

Aus der Klinik für Kinderkardiologie und Angeborene Herzfehler
des Deutschen Herzzentrums Berlin

DISSERTATION

Regulation von Kälteschockproteinen nach moderater Hypothermie
zur Neuroprotektion nach Hypoxie: ein Zellkulturmodell mit
neuronalen Zellen

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Lisa-Maria Rosenthal

aus Berlin

Datum der Promotion: 05.06.2016

Inhaltsverzeichnis

I.	Abkürzungsverzeichnis.....	5
II.	Abbildungsverzeichnis	8
III.	Kurzfassung.....	9
IV.	Abstract.....	11
1	Einleitung.....	13
1.1	Therapeutische Hypothermie.....	13
1.1.1	Definition Hypothermie.....	13
1.1.2	Klinische Anwendung der therapeutischen Hypothermie.....	13
1.2	Klinischer Hintergrund: Perinatale Asphyxie.....	14
1.2.1	Perinatale Asphyxie und hypoxisch-ischämische Enzephalopathie.....	14
1.2.2	Schädigungsmechanismen während der perinatalen Asphyxie.....	15
1.2.3	Zellphysiologische Veränderungen und Schädigungsmechanismen durch Hypoxie.....	17
1.3	Mechanismen der Hypothermie-induzierten Neuroprotektion nach Hypoxie.....	18
1.3.1	Stoffwechsel und Energiehaushalt.....	19
1.3.2	Exzitotoxizität und freie Radikale.....	19
1.3.3	Zelltod.....	19
1.3.4	Inflammation.....	20
1.4	Die Kälteschockproteine RBM3 und CIRP.....	20
1.4.1	RNA-binding motif 3 (RBM3).....	20
1.4.2	Cold-inducible RNA-binding protein (CIRP).....	22
1.5	Zielsetzung dieser Arbeit.....	23
2	Materialien.....	24
2.1	Geräte.....	24
2.2	Chemikalien.....	25
2.3	Zellkulturmaterialien.....	26
2.3.1	SK-N-SH.....	26
2.3.2	Primäre Neurone.....	26
2.4	Antikörper.....	27
2.5	RT-PCR.....	27
2.6	Software.....	28

3 Methoden.....	29
3.1 Zellkultur.....	29
3.2 Präparation primärer Neuronen.....	29
3.3 Simulation der perinatalen Asphyxie.....	30
3.4 Zeit-Temperatur-Protokoll.....	31
3.5 Trypanblau-Färbung zur Zellzählung.....	32
3.6 Phasenkontrastmikroskopie.....	32
3.7 Immunohistochemische Fluoreszenzmikroskopie.....	32
3.8 Messung der LDH-Aktivität zur Quantifizierung des Zelltodes.....	33
3.9 Messung der NSE-Aktivität in den Zellüberständen.....	34
3.10 MTT: Messung mitochondrialer Aktivität.....	34
3.11 Messung des ATP-Gehalts.....	35
3.12 BrdU: Messung der Zellproliferation.....	35
3.13 Untersuchung der Proteinregulation mittels Western Blot Technik.....	36
3.13.1 Gewinnung und Aufreinigung der Proteine.....	36
3.13.2 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA.....	37
3.13.3 Gelelektrophorese (SDS-Page).....	37
3.13.4 Proteintransfer mittels Tank-Blotting-Methode.....	37
3.13.5 Detektion spezifischer Proteine.....	38
3.13.6 Densitometrische Analyse.....	39
3.14 Untersuchung der mRNA-Regulation mittels quantitativer RT-PCR.....	39
3.14.1 Isolation der RNA.....	39
3.14.2 Bestimmung der RNA-Konzentration.....	40
3.14.3 Reverse Transkription.....	40
3.14.4 Quantitative RT-PCR.....	40
3.15 Statistische Analyse.....	41
4 Ergebnisse.....	42
4.1 LDH-Aktivität.....	42
4.1.1 Einfluss von Hypothermie auf die LDH-Aktivität.....	42
4.1.2 Einfluss von schwerer Hypoxie und anschließender Hypothermie.....	42
4.1.3 Einfluss von milder Hypoxie und anschließender Hypothermie.....	43
4.2 Aktivität der neuronenspezifischen Enolase.....	44
4.3 Aktivierung der Caspase 3 und Apoptose.....	45

4.3.1	Einfluss von Hypothermie auf die Aktivierung von Caspase 3.....	45
4.3.2	Einfluss von Hypoxie und Hypothermie auf die Aktivierung von Caspase 3.....	45
4.4	Metabolische Aktivität - MTT-Test.....	46
4.4.1	Einfluss von Hypothermie auf die metabolische Aktivität.....	46
4.4.2	Einfluss von Hypoxie und Hypothermie auf die metabolische Aktivität.....	46
4.5	ATP-Gehalt.....	48
4.5.1	Einfluss von Hypothermie auf den ATP-Gehalt.....	48
4.5.2	Einfluss von schwerer Hypoxie und Hypothermie auf den ATP-Gehalt.....	48
4.6	Zellproliferation.....	49
4.6.1	Einfluss von Hypothermie auf die Zellproliferation.....	49
4.6.2	Einfluss von Hypoxie und Hypothermie auf die Zellproliferation.....	49
4.7	Zellmorphologie.....	50
4.8	RBM3.....	51
4.8.1	Einfluss von Hypoxie und Hypothermie auf die mRNA-Expression von RBM3.....	51
4.8.2	Einfluss von Hypoxie und Hypothermie auf RBM3-Proteinexpression.....	53
4.9	CIRP.....	55
4.9.1	Einfluss von Hypoxie und Hypothermie auf die mRNA-Expression von CIRP.....	55
4.9.2	Einfluss von Hypoxie und Hypothermie auf die CIRP-Proteinexpression.....	56
4.10	Validierung der Ergebnisse der Zellkultur in primären Neuronen.....	58
4.10.1	Einfluss von Hypothermie auf die LDH-Aktivität.....	58
4.10.2	Einfluss von milder Hypoxie und Hypothermie auf die LDH-Aktivität.....	58
4.10.3	Einfluss von Hypothermie auf die mRNA-Expression von RBM3.....	59
4.10.4	Einfluss von milder Hypoxie und Hypothermie auf die mRNA-Expression von RBM3.....	59
5	Diskussion.....	60
5.1	Einfluss von Hypoxie und Hypothermie auf das Zellüberleben.....	60
5.2	Einfluss von Hypoxie und Hypothermie auf den Metabolismus.....	62
5.3	Einfluss von Hypoxie und Hypothermie auf die Zellmorphologie.....	63
5.4	Regulation von Kälteschockproteinen.....	64
5.4.1	Regulation von RBM3.....	64
5.4.2	Regulation von CIRP.....	66

5.5 Unterschiede in primären Neuronen.....	67
5.6 Limitationen des Zellkulturmodells.....	68
5.7 Schlussfolgerungen und Ausblick.....	69
6 Literaturverzeichnis.....	71
7 Lebenslauf.....	78
8 Publikationsliste.....	80
9 Erklärung.....	81
10 Danksagung.....	82

I. Abkürzungsverzeichnis

AIF	Apoptose-induzierender Faktor
ANOVA	Analysis of variance (Varianzanalyse)
ATP	Adenosintriphosphat
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften
Bax	proapoptotisches Protein aus der Bcl-2-Familie
BCA	Bicinchoninsäure
Bcl-2	B-cell lymphoma 2, antiapoptotisches Protein
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	bovine serum albumine, Rinderalbuminserum
cDNA	komplementäre DNS
CIRP	Cold-inducible RNA-binding protein
Cyt C	Cytochrom C
DAPI	4',6-Diamin-2-phenylindol
DMEM	Dubecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
ECL	Elektrochemolumnieszenz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EEG	Elektroenzephalogramm
FasL	Fas Ligand, Protein aus der Tumor Nekrose Faktor-Familie
FCS	Fetales Kälber-Serum
GLUT-1	Glucosetransporter 1
GLUT-3	Glucosetransporter 3
HCL	Salzsäure
HIE	Hypoxisch-ischämische Enzephalopathie
HIF	Hypoxie-induzierter Faktor
IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-6	Interleukin-1
LDH	Lactat-Dehydrogenase

mRNA	Messenger RNA
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NAD ⁺	Nikotin-Adenin-Dinukleotid, oxidierte Form
NADH	Nikotin-Adenin-Dinukleotid, reduzierte Form
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
nNOS	neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
PAGE	Polyarcylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline, phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RBM3	RNA-Binding Motif 3
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RRM	RNA-recognition motif, RNA-Erkennungs-Motiv
SDS	sodium dodecyl sulphate, Natriumdodecylsulfat
siRNA	small interfering RNA, kleine eingreifende RNA
TAMRA	Tetramethylrhodamin
TH	Therapeutische Hypothermie
TNF- α	Tumornekrose-Faktor alpha
TRIS-HCL	Tri-Hydroxymethyl-Aminomethan-Salzsäure
UV	Ultraviolett

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Phasen der Schädigung während perinataler Asphyxie.....	17
Abbildung 2	Zeit-Temperatur-Protokoll.....	31
Abbildung 3	LDH-Aktivität in den Zellüberständen nach moderater Hypothermie.....	42
Abbildung 4	LDH-Aktivität in den Zellüberständen nach schwerer und milder Hypoxie.....	43
Abbildung 5	NSE-Aktivität in den Zellüberständen nach schwerer Hypoxie.....	44
Abbildung 6	MTT-Reduktion nach moderater Hypothermie.....	46
Abbildung 7	MTT-Reduktion nach schwerer und milder Hypoxie.....	47
Abbildung 8	ATP-Gehalt nach moderater Hypothermie und schwerer Hypoxie.....	48
Abbildung 9	Zellmorphologie.....	50
Abbildung 10	mRNA-Expression von RBM.....	52
Abbildung 11	Western Blot von RBM3 und β -Actin.....	53
Abbildung 12	Proteinexpression von RBM3.....	54
Abbildung 13	mRNA-Expression von CIRP nach Hypothermie bzw. schwerer Hypoxie.....	55
Abbildung 14	mRNA-Expression von CIRP nach schwerer Hypoxie und Hypothermie.....	56
Abbildung 15	Western Blot von CIRP und β -Actin.....	56
Abbildung 16	Proteinexpression von CIRP.....	57
Abbildung 17	LDH-Aktivität in den Überständen von primären Neuronen.....	58
Abbildung 18	mRNA-Expression von RBM3 in primären Neuronen.....	59

III. Kurzfassung

Einleitung: Perinatale Asphyxie ist die dritthäufigste Todesursache in den ersten vier Lebenswochen und kann zu schweren neurologischen Folgeschäden führen. Die einzige evidenzbasierte Therapie ist die Absenkung der Körpertemperatur auf 33-34 °C für 48-72 Stunden. Die Mechanismen der Hypothermie-induzierten Neuroprotektion sind bis heute nur teilweise verstanden. Insbesondere die Rolle der Kälteschockproteine RBM3 und CIRP bleibt unklar. Ziel dieser Arbeit ist die Etablierung eines Zellkulturmodells, um den Einfluss von Hypoxie und Hypothermie auf das Zellüberleben, das Proliferationsverhalten und den Zellmetabolismus sowie die Regulation von Kälteschockproteinen zu untersuchen.

Methoden: Für die Versuche wurden die humane Zelllinie SK-N-SH und eine Zellkultur aus primären kortikalen Neuronen verwendet. Hypoxie wurde mit Hilfe einer Hypoxiekammer mit Sauerstoffkonzentrationen von 0,2 % bzw. 8 % für 24 Stunden durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen für 24, 48 oder 72 Stunden auf 33,5 °C gekühlt. Zelltod wurde mit Hilfe der LDH- bzw. NSE-Aktivität in den Zellüberständen quantifiziert. Für das Apoptoseverhalten wurde das Verhältnis von Procaspase 3 zu aktivierter Caspase 3 mittels Western Blot-Technik analysiert. Das Proliferationsverhalten wurde mit der BrdU-Methode untersucht. Die Zellmorphologie wurde durch Immunfluoreszenzfärbung von β III-Tubulin und DAPI dargestellt. Der Zellmetabolismus wurde durch Messung des ATP-Gehalts und die metabolische Aktivität mittels MTT-Reduktion untersucht. Die Regulation der Kälteschockproteine RBM3 und CIRP wurde mit RT-PCR und Western Blot-Technik analysiert.

Ergebnisse: Schwere Hypoxie führte zu signifikant vermehrtem Zellsterben in SK-N-SH, wohingegen milde Hypoxie keinen Einfluss auf das Zellüberleben von SK-N-SH oder primären Neuronen hatte. Hypothermie reduzierte signifikant den Zelltod durch Hypoxie. Weder schwere noch milde Hypoxie führten zu einer erhöhten Apoptoserate und es war kein Einfluss auf die Zellproliferation zu beobachten. Morphologisch führte schwere Hypoxie zu einem Anschwellen der Zellsomata, Hypothermie reduzierte diese morphologischen Veränderungen. Schwere Hypoxie reduzierte signifikant den ATP-Gehalt in SK-N-SH-Zellen. Die metabolische Aktivität wurde weder durch milde noch durch schwere Hypoxie sondern lediglich durch Hypothermie reduziert. Hypothermie führte zu einer Induktion der mRNA von RBM3 in SK-N-SH und

primären Neuronen, sowie zu einer erhöhten RBM3-Proteinexpression in SK-N-SH. CIRP-mRNA und -Protein wurden in SK-N-SH durch moderate Hypothermie ebenfalls hochreguliert, die Unterschiede waren jedoch nur zu einigen Zeitpunkten signifikant. Weder schwere noch milde Hypoxie hatten einen erkennbaren Einfluss auf die Regulation von RBM3 und CIRP.

Schlussfolgerungen: Moderate Hypothermie schützt neuronale Zellen vor Zelluntergang durch Hypoxie. Darüber hinaus induziert moderate Hypothermie die Kälteschockproteine RBM3 und CIRP sowohl auf Transkriptions- als auch auf Translationsebene. Diese könnten mögliche Mediatoren der Hypothermie-induzierten Neuroprotektion sein.

IV. Abstract

Introduction: Perinatal asphyxia is the third most frequent cause of death occurring in the first 4 weeks of life and can also lead to severe neurological damage. The only evidence-based therapy is to lower the body temperature to 33-34 °C for 48-72 hours immediately after birth. However, the mechanisms of hypothermia-induced neuroprotection are still poorly understood, especially the role of cold-shock proteins. Therefore, the aim of this study is to establish a cell-based model to investigate the effects of hypoxia and hypothermia on cell survival, proliferation, and cell metabolism, as well as the regulation of cold-shock proteins.

Methods: Experiments were performed using a human SK-N-SH neuroblastoma cell line and mouse primary cortical neurons. Cells were exposed to either 0,2 % or 8 % O₂ for 24 hours in a hypoxia incubator followed by cooling to 33,5 °C for 24, 48 or 72 hours. Cell viability was assessed by LDH and NSE secretion into cell culture medium, apoptosis was analyzed via caspase 3 activation by western blots and cell proliferation was studied using BrdU cell proliferation assay kit. Neuronal cell type and morphology was identified by immunofluorescence staining with β III-Tubulin and DAPI. Cell metabolism was assessed by quantification of intracellular ATP levels and MTT reduction. The regulation of the cold-shock-proteins RBM3 and CIRP was analyzed via qRT-PCR and western blot.

Results: Exposure to severe hypoxia (0,2 % O₂) significantly increased cell death in the SK-N-SH cells, whereas mild hypoxia did not have an observable impact on cell survival in either SK-N-SH or primary cortical neurons. Moderate hypothermia for 48 or 72 hours rescued the cells from hypoxia-induced injury. No effects on apoptosis or cell proliferation by either degree of hypoxia were observed. However, severe hypoxia lead to observable cell swelling which was attenuated by hypothermia. Exposure to severe hypoxia also resulted in significantly reduced intracellular ATP-level in the SK-N-SH cells. Metabolic activity was not influenced by mild nor severe hypoxia, but reduced by hypothermia. RBM3 mRNA expression was induced by hypothermia in both SK-N-SH and primary cortical neurons, but RBM3 protein expression was up-regulated in response to hypothermia only in the SK-N-SH cells. Both CIRP mRNA and protein were up-regulated under hypothermic conditions, but only significantly at some time

points. Neither mild nor severe hypoxia alone had an observable impact on the expression of RBM3 and CIRP.

Conclusion: Moderate hypothermia protects neurons from hypoxia-induced cellular injury. Moreover, expressions of the cold-shock proteins RBM3 and CIRP are induced by moderate hypothermia on both the transcriptional and the translational levels. Cold-shock proteins could be a possible mediator of hypothermia-induced neuroprotection.

1 Einleitung

1.1 Therapeutische Hypothermie

1.1.1 Definition Hypothermie

Als Hypothermie ist die Senkung der Körperkerntemperatur auf $\leq 36,0$ °C definiert. Dabei ist die akzidentelle, nicht-induzierte Hypothermie im Rahmen einer Kälteexposition von der kontrolliert induzierten oder therapeutischen Hypothermie (TH) zu unterscheiden. In Abhängigkeit von der Höhe der Senkung der Körperkerntemperatur lässt sich therapeutische Hypothermie weiter unterteilen in ¹ :

- Milde Hypothermie 34,0 °C bis 35,9 °C
- Moderate Hypothermie 32,0 °C bis 33,9 °C
- Moderat tiefe Hypothermie 30,0 °C bis 31,9 °C
- Tiefe Hypothermie < 30,0 °C.

Die therapeutische Hypothermie dient in der klinischen Anwendung der Organprotektion und wird in verschiedenen Fachbereichen angewendet. Dabei wird zum einen prophylaktisch, z. B. intraoperativ bei kardiochirurgischen Eingriffen und zum anderen sekundär nach einer potentiellen Gewebsschädigung gekühlt.¹

1.1.2 Klinische Anwendung der therapeutischen Hypothermie

Milde bis moderate Hypothermie (34-35 °C) für 48 bis 72 Stunden wird in den aktuellen Leitlinien (Stand 06/2013) zur Therapie der perinatalen Asphyxie bei Neonaten ab einem Gestationsalter von 36 Schwangerschaftswochen empfohlen.² In mehreren kontrollierten randomisierten Studien und deren Meta-Analysen konnte nachgewiesen werden, dass milde bis moderate Hypothermie die Mortalität reduziert und das neurologische Outcome verbessert.³⁻⁹ Ein tendenziell positiver Effekt der Kühlung auf das Überleben und die Entwicklung der Intelligenz konnte noch bei Nachuntersuchungen im Alter von 6 bis 7 Jahren gezeigt werden.¹⁰ Moderate Hypothermie (32-34 °C) für 12 bis 24 Stunden wird nach kardiopulmonaler Reanimation bei Herzstillstand außerhalb eines Krankenhauses nach Kammerflimmern oder ventrikulären Tachykardien als Initialrhythmus in den Leitlinien der American Heart Association empfohlen.¹¹ Mehrere multizentrische Studien konnten einen positiven Effekt auf das Überleben

und das neurologische Outcome belegen.^{12,13} Eine multizentrische internationale Studie von Nielsen et al. stellt die derzeit angewandten Zieltemperaturen in Frage, nachdem sie keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Gesamtüberlebens und der neurologischen klinischen Entwicklung zwischen auf 33 °C und auf 36 °C gekühlten Patienten fanden.¹⁴ Der therapeutische Nutzen von Hypothermie nach erfolgreicher kardiopulmonaler Reanimation nach Herzstillstand außerhalb des Krankenhauses wird auch bei Kindern untersucht.¹⁵⁻¹⁷ Eine aktuelle multizentrische Studie von Moler et al. hat keinen signifikanten Vorteil von Hypothermie gegenüber Normothermie hinsichtlich des Überlebens mit guter Funktionalität bei Kindern im Alter von 2 Tagen bis 18 Jahren feststellen können.¹⁸ Die therapeutische Anwendung von moderater bis milder Hypothermie nach Schädel-Hirn-Trauma und Schlaganfall ist Gegenstand der klinischen Forschung.¹⁹⁻²²

1.2 Klinischer Hintergrund: Perinatale Asphyxie

1.2.1 Perinatale Asphyxie und hypoxisch-ischämische Enzephalopathie

Perinatale Asphyxie ist weltweit die dritthäufigste Todesursache in den ersten 4 Lebenswochen und eine der Hauptursachen für eine dauerhafte neurokognitive Behinderung.²³ In den westlichen Industrieländern wie den USA, Australien und Deutschland geht man von 1-3 betroffenen Kindern pro 1000 Lebendgeburten aus.^{24,25} Der Begriff Asphyxie kommt aus dem Griechischen und bedeutet wörtlich „Pulslosigkeit“. Bei der perinatalen Asphyxie kommt es zu einer Minderversorgung lebenswichtiger Organe mit Sauerstoff während oder unmittelbar nach der Geburt. Klinische Asphyxiekriterien sind eine metabolische Azidose mit einem pH-Wert von $\leq 7,0$ und einem Basendefizit von ≥ 12 mmol/l im Nabelarterienblut, ein Apgar-Score in der 10. Minute von < 5 , eine Reanimationsdauer über 10 Minuten, so wie nachgewiesene Organfunktionsstörungen.²⁶⁻²⁸ Eine perinatale Asphyxie kann prä-, intra- und postpartale Ursachen haben. Dazu zählen unter anderem die maternale Einnahme bestimmter Medikamente oder Drogen, Präeklampsie, eine Plazentainsuffizienz bzw. vorzeitige Plazentaablösung, Nabelschnurumschlingungen oder verschiedenste Komplikationen während der Geburt.^{25,29} Eine Minderversorgung des Gehirns im Rahmen einer Asphyxie kann zu einer hypoxisch-ischämischen Enzephalopathie (HIE) und damit zu neurologischen Langzeitschäden oder sogar zum Tod führen. Die HIE kann nach Sarnat und Sarnat³⁰ in drei Schweregrade unterteilt werden, die sich in ihrer klinischen Symptomatik und Prognose unterscheiden:

Stadium 1 <i>Milde HIE</i>	Übererregbarkeit, normales EEG, normale primitive Reflexe Dauer: maximal 24 Stunden Prognose: gut, meist keine neurologischen Defizite
Stadium 2 <i>Moderate HIE</i>	Lethargie, Benommenheit, muskuläre Hypotonie, multifokale Schlaganfälle, periodisches oder kontinuierliches Delta-EEG Dauer: 2-14 Tage Prognose: 50-60 % versterben oder weisen moderate bis schwere Defizite auf
Stadium 3 <i>Schwere HIE</i>	Stupor bzw. Koma, Fehlen von Primitivreflexen, isoelektrisches EEG Dauer: Stunden bis Wochen Prognose: etwa 80% versterben oder weisen neurologische Defizite auf.

Neben der hohen Letalität können Langzeitfolgen einer schweren Asphyxie in der Perinatalperiode unter anderem eine Zerebralparese, mentale Retardierung und Epilepsie sein.^{31,32} Milde bis moderate Asphyxien sind hingegen mit Aufmerksamkeitsstörungen, Hyperaktivität und einem verminderten IQ in der Kindheit und im Erwachsenenalter assoziiert.^{33,34}

1.2.2 Schädigungsmechanismen während der perinatalen Asphyxie

Die Schädigung des Gehirns im Rahmen einer perinatalen Asphyxie erfolgt in 2 Phasen. (Abb. 1) Zunächst führt die Unterbrechung der Sauerstoffversorgung im Gehirn zu einem Wechsel des aeroben zum weniger effektiven anaeroben Metabolismus und damit zu einer Reduktion von ATP- und Phosphokreatinreserven. Es kommt zu einem Anstieg des Lactat-Spiegels und der Konzentration von H⁺-Ionen sowie zu einer gesteigerten Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS).³⁵⁻³⁸ Die entstehende intra- und extrazelluläre Azidose sowie der oxidative Stress führen zur Schädigung zahlreicher zellulärer Komponenten.³⁷ Aufgrund der verminderten Energiereserven arbeiten Natrium-Kalium-ATPasen und andere Membrantransporter nicht mehr suffizient.³⁹ Das führt zu Imbalancen der Ionenspiegel. Kaliumionen strömen aus den Zellen heraus und Calcium- und Natriumionen akkumulieren intrazellulär.³⁹ In Kombination mit der vorherrschenden Azidose kann das Membranpotential der Zellen nicht mehr aufrecht erhalten werden und es kommt zu einer globalen Depolarisation und infolge dessen zu einer massiven

Ausschüttung von Neurotransmittern.³⁶ Das führt insbesondere zu einer Akkumulation von Glutamat im Extrazellularraum. Kommt es zusätzlich zum reduzierten Sauerstoffangebot noch zum Mangel an Glucose, entwickelt sich im Rahmen der Ischämie auch in perisynaptischen Gliazellen ein Energieversagen.⁴⁰ Diese sind daraufhin nicht mehr in der Lage, Glutamat aus dem perisynaptischen Spalt aufzunehmen, woraufhin sich der extrazelluläre Glutamatüberschuss weiter erhöht.⁴⁰ Es kommt zu einem schnellen Einstrom von Calcium- und Natriumionen über Glutamat-getriggerte Ionenkanäle und zum Zelluntergang durch Nekrose aufgrund von Osmoseschäden.^{41,42} Dieser Vorgang wird als primäres Energieversagen zusammengefasst. Nach der Reoxygenierung und einer schnellen Erholung, beginnt nach einer Latenzphase von ca. 6 bis 72 Stunden eine zweite verspätete Schädigungsphase, die als sekundäres Energieversagen in der Literatur bezeichnet wird.⁴³ (siehe Abb.1) Es kommt nur zu einer partiellen Erholung der metabolischen Situation, alternative Stoffwechsel-Wege bleiben überaktiv und führen zu einer Verlängerung des Energiedefizits und des oxidativen Stresses.^{44,45} Die Ursachen für diese Vorgänge sind noch nicht vollständig geklärt. Es kommt zu einer Initiierung einer Reihe von Ereignissen, die als „Exzito-oxidative Kaskade“ bezeichnet werden und durch mitochondriale Dysfunktion und intrazelluläre Calcium-Akkumulation zum Zelltod führen.^{42,43} Der Verlust des Membranpotentials bleibt bestehen und damit auch der Einstrom von Calciumionen in die Zelle. Durch den weiterhin vorhandenen Glutamatüberschuss im perisynaptischen Spalt kommt es zu einer Öffnung von N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptorkanälen (NMDA-Rezeptoren) und zu einem zusätzlichen exzessiven Einstrom von Calciumionen.⁴⁶ Diese Aktivierung von NMDA-Rezeptorkanälen ist bereits nach ca. 3 Stunden irreversibel.⁴⁶ Sie sind darüberhinaus in der Perinatal-Periode aufgrund der verstärkten aktivitätsabhängigen neuronalen Plastizität vermehrt exprimiert.⁴⁷ Eine länger andauernde intrazelluläre Akkumulation von Calciumionen führt zu einer Aktivierung von Caspasen und zur DNA-Fragmentierung, somit zum Zelltod, zum anderen werden neuronale Stickstoffmonoxid-Synthasen (nNOS) aktiviert und Stickstoffmonoxid (NO) wird vermehrt produziert.⁴⁸ NO behindert die Zellatmung am Mitochondrium durch Hemmung der Komplexe I und IV und steigert die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS).⁴⁸ Durch die anhaltende anaerobe Stoffwechselaktivität bleibt der Lactat-Spiegel hoch und damit der pH niedrig, zusammen mit der erhöhten Konzentration von Calciumionen und ROS bedingt das eine intrazelluläre Toxizität.⁴⁹ Das führt zu einem Verlust des Membranpotentials am Mitochondrium und damit zum Energieversagen sowie durch Translokation von Cytochrom C (Cyt C) und dem Apoptose-induzierenden Faktor (AIF) und die anschließende Aktivierung von Caspase 3 bzw. direkte DNA-Fragmentierung zum programmierten Zelltod.⁵⁰ Diese Prozesse werden als mitochondriale Dysfunktion

zusammengefasst. Durch inflammatorische Signale im Gewebe wird zusätzlich auch der extrinsische Apoptose-Signalweg über den Fas-Liganden (FasL) aktiviert.⁵¹

