

Aus der Klinik für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie mit dem
Arbeitsbereich Orthopädie der Medizinischen Fakultät Charité –
Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Die Rolle der alternativen
Komplementaktivierung im
experimentellen Schädel-Hirn-Trauma
Modell der Maus**

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Malte Pietzcker

aus Hamburg

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. P. Stahel
2. Prof. Dr. med. M. van der Giet
3. Prof. Dr. med. C.-E. Heyde

Datum der Promotion: 16.05.2010

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	5
1 Einleitung	7
1.1 Epidemiologie des Schädel-Hirn-Traumas	7
1.2 Pathophysiologie des SHT	7
1.3 Das Komplementsystem	11
1.4 Apoptose	17
1.5 Das Komplementsystem und ZNS Erkrankungen	19
1.6 Effekte von Komplement auf die Zellen des Gehirns	20
1.7 Komplement und SHT	22
1.8 Die FB-/- Maus	23
1.9 Fragestellung	26
2 Material und Methoden	27
2.1 Tiere	27
2.2 Das Traumamodell	28
2.3 Neurological Severity Score (NSS)	29
2.4 Euthanasie und Organentnahme	30
2.5 Immunhistochemie	31
2.6 TUNEL-Test	32
2.7 ELISA	34
2.8 Western Blot	34
2.9 Real-time RT PCR	39
2.10 Statistik	42
3 Ergebnisse	43
3.1 Traumaexperiment	43
3.2 Immunhistochemie	44
3.3 TUNEL-Test	47
3.4 ELISA	50
3.5 Western Blot	51
3.6 PCR	54
4 Diskussion	59
4.1 Klinische Unterschiede zu Beginn des Experiments und Gewichtsverhalten	60
4.2 Komplementaktivierung	61
4.3 Histologische Unterschiede nach SHT	62

4.4	Apoptosepathways und Komplementsystem nach SHT	62
4.5	Unterschiede in der Apoptoserate	66
4.6	Unterschiede im neurologischen Outcome	68
5	Zusammenfassung	71
6	Literaturverzeichnis	73
7	Danksagung	84
8	Curriculum vitae	85
9	Erklärung	86

Abkürzungsverzeichnis

+/+	Homozygoter Wildtyp für das entsprechende Gen
-/-	Homozygoter Mutant für das entsprechende Gen
A/C	Acceleration/Deceleration
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure
APAF-1	Apoptotic peptidase activating factor 1
ATP	Adenosin Triphosphat
BCA	bicinchoninic acid
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BSA	Bovine Serum Albumin
CPP	Cerebral Perfusion Pressure
CRASH- Studie	Corticosteroid randomization after significant head injury
Crry	Complement-receptor-1 related y
ED	Enzephalitis Disseminata
EAE	Experimentell Allergische Enzephalomyelitis
d	Tag
DAB	Diaminobenzidin
DAF	Decay-Accelerating Faktor
DAI	Diffus Axonal Injury
DAPI	4',6'-diamino-2-phenylindole
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DR	Death Rezeptor
EAA	Excitatory Amino Acids
ECL	Enhanced Chemiluminescens
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FB	Faktor B
FCS	Fetal Calf Serum
FH	Faktor H
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GCS	Glasgow Coma Scale
GFAP	glia filament acidic Protein
h	Stunde
HCl	Salzsäure
ICP	Intracranial Pressure
IL-1	Interleukin-1
kDa	Kilodalton
KO	Knockout
LAGetSi	Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin“
MAC	Membrane Attack Complex
MAP	mitogen activated protein
MAPK	MAP Kinase
MASP 1-3	MBL-Associated Serine Protease 1-3
MBL	Mannose Bindendes Lectin
MM	Magermilch
MPGN	Membranproliferative Glomerulonephritis

Abkürzungsverzeichnis

n	Anzahl
NaCl	Natrium-Chlorid
NCBI	National Center of Biotechnology Information
NeuN	Neuron-specific Nuclear Protein
NGF	Neuronal Growth Faktor
Nil	unbehandelte Kontrolltiere
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NO	Stickoxid
NSS	Neurological Severity Score
NTC	No Template Control
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Real-Time RT-PCR	real-time Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
sFAS	soluble FAS
Sham	Sheinoperierte Tiere
SHT	Schädel-Hirn-Trauma
SLE	Systemischen Lupus Erythematosus
sCrry	soluble Complement receptor related protein Y
ssDNA	Singel Strand DNA
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor α
TNF-R	TNF Rezeptor
TUNEL	Terminale desoxyribosyl transferase mediated (TdT) dUTP Nick End Labelling
Wt	Wildtyp

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie des Schädel-Hirn-Traumas

Das Schädel-Hirn-Trauma (SHT) gehört zu den häufigsten Mortalitäts- und Morbiditätsursachen von Patienten unter 40 Jahren in den Industrieländern. In den USA beläuft sich die Summe der Hospitalisierungen auf ca. 500.000/Jahr (1-3). In Deutschland beläuft sich die Summe der Menschen mit SHT auf ca. 270.000/Jahr. Dies entspricht etwa 300/100.000 Einwohnern/Jahr. Davon versterben ca. 10.000 Patienten, während etwa 5.000 mit schwerer Behinderung überleben (4).

Trotz enormer Fortschritte in der neurointensiven Behandlung, liegt die Sterberate der Patienten mit schwerem SHT (Glasgow Coma Scale <9) weiterhin bei 35-40% (5;6). Ausschlaggebend für die hohe Sterblichkeits- und Erkrankungsrate sind oft nicht die primären Verletzungen, sondern vielmehr sekundäre Hirnschäden, welche erst im Verlauf der Hospitalisation auftreten. Man geht davon aus, dass der verzögerte neuronale Zellschaden durch eine posttraumatische Entzündungsantwort ausgelöst wird, die mit der Entwicklung eines Hirnödems und erhöhtem intrakraniellen Druck einhergeht (6;7).

1.2 Pathophysiologie des SHT

Zum SHT schreibt Gennarelli: “[...] *injury is a process of events rather than a singular event.*” (8).

Mittlerweile ist bekannt, dass es sich beim Schädel-Hirn-Trauma nicht nur um ein Akutereignis, sondern vielmehr um eine dynamische Abfolge vieler Prozesse handelt. Über den zeitlichen Verlauf hinweg lassen sich hierbei zunächst primäre Schäden von sekundären Schäden unterscheiden.

1.2.1 Primäre Schäden

Man unterscheidet innerhalb der primären Traumaschäden den fokalen Schaden und den diffusen axonalen Schaden.

Der fokale Schaden entsteht als direkte Folge der mechanischen Krafteinwirkung, des Impact auf Schädel, Neurone und Blutgefäße. Die Zellen und Strukturen des Gehirns werden dabei direkt mechanisch oder indirekt durch die Ischämie aufgrund geschädigter Gefäße zerstört. Definitionsgemäß sind diese Schäden irreversibel und therapeutisch nicht angebar (9). Die Zerstörung von Gefäßen kann weiterhin zu

intrakraniellen Raumforderungen im Sinne von Hämatomen (epidural, subdural, subarachnoidal, intrazerebral) führen, welche eine Verlagerung der Hirnmasse bewirken, die wiederum Herniation und Kompression von Hirnanteilen nach sich ziehen können (9).

Der diffuse axonale Schaden (DAI: diffuse axonal injury) tritt bei Einwirkung von Accelerations-/Decelerationskräften (A/C) unabhängig vom Impact auf. „Non-Impact“-SHT sind zum Beispiel bei Verkehrsunfällen im Sinne eines Schleudertraumas (10;11) und beim „Shaken-Baby-Syndrom“ (12) beschrieben. Hierbei kommt es zur Einwirkung von Scherkräften auf die Hirnstrukturen. Je nach Stärke des Traumas kommt es dabei zu Dehnung oder Zerreißung der Axone oder zarter Gefäße, wie zum Beispiel der Brückenvenen mit konsekutivem Subduralhämatom.

Bei einem SHT liegen oft auch Mischformen von fokalen und diffusen Schäden vor, da es bei Einwirkung eines Impact auch zu A/C-Kräften kommt.

Das zerstörte Gewebe am Ort des primären Hirnschadens ist umgeben von einer Zone (Marginalmantel/Penumbra), in welcher zwar die Zellintegrität bewahrt wurde, aber die Perfusion stark beeinträchtigt ist. Zellen dieser Zone sind noch vital, aber in ihrer elektrochemischen Funktion und Homöostaseleistung eingeschränkt. Daher sind diese Zellen besonders anfällig für schädigende Einflüsse, wie sie durch sekundäre Prozesse hervorgerufen werden.

1.2.2 Sekundäre Schäden

Zu den sekundären Traumafolgen zählen

- Elektrolytverschiebungen/Ionen-Imbalance
- Zytotoxizität durch Ausschüttung exzitatorischer Aminosäuren (EAA), wie Glutamat und Aspartat
- Ödem
- Inflammation mit Anstieg von Zytokinen, Komplementfaktoren und Entzündungszellen.

1.2.2.1 Ionen-Imbalance und sekundärer Zelltod

Durch die Zerstörung von Blutgefäßen und erhöhten Energiebedarf zur Aufrechterhaltung der Homöostase im Rahmen eines SHT kommt es im betroffenen Gebiet zu absoluter bzw. relativer Ischämie. Dies hat eine unzureichende ATP-Synthese zur Folge, worauf es in den Neuronen zu Insuffizienz der Na^+/K^+ -ATPase mit

konsekutiver, intrazellulärer Na^+ -Akkumulation kommt. Es folgt eine Aktivierung des Na^+/Ca^+ -Austauschers und ein intrazellulärer Anstieg des Ca^{++} . Es kommt zu einer Depolarisation der Zelle und über Aktivierung von spannungsabhängigen Ca^{++} - und K^+ -Kanälen zu weiterem Ca^{++} Einstrom und K^+ Ausstrom. Folgen dieser Elektrolytverschiebungen mit Depolarisation der Neurone sind zum einen die verstärkte Ausschüttung exzitatorischer Aminosäuren (EAA), wie Glutamat und Aspartat, welche in unphysiologisch hohen Konzentrationen einen zytotoxischen Effekt auf Neurone haben (13;14), und die zum anderen über Aktivierung von NMDA-, AMPA- und Voltage-Gated- K^+ Channels zur Aktivierung weiterer Neurone mit Na^+ -Einstrom, K^+ -Ausstrom und Ausschüttung von EAAs führen (15). Ebenfalls zytotoxisch auf die Neurone wirkt das intrazelluläre Ca^{++} . Calcium behindert den oxidativen Metabolismus in den Mitochondrien, was die Energiesituation weiter verschlechtert. Weiterhin aktiviert Calcium Phospholipasen und Cyclooxygenasen, was zu einer Freisetzung von Arachnoidonsäuren aus der Zellmembran führt, die zu proinflammatorischen Prostaglandinen verstoffwechselt werden (8;16). Aktivierung von Proteinkinasen, Endonukleasen und NO-Synthase mit Bildung freier Radikale und reaktiver Stickstoffmetabolite werden weiterhin beschrieben (15;17-19). All diese Prozesse können zu sekundärem Zelltod führen.

Beim DAI kommt es nicht vordergründig über eine Ischämie als vielmehr über die Dehnung von Axonen zu Beeinträchtigung zytoskelettaler Integrität und Aktivierung mechanosensibler Na^+ -Kanäle (20), was wiederum zum Ca^{++} -Einstrom und Depolarisation führt, mit den gleichen Konsequenzen wie beim voranbeschriebenen Szenario.

1.2.2.2 Ödem

Die Entstehung des Hirnödems, das manche Autoren als einen Hauptfaktor für die hohe Mortalität des SHT ansehen (21), lässt sich in zwei Arten einteilen:

- Zytotoxisches Hirnödem
- Vasogenes Hirnödem

Das zytotoxische Ödem entsteht durch das Ionenungleichgewicht und erhöhte extrazelluläre EEA-Konzentration. Der Na^+ - und Ca^{++} -Einstrom führt zu Cl^- - und Wassereinstrom in das Neuron. Das erhöhte extrazelluläre K^+ und Glutamat wird vermehrt von Astrozyten aufgenommen, um die extrazelluläre Homöostase aufrecht zu

erhalten, was ebenfalls zu konsekutivem Wassereinstrom in die Astrozyten führt. Es kommt zur Schwellung von Neuronen und Gliazellen im Sinne eines zytotoxischen Hirnödems (22).

Das vasogene Hirnödem entsteht durch Insuffizienz der Blut-Hirn-Schranke, die einerseits auf die Wirkung von Zytokinen und Anaphylatoxinen (TNF- α , Interleukine, Komplement Spaltprodukte C5b, C3a) im Rahmen einer Entzündungsreaktion zurückgeführt wird, und zum anderen auf hypertensive Entgleisungen nach Trauma, die zu einer Überwindung der BHS durch hydrostatischen Druck führen (23).

Durch Ödementwicklung kommt es zu weiterer Einschränkung der Durchblutung, insbesondere der Mikrozirkulation, was zu einer Ausbreitung des Gewebeschadens führt. Ca. 60% aller Patienten mit schwerem SHT zeigen einen erhöhten intrakraniellen Druck (ICP) mit der Konsequenz eines verminderten zerebralen Blutflusses und einer diffusen zerebralen Ischämie (zerebraler Blutfluss = mittlerer arterieller Blutdruck – intrakranieller Druck) (24).

1.2.2.3 Inflammation

Binnen kürzester Zeit kommt es nach SHT zur Ausbildung einer intrakraniellen Entzündungsreaktion. Im Gegensatz zu den primären Folgen ermöglicht die Verzögerung im Auftreten dieser Reaktion prinzipiell ein therapeutisches Vorgehen. Nach SHT kommt es durch den Zellzerfall (25) und erhöhte EAA Konzentrationen (17;26) zur Aktivierung von Gliazellen (27-30), welche mit Produktion und Ausschüttung von Zytokinen (25;31-33), Komplementfaktoren (34;35) und reaktiven Sauerstoffspezies (17;25;35) reagieren. Gleichzeitig werden durch diese Zellen verstärkt Rezeptoren für Komplementfaktoren (36-38) und Zytokine (39) exprimiert, was zu einer Autostimulation der Gliazellen und somit zur Aufrechterhaltung, bzw. Verstärkung dieser Prozesse führt. Zytokine wie Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und Interleukin-1 (IL-1), sowie Spaltprodukte der aktivierten Komplementfaktoren, die sogenannten Anaphylatoxine C3a und C5a, führen zu einer Permeabilitätssteigerung der BHS mit Übertritt von weiteren Entzündungsmediatoren und Entzündungszellen aus dem Blut (40;41). Letztere werden durch die chemotaktische Wirkung der Anaphylatoxine und Interleukine angelockt (42). Die eingewanderten Entzündungszellen schütten weitere Zytokine und Komplementfaktoren aus, was in einen positiven Verstärkungskreislauf mündet.

1.3 Das Komplementsystem

Das Komplementsystem ist ein multifaktorielles Proteinkaskadensystem und wesentlicher Bestandteil der angeborenen Immunabwehr. Die mehr als 30 Proteine des menschlichen Komplementsystems sind im Blutplasma gelöst und werden daher auch zum humoralen Immunsystem gezählt. Seine wesentliche Aufgabe ist die Aktivierung zellulärer Abwehrmechanismen, die Opsonierung von Fremdkörpern und die Zerstörung entsprechender Zielzellen. Über verschiedene Aktivierungswege handelt es sich dabei sowohl um eine spezifische Form der Abwehr, als auch um eine unspezifische. Bisher sind drei Wege bekannt, über die das Komplementsystem aktiviert werden kann:

- 1) Der über Antikörper vermittelte **klassische Weg** (spezifisch, Abb.1).
- 2) Der über Mannose-bindendes Lektin (MBL) aktivierte **Lektin-Weg** (unspezifisch).
- 3) Der spontane und Antikörper-unabhängige **alternative Weg** (unspezifisch, Abb.2).

Gemeinsame Endstrecke aller Aktivierungswege ist jeweils eine C3-Konvertase. Es handelt sich hierbei um Serin-Proteasen auf der Oberfläche von Zielzelle, bzw. Pathogen. Die C3-Konvertasen führen zu einer positiven Verstärkung der Komplementaktivierung und zur Ausbildung von C5-Konvertasen, die wiederum die Ausbildung eines zelllytischen Membrane Attack Complex (MAC) nach sich ziehen (Abb.3)(43).

1.3.1 Der klassische Weg

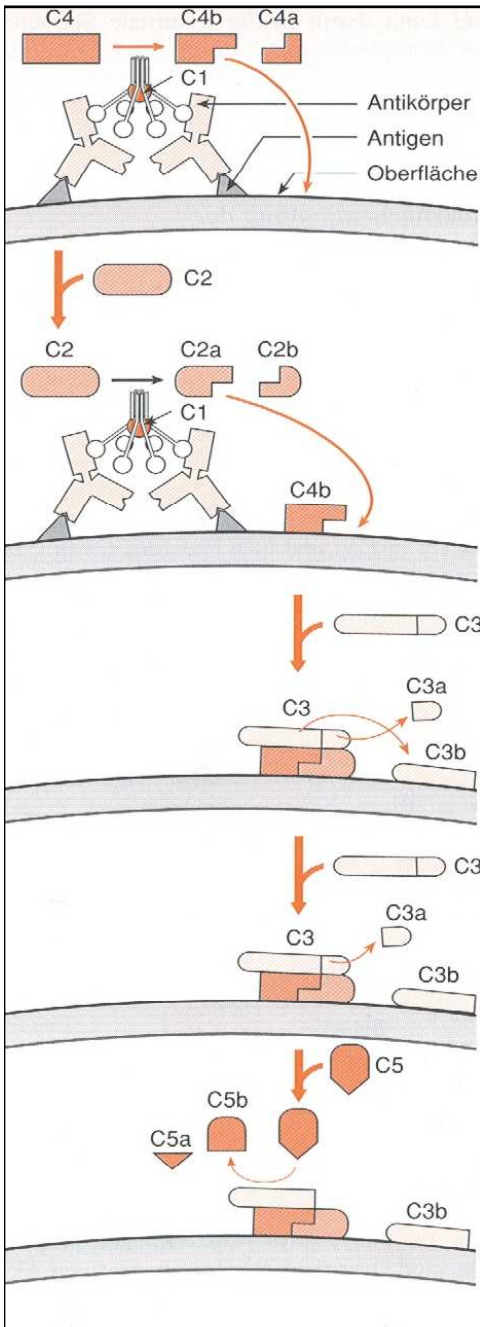


Abb. 1: Klassischer Weg der Komplementaktivierung

Schematische Darstellung der kaskadenartigen Aktivierung der Komplementfaktoren C1-C5 des klassischen Komplementaktivierungsweges (44).

Der Komplementfaktor C1 besteht aus drei funktionellen Einheiten: C1q, C1r, C1s.

C1q besitzt mehrere Bindungsdomänen für Antigen gebundene Antikörper. C1r und C1s sind Serin-Proteasen. Bindet C1q an mindestens zwei 40 nm voneinander entfernte Ig-Fc-Regionen, wird C1r aktiviert. Dieses wiederum aktiviert proteolytisch C1s. Aktives C1s spaltet die beiden Komplementfaktoren C4 und C2 in jeweils ein a- und ein b-Fragment. C4b und C2a binden in unmittelbarer Nähe zum C1-Komplex, und bilden selbst einen aktiven C4bC2a-Komplex, der wiederum C3 in C3a und C3b spalten kann. C4bC2a ist somit die „C3-Konvertase des klassischen Weges“.

C2b diffundiert und wirkt als C-Kinin hauptsächlich permeabilitätssteigernd.

Das entstehende C3b kann einerseits an umliegende Zielzellen binden und so weitere Komplementaktivierung über den alternativen Weg auslösen (s.u.). Andererseits kann C3b an C4bC2a binden, wobei C4bC2aC3b entsteht. Dieser Komplex agiert als C5-Konvertase, der C5 in C5a und C5b spaltet. C4bC2aC3b wird als „C5-Konvertase des klassischen Weges“ bezeichnet. C5a diffundiert und fungiert als Anaphylatoxin und chemotaktischer Lockstoff (43) (Abb.1).

1.3.2 Der Lektin-Weg

Im Lektin-Weg bindet das Mannose-bindende Lektin (MBL) an Mannose oder N-Acetylglukosamin auf pathogenen Oberflächen (z.B. bakterielles Peptidoglykan) und aktiviert

dann die MBL-aktivierten Serin-Proteasen MASP-1, MASP-2 und MASP-3. Diese katalysieren ebenfalls die Spaltung von C4 und C2, wie C1s dies im klassischen Weg übernimmt. Auch hier bilden wieder C4b und C2a ein C4bC2a-Heterodimer und damit die „C3-Konvertase des klassischen Weges“ (43).

1.3.3 Der alternative Weg

Der alternative Weg beinhaltet die Komplementfaktoren C3, Faktor B, Faktor D und Properdin. Ausgelöst wird die Kaskade durch Spaltung von C3 durch eine C3 Konvertase oder durch den spontanen Zerfall des instabilen Komplementfaktors C3 in C3a und C3b in der so genannten „Tick Over Reaktion“. C3b bindet kovalent an Zelloberflächen. Wenn es an körpereigene Zellen bindet, wird es rasch durch Regulatorproteine (Tab.1) inaktiviert oder abgebaut. Auf pathogenen Oberflächen bleibt es dagegen aktiv und kann Faktor B binden. Durch die Bindung an C3b wird Faktor B zugänglich für das Enzym Faktor D, welches am C3bB-Komplex ein Stück des Faktor B (genannt Ba) abspaltet. Bb bleibt an C3b gebunden. Der Komplex C3bBb wird als „C3-Konvertase des alternativen Weges“ bezeichnet. Er ist sehr instabil und zerfällt, wenn er nicht durch die Bindung eines weiteren Proteins, dem Properdin, stabilisiert wird.

C3a diffundiert und besitzt als Anaphylatoxin eine stark chemotaktische und proinflammatorische Wirkung. Das entstehende C3b kann einerseits an umliegende Zielzellen binden und so weitere Komplementaktivierung auslösen, andererseits kann C3b an die C3-Konvertase des alternativen Weges binden, wobei C3bBbC3b entsteht. Dieser Komplex agiert nun ebenfalls als C5-Konvertase, welche C5 in C5a und C5b

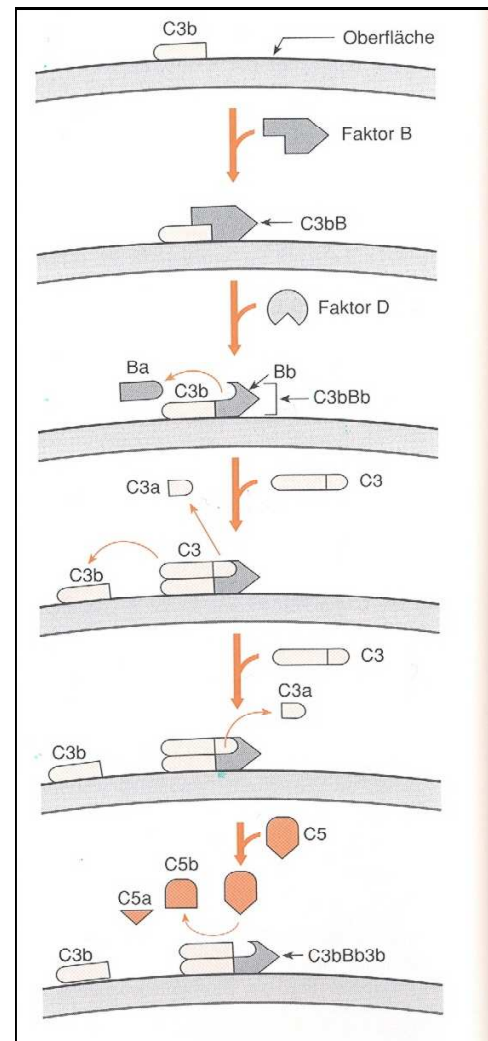
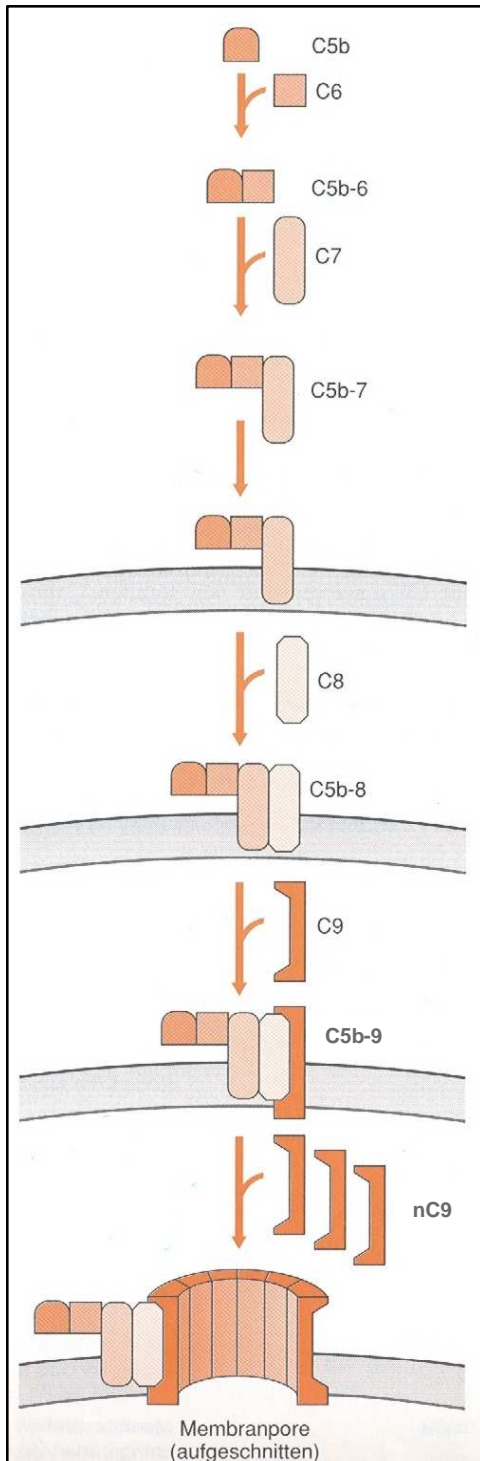


Abb. 2: alternativer Weg der Komplementaktivierung

Schematische Darstellung der Aktivierung der Komplementfaktoren C3, Faktor B und Faktor D des alternativen Weges der Komplementaktivierung (44).

spaltet. C3bBbC3b wird als C5-Konvertase des alternativen Weges bezeichnet. C5a diffundiert und fungiert als Anaphylatoxin und chemotaktischer Lockstoff (43) (Abb.2).

1.3.4 Gemeinsame Endstrecke der Komplementaktivierung - der Membran Angriffs Komplex (MAC)



Die im klassischen, alternativen und Lektin-Weg gebildeten C5-Konvertasen C4bC2aC3b und C3bBbC3b spalten C5 in C5a und C5b. C5a diffundiert und fungiert als Anaphylatoxin und chemotaktischer Lockstoff.

C5b leitet die Bildung des Membran Angriffs Komplexes ein: dazu bildet es mit den Faktoren C6 und C7 einen Komplex, der sich fest in der Lipidschicht der Zellmembran verankert. An diesen Komplex binden wiederum die Faktoren C8 und C9. Der Komplex C5b6789 bildet eine porenförmige Anordnung innerhalb der Zellmembran und wird Membran Angriffs Komplex (MAC) genannt (Abb.3). Das Leck in der Membran führt zum unkontrollierten Einstrom von Ionen und Wasser, was zum Untergang der Zelle führt (43).

Abb. 3: Der Membran Angriffs Komplex (MAC)

Schematische Darstellung der Ausbildung des MAC durch die Komplementfaktoren C5-C9 als gemeinsame Endstrecke aller drei Komplementaktivierungswege (44).

1.3.5 Weitere allgemeine Komplementeffekte

1.3.5.1 C2b

- C2b ist ein Molekül mit Kinin-artiger Wirkung (C-Kinin). Seine Hauptwirkung liegt in einer Steigerung der Gefäßpermeabilität (43)

1.3.5.2 C3a und C5a (Anaphylatoxine)

- Über Bindung an spezifische Rezeptoren auf Mastzellen und basophilen Granulozyten kommt es zur Degranulation und Histaminfreisetzung.
- Über Rezeptoren auf neutrophilen Granulozyten kommt es zur Freisetzung lysosomaler Enzyme und Induktion zytotoxischer Sauerstoffverbindungen.
- Aktivierung und chemotaktische Anlockung immunkompetenter Zellen. Sie opsonieren Antigen-Antikörper-Komplexe durch Bindung und wirken so phagozytosebegünstigend (43;45)
- Der C5a Rezeptor (C5aR) findet sich auf vielen weiteren Körperzellen und kann nach Bindung von C5a genregulatorische Proteine aktivieren, die Proliferation, Differenzierung und Apoptose regulieren (36;46-49).

1.3.6 Schutzmechanismen körpereigener Zellen

Damit keine körpereigenen Zellen vom Komplementsystem opsoniert, bzw. lysiert werden, besitzen diese eine Reihe von Proteinen auf ihrer Zelloberfläche, die als Komplementinhibitoren fungieren. Daneben gibt es auch im Serum gelöste Inhibitoren des Komplementsystems. Letztere sind Gegenspieler zu der Tick Over Reaktion. Diese Reaktion bezeichnet die regelmäßige, spontane hydrolytische Spaltung von C3, welche eine schnelle Elimination von Pathogenen ermöglicht, noch bevor diese z.B. durch Antikörper opsoniert sind. Ungebremst würde dieser spontan aktivierte Komplementfaktor eine unspezifische Entzündungsreaktion hervorrufen, die körpereigenen Zellen schadet. Ein Beispiel für Komplement-Inhibitor-Mangel Syndrome sind das hereditäre Angioödem, das auf einem Mangel an C1-Inhibitor beruht (50), oder das atypische hämolytisch-urämische Syndrom, dem ein Mangel an funktionellem Faktor H zugrunde liegt (51;52). Die folgende Tabelle führt die Komplementinhibitoren mit ihren Eigenschaften auf (Tab.1).

