

Aus der Klinik für Angeborene Herzfehler / Kinderkardiologie
Deutsches Herzzentrum Berlin

DISSERTATION

Hypothermie zur Neuroprotektion nach hypoxisch-ischämischer Schädigung
durch Regulation des Kälteschockproteins RBM3:
Eine Zellkulturstudie mit neuronalen Zellen

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Maria Feldmann

aus Arnsberg

Datum der Promotion: 22.09.2017

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

I. Abkürzungsverzeichnis	7
II. Abbildungsverzeichnis.....	10
III. Kurzzusammenfassung	11
IV. Abstract.....	13
1 Einleitung.....	15
1.1 Herzkreislaufstillstand bei Kindern	15
1.2 Mechanismen hypoxisch-ischämischer Hirnschädigung.....	16
1.3 Die duale Rolle der Mikrogliazellen in hypoxisch-ischämischer Hirnschädigung	19
1.4 Therapeutische Hypothermie	20
1.4.1 Anwendung der therapeutischen Hypothermie nach Herzkreislaufstillstand.....	20
1.4.2 Neuroprotektive Mechanismen der therapeutischen Hypothermie in hypoxisch-ischämischer Hirnschädigung	21
1.5 Das Kälteschockprotein RBM3	23
1.6 Pharmakologische Neuroprotektion	25
1.6.1 [D-Ala2, D-Leu5] Enkephalin (DADLE).....	25
1.6.2 WIN-55,212-2.....	27
1.7 Ziel der Arbeit.....	29
2 Material.....	30
2.1 Geräte.....	30
2.2 Chemikalien	31
2.3 Zellkulturmaterialien	32
2.3.1 Zellkultur allgemein.....	32
2.3.2 HT-22/BV-2 Co-Kultur	33

2.3.3	Primäre Neurone	34
2.4	Antikörper	35
2.5	Quantitative RT-PCR.....	35
2.6	Software	35
3	Methoden	36
3.1	Zellkultur mit Zelllinien	36
3.1.1	HT-22 Neurone	36
3.1.2	BV-2 Mikrogliazellen	36
3.1.3	Direkte HT-22/BV-2 Co-Kultur	37
3.1.4	OGD/R und TH in der HT-22/BV-2 Co-Kultur	37
3.1.5	Phasenkontrastmikroskopie	38
3.1.6	Applikation von DADLE und WIN-55,212-2 in der HT-22/BV-2 Co-Kultur.....	39
3.2	Zellkultur mit primären hippocampalen und corticalen Neuronen.....	39
3.2.1	Präparation und Kultivierung	39
3.2.2	Fluoreszenzmikroskopie primärer Neurone	40
3.2.3	OGD/R und TH in primären hippocampalen und corticalen Neuronen	41
3.2.4	Applikation von DADLE in den primären hippocampalen und corticalen Neuronen	42
3.3	Analyse der Genexpression	43
3.3.1	Isolierung und Aufreinigung von Protein und RNA.....	43
3.3.2	Bestimmung der RNA-Konzentration	43
3.3.3	Reverse Transkription.....	43
3.3.4	Quantitative RT-PCR.....	44
3.4	Analyse der Proteinexpression	45
3.4.1	SDS-PAGE	45
3.4.2	Western Blot	45
3.5	Zytotoxizitätsassay	47
3.6	Statistische Analyse	48
4	Ergebnisse	49
4.1	Direkte HT-22/BV-2 Co-Kultur	49