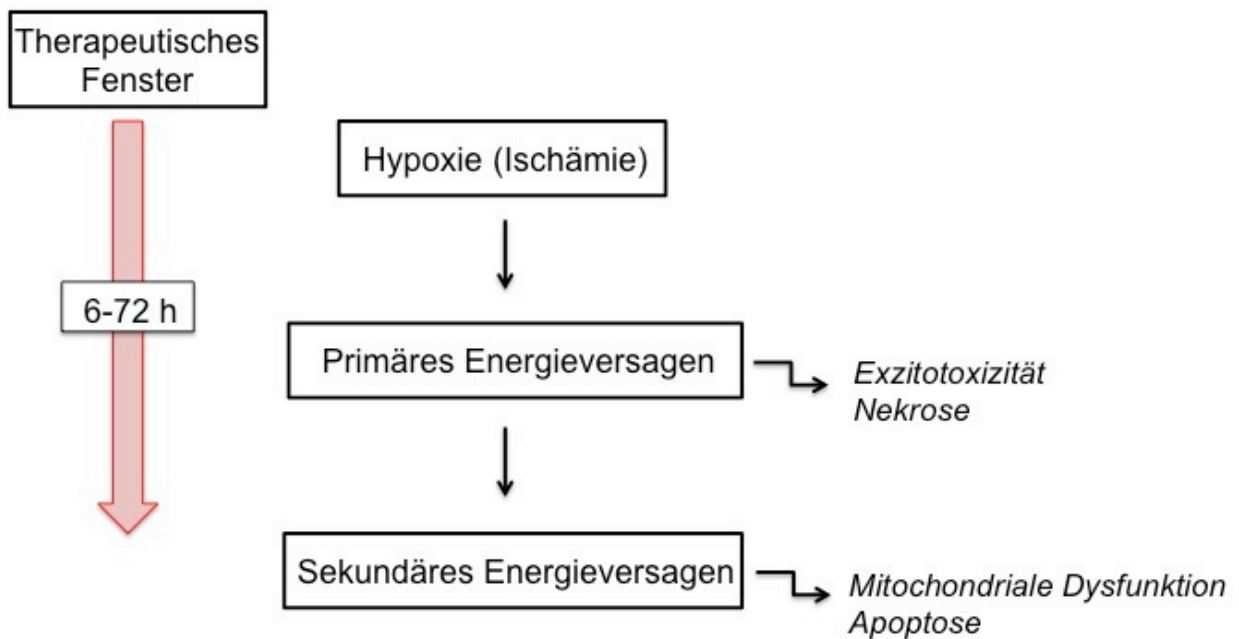


Abbildung 1: Phasen der Schädigung während der perinatalen Asphyxie

1.2.3 Zellphysiologische Veränderungen und Schädigungsmechanismen durch Hypoxie

Hypoxie ist definiert als Sauerstoffgehalt in einem Gewebe, der unter dem physiologischen Sauerstoffgehalt liegt bzw. als Imbalance zwischen dem Bedarf und Angebot an Sauerstoff (O_2).⁵² Im menschlichen Organismus kommt Hypoxie beispielsweise in Höhe, bei akuten oder chronischen vaskulären sowie pulmonalen oder neoplastischen Erkrankungen vor.⁵³ Man unterscheidet drei verschiedene Formen der Hypoxie: chronische, akute und zyklische Hypoxie.⁵² Bei der chronischen Form der Hypoxie handelt es sich um einen diffusionslimitierten Sauerstoffmangel.^{52,54} Dieser kommt beispielsweise zustande, wenn Zellen zu weit entfernt von dem versorgenden Blutgefäß liegen oder durch Anämie oder Hypoxämie der Sauerstoffgehalt des Blutes zu gering ist und dadurch zu geringe O_2 -Spiegel im Gewebe vorhanden sind.^{52,54} Bei der akuten Form der Hypoxie besteht ein perfusions-limitierter Sauerstoffmangel, zum Beispiel im Rahmen eines akuten Gefäßverschlusses.⁵⁵ Als zyklische Hypoxie werden Fluktuationen in der Perfusion mit Perioden der besseren und der schlechteren Oxygenierung bezeichnet.⁵⁶ Diese Form der Hypoxie kommt typischerweise in Tumoren vor.⁵⁶ Unter Hypoxie kommt es zu zahlreichen Veränderungen der Zellphysiologie mit dem Ziel, den O_2 -Verbrauch zu reduzieren und sich der Mangelversorgung anzupassen.⁵³ Diese Mechanismen zur Anpassung werden vor allem durch den Transkriptionsfaktor Hypoxie-induzierter Faktor

(HIF) reguliert.⁵⁷ Unter hypoxischen Bedingungen wird die Alpha-Untereinheit von HIF stabilisiert und der Transkriptionsfaktor in die aktivierte Form HIF-1- α umgewandelt.⁵⁷ Bei Sauerstoffmangel kommt es zum Wechsel von der aeroben Energiegewinnung mittels Citratzyklus zur weniger effizienten anaeroben ATP-Synthese in Form von Glykolyse.^{52,53} HIF-1- α induziert die Transkription der Glukose-Transporter GLUT-1 und GLUT-3, wodurch es zu einer erhöhten Aufnahme von Glukose in den hypoxischen Zellen kommt und damit mehr Substrat für die Glykolyse vorhanden ist.^{57,58} Zum Schutz vor Hypoxieschäden wird der Sauerstoffbedarf der Zellen reduziert, in dem vor allem energieaufwendige Prozesse wie Zellproliferation oder Proteinbiosynthese herunterreguliert werden.⁵⁸ Eine höhere Telomerase-Aktivität begünstigt die Immortalisierung von Zellen.⁵⁹ Hypoxie induziert die DNA-Amplifikation, fördert DNA-Strangbrüche und inhibiert DNA-Reperaturmechanismen.⁶⁰ Es kann HIF-1- α -abhängig oder -unabhängig zu einer Induktion von Zelltod in Form von Apoptose oder Nekrose unter schwerer oder langandauernder Hypoxie kommen.⁵⁷ Nach Beendigung des Sauerstoffmangels, beispielsweise durch Reperfusion, kommt es zur Reoxygenierung des Gewebes oder der Zellen. Diese ist zum einen zwingend notwendig, um eine Regeneration und das Überleben überhaupt zu ermöglichen, zum anderen kann es nach der Reoxygenierung durch oxidativen Stress und eine Überproduktion von reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) kommen.⁶¹ Sind die endogenen Antioxidantien wie die Superoxid-Dismutase und Glutathion verbraucht, kommt es zu einer Reaktion der freien Radikale mit Makromolekülen wie Lipiden, Proteinen und Nukleinsäuren und dadurch zur Zellschädigung und schließlich zum Zelltod.⁶¹

1.3 Mechanismen der Hypothermie-induzierten Neuroprotektion

Hypothermie wird als Therapie zur Neuroprotektion nach perinataler Asphyxie seit langem erforscht. Ein protektiver Effekt von TH konnte in vielen experimentellen und klinischen Studien gezeigt werden. Die genauen zellulären und molekularen Mechanismen, die der Hypothermie-induzierten Neuroprotektion zugrunde liegen, sind nicht vollständig verstanden. Die initiale Annahme, dass die Neuroprotektion allein über eine Reduktion des Metabolismus realisiert wird, erklärt die globalen Veränderungen, die in verschiedenen Studien vor allem unter moderater oder milder Hypothermie beobachtet wurden, nicht ausreichend. Heute geht man von einer Reihe von molekularen und zellulären Wirkmechanismen aus.^{62,63}

1.3.1 Stoffwechsel und Energiehaushalt

Hypothermie verlangsamt den Metabolismus, die Stoffwechselrate wird pro 1 °C um etwa 6 bis 10 % reduziert, in Gehirnen von Ferkeln wurde mittels Magnet-Resonanz-Spektroskopie eine Reduktion der metabolischen Rate um 5,3 % pro 1 °C beobachtet.^{64,65} Bei einer Körperkerntemperatur von 28 bis 32 °C ist der Metabolismus auf 50 bis 65 % des normalen Stoffwechsels reduziert.^{62,66} Dadurch wird der Verbrauch von ATP und damit der Bedarf an Sauerstoff und Glucose gesenkt. Durch Hypothermie wird das im Rahmen der perinatalen Asphyxie beschriebene sekundäre Energieversagen reduziert. Unter der Geburt asphyktische Ferkel, die anschließend moderat auf 35 °C für 12 Stunden gekühlt wurden, zeigten signifikant höhere Reserven an Phosphokreatin und Nukleosidtriphosphaten wie z. B. ATP im Gehirn.⁶⁷ Durch den reduzierten Metabolismus unter TH kommt es zu einer Senkung des Lactat- Spiegels und damit zu einer Reduktion der intrazellulären Azidose.⁶⁸

1.3.2 Exzitotoxizität und freie Radikale

Die Kombination von hypoxischer Depolarisation und die Freisetzung exzitatorischer Aminosäuren wie Glutamat sind die Schlüsselfaktoren der neuronalen Schädigung im Rahmen einer perinatalen Asphyxie.⁴³ Experimentelle Studien konnten zeigen, dass TH nach hypoxisch-ischämischen Ereignissen diese Kaskade an verschiedenen Stellen hemmt.⁶⁷ Hypothermie reduziert durch eine verringerte Glutamatausschüttung die Exzitotoxizität und den NMDA-Rezeptor-getriggerten Calciumeinstrom.⁶⁹ Die durch Energiedefizite bedingte globale Depolarisation wird durch den besseren Energiehaushalt unter TH reduziert, so dass die Ionenimbancen ausgeglichen werden.⁶³ Bei der Senkung der Temperatur kommt es zu einer geringeren Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) und zur Reduktion der NO-assoziierten Schäden.^{62,70} Während der hypoxischen Schädigung im Gehirn kommt es zu einer massiven Produktion freier Radikale. Unter Hypothermie wird die Menge an reaktiven Sauerstoffspezies gesenkt, sodass endogene antioxidative Mechanismen der Zelle greifen können und der oxidative Stress reduziert wird.^{62,71} Insgesamt kommt es zu einer Abschwächung der mitochondrialen Dysfunktion und zu einer Reduktion der neuronalen Degeneration.

1.3.3 Zelltod

Die Anwendung von Hypothermie nach asphyktischen Ereignissen schützt vor Zelltod, wie verschiedene *in vitro*- und *in vivo*-Studien zeigen konnten. Durch die in 1.2.2 beschriebenen Prozesse ist das Ausmaß der mitochondrialen Dysfunktion unter Hypothermie geringer. Dadurch ist der intrinsische Weg der Apoptose weniger aktiv, die Expression und Translokalisierung von

Cytochrom C und die nachfolgende Aktivierung von Caspasen bleibt aus.⁷² Einige Studien zeigten, dass Hypothermie auch direkt die Caspasen 3, 6, 7, 8 und 9 inhibiert.^{73,74} Darüber hinaus führt TH zu einer geringeren Expression von AIF und somit zu einer geringeren Aktivierung der Caspase-unabhängigen Apoptose.⁷² Eine vermehrte Expression von anti-apoptotischen Proteinen wie Bcl-2 und eine verminderte Expression von pro-apoptotischen Proteinen wie Bax und p53 wird unter Hypothermie beobachtet.^{73,75,76}

1.3.4 Inflammation

Die Hypoxie-Ischämie im Gehirn induziert eine Immunantwort, indem unter anderem das Komplementsystem aktiviert wird und proinflammatorische Mediatoren wie Interleukin-1 β (IL-1 β), Interleukin-6 (IL-6) und der Tumornekrose-Faktor (TNF- α) von Mikroglia, Astrozyten oder Endothelzellen ausgeschüttet werden.^{77,78} TH unterdrückt diese ischämie-induzierte Immunantwort durch Hemmung der proinflammatorischen Zytokine.^{77,79} Dennoch ist zu beachten, dass die Immunantwort bis zu einem gewissen Maß physiologisch ist und sowohl neuroprotektive als auch neurotoxische Aspekte hat.⁶²

1.4 Die Kälteschock-Proteine RBM3 und CIRP

Bei Herabsenkung der Temperatur kommt es zu einer globalen Inhibition der Proteinbiosynthese und somit zur verminderten Expression fast aller Proteine.⁸⁰ Die Expression einer kleinen Gruppe von RNA-bindenden Proteinen wird im Gegensatz dazu durch moderate bis milde Hypothermie induziert.⁸⁰ Sie werden dementsprechend als Kälteschock-Proteine bezeichnet. Zu ihnen zählen das RNA-binding motif 3 (RBM3) und das cold-inducible RNA-binding protein (CIRP oder CIRBP). RNA-bindende Proteine helfen bei der RNA-Prozessierung im Nucleus, fungieren als Chaperone beim Transport von prozessierter RNA aus dem Zellkern und sind an der Translation von RNA im Zytosol beteiligt.⁸⁰

1.4.1 RNA-binding motif 3 (RBM3)

Die Struktur von RBM3 wurde 1995 von Derry et al. erstmals beschrieben.⁸¹ Das RBM3-Gen ist auf dem X-Chromosom in der p11.23-Region lokalisiert und kann in mindestens 9 Exons unterteilt werden und hat eine Größe von über 4,5 kb. Das Protein umfasst 157 Aminosäuren im längsten offenen Leseraster und hat ein Molekulargewicht von 17 kDa. RBM3 wird ubiquitär

exprimiert. Die Sequenz von RBM3 zeigt hohe Übereinstimmungen mit der von anderen RNA-bindenden Proteinen. Am Carboxylende hat RBM3 eine Glycin- und Argininreiche Domäne, die zur Bindung von RNA dient und als RNA recognition motif (RRM) bezeichnet wird.^{81,82} Danno et al. entdeckten 1997 dass die Expression von RBM3-Transkripten durch moderate Hypothermie (32 °C für 24 Stunden) induziert werden kann.⁸³ Eine Temperaturerhöhung auf 39 °C führte hingegen zu einer Inhibition der RBM3-Expression. Daraus ergab sich die Hypothese, dass RBM3 an der Kälte-induzierten Stress-Antwort beteiligt ist. Wellmann et al. zeigten 2003, dass Hypoxie (1 % O₂ für 8 Stunden) in verschiedenen Zelllinien die RBM3-Expression erhöht.⁸⁴ Sie konnten darüber hinaus nachweisen, dass die Induktion von RBM3 unter Hypoxie durch einen HIF-1 α -unabhängigen Mechanismus erfolgt.

Zelluläre Funktionen des Protein RBM3 sind vielfältig und noch nicht vollständig verstanden. RBM3 kann die globale Proteinsynthese erhöhen, an die 60S-Untereinheit von Ribosomen binden und erhöht aktiv die Bildung von Polysomen.^{85,86} RBM3 wird in den Gehirnen von jungen Mäusen und Ratten verstärkt exprimiert und ist möglicherweise an der frühen Hirnentwicklung beteiligt.^{87,88} In adulten Rattenhirnen ist RBM3 stärker in Zonen mit erhöhter Translationsrate exprimiert.⁸⁷ Eine Überexpression von RBM3 reduziert Apoptose, wohingegen ein Knock-out von RBM3 mittels siRNA den bekannten protektiven Effekt von milder Hypothermie gegen Apoptose fast komplett aufhebt.⁸⁸ Ein siRNA-knockdown von RBM3 inhibiert darüber hinaus die Zellproliferation und führt zu verminderter Zellviabilität.⁸⁹ Kita et al. zeigten, dass RBM3 protektiv gegen polyglutamin-induzierten Zelltod wirkt.⁹⁰ In einem Rattenmodell zur Wirbelsäulenverletzung beobachteten Zhao et al. einen Anstieg der RBM3-Expression in Neuronen und Astrozyten.⁹¹ RBM3 war dabei vor allem verstärkt in proliferierenden Zellen und in Zellen mit wenig Apoptose exprimiert. Eine Beteiligung von RBM3 an der Regulierung der Genexpression der circadianen Rhythmik, bei der bekanntlich die Körpertemperatur eine entscheidende Rolle spielt, wird diskutiert und untersucht.⁹² Darüber hinaus ist RBM3 Gegenstand der onkologischen Forschung. RBM3 wird in verschiedenen Tumoren verstärkt exprimiert und korreliert unter anderem mit einer erhöhten Sensitivität auf eine Chemotherapie in Prostatakarzinomen.^{93,94} Weiterhin wird RBM3 als prognostischer Marker beim Mammakarzinom, beim epithelialen Ovarialkarzinom, bei kolorektalen Tumoren und beim malignen Melanom diskutiert.⁹⁵⁻⁹⁷

1.4.2 Cold-inducible RNA-binding protein (CIRP)

Das Cold-inducible RNA-binding protein (CIRP) wurde initial bei Transkripten, die durch UV-Strahlung induziert werden, entdeckt.⁹⁸ Das CIRP-Gen befindet sich auf dem Chromosomen-Locus 19p13.3. Das translatierte Protein besteht aus 172 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 18 kDa.⁸⁰ Die Sequenz beinhaltet eine aminoterminal RNA-bindende Domäne sowie einen glycinreichen Bereich am C-terminalen Ende und hat somit strukturelle Ähnlichkeiten mit anderen Kälteschockproteinen wie RBM3.⁹⁹ Zuerst zeigten Nishiyama et al., dass eine Herabsenkung der Temperatur die Expression von CIRP induziert.⁹⁹ Auch in weiteren experimentellen Studien konnte eine gesteigerte Expression von CIRP-mRNA bzw. -Protein unter moderater bis milder Hypothermie beobachtet werden.^{84,100} Darüber hinaus kann es unter hypoxischen Bedingungen HIF-1 α -unabhängig zu einer Induktion der CIRP-Expression kommen.⁸⁴ Die Funktion von CIRP ist bisher nur partiell untersucht und verstanden. CIRP ist an der Protektion vor Apoptose unter Hypothermie beteiligt. Sakurai et al. konnten zeigen, dass CIRP die TNF α -induzierte Apoptose mittels Aktivierung des ERK-Signalweges verhindern konnte.¹⁰¹ In den Experimenten von Saito et al. führte ein siRNA-knockout von CIRP trotz Kühlung der Zellen auf 32 °C zu einer erhöhten Apoptoserate in murinen neuronalen Stammzellen.¹⁰² CIRP unterstützt möglicherweise die Translation von Proteinen, die an der Beseitigung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) beteiligt sind, wie Thioredoxin, und verhindert so die Zellalterung.⁸⁰ In einer aktuellen klinischen Studie von Qiang et al. wurden erhöhte CIRP-Level im Blut von Patienten nach einem hämorrhagischen Schock gefunden.¹⁰³ Sie untersuchten die Funktion von CIRP weiter im Tiermodell und fanden heraus, dass CIRP die inflammatorische Antwort während einer Sepsis bzw. einem hämorrhagischen Schocks triggert. Darüber hinaus konnte festgestellt werden, dass CIRP die Freisetzung von TNF α aus Makrophagen und Mikrogliazellen fördert.^{103,104} CIRP wird ebenfalls in der Onkologie als potentiell Protoonkogen untersucht.⁹³

1.5 Zielsetzung dieser Arbeit

Milde oder moderate Hypothermie nach perinataler Asphyxie ist ein anerkanntes Therapiekonzept, um die Mortalität und die neurologische Prognose betroffener Kinder zu verbessern. Bei anderen Krankheitsbildern, die eine hypoxisch-ischämischen Schädigung des Gehirns zur Folge haben, beispielsweise im Rahmen eines Schlaganfalls, wird therapeutische Hypothermie als Behandlungsansatz in klinischen Studien untersucht. Trotz der teilweise erfolgreichen klinischen Anwendung sind die zugrunde liegenden zellulären und molekularen Mechanismen der Neuroprotektion durch Hypothermie nicht vollständig verstanden und untersucht. Somit ist weitere Grundlagenforschung zum besseren Verständnis der therapeutischen Hypothermie sowie zur Optimierung der klinischen Anwendung notwendig. Zielsetzung dieser Arbeit war es, in einem *in vitro* Zellkulturmodell mit humanen SK-N-SH den Einfluss von Hypoxie und moderater Hypothermie auf das Zellüberleben, den Stoffwechsel, das Proliferationsverhalten und die Transkriptions- bzw. Proteinregulation insbesondere von Kälteschockproteinen zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurde ein Zeit-Temperatur-Protokoll entwickelt, das sich an den klinisch angewandten Zieltemperaturen und Zeiten orientiert. In einem zweiten Schritt wurde ein Teil der Ergebnisse in einem Zellkulturmodell mit primären kortikalen Neuronen nochmals untersucht.

Mit Hilfe des Zellkulturmodells sollten folgende Fragen beantwortet werden:

1. Welchen Einfluss haben milde und schwere Hypoxie auf das Zellüberleben?
2. Kann moderate Hypothermie Zelltod in Folge einer hypoxischen Schädigung verhindern?
3. Kommt es durch Hypoxie und moderate Hypothermie zu zellmorphologischen Veränderungen?
4. Welchen Einfluss haben milde und schwere Hypoxie und moderate Hypothermie auf das Proliferationsverhalten?
5. Wie wird die metabolische Aktivität und der Energiehaushalt durch milde bzw. schwere Hypoxie und moderate Hypothermie beeinflusst?
6. Wie sind die Kälteschockproteine RBM3 und CIRP unter milder und schwerer Hypoxie und durch moderate Hypothermie reguliert?
7. Lassen sich die Ergebnisse in einem Zellkulturmodell mit primären Neuronen validieren bzw. gibt es Unterschiede?

2 Materialien

2.1 Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Blotting-Kammer: Mini-Trans-Blot	Bio-Rad, München, Deutschland
Brutschrank (37°C)	Sanyo Electric Biomedical Co., Tokyo, Japan
Brutschrank (33,5°C)	Sanyo Electric Biomedical Co., Tokyo, Japan
Chemilumineszenz Bildentwickler: ChemiDoc XRS	Bio-Rad, München, Deutschland
Elektrophorese-Kammer: Mini-Protean 3	Bio-Rad, München, Deutschland
Fluoreszenz-Mikroskop: Axio Image M1	Zeiss/Axio, Göttingen, Deutschland
Fluoreszenz-Mikroskop Kamera: AxioCam mRC	Zeiss/Axio, Göttingen, Deutschland
Hypoxiekammer	Binder, Tuttlingen, Deutschland
Magnetrührer	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Plattenfluorometer/-luminometer: Fluorskan Ascent FL	Thermo Scientific, Karlsruhe, Deutschland
PCR-System: StepOnePlus	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Schüttler	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Sterile Werkbank: LaminAir	Heraeus Instruments, Berlin, Deutschland
Stromversorgungsgerät: Power Pac 300	Bio-Rad, München, Deutschland
Thermoblock	Biometra, Göttingen, Deutschland
Thermozykler	MJ Research, St. Bruno, Kanada
Wasserbad	P-D Industriegesellschaft, Dresden, Deutschland
Zentrifuge 1: Bio-Fuge primo	Heraeus, Hanau, Deutschland
Zentrifuge 2: Bio-Fuge fresco	Heraeus, Hanau, Deutschland
Zellkulturmikroskop	Motic, Wetzlar, Deutschland
Zellkulturmikroskop-Kamera: uEye	IDS, Obersulm, Deutschland

2.2 Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
Acrylamid (30%)	Roth, München, Deutschland
BCA Reagenz	Pierce, Rockford, USA
Bovines Serumalbumin (BSA)	Pierce, Rockford, USA
CellTiter-Glo Cell Viability Assay	Promega, Madison, USA
Cytotoxicity Detection Kit (LDH)	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
DAPI	Pierce, Rockford, USA
ECL-Detectionskit	Pierce, Rockford, USA
Ethanol	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Isopropanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Magermilchpulver	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Methanol	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
MTT-Reagenz, 5mg/ml	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Phosphatase Inhibitor Cocktail 1 und 2	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
PMSF	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Ponceau S 0,1%, 5% Essigsäure	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Probenpuffer, reduzierend	Thermo Fisher Scientific, Watham, USA
Protein-Gewichts-Marker	Thermo Fisher Scientific, Watham, USA
Salzsäure	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
SDS	Roth, München, Deutschland
TEMED	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Stripping Buffer	Thermo Scientific, Karlsruhe, Deutschland
Tris-Acetat	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Triton-X 100	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trypanblau 0,5%	Biochrom, Berlin, Deutschland
Tween 20	Sigma-Aldrich, München, Deutschland

2.3 Zellkulturmaterialien

2.3.1 SK-N-SH

Bezeichnung	Hersteller
96-Well Microtiter-platten	Nunc, Langensfeld, Deutschland
96-Well Microtiter-platten, weiß	Nunc, Langensfeld, Deutschland
DMEM Flüssigmedium	Biochrom, Berlin, Deutschland
Eppendorf-Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
FCS	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Gelatine	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Gewebekulturflaschen, 75cm ² , 150cm ²	TPP, Trasadingen, Schweiz
Multipipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Natriumpyruvat	Biochrom, Berlin, Deutschland
Neubauer-Zählkammer	Brand, Wertheim, Deutschland
PBS	Biochrom, Berlin, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin, Deutschland
Petri-Schalen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipetten, 2-50ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Trypsin-EDTA-Lösung	Biochrom, Berlin, Deutschland
Vakuumfiltration	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellkultur-Röhrchen 15ml, 50ml	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
Zellschaber 39cm	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

2.3.2 Primäre Neurone

Bezeichnung	Hersteller
6-Well Mikrotiter-Platten	Nunc, Langensfeld, Deutschland
B-27 supplement	Gibco, Thermo Scientific Fisher, Watham, USA
DNase	
Einmal-Injektions-Kanüle G20, G24	Braun, Meisungen, Deutschland
Eppendorf Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
L—Glutamin	

Multipipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Neubauerzählkammer	Brand, Wertheim, Deutschland
Neurobasalmedium (NBM)	Gibco, Thermo Scientific Fisher, Watham, USA
PBS	
Poly-L-Lysin	
Primocin	
Serologische Pipetten, 2-50ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Spritze 10ml	Braun, Meisungen, Deutschland
Trypsin-EDTA-Lösung	Biochrom, Berlin, Deutschland
Vakuumfiltration	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellkultur-Röhrchen 15ml, 50ml	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
Zellschaber 39cm	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellsieb, 40 μ m	BD Bioscience, Hamburg, Deutschland

2.4 Antikörper

Bezeichnung	Hersteller
Anti-Beta-Actin	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Anti-Caspase 3	Cell Singaling, Boston, USA
Anti-CIRBP	Proteintech, Chicago, USA
Anti-RBM3	Proteintech, Chicago, USA
Donkey Anti-Rabbit	Jackson, ImmunoResearch, West Grove, USA

2.5 RT-PCR

Bezeichnung	Hersteller
DNA-Polymerase (Molony Murine Leukemia Reverse Transcriptase)	Promega, Madison, USA
Master Mix	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen, Deutschland
Primer	Promega, Madison, USA
Peq Gold RNA Pure	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen, Deutschland
PCR MicroAmp 96-Well-Platte	Thermo Scientific Fisher, Watham, USA

Taqman-Sonden: Thermo Scientific Fisher, Watham, USA
GAPDH (Mn99999915 g1)
RBM3 (Mn01609819 g1)
CIRP

2.6 Software

Bezeichnung	Hersteller
ImageLabTM-Software	Bio-Rad, München, Deutschland
Prism 6	Graphpad Software Inc., La Jolla, USA
Quantity One	Bio-Rad, München, Deutschland
uEye-Software	IDS, Obersulm, Deutschland

3 Methoden

3.1 Zellkultur

Für die Versuche dieser Arbeit wurde die humane Neuroblastom-Zelllinie SK-N-SH von American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, USA) verwendet. Die Zellen wurden 1970 von June L. Biedler aus dem Gewebe eines metastasierten Neuroblastoms eines 4-jährigen Mädchens präpariert.¹⁰⁵ SK-N-SH haben Eigenschaften neuronaler Zellen und wurden in der Forschung als ein Standard-Zellkulturmodell bei der Untersuchung der Zyto- bzw. Neurotoxizität häufig verwendet. Die Kryokultur wurde im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und in eine 75 cm² Zellkulturflasche überführt, die mit Kulturmedium mit einer Temperatur von 37 °C und einer CO₂-Konzentration von 5 % befüllt war. Sobald der Großteil der Zellen adhärent war, wurde die Mischung aus DMSO-enhaltenden Kryomedium und Zellkulturmedium entfernt und durch reines Zellkulturmedium ersetzt. Als Zellkulturmedium wurde Dubecco's MEM (DMEM) mit 10 % hitzeinaktiviertem FCS, 1mM Natriumpyruvat und 1 % Penicillin/Streptomycin verwendet. Das Medium wurde alle 2-3 Tage gewechselt und beim Erreichen einer Konfluenz von 70-90 % wurden die Zellen im Verhältnis 1:3, 1:4 oder 1:5 mit Hilfe von 0,05 % Trypsin-EDTA-Lösung passagiert. Die Zellen wurden aus mindestens 4 verschiedenen Kryostocks zwischen der 37. und 63. Zellpassage für die Experimente verwendet.

