

Aus dem Institut für Pharmakologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Neuroprotektive Wirkmechanismen von Ceftriaxon:
Rolle der Astrozyten-Neuronen-Achse

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Susanne Walter

aus Rüdersdorf

Datum der Promotion: 27.02.2015

Inhaltsverzeichnis

Abstrakt (Deutsch)	I	
Abstract (English)	II	
	Seite	
1.	<u>Einleitung</u>	<u>1</u>
1.1.	Schlaganfall	<u>1</u>
1.2.	Astrozyten	<u>4</u>
1.3.	Glutamat	<u>6</u>
1.3.1.	Glutamat-Konzentrationen	<u>7</u>
1.3.2.	Glutamatrezeptoren	<u>8</u>
1.3.3.	Glutamattransporter	<u>8</u>
1.4.	Exzitotoxizität	<u>10</u>
1.5.	Astrozyten und die Ischämie	<u>10</u>
1.6.	Zytokine und Interleukin-6	<u>13</u>
1.7.	Zelltod	<u>15</u>
1.7.1.	Caspasen	<u>16</u>
1.7.2.	BCL-2-Proteinfamilie	<u>16</u>
1.8.	Neurotrophine	<u>18</u>
1.8.1.	Nerve growth factor	<u>18</u>
1.8.2.	Brain derived neurotrophic factor	<u>18</u>
1.9.	Ceftriaxon	<u>19</u>
1.10.	Fragestellung	<u>23</u>
2.	<u>Materialien und Methoden</u>	<u>24</u>
2.1.	Materialien und Geräte	<u>24</u>
2.1.1.	Chemikalien allgemein	<u>24</u>
2.1.2.	Chemikalien für die Molekularbiologie	<u>25</u>
2.1.3.	Kits	<u>25</u>
2.1.4.	Arbeitsmaterialien	<u>25</u>
2.1.5.	Geräte	<u>26</u>
2.2.	Methoden	<u>27</u>
2.2.1.	Zellkultur von primären Astrozyten	<u>27</u>
2.2.1.1.	Zellkulturmedien	<u>27</u>

2.2.1.2.	Isolierung und Kultivierung von primären Astrozyten aus der Ratte	27
2.2.1.3.	Passagieren von primären Astrozyten	28
2.2.1.4.	Mediumwechsel	28
2.2.1.5.	Kryokonservierung von primären Astrozyten	28
2.2.1.6.	Auftauen von primären Astrozyten	29
2.2.1.7.	Kultivierung in Zellkulturplatten	29
2.2.2.	Neuronale Zellkulturen (NG 108-15)	29
2.2.2.1.	Zellkulturbedien	30
2.2.2.2.	Passagieren der neuronalen Zelllinie NG 108-15	30
2.2.2.3.	Mediumwechsel	30
2.2.2.4.	Auftauen der neuronalen Zelllinie NG 108-15	30
2.2.2.5.	Kultivierung in Zellkulturplatten	31
2.2.3.	Molekularbiologische Methoden	31
2.2.3.1.	RNA-Isolation	31
2.2.3.2.	Bestimmung der RNA-Konzentration und Qualität	31
2.2.3.3.	cDNA-Synthese	32
2.2.3.4.	Quantitative <i>Real-time</i> PCR (qRT-PCR)	32
2.2.4.	Studien-Design	35
2.2.5.	Behandlung von primären Astrozyten	35
2.2.5.1.	Herstellung der Lösungen von Glutamat und Ceftriaxon	35
2.2.5.2.	Evaluierung der optimalen Konzentration von Glutamat zur Induktion von Apoptose in primären Astrozyten (Caspase-Glo 3/7 Assay)	36
2.2.5.3.	Evaluierung der optimalen Konzentration von Ceftriaxon zur Induktion von anti-apoptischen Effekten in primären Astrozyten (Caspase-Glo 3/7 Assay)	36
2.2.5.4.	Evaluierung der optimalen Inkubationsdauer mit Glutamat zur Induktion von Apoptose in primären Astrozyten (Caspase-Glo 3/7 Assay)	37
2.2.5.5.	Behandlung primärer Astrozyten mit Ceftriaxon und Glutamat	37
2.2.6.	Bestimmung des Effekts von Ceftriaxon auf die Glutamat-induzierte Apoptose von neuronalen Zellen	38

2.2.6.1.	Behandlung neuronaler Zellen mit Glutamat und/oder Ceftriaxon	38
2.2.6.2.	Behandlung neuronaler Zellen mit konditioniertem Medium von Astrozyten nach Inkubation mit Glutamat und/oder Ceftriaxon	38
2.2.6.3.	Acridinorange / Ethidiumbromid Färbung zur Bestimmung der Apoptose	40
2.2.6.4.	Caspase-Glo 3/7	40
2.2.7.	Messung der Glutamat-Aufnahme von primären Astrozyten unter Ceftriaxon-Behandlung	41
2.2.8.	Methoden der Statistik	42
3.	Ergebnisse	43
3.1.	Optimierung der Behandlungsprotokolle mit Glutamat bzw. Ceftriaxon	43
3.1.1	Optimierung der Konzentration von Glutamat zur Induktion von Apoptose in primären Astrozyten der Ratte	43
3.1.2.	Optimierung der Inkubationszeit mit Glutamat zur Induktion von Apoptose, Inflammation und einer Hemmung der Neuroprotektion in primären Astrozyten der Ratte	44
3.1.2.1.	Untersuchung der IL-6-mRNA-Expression nach verschiedenen Inkubationszeiten mit Glutamat	45
3.1.2.2.	Untersuchung der Bax-mRNA-Expression nach verschiedenen Inkubationszeiten mit Glutamat	45
3.1.2.3.	Untersuchung der BCL-2-mRNA-Expression nach verschiedenen Inkubationszeiten mit Glutamat	46
3.1.2.4.	Untersuchung der BDNF-mRNA-Expression nach verschiedenen Inkubationszeiten mit Glutamat	47
3.1.2.5.	Untersuchung NGF β -mRNA-Expression nach verschiedenen Inkubationszeiten mit Glutamat	48
3.1.2.6.	Festlegung des Protokolls für die weiteren Versuche	49
3.2.	Wirkungen von Ceftriaxon auf primäre Astrozyten der Ratte im Glutamat-Modell	49
3.2.1.	Einfluss von Ceftriaxon auf die IL-6-mRNA-Expression im Glutamat-Modell	51
3.2.2.	Einfluss von Ceftriaxon auf die Bax-mRNA-Expression im	

	Glutamat-Modell	51
3.2.3.	Einfluss von Ceftriaxon auf die BCL-2-mRNA-Expression im Glutamat-Modell	52
3.2.4.	Einfluss von Ceftriaxon auf die BDNF-mRNA-Expression im Glutamat-Modell	53
3.2.5.	Einfluss von Ceftriaxon auf die NGF β -mRNA-Expression im Glutamat-Modell	54
3.3.	Evaluierung der Apoptose von Neuronen unter Glutamat- und Ceftriaxon-Behandlung	55
3.4.	Evaluierung der Glutamat-Aufnahme von primären Astrozyten der Ratte unter Ceftriaxon-Behandlung	58
4.	Diskussion	60
4.1.	Einfluss von Glutamat auf primäre Astrozyten der Ratte – Das Glutamat-Modell	60
4.1.1.	Glutamat-induzierte Entzündung	62
4.1.2.	Glutamat-induzierte Apoptose	62
4.1.3.	Glutamat-induzierte Bildung von Neurotrophinen	64
4.2.	Die neuroprotektive Wirkung von Ceftriaxon	65
4.2.1.	Reduktion der Entzündung durch Ceftriaxon	66
4.2.2.	Reduktion der Apoptose durch Ceftriaxon	67
4.2.3.	Gesteigerte Expression von Neurotrophinen durch Ceftriaxon	67
4.3.	Ceftriaxon und seine Wirkung auf das Astrozyten-Neuronen-Netzwerk	68
5.	Literaturverzeichnis	72
6.	Abbildungsverzeichnis	86
7.	Tabellenverzeichnis	89
8.	Abkürzungsverzeichnis	90
9.	Eidesstattliche Versicherung	94
10.	Lebenslauf	96
11.	Publikationsliste	98
12.	Danksagung	99

Abstrakt (Deutsch)

Einleitung: Seit Jahrzehnten wird nach einer Verbesserung der Schlaganfalltherapie gesucht. Aus neuen Erkenntnissen über die Astrozyten-Neuronen-Interaktion haben sich hierbei neue Ansatzpunkte ergeben. Astrozyten können Glutamat über spezifische Transporter (GLT-1) aus dem Extrazellulärraum aufnehmen, verstoffwechseln und dadurch vermutlich Neuronen vor einer Exposition mit hohen Konzentrationen des toxischen Glutamats schützen. Sie spielen somit eine Schlüsselrolle im Rahmen der mit einem Schlaganfall assoziierten Exzitotoxizität. Aus der Literatur ist bekannt, dass das β -Laktam-Antibiotikum Ceftriaxon in verschiedenen Modellen neurologischer Erkrankungen durch eine Steigerung der Expression oder Aktivität von GLT-1 neuroprotektiv wirkt. Unsere Arbeitsgruppe konnte im Schlaganfallmodell der Ratte zeigen, dass die Behandlung mit Ceftriaxon zu einer Reduktion der 24-Stunden-Mortalität durch eine Verkleinerung der Infarktgröße und eine Erhöhung der Anzahl überlebender Neuronen innerhalb der Penumbra führt. Die vorgelegte Dissertation hatte zum Ziel, die neuroprotektiven Mechanismen, die durch eine Vorbehandlung mit Ceftriaxon im Rahmen einer Ischämie in den Astrozyten hervorgerufen werden, zu analysieren.

Methoden: Primäre Astrozyten wurden aus den Gehirnen neugeborener Ratten isoliert. Die Zellen wurden für 24, 12 und 6 Stunden mit Ceftriaxon vorbehandelt. Anschließend erfolgte eine Applikation von Glutamat und Ceftriaxon für weitere 12 Stunden. Mit Hilfe der Quantitativen *Real-time* PCR (qRT-PCR) wurde die Genexpression von inflammatorischen Zytokinen, Neurotrophinen und Apoptose-Markern analysiert. Die neuroprotektive Wirkung von Ceftriaxon wurde durch direkte Zugabe an Neuronen der Zelllinie NG-108-15 untersucht. Des Weiteren wurden NG-108-15 Neuronenkulturen für 24 Stunden mit Astrozyten-konditioniertem-Medium (AKM) kultiviert, welches von Glutamat/Vehikel- oder Glutamat/Ceftriaxon-behandelten Astrozyten stammte. Mittels Messung der Caspase-Glo3/7-Aktivität oder durch Färbung mit Acridinorange / Ethidiumbromid wurde die Apoptoserate der neuronalen Zellen analysiert. Die Glutamat-Konzentration in primären Astrozyten der Ratte und im AKM wurde fluorometrisch bestimmt.

Ergebnisse: Durch eine 6- bis 24-stündige Vorbehandlung mit Ceftriaxon konnte im Vergleich zur Vehikelbehandlung eine signifikante Reduzierung der Bax-mRNA- und IL-6-mRNA-Expression in den Glutamat-behandelten Astrozytenkulturen nachgewiesen werden. Glutamat

steigerte signifikant die NGF β -mRNA-Expression in Astrozyten, was durch eine Ceftriaxon Vorbehandlung noch verstärkt wurde. Die Apoptoserate neuronaler Zellen war bei Kultur in AKM von Ceftriaxon/Glutamat-behandelten Astrozyten wesentlich geringer als bei Kultur in AKM von Vehikel/Glutamat-behandelten Astrozyten. Ceftriaxon allein hatte keinen direkten neuroprotektiven Effekt auf Glutamat-behandelte Neuronenkulturen. Durch Ceftriaxon konnte jedoch die Glutamat-Aufnahme in Astrozyten gesteigert und die Glutamat-Konzentration im Kulturmedium reduziert werden.

Schlussfolgerung: Durch Ceftriaxon wird in Glutamat-behandelten Astrozytenkulturen die Apoptose und Entzündung reduziert und die Expression von neurotrophen Faktoren induziert. Ceftriaxon hat keinen direkten Effekt auf Glutamat-behandelte Neuronen aber AKM von Glutamat/Ceftriaxon-behandelten Astrozyten wirkt neuroprotektiv. Die protektive Wirkung der Ceftriaxon-behandelten Astrozyten auf die neuronalen Zellkulturen scheint einerseits durch eine Ceftriaxon-vermittelte Steigerung der Glutamat-Aufnahme in die Astrozyten, andererseits durch deren vermehrte Expression von Neurotrophinen bedingt zu sein.

Abstract (English)

Introduction: For decades, there has been a search for improved therapy for patients after stroke. Novel insights into the function of astrocytes within the neural network have stimulated new approaches. Astrocytes are able to absorb and metabolise extracellular glutamate, a key mediator of excitotoxicity, via a specific transporter, GLT-1. Previous studies found that the β -lactam antibiotic ceftriaxone acted neuroprotective in various disease models by increasing the expression and activity of GLT-1. It was hypothesized that increased GLT-1 expression/activity leads to reduction of glutamate levels and thereby dampens excitotoxicity. Our group could show that in rats undergoing transient middle cerebral artery occlusion ceftriaxone reduced the 24-hour mortality rate by reducing the infarct size and by increasing the number of surviving neurons within the penumbra. This dissertation aimed at analysing the neuroprotective mechanism by which ceftriaxone reinforces the astrocytes' protective effect on neurons in glutamate-induced excitotoxicity.

Methods: Primary astrocytes were isolated from postnatal rats. Cells were pre-treated with ceftriaxone for 6, 12 or 24 hours before application of glutamate followed by another 12 hour incubation with ceftriaxone. Gene expression of pro-inflammatory cytokines, neurotrophins and markers for apoptosis was analysed by Real-time RT-PCR (qRT-PCR). The putative protective effect of ceftriaxone on neurons was tested by administering ceftriaxone directly to cells of the neuronal cell line NG-108-15, which were challenged with glutamate. In another approach, which focused on the astrocyte-neuronal interplay: NG-108-15 neuronal cells were cultured in astrocyte-conditioned medium (ACM), obtained from ceftriaxone/glutamate-treated astrocytes. After 24 hours of incubation, glutamate-induced apoptosis of neuronal cells was estimated by staining with acridine orange / ethidium bromide or the measurement of the enzymatic activity of caspases 3 and 7. Furthermore, glutamate content in astrocytes and the ACM was determined.

Results: Pre-treatment with ceftriaxone over 6 to 24 hours significantly reduced the expression of IL-6 mRNA and pro-apoptotic Bax in primary astrocytes challenged with glutamate when compared to vehicle. Glutamate induced the expression of the neurotrophin NGF β in astrocytes, and this effect was further enhanced by pre-treatment with ceftriaxone. Apoptosis of neuronal cells in culture was significantly less when cells were incubation in ACM derived from glutamate/ceftriaxone-treated astrocytes when compared to ACM of glutamate/vehicle-treated

astrocytes. However, ceftriaxone had no direct protective effect on glutamate-challenged neuronal cells. We could further show that ceftriaxone increased glutamate uptake by astrocytes and thereby lowered glutamate levels in the culture medium.

Conclusion: Ceftriaxone reduces inflammation and apoptosis and induces neurotrophin expression in astrocytes challenged with glutamate. Ceftriaxone has no direct effect on glutamate-challenged neuronal cells, but ACM derived from glutamate/ceftriaxone-treated astrocytes acts neuroprotective. The mechanism by which ceftriaxone-treated astrocytes protect neuronal cells seems to be based on the enhanced glutamate uptake and increased synthesis of neurotrophins by astrocytes.

1. Einleitung

1.1. Schlaganfall

Der Schlaganfall ist eine der häufigsten Erkrankungen in der Bundesrepublik Deutschland und steht an dritter Stelle der Todesursachenstatistik nach Herzinfarkt und Krebsleiden (Statistisches Bundesamt, 2010). Er ist die Hauptursache für lebenslange Invalidität im Erwachsenenalter und volkswirtschaftlich eine der teuersten Krankheitsgruppen in den Industrienationen (Wolf, 1992). In Deutschland erleiden jährlich ca. 196 000 Menschen erstmalig einen Schlaganfall, wobei innerhalb eines Monats 20-30% der Patienten versterben (Feigin et al., 2009; Heuschmann 2010 et al.). Die Überlebenden behalten zum größten Teil lebenslange Behinderungen bei und können zu 10% im ersten Jahr ein Rezidiv erleiden (Mattle et al., 2003).

Ein Schlaganfall wird zu 80 bis 85% ischämisch und zu 15 bis 20% durch intrazerebrale und Subarachnoidalblutungen sowie Sinusvenenthrombosen ausgelöst (Mattle et al., 2003).

Der ischämische Insult ist die Folge einer plötzlichen Perfusionsstörung in einem gefäßversorgenden Teil des Gehirns (Dirnagl et al., 1999). Durch den verminderten oder sistierenden Blutfluss werden Neuronen und Gliazellen unzureichend mit Sauerstoff und energiereichen Nährstoffen versorgt. Da das Gehirn eines der empfindlichsten Gewebe gegenüber einer Minderversorgung mit Blut ist und fast keine Sauerstoff- und Glukosevorräte besitzt, hat dies ein schnelles Erlöschen der Gehirnfunktion in den betroffenen Arealen zur Folge. Bei Hypoxie können energiereiche Substrate nicht mehr ausreichend zur Verfügung gestellt werden und es setzt die anaerobe Glykolyse ein, welche zur Azidose führt. Die Ionenpumpen versagen und durch den Zusammenbruch des Membranpotentials gelangen Kaliumionen in den Extrazellulärraum, während Natrium- und Calciumionen sowie Wasser ins Zellinnere strömen. Gleichzeitig werden unphysiologische Konzentrationen des exzitatorischen Neurotransmitters Glutamat freigesetzt und durch die Produktion von freien Radikalen, Leukotrienen und NO kommt es zu zusätzlichen Zellschädigungen. Letztendlich resultiert aus der Akkumulation von Wasser ein Hirnödem, das den intrazerebralen Druck erhöht und den lokalen Blutfluss weiter einschränkt (Mattle et al., 2003; Mergenthaler et al., 2004).

Die Ursachen für einen ischämischen Schlaganfall sind meist auf arteriosklerotische Mikro- und Makroangiopathien zurückzuführen. Makroangiopathien können thromboembolisch oder

hämodynamisch bedingt sein. Die Embolien können aus dem Herzen, der Aorta, der Karotis und den hirnversorgenden Arterien stammen. Dagegen bezeichnen Mikroangiopathien arteriosklerotische Veränderungen kleiner intrazerebraler Gefäße, wobei das Gefäßlumen eingeengt wird. Seltener Ursachen ischämischer Infarkte können Karotidissektionen, Koagulopathien und Vaskulitiden sein (Grau et al., 2001).

Aus dieser Ätiologie der Ursachen lassen sich daher Risikofaktoren wie Hypertonus, Diabetes Mellitus, Hypercholesterinämie, Adipositas, Rauchen und vermehrter Alkoholgenuss ableiten. In Bezug auf die Entstehung von kardialen Embolien sind unter anderem Vorhofflimmern, Herzklappenfehler, ein offenes *Foramen ovale*, infektiöse Endokarditis oder der Myokardinfarkt als Auslöser bekannt (Arnold et al., 2003; Mattle et al., 2003).

Die Symptome bei einem Schlaganfall richten sich nach der Lokalisation im Gehirn. Diese können neuropsychologische Störungen, Artikulationsschwierigkeiten, Gesichtsfelddefekte und Lähmungen beinhalten. Wie ausgeprägt die Symptome sind, hängt aber vor allem von der Größe des minderversorgten Hirngewebes und der Einleitung einer schnellen Therapie ab (Masuhr und Neumann, 2007).

Das Ziel der Schlaganfall-Behandlung ist es, in den ersten Stunden nach Eintreten des Insults die Sauerstoffversorgung der betroffenen Hirnregion wiederherzustellen und ein fortschreitendes Absterben von Neuronen zu verhindern. Dabei ist die Penumbra von besonderem Interesse. Die Penumbra ist das Randgebiet des Infarktes, in dem es noch nicht zu irreversiblen strukturellen Schäden, wie sie im Infarktkern bereits nach wenigen Minuten vorhanden sind, gekommen ist. So wird z.B. durch Rekanalisation verschlossener Gefäße versucht, das Infarktgebiet klein und die daraus möglicherweise resultierende klinisch neurologische Störung gering zu halten (Mattle et al., 2003). Je größer das Zeitintervall zwischen Symptombeginn und einer spezifischen Therapie ist, desto mehr Zellen sterben ab und können durch Wiederherstellung des Blutflusses nicht mehr gerettet werden. Daher wird umgangssprachlich auch gern der Begriff „time is brain“ benutzt (Saver, 2006).

Das Zeitfenster für eine Thrombolyse-Therapie mit rt-PA, dem rekombinanten Gewebsplasminogen-Aktivator (*recombinant tissue-plasminogen activator*) ist mit 3 Stunden nach Symptombeginn sehr eng. Diese Therapie stellt jedoch zurzeit die günstigste Option für ein besseres neurologisches Resultat dar (Adams et al., 2007). Allerdings können nur ca. 4% der Patienten davon profitieren. Dies ist einerseits durch das kurze Zeitfenster bedingt, andererseits

aber auch durch Ausschlusskriterien wie hämorrhagische Insulte oder schwere neurologische Defizite. Abgesehen von der Akutbehandlung wird bei jedem Patienten eine individuelle, symptomatische Therapie durchgeführt, wobei langfristig die Rehabilitation darauf abzielt, neurologische Defizite zu verbessern (Georgiadis et al., 2003).

Schon seit Jahren arbeitet die medizinische Forschung daran, Therapiemethoden zu entwickeln, mit denen im Falle einer zerebralen Ischämie der Untergang von Zellen insbesondere im Bereich der Penumbra verhindert werden kann. Bei dieser Suche nach *neuroprotektiven*, pharmakologischen Substanzen werden verschiedene Ansätze verfolgt wie z.B. ein Abschwächen der Exzitotoxizität, anti-apoptotische oder anti-inflammatorische Wirkprinzipien. In Tiermodellen zeigten diverse Substanzen wie Radikalfänger, Glutamatantagonisten, Ionenkanalblocker, Antagonisten gegen Serotonin oder neurotrophe Faktoren positive, therapeutische Effekte. Jedoch konnten diese Erfolge bisher nicht in klinischen Studien bestätigt werden. Viele Studien wurden aufgrund von unerwünschten Arzneimittelwirkungen oder Wirkungslosigkeit beendet (Adams et al., 2007).

Aktuelle Studien weisen jedoch auf einen gewissen therapeutischen Erfolg durch einige ausgewählte Antibiotika hin. Da es im Rahmen des Schlaganfalls im Tiermodell und bei Patienten nach der akuten Phase zu einer Immunsuppression kommt, durch die vermehrt Infektionen auftreten die letztendlich die Mortalität erhöhen und den klinischen Zustand verschlechtern (Meisel et al., 2005; Prass et al., 2003), wurde zunächst im Tiermodell der Effekt einer antibiotischen Prävention dieser Infektionen auf die Gesamtmortalität analysiert (Chamarro et al., 2005; Meisel et al., 2004). Dabei wurden nicht nur ein Rückgang der Infektionen, sondern auch neuroprotektive Effekte beobachtet (Meisel et al., 2004; Elewa et al., 2006). In klinischen Studien konnten Minocyclin und Dapson in der Tat die neurologischen Störungen nach einem Schlaganfall verbessern (Lampl et al., 2007; Nader-Kawachi et al., 2007). Weiterhin zeigten mehrere Tiermodell-Studien, dass das β -Laktam-Antibiotikum Ceftriaxon ebenfalls neuroprotektive Effekte aufweist, wobei vor allem der astrozytäre Glutamattransporter GLT-1 eine wichtige Rolle zu spielen scheint (Rothstein et al., 2005; Chu et al., 2007; Thöne-Reineke et al., 2008; Verma et al., 2010; Beller et al., 2011).

In-vitro Zellkulturuntersuchungen sind ein möglicher, methodischer Ansatz, um potentielle, neuroprotektive Mechanismen zu untersuchen. In primären Zelllinien, die direkt aus dem Gehirn präpariert werden, oder in immortalisierten Zelllinien können beispielsweise Bedingungen

simuliert werden, wie sie nach einem Schlaganfall auftreten. Diese *in-vitro* Modelle können dann dazu dienen, die pharmakologische Wirkung bestimmter Stoffe auf die simulierten Pathomechanismen zu untersuchen.

So wurden z.B. neuronale Zelllinien untersucht, da Zellen neuronalen Ursprungs eine hohe Empfindlichkeit gegenüber einer Ischämie aufweisen. Besonders verwundbar scheinen sie zu sein, wenn keine Astrozyten in unmittelbarer Nähe bzw. in Ko-Kultur vorhanden sind, da Astrozyten normalerweise über den Glutamattransporter GLT-1 das neurotoxische Glutamat aufnehmen und so die Glutamat-Konzentration in der unmittelbaren Umgebung der Neuronen senken (Rosenberg und Aizenman, 1989).

1.2. Astrozyten

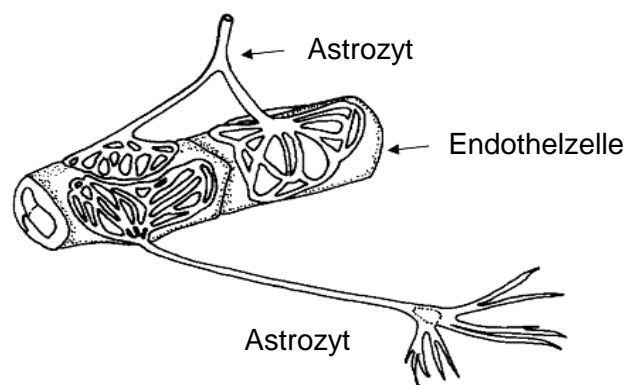
Astrozyten sind der häufigste Zelltyp unter den Gliazellen des zentralen Nervensystems (ZNS) (Newman, 2003). Zusammen mit den Oligodendrozyten werden sie als Makroglia bezeichnet. Gliazellen beanspruchen mehr als die Hälfte des Hirnvolumens und das Neuronen-Glia-Verhältnis kann bis zu 1:10 betragen. Sie können keine Aktionspotentiale entwickeln, sind jedoch erregbar und bleiben zeitlebens teilungsfähig (Drenkhahn, 2008). Astrozyten besitzen einen relativ kleinen Zellkörper und zahlreiche, in alle Richtungen entspringende Fortsätze, woher auch ihr Name als sternförmige Zellen stammt. Nach ihrem Filamentreichtum kann man fibrilläre Astrozyten mit schlanken und wenig verzweigten Fortsätzen von protoplasmatischen Astrozyten mit dickeren und reich verzweigten Fortsätzen unterscheiden (Trepel, 2004). Fibrilläre Astrozyten befinden sich in der weißen Substanz und protoplasmatische Astrozyten sind in der grauen Substanz lokalisiert (Chen und Swanson, 2003). Astrozyten sind über *gap junctions* miteinander gekoppelt, und diese erlauben unter anderem den Austausch von Ca^{2+} -Ionen. Connexine sind die molekularen Bausteine der *gap junctions*. Dies sind Transmembranproteine, die sich zu sechst unter Bildung eines halben Kanals (Connexon) verbinden. Ein vollständiger Kanal entsteht durch zwei benachbarte Connexone der gegenüberliegenden Zellen durch Aneinanderlagerung (Giaume und McCarthy, 1996).

Eine weitere wichtige Funktion besteht in der Ausbildung von Stützelementen im ZNS, welche bereits von Virchow als „Nervenkitt“ beschrieben wurden (Trendelenburg und Dirnagl, 2005). Die Fortsätze der Astrozyten befinden sich zwischen den zellulären Bestandteilen des ZNS und dichten so den extrazellulären Raum ab. Die Astrozytenfortsätze umschließen Synapsen und stehen in Kontakt mit Blutgefäßen (Abbildung 1.1.) (Benarroch, 2005). Durch ihre Verbindung

mit Blutgefäßen sind sie am Austausch von Nährstoffen und Stoffwechselprodukten zwischen Neuronen und Blut beteiligt. An der Oberfläche von Kapillaren bilden sie Grenzmembranen (*Membrana limitans gliae vascularis*), welche auch an der ZNS-Oberfläche an die Basallamina grenzend (*Membrana limitans gliae superficialis*) zu finden sind (Schiebler und Schmidt, 2002). Mit ihren Fortsätzen tragen sie auch zur Bildung der Blut-Hirn-Schranke bei (Janzer und Raff, 1987). Eine Frühform der Astroglia bildet die Radialglia. Sie dient Neuronen als Leitschiene bei der Differenzierung aus embryonalen Stammzellen. Postnatal kommen sie als Bergmann-Glia (Kleinhirn) und Müller-Zellen (Retina) vor.

Astrozyten tragen zum Elektrolytgleichgewicht und zur Volumen-Regulation im ZNS bei. So werden Kaliumionen, die bei der Erregung von Neuronen freigesetzt werden, über das Netzwerk der Astrozytenfortsätze aus dem Extrazellulär-Raum entfernt (Walz und Hertz, 1983). Weiterhin sind sie auch an der Informationsübermittlung im ZNS beteiligt. Sie besitzen unterschiedliche Rezeptoren für eine Vielzahl an Neurotransmittern und Modulatoren wie Noradrenalin, GABA, Histamin, ATP, Acetylcholin und Glutamat (Verkhratsky et al., 1998). So kann die Aufnahme von synaptisch freigesetzten Transmittern über Transmitter-Transporter induziert werden, wodurch die Astrozyten zur Beendigung des Transmittersignals beitragen und auch Neuronen vor einer toxischen Überaktivierung mit Glutamat schützen. Auf der anderen Seite können Astrozyten Neurotransmitter auch wieder freisetzen. Die in ihren Vesikeln abgespeicherten Substanzen werden wie bei Synapsen durch Calcium-abhängige Exozytose ausgeschüttet (Montana et al., 2006). Wird das ZNS-Gewebe zerstört, z.B. durch einen Gefäßverschluss bei einem Schlaganfall, reagieren Astrozyten mit Hyperplasie und Hypertrophie, ein Prozess der auch als Astrogliose bezeichnet wird. Anschließend bilden Astrozyten Glianarben in den Gebieten von geschädigtem Nervengewebe (Ridet et al., 1997; da Cunha et al., 1993).

Abbildung 1.1. Schematische Zeichnung von Astrozyten und Ihren Fortsätzen an Endothelzellen



(aus Abbott, 2002).

1.3. Glutamat

Die Informations- bzw. Signalübermittlung zwischen Neuronen im ZNS kann über elektrische oder chemische Synapsen erfolgen. Bei den häufigen chemischen Synapsen vermittelt ein Überträgerstoff (Neurotransmitter) die Signalweiterleitung. Der Aminosäuretransmitter Glutamat ist der wichtigste exzitatorische Neurotransmitter im ZNS (Erecinska und Silver, 1990). Durch Exozytose wird es bei Depolarisation von präsynaptischen Nerven aus den Vesikeln in den synaptischen Spalt freigesetzt und bindet an Rezeptoren in der postsynaptischen Membran, wodurch die Erregung fortgeleitet wird. Glutamat ist an den Mechanismen der normalen neuronalen Funktion, speziell dem Prozess des Lernens bzw. der Bildung des Langzeitgedächtnisses durch Langzeit-Potenzierung beteiligt (Danbolt, 2001). Glutamat spielt auch eine wichtige Rolle bei der Entwicklung des ZNS und der Migration von Neuronen (Komuro und Rakic, 1993), sowie beim Auswachsen neuronaler Fortsätze (Pearce et al., 1987). Glutamat wirkt jedoch in höheren extrazellulären Konzentrationen neurotoxisch (Choi, 1988).

Im ZNS wird durch verschiedene protektive Mechanismen versucht, die extrazelluläre Glutamat-Konzentration gering zu halten. Da es anscheinend kein extrazelluläres Enzym zur Verstoffwechslung von Glutamat gibt, ist wohl die Glutamat-Aufnahme durch Astrozyten der wichtigste protektive Mechanismus. Die Glutamat-Aufnahme erfolgt durch Glutamattransporter, die sowohl von Neuronen als auch von Astrozyten exprimiert werden. In den terminalen Endigungen der Neuronen wird Glutamat über präsynaptische Transporter wieder aufgenommen und in synaptischen Vesikeln gespeichert. Der größte Anteil wird jedoch über die Astrozyten aufgenommen (Lehre und Danbolt, 1998). In den Astrozyten kann Glutamat im sogenannten Glutamat-Glutamin-Zyklus verstoffwechselt werden. Dabei katalysiert die ATP-abhängige Glutamin-Synthetase die Synthese von Glutamin aus Glutamat und Ammoniak. Die Glutamin-Synthetase befindet sich in Astrozyten und Oligodendrozyten, jedoch nicht in Neuronen. Glutamin ist nicht als Neurotransmitter wirksam und seine extrazelluläre Konzentration liegt bei 0,25mM (Hertz et al., 1999). Glutamin kann nach extrazellulärer Ausschüttung von den Neuronen aufgenommen werden und durch die Phosphat-aktivierte Glutaminase wieder zu Glutamat umgewandelt werden (Danbolt, 2001). Der Glutamat-Glutamin-Zyklus stellt gleichzeitig einen wichtigen Weg zur Entgiftung von Ammoniak im Gehirn dar.

Eine andere Möglichkeit der Metabolisierung von Glutamat kann der Umbau zu α -Ketoglutarat sein. Dies kann in Form einer oxidativen Desaminierung durch die Glutamat-Dehydrogenase oder durch Transaminierung, katalysiert durch die Aspartat-Aminotransferase stattfinden (Hertz

und Dienel, 2002). Ebenso konnte gezeigt werden, dass in kultivierten Astrozyten und Rattengehirnen α -Ketoglutarat zu Kohlenstoff und Wasser abgebaut werden kann (Sonnwald et al., 1993, 1997). Außerdem wurde beobachtet, dass große Mengen von Glutamat oxidativ abgebaut werden, wenn die extrazellulär erhöhte Glutamat-Konzentration Ischämie-bedingt ist (Pascual et al., 1998).