4.1.1	Eine 6-stündige Schädigung durch OGD resultiert in signifikant mehr Zelltod als durch alleinigen Glukoseentzug.....	49
4.1.2	TH schützt vor dem Schaden durch OGD/R	50
4.1.3	OGD/R führt zur Migration der BV-2 Zellen in Richtung der HT-22 Zellen	51
4.1.4	Konzentrationsreihen von DADLE und WIN-55,212-2.....	52
4.1.5	DADLE und WIN-55,212-2 führen tendenziell zu einer reversiblen Suppression der Proteinexpression von RBM3.....	53
4.1.6	10 nM DADLE wirken ebenso protektiv wie TH gegen den Schaden nach OGD/R; WIN-55,212-2 zeigt weder einen alleinigen noch additiv protektiven Effekt in Kombination mit TH.....	54
4.1.7	TH führt mit und ohne DADLE zu einer Induktion der RBM3 Proteinexpression nach OGD/R.....	55
4.2	Primäre corticale und hippocampale Neurone.....	57
4.2.1	Reinheit und Morphologie der primären Neuronenkultur	57
4.2.2	Primäre corticale Neurone zeigen nur einen Schaden nach OGD/R; TH und DADLE sind nicht protektiv	57
4.2.3	Primäre hippocampale Neurone sind signifikant geschädigt nach OGD und OGD/R; die Kombination aus DADLE und TH ist protektiv.....	58
4.2.4	Die RBM3 mRNA Transkription in hippocampalen Neuronen nach OGD ist induziert infolge TH und TH plus DADLE	59
4.2.5	TH plus DADLE führt zu einer früheren Induktion der RBM3 Proteinexpression als TH allein in primären hippocampalen Neuronen unter OGD.....	60
5	Diskussion	61
5.1	Etablierung eines <i>in vitro</i> OGD/R-Schädigungsmodells.....	62
5.1.1	OGD/R-Schädigung in der HT-22/BV-2 Co-Kultur	62
5.1.2	OGD/R-Schädigung in primären Neuronen und selektive Vulnerabilität primärer hippocampaler und corticaler Neurone.....	63
5.2	Protektive Effekte therapeutischer Hypothermie.....	64
5.2.1	Effekte der TH auf Zellüberleben und Morphologie unter OGD/R in der HT-22/BV-2 Co-Kultur	64
5.2.2	Effekte der TH auf das Zellüberleben primärer hippocampaler Neurone unter OGD/R	66
5.3	Einfluss der TH auf die RBM3 Proteinexpression	67

5.3.1	Effekte der TH auf die RBM3 Proteinexpression in der HT-22/BV-2 Co-Kultur unter OGD/R	67
5.3.2	Effekte der TH auf die RBM3 Protein- und Genexpression in primären hippocampalen Neuronen unter OGD/R	68
5.4	DADLE in der HT-22/BV-2 Co-Kultur und den primären hippocampalen Neuronen.....	69
5.4.1	Protektive Effekte in der HT-22/BV-2 Co-Kultur	69
5.4.2	Effekte auf die RBM3 Proteinexpression in der HT-22/BV-2 Co Kultur	71
5.4.3	Protektive Effekte in primären hippocampalen Neuronen	72
5.4.4	Effekte auf die RBM3 Protein- und Genexpression in primären hippocampalen Neuronen	73
5.5	WIN-55,212-2 in der HT-22/BV-2 Co-Kultur	74
5.5.1	Protektive Effekte	74
5.5.2	Effekte auf die RBM3 Proteinexpression	75
5.6	Klinische Relevanz	76
5.7	Limitation der Arbeit	77
5.8	Schlussfolgerung und Ausblick	78
6	Bibliographie	80
7	Eidesstattliche Versicherung.....	96
8	Lebenslauf.....	97
9	Publikationsliste	99
10	Danksagung	100

I. Abkürzungsverzeichnis

AIF	Apoptose-induzierender Faktor
AMPA	<i>Alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid</i>
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
APAF-1	<i>Apoptotic protease-activating factor 1</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	Komplementäre DNA
CIRP	<i>Cold-inducible mRNA binding protein</i>
DADLE	[D-Ala ² , D-Leu ⁵] Enkephalin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DIV	<i>Days in vitro</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
FAM	6-Carboxyfluorescein
FBS	Fetales Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution

