

Aus der Klinik für Neonatologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Die neuroprotektive Wirkung des speziellen Caspase-2- Inhibitors TRP601 am Modell der neonatalen Ratte nach Hyperoxie-Exposition

zur Erlangung des akademischen Grades doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Constanze Börner
aus Berlin

Datum der Promotion: 22. Juni 2014

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Ein zu früher Start ins Leben	1
1.2	Die Phase des rapiden Hirnwachstums	2
1.3	Sauerstoff – Freund oder Feind?	4
1.4	Zelltod im unreifen Gehirn	6
1.4.1	Apoptosemechanismen	8
1.4.1.1	Der extrinsische – rezeptorvermittelte – Signalweg	9
1.4.1.2	Der intrinsische – mitochondriale – Signalweg	11
1.5	Caspasen – Schlüsselenzyme der Apoptose	12
1.5.1	Struktur der Caspasen	14
1.5.2	Initiatorcaspasen – Aktivierung durch Dimerisierung	15
1.5.3	Effektorcaspasen – durch Spaltung zur Aktivierung	16
1.5.4	Caspase-Inhibitoren	16
2	Zentrale Fragestellung	18
3	Methodik	19
3.1	Materialien	19
3.1.1	Chemikalien	19
3.1.2	Puffer und Lösungen	20
3.1.3	Kit	22
3.1.4	Molekulargewichtsmarker	22
3.1.5	Antikörper	22
3.1.6	Geräte, Hilfsmittel und Verbrauchsmaterial	23
3.1.7	Software und Datenbanken	24
3.2	Methoden	25
3.2.1	Schematischer Überblick der Versuche	25
3.2.2	Tierschutzrichtlinien	26
3.2.3	Tierversuchsmodell	26
3.2.4	Perfusion und Präparation	27
3.2.5	Histologie	28

4.3.6	Einfluss von TRP601 auf die Expression des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2	55
4.3.7	Auswirkungen von Hyperoxie und TRP601 auf die Expression von AIF	57
5	Diskussion	59
5.1	Allgemeine Betrachtung	59
5.2	Die Hyperoxie-induzierte Caspase-Aktivierung wird durch TRP601 reduziert	60
5.3	TRP601 führt zu einer Reduktion des neuronalen Zelltods im sich entwickelnden Gehirn	61
5.4	TRP601 hemmt den intrinsischen Signalweg der Apoptose	62
5.5	Hyperoxie führt zur Freisetzung von AIF in das Zytosol	64
5.6	Ausblick	65
6	Verzeichnis wiederkehrender Abkürzungen	67
7	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	70
7.1	Abbildungsverzeichnis	70
7.2	Tabellenverzeichnis	71
8	Literaturverzeichnis	72
9	Eidesstattliche Versicherung	83
10	Anteilerklärung an erfolgten Publikationen	84
11	Lebenslauf	86
12	Publikationsliste	90
13	Danksagung	91

Abstrakt

Einleitung

Eine erhöhte Konzentration von Sauerstoff trägt entscheidend zur Pathogenese der neonatalen Hirnschädigung bei, was im späteren Leben zu einer neurokognitiven Beeinträchtigung der Frühgeborenen führen kann.^{17,120} Daher ist es von großer klinischer Bedeutung, die Pathomechanismen der Neurotoxizität des Sauerstoffs in der vulnerablen Phase des Gehirnwachstums von Frühgeborenen zu verstehen. Dies bietet dann eine mögliche Grundlage für eine medikamentöse Prävention und Therapie.

Methodik

Sechs Tage alte Han Wistar Ratten wurden randomisiert in vier Gruppen eingeteilt und wie folgt behandelt: (1) Normoxie (21% O₂) und Natriumchlorid i.p., (2) Normoxie und 1mg TRP601/kg/KG i.p., (3) Hyperoxie (80% O₂) und Natriumchlorid i.p., (4) Hyperoxie und 1 mg TRP601/kg/KG i.p. Wir verwendeten einen kürzlich entwickelten Pentapeptid-basierten-Gruppe-II-Caspase-Inhibitor (5-(2,6-difluoro-phenoxy)-3(R,S)-(2(S)-(2(S)-(3-methoxy-carbonyl-2(S)-(3-methyl-2(S)-((quinoline-2-carbonyl)-amino) butyrylamino)propionylamino) 3-methylbutyrylamino)propionylamino)-4-oxo-pentanoic-acid-methylester; TRP601).

12 bzw. 24 Stunden nach Beginn der Behandlung wurden die Ratten getötet. Sie wurden mit PBS transkardial perfundiert und anschließend dekapitiert. Die Gehirne wurden entnommen und für Fluoro-Jade B-Färbungen, Western-Blot-Analysen und Messungen der enzymatischen Aktivitäten der Caspase-2 und -3 vorbereitet. Zur statistischen Auswertung wurde eine Varianzanalyse (*one-way ANOVA*) mit nachfolgendem Student's t-Test durchgeführt. Die Standardabweichung und Standardfehler wurden berechnet und die Werte auf Signifikanz untersucht, um signifikante Unterschiede zwischen den Vergleichsgruppen aufzeigen zu können, wobei ein Wert von $p < 0.05$ als signifikant galt.

Ergebnisse

Diese Arbeit zeigt, dass Hyperoxie zu einer deutlichen Zunahme der Caspase-2-Expression führt, was wiederum zur Einleitung der intrinsischen Apoptose mit Hochregulation der wichtigsten Proteine – nämlich Cytochrom c, Apaf-1 und AIF – führt, während Bid und das anti-apoptische Bcl-2 herunterreguliert werden. Diese Ergebnisse fallen mit einer Erhöhung der Caspase-3-Aktivität und somit ausgeprägter Neurodegeneration zusammen. Jedoch bewirkt die einmalige Applikation von TRP601 die Umkehrung der Hyperoxie-induzierten Veränderungen in diesem Modell.

Diskussion

Diese Arbeit zeigt, die Beteiligung der Caspase-2 an der intrinsischen Apoptose bei Hyperoxie-induzierter Schädigung des unreifen zentralen Nervensystems. Wir berichten zum ersten Mal, dass TRP601 einen neuroprotektiven Effekt bei Hyperoxie-induzierter Apoptose hat und sowohl den intrinsischen Caspase-abhängigen als auch den Caspase-unabhängigen Weg beeinflusst. Unsere Ergebnisse stehen im Einklang mit einer kürzlich veröffentlichten Studie, die über eine Schutzwirkung von TRP601 in anderen Tiermodellen der perinatalen Hirnschädigung an Jungratten berichtet¹²⁸ und schlagen verschiedene mögliche molekulare Mechanismen vor, wie diese neuroprotektive Wirkung von TRP601 möglich ist. TRP601 scheint ein vielversprechender Kandidat zur Neuroprotektion in der Neonatologie sein.

Abstract

Introduction

Oxygen contributes to the pathogenesis of neonatal brain damage, leading to neurocognitive impairment of prematurely born infants in later life.^{17,120} We have identified a critical role for receptor-mediated neuronal apoptosis in the immature rodent brain. The contribution of the intrinsic apoptotic pathway accompanied by activation of caspase-2 under hyperoxia in the neonatal brain still remains elusive. Inhibition of caspases appears a promising strategy for neuroprotection in neonatal brain injury.

Materials and Methods

6-day-old Han Wistar rats were randomly assigned to four groups and treated as follows: (1) normoxia (21% O₂) and vehicle i.p., (2) normoxia and 1mg TRP601/kg/KG i.p., (3) hyperoxia (80% O₂) and vehicle i.p. (4) hyperoxia and 1 mg TRP601/kg/KG i.p. We applied a recently developed pentapeptide-based group II caspase-inhibitor (5-(2,6-difluoro-phenoxy) -3(R,S)-(2(S)-(2(S)-(3-methoxy-carbonyl-2(S)-(3-methyl-2(S)-((quinoline-2-carbonyl)-amino) butyrylamino)pro-pionylamino)3methylbutyrylamino)propionyl-amino)-4-oxo-pentanoic-acid-methylester; TRP601).

12h or 24h after treatment, postnatal day-6 pups were killed. They were transcardially perfused with PBS and decapitated. Brains were removed and prepared for Fluoro-Jade B staining, Western blot analysis and detection of caspase-2 and -3 enzymatic activities. Data were analyzed by R Project for Statistical Computing and presented as mean±standard error. Group effects were assessed by ANOVA, followed by independent sample t-test multiple comparison. Adjusted P-values of <0.05 were considered statistically significant.

Results

We report that elevated oxygen (hyperoxia) levels trigger a marked increase in active caspase-2 expression, resulting in an initiation of the intrinsic apoptotic pathway with upregulation of key proteins, namely, cytochrome c, Apaf-1 and AIF, whereas Bid and the anti-apoptotic Bcl-2 are downregulated. These results coincide with an upregulation of caspase-3 activity and marked neurodegeneration. However, single treatment with TRP601 at the beginning of hyperoxia reversed the detrimental effects in this model.

Discussion

The present study reveals the involvement of caspase-2 in combination with the intrinsic apoptotic cascade in hyperoxia-induced injury to the immature central nervous system. We report for the first time that TRP601 provides strong evidence for neuroprotective action against hyperoxia-induced apoptosis influencing intrinsic caspase-dependent and also caspase-independent pathways. Our results are in line with a recently published report of a protective effect of TRP601 in other rodent models of perinatal rodent brain injury,¹²⁸ and suggest different potential molecular mechanisms that may entertain this tissue-protective effect of TRP601. TRP601 seems to be a auspicious prospect for neuroprotection in neonatology.

1 Einleitung

1.1 Ein zu früher Start ins Leben

Im Jahre 1948 designierte die Weltgesundheitsversammlung (*World Health Assembly*, WHA) Kinder mit einem Geburtsgewicht (GG) von 2.500 g oder weniger als unreif („immature“), darüber hinaus wurde ein Lebendgeborenes mit einer Gestationszeit von unter 37 Schwangerschaftswochen als vorzeitig („premature“) geboren bezeichnet. Aufgrund der synonymen Verwendung der Begrifflichkeiten von immature und premature wurde 1961 empfohlen, dass Kinder mit einem GG \leq 2.500 g nicht mehr als unreif, sondern als „low birth weight“-Neugeborene klassifiziert werden.¹

In den letzten drei Dekaden wurde viel auf dem Gebiet der Neonatologie geforscht, was zu deutlich besseren Überlebensraten sehr kleiner Frühgeborener führte. Einer der größten Meilensteine war die Einführung der Surfactantsubstitution in den frühen Neunzigerjahren.² Weitere Therapieoptionen wie Tokolyse, pränatale Kortikosteroidbehandlungen der Mutter und die rechtzeitige Versorgung von Frühgeborenen in Perinatalzentren lassen die Überlebensrate der extrem frühen Neugeborenen ansteigen.³ Vor allem die Kinder mit einem GG von \leq 1.500 g (VLBW, *very low birth weight infants*) profitierten davon.⁴ Weitere Kategorien, wie die ELBW-Kinder (*extremely low birth weight*) mit einem GG zwischen 501 g und 1.000 g mussten eingeführt werden. Aufgrund des enormen medizinischen Fortschritts können heute sogar Kinder mit einem GG unter 500 g oder einer Gestationszeit von weniger als 23 Schwangerschaftswochen überleben.⁵ Unglücklicherweise geht die sinkende Mortalität mit einem Anstieg der Morbidität einher.⁶⁻⁷

Wenn auch viele Innovationen auf dem Gebiet der Beatmung verbucht werden konnten, bleibt die bronchopulmonale Dysplasie (BPD) eine schwere Folgeerkrankung der mechanischen Beatmung Frühgeborener.⁸

Die Inzidenz der ROP (*retinopathy of prematurity*), die sogenannte Frühgeborenen Retinopathie, erhöht sich ebenfalls mit steigender Überlebensrate der Neonaten und ist trotz erfolgreicher Lasertherapie noch eine der Hauptursachen für die Erblindung in der Kindheit.⁹ Die perforierende nekrotisierende Enterokolitis (NEC) ist heute zu einem häufigen gastroenterologischen Notfall in der Frühgeborenenmedizin geworden.¹⁰

Die Behinderungsrate bei extremen Frühgeborenen (< 27. SSW) ist hoch, wobei 44 % milde Funktionsstörungen erkennen lassen, 13 % der Frühgeborenen schwerwiegende Beeinträchtigungen zeigen und lediglich 36 % keine neurosensorischen Dysfunktionen aufweisen. Auch wird über Verhaltensauffälligkeiten wie Hyperaktivität und Aufmerksamkeitsdefizite, aber auch mentale Retardierung, Sprach- und Lernstörungen vermehrt in Frühgeborenenpopulationen berichtet.^{11,12}

Untersuchungen an einer Population unreif geborener Kinder im Alter von 2 Jahren zeigen, dass bis zu 14,6 % unter einer milden und bis zu 7 % unter einer moderaten bis schweren Beeinträchtigung der neurologischen Entwicklung leiden.¹³

1.2 Die Phase des rapiden Hirnwachstums

Frühgeburtlichkeit zählt zu den Hauptgesundheitsproblemen dieses Jahrzehnts.¹⁴ Frühgeborene haben ein erhöhtes Risiko eine prominente Schädigung der weißen Substanz durch Hypoxie, ischämische Ereignisse, Infektionen und/oder inflammatorische Prozesse zu erleiden und weisen somit eine schlechtere Basis für die neuronale Entwicklung auf.¹⁵ Auch pharmakologische Wirkstoffe wie Anästhetika und Antikonvulsiva können zu einer erhöhten Neurodegeneration im sich entwickelnden Gehirn führen.¹⁶

Bildgebende Studien (Kernspintomographie) an ehemaligen Frühgeborenen zeigen, dass motorische Defizite im Zusammenhang mit Schädigungen der weißen Substanz stehen, wohingegen die kognitiven Defizite eher im Zusammenhang mit einem verminderten Volumen an grauer Substanz stehen.¹⁷

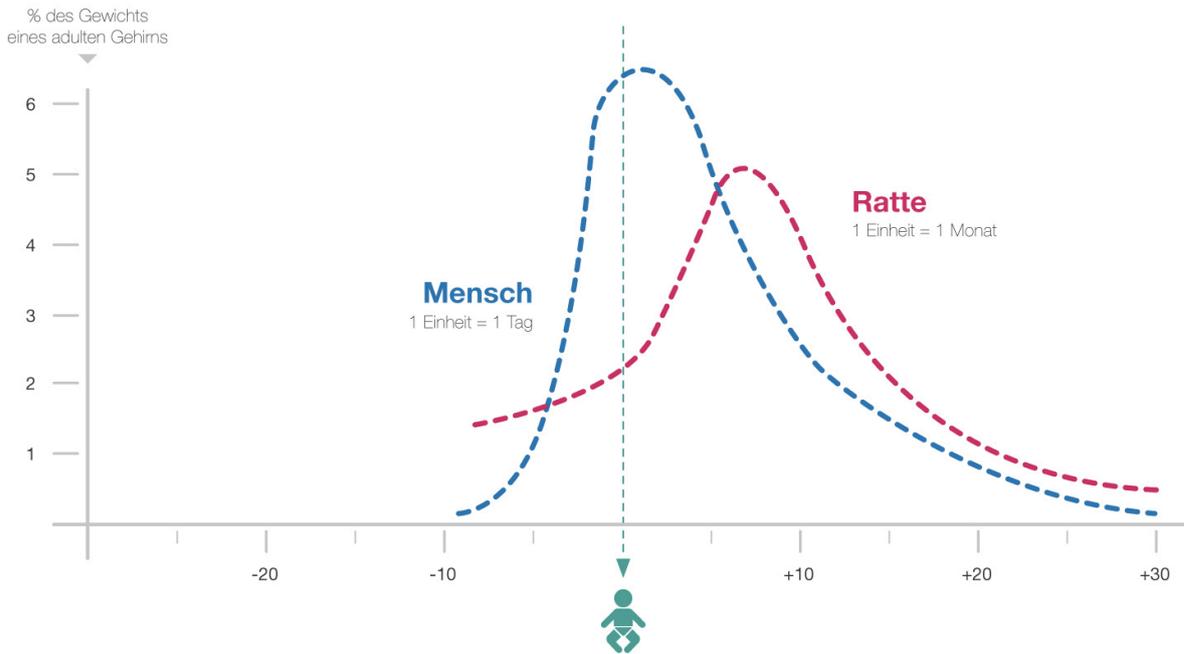


Abbildung 1.1: Darstellung der „*brain growth spurt*“-Phase von Mensch und Ratte. Modifiziert nach Dobbing und Sands (1979).

Von Beginn des sechsten Schwangerschaftsmonats bis zum Beginn des dritten Lebensjahres befindet sich das menschliche Gehirn in einer Phase des rapiden Hirnwachstums, der „*brain growth spurt*“-Periode. Bereits im Jahr 1974 beschrieben Dobbing et al., dass das Gehirn verschiedener Säugetiere eine Phase des rapiden Wachstums durchläuft. Diese Phase ist gekennzeichnet durch Migration und verstärkte Differenzierung von Nervenzellen, Synaptogenese und der physiologischen Apoptose. In dieser Phase ist das Gehirn besonders vulnerabel gegenüber unphysiologischen, exogenen Einflüssen und Therapien, da auch die Schutzmechanismen noch unterentwickelt sind. Eine ontogenetisch vergleichbare Phase der Ratte findet sich in den ersten drei Lebenswochen dieser wieder, wobei die maximale Hirnwachstumsgeschwindigkeit der Ratte zwischen dem sechsten und zehnten Lebenstag zu beobachten ist.¹⁸ In dieser Phase entspricht der neurologische Entwicklungsstand einem Fötus der 32.-34. Schwangerschaftswoche und aus diesem Grund sind experimentelle Untersuchungen an neonatalen Ratten sehr geeignet, um Mechanismen der Neurodegeneration in der Perinatalzeit zu untersuchen. Die germinale Matrix ist in diesem Alter entwickelt, die weiße Substanz noch nicht myelinisiert und die Anlage der cerebralen kortikalen Neuronen vervollständigt.¹⁹

1.3 Sauerstoff – Freund oder Feind?

Nach der Geburt haben Frühgeborene vor allem mit der Folge der Unreife der Organsysteme zu kämpfen. Bereits die Umstellung, die der kindliche Organismus während der Geburt erfährt, nämlich die Umstellung des Sauerstoffpartialdrucks von intrauterin (ca. 25 mmHg) auf extrauterin (ca. 70 mmHg), setzt die unreifen Organe der Kinder frühzeitig einer Hyperoxie aus. Trotz technischer Innovationen auf dem Gebiet der maschinellen Beatmung und der Surfactanttherapie ist es oft notwendig, Frühgeborene mit hohen Sauerstoffkonzentrationen zu beatmen, um eine adäquate Sauerstoffkonzentration beim Kind zu erhalten; der Effekt der Hyperoxie beim Kind kann sich hierdurch potenzieren.²⁰

Bereits bekannte Folgen der Hyperoxie beim Kind sind die Frühgeborenenretinopathie und die bronchopulmonale Dysplasie. Diese korrelieren mit dem GG, der Gestationszeit, postnataler Hypoxie, Anämie und maternaler Graviddität.⁸

Schon in den Neunzigerjahren konnte durch Studien gezeigt werden, dass das antioxidative Schutzsystem der Frühgeborenen noch nicht ausreichend ausgeprägt ist. So sind Frühgeborene, im Gegensatz zu Reifgeborenen, schlechter in der Lage, Enzyme des antioxidativen Systems wie Superoxiddismutase, Katalase, Glutathionperoxidase und Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase bei erhöhter Sauerstoffexposition hoch zu regulieren.²¹ Oxidativer Stress wird auf die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS, *reactive oxygen species*) während der Zellatmung, der Signaltransduktion und des Metabolismus bei einem gleichzeitig überlasteten intrazellulären oder unterentwickelten antioxidativen Abwehrsystem zurückgeführt.²²⁻²⁴ ROS sind aufgrund ihres ungepaarten Elektrons bestrebt, exergone Reaktionen mit anderen Molekülen einzugehen, um somit einen energetisch günstigeren Zustand zu erreichen. Sie können in Kettenreaktionen die Schädigung vieler Moleküle verursachen und auf diese Weise zu unterschiedlichen zellulären Verletzungen führen.²¹ Durch eine Lipidoxidation können Membranen in ihrer Integrität geschädigt werden, im Fall der mitochondrialen Membran hat dies eine Freisetzung von Cytochrom c und die Aktivierung von Caspasen zur Folge. Freie Radikale induzieren DNA-Schäden, die zu DNA-Einzel- und -Doppelstrangbrüchen führen können. Diese bedeuten für das Genom eine gewisse Instabilität und stehen im Zusammenhang mit der Entstehung von Malignomen.²⁵ Proteine werden durch die Oxidation in ihrer Funktion moduliert oder

sogar inaktiviert. Dies kann wichtige Signalkaskaden beeinflussen, welche für Zellproliferation und Differenzierung ausschlaggebend sind. Die Zellen reagieren auf Schäden, die durch freie Radikale verursacht wurden, ähnlich wie bei einem DNA-Schaden mit einer Unterbrechung des Zellzyklus, um Reparaturmechanismen oder den programmierten Zelltod einzuleiten.^{26,27}

Ein erhöhter intrazellulärer ROS-Spiegel und der damit verbundene oxidative Stress stehen sowohl im Zusammenhang mit Alterungsprozessen (Seneszenz, Verlust des replikativen Potentials) als auch mit der Tumorgenese. Da besonders Neurone empfindlich auf eine Überproduktion von ROS reagieren, kommt es zu einer verstärkten Schädigung und Ausbildung vieler neurodegenerativer Krankheiten, wie z. B. Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson, der Amyotrophen Lateralsklerose und Chorea Huntington.²⁸ Die intrazelluläre ROS-Produktion in den Zellen des zentralen Nervensystems steigt während der Hyperoxie an und führt *in vivo*²⁹ und *in vitro*^{30,31} zu vermehrter Apoptose im Gehirn neonataler Ratten. Hypoxie, Ischämie, Entzündungen, Drogen und Medikamente zählen bisher zu den Auslösern, die mit einer Neurodegeneration bei Frühgeborenen in Verbindung gebracht werden. Der zugrunde liegende Auslöser der diffusen Schädigung der Gehirnzellen bleibt weitgehend unklar, wobei intrazerebrale Blutungen und Hypoxie die hohe Inzidenz der zerebralen Schädigung und der bleibenden neurologischen Defizite von Frühgeborenen nicht ausreichend erklären können.³²

Unsere Arbeitsgruppe konnte erstmals 2004 zeigen, dass Hyperoxie im sich entwickelnden Gehirn juveniler Ratten vermehrt zum programmierten Zelltod führt.¹⁷ Die Hyperoxie stellt neben einer langen Beatmungszeit einen Hauptrisikofaktor für die Entstehung einer Zerebralparese dar.³² Ein Tiermodell aus dem Jahr 2006 veranschaulichte, dass die Hyperoxie-Exposition zu akuten und langfristigen Veränderungen im Hirn-Proteom von Mäusen führt. Daraus resultieren oxidativer Stress und neuronaler apoptotischer Zelltod. Ferner konnten Veränderungen in Proteinen nachgewiesen werden, welche beteiligt sind an der Zellproliferation und der Ausbildung von neuronalen Verbindungen.³³

Sirinyan et al. konnten nachweisen, dass ein Zuviel an Sauerstoff als Folge von nitrosativem Stress zu einer zerebralen mikrovaskulären Degeneration, verminderter Hirnmasse und Defiziten im Gehirn von juvenilen Ratten führen kann.³⁴ Eine aktuelle

Studie aus dem Jahr 2013 konnte zeigen, dass die Hyperoxie-Exposition in Mäusen die Entwicklung der weißen Substanz stört und zwar durch verzögerte Reifung der Oligodendrozyten-Linie. Die daraus resultierenden Veränderungen zeigen Abnormalitäten in der Myelinisierung und eine Axonopathie.³⁵ Hyperoxie-Exposition des unreifen Gehirns führt außerdem zu Hyperaktivität, Defiziten in der motorischen Koordination und zu Veränderungen der Leitfähigkeit in der weißen Substanz bei adulten und jugendlichen Mäusen.³⁶

Die neuen Erkenntnisse bezüglich der Sauerstofftoxizität bei Frühgeborenen in der vulnerablen Phase der Gehirnentwicklung führen dazu, dass die Ventilation mit hohen Sauerstoffkonzentrationen zurückhaltender eingesetzt wird.¹⁷ Eine zukünftige Hauptaufgabe der Wissenschaft liegt in der Entwicklung neuroprotektiver Substanzen, da man die frühzeitige Exposition gegenüber dem Sauerstoff nicht immer vermeiden kann. Das Erythropoietin hat aufgrund seiner neuroprotektiven Wirkung bereits Einzug in viele neonatologische Abteilungen erhalten und führt zur Verbesserung des neurologischen Outcomes extrem leichter Frühgeborener.^{37,38} Dem Topiramate, einem Medikament, welches bei Migräne und Epilepsie eingesetzt wird, wird ebenfalls das Potential der Neuroprotektion bei Hyperoxie-induzierten Hirnschädigungen zugeschrieben.³⁹

1.4 Zelltod im unreifen Gehirn

Die Homöostase in einem mehrzelligen Organismus kann durch eine Balance zwischen Zellproliferation und Zelltod aufrechterhalten werden.⁴⁰ Verschiedene Typen des Zelltods wurden beschrieben: Apoptose und Nekrose.⁴¹ Zudem nimmt die Autophagie eine besondere Stellung im Prozess des Zelltods während der embryonalen Entwicklung ein. Es ist eine spezielle Form des programmierten Zelltods.⁴²

Bei der Nekrose handelt es sich um einen pathologischen Prozess, der durch eine irreversible exogene Schädigung, chemischer oder physikalischer Pathogenese, verursacht wird. Nach der Induktion kommt es zu einer Beeinträchtigung der Homöostase und zu einer Störung des Ionenhaushalts der Zelle. Das daraus resultierende Anschwellen der Zellorganellen bzw. der ganzen Zelle führt, zusammen

mit der Aktivierung degradierender Enzyme, zu Fehlfunktionen und Kernveränderungen, die auf unspezifischem DNA-Abbau beruhen, sowie zum Zerfall der Zytoplasmamembran mit anschließender Zellyse. Durch das Freisetzen der Zellinhaltsstoffe wird eine lokale inflammatorische Reaktion ausgelöst.^{43,44}

Die Apoptose wurde erstmals im Jahre 1972 definiert und beschreibt den programmierten Tod einer Zelle. Sie ist ein zellautonomes „Selbstmordprogramm“, das aktiviert wird, um geschädigte oder überzählige Zellen schnell und effizient zu entfernen.⁴⁵ Im Gegensatz zur Nekrose benötigt die Apoptose ATP, ist also energieabhängig. Abnormalitäten in der Kontrolle der Apoptose können in Bereichen der Tumorgenese, der Homöostase des Immunsystems, der Embryonalentwicklung und der Erythropoese zu einer Mannigfaltigkeit an Krankheiten führen.⁴⁶ Vielzellige Lebewesen sind also darauf angewiesen, überschüssige, vor allem aber pathogene Zellen beseitigen zu können. Dies wird eindrucksvoll durch die Rechnung illustriert, dass ein 80jähriger Mensch ohne die Balance zwischen Zellproliferation und der physiologischen Apoptose zwei Tonnen Knochenmark und Lymphgewebe sowie einen Darm mit einer Länge von 16 km hätte.⁴⁷

Dieser Form des Zelltods liegt eine programmierte Abfolge von morphologisch definierten Teilschritten zugrunde. Die Zelle schrumpft und es kommt zur Bildung blasiger Protrusionen des Zytoplasmas. Es folgen Karyopyknose, Karyorrhesis und die Entstehung von sogenannten Apoptosekörperchen. Infolge der Änderungen der Oberflächeneigenschaften an der Zelloberfläche während der Apoptose werden die Apoptosekörperchen phagozytiert und abgebaut. Eine akute Entzündungsreaktion wird, anders als bei der Nekrose, nicht hervorgerufen.⁴⁸

Während der embryonalen Hirnentwicklung wird der Apoptose eine bedeutende Funktion zugesprochen. Sie dient als Regulationsmechanismus für überschüssig angelegte und funktionslose Neurone. Die Zellen, die falsche Verbindungen geknüpft haben, überflüssig angelegt wurden oder einer früheren Entwicklungsstufe angehören, werden durch den programmierten Zelltod eliminiert.⁴⁹ Auch werden während der Embryogenese die entstandenen Neurone und Gliazellen halbiert.⁵⁰ Studien zeigen, dass es sich bei der schädigungsbedingten Apoptose im unreifen Gehirn, um eine verstärkte Aktivierung von physiologischen Apoptosemechanismen handeln könnte.^{51,52}

Die genaue Kenntnis des Ablaufs und der Regulation der Apoptose ist von großer Bedeutung für das Verstehen vieler Krankheitsbilder, bei denen die Regulation der Apoptose fehlerhaft ist. Pathologische Veränderungen in der Zelle können zu einer Verminderung oder Erhöhung der Apoptoserate führen.