Tab. 1: Inhibitoren des Komplementsystems

Protein	Regulatorfunktion	Inhibierter Komplementweg
C1-Inhibitor (C1-Inh.)	lösliches Serumprotein; inaktiviert C1	klassisch
C4-bindendes Protein (C4BP)	lösliches Serumprotein; bindet an C4b und stört dadurch die Interaktion mit C2b; fördert die Spaltung von C4b durch Faktor I	klassisch
Komplementrezeptor 1 (CR1; CD35)	Membranprotein; bindet an C4b und stört die Interaktion mit C2b; bindet an C3b und stört die Interaktion mit Faktor B; fördert die Aktivität von Faktor I	klassisch und alternativ
Faktor H	lösliches Serumprotein; bindet an C3b und stört die Interaktion mit Faktor B; fördert die Aktivität von Faktor I	alternativ
Decay-Accelerating Faktor (DAF; CD55)	Membranprotein; bindet an C3b und stört die Interaktion mit Faktor B; bindet an C4b und stört die Interaktion mit C2b	klassisch und alternativ
Membran-Cofactor-Protein (MCP; CD46)	Membranprotein; fördert die Inaktivierung von C3b und C4b durch Faktor I	klassisch und alternativ
Faktor I	lösliches Serumprotein; inaktiviert C3b durch proteolytische Spaltung, wenn gleichzeitig Faktor H, CR1 oder MCP als Cofaktoren fungieren	alternativ
CD59	Membranprotein; antagonisiert die Bildung des Membran Angriffs Komplexes (MAC) auf homologen Zellen	terminal

1.4 Apoptose

Man unterscheidet grundsätzlich intrinsische von extrinsischen Apoptose-Signalwegen. Beide Wege führen am Ende über die Aktivierung von Caspasen zum Abbau von Proteinen und DNA.

1.4.1 Der intrinsische Weg

Der intrinsische Weg beginnt mit der Freisetzung von apoptoseinduzierenden Proteinen aus den Mitochondrien. Ein wichtiger Mediator ist Cytochrom C. Dieses geht nach seiner Freisetzung mit dem Protein APAF-1 einen Komplex ein (Apoptosom), der durch Bindung der Procaspase 9, diese in ihre aktive Form umwandelt. Dieser Caspase 9 Komplex (Heterotetramer) aktiviert wiederum die Caspase 3, welche ein direkter Effektor der Apoptose ist (53) (Abb.4). Die Freisetzung von Cytochrom C wird über zahlreiche pro- und antiapoptotische Membranproteine der Bcl-2 Familie reguliert. Ein verändertes Verhältnis zugunsten der proapoptotischen Proteine (z.B. BAX) führt zu einer Cytochrom C Freisetzung (53). Eine Freisetzung von Cytochrom C kann ebenfalls aus dem Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials, z.B. durch erhöhte intrazelluläre Ca^{++} -Spiegel (54), oder direkt toxische Einflüsse von freien Radikalen resultieren (53).

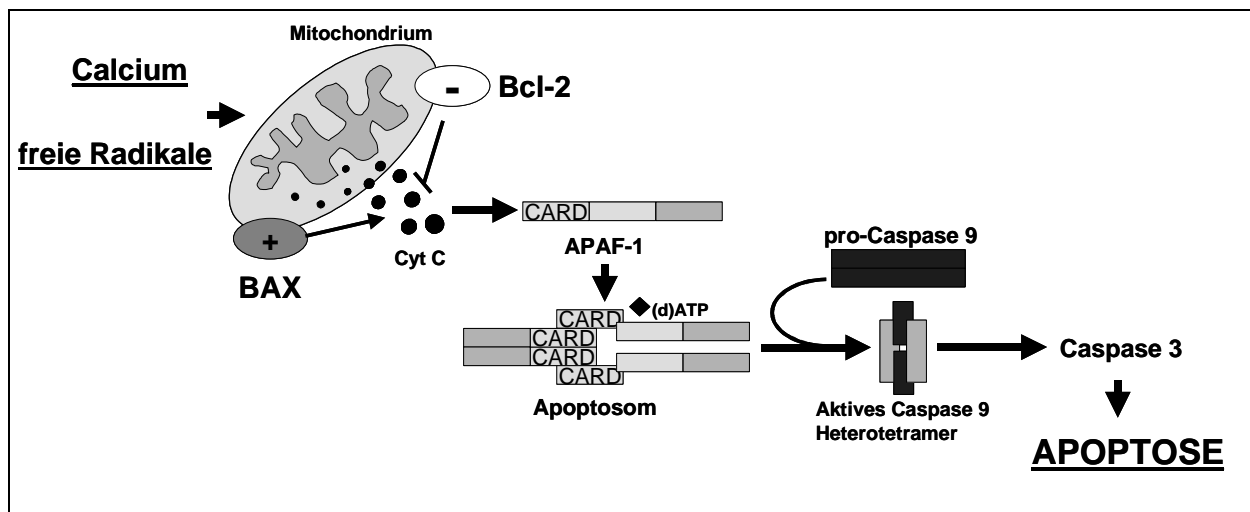


Abb. 4: Intrinsische Apoptoseinduktion

Calcium und durch oxidativen Stress entstehende freie Radikale führen zu einem Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials mit konsekutiver Cytochrom C (Cyt C) Freisetzung. Cyt C bildet mit dem Apoptotic peptidase activating factor 1 (APAF-1), das unter anderem eine Caspase Rekrutierungsdomäne (CARD) besitzt, ein Apoptosom, welches zu einer Aktivierung der Caspase 9 führt, welche wiederum über Aktivierung der Caspase 3 zur Apoptose führt. Bcl-2 hat einen stabilisierenden Einfluss auf die mitochondriale Membran und wirkt so einer Cyt C Freisetzung entgegen. BAX fördert die Freisetzung von Cyt C und wirkt somit proapoptotisch.

1.4.2 Der extrinsische Weg

Der extrinsische Weg ist abhängig von extrazellulären Apoptosesignalen, die ihre Wirkung über Rezeptoren der Zellmembran entfalten. Diese Rezeptoren gehören zur Superfamilie der TNF Rezeptoren (Tumor Nekrose Faktor Rezeptoren). Apoptoseinduzierenden Mitgliedern dieser Familie (Deathreceptors, DR) ist eine etwa 80 Aminosäuren lange, intrazelluläre Sequenz gemein, die als Death Domain (DD) bezeichnet wird. Bei Aktivierung der Rezeptoren durch entsprechende Liganden kommt es über die Bindung und Aktivierung von Procaspasen zur Einleitung der Apoptose. Bisher sind 8 dieser DR beschrieben. Zu den ersten gehören TNF Rezeptor 1 (TNFR1, DR1) und FAS (DR2/CD95). Diese sind mit den Procaspasen 8 und 10 assoziiert. Umwandlung dieser Caspasen in ihre aktive Form mit Aktivierung weiterer Caspasen führen zur Apoptose der Zelle (25;55;56) (Abb.5).

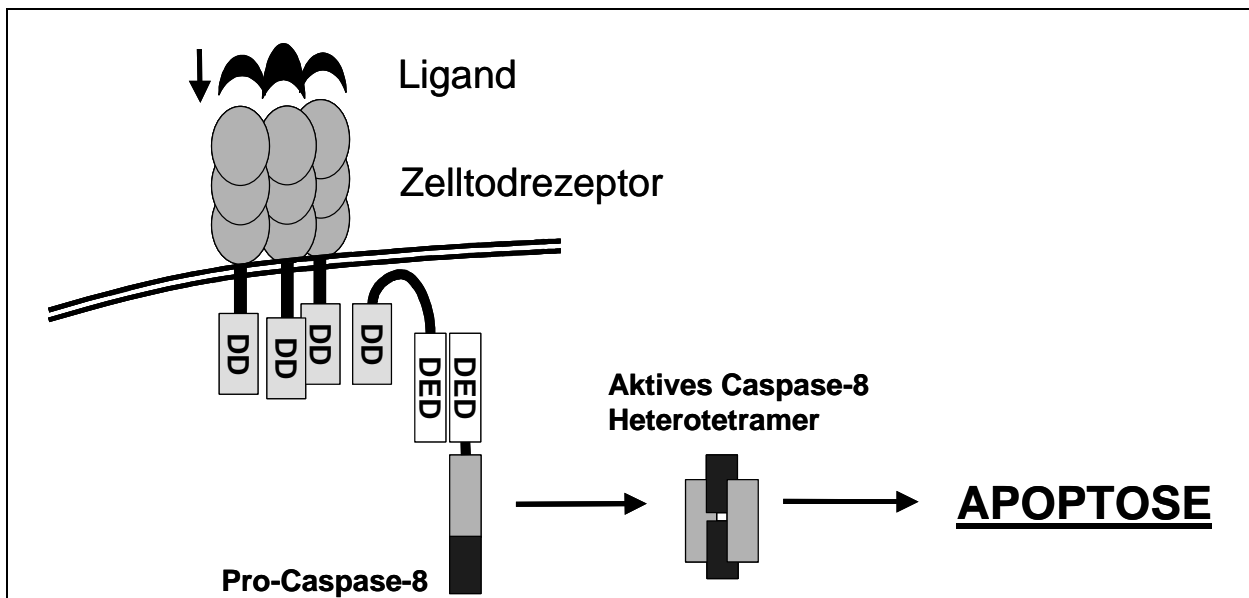


Abb. 5: Extrinsische Apoptoseinduktion

Beispielhafte Darstellung der extrinsischen Apoptoseinduktion. Über die Bindung eines spezifischen Liganden an einen Zelltodrezeptor werden dessen intrazellulär liegenden Death Domänen (DD) aktiviert. Über Assoziation mit Death Effector Domänen (DED) haben diese wiederum einen aktivierenden Einfluss auf Procaspasen, hier Procaspase-8. Die aktivierten Caspasen führen über Bildung von Multimeren zu Apoptose.

1.4.3 Komplementinduzierte Apoptose

Für das Anaphylatoxin C5a ist eine apoptoseinduzierende Wirkung beschrieben (36;57). Farkas et al. zeigten, dass die Apoptoseinduktion in Neuroblastomzelllinien über ein Pertussis-Toxin sensitives G-Protein vermittelt wird (57). Nach Stimulation des C5aR auf den Neuroblastomzellen kommt es zu einem intrazellulären Ca^{++} Anstieg, der die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien bewirkt und zu Apoptose

führen kann. Auch die Induktion bzw. Aktivierung genregulatorischer Proteine, wie c-fos, Ras, B-Raf, Raf-1, MAPK, Phospholipase C und Phosphatidylinositol-3-Kinase durch C5a sind beschrieben (46;47;57). Diese Proteine haben Einfluss auf Proliferation, Differenzierung und auch Apoptose.

Auch die Anlagerung des MAC in die Zellmembran führt zu unkontrolliertem Ioneneinstrom und Anstieg des intrazellulären Calciums, was direkt zu Apoptose, bzw. Nekrose führen kann. Aber auch in nicht-lytischen Konzentrationen zeigte der MAC in einer Studie mit renalen Mesangiumzellen eine apoptoseinduzierende Wirkung über Caspase 3 Aktivierung (58).

Uwai et al. beschrieben weiterhin eine durch Bb vermittelte Apoptoseinduktion in einer Leukämiezellreihe, die TNF- und FAS-Rezeptor unabhängig ist (59).

1.5 Das Komplementsystem und ZNS Erkrankungen

Die Beteiligung des Komplementsystems an ZNS-Erkrankungen wurde in zahlreichen Studien belegt.

Bei Patienten mit Enzephalitis disseminata (ED = Multiple Sklerose = MS), eine Erkrankung, die mit entzündlichen Entmarkungen des ZNS einhergeht, wurden Komplementablagerungen in den Entmarkungsherden gefunden (60-62). Unterstützend hierzu konnte in tierexperimentellen Untersuchungen an Mäusen mit experimentell allergischer Enzephalomyelitis (EAE), dem Tiermodell der ED, festgestellt werden, dass Tiere durch Ausschaltung der Komplementfaktoren C3 und FB weitgehend vor den Folgen einer induzierten EAE geschützt waren(63). Ähnliche Erkenntnisse brachten Untersuchungen an Mäusen, die einen C3-Konvertase-Inhibitor exprimierten(64).

Alzheimer ist eine neurodegenerative Erkrankung, die mit Ablagerung von β -Amyloid im Hirnparenchym einhergeht (50). Innerhalb der Amyloidplaques konnten entzündliche Prozesse mit aktivem Komplement und Interleukinen festgestellt werden (65;66). Da β -Amyloid die Eigenschaft besitzt, das Komplementsystem zu aktivieren (67), wird hier von vielen Forschungsgruppen ein Zusammenhang gesehen (67-69).

Bei Patienten mit Morbus Huntington, einer anderen neurodegenerativen Erkrankung, konnten Ablagerungen von Komplement auf Neuronen und eine Steigerung der Expression von Komplementfaktoren und Rezeptoren (C3aR, C5aR) gezeigt werden (70). Die Gabe eines C5a Rezeptor Antagonisten konnte die klinischen Symptome bei Mäusen mit experimentellem Huntington-Syndrom signifikant lindern (71).

Lupus cerebritis, die zentralnervöse Form des systemischen Lupus erythematosus (SLE), konnte experimentell in Mäusen erzeugt werden (72;73). Eine protektive Wirkung durch den C3-Konvertase Inhibitor Crry (Complement-receptor-1 related y) im Tierversuch legte die Beteiligung des Komplementsystems an diesem Krankheitsbild nahe (72).

Die Beteiligung von Komplement an diesen Krankheitsbildern, die an sich keine Defekte der Blut-Hirn-Schranke aufweisen, spricht für eine intrakranielle Produktion von Komplement. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass Neurone und Gliazellen fähig sind, selbst alle Proteine des Komplementsystems und Komplementrezeptoren zu exprimieren (72;74).

Belege der intrakraniellen Synthese finden sich auch in Studien an Ratten und Menschen, die nicht nur erhöhte Konzentrationen von Komplementfaktoren in Liquor und Hirnparenchym nach SHT zeigen (2;34;35;75), sondern auch gesteigerte mRNA Konzentrationen für Komplementfaktoren, insbesondere in der Penumbra nachweisen konnten (35;76). Das Gleiche gilt für die Rezeptoren der Anaphylatoxine C3a und C5a (C3aR bzw. C5aR), die sowohl konstitutiv von Neuronen und Gliazellen exprimiert werden (36;57;77;78), als auch eine Aufregulierung nach Trauma erfahren (37).

1.6 Effekte von Komplement auf die Zellen des Gehirns

Der Nachweis von C5a- und C3a-Rezeptoren auf Gliazellen(38;48;79) und Neuronen gab Anlass zu einer Reihe von Untersuchungen bezüglich der Funktion dieser Rezeptoren, die zur Erkenntnis verschiedener und scheinbar konträrer Funktionen führten. So konnte C5a bei neuronalen Zellen einerseits Apoptose bewirken(36;57), andererseits aber auch eine protektive Wirkung in Bezug auf Glutamat-Neurotoxizität(80;81), Amyloid- β Toxizität(38) und EAE(82;83) entfalten. Eine mitogene Wirkung auf undifferenzierte Neuroblastomzellen(36) und Oligodendrozyten ließ die Vermutung zu, dass C5a an der Vermittlung reparativer Vorgänge beteiligt sein könnte. Eine ähnlich duale Rolle wird für das Anaphylatoxin C3a angenommen. Neben den schon erwähnten proinflammatorischen Wirkungen, wie Permeabilitätssteigerung der BHS, Chemotaxis und Aktivierung von Leukozyten, wird C3a auch ein protektiver Effekt gegen Glutamat induzierte Neurotoxizität zugeschrieben(79). Heese et al fanden heraus, dass C3a in Mikroglia die Produktion von Nerve Growth Factor (NGF) induziert(48).

Eine mögliche Erklärung für die unterschiedliche Wirkungsweise der Rezeptoren liefern Cole und Morgan in einem Modell, nach dem die Rezeptordichte auf der Zellmembran über Protektion oder Apoptose entscheidet(84) (Abb.6).

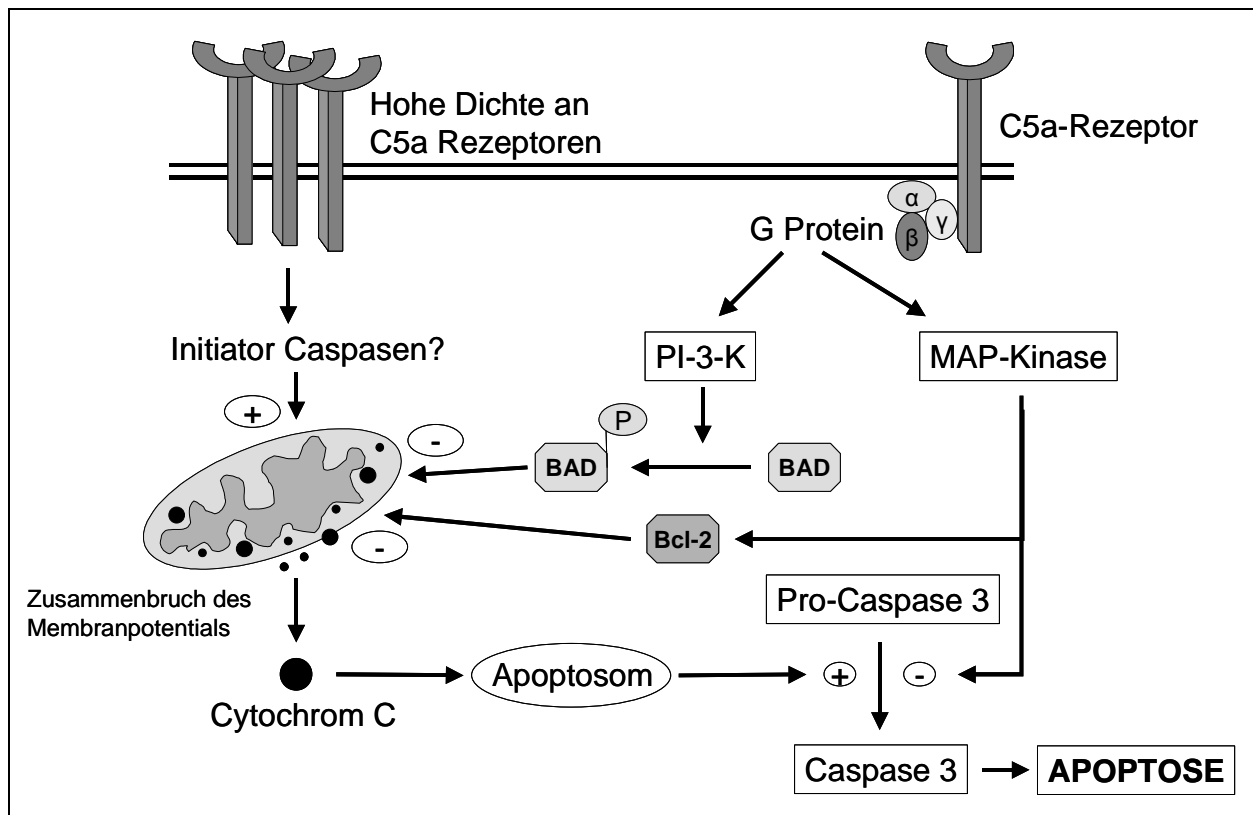


Abb. 6: Modell der pro- und antiapoptischen Wirkung des C5aR nach Cole und Morgan

In diesem Modell von Cole und Morgan führt eine hohe Dichte an C5a Rezeptoren auf der Zellmembran über Mediatorproteine (vermutet werden Initiator Caspasen) zu Apoptose über die mitochondriale Freisetzung von Cytochrom C. Eine geringe Dichte von C5a Rezeptoren hingegen führt über ein G Protein zur Aktivierung von Phosphoinositid-3-Kinase und MAP-Kinase. Diese entwickeln eine antiapoptische Wirkung über Aktivierung von antiapoptischen Proteinen wie Bcl-2 und BAD, bzw. über Inhibition proapoptischer Proteine wie Caspase 3(84).

Sowohl für Faktor B, als auch für C1q und MBL wurde eine anti-inflammatorische, protektive Funktion beschrieben: durch Bindung von Apoptosekörperchen, Zellmembranen nekrotischer Zellen und freier DNA und RNA, wie diese beim Trauma freigesetzt werden, werden diese Strukturen opsoniert und einer schnellen Phagozytose zugänglich gemacht(85;86). Zum einen bremst dies die proinflammatorische Wirkung der freigesetzten Zellinhalte, und zum anderen verhindert die schnelle Clearance von Zelldetritus einen sekundären Kontakt von Zellbestandteilen mit antigenpräsentierenden Zellen, was zu einer Autoimmunisierung führen kann(87;88). Eine Immunisierung und Antikörperbildung gegen DNA und andere Kernbestandteile kann zum Krankheitsbild eines Lupus erythematosus führen(50;87;88). Tatsächlich scheint ein Defizit an C1q mit der Entwicklung des systemischen Lupus erythematosus verbunden zu sein(87;89).

Die Feststellung, dass diese Aufräumarbeiten auch unabhängig von Antikörpern ablaufen können(86;89), prädisponiert diesen Clearance Mechanismus für das Hirnparenchym als immunglobulinfreie Zone.

Der Membran Angriffs Komplex (MAC) aus den Faktoren C5-9 als gemeinsame Endstrecke aller Komplementaktivierungswege führt über die Porenbildung in Membranen zu unkontrolliertem Ionenstrom und Apoptose(84). Dies gilt auch für Neurone und Gliazellen, wie Astrozyten und Oligodendrozyten. Letztere stellen bei der experimentellen autoimmun Enzephalomyelitis (EAE) in Mäusen auch das Angriffsziel des Komplementsystems dar, was zu der für das Krankheitsbild der ED typischen Entmarkung der Neurone führt(90). Die Expression von Komplementinhibitoren, wie DAF, CD46 und CD59, die auf allen Zellen des Hirns exprimiert sind(72)(72;74), macht die Zellen zwar widerstandsfähiger gegen eine Komplement vermittelte Lyse, insbesondere die Astrozyten, die die höchste Dichte des MAC-Inhibitors CD59 aufweisen(74), kann aber bei hohen Konzentrationen von MAC die Apoptose nicht verhindern. Geringere, nicht-lytische Konzentrationen von MAC haben dagegen sogar eine antiapoptotische Wirkung, insbesondere auf Oligodendrozyten(91-93). Weiterhin konnten sublytische Mengen an MAC bei Oligodendrozyten eine Aufhebung der Differenzierung und den Wiedereintritt in den Zellzyklus bewirken(94), was eine Regeneration geschädigten Gewebes ermöglicht. Eine Aktivierung durch MAC führt außerdem zu Produktion von pro-inflammatorischen Metaboliten, wie Leukotrienen, reaktiven Sauerstoffmetaboliten und Interleukinen durch Oligodendrozyten(95), Granulozyten und Monozyten(96).

Experimentelle Injektion des MAC in Rattenhirne führt zu Expression von Adhäsionsmolekülen mit Leukozyteninfiltration in das Hirnparenchym(97) und konnte bei Ratten epileptische Anfälle auslösen(98).

1.7 Komplement und SHT

Diese Vielzahl an positiven und negativen Effekten der Komplementfaktoren auf das Gehirn macht deutlich, dass dieses System weit komplexer in das sekundäre Geschehen nach SHT eingebunden ist, als nur proinflammatorisch. Eine Modulation der Komplementkaskaden scheint aus therapeutischen Gesichtspunkten um so attraktiver. Eine Vielzahl von Versuchen wurde bereits unternommen, unterschiedliche Stellen der Komplementkaskade bei unterschiedlichen experimentellen Krankheitsbildern zu beeinflussen. Einige wurden im Vorfeld genannt. Im Folgenden sollen einige Studien

der letzten Jahre zusammenfassend genannt werden, die speziell das experimentelle SHT betreffen.

Eine Studie an transgenen Mäusen mit astrozytärer Überexpression des löslichen C3-Konvertase-Inhibitors sCrry (soluble Complement receptor related protein Y, homolog des humanen CD46 und CD55=DAF), zeigte nach SHT ein besseres Outcome, geringere Mortalität und eine verbesserte BHS Funktion bei den transgenen Mäusen im Gegensatz zu ihren Wildtyp Littermates über einen Zeitraum von 4 Wochen(3).

In einer Folgestudie wurde Mäusen nach SHT ein rekombinantes Crry-Protein (Crry-Ig) systemisch injiziert, was ebenfalls zu verbessertem neurologischem Outcome im Vergleich zu Vehikel-injizierten Tieren führte. Weiterhin wurde bei den mit Crry-Ig behandelten Tieren ein geringerer Zelluntergang in der hippocampalen CA3/CA4 Region beobachtet. Diese Beobachtungen korrelierten mit einer Hochregulation der Komplement-Regulator-Gene C1-Inh, CD55 und CD59, sowie des anti-apoptotischen Bcl-2 Gens, sowohl auf Gen- als auch auf Proteinebene(99).

In einer weiteren Folgestudie waren CD59 defiziente Mäuse (CD59^{-/-}) ihren Wildtypen nach SHT in Bezug auf cerebrale Apoptose und neurologisches Outcome deutlich unterlegen(100).

Eine Studie an C3^{-/-} und C5^{-/-} Mäusen zeigte nach einer Kryo-Verletzung des Hirnes geringere Neutrophilen Extravasation in das Hirnparenchym im Vergleich zu Wildtyp Mäusen, und eine geringere Ausbreitung des geschädigten Gebietes bei den C3^{-/-} Mäusen. Ebenfalls reduzierend auf die Neutrophileneinwanderung nach Trauma wirkte sich im Rahmen dieser Studie die systemische Injektion eines C5a-Antagonisten aus(101).

Alle diese Studien sprechen dafür, dass Komplement Antagonisten prinzipiell eine Therapieoption nach SHT darstellen. Die dabei bisher angesteuerten Zielproteine des Komplementsystems befinden sich meist auf Ebenen, die die gemeinsame Endstrecke aller Wege der Komplementaktivierung betreffen. Im Hinblick auf die schon angesprochenen vielfältigen, auch antiinflammatorischen und neuroprotektiven Effekte des Komplementsystems, soll die Inhibition in dieser Studie nur auf den alternativen Komplementaktivierungsweg beschränkt bleiben.

1.8 Die FB^{-/-} Maus

Um die Rolle des alternativen Aktivierungsweges der Komplementkaskade genauer untersuchen zu können, entwickelten Matsumoto et al 1997 eine Faktor B defiziente

Knockout Maus (FB^{-/-}). Diese Mäuse besitzen keinerlei Möglichkeit der alternativen Komplementaktivierung. Zelluläre und Antikörper gebundene Immunkompetenz hingegen waren in diesen Mäusen kaum von der in den Wildtypen zu unterscheiden. Lediglich die hämolytische Aktivität des FB^{-/-} Serums war etwas geringer, wohl in Ermangelung der gegenseitig verstärkenden Wirkung der unterschiedlichen Komplementaktivierungswege(102).

Mittlerweile sind zahlreiche Studien an diesen Tieren gelaufen. In vielen experimentell induzierten Krankheitsbildern entpuppten sich die FB^{-/-} Mäuse als besser geschützt im Gegensatz zu ihren Wildtyp Littermates, was auf eine wichtige Rolle des alternativen Komplementaktivierungsweges in der Pathogenese dieser Krankheiten hinweist.

In einer Studie mit experimentell induzierter allergischer Enzephalitis (EAE) zeigten sowohl C3^{-/-} als auch FB^{-/-} Mäuse geringere Ausprägungen von Leukozyteninfiltration und Demyelinisierung. Dieses Ergebnis spricht für eine Komplementbeteiligung an der EAE im Allgemeinen, und für eine Schlüsselrolle des alternativen Weges im Speziellen(63).

FB^{-/-} Tiere waren auch gegen eine experimentell erzeugte Lupus nephritis geschützt(103;104), wohingegen eine Verhinderung der C4 Expression (klassischer Weg) sogar zu einer Verschlimmerung des Krankheitsbildes führte(105). Ähnliches zeigte sich bei der experimentell erzeugten rheumatoiden Arthritis, Asthma und in einem experimentellen Ischämie/Reperusionsmodell der Niere, die in FB^{-/-} Mäusen weniger gravierend verliefen, was man bei C4^{-/-} Mäusen nicht beobachten konnte(106-109).

Auch für den Typ II der membranproliferativen Glomerulonephritis (MPGN II) wurde eine Schlüsselrolle für die alternative Komplementaktivierung postuliert, da diese Erkrankung in mehr als 80% der Fälle mit Autoantikörpern gegen den Komplex C3bBb einhergeht, der einen stabilisierenden Effekt auf diese C3-Konvertase des alternativen Weges hat(110;111). Auch Faktor H defiziente Schweine und Mäuse entwickeln das Krankheitsbild der MPGN(111;112). Eine zusätzliche Defizienz für das FB Gen (FB^{-/-}, FH^{-/-}) schützt die Mäuse jedoch vor einer MPGN(112).

Eine weitere Studie untersuchte den Zusammenhang zwischen Komplementaktivierung und Spontanaborten, da 30% der Frauen mit habituellen Aborten fallende C3 und FB Serumspiegel aufweisen, was im Sinne eines Komplementverbrauchs gewertet werden kann(113). Homozygote Crry-Defizienz (Crry^{-/-}) ist bei Mäusen bereits in Utero letal(114). Die entsprechenden Placentae weisen C3 Ablagerungen auf. Sind die Mäuse

jedoch ebenfalls für FB homozygot defizient (FB^{-/-}), überleben die Feten, was für eine entscheidende Rolle des alternativen Weges spricht(115). Kreuzungen mit C4^{-/-} Tieren dagegen zeigen kein Überleben der Feten(115), was die exklusive Rolle des alternativen Weges unterstreicht.

Ein anderes Syndrom, das zu Fehlgeburten führt, ist das anti-Phospholipid Syndrom (aPL), eine Autoimmunerkrankung mit Ausbildung von Antikörpern gegen Phospholipide, die sich durch gehäufte Thrombosen und Thrombozytopenie bemerkbar macht(116). Mäuse mit induziertem aPL Syndrom erleiden habituell Aborte(117). Ebenfalls auf eine zentrale Rolle des alternativen Komplementweges hinweisend war die protektive Wirkung eines FB inhibierenden Antikörpers, der die Mäuse vor dem Krankheitsbild des aPL Syndroms bewahrte(117).

Diese Ergebnisse deuten auf eine Schlüsselrolle des alternativen Weges der Komplementaktivierung bei der Pathogenese vieler Krankheitsbilder hin.

1.9 Fragestellung

In Hinblick auf zukünftige therapeutische Ansätze bezüglich des SHT geht diese Arbeit einerseits der Frage nach, welche Rolle der alternative Weg der Komplementaktivierung bei der Ausbildung der sekundären Entzündungsantwort nach experimentellem SHT spielt, und andererseits, ob die Ausschaltung dieses Weges günstige Auswirkungen auf das Outcome von Mäusen nach SHT hat. Ein Schlüsselprotein der alternativen Komplementaktivierung ist Faktor B. In dieser Arbeit werden FB^{-/-} Mäuse, die unfähig zur alternativen Komplementaktivierung sind, C57BL/6 Wildtyp Mäusen gegenübergestellt und in Bezug auf die intrazerebralen Anpassungsvorgänge nach experimentellem SHT durch ein weight drop Modell verglichen.