HIT	<i>Hibernation induction trigger</i>
IHCA	<i>In hospital cardiac arrest</i>
KA	<i>Kainic acid</i>
LDH	Laktatdehydrogenase
MEM	Minimal Essential Medium
METH	Methamphetamin
miRNA	Mikro-RNA
MOR	μ -Opioid-Rezeptor
mRNA	Boten-RNA
NBM	Neurobasal Medium
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NO	Stickstoffmonoxid
OGD	Oxygen-Glukose-Deprivation
OGD/R	Oxygen-Glukose-Deprivation/Reperfusion
OHCA	<i>Out of hospital cardiac arrest</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PBST	PBS mit 0,05 % Tween
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PLL	Poly-L-Lysin
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RBM3	<i>RNA binding motif protein 3</i>

RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT-qPCR	Quantitative Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
TAMRA	6- carboxy-tetramethylrhodamin
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TH	Therapeutische Hypothermie
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TRIS	Tri-Hydroxymethyl-Aminomethan
TRIS-HCL	Tri-Hydroxymethyl-Aminomethan-Salzsäure
TTM	<i>Targeted temperature management</i>
ZNS	Zentrales Nervensystem

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Zeit-Temperatur-Protokolls des OGD/R-Experimentes der HT-22/BV-2 Co-Kultur.....	38
Abbildung 2: Schematische Darstellung des Zeit-Temperatur-Protokolls des OGD/R-Experimentes primärer Neurone	42
Abbildung 3: LDH Freisetzung in der HT-22/BV-2 Co-Kultur nach 6-stündiger OGD im Vergleich zu Glukose-Deprivation	49
Abbildung 4: LDH Freisetzung in der HT-22/BV-2 Co-Kultur nach A) OGD nach 6 h und B) OGD/R nach 30 h.....	50
Abbildung 5: Einfluss des OGD/R-Experimentes auf die Morphologie der HT-22/BV-2 Co-Kultur	51
Abbildung 6: Toxizitätsprüfung für DADLE und WIN-55,212-2 mittels LDH Assay in der HT-22/BV-2 Co-Kultur	53
Abbildung 7: Regulation der RBM3 Proteinexpression durch DADLE und WIN-55,212-2 in der HT-22/BV-2 Co-Kultur	54
Abbildung 8: LDH Freisetzung in der HT-22/BV-2 Co-Kultur nach A) OGD nach 6 h und B) OGD/R nach 30 h unter Zusatz von 10 nM DADLE respektive 100 nM WIN-55,212-2	55
Abbildung 9: RBM3 Proteinexpressionslevel in der HT-22/BV-2 Co-Kultur nach A) OGD nach 6 h und B) OGD/R nach 30 h unter Zusatz von 10 nM DADLE respektive 100 nM WIN-55,212-2	56
Abbildung 10: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen primärer corticaler Neurone	57
Abbildung 11: LDH Freisetzung in primären corticalen Neuronen nach A) OGD nach 24 h und B) OGD/R nach 48 h unter Zusatz von 10 μ M DADLE	58
Abbildung 12: LDH Freisetzung in primären hippocampalen Neuronen nach A) OGD nach 24 h und B) OGD/R nach 48 h unter Zusatz von 10 μ M DADLE	59
Abbildung 13: RBM3 mRNA Expression in primären hippocampalen Neuronen nach A) OGD nach 24 h und B) OGD/R nach 48 h unter Zusatz von 10 μ M DADLE.....	60
Abbildung 14: RBM3 Proteinexpressionslevel in primären hippocampalen Neuronen nach A) OGD nach 24 h und B) OGD/R nach 48 h unter Zusatz von 10 μ M DADLE	61