Da Glutamat die Blut-Hirn-Schranke nur sehr schlecht durchdringen kann (Hawkins et al., 1995), kann der Glutamat-Abbau durch eine sogenannte *de novo Synthese* aus Glukose kompensiert werden. Glukose ist die einzige Glutamat-Vorstufe, die in der Lage ist, die Blut-Hirn-Schranke in großen Mengen zu passieren (Hertz und Zielke, 2004). Eine *de novo Synthese* von Glutamat findet in Neuronen nicht statt, da ihnen das Enzym Pyruvat-Carboxylase fehlt (Hertz und Dienel, 2002; Yu et al., 1983). In Astrozyten und Neuronen entstehen aus einem Molekül Glukose zwei Moleküle Pyruvat. Unter anaeroben Bedingungen wird aus Pyruvat Laktat gebildet, das an Neuronen abgegeben wird und von diesen zur aeroben Energiegewinnung genutzt werden kann. Pyruvat wird aber hauptsächlich im Citrat-Zyklus verstoffwechselt. Dabei wird Pyruvat vor der Einschleusung in den Citrat-Zyklus in aktivierte Essigsäure (Acetyl-CoA) umgewandelt. Dies erfolgt in den Mitochondrien durch die Pyruvat-Dehydrogenase. In den Astrozyten wird Pyruvat zusätzlich durch die Pyruvat-Carboxylase zu Oxalacetat carboxiliert. Oxalacetat kondensiert mit Acetyl-CoA zu Citrat, woraus α -Ketoglutarat, eine Vorstufe von Glutamat und auch GABA gebildet wird (Hertz und Zielke, 2004).

1.3.1. Glutamat-Konzentrationen

Die extra- und intrazellulären Glutamat-Konzentrationen sind sehr unterschiedlich. Im Zytosol der synaptischen Terminalen erreicht die Glutamat-Konzentration 10-15mM (Atwell et al., 1993), wobei durch vesikuläre Glutamat-Transporter (VGluTs) in synaptischen Vesikeln bis zu 60 mM gespeichert werden können (Burger et al., 1989). Wenn Glutamat durch Exozytose in den synaptischen Spalt gelangt, herrscht dort eine Konzentration von ca. 1,1mM (Clements et al., 1992). Durch die Glutamat-Transporter nehmen Astrozyten extrazelluläres Glutamat auf und bewahren so konstante Glutamat-Konzentrationen von rund 2 μ M im synaptischen Spalt (Anderson und Swanson, 2000). Die Glutamat-Konzentration im Zytoplasma von Astrozyten ist mit 0,1-5 mM wesentlich niedriger als in den Terminalen (Atwell et al., 1993). Dies ist wahrscheinlich bedingt durch den oxidativen Abbau oder die Glutamin-Synthetase.

1.3.2. Glutamatrezeptoren

Die exzitatorische Wirkung von Glutamat an der Postsynapse wird hauptsächlich durch ionotrope und metabotrope Rezeptoren vermittelt. Ionotrope Rezeptoren gehören zu den ligandenregulierten Ionenkanälen, die durch Erhöhung von Calcium- und Natriumionen erregend wirken und durch die Bindung ihres Liganden, wie z.B. Glutamat, aktiviert werden. Sie werden aufgrund ihrer Wechselwirkung mit selektiven Agonisten, die nicht physiologisch vorkommen und die Ionenporen öffnen, in NMDA (N-Methyl-D-Aspartat), AMPA (α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isloxazolpropionat) und Kainat-Rezeptoren unterteilt. AMPA- und Kainat-Rezeptoren besitzen schnelle, postsynaptische Stromkomponenten und sind für Natrium, Kalium und in geringem Maße Calcium permeabel (Hollmann et al., 1991). NMDA-Rezeptoren öffnen und schließen langsamer als AMPA-Rezeptoren, besitzen aber eine vielfach höhere Permeabilität für Calcium. Sie sind nur bei gleichzeitiger Bindung von Glutamat und einer bestehenden Depolarisation der postsynaptischen Membran leitfähig (Danbolt, 2001). Der Einstrom von Calciumionen in Neuronen durch die NMDA-Rezeptoren spielt wahrscheinlich eine wichtige Rolle bei der Vermittlung von Exzitotoxizität. Studien konnten zeigen, dass eine intrazelluläre Calcium-Erhöhung über die NMDA-Rezeptoren eher zum Zellschaden führt als über spannungsabhängige Calcium-Kanäle (Tymianski et al., 1993).

Die Metabotropen Glutamatrezeptoren sind G-Protein gekoppelt, und es werden zur Zeit acht Subtypen beschrieben (mGluR 1-8). Sie werden in folgende Untergruppen eingeteilt: Gruppe I-Rezeptoren (mGluR1 und mGluR5); Gruppe II-Rezeptoren (mGluR2 und mGluR3) und Gruppe III-Rezeptoren (mGluR4 und mGluR6, 7, 8) (Swanson et al., 2005). Astrozyten bilden bevorzugt mGluR3 und mGluR5 aus (Matute et al., 2006). Die Gruppe I-Rezeptoren sind an Phospholipase C und die intrazelluläre IP3-Calciumkaskade gekoppelt, während die Gruppen II und III negativ an die Adenylatzyklase gekoppelt sind (Danbolt, 2001).

1.3.3. Glutamattransporter

Die Glutamattransporter gehören zur *solute carrier family 1* (SLC1) zu der auch die neutralen Aminosäuretransporter ASC (Alanin, Serin, Cystein) zählen. Bisher konnten fünf hochaffine Glutamattransporter identifiziert werden. Sie sind zu 50-60% in ihrer Aminosäuresequenz identisch (Danbolt, 2001). Die an Astrozyten befindlichen Glutamattransporter wurden ursprünglich von Rattengehirnen geklont und als GLAST (*glutamate-aspartate-transporter*)

(Storck, 1992) und GLT-1 (*glutamate-transporter 1*) (Pines, 1992) bezeichnet. Beim Menschen werden diese analog als EAAT1 und EAAT2 (*excitatory amino acid transporter*) bezeichnet. GLT-1 (EAAT2) und GLAST (EAAT1) besitzen zusammen die größte Aufnahmekapazität für Glutamat und sind an der Plasmamembran der Zelle lokalisiert (Danbolt, 2001). EAAT1 befindet sich hauptsächlich im Kleinhirn und EAAT2 im Großhirn und Vorderhirn (Furuta et al., 1997). An der neuronalen Membran ist der Glutamattransporter EAAT3 gelegen (Kanai et al., 1995), wobei sich EAAT4 größtenteils an den Purkinje-Zellen des Kleinhirns befindet (Fairman et al., 1995). EAAT5 konnte in der Retina lokalisiert werden (Arizza et al., 1997).

Entlang der Zellmembran herrscht ein starker extrazellulär gerichteter Konzentrationsgradient für Glutamat aufgrund seiner höheren intrazellulären Konzentration. Um diesen Gradienten zu überwinden und somit ein Glutamat-Ion aufzunehmen, müssen drei Natriumionen und ein Proton in die Zelle transportiert werden, wobei gleichzeitig ein Austausch von diesen mit einem Kaliumion stattfindet (Abbildung 1.2.). Da dieser Transport sehr viel Energie verbraucht, überrascht es nicht, dass es im Falle einer kompletten Ischämie mit Energieverlust zu einer Störung der Glutamat-Aufnahme und zu einem massiven Anstieg der extrazellulären Konzentration kommt (Choi, 1988; Swanson et al., 1994). Dass die Glutamat-Aufnahme einen limitierenden Faktor in Bezug zur Glutamat vermittelten Neurotoxizität darstellt, zeigt sich auch in einer 100-fach erhöhten neuronalen Vulnerabilität in Astrozyten-armen Kulturen im Vergleich zu neuronalen Kulturen mit reichlich Astrozyten (Rosenberg und Aizenman, 1989).

Die wichtige Funktion der astrozytären Glutamattransporter *in-vivo* wird auch durch Studien unterstützt, die die Ausschaltung von Genen für die Transporter-Subtypen untersuchten. Die Inaktivierung von GLAST und GLT-1 bei Ratten durch die Gabe von antisense-Nukleotiden hatte einen Anstieg der extrazellulären Glutamat-Konzentration und als Konsequenz daraus den exzitotoxischen Untergang von Neuronen sowie neurologische Störungen zur Folge (Rothstein et al., 1996). Mäuse mit einem fehlenden GLT-1 neigten außerdem zu tödlichen epileptischen Anfällen (Tanaka et al., 1997). Weiterhin werden eine astrozytäre Glutamattransporter-assoziierte Störung bei der amyotrophen Lateralsklerose (ALS) (Rothstein et al., 1995; Trotti et al., 1998), der Epilepsie (Rothstein et al., 1996; Tanaka et al., 1997) und bei neuronaler Ischämie diskutiert (Rossi et al., 2000).

Unter Berücksichtigung dieser Glutamattransporter-Funktion lag es nahe, zu untersuchen inwieweit GLT-1-modulierende Substanzen neuroprotektiv wirken können. Rothstein *et al.*

konnten 2005 das β -Laktam-Antibiotikum Ceftriaxon als selektiven Induktor des GLT-1 identifizieren und so über die erhöhte Glutamat-Aufnahme in Astrozyten die Exzitotoxizität in verschiedenen *in-vitro* und *in-vivo* Modellen verringern (Rothstein et al., 2005). Der neuroprotektive Effekt von Ceftriaxon über eine Erhöhung der Transporteraktivität von GLT-1 konnte wenig später von unserer Arbeitsgruppe bestätigt werden (Thöne-Reineke et al., 2008).

1.4. Exzitotoxizität

Als Exzitotoxizität wird eine Glutamat-induzierte Neurotoxizität bezeichnet, die in einer Überaktivierung von Glutamatrezeptoren durch pathologisch erhöhte, extrazelluläre Glutamat-Konzentrationen begründet ist (Sattler und Tymianski, 2001). Ein Ischämie-bedingter Energiemangel führt zum Verlust des Membranpotentials und es kommt zur Depolarisation von Neuronen. Dies führt zu einer pathologischen Ausschüttung des exzitatorischen Aminosäuretransmitters Glutamat in den synaptischen Spalt. Durch die massive Stimulierung von Glutamatrezeptoren, besonders der NMDA-Rezeptoren, kommt es zu einem gesteigerten Einstrom von Natrium-, Chlorid- und Calciumionen in die neuronale Zelle und einem extrazellulären Anstieg von Kalium (Dirnagl et al., 1999). Die erhöhte intrazelluläre Natriumionen-Konzentration bedingt einen osmotischen Einstrom von Wasser und führt zum Anschwellen von Neuronen (Sonnewald et al., 2002). Die intrazelluläre Calcium-Überladung aktiviert Phospholipasen, Proteinkinase C, Proteasen und Endonukleasen. Dadurch kommt es zum Protein- und DNA-Abbau sowie zur Akkumulation von freien Fettsäuren, Stickstoffmonoxid und freien Radikalen. Dies führt schließlich zu einer Membranschädigung, einer Fehlfunktion der Mitochondrien und letztlich zur Apoptose oder Nekrose der betreffenden Zellen (Fisher und Schaebitz, 2000; Arundine und Tymianski, 2004).

1.5. Astrozyten und die Ischämie

Bei ischämischen Prozessen im ZNS nehmen Astrozyten eine zentrale Stellung ein. Im Rahmen eines Schlaganfalles kann es zu einer Reduzierung des zentralen Blutflusses kommen. Diese Ischämie führt zu einer Störung des Sauerstoff- und Nährstoffangebots im betreffenden Gebiet. Dadurch werden auch der Energiestoffwechsel und die Synthese von ATP beeinträchtigt, so dass es zu einer Schädigung von Astrozyten und Neuronen kommt. Astrozyten sind jedoch länger in der Lage unter hypoxischen Bedingungen zu überleben als Neuronen, was auf eine ATP-Produktion durch Glykolyse zurückzuführen ist (Swanson, 1992). Im Rahmen der anaeroben

Glykolyse wird Pyruvat zu Laktat reduziert, das den Neuronen zur Verfügung gestellt werden kann (Hertz und Dienel, 2002; Brown et al., 2005).

Wie bereits oben beschrieben wird der transmembranäre Ionengradient durch die Na^+/K^+ -ATPase konstant gehalten, so dass ein ATP-Mangel zu einem Verlust des Membranpotentials führt. Daraus folgen eine Depolarisation der Zelle und ein anschließender Anstieg der extrazellulären Glutamat-Konzentration (Durukan, 2007). Der ATP-Mangel kann auch eine entgegengesetzte Funktion der Glutamattransporter bewirken (Anderson und Swanson, 2000). Normalerweise wird Glutamat durch den GLT-1 entlang des Konzentrationsgradienten in die Astrozyten transportiert. Bei einer Ischämie oder veränderten Ionengradienten kann Glutamat nach extrazellulär gelangen. So wurde der entgegengesetzte Transport als erstes an Müllerzellen aus der Retina von Salamandern nach Anstieg der extrazellulären Kalium-Konzentration beschrieben (Szatowski et al., 1990). Jedoch reicht unter physiologischen Bedingungen eine erhöhte, extrazelluläre Kalium-Konzentrationen als alleiniger Trigger eines entgegengesetzten Transports nicht aus (Longuemare und Swanson, 1997). Dennoch ist während eines ATP-Mangels der Glutamat-Ausstrom, bedingt durch entgegengesetzte Transporter, aus den Neuronen wesentlich größer als aus den Astrozyten (Rossi et al., 2000).

Der Verlust des Membrangradienten führt auch zu einem Einstrom von Natrium in Astrozyten, wodurch diese anschwellen. Durch Öffnung sogenannter *volume-sensitive organic anion channels* (VSOAC) (Abbildung 1.2.) wird versucht, dieses Volumen zu reduzieren (Chen und Swanson, 2003). Dabei gelangt gleichzeitig Glutamat aus den Zellen ins Interstitium, was zu einem Anstieg der extrazellulären Glutamat-Konzentration führt (Kimmelberg, 2005).

Eine Ischämie kann auch eine Freisetzung von ATP aus intrazellulären Speichern bewirken (Melani et al., 2005). Die Bindung von ATP an Purin-Rezeptoren, z.B. den P2X_7 bedingt eine Calcium-unabhängige Glutamat-Ausschüttung (Abbildung 1.2.) (Duan et al., 2003). Es gibt auch Hinweise, dass die Purin-Rezeptoren in Verbindung mit einer Astroglieose verstärkt exprimiert werden (Franke et al., 2001).

Bei einer Ischämie kann es ebenfalls zu einer vermehrten Freisetzung von Glutamat aus vesikulären Speichern in den Extrazellulärraum kommen, was auf eine erhöhte intrazelluläre Calcium-Konzentration zurückzuführen ist (Montana et al., 2006).

Weiterhin stellen auch die oben beschriebenen *gap-junctions* eine Möglichkeit der Glutamat-Freisetzung in Folge einer Ischämie dar (Ye et al., 2003).

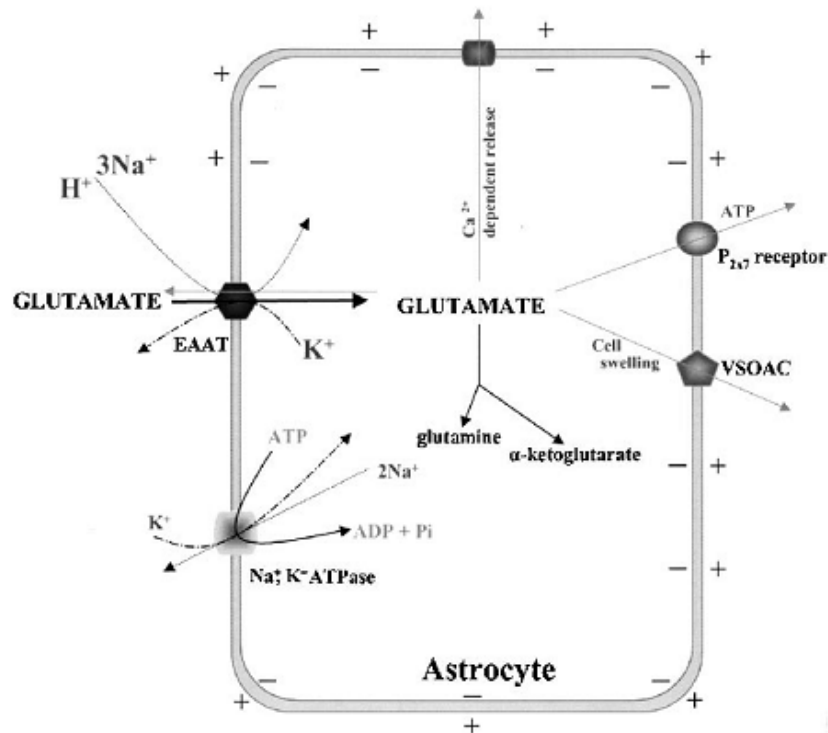


Abbildung 1.2. Schematische Darstellung der Glutamat-Aufnahme und Freisetzung
(aus Chen und Swanson, 2003).

Wie oben bereits erwähnt geht man in der Literatur derzeit davon aus, dass die Glutamat-Freisetzung aus Neuronen während einer Ischämie immer noch die quantitativ größte Menge im Vergleich zur Ausschüttung aus Astrozyten darstellt. Diese Auffassung wurde durch quantitative, immunzytochemische Untersuchungen belegt (Ottersen et al., 1996). Dabei spielen einerseits die im Vergleich zu Astrozyten höheren intrazellulären Glutamat-Konzentrationen in Neuronen eine Rolle (Atwell et al., 1993), andererseits sind die Astrozyten bemüht, über ihre Transporter extrazelluläres Glutamat wieder aufzunehmen. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Neuronen grundsätzlich anfälliger gegenüber einer Ischämie sind und auch durch ihre hohen intrazellulären Glutamat-Konzentrationen entscheidend zum neurotoxischen Anstieg von Glutamat beitragen. Im Gegensatz zu den Neuronen besitzen Astrozyten verschiedenste Mechanismen, Ionengradienten aufrecht zu erhalten oder unter anaeroben Bedingungen Energie bereit zu stellen, so dass sie im Rahmen einer Ischämie weniger vulnerabel zu sein scheinen. Daher ist es ihnen offenbar auch möglich eine wichtige neuroprotektive Aufgabe, die Aufnahme von Glutamat, durch ihre hohe Anzahl von Glutamat-Transportern auszuführen. Die Bedeutung dieser Funktion konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden. Einerseits führt eine Blockade des GLT-1 zu einer vermehrten Ödembildung und neuronalen Schäden nach einer Ischämie (Namura et al., 2002). Andererseits zeigten Studien mit dem

β -Laktam-Antibiotikum Ceftriaxon bedeutende neuroprotektive Effekte, die mit einer Expressionssteigerung (Rothstein et al., 2005; Lee et al., 2008; Lipski et al., 2007) oder einer Aktivierung des GLT-1 (Thöne-Reineke et al., 2008) einhergehen. Wie die Astrozyten auf das vermehrte Glutamat unter Ceftriaxon-Behandlung auf molekularer Ebene reagieren, ist jedoch noch unklar. Bei dieser Reaktion scheint die Regulation der Apoptose und Entzündung eine wichtige Rolle zu spielen (Chu et al., 2007).

1.6. Zytokine und Interleukin-6

Eine Verletzung des ZNS löst eine Entzündungsreaktion mit reaktiver Astrogliose aus, wodurch Mikroglia und Makrophagen aus peripheren Monozyten in das Gewebe einwandern (Streit et al., 1999) und Leukozyten akkumulieren (Hickey, 2001; Raivich et al., 1999). Eine Gewebeschädigung innerhalb des ZNS führt weiterhin zur Ausschüttung von Zytokinen aus Leukozyten und residenten Zellen (Dong und Benveniste, 2001).

Zytokine spielen eine wichtige Rolle beim Zellwachstum und der Differenzierung von Zellen (Rothwell, 1999). Ebenso leisten Sie einen entscheidenden Beitrag im Rahmen von Immun- und Entzündungsreaktionen unter physiologischen sowie pathologischen Bedingungen. Im intakten ZNS sind sie nur gering ausgebildet und werden erst unter ischämischen und infektiösen Bedingungen stimuliert (Rothwell und Hopkins, 1995). Es konnte gezeigt werden, dass eine Reihe von Interleukinen (Interleukin 1,2,3,4,6,8 und 10) sowie Chemokine, Tumor Nekrose Faktor alpha (TNF α) und Interferone unter experimentellen sowie klinischen Schädigungen des ZNS induziert werden. Dazu gehören z.B. Infektionen, Schlaganfall, Hirntrauma, Multiple Sklerose, Morbus Alzheimer und Morbus Parkinson. Des Weiteren sind sie als Mediatoren der Kachexie geläufig. Eines der ersten identifizierten Zytokine wurde *cachectin* genannt, welches nun als TNF α bezeichnet wird (Beutler und Cerami, 1989).

Das Zytokin Interleukin-6 vermittelt wichtige Effekte bei der Entzündungsreaktion (Benveniste, 1998). Früher wurde es auch als Interferon- β 2 oder B-Zell-stimulierender Faktor bezeichnet. So lässt auch schon der ursprüngliche Name auf eine seiner wichtigsten Funktionen schließen, die Differenzierung von B-Zellen zu Plasmazellen. Weiterhin spielt IL-6 eine Rolle bei der Differenzierung und Proliferation von T-Lymphozyten und ist als Aktivator der Akute-Phase-Proteine bekannt (Dong und Benveniste, 2001). Es kann daher auch als diagnostischer Entzündungsparameter im Rahmen einer Sepsis verwendet werden. Die Konzentration von IL-6 im Plasma kann bei schweren systemischen Infektionen bis auf das 1000fache ansteigen.

Aufgrund der phasenabhängigen Aktivierung der Zytokine unterliegt IL-6 bei Sepsispatienten individuellen Schwankungen und dient eher der Verlaufsbeobachtung. Aufgrund seiner schnellen Induktionszeit (Minuten) kann es jedoch als Sepsismarker bei einer neonatologischen Sepsis von diagnostischem Vorteil sein (Brunkhorts, 2008). IL-6 ist ebenfalls an der Regulierung der Körpertemperatur (Chai et al., 1996), des Körpergewichts (Wallenius et al., 2002), des emotionalen Verhaltens (Armario et al., 1998) und der Hämatopoese (Swartz et al., 2001) beteiligt. Es konnte auch gezeigt werden, dass IL-6 über die Freisetzung von Corticotropin-Releasing-Hormon (CRH) Fieber induziert und im weiteren Sinne über die Beeinflussung der Hypothalamus-Hypophysen-Achse auf das Schlaf- und Essverhalten Einfluss nimmt (Rothwell und Hopkins, 1995).

IL-6 kann in verschiedenen Zelltypen wie Monozyten, Makrophagen, Osteoblasten, Keratinozyten, Fibroblasten, Chondrozyten und Muskelzellen gebildet werden (Suzuki et al., 2009). Im Gehirn wird IL-6 in Astrozyten, Makrophagen, Mikroglia, Neuronen und Endothelzellen produziert (Swartz et al., 2001), wobei Astrozyten eine Hauptquelle für IL-1, IL-6 und TNF α darstellen (Rothwell et al., 1996). Bakterielle Lipopolysaccharide und Zytokine wie IL-1 oder TNF- α führen zur Bildung und Freisetzung von IL-6 aus Astrozyten (Sawada et al., 1992; Norris et al., 1994).

Bei einem ischämischen Insult wird IL-6 vermehrt freigesetzt und vermittelt zellschädigende Entzündungsprozesse (Mergenthaler et al., 2004). So zeigte sich in Mäusen mit ausgeschaltetem IL-6 Gen eine signifikante Reduzierung der Entzündungsreaktion unter pathologischen Bedingungen im ZNS (Penkowa et al., 2000). Auf der anderen Seite führte eine transgene Überexpression von IL-6 zu Neurodegeneration und Zellschaden (Campbell, 1998). Neben der bekannten, pro-entzündlichen Wirkung gibt es jedoch auch Hinweise, dass IL-6 neuroprotektiv wirken kann (Benveniste, 1998; Rothwell und Hopkins, 1995). So gehört es auch zur Gruppe der Neurokine, die das Überleben und die Differenzierung von Nervenzellen und Gliazellen fördern. Es teilt sich mit anderen Neurokinen, wie dem *Leukämie-Inhibitor-Faktor* (LIF) und dem *Ciliary neurotrophic factor* (CNTF) die Rezeptoruntereinheit Glykoprotein gp130 (Suzuki et al., 2009). Im experimentellen traumatischen ZNS-Modell führten erhöhte IL-6 Konzentrationen zu einer schnelleren Wundheilung und Senkung des Zelltodes (Swartz et al., 2001). Ferner soll es Neuronen vor NMDA-Rezeptor-vermittelter Toxizität schützen (Ali et al., 2000).

So scheint IL-6 sowohl eine negative als auch positive Rolle bei einer zerebralen Ischämie zu spielen. Auf der einen Seite fungiert es in der akuten ischämischen Phase vermutlich als ein

entzündliches Zytokin und kann zum Zellschaden beitragen. Auf der anderen Seite wirkt es in der subakuten ischämischen Phase eher neuroprotektiv durch LIF und CNTF (Suzuki et al., 2009).

1.7. Zelltod

Grundsätzlich kann man zwei Arten des Zelltodes unterscheiden. Zellen können durch Nekrose oder Apoptose zugrunde gehen. Eine Nekrose, d.h. ein unkoordinierter Zelltod, wird durch die Einwirkung exogener Noxen wie Strahlung, Hyperthermie, Hypoxie, Ischämie, mechanische Kräfte oder Bakteriengifte ausgelöst. Dies geht mit einer Ruptur der Plasmamembran, Zellschwellung und Karyolyse einher. Dabei sind meist mehrere Zellen betroffen und es kommt zu einer Entzündungsreaktion (Lipton, 1999; Love, 2003).

1972 beschrieb John Kerr erstmals den Begriff Apoptose (griech. *apo*= ab, *ptosis* = Fallen) (Kerr et al., 1972). Anstelle des Begriffs „Apoptose“ wird häufig auch der Terminus „programmierter Zelltod“ verwendet (Lipton, 1999; Love, 2003). Dieser genetisch gesteuerte, ATP-abhängige Prozess wird unter anderem durch entartete Zellen, nach Akkumulation von Zellschäden, Fehlen von Wachstumsfaktoren und Überlebenssignalen aktiviert. Bei diesem Vorgang werden meist nur einzelne Zellen ohne Entwicklung einer Entzündungsreaktion entfernt; gesunde Nachbarzellen werden nicht geschädigt. Die Bildung einer Entzündungsreaktion wird durch so genannte „apoptotische Körperchen“ (engl.=*apoptotic bodies*) verhindert, in denen das apoptotische Material abgekapselt und durch Phagozytose schnell entfernt wird (Love, 2003). Weitere morphologische Veränderungen sind Zellschrumpfung und Kondensierung des Chromatins bei intakter Plasmamembran (Zipfel et al., 2000; Bredesen, 2000).

Im Rahmen eines Schlaganfalls kann es gleichzeitig zur Nekrose und Apoptose kommen. Dabei ist die Nekrose ein Mechanismus, der nach schweren, dauerhaften Verschlüssen eher im Kerngebiet der Schädigung vorkommt. Die Apoptose tritt eher nach milden fokalen zerebralen Ischämien in der ischämischen Randzone, der sogenannten Penumbra auf (Dirnagl et al., 1999; Fisher und Schaebitz, 2000; Zipfel et al., 2000).

Die Apoptose kann über extrinsische und intrinsische Signaltransduktionswege ausgelöst werden. Der extrinsische Signalweg erfolgt über „Todesrezeptoren“ wie TNF- α Rezeptor 1 (TNFR1) oder Fas-Rezeptoren (CD95 oder Apo-1), der intrinsische über das Mitochondrium (Love, 2003; Earnshaw et al., 1999). Beide Signalwege führen letztendlich zur Aktivierung von

Caspasen. Diese katalysieren die Zerstörung der Zellen und ihrer Kompartimente (Mergenthaler et al., 2004).

1.7.1. Caspasen

Caspasen, Cystein-abhängige Aspartat-spezifische Proteasen, sind intrazelluläre Proteasen, von denen bisher 14 verschiedene Subtypen identifiziert worden sind (Li und Yuan, 2008). Sie werden als inaktive Proenzyme synthetisiert und müssen in apoptotischen Zellen erst durch Eigenproteolyse oder andere Proteine gespalten werden (Bredesen, 2000; Love, 2003). Caspasen können in zwei große Gruppen eingeteilt werden. Zur Interleukin-1 β -Converting-Enzym (ICE)-Familie gehören die Caspasen 1, 4, 5, 11, 12 und 14, die eine Rolle bei der Zytokin-Ausschüttung und Induktion von Entzündung spielen. Außerdem gibt es Caspasen, die direkt an der Apoptose beteiligt sind (2, 3, 6, 7, 8, 9 und 10). Letztere können wiederum in Initiatorcaspasen (2, 8, 9, und 10) und Effektorcaspasen (3, 6 und 7) gegliedert werden (Bredesen, 2000; Strasser et al., 2000).

Beim bereits erwähnten extrinsischen Signalweg sind die Initiatorcaspasen 8 oder 10 beteiligt. Diese aktivieren die Exekutionscaspasen 3 und 7, die dann letztlich zur Apoptose führen (Stennicke et al., 1998; Lamkanfi und Kanneganti, 2010). Im Verlauf des intrinsischen Signalweges wird nach Aktivierung von Caspase 8 oder 10, das pro-apoptotische Protein Bid aktiviert. Dadurch kommt es zur Zerstörung der äußeren Mitochondrienmembran, was zur Freisetzung von Cytochrom c ins Zytoplasma und letztendlich über die Initiatorcaspase 9 zur Aktivierung der Effektorcaspase-Kaskade führt. (Nuñez et al., 1998; Eldadah und Faden, 2000). Die Caspase 3 nimmt auch eine zentrale Stellung bei apoptotischen Signalkaskaden unter zerebraler Ischämie ein. So wird Caspase 3 nach einem fokalen zerebralen Schaden vermehrt exprimiert (Chen et al., 1998; Namura et al., 1998).

1.7.2. BCL-2-Proteinfamilie

Das regulatorische Protein BCL-2 und dessen gleichnamige Proteinfamilie sind an der Regulation der Apoptose beteiligt. Das Protein wurde erstmals aus einem B-Zell-Lymphom (BCL) isoliert (Bredesen, 2000). Die Mitglieder der BCL-2-Proteinfamilie lassen sich in pro- und anti-apoptotische Proteine einteilen. Zu den Apoptose fördernden Proteinen gehören Bax, Bad,

Bak, Bid, Bik, und BCL-xS, während beispielsweise BCL-2, BCL-x1, BCL-w und Mcl-1 zu den Apoptoseinhibitoren gezählt werden (Adams und Cory, 1998).

Wie bereits erwähnt regulieren BCL-2-Proteine die Freisetzung von Cytochrom c aus dem Mitochondrium im intrinsischen Weg, was den Zelltod zur Folge hat. Anti-apoptotische Mitglieder der BCL-2-Familie wirken dabei blockierend auf die Freisetzung (Yang et al., 1997; Kluck et al., 1997), während pro-apoptotische BCL-2-Proteine wie Bax die Freisetzung von Cytochrom c fördern (Jürgensmeier et al., 1998).

Das anti-apoptotische BCL-2-Gen kodiert ein 26kDa schweres Membran-assoziiertes Protein, das sich unter anderem an der Zellmembran, den Mitochondrien und dem Endoplasmatischen Retikulum befindet (Lithgow et al., 1994). Eine Überexpression des BCL-2-Proteins konnte den Tod von sympathischen Neuronen und Phäochromozytomzellen (PC12 Zellen) verhindern (Garcia et al., 1992; Mah et al., 1993). Weiterhin wurde auch in geschädigten bzw. überlebenden Neuronen nach einer fokalen oder globalen zerebralen Ischämie eine Steigerung des BCL-2-Proteins beobachtet. So scheint das BCL-2-Protein auch eine entscheidende Rolle bei der Regulation des Zelltodes nach einer zerebralen Ischämie zu spielen (Shimazaki et al., 1994; Chen et al., 1995, 1997). Die potentielle klinische Relevanz der Apoptose-supprimierenden Effekte zeigte sich auch im experimentellen, zerebralen Ischämie-Modell an transgenen Mäusen, wobei eine Überexpression von BCL-2 zu einer Reduzierung des Infarkt Volumens führte (Martinou et al., 1994; Wiessner et al., 1999).

Bax ist ein 21kDa schweres, potentes, pro-apoptotisches Protein, das Homodimere und Heterodimere mit BCL-2 bilden kann. Bax Homodimere führen zur Apoptose. In Form von Heterodimeren mit BCL-2 bestimmt jedoch die BCL-2-Bax-Ratio die Empfänglichkeit gegenüber dem Zelltod. Während ein Überwiegen von BCL-2 die pro-apoptotischen Effekte von Bax neutralisieren kann, führt eine Dominanz von Bax zum Zelltod (Oltvai et al., 1993). Eine hohe p53-Aktivität stimuliert die Expression von pro-apoptotischen Faktoren. So wird die Transkription von Bax durch p53 reguliert (Miyashita und Reed, 1995). Nach einer globalen, zerebralen Ischämie steigt die Bax-Expression in geschädigten hippocampalen CA1 Neuronen an (Krajewski et al., 1995).

1.8. Neurotrophine

Neurotrophine (*trophisch*, griech. für Ernährung fördernd) gehören zur Familie der Wachstumsfaktoren, die das Überleben und die Differenzierung von Nervenzellen sichern. Die Mitglieder schließen unter anderem den *nerve growth factor* (NGF), *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF), Neurotrophin-3 (NT-3) und Neurotrophin-4/5 (NT-4/5) ein. Sie binden an spezifische Rezeptoren, den p75-Neurotrophin Rezeptor (p75NTR) aus der TNF Familie und an Rezeptoren aus der Tyrosinkinase-Rezeptor-Familie (Trk A, Trk B und Trk C), wodurch unterschiedliche, intrazelluläre Signalkaskaden ausgelöst werden (Barbacid, 1995; Huang und Reichardt, 2001). Nach einer zerebralen Ischämie können Neurotrophine eine massive Neurodegeneration verhindern und vielleicht sogar das zerstörte neuronale Netzwerk wiederherstellen, indem sie das Auswachsen neuronaler Fortsätze stimulieren (Mocchetti und Wrathall, 1995).

1.8.1. Nerve growth factor

Der Nervenwachstumsfaktor wird in verschiedenen Gehirnregionen synthetisiert und kommt zum größten Teil in Neuronen des Kortex und Hippocampus vor (Mocchetti und Wrathall, 1995). Ebenso können Astrozyten, Mikroglia und Makrophagen NGF produzieren (Furukawa et al., 1986; Mallat et al., 1988). NGF setzt sich aus α -, β - und γ -Untereinheiten zusammen (Fahnestock, 1991). Unter pathophysiologischen Bedingungen spielt NGF eine wichtige neuroprotektive Rolle. Während einer Ischämie kommt es zu einer Steigerung der NGF-Konzentration in Gehirnen adulter Ratten, wodurch neuroprotektive Prozesse in Gang gesetzt werden, die zu einer Regeneration von Neuronen, z.B. dem Aussprossen neuronaler Fortsätze führen (Lorez et al., 1989). Des Weiteren zeigten *in-vitro* Studien einen protektiven Effekt von NGF im Rahmen einer Hypoglykämie (Cheng und Mattson, 1991). Intraventrikuläre Behandlungen mit NGF führten *in-vivo* zu einer Reduzierung des verzögerten, neuronalen Zelltodes (*delayed neuronal death*) (Shigeno et al., 1991).