- Zu bestimmten Zeitpunkten vor und nach SHT wird das neurophysiologische Verhalten anhand des Neurological Severity Score bewertet.
- Immunhistochemische Färbungen von Hirnschnitten geben Aufschluss über Parenchymdefekte und Apoptoseraten.
- Mittels ELISA, Western Blot und real-time-RT-PCR werden Unterschiede der Komplementaktivierung, sowie Expressions- und Transkriptionsraten bestimmter Apoptosemediatoren auf molekularer Ebene untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Tiere

2.1.1 Tierstamm

KO Faktor B $+/+$ (Stamm C57/BL6) (Josh Thurman und Mike Holers; University of Colorado Health Sciences Center)

KO Faktor B $-/-$ (Stamm C57/BL6) (Josh Thurman und Mike Holers; University of Colorado Health Sciences Center)

Die Faktor B defizienten Versuchstiere sind aus Sv129 stämmigen embryonalen Stammzellen generiert und über 7 Generationen mit C57/BL6 Mäusen zurückgekreuzt worden(106). In dieser Arbeit werden die Tiere der F8 Generation verwendet.

Für die Experimente werden ausschließlich männliche Tiere im Alter von 10-30 Wochen und einem Mindestgewicht von 25g verwendet. Die Mäuse werden unter Standardbedingungen gehalten und eine Woche vor Experiment vereinzelt, um sie an Versuchsbedingungen zu gewöhnen. Die Experimente sind vom „Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin“ (LAGetSi) genehmigt (G 0099/03).

2.1.2 Einteilung der Tiere

1. Trauma-Tiere (SHT-Tiere) erhalten eine Narkose, subkutane Schmerzmedikation, eine Inzision der Kopfhaut und ein Trauma auf die linke Schädelkalotte. Sie werden zu den definierten Zeitpunkten mittels des NSS beurteilt und euthanasiert.
2. Sham-Tiere (Kontrolle 1) erhalten wie die SHT-Tiere eine Narkose, Schmerzmedikation und eine Hautinzision der Kopfhaut, jedoch kein Trauma.
3. Nil-Tiere (Kontrolle 2) erhalten keinerlei Behandlung. Sie werden lediglich parallel zu allen anderen Tieren gewogen, dem NSS unterzogen und euthanasiert.

Alle Tiere durchlaufen zu den Zeitpunkten 1 Stunde (1h), 4 Stunden, 24 Stunden und 7 Tage (7d) nach Trauma/Sham-OP den NSS-Parcours und werden gewogen. An den entsprechend zugeordneten Zeitpunkten (ab 4h nach SHT) werden die Mäuse euthanasiert und Hirne und Seren für weitere Untersuchungen konserviert. Eine Versuchsreihe (n=1) umfasst 14 Tiere (Tab.2). Für NSS Erhebung, PCR und ELISA

Untersuchungen ist n=6. Für den Western Blot, die immunhistochemischen sowie TUNEL Untersuchungen gilt jeweils n=2.

Tab. 2: Einteilung der Versuchstiere

Behandlung	Genotyp	Euthanasiezeitpunkt		
		4h	24h	7d
Nil	Wt	4h		
	KO	4h		
Sham	Wt	4h	24h	7d
	KO	4h	24h	7d
SHT	Wt	4h	24h	7d
	KO	4h	24h	7d

Einteilung der Versuchstiere nach Behandlungsart (Nil = Kontrolltier; Sham = Sham-operiert; SHT = Tiere mit appliziertem Schädel-Hirn-Trauma), Genotyp (Wt = Wildtyp; KO = Faktor B Knockout) und Zeitpunkt der Euthanasie mit Organ- und Serumentnahme (4h = 4 Stunden; 24h = 24 Stunden; 7d = 7 Tage)

2.2 Das Traumamodell

Um bei den zu untersuchenden Mäusen ein reproduzierbares, geschlossenes Schädel-Hirn-Trauma zu erzeugen, wurde ein modifiziertes Modell von Chen et al (1996) verwendet (Abb.7). Dieses Modell funktioniert nach dem Prinzip des „weight-drop“: Ein stempelgeführtes Gewicht von 333g wird aus 1-2,5 cm Höhe auf die freigelegte Schädelkalotte der Maus fallengelassen und erzeugt so einen reproduzierbaren Impact.

2.2.1.1 Chemikalien

Isofluran	Florene®, Abbot GmbH & Co. KG
Buprenorphin	Essex Pharma GmbH, Deutschland
Ampuwa®	Fresenius Kabi Deutschland GmbH
Sauerstoff	Linder

In einer Narkoseglocke werden die Tiere zunächst mit Isofluran narkotisiert. Anschließend wird den Tieren zur Analgesie Buprenorphin in einer Dosierung von 0,1mg/kg KG subkutan injiziert. Mit dem Skalpell wird danach eine sagittale Inzision der Kopfhaut und der Weichteile durchgeführt, so dass die Schädelkalotte frei liegt. Das

Trauma wird links paramedian auf die Kalotte der Maus gesetzt. Nach dem Trauma wird den Tieren 100%iger Sauerstoff bis zum Erwachen aus der Narkose gegeben und die Atmung überwacht, bis sie zurück in ihren Käfig gesetzt werden.

2.2.1.2 Traumagerät

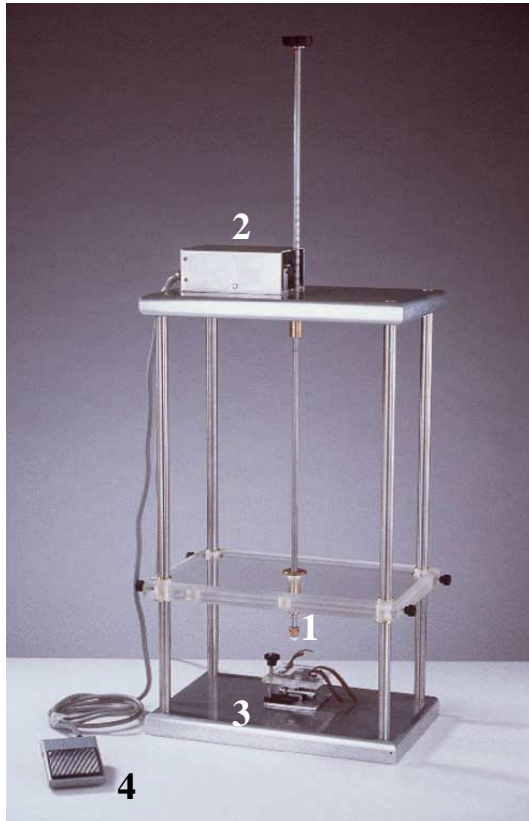


Abb. 7: „Weight-Drop“ Apparatur zum Erzeugen des geschlossenen Schädel-Hirn-Traumas

(1) stempelgeführtes Gewicht von 333g mit silikongepolsterter Spitze, (2) elektronische Haltevorrichtung, (3) Tisch mit Tierhalterung, (4) manueller Fußschalter

2.3 Neurological Severity Score (NSS)

Um die Schwere und die physiologischen Auswirkungen des Traumas auf die jeweiligen Tiere im Verlauf beurteilen zu können, wird für jedes Tier zu den Zeitpunkten 1h, 4h, 24h und 7d mittels eines standardisierten Tests ein Wert des Neurological Severity Score (NSS, Tab.3) ermittelt. Der Test beinhaltet 10 Aufgaben. Für jede nicht bewältigte Aufgabe erhält die Maus einen Punkt. Je mehr Punkte eine Maus erhält, desto schwerwiegender sind die Folgen des Traumas.

Anhand des 1h NSS Wertes erfolgt das Matching der Tiere mit einem entsprechenden Vergleichstier des anderen Genotyps und die Festlegung des Euthanasiezeitpunktes. Tiere mit einem hohen 1h NSS Wert (schweres Trauma) wurden eher zu früheren Zeitpunkten euthanasiert, Tiere mit niedrigerem NSS können länger beobachtet werden. Ein NSS von mehr als 8 Punkten gilt als Abbruchkriterium; die Maus wird euthanasiert.

Tab. 3: Neurological Severity Score (NSS)(118)

Aufgabe	Beschreibung	Punkte (Erfolg/Misserfolg)
Austreten aus Kreis	Fähigkeit und Initiative, einen Kreis von 30cm Durchmesser innerhalb von 3min zu verlassen	0/1
Mono-/Hemiparese	Parese von oberer und/oder unterer Extremität	0/1
geradeaus Laufen	Aufmerksamkeit, Initiative und motorische Fähigkeit geradeaus zu laufen	0/1
Suchen	Physiologisches Verhalten als Zeichen des Interesses an der Umgebung	0/1
Schrecken	Reflex; die Maus reagiert auf lautes Händeklatschen	0/1
Balancieren Balken 7mm	Fähigkeit, auf einem Balken von 7mm Breite mindestens 10 sek. zu balancieren	0/1
Balancieren Balken 5mm	Fähigkeit, auf einem Balken von 5mm Breite mindestens 10 sek. zu balancieren	0/1
Laufen auf Balken 3cm	Fähigkeit, einen Balken von 30cm Länge und 3cm Breite zu überqueren	0/1
Laufen auf Balken 2cm	Fähigkeit, einen Balken von 30cm Länge und 2cm Breite zu überqueren	0/1
Laufen auf Balken 1cm	Fähigkeit, einen Balken von 30cm Länge und 1cm Breite zu überqueren	0/1
maximale Punktzahl		10

Beschreibung der Aufgaben, deren Bewältigung oder Nichtbewältigung zu einem akkumulierten Punktwert zwischen 0 und 10 Punkten führt, dem sogenannten NSS Wert, der als Maß für die klinische Beeinträchtigung der Maus nach SHT herangezogen wird.

2.4 Euthanasie und Organentnahme

Zu den Euthanasiezeitpunkten werden die Tiere mittels Isofluran narkotisiert und mit einer Guillotine enthauptet. Das Blut aus den Carotiden wird in einem Tube aufgefangen, bei 4°C 20 Minuten lang mit 12000 U/min zentrifugiert, das Serum abpipettiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das Großhirn wird entnommen und in einem Kryogefäß in flüssigem Stickstoff eingefroren. Alle Probenmaterialien werden bis zur späteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.5 Immunhistochemie

2.5.1 Herstellen der Gefrierschnitte

Die gefrorenen Gehirne werden in Tissue Tec eingebettet und bei -50°C eingefroren. Danach werden die Gehirne geschnitten oder bei -80°C gelagert. Von dem eingebetteten Gehirn werden am Cryostat $8\mu\text{m}$ dicke Schnitte angefertigt. Die Schnitte werden über Nacht bei Raumtemperatur (RT) getrocknet und anschließend bis zur immunhistochemischen Färbung bei -80°C gelagert.

2.5.2 Immunhistochemische Färbung

Immunhistochemische Analysen der Hirn-Schnitte werden mittels des Vectastain ABC Elite Kit und Vectastain DAB Substrat Kit durchgeführt, welche Biotin-Avidin-Peroxidase als Detektionssystem und Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid (DAB) als Chromogensubstrat benutzen. Die Fixierung der Schnitte erfolgt in -20°C kaltem Aceton. Nach Blocken mit BSA, Inkubation mit primärem AK (Tab. 4) und sekundärem AK (biotinyliert) erfolgt die Zugabe von Avidin-Peroxidase in Form der ABC-Reagenz. Durch 2 minütige Inkubation mit DAB Substrat kommt es zur Anfärbung der detektierten Regionen. Die Farbreaktion wird in Aqua dest. gestoppt, die Entwässerung erfolgt über eine aufsteigende Alkoholreihe (Ethanol 70%, 96%, 100%; Xylol 98%).

2.5.2.1 Chemikalien

Tissue Tec	Sakura Finetek Germany GmbH, Heppenheim, Deutschland
DakoCytomation-Pen	DakoCytomation GmbH, Hamburg, Deutschland
Vectastain Elite ABC Kit	Alexis, Grünberg, Deutschland
Mouse Kit	# PK 6102
Rabbit Kit	# PK 6101
Rat Kit	# PK 6105
Entellan® Schnelleindeckmittel	Merck, Darmstadt, Deutschland

Tab. 4: Primäre Antikörper

Antikörper (IgG)	Hersteller	Spezies	Verdünnung
Anti-neuronal nuclei (NeuN)	Chemicon	Maus	1:2000
Anti-CD11b	AccuSpecs	Ratte	1:200
Anti-Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP)	Immunon	Kaninchen	1:100

Für die immunhistochemischen Untersuchungen verwendete Antikörper mit entsprechenden Verdünnungsverhältnissen

2.5.2.2 Lösungen

H ₂ O ₂ -Lösung in Methanol (Flukalösung)	3:1000
PBS/FCS (Stocklösung)	1:10
Blocking Serum aus Vectastain Elite ABC Kit	1:200 in PBS/FCS
Primäre Antikörper	s. Tab.4
Sekundärer Antikörper aus Vectastain Elite ABC Kit	1:100 in PBS/FCS
Vectastain Elite ABC-Reagenz	20µl Reagenz A 20µl Reagenz B 2960µl PBS/FCS
Vectastain DAB Substrat Kit	2,5ml Aqua dest. 1 Tropfen Puffer 2 Tropfen DAB 1 Tropfen Hydrogenperoxid 1 Tropfen Nickel

2.6 TUNEL-Test

(Terminale desoxyribosyl Transferase (TdT) mediated dUTP Nick End Labeling)

Ein TUNEL Assay dient zum Nachweis apoptotischer Zellen in den Hirnschnitten und somit der Lokalisation und der Beurteilung des Grades an Apoptose in den Hirnarealen. Mit der TUNEL-Reaktion werden die Enden, bzw. Schnittstellen von DNA-Doppelsträngen über eine Fluoreszenzmarkierung sichtbar gemacht. Da die DNA in apoptotischen Zellen durch zelleigene DNAsen in viele kurze DNA-Doppelstränge zerschnitten wird, liegen hier viele DNA-Enden vor – es resultiert ein intensives Signal. In dieser Arbeit wird ein In Situ Cell Death Detection Kit von Roche verwendet.

Alle Schnitte werden in Formalinlösung/Ethanol-Essigsäure fixiert und mit Triton X-100 vorbehandelt. Als Positivkontrolle dienen Hirnschnitte von Nil-Tieren, die mit DNase

vorbehandelt werden. Die Negativkontrollen werden lediglich mit der TUNEL Label Solution ohne Enzym Solution inkubiert. Abschließend werden die Schnitte mit Vectorshield DAPI Mounting Solution eingedeckelt. DAPI färbt die DNA aller Zellen (apoptotisch und nicht-apoptotisch) gleichermaßen und dient als Gegenfärbung. Zur Auswertung dient ein Fluoreszenzmikroskop mit zwei verschiedenen Filtern: DAPI gefärbte DNA emittiert Licht mit 460nm Wellenlänge, TUNEL gefärbte DNA emittiert Licht mit 520nm Wellenlänge. Fotografiert werden Traumastelle, Contrecoup und Hippocampus. Ein Vergleich der DAPI Färbung mit der TUNEL Färbung ermöglicht das Abschätzen der Apoptoserate innerhalb der fotografierten Region.

2.6.1.1 Chemikalien

Triton X-100	Acros Organics, Belgien
DNase 1, grade I	Roche # 10 104 132 001
BSA	Vector #N0912
In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein	Roche #1168495910 Label Solution 550µl Enzym Solution 50µl
Vectorshield (4'-6'-Diamidino-2-phenylindole)	Vector #H1200

2.6.1.2 Lösungen

Formalinlösung	4%ig in PBS (pH-Wert 7,4)
Ethanol/Essigsäure	1:2
Triton X-100 Lösung	3%ig in PBS
DNase grade I Stocklösung	20 000U/ml 50% Glycerol 20mM Tris HCl pH 7, 5 1mM MgCl ₂
DNase Puffer	50mM Tris HCl pH 7,5 10mM MgCl ₂ 1mg/ml BSA
DNase Verbrauchslösung	50µl DNase Puffer 1µl DNase Stocklösung
TUNEL Reaktions Mixtur	450µl Label Solution 50µl Enzym Solution
Negativkontrolle	100µl Label Solution

2.6.1.3 Geräte

Fluoreszenzmikroskop mit Kamera

Carl Zeiss AG, Deutschland

Axioskop 40

Software

Alpha digi doc 1201

2.7 ELISA

Die ELISA Untersuchungen erfolgten durch Michael Holers (Department of Medicin and Immunology, University of Colorado Health Sciences Center, Denver, CO 80262, USA), mit dessen Labor zur Zeit dieser Arbeit eine Kooperation bestand, und dessen ELISA Ergebnisse für diese Arbeit freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurden.

Die Arbeitsgruppe nutzte für ihre ELISA Untersuchungen monoklonale Maus-Antikörper gegen Maus-C5a (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA). Untersucht wurden die Seren aller Versuchstiere auf Gehalt an C5a. Die Seren wurden gefroren verschickt.

2.8 Western Blot

In dieser Arbeit wird die SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese) Methode mit vertikalem Mini-Gelelektrophorese-System verwendet. SDS (Sodium Dodecyl Sulfat) ist ein anionisches Detergenz, das die Eigenladung der Proteine überdeckt. In Kombination mit β -Mercaptoethanol, welches Disulfidbrücken zerstört, führt dies zur Denaturierung der Proteine. So werden diese bei der Gelelektrophorese unabhängig von ihrer Sekundär- und Tertiärstruktur ausschließlich nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Zur Detektion der Proteine wird ein mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelter sekundärer Antikörper in Verbindung mit einer Chemilumineszenz Lösung verwendet.

2.8.1 Aufbereitung der Proben für die Gelelektrophorese

Alle Schritte zur Aufbereitung der Proben werden auf Eis durchgeführt. Die Hirne werden mit dem Skalpell in linke und rechte Hemisphären getrennt und mit dem Homogenisator in Lysatpuffer mechanisch zerkleinert. Anschließend werden die Proben zentrifugiert, die Überstände abpipettiert. Die Seren werden lediglich mit Lysatpuffer auf das Verhältnis 1:10 verdünnt. Alle Probenaliquots werden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.8.1.1 Chemikalien

Tris-HCl

Roth

NaCl	Roth
SDS	Sigma
Aprotinin Tyrasol	Sigma
Leupeptin	Roche Pharma AG Deutschland
Pepstatin	Roche
PMSF	Sigma
Nonidet P40	Sigma

2.8.1.2 Lösungen

Lysat-Puffer (Ripapuffer) 10ml	8,57ml Aqua bidest. 100µl Tris-HCl (1M pH 7,5) 480µl NaCl (3M) 500µl SDS (10%) 100µl Aprotinin Tyrasol 50µl Leupeptin 50µl Pepstatin 100µl PMSF (100mM in DMSO) 50µl Nonidet P40
--------------------------------	--

2.8.2 Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentration jeder Probe wird nach der BCA-Methode (bicinchoninic acid) mit Hilfe des BCA Protein Assay Kit der Firma Pierce bestimmt. Bei jeder Proteinbestimmung wird eine BSA Verdünnungsreihe als Standard mitbestimmt. Der Proteingehalt jeder Lösung wird dreifach bestimmt und gemittelt, die Farbreaktion mittels Microplatereader vermessen und mit dem Microplate Manager® ausgewertet.

2.8.2.1 Chemikalien

BCA Protein Assay Kit mit Reagenz A und B	Pierce, USA
BSA [2µg/µl]	Biorad laboratories GmbH, Deutschland

2.8.2.2 Geräte

Microplatereader 680	Biorad
PC Software Microplate Manager® 5.2.1	Biorad

2.8.3 Gelelektrophorese

Entsprechend der Molekülgröße der nachzuweisenden Proteine wird ein grobmaschiges, 12%iges Gel hergestellt. Von jeder Probe werden je 60µg Protein aufgetragen, die zuvor mit Lysatpuffer auf ein einheitliches Volumen gebracht werden.

Als Größenmarker laufen gefärbte Proteinstandards in den äußeren Taschen mit.

Das anschließende Blotting erfolgt für 2h mit einer Spannung von 100 Volt. Nach Abschluss des Vorgangs wird die Blotmembran zum Nachweis des erfolgreichen und gleichmäßigen Proteinblots in Ponceau Lösung gefärbt, gescannt und anschließend in PBS/Tween entfärbt. Es folgt die Blockierung der Membranen mit 3%iger oder 5%iger Magermilch (MM) (Tab.7). Der primäre Antikörper wird in magermilchhaltigem PBS/Tween angesetzt, die Membran entsprechend Tab.7 inkubiert. Die sekundären Antikörper werden im Verhältnis 1:5000 in 5%MM angesetzt, inkubiert wird 1h bei RT.

Zur Detektion wird ein ECL Detektions Kit verwendet, welches unter Freisetzung von Licht mit der Meerrettich-Peroxidase des sekundären Antikörpers reagiert. Die Lichtemission wird auf einem Fotofilm sichtbar gemacht, die Banden anhand der mitgelaufenen Proteinstandards einem Molekulargewicht zugeordnet. Dieselbe Membran wird nach entsprechendem Waschen auf weitere Proteine untersucht. So werden Bcl-2 und BAX immer auf derselben Membran nachgewiesen. Außerdem durchlaufen alle Membranen mit Hirnproben am Ende einen Inkubationszyklus für β -Aktin, welches als Housekeeping Protein fungiert. Da Serum kein β -Aktin enthält, wird in diesem Fall die Ponceau-Färbung als Beleg für das Auftragen gleicher Proteinmengen herangezogen.

2.8.3.1 Chemikalien

Bisacrylamid 30%	Biorad
Tris (base)	Invitrogen GmbH, Deutschland
Tris-HCl	Roth
SDS	Sigma
Ammoniumpersulfat	Roth
TEMED	Roth
Bromphenolblau	Biorad
β -Mercaptoethanol	Merck
Glycerin	Roth
Ponceau S Solution®	Sigma-Aldrich
Gefärbte Proteinstandards	Biorad

Glycin	Serva Electrophoresis GmbH, Deutschland
Aqua bidest.	Charité, eigene Herstellung
Blotting Grade Blocker® (Magermilchpulver)	Biorad
ECL Detection Reagenz 1 (ECL=Enhanced ChemiLuminescence)	Amersham Bioscience GmbH, Deutschland
ECL Detection Reagenz 2	Amersham Bioscience

Tab. 5: Primäre Antikörper

Mouse-IgG anti Bcl-2 (monoklonal)	Santa Cruz; # sc-7382
Rabbit-IgG anti Bax (polyklonal)	Santa Cruz; # sc-493
Chicken-IgG anti C3a (polyklonal)	Dr. S. Barnum, USA
Chicken-IgG anti FB (polyklonal)	Dr. S. Barnum, USA
Mouse-IgG anti β -Aktin (monoklonal)	Sigma; # A-5441

Tab. 6: Sekundäre Antikörper (Meerrettich-Peroxidase gekoppelt)

IgG anti Mouse-IgG	Dako; # P-0447
IgG anti Chicken-IgG	Santa Cruz; # sc-2497
IgG anti Rabbit-IgG	Dako; # sc-P-0448

2.8.3.2 Lösungen

Trenngelpuffer für 500ml	38,5g Tris (base) 9,3g Tris-HCl 1,0g SDS
Trenngel 12%	4ml 30% Bisacrylamid 5ml Trenngelpuffer 0,9ml Aq. dest. 10 μ l TEMED 100 μ l APS
Sammelgelpuffer für 500 ml	19,7g Tris(base); 0,33M 1,0g SDS pH mit HCl auf 6,8 einstellen
Sammelgel 5,0%	0,8ml 30% Bisacrylamid 2,5ml Sammelgelpuffer 1,7ml Aq. bidest.

2 Material und Methoden

Samplepuffer (Laemmlipuffer) 4x	10µl TEMED 50µl APS 2,5 ml Tris HCl 0,2 g SDS 4 ml Glycerin 2ml β-Mercaptoethanol 4mg Bromphenolblau 1,5ml Aq. bidest.
Elektrophoresepuffer (5l)	72,0 g Glycin 5g SDS mit Aqua dest. auf 5l auffüllen
PBS/Tween 0,05% 2l	19,1 g PBS 100µl Tween 2l Aq. bidest.
ECL Detektionslösung	5ml ECL Detection Reagenz 1 5ml ECL Detection Reagenz 2

Tab. 7: Primäre Antikörper

Antikörper	%MM	Blockieren	Verdünnung	AK Ink.-Zeit	Gel%	Proteingröße
Anti Bcl-2	3%	üN	1:500	2:30h	12%	26 kDa
Anti Bax	5%	üN	1:250	1:30h	12%	21 kDa
Anti FB	5%	1h	1:8000	üN	12%	98 kDa
Anti β-Aktin	5%	1h	1:10000	20min	12%	44 kDa

Für den Western Blot verwendete primäre Antikörper zur Detektion der Bcl-2, BAX, Faktor B und β-Aktin Banden. Die Antikörper werden in PBS mit 3%, bzw. 5% Magermilchpulver (MM) in entsprechender Verdünnung angesetzt (1:250 – 1:10000). AK Ink.-Zeit = Inkubationszeit der Membran in antikörperhaltigem PBS/MM. Gel% bezieht sich auf den prozentualen Bisacrylamid Anteil im Trenngel, welcher die Maschenweite beeinflusst. Die Größe der zu detektierenden Proteine wird in Kilodalton (kDa) angegeben, mitlaufende farbige Marker im Gel erlauben eine Zuordnung der Proteinbanden zu den entsprechenden Molekülgrößen.

2.8.3.3 Geräte

Nitrozellulosemembran Protran BA83

Schleicher&Schüll

Entwickler CronexT6

DuPont

2.9 Real-time RT PCR

2.9.1 RNA-Isolierung

Bei der RNA-Isolierung werden Gewebe und Zellen lysiert, um an die gesamte RNA zu gelangen. Diese wird dann in mehreren Schritten aufgereinigt, von Proteinen und genomischer DNA befreit, und dann für weitere Analysezwecke genutzt.

Die Hirne werden in rechte und linke Hälfte geteilt und in Qiazol (Lysereagenz) auf Eis homogenisiert. Anschließend werden die Homogenisate für 15min bei RT für die weitere chemische Lyse der Zellen inkubiert. Mittels Chloroform erfolgt die Ausfällung lipophiler Substanzen, die RNA wird dann mittels Ethanol aus der wässrigen Phase gefällt und mittels RW1 Puffer und RPE Puffer auf der RNeasy MiniSpin Säule gereinigt und in RNase freiem Wasser isoliert.

Die Konzentration und die Reinheit der RNA wird photometrisch bestimmt.

2.9.1.1 Chemikalien

DEPC-Wasser (0,1%ig in autoklaviertem Wasser)	Roth
Qiazol	Qiagen #79306
Ethanol (70%ig in DEPC-Wasser)	J.T. Baker
Chloroform (100%ig)	Roth
RNeasy mini Kit	Qiagen #74105
<ul style="list-style-type: none"> • RNeasy Mini Spin Column (2ml) • Collection tubes (1,5ml und 2,0ml) • Buffer RW1 • Buffer RPE • RNase freies Wasser 	

2.9.1.2 Geräte

Smart Spec 3000 Photometer	BioRad
Quartz Spectrometer Cell, 10mm	BioRad

2.9.2 cDNA-Synthese

Gleiche Mengen RNA werden mit RNase freiem Wasser auf gleiches Volumen gebracht, Inkubation mit gDNA Wipeout Buffer dient der Elimination evtl. noch vorhandener genomischer DNA. Anschließend wird der Master Mix hergestellt und hinzugefügt. Die cDNA-Synthese wird im Mastercycler durchgeführt. Die Synthese erfolgt mit dem QuantiTect Reverse Transcription Kit in zwei Syntheseschritten. Der erste Schritt ist die Erststrangsynthese, wobei die RNA mittels reverser Transkriptase

2 Material und Methoden

und Oligo-dT-Primern und Nonamer Primern zu einem RNA-DNA-Hybrid umgeschrieben wird. Als Zweites erfolgt die Zweitstrangsynthese, bei der der komplementäre DNA-Strang mit Hilfe der RNase H, der Polymerase gebildet wird.

2.9.2.1 Chemikalien

QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen GmbH, Deutschland #205311
<ul style="list-style-type: none">• gDNA Wipeout Buffer• RT Primer Mix• Quantiscript Reverse Transcriptase• Quantiscript 5x RT Buffer• RNase freies Wasser	

2.9.2.2 Lösungen

MasterMix	Quantiscript 5x RT Buffer 8µl RT Primer Mix 2µl Quantiscript Reverse Transcriptase 2µl
-----------	---

2.9.2.3 Geräte

Mastercycler	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
--------------	---------------------------------------

2.9.3 Real-time-RT-PCR

Die real-time-RT-PCR (RT=reverse Transkriptase) ist eine semiquantitative Methode, bei der die relative Menge der gesuchten DNA nach jedem Reaktionsschritt bestimmt wird.

Als Detektionssystem für die real-time-RT-PCR wird in dieser Arbeit das QuantiProbe Prinzip verwendet. Bei dieser Methode werden Sonden (ssDNA) genutzt, die komplementär zu einem Stück des gewünschten Gens sind. Diese Sonden emittieren Licht, sobald sie an die komplementären DNA-Stränge angelagert sind. Das Signal verstärkt sich damit proportional zu der vorhandenen DNA.

Die PCR erfolgt im Opticon unter standardisierten Bedingungen. Als No Template Control (NTC) dienen Reaktionsgefäße mit Mastermix, jeweiligem Assay und RNase freiem Wasser. In jeder Probe wird GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) als Housekeeping Gen gemessen. Die Quantifizierung der

Gentranskription erfolgt dann jeweils in Bezug zur Transkriptionsstärke dieses Housekeeping Gens als %GAPDH.

2.9.3.1 Chemikalien

QuantiTect Probe PCR Kit Qiagen #204345

- MasterMix (beinhaltet dUTP; HotStarTaq®. DNA Polymerase)
- RNase freies Wasser

Primer Qiagen

- QuantiTect Gene Expression Assay
- QuantiTect Custom Assay

Tab. 8: Eingesetzte Primer in der real-time-RT-PCR

Gen	Gen ID des NCBI	Primer Sequenzen
GAPDH	14433	Validierter Genexpressions Assay QuantiTect Mm_GAPD #241012
BCI-2	12043	Validierter Genexpressions Assay QuantiTect Mm_BCI-2 #241118
BAX	12028	Validierter Genexpressions Assay QuantiTect Mm_BAX #241116
FAS	14102	Validierter Genexpressions Assay QuantiTect Mm_Tnfsf6 #241122
FAS-L	14103	Validierter Genexpressions Assay QuantiTect Mm_Tnfsf6-L #241194
TNF α	21926	Validierter Genexpressions Assay QuantiTect Mm_TNF #241034

2.9.4 Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese wird eingesetzt, um die Reinheit der Amplifikate zu überprüfen. Hierzu erfolgt die Herstellung eines 3%igen Gels aus 4,5g High Resolution Agarose in 150ml TAE 1x Puffer. Die Elektrophorese läuft für ca. 2h bei 120V. Anschließend wird das Gel in der Ethidiumbromid-Lösung für 1h gefärbt. Danach erfolgt die Auswertung mittels einer UV-Lampe.