III. Kurzzusammenfassung

Einleitung: Therapeutische Hypothermie (TH) ist die älteste etablierte Therapie zur Neuroprotektion im Rahmen einer hypoxisch-ischämischen Hirnschädigung. Ein genaueres Verständnis der Mechanismen der Neuroprotektion ist dringend erforderlich sowie Schlüssel zur Entwicklung alternativer oder synergistischer Therapien. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es die Effekte von TH in zwei in vitro Modellen, einer direkten Co-Kultur aus Neuronen und Mikrogliazellen und separaten Monokulturen aus primären hippocampalen und corticalen Neuronen, einer hypoxisch-ischämischen Hirnschädigung zu untersuchen. Insbesondere die Rolle von RBM3 soll betrachtet werden. Zusätzlich sollen die Wirkstoffe DADLE und WIN-55,212-2 auf ihre neuroprotektiven und synergistischen Effekte mit TH getestet werden.

Methoden: Die neuronalen HT-22 und mikroglialen BV-2 Zellen wurden in eine direkte Co-Kultur gebracht. Eine Oxygen-Glukose-Deprivation (OGD) und simulierte Reperfusion (OGD/R) wurden mittels einer 6-stündigen Inkubation in Mangelmedium bei 0,2% O₂ gefolgt von einer 24-stündigen Kultivierung in Vollmedium bei 21% O₂ induziert. Die Kulturen wurden in eine normotherme (37°C) und TH (33,5°C nach 3h OGD) Versuchsgruppe geteilt. DADLE und WIN-55,212-2 wurden jeweils für den 6-stündigen OGD-Zeitraum appliziert. Zelltod und RBM3 Proteinexpression wurden mittels LDH Assay und Western Blot untersucht. Die Ergebnisse wurde in murinen primären corticalen und hippocampalen Neuronenkulturen, die einer 24-stündigen OGD gefolgt von einer 24-stündigen OGD/R ausgesetzt wurden, wiederholt. DADLE wurde für den OGD Zeitraum appliziert, während die Kühlung für den gesamten Versuchszeitraum induziert wurde. Es wurde ebenfalls ein LDH Assay durchgeführt, sowie die RBM3 Gen- und Proteinexpression mittels RT-qPCR und Western Blot analysiert.

Ergebnisse: TH schützt die HT-22/BV-2 Co-Kultur vor einer Schädigung durch OGD/R, gemessen an der LDH Freisetzung der Zellen, wobei der Effekt mit einer Induktion der RBM3 Proteinexpression einhergeht. DADLE allein, sowie DADLE plus TH sind ebenfalls protektiv. Die alleinige Applikation von DADLE führt, im Gegensatz zur Kombination mit TH nicht zu einer Zunahme der RBM3 Proteinexpression. WIN-55,212-2 reduziert nur in Kombination mit TH den Zelltod, wobei der Effekt den der alleinigen TH nicht übersteigt und nicht mit einer Induktion des RBM3 Proteins einhergeht. In primären hippocampalen Neuronen schützt nur die Kombination

aus TH und DADLE vor der OGD/R Schädigung und ist mit einer früheren Translation der induzierten RBM3 mRNA in Protein assoziiert.

Schlussfolgerung: TH schützt neuronale Zellen vor Zelluntergang durch OGD/R und führt zu einer Induktion der RBM3 Gen- und Proteinexpression. Die Substanz DADLE zeigt ein potentes neuroprotektives Potential und ist mit RBM3-unabhängigen Mechanismen sowie einer früheren Translation der RBM3 mRNA assoziiert. WIN-55,212-2 ist nur in Kombination mit TH protektiv und supprimiert die Hypothermie-induzierte Hochregulation der RBM3 Proteinexpression.

IV. Abstract

Introduction: Therapeutic hypothermia (TH) is the oldest established therapy to attenuate hypoxic/ischemic brain injury. A better comprehension of the underlying mechanism is required and essential for the development of alternative and synergistic therapies. The aim of this study was to investigate the effects of TH in two different *in vitro* models, including a direct co-culture of neurons and microglia and separate mono-cultures of primary hippocampal and cortical neurons, exposed to simulated hypoxic/ischemic injury. Specifically, the role of the cold-shock protein RBM3 was examined. Furthermore, the neuroprotective potential of the substances DADLE and WIN-55,212-2 as well as their additive and synergistic effects with TH were evaluated.