Typische Krankheiten, die mit einer erhöhten Rate der Apoptose einhergehen, sind neurodegenerative Erkrankungen wie Morbus Alzheimer und Morbus Parkinson sowie Autoimmunerkrankungen, beispielsweise der systemische Lupus erythematoses und die Immunschwäche HIV. Bei der Entstehung von malignen Tumorerkrankungen kann das Zellwachstum ungebremst fortlaufen, die Apoptose ist hier verringert.^{53,54}

Bei der Autophagie handelt es sich um eine komplexe Zellfunktion, bei der die Zelle mit Hilfe lysosomaler Degeneration von überflüssigen oder sogar schädlichen Proteinen und Zellorganellen „gereinigt“ wird. Der Zweck der Autophagie ist es auch hier eine gesunde Homöostase zu erhalten, indem unerwünschte Zellbestandteile beseitigt werden.⁵⁵

Verschiedene Mechanismen wurden entdeckt, die die Autophagie induzieren. Hierbei spielen toxische Sauerstoffkonzentrationen und reaktive Sauerstoffspezies eine essentielle Rolle. Es konnte gezeigt werden, dass die Autophagie trotz intrazellulärer Stresssignale neuroprotektiv wirken und eine Neurodegeneration im adulten Gehirn verringern kann.⁵⁶⁻⁵⁸ In der Frühphase des programmierten Zelltods scheint die Autophagie neuroprotektiv zu wirken, wohingegen sie, unter besonderen Umständen, die Apoptose auch fördern kann.⁵⁹

1.4.1 Apoptosemechanismen

Bei den Apoptosemechanismen wird zwischen zwei Hauptsignalwegen unterschieden, der extrinsischen (rezeptorvermittelten) und der intrinsischen (mitochondrialen) Signalverarbeitung. Beide enden schließlich in der sogenannten Exekutionsphase, in der sich der Zelltod durch die oben beschriebenen Apoptosemerkmale manifestiert.⁶⁰

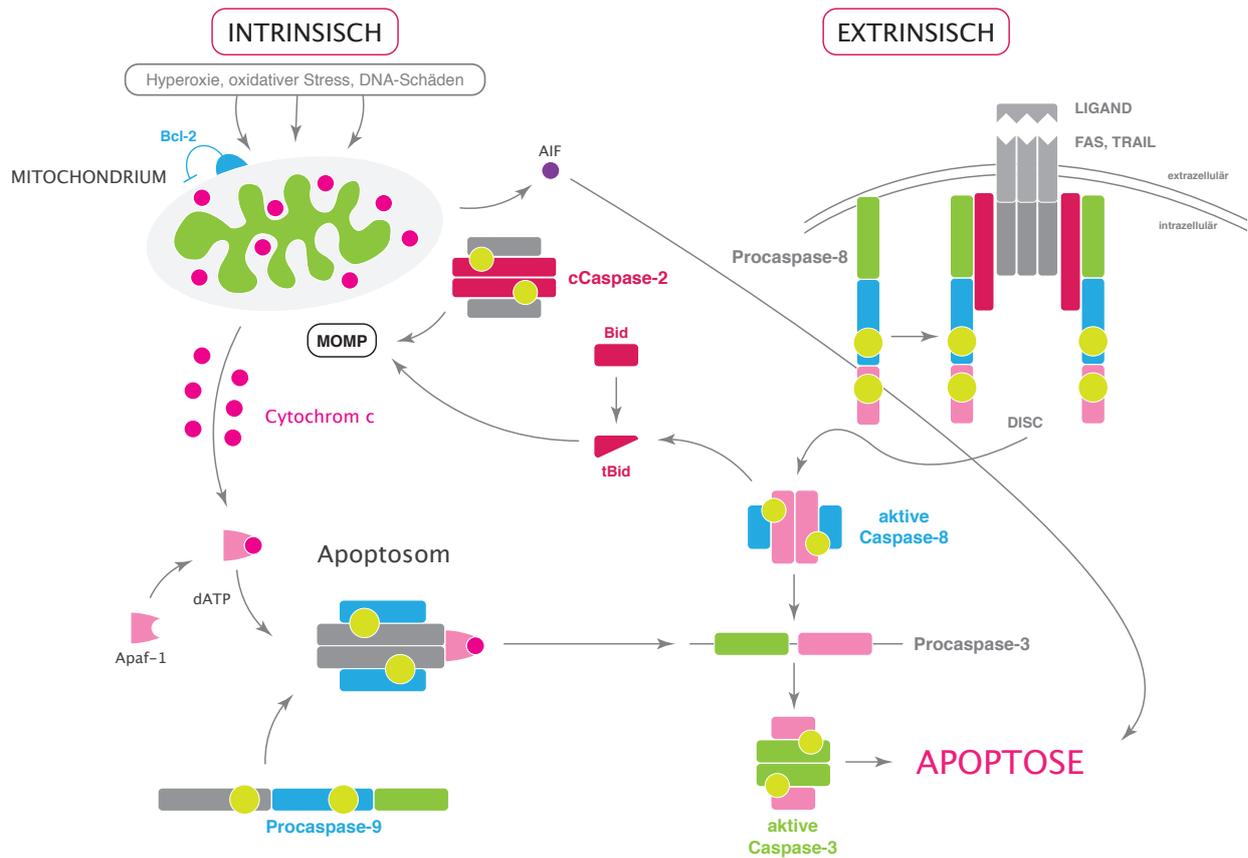


Abbildung 1.2: Übersicht über die intrinsische (linke Seite) und extrinsische (rechte Seite) Signalkaskade und die gemeinsame Endstrecke der Apoptose. „Fas“ steht stellvertretend für die rezeptorvermittelte Apoptose (modifiziert nach Hengartner et al. 2000).

Im Folgenden wird auf die beiden oben genannten Signalwege eingegangen, allerdings kann – aufgrund der enormen Fülle und weitreichenden Vernetzung dieser Signalwege sowie dem begrenzten Rahmen meiner Arbeit – nur ein Überblick über die Thematik gegeben werden.

1.4.1.1 Der extrinsische – rezeptorvermittelte – Signalweg

Die extrinsische Apoptose wird durch externe Signale über eine Rezeptor-Ligandeninteraktion induziert. Hierbei handelt es sich um sogenannte „Todesrezeptoren“. Diese Todesrezeptoren gehören zur TNF(*Tumor Necrosis Factor*)-

Rezeptor-Superfamilie, die insgesamt 29 Rezeptoren und 19 Liganden umfasst.⁶¹ Sämtliche Mitglieder dieser Familie besitzen mehrere extrazelluläre Cystein-reiche Domänen, welche als Bindungsstelle für die korrespondierenden Liganden dienen. Zu den bisher am besten charakterisierten Todesrezeptoren gehört, neben den Apoptose-induzierenden TRAIL(*TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand*)-Rezeptoren, der Fas(Apo-1 /CD95)-Rezeptor mit dem Fas-Liganden (FasL).⁶² Hierbei handelt es sich um ein Typ 1-Transmembranprotein, welches für seine pro-apoptische Wirkung bekannt ist. Der Fas-Rezeptor besitzt die drei typischen extrazellulären Cystein-reichen Domänen (*cysteine-rich domains*, CRD), welche die Bindung zwischen Ligand und dem Rezeptor vermitteln.⁶³⁻⁶⁵ Grundsätzlich wird zur Signaltransduktion eine Homotrimerisierung von drei Rezeptoren benötigt, die durch eine Ligandenbindung herbeigeführt wird.⁶⁶

Am intrazellulären Teil und dem C-terminalen Ende des Rezeptors ist eine sogenannte Todesdomäne (*death domain*, DD) lokalisiert. Dieser intrazelluläre Teil des Fas-Rezeptors weist selbst keine enzymatische Funktion auf, so dass das Signal durch rezeptorassoziierte Moleküle übertragen werden muss. Der durch α -Helices gebildete Teil des Fas-Rezeptors stellt die Bindungsstelle für Interaktionen mit anderen intrazellulären DD-besitzenden Proteinen dar. So kommt es zu einer Interaktion zwischen zwei nahezu homologen Todesdomänen, welche die eigentliche Verbindung zwischen dem Fas-Rezeptor und den intrazellulären Signalkaskaden herstellt. Dieser Komplex zwischen dem aktivierten Fas-Rezeptor und dessen assoziierten Signalmolekülen wird der „den Tod induzierende Komplex“ (*death-inducing signaling complex*, DISC) genannt. Zunächst wird das Adaptermolekül FADD (*Fas-associating death domain*) in den DISC rekrutiert.^{64,67} Beim FADD handelt es sich um ein intrazelluläres Protein, an dessen C-terminalem Ende sich die benötigte DD mit einer Länge von 80 Aminosäuren befindet.⁶⁸ Zusätzlich besitzt dieses Adapterprotein am N-terminalen Ende eine zweite Todesdomäne, die *death effector domain* (DED), über welche die Initiator-Procaspase-8 zum Rezeptor rekrutiert und dort aktiviert werden kann.⁶² Die Procaspase-8 wird autokatalytisch gespalten und am DISC in das aktive Enzym, Caspase-8, überführt.⁶⁹

Mit Ausbildung des DISC kommt es zur Induktion einer Signalkaskade, welche in die Effektorphase mündet, in der die Effektorcaspasen die eigentlich für den Zelltod ursächliche Schädigung einleiten, indem sie zelluläre Substrate (s. u.) spalten.⁷⁰

1.4.1.2 Der intrinsische – mitochondriale – Signalweg

Als Reaktion auf intrazelluläre Stresssignale, wie Zellschädigung durch freie Radikale im Rahmen von oxidativem Stress, Induktion von Strangbrüchen der DNA bei radioaktiver Strahlung oder der Entzug von Wachstumsfaktoren (NGF, *nerve growth factor*), kommt es zur Einleitung der intrinsischen Apoptose.⁷¹ Hierbei spielen Regulationen am Mitochondrium eine zentrale Rolle. Da eine korrekte Abfolge der Apoptose für den Organismus überlebenswichtig ist, liegen ihr eine Vielzahl von molekularen Regulierungsmechanismen zugrunde.⁷²

Die oben genannten Stimuli führen über bestimmte komplexe Signal- und Regulationskaskaden im Mitochondrium zu einem pro-apoptotischen Signal. Als Folge kommt es zur Unterbrechung der ATP-Produktion, anschließend zur Freisetzung pro-apoptotischer Faktoren aus dem Mitochondrium und zuletzt zu einer Veränderung des zellulären Redoxpotentials.⁷³

Es kommt zur Freisetzung von Cytochrom c, das eigentlich als Elektronen-Transporter zwischen Komplex III und IV der Atmungskette bekannt und notwendig für das Überleben der Zelle ist.⁷⁴ Gelangt Cytochrom c jedoch aus dem Intermembranraum in das Zytoplasma, so bindet es an Apaf-1 (*apoptotic protease activation factor-1*) und führt dort zu einer essentiellen konstitutiven Änderung des großen (140 kD) Proteins.⁷⁵

Angenommen wird, dass die Freisetzung von Cytochrom c durch pro-apoptotische Mitglieder der B-cell lymphoma-2(Bcl-2)-Familie, wie Bcl-2-assoziiertes X-Protein (Bax), ausgelöst wird. Nach einem Todessignal führt die Aktivierung des BH3-Proteins Bid durch spezifische Proteasen, u. a. durch Caspase-8, zur Bildung von „truncated“ Bid (tBid), das nachfolgend die Insertion von Bax in die Außenmembran von Mitochondrien induziert.⁷⁶ Dadurch kommt es zur Ausbildung einer kanalartigen Struktur, welche zur Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran führt. Dieser Vorgang wird als MOMP (mitochondrial outer membrane permeabilization) bezeichnet. Dies ermöglicht nun die Diffusion von Proteinen, wie Cytochrom c durch die permeable äußere Mitochondrienmembran.⁷⁷ Die durch MOMP ausgelöste Signalkaskade der Apoptose wird nicht nur Caspase-abhängig induziert, sondern auch Caspase-unabhängig.^{78,79} Anschließend folgt eine durch ATP oder (d)ATP getriggerte Konformationsänderung, die schließlich über eine Heptamerisation zu einem rosettenartigen Komplex führt. Dieser Komplex wird als Apoptosom bezeichnet und besteht jeweils aus sieben Apaf-1-Molekülen, Cytochrom c und (d)ATP.⁷⁵ Die durch den

extrinsischen Signalweg aktivierte Caspase-8 reguliert die Abgabe des Cytochrom c in das Zytoplasma.⁸⁰

Über die am N-terminalen Ende gelegene CARD (*caspase-activation and recruitment domain*) von Apaf-1 kann das Apoptosom mehrere Procaspase-9-Proteine binden. An diesem hochmolekularen Komplex werden nun die Effektorcaspasen-3 und -7 direkt sowie die Caspase-6 indirekt in festgelegter Reihenfolge durch die Caspase-9 prozessiert sowie aktiviert. Es folgt die gezielte Spaltung ihrer Substrate, welche für den ordnungsgemäßen Ablauf des programmierten Zelltods sorgen.⁸¹

Weitere pro-apoptotische Faktoren werden aus dem Mitochondrium in das Zytoplasma der Zelle freigesetzt: AIF (*apoptosis inducing factor*). Hierbei handelt es sich um ein Flavoprotein, welches an der DNA-Degradation im Zellkern beteiligt ist. Es ist unter „normalen“ Bedingungen für die Aufrechterhaltung des Glutathion-Haushalts im Mitochondrium zuständig.⁸²

AIF wurde als erstes Protein entdeckt, dass Caspase-unabhängig den programmierten Zelltod reguliert.⁸³ Es spielt eine Schlüsselrolle in der Vermittlung der Apoptose bei Ischämien, neurodegenerativen Erkrankungen und bei einigen Krebserkrankungen. Nach einem schädigenden Stimulus transloziert AIF durch die äußere, nun permeable Mitochondrienmembran in das Zytoplasma und in den Nukleus. Ektopisch induziert AIF die Chromatinkondensation und DNA-Fragmentierung. Der genaue Mechanismus der Aktivierung und Funktionsweise ist noch unklar.^{84,85}

1.5 Caspasen – Schlüsselenzyme der Apoptose

Die morphologischen Veränderungen der Zelle, die in ihrer Desintegration und Eliminierung durch Phagozyten münden, repräsentieren nur das finale Stadium des apoptotischen Zelltods. Eine Schlüsselrolle hierbei spielen die proteolytische Prozessierung und Aktivierung von Caspasen. Bei dem Wort Caspase handelt es sich um ein Akronym für Cysteiny Aspartat-spezifische Protease. Diese sind Mitglieder der Familie der Cysteinproteasen mit einer Spaltspezifität hinter Aspartatresten, die dadurch irreversibel zum Tod der Zelle führen.⁸⁶ In der Tat kann die klassische Apoptose als Caspasen-vermittelt beschrieben werden. Es sollte jedoch erwähnt werden, dass Apoptose prinzipiell auch ohne Beteiligung von Caspasen erfolgen kann.⁸³

Obwohl 1992 die heutige Caspase-1, Interleukin-1-converting Enzym (ICE), benannt nach ihrer aktivierenden Spaltung des bedeutenden Entzündungsmediators Interleukin-1 β , im menschlichen Körper identifiziert wurde, ist die entscheidende Beteiligung der Caspasen am apoptotischen Zelltod erstmals im Nematoden *Caenorhabditis elegans* erkannt worden. Dessen Gen *ced-3* (*ced* = *cell death abnormal*), welches eine Cysteinprotease kodiert, ist für die Einleitung der Apoptose beim Fadenwurm verantwortlich. Das von *ced-3* codierte Protein ähnelte dem aus dem Menschen bekannten Protein ICE, demnach lässt sich der programmierte Zelltod bei *C. elegans* auf den Menschen übertragen.⁸⁷⁻⁸⁹

Bis heute wurden speziesübergreifend 15 Mitglieder dieser Protein-Familie entdeckt, von denen elf im Menschen exprimiert werden.⁹⁰ Phylogenetisch lassen sich die nunmehr 15 bekannten Caspasen aufgrund ihrer Sequenzähnlichkeiten untereinander in drei Hauptfamilien einteilen. Zur ersten Gruppe gehören die sogenannten proinflammatorischen Caspasen, welche von Bedeutung für die proteolytische Reifung der Zytokine sind. Der zweiten und dritten Gruppe gehören die Initiator- und Effektorcaspasen an, die im Rahmen der Apoptose eine besondere Stellung einnehmen.^{81,91}

Im Gegensatz zur ausgedehnten Verbreitung der bisher genannten Caspasen, findet man Caspase-14 hauptsächlich im Zusammenhang mit der Keratinozyten-differenzierung und diese nimmt somit eine gesonderte Stellung ein. Von den heute 15 bekannten Caspasen nehmen lediglich sieben eine entscheidende Rolle beim programmierten Zelltod ein.⁹² Alle Caspasen werden in der Zelle als katalytische Proenzyme, inaktive Zymogene, produziert und werden durch proteolytische Aktivierung Bestandteil der apoptotischen Signalkaskade.⁹³

Die Caspase-2 wurde bei ihrer Entdeckung ursprünglich Nedd-2/Ich-1 genannt. Zwei verschiedene Caspase-2-mRNA-Spezies, entstanden durch ein alternatives Splicing, sind beschrieben (Caspase-2L und -2S). Eine vermehrte Expression von Caspase-2L führt zur Induktion des Zelltods, wohingegen eine Überexpression von Caspase-2S dem Zelltod entgegenwirkt. Der genaue Mechanismus, wie die Caspase-2-Aktivierung die Effektorcaspasen induziert, ist nicht vollständig geklärt.⁹⁴

1.5.1 Struktur der Caspasen

Allen Caspasen gemeinsam ist der Aufbau aus einer großen (~p20) und einer kleinen (~p10) Untereinheit. Lediglich die Größe der N-terminal-gelegenen Prodomäne variiert zwischen den einzelnen Mitgliedern.

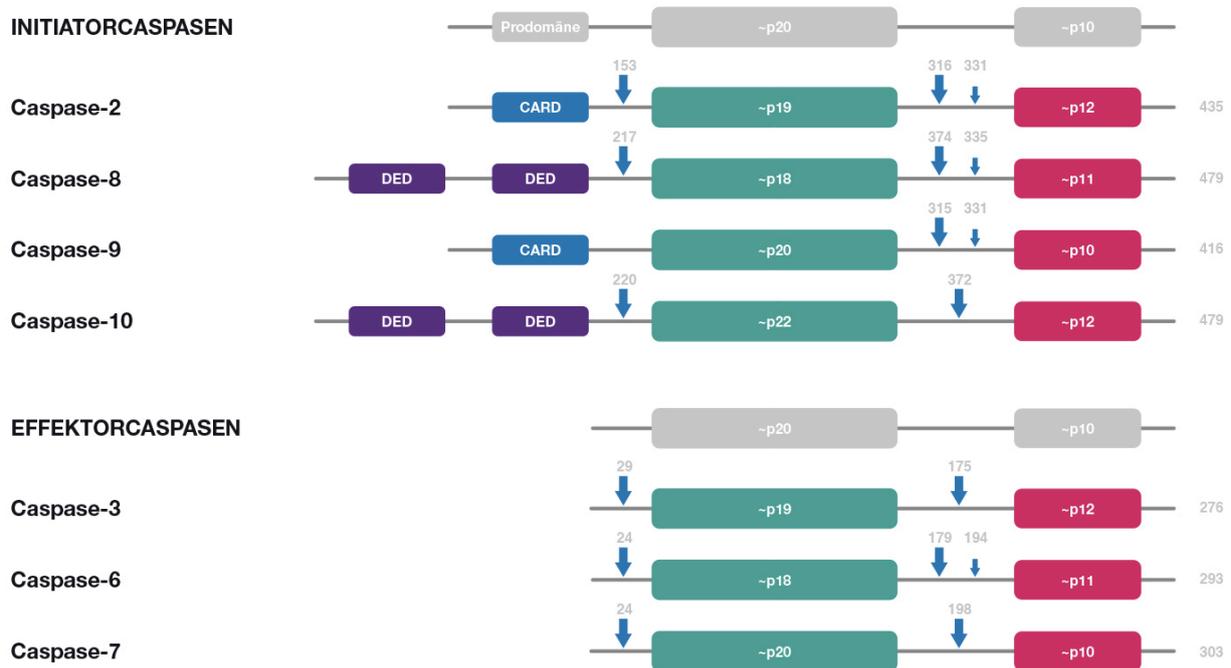


Abbildung 1.3: Darstellung der humanen Initiator- und Effektorcaspasen. Alle Caspasen besitzen eine große (~p20) und eine kleine (~p10) Untereinheit. Die Initiatorcaspasen weisen zusätzlich Oligomerisierungs-Domänen (DED und CARD, siehe Text) in ihrer Prodomäne auf. Mit den Pfeilen sind die Spaltstellen der Caspasen gekennzeichnet. Die Nummern entsprechen der Position des Aspartats im Protein, an dem diese Spaltung stattfindet. Die Zahlen am Ende der jeweiligen Caspase geben an, aus wie vielen Aminosäuren diese bestehen. Das Größenverhältnis ist nur schematisch dargestellt. Adaptiert und zusammengestellt aus Pablo Fuentes-Prior et al. (2004).

Die Aktivierung der Zymogene erfolgt durch die Spaltung zwischen den beiden Untereinheiten und der Entfernung der Prodomäne. Dies führt zur Ausbildung eines aktiven Heterotetramers bestehend aus zwei großen sowie zwei kleinen Untereinheiten. Dabei besitzt jedes Heterotetramer zwei katalytische Zentren, die sich jeweils in der großen Untereinheit befinden.^{95,96}

Alle aktivierenden Spaltstellen der Pro-Caspasen enthalten eine Aspartat-Sequenz („Asp-X“), was hinweisend auf eine autokatalytische Aktivierung untereinander ist.⁹⁷ Ein

Cysteiny-Rest bildet stets das aktive Zentrum der Caspasen, welcher für alle Caspasen spezifisch die Spaltung des Substrats an einem Aspartat-Rest katalysiert. Erkannt wird hierbei eine Tetrapeptidsequenz, bei der sich das gespaltene Aspartat an Position 1 (P1) befindet. Die Caspasen weisen zusätzlich eine unterschiedliche Spezifität für die an P2-P4 folgenden Positionen auf und lassen sich somit nach ihrer optimalen Tetrapeptidsequenz in Gruppen einteilen.^{98,99}

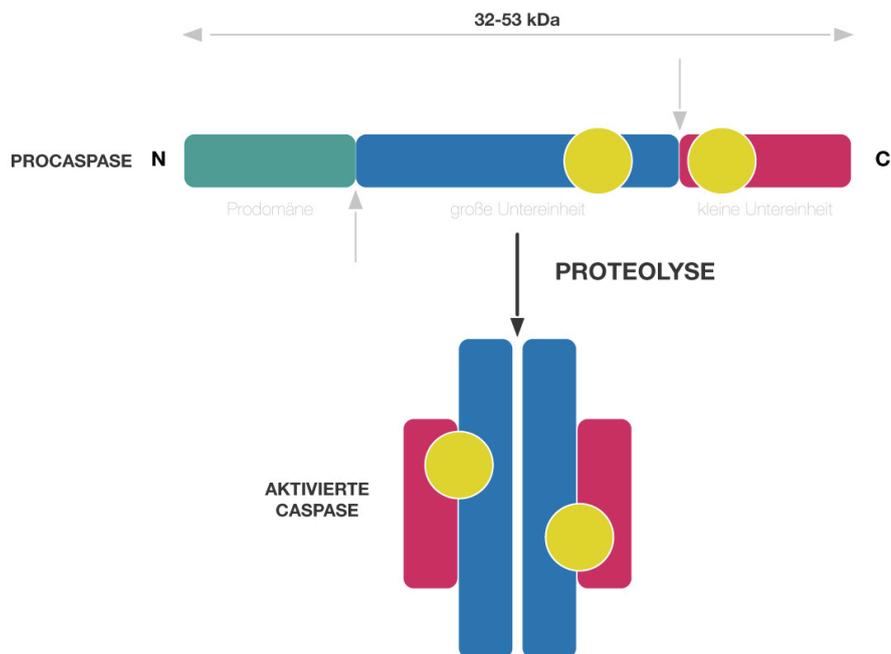


Abbildung 1.4: Aktivierung von Caspasen. Durch Proteolyse (graue Pfeile) entsteht aus dem Zymogen ein Tetramer mit zwei aktiven Zentren (gelbe Kreise), die aktive Caspase.

1.5.2 Initiatorcaspasen – Aktivierung durch Dimerisierung

Ein Merkmal der Initiatorcaspasen ist ihre lange Prodomäne, in der sich eine funktionelle Protein-Protein-Interaktionsdomäne befindet. Diese Prodomäne ist entweder mit einer DED- oder einer CARD-Sequenz gekennzeichnet, die in der Lage sind, mit homologen Domänen zu interagieren. Wie aus Abbildung 1.3 ersichtlich, weisen Procaspase-2 und -9 eine CARD, Procaspase-8 und -10 hingegen zwei DED-Domänen auf. Über diese Domänen können die Initiator-Caspasen in hochmolekulare Aktivierungskomplexe zur Initiierung der Caspasen-Kaskade rekrutiert werden. Diese Komplexe werden als Folge auf die bereits erwähnten Apoptose-induzierenden Stimuli gebildet, die dann entweder extrinsischer oder intrinsischer Natur sein können.^{67,97}

Die Caspase-2 zählte zu den mit am frühesten entdeckten Caspasen der Säugetiere. Jedoch war es lange Zeit nicht ausreichend geklärt, ob es sich um eine Initiatorcaspase oder eine Effektorcaspase handelt. Heutzutage kann der Caspase-2 in Neuronen eine Beteiligung an dem MOMP, hervorgerufen u. a. durch Hitzeschäden und oxidativen Stress, nachgewiesen werden. Dies lässt die Einteilung in die Gruppe der Initiatorcaspasen zu.^{100,101}

Versuche an Caspase-2-Knock-out-Mäusen konnten zeigen, dass das Fehlen von Caspase-2 während der Apoptose zur Induktion von Autophagie führt.¹⁰²

1.5.3 Effektorcaspasen – durch Spaltung zur Aktivierung

Effektorcaspasen besitzen hingegen nur eine kurze Prodomäne, haben keine intrinsische Enzymaktivität und müssen erst durch andere Caspasen proteolytisch aktiviert werden. Zu ihnen gehören die Caspasen-3, -6 und -7.⁹³ Neben weiteren Caspasen spalten aktivierte Effektorcaspasen vor allem bestimmte Schlüsselproteine, die dadurch entweder inaktiviert (z.B. Überlebensproteine) oder aktiviert werden (Todesproteine) und somit zu den oben beschriebenen Charakteristika der Apoptose führen. Der Kernkondensation geht die Spaltung bestimmter nukleärer Strukturproteine voraus,¹⁰³ der Abbau des Zytoskeletts erfolgt ebenfalls Caspasen-abhängig durch die Degradierung der Proteine Fodrin und Gelsolin, die der Stabilität des Zytoskeletts dienen.¹⁰⁴ Bis heute sind weit über 100 verschiedene Substrate der aktivierten Effektorcaspasen bekannt, die gemeinsam zum geordneten Suizid der Zelle führen.¹⁰⁵ Bei der Caspase-3 handelt es sich um einen verlässlichen Biomarker für den apoptotischen Zelltod. Die Aktivierung erfolgt auf direktem Weg, ohne erforderliche Co-Faktoren, aus der Proform heraus über Initiatorcaspasen in die aktivierte Caspase-3.¹⁰⁶

1.5.4 Caspase-Inhibitoren

Bis heute wurden verschiedene reversible und irreversible Inhibitoren für Caspasen beschrieben. Die erste Generation der unspezifischen Pan-Caspase-Inhibitoren wurde in den Neunzigerjahren entwickelt. Einen weiteren Fortschritt brachte die Herstellung zellgängiger Inhibitoren. Seitdem lassen sich *in vitro*- sowie *in vivo*-Experimente

realisieren. Hierdurch konnte die Sonderstellung der Caspasen in der kaskadenartigen Abfolge des programmierten Zelltods deutlich gemacht werden.^{107,108}

Der meistverwendete Vertreter unter den Pan-Caspase-Inhibitoren ist der synthetisch hergestellte zVAD-FMK (Benzyloxycarbonyl-Valin-Alanin-Aspartat-Fluoromethylketon), dieser enthält die für Caspasesubstrate obligate Aminosäure Aspartat am C-terminalen Ende des Peptids. Das z steht hierbei für eine Benzyloxycarbonyl-Gruppe,¹⁰⁹ die Sequenz VAD für die entsprechenden Aminosäuren (V = Valin, A = Alanin, D = Asparaginsäure), die Abkürzung FMK für Fluoromethylketon. Inhibitoren, die halogenierte Ketone wie das Fluoromethylketon als endständige Gruppe enthalten, sind generell irreversibel.^{109,110}

Dieser Pan-Caspase-Inhibitor wurde bereits erfolgreich in verschiedenen Tiermodellen eingesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass dadurch Gewebeschäden aufgrund einer zerebralen Ischämie oder traumatischen Gehirnverletzungen durch zVAD-FMK nachweislich gemindert sowie die jeweilige Gehirnfunktion verbessert werden konnte.¹¹¹⁻¹¹³

Grundsätzlich nutzt man bereits bekannte Sequenzen der eigentlichen Caspasensubstrate und integriert diese in den jeweiligen Inhibitor. Aufgrund der nun sehr ähnlichen Struktur des Inhibitors mit dem eigentlichen Caspasensubstrat kann dieser dieses imitieren und selbst als Substrat fungieren. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Caspase-Inhibitor handelt es sich um den kürzlich entwickelten Pentapeptid-basierten-Gruppe-II-Caspase-Inhibitor **TRP601** (5-(2,6-difluoro-phenoxy)-3(R,S)-(2(S)-(2(S)-(3-methoxy-carbonyl-2(S)-(3-methyl-2(S)-((quinoline-2-carbonyl) amino)butyrylamino)pro-pionylamino)3-methylbutyrylamino)propionylamino)-4-oxo-pentanoic-acid-methylester).¹¹⁴

Neben den synthetisch hergestellten Caspase-Inhibitoren werden zudem die natürlich vorkommenden Protein-Inhibitoren beschrieben. CrmA (*cytokine response modifier A*) ist ein Serpin eines Kuhpocken-Virus. Die virale Infektion wird durch die Hemmung der Wirts-Immunantwort sowie durch die Hemmung der Apoptose gefördert.¹¹⁵ Ein weiteres virales Genprodukt ist ein Protein des Baculovirus, welches ebenfalls die Apoptose durch Hemmung von Caspasen abschwächt.¹¹⁶ Zudem sind die endogenen Mitglieder der Bcl-2-Familie wichtige Inhibitoren des programmierten Zelltods.¹¹⁷

2 Zentrale Fragestellung

Experimentelle Arbeiten zeigen, dass auch Hyperoxie zu einer verstärkten Neurodegeneration am sich entwickelnden Gehirn führt.