2 Material und Methoden

2.9.4.1 Chemikalien

High Resolution Agarose	Roth
Trisbase	Invitrogen
Essigsäure 100%	Merck
EDTA	Sigma Aldrich
Bromphenol blau	BioRad
Xylene	Roth
Glycerol 99.5%	Roth
100bp DNA Ladder	Promega
Ethidiumbromid 1%	Roth

2.9.4.2 Lösungen

50x TAE-Puffer (500ml)	Trisbase 121g Eisessig 28,5ml EDTA (pH 8; 0,5M) 6ml
1xTAE-Puffer	50xTAE mit Aqua dest. verdünnen (1:50)
Auftragspuffer	0,25% Bromphenol blau 0,25% Xylene cyanol 30% Glycerol
TE	10mM Tris/HCl pH 7,5 1nM EDTA
Ethidiumbromid	400ml Aqua dest. 20µl Ethidiumbromid

2.10 Statistik

Es wurden zu jedem Zeitpunkt (1h, 4h, 24h, 7d) die NSS Werte aller noch lebenden Tiere der Gruppen KO vs. Wt untersucht. Mittels Kolmogorov-Smirnov Test wurde die Normalverteilung der Werte bestätigt, die Varianzanalyse erfolgte mittels F-Test, und die Signifikanz wurde mit dem entsprechenden T-Test (für gleiche oder unterschiedliche Varianz) berechnet. Ebenso wurde verfahren bei der Signifikanzberechnung der C5a Serumkonzentrationen und den Transkriptionsraten, wobei hier zu jedem Zeitpunkt (4h, 24h und 7d) 6 Tiere jedes Genotypen (Wt vs. KO) miteinander verglichen wurden (bzw. 3 pro Genotyp bei TNF- α). Weiterhin wurden bei den Transkriptionsraten auch Traumatiere mit Sham und Nil, sowie Sham mit Niltieren innerhalb eines Genotyps verglichen und Unterschiede auf die gleiche Weise auf Signifikanz überprüft.

3 Ergebnisse

3.1 Traumaexperiment

3.1.1 NSS Verlauf

Beim Setzen des Traumas erwies sich die Gruppe der Knockout (KO) Mäuse als wesentlich anfälliger für hohe NSS Werte. Um initial vergleichbare NSS Werte in beiden Gruppen von Mäusen zu erhalten, wurde die Fallhöhe des Weight Drop Modells daher angepasst: KO-Mäuse erlitten das Trauma mit einer Stempel Fallhöhe von 1 – 2cm, wohingegen die Wildtypen ein Trauma aus 2 – 2,5cm Fallhöhe erhielten. Diese Fallhöhen erzeugten vergleichbare 1h NSS Werte in beiden Tiergruppen.

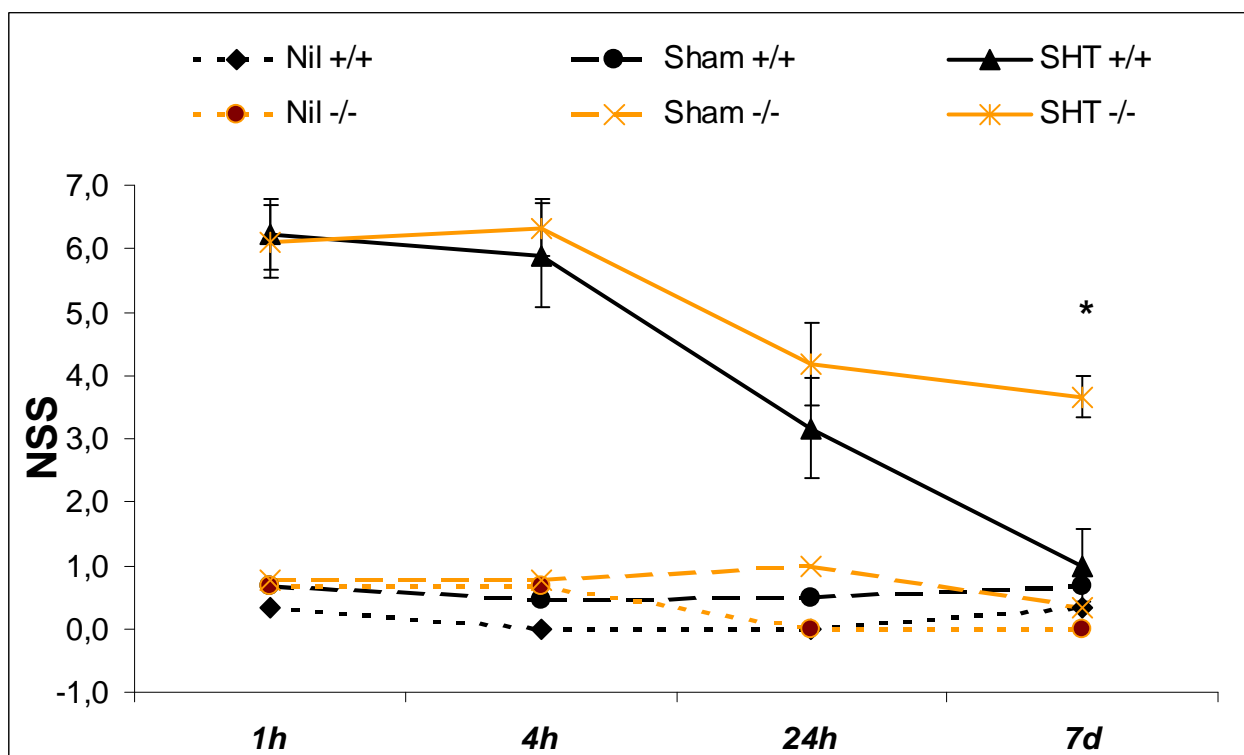


Abb. 8 NSS Verlauf

Darstellung der NSS Verläufe 1h, 4h, 24h und 7 Tage (7d) nach Behandlung (SHT = durchgezogene Linie, Sham Operation = gestrichelte Linie, Niltiere = gepunktete Linie) beider Genotypen (Wt Schwarz, KO Gelb). (* = $p < 0,05$).

Im Verlauf kam es in beiden Trauma Gruppen zu einer Verbesserung der NSS-Werte, wobei die Wildtypen bereits nach 4h und 24h bessere NSS Werte aufzeigten als die KO Tiere. Nach 7d war dieser Unterschied signifikant ($p < 0,05$).

Bei den Nil und Sham Tieren kam es zu keinen signifikanten Schwankungen der NSS Werte.

3.1.2 Gewicht

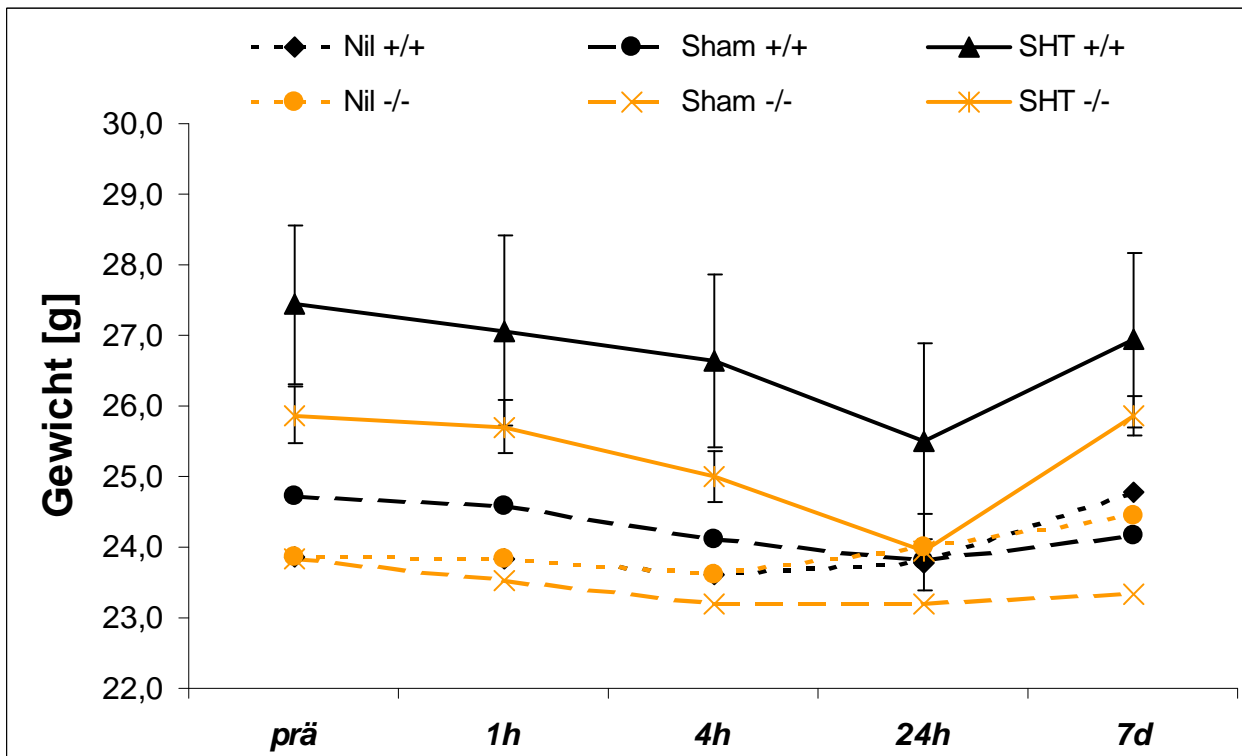


Abb. 9: Gewichtsverlauf

Darstellung der Körpergewichte präoperativ (prä), 1h, 4h, 24h, und 7 Tage (7d) nach Behandlung (SHT = durchgezogene Linie, Sham Operation = gestrichelte Linie, Niltiere = gepunktete Linie) beider Genotypen (Wt Schwarz, KO Gelb).

Das Gewichtsverhalten von Wildtypen und KO Tieren war identisch. Alle Mäuse erlitten nach Trauma einen Gewichtsverlust mit einem Maximum nach 24h und einem folgenden Gewichtsanstieg. Nil Tiere zeigten keine Gewichtsschwankungen. Sham Tiere zeigten ebenfalls einen geringen Gewichtsabfall mit einem Maximum nach 24h. Insgesamt waren die KO Tiere in allen Gruppen etwas leichter als die korrelierenden Wildtypen. Die etwas höheren Werte in den Trauma Gruppen ergeben sich aus der Anforderung eines Mindestgewichts von 25g für das Trauma. Leichtere Tiere wurden als Nil und Sham Tiere verwendet.

3.2 Immunhistochemie

3.2.1 NeuN

NeuN (Neuron-specific Nuclear Protein) ist ein neuronales Protein in nukleärer Lokalisation und gilt als spezifischer Marker reifer Nervenzellen(119). Betrachtet werden in den Abbildungen die Cortexareale der linken Hemisphäre, die in der Übersicht die

Coupverletzung des Impact aufweisen. Die 1h NSS Werte der Tierpaare zu jedem Zeitpunkt waren identisch (4h-Tiere: NSS 8; 24h-Tiere: NSS 6; 7d-Tiere: NSS 5).

Bereits 4h nach dem Trauma ist die Auflösung des Gewebeverbandes bei den Wildtypen stärker ausgeprägt als bei den KO Tieren (Abb.10).

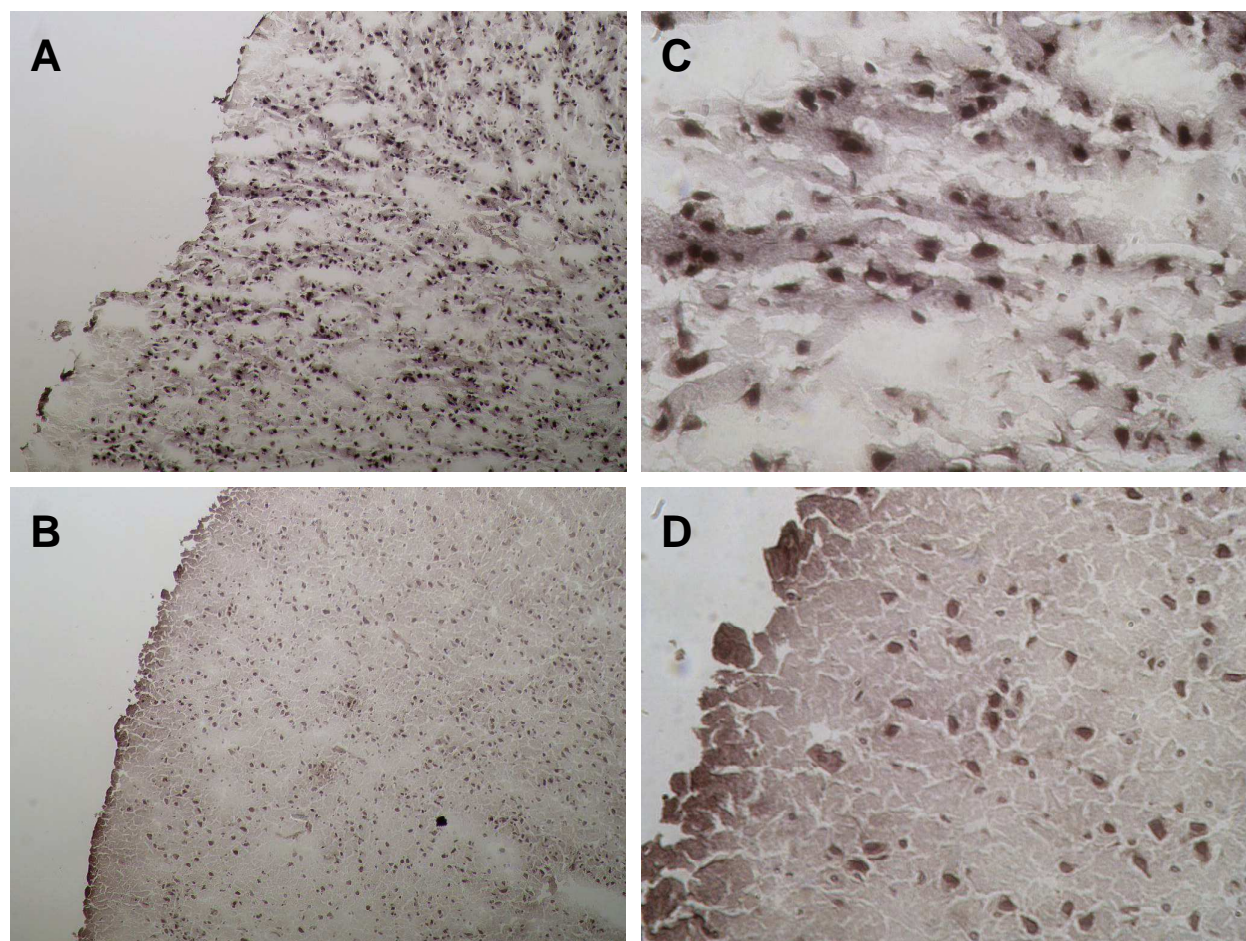


Abb. 10: NeuN Färbung der Gefrierschnitte der Hirne 4h nach SHT.

Der Wildtyp (A und C) zeigt eine stärkere Auflösung des Gewebeverbandes bei vergleichbarer Neuronendichte im Vergleich mit dem Knockouttier (B und D). A und B entspricht 100facher Vergrößerung, C und D ist 400fach vergrößert.

Nach 24h erreicht die Zerstörung des Gewebeverbandes bei den Wildtypen ein Maximum, während das Hirnparenchym bei den KO Mäusen im Vergleich zum 4h Befund kaum verändert scheint. Anhand der NeuN Färbung ist des weiteren zu erkennen, dass es bei den Wildtypen nach 24h zu einem massiven Schwund von Neuronen kommt. Im Gegensatz dazu sind in den Hirnschnitten der KO Mäuse auch nach 24h noch deutlich angefärbte Neurone zu erkennen, deren Anzahl zu der des 4h Wertes nicht verändert scheint (Abb.11).

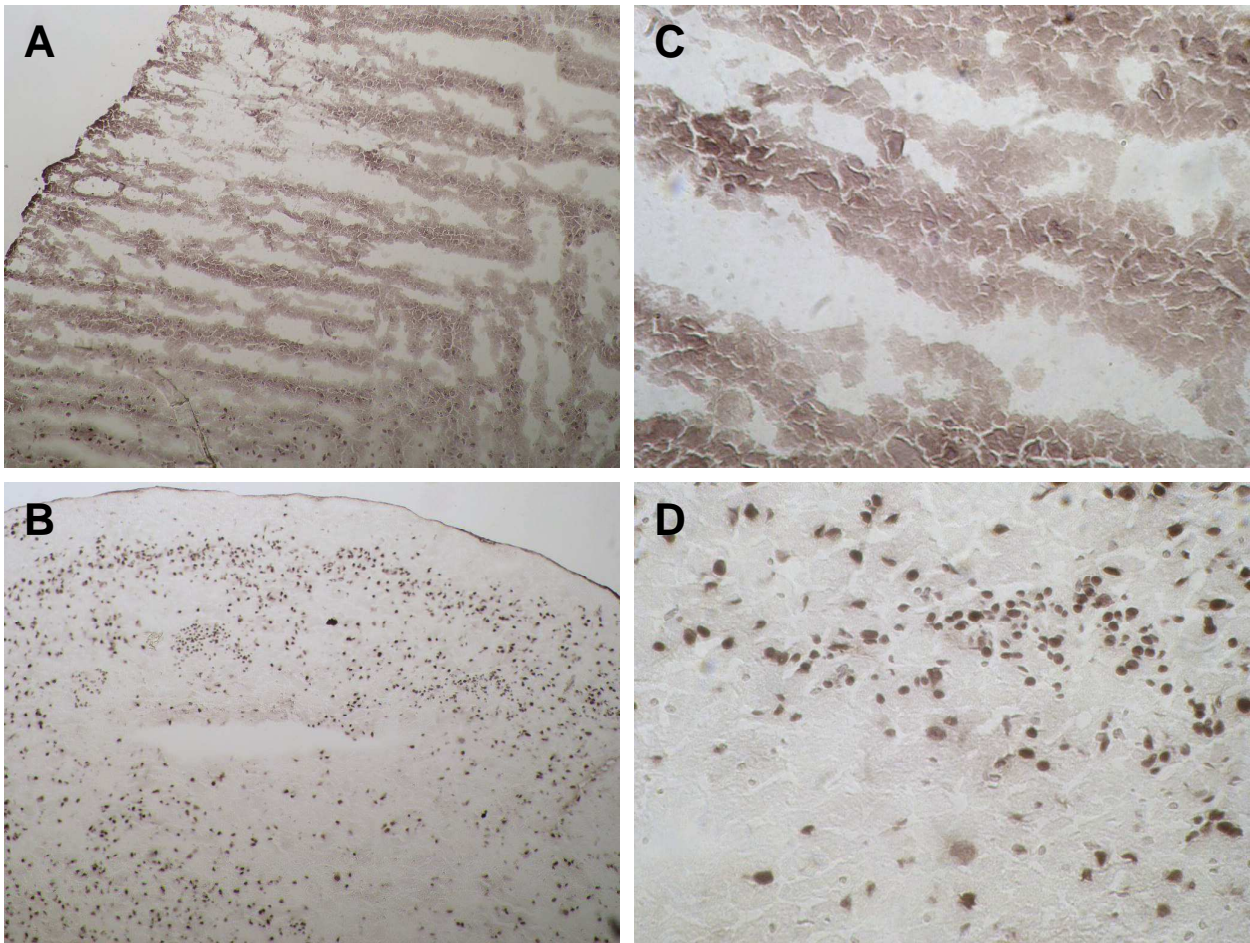


Abb. 11: NeuN Färbung der Gefrierschnitte der Hirne 24h nach SHT

Der Wildtyp (A und C) zeigt eine stärkere Auflösung des Gewebeverbandes und deutlich weniger angefärbte Neurone im Vergleich mit dem Knockouttier (B und D). A und B entspricht 100facher Vergrößerung, C und D ist 400fach vergrößert

Nach 7d ergeben sich für beide Maustypen gleiche histologische Bilder ohne Neuronenverlust oder Gewebsauflösung (Abb.12). Hierbei ist allerdings zu berücksichtigen, dass die Tiere, die für den 7d Zeitpunkt ausgewählt wurden, von vornherein geringere NSS Werte aufwiesen.

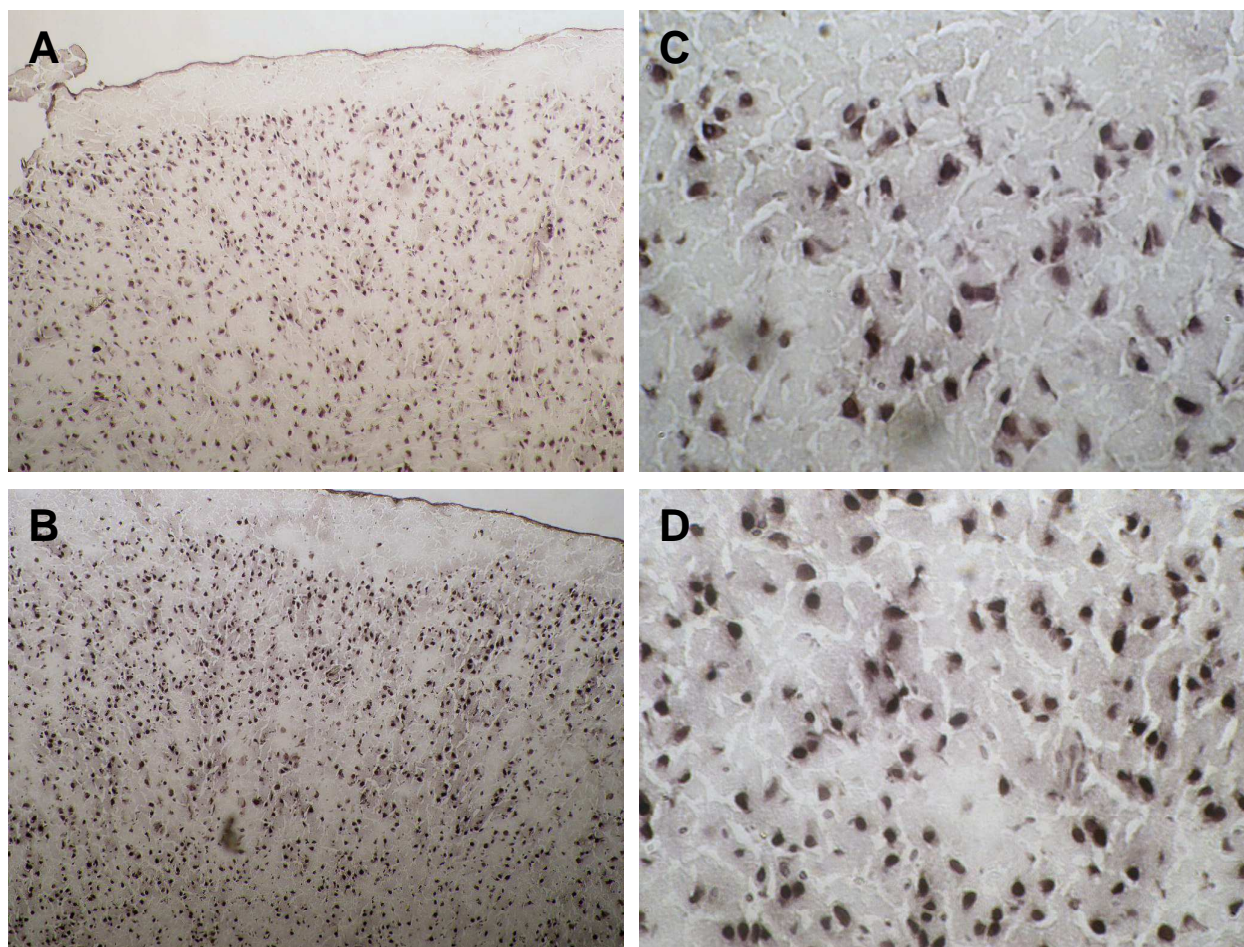


Abb. 12: NeuN Färbung der Gefrierschnitte der Hirne 7d nach SHT.

Sowohl der Wildtyp (A und C), als auch das Knockouttier (B und D) zeigen weitgehend integrale Zellverbände mit vergleichbarer Neuronendichte. A und B entspricht 100facher Vergrößerung, C und D sind 400fach vergrößert.

3.3 TUNEL-Test

Beim TUNEL Verfahren werden die UTP-Enden der DNA Fragmente, die während der Apoptose entstehen, grün dargestellt. Die Dapi Gegenfärbung färbt alle Zellkerne (ob apoptotisch oder nicht) blau. Es wurden angrenzende Schnitte der selben Gehirne benutzt, die auch schon für die Immunhistochemie genutzt wurden. Ebenso wurde der entsprechende Teil des Cortex, der des Coups, betrachtet. Im Vergleich mit der NeuN Färbung der Abbildungen 10-12 wird ersichtlich, dass es sich bei den apoptotischen Zellen überwiegend um Neurone handelt, da sie in Morphologie und Verteilungsmuster den in der Neuronen Färbung dargestellten Zellen entsprechen.

4h nach Trauma zeigen sowohl die Wildtypen als auch die KO Mäuse deutlich apoptotische Neurone. Ein Unterschied zwischen beiden Tiergruppen ist zu diesem Zeitpunkt nicht erkennbar. Im Verlauf weisen die Wildtypen jedoch über einen weitaus

3 Ergebnisse

längeren Zeitraum apoptotische Zellen auf als die korrespondierenden Hirnschnitte der KO Mäuse. Letztere zeigen nach 7d nahezu keine apoptotischen Zellen mehr, im Gegensatz zu den Wildtypen, die auch nach einer Woche noch deutlich apoptotische Zellen zeigen.

Wie auch schon in der Immunhistochemie zu sehen war, zeigt sich die Auflösung des Zellverbandes im Bereich des Traumacoups (linker oberer Cortex) bei den Wildtypen deutlicher als bei den KO Mäusen.

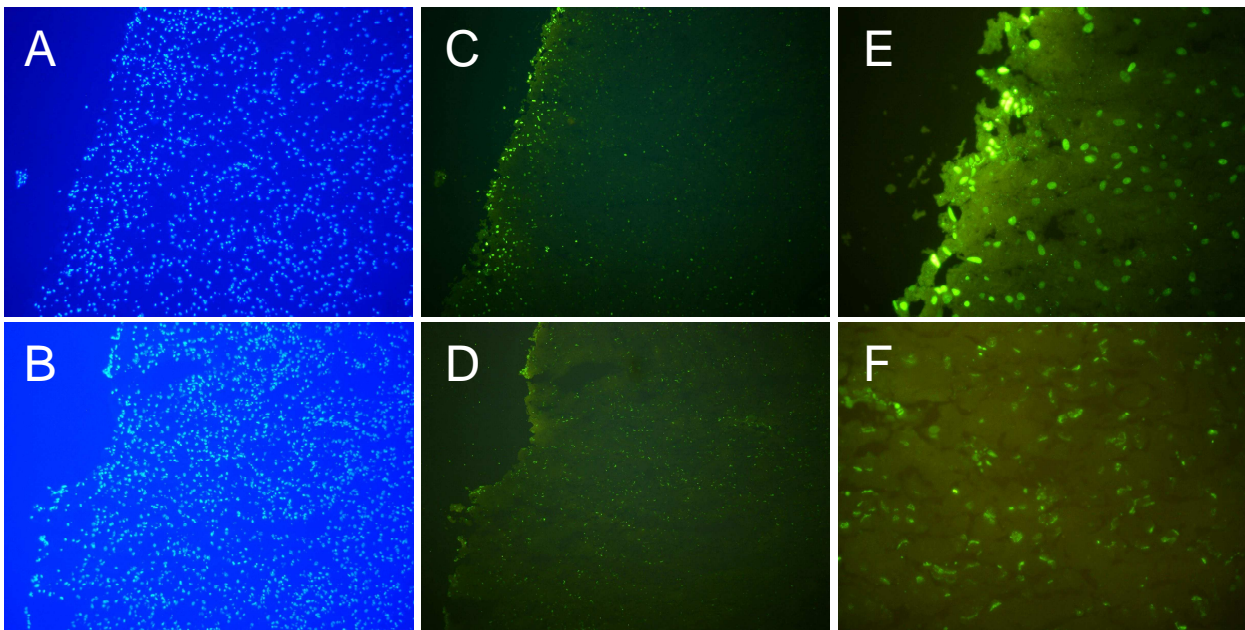


Abb. 13: DAPI (A und B) und TUNEL (C-F) Färbung der Gefrierschnitte der Hirne 4h nach SHT.

Die Ausschnitte zeigen jeweils den Traumacoup am linken Cortex. Die DAPI Färbung (A,B, 100fache Vergrößerung) zeigt dichte Zellverbände in integrem Gewebe in beiden Tieren (Wildtyp = A, Knockouttier = B). In denselben Schnitten stellen sich an der gleichen Stelle die apoptotischen Zellen in der TUNEL Färbung grün dar (Wildtyp = C,E; Knockouttier = D,F. C und D entsprechen 100facher Vergrößerung, E und F sind 400fach vergrößert). Die Hirne weisen 4h nach SHT vergleichbare Apoptoseraten auf.