3.2 Präparation primärer Neuronen

Für die Präparation der primären Neurone wurden Mäuse vom Stamm C57BL/6N benutzt. Die Methode orientiert sich an einem von Kaech und Banker veröffentlichten Protokoll aus dem Jahr 2006.¹⁰⁶ Die Mausembryonen wurden am Schwangerschaftstag E16 verwendet. Nach dem Öffnen des Schädels wurden die Meningen entfernt, die Cortices vom restlichen Hirngewebe abpräpariert und in ein 50ml Zellkulturröhrchen überführt, das mit 10 ml Neurobasalmedium enthielt. Die Cortices wurden mehrmals mit PBS gewaschen, um Meningen- und andere Gewebereste zu entfernen und anschließend mit einer 0,01 % Trypsin-EDTA-Lösung mit 80 µg/ml DNase verdaut. 15 Minuten später wurde das Trypsin durch Zugabe von Neurobasalmedium gestoppt. Nach mehrmaligen Waschen wurden die angedauten Cortices in

2ml Neurobasalmedium resuspendiert und unter Verwendung eines Zellsiebes und durch mehrmaliges Auf- und Abziehen mit G20- und G24-Spritzen homogenisiert. Anschließend wurde die Zellsuspension bei 1200 g zentrifugiert, in 10ml Neurobasalmedium resuspendiert und durch ein Zellsieb mit der Porengröße 40 μ m filtriert. Die Zellzahl wurde mit einer Trypanblaufärbung bestimmt (siehe 3.5.) und $2,5 \times 10^6$ Zellen in 3ml Neurobasalmedium in einer mit 1 %-Poly-L-Lysin beschichteten 6-Well-Platte ausplattiert. Als Kulturmedium wurde Neurobasalmedium mit 2 % B27-supplement, 1 % L-Glutamin und 100 μ g/ml Primocin verwendet. Alle 2-3 Tage wurde die Hälfte des Mediums durch frisches Medium ersetzt. Der Versuchsbeginn war 7 Tage nach der Präparation.

3.2 Simulation der perinatalen Asphyxie

Die perinatale Asphyxie wurde durch eine physikalische Hypoxie mit Hilfe einer Hypoxiekammer simuliert. Die Zellen sind bei Sauerstoffkonzentration von 0,2 % O₂ bzw. 8 % O₂ für 24 Stunden inkubiert worden. Für die Versuche mit den SK-N-SH wurde als Versuchsmedium DMEM mit 10 % hitzeinaktivierten FCS und 1% Penicillin/Streptomycin ohne Natriumpyruvat verwendet, das mit einigen Methoden interferiert hätte. Das Versuchsmedium wurde für mehrere Stunden vor Versuchsbeginn bei 37 °C in der Hypoxiekammer inkubiert, um ihm den enthaltenen Sauerstoff zu entziehen. Für die normoxischen Kontrollgruppen ist das Medium zuvor im Brutschrank bei 37 °C und regulärem Sauerstoffgehalt angeglichen worden. Vor Versuchsbeginn wurde das Kulturmedium durch das jeweilige Versuchsmedium ausgetauscht.

3.4 Das Zeit-Temperatur-Protokoll

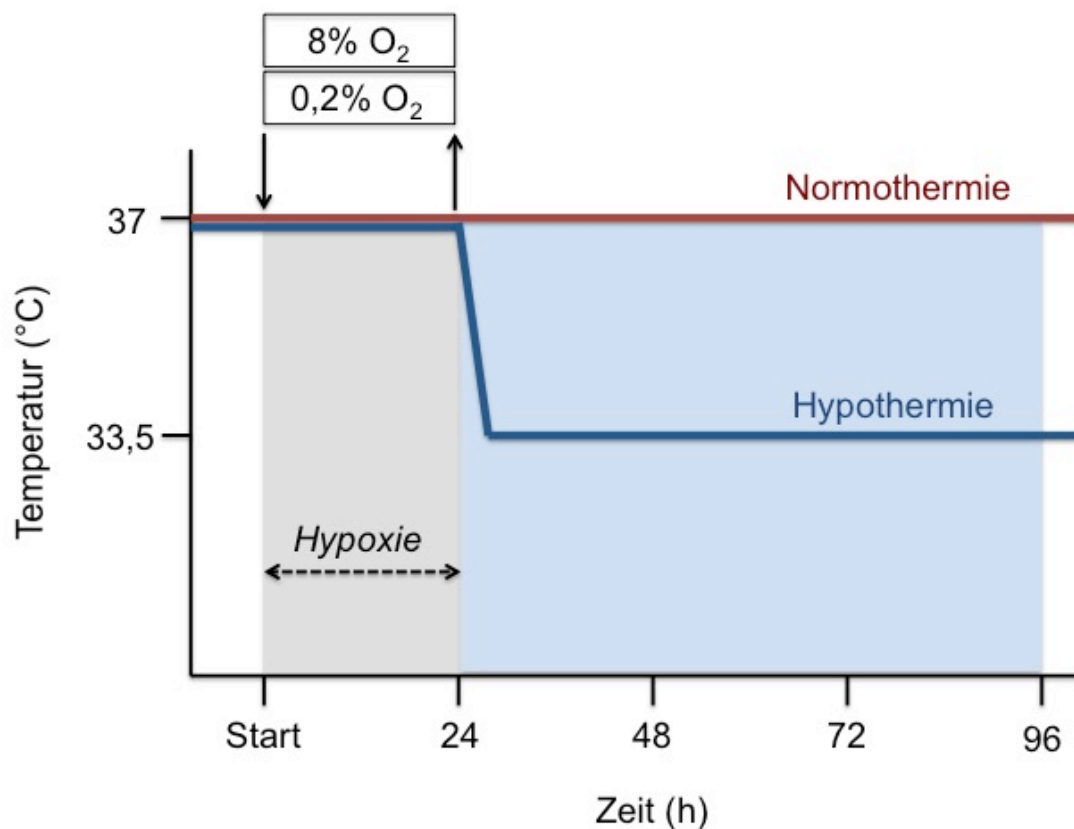


Abbildung 2: Das Zeit-Temperatur-Protokoll

Das Zeit-Temperatur-Protokoll bildet den Ablauf der Experimente ab und orientiert sich an den Leitlinien der Gesellschaft für Neonatologie und Pädiatrische Intensivmedizin zur therapeutischen Hypothermie nach perinataler Asphyxie.² In der klinischen Situation wird die Körperkerntemperatur auf $33,5\text{ °C} \pm 0,5\text{ °C}$ für 48 bis 72 Stunden gesenkt. Die Kühlung soll innerhalb der ersten 6 Stunden postnatal begonnen und die Zieltemperatur sollte möglichst innerhalb einer Stunde erreicht werden. In den durchgeführten Experimenten wurde die perinatale Asphyxie durch eine 24-stündige physikalische Hypoxie bei verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen (wie in 3.3. beschrieben) simuliert. Im Anschluss wurde eine hypotherme Gruppe auf $33,5\text{ °C}$ im Inkubator herabgekühlt und für 72 Stunden kultiviert. Eine normotherme Gruppe wurde bei 37 °C ebenfalls für 72 Stunden inkubiert. Für beide Gruppen, die zuvor der Hypoxie ausgesetzt waren, gibt es jeweils eine ungeschädigte Kontrollgruppe. Diese Kontrollgruppen wurden für 24 Stunden bei normoxischen Bedingungen inkubiert und im Anschluss für 72 Stunden bei 37 °C bzw. $33,5\text{ °C}$ kultiviert. Die Messungen erfolgten 24, 48, 72 und 96 Stunden nach Beginn des Experimentes.

3.5 Trypanblau-Färbung zur Zellzählung

Zur Zellzahleinstellung für die Versuche wurden die Zellen vor dem Ausplattieren mit Hilfe einer Trypanblau-Färbung in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Bei Trypanblau, auch Benzaminblau genannt, handelt es sich um einen anionischen Farbstoff, der an intrazelluläre Proteine bindet. In abgestorbene oder perforierte Zellen dringt Trypanblau ein und färbt durch Bindung an intrazelluläre Proteine die Zelle dunkelblau an. Lebende und funktionstüchtige Zellen hingegen sind mit einer intakten Zellmembran versehen und nehmen den Farbstoff nicht auf. Sie erscheinen dagegen weißlich hell im Phasenkontrastmikroskop.

3.6 Phasenkontrastmikroskopie

Zur morphologischen Untersuchung der Zellen vor bzw. während des Versuches wurden sie unter dem Phasenkontrastmikroskop betrachtet. Dafür wurden für die verschiedenen Zeitpunkte 1×10^6 – 4×10^6 Zellen in einer 60 cm² großen Petrischale ausplattiert, nach dem Zeit-Temperatur-Protokoll behandelt und zu den jeweiligen Zeitpunkten untersucht.

3.7 Immunohistochemische Fluoreszenzmikroskopie

Zur Darstellung der Zellmorphologie wurde das neuronenspezifische Strukturprotein β III-Tubulin in den SK-N-SH mit dem roten Rhodaminfluoreszenzfarbstoff Texas Red markiert. Die Zellkerne wurden mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI), das mit der DNA interkaliert, angefärbt. Anschließend wurden die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. 24h vor dem Versuch wurden 40.000 Zellen auf einem mit 0,2 %-Gelatine beschichteten Deckgläschen in einer 12-Well-Platte in 1ml Medium ausplattiert. Das Medium wurde vor Versuchsbeginn durch Versuchsmedium ersetzt und das Experiment entsprechend des Zeit-Temperatur-Protokolls durchgeführt. Danach wurde das Medium vorsichtig entfernt und die Zellen einmalig mit PBS gewaschen. Zur Immobilisation löslicher Antigene wurden die SK-N-SH mit 4%-Paraformaldehyd für 20 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Nach mehrmaligem Waschen mit einem Waschpuffer (0,1 %BSA in PBS) wurden die Zellen mit 10 % Goat-Serum und 0,3 % Triton-X-100 in PBS permeabilisiert und unspezifische Proteinbindungen blockiert. Gemäß den

Herstellerangaben wurden die Deckgläschen anschließend über Nacht mit dem Primärantikörper (β III-Tubulin, 1:2000 verdünnt in 0,5% BSA in PBS) bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde nach mehrmaligem Waschen mit Waschpuffer der Sekundärantikörper (Goat anti Rabbit-Texas Red, 1:2000 in PBS) für eine Stunde bei Raumtemperatur und vor Licht geschützt aufgegeben. Anschließend wurden die Deckgläschen erneut mit dem Waschpuffer gewaschen und für 10 Minuten mit DAPI (1:4000 in PBS) im Dunkeln inkubiert. Nach einem letzten Waschen mit PBS wurden die Deckgläschen mit Mountain Solution auf einem Objektträger fixiert und konnten unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden.

3.8 Messung der LDH-Aktivität zur Quantifizierung des Zelltodes

Zelltod wird klassischerweise durch die Quantifizierung von Membranschäden evaluiert. Für die Quantifizierung des Zelltodes wurde die enzymatische Aktivität der Lactat-Dehydrogenase (LDH) in den Überständen der Zellkultur und der primären Neuronen gemessen. Dafür wurde ein Cytotoxicity-Detection-Kit der Firma Roche verwendet, der auf dem kolorimetrischen Nachweis der LDH basiert. Die nachfolgende Beschreibung des Test-Prinzips und das Protokoll zur Durchführung basieren auf den Angaben des Herstellers. Bei der Lactat-Dehydrogenase handelt es sich um ein intrazelluläres Enzym, das bei Perforation der Zellmembran oder durch Zellyse aus der geschädigten Zelle in den Überstand entlassen wird. Die Lactat-Dehydrogenase katalysiert eine Redoxreaktion im Zytosol, bei der Pyruvat zu Lactat oxidiert und NAD^+ zu NADH/H^+ reduziert wird. In einer zweiten enzymatischen Reaktion wird durch die entstandenen Protonen das in der Testreagenz enthaltene hellgelbe Tetrazoliumsalz in das rote Formazansalz reduziert. Die Aktivität der LDH im Überstand und damit die Anzahl toter Zellen korreliert direkt mit der Menge des gebildeten Formazansalzes, das bei einem Absorptionsmaximum von 500nm nach einer limitierten Reaktionsdauer gemessen wird. Die Zellen wurden 24h vor Versuchsbeginn in eine mit 0,2%-Gelatine beschichteten 60cm² Petrischale in 3ml Medium ausplattiert. Es wurden verschiedene Zellzahlen entsprechend der 4 Versuchszeitpunkte verwendet. Für den 24h-Wert wurden 4×10^6 Zellen ausplattiert, für den 48h-Wert 3×10^6 Zellen, für den 72h-Wert 2×10^6 Zellen und für den 96h-Wert 1×10^6 Zellen. Nach der Behandlung entsprechend des Zeit-Temperatur-Protokolls wurden die Zellüberstände zur Entfernung zellulärer Bestandteile bei 3000g zentrifugiert und bis zur Bestimmung der LDH-Aktivität bei 4°C aufbewahrt. Für die Messung sind in einer Dreifachbestimmung 100 μ l

Zellüberstand auf eine 96-Well-Platte pipettiert und jeweils 100 μ l Reaktionslösung hinzugegeben worden. Die Reaktionslösung setzt sich aus einem Katalysator (Diaphorase/NAD⁺) und dem Tetrazoliumsalz in einem Mischverhältnis von 1:45 zusammen. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei Raumtemperatur wurden die Proben bei 492 nm photometrisch gemessen.

3.9 Messung der NSE-Aktivität in den Zellüberständen

Die Messung der Aktivität der neuronenspezifischen Enolase (NSE) in den Zellüberständen wurde durch Labor Berlin durchgeführt. Die Beschreibung der Methode basiert auf ihren Angaben. Es wurde ein Test nach dem Sandwich-Prinzip durchgeführt, wobei ein biotinylierter monoklonaler NSE-spezifischer Antikörper und ein mit Ruthenium-Komplex markierter NSE-spezifischer Antikörper einen sogenannten Sandwich-Komplex bilden. Nach Zugabe von Streptavidin-beschichteten Mikropartikeln, die an Biotin binden, wird der Komplex an eine Festphase gebunden. Das Reaktionsgemisch wurde anschließend in eine Messzelle überführt, wo die Mikropartikel durch magnetische Wirkung auf der Oberfläche einer Elektrode fixiert werden. Nach Auswaschen der ungebundenen Substanzen und Anlegen einer Spannung wurde eine Chemilumineszenzemission induziert und mit einem Photomultiplier gemessen. Die absoluten Ergebnisse wurden zuletzt anhand einer Kalibrierungskurve ermittelt.

3.10 MTT- Messung metabolischer Aktivität

Zur Untersuchung der metabolischen Aktivität der neuronalen Zellen wurde ein MTT-Test durchgeführt. Der Test basiert auf der Umwandlung des gelblichen 3-(4,5-Dimethylthiazol)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) in das blau-violette Formazan durch NAD(P)H-Oxidoreduktasen im Zytosol und in den Mitochondrien vitaler Zellen.¹⁰⁷ Auf eine mit 0,2%-Gelatine beschichteten 96-well-Platte wurden 24h vor Versuchsbeginn 2×10^4 , $1,5 \times 10^4$, 1×10^4 und $0,5 \times 10^4$ Zellen entsprechend der verschiedenen Zeitpunkte in einer mit 0,2 %-Gelatine beschichteten 96-well-Platte in 200 μ l Medium ausplattiert und über Nacht im Zellkulturschrank kultiviert. Vor Beginn der Hypoxie wurde das Medium gewechselt und die Zellen anschließend entsprechend des Zeit-Temperatur-Protokolls behandelt. Das Versuchsmedium wurde danach

durch 0,5 mg MTT pro 1 ml Medium ersetzt und die Proben für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen mit 100 µl Extraktionspuffer (0,04 M HCL in 100 % Isopropanol) lysiert und nach 20 Minuten wurde die Extinktion des Farbumschlages bei einer Wellenlänge von 570 nm mit dem Plattenreader gemessen.

3.11 Messung des ATP-Gehalts

Für die Quantifizierung des intrazellulären ATP-Gehalts wurde das CellTiter Glo[®] Luminescent Cell Viability Kit verwendet. Die nachfolgende Beschreibung des Test-Prinzips und das Protokoll zur Durchführung basieren auf den Angaben des Herstellers. Die Messung des ATP-Gehalts beruht auf der Entstehung eines Lumineszenzsignals durch eine ATP-abhängige Luciferase, das proportional zum ATP-Gehalt der Zellen ist. Für den Versuch wurden 24 Stunden vor Versuchsbeginn 2×10^4 , $1,5 \times 10^4$, 1×10^4 und $0,5 \times 10^4$ Zellen entsprechend der verschiedenen Zeitpunkte in einer mit 0,2 %-Gelatine beschichteten 96-well-Platte in 100 µl Medium ausplattiert. Nach der Behandlung der Zellen entsprechend des Zeit-Temperatur-Protokolls wurden die Proben für 30 Minuten bei Raumtemperatur equilibriert. Danach wurde das Medium abpipettiert und durch 100 µl serumfreies Medium ersetzt, um einen eventuellen Abbau von ATP durch im Serum enthaltene ATPasen zu verhindern. Nach dem Zufügen von 100 µl CellTiter Glo[®]-Reagenz wurden die Proben für 2min geschüttelt und für weitere 10 Minuten bei Raumtemperatur belassen. Im Anschluss wurde die Lumineszenzintensität bei einer Integrationszeit von 500 ms gemessen.

3.12 BrdU: Messung der Zellproliferation

Zur Quantifizierung der Zellproliferation wurde das BrdU Cell Proliferation Assay Kit von Cell Signaling verwendet. Die nachfolgende Beschreibung des Test-Prinzips und das Protokoll zur Durchführung basieren auf den Angaben des Herstellers. Die Methode beruht auf dem Einbau des Pyrimidin-Analogons 5-Bromo-2'-Deoxyuridin (BrdU) in neusynthetisierte DNA von proliferierenden Zellen. Für den Versuch wurden 24h vor Versuchsbeginn 2×10^4 , $1,5 \times 10^4$, 1×10^4 und $0,5 \times 10^4$ Zellen entsprechend der verschiedenen Zeitpunkte in einer mit 0,2 %-Gelatine beschichteten 96-well-Platte in 100 µl Medium ausplattiert. Vor dem Beginn der Hypoxie wurde

das Kulturmedium durch Versuchsmedium mit BrdU ersetzt. Nach Behandlung der Zellen entsprechend des Zeit-Temperatur-Protokolls wurde das Medium vorsichtig entfernt und die Zellen mit der Fixing/Denaturing-Solution für 30 Minuten bei Raumtemperatur behandelt, um die Zellen zu fixieren und ihre DNA zu denaturieren. Anschließend wurde der Anti-BrdU-Detektionsantikörper in einer vom Hersteller vorgefertigten Lösung verdünnt für eine Stunde bei Raumtemperatur auf die Zellen gegeben. Nach mehrmaligem Waschen mit dem im Kit enthaltenen Waschpuffer wurden die Proben mit einem Sekundärantikörper (Anti-Maus IgG, mit Meerrettich-Peroxidase konjugiert) für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden die Proben erneut mehrmals mit dem Waschpuffer gewaschen und mit 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB), einem Substrat für die Meerrettich-Peroxidase, für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde mit der Stop-Solution des Herstellers beendet und die Extinktion des Farbumschlages bei einer Wellenlänge von 450 nm mit dem Plattenreader gemessen.

3.13 Untersuchung der Proteinregulation mittels Western Blot Technik

3.13.1 Gewinnung und Aufreinigung der Proteine

Zur Gewinnung von Proteinen wurden verschiedene Zellzahlen für die Versuchszeitpunkte in einer 60 cm² großen Petrischale 24 Stunden vor Versuchsbeginn in 3ml Versuchsmedium ausplattiert. Für den 24h-Wert wurden 4×10^6 Zellen ausplattiert, für den 48h-Wert 3×10^6 Zellen, für den 72h-Wert 2×10^6 Zellen und für den 96h-Wert 1×10^6 Zellen. Die Petrischalen wurden zuvor mit 0,2 %-Gelatine beschichtet. Nach Durchführung des Experimentes entsprechend des Zeit-Temperatur-Protokolls wurden alle weiteren Schritte auf Eis durchgeführt, um einen Proteinverlust durch Proteasenaktivität zu vermeiden. Das Medium wurde vorsichtig abgesaugt und die Zellen mit gekühltem PBS mit einer Temperatur von 4 °C einmal gewaschen. Im Anschluss wurden die Zellen in 1ml PBS bei 4 °C mit einem Zellschaber von der Petrischale abgelöst, in ein Eppendorfgefäß überführt und bei 3000 g für 5 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und die im Pellet befindlichen Zellbestandteile mit einem Zellyse-Puffer mit Proteinase- und Phosphatase-Inhibitoren resuspendiert. Nach einer 5-minütigen Inkubation auf Eis wurden die Suspensionen bei 13000g für 5 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Die Überstände wurden in neue Eppendorfgefäße überführt und bei -80 °C bis zur weiteren Analyse gelagert.

3.13.2 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA

Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe des BCA Assays bestimmt. Dieser Test beruht auf der photometrischen Detektion und Quantifikation des Proteingehalts durch eine Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^{1+} in alkalischem Medium in Anwesenheit von Proteinen, der sogenannten Biuret-Reaktion. Durch die Bildung eines Chelatkomplexes der Bicinchonin-Säure (BCA) mit den reduzierten einwertigen Kupferionen kommt es zu einem violetten Farbumschlag, der sich bei einem Absorptionsmaximum von 562 nm annähernd linear zur Proteinkonzentration verhält und photometrisch bestimmt werden kann. Die Proteinproben wurden 1:10 in Aqua bidest verdünnt und 10 μl dieser Suspension in Duplikaten auf eine 96-well-Platte zusammen mit einer Standardreihe bekannter Konzentrationen von bovinem Serum-Albumin (BSA) aufgetragen. Nach Zugabe von 200 μl BCA-Reagenz wurden die Proben lichtgeschützt bei 37 °C für 30 Minuten inkubiert. Im Anschluss wurde die Extinktion bei 562 nm gemessen und die Proteinkonzentration mit Hilfe der Standardreihe berechnet.

3.13.3 Gelelektrophorese (SDS-Page)

Zur Auftrennung der Proteine wurde das Verfahren der SDS-Page-Gelelektrophorese angewandt. Hierbei werden die Proteine durch Natriumdodecylsulfat (SDS) denaturiert und die gebildeten negativ geladenen SDS-Protein-Komplexe wandern ihrem Molekulargewicht entsprechend in einem Polyacrylamid-Gel entlang eines elektrischen Feldes. Die Proteinproben wurden schonend auf Eis aufgetaut. Die gleiche Menge Protein jeder Probe wurde mit SDS-haltigem Probenpuffer vermischt und gegebenenfalls mit Aqua bidest ergänzt, um identische Volumina zu erhalten. Die Suspensionen wurden im Anschluss für 5 Minuten auf 95 °C zur vollständigen Denaturierung erhitzt und dann auf das Polyacrylamid-Gel aufgetragen. Die Elektrophorese-Kammer enthielt Puffer bestehend aus 192 mM Glycin, 25 mM Trisbase und 3,47 mM SDS. Bei einer Spannung von 60 mV wurden die Proteine zunächst im Sammelgel aufkonzentriert und im Anschluss bei 100 mV im Trenngel ihrer Größe nach aufgetrennt.