1.8.2. Brain derived neurotrophic factor

BDNF weist zu 50% eine Homologie mit NGF auf und ist ebenso am Wachstum und der Differenzierung von Neuronen, sowie der Regulation der synaptischen Plastizität im adulten Gehirn beteiligt (Binder und Scharfman, 2004). Weiterhin spielt es eine wichtige Rolle beim

Langzeitgedächtnis (Bekinschtein et al., 2008) und der Neurogenese (Zigova et al., 1998; Pencea et al., 2001). Knock-out-Mäuse, denen das Gen für BDNF fehlt, entwickelten sensorische Defizite (Ernfors et al., 1994). Verschiedene Ischämie-Modelle zeigten einen Anstieg der BDNF-Expression, die mit einem neuroprotektiven Effekt zu korrelieren schien (Lindvall et al., 1992; Kokaia et al., 1995; Tsukahara et al., 1994). Eine post-ischämische Behandlung mit BDNF verhinderte den Tod von Neuronen in der CA1-Region des Hippocampus, die Aktivierung von Astrozyten und die Infiltration von Makrophagen (Kiprianova et al., 1999). Weiterhin waren Neuronen durch eine Vorbehandlung mit BDNF resistenter gegenüber einer Glutamat-vermittelten Neurotoxizität (Cheng und Mattson, 1994). Ebenso konnte das Infarktvolumen durch Applikation von BDNF reduziert werden (Schäbitz et al., 1997). Wird jedoch ein zur Funktion wichtiges BDNF-Allel entfernt, hat dies eine Vergrößerung der Infarkt-Areales zur Folge (Endres et al., 2000). Diese Studien veranschaulichen eindeutig die neuroprotektiven Effekte von BDNF im Rahmen einer Ischämie. In einer Studie unserer Arbeitsgruppe führte die Behandlung mit dem β -Laktam-Antibiotikum Ceftriaxon in einem *in-vivo* Schlaganfall-Modell zu einer Expressionssteigerung von BDNF, was vermutlich zu dem beobachteten, neuroprotektiven Effekt des Antibiotikums beitrug (Thöne-Reineke et al., 2008).

1.9. Ceftriaxon

Ceftriaxon ist ein β -Laktam-Antibiotikum und gehört zu den Cephalosporinen. Die β -Laktam-Antibiotika besitzen einen β -Laktam-Ring als antibakteriell wirksames Zentrum. Das erste β -Laktam-Antibiotikum wurde 1928 von Alexander Flemming entdeckt. Er beobachtete auf einer Agar-Platte mit *Staphylococcus aureus* eine Schimmelpilzkolonie (*Penicillium notatum*), in deren Umkreis es zu keinem Bakterienwachstum kam. 1929 isolierte er den Pilz und gewann daraus das *Penicillium* (Penicillin), welches sich als ungiftig herausstellte und schon in geringen Konzentrationen human pathogene Bakterien abzutöten vermochte. Aufgrund des großen therapeutischen Erfolges versuchte man weitere Vertreter der β -Laktam-Antibiotika zu entwickeln, und so wurde 1953 aus dem Pilz *Cephalosporium acremonium* das Cephalosporin isoliert. Dies hatte die Vorteile, dass es widerstandsfähiger gegenüber Staphylokokken-Penicillinase war und eine höhere Säurestabilität aufwies (Friedrich, 2006).

Ihre bakterizide Wirkung auf proliferierende Erreger üben die β -Laktam-Antibiotika durch eine Reaktion mit bakteriellen Mureinsynthetasen, auch „PBP“ (Penicillin-bindende-Proteine) genannt, aus. Diese PBPs fungieren im bakteriellen Stoffwechsel als Transpeptidasen, die für

den Aufbau und die Stabilität des Peptidoglykangerüsts essentiell sind. Das β -Laktam-Grundgerüst ist mit dem D-Alanyl-D-Alanin-Rest der Transpeptidasen strukturverwandt und kann dieses daher unter Spaltung des β -Laktam-Ringes acetylieren. Die PBPs sind im menschlichen Organismus nicht vorhanden, und so kommt es nur innerhalb der pathogenen Erreger zu Zellwanddefekten und zur osmotisch bedingten Bakterizidie (Stahlmann und Lohde, 2009; Drawz und Bonomo, 2010).

Jedoch gibt es heutzutage im Bereich der antibiotischen Therapie immer mehr Probleme mit der Entwicklung von Resistenzen. So werden von einigen Bakterienstämmen sogenannte β -Laktamasen gebildet, die durch hydrolytische Spaltung des β -Laktamringes die Wirkung von β -Laktam-Antibiotika aufheben. Weiterhin führen Veränderungen der PBPs oder Aktivierung von Effluxmechanismen, die das Antibiotikum aus der Zelle transportieren, zu vermehrten Resistenzen (Heisig, 2006; Drawz und Bonomo, 2010).

Das Grundgerüst der Cephalosporine bildet die 7-Amino-cephalosporansäure. Im Rahmen ihres Wirkspektrums auf pathogene Keime wurden stetig neue Generationen entwickelt. So zählt Ceftriaxon (Abbildung 1.3.) zur 3. Generation der parenteralen Cephalosporine. Ceftriaxon weist gegenüber der 1. und 2. Generation eine bessere Wirksamkeit im gramnegativen Bereich und eine höhere Stabilität gegenüber β -Laktamasen auf. Sie sind jedoch weniger wirksam gegen Staphylokokken. Das Wirkspektrum erstreckt sich im gramnegativen Bereich auf *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Enterobacteriaceae* und *Haemophilus influenzae*. Im grampositiven Bereich ist es hochaktiv gegenüber *Streptococcus pyogenes* und *Streptococcus pneumoniae*. Ceftriaxon hat sogenannte Wirkungslücken bei *Pseudomonas aeruginosa* und *Enterococcus sp.* (Lamb et al., 2002). Es besitzt ebenfalls, wie alle anderen β -Laktam-Antibiotika, keine Wirkung bei obligat intrazellulär pathogenen Erregern wie *Rickettsiasp.*, *Chlamydia sp.* und *Legionella sp.* (Perry und Schentag, 2001), zellwandlosen Bakterien wie *Mycoplasma sp.*, langsam wachsenden Bakterien wie *Mycobacterium sp.* und obligat intrazellulär parasitären Bakterien wie *Brucella sp.* (Stahlmann und Lohde, 2009).

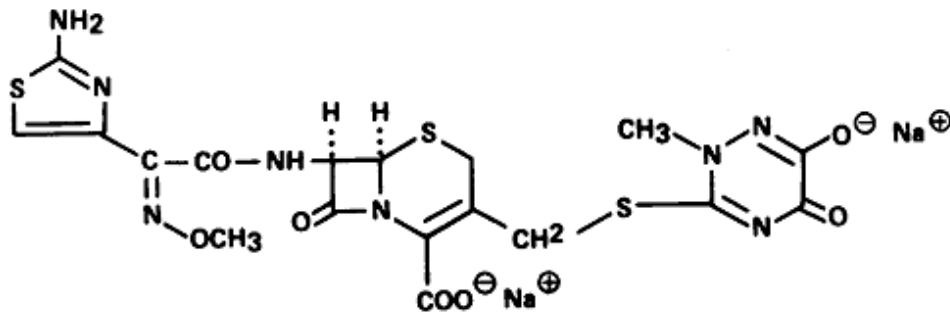


Abbildung 1.3. Strukturformel von Ceftriaxon (aus Hinkle und Bodey, 1980).

Aufgrund seines breiten Wirkungsspektrums ist Ceftriaxon bei schweren akuten und chronischen bakteriellen Infektionen im Hals-, Nasen- und Ohrenbereich, im Bauchraum, der Atemwege, der Haut und Weichteilgewebe, der Geschlechtsorgane, der Knochen und Gelenke und Lyme-Borreliose im Stadium II und III sowie bei Sepsis und Meningitis indiziert (Angaben Firma Roche).

Häufige Nebenwirkungen sind allergische Reaktionen mit Ausschlag und Juckreiz, Venenentzündung (Thrombophlebitis) an der Applikationsstelle, Candidiasis (oral, vaginal), Anstieg der Leberenzyme im Serum und gastrointestinale Beschwerden wie Übelkeit oder Diarrhoe. Sehr selten kann es auch zu einer pseudomembranösen Enterokolitis kommen. Weiterhin können unerwünschte Arzneimittelwirkungen Störungen des Blutbildes mit Leukopenie, Thrombozytopenie, Anämie oder Verlängerung der Prothrombinzeit auslösen (Lamp et al., 2002). Bei Kindern werden sehr häufig Ausfällungen eines Calciumsalzes von Ceftriaxon in der Gallenblase oder den Gallengängen beobachtet, das in der Sonographie als Verschattung zu erkennen ist, aber nach Absetzen von Ceftriaxon Reversibilität aufweist. So wurde ebenso eine Häufung von Cholelithiasis festgestellt (Riccabona et al., 1993).

Ceftriaxon besitzt mit sechs bis neun Stunden die längste Plasmahalbwertszeit unter den Cephalosporinen. Nach Applikation von 1 g Ceftriaxon intravenös beträgt der Serumspiegel nach 12 Stunden noch 30mg/l, während dieser bei den anderen Cephalosporinen der 3. Generation unterhalb der Nachweisgrenze liegt.

Auch im Hinblick auf die Proteinbindung ist Ceftriaxon gegenüber den anderen Vertretern der 3. Generation hervorzuheben. Bei einer normalen Dosierung beträgt die Proteinbindung bis zu 95 % (Stille et al., 2005). Bei höheren Dosierungen kommt es daher zu einer Freisetzung in den extravaskulären Raum, und Ceftriaxon kann so vermehrt in Körperflüssigkeiten diffundieren und wirksam sein. Ferner wird durch die hohe Proteinbindung die renale Elimination umgangen und

so eine längere Plasmahalbwertszeit erreicht (Perry und Schentag, 2001). Ceftriaxon wird nicht nur renal (45 bis 60%), sondern auch biliär eliminiert (Lamp et al., 2002). Bei einer normalen Leberfunktion ist es erst nötig, die verabreichte Tagesdosis unter 2 g zu beschränken, wenn eine Niereninsuffizienz mit einem Kreatin-Clearance von 10ml/Minute oder weniger vorliegt, was mit einer biliären Kompensation begründet ist. Ceftriaxon wird als Standard-Dosis von 1-2 g einmal täglich bei Erwachsenen und Kindern über 50kg parenteral appliziert (Angaben Firma Roche).

Ceftriaxon besitzt im Allgemeinen eine hervorragende Penetrationsfähigkeit in Gewebe und Flüssigkeiten (Perry und Schentag, 2001). So wird es auch, wie bereits oben erwähnt, bei bakteriellen Infektionen im Gehirn, wie einer Meningitis, angewendet. Durch die Blut-Hirn-Schranke gelangt das Antibiotikum parazellulär durch passive Diffusion entlang eines Konzentrationsgradienten. Wegen der geringen Lipophilie von Ceftriaxon erfolgt dieser Transport nur langsam, ist jedoch bei Störung der Blut-Hirn-Schranke z.B. im Rahmen einer Ischämie deutlich beschleunigt. Ceftriaxon besitzt im Liquor eine längere Halbwertszeit als in der Blutbahn (Lutsar und Friedland, 2000) und hat nur eine minimale Affinität gegenüber Transportsystemen im *Plexus choroideus*, die das Antibiotikum aus dem Liquor entfernen würden (Spector, 1986). Ebenfalls werden durch höhere Standard-Dosierungen von einmal täglich 100 mg pro kg Körpergewicht, jedoch nicht mehr als 4 g pro Tag, die freien Konzentrationen von Ceftriaxon erhöht und so auch dessen Diffusion, welches durch die bereits beschriebenen gesättigte Proteinbindung bei normalen Dosierungen begründet ist. So gleichen diese Mechanismen die geringe Penetration durch die Blut-Hirn-Schranke aus und sind für eine ausreichend therapeutisch wirksame Konzentration im Liquor verantwortlich (Lutsar und Friedland, 2000).

Ceftriaxon ist, wie oben bereits beschrieben, ein Antibiotikum und wird zur Therapie bakterieller Infektionen eingesetzt. Jedoch publizierten Rothstein *et al.* 2005, dass Ceftriaxon in einem *in-vivo*-Modell der amyotrophen Lateralsklerose (ALS) sowie in einem *in-vitro*-Modell der neuronalen Ischämie, durch Erhöhung der Expression und Aktivität des astrozytären Glutamattransporters GLT-1 neuroprotektiv wirken kann (Rothstein et al., 2005). Unsere Gruppe konnte außerdem zeigen, dass die Behandlung mit Ceftriaxon nach fokaler zerebraler Ischämie durch Verschluss der *Arteria cerebri media* (MCAO) in Ratten die akute 24-Stunden-Mortalität signifikant reduziert, die neurologischen Schäden verringert und die Anzahl der überlebenden Neuronen innerhalb der Penumbra erhöht. Der von Rothstein *et al.* publizierte Mechanismus der

Induktion des GLT-1 Transporters konnte jedoch im Schlaganfallmodell bei Ratten nicht reproduziert werden (Thöne-Reineke et al., 2008).

Beide Studien trugen dazu bei, die noch relativ neue Erkenntnis zu bestärken, dass einige Antibiotika neuroprotektive Eigenschaften haben und eventuell in der Akuttherapie des Schlaganfalls zu Verbesserungen führen könnten. Die von Rothstein *et al.* beschriebenen therapeutischen Effekte von Ceftriaxon bei der ALS führten zur Initiierung einer klinischen Phase III Studie an Patienten mit ALS, die jedoch keinen therapeutischen Effekt zeigen konnte (Cudkowicz, et al., 2013).

1.10. Fragestellung

Wie in der Einleitung beschrieben, ist Glutamat der wichtigste exzitatorische Aminosäuretransmitter im ZNS. Im Rahmen einer zerebralen, fokalen Ischämie kommt es durch einen extrazellulären Anstieg von Glutamat zur Überstimulation von Glutamatrezeptoren. Dies führt zum Absterben von Neuronen durch den sogenannten Mechanismus der Exzitotoxizität. Astrozyten sind in der Lage, Glutamat über Transportsysteme aus dem Extrazellulärraum zu entfernen.

Bisher durchgeführte Studien haben gezeigt, dass die neuroprotektiven Wirkungen von Ceftriaxon auf eine Expressions- und/oder Aktivitätssteigerung des Glutamat-Transporters GLT-1 zurückzuführen sind, wodurch die astrozytäre Glutamat-Aufnahme gesteigert wird und Neuronen vor Exzitotoxizität geschützt werden (Rothstein et al., 2005; Lee et al., 2008; Thöne-Reineke et al., 2008). Bislang ist jedoch noch nicht bekannt, wie die Astrozyten auf die vermehrte Glutamat-Aufnahme reagieren: ob die Astrozyten z.B. selbst geschädigt werden und/oder ob sie neuroprotektive Substanzen synthetisieren und freisetzen.

Vor diesem Hintergrund sollten in der vorliegenden Arbeit in einem *in-vitro* Glutamat-Modell die Ceftriaxon-induzierten Veränderungen an primären Astrozyten der Ratte untersucht werden. Hierfür wurde die Genexpression von inflammatorischen Zytokinen, Neurotrophinen und Apoptose-Markern in Ceftriaxon-behandelten und unbehandelten Astrozyten analysiert und verglichen. Weiterhin wurde in dieser Arbeit anhand von Versuchen, in denen primäre, neuronale Zellen mit konditioniertem Medium von Astrozyten behandelt wurden, untersucht, inwieweit Substanzen, die von Ceftriaxon-behandelten Astrozyten freigesetzt werden, protektiv auf Neuronen wirken.

2. Materialien und Methoden

2.1. Materialien und Geräte

2.1.1. Chemikalien allgemein

Chemikalien	Bezugsquelle
Acridinorange	Roth, Karlsruhe, D
Alpha MEM Eagle Medium	PAN Biotech, Aidenbach, D
Alpha MEM Eagle Medium without Glutamin	PAN Biotech, Aidenbach, D
Amphotericin (2,5 µg/ml)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
Ceftriaxon-Dinatrium·3,5H ₂ O (<i>Rocephin</i>)	Hoffmann-La Roche, Grenzach-Wyhlen, D
Chloroform	Merck, Darmstadt, D
Dimethylsulfoxid (DMSO)	SIGMA, Taufkirchen, D
DMEM (Dulbecco's modified Eagle Medium)	GIBCO, Invitrogen, Karlsruhe, D
Ethanol (70% v/v)	Mallinckrodt Baker, Deventer, NL
Ethidiumbromid (1% m/v)	Roth, Karlsruhe, D
Fetales Kälberserum (FBS)	GIBCO, Invitrogen, Karlsruhe, D
Gentamycinsulfat-Lösung (10 mg/ml)	Biochrom Ag, Berlin, D
Isopropanol	Merck, Darmstadt, D
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt, D
L-Glutamic acid monosodium salt hydrate (Natrium-L-glutamatmonohydrat)	SIGMA, Taufkirchen, D
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Aldrich, Steinheim D
NP40 (10% (v/v))	SIGMA, Taufkirchen, D
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	PAN Biotech, Aidenbach, D
Penicillin-Streptomycin (100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin)	PAN Biotech GmbH, Aidenbach, D
ROX- Solution	Invitrogen, Karlsruhe, D
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris) als Tris-Base und Tris-HCl	SIGMA, Taufkirchen, D
Trypsin/EDTA (0,25 % w/v / 0,5 mM)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D
Tween 20	SIGMA, Taufkirchen, D
H ₂ O (Ultra-Pure water)	PAN Biotech, Aidenbach, D

2.1.2. Chemikalien für die Molekularbiologie

Chemikalien	Bezugsquelle
DNASE	Promega, Mannheim, D
DNASE Puffer	Promega, Mannheim, D
Desoxynukleosid-Triphosphat (dNTP)	Promega, Mannheim, D
5 x M-MLV-Puffer	Promega, Mannheim, D
M-MLV Reverse Transkriptase	Promega, Mannheim, D
Power SYBR Green [®] Mastermix	Applied Biosystems, Darmstadt, D
Random Hexamer Primer	Promega, Mannheim, D
RNasin	Promega, Mannheim, D
Stop - Solution	Promega, Mannheim, D
Taq-Polymerase	Invitex, Berlin, D
TRIZOLReagenz	Invitrogen, Karlsruhe, D

2.1.3. Kits

Gaspase-Glo 3/7 Assay	Promega, Mannheim, D
Glutamate – Assay	BioVison, CA, USA

2.1.4. Arbeitsmaterialien

Materialien	Hersteller
CryoTube Kryoröhrchen	Nunc, Roskilde, DK
Cryo- 1°C Freezing Container	Nalgene, USA
Filtereinheit FP30/0.2 CA-S	Whatman, Dassel, D
T-Flaschen (25 cm ² , 75 cm ² , 175 cm ²)	Falcon. Gräfelfing-Lochham. D
6-, 24 und 96-well Zellkulturplatten	Becton Dickenson, Sparks, USA
Eppendorfgefäße	Eppendorf, Hamburg, D
10 µl-, 100 µl-, 1000 µl-Eppendorfspitzen	Eppendorf, Hamburg, D
96-well Multiplay PCR-Platten	Sarstedt, Nümbrecht, D
Klebefolie, optisch klar	Sarstedt, Nümbrecht, D

2.1.5. Geräte

Geräte	Hersteller
Analysenwaage BL 150S	Sartorius, Göttingen, D
Benchmark plus microplate Spektrophotometer	Bio-Rad, Hercules, USA
CO ₂ -Inkubator HERACell 150	Kendro, Langenselbold, D
Fluoreszenzmikroskop DM IRE2	Leica, Wetzlar, D
Luminometer Monolight 3010	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Mikroskop DM IL	Leica, Wetzlar, D
NANO Drop Spektrophotometer ND 100	Biotechnologie GmbH, D
Pipettierhilfe pippetus-akku	Hirschmann, Eberstadt, D
Pipetten	Rainin Classic, Oakland, CA, USA
Präzisionswaage SC2	Sartorius, Göttingen, D
Real-timePCR-System Mx3000P	Stratagene, La Jolla, USA
Schüttelgerät Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Bohema, USA
Sicherheitswerkbank Safe2010	Heto-Holten, Allerød, DK
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, D
Vakuumsaugpumpe	KNF Neuberger, Freiburg, D
Wasserbad WB14	Memmert, Schwabach, D
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf, Hamburg, D
Zentrifuge 22R	Hettich, Tuttlingen, D
Zentrifuge 32R	Hettich, Tuttlingen, D

2.2. Methoden

2.2.1. Zellkultur von primären Astrozyten

Die gesamten Arbeiten mit Astrozytenkulturen erfolgten unter sterilen Bedingungen. Dazu wurden eine entsprechende Sicherheitswerkbank und keimfreie Materialien vom Hersteller genutzt.

2.2.1.1. Zellkulturmedien

Das Zellkulturmedium zum Wachstum und zur Vitalitätserhaltung der Astrozytenkulturen wurde aus 450 ml Alpha MEM Eagle, 50 ml FBS und 5 ml Gentamycinsulfat hergestellt. Zur Anzucht von Zellkulturen (Anzuchtmedium) werden 442,5 ml Alpha MEM Eagle mit 5 ml Penicillin-Streptomycin (100 U/ml), 5 ml Amphotericin (5,5 µg/ml), 2,5 ml Gentamycinsulfat (50 µg/ml) und 50 ml FBS versetzt. Während der unterschiedlichen Behandlungen der Zellen und 24 Stunden davor wurde ein sogenanntes Hungermedium (0,5 % FBS) genutzt, welches aus 492,5 ml Alpha MEM Eagle, 2,5 ml FBS und 5 ml Gentamycinsulfat besteht.

2.2.1.2. Isolierung und Kultivierung von primären Astrozyten aus der Ratte

Die Tötung von Ratten zur Gewinnung primärer Astrozyten war durch die Anzeige T0059/05 beim Landesamt für Gesundheit und Soziales (LaGeSo) Berlin genehmigt.

Die Isolierung primärer Astrozyten erfolgte basierend auf einer Methode von McCarthy und de Vellis (McCarthy und de Vellis, 1980). Im Alter von ein bis zwei Tagen wurden Ratten durch Dekapitation getötet. Das Gehirn wurde mit Hilfe einer Schere steril entnommen, indem der Schädel vom *Foramen magnum* entlang der *Sutture sagittalis* nach rostral eröffnet wurde. Zur weiteren Verarbeitung wurde das Gehirn auf kaltem PBS gelagert und die anhaftenden Meningen und Blutgefäße entfernt. Das Hirngewebe wurde anschließend mit Anzuchtmedium versetzt und mittels verschiedener Pipettengrößen durch wiederholtes Aufziehen zerkleinert. Die gewonnene Suspension wurde in eine T-75 Flasche überführt und bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach 24 Stunden erfolgte eine mikroskopische Kontrolle der Flaschen. Die Hälfte des Mediums konnte gewechselt und größere Gewebstücke abgesaugt werden, wenn aus abgesetzten Gewebsfragmenten am Boden der Flasche erste Astrozyten wuchsen. Ein kompletter Mediumwechsel wurde drei Tage nach Präparation durchgeführt. Wurde der Flaschenboden

vollständig von Astrozyten bedeckt, also eine Konfluenz erreicht, konnte eine Subkultivierung durch „Passagieren“ durchgeführt werden.

2.2.1.3. Passagieren von primären Astrozyten

Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen unter Verdünnung vom alten Kulturgefäß in neue Zellkulturflaschen überführt. Dazu wurde das Zellkulturmedium aus den Kulturflaschen abgesaugt und der Zellrasen mit auf 37 °C erwärmtem PBS gewaschen. Danach wurden pro T-75 Zellkulturflasche 2 ml Trypsin/EDTA-Lösung zugesetzt, so dass ein dünner Flüssigkeitsfilm die gesamten Zellen benetzte. Die Zellkulturflasche wurde für 5 Minuten bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert und unter mikroskopischer Kontrolle der Beginn der Ablösung des Zellrasens festgestellt. Jetzt konnte durch leichtes Schlagen gegen die Flasche der Zellrasen vom Boden soweit gelöst werden, dass die Zellen mit 10 ml Zellkulturmedium abgespült und in ein 15 ml Falcon überführt werden konnten. Das Falcon wurde für 5 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 10 ml Zellkulturmedium resuspendiert, wobei je 5 ml in zwei neue T-175 Flaschen pipettiert und 20 ml Zellkulturmedium dazugegeben wurden. Die Kultivierung der Flaschen bis zur Konfluenz erfolgte im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂.

2.2.1.4. Mediumwechsel

Das Zellkulturmedium wurde alle drei Tage regelmäßig erneuert, um genügend Nährstoffe für die Zellen zu gewährleisten. Das vorhandene Medium wurde abgesaugt und durch 25 ml frisches Zellkulturmedium ersetzt.

2.2.1.5. Kryokonservierung von primären Astrozyten

Zur langfristigen Aufbewahrung von primären Astrozyten konnten aus den Zellen Kryostocks angelegt werden. Durch mehrmaliges Passagieren zuerst in T-75 Kulturflaschen, dann in T-175 Kulturflaschen, wurden größere Mengen an primären Astrozyten hergestellt. Eine konfluente Zellpopulation in einer T-175 Kulturflasche konnte auf zwei Aliquots von je 1 ml aufgeteilt werden. Nach Konfluenz wurden die Zellen wie beim „Passagieren“ beschrieben von der Kulturflasche abgelöst. Die Zellsuspension wurde für 3 Minuten bei 25°C und 1000 rpm zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand abgesaugt und es erfolgte eine Resuspension

des Pellets in Einfriermedium bestehend aus FBS und 10% DMSO. Die Suspension wurde in Kryoröhrchen zu jeweils 1 ml aliquotiert, bei -80°C für 24 Stunden in einem Kryo- Container (Cryo-Freezing Container, Nalgene) eingefroren und anschließend in einem Vorratstank in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

2.2.1.6. Auftauen von primären Astrozyten

Die Kryoröhrchen wurden aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und langsam im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. In ein 15 ml Falcongefäß mit 9 ml Zellkulturmedium wurde je 1 ml der Zellsuspension aus den Kryoröhrchen tropfenweise pipettiert und anschließend für 5 Minuten bei 25°C und 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 10 ml 37°C warmem Zellkulturmedium durch mehrmaliges Auf- und Absaugen resuspendiert.

Die Zellsuspension wurde dann in eine T-75 Kulturflasche mit 10 ml warmem Zellkulturmedium überführt und im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Zeigte sich nach 24 Stunden in der mikroskopischen Kontrolle eine Adhäsion der Zellen am Flaschenboden, wurde die Hälfte des Zellkulturmediums gewechselt. Bestand keine oder nur eine geringe Adhäsion, wurde noch weitere 24 Stunden bis zum Mediumwechsel gewartet. Ein kompletter Mediumwechsel erfolgte nach drei Tagen.

2.2.1.7. Kultivierung in Zellkulturplatten

Zur Kultivierung von primären Astrozyten in Zellkulturplatten wurde in eine 96-*well*-Platte 50 µl Zellsuspension pro *well* pipettiert, in 24-*well*-Platten 500 µl pro *well* und in 6-*well*-Platten 2 ml pro *well*. Nach 24 Stunden erfolgte der erste Mediumwechsel und die Zellen wurden bis zur Konfluenz im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert.

2.2.2. Neuronale Zellkulturen (NG 108-15)

Neuronen der Zelllinie NG 108-15 sind eine Fusion aus N18TG2 Maus-Neuroblastom-Zellen und 6CBU-1 Ratten-Gliom-Zellen. Die Zellen waren in unserer Arbeitsgruppe vorrätig. Die gesamten Arbeiten mit neuronalen Zellkulturen erfolgten unter sterilen Bedingungen. Dazu wurden eine entsprechende Sicherheitswerkbank und keimfreie Materialien vom Hersteller genutzt.

2.2.2.1. Zellkulturmedien

Das Zellkulturmedium wurde aus 450 ml DMEM (Dulbecco's modified Eagle Medium), 50 ml FBS und 5 ml Gentamycinsulfat hergestellt. Während der unterschiedlichen Behandlungen der Zellen und 24 Stunden davor wurde ein sogenanntes Hungermedium (1 % FBS) genutzt, welches aus 490 ml DMEM, 5 ml FBS und 5 ml Gentamycinsulfat besteht.

2.2.2.2. Passagieren der neuronalen Zelllinie NG 108-15

Eine Subklutivierung erfolgte durch passagieren bis zu einer Rate von 1:6, da die Zellen sehr schnell proliferieren. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen unter Verdünnung vom alten Kulturgefäß in neue Zellkulturflaschen überführt. Dazu wurde das Zellkulturmedium aus den Kulturflaschen abgesaugt und der Zellrasen mit auf 37 °C erwärmtem PBS gewaschen. Danach wurden pro T-75 Zellkulturflasche 2 ml Trypsin/EDTA-Lösung zugesetzt, so dass ein dünner Flüssigkeitsfilm die gesamten Zellen benetzte. Die Zellkulturflasche wurde bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert bis sich unter mikroskopischer Kontrolle der Zellrasen ablöste. Zu den Zellkulturflaschen wurde dann frisches Zellkulturmedium gegeben. Das Medium wurde mit den Zellen abgesaugt und auf zwei neue Zellkulturflaschen aufgeteilt. Die Kultivierung der Flaschen bis zur Konfluenz erfolgte im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂.

2.2.2.3. Mediumwechsel

Das Zellkulturmedium wurde alle zwei Tage regelmäßig erneuert. Das vorhandene Medium wurde abgesaugt und durch frisches Zellkulturmedium ersetzt. Die Menge des Mediums war abhängig von der Platten- bzw. Kulturflaschengröße (T-175 mit 25ml, T- 75 mit 10ml, in 6-*well*-Platten 2 ml pro *well*).

2.2.2.4. Auftauen der neuronalen Zelllinie NG 108-15

Die neuronalen Zellen wurden im flüssigen Stickstoff aufbewahrt. Die Kryoröhrchen wurden aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und langsam im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Die Zellen wurden in 20 ml Zellkulturmedium resuspendiert und anschließend für 5 Minuten bei 25°C und 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 10 ml 37°C warmem Zellkulturmedium durch mehrmaliges Auf- und Absaugen resuspendiert. Die Zellsuspension

wurde dann in eine T-75 Kulturflasche mit 10 ml warmem Zellkulturmedium überführt und im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert.

2.2.2.5. Kultivierung in Zellkulturplatten

Zur Kultivierung der neuronalen Zelllinie NG 108-15 in Zellkulturplatten wurde in eine 96-*well*-Platte ca. 10.000 Zellen und in 24-*well*-Platten ca. 50.000 Zellen ausgesät. Nach 24 Stunden erfolgte der erste Mediumwechsel und die Zellen wurden bis zur Konfluenz im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert.

2.2.3. Molekularbiologische Methoden

2.2.3.1. RNA-Isolation

Primäre Astrozyten wurden in 6-*well*-Platten kultiviert und wie unten (2.2.5.) beschrieben behandelt. Nach Abschluss der Inkubation und Absaugen des Mediums wurden die Zellen mit 2 ml kaltem PBS gewaschen und anschließend mit 1 ml TRIzol Reagenz versetzt. Die Zellen wurde mit Hilfe eines Zellkulturschabers in TRIzol Reagenz von der Zellkulturplatte gelöst und in ein Eppendorf-Gefäß aufgenommen. Das gewonnene Gemisch konnte entweder direkt weiterverarbeitet oder bei -80 °C gelagert werden. Die weiteren Schritte zur Isolierung von RNA aus Zellen erfolgten nun gemäß den Angaben des TRIzol-Protokolls (Invitrogen®). Nach Inkubation der Zellen in TRIzol Reagenz bei Raumtemperatur für 5 min wurden die Proben mit 0,2 ml Chloroform extrahiert. Die RNA wurde anschließend mit 0,5 ml Isopropanol gefällt, mit 75 % Ethanol gewaschen und in 20 µl Wasser gelöst.

2.2.3.2. Bestimmung der RNA-Konzentration und Qualität

Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte photometrisch mit Hilfe des NANO Drop Spektrophotometer ND 100, wobei die gewonnene RNA ohne Verdünnung direkt auf den Messbereich zu 1,5 µl aufgetragen werden konnte. Das Absorptionsmaximum der RNA lag bei einer Wellenlänge von $\lambda=260$ nm. Gleichzeitig wurde eine Messung bei einer Wellenlänge von $\lambda=280$ nm durchgeführt, die der Kontrolle auf eventuelle Verunreinigungen durch Proteine diente. Der Absorptionsquotient (*Ratio*) bei 260 nm und 280 nm sollte bei einer kontaminationsfreien RNA-Gewinnung zwischen 1,6 und 2,0 liegen.

2.2.3.3. cDNA-Synthese

Die komplementäre DNA (cDNA) wurde gemäß des folgenden Protokolls aus der gewonnenen RNA synthetisiert. Jeweils 0,5 µg RNA wurden umgeschrieben und die RNA-Proben zu einem Gesamtvolumen von 8 µl mit Wasser verdünnt. Danach wurde ein DNase-Verdau durchgeführt, indem jede Probe mit 1 µl DNase und 1 µl DNase-Puffer versetzt und bei 37°C für 30 Minuten inkubiert wurde. Anschließend erfolgte die Zugabe von 1 µl STOP-Lösung zu jeder Probe und eine Inkubation für 10 Minuten bei 65°C. Die Proben wurden danach mit 0,5 µl Random Hexamer Primer versetzt und für 5 Minuten bei 70°C inkubiert. Alle Proben wurden sofort auf Eis gelagert und mit 13,5 µl Mastermix, bestehend aus 0,75 µl RNasin, 0,5 µl M-MLV-Reverse Transkriptase, 5 µl 5x M-MLV-Puffer, 6 µl ddH₂O und 1,25 µl 10 mM dNTP's, versetzt, und bei 37°C für 60 Minuten inkubiert. Die gewonnene cDNA konnte bei -20°C aufbewahrt werden. Eine Negativkontrolle (RT(-)), in deren Ansatz die Reverse Transkriptase durch ein entsprechendes Volumen an H₂O ersetzt wurde, ist bei der cDNA-Synthese mitgeführt worden und wurde ebenfalls den nachfolgenden PCR-Untersuchungen unterzogen.