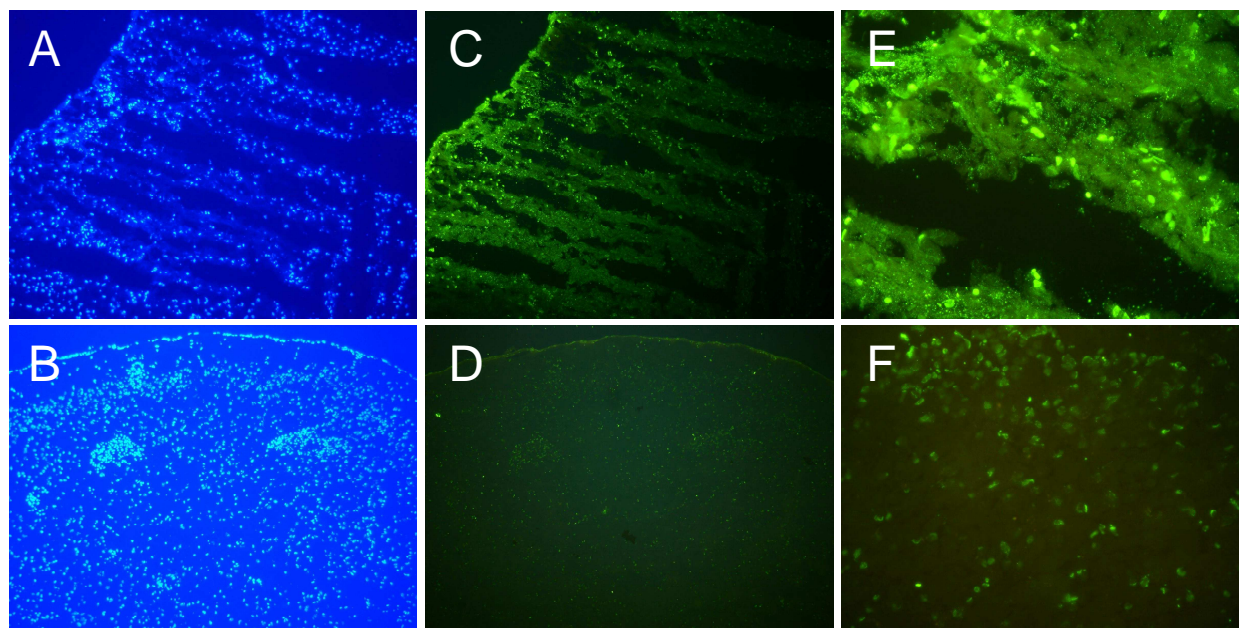


Abb. 14: DAPI (A und B) und TUNEL (C-F) Färbung der Gefrierschnitte der Hirne 24h nach SHT

Die Ausschnitte zeigen jeweils den Traumacoup am linken Cortex. Die DAPI Färbung (A,B, 100fache Vergrößerung) zeigt in der Wildtyp Maus ein stark aufgelockertes Gewebe (A). Der Zellverband im Knockouttier scheint dagegen noch weitgehend erhalten zu sein (B). In denselben Schnitten stellen sich an der gleichen Stelle die apoptotischen Zellen in der TUNEL Färbung grün dar (Wildtyp = C,E; Knockouttier = D,F. C und D entsprechen 100facher Vergrößerung, E und F sind 400fach vergrößert). Beide Tiere zeigen apoptotische Zellen, wobei das Signal bei den Wildtypen nach 24h deutlich intensiver ist.

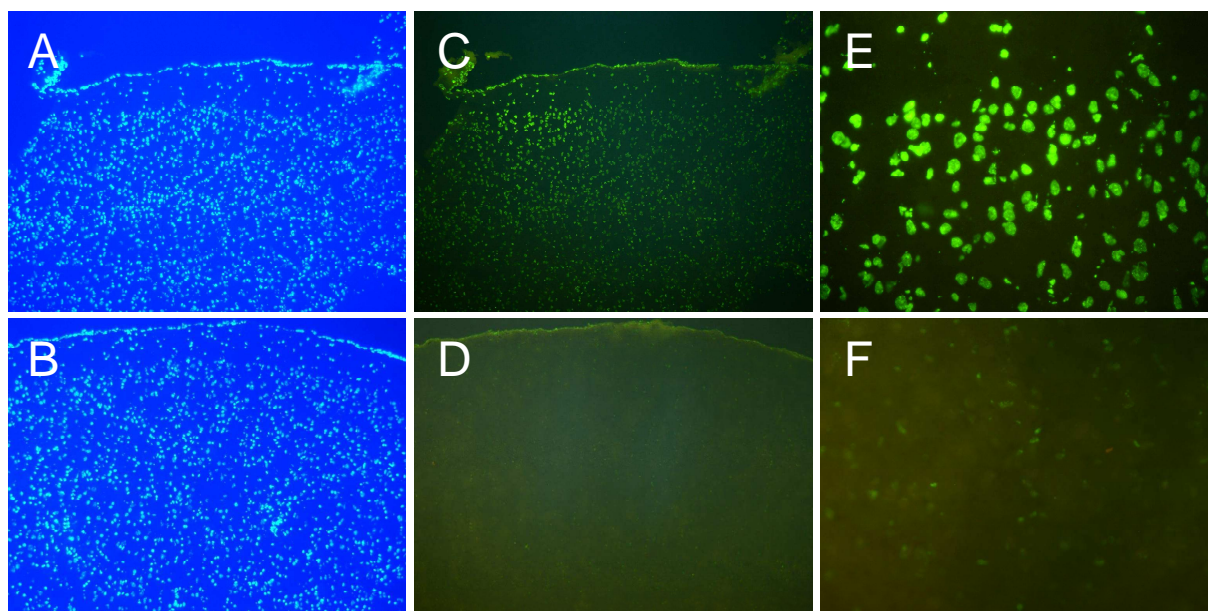


Abb. 15: DAPI (A und B) und TUNEL (C-F) Färbung der Gefrierschnitte der Hirne 7d nach SHT

Die Ausschnitte zeigen jeweils den Traumacoup am linken Cortex. Die DAPI Färbung (A,B, 100fache Vergrößerung) zeigt dichte Zellverbände in integrem Gewebe in beiden Tieren (Wildtyp = A, Knockouttier = B). In denselben Schnitten stellen sich an der gleichen Stelle die apoptotischen Zellen in der TUNEL Färbung grün dar (Wildtyp = C,E; Knockouttier = D,F. C und D entsprechen 100facher Vergrößerung, E und F sind 400fach vergrößert). 7d nach SHT weist der Wildtyp noch immer deutlich apoptotische Zellen auf. Im Knockouttier lassen sich 7d nach Trauma kaum noch apoptotische Zellen anfärben.

3.4 ELISA

Die ELISA Untersuchungen wurden durch ein Kooperationslabor des Department of Medicin and Immunology, University of Colorado Health Sciences Center, Denver, USA unter Michael Holers durchgeführt und für diese Arbeit freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Untersucht wurden die Seren von 4 Kontrolltieren (Wt) und jeweils 6 SHT Tieren pro Zeitpunkt und Genotyp.

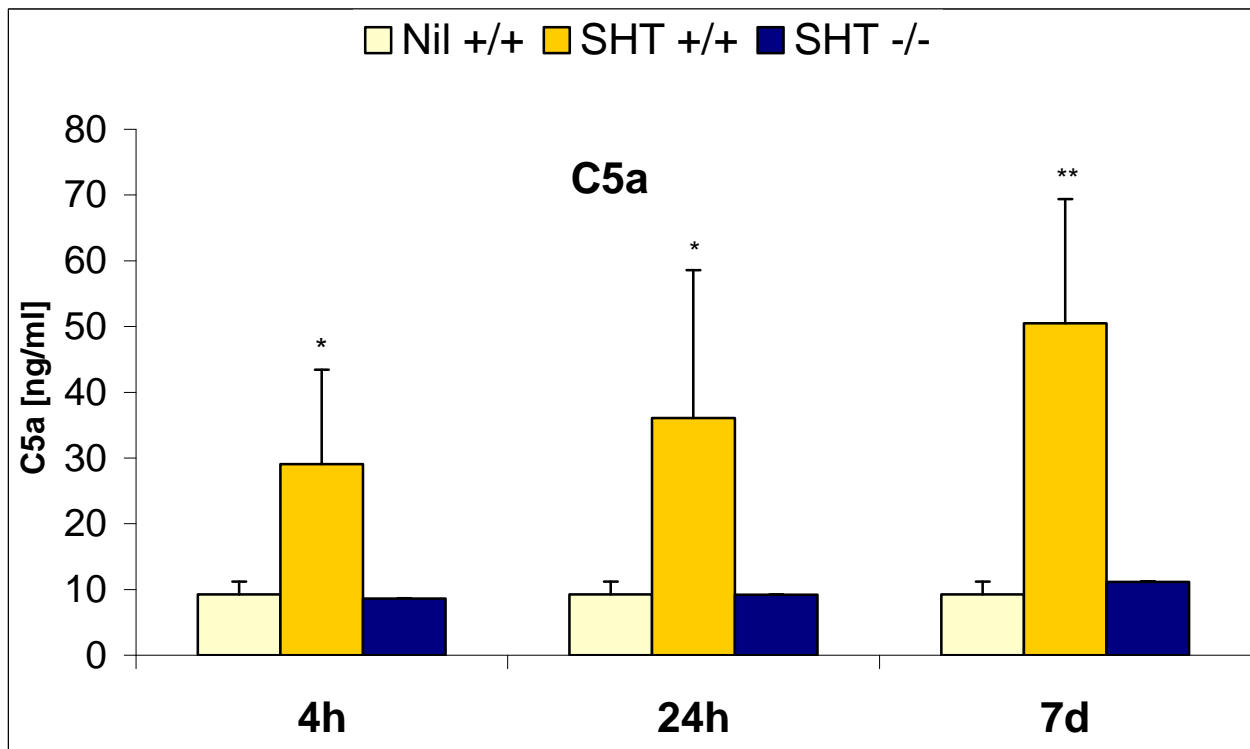


Abb. 16: C5a Serum Konzentrationen

Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der ELISA Ergebnisse zur Serumkonzentration des aktivierten Komplementfaktors C5a von 4 Niltieren (Wt) und jeweils 6 Versuchstieren zu den Zeitpunkten 4 Stunden, 24 Stunden und 7 Tage. (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$)

3.4.1 C5a

Die ELISA Untersuchung zeigt bei den Wildtypen bereits 4h nach SHT einen deutlichen Konzentrationsanstieg des Komplementfaktor Spaltproduktes C5a im Serum, der bis 7d nach SHT anhält und zu allen Zeitpunkten signifikant gegenüber den Kontrolltieren und den KO Tieren ist. Bei den KO Tieren kommt es im Vergleich zu den Kontrolltieren zu keinem Anstieg der C5a Serumkonzentration.

3.5 Western Blot

Mittels Western Blot wurden die relativen Mengen des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 und des proapoptotischen Proteins BAX im Hirnhomogenat der Mäuse bestimmt. Für die Untersuchung standen pro Zeitpunkt und Behandlung jeweils zwei KO Tiere und zwei Wildtypen zur Verfügung, so dass zwei Serien erstellt werden konnten. Als Housekeeping Protein wurde auf jedem Blot β -Aktin mitbestimmt.

Zur Kontrolle des Knockout Status wurde bei allen Tieren ein Serumscreening auf Faktor B durchgeführt. Abb. 10 zeigt exemplarisch einen dieser Blots. Alle Wildtypen (FB+/+) zeigten deutlich die 98 kDa Faktor B Bande. Alle KO Tiere (FB-/-) zeigten diese Bande nicht. Der Genstatus für Faktor B konnte für alle Tiere eindeutig bestätigt werden.

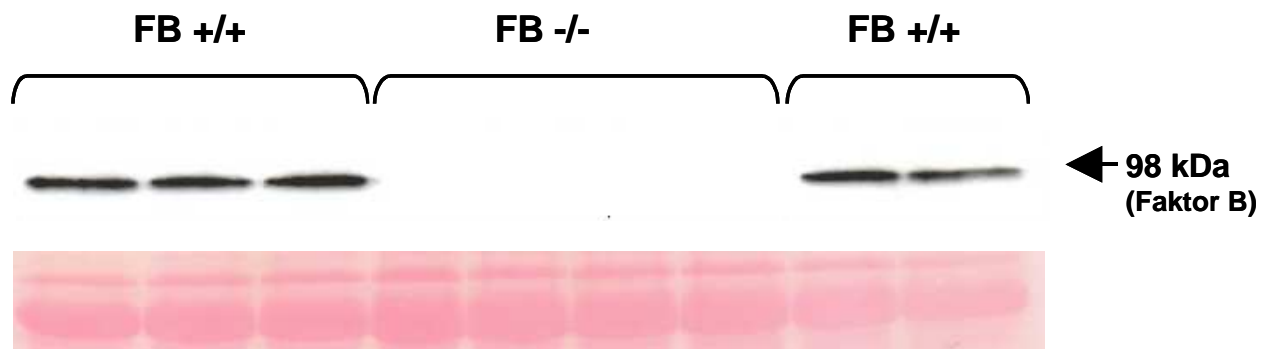


Abb. 17: Serumscreening auf Faktor B

Dargestellt ist die 98 kDa Bande eines Western Blots von Seren der Mäuse. Die Bande entspricht dem 98 kDa großen Faktor B. Sie stellt sich deutlich bei den Wildtypen dar (FB +/+). Die Knockout Mäuse zeigen diese Bande nicht (FB -/-). Unter dem Western Blot ist die Ponceau Färbung der Membran abgebildet, die als Beleg für den erfolgreichen Proteinauftrag durchgeführt wurde.

3.5.1 Bcl-2

Bcl-2 ist ein 26 kDa großes Protein der Bcl-2 Familie mit antiapoptotischer Funktion. Durch Inhibition der proapoptotischen Proteine BAX und BAK verhindert Bcl-2 eine Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran, was eine Freisetzung von Cytochrom C und weiterer, caspaseaktivierender Proteine zur Folge hätte(120).

Die erste Serie zeigt zu jedem Zeitpunkt bei den KO Tieren deutlich höhere Bcl-2 Werte als bei den Wildtypen. 24h nach Trauma ist diese Diskrepanz am größten. Der zeitliche Verlauf der Bcl-2 Expression innerhalb der einzelnen Tiergruppen zeigt für die Wildtypen einen Abfall des Bcl-2 nach dem Trauma mit einem Niedrigststand nach 24h. Die KO Tiere hingegen zeigen in dieser Serie kaum eine Veränderung der Bcl-2 Expression. Erst nach 7d ist hier ein leichter Rückgang der Bcl-2 Expression zu sehen.

3 Ergebnisse

In der zweiten Versuchsserie ließen sich diese Tendenzen nicht bestätigen. Hier zeigen sich keine Unterschiede zwischen den Wildtypen und den KO-Tieren. Bei beiden Tieren kommt es zu einer verringerten Bcl-2 Expression nach 4h, nach 24h gleicht die Expression wieder der der Sham Tiere.

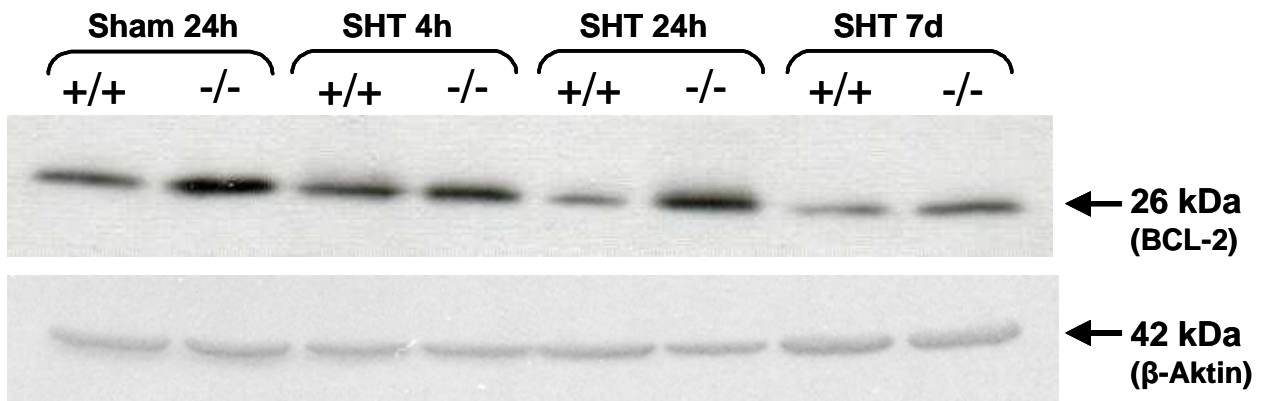


Abb. 18: relative Bcl-2 Expression in den Gehirnen nach Trauma; erste Serie

Darstellung der Bcl-2 Bande (oben) und der β -Aktin Bande (unten) der Traumatiere 4 Stunden, 24 Stunden und 7 Tage nach SHT sowie der shamoperierten Tiere als Kontrollgruppe. Die Faktor B Knockout Tiere sind mit -/- gekennzeichnet, Wildtypen mit +/+.

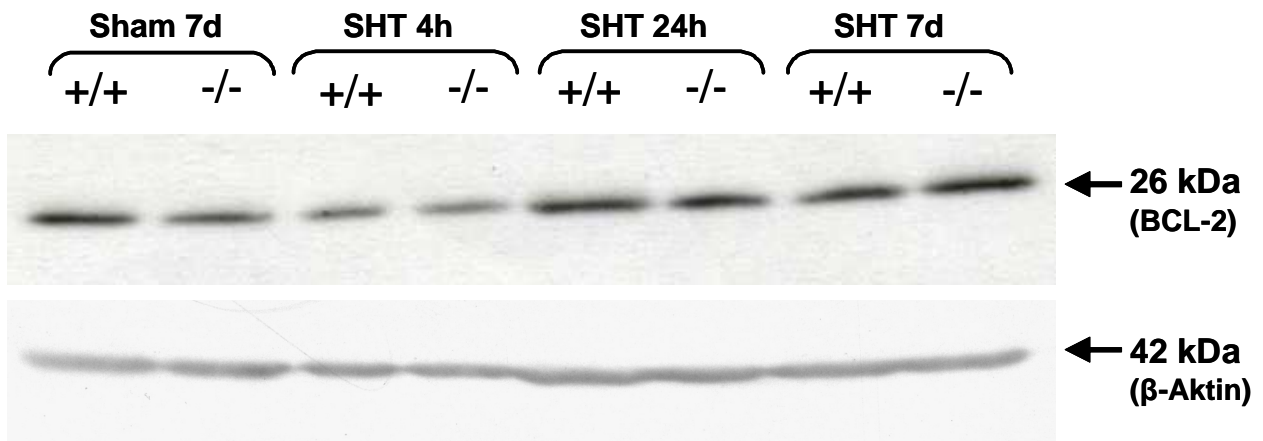


Abb. 19: relative Bcl-2 Expression in den Gehirnen nach Trauma; zweite Serie

Darstellung der Bcl-2 Bande (oben) und der β -Aktin Bande (unten) der Traumatiere 4 Stunden, 24 Stunden und 7 Tage nach SHT sowie der shamoperierten Tiere als Kontrollgruppe. Die Faktor B Knockout Tiere sind mit -/- gekennzeichnet, Wildtypen mit +/+.

3.5.2 BAX

Das proapoptotische Protein BAX führt zu einer Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran, und so zu einer Freisetzung von Cytochrom C mit konsekutiver Caspasenaktivierung(120).

BAX zeigt innerhalb der ersten Serie im Verlauf ein nahezu identisches Expressionsmuster wie das des antiapoptotischen Proteins Bcl-2. Die Wildtypen zeigen nach dem Trauma einen Abfall der BAX Expression mit einem Minimum nach 24h, die KO Tiere weisen eine kontinuierliche Expression von BAX auf, wobei diese nach 7d leicht abzunehmen scheint (Abb. 20).

In der zweiten Serie konnte diese Tendenz nicht bestätigt werden. Hier kommt es nach 4h zu einem Abfall der BAX Expression. Nach 24h und 7d steigt die BAX Expression wieder an. Hierbei scheint es bei den KO Tieren zu einem etwas stärkeren BAX Anstieg zu kommen, nach 7d ist dieser Unterschied zwischen KO und Wildtypen am größten (Abb. 21).

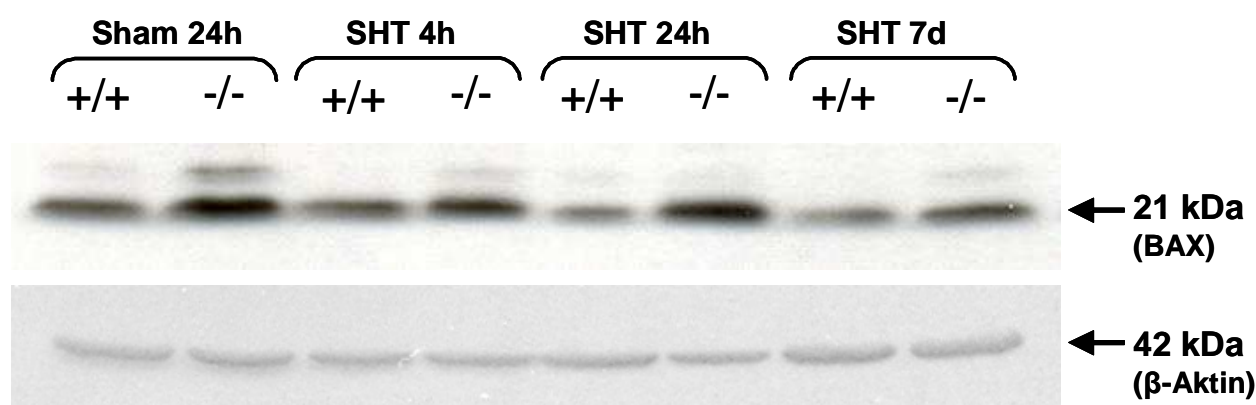


Abb. 20: relative BAX Expression nach Trauma; erste Serie

Darstellung der BAX Bande (oben) und der β-Aktin Bande (unten) der Traumatiere 4 Stunden, 24 Stunden und 7 Tage nach SHT sowie der shamoperierten Tiere als Kontrollgruppe. Die Faktor B Knockout Tiere sind mit -/- gekennzeichnet, Wildtypen mit +/+.

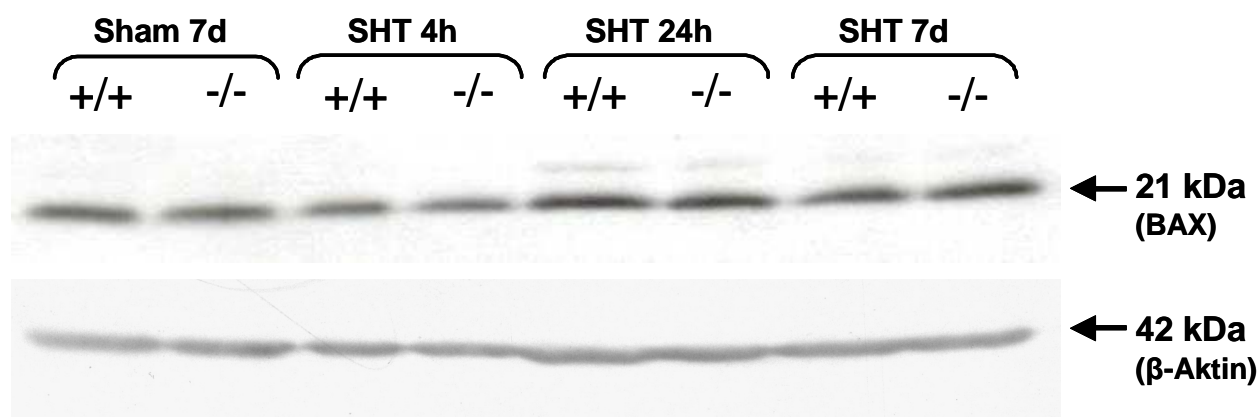


Abb. 21: relative BAX Expression nach Trauma; zweite Serie

Darstellung der BAX Bande (oben) und der β-Aktin Bande (unten) der Traumatiere 4 Stunden, 24 Stunden und 7 Tage nach SHT sowie der shamoperierten Tiere als Kontrollgruppe. Die Faktor B Knockout Tiere sind mit -/- gekennzeichnet, Wildtypen mit +/+.

3.6 PCR

3.6.1 Intrinsische Apoptose: Bcl-2 und BAX Transkription

In den folgenden Abbildungen sind die Ergebnisse der PCR Läufe für Bcl-2 (Abb.22) und BAX (Abb.23) aller sechs Versuchsserien (drei in der Nil-Tiergruppe) als deren Mittelwerte mit Standardabweichung für jede Versuchsgruppe (Nil, Sham, SHT) und jeden Maustyp (Wildtyp = Gelb, KO = Blau) grafisch dargestellt.

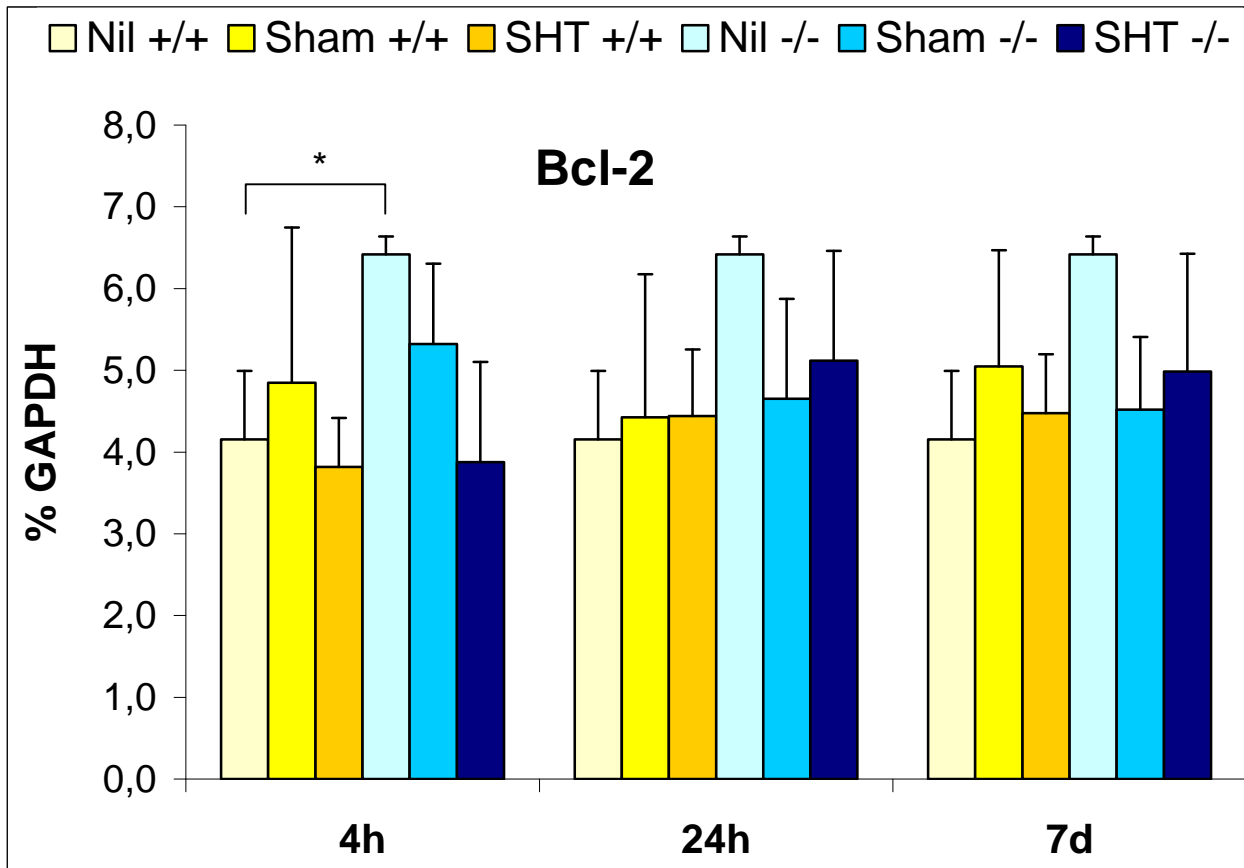


Abb. 22: BCL-2 Transkription

Darstellung der %GAPDH-Mittelwerte und Standardabweichungen der PCR-Läufe des antiapoptotischen Bcl-2 der Nil-, Sham- und SHT Tiere (Wt gelb und KO blau) zu den Zeitpunkten 4 Stunden, 24 Stunden und 7 Tage nach Trauma (n=6). (* = $p < 0,05$)

3.6.1.1 Bcl-2 Transkription

Zwischen KO Tieren und Wildtypen bestehen nach Trauma oder Sham-OP keine signifikanten oder richtungsweisenden Unterschiede in der Bcl-2 Transkriptionsrate. Lediglich die Niltiere der KO Gruppe zeigen eine signifikant höhere Transkriptionsaktivität im Vergleich zu den Niltieren der Wildtypen.

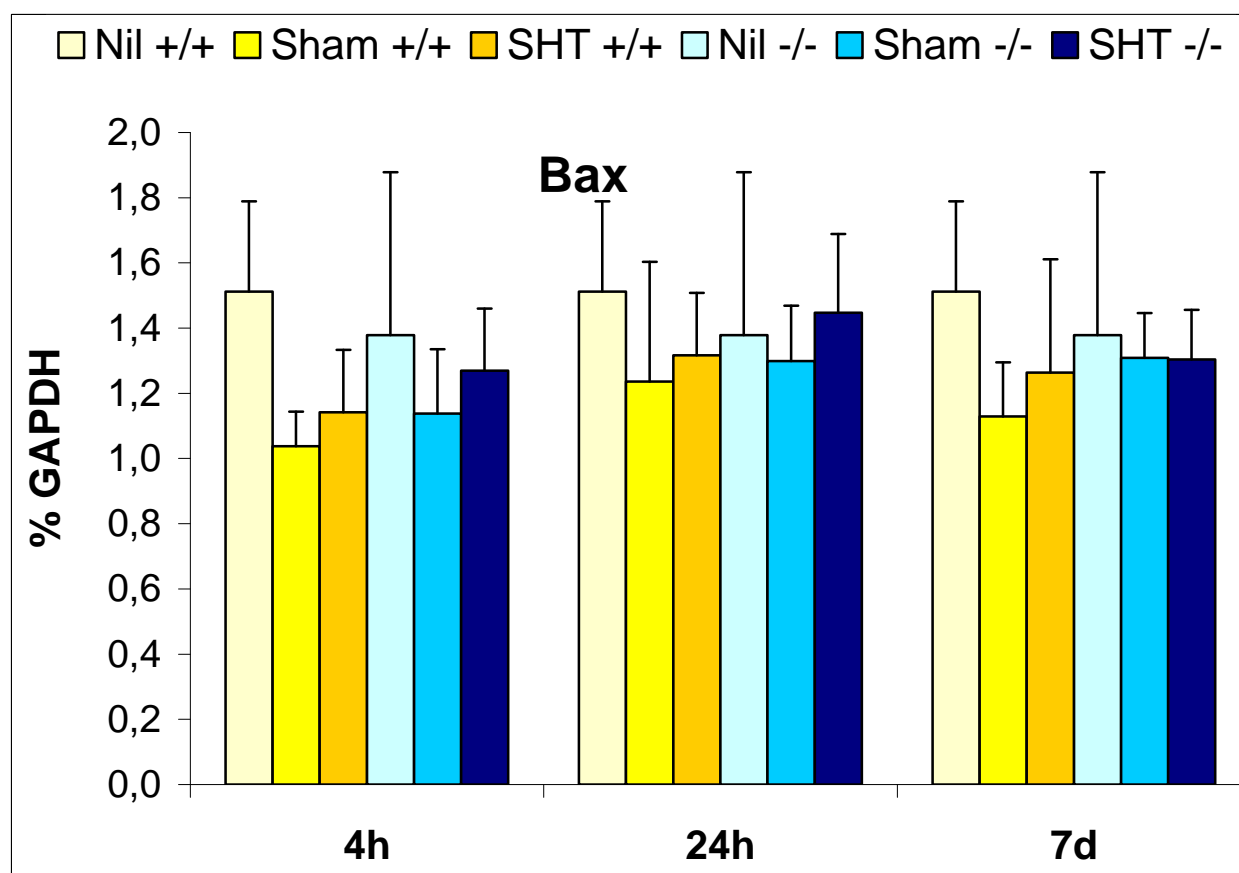


Abb. 23: Bax Transkription

Darstellung der %GAPDH-Mittelwerte und Standardabweichungen der PCR-Läufe des proapoptotischen Bax der Nil-, Sham- und SHT Knockout-Tiere (FB+/+ gelb und FB-/- blau) zu den Zeitpunkten 4 Stunden, 24 Stunden und 7 Tage nach Trauma (n=6).