3.13.4. Proteintransfer mittels Tank-Blotting-Methode

Nach der SDS-Page-Elektrophorese wurden die Proteine vom Gel auf eine PVDF- oder Nitrocellulose-Membran mit Hilfe der Tank-Blotting-Methode transferiert. Das Gel und die Membran wurden dafür unter Bildung eines „Sandwiches“ zusammen mit Filterpapier und Filterpads in die mit Blotting-Puffer gefüllte Kammer eingespannt. Bei einer Spannung von 100 mV für 60 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Proteine auf die Membran transferiert. Der

Blotting-Puffer wurde dabei mit einem Eisakku und einem Magnetrührer gekühlt, um Hitzeschäden der Proteine zu vermeiden. Eine erfolgreiche Übertragung der Proteine wurde mit einer Ponceau-Färbung getestet.

Sammelgel	Trenngel
Sammelgelpuffer 0,5 M (pH=6,8)	Trenngelpuffer 1,5 M (pH=8,8)
SDS-Lösung 10 %	SDS-Lösung 10 %
APS-Lösung 10 %	APS-Lösung 10 %
Acrylamid	Acrylamid
TEMED	TEMED
H ₂ O	H ₂ O

Sammelgelpuffer	Trenngelpuffer
0,5 M TRIS-HCl (pH=6,8)	Trenngelpuffer 1,5 M (pH=8,8)
30,28 g TRIS ad 350 ml Aqua bidest	90,85 g TRIS ad 350 ml Aqua bidest
pH einstellen mit 1 N HCL	pH einstellen mit 1 N HCL
ad 500 ml	ad 500 ml

Elektrophorese-Puffer	Blotting-Puffer
Glycin, 250 mM	Glycin, 192 mM
Tris-Base, 25 mM	Tris-Base, 25 mM
SDS, 0,1 %	Methanol, 20 %

3.13.5 Detektion spezifischer Proteine

Auf die PVDF- oder Nitrocellulose-Membran wurde eine Suspension aus 5 % Magermilchpulver in PBS oder PBST zur Blockierung unspezifischer Proteinbindung für eine Stunde bei Raumtemperatur gegeben. Nach einmaligem Waschen wurde die Membran anschließend in ein Zellkultur-Röhrchen mit Primärantikörper, gemäß den Herstellerangaben, in PBS oder PBST verdünnt, überführt und über Nacht bei 4 °C auf einem Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Membranen 3 mal für 10 Minuten gewaschen und für eine Stunde mit dem enzymgekoppelten Sekundärantikörper (Donkey anti Rabbit 1:10000 in PBS oder PBST) bei

Raumtemperatur schüttelnd inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurde die Membran mit Enhanced Chemiluminescent- Reagenz (ECL) von Pierce bedeckt, die als Substrat für die mit dem Sekundäntikörper konjugierte Meerrettich-Peroxidase dient. Die Reaktion führt zur Emission eines Chemilumineszenz-Signals, das mit Hilfe des Chemilumineszenz-Bildentwicklers ChemiDoc XRS und der Software Quantity One detektiert wurde.

3.13.6 Densitometrische Analyse

Die Proteinbanden wurden mit der Software ImageLab™-Software densitometrisch quantifiziert. Als Ladekontrolle wurde β -Actin bei allen Proben mitbestimmt und die Bandenintensität des untersuchten Proteins durch die Bandenintensität von β -Actin dividiert, um vermeintliche Unterschiede der Proteinmengen herauszurechnen.

3.14. Untersuchung der mRNA-Regulation mittels quantitativer RT-PCR

3.14.1 Isolation der RNA

Zur Extraktion von RNA wurde die peqGOLD RNAPure™ Methode entsprechend den Herstellerangaben angewandt. Die gebrauchsfertige Reagenz enthält Phenol und Guanidinisothiocyanat in einphasiger Lösung. Nach Zugabe von Chloroform und anschließender Zentrifugation trennt sich die homogene Suspension in 3 Phasen auf, wobei in der oberen wässrigen Phase die RNA enthalten ist. Für den Versuch wurden 24 Stunden vor Versuchsbeginn 200.000 Zellen in einer mit 0,2 %-Gelatine beschichteten 22 cm² großen Petrischale in 1 ml Medium ausplattiert. Das Medium wurde vor Versuchsbeginn durch Versuchsmedium ersetzt und das Experiment entsprechend des Zeit-Temperatur-Protokolls durchgeführt. Zum jeweiligen Untersuchungszeitpunkt wurde das Versuchsmedium vorsichtig abgesaugt und Zellen einmalig mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für 5 Minuten bei Raumtemperatur mit 500 μ l peqGOLD RNAPure™ –Reagenz inkubiert, durch mehrmaliges Resuspendieren von den Petrischalen abgelöst und in ein RNase-freies Eppendorfgefäß überführt. Nach Zugabe von 100 μ l Chloroform wurden die Proben für 5 Minuten auf Eis inkubiert und im Anschluss für 15 Minuten bei 12000 g und 4 °C zentrifugiert. Hinterher waren 3 Phasen sichtbar, wobei die obere wässrige Phase RNA enthält. Sie wurde vorsichtig abpipettiert und in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Die Ausfällung der RNA erfolgt mit der Zugabe des gleichen Volumens an Isopropanol. Die Proben wurden für 15

Minuten auf Eis inkubiert und danach für 10 Minuten bei 12000g und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig entfernt und das entstandene Pellet mit 1 ml 75 %igem Ethanol gewaschen. Nach einer erneuten 15-minütigen Zentrifugation bei 12000g und 4 °C wurde das Ethanol vorsichtig abgenommen und die Pellets in RNase freiem Aqua bidest resuspendiert und für 10 Minuten zur vollständigen Lösung auf Eis inkubiert. Die Proben wurden hinterher bei -80 °C eingefroren und gelagert.

3.14.2 Bestimmung der RNA-Konzentration

Die RNA-Konzentrationen der Proben wurden mit Hilfe des Spektrophotometers NanoDrop von ThermoScientific bestimmt. Dafür wurden 1 µl der Proben bei einer Wellenlänge von $\lambda=280$ nm gemessen. Die Reinheit der RNA wurde mit der 260 nm/280 nm-Ratio überprüft und bei einem Verhältnis von 2,0 als rein angesehen.

3.14.3 Reverse Transkription

Die RNA wurde mit einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase (Moloney Murine Leukemia Viruse Reverse Transcriptase) in cDNA transkribiert. Dafür wurden 500 ng der RNA-Proben bei 42 °C für 1 Stunde mit 200 U MMLV-Reverse Tanskriptase und einzelsträngigen Hexanukleotiden zufälliger Sequenz, sogenannten Random Primer (Promega, Madison, WI), gemischt und die Reaktion durch Zugabe von 35 µl DNase I enthaltenden Reaktionsmix katalysiert.

3.14.4 Quantitative RT-PCR

Mit Hilfe der Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) wurden die Zielabschnitte der umgeschriebenen cDNA verfielfältigt und in Echtzeit quantifiziert. Die Methode beruht auf dem Einsatz einer TaqManTM-Sonde. Diese besteht aus einem Primer für die Zielabschnitte, der am 5'-Ende eine Reporter- (6-Carboxyfluorescein, FAM) und am 3'-Ende eine Quencher-Fluoreszenz (6-carboxy-tetramethylrhodamine, TAMRA) trägt. Der Quencher unterdrückt die Emission des Reporters. Kommt es zur Hybridisierung der Sonde mit der cDNA und zur Freisetzung des Reporters durch die Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase, steigt die Emission des Reporterfarbstoffs FAM. Je mehr DNA synthetisiert wird, dest so stärker ist das FAM-Signal.

Verwendete TaqMan™-Sonden:

RBM3, murin	F 5' caccttcacaaaccagagcat 3' (336-357nt, Exon 3)
	R50 gcatgatcaactcggatttgg 3' (425-405nt, Exon 4)
	Probe 5' agagctatgaatggagagtc 3' (373-392nt, Exon3/4)
	NM_001166409.1
CIRP, murin	F 5' acgctaaggacgccatgatg 3' (258-277nt, Exon 3)
	R 5' gggaccggzzgtcagaagac 3' (353-334nt, Exon 4)
	Probe 5' tgaatgggaagtctgtggac 3' (282-301nt, Exon ¾)
	NM_007705.2

3.15 Statistische Auswertung

Für die statistischen Auswertungen und Graphen wurde das Programm GraphPad Prism 6 verwendet. Alle statistisch ausgewerteten Versuche wurden mindestens dreimal mit unterschiedlichen Zellpassagen und/oder aus unterschiedlichen Zellstämmen wiederholt. Die Daten werden als Mittelwert +/- Standardabweichung dargestellt. Für die statistische Analyse von nicht gepaarten Stichproben bei der Auswertung der mRNA- und Proteinexpression von RBM3 und CIRP wurde der Student's T-Test verwendet. Zum Vergleich von mehreren Gruppen wurde für die restlichen Versuche eine One-way-ANOVA mit Bonferroni-Korrektur zur Vermeidung des alpha-Fehlers angewandt. P-Werte < 0,05 *, < 0,01 **, und < 0,001 *** wurden als statistisch signifikant gewertet.

4 Ergebnisse

4.1 LDH-Ausschüttung und Zelltod

4.1.1 Einfluss der Hypothermie auf die LDH-Ausschüttung

Im Vorversuch wurde der Einfluss der moderaten Kühlung ohne vorherige Schädigung auf den Zelltod bzw. das Zellüberleben untersucht. Dafür wurden die neuronalen Zellen auf 33,5 °C für 24, 48 oder 72 Stunden gekühlt und anschließend zur Quantifizierung des Zelltodes die enzymatische Aktivität der Lactat-Dehydrogenase (LDH) in den Überständen der Zellkultur gemessen. Moderate Hypothermie für 24, 48 oder 72 Stunden hat signifikant die LDH-Ausschüttung reduziert. Eine Kühlung für 24 Stunden reduzierte die LDH-Ausschüttung um ca. 20 %. 48 und 72 Stunden moderate Hypothermie führten zu einer Reduktion um ca. 40 % im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 3).

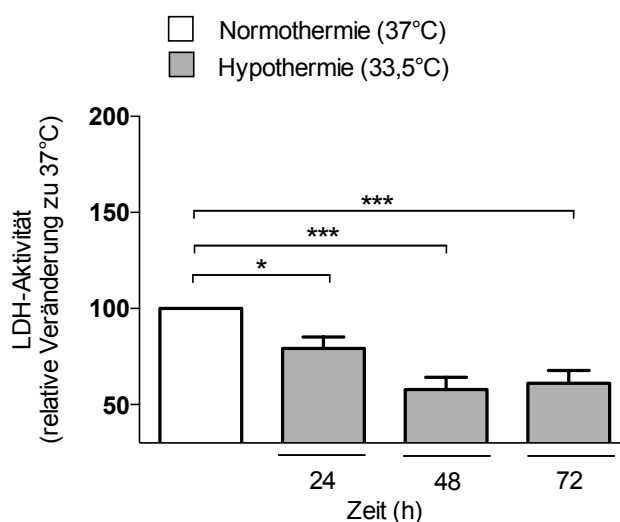


Abbildung 3: LDH-Aktivität in den Zellüberständen von SK-N-SH nach 24, 48 oder 72-stündiger moderater Hypothermie (33,5 °C) im relativen Vergleich zu einer normothermen Kontrollgruppe bei 37 °C. (n = 6; * p < 0,05, *** p < 0,001)

4.1.2 Einfluss von Hypoxie und anschließender Hypothermie

Im nächsten Schritt wurden die Auswirkungen von Hypoxie und anschließender Hypothermie auf das Zellüberleben untersucht. Dafür wurden die Neuronen für 24 Stunden bei einem Sauerstoffgehalt von 0,2 % O₂ bzw. 8 % O₂ inkubiert und im Anschluss bei normoxischen Bedingungen bei 33,5 °C bis zu 72 Stunden gekühlt. Nach der Hypoxie und nach 24, 48 und 72-stündiger Kühlung wurde die LDH-Aktivität in den Zellüberständen bestimmt. Eine schwere

Hypoxie mit einer Sauerstoffkonzentration von 0,2 % für 24 Stunden führte zu einer signifikant erhöhten LDH-Ausschüttung 24 Stunden nach Beendigung der Hypoxie und damit zu einem vermehrten Zellsterben (Abb. 4a). Die LDH-Aktivität in den Zellüberständen war um ca. 80 % höher im Vergleich zur Kontrollgruppe. Auch 48 und 72 Stunden nach der schweren Hypoxie ist mehr LDH in den Zellüberständen der geschädigten Gruppen zu messen, die Unterschiede sind jedoch nicht statistisch signifikant. Eine Kühlung der Zellen auf 33,5 °C für 48 und 72 Stunden konnte die LDH-Ausschüttung signifikant um ca. 45 % und ca. 50 % senken im Vergleich zu ungekühlten geschädigten Zellen. Moderate Hypothermie für 24 Stunden genügt nicht, um die LDH-Ausschüttung signifikant zu senken, auch wenn tendenziell weniger LDH im Vergleich zur ungekühlten Gruppe zu messen war. In den Überständen der geschädigten und für 24 Stunden gekühlten SK-N-SH wurde eine signifikant höhere LDH-Aktivität im Vergleich zur Kontrollgruppe gemessen.

Milde Hypoxie (8 % O₂ für 24 Stunden) führt nicht zu einer erhöhten LDH-Ausschüttung in SK-N-SH-Zellen (Abb. 4b). Man kann jedoch bei Zellen, die nach milder Hypoxie für 24, 48 oder 72 Stunden gekühlt wurden, eine signifikant niedrigere LDH-Aktivität im Vergleich zu ungekühlten, zuvor geschädigten Zellen messen. Zusätzlich ist die LDH-Aktivität nach milder Hypoxie und moderater Hypothermie für 48 bzw. 72 Stunden geringer als in der ungeschädigten normothermen Kontrollgruppe.

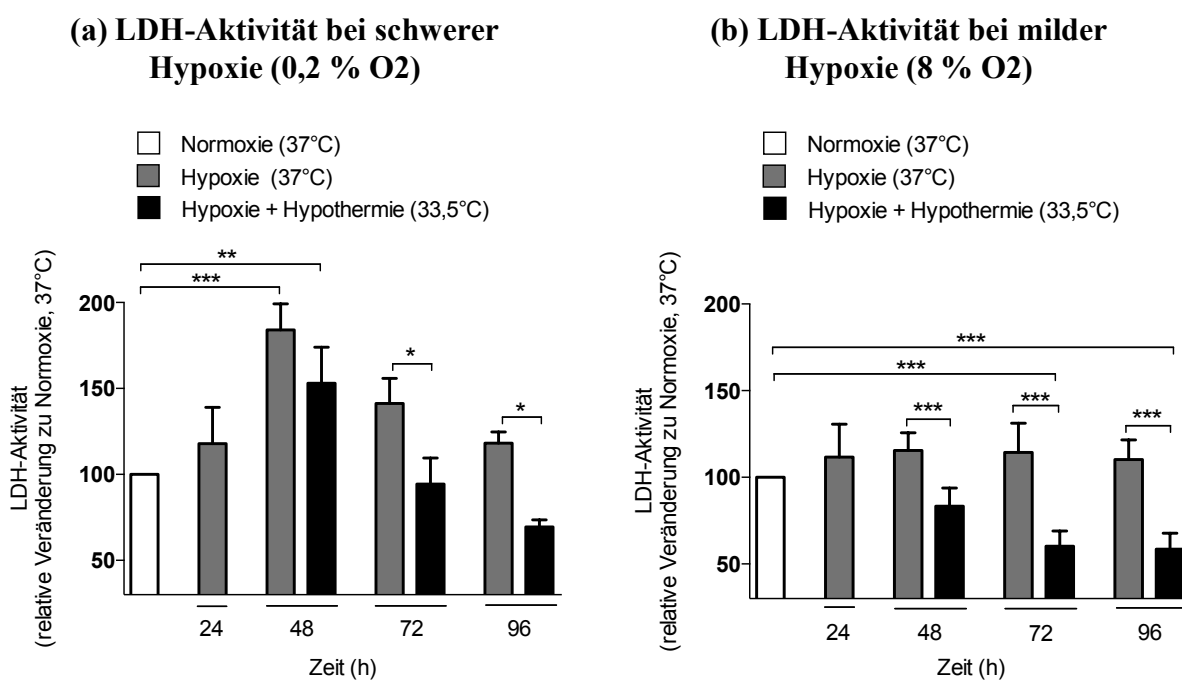


Abbildung 4: Einfluss von schwerer Hypoxie, 0,2 % O₂ für 24h (a) und milder Hypoxie, 8 % O₂ für 24h (b) und anschließender moderater Hypothermie (33,5 °C) auf die LDH-Aktivität in den Zellüberständen. (n = 3 - 4; * p < 0,05, ** p < 0,01 und *** p < 0,001)

4.2 Aktivität der neuronenspezifischen Enolase

Zur Validierung der Ergebnisse zum Zelltod bei schwerer Hypoxie und konsekutiver moderater Hypothermie wurde die Aktivität der neuronenspezifischen Enolase (NSE) in den Zellüberständen bestimmt. Nach 24-stündiger Hypoxie bei 0,2 % O₂ und anschließender Kühlung auf 33,5 °C für 72 Stunden wurde die NSE-Ausschüttung quantifiziert. Schwere Hypoxie führte zu einer signifikant höheren NSE-Aktivität im Vergleich zu einer normoxischen Kontrollgruppe und damit zu vermehrtem Zellsterben (Abb. 5). Zellen, die nach der hypoxischen Schädigung für 72 Stunden moderat gekühlt wurden, zeigten eine signifikant reduzierte NSE-Aktivität im Vergleich zu ungekühlten geschädigten SK-N-SH-Zellen und damit ein geringeres Maß an Zelltod. Die Konzentration der neuronenspezifischen Enolase ist in der gekühlten Hypoxie-Gruppe annähernd die gleiche wie in der ungeschädigten Kontrollgruppe. Darüber hinaus wurde die Auswirkung von moderater Hypothermie für 72 Stunden ohne vorangegangene hypoxische Schädigung auf die NSE-Ausschüttung untersucht. Die alleinige Kühlung auf 33,5 °C konnte die Rate an Zelltod signifikant im Vergleich zur normothermen Kontrollgruppe reduzieren. Die NSE-Konzentration in ungeschädigten gekühlten Zellen war signifikant niedriger als die der geschädigten gekühlten Zellen.

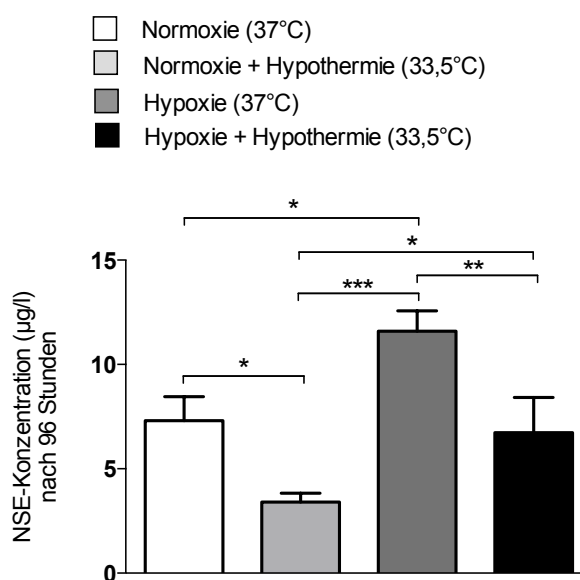


Abbildung 5: Aktivität der neuronenspezifischen Enolase (NSE) in den Überständen von SK-N-SH, die nach 24-stündiger schwerer Hypoxie (0,2% O₂) und ohne vorherige Schädigung für 72 Stunden bei 37 °C oder 33,5 °C inkubiert wurden. (n = 3; * p < 0,05, ** p < 0,01 und *** p < 0,001)

4.3 Aktivierung der Caspase 3 und Apoptose

4.3.1 Einfluss der Hypothermie auf die Aktivierung der Caspase 3

Im Vorversuch wurde der Einfluss der Hypothermie ohne vorherige Schädigung auf das Apoptoseverhalten der Zellen untersucht. Dafür wurde mittels Western Blot die Aktivierung der Caspase 3 mit dem Verhältnis des aktiven Spaltprodukts (cleaved Caspase 3) zum inaktiven ungespaltenen Enzym (Caspase 3) bestimmt. Moderate Hypothermie für 24, 48 und 72 Stunden führte zu keiner signifikanten Änderung der Aktivierung von Caspase 3.

4.3.2 Einfluss von Hypoxie und Hypothermie auf die Aktivierung der Caspase 3

Im weiteren wurde der Einfluss von schwerer Hypoxie mit folgender Hypothermie auf die Aktivierung der Caspase 3 untersucht. Die SK-N-SH-Zellen wurden für 24 Stunden bei 0,2 % O₂ inkubiert und danach entweder auf 33,5 °C bis zu 72 Stunden gekühlt oder bei 37 °C belassen. Schwere Hypoxie führte nicht zu einer signifikant erhöhten Aktivierung der Caspase 3 im Zellkulturmodell im Vergleich zu ungeschädigten Zellen. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen gekühlten und nicht gekühlten geschädigten Zellen.

4.4 Metabolische Aktivität der Zellen – MTT-Test

4.4.1 Einfluss der Hypothermie auf die metabolische Aktivität

Zunächst wurde der Einfluss der moderaten Hypothermie auf die metabolische Aktivität untersucht. Die SK-N-SH-Zellen wurden für 24, 48 oder 72 Stunden bei 33,5 °C inkubiert und im Anschluss die MTT-Reduktion kolorimetrisch quantifiziert. Moderate Hypothermie für 24 bzw. 72 Stunden führte zu einer signifikant reduzierten metabolischen Aktivität um ca. 16 % und ca. 26 % im Vergleich zu einer normothermen Kontrollgruppe. Moderate Hypothermie für 48 Stunden führte zu einer ähnlichen Reduktion der metabolischen Aktivität wie nach 24 Stunden, der Unterschied war jedoch nicht statistisch signifikant (Abb. 6).

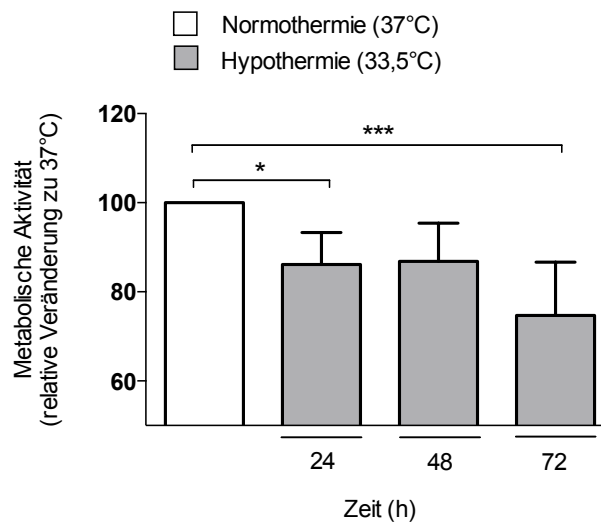


Abbildung 6: Metabolische Aktivität von SK-N-SH nach 24, 48 oder 72 Stunden moderater Hypothermie (33,5 °C) im Vergleich zu einer normothermen Kontrollgruppe. (n = 5 - 8; * p < 0,05, *** p < 0,001)

4.4.2 Einfluss von Hypoxie und Hypothermie auf die metabolische Aktivität

Der Einfluss von schwerer und milder Hypoxie und darauffolgender Hypothermie auf die metabolische Aktivität der SK-N-SH wurde daraufhin untersucht. Die Zellen wurden für 24 Stunden bei einem Sauerstoffgehalt von 0,2 % oder 8 % inkubiert und im Anschluss unter normoxischen Bedingungen auf 33,5 °C bis zu 72 Stunden gekühlt. Zu den Versuchszeitpunkten 24, 48, 72 und 96 Stunden wurde der MTT-Test durchgeführt.

Schwere Hypoxie für 24 Stunden führte nicht zu einer signifikant reduzierten metabolischen Aktivität in SK-N-SH-Zellen, auch wenn eine dahingehende Tendenz zu beobachten ist. Zellen, die nach der Hypoxie für 24 oder 72 Stunden moderat gekühlt wurden, zeigten eine signifikant

reduzierte metabolische Aktivität im Vergleich zu ungeschädigten normothermen Zellen. Zwischen gekühlten und nicht-gekühlten zuvor geschädigten Zellen gab es keine signifikanten Unterschiede (Abb. 7a).

Milde Hypoxie mit einem Sauerstoffgehalt von 8 % für 24 Stunden beeinflusste die metabolische Aktivität der Zellen nicht (Abb. 7b). Dennoch ließen sich signifikante Unterschiede zwischen gekühlten Gruppen im Vergleich zur ungeschädigten Kontrollgruppe bei 37 °C zu den Versuchszeitpunkten 72 und 96 Stunden beobachten. Nach 72 Stunden war auch der Unterschied zwischen hypothermen und normothermen Zellen, die zuvor hypoxisch geschädigt wurden, signifikant.

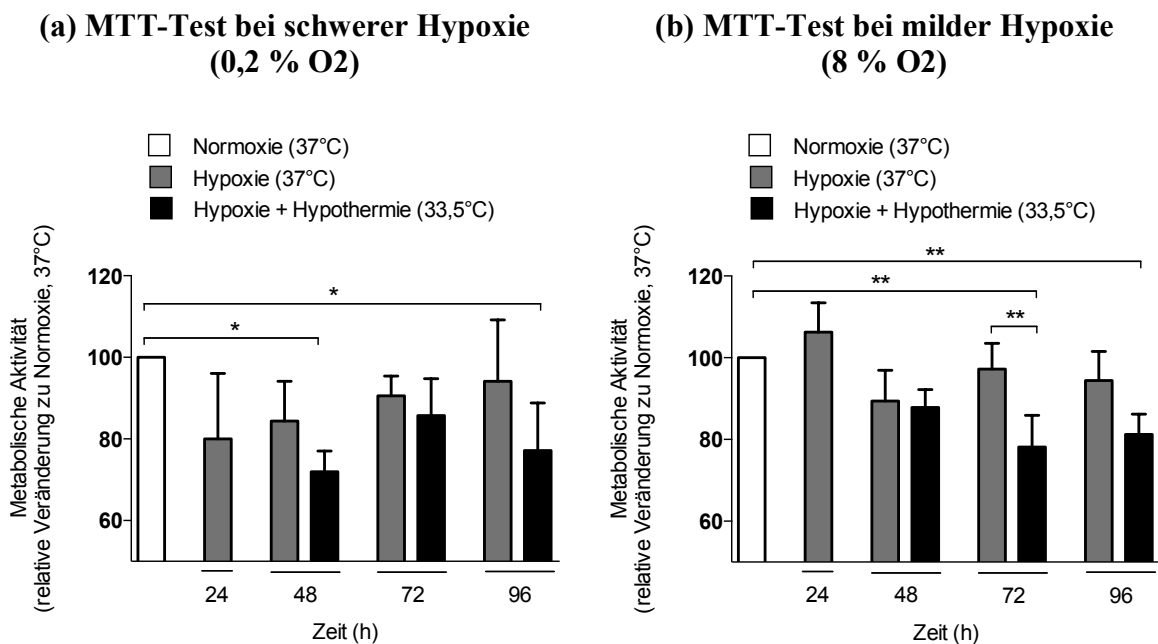


Abbildung 7: Einfluss von schwerer Hypoxie, 0,2 % O₂ für 24h (a) und milder Hypoxie, 8 % O₂ für 24h (b) und anschließender moderater Hypothermie (33,5 °C) bzw. Normothermie (37 °C) auf die metabolische Aktivität. (n = 3 - 5; * p < 0,05, ** p < 0,01)

4.5 ATP-Haushalt

4.5.1 Einfluss der Hypothermie auf die ATP-Konzentration

Zunächst wurden die Effekte der moderaten Hypothermie auf den ATP-Haushalt untersucht. Dafür wurden die Zellen für 24, 48 oder 72 Stunden auf 33,5 °C gekühlt, die ATP-Konzentration bestimmt und mit einer normothermen Kontrollgruppe verglichen. Moderate Hypothermie führte zu keinen Veränderungen der ATP-Konzentration (Abb. 8a).