2.2.3.4. Quantitative *Real-time* PCR (qPCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine Methode zur Amplifizierung von Nucleinsäure-Fragmenten. Die Standard-PCR besteht aus den Schritten: Denaturierung, Anlagerung (*Annealing*) und Verlängerung (*Elongation*). Nach Denaturierung bei 95°C, lagern sich bei 60°C die Primer an die DNA Einzelstränge an. Danach wird die Temperatur auf 72°C, das Temperaturoptimum einer hitzestabilen DNA-Polymerase, erhöht, um eine optimale Doppelstrangsynthese zu erlauben, die der ursprünglichen DNA exakt gleicht. Werden die Zyklen mehrfach wiederholt, ergibt sich eine exponentielle Zunahme der amplifizierten DNA-Moleküle (PCR-Produkt). Die *Real-time* PCR bietet die Möglichkeit der Quantifizierung und so die Zunahme des PCR-Produktes in Echtzeit zu verfolgen. Dazu ist in dem PCR-Ansatz der Farbstoff SYBR Green[®] integriert, der nach Interkalierung in doppelsträngige DNA fluoresziert. Die steigende Anzahl des PCR-Produktes korreliert nun mit der Zunahme der Fluoreszenz. Der Gehalt des PCR-Produktes kann somit nach jedem PCR-Zyklus gemessen und mit einem Schwellenwert, bei dem sich das Fluoreszenzsignal gerade deutlich von der Hintergrund-Fluoreszenz abhebt, verglichen werden. Die Zykluszahl bei dem ein konstantes Fluoreszenzsignal erreicht wird, wird als *Threshold*-Zyklus (C_T) bezeichnet.

Die Auswertung der Daten erfolgte hier mit Hilfe der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode (Livak und Schmittgen, 2001). Dabei handelt es sich um eine relative Quantifizierung, wobei die Expression der gemessenen Gene auf ein nicht reguliertes Gen („*Housekeeping Gen*“), z.B. die ribosomale 18S-RNA-Untereinheit (18S-rRNA), normalisiert wird (Pfaffl, 2001).

Durchführung der *Real-time* PCR

Die cDNA Proben und Primer wurden 1:10 verdünnt. Für die quantitative *Real-time* PCR wurden pro Probe 10 $\mu\text{l/well}$ cDNA in eine 96-well-Platte pipettiert und mit 20 μl PCR Mastermix bestehend aus 15 μl SYBR Green[®] Housemix (Zusammensetzung siehe Tabelle 2.1.), 0,6 μl sense-/antisense-Primer (10 μM), 3,725 μl ddH₂O und 0,075 μl Taq-Polymerase (5 U/ μl) aufgefüllt. Anschließend wurde die Platte mit einer durchsichtigen Klebefolie verschlossen und für 4 Minuten bei 4°C und 4000 rpm zentrifugiert. Die Platte wurde danach in den *Real-time Cycler* gestellt und der entsprechende Reaktionszyklus gestartet. Für PCR-Untersuchungen bestimmter Primer wurde ein kommerzieller Power SYBR[®] Green PCR Master Mix verwendet, wobei der Reaktionsansatz in einer 96-well-Platte nun aus 10 $\mu\text{l/well}$ cDNA, 12,5 μl Power SYBR[®] Green PCR Master Mix, 0,6 μl sense-/antisense-Primer (10 μM) und 1,3 μl H₂O bestand. Der Reaktionszyklus wurde entsprechend angepasst (siehe Tabelle 2.2.). Die Auswertung der C_T-Werte erfolgte automatisch mit der zum Gerät gehörenden Software. Die Proben wurden in dreifacher Ausfertigung pipettiert, vermessen und auf die Expression des Genes ribosomale 18S-RNA-Untereinheit (18S-rRNA) als Standard bezogen. Auf den 96-well-Platten wurden gleichzeitig zu den Proben sowie der RT(-)-Kontrolle, sogenannte Wasserproben vermessen, wobei ein äquivalentes Volumen H₂O anstatt cDNA im Reaktionsansatz vorhanden war.

Tabelle 2.1: Zusammensetzung des SYBR Green[®] Housemix als 10 ml Vorratslösung

	Volumen [ml]	Konzentration	Endkonzentration in der Reaktion
SYBR Green [®]	0,001	0,02 %	0,01 %
DMSO	0,001	4 %	2 %
Tween 20	0,001	0,01 %	0,005 %
ROX-Solution	0,2	2 %	1 %
NP 40	0,001	0,01 %	0,005 %
KCl, 2,5 M	0,4	100 mM	50 mM

Tris-HCl, 1 M	0,2	20 mM	10 mM
Mg ²⁺ -Solution, 1 M	0,13	13 mM	6,5 mM
dATP, 100 mM	0,04	0,4 mM	0,2 mM
dCTP, 100 mM	0,04	0,4 mM	0,2 mM
dTTP, 100 mM	0,04	0,4 mM	0,2 mM
dGTP, 100 mM	0,04	0,4 mM	0,2 mM
H ₂ O, ultra pure	8,91	/	/

Tabelle 2:2. Reaktionszyklus einer *Real-Time* PCR mit SYBR Green[®] Housemix und Power SYBR[®] Green Mastermix

		SYBR Housemix	Green [®] Power SYBR [®] Mastermix
Schritt	Temperatur	Zeit	Zeit
Aktivierung der Polymerase	95 °C	2 min	10 min
Denaturierung*	95 °C	15 s	30 s
Annealing*	60°C	15 s	1 min
Elongation*	72 °C	30 s	30 s
Dissotiationskurve	55 °C	30 s	30 s
	95 °C	30 s	30 s

* 40 Zyklen

Primer

Die verwendeten Primer in Tabelle 2.3. wurden mit dem Programm Primer 3 auf der Website www.folker.wi.mit.edu/primer3/input.htm entworfen, basierend auf den Sequenzdaten des Genoms der Ratte unter www.ensembl.org. Die Primersequenzen wurden so gewählt, dass diese eine Exon-Exon-Grenze des Zielgens überspannten, damit sichergestellt wurde, dass es sich bei dem späteren Amplifikat ausschließlich um mRNA handelt. Beide Primer wurden mittels *BLAST Search* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) auf ihre Spezifität bezogen auf das gesamte Organismusgenom hinsichtlich der Amplifikation unerwünschter Fragmente geprüft.

Tabelle 2.3: Primersequenzen für die quantitative *Real-time* PCR

Gene	sense (5'-3')	antisense (5'-3')
18S-rRNA	CCgCAgCTAaggAATAATggAATA	TCTAgCggCgCAATACgAAT
IL-6	ATATgTTCTCAgggAgATCTTggAA	AgTgCATCATCgCTgTTCATACA
BDNF	AgCAggCTCTggAATgATgT	AgCTgCTCCAggTTAATCCA
NGFβ	gTCAgTgTgTgggTTggAgA	CAAaggTgTgAgTCgTggTg
Bax	gTgTggCAgCTgACATgTTT	gATCAgCTCgggCACTTTAg
BCL-2	TgTgTgTggAgAgCgTCAA	CATCCCAgCCTCCgTTATC

2.2.4. Studien-Design

Bei einem Schlaganfall kommt es zu einer stark erhöhten Ausschüttung des Neurotransmitters Glutamat, welcher in Zusammenhang mit einem vermehrten Calcium-Einstrom zum neuronalen Zelltod führt. Zur Simulierung eines dem Schlaganfall äquivalenten Schadensmusters in der Zellkultur wurden primäre Astrozyten mit Glutamat behandelt. Um die optimal wirksame Dosis und die optimale Inkubationsdauer für die Behandlung mit Glutamat in den weiteren Versuchen festzustellen, wurden zunächst Dosis-Wirkungs- (Glutamat-Konzentration 10 mM – 1 M; über eine Inkubationszeit von 24 Stunden) und Zeit-Wirkungs-Verläufe erstellt (1, 3, 6, 12, und 24 Stunden).

Nach Optimierung des Glutamat-Modells konnten an diesem molekulare Mechanismen von Ceftriaxon untersucht werden. Dazu wurden primäre Astrozyten der Ratte vor der Stimulierung mit Glutamat zu verschiedenen Zeitpunkten (6, 12, oder 24 Stunden) mit 100 µM Ceftriaxon behandelt und der Effekt einer Behandlung mit Ceftriaxon auf die Glutamat-Aufnahme untersucht. Um weitere Einblicke in das Wechselspiel zwischen Astrozyten und Neuronen zu erhalten, wurde entweder die direkte Wirkung von Ceftriaxon auf den Glutamat-induzierten Zelltod, in Neuronen untersucht oder – indirekt - die Wirkung von konditioniertem Medium von Ceftriaxon-behandelten Astrozyten auf die Neuronen.

2.2.5. Behandlung von primären Astrozyten

2.2.5.1. Herstellung der Lösungen von Glutamat und Ceftriaxon

Zum Behandeln der Zellen mit Glutamat wurde Natrium-L-glutamatmonohydrat unter Laborbedingungen eingewogen und in Zellkulturmedium gelöst, steril filtriert und in

entsprechender Verdünnung zu den Zellen gegeben, wobei die „Glutamat-Lösung“ immer frisch angesetzt wurde. Bei Abwiegen von 1,69 g Natrium-L-glutamatmonohydrat und Verdünnung mit 10 ml Medium erhielt man eine Stammlösung von 1 M.

Zur Behandlung der Zellen mit Ceftriaxon wurde Ceftriaxon-Dinatrium 3,5 H₂O (M_R: 661,6 g/mol) verwendet, das im Handel als Rocephin[®] bezeichnet wird. Eine definierte Menge Ceftriaxon wurde unter Laborbedingungen für jedes Experiment frisch eingewogen und in Wasser gelöst, steril filtriert und als Stammlösung zum Verdünnen in der gewünschten Konzentration verwendet. Für eine Stammlösung von 10 mM wurden 6,616 mg Ceftriaxon in 1 ml Wasser gelöst. Zum Behandeln von Zellen in 6-well-Platten mit 2 ml Medium wurden 20 µl Ceftriaxon-Lösung der 10 mM Stammlösung hinzugefügt um eine Konzentration von 100 µM zu erhalten.

2.2.5.2. Evaluierung der optimalen Konzentration von Glutamat zur Induktion von Apoptose in primären Astrozyten (Caspase-Glo 3/7 Assay)

Mit diesem Experiment wurde die Glutamat-Konzentration bestimmt, die eine ausreichende Apoptose in primären Astrozyten herbeiführte. Als Marker für die Apoptose dienten Caspase 3 und 7. Primäre Astrozyten wurden in einer 96-well-Platte kultiviert und 24 Stunden vor Beginn der Stimulation erfolgte ein Wechsel auf Hungermedium. Anschließend wurden die konfluenten Zellen für 24 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen von Glutamat (10 mM, 50 mM, 100 mM, 1 M in je 50 µl Medium) behandelt.

Die Lösung der Substanzen erfolgte in Hungermedium und für jede Konzentration wurden drei Versuchsansätze durchgeführt. Zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität von Caspase 3 und 7 wurde anschließend zu den Zellen 50 µl Caspase-Glo 3/7 Reagenz gefügt und für 1 Stunde bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert. Die Messung der Caspase-Aktivität erfolgte mit einem Luminometer. Die einzelnen experimentellen Schritte wurden gemäß den Angaben des Caspase-Glo 3/7 Assay Protokolles (Promega[®]) durchgeführt. Das Protokoll wird im Kapitel 2.2.6.4. näher erläutert.

2.2.5.3. Evaluierung der optimalen Konzentration von Ceftriaxon zur Induktion von anti-apoptischen Effekten in primären Astrozyten (Caspase-Glo 3/7 Assay)

Neben der Bestimmung der optimalen Glutamat-Konzentration wurde gleichzeitig ein pro-apoptischer Effekt von Ceftriaxon ausgeschlossen. Dazu wurden ebenfalls wie bereits oben

beschrieben primäre Astrozyten in einer 96-*well*-Platte kultiviert und 24 Stunden nach dem Wechsel auf Hungermedium die Stimulation begonnen. Die konfluenten Zellen wurden für 24 Stunden mit verschiedenen Konzentrationen von Ceftriaxon (1 μ M, 10 μ M oder 100 μ M in je 50 μ l Medium) behandelt. Anschließend erfolgten die weiteren Schritte entsprechend dem Caspase-Glo 3/7 Assay Protokolle welches in Kapitel 2.2.6.4. nachzulesen ist.

2.2.5.4. Evaluierung der optimalen Inkubationsdauer mit Glutamat zur Induktion von Apoptose in primären Astrozyten

Mit diesem Experiment sollte die optimale Dauer einer Glutamat-Behandlung gefunden werden, nach der es zu einer vermehrten Expression des inflammatorischen Zytokins IL-6 und des Apoptosemarkers Bax bzw. zu einer verminderten Expression des Apoptosemarkers BCL-2 und des Neurotrophins BDNF und NGF β kommt, was der Situation beim Schlaganfall entspricht und es erlaubt, etwaige neuroprotektive Wirkungen von Ceftriaxon zu detektieren.

Primäre Astrozyten wurden hierzu in 6-*well*-Platten bis zur Konfluenz kultiviert. Der Mediumwechsel auf Hungermedium erfolgte 24 Stunden vor Beginn der Stimulation. Die Zellen wurden 1, 3, 6, 12 oder 24 Stunden vor Ernte der Zellen und Isolation der mRNA mit Glutamat (100 mM) stimuliert. Als Negativkontrolle dienten unbehandelte kultivierte Zellen, die ebenfalls 24 Stunden vor Stimulationsbeginn Hungermedium erhielten (Vehikel). Anschließend erfolgte die Messung der oben genannten Marker mittels Quantitative *Real-time* PCR.

2.2.5.5. Behandlung primärer Astrozyten mit Ceftriaxon und Glutamat

Die Zellen wurden in 6-*well*-Platten bis zur Konfluenz kultiviert. Das Medium wurde 24 Stunden vor Beginn der Stimulation auf Hungermedium umgesetzt. Die Zellen wurden in die Behandlungsgruppen Vehikel, Vehikel/Glutamat und Ceftriaxon/Glutamat eingeteilt. Zunächst erfolgte eine Vorbehandlung der Zellen mit 100 μ M Ceftriaxon (in der Behandlungsgruppe Ceftriaxon/Glutamat) bzw. einem entsprechenden Volumen H₂O (in der Behandlungsgruppe Vehikel/Glutamat) zu den Zeitpunkten 24, 12 und 6 Stunden vor Zugabe von Glutamat. Im Anschluss wurde ein Mediumwechsel durchgeführt und die Zellen für 12 Stunden entsprechend den Behandlungsgruppen mit 100 mM Glutamat plus 100 μ M Ceftriaxon oder H₂O behandelt. Die Negativkontrolle (Vehikel) erhielt ebenfalls frisches Medium mit einem entsprechenden Volumen an H₂O (Abbildung 2.1.).

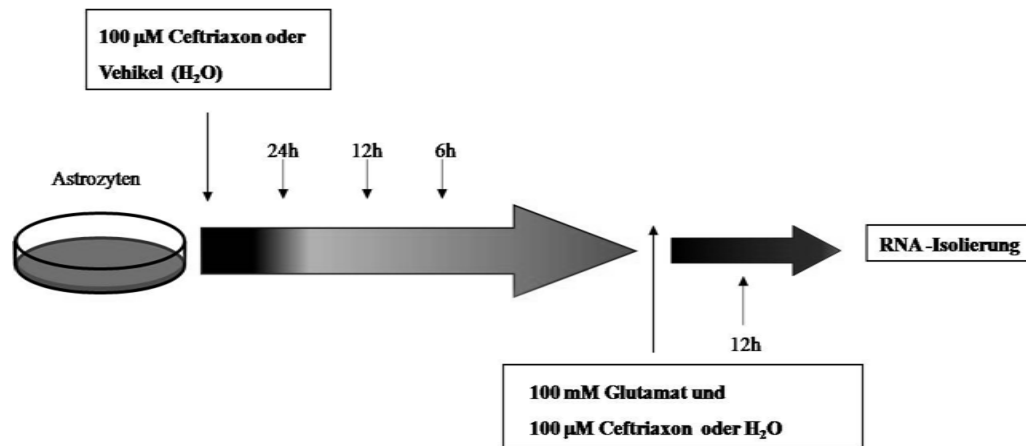


Abbildung 2.1. Schematische Darstellung der Behandlung primärer Astrozyten mit Ceftriaxon und Glutamat.

2.2.6. Bestimmung des Effekts von Ceftriaxon auf die Glutamat-induzierte Apoptose von neuronalen Zellen

2.2.6.1. Behandlung neuronaler Zellen mit Glutamat und/oder Ceftriaxon

Neuronen der Zelllinie NG 108-15, einer Fusion aus N18TG2 Maus-Neuroblastom-Zellen und 6CBU-1 Ratten-Gliom-Zellen, wurden auf 24-well-Platten in DMEM (versetzt mit 10 % FBS und 100 µg/ml Gentamycinsulfat) angezchtet. Das Medium wurde 24 Stunden vor Beginn der Stimulation auf Hungermedium umgesetzt (1% FBS und 1% Gentamycinsulfat). Nach Erreichen der Konfluenz erfolgte die Inkubation der Zellen für 24 Stunden nach folgenden vier Behandlungsprotokollen: (1) Kontrolle (H₂O), (2) Glutamat (100 mM), (3) Ceftriaxon (100 µM), (4) Glutamat (100 mM) plus Ceftriaxon (100 µM). Anschließend erfolgte die Färbung mit Acridinorange und Ethidiumbromid (siehe 2.2.6.3.)

2.2.6.2. Behandlung neuronaler Zellen mit konditioniertem Medium von Astrozyten nach Inkubation mit Glutamat und/oder Ceftriaxon

Der vorliegenden Studie lagen Publikationen von unserer und anderer Arbeitsgruppen zu Grunde, die den neuroprotektiven Effekt von Ceftriaxon auf eine Steigerung der Glutamat-Aufnahme in Astrozyten durch eine vermehrte Expression bzw. durch eine Aktivitätssteigerung des astrozytären Glutamat-Transporters GLT-1 zurückführten (Rothstein et al., 2005; Lee et al.,

2008; Thöne-Reineke et al., 2008). Um zu untersuchen, ob Ceftriaxon tatsächlich indirekt über Effekte auf Astrozyten und nicht direkt über Effekte auf Neuronen neuroprotektiv wirkt, wurden zunächst Astrozyten in 6-well-Platten in Medium zur Kultur neuronaler Zellen (DMEM + 10% FBS + 1% Gentamycinsulfat) kultiviert. Das Zellkulturmedium wurde 24 Stunden vor Beginn der Behandlung auf Hungermedium umgesetzt (DMEM + 1% FBS + 1% Gentamycinsulfat), gefolgt von einer Inkubation der Astrozytenkulturen mit Glutamat (100mM), Ceftriaxon (100µM), Glutamat plus Ceftriaxon oder Vehikel für 24 Stunden. Anschließend wurde das Kulturmedium der Astrozyten, sogenanntes „Astrozyten-konditioniertes-Medium“, zur Kultur von neuronalen NG 108-15 Zellen verwendet. Dieses „Astrozyten-konditionierte-Medium“ enthielt also weiterhin Glutamat und Ceftriaxon, soweit diese Substanzen nach 24 Stunden noch nicht abgebaut waren, sowie zusätzlich von den Astrozyten während der 24 Stunden Inkubationszeit synthetisierte bzw. sezernierte Moleküle. Das Astrozyten-konditionierte-Medium wurde nach steriler Filtration als Kulturmedium für NG 108-15 Zellen verwendet, die weitere 24 Stunden lang in den verschiedenen Astrozyten-konditionierten-Medien (Medium + Vehikel; Medium + Glutamat; Medium + Ceftriaxon; Medium + Glutamat/Ceftriaxon; 3 wells pro Gruppe), inkubiert wurden. Anschließend erfolgte die Färbung mit Acridinorange und Ethidiumbromid, wie es im Folgenden beschrieben wird (Abbildung 2.2.).

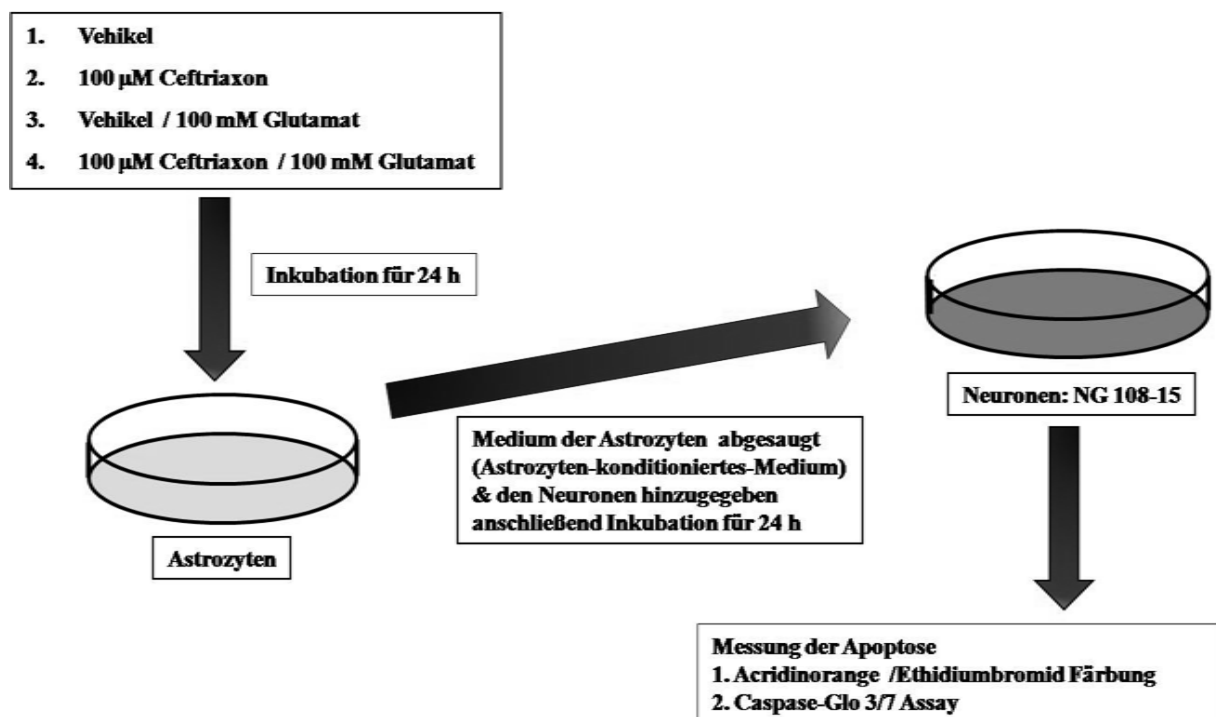


Abbildung 2.2. Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus. Neuronen (NG 108-15) wurden für 24 Stunden mit konditioniertem-Medium von Astrozyten inkubiert und anschließend die Apoptose bestimmt.

2.2.6.3. Acridinorange / Ethidiumbromid Färbung zur Bestimmung der Apoptose

Acridinorange und Ethidiumbromid können in Nukleinsäuren interkalieren. Acridinorange ist dabei in der Lage, die Zellmembran lebender und toter Zellen zu durchdringen. Ethidiumbromid kann jedoch nur in Zellen eindringen, deren Zellmembranen geschädigt sind. Durch die Kombination beider Farbstoffe ist es möglich, zwischen lebenden und toten Zellen (grün bzw. rot fluoreszierend, bzw. durch Überlagerung der Farben orange (tote Zellen)) zu differenzieren (Popovic et al., 2006). Die Neuronen der Zelllinie NG 108-15 wurden wie im obigen Abschnitt beschrieben stimuliert, anschließend 1 x mit PBS gewaschen und mit 500 µl einer Lösung bestehend aus Acridinorange, Ethidiumbromid (jeweils 200 µl/ml) und PBS für 1 Stunde bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend erfolgten ein zweimaliger Waschschrift mit PBS und die Analyse der apoptotischen Zellen mit einem Leica DM IRE2 Fluoreszenzmikroskop. Dazu wurden aus jedem *well* acht Bilder zu je mindestens 100 Zellen (insgesamt 2400 Zellen pro Behandlungsgruppe) in 20-facher Vergrößerung ausgezählt.

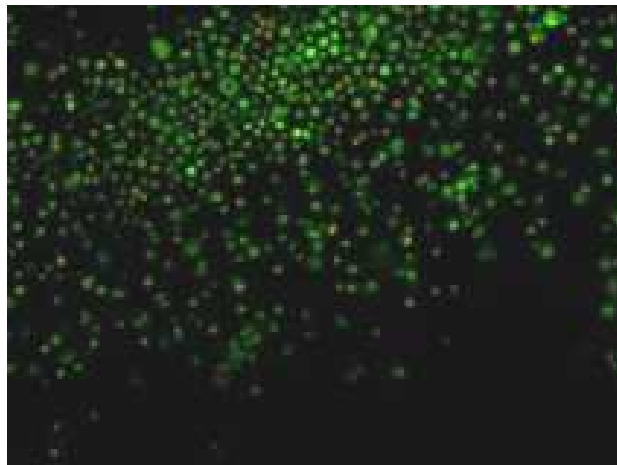


Abbildung. 2.3. Beispiel eines Bildes aus dem Fluoreszenzmikroskop, apoptotische Zellen stellen sich orange dar und lebende grün (eigenes Bild).

2.2.6.4. Caspase-Glo 3/7

Die Wirkung von Ceftriaxon und Glutamat bzw. von Astrozyten-konditioniertem Medium auf die Apoptose von Neuronen der Zelllinie NG 108-15 wurde zusätzlich zu der Acridinorange / Ethidiumbromid Methode mit der Caspase-Glo 3/7 Methode vermessen. Dafür wurden Neuronen nach dem entsprechenden Protokoll unter 2.2.6.2. behandelt. Allerdings erfolgte die Kultivierung der Neuronen nicht in 24-*well*-Platten sondern in 96-*well*-Platten.

Nach Klutivierung von 50 μ l der entsprechenden Behandlungsgruppen auf den neuronalen Zellen über 24 Stunden, erfolgte anschließend die Applikation von 50 μ l Caspase-Glo 3/7 Reagenz (bestehend aus der Zugabe von 10 ml Caspase-Glo Puffer zu einer Flasche von gefriergetrocknetem Caspas-Glo Substrat). Anschließend erfolgte eine Verteilung der Caspase-Glo 3/7 Reagenz auf den *wells* mit Hilfe eines Plattenrüttlers über 30 Sekunden bei 300 – 500 rpm. Lichtgeschützt wurden die Zellen bei Raumtemperatur dann für 1 Stunde inkubiert. Die Lumineszenz wurde mit einem Luminometer (Multilabel Counter 1420, Victor 3) gemessen.

2.2.7. Messung der Glutamat-Aufnahme von primären Astrozyten unter Ceftriaxon-Behandlung

Die Messung der Glutamat-Aufnahme von primären Astrozyten erfolgte mit einem Glutamat Assay Kit (BioVison[®]) und richtete sich nach dem vom Hersteller empfohlenen Protokoll. Für dieses Experiment wurde ausschließlich Alpha MEM ohne Glutamin verwendet. Konfluente Astrozyten in 6-*well*-Platten wurden mit Glutamat (10 nM), Glutamat (10 nM) plus Ceftriaxon (100 μ M) und einer Negativkontrolle mit adäquaten Volumen Wasser (Vehikel) für 24 Stunden behandelt. Das Medium mit den Lösungen wurde abgesaugt und je 40 μ l von diesem in 96-*well*-Platten (3 wells pro Behandlungsgruppe) überführt und mit jeweils 10 μ l Glutamat-Assay-Puffer versetzt. Die Astrozyten wurden mit 100 μ l Glutamat-Assay-Puffer abgeschabt, homogenisiert und mit 13000 rpm für 10 Minuten bei 25°C zentrifugiert. Je 10 μ l dieser Zellsuspension wurden ebenfalls in dreifacher Ausfertigung in 96-*well*-Platten pipettiert und mit 40 μ l Gluatamat-Assay-Puffer aufgefüllt. Danach wurden 100 μ l Reaktionsmix (90 μ l Glutamat-Assay-Puffer, 8 μ l Glutamat-Entwickler, 2 μ l Glutamat-Enzym-Mix) zu jedem *well* gefügt und bei 37°C lichtgeschützt für 30 Minuten inkubiert. Mit einem Spektrophotometer wurde bei 450 nm die optische Dichte gemessen (O.D.). Zur Berechnung der Glutamat-Konzentration wurde eine Glutamat-Standardkurve ermittelt (Abbildung 2.4.). Dazu wurde 1 mM Glutamatstammlösung soweit verdünnt, dass sich in einer 96-*well*-Platte verschiedene Glutamat-Standardkurvenwerte von 0, 2, 4, 6, 8 und 10 nmol/well befanden. Diese wurden anschließend ebenfalls mit dem Reaktionsmix behandelt und vermessen. Anhand der Standardkurve konnten die Konzentrationen der Proben errechnet werden. (Formel: $C = Sa/Sv$, nmol/ μ l; Sa: unbekannter Probenwert (nmol) von der Standardkurve abgelesen; Sv Proben Volumen in μ l welches in die *wells* gegeben wurde). Als Hintergrundbeleuchtung wurde von allen Messwerten der gemessene Glutamat-Standardkurvenwert bei 0 nmol/well abgezogen.

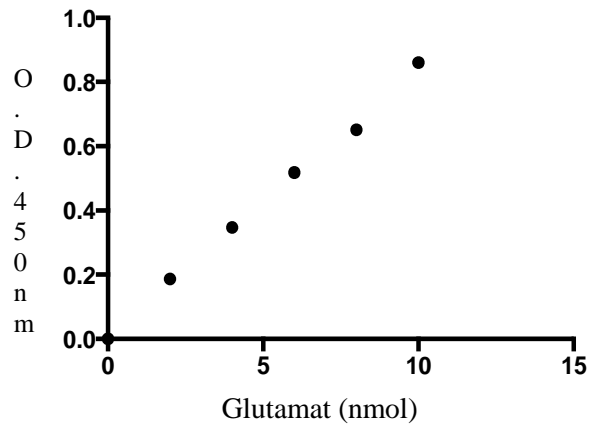


Abbildung 2.4. Glutamat-Standardkurve

2.2.8. Methoden der Statistik

Die Ergebnisse sind als Mittelwerte und Fehlerindikatoren in den Diagrammen als Standardfehler (SEM, „standard error of the mean“) dargestellt. Zur statistischen Analyse wurden ein zweiseitiger Studentischer t-Test und die einseitige Varianzanalyse (ANOVA) mit anschließendem Posttest (Bonferroni) durchgeführt. Als statistisch signifikant wurden Unterschiede zwischen den Gruppen bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit unter 5 % ($p < 0,05$) bezeichnet und ein $p < 0,001$ wurde als hochsignifikant bewertet. Die statistische Auswertung erfolgte mit den Programmen GraphPad Instat 3 und GraphPad Prism 5.

3. Ergebnisse

3.1. Optimierung der Behandlungsprotokolle mit Glutamat bzw. Ceftriaxon

3.1.1. Optimierung der Konzentration von Glutamat zur Induktion von Apoptose in primären Astrozyten der Ratte

Während eines Schlaganfalles kommt es zu einer verstärkten Ausschüttung des exzitatorischen Neurotransmitters Glutamat, der in erhöhten Konzentrationen neurotoxisch wirkt (Choi, 1988).

In dieser Untersuchung sollte diejenige Glutamat-Konzentration gefunden werden, welche den größtmöglichen apoptotischen Effekt erzeugt. Gleichzeitig wurde untersucht, ob das β -Laktam-Antibiotikum Ceftriaxon selbst einen apoptotischen Effekt auf primäre Astrozyten ausübt. Für diese Untersuchung wurden Astrozyten entsprechend den unter 2.2.5.2 und 2.2.5.3. beschriebenen Protokollen mit Ceftriaxon für 24 Stunden in Konzentrationen von 1 μ M, 10 μ M, 100 μ M oder Glutamat in Konzentrationen zu 10 mM, 50 mM, 100 mM und 1 M behandelt. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die im gleichen Behandlungszeitraum nur mit Hungermedium ohne Ceftriaxon oder Glutamat behandelt wurden. Anschließend wurde mit Hilfe des Caspase-Glo 3/7 Assays die Aktivität der apoptotischen Marker, Caspase 3 und 7, mit einem Luminometer gemessen.

In Abbildung 3.1. sind die Ergebnisse dieser Untersuchung dargestellt. Es zeigt sich eine signifikante apoptotische Aktivität bei der Behandlung primärer Astrozyten mit 100 mM Glutamat gegenüber der Negativkontrolle (Vehikel). Anhand dieses Ergebnisses wurden in den folgenden Untersuchungen immer 100 mM Glutamat eingesetzt. Gleichzeitig lassen die Ergebnisse dieser Untersuchung erkennen, dass keine der hier gewählten Ceftriaxon-Konzentrationen zu einer gesteigerten Apoptose, im Vergleich zur Negativkontrolle geführt hat.

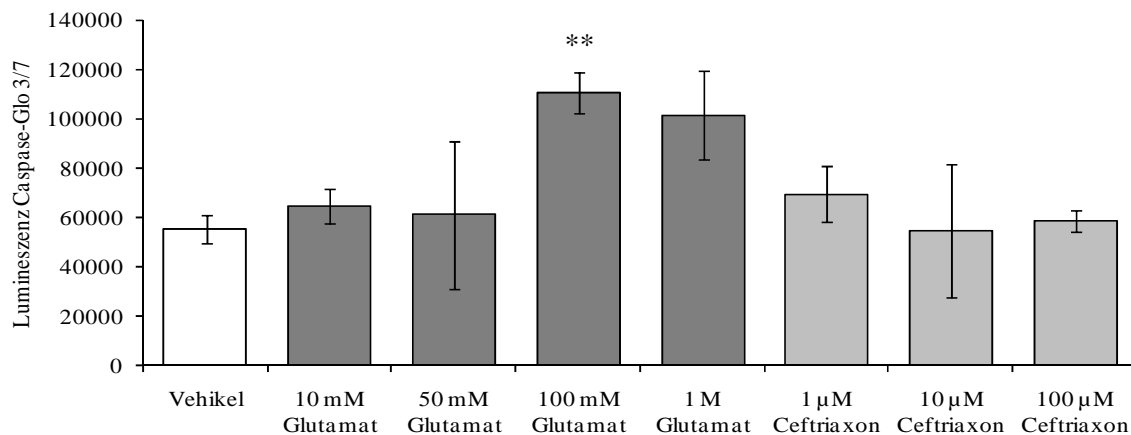


Abbildung 3.1. Graphische Darstellung der Aktivität der apoptotischen Marker Caspase 3 und 7 in Astrozyten der Ratte nach Behandlung mit unterschiedlichen Glutamat- und Ceftriaxon-Konzentrationen, Darstellung der Lumineszenz, (n=3, **p<0,01 vs. Vehikel).