Ziel dieser Arbeit war es, die neuroprotektive Wirkung eines speziellen Caspase-Inhibitors nach Hyperoxie-Exposition in Gehirnen neugeborener Ratten zu untersuchen. Die Ergebnisse sollen zum Verständnis der Schädigungsmechanismen von konzentriertem Sauerstoff auf das sich entwickelnde Gehirn beitragen und eine mögliche Therapieoption in der Neonatologie aufzeigen.

Im Speziellen bedeutet dies, dass in dieser Arbeit geprüft werden soll, ob mit Hilfe des Caspase-2-Inhibitors TRP601 der intrinsische Weg der Apoptose dahingehend beeinflusst werden kann, dass es zu einer Minderung der Neurodegeneration im sich entwickelnden Gehirn juveniler Ratten kommt. Die Beeinflussung des extrinsischen Weges des programmierten Zelltods mit Hilfe des Caspase-8-Inhibitors TRP801 wurde bereits von unserer Arbeitsgruppe untersucht.

Weitere zu untersuchende Proteine dieser Signalwege sind das Caspase-unabhängige AIF-Protein, Apaf-1 sowie Cytochrom c, als Marker für eine intrinsisch initiierte Apoptose, Bid und die Effektorcaspase 3, als gemeinsames Endglied des intrinsischen sowie extrinsischen Teils der Apoptose. Außerdem wird das anti-apoptotische Protein Bcl-2 untersucht.

3 Methodik

3.1 Materialien

3.1.1 Chemikalien

Bezeichnung	Bezugsquelle
3-Amino-phthalhydrazid (Luminol)	Fluka, Buchs, Schweiz
Ac-DEVD-AMC	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ac-VDVAD-AFC	BioVision, Mountain View, CA, USA
Acrylamid	Fluka, Buchs, Schweiz
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva, Heidelberg
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Chloralhydrat	Braun, Ingelheim
Chloroform	Merck, Darmstadt
p-Coumarsäure	Amersham, Biosciences, Freiburg
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fluka, Buchs, Schweiz
di-Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
D.P.X. Mounting-Medium	Sigma, Diesenhofen
DTT	Sigma-Aldrich, Steinheim
EDTA	Merck, Darmstadt
EGTA	Serva, Heidelberg
Ethanol (vergällt und unvergällt)	Merck, Darmstadt
Essigsäure	Merck, Darmstadt
Fluoro-Jade B	Histo-Chem, Jefferson, USA
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	ICN Biomedicals, Aurora, USA
Isopropanol	J.T. Baker, Deventer, Holland
β-Mercaptoethanol	Fluka, Buchs, Schweiz
Methanol	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt

Bezeichnung	Bezugsquelle
0,9 % isotonische Natriumchlorid-Lösung	Braun, Melsungen
Natriumdeoxycholat	Fluka, Buchs, Schweiz
Natriumdihydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Natriumfluorid	Fluka, Buchs, Schweiz
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Nitrozellulosemembran	Schleicher & Schuell Bioscience, Dassel
NP40	Fluka, Buchs, Schweiz
Paraffin	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
PBS Phosphatpuffer Dulbecco	Biochrom, Berlin
PCR-H ₂ O	ddH ₂ O autoklaviert
Ponceau S	Roth, Karlsruhe
PMSF	Fluka, Buchs, Schweiz
Roti®-Block	Roth, Karlsruhe
Roti®-Free	Roth, Karlsruhe
Salzsäure	Merck, Darmstadt
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Roth, Karlsruhe
Stickstoff (flüssig)	Linde, Berlin
Tris (ultra)	Serva, Heidelberg
TEMED (Tetramethylethyldiamin)	Serva, Heidelberg
Tween 20	Fluka, Buchs, Schweiz
Xylol	Merck, Darmstadt

3.1.2 Puffer und Lösungen

Die im Folgenden aufgeführten Puffer und Lösungen wurden, falls nicht anders angegeben, mit ddH₂O hergestellt.

Bezeichnung	Inhalt
1%ige BSA-Lösung	1 % BSA (w/v) in TBST
ECL-Lösung I	2,5 mM Luminol, 0,4 mM p-Coumarsiure,

Bezeichnung	Inhalt
ECL-Lösung II	100 mM Tris-HCl (pH 8,5)
Fluoro-Jade B-Arbeitslösung	100 mM Tris-HCl (pH 8,5)
Fluoro-Jade B-Stammlösung	4 % (v/v) Fluoro-Jade-B Stammlösung, 0.096 % (v/v) Essigsäure
Kaliumpermanganatlösung	50 % (v/v) Fluoro-Jade-B
Laemmli-Puffer	60 % (v/v) Kaliumpermanganat 0,1 % (w/v) Bromphenolblau, 50 % (v/v) Glycerin, 5 % β -Mercaptoethanol, 2 % SDS, 0,125 M Tris-HCl (pH 6,8)
10x PBS (pH 7,4)	81mM di-Natriumhydrogenphosphat, 19 mM Natriumdihydrogenphosphat, 9,0 % (w/v) Natriumchlorid
10x Polyacrylamid- Gelelektrophorese-Puffer (Western Blot)	0,192 M Glycin, 0,1 % SDS, 25 mM Tris-HCl (pH 8,1)
RIPA-Puffer	0,5 mM DTT, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0,5 % Natriumdeoxycholat, 20 mM Natriumfluorid, 1 mM Natriumorthovanadat, 1 % NP40, 1 mM PMSF, 0,1 % SDS in 1x PBS (pH 7,4)
4x Sammelgelpuffer (pH 6,8)	0,4 % (w/v) SDS, 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8)
10x TBS	0,1 M Tris-HCl (pH 7,4), 1,5 M Natriumchlorid
TBS/T	150 mM Natriumchlorid, 10 mM Tris-HCl (pH 7,4), 0,1 % (w/v) Tween® 20
Transferpuffer (pH 9,2)	39 mM Glycin,

Bezeichnung

4x Trenngelpuffer (pH 8,8)

Inhalt

48 mM Tris,
 20 % (v/v) Methanol
 0,4 % (w/v) SDS,
 1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)

3.1.3 Kits**Bezeichnung**

Caspase-3-Aktivitätsassay
 Caspase-2-Aktivitätsassay
 Micro-Bicinchoninsäure-Assay

Bezugsquelle

Sigma-Aldrich, Steinheim
 BioVision, Mountain View, USA
 Interchim, Montluçon, Frankreich

3.1.4 Molekulargewichtsmarker**Bezeichnung**

Precision Plus® Protein Standard
 DualColor

Bezugsquelle

Bio-Rad, München

3.1.5 Antikörper**Bezeichnung**

AIF (polyklonal)

Quelle

Kaninchen

Bezugsquelle

New England Biolabs, Frankfurt,
 Germany

Apaf-1 (polyklonal)

Kaninchen

New England Biolabs, Frankfurt,
 Germany

Bcl-2 (polyklonal)

Kaninchen

BioVision, Mountain View, USA

Bid (polyklonal)

Kaninchen

Millipore, Schwalbach, Germany

β-Aktin (monoklonal)

Maus

Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany

Caspase-2 (polyklonal)

Kaninchen

Santa Cruz Biotechnology, USA

Cytochrome c (polyklonal)

Kaninchen

BioVision, Mountain View, USA

Bezeichnung	Quelle	Bezugsquelle
VDAC (polyklonal)	Kaninchen	New England Biolabs, Frankfurt, Germany

3.1.6 Geräte, Hilfsmittel und Verbrauchsmaterial

Bezeichnung	Bezugsquelle
Blot-Paper (Extra thick Protean XL Size)	Bio-Rad, München
Calibrated Imaging Densitometer GS-710	Bio-Rad, München
ChemiDoc XRS	Bio-Rad, München
Chirurgische Instrumente	EMS, Fort Washington, USA
Deckgläschen	Roth, Karlsruhe
Elektrophoresekammer	Biometra, Göttingen
Feinwaage MC 210S	Sartorius, Göttingen
Hypercassette™	Amersham Biosciences, Freiburg
Hyperfilm™ (ECL)	Amersham Biosciences, Freiburg
Injektionskanülen	B. Braun, Melsungen
Kamera PM-C35DX	Olympus, Hamburg
Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Lichtmikroskop BX60	Olympus, Hamburg
Mikroplattenreader Infinite® 200	Tecan, Crailsheim
Mini-PROTEAN3®-Gelsystem	Bio-Rad, München
Objektträger	Roth, Karlsruhe
Pipetten und Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Präzisionswaage MC 210S	Sartorius, Göttingen
Rotationsvibrator VT 1000S	Leica Microsystems, Nussloch
Schüttelinkubator Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Schütteltisch Stovall Belly Dancer	Castle Scientific, Emersacker
Tischzentrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg
Trans-Blot-SD-System	Bio-Rad, München
Transportinkubator T 1500	MEDAP, Bad Homburg
Umlufttrockenschrank UT 6000	Heraeus, Hanau
Vortexgerät REAX 2000	Heidolph, Kelheim

3.1.7 Software und Datenbanken

Bezeichnung

Adobe® Photoshop® Elements 2.0

BioDocAnalyse 2.0

GraphPad PRISM™ Version 5.1

NCBI Datenbank

Bezugsquelle

Adobe Systems, San Jose, USA

Whatman Biometra, Göttingen

GraphPad Software, San Diego, USA

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>

3.2 Methoden

3.2.1 Schematischer Überblick der Versuche

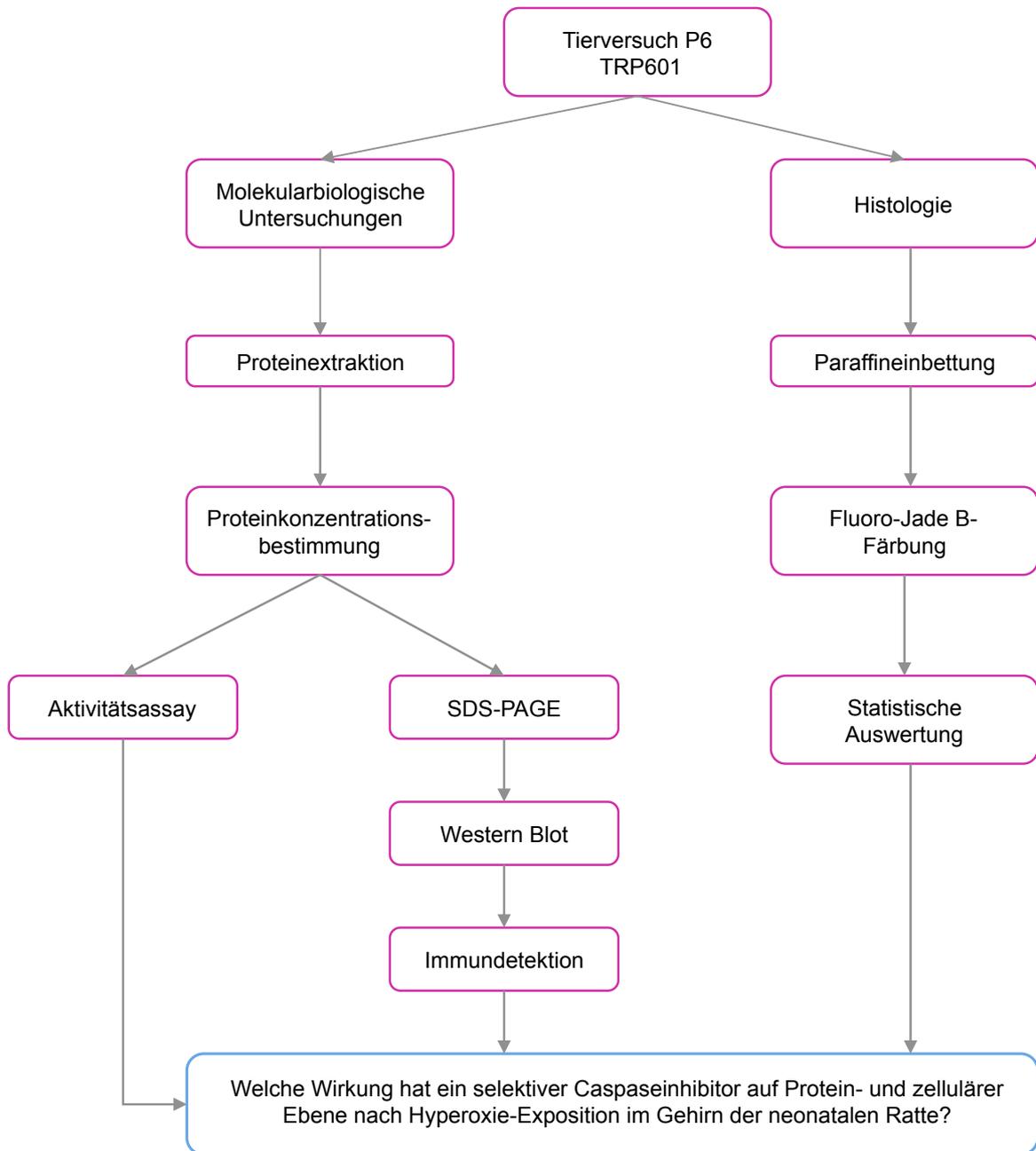


Abbildung 3.1: Schematischer Überblick der Versuche.

3.2.2 Tierschutzrichtlinien

Die Tierexperimente erfolgten in Übereinstimmung mit den Richtlinien zur Durchführung von Tierversuchen der Humboldt-Universität zu Berlin und wurden vom Landesamt für technische Sicherheit und Arbeitsschutz am 25.07.2007 in Berlin genehmigt (Aktenzeichen G140/07).

3.2.3 Tierversuchsmodell

Die tierexperimentellen Untersuchungen wurden mit Han Wistar-Ratten durchgeführt, wobei die Ratten im Alter von sechs Tagen randomisiert und den verschiedenen Zeitgruppen (12 und 24 h) zugeordnet wurden.

Direkt vor der Hyperoxie-Exposition wurde den Rattenjungern ein Caspase-Inhibitor (TRP601) bzw. den Kontrolltieren isotone Kochsalzlösung intraperitoneal (i.p.) injiziert. Das Injektionsvolumen richtete sich nach dem Körpergewicht, wobei 1 mg TRP601/kg Körpergewicht verabreicht wurde.

Um den aufkommenden Stress für die infantilen Ratten so gering wie möglich zu halten oder eine eventuelle Hypothermie zu vermeiden, wurden die Jungtiere direkt nach der Injektion wieder zu ihren Muttertieren zurückgegeben. Die Wurfgrößen wurden mit sechs bis zwölf Tieren pro Mutter versucht konstant zu halten, um zu große Gewichtsunterschiede zu verhindern. Das Gewicht der Jungtiere lag zwischen 14 bis 20 g. Jede einzelne Gruppe bestand aus mindestens vier Tieren (n = 4). Die Geschwisterwürfe wurden nach dem nachfolgenden Schema aufgeteilt und behandelt.

Tabelle 3.1: Versuchsaufbau für die histologischen und molekularbiologischen Untersuchungen.

Gruppen	Injektion	Behandlung	Untersuchungen
1 / 2	NaCl 0,9 % / TRP601	24 h Normoxie (21 % O ₂)	Aktivitätsassay
3 / 4	NaCl 0,9 % / TRP601	12 h Hyperoxie (80 % O ₂)	Fluoro-Jade B-Färbung
			Western Blot
5 / 6	NaCl 0,9 % / TRP601	24 h Hyperoxie (80 % O ₂)	

Nach der Injektion wurden die Tiere der „Hyperoxie-Gruppen“ zusammen mit dem jeweiligen Muttertier über 12 bzw. 24 h einer Hyperoxie (80 % Sauerstoff) in einem ehemaligen Transportinkubator für Neugeborene (Abb. 3.2) ausgesetzt; die Kontrolltiere wurden 24 h unter normoxischen (21 % Sauerstoff) Bedingungen belassen, ebenfalls bei ihrem Muttertier. Die Gruppe der Kontrolltiere wurde ein weiteres Mal unterteilt: Gruppe 1 wurde isotone Kochsalzlösung verabreicht (Kon) und Gruppe 2 der spezielle Capase-Inhibitor injiziert (Kon + TRP 601).

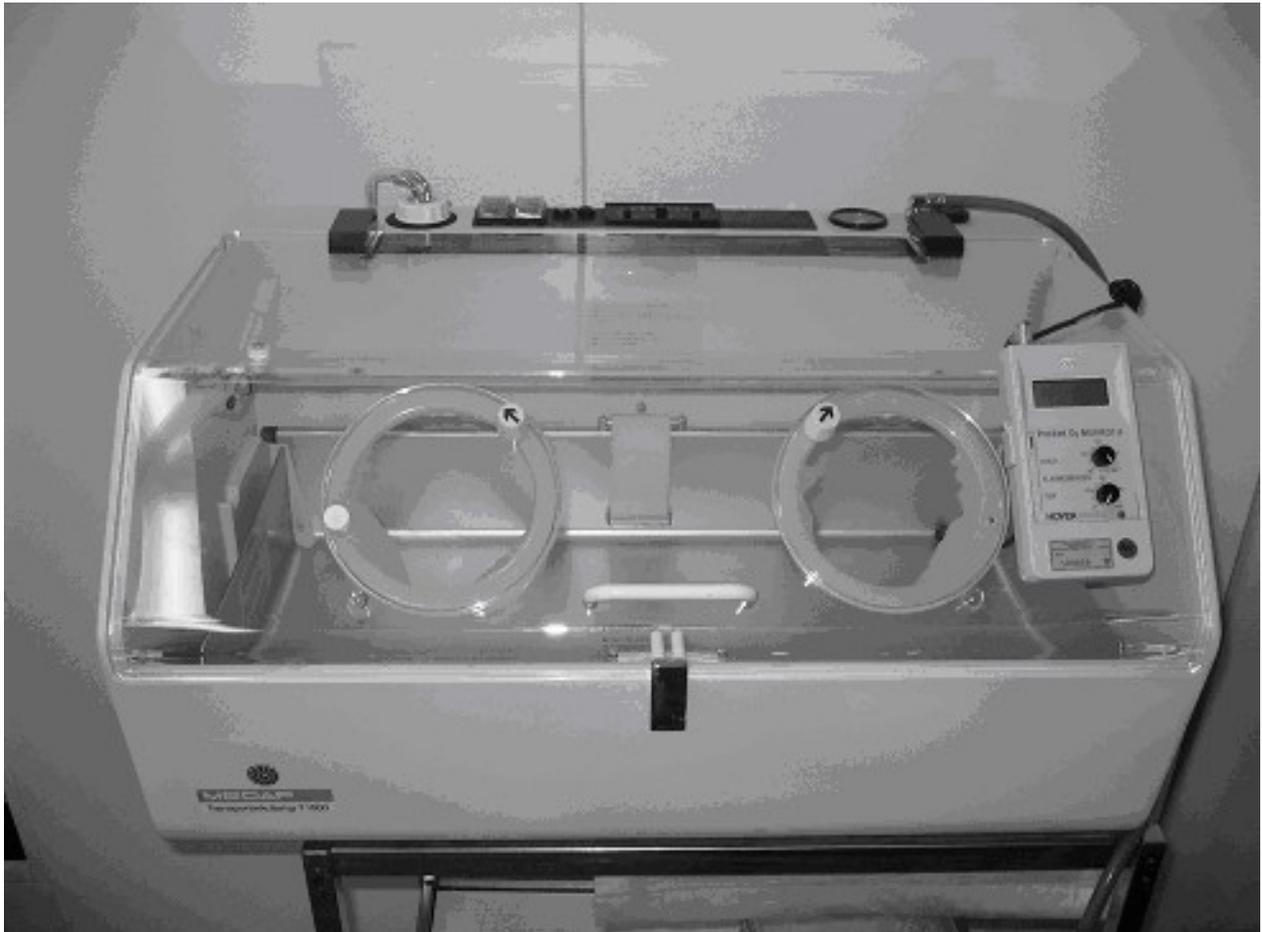


Abbildung 3.2: Neonatologischer Transportinkubator.

3.2.4 Perfusion und Präparation

Nach 12 bzw. 24 h wurden die Jungtiere mit einer Überdosis Chloralhydrat getötet. Der Thorax wurde chirurgisch eröffnet. Mit Hilfe einer stumpfen Kanüle, die transkardial über den linken Ventrikel in die Aorta ascendens hervorgeschoben wurde, wurden die Tiere

mit 4 °C kaltem PBS (*phosphate buffered saline*) perfundiert. Es folgte die Dekapitation der Ratten, anschließend wurde die Kalotte entlang der Sagittalnaht eröffnet, das Gehirn mit einem Spatel aus dem Schädel herausgelöst und das Riech- und Kleinhirn entfernt. Die linke Hirnhälfte wurde für die nachfolgende histologische Untersuchung und zur weiteren Fixierung mindestens vier Tage in einer 4%igen Paraformaldehydlösung im Kühlschrank bei 4° C aufbewahrt. Für die molekularbiologischen Untersuchungen wurden bei der rechten Hirnhälfte der rostrale sowie der caudale Teil des Hirns mit einer Rasierklinge entfernt und der Thalamus und Teile des Cortex' präpariert. Zusätzlich gewann man von jedem Tier Proben folgender Organe: Leber, Lunge, Herz und Kleinhirn. Alle Gewebeproben wurden unmittelbar nach der Präparation in 2ml-Reaktionsgefäßen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

3.2.5 Histologie

3.2.5.1 Schnitte und Einbettung

Von den linken Hirnhälften wurde der rostrale Teil des Hirns ebenfalls entfernt. Anschließend wurden die Hirnhälften mit Hilfe einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert (Tab. 3.2).

Tabelle 3.2: Dehydrierungsreihe.

Materialien	Inkubationsdauer	Temperatur
Ethanol 70 %	3,5 Std.	Raumtemperatur (RT)
Ethanol 80 %	über Nacht	RT
Ethanol 96 %	1 h	40 °C
Ethanol 100 %	1 h	40 °C
Ethanol 100 %	1 h	40 °C
Ethanol 100 % /Chloroform (1:1)	1 h	40 °C
Chloroform	1 h	40 °C
Chloroform	1 h	40 °C

Im Anschluss erfolgte die Imprägnierung in flüssigem Paraffin für 1 h bei 60 °C und eine zweite Einbettung für 12 h bei 60 °C. Nun wurden die Hirnhälften in die vorgefertigten

Plastikwürfel gelegt und mit Paraffin aufgefüllt. Über Nacht härteten diese aus und wurden anschließend mit Hilfe des Schlittenmikrotoms (SM 2000 R, Leica) in 10 µm dicken Schnitten auf die Objektträger aufgebracht.

3.2.5.2 Fluoro-Jade B-Färbung

Fluoro-Jade B ist ein anionischer Fluoreszenzfarbstoff, der gut geeignet für den histologischen Nachweis der Degeneration von Neuronen ist.¹¹⁸ Nekrotische und apoptotische Nervenzellen, eine Unterscheidung zwischen diesen beiden ist mit der Färbung nicht möglich, erscheinen heller als ihre nicht-degenerierenden Nachbarzellen. Hierzu wurden die Objektträger mit den Paraffinschnitten zunächst bei 45 °C für 20 min erwärmt. Danach wie folgt (Tab. 3.3) in Xylol entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe bei RT rehydriert:

Tabelle 3.3: Rehydrierungsreihe.

Substanz	Dauer
Xylol I	3 min
Xylol II	3 min
100% Ethanol	3 min
90% Ethanol	3 min
80% Ethanol	3 min
70% Ethanol	1 min
Aqua dest.	1 min

Nun wurden die Schnitte in eine 0,06%ige Kaliumpermanganatlösung gestellt und für 15 min auf einem Schüttler bei RT inkubiert, danach 1 min mit Aqua dest. gewaschen. Von nun an wird lichtgeschützt gearbeitet. Die Paraffinschnitte werden in einer 0,001%igen Fluoro-Jade B-Lösung für 30 min auf dem Schüttler inkubiert. Danach werden die Schnitte in Aqua dest. fünfmal für jeweils 1 min gewaschen und im Anschluss über Nacht bei 37 °C getrocknet. Nach dem Trocknen werden die Schnitte für 3 min in Xylol inkubiert und anschließend mit DPX, einem nicht-fluoreszierenden Mounting-Medium, gedeckelt.

3.2.5.3 Stereologisch-optische Dissektionsmethode

Die Auszählung der Hirnschnitte erfolgte geblindet und die Präparate wurden mittels der stereologisch-optischen Dissektionsmethode (*unbiased stereological dissector method*) quantitativ ausgewertet.¹¹⁹ Zunutze macht man sich hierbei den fixen Zählrahmen (0,05 x 0,05 mm, Dissektorhöhe 0,01 – 0,07 mm) der im Okular des Mikroskops integriert ist. Dadurch war eine Aufteilung des Gewebeblocks in kleine Untereinheiten möglich, was das Auszählen erleichterte. Für die Auszählung der Anzahl an degenerierten Zellen wurden komplette Hirnhälften verwendet. Die Dicke der Präparate musste zum Erfassen aller in einem solchen Bereich liegenden degenerierten Zellen mittels Durchfokussieren berücksichtigt werden. Daraus ergab sich die Möglichkeit, unter Verwendung der jeweiligen Vergrößerung, eine Volumen- (V) und eine Dichteberechnung (D) vorzunehmen:

$$k = 1 \text{ mm} / N$$

$$V = k^2 \times d$$

$$D = n / V$$

D = Dichte [1 / mm³]

d = Schnittdicke [mm]

k = Kantenlänge eines Zählkästchens [mm]

N = Vergrößerung

n = Anzahl der degenerierten Zellen

V = Volumen [mm³]

Durch die Ermittlung der Dichte, der degenerierten Zellen und der einzelnen Hirne lassen sich die verschiedenen Versuchsgruppen direkt miteinander vergleichen.

Die Auswertung der Fluoro-Jade B-gefärbten-Präparate erfolgte mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops bei einer Extinktionswellenlänge von 450-490 nm und einer Emissionwellenlänge von 515-565 nm. Die degenerierten Zellen erscheinen dabei hellgrün, vor einem dunkelgrünen Hintergrund.

3.2.5.4 Statistische Auswertung der Fluoro-Jade B-Färbung

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe einer Varianzanalyse (*one-way ANOVA*) und nachfolgendem Student's t-Test mit der Software GraphPad PRISM™ Version 5.1. Die Auszählung der Schnitte wurde geblindet durchgeführt und aus den Werten der einzelnen Tiere erfolgte dann die Berechnung des Gesamtwerts pro Gruppe. Die Ergebnisse der Dichteberechnung der degenerierten Zellen wurden auf signifikante Unterschiede der jeweiligen Versuchsgruppen untersucht und die Mittelwerte sowie der Standardfehler dargestellt, wobei ein p-Wert von <0.05 als statistisch signifikant angesehen wurde.

3.2.6 Molekularbiologie

3.2.6.1 Proteinextraktion aus dem Hirngewebe

Von dem bei -80 °C tiefgefrorenen Hirngewebe wurden ca. 30-80 mg in 1,5ml-Reaktionsgefäße überführt, die mit jeweils 300 μl RIPA-Extraktionspuffer versehen und durch wiederholtes Auf- und Abpipettieren homogenisiert wurden. Das Homogenat wurde anschließend für 20 min auf Eis inkubiert. Es erfolgte die Zentrifugation des Homogenats mit 3.000 g für 10 min bei 4 °C . Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 17.000 g für 20 min bei 4 °C zentrifugiert. Entstanden sind hierbei ein Sediment, welches die mitochondriale Fraktion enthält sowie einen Überstand, der die zytosolische Fraktion enthält. Anschließend wurde der zytosolische Überstand abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt, die mitochondriale Fraktion erneut mit 300 μl RIPA-Extraktionspuffer versehen und beide Fraktionen bis zur Bestimmung des Proteingehalts mittels der BCA-Methode weiter bei -80 °C gelagert.

3.2.6.2 Proteinbestimmung mittels Biuret-Reaktion

Die Proteinkonzentration der zytosolischen sowie mitochondrialen Fraktionen wurde mittels der BCA-Methode bestimmt. Grundlage dieser Methode ist die Biuret-Reaktion.