4.5.2 Einfluss von Hypoxie und Hypothermie auf die ATP-Konzentration

Darüber hinaus wurde untersucht, inwiefern sich eine schwere Hypoxie und eine darauffolgende moderate Hypothermie auf den ATP-Haushalt auswirken. Dafür wurden die Neuronen für 24 Stunden bei 0,2 % O₂ inkubiert und im Anschluss entweder für bis zu 72 Stunden auf 33,5 °C gekühlt bzw. normotherm belassen. Eine schwere Hypoxie für 24 Stunden führte zu einer signifikant reduzierten ATP-Konzentration um fast 50 % (Abb. 8b). 24 Stunden nach der hypoxischen Schädigung ist der ATP-Gehalt in den Zellen wieder signifikant angestiegen und blieb etwas unter dem der ungeschädigten Kontrollgruppe. In den SK-N-SH, die nach der Hypoxie für 24, 48 oder 72 Stunden gekühlt wurden, ist tendenziell der ATP-Gehalt höher als in den ungekühlten Zellen. Die Unterschiede sind jedoch nicht statistisch signifikant.

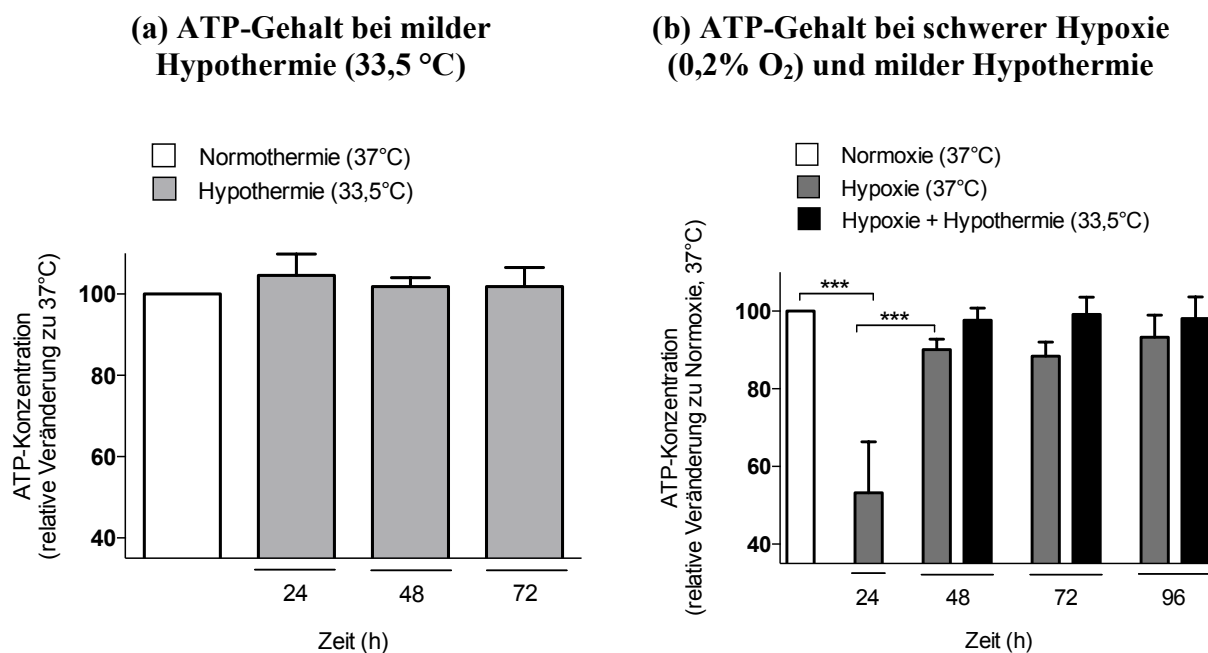


Abbildung 8: (a) ATP-Gehalt in SK-N-SH nach 24, 48 bzw. 72-stündiger Hypothermie (33,5 °C) im Vergleich zu einer normothermen Kontrollgruppe (b) ATP-Gehalt in SK-N-SH nach 24-stündiger schwerer Hypoxie (0,2 % O₂) und darauffolgender Hypothermie für 24, 48 bzw. 72 Stunden im Vergleich zu normothermen geschädigten SK-N-SH und zu einer ungeschädigten Kontrollgruppe bei 37 °C. (n = 4; *** p < 0,0001)

4.6 Zellproliferation

4.6.1 Einfluss der Hypothermie auf die Zellproliferation

Ob und wie sich das Proliferationsverhalten von Neuronen durch milde bzw. schwere Hypoxie und moderate Hypothermie verändert, wurde mit dem BrdU-Test untersucht. Zunächst wurde der Einfluss einer 24, 48 bzw. 72-stündigen Hypothermie auf die Zellproliferation analysiert. Es konnten keine Unterschiede im Vergleich zu einer normothermen Kontrollgruppe festgestellt werden.

4.6.2 Einfluss der Hypoxie und Hypothermie auf die Zellproliferation

Weder schwere (0,2 % O₂ für 24 Stunden) noch milde Hypoxie (8 % O₂ für 24 Stunden) haben das Proliferationsverhalten der Neuronen signifikant beeinflusst. Es gab darüber hinaus auch keine signifikanten Unterschiede zwischen Zellen, die nach der hypoxischen Schädigung auf 33,5 °C gekühlt und denen die bei 37 °C belassen wurden.

4.7 Zellmorphologie

Um zellmorphologische Veränderungen infolge der Schädigung mit Hypoxie und der anschließenden Behandlung mit Hypothermie zu erkennen, wurden die SK-N-SH-Zellen mit der Immunfluoreszenz-Methode angefärbt. Nach Behandlung der SK-N-SH entsprechend dem Zeit-Temperatur-Protokoll wurden die Zellen mit β III-Tubulin und DAPI gefärbt und unter dem Fluoreszenzmikroskop angeschaut.

SK-N-SH, die durch milde Hypoxie (8 % O_2) geschädigt wurden, zeigen moderate morphologische Veränderungen, die Zellkörper sind vergrößert im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe. Dabei ist kein wesentlicher Unterschied zwischen anschließend gekühlten und ungekühlten Neuronen festzustellen. Schwere Hypoxie (0,2 % O_2) führt zu stärkeren morphologischen Veränderungen, die Zellkörper schwellen an und sind deutlich vergrößert. Neuronen, die im Anschluss an die schwere hypoxische Schädigung bei 33,5 °C für 72 Stunden inkubiert wurden, unterscheiden sich morphologisch von denen, die unter normothermen Bedingungen belassen wurden. Sie sind weniger stark geschwollen, jedoch sind die Zellkörper ebenfalls deutlich vergrößert im Vergleich zu ungeschädigten Neuronen. Die Kühlung von SK-N-SH auf 33,5 °C ohne vorherige Schädigung führt zu geringen morphologischen Veränderungen, es sind auch dort vereinzelt Zellen mit vergrößerten Somata zu sehen gewesen.

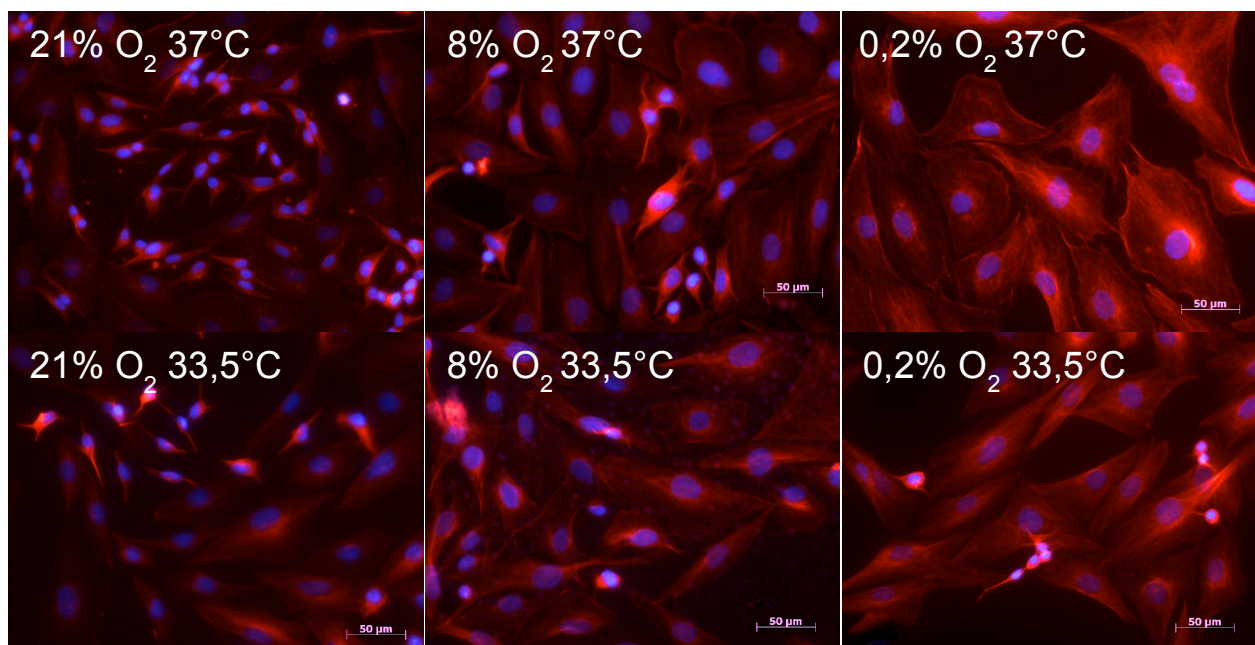


Abbildung 9: Zellmorphologische Veränderungen durch 72-stündige milde Hypothermie (33,5 °C) und Einfluss von milder (8 % O_2) bzw. schwerer Hypoxie (0,2 % O_2) und anschließender moderater Hypothermie (33,5 °C) bzw. Normothermie (37 °C) auf die Zellmorphologie.

4.8 RBM3

4.8.1 Einfluss von Hypothermie und Hypoxie auf die mRNA-Expression von RBM3

Inwiefern die Expression der mRNA von RBM3 durch milde bzw. schwere Hypoxie und Hypothermie beeinflusst wird, wurde mit Hilfe einer RT-PCR untersucht. Die Zellen wurden für 24 Stunden bei einem Sauerstoffgehalt von 0,2 % und 8 % inkubiert und im Anschluss unter normoxischen Bedingungen auf 33,5 °C bis zu 72 Stunden gekühlt. Darüber hinaus wurde die mRNA-Expression einer normoxischen Kontrollgruppe, so wie einer für 48 Stunden moderat gekühlten normoxischen Gruppe analysiert, um den alleinigen Einfluss der Hypothermie zu untersuchen. Die zuvor nicht hypoxisch geschädigten Zellen, die für 48 Stunden einer moderaten Hypothermie ausgesetzt waren, zeigen eine signifikant erhöhte RBM3-mRNA-Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 10a). Die Expression war um das ca. 3,0-fache erhöht. Weder schwere noch moderate Hypoxie für 24 Stunden induzierten die Synthese von RBM3-mRNA (Abb. 10b). Jedoch zeigten SK-N-SH-Zellen, die nach einer schweren Hypoxie für 48 oder 72 Stunden moderat gekühlt wurden, eine signifikant erhöhte RBM3-mRNA-Expression im Vergleich zu ungekühlten geschädigten Zellen (Abb. 10c). RBM3-mRNA wurde ca. 3,7- bzw. 4,1-fach stärker exprimiert. SK-N-SH-Zellen die nach schwerer hypoxischer Schädigung für 24 Stunden gekühlt wurden, zeigten tendenziell auch eine stärkere RBM3-Expression. Der Unterschied war jedoch nicht signifikant.

SK-N-SH-Zellen, die nach milder hypoxischer Schädigung für 24 oder 72 Stunden gekühlt wurden, exprimierten signifikant mehr RBM3-mRNA im Vergleich zu ungekühlten geschädigten Zellen (Abb. 10d). Die mRNA von RBM3 wurde ca. 3,4- bzw. 4,8-fach stärker exprimiert. SK-N-SH-Zellen, die für 48 Stunden nach milder hypoxischer Schädigung gekühlt wurden, zeigten eine nicht-signifikant erhöhte Expression von RBM3-mRNA.

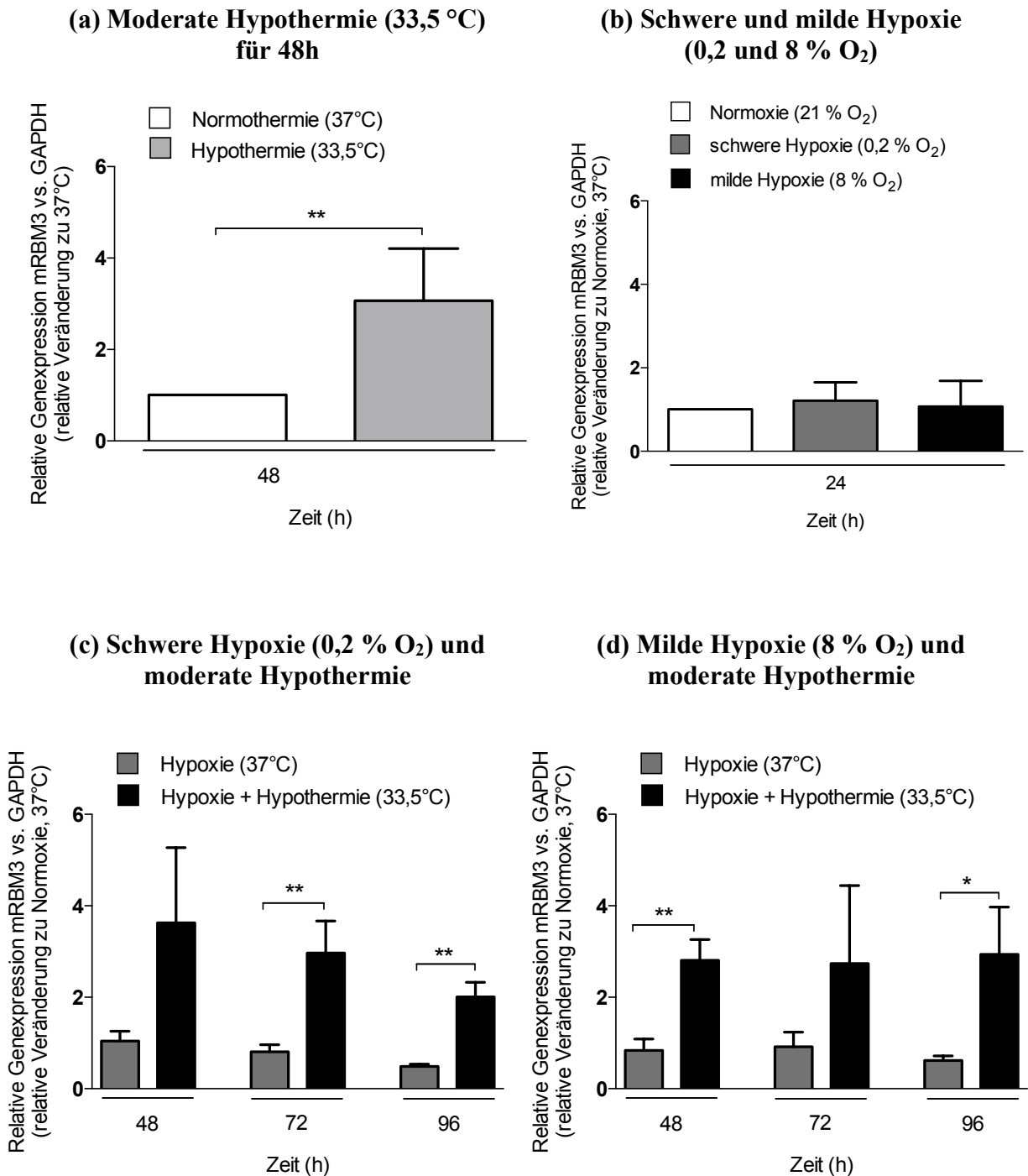


Abbildung 10: (a) RBM3-mRNA-Expression in SK-N-SH nach 48-stündiger moderater Hypothermie (33,5 °C) im Vergleich zu normothermen Kontrollgruppe (b) RBM3-mRNA-Expression in SK-N-SH die 24 Stunden einer schweren (0,2 % O₂) bzw. milden (8 % O₂) ausgesetzt waren im Vergleich zu einer Kontrollgruppe (c) RBM3-mRNA-Expression in SK-N-SH die nach 24-stündiger schwerer Hypoxie (0,2 % O₂) für 24, 48 bzw. 72 Stunden entweder auf 33,5 °C gekühlt wurden (d) RBM3-mRNA-Expression in SK-N-SH die nach 24-stündiger schwerer Hypoxie (8 % O₂) für 24, 48 bzw. 72 Stunden entweder auf 33,5 °C gekühlt wurden. (n = 3 – 6; * p < 0,05, ** p < 0,01)

4.8.2 Einfluss von Hypothermie und Hypoxie auf die RBM3-Proteinexpression

Um posttranskriptionelle Einflüsse auf die RBM3-Expression zu untersuchen, wurde zu den gleichen Versuchszeitpunkten eine Western-Blot-Analyse durchgeführt (Abb. 11). Moderate Hypothermie für 48 Stunden führte in ungeschädigten SK-N-SH-Zellen zu einer signifikant erhöhten RBM3-Proteinexpression um das ca. 2,6-fache. Weder schwere noch milde Hypoxie für 24 Stunden induzierte die Synthese von RBM3-Protein. Zellen, die nach schwerer hypoxischer Schädigung für 24, 48 oder 72 Stunden auf 33,5 °C gekühlt wurden, zeigen eine signifikant erhöhte RBM3-Proteinexpression um das ca. 2,2 bis 3,3-fache im Vergleich zu nicht gekühlten geschädigten Zellen und um das ca. 2 bis 2,5-fache im Vergleich zur Kontrollgruppe. Bei Neuronen, die nach milder 24-stündiger Hypoxie für 24, 48 oder 72 Stunden moderat gekühlt wurden, wird RBM3-Protein ebenfalls signifikant stärker exprimiert. Die Expression ist ca. 1,9 bis 3,6-fach stärker im Vergleich zu geschädigten SK-N-SH-Zellen, die nach der Hypoxie bei 37 °C inkubiert wurden und um ca. 1,3 bis 2,85-fach stärker verglichen mit Neuronen ungeschädigten Kontrollgruppe.

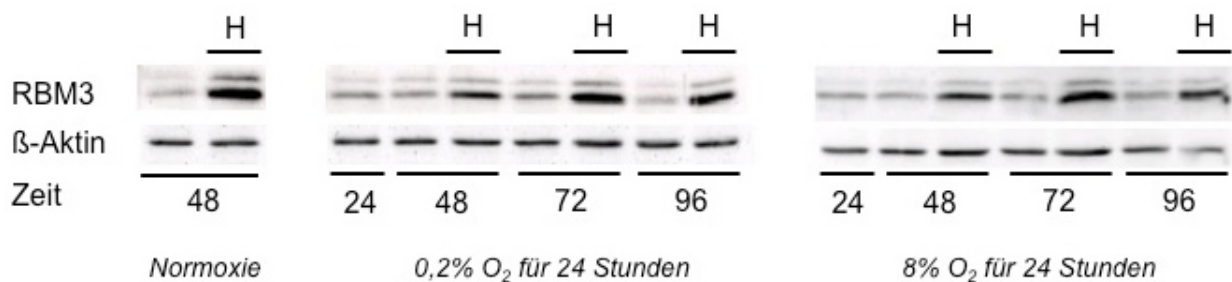


Abbildung 11: Western-Blots von RBM3 und β-Actin als Ladekontrolle von SK-N-SH die nach dem Zeit-Temperatur-Protokoll entweder mit schwerer Hypoxie (0,2 % O₂ für 24 Stunden) oder milder Hypoxie (8 % O₂ für 24 Stunden) geschädigt wurden bzw. physiologischen O₂-Konzentrationen ausgesetzt waren und im Anschluss entweder bei 37°C oder 33,5 °C inkubiert wurden. Mit „H“ markierte Banden entsprechen den hypothermen Versuchsgruppen (33,5 °C für 24, 48 oder 72 Stunden).

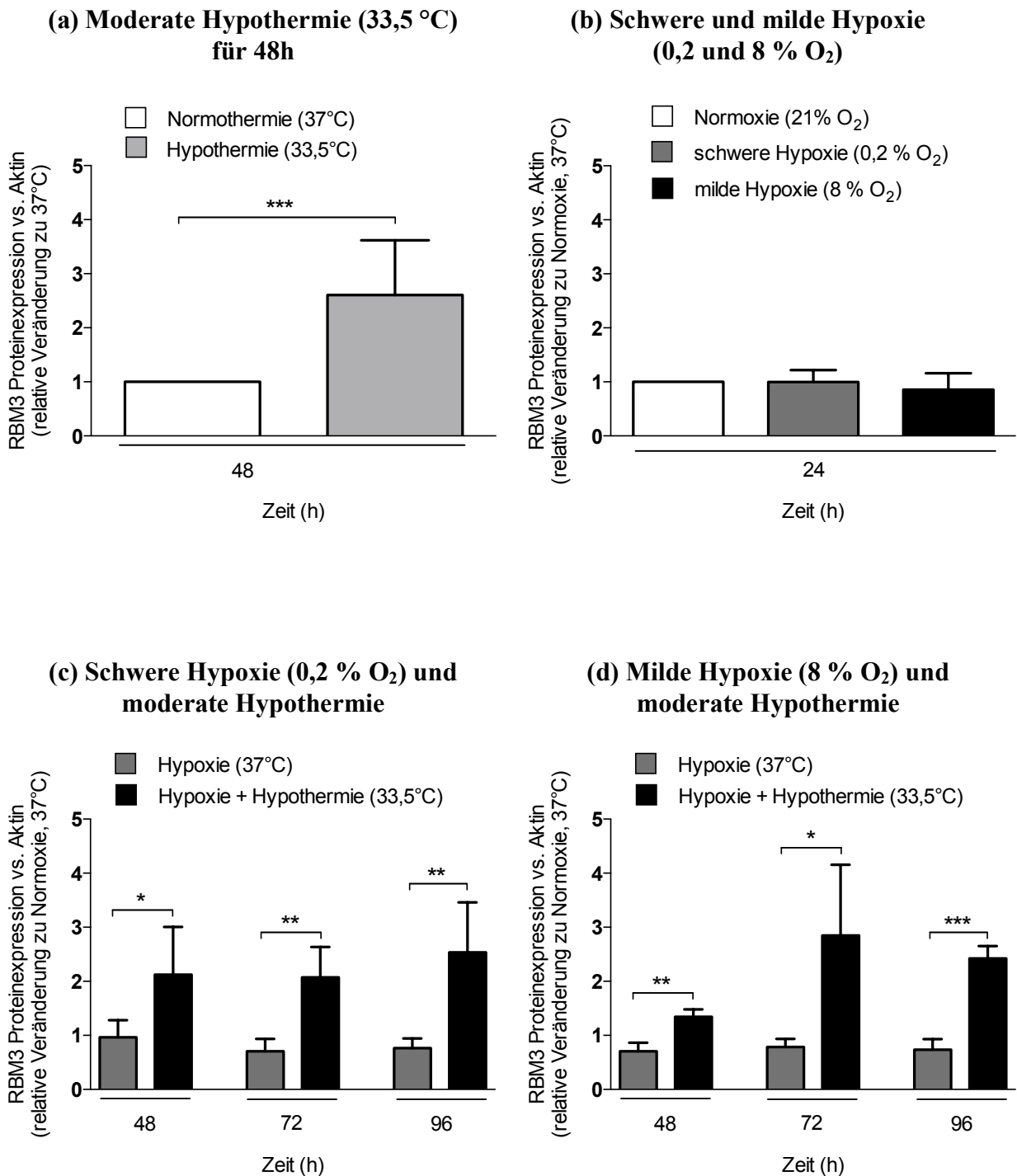


Abbildung 12: Densitometrische Analysen von (a) RBM3 in SK-N-SH die für 48h auf 33,5 °C gekühlt wurden (b) RBM3 in SK-N-SH nach 24-stündiger schwerer bzw. milder Hypoxie (0,2 % bzw. 8 % O₂) (c) RBM3 in SK-N-SH nach schwerer Hypoxie (0,2 % O₂) und 24, 48 oder 72 Stunden moderater Hypothermie (33,5 °C) bzw. Normothermie (d) RBM3 in SK-N-SH nach milder Hypoxie (8 % O₂) und 24, 48 oder 72 Stunden moderater Hypothermie (33,5 °C) bzw. Normothermie. (n = 4 - 8; * p < 0,05, ** p < 0,01 und *** p < 0,001)

4.9 CIRP

4.9.1 Einfluss von Hypothermie und Hypoxie auf die mRNA-Expression von CIRP

Der Einfluss von Hypothermie, sowie schwerer Hypoxie und folgender Hypothermie auf die mRNA-Expression von CIRP wurde mittels RT-PCR in Zellen untersucht. Dafür wurden die SK-N-SH nach dem Zeit-Temperatur-Protokoll behandelt und die Expression von CIRP-mRNA an den entsprechenden Versuchszeitpunkten gemessen.

Moderate Hypothermie für 48 Stunden führte zu einer nicht-signifikant erhöhten Synthese von CIRP-mRNA (Abb. 13a). Schwere Hypoxie für 24 Stunden hatte keinen Einfluss auf die mRNA-Expression von CIRP (Abb. 13b). Schwer hypoxisch-geschädigte Neuronen, die anschließend für 72 Stunden auf 33,5 °C gekühlt wurden, zeigten eine signifikant stärkere mRNA-Expression von CIRP im Vergleich zu geschädigten ungekühlten Zellen (Abb. 14). Die Expression war um das ca. 1,9-fache erhöht. Auch in Neuronen, die für 24 oder 48 Stunden bei moderater Hypothermie inkubiert wurden, ist die mRNA von CIRP im Vergleich zu normothermen Neuronen vermehrt exprimiert, die Unterschiede sind jedoch nicht statistisch signifikant.