3.6.1.2 BAX Transkription

Zwischen KO Tieren und Wildtypen bestehen nach Trauma oder Sham-OP keine signifikanten oder richtungsweisenden Unterschiede in der BAX Transkriptionrate. 4h nach Sham-OP und Trauma sind die BAX Transkriptionsraten beider Genotypen etwas geringer als bei den Nil Tieren, signifikant sind diese Unterschiede jedoch nicht.

3.6.2 Extrinsische Apoptose: FAS, FAS-L und TNF- α

In den folgenden Abbildungen sind die Ergebnisse der PCR Läufe für FAS (Abb.24), FAS-L (Abb.25) und TNF- α (Abb.26) aller sechs Versuchsserien (drei in der Nil-Tiergruppe) als deren Mittelwerte mit Standardabweichungen für jede Versuchsgruppe (Nil, Sham, SHT) und jeden Maustyp (Wildtyp, KO) grafisch dargestellt.

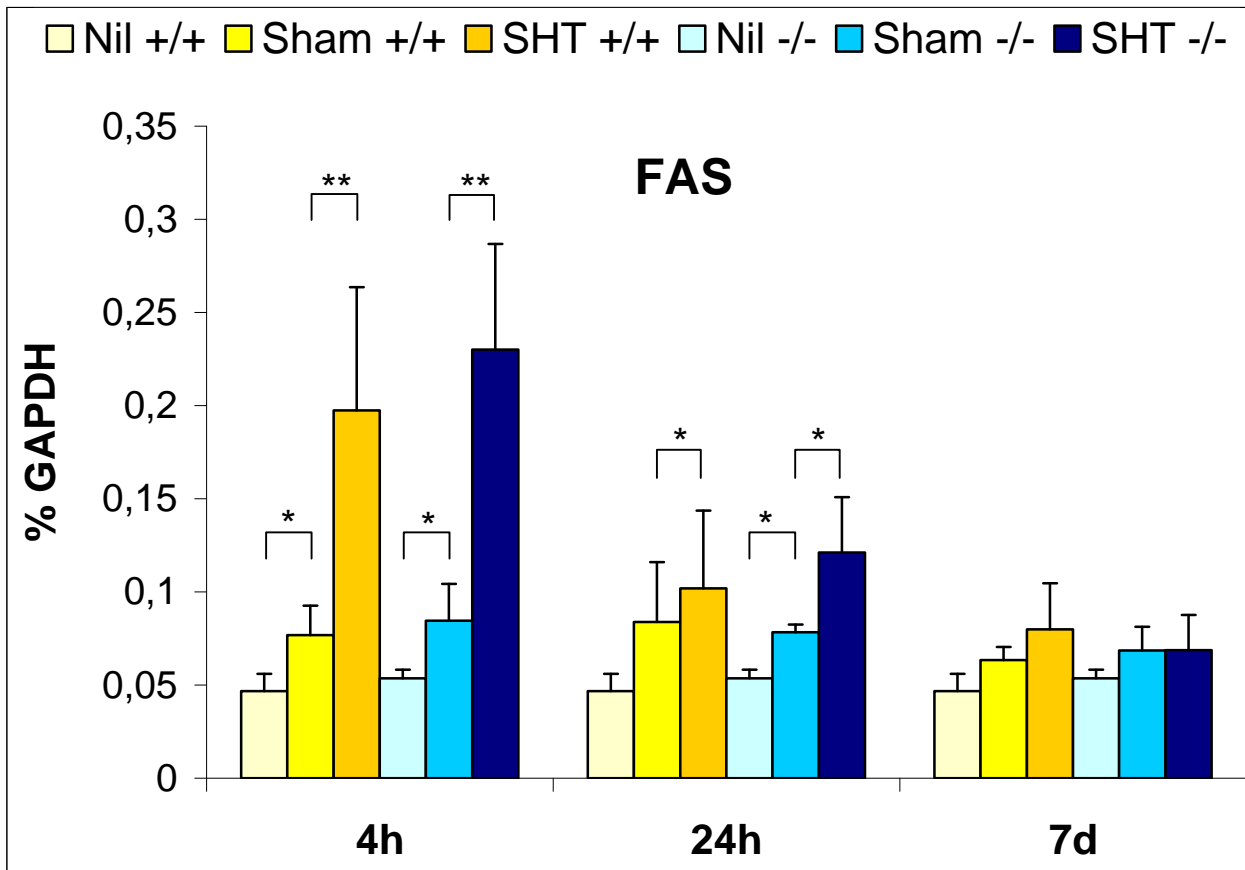


Abb. 24: FAS Transkription

Darstellung der %GAPDH-Mittelwerte und Standardabweichungen der PCR-Läufe des proapoptotischen FAS der Nil-Sham- und SHT Knockout-Tiere (FB+/+ gelb und FB-/- blau) zu den Zeitpunkten 4 Stunden, 24 Stunden und 7 Tage nach Trauma (n=6). (* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$)

3.6.2.1 FAS Transkription

Die FAS Transkription steigt bei beiden Genotypen nach Trauma signifikant gegenüber Sham- und Niltieren an und fällt bis 7d nach Trauma wieder nahezu auf das Niveau der Kontrolltiere ab.

Traumatiere beider Genotypen zeigen 4h nach Trauma stark erhöhte Transkriptionsraten im Vergleich zu Niltieren und shamoperierten Mäusen. Diese Steigerung in der FAS Transkriptionsrate hält bei Wildtypen und KO Mäusen bis 7d nach Trauma an und ist nach 4h und 24h signifikant gegenüber den Niltieren und shamoperierten Tieren. Shamoperierte Tiere beider Genotypen zeigen im Vergleich zu den Nil Tieren ebenfalls eine Erhöhung der FAS Transkription nach 4h bis 7d, die nach 4h (KO und Wt) und 24h (KO) signifikant ist. Zwischen den Genotypen bestehen zu keinem Zeitpunkt signifikante oder richtungsweisende Unterschiede in der Genregulation von FAS.

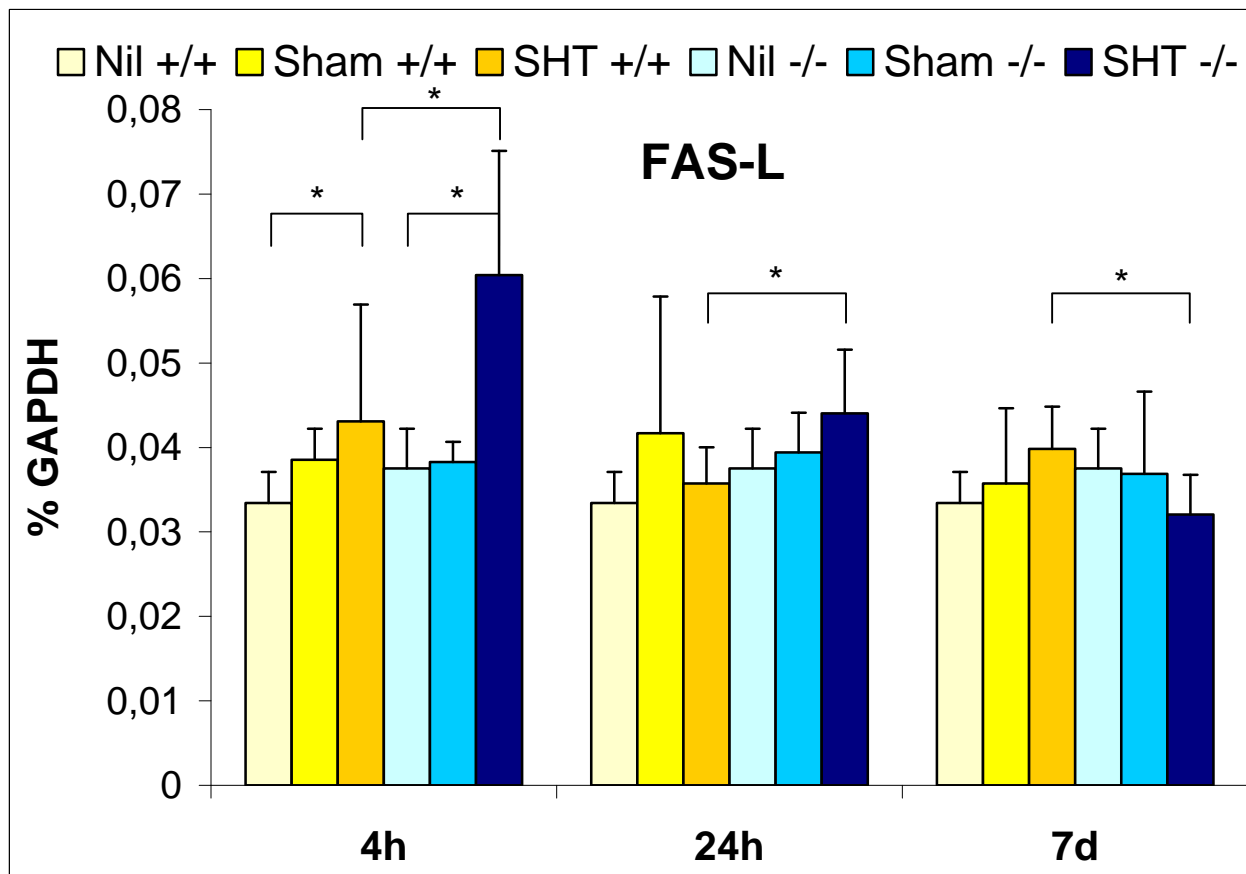


Abb. 25: FAS-L Transkription

Darstellung der %GAPDH-Mittelwerte und Standardabweichungen der PCR-Läufe des proapoptotischen FAS-Liganden der Nil-, Sham- und SHT Knockout-Tiere (FB+/+ gelb und FB-/- blau) zu den Zeitpunkten 4 Stunden, 24 Stunden und 7 Tage nach Trauma (n=6). (* = $p < 0,05$)

3.6.2.2 FAS-L Transkription

Im Vergleich von Traumatier zu Niltier zeigen sowohl KO Mäuse als auch Wildtypen 4h nach Trauma einen signifikanten Anstieg der FAS-Ligand Transkription ($p < 0,05$). 24h und 7d nach Trauma sind diese Unterschiede nicht mehr signifikant.

Im Vergleich der Traumatiere untereinander ist die Transkriptionsrate bei der KO Gruppe 4h und 24h nach Trauma signifikant höher gegenüber der der Wildtypen ($p < 0,05$). Nach 7d kehrt sich dieses Verhältnis um: hier ist die FAS-L Transkription bei den Wildtypen nach Trauma signifikant höher als bei den KO Tieren ($p < 0,05$).

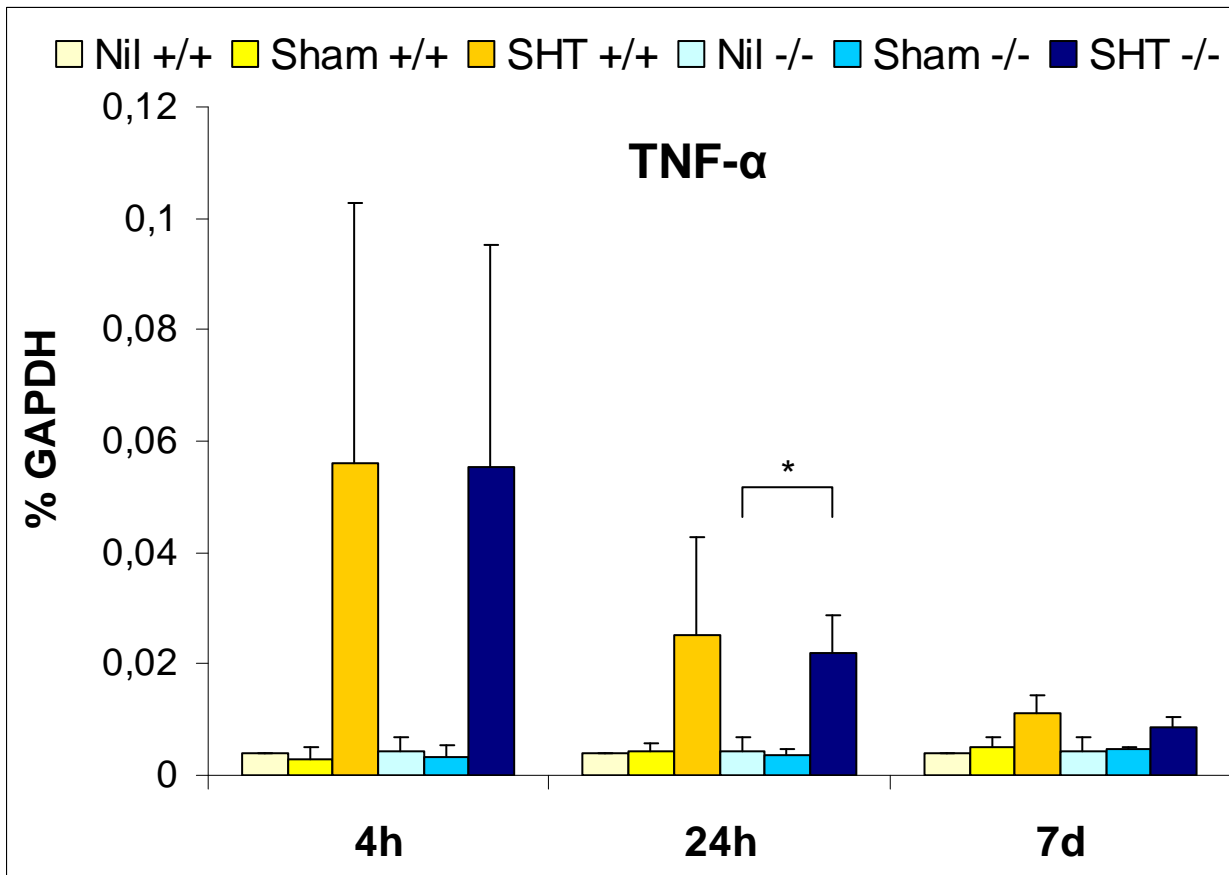


Abb. 26: TNF- α Transkription

Darstellung der %GAPDH-Mittelwerte und Standardabweichungen der PCR-Läufe des proinflammatorischen und proapoptotischen TNF- α der Nil-, Sham- und SHT Knockout-Tiere (FB+/+ gelb und FB-/- blau) zu den Zeitpunkten 4 Stunden, 24 Stunden und 7 Tage nach Trauma (n=3). (* = $p < 0,05$)

3.6.2.3 TNF- α

Beide Genotypen reagieren auf das Trauma mit einer Steigerung der TNF- α Transkriptionsrate zu allen Zeitpunkten. Das Maximum liegt bei 4h, im zeitlichen Verlauf nimmt die Rate wieder ab, und ist nach 7d kaum noch erhöht. Signifikante Unterschiede zwischen den beiden Genotypen bestehen dabei nicht. In der KO Gruppe ist die Steigerung in der Transkription 24h nach SHT gegenüber den Niltieren signifikant ($p < 0,05$). Für die anderen Zeitpunkte und die Wildtiergruppe ließen sich keine Signifikanzen nachweisen. Shamoperierte Tiere zeigen keine Veränderung in der Transkriptionsrate von TNF- α gegenüber den Kontrolltieren.

4 Diskussion

Das Schädel-Hirn-Trauma (SHT) gehört zu den häufigsten Mortalitäts- und Morbiditätsursachen von Patienten unter 40 Jahren in den Industrieländern. In Deutschland beläuft sich die Summe der Menschen mit SHT auf ca. 270.000 pro Jahr. Dies entspricht etwa 300/100.000 Einwohnern/Jahr. Davon versterben rund 10.000 Patienten während etwa 5.000 mit schwerer Behinderung überleben (4).

Trotz enormer Fortschritte in der neurointensiven Behandlung liegt die Sterberate der Patienten mit schwerem SHT (GCS<9) weiterhin bei 35-40% (5;6). Ausschlaggebend für die hohe Sterblichkeits- und Erkrankungsrate sind oft nicht die primären Verletzungen, sondern vielmehr sekundäre Hirnschäden, welche erst im Verlauf der Hospitalisation auftreten. Es entsteht ein verzögerter neuronaler Zellschaden durch eine posttraumatische Entzündungsantwort, die mit der Entwicklung eines Hirnödems und erhöhtem intrakraniellen Druck einhergeht (6;7).

Die aktuellen Standards in der Therapie nach Schädel-Hirn-Trauma beinhalten neben allgemeinen Maßnahmen zur Aufrechterhaltung der Vitalfunktion vor allem die durchgehende Aufrechterhaltung eines ausreichenden cerebralen Perfusionsdruckes (CPP) von 70 mmHg, ggf. über Anhebung des peripheren arteriellen Blutdruckes, sowie die Oxygenierung des Blutes, um die Versorgung des Gehirns mit Blut und Sauerstoff zu gewährleisten (6;121;122). Als einzige kausale Therapie des posttraumatischen Hirnödems galt bislang die Gabe von Kortikosteroiden. Dies sollte die Ausbildung der Entzündungsreaktion und der damit verbundenen sekundären Schädigung des Hirns durch Inflammation und Erhöhung des Hirndrucks verhindern. Allerdings zeigte sich in der „CRASH-Studie“ (Corticosteroid randomization after significant head injury) im Jahr 2004 überraschenderweise, dass die Hochdosistherapie mit Methylprednisolon nach SHT zu einer signifikant höheren Sterblichkeit im Vergleich zu einer Placebokontrollgruppe geführt hatte (123). Damit ist der Stellenwert der Kortikosteroidtherapie mit seiner allgemeinen und ungezielt antiinflammatorischen Wirkung wieder umstritten. Um so größer ist das Interesse an Therapeutika geworden, die gezielter in die posttraumatische Entzündungsreaktion eingreifen. Viele Forschergruppen gehen daher seit Jahren der Frage nach, welche Entzündungsmediatoren in der Pathogenese des SHT eine Rolle spielen. Dabei rückte in den letzten Jahren das Komplementsystem verstärkt in den Blick der Wissenschaft. Die Beteiligung an der posttraumatischen Entzündungsantwort ist mittlerweile

unumstritten (5;34;35;101;124). Multiple Funktionen der Proteinkaskade und seiner Produkte sind inzwischen bekannt, es werden sowohl schädigende als auch protektive Eigenschaften beschrieben, man spricht von einer dualen Rolle des Komplementsystems (125). Bei der Pathogenese anderer zentralnervöser und systemischer Erkrankungen haben Studien dem alternativen Komplementweg eine tragende Rolle zugewiesen (63;103-117). Auch in dieser Studie soll der alternative Weg der Komplementaktivierung auf seine Beteiligung an der posttraumatischen Entzündungsantwort hin untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden C57/BL6 Mäuse verwendet, die defizient für das Faktor B Gen waren (FB^{-/-}). Diese Mäuse sind nicht fähig, die C3-Konvertase (C3bBb) oder die C5-Konvertase (C3bBbC3b) des alternativen Komplementweges zu bilden. Der klassische und der Lektin Weg sind dagegen erhalten. Die FB^{-/-} Mäuse wurden mit C57/BL6 Wildtypen in Hinblick auf neurologisches Outcome, Größe von zerebralen Parenchymdefekten, Apoptose, Komplementaktivierung und Genexpression nach experimentellem, geschlossenem Schädel-Hirn-Trauma untersucht und verglichen.

4.1 Klinische Unterschiede zu Beginn des Experiments und Gewichtsverhalten

Zunächst ist zu vermerken, dass die KO Mäuse den Wildtypen (Wt) bereits vor dem Experiment konstitutionell unterlegen sind. Dies zeigt sich zum einen im Gewicht zu Beginn, das bei gleichem Alter signifikant geringer bei den KO Tieren ist ($p < 0,05$). Ferner wird dies deutlich bei der Sofortantwort auf das Trauma. Für die KO Mäuse sind Stempelfallhöhen, die bei Wt einen NSS von 6-8 erzeugen, letal. Hier musste die Fallhöhe des Stempels entsprechend angepasst werden, um vergleichbare NSS Werte zu erhalten. Es liegt also ein deutliches Defizit in der physischen Entwicklung der KO Tiere vor, das vermutlich durch den Mangel an Faktor B bedingt ist. Der wesentliche Unterschied der Mäuse besteht darin, dass die KO Mäuse nicht fähig zur alternativen Komplementaktivierung sind, weder über die Tick Over Reaktion, noch durch Aktivierung über die C3-Konvertase des klassischen Weges (C4bC2a). Auch dem klassischen Weg der Komplementaktivierung fehlt damit ein positiver Verstärkungsmechanismus: die Rekrutierung des alternativen Komplementweges über die Spaltung von C3. Damit sind die Mäuse eingeschränkt immunkompetent und anfälliger für pathogene Einflüsse. Doch auch über die Infektabwehr hinaus hat das Komplementsystem wichtige Aufgaben während der physischen Entwicklung. Eine Aufgabe des Komplementsystems diesbezüglich ist die Opsonierung von

apoptotischen, nekrotischen oder veränderten Zellen und Zellbestandteilen. Im Rahmen des Zell-Turnovers fallen in den meisten Geweben lebenslang und gerade während der körperlichen Entwicklung solche Mauserungsaufgaben an (86). Darüber hinaus aktivieren C5a und C3a genregulatorische Proteine und haben so Einfluss auf die Proliferation und Differenzierung verschiedener, auch nicht immunkompetenter Zellen (36;38;46;47;57;57;126-128). Möglicherweise liegt in der Einschränkung dieser Funktionen die Ursache für die mangelhafte Entwicklung und Konstitution der KO Tiere bereits zu Beginn des Experiments.

Was das Gewichtsverhalten im Verlauf angeht, zeigen beide Gruppen nach Trauma eine deutliche Gewichtsabnahme, die nach 24h seinen Talstand erreicht. Nach 7 Tagen erreichen beide Gruppen wieder ihr Ausgangsgewicht. Der Gewichtsverlust kann im Rahmen eines katabolen Postaggressionsstoffwechsels gewertet werden, wie er auch beim Menschen unmittelbar nach Unfällen oder Operationen zu beobachten ist. Über gesteigerte Katecholamin- und Kortisonausschüttung kommt es zu Mobilisierung der körpereigenen Energiereserven in Form von Fettdepots und Muskeleiweißen (129).

Neurologisch zeigen die KO Tiere im zeitlichen Verlauf trotz geringerer Stempelfallhöhe und bei vergleichbaren 1h-NSS Werten schlechtere Resultate. Während sich die Wildtypen innerhalb von einer Woche bis auf nahezu normwertige NSS Werte erholen, zeigen die KO Tiere auch nach 7 Tagen noch deutlich pathologische NSS Werte. Die 7d Tiere verbessern sich innerhalb einer Woche nur um 0,6 Punkte vs. 3,7 Punkte bei den Wt. Um diesen relevanten Befund besser deuten zu können, werden zunächst die Ergebnisse der Untersuchungen auf zellulärer und molekularer Ebene betrachtet.

4.2 Komplementaktivierung

In ELISA Untersuchungen zeigt sich, dass es im Serum der Wildtypen nach Trauma zu einem signifikanten Anstieg der C5a Konzentration kommt. Dies ist ein direkter Nachweis der systemischen Komplementaktivierung in Folge des SHT. Die Faktor B defizienten Mäuse zeigen hingegen keinen Anstieg von C5a im Serum, d.h. weniger Komplementaktivierung als die Wildtypen. Hieraus ist ersichtlich, dass der alternative Weg über Faktor B eine tragende Rolle für die Komplementaktivierung in der Maus nach SHT spielt.

4.3 Histologische Unterschiede nach SHT

Überraschend ist, dass das deutlich schlechtere neurologische Outcome der KO Tiere in der Histologie kein Korrelat findet. Hier zeigen sich bei den Wildtypen deutlich ausgeprägtere Gewebeschädigungen als bei den KO Tieren. Diese Tendenz lässt sich zu den Zeitpunkten 4h und 24h nachweisen. Nach 7 Tagen zeigen beide Tiergruppen histologisch weitgehend integrale Zellverbände. Betrachtet man die korrelierenden TUNEL Färbungen zur Beurteilung der Apoptoseraten, so bestätigt dies den Eindruck, der bereits durch die Schnitte mit der NeuN Färbung entstanden ist: nämlich, dass die Wt neben den ausgeprägteren Gewebeschäden auch die höheren Apoptoseraten aufweisen. Vielmehr wird hier sogar sichtbar, dass selbst nach sieben Tagen, wenn in der NeuN Färbung die Zellverbände beider Tiergruppen intakt erscheinen, bei den Wt noch immer deutlich Apoptosevorgänge zu verzeichnen sind, während die KO Tiere so gut wie keine Apoptose mehr aufweisen.

Nun könnte dies seine Ursache in der Tatsache haben, dass die KO Tiere ihr Trauma aus einer geringeren Fallhöhe erlitten haben, und deshalb weniger Gewebsauflösung und weniger Apoptose zeigen. Aber selbst dann spiegelt der Befund nicht die klinischen Ergebnisse in Form eines entsprechenden NSS wider.

Es bleibt also festzuhalten, dass die KO Mäuse bei vergleichbaren 1h NSS-Werten ein deutlich schlechteres klinisches Outcome nach 7 Tagen, gemessen am NSS Verlauf, aufweisen. Weiterhin ist bemerkenswert, dass die KO Tiere hierbei aber weniger Gewebsauflösung und geringere Apoptoseraten im Vergleich zu den Wt zeigen.

4.4 Apoptosepathways und Komplementsystem nach SHT

Es sollte untersucht werden, welches der prädominante Apoptosepathway nach experimentell erzeugtem SHT in der Maus ist, und ob und wo Faktor B, bzw. die alternative Komplementkaskade in diese Apoptosepathways eingreift. Bisher ergaben sich in zahlreichen Studien Hinweise auf sowohl extrinsische als auch auf intrinsische Apoptoseinduktion nach SHT (130-132). In dieser Studie wurden als Marker für intrinsische Apoptose Bcl-2 und Bax Transkriptions- und Expressionsmuster untersucht, sowie als Marker für extrinsische Apoptose FAS, FAS-Ligand und TNF- α .

4.4.1 Intrinsische Apoptose: Bcl-2 und BAX

In dieser Studie ergaben sich im Western Blot in der ersten Versuchsserie Hinweise auf eine Beziehung der verstärkten Apoptose in den Wildtypen zu einer verminderten Bcl-2

Expression. Allerdings ließ sich keine gesteigerte BAX Expression nachweisen, vielmehr zeigte sich BAX über den zeitlichen Verlauf gleichsinnig vermindert. Es resultiert aus diesen Veränderungen der Proteinkonzentration also kein verändertes Bcl-2/BAX Verhältnis, welches für die Permeabilisierung der Mitochondrienmembran und konsekutiver Cytochrom C Freisetzung notwendig wäre. Darüber hinaus ließen sich diese Veränderungen in einer zweiten Serie nicht bestätigen; hier waren geringe Schwankungen in der Bcl-2 und BAX Expression zu sehen, die aber ebenfalls gleichgerichtet ausfielen. Die KO Tiere zeigten in der ersten Serie konstante Proteinkonzentrationen für Bcl-2 und BAX. Eine Veränderung des Bcl-2/BAX Verhältnisses war auch bei den KO Tieren in keiner Serie zu beobachten. Unter Vorbehalt der sehr kleinen Fallzahl ($n=2$ je Genotyp) ergibt sich somit auf Proteinebene kein eindeutiger Hinweis auf eine gesteigerte Apoptose über den intrinsischen Bcl-2/BAX Pathway, weder in den Wildtypen, noch in den KO Tieren.

Bei Betrachtung der Transkriptionsmuster von Bcl-2 und BAX mittels real time RT-PCR bestätigt sich dieser Eindruck. Es kommt zu keinen signifikanten Veränderungen der Bcl-2 Transkription in den Wildtypen. Lediglich die Nil Tiere der KO Gruppe zeigen eine signifikant höhere Bcl-2 Transkriptionsrate im Vergleich mit den Nil Tieren der Wildtypen ($p < 0,05$). Shamtiere und Traumatiere unterscheiden sich nicht signifikant voneinander, weder innerhalb der Gruppe eines Genotyps, noch zwischen den verschiedenen Genotypen. Das SHT scheint also keine Veränderungen der Transkription von Bcl-2 bewirkt zu haben. Als Erklärung für die immunhistologisch gezeigte geringere Apoptoserate der KO Tiere im Verlauf kann dieser Befund also nicht herangezogen werden, denn behandelte KO Tiere (Sham OP oder Trauma) zeigen gleiche Bcl-2 Transkriptionsraten wie Wildtypen, ohne signifikante Veränderungen im zeitlichen Verlauf. Auch die BAX Transkription zeigt innerhalb der behandelten Tiere keine signifikanten oder richtungsweisenden Unterschiede, weder zwischen den Genotypen, noch im zeitlichen Verlauf nach Behandlung, noch zwischen Trauma- und shamoperierten Tieren. Auch dieser Befund spricht gegen die intrinsische Apoptose via verändertem Bcl-2/BAX Verhältnis nach SHT in der Maus in der vorliegenden Studie.