Hierbei gehen zweiwertige Kupferionen (Cu^{2+}) in alkalischer Lösung einen Komplex mit den Peptidbindungen der Proteine ein. Die Cu^{2+} -Ionen werden zu einwertigen Cu-Ionen reduziert, welche dann mit der Bicinchoninsäure (BCA) einen intensiven violetten Farbkomplex bilden, wobei die Intensität der Farbe mit der enthaltenen Proteinmenge korreliert.

Das Absorptionsmaximum für den entstandenen Chelatkomplex liegt bei 562 nm. Um den Proteingehalt zu bestimmen, wurden eine BSA(*bovine serum albumin*)-Standardreihe im Konzentrationsbereich von 0,125-2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ und 1:2-Verdünnung (mitochondriale Fraktion) bzw. eine 1:20-Verdünnung (zytosolische Fraktion) mit PBS (*phosphate buffered saline*) hergestellt. Dabei diente mit BC Assay-Reagenz versetztes PBS als Leerwert. 10 μl der verdünnten Proben wurden jeweils zur Dreifach-Bestimmung in eine 96-Mehrloch-Mikrotiterplatte pipettiert und anschließend 200 μl der BCA-Lösung pro Vertiefung hinzugefügt. Es folgte ein Schüttelvorgang für 10 Sekunden und die Inkubation für eine Stunde bei 37 °C. Nach Abkühlung auf RT wurde die Absorption der Reaktionsansätze im Mikroplattenreader bei 562 nm gemessen. Anhand der BSA-Standardkurve wurden die Proteinkonzentrationen der mitochondrialen und zytosolischen Fraktionen berechnet.

3.2.6.3 Western Blot

3.2.6.3.1 Elektrophorese der Proteine in SDS-Polyacrylamidgelen

Mit Hilfe der Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) können Proteine in einem elektrischen Feld aufgetrennt werden. Bei der SDS-PAGE (*sodium dodecylsulfate*-PAGE) werden die Proteine nach ihrer Größe aufgetrennt. Dies ermöglicht die Zugabe des anionischen Tensids SDS, welches mit seinen Sulfatgruppen negative Ladungen einführt und somit die Eigenladungen der Proteine überdeckt, so dass die Proteine eine negative Ladungsverteilung aufweisen. Den Proteinproben wird zusätzlich Laemmli-Probenpuffer zugesetzt, um durch das darin enthaltene β -Mercaptoethanol die Disulfidbrückenbindungen der Proteine aufzuspalten und somit die natürliche Konformation der Proteine zu zerstören. Die denaturierten und negativ geladenen Proteine werden nun ihrem Molekulargewicht entsprechend elektrophoretisch getrennt.

Die Herstellung der Polyacrylamidgele erfolgte mit Hilfe des Mini-PROTEAN® 3-Electrophoresis Cell Systems von Bio-Rad.

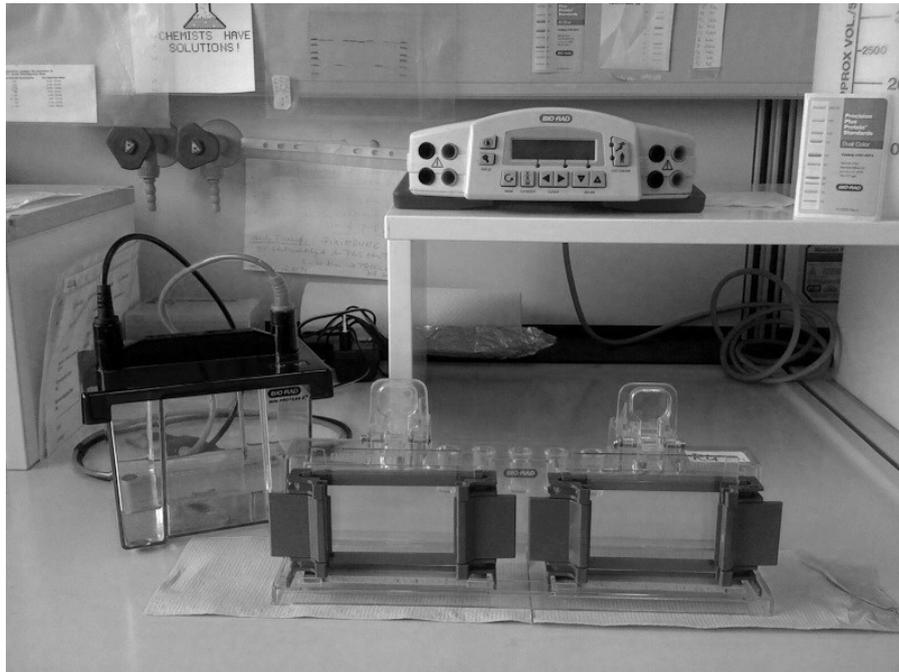


Abbildung 3.3: Mini-PROTEAN® 3 Cell System.

Die hierfür benötigten Glasplatten wurden zunächst mit Ethanol und fusselfreien KIMTECH-Tüchern gereinigt, aufeinandergelegt und in die Gelgießapparatur des Mini-PROTEAN® 3-Systems eingespannt. Da die zu untersuchenden Proteine unterschiedliche Molekulargewichte aufweisen, wurden 10-, 12,5- oder 15%-ige Gele hergestellt, um somit optimale Bedingungen für die gelelektrophoretische Auftrennung der jeweiligen Proteine zu schaffen. Die hierfür benötigten Komponenten sind der folgenden Tabelle 3.4 zu entnehmen:

Tabelle 3.4: Gelzusammensetzung für vier Minigelte verschiedener Konzentrationen.

Komponente	Trenngel 10 %	Trenngel 12,5 %	Trenngel 15 %	Sammelgel 4,5 %
4x Trenngelpuffer	6,0 mL	6,0 mL	6,0 mL	–
4x Sammelgelpuffer	–	–	–	3,7 mL
30 % Acrylamid	8,0 mL	10,0 mL	12,0 mL	2,2 mL
PCR-H ₂ O	9,9 mL	7,9 mL	5,9 mL	9,0 mL
12,5 % APS	96 µL	96 µL	96 µL	50 µL
TEMED	20 µL	20 µL	20 µL	30 µL

In der folgenden Tabelle 3.5 sind die verwendeten Gele entsprechend des Molekulargewichts der untersuchten Proteine aufgeführt.

Tabelle 3.5: Eingesetzte Gele entsprechend des Molekulargewichts der untersuchten Proteine.

Protein	Molekülgröße	Verwendetes Gel
AIF	57 kDa	10 %
Apaf-1	135 kDa	10 %
Bcl-2	25 kDa	10 %
Bid	22 kDa	12,5 %
cCaspase-2	18 kDa	12,5 %
Cytochrom c	12,6 kDa	15 %

Zuerst wurde das Trenngel hergestellt und zwischen die Glasplatten, bis ca. 2 cm unterhalb der Oberkante, gegossen und anschließend mit 50%igem Isopropanol bedeckt. Die Polymerisierung des Gels war nach 30 min abgeschlossen, das Isopropanol wurde abgegossen und anschließend das Trenngel mit dem Sammelgel überschichtet. Die Probenaschen entstanden durch das Einbringen eines Probenkamms unmittelbar nach Einfüllen des Sammelgels. Nach weiteren 30 min war das Sammelgel polymerisiert. In eine Elektrophorese-Kammer (EK) wurden zwei Gele gleichzeitig eingesetzt. Nach dem Befüllen der EK mit Elektrophoresepuffer wurden die Kämme entfernt und die entstandenen Taschen mit einer Glaspipette gespült, um eine Verunreinigung der Taschen mit Gelresten zu vermeiden.

Während der Polymerisierung der Gele wurden die vorbereiteten Proteinproben bei 95 °C für 5 min in einem Thermomixer denaturiert und anschließend bis zur weiteren Verwendung auf Eis gestellt. Die Proteinproben wurden mit Hilfe einer Pipette in die Taschen überführt und ein Molekulargewichtsmarker (Precision Plus® Protein Standard DualColor) wurde jeweils in die erste Tasche des Gels pipettiert.

Tabelle 3.6: Probenzusammensetzung vor dem SDS-PAGE-Auftrag.

Komponente	Volumen	Endkonzentration
Proteinlösung	x µL	20 µg
Laemmli-Puffer	6,5 µL	–
PCR-H ₂ O	ad 13,0 µL	–
Σ	13,0 µL	

Die EK wurde geschlossen und eine Spannung von 100 V für 30 min angelegt. In dieser Zeit wanderten die Proteinproben durch das großporige Sammelgel. Nach dem Erreichen des engporigen Trenngels wurde die Spannung auf 160 V erhöht. Während dieses Vorganges fungiert das Polyacrylamidgel als eine Art Sieb. Kleine Proteine laufen hierbei schneller durch das Gel als größere, da diese durch die feinen Poren des Gels stärker bei ihrer Wanderung gehindert werden. Sobald die Lauffront das untere Ende der Trenngelschicht erreichte, wurde die Elektrophorese gestoppt. Je nach Zusammensetzung des Gels war die Elektrophorese der Proteine nach maximal 1,5 h beendet und die Proteine nach ihrer Größe aufgetrennt.

3.2.6.3.2 Elektrotransfer der Proteine auf Nitrocellulose-Membranen (Western Blot)

Für den Elektrotransfer, bei dem die im Polyacrylamidgel gebundenen Proteine auf eine Nitrocellulosemembran übertragen werden, wurde das Semidry-Blotverfahren ausgewählt. Vorbereitend dazu wurden je Gel zwei Filterpapiere und eine Nitrocellulosemembran (Porengröße 0,22 µm) zugeschnitten. Anschließend wurden die Trenngele aus den Glasplatten herausgelöst, von den Sammelgelen separiert und für 20 min in Transferpuffer äquilibriert. Die Filterpapiere sowie die Membran wurden kurz mit Transferpuffer benetzt und das Sammelgel verworfen. Die Gele und die Membranen werden nun sandwichartig von den Filterpapieren eingerahmt (siehe Abbildung 3.4). Es ist darauf zu achten, dass nach dieser Prozedur keine Luftblasen zwischen dem Gel und der Membran verbleiben.

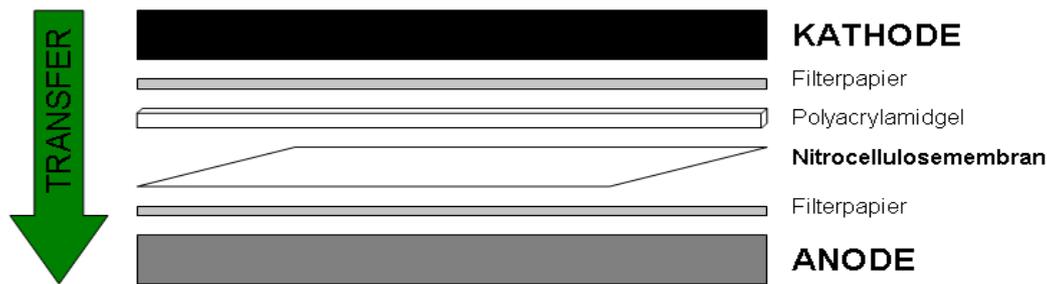


Abbildung 3.4: Aufbau des Semidry-Transfers beim Western Blot.

Das System wird durch Auflegen der Kathode, in Form einer Edelstahlplatte, geschlossen. Der Transfer wurde für 45 min bei 400 mA und 25 V vollzogen (bei 4 gleichzeitig zu transferierenden Gelen). Anschließend wurde die Membran mittels einer reversiblen Ponceau S-Lösung angefärbt, um die übertragenen Proteinbanden darzustellen und somit den Transfer zu kontrollieren. Die Proteinbanden des Molekulargewichtsmarkers wurden mit einem Kugelschreiber markiert. Zur Entfärbung wurde die Membran mit ddH₂O gespült und dreimal für 8 Minuten in TBS/T gewaschen.

3.2.6.3.3 Immundetektion der transferierten Proteine

Um die freien Bindungsstellen auf der Nitrocellulosemembran zu blockieren, wurde die Membran für eine Stunde bei RT mit einer Blockierungslösung (10 % Roti®-Block) inkubiert, so dass eine spezifische Bindung des spezifisch gegen das jeweilige Protein gerichteten Erstantikörpers gewährleistet wurde.

In Vorversuchen wurden die optimale Blockierungslösung, Antikörperverdünnung und Inkubationslösung für jeden der verwendeten Antikörper ermittelt. Nach der Blockierung erfolgte ein dreimaliges Waschen für 8 Minuten in TBS/T. Die Inkubation des Erstantikörpers erfolgte über Nacht, bei 4 °C unter ständigem Schütteln. Die verwendeten Antikörperverdünnungen sind der folgenden Tabelle 3.7 zu entnehmen:

Tabelle 3.7: Verwendete Antikörperlösungen für die Immundetektion der Zielproteine und der internen Kontrollproteine β -Aktin sowie VDAC.

Primärer Antikörper (Quelle)	Verdünnung	Sekundärer Antikörper	Verdünnung
AIF (Kaninchen)	1:500 in 1 % BSA/TBS/T	HPR-anti- Kaninchen-AK	1:5.000 in 1 % BSA/TBS/T
Apaf-1 (Kaninchen)	1:500 in 1 % BSA/TBS/T	HPR-anti- Kaninchen-AK	1:5.000 in 1 % BSA/TBS/T
Bcl-2 (Kaninchen)	1:200 in 1 % BSA/TBS/T	HPR-anti- Kaninchen-AK	1:5.000 in 1 % BSA/TBS/T
Bid (Kaninchen)	1:1.000 in 1 % BSA/TBS/T	HPR-anti- Kaninchen-AK	1:5.000 in 1 % BSA/TBS/T
cCaspase-2 (Kaninchen)	1:200 in 1 % BSA/TBS/T	HPR-anti- Kaninchen-AK	1:5.000 in 1 % BSA/TBS/T
Cytochrom c (Kaninchen)	1:1.000 in 1 % BSA/TBS/T	HPR-anti- Kaninchen-AK	1:5.000 in 1 % BSA/TBS/T
β-Aktin (Maus)	1:10.000 in 1 % BSA/TBS/T	HPR-anti- Maus-AK	1:1.000 in 1 % BSA/TBS/T
VDAC (Kaninchen)	1:1.000 in 1 % BSA/TBS/T	HPR-anti- Kaninchen-AK	1:5.000 in 1 % BSA/TBS/T

Um den überschüssigen Erstantikörper zu entfernen erfolgte ein dreimaliges Waschen für 8 Minuten in TBST/T. Die Membran wurde nun bei RT für eine Stunde mit dem jeweiligen Spezies-spezifischen, und Peroxidase-gekoppelten, sekundären – gegen den primären Antikörper gerichteten – Antikörper inkubiert. Jede Membran wurde nach der Inkubation erneut dreimal für 8 Minuten in TBST/T gewaschen.

Die Membran wurde nun mit jeweils 3 mL ECL-I-Lösung sowie 3 mL ECL-II-Lösung für eine Minute inkubiert, wobei der ECL-I-Lösung zuvor 1,8 μ l Wasserstoffperoxid (30 %) zugesetzt wurden. Das Wasserstoffperoxid oxidiert ein zyklisches Diacylhydrazid (Luminol) zu einem instabilen und energiereichen Intermediat. Unter Lichtemission geht dieses wieder in seinen Grundzustand über und kann mittels Exposition auf einem Röntgenfilm nachgewiesen werden. Dazu werden die abgetropften Membranen in Haushaltsfolie eingewickelt, unter Rotlicht in eine Filmkassette gelegt und mit einem Röntgenfilm versehen. Die Expositionszeit variierte in Abhängigkeit vom zu detektierenden Protein zwischen einigen Sekunden bis zu mehreren Minuten. Die

Entwicklung des Films fand anschließend in der Filmentwicklungsmaschine statt und die erhaltenen Proteinbanden wurden mit dem Bildanalyseprogramm BioDocAnalyse 2.0 densitometrisch ausgewertet.

3.2.6.3.4 Entfernung gebundener Antikörper

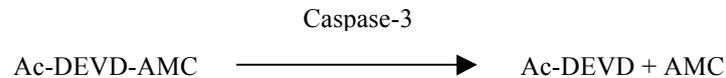
Um den gebundenen Antikörper zu entfernen, wurde die Membran zunächst zweimal für 8 min unter Agitation bei RT in TBS/T gewaschen und anschließend mit einem Stripping-Puffer (Roti®-Free) für 30 min bei 55 °C auf einem Schüttler inkubiert. Es folgte ein dreimaliges Waschen für 8 min in TBS/T bei RT und anschließend wurde die Membran erneut für 1 h in Blockierungslösung belassen. Die Inkubationen mit dem primären und sekundären Antikörper folgte sowie die jeweiligen Waschschrte und Durchführungen der Chemilumineszenzreaktion. Die erhaltenen Proteinbanden wurden ebenfalls mit der densitometrischen Software BioDocAnalyse 2.0 erfasst, quantifiziert und schließlich zur Normalisierung des jeweiligen Zielproteins herangezogen. Hierfür wurde das Dichteverhältnis vom jeweiligen Zielprotein zum internen Kontrollprotein, β -Aktin (42 kDa) bzw. VDAC (32 kDa) ermittelt. Diese Auswertung erfolgte ebenfalls unter Verwendung der Software Excel, zur statistischen Auswertung wurde eine Varianzanalyse (*one-way ANOVA*) mit nachfolgendem Student's t-Test mit dem Programm GraphPad PRISM™ Version 5.1 durchgeführt. Anschließend wurde Standardabweichung und Standardfehler berechnet und die Werte auf die jeweilige Signifikanz untersucht, um signifikante Unterschiede zwischen den Vergleichsgruppen aufzeigen zu können, wobei ein Wert von $p < 0.05$ als signifikant galt.

3.2.6.4 Aktivitätsassays

3.2.6.4.1 Caspase-3-Aktivitätsassay

Das Caspase-3-Aktivitätsassay ermöglicht die spezifische und quantitative Detektion der Caspase-3-Aktivität in den gewonnenen zytosolischen Fraktionen (siehe 3.2.6.1).

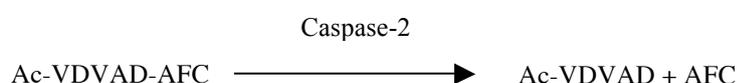
Die spezifische Spaltung des Ac-DEVD-AMC-Substrats (Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amido-4-methylcoumarin) führt zur Freisetzung des Fluoreszenzfarbstoffs Amido-4-methylcoumarin (AMC), welcher photometrisch bestimmt wird.



Es wurden jeweils 5 µl der zytosolischen Fraktion Zelllysats in eine Vertiefung einer 96-Mehrloch-Mikrotiterplatte überführt. Zur Bestimmung eines Leerwertes werden zwei Vertiefungen mit 5 µl des Assaypuffers befüllt. Um den Erfolg des Assays überprüfen zu können, wurden eine dem Kit beiliegende Caspase-3-Positivkontrolle (5 µl) ebenfalls auf die 96-Mehrloch-Mikrotiterplatte überführt. Abschließend wurden 200 µl der Reaktionslösung auf die Vertiefungen verteilt, die Platte behutsam geschüttelt, abgedeckt und bei RT für eine Stunde inkubiert. Die Messung der Fluoreszenz im Mikroplattenreader erfolgte dann bei einer Anregungswellenlänge von 360 nm sowie einer Emissionswellenlänge von 460 nm alle 15 min über einen Zeitraum von 90 min. Die erhaltenen Fluoreszenzen wurden gemäß den Herstellerangaben als relative Fluoreszenzeinheiten (RFU), nach Abzug der Fluoreszenz reiner Pufferlösung, angegeben.

3.2.6.4.2 Caspase-2-Aktivitätsassay

Ähnlich dem Caspase-3-Aktivitätsassay wurde bei der Messung der Aktivität der Caspase-2 verfahren. Hierbei wird das Substrat Ac-VDVAD-AFC, welches mit dem Farbstoff AFC (7-amino-4-trifluoromethyl-cumarin) markiert ist abgespalten und ebenfalls photometrisch bestimmt. Der Vergleich der Fluoreszenz des abgespaltenen AFCs mit einer Kontrolle erlaubt es,



Rückschlüsse auf die gesteigerte Aktivität von Caspase-2 zu ziehen. Hierfür wurden jeweils 5 µg/µl der zytosolischen Fraktion der jeweiligen Proben in 50 µl Assaypuffer gelöst und für 10 min auf Eis inkubiert. Es folgte die Zugabe von 50 µl Reaktionspuffer und 5 µl Ac-VDVAD-AFC-Substrat sowie eine Inkubation für 1-2 Stunden bei 37 °C. Die Proben wurden ebenfalls in eine 96-Mehrloch-Mikrotiterplatte überführt und im Anschluss bei einer Anregungswellenlänge von 400 nm und einer Emissionswellenlänge von 505 nm gemessen.

4 Ergebnisse

4.1 Physiologische Parameter der Versuchstiere

Zwischen den Versuchstieren der Hyperoxiegruppe (80 % Sauerstoff) und den jeweiligen Kontrolltieren, die unter normoxischen Bedingungen belassen wurden, gab es keine Unterschiede im Körpergewicht oder anderen phänotypischen Parametern. Es wurden in beiden Gruppen keine körperlichen Beeinträchtigungen festgestellt und die Mortalität war in beiden Gruppen gleich null. Während der gesamten Versuche konnten bei den Versuchstieren, denen TRP601 appliziert wurde, zu keiner Zeit Nebenwirkungen beobachtet werden.

4.2 Histologische Untersuchungen

4.2.1 Einfluss des Caspase-2-Inhibitors TRP601 auf die Hyperoxie-induzierte Neurodegeneration

Aufgrund der Hyperoxie-Exposition kommt es im sich entwickelnden Gehirn der infantilen Wistar-Ratten zu einer verstärkten Neurodegeneration. Die geschädigten Neurone wurden mittels Fluoro-Jade B-Färbung sichtbar gemacht und zeichnen sich als hellgrüne Punkte ab. Die Quantifizierung der degenerierten Neuronen erfolgte nach der oben beschriebenen stereologisch-optischen Dissektionsmethode und wurde nachfolgend mit der Software GraphPad PRISM™ Version 5.1 und ANOVA statistisch ausgewertet.

Die histologischen Untersuchungen zeigen Fluoro-Jade B-positive Zellen in folgenden Hirnregionen: Cortex [(frontal (II + IV), parietal (II + IV), Gyrus cinguli (II + IV) und retrosplenial (II + IV)], Nucleus caudatus, Corpus Callosum und der angrenzenden weißen Substanz, Thalamus (laterodorsal, mediodorsal und in den ventralen Kernen), im hippocampalen Gyrus dentatus und im Subiculum. Die Fluoro-Jade B-gefärbten Präparate zeigen deutlich, dass die Behandlung mit dem Caspase-Inhibitor TRP601 zu einer Reduktion der Fluoro-Jade B-positiven Zellen und somit zu einer Minderung der Neurodegeneration im Gehirn der neonatalen Ratte führt (Abb. 4.1).

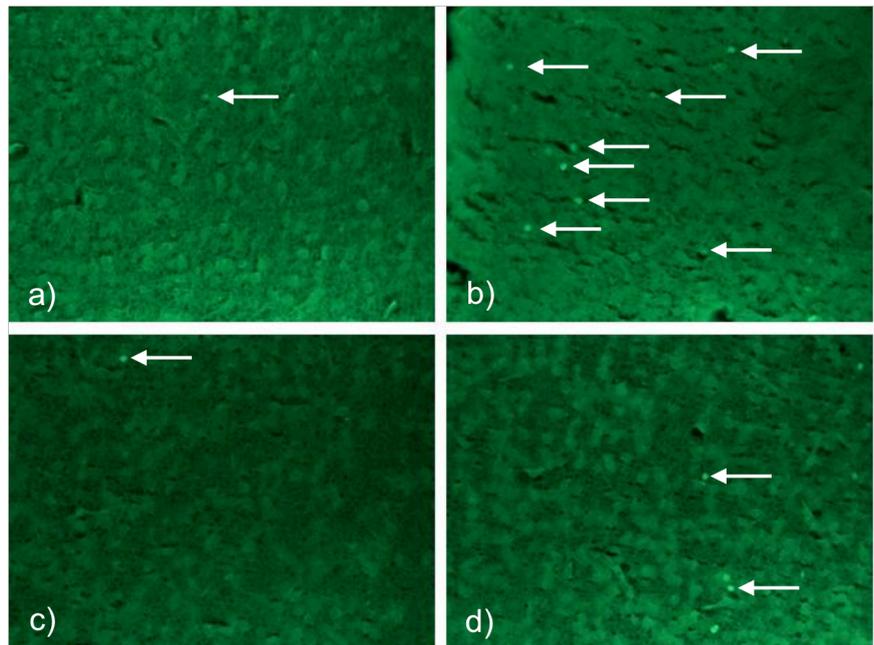


Abbildung 4.1: TRP601 reduziert den Zelltod *in vivo*. Repräsentative Mikrophotographien (ursprüngliche Vergrößerung 400x) Fluoro-Jade B-gefärbter Abschnitte aus dem Thalamus sieben Tage alter Ratten. Einerseits wurden die Tiere für 24 Stunden bei normoxischen Bedingungen belassen (a), andererseits 24 Stunden einer Hyperoxie ausgesetzt (b) und jeweils mit dem Caspase-Inhibitor TRP601 behandelt [Normoxie und TRP601 (c), Hyperoxie und TRP601 (d)]. Die weißen Pfeile markieren die Fluoro-Jade B-positiven Zellen.

Der erhöhte Sauerstoffgehalt in der zugeführten Luft (80 % Sauerstoff) hat die Induktion der Apoptose zufolge, was sich aus den erhöhten Zahlen an Fluoro-Jade B-positiven Zellen, im Vergleich zu den unter normoxischen Bedingungen belassenen Versuchstieren, ableiten lässt (von 58 % auf 103 %). Der neuronale Zelltod ist nach einer einmaligen Behandlung mit dem Caspase-Inhibitor TRP601 bei den neonatalen Ratten der „Hyperoxie-Gruppe“ signifikant reduziert (von 103 % auf 65 %). Zudem konnte gezeigt werden, dass die Anwendung von TRP601 unter Kontrollbedingungen keinen Einfluss auf die physiologische Apoptose hat (siehe Abb. 4.2).

Fluoro-Jade B positive Zellen

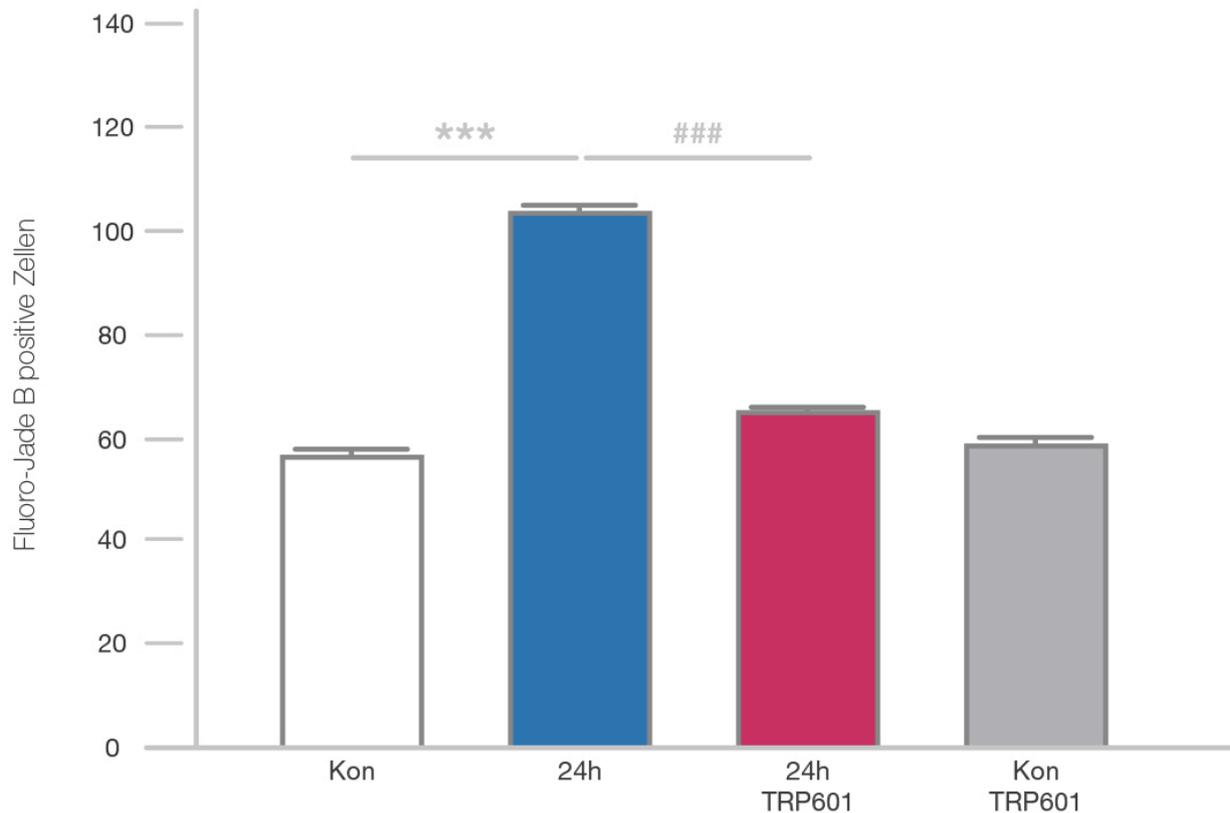


Abbildung 4.2: TRP601 beeinflusst nicht die physiologische Apoptose (grauer Balken), mindert jedoch die Neurodegeneration der Hyperoxie-Tiere (magentafarbener Balken), während der 24-stündigen Hyperoxie, *in vivo*. Die Quantifizierung von 16 Hirnregionen zeigt eine signifikante Reduktion der Fluoro-Jade B-positiven degenerierten Neuronen nach TRP601-Behandlung (magentafarbener Balken). Die Balken stellen jeweils den Mittelwert \pm Standardfehler dar (n = 8-12 pro Gruppe, *** p<0.001, ### p<0.001, one-way ANOVA).