Methods: A direct co-culture of HT-22 neuronal and BV-2 microglial cells was established to investigate oxygen-glucose deprivation (OGD) insult induced by exposure to 0.2% O₂ in a glucose-serum free medium for 6h followed by 24h of replenished nutrients and oxygen simulating resuscitation (OGD/R). Experimental groups were further divided into normothermic (37°C) and hypothermic (33.5°C cooling after 3h of OGD) groups. DADLE and WIN-55,212-2 were separately applied during OGD. Cell viability and RBM3 expression was quantified by LDH release and Western blotting, respectively. The experiments were repeated in embryonic mouse primary hippocampal and cortical neuron cultures exposed to OGD for 24h followed by additional 24h of OGD/R. DADLE was applied at experimental start for the duration of OGD, whereas cooling was performed throughout the whole experiment in the respective groups. LDH was quantified using a LDH assay and RBM3 gene and protein expressions were assessed by Western blotting and RT-qPCR, respectively.

Results: TH significantly reduced LDH release following OGD/R injury and is associated with an increase in RBM3 protein expression. Likewise, DADLE as well as the combination of DADLE and TH conferred cytoprotective effects. However, only the combinational application led to an upregulation of RBM3 expression. WIN-55,212-2 was only protective in combination with TH and suppressed the hypothermia-induced upregulation of RBM3. In primary hippocampal neurons,

only the combination of TH and DADLE was protective and led to an earlier translation of RBM3 mRNA into protein.

Conclusion: TH protects neuronal cells from hypoxic-ischemic brain injury with the effect possibly being mediated via an induction of RBM3 gene- and protein expression. DADLE has a potent neuroprotective potential and in combination with TH is associated with an earlier translation of RBM3 mRNA into protein. WIN-55,212-2 is only protective in combination with TH, although the hypothermia-induced RBM3 upregulation is suppressed.

A

1 Einleitung

1.1 Herzkreislaufstillstand bei Kindern

Ein Herzkreislaufstillstand mit anschließender kardiopulmonaler Reanimation außerhalb des Krankenhauses im Kindesalter ist mit einer Häufigkeit von 2–20/100 000 Kinder jährlich beschrieben^{1,2}. Hingegen erleiden etwa 100-mal mehr bereits hospitalisierte pädiatrische Patienten einen Herzkreislaufstillstand^{1,3}. Auf einer pädiatrischen Intensivstation betrifft es etwa 2–6 % der Kinder³.

Die Ätiologie des Herzkreislaufstillstandes bei Kindern unterscheidet sich klar von der Ätiologie bei Erwachsenen. Bei pädiatrischen Patienten ist das Ereignis in der Regel der terminale Zustand progredienter Hypoxie und Azidose infolge respiratorischen Versagens⁴. Zusätzlich spielen Schock, Trauma und plötzlicher Kindstod eine Rolle. In seltenen Fällen liegt primär eine kardiale oder neurologische Ursache zugrunde^{3,5}. Daher ist der Herzkreislaufstillstand bei Kindern als eigenständige Entität zu betrachten⁴. Zur genaueren Analyse der Epidemiologie und des Outcomes können der inner- (*In Hospital Cardiac Arrest*, IHCA) und außerklinische (*Out of Hospital Cardiac Arrest*, OHCA) Herzkreislaufstillstand unterschieden werdend⁶.

Bezüglich der Überlebensraten des IHCA wurden in den letzten zwei Dekaden bemerkenswerte Fortschritte gemacht⁷. Die Überlebensraten bei Kindern sind im Vergleich zu Erwachsenen nach einem Herzkreislaufstillstand deutlich besser^{2,3}. Im Gegensatz dazu zeigte sich die Inzidenz und Überlebensrate des OHCA von 2007 bis 2012 konstant, wie eine Analyse des nordamerikanischen ROC-Registers (*Resuscitation Outcomes Consortium*) von Fink et al. ergab⁶.