3.1.2. Optimierung der Inkubationszeit mit Glutamat zur Induktion von Apoptose, Inflammation und einer Hemmung der Neuroprotektion in primären Astrozyten der Ratte

Um den optimalen Zeitpunkt zur Induktion von Apoptose, Inflammation und einer Hemmung der Neuroprotektion in primären Astrozyten der Ratte zu ermitteln, wurden Astrozyten gemäß Protokoll 2.2.5.4. für einen Zeitraum von 1, 3, 6, 12 oder 24 Stunden mit 100 mM Glutamat behandelt. Anschließend wurde in den folgenden Untersuchungen die Genexpression des inflammatorischen Zytokins IL-6, von neurotrophen Faktoren (BDNF und NGF β) und Apoptose-Markern (Bax, BCL-2) mittels quantitativer *Real-time* PCR gemessen. Als Negativkontrolle (Vehikel) dienten Astrozyten, die nur in Medium inkubiert waren. Die einzelnen Schritte wie Isolierung der RNA, Umschreiben in cDNA, die quantitative *Real-time* PCR mit spezifischen Primern unter gleichzeitiger Normalisierung auf 18S-rRNA, wurden wie in Kapitel 2.2.3. beschrieben durchgeführt. Die Expressionsdaten stammen aus drei unabhängigen Versuchsansätzen mit jeweils technischen Triplikaten, wobei hier jeweils eine repräsentative Grafik gezeigt wird.

3.1.2.1. Untersuchung der IL-6-mRNA-Expression nach verschiedenen Inkubationszeiten mit Glutamat

Zur Untersuchung der IL-6-mRNA-Expression wurde eine *Real-time* PCR mit dem SYBR Green® Housemix und dem entsprechenden Temperaturprofil durchgeführt. In Abbildung 3.2. ist die graphische Darstellung dieser Untersuchung zu sehen.

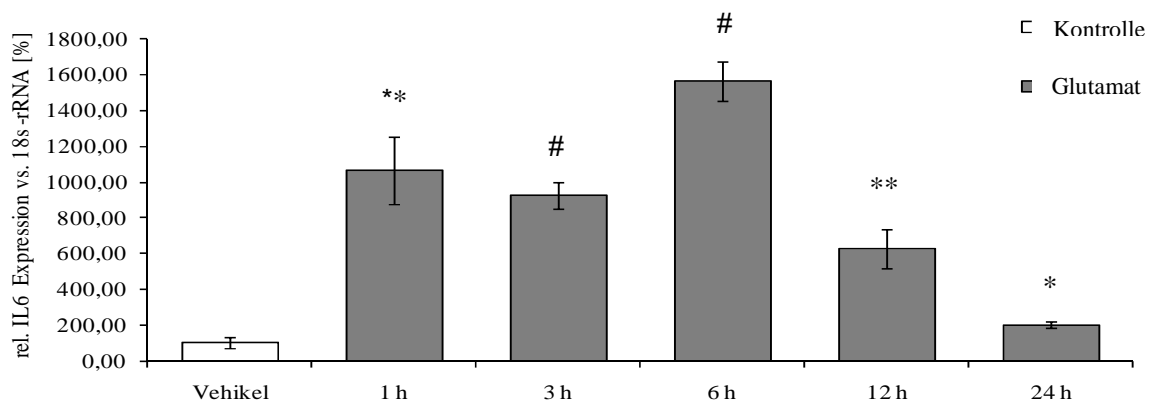


Abbildung 3.2. Zeitlicher Verlauf der relativen IL-6-mRNA-Expression in kultivierten Astrozyten der Ratte nach Stimulation mit 100 mM Glutamat, normalisiert auf 18S-rRNA-Expression, dargestellt in Prozent relativ zur Kontrolle (100%) (repräsentative Grafik aus n=3; *p<0,05 vs. Vehikel, **p<0,01 vs. Vehikel, #p<0,001 vs. Vehikel).

Die Stimulation mit Glutamat zeigt nach allen untersuchten Zeitintervallen einen signifikanten Anstieg der IL-6-mRNA-Expression verglichen mit der Kontrollgruppe (Vehikel). Dabei ist eine stetige Zunahme der Expression bis zum 6-Stunden-Behandlungszeitpunkt zu beobachten, wobei es danach in den Zeitpunkten 12 und 24 Stunden zu einem Abfall der IL-6-mRNA-Expression, jedoch nicht unter das Expressionsniveau der Negativkontrolle kommt. Hochsignifikant fällt der Unterschied beim Vergleich der Glutamat-Behandlungsgruppen 3 und 6 Stunden mit der Negativkontrolle aus.

3.1.2.2. Untersuchung der Bax-mRNA-Expression nach verschiedenen Inkubationszeiten mit Glutamat

In Abbildung 3.3. sind die Ergebnisse der Bax-mRNA-Expression unter Verwendung des Power SYBR Green® Mastermix in der *Real-time* PCR dargestellt. Nach 1 und 3 Stunden Inkubation mit 100 mM Glutamat ist eine minimale, nicht signifikante Verminderung der mRNA-

Expression des pro-apoptotischen Markers Bax im Vergleich zur Negativkontrolle zu erkennen. Nach 6, 12 und 24 Stunden Glutamat-Behandlung steigt die Bax-mRNA-Expression an, wobei die 12-Stunden-Behandlung mit Glutamat eine signifikant gesteigerte Expression der Bax-mRNA gegenüber der Kontrollgruppe (Vehikel) bewirkt.

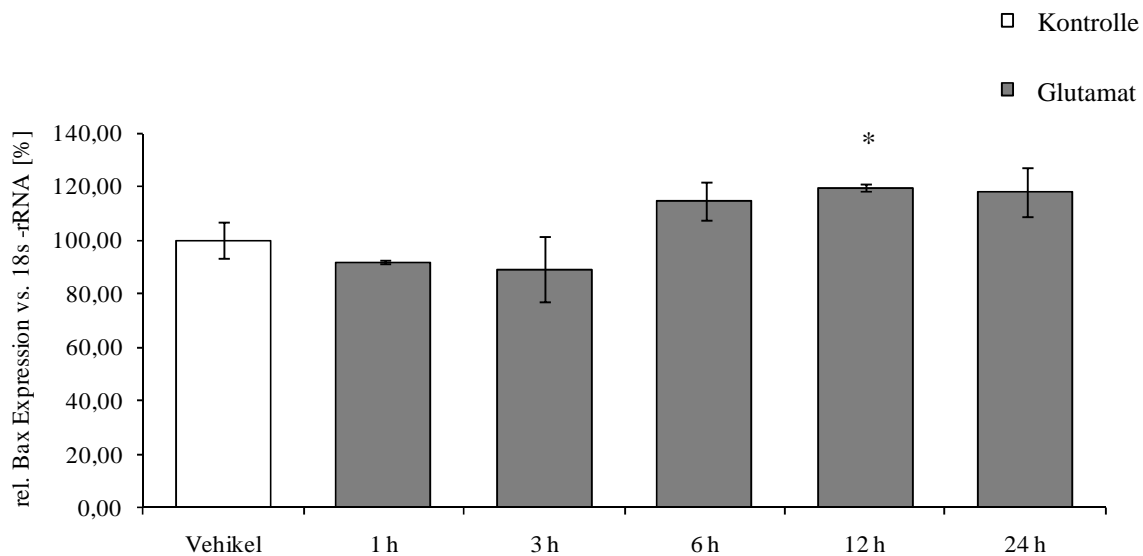


Abbildung 3.3. Zeitlicher Verlauf der relativen Bax-mRNA-Expression in kultivierten Astrozyten der Ratte nach Stimulation mit 100 mM Glutamat, normalisiert auf 18S-rRNA-Expression, dargestellt in Prozent relativ zur Kontrolle (100%) (repräsentative Grafik aus n=3; *p<0,05 vs. Vehikel).

3.1.2.3. Untersuchung der BCL-2-mRNA-Expression nach verschiedenen Inkubationszeiten mit Glutamat

Der quantitative Nachweis des anti-apoptotischen Markers BCL-2 auf mRNA-Ebene erfolgte durch eine *Real-time* PCR mit dem kommerziellen Power SYBR Green® Mastermix. In Abbildung 3.4. ist der zeitliche Verlauf der Genexpression graphisch dargestellt. BCL-2 zeigt bereits nach 3 Stunden eine signifikante Senkung der Genexpression unter Glutamat-Behandlung im Vergleich zur Kontrollgruppe (Vehikel). Diese signifikante Senkung bestand nach 6, 12 bzw. 24 Stunden Inkubationszeit fort.

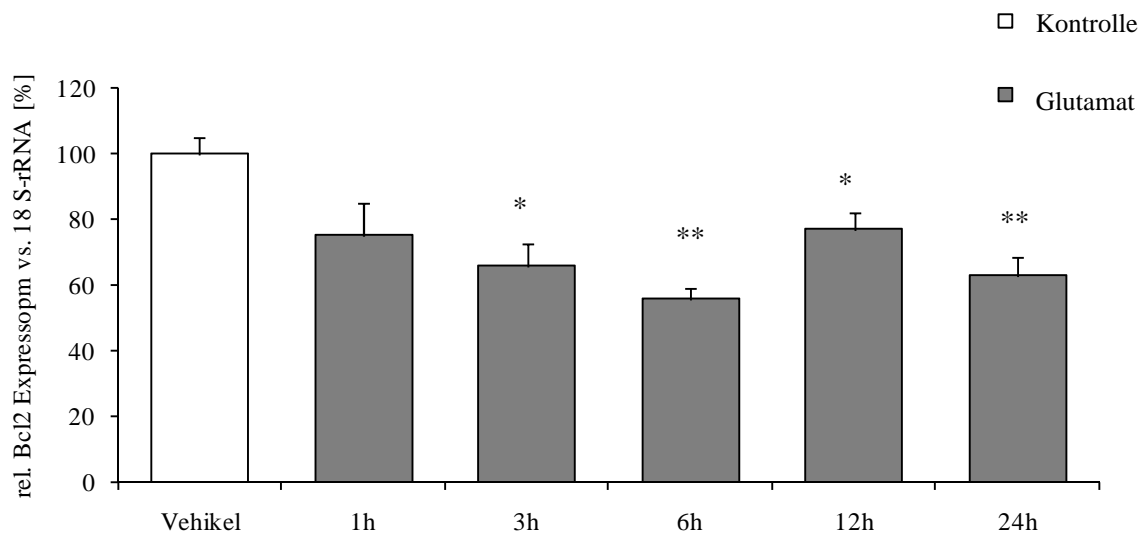


Abbildung 3.4. Zeitlicher Verlauf der relativen BCL-2-mRNA-Expression in kultivierten Astrozyten der Ratte nach Stimulation mit 100 mM Glutamat, normalisiert auf 18S-rRNA-Expression, dargestellt in Prozent relativ zur Kontrolle (100%) (repräsentative Grafik aus n=3; *p<0,05 vs. Vehikel, **p<0,01 vs. Vehikel).

3.1.2.4. Untersuchung der BDNF-mRNA-Expression nach verschiedenen Inkubationszeiten mit Glutamat

Zur Evaluierung der BDNF-mRNA-Expression wurde eine *Real-Time* PCR mit dem Power SYBR Green® Mastermix und dem entsprechenden Temperaturprofil durchgeführt. Wie aus der Abbildung 3.5. zu ersehen ist, steigt bereits nach 1 Stunde Glutamat-Behandlung die BDNF-mRNA-Expression im Vergleich zur Negativkontrolle an. Nach 3 Stunden Inkubation ist dieser Effekt signifikant. Im weiteren Zeitverlauf sinkt die Genexpression von BDNF wieder ab. Obwohl tendenziell eine Erhöhung im Vergleich zum Expressionsniveau der Negativkontrolle (Vehikel) bestehen bleibt, ist dieser Unterschied nach 6, 12 und 24 Stunden Inkubation nicht mehr statistisch signifikant.

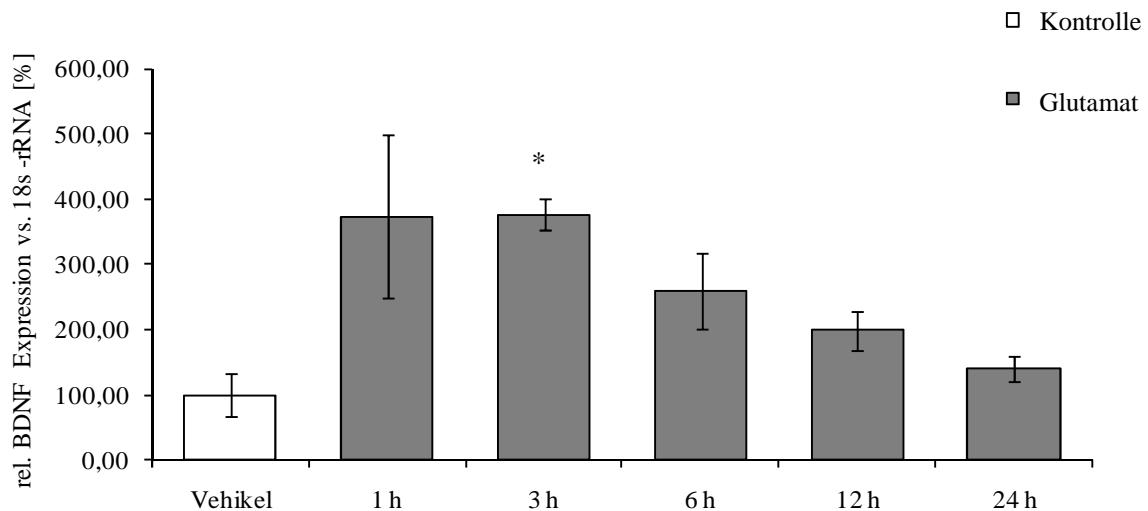


Abbildung 3.5. Zeitlicher Verlauf der relativen BDNF-mRNA-Expression in kultivierten Astrozyten der Ratte nach Stimulation mit 100 mM Glutamat, normalisiert auf 18S-rRNA-Expression, dargestellt in Prozent relativ zur Kontrolle (100%) (repräsentative Grafik aus n=3; *p<0,05 vs. Vehikel).

3.1.2.5. Untersuchung NGFβ-mRNA-Expression nach verschiedenen Inkubationszeiten mit Glutamat

In Abbildung 3.6. sind die Ergebnisse der Messung der NGFβ-mRNA-Expression unter Verwendung des SYBR Green® Housemix in der *Real-time* PCR veranschaulicht. Die NGFβ-mRNA-Expression verändert sich nach 1 und 3 Stunden Glutamat-Behandlung zunächst nicht signifikant gegenüber der Negativkontrolle. Jedoch ist zu erkennen, dass nach 6 und 12 Stunden Behandlung primärer Astrozyten mit Glutamat die Expression der NGFβ-mRNA im Vergleich zur Kontrollgruppe (Vehikel) signifikant ansteigt. Nach 24 Stunden Inkubation ist keine signifikante Steigerung mehr erkennbar.

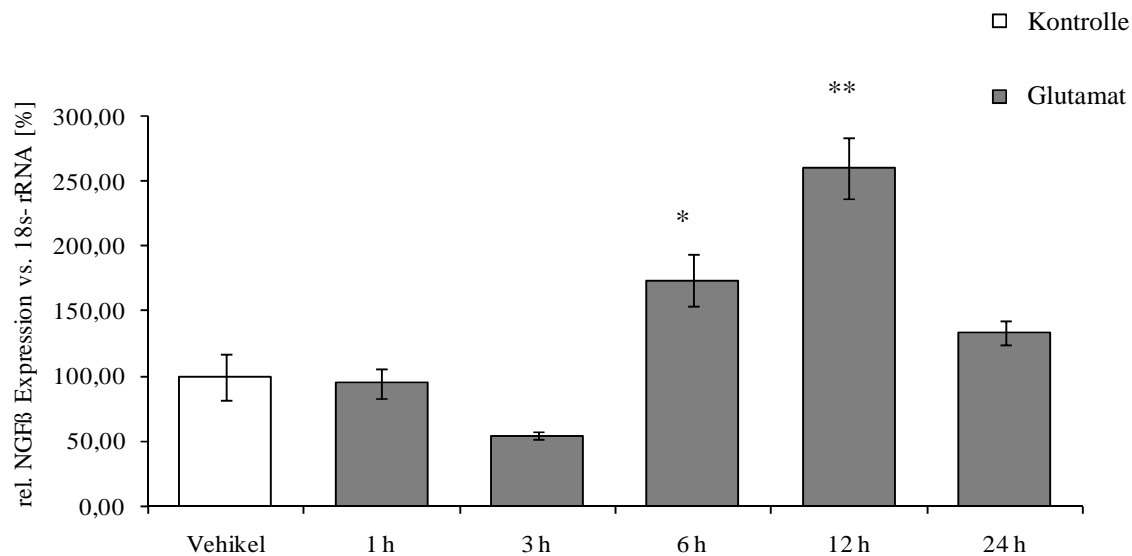


Abbildung 3.6. Zeitlicher Verlauf der relativen NGFβ-mRNA-Expression in kultivierten Astrozyten der Ratte nach Stimulation mit 100 mM Glutamat, normalisiert auf 18S-rRNA-Expression, dargestellt in Prozent relativ zur Kontrolle (100%) (repräsentative Grafik aus n=3; *p<0,05 vs. Vehikel, **p<0,01 vs. Vehikel).

3.1.2.6. Festlegung des Protokolls für die weiteren Versuche

Aufgrund der oben beschriebenen Vorversuche wurden für die weiteren Versuche eine Dosierung von 100 mM Glutamat sowie eine Inkubationszeit der Astrozyten mit Glutamat von 12 Stunden gewählt. Die Inkubationsdauer von 12 Stunden wurde gewählt, da in den Vorversuchen alle Marker bis auf BDNF nach 12 Stunden signifikant gegenüber der Kontrolle verändert waren. Eine Inkubationszeit, nach der alle Marker signifikant reguliert waren, gab es nicht. Die Dosierung von Ceftriaxon wurde entsprechen publizierter Daten anderer Gruppen gewählt (Rothstein et al., 2005; Thöne-Reineke et al., 2008).

3.2. Wirkungen von Ceftriaxon auf primäre Astrozyten der Ratte im Glutamat-Modell

Zur Analyse von möglichen neuroprotektiven, molekularen Mechanismen, die durch Ceftriaxon induziert werden könnten, wurde die Genexpression von inflammatorischen Zytokinen, neurotrophen Faktoren und Apoptose-Markern in primären Astrozyten mittels *Real-time* PCR gemessen. Wie unter 2.2.5.5. dargestellt, erhielten primäre Astrozyten der Ratte in der Behandlungsgruppe Ceftriaxon/Glutamat eine Vorbehandlung mit Ceftriaxon (100 μM) bzw. in der Behandlungsgruppe Vehikel/Glutamat eine Vorbehandlung mit einem entsprechenden Volumen H₂O für jeweils 24, 12 oder 6 Stunden. Anschließend erfolgte ein Mediumwechsel und

die Zellen wurden für 12 Stunden entsprechend den Behandlungsgruppen mit 100 mM Glutamat plus 100 μ M Ceftriaxon oder 100 mM Glutamat plus einem adäquaten Volumen H_2O 100 μ M (Glutamat Kontrolle) behandelt. Die Negativkontrolle (Vehikel) erhielt frisches Medium mit einem entsprechenden Volumen H_2O . Die Expressionsdaten stammen aus drei unabhängigen Versuchsansätzen mit jeweils technischen Triplikaten, wobei hier jeweils eine repräsentative Grafik gezeigt wird. Zum Verständnis des Behandlungsprotokolls ist dieses hier noch einmal graphisch dargestellt.

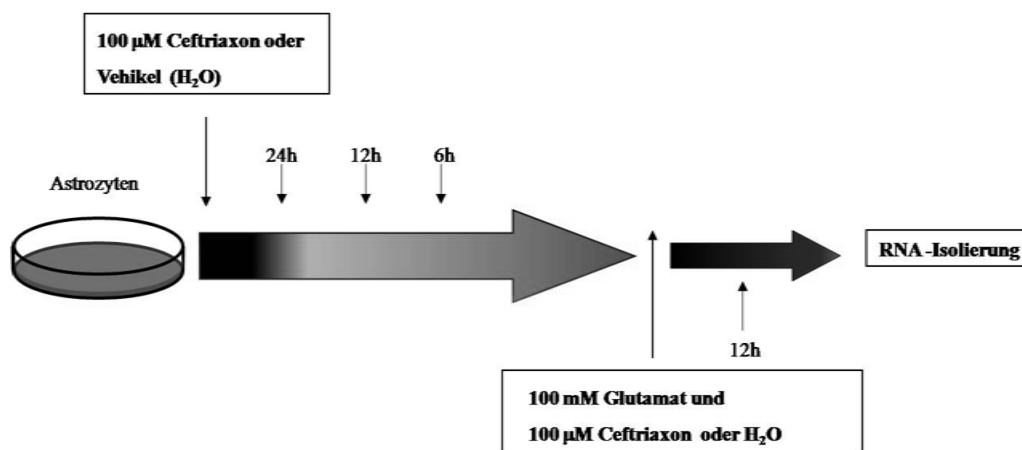


Abbildung 3.7. Schematische Darstellung der Behandlung primärer Astrozyten mit Ceftriaxon und Glutamat.

3.2.1. Einfluss von Ceftriaxon auf die IL-6-mRNA-Expression im Glutamat-Modell

Zur Untersuchung der IL-6-mRNA-Expression wurde eine *Real-time* PCR mit dem Power SYBR Green[®] Mastermix, jeweils bezogen auf die 18S-rRNA, durchgeführt. Wie in der Abbildung 3.8. veranschaulicht, zeigten sich im Vergleich zu den Expressionswerten der Negativkontrolle (Vehikel) zu allen Zeitpunkten hochsignifikant gesteigerte Expressionswerte für die IL6-mRNA in der Gruppe der Vehikel/Glutamat-behandelten primären Astrozyten. Das β -Laktam-Antibiotikum Ceftriaxon wirkte der Glutamat-vermittelte Expressionssteigerung von IL-6-mRNA nach 6, 12 oder 24 Stunden Inkubation hochsignifikant entgegen.

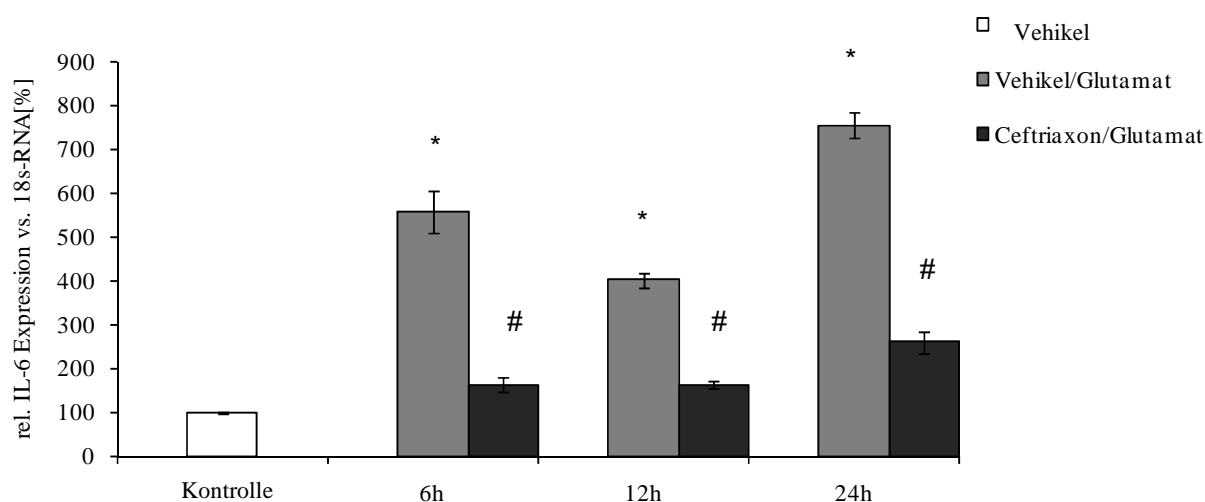


Abbildung 3.8. Relative IL-6-mRNA-Expression in kultivierten Astrozyten der Ratte nach 6, 12 oder 24 Stunden Vorbehandlung mit 100 μ M Ceftriaxon oder Vehikel (H₂O) und anschließender, 12-stündiger Stimulation mit 100 mM Glutamat/H₂O (Vehikel/Glutamat Gruppe), 100 mM Glutamat/100 μ M Ceftriaxon (Ceftriaxon/Glutamat Gruppe) oder Medium/H₂O (Kontrolle); jeweils normalisiert auf 18S-rRNA-Expression, dargestellt in Prozent relativ zur Kontrolle (100%) (repräsentative Grafik aus n=3; *p<0.001 Vehikel vs. Vehikel/Glutamat; #p<0,001 Vehikel/Glutamat vs. Ceftriaxon/Glutamat).

3.2.2. Einfluss von Ceftriaxon auf die Bax-mRNA-Expression im Glutamat-Modell

Durch eine *Real-time* PCR mit dem Power SYBR Green[®] Mastermix wurde die Bax-mRNA-Expression, jeweils bezogen auf die 18S-rRNA, untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.9. dargestellt. Bei Betrachtung der Daten zeigt sich im Vergleich der Gruppen zu allen Zeitpunkten eine hochsignifikante Steigerung der Bax-mRNA-Expression bei den Zellen mit Vehikel/Glutamat-Behandlung gegenüber den Zellen der Negativkontrolle. Die Bax-mRNA-

Expression wird zu den Zeitpunkten 6, 12 und 24 Stunden hochsignifikant durch Behandlung der Zellen mit Ceftriaxon im Vergleich zur Vehikel/Glutamat-Gruppe vermindert.

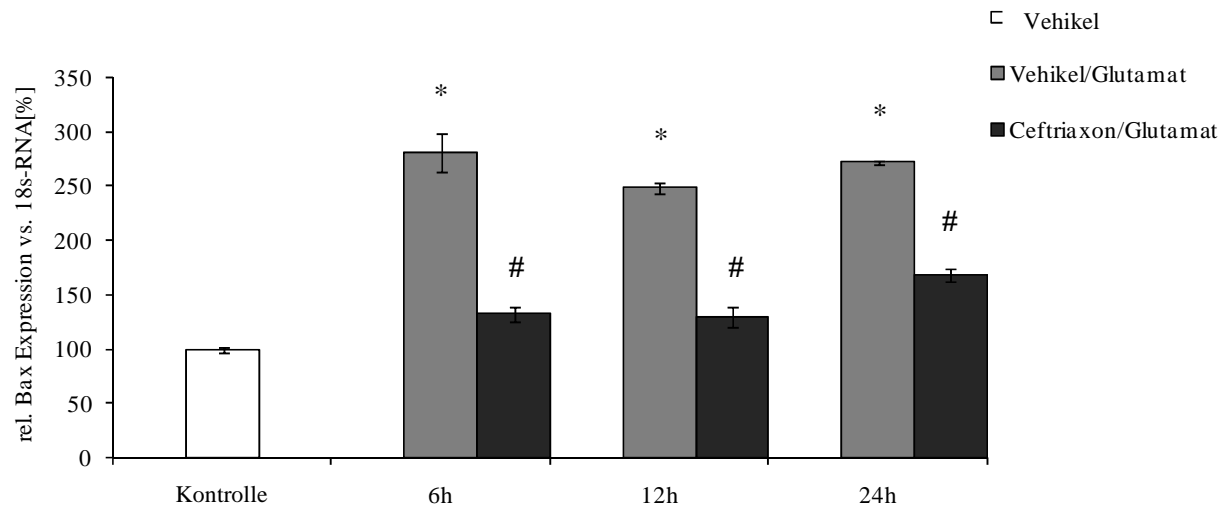


Abbildung 3.9. Relative Bax-mRNA-Expression in kultivierten Astrozyten der Ratte nach 6, 12 oder 24 Stunden Vorbehandlung mit 100 μ M Ceftriaxon oder Vehikel (H_2O) und anschließender, 12-stündiger Stimulation mit 100 mM Glutamat/ H_2O (Vehikel/Glutamat Gruppe), 100 mM Glutamat/100 μ M Ceftriaxon (Ceftriaxon/Glutamat Gruppe) oder Medium/ H_2O (Kontrolle); jeweils normalisiert auf 18S-rRNA-Expression, dargestellt in Prozent relativ zur Kontrolle (100%) (repräsentative Grafik aus $n=3$; * $p<0.001$ Vehikel vs. Vehikel/Glutamat; # $p<0,001$ Vehikel/Glutamat vs. Ceftriaxon/Glutamat).

3.2.3. Einfluss von Ceftriaxon auf die BCL-2-mRNA-Expression im Glutamat-Modell

In Abbildung 3.10. sind die Ergebnisse der Messung der BCL-2-mRNA-Expression im Bezug auf die 18S-rRNA- Expression unter Verwendung des Power SYBR Green[®] Mastermix in der *Real-time* PCR dargestellt. Tendenziell ist eine Senkung der BCL-2-mRNA in der Behandlungsgruppe Vehikel/Glutamat im Vergleich zur Kontrollgruppe Vehikel zu erkennen. Es lässt sich eine Steigerung der BCL-2-mRNA-Expression zu den Zeitpunkten 12 und 24 Stunden durch Ceftriaxon im Vergleich zur Behandlungsgruppe Vehikel/Glutamat beobachten. Alle diese Expressionsänderungen erreichen jedoch nicht statistische Signifikanz.

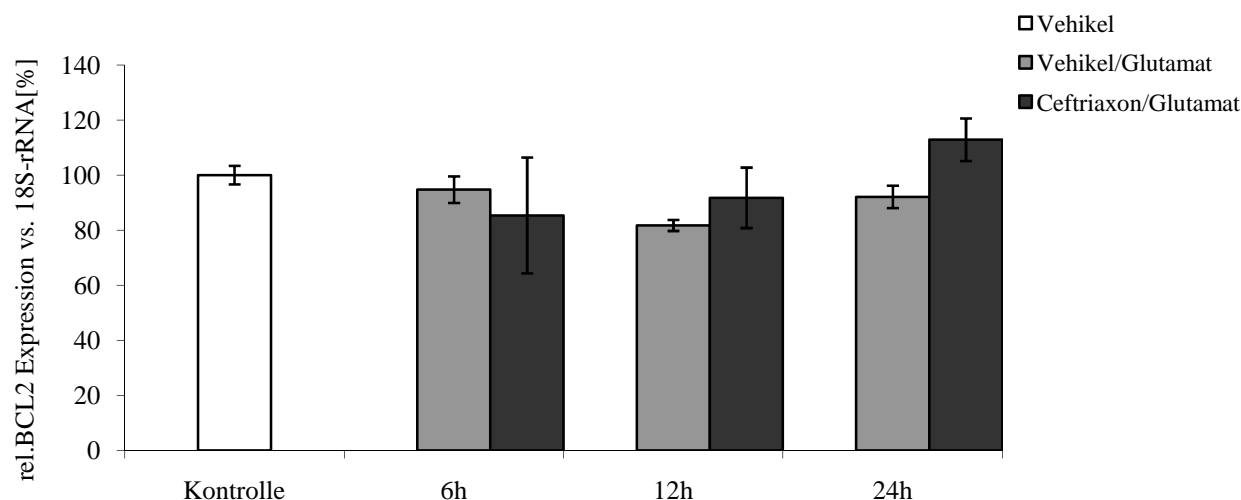


Abbildung 3.10. Relative BCL-2-mRNA-Expression in kultivierten Astrozyten der Ratte nach 6, 12 oder 24 Stunden Vorbehandlung mit 100 μ M Ceftriaxon oder Vehikel (H_2O) und anschließender, 12-stündiger Stimulation mit 100 mM Glutamat/ H_2O (Vehikel/Glutamat Gruppe), 100 mM Glutamat/100 μ M Ceftriaxon (Ceftriaxon/Glutamat Gruppe) oder Medium/ H_2O (Kontrolle); jeweils normalisiert auf 18S-rRNA-Expression, dargestellt in Prozent relativ zur Kontrolle (100%) (repräsentative Grafik aus $n=3$).

3.2.4. Einfluss von Ceftriaxon auf die BDNF-mRNA-Expression im Glutamat-Modell

Zur Evaluierung der BDNF-mRNA-Expression wurde eine *Real-time* PCR mit dem Power SYBR Green[®] Mastermix durchgeführt. Dabei wurden die Expressionsdaten der BDNF-mRNA jeweils auf die 18S-rRNA-Expression bezogen. Nach 6 Stunden Vorbehandlung mit Ceftriaxon sinkt die BDNF-mRNA-Expression in der Gruppe Ceftriaxon/Glutamat tendenziell, jedoch nicht signifikant gegenüber der Gruppe Vehikel/Glutamat ab, während nach 12 und 24 Stunden ein Trend zu einer gesteigerten BDNF-Expression in der Ceftriaxon/Glutamat gegenüber der Vehikel/Glutamat Gruppe erkennbar ist. Alle Veränderungen in der Expression erreichen jedoch nicht statistische Signifikanz (Abbildung 3.11.).

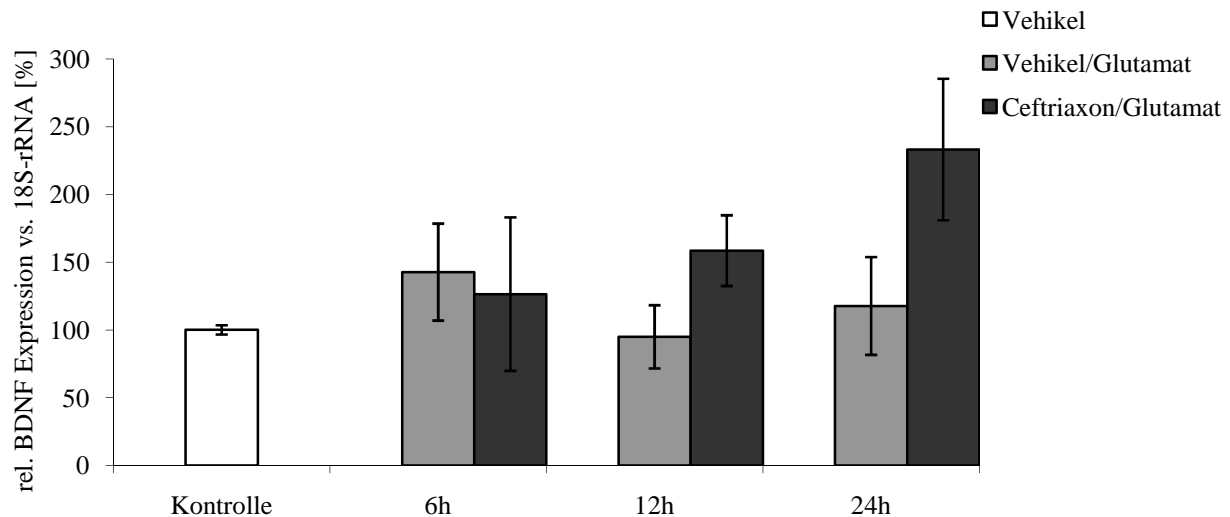


Abbildung 3.11. Relative BDNF-mRNA-Expression in kultivierten Astrozyten der Ratte nach 6, 12 oder 24 Stunden Vorbehandlung mit 100 μ M Ceftriaxon oder Vehikel (H_2O) und anschließender, 12-stündiger Stimulation mit 100 mM Glutamat/ H_2O (Vehikel/Glutamat Gruppe), 100 mM Glutamat/100 μ M Ceftriaxon (Ceftriaxon/Glutamat Gruppe) oder Medium/ H_2O (Kontrolle); jeweils normalisiert auf 18S-rRNA-Expression, dargestellt in Prozent relativ zur Kontrolle (100%) (repräsentative Grafik aus $n=3$).