4.3 Molekularbiologische Untersuchungen

4.3.1 Einfluss von TRP601 auf die enzymatische Aktivität und Proteinexpression von Caspase-2 im sich entwickelnden Gehirn nach Hyperoxie

Der Caspase-2-Aktivitätsassay ergab einen signifikanten Anstieg der prozessierten Caspase-2 (cCaspase-2) nach Hyperoxie-Exposition. Nach 12 Stunden kommt es zu einem Anstieg der enzymatischen Aktivität von cCaspase-2 auf 358 %, welcher nach 24 Stunden noch deutlicher ausfällt (677 %, Abb. 4.3).

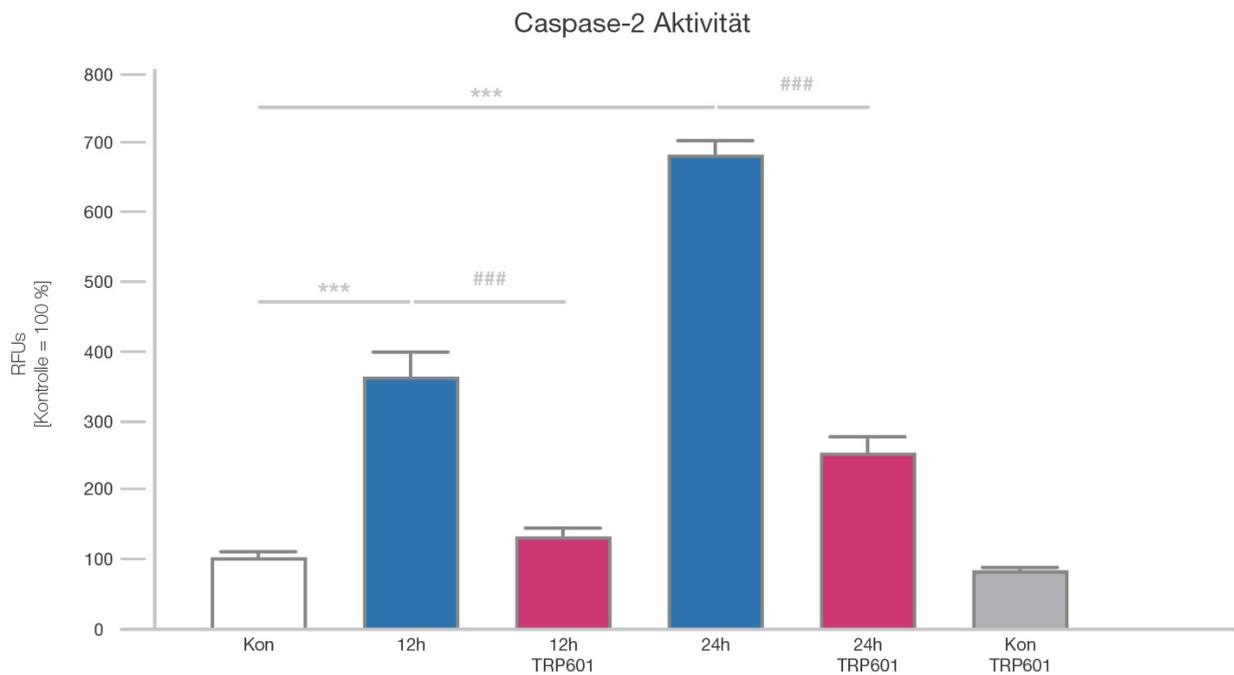


Abbildung 4.3: Nachweis der Caspase-2-Aktivität im Thalamus sechs Tage alter Ratten. Die Detektion der Caspase-2-Aktivität mittels des spezifischen Substrats VDVAD-AFC ergab eine signifikante Hochregulation der Caspase-2-Aktivität unter hyperoxischen Bedingungen. Die einmalige Behandlung mit TRP601 führte zu einer signifikanten Reduktion der Caspase-2-Aktivität (magentafarbene Balken). Die Balken stellen jeweils den Mittelwert \pm Standardfehler dar (Normoxie-Kontrollgruppe (Kon) = 100 %, n = 6 pro Gruppe, *** p<0.001, ### p<0.001, one-way-ANOVA).

Diese Ergebnisse konnten durch den Western Blot der prozessierten Caspase-2 verifiziert werden. Auch hier kommt es nach Hyperoxie-Exposition zu einem deutlichen Anstieg der Proteinexpression der aktiven Caspase-2, nach 12 Stunden auf 358 % und nach 24 Stunden auf 621 % (siehe blaue Balken, Abb. 4.4 B). Die einmalige Applikation von TRP601 zu Beginn der Hyperoxie-Exposition führt – in beiden gewählten Zeitstufen – zu einer signifikanten Reduktion der Proteinexpression der cCaspase-2 auf 167 % nach 12 Stunden bzw. 224 % nach 24 Stunden (siehe magentafarbene Balken, Abb. 4.4 B).

Unter normoxischen Bedingungen zeigt die TRP601-Applikation sowohl im Caspase-2-Aktivitätsassay als auch im Western Blot keinen signifikanten Effekt. Somit hat der Caspase-2-Inhibitor TRP601 anscheinend keinen Effekt auf die Caspase-2-Proteinexpression unter Normoxie (siehe graue Balken, Abb. 4.3 und 4.4 B).

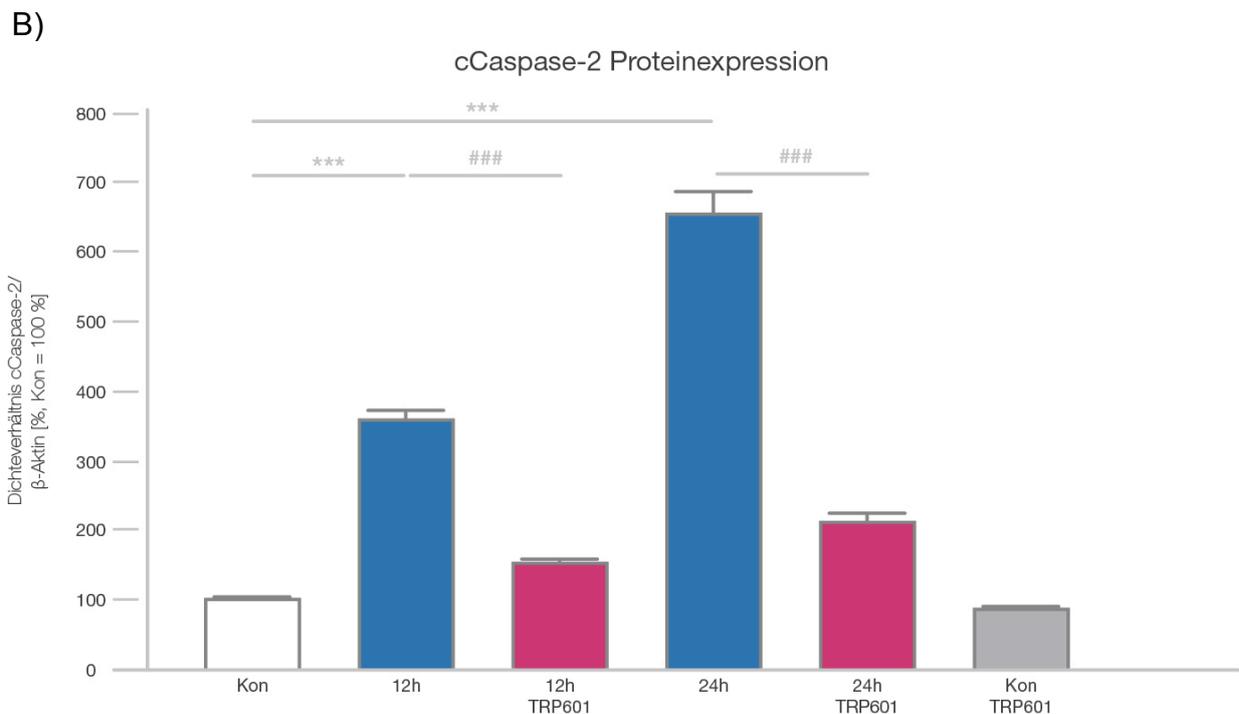
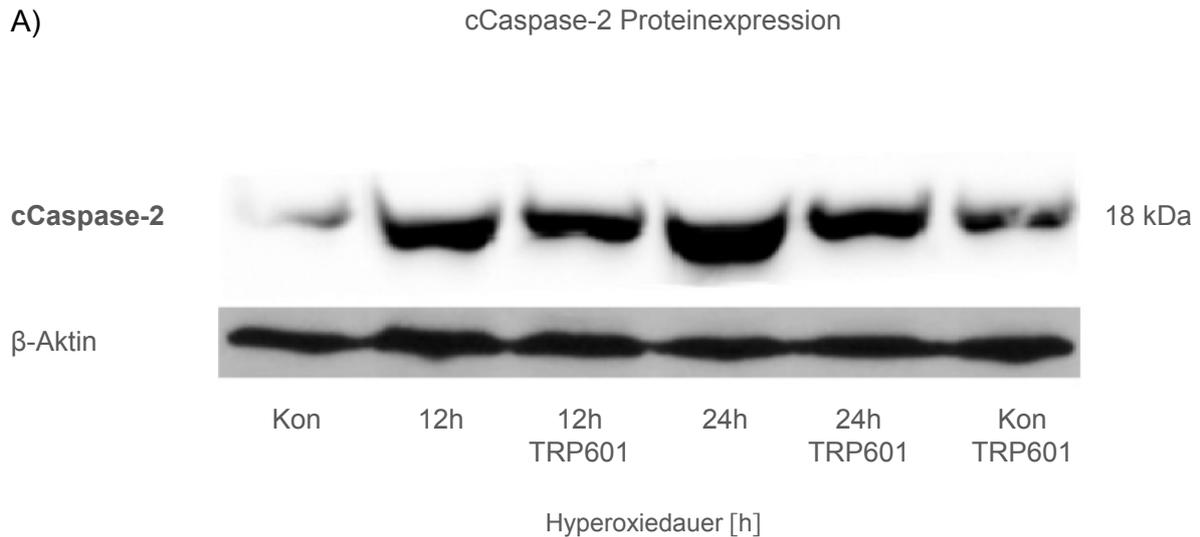


Abbildung 4.4: Expressionsnachweis prozessierter Caspase-2 im Thalamus sechs Tage alter Ratten. Der Caspase-2-Inhibitor TRP601 führt, unter Hyperoxie, zu einer Reduktion der Proteinexpression von cCaspase-2.

A) Repräsentative Western Blots für cCaspase-2 und das interne Standardprotein β-Aktin.

B) Die densitometrische Auswertung der cCaspase-2-Proteinexpression im Thalamus der neonatalen Ratten nach Hyperoxie zeigt einen signifikanten Anstieg im Vergleich zu den Normoxiegruppen (nach 12 Stunden auf 358 %, nach 24 Stunden auf 621 %). Nach Applikation von TRP601 kommt es bei den Hyperoxie-Tieren zu einer signifikanten Reduktion der cCaspase-2-Proteinexpression (auf 167 % nach 12 Stunden, auf 224 % nach 24 Stunden). Dargestellt sind die Mittelwerte des Dichteverhältnisses von cCaspase-2 normalisiert mit β-Aktin ± Standardfehler (Normoxie-Kontrollgruppe = 100 %, n = 8 pro Gruppe, *** p<0.001, ### p<0.001, one-way ANOVA). Die Grundlage der Auswertung bildet eine Serie von mindestens drei durchgeführten Blot-Experimenten.

4.3.2 Einfluss von TRP601 auf die Expression von Caspase-3 im Hyperoxiemodell

Bei der Effektorcaspase-3 handelt es sich um einen verlässlichen Biomarker für den apoptotischen Zelltod. Im Caspase-3-Aktivitätsassay, welcher eine hohe Sensitivität aufweist, konnte gezeigt werden, dass hyperoxische Bedingungen zu einem Anstieg der Effektorcaspase-3 führten. Bereits nach 12 Stunden Hyperoxiedauer wurde ein signifikanter Anstieg der Caspase-3-Aktivität auf 186 % verzeichnet. Ein noch deutlicherer Anstieg wurde bei den Versuchstieren mit 24-stündiger Hyperoxie-Exposition registriert (301 %, siehe Abb. 4.5).

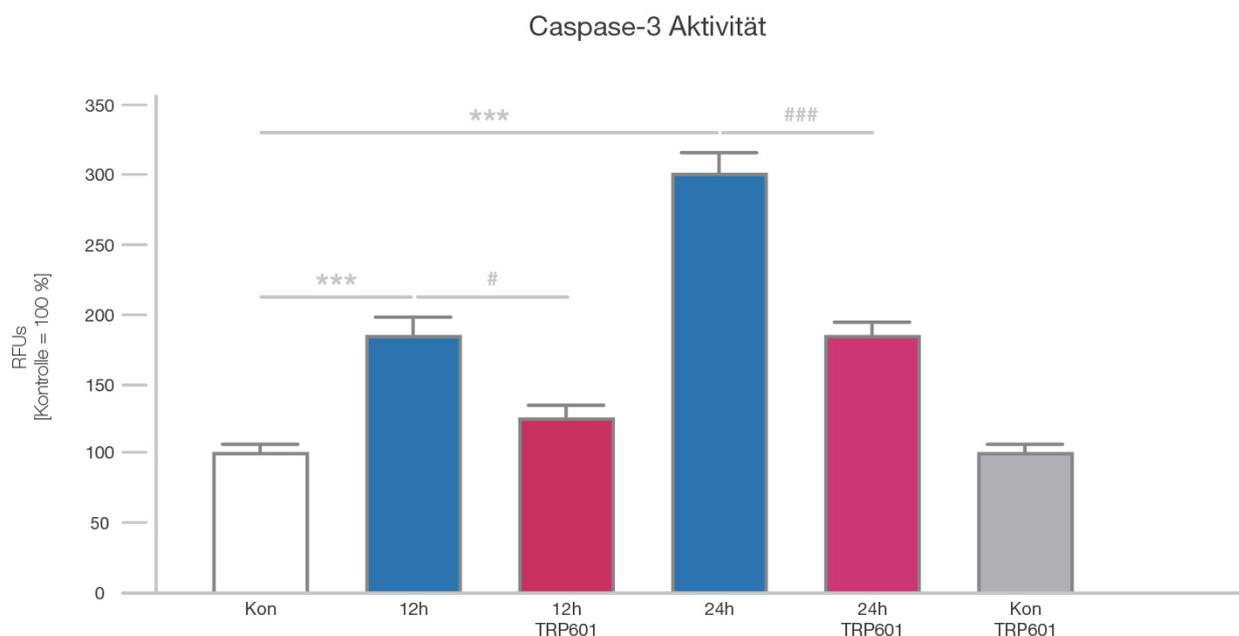


Abbildung 4.5: Bestimmung der Caspase-3-Aktivität mittels Aktivitätsassay im Thalamus sechs Tage alter Ratten. Der Nachweis der Caspase-3-Aktivität bei 460 nm – nach Hydrolyse von Ac-DEVD-AMC – ergab eine signifikante Hochregulierung der Caspase-3-Aktivität unter hyperoxischen Bedingungen. Wohingegen eine einmalige Applikation von TRP601 diese signifikant verringerte. Die Caspase-3-Aktivität erreichte nach 12 Stunden Hyperoxie + TRP601 das Niveau der Kontrollgruppe unter normoxischen Bedingungen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler (Normoxie-Kontrollgruppe = 100 %, n = 6 pro Gruppe, *** $p < 0.001$, # $p < 0.05$, ### $p < 0.001$, one-way ANOVA).

Bei den infantilen Ratten, denen unmittelbar vor der Hyperoxie-Exposition TRP601 injiziert wurde, konnte eine signifikante Reduktion der Caspase-3-Aktivität erreicht werden, wobei die Reduktion nach 24 Stunden (von 301 % auf 186 %) deutlicher als

nach 12 Stunden (von 186 % auf 128 %) ausfiel (siehe Abb. 4.5).

Die Tiere der Kontrollgruppen, die unter normoxischen Bedingungen gehalten wurden, weisen sowohl nach Applikation von TRP601 als auch von isotoner Kochsalzlösung eine nahezu gleiche Caspase-3-Aktivität auf (100 % zu 99 %). Die einmalige Anwendung von TRP601 hat somit keinen Einfluss auf die Caspase-3-Aktivität unter normoxischen Bedingungen (siehe grauer Balken, Abb. 4.5).

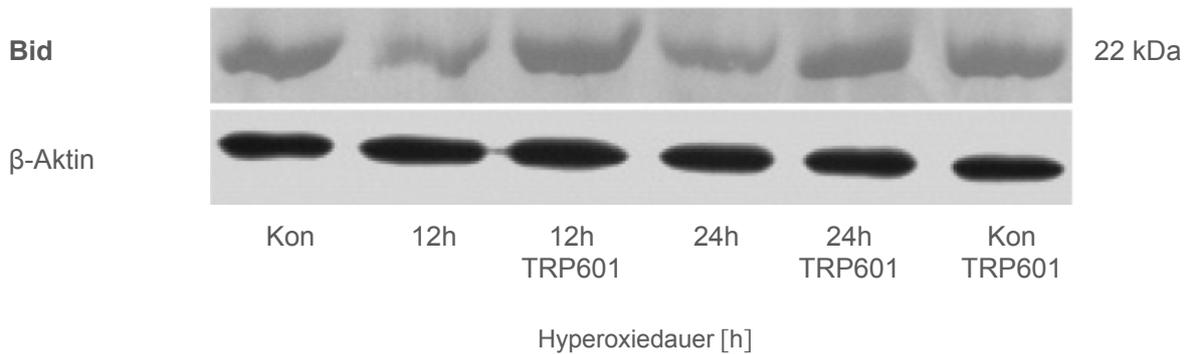
4.3.3 Die Proteinexpression von Bid nach Hyperoxie und Behandlung mit TRP601

Nach einem apoptotischen Todessignal führt die Aktivierung von Bid über mehrere Schritte zum Einbau einer kanalartigen Struktur in das Mitochondrium. Diese Pore ermöglicht die Diffusion verschiedenster Proteine in das Zytosol.

Der Einfluss des Sauerstoffgehalts in Höhe von 80 % auf das Protein Bid wurde im Gehirn von sechs Tage alten Ratten mittels Western Blot auf Proteinebene untersucht. Die Expressionsgehalte von Bid wurden mit denen der Kontrolltiere, die unter Normoxie gehalten wurden, verglichen (siehe Abb. 4.6).

A)

Bid Proteinexpression



B)

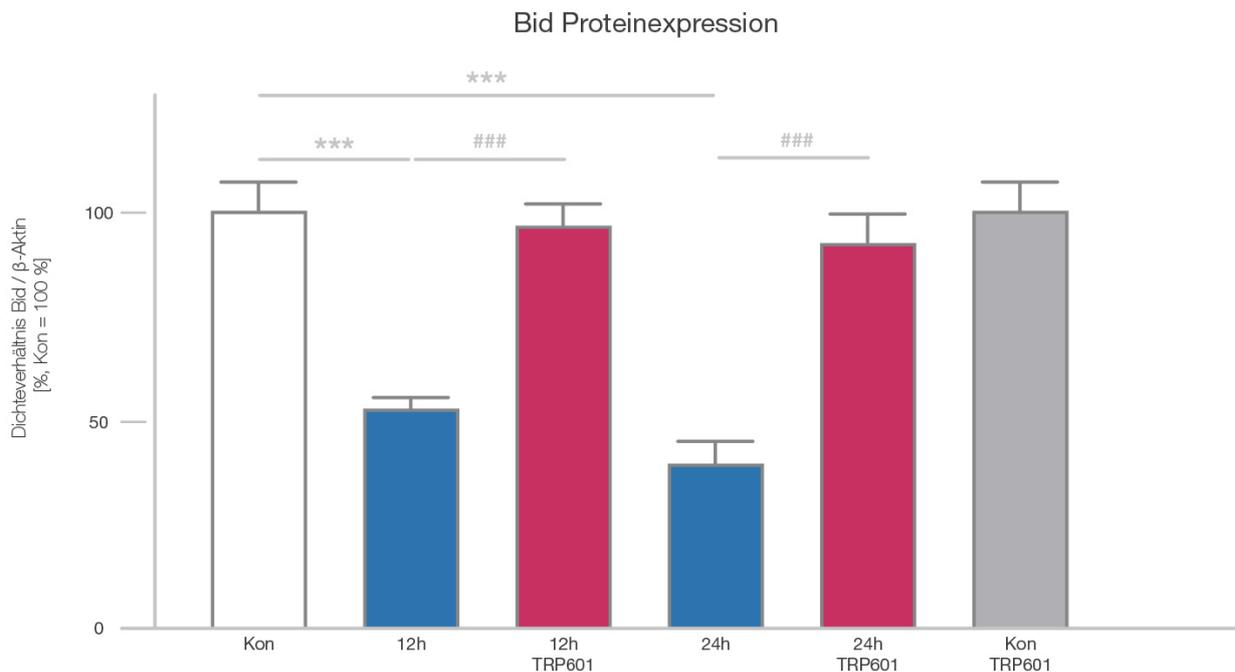


Abbildung 4.6: Expressionsnachweis von Bid im Thalamus sechs Tage alter Ratten.

A) Repräsentative Western Blots für Bid und das interne Standardprotein β -Aktin.

B) Hyperoxie führt zur Reduktion der Expression von Bid. Der Caspase-Inhibitor TRP601 führt, unter Hyperoxie, zu einer Zunahme der Proteinexpression von Bid. Die densitometrische Auswertung der Bid-Proteinexpression im Thalamus der neonatalen Ratten nach Hyperoxie zeigt eine Abnahme des Dichteverhältnisses der Banden im Western Blot im Vergleich zum internen Standardprotein β -Aktin. Nach Applikation von TRP601 kommt es zu einer signifikanten Zunahme trotz Hyperoxie. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler (Normoxie-Kontrollgruppe = 100 %, n = 8 pro Gruppe, in Relation zu den Tieren, die der Normoxie ausgesetzt waren, *** p<0.001, ### p<0.001, one-way ANOVA). Grundlage der Auswertung bildet eine Serie von mindestens drei durchgeführten Blot-Analysen.

Die Bande des Proteins Bid bei 22 kDa zeigt, nach 12 bzw. 24 Stunden Hyperoxie-Exposition, eine Abnahme der Bandenintensität im Thalamus in Relation zum internen Standardprotein β -Aktin (Abb. 4.6 A), was auf eine Spaltung und anschließende Aktivierung von Bid (tBid) hindeutet.

Die densitometrische Auswertung zeigt, dass sich die Proteinexpression von Bid in beiden Zeitstufen signifikant reduziert hat. Nach 12-stündiger Hyperoxie-Exposition hat sie sich nahezu halbiert (von 100 % auf 51 %) und nach 24 Stunden ist sie auf ca. ein Drittel gesunken (von 100 % auf 40 %, Abb. 4.6 B).

Nach der Behandlung der neonatalen Ratten mit TRP601 kommt es zu einer weitestgehenden Normalisierung der nichtaktivierten Form Bid. Dies bedeutet, dass man mit einer einmaligen Applikation des speziellen Caspase-2-Inhibitors trotz Hyperoxie-Exposition, in beiden Zeitstufen, nahezu die gleiche Bid-Proteinexpression erreicht wie bei den Tieren der Normoxie-Kontrollgruppe (magentafarbene Balken, Abb. 4.6 B).

Betrachtet man den grauen (101 %) sowie den weißen (100 %) Balken in Abbildung 4.6 B so wird deutlich, dass die Anwendung von TRP601 keinen Einfluss auf die Bid-Proteinexpression unter normoxischen Bedingungen hat.

4.3.4 Auswirkungen von Hyperoxie und TRP601 auf die Expression von Cytochrom c

Aufgrund der Lokalisation des Proteins Cytochrom c im Intermembranraum des Mitochondriums wurde in diesem Fall sowohl die mitochondriale als auch die zytosolische Zellfraktion mittels Western Blot nach Hyperoxie-Exposition untersucht.

Die Ergebnisse der Western Blot-Analysen zeigten, dass sich die Expression von Cytochrom c nach Hyperoxie-Exposition in beiden Fraktionen gegenläufig verhält. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Bande bei 12,6 kDa in der mitochondrialen Fraktion nach 12 und 24 Stunden, im Vergleich zur Normoxie-Kontrollgruppe, eine signifikante Dichteabnahme zeigt [100 % auf 27 % (12 h) bzw. von 100 % auf 21 % (24 h), siehe Abb. 4.7], wohingegen es bei der zytosolischen Fraktion zu einer signifikanten Zunahme der Pixelintensität in den beiden Zeitstufen kommt [von 100 % auf 247 % (12 h) bzw. von 100 % auf 386 % (24 h), siehe Abb. 4.7].

Die *in vivo*-Behandlung mit TRP601 wirkt regulierend auf diese Hyperoxie-induzierten Veränderungen in der Cytochrom c-Verteilung, in beiden Zellfraktionen, so dass das Niveau der Normoxie-Kontrollgruppe wieder annähernd erreicht wurde [mitochondriale Fraktion: von 27 % auf 82 % (12 h) bzw. von 21 % auf 67 % (24 h), zytosolische Fraktion: von 247 % auf 109 % (12 h) bzw. von 386 % auf 156 % (24 h), siehe magentafarbene Balken Abb. 4.7 B und 4.8 B].

Die densitometrische Analyse ergab weiterhin, dass in beiden Zellfraktionen keine signifikanten Unterschiede der Cytochrom c-Expression sowohl bei TRP601-behandelten Tieren als auch bei den Tieren, denen nur isotonische Kochsalzlösung verabreicht wurde, unter normoxischen Bedingungen auftraten (siehe weiße und graue Balken Abb. 4.7 B und 4.8 B), so dass die Applikation von TRP601 unter Normoxie keinen Einfluss auf die Cytochrom c-Proteinexpression hat.

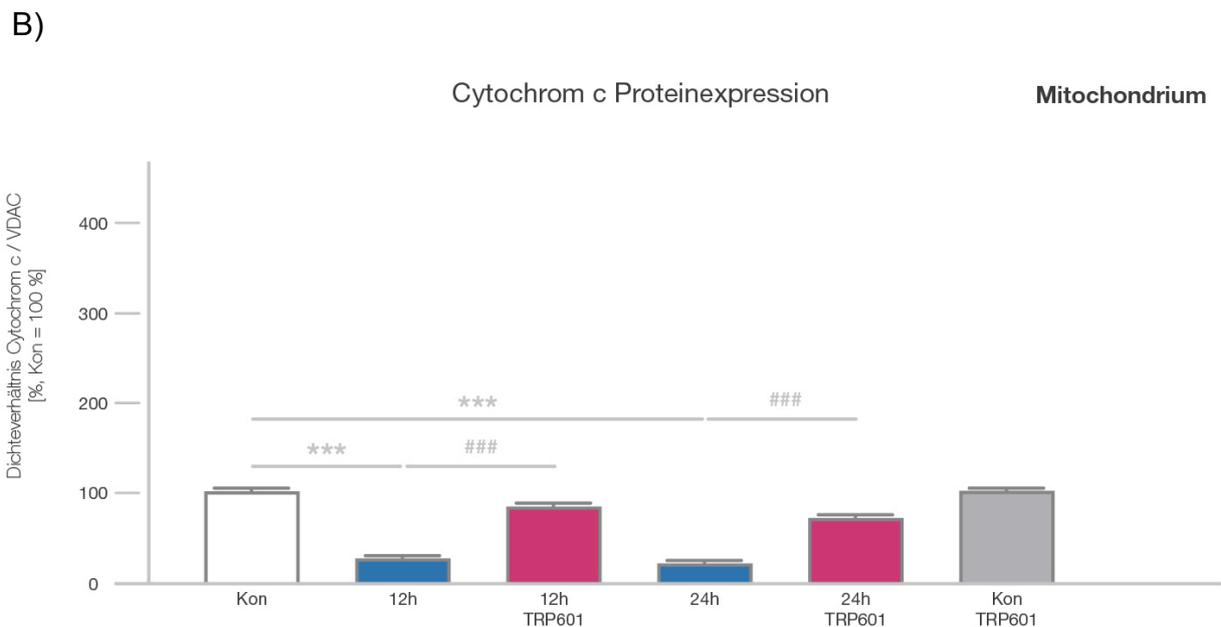
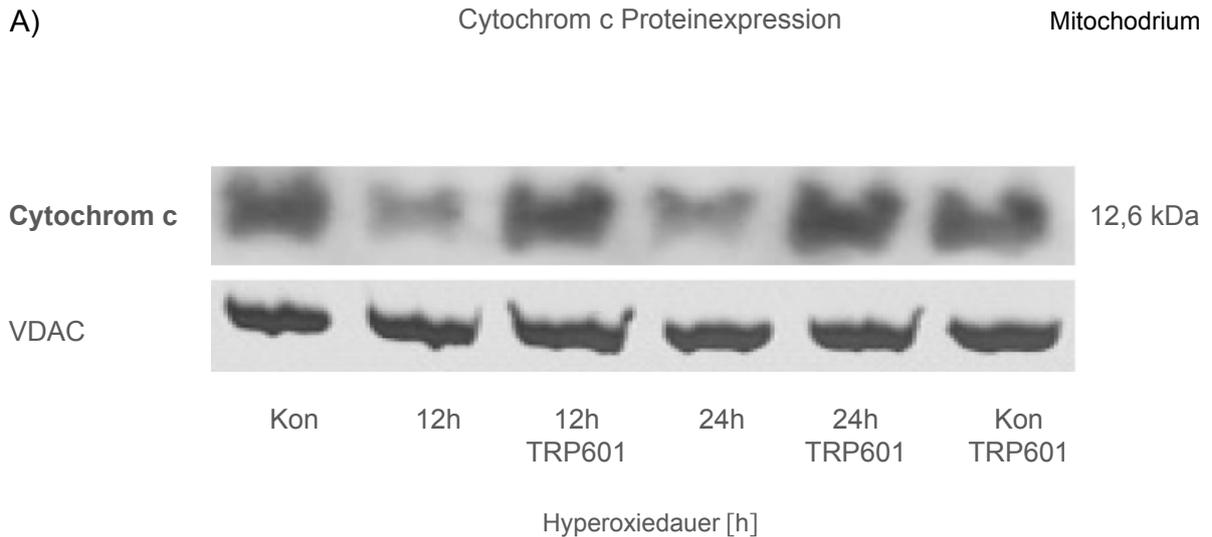


Abbildung 4.7: Expressionsnachweis von Cytochrom c in der mitochondrialen Fraktion des Thalamus sechs Tage alter Ratten.