Die Langzeitfolgen aufgrund des einhergehenden hypoxisch-ischämischen Hirnschadens stellen darüber hinaus eine große individuelle, familiäre und gesellschaftliche Last dar^{8,9}. Dabei reicht das Spektrum der neurologischen Beeinträchtigung von milden Konzentrations- und Aufmerksamkeitsstörungen über globale kognitive Defizite bis hin zu schwerer Mehrfachbehinderung⁹⁻¹¹.

Es besteht intensiver Forschungsbedarf, um das Überleben und Outcome von Kindern nach Herzkreislaufstillstand, insbesondere OHCA, zu verbessern und effektive therapeutische Strategien zur Behandlung der hypoxisch-ischämischen Hirnschädigung zu etablieren. Der Hintergrund des OHCA stellt die klinische Motivation für diese Arbeit dar.

1.2 Mechanismen hypoxisch-ischämischer Hirnschädigung

Die Hirnschädigung nach Herzkreislaufstillstand ist ein Resultat des globalen zerebralen hypoxisch-ischämischen Ereignisses. Durch den Verlust der Pumpfunktion des Herzens im Rahmen des Herzkreislaufstillstandes kommt es zu einer akuten Minderperfusion des Gehirns mit sauerstoff- und substratreichem Blut und so zu einem hypoxisch-ischämischen Ereignis. Pathophysiologisch sind komplexe molekulare Kaskaden involviert, die durch die Hypoxie und Ischämie sowie Reperfusion getriggert werden und noch über Stunden bis Tage nach der erfolgreichen Reanimation fortgesetzt werden, sodass sie schließlich zum Untergang neuronaler Zellen führen können¹². Die zellulären und molekularen pathophysiologischen Mechanismen, wie Exzitotoxizität, Azidotoxizität, Verlust der Ionenhomöostase sowie oxidativer und nitritiver Stress, sind in ihrer Komplexität noch nicht vollständig verstanden. Die Relevanz der Mechanismen variiert zudem unter den beteiligten Zelltypen und Neuronenpopulationen^{13,14}.

Durch das Erliegen des zerebralen Blutflusses im Rahmen des Herzversagens kommt es zu einem Ausfall der kontinuierlichen Versorgung des Gehirns mit Sauerstoff und Glukose. Die Gehirnzellen haben einen hohen Verbrauch an Sauerstoff und Glukose und sind fast ausschließlich von der oxidativen Phosphorylierung abhängig¹⁵. In Folge des hypoxisch-ischämischen Ereignisses kommt es zunächst zur anaeroben Glykolyse und durch die Laktatakkumulation schließlich zur zellulären Azidose. Die oxidative Phosphorylierung stoppt im Verlauf gänzlich und die energiereichen Adenosintriphosphate (ATP) und Kreatinphosphate werden verbraucht. Dies führt zum Versagen der ATP-abhängigen Ionenpumpen, insbesondere der Na^+/K^+ -ATPase, und zum Verlust der empfindlichen Ionenhomöostase der Zellen. Das Membranpotential geht verloren und es kommt zu einer Depolarisation von Neuronen und Gliazellen¹⁵.