3.2.5. Einfluss von Ceftriaxon auf die NGF β -mRNA-Expression im Glutamat-Modell

Die Daten zur Untersuchung der Expression der NGF β -mRNA wurden per *Real-time* PCR mit dem Power SYBR Green[®] Mastermix ermittelt und auf die 18S-rRNA normalisiert. Bei vergleichender Betrachtung der Negativkontrolle Vehikel mit den Gruppen Ceftriaxon/Glutamat sowie Vehikel/Glutamat zeigt sich eine signifikante Steigerung der Expression des Neurotrophins NGF β zu allen gemessenen Zeitpunkten (Abbildung 3.12.). Die 6-, 12- und 24-stündigen Vorbehandlungen der Zellen mit Ceftriaxon führten alle zu einer Expressionssteigerung der NGF β -mRNA im Vergleich zur Vehikel/Glutamat Gruppe. Im Falle der 12- und 24-stündigen Inkubation war diese Steigerung statistisch signifikant.

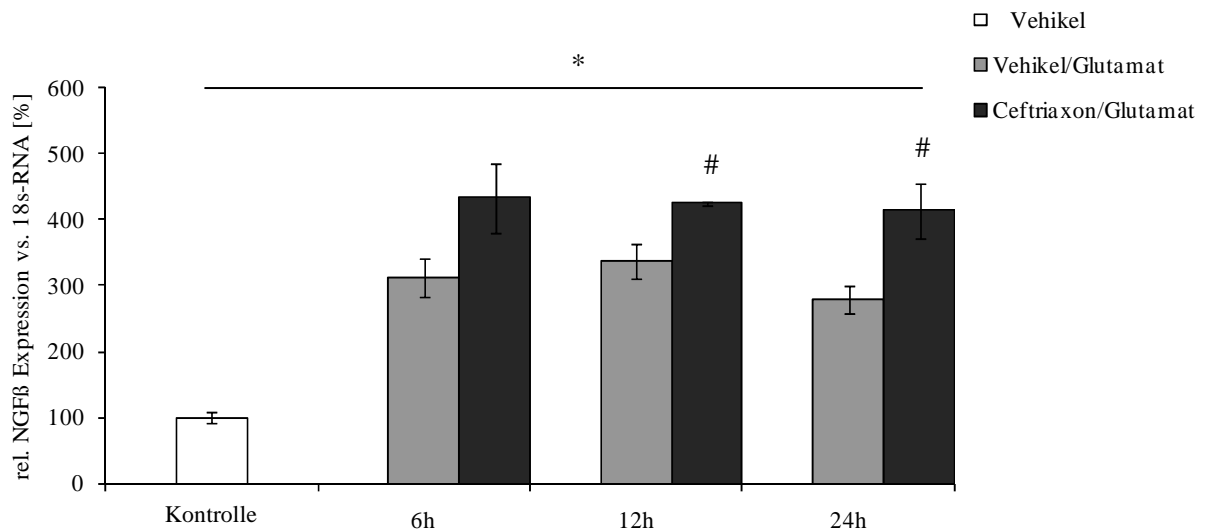


Abbildung 3.12. Relative NGF β -mRNA-Expression in kultivierten Astrozyten der Ratte nach 6, 12 oder 24 Stunden Vorbehandlung mit 100 μ M Ceftriaxon oder Vehikel (H₂O) und anschließender, 12-stündiger Stimulation mit 100 mM Glutamat/H₂O (Vehikel/Glutamat Gruppe), 100 mM Glutamat/100 μ M Ceftriaxon (Ceftriaxon/Glutamat Gruppe) oder Medium/H₂O (Kontrolle); jeweils normalisiert auf 18S-rRNA-Expression, dargestellt in Prozent relativ zur Kontrolle (100%) (repräsentative Grafik aus n=3; *p<0,05 Vehikel/Glutamat oder Ceftriaxon/Glutamat vs. Vehikel; #p<0,05 Vehikel/Glutamat vs. Ceftriaxon/Glutamat).

3.3. Evaluierung der Apoptose von Neuronen unter Glutamat- und Ceftriaxon-Behandlung

Um eine mögliche direkte, protektive Wirkung von Ceftriaxon auf Glutamat-geschädigte Neuronen zu testen, wurden Neuronen der Zelllinie NG 108-15 für 24 Stunden entsprechend des in Kapitel 2.2.5. beschriebenen Protokolls mit 100 μ M Ceftriaxon plus Vehikel, 100 mM Glutamat plus Vehikel oder 100 μ M Ceftriaxon plus 100 mM Glutamat behandelt. Kontrollzellen erhielten ein entsprechendes Volumen Vehikel (H₂O). Anschließend erfolgte die Färbung mit Acridinorange / Ethidiumbromid zur Anfärbung apoptotischer Zellen, die unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgezählt wurden. Die Daten stammen aus drei Versuchsansätzen, wobei jeweils 100 Zellen in 8 Gesichtsfeldern aus jeweils 3 *wells* (800 Zellen je *well*; insgesamt 2400 Zellen je Behandlungsgruppe) ausgezählt wurden.

Die Ergebnisse der direkten Stimulation von Neuronen mit Ceftriaxon und/oder Glutamat sind in der Abbildung 3.13. graphisch dargestellt. Dabei ist zu erkennen, dass im Vergleich zur Negativkontrolle (Vehikel), Glutamat allein und in Kombination mit Ceftriaxon eine signifikante Steigerung der Anzahl apoptotischer Zellen bewirkt. Es besteht jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen Glutamat-behandelten Zellen mit oder ohne Zugabe von Ceftriaxon.

Ceftriaxon scheint also keinen direkten Einfluss auf die Glutamat-induzierte Apoptose in neuronalen Zellen zu haben.

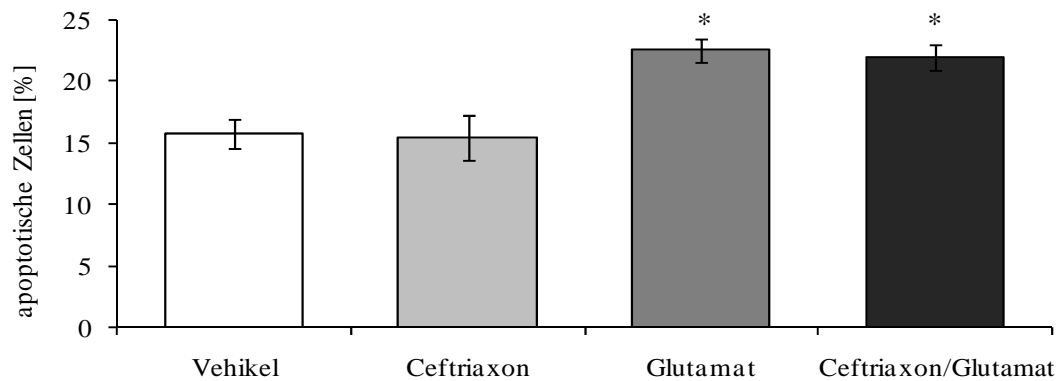


Abbildung 3.13. Anfärbung apoptotischer Zellen mittels Acridinorange/Ethidiumbromid-Färbung: Prozentualer Anteil apoptotischer, neuronaler Zellen (Zelllinie NG 108-15) an der Gesamtzellzahl nach 24-stündiger Inkubation mit Vehikel, 100 μ M Ceftriaxon und / oder 100 mM Glutamat (n= 3, *p< 0,05 vs. Vehikel).

In Abbildung 3.14. sind die Ergebnisse der Behandlung von Neuronen mit Astrozyten-konditioniertem-Medium aufgeführt. Hierzu wurden zunächst Astrozyten mit Glutamat, Ceftriaxon, Glutamat + Ceftriaxon oder Vehikel für 24 Stunden inkubiert. Das „konditionierte“ Astrozytenmedium wurde anschließend zur Inkubation von neuronalen NG 108-15 für weitere 24 Stunden verwendet. Im Vergleich der Gruppen ist eine signifikant größere Anzahl apoptotischer, neuronaler Zellen nach Inkubation in Medium Glutamat-behandelter Astrozyten als in Medium Vehikel-behandelter Astrozyten zu verzeichnen. Wurden die Astrozyten jedoch zusätzlich zu Glutamat auch mit Ceftriaxon behandelt, so führt die Inkubation der Neuronen im entsprechenden Medium nur zu einer geringen, nicht signifikanten Steigerung der Anzahl apoptotischer Neurone. Im Vergleich zur Glutamat Gruppe ist die Anzahl apoptotischer Neurone in der Glutamat/Ceftriaxon Gruppe signifikant niedriger. Die Behandlung mit konditioniertem Medium von mit Ceftriaxon alleine behandelten Astrozyten hatte keinen Einfluss auf die Zahl apoptotischer Zellen.

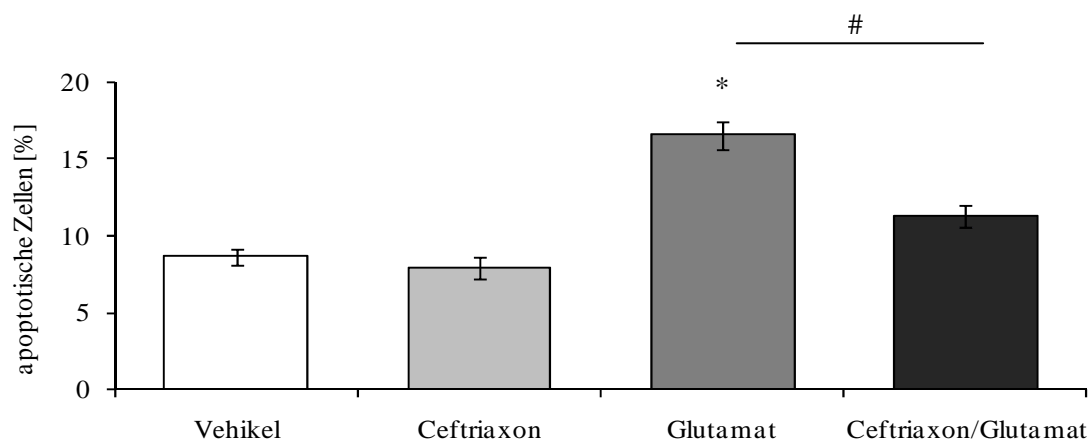


Abbildung 3.14. Anfärbung apoptotischer Zellen mittels Acridinorange/Ethidiumbromid-Färbung: Prozentualer Anteil apoptotischer, neuronaler Zellen (Zelllinie NG 108-15) an der Gesamtzellzahl nach 24-stündiger Inkubation mit Astrozyten-konditionierten-Medium. Die Beschriftung der x-Achse zeigt die Behandlung der Astrozyten vor Zugabe des Mediums zu den NG 108-15 Zellen. (n= 3, *p< 0,01 vs. Vehikel; #p<0.05 Vehikel/Glutamat vs. Ceftriaxon/Glutamat).

Astrozyten-konditioniertes-Medium und die Caspase 3 und 7 Aktivität

Wie in 2.2.6.4. beschrieben, wurde die Wirkung der Behandlung von Neuronen der Zelllinie NG 108-15 mit Astrozyten-konditioniertem-Medium, welches zuvor 24 Stunden in den Behandlungsgruppen Vehikel (Medium mit entsprechenden Volumen H₂O), 100 µM Ceftriaxon, Glutamat (100 mM) und 100 µM Ceftriaxon / 100 mM Glutamat auf Astrozyten inkubiert war, auch mittels Caspase-Glo 3/7 Assay gemessen. Die Daten stammen aus drei unabhängigen Versuchsansätzen mit jeweiligen Triplikaten, wobei hier eine repräsentative Grafik (Abb. 3.15) gezeigt wird. Dabei ist zu beobachten, dass die Behandlung der Neuronen mit Medium von Glutamat-behandelten Astrozyten mit und ohne Zugabe von Ceftriaxon eine signifikante Steigerung der Lumineszenz also der Aktivität der Caspase 3 und 7 im Vergleich zur Kontrollgruppe Vehikel bewirkt. Unter der Behandlung mit Medium Ceftriaxon/Glutamat-inkubierter Astrozyten ist zwar eine Tendenz zu einer Senkung der Caspase Aktivität im Vergleich zur Behandlungsgruppe Glutamat feststellbar, jedoch erreicht dieser Unterschied keine statistische Signifikanz.

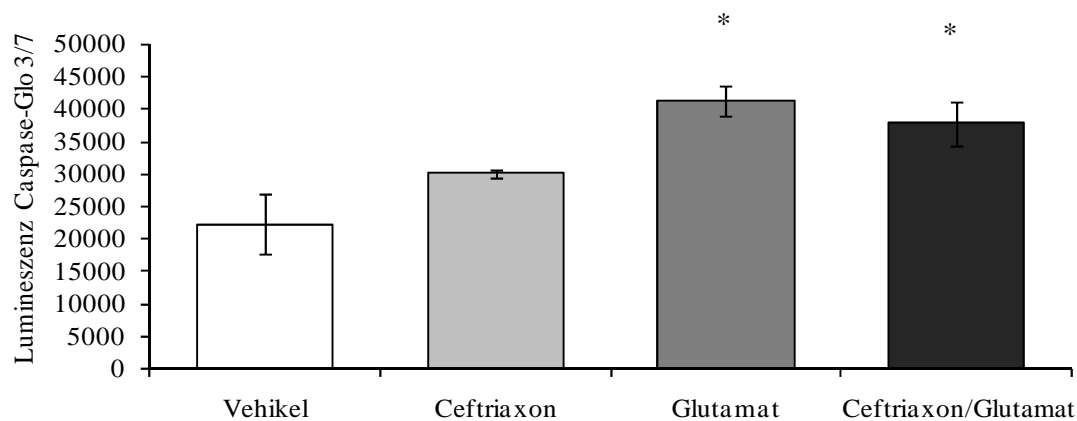


Abbildung 3.15. Graphische Darstellung der Aktivität des apoptotischen Marker Caspase 3 und 7 in Neuronen (Zelllinie NG 108-15), nach 24-stündiger Stimulation mit Astrozyten-konditionierten-Medium, Darstellung der Lumineszenz (eine repräsentative Grafik aus $n=3$, $*p < 0,05$ vs. Vehikel).

3.4. Evaluierung der Glutamat-Aufnahme von primären Astrozyten der Ratte unter Ceftriaxon-Behandlung

Primäre Astrozyten wurden entsprechend Protokoll 2.2.7. mit 10 nM Glutamat mit oder ohne Zugabe von 100 μ M Ceftriaxon für 24 Stunden behandelt. Als Negativkontrolle (Vehikel) diente Medium mit einem adäquaten Volumen H_2O . Anschließend wurde die Glutamat-Konzentration sowohl in den Astrozyten als auch im Medium mittels eines kommerziellen, kolorimetrischen Assays gemessen und anhand einer Glutamat-Standardkurve ermittelt. Die Ergebnisse der Glutamat-Messung in den Astrozyten sind in der Abbildung 3.16. graphisch dargestellt. Wie dabei zu erkennen ist, führt die Gabe von Ceftriaxon zusätzlich zu Glutamat zu einer signifikant erhöhten Exstinktion im Zelllysate, was einen erhöhten intrazellulären Glutamat-Gehalt in Ceftriaxon-behandelten Zellen gegenüber nicht-Ceftriaxon-behandelten Zellen (Kontrolle und Glutamat Behandlung) anzeigt.

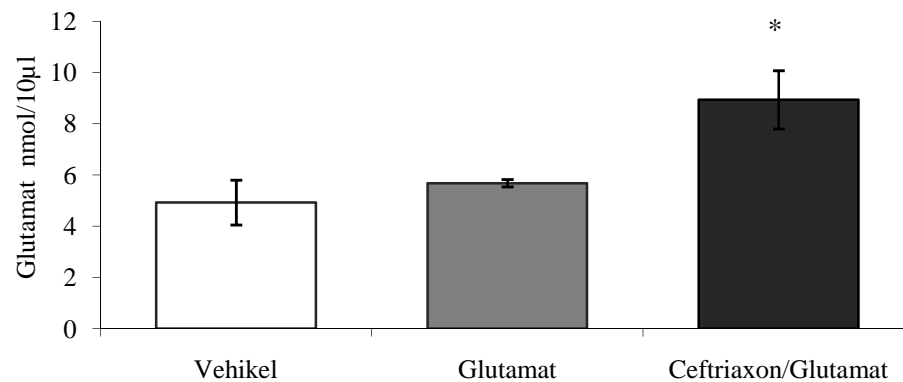


Abbildung 3.16. Graphische Darstellung der intrazellulären Glutamat-Konzentration (nmol/10µl) in primären Astrozyten der Ratte nach 24-stündiger Stimulation mit 10 nM Glutamat oder 100 µM Ceftriaxon / 10 nM Glutamat oder Vehikel, (Messung in Triplikaten, * $p < 0,05$ vs. Vehikel).

In der Abbildung 3.17. ist die graphische Darstellung der Glutamat-Messung im Astrozyten-Medium zu sehen. Im Medium Glutamat-behandelter Zellen ist – wie zu erwarten – eine signifikant erhöhte Exstinktion bzw. Konzentration von Glutamat gegenüber der Negativkontrolle zu beobachten. Im Vergleich der Behandlungsgruppen Glutamat und Ceftriaxon/Glutamat zeigt sich unter zusätzlicher Gabe von Ceftriaxon eine signifikant verringerte Glutamat-Konzentration im Medium, was ebenso wie die Messungen der Glutamat-Konzentration in den Astrozyten darauf hindeutet, dass Ceftriaxon-behandelte Astrozyten vermehrt Glutamat aufnehmen.

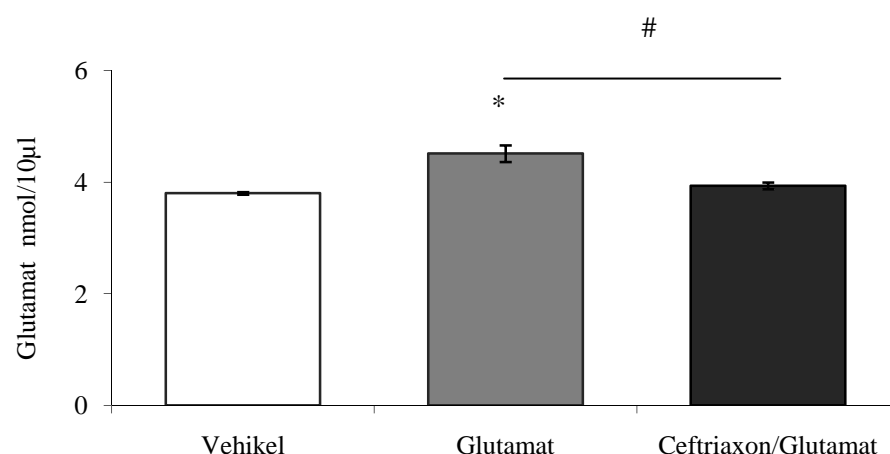


Abbildung 3.17. Graphische Darstellung der Glutamat-Konzentration (nmol/10µl) in Astrozyten-konditioniertem-Medium nach Kultivierung von 10 nM Glutamat bzw. 100 µM Ceftriaxon / 10 nM Glutamat oder Vehikel für 24 Stunden, (Triplikate eines repräsentativen Experiments, * $p < 0,01$ vs. Vehikel, # $p < 0,05$ Vehikel/Glutamat vs. Ceftriaxon/Glutamat).

4. Diskussion

Der Schlaganfall stellt eine der häufigsten vaskulären Erkrankungen dar (Kolominsky-Rabas und Heuschmann, 2002), wobei die Inzidenz unter Berücksichtigung der fortschreitenden Alterung der Bevölkerung weiter zunehmen wird. In aktuellen Forschungen wird die Neuroprotektion als ein neuer pharmakologischer Therapieansatz betrachtet, der zum Ziel hat, die bei einer zerebralen Ischämie ausgelöste Kaskade von pathologischen Prozessen zu vermindern. Dabei stehen insbesondere die sogenannte Exzitotoxizität sowie die Entzündung und Apoptose im Mittelpunkt der Untersuchungen. Ein neuer vielversprechender pharmakologischer Ansatzpunkt ist gegenwärtig das β -Laktam-Antibiotikum Ceftriaxon. Eine wichtige, bisher wenig untersuchte Schlüsselrolle nehmen dabei die Astrozyten ein. Neben der Signalweiterleitung und Versorgung der Neuronen mit Nährstoffen tragen sie entscheidend zur Aufnahme von Glutamat bei und limitieren somit den exzitotoxischen Zellschaden der benachbarten Neuronen. Diese Arbeit soll die molekularen neuroprotektiven Mechanismen aufklären, die durch Ceftriaxon im Rahmen einer Ischämie in den Astrozyten hervorgerufen werden. Zu diesem Zweck wurde ein Glutamat-Modell zur Simulierung einer Exzitotoxizität entwickelt, in welchem die Wirkung von Ceftriaxon studiert werden konnte.

4.1. Einfluss von Glutamat auf primäre Astrozyten der Ratte – Entwicklung des Glutamat-Modells

Eine fokale zerebrale Ischämie führt über die verstärkte Ausschüttung von Glutamat zur Überstimulation von Glutamatrezeptoren und zum Anstieg des Calcium-Einstroms in Neuronen, wobei diese Mechanismen zur Apoptose von Gehirnzellen beitragen (Dirnagl et al., 1999).

Es wurde in dieser Arbeit ein Modell entwickelt um die neurotoxische Wirkung von Glutamat im Rahmen einer Ischämie zu simulieren. Anhand des Modells konnten verschiedene Dosierungen von Glutamat und Ceftriaxon effektiv und schnell in der Zellkultur getestet werden. Primäre Astrozyten von Ratten wurde in entsprechenden Zellkulturplatten (*wells*) angezüchtet, bis zur Konfluenz kultiviert und dann für die Experimente verwendet. Dabei war es jedoch aus technischen Gründen nicht möglich immer die exakt gleiche Zellzahl in den *wells* zu haben. Zur Vermeidung von Messfehlern wurden daher bei jedem Zellkulturexperiment 3 Proben pro Gruppe benutzt sowie insgesamt das Experiment dreimal wiederholt.

Die Messung der durch Glutamat entstehenden Apoptose in der Zellkultur erfolgte mit Hilfe des Caspase Glo 3/7 Assays. Denn die Effektor-Caspasen 3 und 7 vermitteln in der apoptotischen Signalkaskade letztendlich den programmierten Zelltod (Bredesen, 2000).

Daher wurden die Caspasen 3 und 7 in dieser Arbeit als biochemische Marker zur Untersuchung der Apoptose verwendet.

Bei einer Glutamat-Konzentration von 100 mM wurde eine signifikante Aktivität der pro-apoptotischen Caspasen 3 und 7 nachgewiesen (Abbildung 3.1.). Entsprechend diesem Ergebnis wurden für eine optimale Induzierung eines Schadens, an dem anschließend die Effekte von Ceftriaxon erforscht werden können, im *in-vitro* Glutamat-Modell immer 100 mM Glutamat verwendet. Dieses Ergebnis ist auch mit einer Studie von Szydłowska *et al.* vereinbar. Sie konnten mittels *western-blot*-Analyse eine Akkumulation der aktiven Caspase 3 nach Behandlung von Astrozyten der Ratte mit 100 mM Glutamat für 24 Stunden zeigen (Szydłowska *et al.*, 2006).

Die Glutamat-vermittelte Neurotoxizität und die Erforschung neuroprotektiver Substanzen wurden jedoch in den meisten Studien hauptsächlich an Neuronen durchgeführt. Diesbezüglich wurden sehr viel geringere Glutamat-Konzentrationen (0,5 mM bis 1 mM) im Vergleich zur vorliegenden Arbeit eingesetzt, wodurch eine signifikante Exzitotoxizität erzielt werden konnte (Semkova *et al.*, 1999; Perovic *et al.*, 1996). Die Nutzung von geringeren Glutamat-Konzentrationen bei Neuronen gegenüber höheren Konzentrationen bei Astrozyten im Rahmen eines induzierten ischämischen Zelltodes im *in-vitro* Modell kann sich mit einer höheren Vulnerabilität von Neuronen gegenüber Glutamat begründen lassen. Die höhere Vulnerabilität der Neuronen lässt sich durch das Fehlen der Glutamin-Synthetase erklären. Diese befindet sich nur in Astrozyten, welche damit in der Lage sind Glutamat zu Glutamin umzuwandeln. Glutamin ist nicht als Neurotransmitter wirksam und seine extrazelluläre Konzentration liegt bei 0,25 mM (Hertz *et al.*, 1999). Glutamin kann nach extrazellulärer Ausschüttung von den Neuronen aufgenommen werden und durch die Phosphat-aktivierte Glutaminase wieder zu Glutamat umgewandelt werden (Danbolt, 2001).

Nach Optimierung der Glutamatdosis von 100 mM wurden Zeit-Wirkungs-Verläufe erstellt. Zu verschiedenen Behandlungszeitpunkten von 1 bis 24 h wurde die Wirkung von Glutamat auf Astrozyten durch die Genexpression von inflammatorischen Zytokinen und Apoptose-Markern sowie Neurotrophenen ermittelt. Dies diente zur Klärung, ob sich das in dieser Arbeit benutzte Glutamat-Modell an den Gegebenheiten *in-vivo* im Rahmen einer Exzitotoxizität anlehnen kann und welches der optimale Behandlungszeitpunkt für Ceftriaxon im Zellkulturmodell ist. Die einzelnen Ergebnisse werden entsprechend in den nächsten Kapiteln diskutiert.

4.1.1. Glutamat-induzierte Entzündung

Das Zytokin IL-6 spielt eine wichtige Rolle bei Entzündungsreaktionen. Im ZNS ist es an pathologischen Prozessen wie einem Schlaganfall und neurodegenerativen Erkrankungen beteiligt. Verschiedene Zellen des ZNS sind in der Lage, IL-6 zu produzieren, wobei Astrozyten eine der Hauptquellen für IL-6 darstellen (Van Wagoner und Benveniste, 1999).

So konnte *in-vitro* nach einer mechanischen oder metabolischen Ischämie eine Expressionssteigerung des IL-6-Proteins in Astrozyten von Mäusen gezeigt werden (Lau und Yu, 2001). Ein starker Anstieg der IL-6-mRNA wurde nach 4 bis 8 Stunden in einem hypoxischen und einem hypoglykämischen Ischämie-Modell beobachtet (Yu und Lau 2000).

Auch ein exzitotoxischer Schaden durch eine Injektion mit N-Methyl-D-Aspartat in das Gehirn von neugeborenen Ratten führte zu einer Erhöhung des IL-6-Proteins in Neuronen (Acarin et al., 2000). In Übereinstimmung mit diesen Studien zeigt sich auch im hier genutzten Ischämie-Modell, dass eine 1- bis 24-stündige Glutamat-Behandlung in Astrozyten eine signifikante Steigerung der IL-6-mRNA-Expression induziert. Unter dem Gesichtspunkt seiner pro-inflammatorischen Funktion unterstützt dieses Ergebnis eindeutig die Beteiligung von IL-6 bei der Entwicklung eines exzitotoxischen Schadens. Das in dieser Arbeit genutzte Glutamat-Modell zur Simulierung einer Exzitotoxizität konnte somit gefestigt werden.

4.1.2. Glutamat-induzierte Apoptose

Die Regulation der Apoptose spielt bei einer Ischämie eine wichtige Rolle. So werden nicht nur pro-apoptotische Gene wie Bax sondern auch anti-apoptotische Gene wie BCL-2 vermehrt ausgeschüttet (Dirnagl et al., 1999). Krajewski *et al.* konnte *in-vivo* eine Steigerung des Bax-Protein-Levels nach cerebraler Ischämie an hippocampalen CA1-Neuronen und Purkinje-Zellen des Kleinhirns der Ratte feststellen (Krajewski et al., 1995). Eine Induzierung der Bax-mRNA und des Proteins in CA1-Neuronen des Hippocampus nach einer cerebralen globalen Ischämie wurde ebenfalls von Chen *et al.* gezeigt (Chen et al., 1996). Ferner konnte an neuronalen Zelllinien direkt die neurotoxische Wirkung des Glutamats *in-vitro* nachgewiesen werden. So führte eine Behandlung von 10 mM Glutamat für 6 Stunden zu einem Anstieg des Bax-Protein-Levels (Schelman et al., 2004). Xiang *et al.* beobachteten ebenfalls an Neuronen von Mäusen eine Glutamat-vermittelte Steigerung des Bax-Proteins nach 24 Stunden (Xiang et al., 1998). Auch in der vorliegenden Arbeit an Astrozyten konnte eine signifikante Expressionssteigerung der Bax-mRNA nach 12-stündiger Glutamat-Behandlung festgestellt

werden. Dies zeigt zusätzlich zur erhöhten Caspase 3- und 7-Aktivität, dass die gewählte Glutamat-Konzentration zu einem adäquaten Zellschaden führt und Glutamat eine potente neurotoxische Substanz ist.

Das BCL-2-Protein ist ein potenter Inhibitor des programmierten Zelltodes (Yang und Korsmeyer, 1996). Außerdem wurde eine Erhöhung der BCL-2-mRNA (Chen et al., 1997) und des BCL-2-Proteins nach cerebralen Ischämien in mehreren *in-vivo* Studien beobachtet (Shimazaki et al., 1994; Chen et al., 1995, 1997). Dabei wurde eine Induktion des BCL-2-Proteins hauptsächlich in überlebenden Neuronen nachgewiesen, was wiederum für seine protektive Rolle spricht.

In dem in dieser Arbeit benutztem *in-vitro* Glutamat-Modell zeigte sich jedoch eine signifikante Abnahme der BCL-2-mRNA nach 3- bis 24-stündiger Glutamat-Behandlung, welches eine Exzitotoxizität *in-vitro* simulieren sollte. Xu *et al.* konnten ebenfalls eine Reduzierung der BCL-2-mRNA in Astrozyten nach einer Glutamat-Behandlung feststellen (Xu et al., 2009). Dieser Unterschied zu den *in-vivo* Studien spiegelte sich jedoch auch *in-vitro* an Neuronen wieder. Hierbei führte eine Stimulation mit Glutamat zu einer Reduktion der BCL-2-mRNA und des Protein-Levels (Perovic et al., 1996; Montpied et al., 1993).

So scheint die toxische Wirkung von Glutamat so stark zu sein, dass in dessen Gegenwart keine Gegenregulation in Form einer Protektion durch Hochregulierung der BCL-2-mRNA stattfinden kann. Ferner ist bekannt, dass Bax mit BCL-2 Heterodimere bilden kann (Oltvai et al., 1993). Durch die hier vermehrte Expressionssteigerung von Bax durch Glutamat könnte dieses Gen als dominanter Inhibitor von BCL-2 fungieren und so für dessen fehlende Induktion verantwortlich sein. Im Rahmen einer Glutamat-vermittelten Exzitotoxizität sind die regulatorischen Transkriptionswege, die zu einer Steigerung von Bax und zu einer Reduzierung von BCL-2 führen, jedoch noch nicht genau bekannt. Miyashita *et al.* konnten zeigen, dass p53 bei der Regulation der Transkription von Bax und BCL-2 eine wichtige Funktion einnimmt. So stimuliert p53 die Expression von Bax und kann die BCL-2-Expression verringern (Miyashita et al., 1994; Miyashita und Reed, 1995). Es zeigte sich auch, dass es nur bei der Anwesenheit von p53 zu einer Erhöhung des Bax-Proteins durch Glutamat kam (Xiang et al., 1998). Schlussfolgernd scheint das Gleichgewicht zwischen Bax und BCL-2 im Rahmen einer Ischämie eine entscheidende Rolle bei der Regulation von Apoptose und Überleben zu spielen.

4.1.3. Glutamat-induzierte Bildung von Neurotrophinen

Die Glutamat-Behandlung von primären Astrozyten der Ratte führte in der vorliegenden Arbeit zu einer signifikanten Expressionssteigerung der NGF β -mRNA nach 6 und 12 Stunden und zu einer signifikanten Hochregulierung der BDNF-mRNA nach 3 Stunden.

Neurotrophine sind wichtige Faktoren, die das Überleben und Wachstum von Neuronen im ZNS steuern (Huang und Reichardt, 2001). Astrozyten können in bedeutendem Umfang Neurotrophine ausbilden und so das neuronale Überleben beeinflussen (Furukawa et al., 1986). Viele Studien unterstreichen die neuroprotektiven Wirkungen der Neurotrophine unter Ischämie-ähnlichen Bedingungen. So schützte *in-vitro* eine Vorinkubation mit NGF, hippocampale Neuronen der Ratte und humane kortikale Neuronen gegenüber einer Hypoglykämie (Cheng und Mattson, 1991). BDNF zeigte ebenfalls neuroprotektive Effekte innerhalb eines Hypoglykämie-Modells in kortikalen und hippocampalen Zellkulturen von Neuronen der Ratte (Cheng und Mattson, 1994). Ebenso verhinderte NGF den Tod von neuronalen Zellkulturen des Hippocampus nach einem hypoxischem Insult (Mattson und Cheng, 1993).

Die Daten von *in-vivo* Studien an cerebralen Ischämie-Modellen zeigten, dass NGF den neuronalen Schaden reduzieren kann. Shigeno *et al.* beobachteten, dass sowohl eine Vor- und Nachbehandlung mit NGF nach einer cerebralen Ischämie zu einem signifikant verbesserten Überleben von Neuronen in der CA1-Region des Hippocampus von Wüstenrennmäusen führte (Shigeno et al., 1991).