A) Repräsentative Western Blots für Cytochrom c der mitochondrialen Fraktion und das interne Standardprotein VDAC.

B) Hyperoxie vermindert die Expression von Cytochrom c in den Mitochondrien. Der Caspase-Inhibitor TRP601 führt – unter Hyperoxie – zu einer signifikanten Zunahme der Proteinexpression von Cytochrom c im Mitochondrium. Die densitometrische Auswertung der Cytochrom c-Proteinexpression im Mitochondrium des Thalamus der sechs Tage alten Ratten nach Hyperoxie zeigt eine Abnahme des Dichteverhältnisses der Banden im Western Blot im Vergleich zum internen Standardprotein VDAC. Nach Applikation von TRP601 kommt es zu einem signifikanten Anstieg trotz Hyperoxie. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler (Normoxie-Kontrollgruppe = 100 %, n = 8 pro Gruppe, *** p<0.001, ### p<0.001, one-way ANOVA). Die Grundlage der Auswertung bildet eine Serie von mindestens drei durchgeführten Blot-Experimenten.

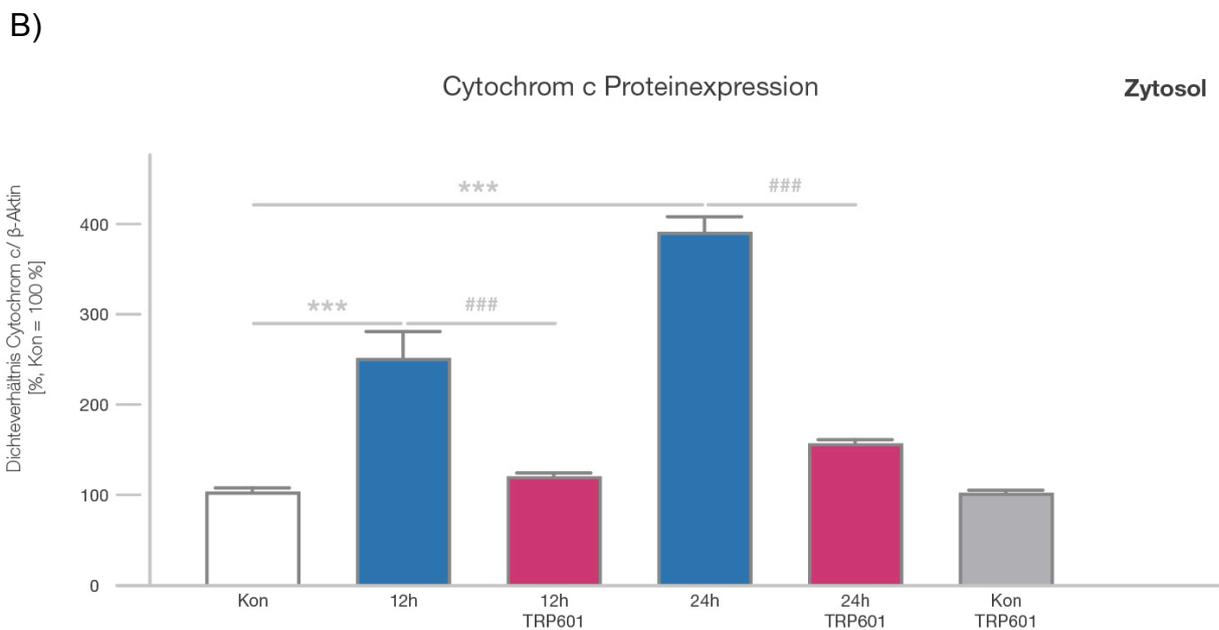
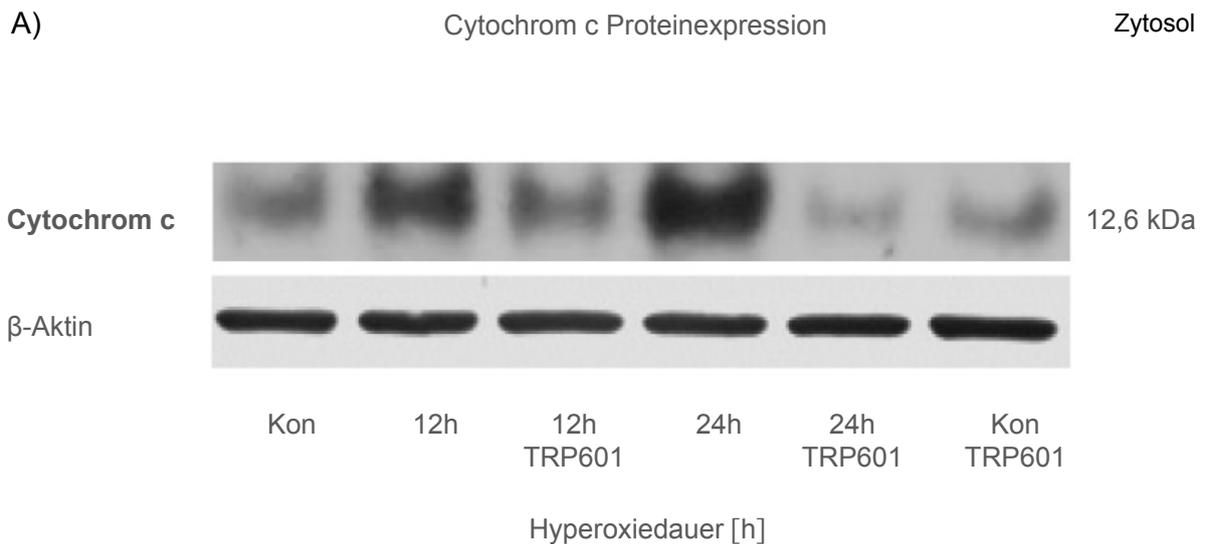


Abbildung 4.8: Expressionsnachweis von Cytochrom c in der zytosolischen Fraktion des Thalamus sechs Tage alter Ratten.

A) Repräsentative Western Blots für Cytochrom c der zytosolischen Fraktion und das interne Standardprotein β -Aktin.

B) Hyperoxie verstärkt die Expression von Cytochrom c im Zytosol. Der Caspase-Inhibitor TRP601 führt – unter Hyperoxie – zu einer signifikanten Abnahme der Proteinexpression von Cytochrom c im Zytosol. Die densitometrische Auswertung der Cytochrom c-Proteinexpression im Zytosol des Thalamus der neonatalen Ratten nach Hyperoxie zeigt einen Anstieg der Pixelintensität der Banden im Western Blot im Vergleich zum internen Standardprotein β -Aktin. Nach Applikation von TRP601 kommt es zu einer signifikanten Reduktion trotz Hyperoxie. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler (Normoxie-Kontrollgruppe = 100 %, n = 8 pro Gruppe, *** p<0.001, ### p<0.001, one-way ANOVA). Grundlage der Auswertung bildet eine Serie von mindestens drei durchgeführten Blot-Experimenten.

4.3.5 Die Proteinexpression von Apaf-1 nach Hyperoxie und Behandlung mit TRP601

Ebenfalls untersucht wurde der Einfluss der Hyperoxie und des Caspase-Inhibitors TRP601 auf die Proteinexpression von Apaf-1, einem wichtigen Bestandteil des Apoptosoms. Auch hier erfolgte die Untersuchung im Thalamus 6 Tage alter Han Wistar-Ratten mittels Western Blot im Vergleich zu den unter normoxischen Bedingungen gehaltenen Kontrolltieren.

Die Ergebnisse des Western Blots zeigten eine Dichtezunahme der Apaf-1-Proteinbande bei 135 kDa nach 12- und 24-stündiger Hyperoxie-Exposition (siehe Abb. 4.9 A).

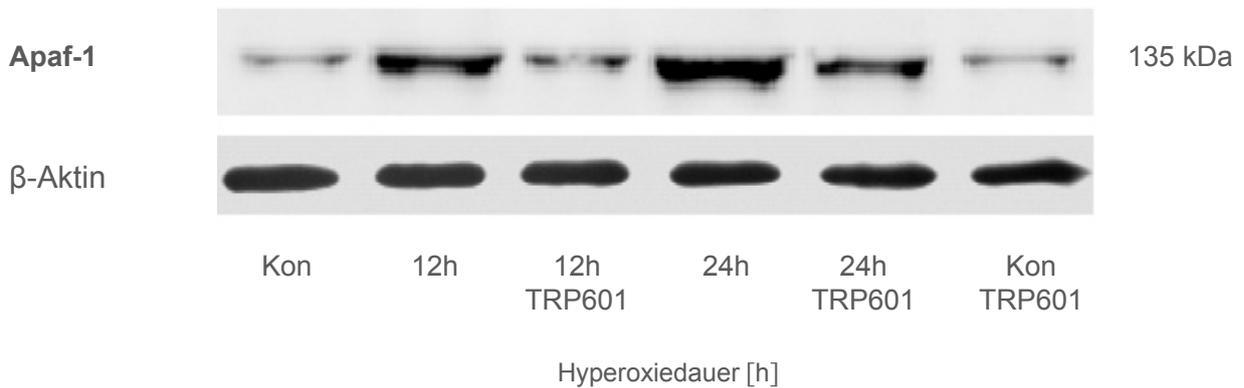
Die anschließende densitometrische Analyse machte deutlich, dass es zu einer signifikanten Hochregulation der Apaf-1-Proteinexpression in beiden untersuchten Zeitstufen kommt. Die Proteinexpression nach Hyperoxie zeigt ihr Maximum nach 12 Stunden und liegt mit 212 % etwas höher als bei den Tieren die 24 Stunden (209 %) 80%igem Sauerstoff ausgesetzt waren.

Dieser Effekt kann durch eine einmalige Applikation von TRP601 vor der Hyperoxie-Exposition signifikant gemindert werden [93 % (12 h) und 75 % (24 h), Abb. 4.9 B]. Nach 12 Stunden und vorangegangener Injektion von TRP601 kann die Proteinexpression von Apaf-1 auf das Niveau der Kontrolltiere gebracht werden (von 212 % auf 93 %, Abb. 4.9 B).

Die Behandlung mit TRP601 hat keinen Effekt auf die Expression von Apaf-1 unter normoxischen Bedingungen (100 % und 103 %, siehe weißer und grauer Balken in Abb. 4.9 B).

A)

Apaf-1 Proteinexpression



B)

Apaf-1 Proteinexpression

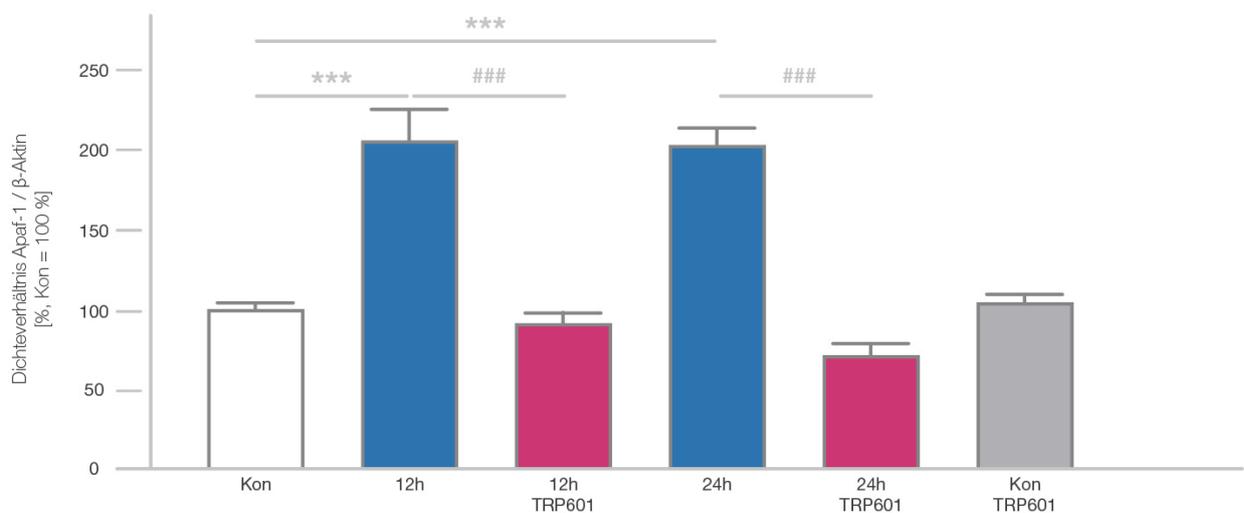


Abbildung 4.9: Expressionsnachweis von Apaf-1 im Thalamus sechs Tage alter Ratten. Hyperoxie verstärkt die Expression von Apaf-1 und der Caspase-Inhibitor TRP601 führt, unter Hyperoxie, zu einer Reduktion der Proteinexpression von Apaf-1.

A) Repräsentative Western Blots für Apaf-1 und das interne Standardprotein β -Aktin.

B) Die densitometrische Auswertung der Apaf-1-Proteinexpression im Thalamus der sechs Tage alten Ratten nach Hyperoxie zeigt einen signifikanten Anstieg der Dichteverhältnisse der Banden im Western Blot im Vergleich zum internen Standardprotein β -Aktin. Nach Applikation von TRP601 kommt es zu einer signifikanten Reduktion trotz Hyperoxie. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler (Normoxie-Kontrollgruppe = 100 %, n = 8 pro Gruppe, *** p<0.001, ### p<0.001, one-way ANOVA). Grundlage der Auswertung bildet eine Serie von mindestens drei durchgeführten Blot-Analysen.

4.3.6 Einfluss von TRP601 auf die Expression des anti-apoptischen Proteins Bcl-2

Die Mitglieder der Bcl-2-Superfamilie sind dafür bekannt, spezifische Regulatoren der Caspase-abhängigen als auch der Caspase-unabhängigen Apoptose zu sein und während der neonatalen Neurodegeneration reguliert zu werden. Aus diesem Grund wurde die Expression des anti-apoptischen Proteins Bcl-2 im Thalamus sechs Tage alter Ratten nach Hyperoxie mittels Western Blot bestimmt.

Durch Hyperoxie-Exposition kam zu einer Abnahme der Bcl-2-Expression. Die Banden bei 25 kDa zeigen bei den Tieren, die 12 Stunden der Hyperoxie ausgesetzt waren, dabei eine stärkere Abnahme im Vergleich zu den Kontrolltieren und in Relation zu β -Aktin (59 % (12 h) zu 41 % (24 h), siehe Abb. 4.10 A).

Die anschließende densitometrische Analyse konnte zeigen, dass es sich um eine signifikante Herunterregulation der Bcl-2 Proteinexpression in beiden untersuchten Zeitstufen handelt. Die Proteinexpression von Bcl-2 nach Hyperoxie zeigt ihr Minimum nach 24 Stunden mit 41 %, etwas geringer ausgeprägt ist es bei den Tieren, die 12 Stunden (59 %) 80%igem Sauerstoff ausgesetzt waren (siehe Abb. 4.10 B).

Die Effekte der Hyperoxie-Exposition können durch eine einmalige Applikation von TRP601 signifikant verändert werden [87 % (12 h) und 91 % (24 h) in Abb. 4.10 B]. Die Behandlung von TRP601 führt, in beiden Zeitstufen, nahezu zu einer Normalisierung (Erhöhung) der Bcl-2-Proteinexpression auf das Ausgangsniveau.

Die Analyse und densitometrische Quantifizierung der Proteinexpression durch Immunoblotting ergab keinen Effekt der Proteinexpression von Bcl-2 bei den mit TRP601-behandelten Normoxie-Tieren (siehe Abb. 4.10).

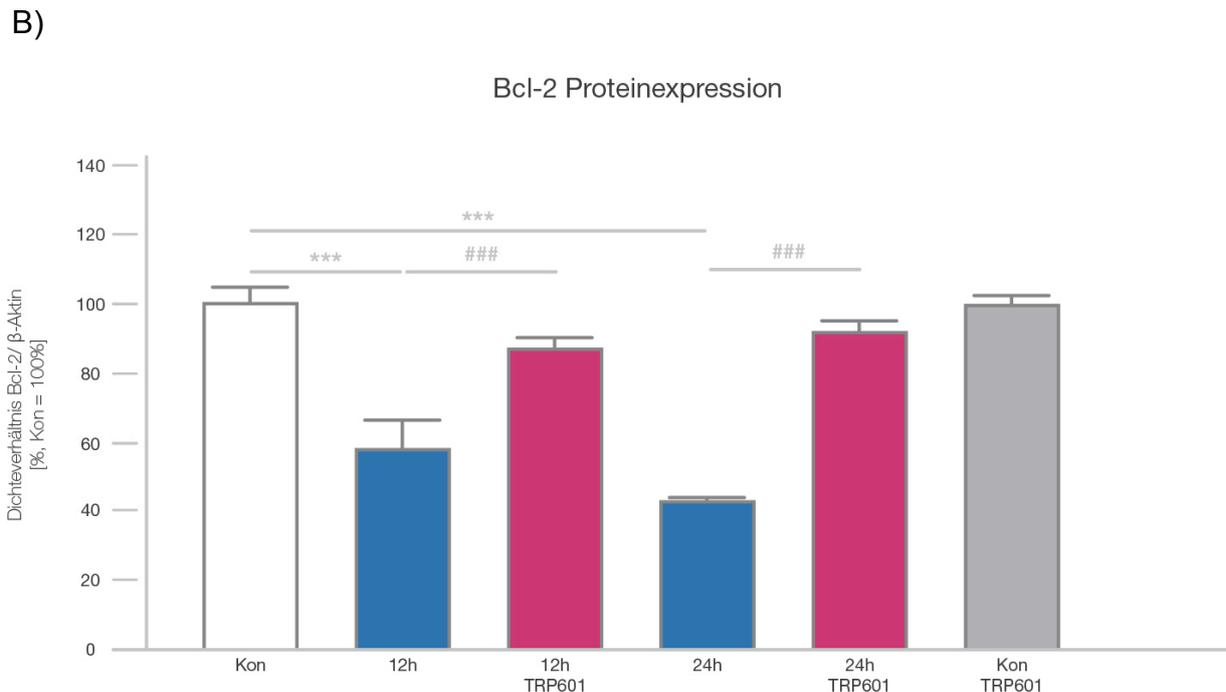
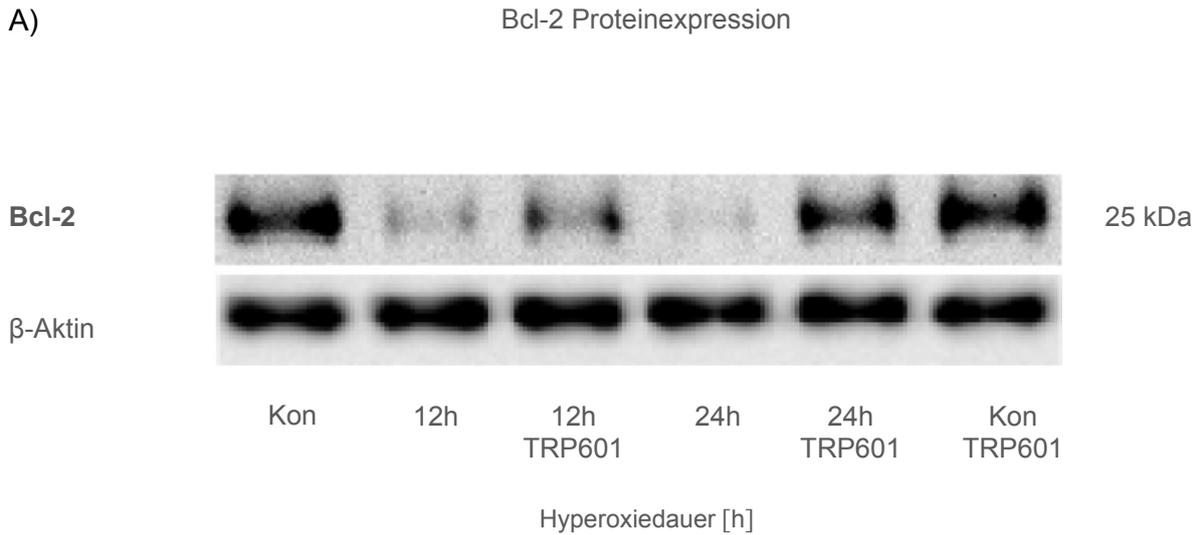


Abbildung 4.10: Expressionsnachweis von Bcl-2 im Thalamus sechs Tage alter Ratten. Hyperoxie führt zur Reduktion der Expression von Bcl-2. Der Caspase-Inhibitor TRP601 führt, unter Hyperoxie, zu einer Zunahme der Proteinexpression von Bcl-2.

A) Repräsentative Western Blots für Bcl-2 und das interne Standardprotein β -Aktin.

B) Die densitometrische Auswertung der Bcl-2-Proteinexpression im Thalamus der neonatalen Ratten nach Hyperoxie zeigte eine signifikante Abnahme des Dichteverhältnisses der Bcl-2-Banden im Western Blot im Vergleich zum internen Standardprotein β -Aktin. Nach Applikation von TRP601 kommt es zu einer signifikanten Zunahme trotz Hyperoxie. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler (Normoxie-Kontrollgruppe = 100 %, n = 8 pro Gruppe, *** p<0.001, ### p<0.001, one-way ANOVA). Grundlage der Auswertung bildet eine Serie von mindestens drei durchgeführten Blot-Analysen.

4.3.7 Auswirkungen von Hyperoxie und TRP601 auf die Expression von AIF

Die Apoptose folgt einer kontrollierten Abfolge zellinterner Prozesse, welche größtenteils Caspase-abhängig reguliert werden. Um festzustellen, ob der Caspase-Inhibitor TRP601 ausschließlich durch Hemmung der Caspase-vermittelten Apoptose regulierend wirkt, wurde zusätzlich ein Caspase-unabhängiger Apoptoseweg untersucht, welcher hauptsächlich über AIF vermittelt wird.

Die Ergebnisse des Western Blots zeigten bei 57 kDa eine Dichtezunahme der Proteinbande von AIF nach 12- und 24-stündiger Hyperoxie-Exposition (siehe Abb. 4.11 A).

In der densitometrischen Auswertung zeigte sich eine signifikante Zunahme der Proteinexpression von AIF in beiden Zeitstufen. Nach 12-stündiger Hyperoxie-Exposition hatte diese sich nahezu verdoppelt (von 100 % auf 220 %) und nach 24 Stunden war sogar ein Wert von 249 % zu verzeichnen (siehe blaue Balken, Abb. 4.11 B).

Nach der Behandlung der neonatalen Han Wistar-Ratten mit TRP601 kam es zu einer weitestgehenden Normalisierung (Reduzierung) der Proteinexpression von AIF. Mit einer einmaligen Applikation des Caspase-2-Inhibitors wurde trotz Hyperoxie-Exposition, in beiden Zeitstufen, nahezu die gleiche AIF-Proteinexpression erreicht wie bei den Tieren, die unter normoxischen Bedingungen gehalten wurden [110 % (12 h) und 100 % (24 h), siehe magentafarbene Balken in Abb. 4.11 B].

Dies lässt den Schluss zu, dass der Caspase-2-Inhibitor TRP601 auch auf die caspase-unabhängige, durch AIF-vermittelte Apoptose einen Einfluss hat. Auf die AIF-Expression unter normoxischen Bedingungen hat TRP601 dagegen keinen Einfluss (98 %, siehe grauer Balken Abb. 4.11 B).

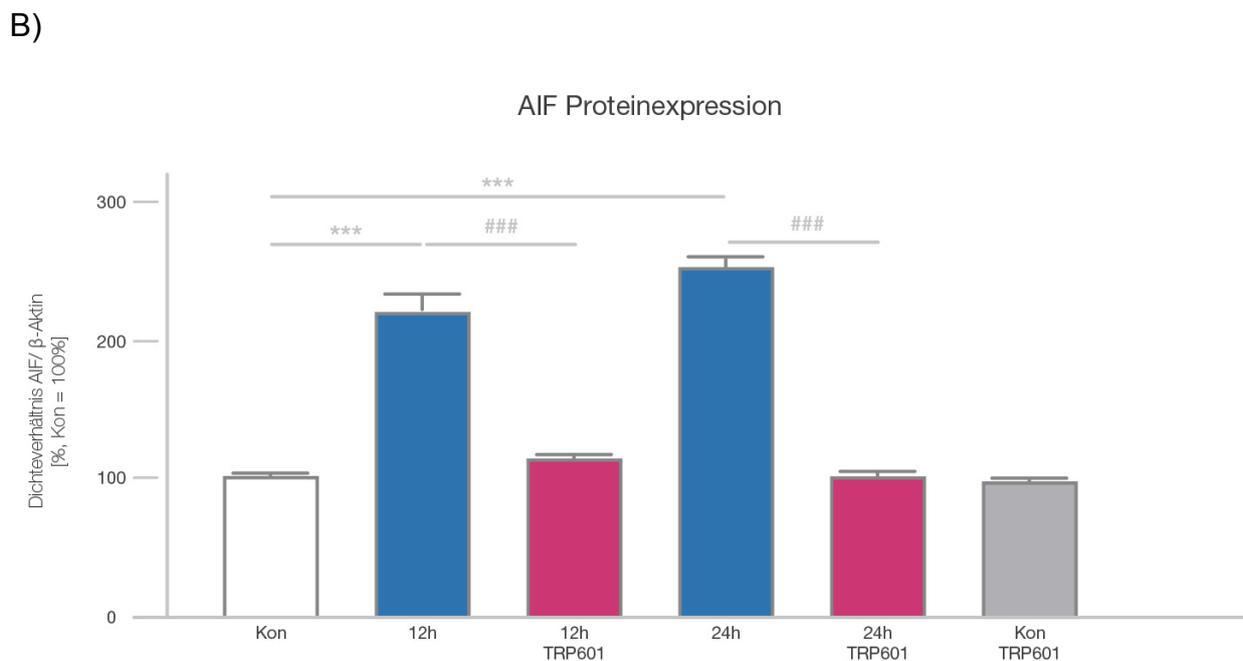
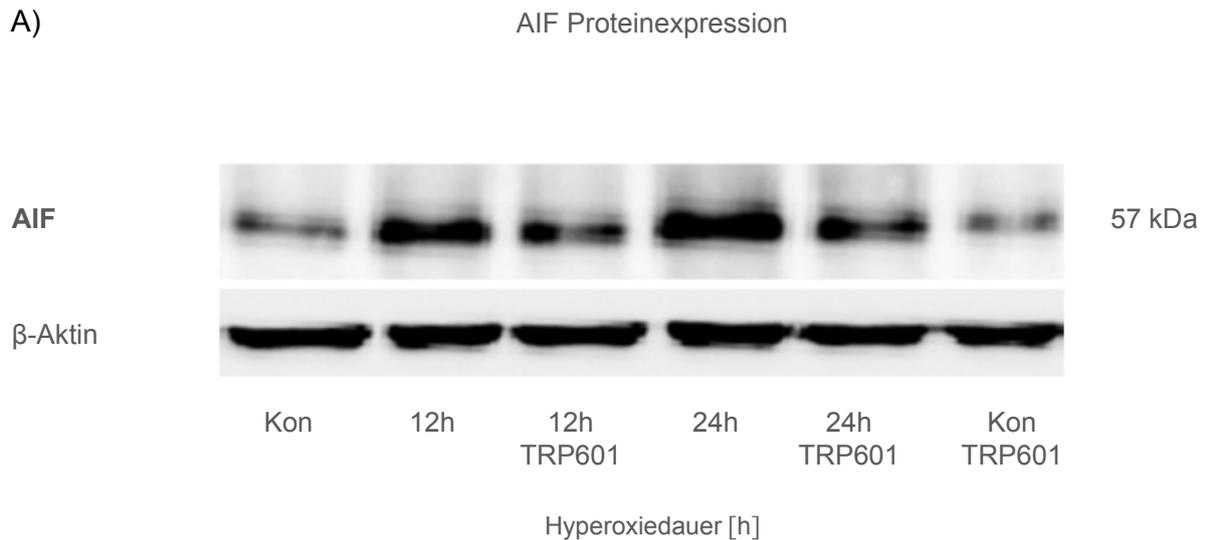


Abbildung 4.11: Expressionsnachweis von AIF im Thalamus sechs Tage alter Ratten. Hyperoxie führt zu einer Zunahme der Expression von AIF. Der Caspase-Inhibitor TRP601 führt, unter Hyperoxie, zu einer Reduktion der Proteinexpression von AIF.