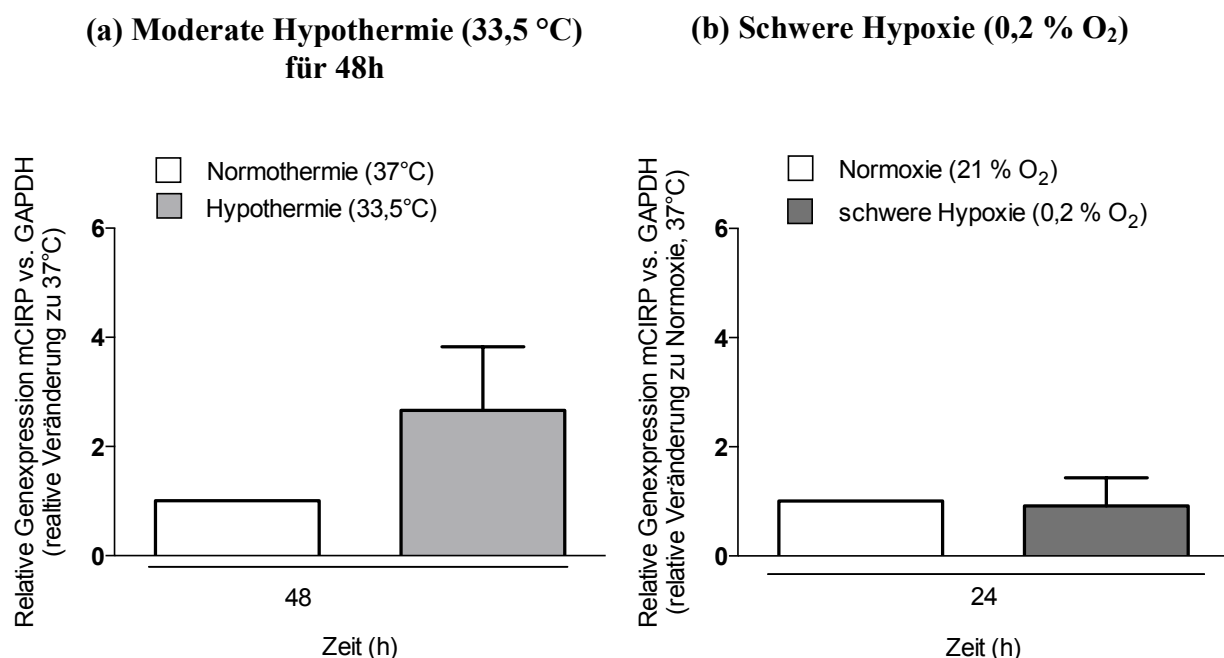


Abbildung 13: (a) CIRP-mRNA-Expression in SK-N-SH nach 48-stündiger moderater Hypothermie (33,5 °C) (b) CIRP-mRNA-Expression in SK-N-SH nach 24-stündiger schwerer Hypoxie (0,2 % O₂). (n = 3)

Schwere Hypoxie (0,2 % O₂) und moderate Hypothermie

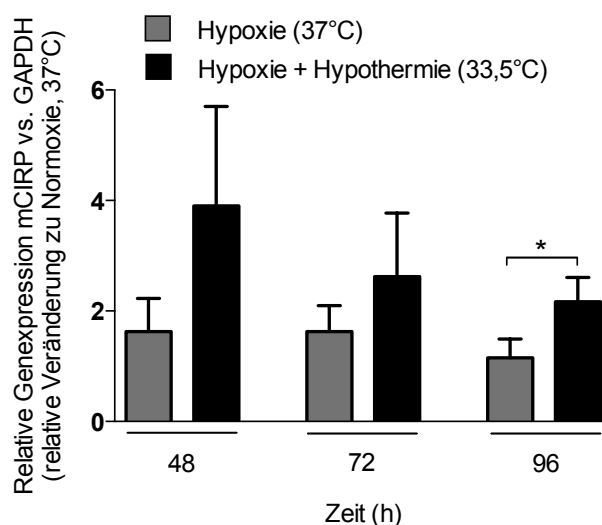


Abbildung 14: CIRP-mRNA-Expression in SK-N-SH die nach schwerer Hypoxie (0,2 % O₂) für 24, 48 bzw. 72 Stunden entweder normotherm oder hypotherm bei 33,5 °C inkubiert wurden. (n = 3; * p < 0,05)

4.9.2 Einfluss von Hypothermie und Hypoxie auf die CIRP-Proteinexpression

Moderate Hypothermie für 48 Stunden führte zu einer signifikant erhöhten CIRP-Proteinexpression in SK-N-SH-Zellen. Schwere bzw. milde Hypoxie haben die Expression des Proteins CIRP nicht beeinflusst. Neuronen, die nach der schweren bzw. milden Hypoxie anschließend für 24, 48 bzw. 72 Stunden auf 33,5 °C gekühlt wurden, zeigten tendenziell eine erhöhte CIRP-Proteinexpression im Vergleich zu den ungekühlten Neuronen. Es gab jedoch keine signifikanten Unterschiede.

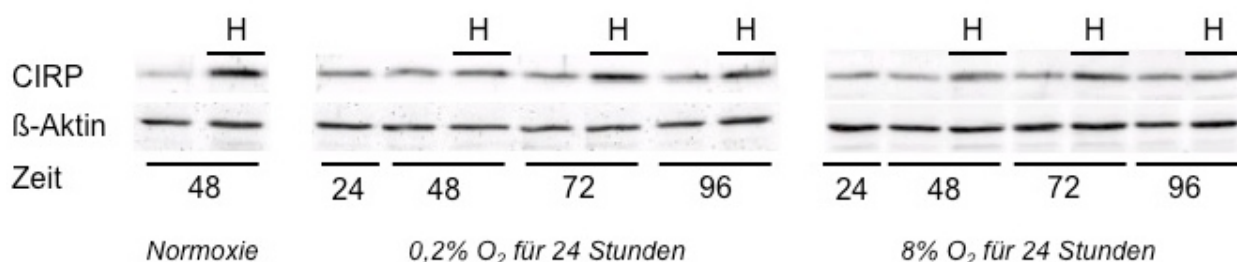


Abbildung 15: Western-Blots von CIRP und β-Actin als Ladekontrolle von SK-N-SH die nach dem Zeit-Temperatur-Protokoll entweder mit schwerer Hypoxie (0,2 % O₂ für 24 Stunden) oder milder Hypoxie (8 % O₂ für 24 Stunden) geschädigt wurden bzw. physiologischen O₂-Konzentrationen ausgesetzt waren und im Anschluss entweder bei 37 °C oder 33,5 °C inkubiert wurden. Mit „H“ markierte Banden entsprechen den hypothermen Versuchsgruppen (33,5 °C für 24, 48 oder 72 Stunden).

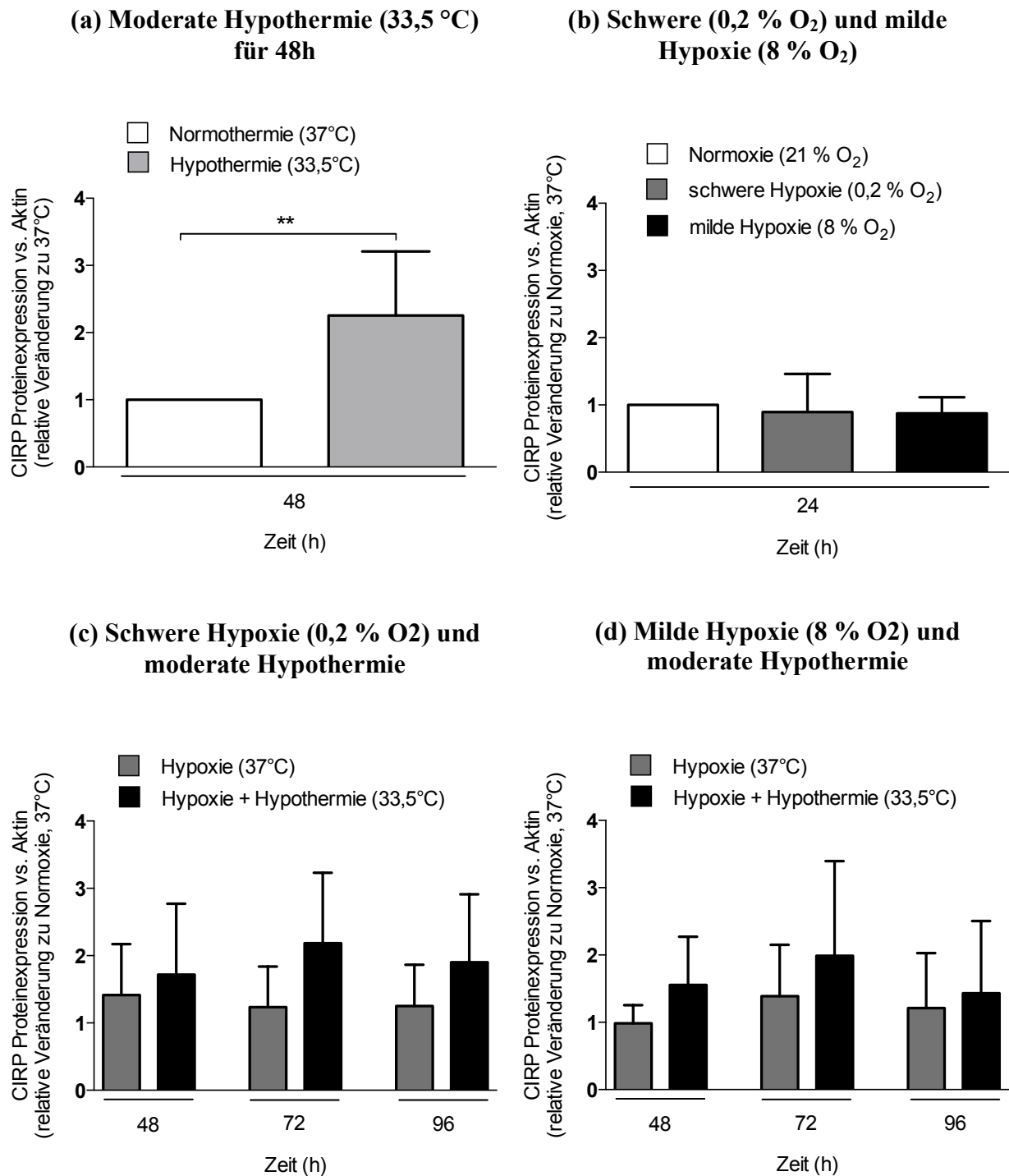


Abbildung 16: Densitometrische Analysen von (a) CIRP in SK-N-SH die für 48 Stunden auf 33,5 °C gekühlt wurden (b) CIRP in SK-N-SH nach 24-stündiger schwerer bzw. milder Hypoxie (0,2 % bzw. 8 % O₂) (c) CIRP in SK-N-SH nach schwerer Hypoxie (0,2 % O₂) und 24, 48 oder 72 Stunden Hypothermie (33,5 °C) bzw. Normothermie (d) CIRP in SK-N-SH nach milder Hypoxie (8 % O₂) und 24, 48 oder 72 Stunden Hypothermie (33,5 °C) bzw. Normothermie. (n = 3 – 7; ** p < 0,01)

4.10 Validierung der Ergebnisse der Zellkultur in primären Neuronen

Ein Teil der Experimente wurde in einer Zellkultur aus präparierten primären Neuronen erneut untersucht. Die primären Neuronen wurden für 24 Stunden mild hypoxisch (8 % O₂) geschädigt und im Anschluss entweder bei 37 °C belassen oder für 24 bzw. 48 Stunden auf 33,5 °C gekühlt.

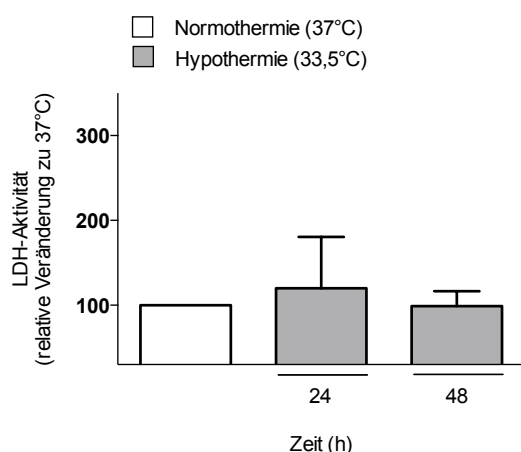
4.10.1 Einfluss von Hypothermie auf die LDH-Ausschüttung

Moderate Hypothermie von 33,5 °C für 24 bzw. 48 Stunden führte nicht zu einer Veränderung der LDH-Ausschüttung. Moderate Hypothermie ohne vorherige Schädigung hatte damit bei primären Neuronen nicht den LDH-senkenden Effekt, der im Zellkultur-Modell mit den SK-N-SH-Zellen gesehen wurde. Die Kühlung zeigte aber auch keinen negativen Einfluss auf das Überleben der Zellen.

4.10.2 Einfluss von milder Hypoxie und Hypothermie auf die LDH-Ausschüttung

Milde Hypoxie mit einer O₂-Konzentration von 8 % für 24 Stunden führte nicht direkt zu einem signifikanten Anstieg der LDH-Aktivität. In der Nachbeobachtung 24 Stunden nach der hypoxischen Schädigung ist die LDH-Aktivität nicht-signifikant höher als in der ungeschädigten Kontrollgruppe. Moderate Hypothermie für 24 bzw. 48 Stunden hatte keinen Einfluss auf die LDH-Ausschüttung.

(a) LDH-Aktivität bei Hypothermie



(b) LDH-Aktivität bei milder Hypoxie

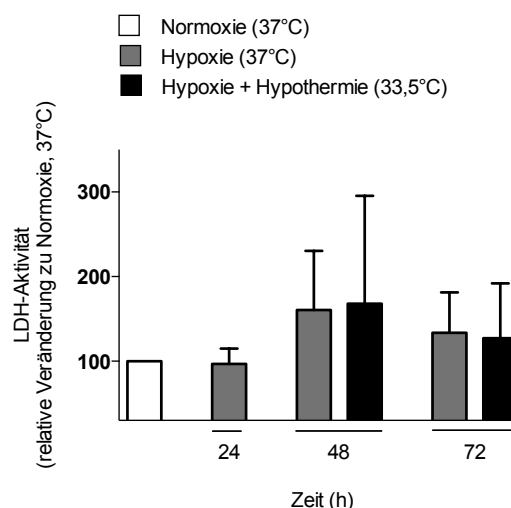


Abbildung 17: (a) LDH-Aktivität in den Überständen von primären Neuronen, die für 24 bzw. 48 Stunden auf 33,5 °C gekühlt wurden im Vergleich zu primären Neuronen bei 37 °C. (n = 3) (b) LDH-Aktivität in primären Neuronen die mild hypoxisch geschädigt wurden und anschließend bei 37 °C oder 33,5 °C inkubiert wurden (n = 7 - 8)

4.10.3 Einfluss von Hypothermie auf die mRNA-Expression von RBM3

Moderate Hypothermie für 24 Stunden führte zu einer signifikant erhöhten Expression der mRNA von RBM3. Die Expression war dabei 2,4-fach höher im Vergleich mit einer normothermen Kontrollgruppe.

4.10.4 Einfluss von milder Hypoxie und Hypothermie auf die mRNA-Expression von RBM3

Milde Hypoxie für 24 Stunden führte nicht zu einem signifikanten Anstieg der RBM3-mRNA-Expression. Auch in der Reoxygenierungsphase konnte kein Einfluss auf die Expression von RBM3 beobachtet werden. Neurone, die nach 24-stündiger Hypoxie für 48 Stunden unter Normoxie auf 33,5 °C gekühlt wurden, zeigten eine signifikant erhöhte Expression von RBM3-mRNA im Vergleich zu geschädigten ungekühlten Neuronen.

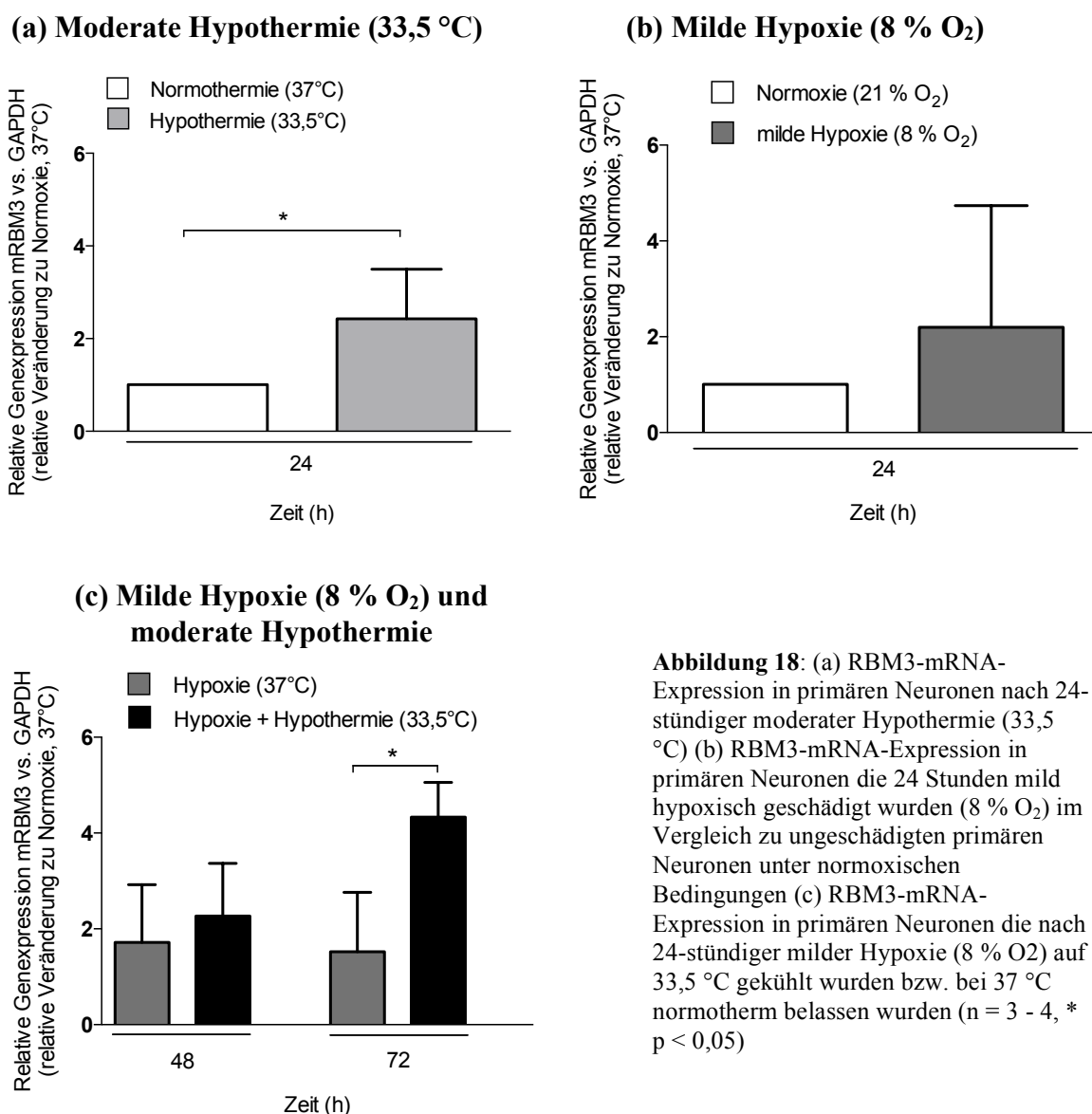


Abbildung 18: (a) RBM3-mRNA-Expression in primären Neuronen nach 24-stündiger moderater Hypothermie (33,5 °C) (b) RBM3-mRNA-Expression in primären Neuronen die 24 Stunden mild hypoxisch geschädigt wurden (8 % O₂) im Vergleich zu ungeschädigten primären Neuronen unter normoxischen Bedingungen (c) RBM3-mRNA-Expression in primären Neuronen die nach 24-stündiger milder Hypoxie (8 % O₂) auf 33,5 °C gekühlt wurden bzw. bei 37 °C normotherm belassen wurden (n = 3 - 4, * p < 0,05)

5 Diskussion

Milde Hypothermie ist in den aktuellen AWMF-Leitlinien zur Prävention der hypoxisch-ischämischen Enzephalopathie durch perinatale Asphyxie als Therapie etabliert. Auch bei anderen Krankheitsbildern, die mit einer hypoxisch-ischämischen Schädigung einhergehen, ist milde bis moderate Hypothermie als Therapiekonzept Gegenstand der aktuellen klinischen Forschung. Die zugrunde liegenden Wirkmechanismen von Hypothermie sind jedoch noch nicht abschließend untersucht und verstanden. Besonders die Funktion von Kälteschockproteinen und deren Rolle in der durch Hypothermie vermittelten Neuroprotektion ist unklar. Ziel dieser Arbeit war die Etablierung eines Zellkulturmodells, um den Einfluss von Hypoxie und moderater Hypothermie auf neuronale Zellen nach Sauerstoffentzug und Reoxygenierung zu untersuchen. Dafür wurden Veränderungen bezüglich des Zellüberlebens, der Zellmorphologie, des Proliferationsverhaltens und des Zellstoffwechsels, sowie die Regulation der Kälteschockproteine RBM3 und CIRP untersucht.

5.1 Einfluss von Hypoxie und Hypothermie auf das Zellüberleben

Die schädigende Wirkung eines Sauerstoff- und Glucose-Entzugs auf Neuronen zur Simulation einer hypoxisch-ischämischen Hirnschädigung hinsichtlich des Zellüberlebens, sowie der neuroprotektive Effekt von moderater bis milder Hypothermie, ist in mehreren experimentellen *in vitro*- und *in vivo*- Studien beschrieben und wurde von Antonic et al. 2014 in einem Review zusammengefasst.¹⁰⁸ In unserem Zellkulturmodell wurde die schädigende Wirkung von Hypoxie auf neuronale Zellen bei erhaltenem Glucoseangebot und der Einfluss von TH untersucht. Wir konnten zeigen, dass moderate Hypothermie (33,5 °C) alleine die Anzahl toter Zellen reduziert, auch in zuvor nicht geschädigten Neuronen. Schwere Hypoxie (0,2 % O₂) für 24 Stunden reduzierte die Zellvitalität signifikant, jedoch nicht unmittelbar nach der hypoxischen Schädigung, sondern verzögert nach einer 24-stündigen Reoxygenierungsphase. Daraus lässt sich schließen, dass das Zellsterben in unserem Zellkulturmodell aufgrund eines Reoxygenierungsschadens, wie in 1.2.3. beschrieben, erfolgt. In unseren Versuchen war die erhöhte Zelltod-Rate auch 72 Stunden nach Reoxygenierung mittels NSE-Aktivität noch messbar. Auch Lehane et al setzten SK-N-SH-Zellen einer 24-stündigen Hypoxie (0 % O₂, 95 % N₂, 5 % CO₂) und konnten unmittelbar nach der hypoxischen Schädigung ebenfalls keinen

vermehrten Zelltod feststellen.¹⁰⁹ Sie haben leider keine Daten über die Zelltod-Rate nach Reoxygenierung in ihrer Studie veröffentlicht. Auch in den Experimenten von Khaspekov et al. konnte gezeigt werden, dass mehr primäre hippocampale Neuronen sterben, wenn sie nach einer Hypoxie reoxygeniert werden, als wenn man sie für den Zeitraum der Reoxygenierung weiter hypoxisch schädigt.¹¹⁰

In unserem Zellkultur-Modell konnte moderate Hypothermie für 48 oder 72 Stunden den Zelltod durch Hypoxie signifikant reduzieren und wirkt dementsprechend neuroprotektiv. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Hua et al. in einer Studie mit primären Neuronen von Wistar-Ratten.¹¹¹ Sie schädigten die Zellen für 24 Stunden mit einem Sauerstoffentzug von unter 1 % O₂. Im Gegensatz zu unserem Versuchsaufbau kühlten sie die Neurone bereits während der hypoxischen Schädigung auf 33 °C bzw. 30 °C und erzielten damit einen neuroprotektiven Effekt. Bossenmeyer-Pourié et al. konnten ebenfalls zeigen, dass moderate Hypothermie (32 °C) primäre Neuronen von Wistar-Ratten vor einer hypoxischen Schädigung schützt.⁷⁵ Auch sie kühlten die Neuronen schon während der 6-stündigen Hypoxie und nicht posthypoxisch. Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse unserer und anderer Studien, dass moderate Hypothermie neuronale Zellen vor Zelltod durch Hypoxie schützen kann.

Weder milde Hypoxie alleine, noch die darauffolgende Reoxygenierung führten zu einer Reduktion der Zellvitalität in unserem Zellkulturmodell. Eine moderate Reduktion des Sauerstoffgehalts scheint keine schädigende Wirkung auf humane SK-N-SH zu haben. Das könnte daran liegen, dass es sich bei SK-N-SH-Zellen um eine Tumorzelllinie handelt. Tumorzellen können mitunter an ein vermindertes Sauerstoffangebot adaptiert sein. Es wäre aber auch denkbar, dass neuronale Zellen eine vorübergehende Reduktion der Sauerstoffkonzentration auf 8% grundsätzlich tolerieren können oder es zumindest nicht zu vermehrtem Zellsterben kommt. In den Versuchen zu hypoxischer Präkonditionierung von Parmar et al. wurden 6-Tage alte Ratten für 3 Stunden bei 8 % O₂ gehalten und im Anschluss mehrere kortikale Regionen unter dem Mikroskop untersucht. Es konnten keine Unterschiede bezüglich der Zellzahl und -morphologie im Vergleich zu den Hirnschnitten von Ratten gesehen werden, die unter physiologische Sauerstoffkonzentrationen gehalten wurden.¹¹²

Im nächsten Schritt haben wir analysiert, ob apoptotischer Zelltod an dem Zelluntergang durch schwere Hypoxie (0,2 % O₂) beteiligt ist und die Aktivierung von Caspase 3 untersucht. Es kam zu keiner Aktivierung der Caspase 3 in unserem Zellkulturmodell nach hypoxischer Schädigung und moderate Hypothermie hatte keinen Einfluss auf die Caspase-3-Regulation. Eine Annahme wäre, dass es sich bei dem Zelltod in unserem Zellkulturmodell nicht um Apoptose, sondern ausschließlich um Nekrose handelt. Das würde im Gegensatz zu den Ergebnissen vieler anderer

Studien stehen, die Apoptose als eine wichtige Form des Zelltodes durch hypoxische Schädigung identifizieren konnten.^{75,111} Möglicherweise wurden falsche Zeitpunkte ausgewählt, um die Aktivierung der Caspase 3 zu untersuchen oder das Ausmaß der hypoxischen Schädigung war nicht ausreichend, um Apoptose in humanen SK-N-SH zu initiieren. Takada et al. untersuchten in einem Tiermodell mit neonatalen Ratten den Einfluss von perinataler Asphyxie auf Zelltod, Apoptose und der Aktivierung von Caspase 3 im Hippocampus der Tiere.¹¹³ Dafür wurden neonatale Ratten an ihrem ersten Lebenstag für 25 Minuten einer Anoxie (0 % O₂) ausgesetzt und anschließend ihr Hirngewebe zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht. Obwohl sowohl vermehrter Zelltod auch in Form von Apoptose mit mehreren Methoden nachweisbar war, kam es nicht zu einer Aktivierung der Caspase 3. Sie schlussfolgern daraus, dass Zelltod infolge von Anoxie in Neuronen des Hippocampus Caspase 3-unabhängig ist. Auch bei der zuvor erwähnten Studie von Lehane et al. kam es zu keiner Spaltung von Procaspase 3 in primären kortikalen Neuronen, die bis zu 72 Stunden einer Hypoxie ausgesetzt waren.¹⁰⁹ Es ist also auch denkbar, dass, abhängig von der Art und Lokalisationen der Neuronen, sowie vom Ausmaß der Hypoxie und davon, ob es zusätzlich auch zu einem Glucoseentzug im Sinne einer Ischämie kommt, verschiedene Signalwege zum Zelltod in Form von Apoptose führen. Diese Fragen müssen in zukünftigen Studien weiter untersucht und beantwortet werden.