Die neuroprotektiven Effekte der Neurotrophine im Rahmen einer Ischämie sind auch im Rahmen der Glutamat-Toxizität von Bedeutung. NGF reduzierte die Größe der exzitotoxischen Läsionen im Striatum von Ratten nach Injektion mit Chinolinsäure, einem NMDA-Rezeptor-Agonisten (Frim et al., 1993). Desweiteren schützte BDNF neuronale Zellkulturen des Hippocampus vor einer Glutamat-vermittelten Toxizität (Cheng und Mattson, 1994). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Arbeit berichtete Wu *et al.* über eine NGF- und BDNF-mRNA-Expressionssteigerung nach 100 μ M Glutamat-Behandlung von 4 Stunden in den untersuchten Astrozyten-Kulturen (Wu et al., 2004). Auch Pechán *et al.* konnte in Astrozyten einen Anstieg von NGF-mRNA durch Glutamat nachweisen (Pechán et al., 1993). An Gliazellen in der Retina, den sogenannten Müller-Zellen, der Ratte führte eine Inkubation mit Glutamat ebenfalls zu einer Steigerung der NGF- und BDNF-Protein-Level (Taylor et al., 2003). Die *in-vitro* Studien werden von *in-vivo* Untersuchungen unterstützt, die einen Anstieg der Neurotrophine NGF und BDNF nach einer cerebralen Ischämie beobachteten (Lindvall et al., 1992; Takeda et al., 1993). Durch die Expressionssteigerung *in-vivo* kann es zu einer

Regeneration des zerstörten Neuronennetzwerkes und einem Aussprossen von neuronalen Fortsätzen kommen.

In der Literatur bereits bekannt, unterstützen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit eindeutig, dass Astrozyten in der Lage sind, Neurotrophine auszuschütten (Furukawa et al., 1986; Mallat et al., 1988; Pechán et al., 1993). Durch die neuroprotektive Wirkung der Neurotrophine können sich Astrozyten selbst oder Neurone vor einer Glutamat-vermittelten Neurotoxizität schützen. Astrozyten könnten so dazu beitragen, dass Sie neben Ihrer bekannten Fähigkeit Glutamat aufzunehmen und zu verstoffwechseln, auch durch die Bildung von neurotrophen Faktoren während einer Ischämie, Neurone vor einem weiteren Zelluntergang bewahren und Ihr Überleben verbessern.

4.2. Die neuroprotektive Wirkung von Ceftriaxon

Um zunächst abzuklären, dass das eingesetzte β -Laktam-Antibiotikum Ceftriaxon *in-vitro* an Astrozyten keine eigene, zellschädigenden Wirkungen entwickelt, wurde die Aktivität der Caspasen 3 und 7 von Astrozyten nach 24-stündiger Ceftriaxon-Behandlung gemessen, wobei kein signifikanter Anstieg der Apoptose ermittelt werden konnte. Daraus lässt sich schließen, dass Ceftriaxon nicht toxisch gegenüber Astrozyten ist. Die Dosierung von Ceftriaxon in dieser Arbeit wurde in Anlehnung an die Studie von Rothstein *et al.* gewählt (Rothstein et al., 2005). Somit wurden hier Astrozyten mit 100 μ M Ceftriaxon behandelt, wobei Thöne-Reineke *et al.* ebenfalls Dosierungen von 100 μ M benutzten (Thöne-Reineke et al., 2008).

Wie bereits oben beschrieben konnte in dem hier verwendeten Glutamat-Modell eine signifikante Steigerung der Apoptose, Inflammation und Ausschüttung von Neurotrophinen innerhalb von 1 bis 24 h nach Behandlung mit Glutamat erzielt werden. Für diese Arbeit legte man sich auf den Behandlungszeitpunkt von 12 h fest, an dem die Wirkung von Ceftriaxon studiert werden konnte. Es wurde sich für 12 h entschieden um sich möglichst zeitnah an die Geschehnisse *in-vivo* anzulehnen. Denn bereits 1999 wurde durch Dirnagl *et al.* veranschaulicht, dass ein zerebraler Infarkt eine bestimmte Reihenfolge von schädigenden Ereignissen auslöst. Durch Exzitotoxizität ausgelöst, kommt es im Zeitraum von 12 bis 24 h nach einem Infarkt zu einer vermehrten Entzündungsreaktion im Randgebiet des Infarktes (Dirnagl et al., 1999). Auch muss man bedenken, dass die Experimente in kleinen Zellkulturplatten (24-wells) durchgeführt wurden und sich daher der Mediumwechsel auf mindestens alle 2 Tage belief. Somit sollte die

Messung der Apoptose oder Inflammation in maximal 48h erfolgt sein, ohne die Ergebnisse durch zusätzlichen Nährstoffmangel zu beeinflussen.

Im Glutamat-Modell konnte hier bereits nach 1 h eine signifikante Steigerung der IL-6-mRNA im Vergleich zum Vehikel gemessen werden. Dies veranschaulicht, dass die neurotoxische Wirkung des in dieser Arbeit genutzten Zellkulturmodells sehr rasch eintritt. Um die molekularbiologische Wirkung von Ceftriaxon *in-vitro* zu testen, entschieden wir uns für eine Vorbehandlung mit Ceftriaxon zu den Zeitpunkten 6-, 12- und 24 h mit einer anschließenden Behandlungszeit von Glutamat über 12h in Kombination mit Ceftriaxon.

4.2.1. Reduktion der Entzündung durch Ceftriaxon

Wie in 4.1.1. beschrieben kam es im Behandlungszeitraum von 1- bis 24 h zu einem signifikanten Anstieg der IL-6-mRNA durch Glutamat. Es zeigte sich, dass zu jeder Zeit eine deutliche Entzündungsreaktion hervorgerufen werden konnte. In Anlehnung an die Geschehnisse *in-vivo*, erfolgte die Testung von unterschiedlichen Ceftriaxon-Vorbehandlungszeitpunkten unter der Glutamat-Belastung von 12 h (siehe 4.2.). In diesen Experimenten führte eine Vorbehandlung mit Ceftriaxon über 6, 12 oder 24 h vor Zugabe von Glutamat sowie über weitere 12 h nach Zugabe von Glutamat zu einer signifikanten Senkung der IL-6-m-RNA-Expression. Damit konnte in der vorliegenden Arbeit deutlich die anti-inflammatorische Wirkung von Ceftriaxon auf primäre Astrozyten der Ratte demonstriert werden. Bei Gesamtbetrachtung dieses Ergebnisses könnte so auch indirekt ein neuronales Überleben gesichert werden, indem die Astrozyten durch Ceftriaxon der Entzündungsreaktion widerstehen und ihre Aufgaben, besonders die Glutamat-Reduktion, weiter vornehmen können.

Chu *et al.* kamen jedoch zu einem anderen Ergebnis. In dieser Studie im MCAO-Modell der Ratte zeigte eine Vorbehandlung mit Ceftriaxon über 5 Tage keinen Effekt auf die IL-6-m-RNA-Expression. Allerdings erfolgte die Messung nicht nur an Astrozyten, sondern am gesamten ischämischen Hirnabschnitt. So konnte man keine direkte Wirkung auf die einzelnen unterschiedlichen Zellpopulationen feststellen. Auch erfolgte die Messung erst 24 h nach der Ischämie und Ceftriaxon wurde in dieser Zeit nicht weiter verabreicht (Chu *et al.*, 2007). Ebenfalls kam es zu keinem Effekt auf die IL-6-mRNA-Expression in der Studie von Thöne-Reineke *et al.* Dort erfolgte die Messung auch an Hirnabschnitten und erst 48 h nach der Ischämie wobei keine Vorbehandlung stattfand, sondern eine einmalige Gabe von Ceftriaxon, 90 min nach dem Hirninfarkt erfolgte (Thöne-Reineke *et al.*, 2008). So ergeben sich aus unterschiedlichen Modellen, diverse Ergebnisse. Die protektive Wirkung von Ceftriaxon scheint

dabei abhängig von der Zellpopulation und Zellart zu sein. Desweiteren spielt der Zeitpunkt der Therapie eine entscheidende Rolle bei der Wirkung des Medikamentes.

4.2.2. Reduktion der Apoptose durch Ceftriaxon

Durch 12-stündige Glutamat-Behandlung von primären Astrozyten der Ratte konnte eine bedeutsame mRNA-Expression des pro-apoptischen Markers Bax erreicht werden. Durch eine 6- bis 24-stündige Vorbehandlung der Zellen mit Ceftriaxon gelang es in dieser Arbeit, eine signifikante Reduzierung der Apoptose bzw. der Bax-mRNA herbeizuführen. Eine signifikante Induktion des anti-apoptischen Markers BCL-2 konnte allerdings nicht gezeigt werden. Lediglich eine tendenzielle Hochregulierung nach 12- und 24 h-Vorbehandlung mit Ceftriaxon gegenüber der Kontrollgruppe Vehikel/Glutamat war ersichtlich. Auch bei der Etablierung des Glutamat-Modells führte Glutamat nicht zu einer Stimulation der BCL-2-mRNA, sondern zu einer signifikanten Reduktion. So scheint BCL-2 ein Marker zu sein, der durch Ceftriaxon nicht direkt zu beeinflussen ist. Andererseits gibt es in den verschiedenen Gehirnregionen unterschiedliche Expressionsmuster. Bcl-xl, ein zur anti-apoptischen BCL-2-Proteinfamilie gehörender Marker, ist im Rahmen einer Ischämie signifikant höher in Astrozyten aus dem Striatum nachzuweisen, als in Astrozyten aus anderen Gehirnregionen (Xu et al., 2001). In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Messung an Astrozyten, die aus dem gesamten Gehirn von neonatalen primären Ratten entstammten. Zukünftig könnte man also auch erwägen, eine Untersuchung an primären Astrozyten der Ratte aus unterschiedlichen Gehirnabschnitten vorzunehmen. Denn Astrozyten sowie Neuronen aus den verschiedenen Regionen zeigen eine unterschiedliche Reaktion auf Stress (Xu et al., 2001).

4.2.3. Gesteigerte Expression von Neurotrophinen durch Ceftriaxon

Im Rahmen des hier angewendeten Ischämie-Modells an primären Astrozyten der Ratte, führte das β -Laktam-Antibiotikum Ceftriaxon zu einem signifikanten Anstieg der NGF β -mRNA im Vorbehandlungszeitraum von 12- und 24 h gegenüber der Kontrollgruppe Vehikel/Glutamat. Auch die BDNF-mRNA Expression wurde durch Ceftriaxon erhöht, jedoch nicht signifikant. Diese Ergebnisse stimmen mit denen von Thöne-Reineke *et al.* überein, die im Bereich der peri-Infarkt-Zone einen Anstieg der Protein-Expressionen von Neurotrophinen (BDNF, NT3), 48 h nach einem Infarkt, durch einmalige Applikation von Ceftriaxon nach MCAO zeigen konnten

(Thöne-Reineke et al., 2008). Wie bereits in 4.1.3. beschrieben, können Astrozyten auch allein durch eine Überproportionalität an Glutamat vermehrt Neurotrophine ausschütten.

Durch die Vorbehandlung mit Ceftriaxon wurde in der vorliegenden Arbeit dieser protektive Mechanismus noch verstärkt. Daher könnten mehr neuronale Zellen überleben und die Stabilität der astrozytären Funktionen, im Rahmen einer Ischämie aufrecht erhalten werden. Somit besitzen Astrozyten autokrine und parakrine Mechanismen, die sie selbst schützen und das neuronale Überleben unterstützen können.

4.3. Ceftriaxon und seine Wirkung auf das Astrozyten-Neuronen-Netzwerk

Das Astrozyten-Neuronen-Netzwerk könnte derzeit einer der neusten und wichtigsten Ansatzpunkte bei der Entwicklung neuer Behandlungen des Schlaganfalles darstellen. Schon 1989 konnten Rosenberg und Aizenman nachweisen, dass kortikale neuronale Kulturen signifikant weniger empfindlich gegenüber Glutamat sind, wenn sie zusammen in einem Milieu bestehend aus zahlreichen Astrozyten kultiviert werden (Rosenberg und Aizenman, 1989). In diesem Zusammenhang ist es von entscheidender Bedeutung, bei einer medikamentösen Therapie nicht nur eine Zellpopulation, wie die Neuronen, zu betrachten, sondern von einem regulatorischen Netzwerk auszugehen.

Eine pharmakologische Intervention mit Ceftriaxon, die nur auf Neuronen ausgerichtet ist, wies bereits bei Lipski und seiner Arbeitsgruppe keine positiven Erfolge auf. Ihre 5-tägige Vorinkubation der neuronalen Zellkulturen mit Ceftriaxon verhinderte weder den primären noch den verzögerten Zellschaden durch überproportional vorhandenes Glutamat (Lipski et al., 2007). So zeigte sich auch in der vorliegenden Arbeit, dass eine einfache direkte Stimulation der Neuronen mit Ceftriaxon zusammen mit Glutamat nicht ausreicht, um sie vor dem neurotoxischen Transmitter zu schützen. Allerdings konnte nachgewiesen werden, dass eine Vorinkubation der Substanzen (Ceftriaxon, Glutamat) 24 h auf Astrozyten und anschließender Applikation dieses Astrozyten-konditionierten-Mediums auf Neuronen, zu einem signifikant verringerten apoptotischen Zellschaden innerhalb von 24 h führt. Einerseits konnte dann in den neuronalen Zellkulturen eine verringerte Anzahl apoptotischer Zellen gezählt werden, andererseits sank die Caspase-7- und -3-Aktivität. Auch in einer aktuellen Studien von Beller et al., konnte in einer gemeinsamen Kultur aus Neuronen und Astrozyten nachgewiesen werden, dass eine Vorinkubation durch Ceftriaxon den neuronalen Schaden bis zu 22% reduziert (Beller et al., 2011).

Diese Ergebnisse veranschaulichen deutlich, dass es symbiotische Mechanismen zwischen Neuronen und Astrozyten geben muss, wodurch die neuroprotektive Wirkung von Ceftriaxon hervorgerufen wird. Einerseits kann man dies durch die bereits oben beschriebene Ceftriaxon-vermittelte signifikant erhöhte Neurotrophin-Produktion in Astrozyten erklären. Andererseits gibt es seit Jahren Experimente, die sich auf einen ganz simplen Faktor beziehen, nämlich die Glutamat-Aufnahme durch Astrozyten. In der Studie von Thöne-Reineke *et al.* konnte eine signifikant gesteigerte Glutamat-Aufnahme in primären Astrozyten der Ratte durch Ceftriaxon nachgewiesen werden (Thöne-Reineke *et al.*, 2008).

Auch in dem Experiment dieser Arbeit führte das β -Laktam-Antibiotikum Ceftriaxon zu einer signifikant gesteigerten Glutamat-Aufnahme in primären Astrozyten der Ratte (Abbildung 3.16. und 3.17.). Die intrazelluläre Glutamat-Konzentration in Astrozyten stieg an und parallel dazu sank sie in im Astrozyten-Medium (Astrozyten-konditioniertes-Medium). Auf diese Weise lässt sich auch erklären, warum das Astrozyten-konditionierte-Medium auf Neuronen weniger toxisch wirkte. Nicht nur die durch Astrozyten produzierten Neurotrophine, sondern auch ein verringerter Gehalt an Glutamat führten zu einem verbesserten Überleben von Neuronen. Aufgrund der hohen Kosten wurde dieses Experiment nur einmal für diese Arbeit durchgeführt. Laut aktueller Literatur sind für die Fähigkeit der Astrozyten, der Glutamatoxizität entgegenzuwirken, zwei wesentliche Mechanismen verantwortlich. Zum einen die an der Plasmamembran befindlichen GLT-1-Transporter und zum anderen ein intrazelluläres Enzym welches nur in Astrozyten vorkommt und Glutamat in Glutamin umwandeln kann, die Glutaminsynthetase (Danbolt, 2001). Mehrere Studien haben sich mit diesen Mechanismen beschäftigt und protektive Eigenschaften von Ceftriaxon durch die Expressionssteigerung (Rothstein *et al.*, 2005; Chu *et al.*, 2007; Verma *et al.*, 2010; Beller *et al.*, 2011) bzw. Aktivitätszunahme des astrozytären GLT-1-Transporters erklärt (Thöne-Reineke *et al.*, 2008). Dieser ist zu 90% für die Entfernung von Glutamat aus dem Extrazellulärraum verantwortlich (Danbolt, 2001). Laut Lee *et al.*, scheint Ceftriaxon die Transkription des GLT-1-Transporters durch den NF-kB Signalweg (nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells) zu steigern (Lee *et al.*, 2008). In Verbindung mit dem GLT-1-Transporter konnte durch Ceftriaxon ebenfalls die Aktivität der Glutaminsynthetase erhöht werden (Verma *et al.*, 2010). Des Weiteren stellt die Glutaminsynthetase auch ohne die Anwesenheit von Ceftriaxon einen natürlichen Schutzmechanismus im Falle einer Ischämie dar. Ein Anstieg von extrazellulärem Glutamat führt zu einer Induktion der Glutaminsynthetase-Aktivität (Hoshi *et al.*, 2006).

Welcher Prozess jedoch in den Astrozyten durch das vermehrte Glutamat ausgelöst wird, wurde jedoch in den Studien nicht geklärt. Daher konnte mit dieser Arbeit ein entscheidender Beitrag

zum Verständnis der protektiven molekularen Mechanismen von Ceftriaxon geleistet werden. Allerdings ist zu beachten, dass in der Literatur und der vorliegenden Arbeit die Experimente hauptsächlich an neonatalen oder ein paar Tage alten Zellen, vorzugsweise von Ratten durchgeführt wurden. Im Hinblick auf das Auftreten von Schlaganfällen im hohen Alter bleibt offen, ob das β -Laktam-Antibiotikum Ceftriaxon auch den gleichen protektiven Effekt an älteren Zellen bzw. Tieren und schließlich dem Menschen erzielen könnte. Desweiteren existieren dann neben dem Alter auch vermehrt multiple Grunderkrankungen, die eine effektive Therapie limitieren könnten.

Ein weiterer Diskussionspunkt besteht hinsichtlich der Applikation von Ceftriaxon und dem Beginn der Ischämie. In einigen Studien und der vorliegenden Arbeit führte erst eine Vorbehandlung der Zellen mit Ceftriaxon zu einem geeigneten Schutz vor Glutamattoxizität (Rothstein et al., 2005; Chu et al., 2007; Verma et al., 2010; Beller et al., 2011). Im hier genutzten *in-vitro* Glutamat-Modell tritt der schädigende Effekt von Glutamat zu rasch ein, um anschließend eine Wirkung des β -Laktam-Antibiotikums auf Zellkulturebene zu vermitteln. Durch die Vorbehandlung mit Ceftriaxon war es hier jedoch möglich, dessen molekulare Mechanismen im Rahmen einer Ischämie zu studieren. Im klinischen Bereich wäre dieser Einsatz z.B. auch als Prophylaxe vor Operationen am Hirn denkbar. Dies beschrieben Chu und Arbeitskollegen auch als „ischämische Toleranz“, mit der Begründung, dass die Expressionssteigerung des GLT-1-Transporters auch eine gewisse Zeit benötigt, um protektiv wirksam bei einer Ischämie zu sein (Chu et al., 2007).

Andererseits sollte man aber auch berücksichtigen, dass das Ziel der Schlaganfall-Therapie vorwiegend die Penumbra ist, das Randgebiet des Infarktes in dem es noch nicht zu einem irreversiblen strukturellen Schaden gekommen ist. Thöne-Reineke *et al.* konnten insbesondere in dieser Region eine Expressionssteigerung von neurotrophen Faktoren, infolge einer Applikation von Ceftriaxon 90 min nach MCAO, feststellen (Thöne-Reineke et al., 2008). Das heißt, um die durch Exzitotoxizität ausgelöste ischämische Kaskade in der Penumbra, in welcher es zusätzlich im Zeitraum von 12 bis 24 h nach einem Infarkt zu einer vermehrten Entzündungsreaktion kommt (Dirnagl et al., 1999) zu limitieren, ist eine Applikation *in-vivo* nach dem ischämischen Ereignis ebenfalls sinnvoll. Dies führt wie bereits beschrieben zu einer Aktivierung von protektiven Faktoren, die den zytotoxischen Schaden in der Penumbra reduzieren können. Dabei besteht allerdings weiterhin die Frage, in welchem Zeitraum eine therapeutische Intervention am Menschen nach einem Schlaganfall noch möglich ist, um einen irreversiblen Schaden abzuwenden. Das begrenzte Zeitfenster von 3 bis 6 h, wie bei der Nutzung der aktuellen

Thrombolyse-Therapie mit rt-PA, stellt insbesondere in ländlichen Regionen ein großes Problem dar, da zur Anwendung von rt-PA immer ein hämorrhagischer Hirninfarkt mittels Computertomographie ausgeschlossen werden muss und eine Lyse-Therapie nur in speziellen Stroke Unit Zentren erfolgen darf (Georgiadis et al., 2003). Für Ceftriaxon wäre jedoch auch eine ambulante, sofortige Applikation denkbar. Für dessen medikamentösen Einsatz gibt es derzeit kaum Kontraindikationen und es treten nur wenige Nebenwirkungen auf. Auch bezüglich der Penetration von Ceftriaxon durch die Blut-Hirn-Schranke konnten bereits eine gute Liquorgängigkeit und hohe Konzentrationsspiegel in der Cerebrospinalflüssigkeit im Rahmen von bakteriellen Hirninfektionen nachgewiesen werden (Lutsar et al., 1998; Lamb et al., 2002). So könnte bei konkretem Verdacht auf einen Schlaganfall der zuerst eintreffende Arzt bereits mit einer Akuttherapie vor Ort beginnen.

Letztendlich gilt es, eine geeignete Therapie zur Abschwächung der Exzitotoxizität zu finden. Sie ist der bedeutungsvollste neurotoxische Mechanismus bei akuten oder chronisch neurodegenerativen Erkrankungen. Eine Schlüsselrolle spielen dabei die Astrozyten. Durch ihre Fähigkeit, Glutamat aufzunehmen, bilden sie einen entscheidenden Therapieansatz zur Behandlung des Schlaganfalles. Im Astrozyten-Neuronen-Netzwerk sind sie durch die Ausschüttung von neurotrophen Faktoren von essentieller Bedeutung für das neuronale Überleben.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass das β -Laktam-Antibiotikum Ceftriaxon in einem *in-vitro*-Modell der Glutamat-induzierten Exzitotoxizität in primären Astrozyten der Ratte über die Ausschüttung neurotropher Faktoren und die Reduzierung von Apoptose und Entzündung in primären Astrozyten der Ratte neuroprotektiv wirkt. Weiterhin wurde die Apoptose von Neuronen durch die Ceftriaxon-Behandlung von primären Astrozyten vermindert. Dies kann einerseits durch eine Ceftriaxon-vermittelte Steigerung der Glutamat-Aufnahme von Astrozyten bedingt sein, andererseits durch deren vermehrte Expression von Neurotrophenen.

Mit dieser Arbeit konnte ein Beitrag zur Aufklärung der molekularen neuroprotektiven Mechanismen von Ceftriaxon an primären Astrozyten und Neuronen geleistet werden. Diese Erkenntnisse sind relevant für die weitere Erforschung und Testung der neuroprotektiven Eigenschaften von Ceftriaxon, und deren potentielle Nutzung in einer zukünftigen, klinischen Anwendung am Menschen.

5. Literaturverzeichnis

Abbott NJ. Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability. *J. Anat.* 2002;200(6):629-638.

Acarin L, González B, Castellano B. Neuronal, astroglial and microglial cytokine expression after an excitotoxic lesion in the immature rat brain. *Eur. J. Neurosci.* 2000;12(10):3505-3520.

Adams HP, del Zoppo G, Alberts MJ, et al. Guidelines for the early management of adults with ischemic stroke: a guideline from the American Heart Association/American Stroke Association Stroke Council, Clinical Cardiology Council, Cardiovascular Radiology and Intervention Council, and the Atherosclerotic Peripheral Vascular Disease and Quality of Care Outcomes in Research Interdisciplinary Working Groups: the American Academy of Neurology affirms the value of this guideline as an educational tool for neurologists. *Stroke.* 2007;38(5):1655-1711.

Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science.* 1998;281(5381):1322-1326.

Ali C, Nicole O, Docagne F, et al. Ischemia-induced interleukin-6 as a potential endogenous neuroprotective cytokine against NMDA receptor-mediated excitotoxicity in the brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2000;20(6):956-966.

Anderson CM, Swanson RA. Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. *Glia.* 2000;32(1):1-14.

Armario A, Hernández J, Bluethmann H, Hidalgo J. IL-6 deficiency leads to increased emotionality in mice: evidence in transgenic mice carrying a null mutation for IL-6. *J. Neuroimmunol.* 1998;92(1-2):160-169.

Arnold M, Nedeltchev K, Lyrer P, Baumgartner RW. [Stroke prevention]. *Ther Umsch.* 2003;60(9):521-526.

Arriza JL, Eliasof S, Kavanaugh MP, Amara SG. Excitatory amino acid transporter 5, a retinal glutamate transporter coupled to a chloride conductance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1997;94(8):4155-4160.

Arundine M, Tymianski M. Molecular mechanisms of glutamate-dependent neurodegeneration in ischemia and traumatic brain injury. *Cell. Mol. Life Sci.* 2004;61(6):657-668.

Attwell D, Barbour B, Szatkowski M. Nonvesicular release of neurotransmitter. *Neuron.* 1993;11(3):401-407.

Barbacid M. Neurotrophic factors and their receptors. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1995;7(2):148-155.

- Bekinschtein P**, Cammarota M, Katche C, et al. BDNF is essential to promote persistence of long-term memory storage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2008;105(7):2711-2716.
- Beller JA**, Gurkoff GG, Berman RF, Lyeth BG. Pharmacological enhancement of glutamate transport reduces excitotoxicity in vitro. *Restor. Neurol. Neurosci.* 2011;29(5):331-346.
- Benarroch EE**. Neuron-astrocyte interactions: partnership for normal function and disease in the central nervous system. *Mayo Clin. Proc.* 2005;80(10):1326-1338.
- Benveniste EN**. Cytokine actions in the central nervous system. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1998;9(3-4):259-275.
- Berger, K**. Epidemiologie zerebrovaskulärer Erkrankungen. In: Hartmann A, Heiss WD. *Der Schlaganfall*. Darmstadt: Steinkopff, 2001.
- Beutler B**, Cerami A. The biology of cachectin/TNF--a primary mediator of the host response. *Annu. Rev. Immunol.* 1989;7:625-655.
- Binder DK**, Scharfman HE. Brain-derived neurotrophic factor. *Growth Factors.* 2004;22(3):123-131.
- Bredesen DE**. Apoptosis: overview and signal transduction pathways. *J. Neurotrauma.* 2000;17(10):801-810.
- Brown AM**, Sickmann HM, Fosgerau K, et al. Astrocyte glycogen metabolism is required for neural activity during aglycemia or intense stimulation in mouse white matter. *J. Neurosci. Res.* 2005;79(1-2):74-80.
- Brunkhorst FM**. [Sepsismarker--what is useful?]. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 2008;133(48):2512-2515.
- Burger PM**, Mehl E, Cameron PL, et al. Synaptic vesicles immunisolated from rat cerebral cortex contain high levels of glutamate. *Neuron.* 1989;3(6):715-720.
- Campbell IL**. Structural and functional impact of the transgenic expression of cytokines in the CNS. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1998;840:83-96.
- Chai Z**, Gatti S, Toniatti C, Poli V, Bartfai T. Interleukin (IL)-6 gene expression in the central nervous system is necessary for fever response to lipopolysaccharide or IL-1 beta: a study on IL-6-deficient mice. *J. Exp. Med.* 1996;183(1):311-316.
- Chamorro A**, Horcajada JP, Obach V, et al. The Early Systemic Prophylaxis of Infection After Stroke study: a randomized clinical trial. *Stroke.* 2005;36(7):1495-1500.
- Chen J**, Graham SH, Chan PH, et al. bcl-2 is expressed in neurons that survive focal ischemia in the rat. *Neuroreport.* 1995;6(2):394-398.

- Chen J**, Zhu RL, Nakayama M, et al. Expression of the apoptosis-effector gene, Bax, is up-regulated in vulnerable hippocampal CA1 neurons following global ischemia. *J. Neurochem.* 1996;67(1):64-71.
- Chen J**, Graham SH, Nakayama M, et al. Apoptosis repressor genes Bcl-2 and Bcl-x-long are expressed in the rat brain following global ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1997;17(1):2-10.
- Chen J**, Nagayama T, Jin K, et al. Induction of caspase-3-like protease may mediate delayed neuronal death in the hippocampus after transient cerebral ischemia. *J. Neurosci.* 1998;18(13):4914-4928.
- Chen Y**, Swanson RA. Astrocytes and brain injury. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2003;23(2):137-149.
- Cheng B**, Mattson MP. NGF and bFGF protect rat hippocampal and human cortical neurons against hypoglycemic damage by stabilizing calcium homeostasis. *Neuron.* 1991;7(6):1031-1041.
- Cheng B**, Mattson MP. NT-3 and BDNF protect CNS neurons against metabolic/excitotoxic insults. *Brain Res.* 1994;640(1-2):56-67.
- Choi DW**. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron.* 1988;1(8):623-634.
- Chu K**, Lee S, Sinn D, et al. Pharmacological Induction of Ischemic Tolerance by Glutamate Transporter-1 (EAAT2) Upregulation. *Stroke.* 2007;38(1):177-182.
- Clements JD**, Lester RA, Tong G, Jahr CE, Westbrook GL. The time course of glutamate in the synaptic cleft. *Science.* 1992;258(5087):1498-1501.
- Cudkowicz M**, Shefner J and Consortium N.STAGE 3 Clinical Trial of Ceftriaxone in Subjects with ALS (S36.001). *Neurology February 12, 2013; 80(Meeting Abstracts 1): S36.001*
- da Cunha A**, Jefferson JJ, Tyor WR, et al. Gliosis in human brain: relationship to size but not other properties of astrocytes. *Brain Res.* 1993;600(1):161-165.
- Danbolt NC**. Glutamate uptake. *Prog. Neurobiol.* 2001;65(1):1-105.
- Dirnagl U**, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci.* 1999;22(9):391-397.
- Dong Y**, Benveniste EN. Immune function of astrocytes. *Glia.* 2001;36(2):180-190.
- Drawz SM**, Bonomo RA. Three decades of beta-lactamase inhibitors. *Clin. Microbiol. Rev.* 2010;23(1):160-201.
- Drenkhahn D**, Kugler P, Nervengewebe. In: Drenkhahn D. Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie, Band 1. 17. Auflage. München: Urban & Fischer 2008.

- Duan S**, Anderson CM, Keung EC, et al. P2X7 receptor-mediated release of excitatory amino acids from astrocytes. *J. Neurosci.* 2003;23(4):1320-1328.
- Durukan A**, Tatlisumak T. Acute ischemic stroke: overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2007;87(1):179-197.
- Earnshaw WC**, Martins LM, Kaufmann SH. Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis. *Annu. Rev. Biochem.* 1999;68:383-424.
- Eldadah BA**, Faden AI. Caspase pathways, neuronal apoptosis, and CNS injury. *J. Neurotrauma.* 2000;17(10):811-829.
- Elewa HF**, Hilali H, Hess DC, Machado LS, Fagan SC. Minocycline for short-term neuroprotection. *Pharmacotherapy.* 2006;26(4):515-521.
- Endres M**, Fan G, Hirt L, et al. Ischemic brain damage in mice after selectively modifying BDNF or NT4 gene expression. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2000;20(1):139-144.
- Erecińska M**, Silver IA. Metabolism and role of glutamate in mammalian brain. *Prog. Neurobiol.* 1990;35(4):245-296.
- Ernfors P**, Lee KF, Jaenisch R. Mice lacking brain-derived neurotrophic factor develop with sensory deficits. *Nature.* 1994;368(6467):147-150.
- Fahnestock M**. Structure and biosynthesis of nerve growth factor. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 1991;165:1-26.
- Fairman WA**, Vandenberg RJ, Arriza JL, Kavanaugh MP, Amara SG. An excitatory amino-acid transporter with properties of a ligand-gated chloride channel. *Nature.* 1995;375(6532):599-603.
- Feigin VL**, Lawes CM, Bennett DA, et al. Worldwide stroke incidence and early case fatality reported in 56 population-based studies: a systematic review. *Lancet Neurol.* 2009; 8(4):355-369.
- Fisher M**, Schaebitz W. An overview of acute stroke therapy: past, present, and future. *Arch. Intern. Med.* 2000;160(21):3196-3206.
- Franke H**, Grosche J, Schädlich H, et al. P2X receptor expression on astrocytes in the nucleus accumbens of rats. *Neuroscience.* 2001;108(3):421-429.
- Friedrich C**. [Between chance and deliberate development: the history of beta-lactam antibiotics]. *Pharm Unserer Zeit.* 2006;35(5):392-398.
- Frim DM**, Uhler TA, Short MP, et al. Effects of biologically delivered NGF, BDNF and bFGF on striatal excitotoxic lesions. *Neuroreport.* 1993;4(4):367-370.

- Furukawa S**, Furukawa Y, Satoyoshi E, Hayashi K. Synthesis and secretion of nerve growth factor by mouse astroglial cells in culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1986;136(1):57-63.
- Furuta A**, Rothstein JD, Martin LJ. Glutamate transporter protein subtypes are expressed differentially during rat CNS development. *J. Neurosci.* 1997;17(21):8363-8375.
- Garcia I**, Martinou I, Tsujimoto Y, Martinou JC. Prevention of programmed cell death of sympathetic neurons by the bcl-2 proto-oncogene. *Science.* 1992;258(5080):302-304.
- Georgiadis D**, Michel P, Bogousslavsky J, Baumgartner RW. [Treatment of acute stroke -- an overview]. *Ther Umsch.* 2003;60(9):509-520.
- Giaume C**, McCarthy KD. Control of gap-junctional communication in astrocytic networks. *Trends Neurosci.* 1996;19(8):319-325.
- Grau AJ**, Weimar C, Buggle F, et al. Risk factors, outcome, and treatment in subtypes of ischemic stroke: the German stroke data bank. *Stroke.* 2001;32(11):2559-2566.
- Hawkins RA**, DeJoseph MR, Hawkins PA. Regional brain glutamate transport in rats at normal and raised concentrations of circulating glutamate. *Cell Tissue Res.* 1995;281(2):207-214.
- Heisig P**. [Actions and resistance mechanisms of beta-lactam antibiotics. Penicillin-binding proteins, beta-3-lactamases and signal proteins]. *Pharm Unserer Zeit.* 2006;35(5):400-408.
- Hertz L**, Dringen R, Schousboe A, Robinson SR. Astrocytes: glutamate producers for neurons. *J. Neurosci. Res.* 1999;57(4):417-428.
- Hertz L**, Dienel GA. Energy metabolism in the brain. *Int. Rev. Neurobiol.* 2002;51:1-102.
- Hertz L**, Zielke HR. Astrocytic control of glutamatergic activity: astrocytes as stars of the show. *Trends Neurosci.* 2004;27(12):735-743.
- Heuschmann PU**, Busse O, Wagner M, et al.: Schlaganfallhäufigkeit und Versorgung von Schlaganfallpatienten in Deutschland. *Akt. Neurol* 2010; 37:333-40
- Hickey WF**. Basic principles of immunological surveillance of the normal central nervous system. *Glia.* 2001;36(2):118-124.
- Hinkle AM**, Bodey GP. In vitro evaluation of Ro 13-9904. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1980;18(4):574-578.
- Hollmann M**, Hartley M, Heinemann S. Ca²⁺ permeability of KA-AMPA--gated glutamate receptor channels depends on subunit composition. *Science.* 1991;252(5007):851-853.
- Hoshi A**, Nakahara T, Kayama H, et al. Ischemic tolerance in chemical preconditioning: possible role of astrocytic glutamine synthetase buffering glutamate-mediated neurotoxicity. *J Neurosci Res.* 2006 Jul;84(1):130-41.