A) Repräsentative Western Blots für AIF und das interne Standardprotein β-Aktin.

B) Die densitometrische Auswertung der AIF-Proteinexpression im Thalamus der neonatalen Ratten nach Hyperoxie zeigte einen signifikanten Anstieg des Dichteverhältnisses der AIF-Banden im Western Blot im Vergleich zum internen Standardprotein β-Aktin und nach Applikation von TRP601 eine signifikante Abnahme trotz Hyperoxie. Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardfehler (Normoxie-Kontrollgruppe = 100 %, n = 8 pro Gruppe, *** p<0.001, ### p<0.001, one-way ANOVA). Grundlage der Auswertung bildet eine Serie von mindestens drei durchgeführten Blot-Experimenten.

5 Diskussion

5.1 Allgemeine Betrachtung

Innerhalb des letzten Jahrzehnts wurde deutlich, dass eine erhöhte Konzentration von Sauerstoff entscheidend an der Pathogenese der neonatalen Hirnschädigung beteiligt ist, was im späteren Leben zu einer neurokognitiven Beeinträchtigung Frühgeborener führen kann.^{17,120} Daher ist es von großer klinischer Bedeutung, die Pathomechanismen der Neurotoxizität des Sauerstoffs in der vulnerablen Phase des Gehirnwachstums von Frühgeborenen genauer zu verstehen. Dies bietet eine mögliche Grundlage für eine medikamentöse Prävention der Neurodegeneration.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass bei 6 Tage alten Han Wistar-Ratten durch Hyperoxie-Exposition die rezeptor-vermittelte extrinsische Apoptose eingeleitet wird und sie somit zur Neurodegeneration führt.¹²¹ Andererseits ist das genaue Verständnis des intrinsischen Signalwegs noch weitestgehend ungeklärt. Von besonderem Interesse erscheint die Beteiligung der Initiatorcaspase-2 an der Induktion der intrinsischen Apoptose.

In der „brain growth spurt“-Periode ist das Gehirn besonders vulnerabel gegenüber unphysiologischen, exogenen Einflüssen und Therapien, da auch die antioxidativen Schutzmechanismen noch unterentwickelt sind.¹⁸ Aufgrund der ontogenetisch vergleichbaren Phase sechs Tage alter Wistar-Ratten mit dem Gehirn Frühgeborener wurde dieses Tiermodell gewählt, um die neuroprotektive Wirkung des Caspase-2-Inhibitors TRP601 trotz einer erhöhten Sauerstoffkonzentration von 80 % aufzuzeigen.

Die Inhibition von Caspasen scheint eine vielversprechende Strategie zur Neuroprotektion in der Neonatologie zu sein. Um den Einfluss von spezifischen Caspasen auf das sich entwickelnde Gehirn zu beurteilen, wurde in dieser Arbeit der kürzlich entwickelte Pentapeptid-basierte-Gruppe-II-Caspase-Inhibitor (5-(2,6-difluorophenoxy)-3(R,S)-(2(S)-(2(S)-(3-methoxycarbonyl-2(S)-(3-methyl-2(S)-((quinoline-2-carbonyl)-amino)-butyrylamino)propionylamino)3-methylbutyryl-amino)propionylamino)-4-oxo-pentanoic acid methyl ester, TRP601) verwendet.

Mittels Western Blots, Aktivitätsassays und Fluoro-Jade B-Färbungen konnte hier gezeigt werden, dass erhöhte Sauerstoffkonzentrationen (Hyperoxie) zu einer

deutlichen Zunahme der Proteinexpression der prozessierten Caspase-2 im Gehirn neonataler Han Wistar-Ratten führten. Als Folge kommt es zu der Initiierung der intrinsischen Apoptose mit Hochregulation des Apoptose-Protease aktivierenden Faktors-1 (Apaf-1) und des Apoptose-induzierenden Faktors (AIF) und einer gleichzeitigen Translokation von mitochondrialem Cytochrom c in das Zytosol. Zudem werden die Expression des anti-apoptotischen Proteins B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) und des BH3-interacting domain death agonists (Bid) signifikant reduziert. Dies hat eine Erhöhung der Caspase-3-Aktivität und die entsprechende Neurodegeneration zur Folge. Die einmalige intraperitoneale Gabe des Caspase-2-Inhibitors TRP601 kurz vor Beginn der Hyperoxie kann hingegen den induzierten Zelltod im unreifen Gehirn der neonatalen Ratte signifikant verringern.

Die Hyperoxie-vermittelte Neurodegeneration ist u.a. durch die intrinsische Apoptose vermittelt, somit ist die Entwicklung eines speziellen Caspase-Inhibitors eine vielversprechende und nützliche neuroprotektive Präventions- bzw. Therapieoption in der Neonatologie.

5.2 Die Hyperoxie-induzierte Caspase-Aktivierung wird durch TRP601 reduziert

Caspase-2 konnte als Initiatorcaspase der neuronalen Apoptose, während der β -Amyloid-vermittelten neuronalen Toxizität, bei Serumentzug oder bei der durch oxidativen Stress induzierten Apoptose von neuronalen Stammzellen, identifiziert werden.¹²²⁻¹²⁴

Mit denen in dieser Arbeit durchgeführten Tierexperimenten konnte gezeigt werden, dass die Hyperoxie-Exposition zu einer Erhöhung der Caspase-2-Aktivität führt. Durch die Applikation des Caspase-2-Inhibitors, kurz vor der Zufuhr von 80%igem Sauerstoff, konnte die Caspase-2-Aktivierung signifikant reduziert werden.

Bereits frühere Studien zeigten eine erhebliche Toxizität erhöhter Sauerstoffkonzentration in verschiedenen Tiermodellen. Diese wird deutlich durch eine Erhöhung der Caspase-3-Aktivität im Gehirn der Hyperoxie-behandelten Tiere.^{121,125}

Die tierexperimentellen Studien dieser Arbeit bestätigen diese Ergebnisse. Eine Behandlung mit TRP601 kurz vor der Hyperoxie-Exposition führte zu einer deutlichen Minderung der enzymatischen Aktivität von Caspase-3 und somit zu einer Reduktion der Neurodegeneration im neonatalen Rattengehirn. Auch konnten diese Ergebnisse

zeigen, dass die Applikation des Caspase-Inhibitors keinen Effekt auf die physiologische Apoptose hat.

Die erhaltenen Ergebnisse der vollzogenen *in vivo*-Experimente erlauben die Annahme, dass die Wirkung von TRP601 bereits in der der Caspase-3 vorgeschalteten Signalkaskade zum Tragen kommt.¹¹⁸⁻¹²⁰ Dies wird unterstützt durch frühere Berichte über *in vitro*- und *in vivo*-Studien, in denen eine Caspase-2-Modulation mit siRNA und Caspase-2 defizienten Mäusen die Inhibition der Caspase-3-Aktivität zur Folge hatte.¹²⁶⁻

128

5.3 TRP601 führt zu einer Reduktion des neuronalen Zelltods im sich entwickelnden Gehirn

Durch die Exposition mit 80%igem Sauerstoff über eine Dauer von 24 h kommt es zu einer Erhöhung der Zelltodrate im sich entwickelnden Gehirn (P6) von Han Wistar-Ratten (Abb. 4.1 und 4.2).

In früheren Studien wurde gezeigt, dass der Hyperoxie-induzierte Zelltod morphologische Merkmale der physiologischen Apoptose zeigt. Diese treten disseminiert im gesamten unreifen Rattenhirn auf und sind abhängig vom Alter der Versuchstiere. Am stärksten ausgeprägt sind diese Veränderungen im Gehirn der neonatalen Ratte in der ersten Lebenswoche.^{17,125} Die intraperitoneale Applikation von 1 mg/kg/KG TRP601 kurz vor Beginn der Hyperoxie-Exposition führt zu einer signifikanten Abnahme des Zelltodes im Gehirn bei neonatalen Ratten. Die Zelltodraten der Tiere, die bei Normoxie gehalten wurden und denen TRP601 appliziert wurde, entsprechen dabei denen der Vehikel-behandelten Kontrolltiere. Somit beeinflusst TRP601 die physiologische Apoptose nicht und hat keine negativen Auswirkungen ohne die schädigende Noxe Hyperoxie.

Dieser Effekt zeigt eine mögliche Therapieoption von TRP601 in der Neonatologie als neuroprotektives Medikament. Im Einklang mit diesen Ergebnissen wurde eine neuroprotektive Wirkung von Apoptose-modulierenden Stoffen in verschiedenen neonatalen tierexperimentellen *in vivo*- und *in vitro*-Modellen berichtet.^{126,128,129}

Die Arbeitsgruppe Chauvier et al. konnte zeigen, dass eine einmalige Applikation von TRP601 das neonatale Hirn vor Excitotoxizität und Hypoxie-Ischämie schützt. Das

Zeitfenster der Applikation beträgt 6 Stunden und auch hier konnte kein Einfluss auf die physiologische Apoptose nachgewiesen werden.¹²⁸

Eine weitere neuroprotektive Strategie ist die Inhibition von p53 durch Pifithrin- μ . Hier kommt es bei Rattenjungen trotz neonataler Hypoxie-Ischämie zu einem verbesserten neurosensorischen Outcome und zu einer Verringerung der Hirnschädigung.¹²⁹

5.4 TRP601 hemmt den intrinsischen Signalweg der Apoptose

Die prozessierte Caspase-2 induziert die *Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization* (MOMP), dies wiederum führt zur Ausschüttung verschiedener pro-apoptotischer Mediatoren aus den Mitochondrien. Es kommt u.a. zu einer Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien in das Zytosol.¹³⁰⁻¹³²

Eine Schlüsselstelle in diesem mitochondrial-vermittelten Apoptoseweg stellt die Interaktion der Mitglieder der Bcl-2-Familie dar. Die Mitglieder der Bcl-2-Familie regulieren die Integrität der äußeren Mitochondrienmembran und somit den intrinsischen Apoptosesignalweg. Dabei ist das Verhältnis von pro- und anti-apoptotischen Faktoren entscheidend für den Ablauf des programmierten Zelltodes.¹³³

Zur weiteren Aufklärung der beteiligten Mechanismen an der Reduktion des neuronalen Zelltods durch TRP601 wurde die Proteinexpression von Cytochrom c, Bid und Bcl-2 nach Hyperoxie-Exposition und vorangegangener TRP601-Behandlung visualisiert.

Die hier dargelegten Resultate zeigen unter Hyperoxiebedingungen, dass es zu einer Translokation von Cytochrom c aus dem Intermembranraum der Mitochondrien in das Zytosol kommt. Dadurch kommt es zur Veränderung des Membranpotentials, zu Störungen im Elektronentransport und der Freisetzung von Ca^{2+} .¹³⁴ Zudem nehmen die Proteinexpressionen von Bid und des anti-apoptotischen Bcl-2 signifikant ab. Diese Studie zeigte, dass die einmalige intraperitoneale Applikation des Caspase-2-Inhibitors TRP601 diese Hyperoxie-induzierten Änderungen zu modulieren vermag.

Die Abnahme der Bcl-2-Proteinexpression könnte zu einer Verlagerung zwischen pro- und anti-apoptischen Mitgliedern der Bcl-2-Familie zu Gunsten der Apoptose führen und induziert die Freisetzung von Cytochrom c, möglicherweise durch die Aktivierung von Bid und des porenbildenden Proteins Bax.¹³⁵ Allerdings muss der zugrunde liegende Mechanismus, wie TRP601 die Bcl-2-Expression ‚stabilisiert‘ und somit eine Reduktion – trotz Hyperoxie – vermieden werden kann, durch künftige Untersuchungen geklärt

werden, wobei der genaue Mechanismus noch kontrovers diskutiert wird. Es sind mehrere Modelle vorgeschlagen worden, in denen das pro-apoptotische aktivierte Bid (tBid) und das anti-apoptotische Bcl-2 interagieren.^{136,137}

Apaf-1 ist ein Kernbestandteil des Apoptosoms und somit maßgeblich an der intrinsischen Kaskade der Apoptose beteiligt. Im sich entwickelnden Gehirn ist Apaf-1 ein Regulator von neuronalen Vorläuferzellen.^{130,138} Bemerkenswert ist, dass im vorliegenden Modell der Sauerstofftoxizität bei neonatalen Ratten, die Apaf-1-Proteinexpression unter hyperoxischen Bedingungen signifikant ansteigt und eine einmalige Behandlung mit TRP601 diese Hochregulation mindert. Somit scheint Apaf-1 an dem Prozess der Neuroprotektion durch TRP601 beteiligt zu sein.

Interessanterweise zeigt ein Nagetier-Modell der neonatalen hypoxisch-ischämischen Hirnschädigung, dass die Hemmung des Apaf-1-Signalweges bei mitochondrialer Schädigung zu einer Neuroprotektion führt.¹³⁹

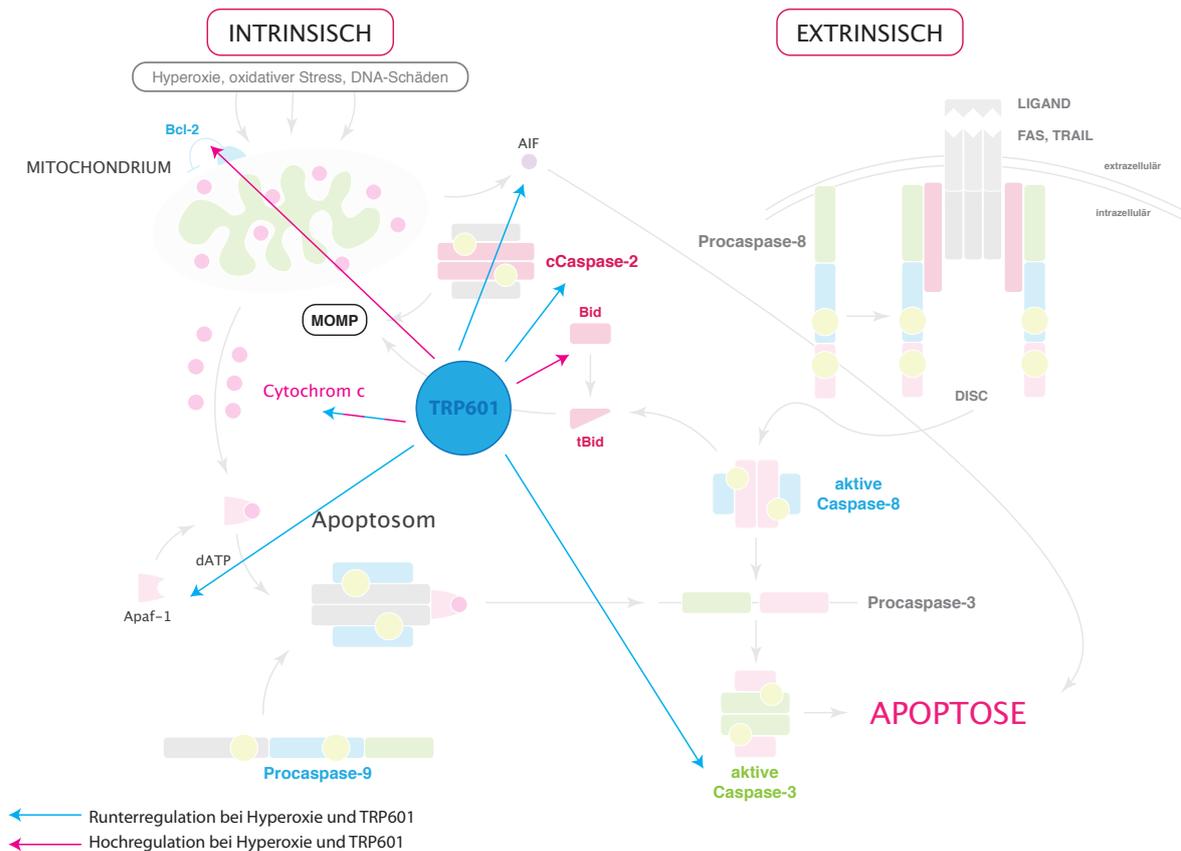


Abbildung 5.1: Die Wirkung von TRP601 auf die Proteine der intrinsischen Apoptose. Trotz Hyperoxie kommt es zu einer Reduktion der Proteinexpression des zytosolischen Cytochrom cs, Apaf-1 und AIF. Das anti-apoptotische Protein Bcl-2 und Bid werden verstärkt exprimiert. Die Aktivität der Caspase-2 und der Effektorcaspase-3 sind auf das Niveau der bei Normoxie gehaltenen Tiere herunterreguliert.

5.5 Hyperoxie führt zur Freisetzung von AIF in das Zytosol

Beim AIF handelt es sich um ein Flavoprotein, welches an der DNA-Degradation im Zellkern beteiligt ist.⁸² Es wurde als erstes Protein entdeckt, dass Caspase-unabhängig den programmierten Zelltod reguliert.⁸³ AIF wird proteolytisch aus dem Intermembranraum des Mitochondriums in das Zytoplasma freigesetzt. Von da gelangt es in den Zellkern und induziert dort die typischen Vorgänge der Apoptose.^{83,140} AIF spielt eine Schlüsselrolle in der Vermittlung der Apoptose bei Ischämien, neurodegenerativen Erkrankungen und bei einigen Krebserkrankungen.⁸⁴

Kürzlich wurde jedoch die Existenz eines AIF-Pools an der äußeren mitochondrialen Membran (zytosolische Seite) beschrieben, welche ebenfalls die Fähigkeit besitzt leicht in den Zellkern zu translozieren.¹⁴¹

In den vorgelegten Untersuchungen konnte eine signifikante Hochregulation der zytosolischen Proteinexpression von AIF gezeigt werden, die von einer einzigen Behandlung mit TRP601 nahezu völlig blockiert wurde. Somit hat der Caspase-2-Inhibitor TRP601 auch einen Einfluss auf das caspase-unabhängig agierende Protein AIF.

In vivo-Studien zeigen konsequent, dass ein AIF-Targeting eine große Wirkung auf Neuronen hat. AIF kann nützlich oder schädlich für Neuronen sein, abhängig vom physiologischen Zustand.^{142,143}

Zum heutigen Zeitpunkt ist dies der erste Bericht, der die direkten und indirekten Auswirkungen der Hyperoxie im sich entwickelnden Nagergehirn erläutert, mit dem besonderen Augenmerk auf die intrinsische Apoptose und eine vielversprechende neuroprotektive Substanz (TRP601). Die vorliegenden Studien zeigen, dass die prozessierte Caspase-2 wohl eine wesentliche Rolle im mitochondrialen Signalweg der Apoptose spielt und TR601 die Initialisierung von MOMP verhindern kann.

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse der vorgestellten Arbeit daraufhin, dass eine medikamentöse Beeinflussung sowohl der Caspase-2 als auch der Caspase-3 eine Präventions- bzw. Therapieoption darstellt, um so die Neurodegeneration durch eine Hyperoxie-induzierte Schädigung im sich entwickelnden Gehirn begrenzen zu können. Diese Resultate sind von großer Bedeutung aus klinischer Sicht, da eine Sauerstoffverabreichung bei Früh- und Neugeborenen oft unvermeidlich ist und es aktuell noch an vielversprechenden Kandidaten zur neuroprotektiven Prävention bzw. Therapie in diesem Zusammenhang mangelt.

5.6 Ausblick

Trotz erheblicher Fortschritte in der medizinischen Behandlung Frühgeborener gehen die sinkenden Mortalitätsraten noch immer mit einem hohen Anteil neurologischer Folgeschäden einher. Hierbei konnten in der Vergangenheit diverse Schädigungsmechanismen, aber auch mögliche protektive Faktoren in der vulnerablen

Phase des neonatalen Gehirns exploriert werden.¹¹⁻¹²

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass es durch den Einsatz des Caspase-2-Inhibitors TRP601, trotz der Hyperoxie-Exposition der neonatalen Ratte, zu einer Herunterregulierung der Expression Apoptose-induzierender Proteine kommt. Als Folge daraus ergibt sich die Reduktion der Caspase-3-Aktivität, einem Biomarker für den neuronalen Zelltod.

Aus diesem Grund scheint TRP601 eine Substanz zu sein, deren Einsatz für die Neuroprotektion in der Neonatologie deutliche Behandlungserfolge versprechen könnte.

Durch die Applikation des Caspase-Inhibitors TRP601 konnte hier eine sinkende Neurodegenerationsrate trotz Hyperoxie nachgewiesen werden. Jedoch muss die Frage geklärt werden, ob dies auch eine Verbesserung des neuronalen Outcomes der Frühgeborenen zur Folge hat. Joly et al. konnten zeigen, dass es in Arbeiten mit einem neonatalen Hypoxie-Ischämie-Modell der Ratte zu keiner Verbesserung im klinischen Outcome nach Gabe des Caspase-Inhibitors BAF (Boc-Aspartat-Fluoromethyl-Keton) kam.¹⁴⁴ Es gilt zu prüfen, ob sich dies auch im Hyperoxiemodell bestätigt werden kann.

Frühgeborene werden aufgrund der Unreife häufig auch länger als 24 Stunden beatmet. Eine weitere Überlegung sollte sein, ob die Applikationshäufigkeit von TRP601 bei länger anhaltender „Hyperoxiedauer“ erhöht werden muss.

Grundsätzlich müssen Verhaltenstests durchgeführt werden, um zu prüfen, ob sich das Tiermodell auf den Neonaten übertragen lässt. Auch sollte geklärt werden, ob die Applikation von TRP601 zu Nebenwirkungen in anderen Organen führt. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Applikation von TRP601 keinen Einfluss auf die physiologische Apoptose hat.

Langzeitstudien stehen zu diesen Fragestellungen noch aus und sind von großer Bedeutung. Die Antwort kann nur eine intensivere Auseinandersetzung mit dieser Thematik liefern. Weitere Erforschungen der Mechanismen im unreifen Gehirn sind obligat, um die oben genannten Fragen klären zu können und einen eventuell schädigenden Nebeneffekt von Caspase-Inhibitoren zu vermeiden.

6 Verzeichnis wiederkehrender Abkürzungen

Ac-DEVD-AMC	Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-7-amido-4-methylcoumarin
Ac-VDVAD-AFC	Acetyl-Val-Asp-Val-Ala-Asp-7-amino-4-trifluoro-methylcoumarin
AFC	7-amino-4-trifluoromethyl-cumarin
AIF	Apoptosis Inducing Factor
APAF-1	apoptotic protease activation factor-1
AMC	Amido-4-methylcoumarin
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
Bax	Bcl-2-assoziiertes X-Protein
BCA	Bicinchoninsäure
Bcl-2	B-cell lymphoma-2
Bid	BH3 Interacting Domain Death Agonist
BPD	bronchopulmonale Dysplasie
BSA	bovine serum albumin
CARD	caspase-activation and recruitment domain
cCaspase-2	cleaved Caspase-2
ced	cell death abnormal
CRD	cysteine-rich domain
CrmA	cytokine response modifier A
Cu ²⁺	zweiwertige Kupferionen
(d)ATP	Desoxyadenosintriphosphat
DD	death domain
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DED	death effector domain
DISC	death-inducing signalling complex
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonucleid acid
ECL	enhanced chemiluminescence
EK	Elektrophorese-Kammer

ELBW	extremely low birth weight
FADD	fas-associated death domain
FasL	Fas-Ligand
FasR	Fas-Rezeptor
GG	Geburtsgewicht
HIV	Humane Immundefizienz-Virus
ICE	Interleukin-1-converting Enzym
i.p.	intraperitoneal
kDa	Kilodalton
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
Kon	Kontrolle
mA	Milliampere
MOMP	mitochondrial outer membrane permeabilization
NaCl	Natriumchlorid
NEC	nekrotisierende Enterokolitis
NGF	nerve growth factor
O ₂	Sauerstoff
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	polymerase Chain Reaction
PCR-H ₂ O	membrangefiltertes und autoklaviertes Wasser
PBS	phosphate buffered saline
PMSF	Phenylmethylylsulfonylfluorid
RFU	Fluoreszenzeinheiten
ROP	retinopathy of prematurity
ROS	reactive oxygen species
RT	Raumtemperatur
SDS-PAGE	sodium dodecylsulfate-PAGE
tBid	„truncated“ Bid
TBS	Tris buffered Saline
TBS/T	Tris buffered Saline Tween
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAIL	TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand

TRP601	(5-(2,6-difluoro-phenoxy)- 3(R,S)-(2(S)-(2(S)-(3-methoxy-carbonyl-2(S)-(3-methyl-2(S)-((quinoline-2-carbonyl)-amino)-butyrylamino)propionylamino) 3-methylbutyrylamino) propionyl-amino)-4-oxo-pentanoic acid methyl ester)
V	Volt
VLBW	very low birth weight infants
WHA	World Health Assembly
zVAD-FMK	Benzyloxycarbonyl-Valin-Alanin-Aspartat-Fluoromethylketon

7 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

7.1 Abbildungen

Abb. 1.1	Darstellung der „ <i>brain growth spurt</i> “-Phase von Mensch und Ratte	3
Abb. 1.2	Übersicht über die extrinsische und intrinsische Signalkaskade und die gemeinsame Endstrecke der Apoptose	9
Abb. 1.3	Darstellung der humanen Initiator- und Effektorcaspasen	14
Abb. 1.4	Aktivierung von Caspasen	15
Abb. 3.1	Schematischer Überblick der Versuch	25
Abb. 3.2	Neonatologischer Transportinkubator	27
Abb. 3.3	Mini-PROTEAN® 3 Cell System	33
Abb. 3.4	Aufbau des Semidry-Transfers beim Western Blot	36
Abb. 4.1	TRP601 reduziert den Zelltod <i>in vivo</i>	42
Abb. 4.2	TRP601 beeinflusst nicht die physiologische Apoptose, mindert jedoch die Neurodegeneration der Hyperoxie-Tiere, während der 24-stündigen Hyperoxie, <i>in vivo</i>	43
Abb. 4.3	Nachweis der Caspase-2-Aktivität im Thalamus sechs Tage alter Ratten	44
Abb. 4.4	Expressionsnachweis prozessierter Caspase-2 im Thalamus sechs Tage alter Ratten	45
Abb. 4.5	Bestimmung der Caspase-3-Aktivität mittels Aktivitätsassay im Thalamus sechs Tage alter Ratten	46
Abb. 4.6	Expressionsnachweis von Bid im Thalamus sechs Tage alter Ratten	48
Abb. 4.7	Expressionsnachweis von Cytochrom c in der mitochondrialen Fraktion des Thalamus sechs Tage alter Ratten	51
Abb. 4.8	Expressionsnachweis von Cytochrom c in der zytosolischen Fraktion des Thalamus sechs Tage alter Ratten	52
Abb. 4.9	Expressionsnachweis von Apaf-1 im Thalamus sechs Tage alter Ratten	54

Abb. 4.10	Expressionsnachweis von Bcl-2 im Thalamus sechs Tage alter Ratten	56
Abb. 4.11	Expressionsnachweis von AIF im Thalamus sechs Tage alter Ratten	58
Abb. 5.1	Die Wirkung von TRP601 auf die Proteine der intrinsischen Apoptose	64

7.2 Tabellen

Tab. 3.1	Versuchsaufbau für die histologischen und molekularbiologischen Untersuchungen	26
Tab. 3.2	Dehydrierungsreihe	28
Tab. 3.3	Rehydrierungsreihe	29
Tab. 3.4	Gelzusammensetzung für vier Minigele verschiedener Konzentrationen	33
Tab. 3.5	Eingesetzte Gele entsprechend des Molekulargewichts der untersuchten Proteine	34
Tab. 3.6	Probenzusammensetzung vor dem SDS-PAGE-Auftrag	34
Tab. 3.7	Verwendete Antikörperlösungen für die Immundetektion der Zielproteine und der internen Kontrollproteine β -Aktin sowie VDAC	37

8 Literaturverzeichnis

1. Dunn HG, Social aspects of low birth weight. Canadian Medical Association Journal 1984. **130**(9):1131-1140.
2. Hamvas A, Wise PH, Yang RK et al., The influence of the wider use of surfactant therapy on neonatal mortality among blacks and whites. The New England Journal of Medicine 1996. **334**(25):1635-1640.
3. Leijon I, Factors of importance for neurodevelopment in preterm infants. Acta Paediatrica 2010. **99**(5):642-644.
4. Darlow BA, Cust AE, Donoghue DA, Improved outcomes for very low birth weight infants: evidence from New Zealand national population based data, Archives of Disease in Childhood. Fetal and Neonatal Edition 2003. **88**(1):F23-28.
5. Lorenz JM, Survival of the extremely preterm infant in North America in the 1990s. Clinics in Perinatology 2000. **27**(2):255-262.
6. Tin W, Wariyar U, Hey E, Changing prognosis for babies of less than 28 weeks gestation in the north of England between 1983 and 1994. Northern Neonatal Network BMJ 1997. **314**(7074):107-111.
7. Bregman J, Developmental outcome in very low birth weight infants. Current status and future trends. Pediatr Clin North Am 1998. **45**(3):673-90.
8. Lista G, Fontana P, Castoldi F et al., Does Sustained Lung Inflation at Birth Improve Outcome of Preterm Infants at Risk for Respiratory Distress Syndrome? Neonatology 2010. **99**(1):45-50.
9. Liu L, Tian T, Zheng CX et al., Risk factors and laser therapy for retinopathy of prematurity in neonatal intensive care unit. World Journal of Pediatrics 2009. WJP **5**(4):304-307.
10. Eltayeb AA, Mostafa MM, Ibrahim NH et al., The role of surgery in management of necrotizing enterocolitis. International Journal of Surgery 2010. **8**(6):458-61.
11. Stahlmann N, Rapp M, Herting E et al., Outcome of extremely premature infants at early school age: health-related quality of life and neurosensory, cognitive, and behavioural outcomes in a population-based sample in northern Germany. Neuropediatrics 2009. **40**(3):112-119.