Ausgelöst durch die elektrische Erregung der Zellen wird Glutamat ausgeschüttet, ein im zentralen Nervensystem (ZNS) exprimierter exzitatorischer Neurotransmitter. Die exzessive Freisetzung von Glutamat und die durch die Bindung an prä- und postsynaptische Glutamatrezeptoren

ausgelösten Prozesse stellen den Hauptmechanismus der hypoxisch-ischämischen Hirnschädigung dar und werden unter dem Begriff Exzitotoxizität zusammengefasst ¹⁶. Die Glutamatrezeptoren lassen sich in zwei Familien unterteilen, die metabotropen und ionotropen Rezeptoren. Erstere führen zu einer Aktivierung von Phospholipase C und Inhibierung der Adenylylzyklase. Die Letzteren, ionotropen Rezeptoren, lassen sich wiederum aufgrund ihrer unterschiedlichen Sensitivität gegenüber den Agonisten NMDA (*N-methyl-D-aspartate*), KA (*kainic acid*) und AMPA (*alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid*) in drei distinkte Typen unterteilen. Allein der NMDA-Rezeptor führt zu einer direkten Erhöhung der Ca²⁺-Permeabilität der Zelle, während die beiden übrigen sekundär über Na⁺ und K⁺ Ströme und die resultierende Depolarisierung zu einer Erhöhung des intrazellulären Ca²⁺ führen ¹⁷.

Der exzessive Ca²⁺-Influx führt in der Folge zur Initiierung weiterer Signalkaskaden, die über die Aktivierung von Proteasen, Lipasen und Kinasen, sowie die Bildung freier Radikale und Stickstoffmonoxid (NO) ¹⁸ weitere katabole Prozesse in Gang setzten, an dessen Ende der Zelltod in Form von Apoptose, Autophagie und Nekrose steht ^{16,19}. Der zentrale Mediator der Nekrosekaskade ist Calpain, welches durch hohe intrazelluläre Ca²⁺-Konzentrationen aktiviert wird. Die Charakteristika dieses Zelltodtyps sind Vakuolisierung und Zellschwellung. Bei der Autophagie steht die lysosomale Degradierung der Zellbestandteile im Vordergrund. Die Apoptose, der programmierte Zelltod, zeichnet sich durch spezifische Zellkernveränderungen und Schrumpfung der Zelle aus, welche schließlich zur Phagozytose durch Immunzellen führen. Die Apoptose kann durch den intrinsischen und extrinsischen Signalweg aktiviert werden, wobei Caspasen die zentrale Rolle spielen ¹⁶. Der intrinsische Signalweg wird durch intrazelluläre Apoptose-Signale, wie mitochondriale Dysfunktion und Schädigung der Desoxyribonukleinsäure (DNA) aktiviert. Das Gleichgewicht zwischen pro-apoptotischen und anti-apoptotischen Mitgliedern der Bcl-2 Superfamilie verschiebt sich in Richtung der Apoptose, was schließlich dazu führt, dass mitochondriales Cytochrom c freigesetzt wird. Dieser Faktor bildet in einem energieabhängigen Prozess einen zytosomalen Komplex mit APAF-1 (*apoptotic protease-activating factor 1*), welcher als Apoptosom die Caspase 9 aktivieren kann. Diese wiederum aktiviert die Caspase 3, die letztendlich zur Apoptose führt. Über den extrinsischen Weg können extrazelluläre Signale durch Bindung an sogenannte Todesrezeptoren, wie Fas, zur Aktivierung der Apoptosekaskade führen. Zentraler Mediator ist hier die Caspase 8, welche schließlich in der Aktivierung der Caspase 3 und so letztlich dem programmierten Zelltod mündet. Auf einem dritten Weg kann die Apoptose durch den Apoptose-induzierenden Faktor (AIF) initiiert werden. AIF

wird direkt von den Mitochondrien sezerniert und stellt einen Caspase-unabhängigen Signalweg dar²⁰.

Durch die Aktivierung von Phospholipase A₂ und Cyclooxygenase infolge des Ca²⁺-Exzesses sowie durch eine mitochondriale Dysfunktion aufgrund des Energiemangels kommt es zur Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), welche das antioxidative Potential der Zelle übersteigen und so zum oxidativen Stress führen. Die Folge sind Lipidperoxidationen und Beschädigung von Membranen, Mitochondrien und DNA¹⁸. Darüber hinaus führt die verstärkte Bildung von NO durch die Ca²⁺-sensitive NO-Synthase zu einer zusätzlichen Gewebeschädigung¹⁸. Das destruktive Potential von ROS und NO wird zudem durch ihre Kombination zu Peroxynitrit gesteigert¹⁷. Schließlich führt die Gewebeschädigung und Modifikation der Makromoleküle ebenfalls zur Induktion von Apoptose, Nekrose und Autophagie¹⁷.

