

2 Herleitung der Aufgabenstellung

2.1 Präkonditionierungsmodelle

Zur Erzeugung einer Toleranz gegen einen Stressor bedarf es dreier intrazellulärer Komponenten. Zunächst muss 1. eine Detektion des Stimulus erfolgen, dieser muss 2. in ein intrazelluläres Signal übersetzt werden und dieses muss 3. zu einer Toleranzinduktion führen.

Aufgrund der Tatsache, dass an einer Vielzahl von Geweben und Zellen eine Toleranzentwicklung durch Präkonditionierung nachweisbar ist, geht man davon aus, dass es sich bei der Signaldetektion um einen hochkonservierten Mechanismus handelt, der durch eine relativ geringe Anzahl von Sensoren geleistet wird, die ein mehr oder minder stereotypes Stress-Signal generieren und weiterleiten.

Im Gegensatz dazu existiert offensichtlich eine Vielzahl von toleranzinduzierenden Effektoren, die einerseits spezifisch für das betroffene Gewebe und auch spezifisch für den potentiell letalen Stimulus sind, andererseits aber auch unspezifische protektive und regenerierende Funktionen ausüben können. Eine Übersicht über die vermuteten Mechanismen der ischämischen Toleranz gibt die folgende Tabelle (Tabelle 1).

Tabelle 1: **Mechanismen der Ischämie-Toleranz.** Modifiziert nach Kirino [59].

| |
|--|
| <p><u>1. Membran-Stabilisierung und Hemmung der Erregbarkeit</u></p> <ul style="list-style-type: none">• Adenosin• GluR(Glukose Rezeptor)2• ATP-abhängiger Kalium-Kanal |
| <p><u>2. Zellprotektion und Apoptoseinhibition</u></p> <ul style="list-style-type: none">• Proteinphosphorylierung<ul style="list-style-type: none">▪ Hemmung der MAP(mitogen activated protein) –Kinasen▪ Hemmung der CaM-Kinase II▪ Aktivierung von Akt• NO-Produktion<ul style="list-style-type: none">▪ Raf, Mek, Erk• Frühe-Phase-Gene<ul style="list-style-type: none">▪ c-Jun, c-Fos• Protektion durch Zytokine<ul style="list-style-type: none">▪ TNF(Tumor Nekrose Faktor)-alpha▪ Interleukin1-beta▪ Ceramid• Apoptoseinhibition<ul style="list-style-type: none">▪ Hemmung von p53▪ Expression von Bcl-2• Gliale Zellproliferation |
| <p><u>3. Stressantwort</u></p> <ul style="list-style-type: none">• Chaperone<ul style="list-style-type: none">▪ Entfaltung von Proteinen▪ Abbau denaturierter Proteine• Prozessierung von entfalteten Proteinen am endoplasmatischen Retikulum• Wiederherstellung der Proteinsynthese |

Mek: mitogen activated protein kinase kinase, Erk: extracellular signal-regulated kinase, Raf: serine/threonine-proteinkinase, c-jun, c-fos: humane Proto-Oncogene, Bcl-2: B-Zell-Lymphom-2 Gen.

Das Wissen um die neuronalen Toleranzmechanismen ist nach wie vor lückenhaft. Hingegen gut bekannt und in zahlreichen Experimenten bestätigt sind die zeitlichen Abläufe der Toleranzinduktion.

Man geht von der Existenz von zwei verschiedenen Zeitfenstern der Präkonditionierung aus.

Ein kurzes Zeitintervall wenige Minuten nach dem Stimulus ist vermutlich unabhängig von der Proteinsynthese und durch posttranslationale Modifizierungen bedingt. Die Dauer ist zeitlich auf wenige Minuten bis Stunden begrenzt, wie bei den ersten Untersuchungen am Myokard. Präkonditionierungen nach einem kurzen Intervall wurden sowohl *in vivo* als auch *in vitro* beschrieben [13, 14, 28, 37, 48, 60, 61], wobei es fraglich ist, ob die beobachtete Wirkung nur zu einer Verzögerung des Zelltodes oder tatsächlich zu einer Verhinderung von letaler Zellschädigung führt. *In vitro* ist eine Langzeitbeobachtung in Bezug auf neuronales Überleben methodenbedingt nur für wenige Tage möglich. Ein hierzu methodisch sehr interessantes Experiment *in vivo* an Ratten wurde 1997 von Pérez-Pinzón veröffentlicht [27]: Zwischen präkonditionierender und potentiell letaler Ischämie lag ein kurzes 30-minütiges Reperusionsintervall. Bei Vergleich am 3. postischämischen Tage wurde eine signifikant geringere Zellschädigung in präkonditionierten Tieren gefunden. Wurden die Tiere erst am 7. postoperativen Tag miteinander verglichen, war nur noch ein wesentlich geringerer Unterschied feststellbar, der nicht mehr das Signifikanzniveau erreichte. Weitere Experimente die sich mit einer Präkonditionierung im kurzem Zeitintervall beschäftigen und eine Langzeitbeobachtung einschließen, stehen noch aus.