12. Hack M, Taylor HG, Klein N et al., School-age outcomes in children with birth weights under 750 g. *The New England Journal of Medicine* 1994. **331**(12):753-759.
13. Spinillo A, Montanari L, Gardella B et al. Infant sex, obstetric risk factors, and 2-year neurodevelopmental outcome among preterm infants. *Dev Med Child Neurol*. 2009. **51**(7):518-25.
14. Myers E, Ment LR, Long-term outcome of preterm infants and the role of neuroimaging. *Clinics in Perinatology* 2009. **36**(4):773-789.
15. Deng W, Neurobiology of injury to the developing brain. *Nature Reviews Neurology* 2010. **6**(6):328-336.
16. Bittigau P, Sifringer M, Genz K et al., Antiepileptic drugs and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002. **99**(23):15089-94.
17. Felderhoff-Mueser U, Bittigau P, Sifringer M et al., Oxygen causes cell death in the developing brain. *Neurobiology of Disease* 2004. **17**(2):273-282.
18. Dobbing J, The later growth of the brain and its vulnerability. *Pediatrics* 1974. **53**(1):2-6.
19. Dobbing J, Sands J, Comparative aspects of the brain growth spurt. *Early Hum Dev*, 1979. **3**(1):79-83
20. Iwamoto HS, Teitel D, Rudolph AM, Effects of birth-related events on blood flow distribution. *Pediatric Research* 1987. **22**(6):634-640.
21. Frank L, Sosenko IR, Failure of premature rabbits to increase antioxidant enzymes during hyperoxic exposure: increased susceptibility to pulmonary oxygen toxicity compared with term rabbits. *Pediatric Research* 1991. **29**(3):292-296.
22. Jones DP, Radical-free biology of oxidative stress. *Am. J. Physiol., Cell Physiol* 2008. **295**(4):849-868.
23. Rhee SG, Cell signaling. H₂O₂, a necessary evil for cell signaling. *Science* 2006. **312**(5782):1882-1883.
24. Ghaffari S, Oxidative stress in the regulation of normal and neoplastic hematopoiesis. *Antioxid Redox Signal* 2008. **10**(11):1923-1940.
25. Graves JA, Metukuri M, Scott D et al., Regulation of reactive oxygen species homeostasis by peroxiredoxins and c-Myc. *J. Biol. Chem* 2009. **284**(10):6520-6529.

26. Papadia S, Soriano FX, Léveillé F et al., Synaptic NMDA receptor activity boosts intrinsic antioxidant defenses. *Nat. Neuroscience* 2008. **11**(4):476-487.
27. Li B, Ishii T, Tan CP et al., Pathways of induction of peroxiredoxin I expression in osteoblasts: roles of p38 mitogen-activated protein kinase and protein kinase. *C. J. Biol. Chem* 2002. **277**(14):12418-12422.
28. Mariani E, Polidori MC, Cherubini A et al., Oxidative stress in brain aging, neurodegenerative and vascular diseases: an overview. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci* 2005. **827**(1):65-75.
29. Gerstner B, DeSilva TM, Genz K et al., Hyperoxia causes maturation-dependent cell death in the developing white matter. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 2008. **28**(5):1236-1245.
30. Kwak JD, Kwak SD, Gauda EB, The effect of hyperoxia on reactive oxygen species (ROS) in rat petrosal ganglion neurons during development using organotypic slices. *Pediatric Research* 2006. **60**(4):371-376.
31. Mori H, Oikawa M, Tamagami T et al., Oxidized proteins in astrocytes generated in a hyperbaric atmosphere induce neuronal apoptosis. *Journal of Alzheimer's Disease: JAD* 2007. **11**(2):165-174.
32. Collins MP, Lorenz JM, Jetton JR et al., Hypocapnia and other ventilation related risk factors for cerebral palsy in low birth weight infants. *Pediatric Research* 2001. **50**(6):712-719.
33. Kaindl AM, Sifringer M, Zabel et al., Acute and long-term proteome changes induced by oxidative stress in the developing brain. *Cell Death Differ.* 2006. **13**(7):1097-109.
34. Sirinyan M, Sennlaub F, Dorfman A et al., Hyperoxic exposure lead to nitrative stress and ensuing microvascular degeneration and diminished brain mass and function in the immature subject. *Stroke* 2006. **37**(11):2807-15.
35. Ritter J, Schmitz T, Chew LJ et al., Neonatal hyperoxia exposure disrupts axon-oligodendrocyte integrity in the subcortical white matter. *J Neurosci.* 2013. **33**(21):8990-9002.
36. Schmitz T, Endesfelder S, Reinert MC et al., Adolescent hyperactivity and impaired coordination after neonatal hyperoxia. *Exp Neurol.* 2012. **235**(1):374-9.
37. Neubauer AP, Voss W, Wachtendorf M et al., Erythropoietin improves neurodevelopmental outcome of extremely preterm infants. *Annals of Neurology* 2010. **67**(5):657-666.

38. Sifringer M, Brait D, Weichelt U et al., Erythropoietin attenuates hyperoxia induced oxidative stress in the developing rat brain. *Brain, Behavior, and Immunity* 2010. **24**(5):792-799.
39. Kurul SH, Yis U, Kumara A et al., Protective effects of topiramate against hyperoxic brain injury in the developing brain. *Neuropediatrics* 2009. **40**(1):22-27.
40. Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR, Cell death: the significance of apoptosis. *International Review of Cytology* 1980. **68**:251-306.
41. Krysko DV, Vanden Berghe T, D'Herde K et al., Apoptosis and necrosis: detection, discrimination and phagocytosis. *Methods (San Diego, Calif.)* 2008. **44**(3):205-221.
42. Lee J, Giordano S, Zhang J, Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signalling. *Biochem J.* 2012. **441**(2):523-40.
43. Parr EL, Tung HN, Parr MB, Apoptosis as the mode of uterine epithelial cell death during embryo implantation in mice and rats. *Biology of Reproduction* 1987. **36**(1):211-225.
44. Trump BF, Goldblatt PJ, Stowell RE, Studies on necrosis of mouse liver in vitro. Ultrastructural alterations in the mitochondria of hepatic parenchymal cells. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* 1965. **14**:343-371.
45. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR, Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer* 1972. **26**(4):239-257.
46. Fadeel B, Orrenius S, Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease. *J Intern Med.* 2005. **258**(6):479-517.
47. Melino G, The Sirens' song. *Nature* 2001. **412**(6842):23.
48. Gallaher BW, Hille R, Raile et al., Apoptosis: live or die – hard work either way! *Hormone and Metabolic Research* 2001. **33**(9):511-519.
49. Dikranian K, Ishimaru MJ, Tenkova T et al., Apoptosis in the in vivo mammalian forebrain. *Neurobiology of Disease* 2001. **8**(3):359-379.
50. Burek MJ, Oppenheim RW, Programmed cell death in the developing nervous system. *Brain Pathology* 1996. **6**(4):427-446.
51. Bittigau P, Pohl D, Sifringer M et al., Modeling pediatric head trauma: mechanisms of degeneration and potential strategies for neuroprotection. *Restorative Neurology and Neuroscience* 1998. **13**(1-2):11-23.

52. Bittigau P, Sifringer M, Pohl D et al., Apoptotic neurodegeneration following trauma is markedly enhanced in the immature brain. *Annals of Neurology* 1999. **45**(6):724-735.
53. Shi B, De Girolami U, He J et al., Apoptosis induced by HIV-1 infection of the central nervous system. *The Journal of Clinical Investigation* 1996. **98**(9):1979-1990.
54. Thompson CB, Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science (New York, N.Y.)* 1995. **267**(5203):1456-1462.
55. Eskelinen EL, Saftig P, Autophagy: a lysosomal degradation pathway with a central role in health and disease. *Biochim Biophys Acta*. 2009. **1793**(4):664-73.
56. Hara T, Nakamura K, Matsui M, Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* 2006. **441**(7095):885-9.
57. Metcalf DJ, Garia-Arenciba M, Hochfeld WE et al., Autophagy and misfolded proteins in neurodegeneration. *Exp Neurol*. 2012. **238**(1):22-8.
58. Komatsu M, Waguri S, Chiba T et al., Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature* 2006. **441**(7095):880-4.
59. Bendix I, Schulze C, Haefen Cv et al., Erythropoietin modulates autophagy signalling in the developing rat brain in an in vivo model of oxygen-toxicity. *Int J Mol Sci*. 2012. **13**(10):12939-51.
60. Chipuk JE, Green DR, Do inducers of apoptosis trigger caspase-independent cell death? *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 2005. **6**(3):268-275.
61. Aggarwal BB, Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol*. 2003. **3**(9):745-56.
62. Peter ME, Kammer PH, The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death Differ*. 2003. **10**(1):26-35.
63. Brunner T, Mogil RJ, LaFace D et al., Cell-autonomous Fas (CD95)/Fas-ligand interaction mediates activation-induced apoptosis in T-cell hybridomas. *Nature* 1995. **373**(6513):441-444.
64. Chan FK, Chun HJ, Zheng L et al., A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signalling. *Science (N.Y.)* 2000. **288**(5475):2351-2354.
65. Naismith JH, Sprang SR, Modularity in the TNF-receptor family. *Trends Biochem Sci*. 1998. **23**(2):74-9.
66. Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ, The TNF and TNF receptor superfamilies:

- integrating mammalian biology. *Cell*. 2001. **104**(4):487-501.
67. Hengartner MO, The biochemistry of apoptosis. *Nature*. 2000. **407**(6805):770-6.
 68. Carrington PE, et al., The structure of FADD and its mode of interaction with procaspase-8. *Molecular Cell* 2006. **22**(5):599-610.
 69. Rasper DM, Vaillancourt JP, Hadano S et al., Cell death attenuation by 'Usurpin', a mammalian DED-caspase homologue that precludes caspase-8 recruitment and activation by the CD-95 (Fas, APO-1) receptor complex. *Cell Death and Differentiation* 1998. **5**(4):271-288.
 70. Kim KS, Multifunctional role of Fas-associated death domain protein in apoptosis. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* 2002. **35**(1):1-6.
 71. Kroemer G, Zamzami N, Susin SA, Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol Today* 1997. **18**(1):44-51.
 72. Kiess W, Gallaher B, Hormonal control of programmed cell death/apoptosis. *Eur J Endocrinol* 1998. **138**(5):482-91
 73. Green DR, Reed JC, Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998. **281**(5381):1309-12.
 74. Liu X, Kim CN, Yang J et al., Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 1996. **86**(1):147-157.
 75. Riedl SJ, Salvesen GS, The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007. **8**(5):405-13
 76. Lovell JF, Billen LP, Bindner S et al., Membrane binding by tBid initiates an ordered series of events culminating in membrane permeabilization by Bax. *Cell* 2008. **135**(6):1074-1084.
 77. Bao Q, Shi Y, Apoptosome: a platform for the activation of initiator caspases. *Cell Death Differ* 2007. **14**(1):56-65.
 78. Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A et al., Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007. **8**(9):741-752.
 79. Leist M, Jäättelä M, Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001. **2**(8):589-98.
 80. Li H, Zhu H, Xu CJ et al., Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 1998. **94**(4):491-501.
 81. Slee EA, Adrain C, Martin SJ, Serial killers: ordering caspase activation events in apoptosis. *Cell Death Differ*. 1999. **6**(11):1067-74.
 82. Parone PA, James D, Martinou JC, Mitochondria: regulating the inevitable.

- Biochimie. 2002. **84**(2-3):105-11.
83. Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N et al., Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 1999. **397**(6718):441-6.
 84. Joza N, Pospisilik JA, Hangen E et al., AIF: not just an apoptosis-inducing factor. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2009. **1171**:2-11.
 85. Daugas E, Nochy D, Ravagnan L et al., Apoptosis-inducing factor (AIF): a ubiquitous mitochondrial oxidoreductase involved in apoptosis. *FEBS Letters* 2000. **476**(3):118-123.
 86. Alnemri ES, Mammalian cell death proteases: a family of highly conserved aspartate specific cysteine proteases. *J Cell Biochem*, 1997. **64**(1):33-42
 87. Yuan, J, Shaham S, Ledoux S et al., The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *Cell* 1993. **75**(4):641-52.
 88. Thornberry NA, Bull HG, Calaycay JR et al., A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature* 1992. **356**(6372):768-74.
 89. Ellis HM, Horvitz HR, Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell* 1986. **44**(6):817-29.
 90. Reed JC, Doctor K, Rojas A et al., Comparative analysis of apoptosis and inflammation genes of mice and humans. *Genome Res*. 2003. **13**(6B):1376-88.
 91. Shi Y, Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Molecular Cell* 2002. **9**(3):459-470.
 92. Lippens S, Kockx M, Knaapen M et al., Epidermal differentiation does not involve the pro-apoptotic executioner caspases, but is associated with caspase-14 induction and processing. *Cell Death Differ* 2000. **7**(12):1218-1224.
 93. Fuentes-Prior P, Salvesen GS, The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *The Biochemical Journal* 2004. **384**(2):201-232.
 94. Guo Y, Srinivasula SM, Druihle A et al., Caspase-2 induces apoptosis by releasing proapoptotic proteins from mitochondria. *Biol Chem*. 2002. **277**(16):13430-7.
 95. Thornberry NA, Lazebnik Y, Caspases: Enemies Within. *Science* 1998. **281**(5381):1312-6.
 96. Cohen GM, Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 1997. **326**(Pt1):1-16.

97. Lavirk IN, Golks A, Krammer PH, Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *J Clin Invest*. 2005. **115**(10):2665-72.
98. Garcia-Calvo M, Peterson EP, Leiting B et al., Inhibition of human caspases by peptide-based and macromolecular inhibitors. *J Biol Chem*. 1998. **273**(49):32608-13.
99. Garcia-Calvo M, Peterson EP, Rasper DM et al. Purification and catalytic properties of human caspase family members. *Cell Death Differ*. 1999. **6**(4):362-9.
100. Ho LH, Read SH, Dorstyn L et al., Caspase-2 is required for cell death induced by cytoskeletal disruption. *Oncogene* 2008. **27**(24):3393-3404.
101. Tiwari M, Lopez-Cruzan M, Morgan WW et al., Loss of caspase-2-dependent apoptosis induces autophagy after mitochondrial oxidative stress in primary cultures of young adult cortical neurons. *J Biol Chem* 2011. **286**(10):8493–8506.
102. Tiwari M, Lopez-Cruzan M, Morgan WW et al., Loss of caspase-2-dependent apoptosis induces autophagy after mitochondrial oxidativ stress in primary cultures of young adult cortical neurons. *J Biol Chem*. 2011. **286**(10):8493-506. doi: 10.1074/jbc.M110.163824.
103. Rao L, Perez D, White E, Lamin proteolysis facilitates nuclear events during apoptosis. *J Cell Biol*. 1996. **135**(6 Pt1):1441-55.
104. Kothakota S, Azuma T, Reinhard C et al., Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. *Science* 1997. **278**(5336):294-8.
105. Earnshaw WC, Martins LM, Kaufmann SH, Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu. Rev. Biochem*. 1999. **68**:383-424.
106. Stennicke HR, Jürgensmeier JM, Shin H et al., Pro-caspase-3 is a major physiologic target of caspase-8. *J Biol Chem*. 1998. **273**(42):27084-90.
107. Van Noorden CJ, The history of Z-VAD-FMK, a tool for understanding the significance of caspase inhibition. *Acta Histochem*. 2001. **103**(3):241-51.
108. Fischer U, Schulz-Osthoff K, New approaches and therapeutics targeting apoptosis in disease. *Pharmacol Rev*. 2005. **57**(2):187-215.
109. Gonzales-Muniz R, Bergeron F, Marseigne I et al., Boc-Trp-Orn(Z)-Asp-NH₂ and deivatives: a new family of CCK antagonists. *J. Med. Chem*. 1990. **33**(12):3199-3204.
110. Nicholson DW, Thornberry NA, Caspases: killer proteases. *Trends Biochem Sci*.

1997. **22**(8):299-306.
111. Hara H, Friedlander RM, Gagliardini V et al., Inhibition of interleukin 1 beta converting enzyme family proteases reduces ischemic and excitotoxic neuronal damage. *Proc Natl Acad Sci.* 1997. **94**(5):2007-2012.
 112. Loddick SA, MacKenzie A, Rothwell NJ, An ICE inhibitor, z-VAD-DCB attenuates ischaemic brain damage in the rat *Neuroreport.* 1996. **7**(9):1465-1468.
 113. Daemen MA, van't Veer C, Denecker G et al., Inhibition of apoptosis induced by ischemia-reperfusion prevents inflammation *J Clin Invest.* 1999. **104**(5):541-549.
 114. Sifringer M, Bendix I, Börner C et al., Prevention of neonatal oxygen-induced brain damage by reduction of intrinsic apoptosis. *Cell Death and Disease* 2012. **3**, e250; doi:10.1038/cddis.2011.133.
 115. Ray CA, Black RA, Kronheim SR et al., Viral inhibition of inflammation: cowpox virus encodes an inhibitor of the interleukin-1 β converting enzyme. *Cell* 1992. **69**(4):597-604.
 116. Bump NJ, Hackett M, Hugunin M et al., Inhibition of ICE family proteases by baculovirus antiapoptotic protein p35. *Science* 1995. **269**(5232):1885-1888.
 117. Schulze-Osthoff K, Ferrari D, Los M et al., Apoptosis signaling by death receptors. *Eur. J. Biochem.* 1998. **254**(3):439-459.
 118. Schmued LC, Hopkins KJ, Fluoro-Jade B: a high affinity fluorescent marker for the localization of neuronal degeneration. *Brain Res.* 2000. **874**(2):123-30.
 119. West MJ, Gundersen HJ, Unbiased stereological estimation of the number of neurons in the human hippocampus. *J Comp Neurol.* 1990. **296**(1):1-22.
 120. Felderhoff-Mueser U, Sifringer M, Polley O et al., Caspase-1-processed interleukins in hyperoxia-induced cell death in the developing brain. *Ann Neurol* 2005. **57**(1):50-59.
 121. Dzierko M, Boos V, Sifringer et al., A critical role for Fas/ CD-95 dependent signaling pathways in the pathogenesis of hyperoxia-induced brain injury. *Ann Neurol* 2008. **64**(6):664-673.
 122. Troy CM, Rabacchi SA, Friedman WJ et al., Caspase-2 mediates neuronal cell death induced by beta-amyloid. *J Neurosci* 2000. **20**(4):1386-1392.
 123. Chauvier D, Lecoœur H, Langonné et al., Upstream control of apoptosis by caspase-2 in serum-deprived primary neurons. *Apoptosis* 2005. **10**(6):1243-1259.
 124. Tamm C, Zhivotovsky B, Ceccatelli S, Caspase-2 activation in neural stem cells undergoing oxidative stress-induced apoptosis. *Apoptosis* 2008. **13**(3):354-363.

125. Kaindl AM, Sifringer M, Koppelstaetter A et al., Erythropoietin protects the developing brain from hyperoxia-induced cell death and proteome changes. *Ann Neurol* 2008. **64**(5):523-534.
126. Carlsson Y, Schwendimann L, Vontell R et al., Genetic inhibition of caspase-2 reduces hypoxic-ischemic and excitotoxic neonatal brain injury. *Ann Neurol* 2011. **70**(5):781-9.
127. Solberg R, Løberg EM, Andresen JH et al., Resuscitation of newborn piglets. short-term influence of FiO₂ on matrix metalloproteinases, caspase-3 and BDNF. *PloS One* 2010. **5**(12):e14261.
128. Chauvier D, Renolleau S, Holifanjaniaina S et al., Targeting neonatal ischemic brain injury with a pentapeptide-based irreversible caspase inhibitor. *Cell Death Dis* 2011. **2**:e203.
129. Nijboer CH, Heijnen CJ, van der Kooij MA et al. Targeting the p53 pathway to protect the neonatal ischemic brain. *Ann Neurol* 2011. **70**(2):255-264.
130. Bao Q, Shi Y, Apoptosome: a platform for the activation of initiator caspases. *Cell Death Differ* 2007. **14**(1):56-65.
131. Bouchier-Hayes L, Oberst A, McStay GP et al., Characterization of cytoplasmic caspase-2 activation by induced proximity. *Mol Cell* 2009. **35**(6):830-840.
132. Guo Y, Srinivasula SM, Druilhe A et al., Caspase-2 induces apoptosis by releasing proapoptotic proteins from mitochondria. *J Biol Chem* 2002. **277**(16):13430-13437.
133. Chipuk JE, Moldoveanu T, Llambi F et al., The BCL-2 family reunion. *Mol Cell* 2010. **37**(3):299-310.
134. Green DR, Kroemer G, The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* 2004. **305**(5684):626-9.
135. Brustovetsky T, Li T, Yang Yet al., BAX insertion, oligomerization, and outer membrane permeabilization in brain mitochondria: role of permeability transition and SH-redox regulation. *Biochim Biophys Acta* 2010. **1797**(11):1795-1806.
136. Ding J, Zhang Z, Roberts GJ et al., Bcl-2 and Bax interact via the BH1-3 groove-BH3 motif interface and a novel interface involving the BH4 motif. *J Biol Chem* 2010. **285**(37):28749-28763.
137. Tan C, Dlugosz PJ, Peng J et al. Auto-activation of the apoptosis protein Bax increases mitochondrial membrane permeability and is inhibited by Bcl-2. *J Biol Chem* 2006. **281**(21):14764-14775.
138. D'Sa C, Klocke BJ, Cecconi F et al., Caspase regulation of genotoxin-induced

- neural precursor cell death. *J Neurosci Res* 2003. **74**(3):435-445.
139. Gao Y, Liang W, Hu X et al., Neuroprotection against hypoxic-ischemic brain injury by inhibiting the apoptotic protease activating factor-1 pathway. *Stroke* 2010. **41**(1):166-172.
140. Otera H, Ohsakaya S, Nagaura Z-I et al., Export of mitochondrial AIF in response to proapoptotic stimuli depends on processing at the intermembrane space. *EMBO J* 2005. **24**(7):1375-1386.
141. Yu SW, Wang Y, Frydenlund DS et al., Outermitochondrial membrane localization of apoptosis-inducing factor: mechanistic implications for release. *ASN Neuro* 2009. **1**(5):e00021.
142. Engel T, Plesnila N, Prehn JH et al., In vivo contributions of BH3-only proteins to neuronal death following seizures, ischemia, and traumatic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 2011. **31**(5):1196-1210.
143. Sevrioukova IF, Apoptosis-inducing factor: structure, function, and redox regulation. *Antioxid Redox Signal* 2011. **14**(12):2545-2579.
144. Joly LM, Mucignat V, Mariani J et al., Caspase inhibition after neonatal ischemia in the rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2004. **24**(1):124-31.

9 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Constanze Börner, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Die neuroprotektive Wirkung des speziellen Caspase-2-Inhibitors TRP601 am Modell der neonatalen Ratte nach Hyperoxie-Exposition“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE – www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s. o.) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum:

Constanze Börner

10 Anteilserklärung an erfolgten Publikationen

Constanze Börner hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation I

Journal: Annals of Neurology 2008. 64(5):523-34.
(Impact Faktor 11.193)

Titel: Erythropoietin protects the developing brain from hyperoxia-induced cell death and proteome changes.

Autoren: Kaindl AM, Sifringer M, Koppelstaetter A, Genz K, Loeber R, **Boerner C**, Stuwe J, Klose J, Felderhoff-Mueser U.

Anteil: 15-20 % eigener Anteil (Mitautorenschaft). Der eigene Anteil im Rahmen der Arbeiten für diese Publikation ist mit 15-20 % anzugeben. Neben einer Vielzahl an Western Blot-Analysen war die Promovendin beim Erstellen des Manuskriptes beteiligt.

Publikation II

Journal: Annals of Neurology 2008. 64(5):523-34.
(Impact Faktor 11.193)

Titel: A critical role for Fas/CD-95 dependent signaling pathways in the pathogenesis of hyperoxia induced brain injury.

Autoren: Dzierko M, Boos V, Sifringer M, Polley O, Gerstner B, Genz K, Endesfelder S, **Börner C**, Jacotot E, Chauvier D, Obladen M, Bühler C, Felderhoff-Mueser U.

Anteil: 25-30 % eigener Anteil (Mitautorenschaft). Der eigene Anteil im Rahmen der Arbeiten für die genannte Publikation ist mit 25-30 % anzugeben. Neben der Durchführung des Tierversuchs wurden Western Blot-Analysen und histologische Untersuchungen von der Promovendin durchgeführt. Zudem war sie beim Erstellen des Manuskriptes beteiligt.

Publikation III

- Journal: Cell Death and Disease 2012. 3,e250;doi:10.1038/cddis.2011.133.
(Impact Factor 6.044)
- Titel: Prevention of neonatal oxygen-induced brain damage by reduction of intrinsic apoptosis.
- Autoren: Sifringer M, Bendix I, **Börner C**, Endesfelder S, von Haefen C, Kalb A, Holifanjaniaina S, Prager S, Schlager GW, Keller M, Jacotot E, Felderhoff-Mueser U.
- Anteil: 35-40 % eigener Anteil (Mitautorenschaft). Der eigene Anteil im Rahmen der Arbeiten für die genannte Publikation ist mit 35-40 % anzugeben. Neben der Durchführung des Tierversuchs wurden Western Blot-Analysen und Aktivitätsassays sowie histologische Untersuchungen von der Promovendin durchgeführt. Zudem war sie beim Erstellen des Manuskriptes beteiligt.

Constanze Börner

Datum:

11 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

12 Publikationsliste

- 1.) Sifringer M, Bendix I, **Börner C** et al., Prevention of neonatal oxygen-induced brain damage by reduction of intrinsic apoptosis. *Cell Death and Disease* 2012.3,e250;doi:10.1038/cddis.2011.133.
- 2.) Dzierko M, Boos V, Sifringer M, Polley O, Gerstner B, Genz K, Endesfelder S, **Börner C** et al., A critical role for Fas/CD-95 dependent signaling pathways in the pathogenesis of hyperoxia induced brain injury. *Ann Neurol*. 2008. 64(6):664-73.
- 3.) Kaindl AM, Sifringer M, Koppelstaetter A, Genz K, Loeber R, **Boerner C** et al., Erythropoietin protects the developing brain from hyperoxia-induced cell death and proteome changes. *Ann Neurol*. 2008. 64(5):523-34.

13 Danksagung

Ich möchte an dieser Stelle die Gelegenheit nutzen, meinen Dank an diejenigen zu richten, die mich während meiner Promotion motiviert, unterstützt und inspiriert haben.

Allen voran gilt mein ganz besonderer Dank Frau Prof. Dr. med. Ursula Felderhoff-Müser aus der Klinik für Kinderheilkunde I des Universitätsklinikum Essen (ehemals Klinik für Neonatologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin) für die Ermöglichung und beste Förderung der Dissertation. Sie ist beruflich und menschlich ein großes Vorbild für mich.

Großer Dank gilt Herrn Dr. rer. nat. Marco Sifringer aus der Klinik für Anästhesiologie und operative Intensivmedizin der Charité – Universitätsmedizin Berlin (ehemals Klinik für Neonatologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin), der mich beim Schreiben dieser Arbeit betreut, mich bei der Arbeit mit den Versuchstieren angeleitet und mich in das „Laborleben“ eingeführt hat. Für die damit verbundene unermüdliche Unterstützung, die unkomplizierten sowie effektiven Hilfestellungen, die stets schnelle und kompetente Beantwortung aller Fragen möchte ich mich herzlich bedanken.

Ein ganz besonderer Dank geht an die MTAs und guten Seelen des Labors: Evelyn Strauß, Rodica Altmann und Ruth Herrmann. Sie haben mir stets geduldig mit fachlicher sowie praktischer Beratung zur Seite gestanden und so zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Ein ebenso herzliches Dankeschön gilt auch allen anderen Mitarbeitern der Arbeitsgruppen für das stets angenehme Arbeitsklima, insbesondere Ulrike Weichert und Dr. rer. nat. Stefanie Endesfelder für ihre jeweilige praktische und moralische Unterstützung.

Mein tiefster Dank gebührt jedoch meiner Familie, denen meine Arbeit gewidmet ist: Bärbel, Philipp und Ralph sowie meinem lieben Freund Heiko. Ohne ihre Liebe und Toleranz, ihr Verständnis, ihre Geduld und moralische Unterstützung gäbe es diese Arbeit nicht.

Meinen lieben Eltern danke ich, für die Möglichkeit Medizin studieren zu können, für ihre unermüdliche Unterstützung und ihre bedingungslose Liebe! Danke, dass ihr meine Eltern seid!