5.2 Einfluss von Hypoxie und Hypothermie auf den Metabolismus

Moderate Hypothermie reduzierte die metabolische Aktivität signifikant in unserem Zellkulturmodell. Das gilt sowohl für nicht-geschädigte SK-N-SH als auch für SK-N-SH, die zuvor mit schwerer oder milder Hypoxie geschädigt wurden. Dass Hypothermie den Stoffwechsel verlangsamen und den Sauerstoff- bzw. Energie-Bedarf dadurch senken kann, ist in der Literatur beschrieben. Hagerdal et al. und Laptook et al. zeigten, dass die Stoffwechselrate um ca. 5 % pro 1 °C Temperatursenkung vermindert ist.^{64,65} Moderate Hypothermie für 24 bis 72 Stunden senkte in unserem Zellkulturmodell die Stoffwechselaktivität um 14 – 28 %. Trotz verminderter metabolischer Aktivität war der ATP-Gehalt in den SK-N-SH auch nach 72 Stunden moderater Hypothermie nicht reduziert, sondern entsprach dem normothermer Zellen. Die Senkung der Temperatur führt also lediglich zu einer Reduktion der Stoffwechselaktivität, wobei die Energiereserven auf physiologischem Niveau bleiben. Weder schwere noch milde Hypoxie führte zu einer signifikanten Reduktion der metabolischen Aktivität von humanen SK-

N-SH-Zellen. Dennoch ist die MTT-Reduktion bei SK-N-SH, die mit schwerer Hypoxie geschädigt wurden, tendenziell niedriger im Vergleich zur normoxischen Kontrolle oder durch milde Hypoxie geschädigten Neuronen. Die Unterschiede sind jedoch aufgrund hoher Standardabweichungen nicht statistisch signifikant. SK-N-SH, die mit schwerer Hypoxie geschädigt und anschließend auf 33,5 °C gekühlt wurden, zeigen darüber hinaus tendenziell die geringste metabolische Aktivität. Wang et al. schädigten primäre kortikale Neuronen von Ratten mit einer 12- bzw. 24-stündigen Hypoxie (0 % O₂) und fanden nach einer 24-stündigen Reoxygenierung eine signifikant niedrigere MTT-Reduktion in den geschädigten Neuronen im Vergleich zur normoxischen Kontrollgruppe.¹¹⁴ Ähnliche Ergebnisse erzielten auch Bossenmeyer-Pourié et al. in einer Kultur aus primären, ebenfalls von Ratten abstammenden Neuronen.⁷⁵ Die metabolische Aktivität von SK-N-SH-Zellen scheint weniger vulnerabel auf eine hypoxische Schädigung zu reagieren als primäre Neuronen.

Darüber hinaus wurde untersucht, inwiefern der ATP-Gehalt der SK-N-SH von schwerer Hypoxie und anschließender Kühlung beeinflusst wird. Schwere Hypoxie für 24 Stunden führte zu einer signifikant niedrigeren ATP-Konzentration in den Neuronen. Der ATP-Gehalt war um 47 % niedriger als in der normoxischen Kontrollgruppe. Nach einer 24-stündigen Reoxygenierung war der ATP-Gehalt wieder annähernd so hoch wie in der Kontrollgruppe. Ähnliche Ergebnisse erzielten auch Lehane et al. in der in 5.1. erwähnten Studie.¹⁰⁹ Sie schädigten SK-N-SH und haben nach 24 Stunden Hypoxie eine signifikant reduzierte ATP-Konzentration gemessen. Es gab keine signifikanten Unterschiede zwischen geschädigten gekühlten und nicht-gekühlten SK-N-SH hinsichtlich ihres ATP-Gehaltes in unserem Zellkulturmodell, auch wenn tendenziell der ATP-Gehalt in allen hypothermen Gruppen höher war als in den normothermen Gruppen.

5.3 Einfluss von Hypoxie und Hypothermie auf die Zellmorphologie

Mit Hilfe der Immunfluoreszenzmikroskopie wurde der Einfluss von Hypoxie und Hypothermie auf die Zellmorphologie untersucht. Hypothermie führte zu leichten morphologischen Veränderungen. Neben den regulären Neuronen mit kleinem Soma und dendritischen Auläufnern, sind auch Zellen mit größeren Somata zu sehen gewesen. Milde Hypoxie führte zu einer leichten Vergrößerung der Zellsoma der SK-N-SH, dabei waren keine morphologischen Unterschiede zwischen normo- und hypothermen Neuronen festzustellen. Insgesamt sind die Veränderungen

als moderat zu bezeichnen. Im Gegensatz dazu erscheint die Zellmorphologie von SK-N-SH, die einer schweren Hypoxie ausgesetzt waren, in der Nachbeobachtung nach 72 Stunden deutlich verändert. Die Zellsomata der SK-N-SH wirkten stark geschwollen. Das Zellvolumen und intrazelluläre osmotische Ionenkonzentrationen spielen eine zentrale Rolle für verschiedene zelluläre Prozesse und werden unter physiologischen Bedingungen streng reguliert, um eine normale Zellfunktion aufrecht zu erhalten.¹¹⁵ Unter hypoxischen Bedingungen kommt es zu zahlreichen zellulären Veränderungen, wie in 1.2.2 und 1.2.3 beschrieben, die zu einer intrazellulären Akkumulation von Calcium- und Natriumionen führen. Dabei kommt es konsekutiv zum Wassereinstrom in die Zellen und zur Zunahme des Zellvolumens, was als Zellschwellung bezeichnet wird.¹¹⁶ In der Phase der Reoxygenierung wird dieser Prozess durch oxidativen Stress und die Produktion von ROS und Superoxiden weiter begünstigt.¹¹⁵ Während Gliazellen bei akutem osmotischen Stress ihr Zellvolumen über verschiedene Ionentransporter regulieren können, scheinen Neuronen nicht dazu in der Lage zu sein und es kommt zum Zelluntergang.¹¹⁷⁻¹¹⁹ Die morphologischen Veränderungen der SK-N-SH durch schwere Hypoxie werden durch Zellschwellung bei osmotischem Stress verursacht. Werden SK-N-SH nach schwerer Hypoxie für 72 Stunden mit TH behandelt, sind die Zellsomata zwar ebenfalls vergrößert, jedoch in geringerem Maße als normotherme geschädigte SK-N-SH. TH konnte die morphologischen Veränderungen und damit den osmotischen Stress der Neuronen sichtlich reduzieren und, in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der LDH- und NSE-Ausschüttung, den Zelluntergang durch Hypoxie und Reoxygenierung verhindern. Auch in der bereits zuvor beschriebenen *in vivo*-Studie von Takada et al. bei der neonatale Ratten für 25 Minuten einer Anoxie ausgesetzt und im Anschluss die Gewebe analysiert wurden, wurden morphologische Veränderungen in Form einer somatodendritischen Schwellung von Neuronen des Hippocampus im Elektronenmikroskop beobachtet.¹¹³

5.4 Regulation von Kälteschockproteinen

5.1 Regulation von RBM3

Wir konnten in unserem Zellkulturmodell zeigen, dass moderate Hypothermie (33,5 °C) für 24, 48 oder 72 Stunden zu einer Erhöhung der Expression von RBM3 sowohl auf Transkriptions- als auch auf Translationsebene führt. Auch wenn die Unterschiede nicht zu allen Zeitpunkten statistisch signifikant waren, ist die Tendenz auch in allen Versuchsgruppen eindeutig. Die

Überexpression von RBM3 war sowohl in SK-N-SH-Zellen, die zuvor schwer oder mild hypoxisch geschädigt wurden, als auch in ungeschädigten SK-N-SH-Zellen, die ausschließlich gekühlt wurden, zu beobachten. Danno et al. beschrieben als erste die temperaturabhängige Regulation von RBM3 in verschiedenen humanen Geweben.⁸³ Sie beobachteten einen maximalen Anstieg der RBM3-mRNA-Expression schon nach 18 Stunden moderater Hypothermie (32 °C). Eine Hochregulierung von RBM3 durch moderate bis milde Hypothermie in neuronalen Gewebe, wie in unserem Zellkulturmodell, haben auch Chip et al. und Tong et al. feststellen können.^{88,100} Chip et al. zeigten eine erhöhte RBM3-mRNA und Proteinexpression nach 72-stündiger moderater Hypothermie (32 °C) in hippocampalen Hirnschnitten von Mäusen und ein Anstieg von RBM3-Transkripten in primären Neuronen nach 24-stündiger moderater Hypothermie. Wir zeigten in einer früheren Arbeit eine erhöhte Expression von RBM3-Transkripten und -Protein nach 24- bzw. 48-stündiger milder Hypothermie (33,5 °C) in hippocampalen Hirnschnitten von Mäusen, HT-22-Neuronen und einer Co-Kultur aus HT-22-Neuronen und BV-2-Mirkogliazellen.¹⁰⁰ Unsere Ergebnisse stehen folglich in Übereinstimmung mit anderen Forschungsarbeiten, die eine Induktion von RBM3 auf Transkriptions- und auf Translationsebene durch moderate bis milde Hypothermie feststellen konnten. Im Gegensatz dazu konnten wir eine Induktion von RBM3 durch schwere oder milde Hypoxie, wie Wellmann et al. sie zeigten, nicht reproduzieren.⁸⁴ Bei den von ihnen verwendeten Zelllinien handelte es sich jedoch nicht um Neuronen, sondern um Zellen epithelialen, hepatischen und lymphatischen Ursprungs. Ein weiterer Unterschied in ihren Experimenten ist, dass den Zellen nicht nur Sauerstoff, sondern auch Glucose entzogen wurde. Möglicherweise führt nur die Kombination von Hypoxie und Substratentzug zu einer Induktion von RBM3. Trollmann et al. untersuchten die Regulation verschiedener Gene nach einer systemischen Hypoxie (6 % O₂ für 6 Stunden) in der späten Schwangerschaft in Mäusen.¹²⁰ Sie führten dafür eine Microarray-Analyse von Gewebeproben der maternalen Plazenta und der Gehirne der Feten durch. Dabei kamen sie zu dem Ergebnis, dass RBM3-Genexpression in fetalen Hirnen von Mäusen nach Hypoxie nicht erhöht, sondern sogar reduziert ist. Gleiches ließ sich auch in den Gewebeproben der Plazenta beobachten. Diese Differenzen in den Ergebnissen der verschiedenen Studien lassen vermuten, dass sich die Regulation der Expression von RBM3 durch Hypoxie in Neuronen möglicherweise von der in nicht-neuronalen Zellen unterscheidet bzw. dass eine zusätzliche Schädigung beispielsweise in Form eines Glucoseentzugs vorliegen muss, um eine Induktion von RBM3 zu erzielen. Um zu einem abschließenden Ergebnis zu kommen, sind weitere Experimente notwendig.

Die Ergebnisse einiger Studien zu RBM3 implizieren, dass RBM3 ein wichtiger Mediator der Neuroprotektion durch moderate Hypothermie ist.^{88,89,121} Auch wenn die RBM3-Expression bei Absenkung der Temperatur auf 33,5 °C ansteigt und moderate Hypothermie humane SK-N-SH vor Zelltod schützt, ist dieser Zusammenhang mit unseren Experimenten nicht eindeutig zu beweisen. Um diese Frage abschließend zu beantworten, müssen weitere Versuche, beispielsweise in Form eines siRNA-induzierten Ausschaltung des RBM3-Gens, in Zukunft erfolgen.

5.4.2 Regulation von CIRP

Moderate Hypothermie für 48 Stunden führte in ungeschädigten SK-N-SH zu einer signifikant erhöhten CIRP-Proteinexpression und einer erhöhten Expression von CIRP-mRNA, auch wenn diese Erhöhung bei geringer Stichprobengröße knapp das Signifikanz-Niveau verpasste ($p = 0,0683$). Eine Induktion von CIRP auf Transkriptionsebene durch moderate Hypothermie (32 °C) wurde zuerst von Danno et al. beschrieben.⁸³ Sie beobachteten die höchste Expression nach 12 bis 18 Stunden. Nishiyama et al. konnten die temperaturabhängige Regulation von CIRP in verschiedenen humanen Zelllinien zeigen.¹²² Auch Xue et al. und Wellmann et al. beobachteten, dass moderate Hypothermie zu einer vermehrten CIRP-Expression führt.^{84,123} Moderate Hypothermie für 24, 48 oder 72 Stunden nach schwerer oder milder 24-stündiger Hypoxie führte tendenziell auch zu einer Hochregulierung von CIRP, sowohl auf Transkriptions- als auch auf Translationsebene. Die Daten waren jedoch aufgrund einer hohen Standardabweichung zum Großteil nicht statistisch signifikant und die Erhöhung der Expression nicht so stark wie bei RBM3. Bei Liu et al. kam es in einem Maus-Tiermodell nach Ischämie mittels Gefäßverschluss und darauffolgender 2-stündiger moderater Hypothermie ($30\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$) zu einer Erhöhung der CIRP-Transkripte in Gewebeproben der Gehirne.¹²⁴ Sie stellten darüber hinaus fest, dass eine vorangegangene Ischämie die Induktion von CIRP durch moderate Hypothermie verzögert. Insgesamt sprechen die Daten dafür, dass CIRP durch postischämische milde oder moderate Hypothermie induziert wird, dabei scheint jedoch die Höhe und Kinetik dieser Regulation von der Ischämie bzw. Hypoxie beeinflusst zu werden. Schwere oder milde Hypoxie für 24 Stunden hatte keinen Einfluss auf die Regulation von CIRP in unserem Zellkulturmodell. Wie bereits für RBM3 beschrieben, konnten Wellmann et al. auch eine Induktion von CIRP nach 24-stündiger milder (8 % O₂) oder schwerer Hypoxie (1 % O₂) in Hepatozyten, Epithelzellen und lymphatischen Zellen zeigen.⁸⁴ Sie entzogen den Zellen zusätzlich Glucose während der Hypoxie, so dass möglicherweise nur die Kombination von Sauerstoff- und Substratentzug und nicht eine Hypoxie allein die Regulation von CIRP beeinflusst. In dem zuvor beschriebenen

Tiermodell von Liu et al. kam es 24 Stunden postischämisch ebenfalls zu einer signifikanten Erhöhung der CIRP-mRNA-Expression.¹²⁴ Zhou et al. untersuchten auch die CIRP-Regulation nach Ischämie durch Gefäßverschluss in einem Maus-Tiermodell und kamen zu einem ähnlichen Ergebnis: die CIRP-Gen- und Proteinexpression war 30 und 48 Stunden postischämisch erhöht.¹⁰⁴ Darüber hinaus konnten sie eine Erhöhung von CIRP-Transkripten und -Protein in murinen BV-2-Mikrogliazellen nach einer 20- bzw. 30-stündigen Hypoxie (1 % O₂) ohne zusätzlichen Glucoseentzug sehen. Dem gegenüber stehen die Ergebnisse der Studien von Xue et al. und De Leeuw et al. Xue et al. untersuchten die CIRP-mRNA-Expression in einem Ratten-Tiermodell nach einer Ischämie durch Gefäßverschluss.¹²³ In Zellen aus dem Cortex der Tiere kam es 3 und 6 Stunden nach der Ischämie zu keiner veränderten Expression von CIRP-mRNA, in Zellen des Hippocampus sogar zu einer verminderten Expression. In den Versuchen von De Leeuw et al. hatte oxidativer Stress, wie er bei einer hypoxischen Schädigung typisch ist, keinen Einfluss auf die CIRP-Expression in verschiedenen nicht-neuronalen Zelllinien, dafür beobachteten sie eine Migration von CIRP in Stressgranula.¹²⁵ Zusammengefasst gibt es mehrere mögliche Erklärungen für die Differenzen in den Ergebnissen der verschiedenen Studien. Möglicherweise führt Hypoxie ohne zusätzlichen Substratentzug, wie es bei einer Ischämie der Fall ist, in Neuronen nicht zu einer vermehrten CIRP-Expression. Die Regulation von CIRP durch Hypoxie in Neuronen, ähnlich wie bei RBM3, könnte sich von der in nicht-neuronalen Gewebe unterscheiden. Eine andere mögliche Erklärung für die Differenzen wäre, dass es nur zu bestimmten Zeitpunkten und für einen begrenzten Zeitraum zu einer vermehrten CIRP-Expression nach Ischämie oder Hypoxie kommt. Diese Fragen lassen sich in unserem Zellkulturmodell nicht abschließend beantworten und müssen in zukünftigen Studien weiter untersucht werden.

5.5 Unterschiede in Primären Neuronen

Zur Validierung der in der Zellkultur mit humanen SK-N-SH-Zellen erzielten Ergebnisse und um Besonderheiten und Unterschiede des Einflusses von Hypoxie und moderater Hypothermie auf kortikale Neuronen in der Perinatalzeit zu untersuchen, wurden einige Experimente in einer Kultur aus primären murinen Neuronen wiederholt. Dabei wurde eine Schädigung der primären Neuronen mit milder Hypoxie (8 % O₂ für 24 Stunden) gewählt, in der Annahme, dass sie vulnerabler gegenüber einem Sauerstoffentzug seien als die zuvor verwendete Tumorzelllinie.

In der Tat konnte gezeigt werden, dass die primären Neurone durch milde Hypoxie verzögert durch einen Reoxygenierungsschaden geschädigt werden und eine erhöhte Zelltodrate haben, auch wenn die Daten bei hohen Standardabweichungen nicht signifikant waren. Posthypoxische TH für 24 oder 48 Stunden konnte diesen Schaden jedoch nicht reduzieren und hatte keinen protektiven Effekt. Im Gegensatz zu dem Kulturmedium der Zelllinien enthielt das Medium der primären Neurone das Ergänzungsmittel B27, das einen Antioxidanzien-Mix mit reduziertem Glutathion und Superoxid-Dismutase enthält. Die hypoxische Schädigung durch oxidativen Stress und die Produktion von ROS, vor allem während der Reoxygenierungsphase, ist daher vermutlich abgeschwächt und möglicherweise wurde der vermeintliche neuroprotektive Effekt von TH durch diesen zusätzlichen Schutz maskiert. Es war keine signifikante Erhöhung der RBM-mRNA-Expression durch milde Hypoxie zu sehen. TH für 24 Stunden und für 48 Stunden nach hypoxischer Schädigung führte zu einer signifikanten Induktion der RBM3-mRNA-Expression, wie schon zuvor in den Versuchen mit humanen SK-N-SH-Zellen zu beobachten war. Die temperaturabhängige Regulation von RBM3 konnte damit erneut gezeigt werden. Insgesamt bedarf es weiterer Experimente mit optimierten Methoden und höheren Fallzahlen in primären Neuronen, um die Fragestellungen dieser Arbeit und darüber hinaus unter Berücksichtigung der Besonderheiten von Neuronen in der Perinatalphase zu beantworten.

5.6 Limitationen des Zellkulturmodells

Die Versuche dieser Arbeit wurden zum Großteil in einem Zellkulturmodell aus humanen SK-N-SH-Zellen untersucht. Neben Vorteilen, die eine Zellkultur gegenüber einem *in vivo*-Modell hat, wie zum Beispiel kontrollierte Versuchsbedingungen und die Möglichkeit zur Verwendung humaner Gewebe, werden systemische Einflüsse oder organspezifische Aspekte nicht erfasst. Die Inflammationsreaktion, die in vielen Studien beschrieben und maßgeblich an der Schädigung durch Hypoxie beteiligt ist, wird im Zellkulturmodell durch das Fehlen von immunkompetenten Zellen nicht beachtet. Auch die Rolle von Gliazellen, die, wie in 1.2.2 beschrieben, in den zellulären Signalkaskaden bei Sauerstoffentzug und Reoxygenierung involviert sind und den Ionen- und Transmitterhaushalt von Neuronen in großem Maße beeinflussen, kann in unserem Zellkulturmodell nicht berücksichtigt werden. Weiterhin ist zu beachten, dass es sich bei den SK-N-SH um eine Neuroblastom-Tumorzelllinie handelt, die zwar viele Eigenschaften neuronaler Zellen besitzt und ein etabliertes Modell zur Untersuchung von Neurotoxizität ist,

jedoch auch wesentliche Unterschiede bezüglich Proliferation, Zelltod und Metabolismus, sowie Vulnerabilität bei Hypoxie im Vergleich zu nicht-tumorösen Neuronen aufweist.¹⁰⁵ In unseren Experimenten wurden Kühlungszeiten verwendet und Überlegungen untersucht, die sich auf Schädigung und Neuroprotektion bei perinataler Asphyxie beziehen. SK-N-SH-Zellen haben nicht die Eigenschaften von Neuronen in der Perinatalphase, so dass besondere Aspekte und Unterschiede in dieser Entwicklungsphase nicht berücksichtigt werden konnten. Aus diesem Grund wurden einige Versuche mit einer Zellkultur aus primären Neuronen wiederholt.

5.7 Schlussfolgerungen und Ausblick

Mit Hilfe des Zellkulturmodells mit humanen SK-N-SH konnte gezeigt werden, dass moderate Hypothermie nach schwerer Hypoxie neuronale Zellschädigungen abschwächen kann. Dieser neuroprotektive Effekt durch Herabsenkung der Temperatur wird klinisch zur Therapie der perinatalen Asphyxie bei Neugeborenen, sowie nach Kreislaufstillstand und erfolgreicher Reanimation bei Erwachsenen genutzt.^{2,11}

Die zellulären und molekularen Mechanismen, die therapeutischer moderater Hypothermie unterliegen, sind jedoch nicht vollständig untersucht und verstanden. In unserem Zellkulturmodell konnten wir eine temperaturabhängige Regulation der Kälteschockproteine RBM3 und teilweise CIRP auf Transkriptions- und Translationsebene zeigen. Sie könnten wichtige Schlüsselproteine in der zellulären Signalkaskade der Neuroprotektion durch moderate Hypothermie sein. Bisher liegen wenige Daten zur Regulation und Funktion dieser beiden Proteine vor. Weitere Experimente, zum Beispiel ein siRNA-knockout von RBM3 und CIRP, sollten die Rolle der Kälteschockproteine bei Kühlung untersuchen. Fraglich bleibt auch die genaue Regulation und Funktion von RBM3 und CIRP durch Hypoxie. In unseren Experimenten konnte keine Regulation der Kälteschockproteine durch milde oder schwere Hypoxie beobachtet werden und die Ergebnisse anderer Studien sind zum Teil uneinheitlich, so dass diese Frage nicht abschließend beantwortet werden kann und in weiteren Experimenten untersucht werden sollte, um die Funktion von RBM3 und CIRP vollständig zu verstehen. Insgesamt sollte auch in Zukunft die Grundlagenforschung wichtiger Bestandteil der Erforschung von therapeutischer Hypothermie sein. Neben zellulären und molekularen Mechanismen sind auch viele Fragen bezüglich der Zieltemperaturen und der Rolle der Wiedererwärmung nicht ausreichend untersucht und beantwortet. Therapeutische Hypothermie sollte darüber hinaus mit seinem

neuro- bzw. zellprotektiven Potential auch in anderen klinischen Fragestellungen und in experimentellen Studien als mögliches Behandlungskonzept Gegenstand der Forschung werden.