Im Gegensatz dazu wird für das späte Zeitfenster die Fähigkeit zur *de novo* Proteinbiosynthese vorausgesetzt. Mit dieser verzögerten Entwicklung der Präkonditionierung beschäftigen sich die meisten Untersuchungen am Hirn bzw. an Neuronen. Das Latenzintervall beträgt dabei in der Regel mindestens 24 Stunden, die Protektion hält für einige Tage an und nimmt nach circa einer Woche langsam wieder ab [33, 37]. Hierbei konnte in mehreren Publikationen auch nach bis zu 8 Wochen ein Unterschied zwischen präkonditionierten und nicht präkonditionierten Tieren gezeigt werden, der sich auch in verbesserten funktionellen Parametern, wie der Merkfähigkeit zeigen ließ[62, 63].

2.2. Auswahl eines geeigneten Modells zur Untersuchung der zellulären Komponenten der Präkonditionierung

Uns interessiert der spezielle Teilaspekt der Entwicklung einer Ischämietoleranz an *neuronalen* Zellen, deren Untergang beim Schlaganfall hauptsächlich für die anschließenden neurologischen Defizite verantwortlich zu machen ist.

In *in vivo* Modellen ist die Situation des tatsächlichen Schlaganfalls naturgemäß leichter nachzustellen. Andererseits stellt gerade die Komplexität eines Tiermodells ein Problem dar, da sich nur selten alle begleitenden Einflüsse kontrollieren und standardisieren lassen, wie zum Beispiel der Blutdruck, der Blutzuckerspiegel und der zerebrale Blutfluss über Kollateralgefäße. Dadurch ist zwar die Gesamtwirkung einer Substanz besser abschätzbar, jedoch ist die Aufdeckung der beteiligten Mechanismen deutlich erschwert, da nur schwer zwischen neuronalen, astrozytären, endothelialen, vaskulären und rheologischen Effekten unterschieden werden kann.

Aus diesem Grunde wählten wir für unsere Versuche eine neuronienangereicherte Zellkultur aus kortikalen Nervenzellen und beobachteten deren Toleranz gegenüber einer Ischämiesimulation mit und ohne vorherige Stimulation mit verschiedenen möglicherweise präkonditionierenden Substanzen. Dabei ist zu beachten, dass die embryonal entnommenen Neuronen erst eine Maturation durchlaufen müssen, ehe sie NMDA-Rezeptoren ausgebildet haben und ihre Vulnerabilität gegenüber einem hypoxischen (NMDA-vermittelten) Stimulus mit adulten Zellen vergleichbar ist [64, 65].

Die Simulation der Ischämie erfolgte durch OGD. In diesem Modell ist das Substratangebot durch das aufgebrachte Medium und die Schwere und Dauer der Hypoxie durch die Bedingungen in der Hypoxiekammer standardisiert. Durch die genaue Steuerung der wichtigsten Komponenten wie Sauerstoffpartialdruck, Temperatur, relative Luftfeuchtigkeit und Hypoxiedauer kann eine optimale Vergleichbarkeit aufeinanderfolgender Experimente gewährleistet werden. Da die Menge an definiertem Zellkulturmedium konstant 500µl betrug, reicherten sich Stoffwechselmetabolite jeweils in gleicher Menge an, ohne dass wie *in vivo* durch Kollateral- oder Reperfusion ein Auswaschen stattfinden konnte.