- Huang EJ**, Reichardt LF. Neurotrophins: roles in neuronal development and function. *Annu. Rev. Neurosci.* 2001;24:677-736.
- Jürgensmeier JM**, Xie Z, Deveraux Q, et al. Bax directly induces release of cytochrome c from isolated mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1998;95(9):4997-5002.
- Kanai Y**, Bhide PG, DiFiglia M, Hediger MA. Neuronal high-affinity glutamate transport in the rat central nervous system. *Neuroreport.* 1995;6(17):2357-2362.
- Kerr JF**, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer.* 1972;26(4):239-257.
- Kimelberg HK**. Astrocytic swelling in cerebral ischemia as a possible cause of injury and target for therapy. *Glia.* 2005;50(4):389-397.
- Kiprianova I**, Freiman TM, Desiderato S, et al. Brain-derived neurotrophic factor prevents neuronal death and glial activation after global ischemia in the rat. *J. Neurosci. Res.* 1999;56(1):21-27.
- Kluck RM**, Bossy-Wetzler E, Green DR, Newmeyer DD. The release of cytochrome c from mitochondria: a primary site for Bcl-2 regulation of apoptosis. *Science.* 1997;275(5303):1132-1136.
- Kokaia Z**, Zhao Q, Kokaia M, et al. Regulation of brain-derived neurotrophic factor gene expression after transient middle cerebral artery occlusion with and without brain damage. *Exp. Neurol.* 1995;136(1):73-88.
- Kolominsky-Rabas PL**, Heuschmann PU. [Incidence, etiology and long-term prognosis of stroke]. *Fortschr Neurol Psychiatr.* 2002;70(12):657-662.
- Komuro H**, Rakic P. Modulation of neuronal migration by NMDA receptors. *Science.* 1993;260(5104):95-97.
- Krajewski S**, Mai JK, Krajewska M, et al. Upregulation of bax protein levels in neurons following cerebral ischemia. *J. Neurosci.* 1995;15(10):6364-6376.
- Lamb HM**, Ormrod D, Scott LJ, Figgitt DP. Ceftriaxone: an update of its use in the management of community-acquired and nosocomial infections. *Drugs.* 2002;62(7):1041-1089.
- Lamkanfi M**, Kanneganti T. Caspase-7: a protease involved in apoptosis and inflammation. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2010;42(1):21-24.
- Lampl Y**, Boaz M, Gilad R, et al. Minocycline treatment in acute stroke: an open-label, evaluator-blinded study. *Neurology.* 2007;69(14):1404-1410.
- Lau LT**, Yu AC. Astrocytes produce and release interleukin-1, interleukin-6, tumor necrosis factor alpha and interferon-gamma following traumatic and metabolic injury. *J. Neurotrauma.* 2001;18(3):351-359.

- Lee S**, Su Z, Emdad L, et al. Mechanism of ceftriaxone induction of excitatory amino acid transporter-2 expression and glutamate uptake in primary human astrocytes. *J. Biol. Chem.* 2008;283(19):13116-13123.
- Lehre KP**, Danbolt NC. The number of glutamate transporter subtype molecules at glutamatergic synapses: chemical and stereological quantification in young adult rat brain. *J. Neurosci.* 1998;18(21):8751-8757.
- Li J**, Yuan J. Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene.* 2008;27(48):6194-6206.
- Lindvall O**, Ernfors P, Bengzon J, et al. Differential regulation of mRNAs for nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor, and neurotrophin 3 in the adult rat brain following cerebral ischemia and hypoglycemic coma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1992;89(2):648-652.
- Lipski J**, Wan CK, Bai JZ, et al. Neuroprotective potential of ceftriaxone in in vitro models of stroke. *Neuroscience.* 2007;146(2):617-629.
- Lipton P**. Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol. Rev.* 1999;79(4):1431-1568.
- Lithgow T**, van Driel R, Bertram JF, Strasser A. The protein product of the oncogene bcl-2 is a component of the nuclear envelope, the endoplasmic reticulum, and the outer mitochondrial membrane. *Cell Growth Differ.* 1994;5(4):411-417.
- Livak KJ**, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)} Method. *Methods.* 2001;25(4):402-408.
- Longuemare MC**, Swanson RA. Net glutamate release from astrocytes is not induced by extracellular potassium concentrations attainable in brain. *J. Neurochem.* 1997;69(2):879-882.
- Lorez H**, Keller F, Ruess G, Otten U. Nerve growth factor increases in adult rat brain after hypoxic injury. *Neurosci. Lett.* 1989;98(3):339-344.
- Love S**. Apoptosis and brain ischaemia. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 2003;27(2):267-282.
- Lutsar I**, Friedland IR. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cephalosporins in cerebrospinal fluid. *Clin Pharmacokinet.* 2000;39(5):335-343.
- Lutsar I**, McCracken GH, Friedland IR. Antibiotic pharmacodynamics in cerebrospinal fluid. *Clin. Infect. Dis.* 1998;27(5):1117-1127, quiz 1128-1129.
- Mah SP**, Zhong LT, Liu Y, et al. The protooncogene bcl-2 inhibits apoptosis in PC12 cells. *J. Neurochem.* 1993;60(3):1183-1186.
- Mallat M**, Houlgatte R, Brachet P, Prochiantz A. Lipopolysaccharide-stimulated rat brain macrophages release NGF in vitro. *Dev. Biol.* 1989;133(1):309-311.

- Martinou JC**, Dubois-Dauphin M, Staple JK, et al. Overexpression of BCL-2 in transgenic mice protects neurons from naturally occurring cell death and experimental ischemia. *Neuron*. 1994;13(4):1017-1030.
- Masuhr KF**, Neumann N. Zerebrale Ischämien. Bob A, Bob K, eds. *Neurologie*. Stuttgart, Deutschland: Georg Thieme Verlag, 2007: 391-393.
- Mattle HP**, Hennerici M, Sztajzel R. [Pathophysiology, etiology and diagnosis of stroke]. *Ther Umsch*. 2003;60(9):499-507.
- Mattson MP**, Cheng B. Growth factors protect neurons against excitotoxic/ischemic damage by stabilizing calcium homeostasis. *Stroke*. 1993;24(12 Suppl):I136-140; discussion I144-145.
- Matute C**, Domercq M, Sánchez-Gómez M. Glutamate-mediated glial injury: mechanisms and clinical importance. *Glia*. 2006;53(2):212-224.
- McCarthy KD**, de Vellis J. Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *J. Cell Biol* 1980 Juni;85(3):890–902.
- Meisel C**, Prass K, Braun J, et al. Preventive antibacterial treatment improves the general medical and neurological outcome in a mouse model of stroke. *Stroke*. 2004;35(1):2-6.
- Meisel C**, Schwab JM, Prass K, Meisel A, Dirnagl U. Central nervous system injury-induced immune deficiency syndrome. *Nat. Rev. Neurosci*. 2005;6(10):775-786.
- Melani A**, Turchi D, Vannucchi MG, et al. ATP extracellular concentrations are increased in the rat striatum during in vivo ischemia. *Neurochem. Int*. 2005;47(6):442-448.
- Mergenthaler P**, Dirnagl U, Meisel A. Pathophysiology of stroke: lessons from animal models. *Metab Brain Dis*. 2004;19(3-4):151-167.
- Miyashita T**, Krajewski S, Krajewska M, et al. Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene*. 1994;9(6):1799-1805.
- Miyashita T**, Reed JC. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell*. 1995;80(2):293-299.
- Mocchetti I**, Wrathall JR. Neurotrophic factors in central nervous system trauma. *J. Neurotrauma*. 1995;12(5):853-870.
- Montana V**, Malarkey EB, Verderio C, Matteoli M, Parpura V. Vesicular transmitter release from astrocytes. *Glia*. 2006;54(7):700-715.
- Montpied P**, Weller M, Paul SM. N-methyl-D-aspartate receptor agonists decrease protooncogene bcl-2 mRNA expression in cultured rat cerebellar granule neurons. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 1993;195(2):623-629.

- Nader-Kawachi J**, Góngora-Rivera F, Santos-Zambrano J, Calzada P, Ríos C. Neuroprotective effect of dapsone in patients with acute ischemic stroke: a pilot study. *Neurol. Res.* 2007;29(3):331-334.
- Namura S**, Zhu J, Fink K, et al. Activation and cleavage of caspase-3 in apoptosis induced by experimental cerebral ischemia. *J. Neurosci.* 1998;18(10):3659-3668.
- Namura S**, Maeno H, Takami S, et al. Inhibition of glial glutamate transporter GLT-1 augments brain edema after transient focal cerebral ischemia in mice. *Neurosci. Lett.* 2002;324(2):117-120.
- Newman EA**. New roles for astrocytes: regulation of synaptic transmission. *Trends Neurosci.* 2003;26(10):536-542.
- Norris JG**, Tang LP, Sparacio SM, Benveniste EN. Signal transduction pathways mediating astrocyte IL-6 induction by IL-1 beta and tumor necrosis factor-alpha. *J. Immunol.* 1994;152(2):841-850.
- Nuñez G**, Benedict MA, Hu Y, Inohara N. Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. *Oncogene.* 1998;17(25):3237-3245.
- Oltvai ZN**, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell.* 1993;74(4):609-619.
- Ottersen OP**, Laake JH, Reichelt W, Haug FM, Torp R. Ischemic disruption of glutamate homeostasis in brain: quantitative immunocytochemical analyses. *J. Chem. Neuroanat.* 1996;12(1):1-14.
- Pascual JM**, Carceller F, Roda JM, Cerdán S. Glutamate, glutamine, and GABA as substrates for the neuronal and glial compartments after focal cerebral ischemia in rats. *Stroke.* 1998;29(5):1048-1056; discussion 1056-1057.
- Pearce IA**, Cambray-Deakin MA, Burgoyne RD. Glutamate acting on NMDA receptors stimulates neurite outgrowth from cerebellar granule cells. *FEBS Lett.* 1987;223(1):143-147.
- Pechán PA**, Chowdhury K, Gerdes W, Seifert W. Glutamate induces the growth factors NGF, bFGF, the receptor FGF-R1 and c-fos mRNA expression in rat astrocyte culture. *Neurosci. Lett.* 1993;153(1):111-114.
- Pencea V**, Bingaman KD, Wiegand SJ, Luskin MB. Infusion of brain-derived neurotrophic factor into the lateral ventricle of the adult rat leads to new neurons in the parenchyma of the striatum, septum, thalamus, and hypothalamus. *J. Neurosci.* 2001;21(17):6706-6717.
- Penkowa M**, Giralt M, Carrasco J, Hadberg H, Hidalgo J. Impaired inflammatory response and increased oxidative stress and neurodegeneration after brain injury in interleukin-6-deficient mice. *Glia.* 2000;32(3):271-285.

- Perovic S**, Pialoglou P, Schröder HC, Pergande G, Müller WE. Flupirtine increases the levels of glutathione and Bc1-2 in hNT (human Ntera/D1) neurons: mode of action of the drug-mediated anti-apoptotic effect. *Eur. J. Pharmacol.* 1996;317(1):157-164.
- Perry TR**, Schentag JJ. Clinical use of ceftriaxone: a pharmacokinetic-pharmacodynamic perspective on the impact of minimum inhibitory concentration and serum protein binding. *Clin Pharmacokinet.* 2001;40(9):685-694.
- Pfaffl MW**. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 2001;29(9):e45.
- Pines G**, Danbolt NC, Bjørås M, u. a. Cloning and expression of a rat brain L-glutamate transporter. *Nature.* 1992;360(6403):464-467.
- Popovic S**, Arsenijevic N, Baskic D. In vitro assay for the quantitative measurement of apoptotic lymphocytes phagocytosis by peripheral blood monocytes. *Acta Physiol Hung.* 2006;93(4):325-333.
- Prass K**, Meisel C, Höflich C, et al. Stroke-induced immunodeficiency promotes spontaneous bacterial infections and is mediated by sympathetic activation reversal by poststroke T helper cell type 1-like immunostimulation. *J. Exp. Med.* 2003;198(5):725-736.
- Raivich G**, Bohatschek M, Kloss CU, et al. Neuroglial activation repertoire in the injured brain: graded response, molecular mechanisms and cues to physiological function. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 1999;30(1):77-105.
- Riccabona M**, Kerbl R, Schwinger W, et al. [Ceftriaxone-induced cholelithiasis--a harmless side-effect?]. *Klin Padiatr.* 1993;205(6):421-423.
- Ridet JL**, Malhotra SK, Privat A, Gage FH. Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. *Trends Neurosci.* 1997;20(12):570-577.
- Rosenberg PA**, Aizenman E. Hundred-fold increase in neuronal vulnerability to glutamate toxicity in astrocyte-poor cultures of rat cerebral cortex. *Neurosci. Lett.* 1989;103(2):162-168.
- Rossi DJ**, Oshima T, Attwell D. Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake. *Nature.* 2000;403(6767):316-321.
- Rothstein JD**, Van Kammen M, Levey AI, Martin LJ, Kuncl RW. Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* 1995;38(1):73-84.
- Rothstein JD**, Dykes-Hoberg M, Pardo CA, et al. Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron.* 1996;16(3):675-686.
- Rothstein JD**, Patel S, Regan MR, et al. Beta-lactam antibiotics offer neuroprotection by increasing glutamate transporter expression. *Nature.* 2005;433(7021):73-77.

- Rothwell NJ**. Annual review prize lecture cytokines - killers in the brain? *J. Physiol. (Lond.)*. 1999;514 (Pt 1):3-17.
- Rothwell NJ**, Luheshi G, Toulmond S. Cytokines and their receptors in the central nervous system: physiology, pharmacology, and pathology. *Pharmacol. Ther.* 1996;69(2):85-95.
- Rothwell NJ, Hopkins SJ. Cytokines and the nervous system II: Actions and mechanisms of action. *Trends Neurosci.* 1995;18(3):130-136.
- Sattler R**, Tymianski M. Molecular mechanisms of glutamate receptor-mediated excitotoxic neuronal cell death. *Mol. Neurobiol.* 2001;24(1-3):107-129.
- Saver JL**. Time is brain--quantified. *Stroke.* 2006;37(1):263-266.
- Sawada M**, Suzumura A, Marunouchi T. TNF alpha induces IL-6 production by astrocytes but not by microglia. *Brain Res.* 1992;583(1-2):296-299.
- Schäbitz WR**, Schwab S, Spranger M, Hacke W. Intraventricular brain-derived neurotrophic factor reduces infarct size after focal cerebral ischemia in rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1997;17(5):500-506.
- Schelman WR**, Andres RD, Sipe KJ, Kang E, Weyhenmeyer JA. Glutamate mediates cell death and increases the Bax to Bcl-2 ratio in a differentiated neuronal cell line. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 2004;128(2):160-169.
- Schiebler TH**, Schmidt W. Anatomie. 8. Auflage. Berlin; Heidelberg; New York; Barcelona; Hongkong; London; Mailand; Paris; Tokio: Springer 2002.
- Semkova I**, Häberlein C, Krieglstein J. Ciliary neurotrophic factor protects hippocampal neurons from excitotoxic damage. *Neurochem. Int.* 1999;35(1):1-10.
- Shigeno T**, Mima T, Takakura K, et al. Amelioration of delayed neuronal death in the hippocampus by nerve growth factor. *J. Neurosci.* 1991;11(9):2914-2919.
- Shimazaki K**, Ishida A, Kawai N. Increase in bcl-2 oncoprotein and the tolerance to ischemia-induced neuronal death in the gerbil hippocampus. *Neurosci. Res.* 1994;20(1):95-99.
- Sonnenwald U**, Westergaard N, Petersen SB, Unsgård G, Schousboe A. Metabolism of [U-13C]glutamate in astrocytes studied by 13C NMR spectroscopy: incorporation of more label into lactate than into glutamine demonstrates the importance of the tricarboxylic acid cycle. *J. Neurochem.* 1993;61(3):1179-1182.
- Sonnenwald U**, Westergaard N, Schousboe A. Glutamate transport and metabolism in astrocytes. *Glia.* 1997;21(1):56-63.
- Sonnenwald U**, Qu H, Aschner M. Pharmacology and toxicology of astrocyte-neuron glutamate transport and cycling. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2002;301(1):1-6.

- Spector R**. Ceftriaxone pharmacokinetics in the central nervous system. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1986;236(2):380-383.
- Stahlmann R**, Lode H. β -Lactam-Antibiotika. Aktories K, Förstermann U, Hofmann FB, Starke K, eds. *Allgemein und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. München, Deutschland: Elsevier GmbH Urban & Fischer Verlag, 2009: 795-799.
- Statistisches Bundesamt 2010**. *Gesundheit. Todesursachen in Deutschland*. Fachserie 12, Reihe 4. Artikelnummer: 2120400097004.
- Stennicke HR**, Jürgensmeier JM, Shin H, et al. Pro-caspase-3 is a major physiologic target of caspase-8. *J. Biol. Chem.* 1998;273(42):27084-27090.
- Stille W**, Brodt HR, Groll A, Just-Nübling G. *Antibiotika-Therapie: Klinik und Praxis der antiinfektiösen Behandlung*. 11. Auflage. Stuttgart; New York: Schattauer GmbH 2005:78-83.
- Storck T**, Schulte S, Hofmann K, Stoffel W. Structure, expression, and functional analysis of a Na(+)-dependent glutamate/aspartate transporter from rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1992;89(22):10955-10959.
- Strasser A**, O'Connor L, Dixit VM. Apoptosis signaling. *Annu. Rev. Biochem.* 2000;69:217-245.
- Streit WJ**, Walter SA, Pennell NA. Reactive microgliosis. *Prog. Neurobiol.* 1999;57(6):563-581.
- Suzuki S**, Tanaka K, Suzuki N. Ambivalent aspects of interleukin-6 in cerebral ischemia: inflammatory versus neurotrophic aspects. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2009;29(3):464-479.
- Swanson RA**. Astrocyte glutamate uptake during chemical hypoxia in vitro. *Neurosci. Lett.* 1992;147(2):143-146.
- Swanson RA**, Chen J, Graham SH. Glucose can fuel glutamate uptake in ischemic brain. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1994;14(1):1-6.
- Swanson CJ**, Bures M, Johnson MP, et al. Metabotropic glutamate receptors as novel targets for anxiety and stress disorders. *Nat Rev Drug Discov.* 2005;4(2):131-144.
- Swartz KR**, Liu F, Sewell D, et al. Interleukin-6 promotes post-traumatic healing in the central nervous system. *Brain Res.* 2001;896(1-2):86-95.
- Szatkowski M**, Barbour B, Attwell D. Non-vesicular release of glutamate from glial cells by reversed electrogenic glutamate uptake. *Nature.* 1990;348(6300):443-446.
- Szydłowska K**, Zawadzka M, Kaminska B. Neuroprotectant FK506 inhibits glutamate-induced apoptosis of astrocytes in vitro and in vivo. *J. Neurochem.* 2006;99(3):965-975.

- Takeda A**, Onodera H, Sugimoto A, et al. Coordinated expression of messenger RNAs for nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 in the rat hippocampus following transient forebrain ischemia. *Neuroscience*. 1993;55(1):23-31.
- Tanaka K**, Watase K, Manabe T, et al. Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1. *Science*. 1997;276(5319):1699-1702.
- Taylor S**, Srinivasan B, Wordinger RJ, Roque RS. Glutamate stimulates neurotrophin expression in cultured Müller cells. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 2003;111(1-2):189-197.
- Thöne-Reineke C**, Neumann C, Namsolleck P, et al. The beta-lactam antibiotic, ceftriaxone, dramatically improves survival, increases glutamate uptake and induces neurotrophins in stroke. *J. Hypertens.* 2008;26(12):2426-2435.
- Trendelenburg G**, Dirnagl U. Neuroprotective role of astrocytes in cerebral ischemia: focus on ischemic preconditioning. *Glia*. 2005;50(4):307-320.
- Trepel M**. Neuroanatomie. 3. neu bearb. Aufl. München, Jena: Urban & Fischer 2004.
- Trotti D**, Danbolt NC, Volterra A. Glutamate transporters are oxidant-vulnerable: a molecular link between oxidative and excitotoxic neurodegeneration? *Trends Pharmacol. Sci.* 1998;19(8):328-334.
- Tsukahara T**, Yonekawa Y, Tanaka K, et al. The role of brain-derived neurotrophic factor in transient forebrain ischemia in the rat brain. *Neurosurgery*. 1994;34(2):323-331; discussion 331.
- Tymianski M**, Charlton MP, Carlen PL, Tator CH. Source specificity of early calcium neurotoxicity in cultured embryonic spinal neurons. *J. Neurosci.* 1993;13(5):2085-2104.
- Van Wagoner NJ**, Benveniste EN. Interleukin-6 expression and regulation in astrocytes. *J. Neuroimmunol.* 1999;100(1-2):124-139.
- Verkhratsky A**, Orkand RK, Kettenmann H. Glial calcium: homeostasis and signaling function. *Physiol. Rev.* 1998;78(1):99-141.
- Verma R**, Mishra V, Sasmal D, Raghurir R. Pharmacological evaluation of glutamate transporter 1 (GLT-1) mediated neuroprotection following cerebral ischemia/reperfusion injury. *Eur. J. Pharmacol.* 2010;638(1-3):65-71.
- Wallenius V**, Wallenius K, Ahrén B, et al. Interleukin-6-deficient mice develop mature-onset obesity. *Nat. Med.* 2002;8(1):75-79.
- Walz W**, Hertz L. Functional interactions between neurons and astrocytes. II. Potassium homeostasis at the cellular level. *Prog. Neurobiol.* 1983;20(1-2):133-183.
- Wiessner C**, Allegrini PR, Rupalla K, et al. Neuron-specific transgene expression of Bcl-XL but not Bcl-2 genes reduced lesion size after permanent middle cerebral artery occlusion in mice. *Neurosci. Lett.* 1999;268(3):119-122.

- Wolf PA**, Cobb JL, D'Agostino RB. Epidemiology of stroke. In: Barnett HJM, Mohr JP, Stein BM, Yatsu FM. Stroke: pathophysiology, diagnosis and management. New York: Churchill Livingstone, 1992: 3-27.
- Wu H**, Friedman WJ, Dreyfus CF. Differential regulation of neurotrophin expression in basal forebrain astrocytes by neuronal signals. *J. Neurosci. Res.* 2004;76(1):76-85.
- Xiang H**, Kinoshita Y, Knudson CM, et al. Bax involvement in p53-mediated neuronal cell death. *J. Neurosci.* 1998;18(4):1363-1373.
- Xu L**, Sapolsky RM, Giffard RG. Differential sensitivity of murine astrocytes and neurons from different brain regions to injury. *Exp. Neurol.* 2001;169(2):416-424.
- Xu ZY**, Liu HD, Lau LT, et al. Responses of astrocyte to simultaneous glutamate and arachidonic acid treatment. *Neurochem. Int.* 2009;55(1-3):143-150.
- Yang J**, Liu X, Bhalla K, et al. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science.* 1997;275(5303):1129-1132.
- Yang E**, Korsmeyer SJ. Molecular thanatopsis: a discourse on the BCL2 family and cell death. *Blood.* 1996;88(2):386-401.
- Ye Z**, Wyeth MS, Baltan-Tekkok S, Ransom BR. Functional hemichannels in astrocytes: a novel mechanism of glutamate release. *J. Neurosci.* 2003;23(9):3588-3596.
- Yu AC**, Drejer J, Hertz L, Schousboe A. Pyruvate carboxylase activity in primary cultures of astrocytes and neurons. *J. Neurochem.* 1983;41(5):1484-1487.
- Yu AC**, Lau LT. Expression of interleukin-1 alpha, tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 genes in astrocytes under ischemic injury. *Neurochem. Int.* 2000;36(4-5):369-377.
- Zigova T**, Pencea V, Wiegand SJ, Luskin MB. Intraventricular administration of BDNF increases the number of newly generated neurons in the adult olfactory bulb. *Mol. Cell. Neurosci.* 1998;11(4):234-245.
- Zipfel GJ**, Babcock DJ, Lee JM, Choi DW. Neuronal apoptosis after CNS injury: the roles of glutamate and calcium. *J. Neurotrauma.* 2000;17(10):857-869.

6. Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1.1.** Schematische Zeichnung von Astrozyten und Ihren Fortsätzen an Endothelzellen (aus Abbott, 2002). Seite 5
- Abbildung 1.2.** Schematische Darstellung der Glutamat-Aufnahme und Freisetzung (aus Chen und Swanson, 2003). Seite 12
- Abbildung 1.3.** Strukturformel von Ceftriaxon (aus Hinkle und Bodey, 1980). Seite 21
- Abbildung 2.1.** Schematische Darstellung der Behandlung primärer Astrozyten mit Ceftriaxon und Glutamat. Seite 38
- Abbildung 2.2.** Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Messung der Apoptose von Neuronen (NG 108-15) nach Inkubation 24 Stunden mit konditioniertem-Medium von Astrozyten. Seite 39
- Abbildung. 2.3.** Beispiel eines Bildes aus dem Fluoreszenzmikroskop. Seite 40
- Abbildung. 2.4.** Glutamat-Standardkurve. Seite 42
- Abbildung 3.1.** Graphische Darstellung der Aktivität der apoptotischen Marker Caspase 3 und 7 in Astrozyten der Ratte nach Behandlung mit unterschiedlichen Glutamat- und Ceftriaxon-Konzentrationen. Seite 43
- Abbildung 3.2.** Graphische Darstellung der relativen IL-6-mRNA-Expression in kultivierten Astrozyten der Ratte nach Stimulation mit 100 mM Glutamat zu verschiedenen Zeitpunkten. Seite 44
- Abbildung 3.3.** Graphische Darstellung der relativen Bax-mRNA-Expression in kultivierten Astrozyten der Ratte nach Stimulation mit 100 mM Glutamat zu verschiedenen Zeitpunkten. Seite 46

- Abbildung 3.4.** Graphische Darstellung der relativen BCL-2-mRNA-Expression in kultivierten Astrozyten der Ratte nach Stimulation mit 100 mM Glutamat zu verschiedenen Zeitpunkten. Seite 47
- Abbildung 3.5.** Graphische Darstellung der relativen BDNF-mRNA-Expression in kultivierten Astrozyten der Ratte nach Stimulation mit 100 mM Glutamat zu verschiedenen Zeitpunkten. Seite 48
- Abbildung 3.6.** Graphische Darstellung der relativen NGF β -mRNA-Expression in kultivierten Astrozyten der Ratte nach Stimulation mit 100 mM Glutamat zu verschiedenen Zeitpunkten. Seite 49
- Abbildung 3.7.** Schematische Darstellung der Behandlung primärer Astrozyten mit Ceftriaxon und Glutamat. Seite 50
- Abbildung 3.8.** Graphische Darstellung der IL-6-mRNA-Expression in kultivierten Astrozyten der Ratte nach Vorbehandlung mit Ceftriaxon zu verschiedenen Zeitpunkten und anschließender Glutamat-Belastung. Seite 51
- Abbildung 3.9.** Graphische Darstellung der *derbe*-mRNA-Expression in kultivierten Astrozyten der Ratte nach Vorbehandlung mit Ceftriaxon zu verschiedenen Zeitpunkten und anschließender Glutamat-Belastung. Seite 52
- Abbildung 3.10.** Graphische Darstellung der BCL-2-mRNA-Expression in kultivierten Astrozyten der Ratte nach Vorbehandlung mit Ceftriaxon zu verschiedenen Zeitpunkten und anschließender Glutamat-Belastung. Seite 53
- Abbildung 3.11.** Graphische Darstellung der *derben*-mRNA-Expression in kultivierten Astrozyten der Ratte nach Vorbehandlung mit Ceftriaxon zu verschiedenen Zeitpunkten und anschließender Glutamat-Belastung. Seite 54

- Abbildung 3.12.** Graphische Darstellung der NGF β -mRNA-Expression in kultivierten Astrozyten der Ratte nach Vorbehandlung mit Ceftriaxon zu verschiedenen Zeitpunkten und anschließender Glutamat-Belastung. Seite 55
- Abbildung 3.13.** Graphische Darstellung der apoptotischen Neurone, nach direkter 24-stündiger Stimulation mit 100 μ M Ceftriaxon und / oder 100 mM Glutamat, und Färbung mit Acridinorange/ Ethidiumbromid. Seite 56
- Abbildung 3.14.** Graphische Darstellung der apoptotischen Neurone, nach 24-stündiger Stimulation mit Astrozyten konditionierten Medium, und Anfärbung mit Acridinorange/ Ethidiumbromid. Seite 57
- Abbildung 3.15.** Graphische Darstellung der Aktivität des apoptotischen Marker Caspase 3 und 7 in Neuronen (Zelllinie NG 108-15), nach 24-stündiger Stimulation mit Astrozyten-konditionierten-Medium. Seite 58
- Abbildung 3.16.** Graphische Darstellung der intrazellulären Glutamat-Konzentration in primären Astrozyten der Ratte nach Kultivierung mit Glutamat und/oder Ceftriaxon. Seite 59
- Abbildung 3.17.** Graphische Darstellung der Glutamat-Konzentration in Astrozyten-konditioniertem-Medium nach Kultivierung mit Glutamat und/oder Ceftriaxon. Seite 59

7. Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1. Zusammensetzung des SYBR Green[®] Housemix als 10 ml Vorratslösung, Seite 33

Tabelle 2.2. Reaktionszyklus einer *Real-Time* PCR mit SYBR Green[®] Housemix und Power SYBR[®] Green Mastermix, Seite 34

Tabelle 2.3. Primersequenzen für die quantitative *Real-time* PCR, Seite 35

8. Abkürzungsverzeichnis

ALS	amyotrophe Lateralsklerose
AMPA	α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolpropionat
ATP	Adenosintriphosphat
Bad, Bax, Bak, Bid, Bik	proapoptotische Proteine
BCL-2	B-cell lymphoma 2
BDNF	brain-derived neurothrophic factor
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
Ca^{2+}	Calcium
CCR	Center for Cardiovascular Research
cDNA	komplementäre DNA
cm^2	Quadratzentimeter
CNTF	Ciliary neurotrophic factor
CO_2	Kohlendioxid
Ct	Cycle threshold
CTP	Cytidintriphosphat
DAG	Diacylglycerin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNASE	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosid-Triphosphat
EAAC	Transporter exzitatorischer Aminosäuren
EAAT	Transporter exzitatorischer Aminosäuren
EDTA	Ethylendiamino-tetraessigsäure
FBS	Fetales Kälberserum
g	Gramm

GABA	γ -Aminobuttersäure
GFAP	gliäres fibrilläres saures Protein
GLAST	Glutamat-Aspartat-Transporter
GLT	Glutamat-Transporter
GP	Glykoprotein
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HCl	Salzsäure
H ₂ O	Wasser
IL	Interleukin
IP 3	Inositoltriphosphat
kDa	Kilo-Dalton
K	Kalium
KCl	Kaliumchlorid
kg	Kilogramm
l	Liter
LAGeSo	Landesamt für Gesundheit und Soziales
LIF	Leukämie-Inhibitor-Faktor
MCAO	middle cerebral artery occlusion; Okklusion der Arteria cerebri Media
M	Molar
Mcl-1	Myeloid cell leukemia sequence 1
mg	Milligramm
mGluR	metabotroper Glutamat-Rezeptor
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
MLV	murines Leukämievirus
min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
mRNA	messenger Ribonukleinsäure

Na	Natrium
Na-K-ATPase	Natrium-Kalium-ATPase
NF κ B	Nuclear Factor „kappa-light-chain-enhancer“ of activated B-cells
NGF	Nerve Growth Factor
nM	nano Molar
nmol	Nanomol
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NO	Stickoxid
NT	Neurotrophin
PBPs	Penicillin-bindende-Proteine
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
qPCR	Real-Time-quantitative-PCR
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehung pro Minute
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
rt-PA	rekombinantes Gewebsplasminogenaktivator
RT-PCR	Real Time Polymerase Chain Reaction
SLC	solute carrier; löslicher Transporter
TNF α	Tumor-Nekrose-Faktor α
Taq	Thermophilus aquaticus
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Trk	Tyrosinkinase
Trk-R.	Tyrosinkinase-Rezeptor
TTP	Thymidintriphosphat
U	Unit; Einheit

VGluTs	vesikuläre Glutamat-Transporter
VSOAC	volume-sensitive organic anion channels
ZNS	Zentralnervensystem
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	mikromolar
[Glucose]	Glucose-Konzentration
[Na ⁺]	Konzentration an Na ⁺ -Ionen
[K ⁺]	Konzentration an K ⁺ -Ionen

9. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Susanne Walter, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Neuroprotektive Wirkmechanismen von Ceftriaxon: Rolle der Astrozyten-Neuronen-Achse selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

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

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

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

16.07.2014

Unterschrift

Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Susanne Walter, Pawel Namsolleck, Katja Schwengel, Thomas Unger, Christa Thöne-Reineke, Ulrike Muscha Steckelings

The beta-lactam antibiotic ceftriaxone acts neuroprotective by stimulation of glutamate uptake into astrocytes

(Manuskript in Vorbereitung)

Beitrag im Einzelnen: 70% Beteiligung an Idee und Konzept der Experimente, Methodenetablierung, Planung und Durchführung der Experimente, statistische Auswertung, Verfassen des Manuskripts

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

10. Lebenslauf

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

11. Publikationsliste

Susanne Walter, Pawel Namsolleck, Katja Schwengel, Thomas Unger, Christa Thöne-Reineke,
Ulrike Muscha Steckelings

The beta-lactam antibiotic ceftriaxone acts neuroprotective by stimulation of glutamate uptake
into astrocytes

(Manuskript in Vorbereitung)

12. Danksagung

Ich möchte mich hiermit bei Herrn Prof. Dr. Unger, Frau Prof. Dr. Steckelings und Frau PD Dr. Christa Thöne-Reineke für die Überlassung des interessanten Promotionsthemas sowie die gute Betreuung und die Anleitung zur wissenschaftlichen Arbeit bedanken.

Besonderen Dank gilt auch allen Mitarbeitern des CCR die mich unterstützt haben. Insbesondere Pawel Namsolleck, Kristin Lucht, Kerstin Seidel und Katja Schwengel. Die mir mit Rat und Tat im Labor zur Seite standen.

Ich bedanke mich bei meiner Familie für Ihre Unterstützung.