6 Literaturverzeichnis

1. Polderman KH, Herold I. Therapeutic hypothermia and controlled normothermia in the intensive care unit: practical considerations, side effects, and cooling methods. *Critical care medicine* 2009;37:1101-20.
2. H FAMRH. AWMF Leitlinie zur Behandlung der neonatalen Asphyxie unter besonderer Berücksichtigung der therapeutischen Hypothermie. In: Gesellschaft für Neonatologie und Pädiatrische Intensivmedizin AdMFeV, ed. AWMF-Register Nr 024/023. Düsseldorf, Germany: Arbeitsgemeinschaft der Medizinischen Fachgesellschaften e.V. (AWMF); 2013:42.
3. Jacobs SE, Berg M, Hunt R, Tarnow-Mordi WO, Inder TE, Davis PG. Cooling for newborns with hypoxic ischaemic encephalopathy. *The Cochrane database of systematic reviews* 2013;1:CD003311.
4. Pauliah SS, Shankaran S, Wade A, Cady EB, Thayyil S. Therapeutic hypothermia for neonatal encephalopathy in low- and middle-income countries: a systematic review and meta-analysis. *PloS one* 2013;8:e58834.
5. Gluckman PD, Wyatt JS, Azzopardi D, et al. Selective head cooling with mild systemic hypothermia after neonatal encephalopathy: multicentre randomised trial. *Lancet* 2005;365:663-70.
6. Azzopardi D, Brocklehurst P, Edwards D, et al. The TOBY Study. Whole body hypothermia for the treatment of perinatal asphyxial encephalopathy: a randomised controlled trial. *BMC pediatrics* 2008;8:17.
7. Shankaran S, Laptook AR, Ehrenkranz RA, et al. Whole-body hypothermia for neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy. *The New England journal of medicine* 2005;353:1574-84.
8. Simbruner G, Mittal RA, Rohlmann F, Mucic R. Systemic hypothermia after neonatal encephalopathy: outcomes of neo.nEURO.network RCT. *Pediatrics* 2010;126:e771-8.
9. Zhou WH, Cheng GQ, Shao XM, et al. Selective head cooling with mild systemic hypothermia after neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy: a multicenter randomized controlled trial in China. *The Journal of pediatrics* 2010;157:367-72, 72 e1-3.
10. Shankaran S, Pappas A, McDonald SA, et al. Childhood outcomes after hypothermia for neonatal encephalopathy. *The New England journal of medicine* 2012;366:2085-92.
11. Peberdy MA, Callaway CW, Neumar RW, et al. Part 9: post-cardiac arrest care: 2010 American Heart Association Guidelines for Cardiopulmonary Resuscitation and Emergency Cardiovascular Care. *Circulation* 2010;122:S768-86.
12. Bernard SA, Gray TW, Buist MD, et al. Treatment of comatose survivors of out-of-hospital cardiac arrest with induced hypothermia. *The New England journal of medicine* 2002;346:557-63.
13. Mild therapeutic hypothermia to improve the neurologic outcome after cardiac arrest. *The New England journal of medicine* 2002;346:549-56.
14. Nielsen N, Wetterslev J, Cronberg T, et al. Targeted temperature management at 33 degrees C versus 36 degrees C after cardiac arrest. *The New England journal of medicine* 2013;369:2197-206.
15. Kleinman ME, Chameides L, Schexnayder SM, et al. Pediatric advanced life support: 2010 American Heart Association Guidelines for Cardiopulmonary Resuscitation and Emergency Cardiovascular Care. *Pediatrics* 2010;126:e1361-99.
16. Doherty DR, Parshuram CS, Gaboury I, et al. Hypothermia therapy after pediatric cardiac arrest. *Circulation* 2009;119:1492-500.
17. Fink EL, Clark RS, Kochanek PM, Bell MJ, Watson RS. A tertiary care center's experience with therapeutic hypothermia after pediatric cardiac arrest. *Pediatric critical care*

- medicine : a journal of the Society of Critical Care Medicine and the World Federation of Pediatric Intensive and Critical Care Societies 2010;11:66-74.
18. Moler FW, Silverstein FS, Holubkov R, et al. Therapeutic hypothermia after out-of-hospital cardiac arrest in children. *The New England journal of medicine* 2015;372:1898-908.
 19. Perman SM, Goyal M, Neumar RW, Topjian AA, Galeski DF. Clinical applications of targeted temperature management. *Chest* 2014;145:386-93.
 20. Clifton GL, Valadka A, Zygun D, et al. Very early hypothermia induction in patients with severe brain injury (the National Acute Brain Injury Study: Hypothermia II): a randomised trial. *Lancet neurology* 2011;10:131-9.
 21. Guluma KZ, Hemmen TM, Olsen SE, Rapp KS, Lyden PD. A trial of therapeutic hypothermia via endovascular approach in awake patients with acute ischemic stroke: methodology. *Academic emergency medicine : official journal of the Society for Academic Emergency Medicine* 2006;13:820-7.
 22. De Keyser J, Uyttenboogaart M, Koch MW, et al. Neuroprotection in acute ischemic stroke. *Acta neurologica Belgica* 2005;105:144-8.
 23. Lawn JE, Cousens S, Zupan J. 4 million neonatal deaths: when? Where? Why? *Lancet* 2005;365:891-900.
 24. Kurinczuk JJ, White-Koning M, Badawi N. Epidemiology of neonatal encephalopathy and hypoxic-ischaemic encephalopathy. *Early human development* 2010;86:329-38.
 25. Badawi N, Kurinczuk JJ, Keogh JM, et al. Intrapartum risk factors for newborn encephalopathy: the Western Australian case-control study. *BMJ (Clinical research ed)* 1998;317:1554-8.
 26. Neonatal encephalopathy and cerebral palsy: executive summary. *Obstetrics and gynecology* 2004;103:780-1.
 27. Carter BS, Haverkamp AD, Merenstein GB. The definition of acute perinatal asphyxia. *Clinics in perinatology* 1993;20:287-304.
 28. Gilstrap LC, 3rd, Leveno KJ, Burris J, Williams ML, Little BB. Diagnosis of birth asphyxia on the basis of fetal pH, Apgar score, and newborn cerebral dysfunction. *American journal of obstetrics and gynecology* 1989;161:825-30.
 29. Badawi N, Kurinczuk JJ, Keogh JM, et al. Antepartum risk factors for newborn encephalopathy: the Western Australian case-control study. *BMJ (Clinical research ed)* 1998;317:1549-53.
 30. Sarnat HB, Sarnat MS. Neonatal encephalopathy following fetal distress. A clinical and electroencephalographic study. *Archives of neurology* 1976;33:696-705.
 31. Vannucci RC. Current and potentially new management strategies for perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Pediatrics* 1990;85:961-8.
 32. Freeman JM, Nelson KB. Intrapartum asphyxia and cerebral palsy. *Pediatrics* 1988;82:240-9.
 33. Maneru C, Junque C, Botet F, Tallada M, Guardia J. Neuropsychological long-term sequelae of perinatal asphyxia. *Brain injury : [BI]* 2001;15:1029-39.
 34. Odd DE, Lewis G, Whitelaw A, Gunnell D. Resuscitation at birth and cognition at 8 years of age: a cohort study. *Lancet* 2009;373:1615-22.
 35. Seidl R, Stockler-Ipsiroglu S, Rolinski B, et al. Energy metabolism in graded perinatal asphyxia of the rat. *Life sciences* 2000;67:421-35.
 36. Chen Y, Engidawork E, Loidl F, et al. Short- and long-term effects of perinatal asphyxia on monoamine, amino acid and glycolysis product levels measured in the basal ganglia of the rat. *Brain research Developmental brain research* 1997;104:19-30.
 37. Engidawork E, Chen Y, Dell'Anna E, et al. Effect of perinatal asphyxia on systemic and intracerebral pH and glycolysis metabolism in the rat. *Experimental neurology* 1997;145:390-6.

38. Ikeda T, Choi BH, Yee S, Murata Y, Quilligan EJ. Oxidative stress, brain white matter damage and intrauterine asphyxia in fetal lambs. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience* 1999;17:1-14.
39. Taylor DL, Edwards AD, Mehmet H. Oxidative metabolism, apoptosis and perinatal brain injury. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)* 1999;9:93-117.
40. Bak LK, Schousboe A, Sonnewald U, Waagepetersen HS. Glucose is necessary to maintain neurotransmitter homeostasis during synaptic activity in cultured glutamatergic neurons. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 2006;26:1285-97.
41. Won SJ, Kim DY, Gwag BJ. Cellular and molecular pathways of ischemic neuronal death. *Journal of biochemistry and molecular biology* 2002;35:67-86.
42. Northington FJ, Ferriero DM, Graham EM, Traystman RJ, Martin LJ. Early Neurodegeneration after Hypoxia-Ischemia in Neonatal Rat Is Necrosis while Delayed Neuronal Death Is Apoptosis. *Neurobiology of disease* 2001;8:207-19.
43. Johnston MV, Fatemi A, Wilson MA, Northington F. Treatment advances in neonatal neuroprotection and neurointensive care. *Lancet neurology* 2011;10:372-82.
44. Hope PL, Costello AM, Cady EB, et al. Cerebral energy metabolism studied with phosphorus NMR spectroscopy in normal and birth-asphyxiated infants. *Lancet* 1984;2:366-70.
45. Hope PL, Reynolds EO. Investigation of cerebral energy metabolism in newborn infants by phosphorus nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Clinics in perinatology* 1985;12:261-75.
46. Cross JL, Meloni BP, Bakker AJ, Lee S, Knuckey NW. Modes of Neuronal Calcium Entry and Homeostasis following Cerebral Ischemia. *Stroke research and treatment* 2010;2010:316862.
47. McDonald JW, Johnston MV. Physiological and pathophysiological roles of excitatory amino acids during central nervous system development. *Brain research Brain research reviews* 1990;15:41-70.
48. Blomgren K, Hagberg H. Free radicals, mitochondria, and hypoxia-ischemia in the developing brain. *Free radical biology & medicine* 2006;40:388-97.
49. Rousset CI, Baburamani AA, Thornton C, Hagberg H. Mitochondria and perinatal brain injury. *The journal of maternal-fetal & neonatal medicine : the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstet* 2012;25 Suppl 1:35-8.
50. Hagberg H, Mallard C, Rousset CI, Xiaoyang W. Apoptotic mechanisms in the immature brain: involvement of mitochondria. *Journal of child neurology* 2009;24:1141-6.
51. Graham EM, Sheldon RA, Flock DL, et al. Neonatal mice lacking functional Fas death receptors are resistant to hypoxic-ischemic brain injury. *Neurobiology of disease* 2004;17:89-98.
52. Span PN, Bussink J. Biology of hypoxia. *Seminars in nuclear medicine* 2015;45:101-9.
53. Harris AL. Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nature reviews Cancer* 2002;2:38-47.
54. Thomlinson RH, Gray LH. The histological structure of some human lung cancers and the possible implications for radiotherapy. *British journal of cancer* 1955;9:539-49.
55. Brown JM. Evidence for acutely hypoxic cells in mouse tumours, and a possible mechanism of reoxygenation. *The British journal of radiology* 1979;52:650-6.
56. Ellingsen C, Ovrebo KM, Galappathi K, Mathiesen B, Rofstad EK. pO(2) fluctuation pattern and cycling hypoxia in human cervical carcinoma and melanoma xenografts. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 2012;83:1317-23.
57. Palazon A, Goldrath AW, Nizet V, Johnson RS. HIF transcription factors, inflammation, and immunity. *Immunity* 2014;41:518-28.

58. Rademakers SE, Span PN, Kaanders JH, Sweep FC, van der Kogel AJ, Bussink J. Molecular aspects of tumour hypoxia. *Molecular oncology* 2008;2:41-53.
59. Seimiya H, Tanji M, Oh-hara T, Tomida A, Naasani I, Tsuruo T. Hypoxia up-regulates telomerase activity via mitogen-activated protein kinase signaling in human solid tumor cells. *Biochemical and biophysical research communications* 1999;260:365-70.
60. Yuan J, Narayanan L, Rockwell S, Glazer PM. Diminished DNA repair and elevated mutagenesis in mammalian cells exposed to hypoxia and low pH. *Cancer research* 2000;60:4372-6.
61. Sugawara T, Fujimura M, Noshita N, et al. Neuronal death/survival signaling pathways in cerebral ischemia. *NeuroRx : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 2004;1:17-25.
62. Polderman KH. Mechanisms of action, physiological effects, and complications of hypothermia. *Critical care medicine* 2009;37:S186-202.
63. Gunn AJ, Thoresen M. Hypothermic neuroprotection. *NeuroRx : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 2006;3:154-69.
64. Hagerdal M, Harp J, Nilsson L, Siesjo BK. The effect of induced hypothermia upon oxygen consumption in the rat brain. *Journal of neurochemistry* 1975;24:311-6.
65. Laptook AR, Corbett RJ, Sterett R, Garcia D, Tollefsbol G. Quantitative relationship between brain temperature and energy utilization rate measured in vivo using ³¹P and ¹H magnetic resonance spectroscopy. *Pediatric research* 1995;38:919-25.
66. Ehrlich MP, McCullough JN, Zhang N, et al. Effect of hypothermia on cerebral blood flow and metabolism in the pig. *The Annals of thoracic surgery* 2002;73:191-7.
67. Thoresen M, Penrice J, Lorek A, et al. Mild hypothermia after severe transient hypoxia-ischemia ameliorates delayed cerebral energy failure in the newborn piglet. *Pediatric research* 1995;37:667-70.
68. Jiang JY, Liang YM, Luo QZ, Zhu C. Effect of mild hypothermia on brain dialysate lactate after fluid percussion brain injury in rodents. *Neurosurgery* 2004;54:713-7; discussion 7-8.
69. Bruno VM, Goldberg MP, Dugan LL, Giffard RG, Choi DW. Neuroprotective effect of hypothermia in cortical cultures exposed to oxygen-glucose deprivation or excitatory amino acids. *Journal of neurochemistry* 1994;63:1398-406.
70. Thoresen M, Satas S, Puka-Sundvall M, et al. Post-hypoxic hypothermia reduces cerebrocortical release of NO and excitotoxins. *Neuroreport* 1997;8:3359-62.
71. Globus MY, Busto R, Lin B, Schnippering H, Ginsberg MD. Detection of free radical activity during transient global ischemia and recirculation: effects of intranscemic brain temperature modulation. *Journal of neurochemistry* 1995;65:1250-6.
72. Zhao H, Wang JQ, Shimohata T, et al. Conditions of protection by hypothermia and effects on apoptotic pathways in a rat model of permanent middle cerebral artery occlusion. *Journal of neurosurgery* 2007;107:636-41.
73. Gonzalez-Ibarra FP, Varon J, Lopez-Meza EG. Therapeutic hypothermia: critical review of the molecular mechanisms of action. *Frontiers in neurology* 2011;2:4.
74. Xu L, Yenari MA, Steinberg GK, Giffard RG. Mild hypothermia reduces apoptosis of mouse neurons in vitro early in the cascade. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 2002;22:21-8.
75. Bossenmeyer-Pourie C, Koziel V, Daval JL. Effects of hypothermia on hypoxia-induced apoptosis in cultured neurons from developing rat forebrain: comparison with preconditioning. *Pediatric research* 2000;47:385-91.
76. Bargonetti J, Manfredi JJ. Multiple roles of the tumor suppressor p53. *Current opinion in oncology* 2002;14:86-91.

77. Xiong M, Yang Y, Chen GQ, Zhou WH. Post-ischemic hypothermia for 24h in P7 rats rescues hippocampal neuron: association with decreased astrocyte activation and inflammatory cytokine expression. *Brain research bulletin* 2009;79:351-7.
78. Diestel A, Troeller S, Billecke N, Sauer IM, Berger F, Schmitt KR. Mechanisms of hypothermia-induced cell protection mediated by microglial cells in vitro. *The European journal of neuroscience* 2010;31:779-87.
79. Kimura A, Sakurada S, Ohkuni H, Todome Y, Kurata K. Moderate hypothermia delays proinflammatory cytokine production of human peripheral blood mononuclear cells. *Critical care medicine* 2002;30:1499-502.
80. Leonart ME. A new generation of proto-oncogenes: cold-inducible RNA binding proteins. *Biochimica et biophysica acta* 2010;1805:43-52.
81. Derry JM, Kerns JA, Francke U. RBM3, a novel human gene in Xp11.23 with a putative RNA-binding domain. *Human molecular genetics* 1995;4:2307-11.
82. Sutherland LC, Rintala-Maki ND, White RD, Morin CD. RNA binding motif (RBM) proteins: a novel family of apoptosis modulators? *Journal of cellular biochemistry* 2005;94:5-24.
83. Danno S, Nishiyama H, Higashitsuji H, et al. Increased transcript level of RBM3, a member of the glycine-rich RNA-binding protein family, in human cells in response to cold stress. *Biochemical and biophysical research communications* 1997;236:804-7.
84. Wellmann S, Buhner C, Moderegger E, et al. Oxygen-regulated expression of the RNA-binding proteins RBM3 and CIRP by a HIF-1-independent mechanism. *Journal of cell science* 2004;117:1785-94.
85. Dresios J, Aschrafi A, Owens GC, Vanderklish PW, Edelman GM, Mauro VP. Cold stress-induced protein Rbm3 binds 60S ribosomal subunits, alters microRNA levels, and enhances global protein synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005;102:1865-70.
86. Smart F, Aschrafi A, Atkins A, et al. Two isoforms of the cold-inducible mRNA-binding protein RBM3 localize to dendrites and promote translation. *Journal of neurochemistry* 2007;101:1367-79.
87. Pilotte J, Cunningham BA, Edelman GM, Vanderklish PW. Developmentally regulated expression of the cold-inducible RNA-binding motif protein 3 in euthermic rat brain. *Brain research* 2009;1258:12-24.
88. Chip S, Zelmer A, Ogunshola OO, et al. The RNA-binding protein RBM3 is involved in hypothermia induced neuroprotection. *Neurobiology of disease* 2011;43:388-96.
89. Wellmann S, Truss M, Bruder E, et al. The RNA-binding protein RBM3 is required for cell proliferation and protects against serum deprivation-induced cell death. *Pediatric research* 2010;67:35-41.
90. Kita H, Carmichael J, Swartz J, et al. Modulation of polyglutamine-induced cell death by genes identified by expression profiling. *Human molecular genetics* 2002;11:2279-87.
91. Zhao W, Xu D, Cai G, et al. Spatiotemporal Pattern of RNA-Binding Motif Protein 3 Expression After Spinal Cord Injury in Rats. *Cellular and molecular neurobiology* 2014;34:491-9.
92. Liu Y, Hu W, Murakawa Y, et al. Cold-induced RNA-binding proteins regulate circadian gene expression by controlling alternative polyadenylation. *Scientific reports* 2013;3:2054.
93. Zeng Y, Kulkarni P, Inoue T, Getzenberg RH. Down-regulating cold shock protein genes impairs cancer cell survival and enhances chemosensitivity. *Journal of cellular biochemistry* 2009;107:179-88.
94. Sureban SM, Ramalingam S, Natarajan G, et al. Translation regulatory factor RBM3 is a proto-oncogene that prevents mitotic catastrophe. *Oncogene* 2008;27:4544-56.

95. Jogi A, Brennan DJ, Ryden L, et al. Nuclear expression of the RNA-binding protein RBM3 is associated with an improved clinical outcome in breast cancer. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 2009;22:1564-74.
96. Ehlen A, Brennan DJ, Nodin B, et al. Expression of the RNA-binding protein RBM3 is associated with a favourable prognosis and cisplatin sensitivity in epithelial ovarian cancer. *Journal of translational medicine* 2010;8:78.
97. Jonsson L, Bergman J, Nodin B, et al. Low RBM3 protein expression correlates with tumour progression and poor prognosis in malignant melanoma: an analysis of 215 cases from the Malmo Diet and Cancer Study. *Journal of translational medicine* 2011;9:114.
98. Sheikh MS, Carrier F, Papathanasiou MA, et al. Identification of several human homologs of hamster DNA damage-inducible transcripts. Cloning and characterization of a novel UV-inducible cDNA that codes for a putative RNA-binding protein. *The Journal of biological chemistry* 1997;272:26720-6.
99. Nishiyama H, Itoh K, Kaneko Y, Kishishita M, Yoshida O, Fujita J. A glycine-rich RNA-binding protein mediating cold-inducible suppression of mammalian cell growth. *The Journal of cell biology* 1997;137:899-908.
100. Tong G, Endersfelder S, Rosenthal LM, et al. Effects of moderate and deep hypothermia on RNA-binding proteins RBM3 and CIRP expressions in murine hippocampal brain slices. *Brain research* 2013;1504:74-84.
101. Sakurai T, Itoh K, Higashitsuji H, et al. Cirp protects against tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis via activation of extracellular signal-regulated kinase. *Biochimica et biophysica acta* 2006;1763:290-5.
102. Saito K, Fukuda N, Matsumoto T, et al. Moderate low temperature preserves the stemness of neural stem cells and suppresses apoptosis of the cells via activation of the cold-inducible RNA binding protein. *Brain research* 2010;1358:20-9.
103. Qiang X, Yang WL, Wu R, et al. Cold-inducible RNA-binding protein (CIRP) triggers inflammatory responses in hemorrhagic shock and sepsis. *Nature medicine* 2013;19:1489-95.
104. Zhou M, Yang WL, Ji Y, Qiang X, Wang P. Cold-inducible RNA-binding protein mediates neuroinflammation in cerebral ischemia. *Biochimica et biophysica acta* 2014;1840:2253-61.
105. Biedler JL, Helson L, Spengler BA. Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer research* 1973;33:2643-52.
106. Kaech S, Banker G. Culturing hippocampal neurons. *Nature protocols* 2006;1:2406-15.
107. Berridge MV, Herst PM, Tan AS. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnology annual review* 2005;11:127-52.
108. Antonic A, Dottori M, Leung J, et al. Hypothermia protects human neurons. *International journal of stroke : official journal of the International Stroke Society* 2014;9:544-52.
109. Lehane C, Guelzow T, Zenker S, et al. Carbimazole is an inhibitor of protein synthesis and protects from neuronal hypoxic damage in vitro. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 2013;347:781-93.
110. Khaspekov LG, Lyzhin AA, Victorov IV, Dupin AM, Erin AN. Hypoxic and posthypoxic neuronal injury in hippocampal cell culture: attenuation by lipophylic antioxidant U-18 and superoxide dismutase. *The International journal of neuroscience* 1995;82:33-45.
111. Hua Y, Hisano K, Morimoto Y. Effect of mild and moderate hypothermia on hypoxic injury in nearly pure neuronal culture. *Journal of anesthesia* 2010;24:726-32.
112. Parmar J, Jones NM. Hypoxic preconditioning can reduce injury-induced inflammatory processes in the neonatal rat brain. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience* 2015;43:35-42.

113. Takada SH, dos Santos Haemmerle CA, Motta-Teixeira LC, et al. Neonatal anoxia in rats: hippocampal cellular and subcellular changes related to cell death and spatial memory. *Neuroscience* 2015;284:247-59.
114. Wang JY, Shum AY, Wang JY. Hypoxia/reoxygenation induces cell injury via different mechanisms in cultured rat cortical neurons and glial cells. *Neuroscience letters* 2002;322:187-91.
115. Pedersen SF, O'Donnell ME, Anderson SE, Cala PM. Physiology and pathophysiology of Na⁺/H⁺ exchange and Na⁺ -K⁺ -2Cl⁻ cotransport in the heart, brain, and blood. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 2006;291:R1-25.
116. Song M, Yu SP. Ionic regulation of cell volume changes and cell death after ischemic stroke. *Translational stroke research* 2014;5:17-27.
117. McManus ML, Strange K. Acute volume regulation of brain cells in response to hypertonic challenge. *Anesthesiology* 1993;78:1132-7.
118. Eriksson PS, Nilsson M, Wagberg M, Ronnback L, Hansson E. Volume regulation of single astroglial cells in primary culture. *Neuroscience letters* 1992;143:195-9.
119. Andrew RD, Lobinowich ME, Osehobo EP. Evidence against volume regulation by cortical brain cells during acute osmotic stress. *Experimental neurology* 1997;143:300-12.
120. Trollmann R, Rehrauer H, Schneider C, et al. Late-gestational systemic hypoxia leads to a similar early gene response in mouse placenta and developing brain. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 2010;299:R1489-99.
121. Peretti D, Bastide A, Radford H, et al. RBM3 mediates structural plasticity and protective effects of cooling in neurodegeneration. *Nature* 2015;518:236-9.
122. Nishiyama H, Higashitsuji H, Yokoi H, et al. Cloning and characterization of human CIRP (cold-inducible RNA-binding protein) cDNA and chromosomal assignment of the gene. *Gene* 1997;204:115-20.
123. Xue JH, Nonoguchi K, Fukumoto M, et al. Effects of ischemia and H₂O₂ on the cold stress protein CIRP expression in rat neuronal cells. *Free radical biology & medicine* 1999;27:1238-44.
124. Liu A, Zhang Z, Li A, Xue J. Effects of hypothermia and cerebral ischemia on cold-inducible RNA-binding protein mRNA expression in rat brain. *Brain research* 2010;1347:104-10.
125. De Leeuw F, Zhang T, Wauquier C, Huez G, Kruys V, Gueydan C. The cold-inducible RNA-binding protein migrates from the nucleus to cytoplasmic stress granules by a methylation-dependent mechanism and acts as a translational repressor. *Experimental cell research* 2007;313:4130-44.

7 Lebenslauf

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

8 Publikationsliste

Originalarbeiten als Erst- oder Koautorin

Tong G, Endesfelder S, **Rosenthal LM**, Wollersheim S, Sauer IM, Bühner C, Berger F, Schmitt KR

Effects of moderate and deep hypothermia on RNA-binding proteins RBM3 and CIRP expressions in murine hippocampal brain slices. *Brain Research* 2013 Apr 4; 1504:74-84

Posterpräsentationen mit Abstract-Veröffentlichungen

Rosenthal LM, Tong G, Berger F, Schmitt KR

Hypothermia after hypoxia is neuroprotective possibly via upregulation of cold shock proteins CIRP and RBM3, *46th Annual Meeting of the Association for European Pediatric and Congenital Cardiology, Istanbul Türkei, Mai 2012*

Rosenthal LM, Tong G, Endesfelder S, Berger F, Schmitt KR

Hypothermia after ischemic insults in transplant surgery is cytoprotective possibly via upregulation of cold shock protein RBM3. *24th International Congress of the Transplantation Society, Berlin Juli 2012*

Rosenthal LM

Hypothermia after hypoxia is neuroprotective possibly via upregulation of cold shock protein RBM3. *European Society for Artificial Organs, Rostock Dezember 2012*

Tong G, **Rosenthal LM**

Mild therapeutic hypothermia after hypoxia is neuroprotective possibly via upregulation of cold shock protein RBM3. *Cardiovascular Research Day 2014, Cortina Italien, Januar 2014*

9 Eidesstattliche Versicherung

Ich, Lisa-Maria Rosenthal, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Regulation von Kälteschockproteinen nach moderater Hypothermie zur Neuroprotektion nach Hypoxie: ein Zellkulturmodell mit neuronalen Zellen“ 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.“

Datum

Unterschrift

Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Lisa-Maria Rosenthal hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: Tong G, Endesfelder S, Rosenthal LM, Wollersheim S, Sauer IM, Bühler C, Berger F, Schmitt KR, Effects of moderate and deep hypothermia on RNA-binding proteins RBM3 and CIRP expressions in murine hippocampal brain slices. , Brain Research, 2013

Beitrag im Einzelnen (bitte kurz ausführen): Praktische Durchführung und Auswertung von Teilen der Experimente.

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

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

10 Danksagung

Zum Abschluss dieser Arbeit gilt mein besonderer Dank:

Meiner Doktormutter PD Dr. med. Katharina Schmitt für die außerordentlich gute Betreuung und kontinuierliche Unterstützung während der gesamten Zeit im Labor und bei der Fertigstellung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. med. Felix Berger für die Überlassung des interessanten Themas und die wertvollen inhaltlichen Anmerkungen und Ideen in den gemeinsamen Laborbesprechungen.

Herrn Prof. Dr. med. Christoph Bühner und Dr. Stefanie Endesfelder für die Nutzung der Laborräume und der Hypoxiekammer.

Giang Tong, PhD für das Teilen seiner Erfahrung bei der Planung, Durchführung und Auswertung dieser Arbeit, sowie für die viele konstruktive Diskussionen.

Anke Jurisch und Nora Ebermann für die Einarbeitung in das laborexperimentelle Arbeiten und die tatkräftige Unterstützung bei zahlreichen Versuchen.

Den medizinischen Doktoranden Annemarie Krauss, Johannes Mochner, Sonja Wollersheim und Christoph Walker für die gemeinsamen lustigen Stunden im Labor, sowie die unermüdliche Diskussions- und Hilfsbereitschaft.

Meiner Familie, meinen Freunden und meinem Freund Richard Steinberg, die mir stets zur Seite gestanden haben.