Aufgrund des Anreicherns von Neuronen durch geeignetes Zellkulturmedium wurde die physiologische Relation von Neuronen zu Astrozyten, die *in vivo* 1:10

beträgt, auf etwa 10:1 umgekehrt (Abbildung 2). Dadurch unterscheidet sich die untersuchte Zellpopulation zwar erheblich von der *in vivo*-Situation, aber so konnte davon ausgegangen werden, dass die beobachteten Effekte tatsächlich hauptsächlich auf *neuronalen* Regulationsmechanismen beruhen.

Zuvor konnte durch unsere Arbeitsgruppe in diesem Modell eine gesteigerte Hypoxietoleranz nach kurzer subletaler Stimulation bei einer erneuten längeren OGD nachgewiesen werden [43], so dass dieses Modell für unsere Untersuchungen geeignet schien. Unsere Ergebnisse der hypoxischen Präkonditionierung in diesem Modell zeigt die Abbildung 1. Wir konnten durch eine 90-minütige hypoxische Präkonditionierung (HP) 48 Stunden vor einer letalen 120-minütigen OGD eine Schadensreduktion, gemessen an der Freisetzung der Laktatdehydrogenase (LDH), um 57% erreichen.

Als „full kill“ bezeichnet wird hierbei ein Vergleichswert, der einem 100%igen neuronalen Schaden entsprechen soll. Er wird durch die Applikation des exzitatorischen Neurotransmitters Glutamat erzeugt.

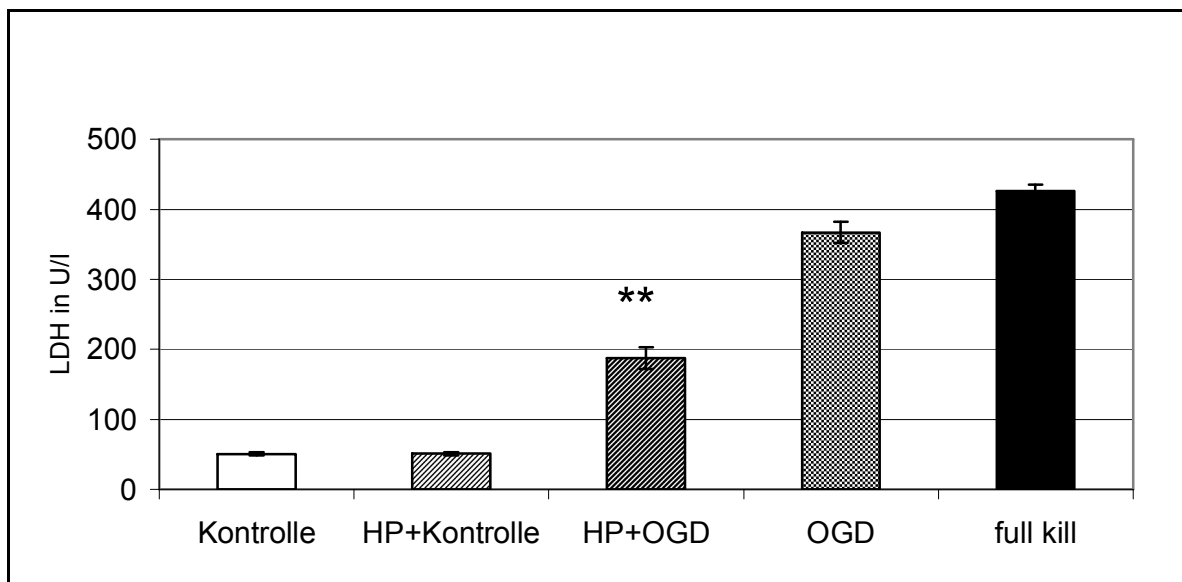


Abbildung 1: LDH-Freisetzung 24h nach 120-minütiger OGD am 12. Tag in Kultur (days in vitro = DIV) nach 90 min HP am 10. DIV. Mittelwerte in U/I \pm SEM. N=16, je 3 Experimente. HP: hypoxische Präkonditionierung, full kill: maximaler glutamat-induzierbarer Zellschaden, OGD: Sauerstoff-Glukose-Entzug. ** $p < 0,001$ versus OGD.

2.3. Kreuztoleranz

Als Kreuztoleranz bezeichnet man die Tatsache, dass nach der Einwirkung eines spezifischen Stresses/ Stimulus eine gesteigerte Toleranz gegenüber einer anderen Noxe entwickelt wird.