Es ergibt sich also weder auf Proteinebene, noch auf DNA Ebene ein Hinweis auf Unterschiede der beiden untersuchten Genotypen in Beziehung auf die Transkription und Expression von Bcl-2 und BAX nach SHT. Ferner noch ergab sich kein Hinweis darauf, dass es nach SHT in der Maus überhaupt zu einer Initiierung der Apoptose via einer Veränderung des Bcl-2/BAX Verhältnisses kommt. Dieses Resultat deckt sich mit

den Ergebnissen einer Studie an CD59 defizienten Mäusen, denen ein wichtiger Gegenspieler zum MAC fehlt. Die Mäuse zeigten im Gegensatz zu Wildtypen deutlich erhöhte zerebrale Apoptoseraten nach SHT, jedoch ließen sich ebenfalls keine Unterschiede in den Transkriptions- und Expressionsraten von Bcl-2 und BAX nachweisen (100). Die Ergebnisse anderer experimenteller Studien zum SHT an Ratten und Mäusen, die diesem intrinsischen Apoptosepathway eine entscheidende Rolle nach SHT zuschreiben (131;133-136), konnten in dieser Studie somit nicht bestätigt werden. Viele Wissenschaftler halten den intrinsischen Apoptoseweg via Bcl-2/BAX für den prädominanten Pathway nach SHT. Einige Forschungsgruppen hatten erniedrigte Bcl-2 Expression und eine erhöhte BAX Expression in Korrelation mit Apoptose in SHT-Modellen an der Ratte gezeigt (131;133;134), andere hatten dagegen gesteigerte Bcl-2 Expression nachweisen können, bei ebenfalls gesteigertem Bax Expressionsmuster in apoptotischen Bereichen traumatisch geschädigten Hirnparenchyms der Ratte (137;138). Was trotz unterschiedlicher Ergebnisse in den einzelnen Studien gezeigt werden konnte, ist, dass eine erhöhte Bcl-2 Transkription einen protektiven Effekt auf das Outcome nach SHT hat. Dies bestätigte sich auch bei Untersuchungen an Menschen. So konnten Nathoo et al und auch Nq et al in 29 bzw. 11 menschlichen Hirnanteilen nach SHT eine gesteigerte BAX Expression nachweisen, wobei lediglich 14 bzw. 6 davon eine gesteigerte Bcl-2 Expression aufwiesen. Die gesteigerte Bcl-2 Expression korrelierte in beiden Untersuchungen mit einem besseren Outcome (139;140). Clark et al zeigten hingegen nur eine signifikant erhöhte Bcl-2 Expression in 8 Hirnresektaten, ohne Nachweis gesteigerter BAX Expression (141). Ebenfalls konnten sie in einer Folgestudie in Liquor von 23 Kindern mit SHT gesteigerte Bcl-2 Konzentrationen nachweisen. Höhere Konzentrationen waren auch hier mit einem besseren Outcome verbunden (142). Dass Bcl-2 durch Stabilisierung der Mitochondrienmembran zytoprotektiv wirkt, ist bekannt. Doch ob die Apoptose in Neuronen nach Schädel-Hirn-Trauma durch ein verändertes Verhältnis von Bcl-2/BAX initiiert wird, oder ob unterschiedliche Bcl-2 Konzentrationen lediglich einen unabhängigen Einfluss auf das Ausmaß der Apoptose durch andere Mechanismen haben, ist noch nicht abschließend geklärt. In den zitierten Studien wären beide Möglichkeiten denkbar. In dieser Studie ergaben sich keine Hinweise auf eine Schlüsselrolle von Bcl-2 und BAX, weder in Hinblick auf Apoptoserate, noch in Hinblick auf das neurologische Outcome nach SHT.

4.4.2 Extrinsische Apoptose: TNF- α , FAS und FAS-L

In dieser Studie ergaben sich Hinweise auf extrinsische Induktion von Apoptose nach SHT in beiden Genotypen. Es kam zu signifikanten Anstiegen der Transkription des Death Domain Rezeptors FAS und den apoptoseauslösenden Molekülen Tumor Nekrose Faktor α (TNF- α) und FAS-Ligand (FAS-L), sowohl in den KO als auch in den Wildtyp Mäusen. 4h nach dem Trauma steigt die Transkriptionsrate dieser Gene in beiden Genotypen deutlich an. Der Anstieg der FAS Transkription beider Genotypen ist nach 4h und 24h signifikant ($p < 0,01$ bzw. $p < 0,05$), für TNF- α ließ sich Signifikanz nur für die KO Tiere 24h nach SHT gegenüber den Niltieren nachweisen. Nach 7d sind die Transkriptionsraten des FAS Gens und des TNF- α Gens wieder nahezu auf Normalniveau, verglichen mit Nil Tieren. Auch die shamoperierten Tiere beider Genotypen zeigen einen signifikanten Anstieg der FAS Transkription nach 4h (Wt und KO) und 24h (KO), dieser ist aber jeweils signifikant geringer als bei den jeweiligen Traumatieren ($p < 0,01$ [4h] bzw. $p < 0,05$ [24h]).

Die Transkriptionsraten des FAS-Liganden steigen in beiden Genotypen 4h nach SHT signifikant gegenüber den Niltieren an ($p < 0,05$). Dabei ist der Anstieg bei den KO Mäusen signifikant höher ausgeprägt als bei den Wildtypen ($p < 0,05$). Dieser signifikante Unterschied besteht auch noch nach 24h ($p < 0,05$). Wie auch bei den Rezeptorgenen geht die Transkription des FAS-Liganden im zeitlichen Verlauf dann bis auf Niltierniveau zurück. Bemerkenswerterweise ist zu dem Zeitpunkt 7d jedoch die Transkriptionsrate für FAS-L in den KO Tieren signifikant geringer als in den Wildtypen. Die Mehrexpression dieser drei Gene in den Traumatieren fällt zusammen mit der ausgeprägten Apoptose in beiden Genotypen 4h nach SHT, wie sie in den TUNEL Färbungen gezeigt wurde. Es ist daher anzunehmen, dass zumindest ein Teil der Apoptose nach SHT extrinsisch über das Zusammenspiel von Todesrezeptoren wie FAS und TNF-R, und deren Liganden, wie FAS-L und TNF- α vermittelt wird. Dieses Ergebnis deckt sich mit Studien, die das Vorhandensein extrinsischer Apoptoseinduktion nach SHT postulieren. So konnten Ertel et al erhöhte FAS-Ligand Konzentrationen in Liquor von SHT Patienten im Vergleich zu Trauma Patienten ohne SHT nachweisen, was als Hinweis auf extrinsische Apoptose zu werten ist (143). Uzan et al. konnten erhöhte Spiegel von sFAS (soluble FAS) im Liquor von Patienten nach schwerem SHT im Vergleich zu Patienten ohne Trauma messen. Qiu et al wiesen sowohl in Hirnresektaten von Patienten nach SHT als auch in der Maus nach SHT FAS/FAS-Ligand Bindungskomplexe nach, die in der Maus zu Caspase-8 Aktivierung

und Apoptose führten (132). Bempohl et al experimentierten mit Knockout Mäusen, die defizient für FAS und TNF- α waren. Nach SHT zeigten diese Mäuse ein verbessertes Outcome und geringere Ausdehnung des Traumabereichs (144).

Es zeigt sich also in dieser Studie, dass die ausgeprägten Apoptosevorgänge 4h nach Trauma sowohl bei den KO Mäusen, als auch bei den Wildtypen mit gesteigerter FAS, FAS-L und TNF- α Transkription einhergehen. Signifikante Unterschiede der Transkriptionsraten zwischen den beiden Genotypen konnten dabei alleine für den FAS-Liganden gezeigt werden. 4h und 24h nach Trauma ist die FAS-L Transkriptionsrate noch signifikant höher bei den KO Tieren, nach 7d ist diese jedoch signifikant höher bei den Wildtypen. Diese letzte Feststellung deckt sich bisher als einziges Ergebnis mit der höheren Apoptoserate in den Wildtypen gegenüber den KO Tieren 7d nach Trauma. Es scheint jedoch unwahrscheinlich, dass das Fortbestehen der Apoptosevorgänge in den Wildtypen bis 7d nach dem Trauma durch FAS-L bedingt ist, da sich das Transkriptionsniveau beider Genotypen bereits 24h nach Trauma kaum noch von dem der Niltiere unterscheidet. Der signifikante Unterschied zwischen den Genotypen 7d nach Trauma rührt eher von einer gegenüber den Niltieren verminderten FAS-L Transkription bei den KO Tieren her, als von einer noch immer erhöhten Transkriptionsrate bei den Wildtypen. Ähnliche Ergebnisse zeigten sich auch in einer Studie von Stahel et al, in der CD59 defiziente Mäuse mit Wildtypen in Bezug auf Apoptose und Outcome nach SHT verglichen wurden. Auch dort kam es zu signifikanten Anstiegen von FAS und FAS-L 4h nach Trauma in beiden Gruppen, was für extrinsische Apoptose nach SHT spricht, jedoch nicht die Unterschiede in den Apoptoseraten erklären konnte (100).

Die vergleichbaren Transkriptionsraten in dieser Arbeit für FAS, FAS-L und TNF- α in beiden Genotypen zu jedem Zeitpunkt bieten ebenfalls keine hinreichende Erklärung für die ausgeprägteren Apoptosevorgänge in den Wildtypen 7 Tage nach SHT, so dass hier ein anderer Pathomechanismus verantwortlich sein muss.

4.5 Unterschiede in der Apoptoserate

Eine Erklärung für die geringeren Apoptoseraten der FB defizienten Mäuse 24h und 7d nach Trauma bieten die bisher dargestellten Ergebnisse nicht. Es muss also angenommen werden, dass es für die länger anhaltenden Apoptosevorgänge in den Wildtypen noch weitere Mechanismen gibt, die durch den alternativen Weg des Komplementsystems verursacht oder zumindest beeinflusst sind. Denkbar ist die

direkte Apoptoseinduktion durch Bb, ein Spaltprodukt des Faktor B. Eine direkte Apoptoseinduktion für dieses Molekül konnte von Uwai et al an verschiedenen Leukämiezellreihen demonstriert werden. Diese Apoptoseinduktion war unabhängig von FAS- oder TNF-Rezeptoren (59) und kann somit auch eine Erklärung für die Ergebnisse dieser Studie bezüglich der Unterschiede im Apoptoseverlauf der Wildtypen und der FB defizienten Mäuse sein.

Auch für das Anaphylatoxin C5a ist eine apoptoseinduzierende Wirkung beschrieben (36;57). Der C5a-Rezeptor (C5aR; CD88) gehört zur Familie der G-Protein-gekoppelten 7-Transmembranrezeptoren (145). Durch Bindung des Liganden C5a kommt es zur Initiierung komplexer Signalwege. An unterschiedlichen Zellen konnte u.a. gezeigt werden, dass es durch C5a/C5aR Bindung zu gesteigertem Calcium Influx (57), zu einer Steigerung der c-Fos Expression (57), zur Aktivierung der Phospholipase C, der Proteinkinase C, der Phosphatidylinositol-3-Kinase und zur Aktivierung von Ras, B-Raf, Raf-1, der MAP-Kinase und NF- κ B kommt, die als Transkriptionsfaktoren u.a. die Proliferation, Differenzierung, aber auch Apoptose regulieren bzw. induzieren können (36;46;47).

Der C5a Rezeptor (C5aR) wird konstitutiv von allen Zellen des Gehirns exprimiert (Astrozyten, Oligodendrozyten, Mikroglia und Neurone) (38;126-128). Stahel et al konnten darüber hinaus zeigen, dass der C5aR im Gehirn von Ratten und Mäusen nach experimentellem Schädel-Hirn-Trauma in Mäusen und Ratten verstärkt exprimiert wird (146). Interessanterweise zeigte sich die Expression dabei durch TNF- α reguliert. TNF- α - KO Mäuse reagierten auf das Trauma mit geringerem und kürzerem C5aR Anstieg (75;147). In einer anderen Studie ließ sich allein durch die intraperitoneale Injektion von rekombinantem TNF- α ein C5aR Anstieg im Hirnparenchym von Mäusen erzeugen (148). In Anbetracht dieser Ergebnisse und der Tatsache, dass die Mäuse in dieser Studie ebenfalls einen TNF- α Anstieg 4h und 24h nach Trauma zeigten, ist anzunehmen, dass es zu einer Hochregulation der C5aR Expression gekommen ist. Die Apoptoseinduktion über C5a/C5aR Bindung stellt also eine weitere mögliche Ursache für die anhaltende Apoptose in den Wildtypen über 24h hinaus dar. Da die Faktor B KO Tiere wesentlich weniger C5a bilden, fehlt diesen selbst bei hochregulierter Expression der C5a-Rezeptoren das entsprechende Substrat zur Apoptoseinduktion - mit konsekutiv weniger Apoptose nach 24h bzw. 7d nach SHT. Die Vermutung, dass C5a über den C5a Rezeptor für die anhaltende Apoptose in den Wildtypen verantwortlich ist, deckt sich mit der Beobachtung von Stahel et al, dass die C5aR Transkription nach

experimentellem SHT in der Maus bzw. Ratte weit über den 24h Zeitpunkt hinaus erhöht ist (72h bzw. 96h)(75;146;147).

Zuletzt ist noch der Membran Angriffs Komplex (MAC) zu nennen, der am Ende der Komplementkaskade steht und Apoptose verursachen kann. Zum einen führt die Anlagerung des MAC in die Zellmembran zu unkontrolliertem Ioneneinstrom und Anstieg des intrazellulären Calciums, was direkt zu Apoptose führen kann (54). Zum anderen konnte in einer Studie mit renalen Mesangiumzellen eine apoptoseinduzierende Wirkung durch nicht-lytische Konzentrationen von MAC über eine Aktivierung von Caspase 3 gezeigt werden (58). Da die KO Tiere weniger C5a aufweisen, ist auch mit entsprechend weniger C5b zu rechnen, das als Initiator des MAC fungiert. Somit ist auch die konsekutiv geringere MAC Ausbildung in den KO Tieren eine mögliche Ursache für geringere Apoptoseraten zu späteren Zeitpunkten nach SHT. Umgekehrt hatte sich in einer Studie an knockout Mäusen, die defizient für den wirteigenen MAC Inhibitor CD59 waren, gezeigt, dass ein Mangel an MAC-Inhibition zu deutlich höheren und längeren Apoptoseraten bis 7d nach SHT führt als beim Wildtyp, der CD59 auf seiner Zelloberfläche aufweist. Diese unterschiedlichen Apoptoseraten waren ebenfalls unabhängig von der FAS, FAS-L, Bcl-2 und BAX Transkription (100) und sind somit ein weiterer Hinweis auf einen möglichen, komplementvermittelten Apoptosepathway über den MAC.

Es sind hier verschiedene mögliche Ursachen der geringeren Apoptoseraten der KO Tiere verglichen mit den Wildtypen nach 24h und 7d aufgeführt, die alle mit den Ergebnissen dieser Studie vereinbar sind. Ob einer oder mehrere dieser, direkt durch das Komplementsystem vermittelten Apoptosepathways für die anhaltende Apoptose in den Wildtypen verantwortlich ist, bzw. sind, oder ob andere Apoptosemechanismen vorliegen, die direkt oder indirekt durch Faktor B oder andere downstream Moleküle der Komplementkaskade verursacht werden, kann nicht abschließend beantwortet werden. Hierzu sind weitere Studien notwendig. Eine Beteiligung des alternativen Komplementweges an den Prozessen während der posttraumatischen Entzündungsantwort mit Einfluss auf die verspäteten Apoptosevorgänge (24h bis 7d nach Trauma) ist nach den Ergebnissen der vorliegenden Studie jedoch anzunehmen.

4.6 Unterschiede im neurologischen Outcome

Neurologisch zeigen die KO Tiere trotz geringerer Stempelfallhöhe und bei vergleichbaren 1h-NSS Werten schlechtere Resultate im zeitlichen Verlauf. Während

sich die Wildtypen innerhalb von einer Woche bis auf nahezu normwertige NSS Werte erholen, zeigen die KO Tiere auch nach 7 Tagen noch deutlich pathologische und signifikant schlechtere NSS Werte ($p < 0,05$). Sie verbessern sich innerhalb einer Woche nur um 0,6 Punkte vs. 3,7 Punkte bei den Wt. Dieser Befund korreliert jedoch nicht, wie bereits dargestellt, mit den Apoptoseraten. Das schlechtere neurologische Outcome ist also offensichtlich nicht durch höhere Apoptoseraten zu erklären. Hierin wird deutlich, dass dem Komplementsystem neben einem verstärkenden Einfluss auf die Apoptose auch ein positiver Effekt in Bezug auf neuronale Anpassungsvorgänge und Regeneration nach SHT zukommt. Tatsächlich werden vielen Effektoren des Komplementsystems in den letzten Jahren zunehmend auch neuroprotektive und sogar regenerative Funktionen zugeschrieben.

Zunächst ist hier die Opsonierung von Zelldetritus und Apoptosekörperchen zu nennen, die diese einer schnellen Phagozytose zugänglich macht und so die proinflammatorische Wirkung freigesetzter Zellinhalte verhindert(85;86). Den Anaphylatoxinen C3a und C5a wird ein protektiver Effekt gegen Glutamat induzierte Neurotoxizität zugeschrieben (79-81;149). Glutamat wird bei Zerstörung von Neuronen in unphysiologisch hohen Mengen freigesetzt (17;22;26). Mukherjee et al fanden jüngst heraus, dass C5a diese Wirkung über die Regulation eines Glutamatrezeptors entfaltet (149). C5a schützte Neurone darüber hinaus auch vor anderen neurotoxischen Einflüssen, wie β -Amyloid, das eine wesentliche Rolle in der Pathogenese des Morbus Alzheimers spielt (36), und vor Kainsäure, einem Strukturanalogon der Glutaminsäure (150;151).

O'Barr et al konnten über die protektiven Funktionen von C5a hinaus sogar eine mitogene Wirkung auf undifferenzierte Neuroblastomzellen in vivo nachweisen (36). Heese et al und Jauneau et al konnten in vitro zeigen, dass C3a und C5a zu einer Induktion von NGF (Neuronal Growth Faktor) in Astrozyten führen (48;49). Dies lässt die Vermutung zu, dass diese Anaphylatoxine an regenerativen Prozessen im Gehirn nach SHT beteiligt sind, und bietet so eine mögliche Erklärung des signifikant besseren neurologischen Outcome der Wildtypen nach 7d.

Auch für den Membran Angriffs Komplex (MAC) sind neben der Apoptoseinduktion protektive Eigenschaften beschrieben. In nicht-lytischen Konzentrationen entfaltet der MAC insbesondere auf Oligodendrozyten eine antiapoptotische Wirkung (91-93;152). Außerdem konnten sublytische Mengen an MAC bei Oligodendrozyten eine Aufhebung der Differenzierung und den Wiedereintritt in den Zellzyklus bewirken (94), was

eine Regeneration geschädigten Gewebes ermöglicht. Als Mechanismus wird, ähnlich wie für C5a und C3a, eine Aktivierung genregulatorischer Proteine über ein G-Protein postuliert (153).

Die Ergebnisse spiegeln deutlich die duale Rolle des Komplementsystems dar, die mittlerweile für viele Zytokine und Chemokine angenommen wird. So wird zum Beispiel auch TNF- α , dem lange nur proinflammatorische und apoptoseinduzierende Wirkungen zugeordnet wurden, eine neuroprotektive Funktion zugesprochen. In einer Studie mit experimentellem SHT an TNF- α Knockout Mäusen (TNF- α $-/-$) zeigten diese zwar weniger neurologische Ausfälle innerhalb von 48h im Vergleich mit korrespondierenden Wildtypen, hatten aber nach 4 Wochen noch deutliche neurologische Ausfälle, während sich die Wildtypen hier bereits vollständig erholt hatten. Dies korrelierte mit erhöhtem Zellverlust in den KO Tieren nach 4 Wochen (154). Ähnliches mag auch auf die Komplementkaskade zutreffen, die mit ihren vielen Effektoren und Funktionen hochkomplex auf die posttraumatischen Prozesse im Hirnparenchym Einfluss nimmt. Es scheint ein empfindliches Gleichgewicht zwischen positiven und negativen Effekten bereits in Bezug auf einzelne Moleküle zu bestehen, die ihre detrimentalen oder protektive Wirkung jeweils in Abhängigkeit von Konzentration, zeitlichem Verlauf und der Anwesenheit weiterer Mitspieler entfalten. Zwar ist daher die vollständige und dauerhafte Ausschaltung eines ganzen Komplementarmes, wie in der vorliegenden Studie offensichtlich, nicht von Vorteil, doch der Einfluss des Komplementsystems, insbesondere des alternativen Aktivierungsweges auf die posttraumatische Entzündungsantwort kann auch in dieser Studie eindeutig belegt werden. Somit bietet das Komplementsystem weiterhin einen interessanten Ansatz für künftige therapeutische Ansätze nach SHT. Zur Evaluierung der unterschiedlichen Wirkungen der alternativen Komplementkaskade über den zeitlichen Verlauf hinweg würden sich z.B. Studien mit Faktor B neutralisierenden Antikörpern anbieten, die eine nur zeitweilige Inhibierung des Komplementsystems bewirken, um langfristig protektive Funktionen der alternativen Komplementkaskade nicht ebenfalls auszuschalten.

5 Zusammenfassung

Das Schädel-Hirn-Trauma (SHT) gehört zu den häufigsten Mortalitäts- und Morbiditätsursachen von Patienten unter 40 Jahren in den Industrieländern (4). Ausschlaggebend für die hohe Sterblichkeits- und Morbiditätsrate sind oft sekundäre Hirnschäden im Sinne einer posttraumatischen Entzündungsreaktion, die mit der Entwicklung eines Hirnödems und erhöhtem intrakraniellen Druck einhergeht (7). Diese reaktiven Prozesse bieten Spielraum für therapeutische Maßnahmen. Das Verständnis der genauen inflammatorischen Abläufe ist dabei unbedingte Voraussetzung zur Entwicklung spezifischer Therapieansätze. Diese Studie befasst sich mit der Rolle des alternativen Weges der Komplementaktivierung, dem bereits für viele andere zentralnervöse und systemische Erkrankungen eine Schlüsselrolle zugesprochen wird (63;103-117). Ein Schlüsselprotein der alternativen Komplementaktivierung ist Faktor B. In dieser Arbeit wurden Faktor B defiziente Mäuse (FB-/-) mit C57/BL6 Wildtypen in Hinblick auf neurologisches Outcome, Größe von zerebralen Parenchymdefekten, Apoptose, Komplementaktivierung und Genexpression nach experimentellem geschlossenen Schädel-Hirn-Trauma (SHT) verglichen.

Zur klinischen Beurteilung der Mäuse diente neben dem regelmäßigen Erfassen des Körpergewichts ein Neurological Severity Score (NSS), der anhand von 10 Aufgaben ermittelt wird und ein Maß für die neurologische Beeinträchtigung der Maus darstellt. Die histologischen Gewebeeränderungen und Apoptoseraten wurden mittels NeuN und TUNEL Färbung an Kryoschnitten der entnommenen Hirne abgeschätzt. Ein Maß für die Komplementaktivität nach SHT lieferten ELISA Untersuchungen des Serums auf den aktivierten Komplementfaktor C5a. Die Transkriptionsraten der apoptoseregulierenden Proteine Bcl-2, BAX, FAS, FAS-Ligand (FAS-L) und TNF- α wurden mittels real-time RT PCR, die Expression auf Proteinebene mittels Western Blot (SDS-PAGE) für Bcl-2 und BAX untersucht.

Die Apoptoseraten in den Hirnschnitten zeigten sich 4h nach Trauma in beiden Gruppen gleich stark ausgeprägt, nach 24h und 7d dagegen geringer in der FB-/- Gruppe. Als wahrscheinliche Ursache für die frühe Apoptose (4h) nach SHT wird bei signifikanter Steigerung der Transkriptionsraten für FAS, FAS-L und TNF- α in beiden Tiergruppen eine extrinsische Apoptoseinduktion angenommen. Die Transkriptions- und Expressionsraten für Bcl-2 und BAX zeigten sich dagegen nicht wesentlich verändert, was gegen eine Beteiligung dieser Apoptoseinduktoren nach SHT in der vorliegenden

Studie spricht. Der untersuchte extrinsische Apoptosepathway zeigte sich nicht durch den alternativen Arm des Komplementsystems beeinflusst, da beide Tiergruppen identische Transkriptionsmuster aufwiesen. Es wird daher in Hinblick auf die divergenten Apoptoseraten 24h und 7d nach Trauma ein von FAS, TNF- α und Bcl-2/BAX unabhängiger Einfluss des Komplementsystems angenommen. Als Erklärung bieten sich direkt apoptoseinduzierende Wirkungen einzelner Effektoren des Komplementsystems an, wie diese bereits für Faktor B, C5a und den Membran Angriffs Komplex (MAC) beschrieben sind (36;57-59;100).

Im Gegensatz dazu zeigten die FB-/- Mäuse 7d nach SHT ein signifikant schlechteres neurologisches Outcome im Neurological Severity Score (NSS) bei gleichen Ausgangswerten. In Bezug auf dieses Ergebnis muss für das alternative Komplementsystem auch eine protektive Funktion postuliert werden, die sich insbesondere im späteren zeitlichen Verlauf bemerkbar macht und den Wildtypen zu einer schnelleren Wiederherstellung neurologischer Funktionen verhilft. Neben protektiven Eigenschaften von C3a und C5a auf glutamatinduzierte Neurotoxizität (79-81;149) und schnellere Phagozytose von Zelldetritus (85;86;155) ist auch ein positiver Einfluss von Komplementfaktoren auf die Regeneration von Neuronen und Gliazellen durch Induktion mitogener Prozesse denkbar, der in vitro und in vivo bereits für C3a, C5a und den MAC beschrieben wurde (36;48;49;94).

Diese Studie zeigt einen deutlichen Einfluss des alternativen Komplementweges auf die intrakraniellen Anpassungsvorgänge nach Schädel-Hirn-Trauma in der Maus. Insbesondere in Bezug auf die Zeitpunkte 24h und 7d nach SHT zeigt sich einerseits eine apoptosebegünstigende Wirkung, andererseits aber auch ein protektiver Effekt in Hinblick auf das neurologische Outcome. Zur Klärung der Frage, welche Proteine im Verlauf der alternativen Komplementaktivierung zu welchen Zeitpunkten positive oder negative Einflüsse auf das klinische Outcome nach SHT haben, sind weitere Studien notwendig. Anbieten würden sich zum Beispiel Studien mit Faktor B neutralisierenden Antikörpern, die nur eine kurzzeitige Inhibierung des Komplementsystems bewirken, um langfristig protektive Funktionen der alternativen Komplementkaskade nicht ebenfalls auszuschalten.

6 Literaturverzeichnis

1. Jennett B. Epidemiology of head injury. *J.Neurol.Neurosurg.Psychiatry* 1996;60(4):362-9.
2. Keeling KL, Hicks RR, Mahesh J, Billings BB, Kotwal GJ. Local neutrophil influx following lateral fluid-percussion brain injury in rats is associated with accumulation of complement activation fragments of the third component (C3) of the complement system. *J.Neuroimmunol.* 2000;105(1):20-30.
3. Rancan M, Morganti-Kossmann MC, Barnum SR, Saft S, Schmidt OI, Ertel W et al. Central nervous system-targeted complement inhibition mediates neuroprotection after closed head injury in transgenic mice. *J.Cereb.Blood Flow Metab* 2003;23(9):1070-4.
4. Statistisches Bundesamt. Sterbefälle 2004 durch Unfälle nach Unfallkategorien, Altersgruppen und Geschlecht. *Gesundheitswesen Todesursachen in Deutschland.* Wiesbaden: 2005. p. 54-5.
5. Stahel PF, Morganti-Kossmann MC, Kossmann T. The role of the complement system in traumatic brain injury. *Brain Res.Brain Res.Rev.* 1998;27(3):243-56.
6. Philip F.Stahel, Wade R.Smith. Closed Head Injury. In: Kirby I.Bland, Markus W.Büchler, Attila Csendes, Oliver James Garden, Michael G.Sarr, John Wong, editors. *General Surgery.* 2nd ed. Berlin: Springer; 2008. p. 131-42.
7. Gaetz M. The neurophysiology of brain injury. *Clin.Neurophysiol.* 2004;115(1):4-18.
8. Gennarelli TA, Graham DI. Neuropathology of the Head Injuries. *Semin.Clin.Neuropsychiatry* 1998;3(3):160-75.
9. O.Gratzel, J.A.Rem, M.Wasner. Nervensystem. In: Siewert JR, editor. *Chirurgie.* 7 ed. Berlin; Heidelberg; New York: Springer-Verlag; 2001. p. 236-46.
10. Gieron MA, Korthals JK, Riggs CD. Diffuse axonal injury without direct head trauma and with delayed onset of coma. *Pediatr.Neurol.* 1998;19(5):382-4.
11. Henry GK, Gross HS, Herndon CA, Furst CJ. Nonimpact brain injury: neuropsychological and behavioral correlates with consideration of physiological findings. *Appl.Neuropsychol.* 2000;7(2):65-75.
12. Duhaime AC, Christian CW, Rorke LB, Zimmerman RA. Nonaccidental head injury in infants--the "shaken-baby syndrome". *N.Engl.J.Med.* 1998;338(25):1822-9.
13. Sanganahalli BG, Joshi PG, Joshi NB. NMDA and non-NMDA receptors stimulation causes differential oxidative stress in rat cortical slices. *Neurochem.Int.* 2006;49(5):475-80.
14. Kannurpatti SS, Sanganahalli BG, Mishra S, Joshi PG, Joshi NB. Glutamate-induced differential mitochondrial response in young and adult rats. *Neurochem.Int.* 2004;44(5):361-9.
15. Giza CC, Hovda DA. The Neurometabolic Cascade of Concussion. *J.Athl.Train.* 2001;36(3):228-35.

16. Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci.* 1999;22(9):391-7.
17. Sahuquillo J, Poca MA, Amoros S. Current aspects of pathophysiology and cell dysfunction after severe head injury. *Curr.Pharm.Des* 2001;7(15):1475-503.
18. Kampf A, Posmantur RM, Zhao X, Schmutzhard E, Clifton GL, Hayes RL. Mechanisms of calpain proteolysis following traumatic brain injury: implications for pathology and therapy: implications for pathology and therapy: a review and update. *J.Neurotrauma* 1997;14(3):121-34.
19. Siesjo BK. Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part II: Mechanisms of damage and treatment. *J.Neurosurg.* 1992;77(3):337-54.
20. Wolf JA, Stys PK, Lusardi T, Meaney D, Smith DH. Traumatic axonal injury induces calcium influx modulated by tetrodotoxin-sensitive sodium channels. *J.Neurosci.* 2001;21(6):1923-30.
21. Ragaisis V. [Brain contusion: morphology, pathogenesis and treatment]. *Medicina (Kaunas.)* 2002;38(3):243-9.
22. Wahl M, Schilling L, Unterberg A, Baethmann A. Mediators of vascular and parenchymal mechanisms in secondary brain damage. *Acta Neurochir.Suppl (Wien.)* 1993;57:64-72.
23. Hayes RL, Dixon CE. Neurochemical changes in mild head injury. *Semin.Neurol.* 1994;14(1):25-31.
24. Graham DIAJHea. Pathology of brain damage in head injury. in: *Head Injury*, Cooper, P.R., (Ed.). Williams&Wilkins third editioned. 1993.
25. Friedlander RM. Apoptosis and caspases in neurodegenerative diseases. *N.Engl.J.Med.* 2003;348(14):1365-75.
26. Schiefer J, Topper R, Schmidt W, Block F, Heinrich PC, Noth J et al. Expression of interleukin 6 in the rat striatum following stereotaxic injection of quinolinic acid. *J.Neuroimmunol.* 1998;89(1-2):168-76.
27. Dickson DW, Mattiace LA, Kure K, Hutchins K, Lyman WD, Brosnan CF. Microglia in human disease, with an emphasis on acquired immune deficiency syndrome. *Lab Invest* 1991;64(2):135-56.
28. Kreutzberg GW. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci.* 1996;19(8):312-8.
29. McGeer PL, Kawamata T, Walker DG, Akiyama H, Tooyama I, McGeer EG. Microglia in degenerative neurological disease. *Glia* 1993;7(1):84-92.
30. Perry VH, Andersson PB, Gordon S. Macrophages and inflammation in the central nervous system. *Trends Neurosci.* 1993;16(7):268-73.
31. Stover JF, Schoning B, Beyer TF, Woiciechowsky C, Unterberg AW. Temporal profile of cerebrospinal fluid glutamate, interleukin-6, and tumor necrosis factor-alpha in relation to brain edema and contusion following controlled cortical impact injury in rats. *Neurosci.Lett.* 2000;288(1):25-8.
32. Yatsiv I, Morganti-Kossmann MC, Perez D, Dinarello CA, Novick D, Rubinstein M et al. Elevated intracranial IL-18 in humans and mice after traumatic brain injury and evidence

- of neuroprotective effects of IL-18-binding protein after experimental closed head injury. *J.Cereb.Blood Flow Metab* 2002;22(8):971-8.
33. Philip F.Stahel, Ursula Felderhoff-Mueser, Scott R.Barnum. *Encyclopedia of Neuroscience*. 1ed. Berlin: Springer; 2009.
 34. Kossmann T, Stahel PF, Morganti-Kossmann MC, Jones JL, Barnum SR. Elevated levels of the complement components C3 and factor B in ventricular cerebrospinal fluid of patients with traumatic brain injury. *J.Neuroimmunol*. 1997;73(1-2):63-9.
 35. Bellander BM, Singhrao SK, Ohlsson M, Mattsson P, Svensson M. Complement activation in the human brain after traumatic head injury. *J.Neurotrauma* 2001;18(12):1295-311.
 36. O'Barr SA, Caguioa J, Gruol D, Perkins G, Ember JA, Hugli T et al. Neuronal expression of a functional receptor for the C5a complement activation fragment. *J.Immunol*. 2001;166(6):4154-62.
 37. Stahel PF, Kossmann T, Morganti-Kossmann MC, Hans VH, Barnum SR. Experimental diffuse axonal injury induces enhanced neuronal C5a receptor mRNA expression in rats. *Brain Res.Mol.Brain Res*. 1997;50(1-2):205-12.
 38. Nataf S, Stahel PF, Davoust N, Barnum SR. Complement anaphylatoxin receptors on neurons: new tricks for old receptors? *Trends Neurosci*. 1999;22(9):397-402.
 39. Beschorner R, Nguyen TD, Gozalan F, Pedal I, Mattern R, Schluesener HJ et al. CD14 expression by activated parenchymal microglia/macrophages and infiltrating monocytes following human traumatic brain injury. *Acta Neuropathol*. 2002;103(6):541-9.
 40. Stamatovic SM, Dimitrijevic OB, Keep RF, Andjelkovic AV. Inflammation and brain edema: new insights into the role of chemokines and their receptors. *Acta Neurochir.Suppl* 2006;96:444-50.
 41. Cartier L, Hartley O, Dubois-Dauphin M, Krause KH. Chemokine receptors in the central nervous system: role in brain inflammation and neurodegenerative diseases. *Brain Res.Brain Res.Rev*. 2005;48(1):16-42.
 42. Morganti-Kossmann MC, Kossmann T, Wahl SM. Cytokines and neuropathology. *Trends Pharmacol.Sci*. 1992;13(7):286-91.
 43. Charles A.Janeway jr et al. Die angeborene Immunität. In: Charles A.Janeway, Paul Travers, Mark Walport, Mark Shlomchik, editors. *Immunologie*. 5 ed. Heidelberg; Berlin: Spektrum Akademischer Verlag GmbH; 2002. p. 37-67.
 44. Michael D.Kramer. Das Komplement-System. In: Michael D.Kramer, editor. *Immunologie und Immunpathologie*. Stuttgart: Ferdinand Enke Verlag; 1997. p. 68-74.
 45. Hans-Hartmut Peter, Ursus-Nikolaus Riede. Pathogene Immunreaktionen. In: Ursus-Nikolaus Riede, Martin Werner, Hans-Eckart Schäfer, editors. *Allgemeine und spezielle Pathologie*. 5th ed. Stuttgart: Thieme; 2004. p. 176-8.
 46. J.A.Ember, M.A.Jagels, T.E.Hugli. Characterization of complement anaphylatoxins and their biological responses. *The Human Complement System in Health and Disease*. New Yorck: J.E. Voankis and M.M. Frank, eds. Dekker; 2008. p. 241-84.

47. Buhl AM, Avdi N, Worthen GS, Johnson GL. Mapping of the C5a receptor signal transduction network in human neutrophils. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1994;91(19):9190-4.
48. Heese K, Hock C, Otten U. Inflammatory signals induce neurotrophin expression in human microglial cells. *J.Neurochem.* 1998;70(2):699-707.
49. Jauneau AC, Ischenko A, Chatagner A, Benard M, Chan P, Schouft MT et al. Interleukin-1beta and anaphylatoxins exert a synergistic effect on NGF expression by astrocytes. *J.Neuroinflammation.* 2006;3:8.
50. Willibald Pschyrembel. *Pschyrembel.* 259ed. New York: de Gruyter; 2002.
51. Perez-Caballero D, Gonzalez-Rubio C, Gallardo ME, Vera M, Lopez-Trascasa M, Rodriguez dC et al. Clustering of missense mutations in the C-terminal region of factor H in atypical hemolytic uremic syndrome. *Am.J.Hum.Genet.* 2001;68(2):478-84.
52. Neumann HP, Salzmann M, Bohnert-Iwan B, Mannuelian T, Skerka C, Lenk D et al. Haemolytic uraemic syndrome and mutations of the factor H gene: a registry-based study of German speaking countries. *J.Med.Genet.* 2003;40(9):676-81.
53. Yao XL, Liu J, Lee E, Ling GS, McCabe JT. Progesterone differentially regulates pro- and anti-apoptotic gene expression in cerebral cortex following traumatic brain injury in rats. *J.Neurotrauma* 2005;22(6):656-68.
54. Duchen MR. Mitochondria and calcium: from cell signalling to cell death. *J.Physiol* 2000;529 Pt 1:57-68.
55. Ghobrial IM, Witzig TE, Adjei AA. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *CA Cancer J.Clin.* 2005;55(3):178-94.
56. Bhardwaj A, Aggarwal BB. Receptor-mediated choreography of life and death. *J.Clin Immunol.* 2003;23(5):317-32.
57. Farkas I, Baranyi L, Takahashi M, Fukuda A, Liposits Z, Yamamoto T et al. A neuronal C5a receptor and an associated apoptotic signal transduction pathway. *J.Physiol* 1998;507 (Pt 3):679-87.
58. Nauta AJ, Daha MR, Tijmsa O, van de WB, Tedesco F, Roos A. The membrane attack complex of complement induces caspase activation and apoptosis. *Eur.J.Immunol.* 2002;32(3):783-92.
59. Uwai M, Terui Y, Mishima Y, Tomizuka H, Ikeda M, Itoh T et al. A new apoptotic pathway for the complement factor B-derived fragment Bb. *J.Cell Physiol* 2000;185(2):280-92.
60. Lumsden CE. The immunogenesis of the multiple sclerosis plaque. *Brain Res.* 1971;28(3):365-90.
61. Woyciechowska JL, Brzosko WJ. Immunofluorescence study of brain plaques from two patients with multiple sclerosis. *Neurology* 1977;27(7):620-2.
62. Compston DA, Morgan BP, Campbell AK, Wilkins P, Cole G, Thomas ND et al. Immunocytochemical localization of the terminal complement complex in multiple sclerosis. *Neuropathol.Appl.Neurobiol.* 1989;15(4):307-16.

63. Nataf S, Carroll SL, Wetsel RA, Szalai AJ, Barnum SR. Attenuation of experimental autoimmune demyelination in complement-deficient mice. *J.Immunol.* 2000;165(10):5867-73.
64. Davoust N, Nataf S, Reiman R, Holers MV, Campbell IL, Barnum SR. Central nervous system-targeted expression of the complement inhibitor sCrry prevents experimental allergic encephalomyelitis. *J.Immunol.* 1999;163(12):6551-6.
65. Eikelenboom P, Hack CE, Rozemuller JM, Stam FC. Complement activation in amyloid plaques in Alzheimer's dementia. *Virchows Arch.B Cell Pathol.Incl.Mol.Pathol.* 1989;56(4):259-62.
66. McGeer PL, Akiyama H, Itagaki S, McGeer EG. Activation of the classical complement pathway in brain tissue of Alzheimer patients. *Neurosci.Lett.* 1989;107(1-3):341-6.
67. Rogers J, Cooper NR, Webster S, Schultz J, McGeer PL, Styren SD et al. Complement activation by beta-amyloid in Alzheimer disease. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1992;89(21):10016-20.
68. L Bergamaschini SCBBMCPB*aAA. Alzheimer's β -amyloid peptides can activate the early components of complement classical pathway in a C1q-independent manner. *Clin Exp Immunol.* 1999;115(3):526-33.
69. Cooper NR, Bradt BM, O'Barr S, Yu JX. Focal inflammation in the brain: role in Alzheimer's disease. *Immunol.Res.* 2000;21(2-3):159-65.
70. Singhrao SK, Neal JW, Morgan BP, Gasque P. Increased complement biosynthesis by microglia and complement activation on neurons in Huntington's disease. *Exp Neurol.* 1999;159(2):362-76.
71. Woodruff TM, Crane JW, Proctor LM, Buller KM, Shek AB, de Vos K et al. Therapeutic activity of C5a receptor antagonists in a rat model of neurodegeneration. *FASEB J.* 2006;20(9):1407-17.
72. Alexander JJ, Jacob A, Bao L, Macdonald RL, Quigg RJ. Complement-dependent apoptosis and inflammatory gene changes in murine lupus cerebritis. *J.Immunol.* 2005;175(12):8312-9.
73. Andrews BS, Eisenberg RA, Theofilopoulos AN, Izui S, Wilson CB, McConahey PJ et al. Spontaneous murine lupus-like syndromes. Clinical and immunopathological manifestations in several strains. *J.Exp Med.* 1978;148(5):1198-215.
74. Morgan BP, Gasque P. Expression of complement in the brain: role in health and disease. *Immunol.Today* 1996;17(10):461-6.
75. Stahel PF, Morganti-Kossmann MC, Perez D, Redaelli C, Gloor B, Trentz O et al. Intrathecal levels of complement-derived soluble membrane attack complex (sC5b-9) correlate with blood-brain barrier dysfunction in patients with traumatic brain injury. *J.Neurotrauma* 2001;18(8):773-81.
76. Pasinetti GM, Johnson SA, Rozovsky I, Lampert-Etchells M, Morgan DG, Gordon MN et al. Complement C1qB and C4 mRNAs responses to lesioning in rat brain. *Exp Neurol.* 1992;118(2):117-25.
77. Lacy M, Jones J, Whittemore SR, Haviland DL, Wetsel RA, Barnum SR. Expression of the receptors for the C5a anaphylatoxin, interleukin-8 and FMLP by human astrocytes and microglia. *J.Neuroimmunol.* 1995;61(1):71-8.

78. Ames RS, Li Y, Sarau HM, Nuthulaganti P, Foley JJ, Ellis C et al. Molecular cloning and characterization of the human anaphylatoxin C3a receptor. *J.Biol.Chem.* 1996;271(34):20231-4.
79. van Beek J, Nicole O, Ali C, Ischenko A, MacKenzie ET, Buisson A et al. Complement anaphylatoxin C3a is selectively protective against NMDA-induced neuronal cell death. *Neuroreport* 2001;12(2):289-93.
80. Mukherjee P, Pasinetti GM. Complement anaphylatoxin C5a neuroprotects through mitogen-activated protein kinase-dependent inhibition of caspase 3. *J.Neurochem.* 2001;77(1):43-9.
81. Osaka H, Mukherjee P, Aisen PS, Pasinetti GM. Complement-derived anaphylatoxin C5a protects against glutamate-mediated neurotoxicity. *J.Cell Biochem.* 1999;73(3):303-11.
82. Mukherjee P, Pasinetti GM. The role of complement anaphylatoxin C5a in neurodegeneration: implications in Alzheimer's disease. *J.Neuroimmunol.* 2000;105(2):124-30.
83. Niculescu T, Weerth S, Soane L, Niculescu F, Rus V, Raine CS et al. Effects of membrane attack complex of complement on apoptosis in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 2003;1010:530-3.
84. Cole DS, Morgan BP. Beyond lysis: how complement influences cell fate. *Clin Sci.(Lond)* 2003;104(5):455-66.
85. Ogden CA, deCathelineau A, Hoffmann PR, Bratton D, Ghebrehiwet B, Fadok VA et al. C1q and mannose binding lectin engagement of cell surface calreticulin and CD91 initiates macropinocytosis and uptake of apoptotic cells. *J.Exp Med.* 2001;194(6):781-95.
86. Elward K, Griffiths M, Mizuno M, Harris CL, Neal JW, Morgan BP et al. CD46 plays a key role in tailoring innate immune recognition of apoptotic and necrotic cells. *J.Biol.Chem.* 2005;280(43):36342-54.
87. Bowness P, Davies KA, Norsworthy PJ, Athanassiou P, Taylor-Wiedeman J, Borysiewicz LK et al. Hereditary C1q deficiency and systemic lupus erythematosus. *QJM.* 1994;87(8):455-64.
88. Botto M, Walport MJ. C1q, autoimmunity and apoptosis. *Immunobiology* 2002;205(4-5):395-406.
89. Korb LC, Ahearn JM. C1q binds directly and specifically to surface blebs of apoptotic human keratinocytes: complement deficiency and systemic lupus erythematosus revisited. *J.Immunol.* 1997;158(10):4525-8.
90. Rus HG, Niculescu FI, Shin ML. Role of the C5b-9 complement complex in cell cycle and apoptosis. *Immunol.Rev.* 2001;180:49-55.
91. Rus H, Cudrici C, Niculescu F. C5b-9 complement complex in autoimmune demyelination and multiple sclerosis: dual role in neuroinflammation and neuroprotection. *Ann.Med.* 2005;37(2):97-104.
92. Rus H, Cudrici C, Niculescu F, Shin ML. Complement activation in autoimmune demyelination: dual role in neuroinflammation and neuroprotection. *J.Neuroimmunol.* 2006;180(1-2):9-16.

93. Hila S, Soane L, Koski CL. Sublytic C5b-9-stimulated Schwann cell survival through PI 3-kinase-mediated phosphorylation of BAD. *Glia* 2001;36(1):58-67.
94. Rus H, Cudrici C, David S, Niculescu F. The complement system in central nervous system diseases. *Autoimmunity* 2006;39(5):395-402.
95. Shirazi Y, Imagawa DK, Shin ML. Release of leukotriene B4 from sublethally injured oligodendrocytes by terminal complement complexes. *J.Neurochem.* 1987;48(1):271-8.
96. Hansch GM, Seitz M, Betz M. Effect of the late complement components C5b-9 on human monocytes: release of prostanoids, oxygen radicals and of a factor inducing cell proliferation. *Int.Arch.Allergy Appl.Immunol.* 1987;82(3-4):317-20.
97. Casarsa C, De Luigi A, Pausa M, De Simoni MG, Tedesco F. Intracerebroventricular injection of the terminal complement complex causes inflammatory reaction in the rat brain. *Eur.J.Immunol.* 2003;33(5):1260-70.
98. Xiong ZQ, Qian W, Suzuki K, McNamara JO. Formation of complement membrane attack complex in mammalian cerebral cortex evokes seizures and neurodegeneration. *J.Neurosci.* 2003;23(3):955-60.
99. Leinhase I, Schmidt OI, Thurman JM, Hossini AM, Rozanski M, Taha ME et al. Pharmacological complement inhibition at the C3 convertase level promotes neuronal survival, neuroprotective intracerebral gene expression, and neurological outcome after traumatic brain injury. *Exp Neurol.* 2006;199(2):454-64.
100. Stahel PF, Flierl MA, Morgan BP, Persigehl I, Stoll C, Conrad C et al. Absence of the complement regulatory molecule CD59a leads to exacerbated neuropathology after traumatic brain injury in mice. *J.Neuroinflammation.* 2009;6:2.
101. Sewell DL, Nacewicz B, Liu F, Macvilay S, Erdei A, Lambris JD et al. Complement C3 and C5 play critical roles in traumatic brain cryoinjury: blocking effects on neutrophil extravasation by C5a receptor antagonist. *J.Neuroimmunol.* 2004;155(1-2):55-63.
102. Matsumoto M, Fukuda W, Circolo A, Goellner J, Strauss-Schoenberger J, Wang X et al. Abrogation of the alternative complement pathway by targeted deletion of murine factor B. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1997;94(16):8720-5.
103. Watanabe H, Garnier G, Circolo A, Wetsel RA, Ruiz P, Holers VM et al. Modulation of renal disease in MRL/lpr mice genetically deficient in the alternative complement pathway factor B. *J.Immunol.* 2000;164(2):786-94.
104. Elliott MK, Jarmi T, Ruiz P, Xu Y, Holers VM, Gilkeson GS. Effects of complement factor D deficiency on the renal disease of MRL/lpr mice. *Kidney Int.* 2004;65(1):129-38.
105. Prodeus AP, Goerg S, Shen LM, Pozdnyakova OO, Chu L, Alicot EM et al. A critical role for complement in maintenance of self-tolerance. *Immunity.* 1998;9(5):721-31.
106. Thurman JM, Ljubanovic D, Edelstein CL, Gilkeson GS, Holers VM. Lack of a functional alternative complement pathway ameliorates ischemic acute renal failure in mice. *J.Immunol.* 2003;170(3):1517-23.
107. Ji H, Ohmura K, Mahmood U, Lee DM, Hofhuis FM, Boackle SA et al. Arthritis critically dependent on innate immune system players. *Immunity.* 2002;16(2):157-68.
108. Zhou W, Farrar CA, Abe K, Pratt JR, Marsh JE, Wang Y et al. Predominant role for C5b-9 in renal ischemia/reperfusion injury. *J.Clin Invest* 2000;105(10):1363-71.

109. Taube C, Thurman JM, Takeda K, Joetham A, Miyahara N, Carroll MC et al. Factor B of the alternative complement pathway regulates development of airway hyperresponsiveness and inflammation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 2006;103(21):8084-9.
110. Schwertz R, Rother U, Anders D, Gretz N, Scharer K, Kirschfink M. Complement analysis in children with idiopathic membranoproliferative glomerulonephritis: a long-term follow-up. *Pediatr.Allergy Immunol.* 2001;12(3):166-72.
111. Jansen JH, Hogasen K, Grondahl AM. Porcine membranoproliferative glomerulonephritis type II: an autosomal recessive deficiency of factor H. *Vet.Rec.* 1995;137(10):240-4.
112. Pickering MC, Cook HT, Warren J, Bygrave AE, Moss J, Walport MJ et al. Uncontrolled C3 activation causes membranoproliferative glomerulonephritis in mice deficient in complement factor H. *Nat.Genet.* 2002;31(4):424-8.
113. Tichenor JR, Bledsoe LB, Opsahl MS, Cunningham DS. Activation of complement in humans with a first-trimester pregnancy loss. *Gynecol.Obstet.Invest* 1995;39(2):79-82.
114. Xu C, Mao D, Holers VM, Palanca B, Cheng AM, Molina H. A critical role for murine complement regulator cry in fetomaternal tolerance. *Science* 2000;287(5452):498-501.
115. Mao D, Wu X, Deppong C, Friend LD, Dolecki G, Nelson DM et al. Negligible role of antibodies and C5 in pregnancy loss associated exclusively with C3-dependent mechanisms through complement alternative pathway. *Immunity.* 2003;19(6):813-22.
116. Rand JH. Antiphospholipid antibody-mediated disruption of the annexin-V antithrombotic shield: a thrombogenic mechanism for the antiphospholipid syndrome. *J.Autoimmun.* 2000;15(2):107-11.
117. Thurman JM, Kraus DM, Girardi G, Hourcade D, Kang HJ, Royer PA et al. A novel inhibitor of the alternative complement pathway prevents antiphospholipid antibody-induced pregnancy loss in mice. *Mol.Immunol.* 2005;42(1):87-97.
118. Beni-Adani L, Bassan M, Gibney G, Popmeranz S, Berenneman DE, Gozes I et al. Activity-dependent neurotrophic protein is neuroprotective in a mouse model of closed head injury. *Proceedings from 28th annual meeting of Society for Neuroscience* 1998;(Nov):1-12.
119. Mullen RJ, Buck CR, Smith AM. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development* 1992;116(1):201-11.
120. Youle RJ, Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 2008;9(1):47-59.
121. The Brain Trauma Foundation. Guidelines for the management of severe traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 2007;24 Suppl 1:7-13.
122. Stahel PF, Smith WR, Moore EE. Hypoxia and hypotension, the "lethal duo" in traumatic brain injury: implications for prehospital care. *Intensive Care Med.* 2008;34(3):402-4.
123. Roberts I, Yates D, Sandercock P, Farrell B, Wasserberg J, Lomas G et al. Effect of intravenous corticosteroids on death within 14 days in 10008 adults with clinically significant head injury (MRC CRASH trial): randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2004;364(9442):1321-8.

124. You Z, Yang J, Takahashi K, Yager PH, Kim HH, Qin T et al. Reduced tissue damage and improved recovery of motor function after traumatic brain injury in mice deficient in complement component C4. *J.Cereb.Blood Flow Metab* 2007;27(12):1954-64.
125. Schmidt OI, Heyde CE, Ertel W, Stahel PF. Closed head injury--an inflammatory disease? *Brain Res.Brain Res.Rev.* 2005;48(2):388-99.
126. Armstrong RC, Harvath L, Dubois-Dalcq ME. Type 1 astrocytes and oligodendrocyte-type 2 astrocyte glial progenitors migrate toward distinct molecules. *J.Neurosci.Res.* 1990;27(3):400-7.
127. Gasque P, Singhrao SK, Neal JW, Gotze O, Morgan BP. Expression of the receptor for complement C5a (CD88) is up-regulated on reactive astrocytes, microglia, and endothelial cells in the inflamed human central nervous system. *Am.J.Pathol.* 1997;150(1):31-41.
128. Nataf S, Levison SW, Barnum SR. Expression of the anaphylatoxin C5a receptor in the oligodendrocyte lineage. *Brain Res.* 2001;894(2):321-6.
129. Siewert JR, Bartels H, Encke A, Heberer M, Lehr L. Pathophysiologische Folgen, Vorbehandlung und Nachbehandlung bei operativen Eingriffen und Traumen. In: Siewert JR, editor. *Chirurgie.* 7 ed. Berlin; Heidelberg; New York: Springer Verlag; 2001. p. 77-82.
130. Franz G, Beer R, Intemann D, Krajewski S, Reed JC, Engelhardt K et al. Temporal and spatial profile of Bid cleavage after experimental traumatic brain injury. *J.Cereb.Blood Flow Metab* 2002;22(8):951-8.
131. Strauss KI, Narayan RK, Raghupathi R. Common patterns of bcl-2 family gene expression in two traumatic brain injury models. *Neurotox.Res.* 2004;6(4):333-42.
132. Qiu J, Whalen MJ, Lowenstein P, Fiskum G, Fahy B, Darwish R et al. Upregulation of the Fas receptor death-inducing signaling complex after traumatic brain injury in mice and humans. *J.Neurosci.* 2002;22(9):3504-11.
133. Luo C, Lu Y, Jiang J, Zhu C. Changes of bcl-x(L) and bax mRNA expression following traumatic brain injury in rats. *Chin J.Traumatol.* 2002;5(5):299-302.
134. Raghupathi R, Conti AC, Graham DI, Krajewski S, Reed JC, Grady MS et al. Mild traumatic brain injury induces apoptotic cell death in the cortex that is preceded by decreases in cellular Bcl-2 immunoreactivity. *Neuroscience* 2002;110(4):605-16.
135. Felderhoff-Mueser U, Sifringer M, Pesditschek S, Kuckuck H, Moysich A, Bittigau P et al. Pathways leading to apoptotic neurodegeneration following trauma to the developing rat brain. *Neurobiol.Dis.* 2002;11(2):231-45.
136. Tehranian R, Rose ME, Vagni V, Griffith RP, Wu S, Maits S et al. Transgenic mice that overexpress the anti-apoptotic Bcl-2 protein have improved histological outcome but unchanged behavioral outcome after traumatic brain injury. *Brain Res.* 2006;1101(1):126-35.
137. Cernak I, Chapman SM, Hamlin GP, Vink R. Temporal characterisation of pro- and anti-apoptotic mechanisms following diffuse traumatic brain injury in rats. *J.Clin Neurosci.* 2002;9(5):565-72.

138. Clark RS, Chen J, Watkins SC, Kochanek PM, Chen M, Stetler RA et al. Apoptosis-suppressor gene bcl-2 expression after traumatic brain injury in rats. *J.Neurosci.* 1997;17(23):9172-82.
139. Nathoo N, Narotam PK, Agrawal DK, Connolly CA, van Dellen JR, Barnett GH et al. Influence of apoptosis on neurological outcome following traumatic cerebral contusion. *J.Neurosurg.* 2004;101(2):233-40.
140. Ng I, Yeo TT, Tang WY, Soong R, Ng PY, Smith DR. Apoptosis occurs after cerebral contusions in humans. *Neurosurgery* 2000;46(4):949-56.
141. Clark RS, Kochanek PM, Chen M, Watkins SC, Marion DW, Chen J et al. Increases in Bcl-2 and cleavage of caspase-1 and caspase-3 in human brain after head injury. *FASEB J.* 1999;13(8):813-21.
142. Clark RS, Kochanek PM, Adelson PD, Bell MJ, Carcillo JA, Chen M et al. Increases in bcl-2 protein in cerebrospinal fluid and evidence for programmed cell death in infants and children after severe traumatic brain injury. *J.Pediatr.* 2000;137(2):197-204.
143. Ertel W, Keel M, Stocker R, Imhof HG, Leist M, Steckholzer U et al. Detectable concentrations of Fas ligand in cerebrospinal fluid after severe head injury. *J.Neuroimmunol.* 1997;80(1-2):93-6.
144. Bermpohl D, You Z, Lo EH, Kim HH, Whalen MJ. TNF alpha and Fas mediate tissue damage and functional outcome after traumatic brain injury in mice. *J.Cereb.Blood Flow Metab* 2007;27(11):1806-18.
145. Rollins TE, Siciliano S, Kobayashi S, Cianciarulo DN, Bonilla-Argudo V, Collier K et al. Purification of the active C5a receptor from human polymorphonuclear leukocytes as a receptor-Gi complex. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1991;88(3):971-5.
146. Stahel PF, Kossmann T, Morganti-Kossmann MC, Hans VH, Barnum SR. Experimental diffuse axonal injury induces enhanced neuronal C5a receptor mRNA expression in rats. *Brain Res.Mol.Brain Res.* 1997;50(1-2):205-12.
147. Stahel PF, Kariya K, Shohami E, Barnum SR, Eugster H, Trentz O et al. Intracerebral complement C5a receptor (CD88) expression is regulated by TNF and lymphotoxin-alpha following closed head injury in mice. *J.Neuroimmunol.* 2000;109(2):164-72.
148. Stahel PF, Frei K, Eugster HP, Fontana A, Hummel KM, Wetsel RA et al. TNF-alpha-mediated expression of the receptor for anaphylatoxin C5a on neurons in experimental *Listeria meningoenzephalitis*. *J.Immunol.* 1997;159(2):861-9.
149. Mukherjee P, Thomas S, Pasinetti GM. Complement anaphylatoxin C5a neuroprotects through regulation of glutamate receptor subunit 2 in vitro and in vivo. *J.Neuroinflammation.* 2008;5:5.
150. Tocco G, Musleh W, Sakhi S, Schreiber SS, Baudry M, Pasinetti GM. Complement and glutamate neurotoxicity. Genotypic influences of C5 in a mouse model of hippocampal neurodegeneration. *Mol.Chem.Neuropathol.* 1997;31(3):289-300.
151. Pasinetti GM, Tocco G, Sakhi S, Musleh WD, DeSimoni MG, Mascarucci P et al. Hereditary deficiencies in complement C5 are associated with intensified neurodegenerative responses that implicate new roles for the C-system in neuronal and astrocytic functions. *Neurobiol.Dis.* 1996;3(3):197-204.

152. Soane L, Cho HJ, Niculescu F, Rus H, Shin ML. C5b-9 terminal complement complex protects oligodendrocytes from death by regulating Bad through phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *J.Immunol.* 2001;167(4):2305-11.
153. Niculescu F, Rus H. Mechanisms of signal transduction activated by sublytic assembly of terminal complement complexes on nucleated cells. *Immunol.Res.* 2001;24(2):191-9.
154. Scherbel U, Raghupathi R, Nakamura M, Saatman KE, Trojanowski JQ, Neugebauer E et al. Differential acute and chronic responses of tumor necrosis factor-deficient mice to experimental brain injury. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 1999;96(15):8721-6.
155. Leinhase I, Holers VM, Thurman JM, Harhausen D, Schmidt OI, Pietzcker M et al. Reduced neuronal cell death after experimental brain injury in mice lacking a functional alternative pathway of complement activation. *BMC.Neurosci.* 2006;7:55.

7 Danksagung

Mein Dank gilt Herrn PD Dr. med. Philip Stahel, der diese Arbeit ermöglicht und umfangreich betreut hat.

Weiterhin danke ich Herrn Dr. med. Thilo John für die Unterstützung bei der Fertigstellung der Arbeit, sowie Frau Dr. rer. Iris Leinhase und Frau Claudia Konrad für die gute Zusammenarbeit und Hilfe im Labor.

Vielen Dank für die Messungen der C5a Serumkonzentrationen und das zur Verfügung Stellen der Ergebnisse an Michael Holers und dessen Arbeitsgruppe (Department of Medicine and Immunology, University of Colorado Health Sciences Center, Denver, USA).

Außerdem danke ich Johannes Hennies für die Unterstützung bei der Statistik.

8 Curriculum vitae

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

9 Erklärung

Ich, Malte Pietzcker, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Die Rolle der alternativen Komplementaktivierung im experimentellen Schädel-Hirn-Trauma Modell der Maus“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Die Arbeit wurde bisher in gleicher oder ähnlicher Form keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und auch nicht veröffentlicht.

Malte Pietzcker