Als klassisches Beispiel hierfür gilt die hypertherme Präkonditionierung, die an Retinazellen vor exzessiver Photostimulation [66] und an Rattenneuronen vor anschließender Ischämie [67, 68] nachgewiesen wurde. Bei letzterer war die maximal erreichte Protektion allerdings deutlich geringer als die durch ischämische Präkonditionierung erreichbare Protektion. Beachtenswerter Weise konnte ebenso durch eine Vorbehandlung mittels Hypothermie eine Verringerung der Infarktgröße nachgewiesen werden [50, 59]. Auch für komplexe physiologische Stimuli wie eine Spreading Depression [38, 54, 55, 70] oder einen Status epilepticus [71] wurde *in vivo* eine nachfolgende gesteigerte Ischämie-Toleranz bestätigt. Vice versa ist durch eine vorangehende Hypoxie eine Kreuztoleranz gegen eine Kainat-vermittelten Zellschädigung von hippocampalen CA1-Neuronen gezeigt worden [72].

Für die klinische Umsetzung jedoch wesentlich interessanter ist eine Ischämietoleranz nach pharmakologischer Präkonditionierung. Dieser Begriff wurde 1997 von Riepe et al. eingeführt. Die Vorbehandlung mit 3-NPA (einem Inhibitor der oxidativen Phosphorylierung) konnte eine gesteigerte Hypoxietoleranz *in vitro* [45] induzieren. Diese Ergebnisse wurden ebenso *in vivo* an der Ratte und an Wüstenspringmäusen bestätigt [46, 47]. Die folgende Tabelle 2 gibt eine Übersicht, über die Substanzen, durch die eine Präkonditionierung gezeigt werden konnte.

Tabelle 2: Substanzen, die eine Präkonditionierung auslösen.

| |
|---|
| <u>Chemische Präkonditionierung <i>in vivo</i></u> <ul style="list-style-type: none">• 3-NPA [46, 47]• TNF-alpha [73] |
| <u>Chemische Präkonditionierung <i>in vitro</i></u> <ul style="list-style-type: none">• 3-NPA [45, 74]• NMDA-Rezeptor-Agonisten und Antagonisten [44, 75]• TNF-alpha [76]• Ceramide [76]• Cycloheximid [52] |

2.4. Auswahl chemischer Substanzen zur Präkonditionierung

2.4.1. Hemmer der Atmungskette

Die oxidative Phosphorylierung durch die Enzyme der Atmungskette stellt die Hauptenergiequelle im Hirnstoffwechsel dar. Durch die Hemmung eines Enzyms der Atmungskette kann ein Energiemangel hervorgerufen werden, der ähnlich wie eine milde oder kurzzeitige Ischämie eine Präkonditionierung der Neuronen in der Zellkultur hervorrufen könnte.

Daher wählten wir als möglichen präkonditionierenden Stimulus 3-NPA. Dieser Hemmer des Komplex II der Atmungskette bewirkt eine konzentrationsabhängige irreversible Hemmung der mitochondrialen Succinat-Dehydrogenase [77] und verhindert damit die Einspeisung von Protonen über FAD. Durch einen gestörten Elektronenfluss entstehen dabei intrazellulär freie Sauerstoffradikale und die oxidative Phosphorylierung ist gestört [78, 79].

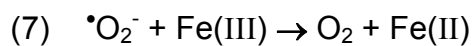
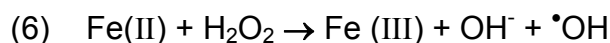
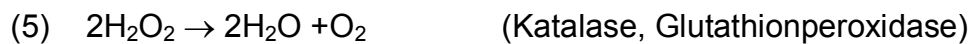
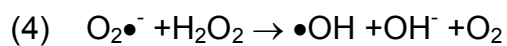
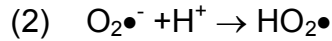
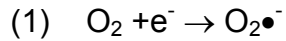
Da die Komplexe I, III und IV in ihrer Funktion unbeeinträchtigt bleiben, kann ein Teil der Atmungskette ungehindert ablaufen und eine eingeschränkte oxidative Energiegewinnung bleibt weiterhin möglich. Mit einer Beendigung der Wirkung ist erst bei einer *de novo* Synthese von Succinat-Dehydrogenase nach etwa 24 – 48 Stunden zu rechnen.

2.4.2. Redoxsystem mit Produktion von freien Hydroxylradikalen

Während einer zerebralen Ischämie und der anschließenden Reperfusion werden vermehrt freie Radikale freigesetzt [80]. Um die möglichen präkonditionierenden Aspekte dieser Radikalfreisetzung *in vitro* zu simulieren, wählten wir daher ein System, das *in vitro* zuverlässig und dosisabhängig freie Radikale generiert.

Reduzierte metallische Ionen wie Fe^{2+} reagieren mit Wasserstoffperoxid und führen dabei zu einer Produktion von reaktiven Sauerstoffradikalen wie dem hochreaktiven Hydroxyl-Radikal ($\cdot\text{OH}$) (Gleichung 6 = Fenton-Reaktion) [81]. In Verbindung mit dem als Reduktionsmittel wirkenden Ascorbat kann über die Haber-Weiss-Reaktion (Gleichung 4) ein hohes oxidatives Potential entstehen. So kann Ascorbat das Superoxidanion in Gleichung 7 ersetzen, um wieder die reduzierte Form von Eisen zu erhalten und eine erneute Hydroxylradikalproduktion hervorrufen. Zusätzlich nimmt man an, dass Ascorbat autooxidiert [82] und dabei

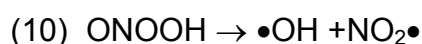
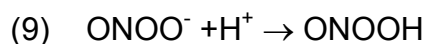
Superoxidanionen freisetzt. Diese können entweder (Gleichung 7) ebenfalls Eisen reduzieren, oder katalysiert durch die Superoxiddismutase (Gleichung 3) Wasserstoffperoxid bilden, aus welchem wie in Gleichung 6 dargestellt, das hochreaktive Hydroxylradikal ($\bullet\text{OH}$) entstehen kann.



Die radikalische Wirkung hält dabei genau so lange an, wie das Gemisch den Zellen appliziert wird, so dass nach dem Herunterwaschen von der Zellkultur der radikalische Stress terminiert wird. Die Stärke des Stimulus kann dabei also sowohl durch die Konzentration als auch die Einwirkzeit variiert und definiert werden.

2.4.3. NO-Donoren

NO ist als Endothelium-derived relaxing factor der stärkste physiologische Vasodilatator. Zusätzlich ist NO selbst ein Radikal und zur Generation des hochreaktiven Peroxynitrits in der Lage (Gleichung 8-10). *In vivo* ist im Gegensatz zu *in vitro*-Experimenten nur schwer zwischen diesen beiden Effekten zu unterscheiden.



Verschiedene Substanzenklassen, die als NO-Donoren wirken, sind zur Zeit zur experimentellen Anwendung erhältlich. Dazu gehören Natriumnitroprussid, organische Nitrate, Sydnonimine, Nucleophile-NO-Komplexe und S-Nitrosothiole.

Der NO-Donor N-[4-[1-(3-aminopropyl)-2-hydroxy-2-nitrosohydrazino]-butyl]-1,3-propan-diamin, der auch als Spermine NONOate oder sperminer NO-Komplex (SPER/NO) bezeichnet wird, gibt spontan nichtenzymatisch NO ab, ohne wie andere NO-Donoren dabei Redoxreaktionen zu durchlaufen [83].

Die physiologische NO-Konzentration liegt in einem Bereich um 100 – 500nM [84], wobei die größte Affinität zum Eisen-Häm-Kofaktor der löslichen Guanylatcyclase besteht. Daher wird in den meisten Systemen die intrazelluläre Signalkaskade der NO-Wirkung über die Synthese von cGMP fortgeleitet. Allerdings können durch die induzierbare NO-Synthetase (iNOS) nach Laurent [85] Konzentrationen bis zu 4-5 μM *in vivo* entstehen, bei der auch zusätzliche Signalübertragungs-Mechanismen außer der Guanylatzyklase eine Rolle spielen. So bindet NO ebenfalls an Eisen-Schwefel-Gruppen von verschiedenen Enzymen, die zum Teil bedeutende Rollen in der Energiegewinnung und DNA-Synthese spielen und verändert deren Aktivitätsgrad [86].

Für NO konnte eine Beteiligung an der neurotoxischen Schadenskaskade, die durch Glutamat ausgelöst wird, nachgewiesen werden [87]. Glutamat ist der Hauptmediator der exzitotoxischen Zellschädigung an Neuronen. Wir gingen daher davon aus, dass NO in der Lage sein müsste, einen deutlichen Stress-Stimulus an kultivierten Neuronen auszulösen und so eventuell eine Präkonditionierung hervorzurufen. Die genaue Rolle von NO bzw. der endothelialen (eNOS), neuronalen (nNOS) und induzierbaren (iNOS) NO-Synthasen während der Ischämie und der ischämischen Präkonditionierung sind noch unklar.

2.4.4. Flupirtin

Flupirtin ist bekannt als zentral wirkendes, nicht opioides Analgetikum und bereits seit 1984 als solches unter dem Handelsnamen Katadolon in klinischem Gebrauch. Neuere Untersuchungen deuteten jedoch neben den bekannten antikonvulsiven und muskelrelaxierenden Effekten [88] auch auf eine zusätzliche zyto- und neuroprotektive Wirkung hin. Inzwischen konnte eine Protektion von Retina-Zellen *in vivo* während einer Ischämie an Ratten [89, 90], eine Reduktion des Infarktareals *in vivo* in Mäusen nach intraperitonealer Applikation eine Stunde vor der Ischämie und eine Verringerung eines exzitotoxischen glutamatvermittelten Schadens *in vitro* durch Applikation von Flupirtin 30 Minuten vor und während der Glutamatexposition [91], eine Neuroprotektion gegen β -Amyloid-induzierte Apoptose *in vitro* [92] und eine Verhinderung einer neuronalen Schädigung durch Prionen-Fragmente und Bleiacetat *in vitro* nachgewiesen werden [93].

Der für die Neuroprotektion hauptsächlich verantwortlich gemachte Wirkmechanismus ist ein funktioneller NMDA-Rezeptor-Antagonismus [94]. NMDA-Rezeptoren sind Glutamatrezeptoren und spielen eine entscheidende Rolle in der durch Glutamat ausgelösten Exzitotoxizität. Bereits 1992 schlugen Kato et al. die milde NMDA-Rezeptor-Aktivierung als Grundlage der ischämischen Toleranzentwicklung vor. Sie stützten dies auf die Beobachtung, dass MK-801, ein NMDA-Antagonist die Entwicklung einer ischämischen Toleranz blockieren konnte [32].

Flupirtin bindet zwar an keine der bekannten Bindungsstellen des NMDA-Rezeptors, könnte jedoch nach Kornhuber [95] eine Öffnung von einwärts gerichteten Kalium-Kanälen bewirken und so durch Stabilisation des Membranpotentials und Stärkung des Mg^{2+} -Blockes am NMDA-Rezeptor einen funktionell antagonistischen Effekt bewirken.

Aufgrund des vermuteten funktionellen NMDA-Antagonismus lag es nahe, eine mögliche neuroprotektive Wirkung bei Applikation *während* einer OGD in unserem Modell zu vermuten. Eine präkonditionierende Wirkung von Flupirtin war bislang nicht bekannt. Ebenso bisher nicht untersucht war die Auswirkung von Flupirtin bei Applikation während einer hypoxischen Präkonditionierung.

2.5. Auswahl der untersuchten Zeitfenster

Die Existenz eines physiologisch bedeutsamen verzögerten Präkonditionierungs-Zeitfensters ist im Gegensatz zum kurzen Zeitfenster am Hirn allgemein akzeptiert [59]. Wir wählten daher ein Präkonditionierungs-Zeitfenster von 24 - 96 Stunden für unsere Experimente. Ein längeres Intervall war wegen der begrenzten Lebensdauer der Neuronenkulturen und wegen der geplanten Nachbeobachtung über 72 Stunden nicht möglich.

2.6 Fragestellungen

1. Ist eine chemische Präkonditionierung von Neuronenkulturen vor einer OGD *in vitro* durch 3-NPA, SPER/NO, Eisen-Ascorbat und/oder Flupirtin möglich? Falls diese Toleranzentwicklung nachweisbar ist, in welchem Zeitfenster ist eine optimale präkonditionierende Wirkung nachweisbar?

2. Welche Rolle spielt die Freisetzung von freien Radikalen und ihre Blockade bei der chemischen Präkonditionierung in unserem System?

3. Welches sind die Auswirkungen von Flupirtin auf eine 120-minütige, schädigende OGD und auf eine 90-minütige präkonditionierende OGD von Neuronenkulturen *in vitro*?