Die Hirnschädigung endet allerdings nicht prompt nach Wiederherstellung der zerebralen Perfusion mit sauerstoff- und glukosereichem Blut, sondern setzt sich darüber hinaus fort. Grund dafür ist unter anderem die verstärkte Bildung von ROS infolge der wiederhergestellten Zufuhr von Sauerstoff als Substrat²¹. Die dominierende Modalität des Zelltodes während der Reperfusion ist die Apoptose. Sie ist vom intrazellulären ATP-Level abhängig und wird so durch die Regeneration der energiereichen Phosphate nach Wiederherstellung der Sauerstoff- und Glukoseversorgung verstärkt^{22,23}.

Zusätzlich wird infolge der hypoxisch-ischämischen Gewebeschädigung eine langwierige Entzündungsreaktion ausgelöst, die bei der Protrahierung der Hirnschädigung eine Rolle spielt. Es kommt zur Ausschüttung von proinflammatorischen Mediatoren, wie Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und Interleukin-1 durch Astrozyten, Mikroglia- und Endothelzellen²⁴. Durch die Zytokine wird eine Migration von Zellen des Immunsystems zum Ort der Schädigung stimuliert und eine weitere Verstärkung der Entzündungsreaktion ausgelöst²⁴. Diese inflammatorische und immunologische Reaktion findet verstärkt während der Reperfusionsphase statt und ist durch phagozytische Aktivität der Makrophagen, Bildung weiterer toxischer Produkte und eine fortgehende Stimulation der Immunantwort für den späten Zelltod mitverantwortlich²⁵. Allerdings ist auch zu beachten, dass die inflammatorische Reaktion nicht ausschließlich neurotoxisch ist, sondern aufgrund der gleichzeitigen Sezernierung neuroprotektiver Mediatoren eine duale Funktion besitzt²⁵. Die Prozesse, die sekundär nach Wiederherstellung der Sauerstoff- und Nährstoffversorgung zum Zelltod führen, werden als Reperfusionsschaden zusammengefasst²⁶.

1.3 Die duale Rolle der Mikrogliazellen in hypoxisch-ischämischer Hirnschädigung

Mikrogliale Zellen sind die ortsständigen, immunkompetenten Zellen des Gehirns, welche mit ihren beweglichen zellulären Ausläufern eine permanente aktive Überwachung des Gewebes durchführen und jederzeit bereit sind zu sogenannter aktivierter Mikroglia zu transformieren. Diese Transformation beinhaltet eine Änderung der Zellform, der Genexpression und der funktionalen Eigenschaften der Zellen. Mikrogliazellen zeigen im aktivierten Zustand amöboide Fähigkeiten und können, angezogen durch Chemotaxine, zum Ort der Schädigung migrieren. Darüber hinaus können diese Zellen im aktivierten Status proliferieren, phagozytieren, Oberflächenmoleküle zur Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktion exprimieren, und proinflammatorische sowie antiinflammatorische Faktoren sezernieren²⁷. Der Zustand der Aktivierung ist allerdings nicht, wie lange angenommen, eine Alles-oder-Nichts-Reaktion, sondern vielmehr ein mehrphasiger, anpassungsfähiger und kontextabhängiger Prozess²⁸.

Welche modulatorische Rolle Mikrogliazellen bei der Vermittlung von neuronaler Schädigung, beispielsweise durch Exzitotoxizität, spielen, konnte eindrücklich anhand der Diversität der mikroglialen Populationen und damit einhergehender unterschiedlicher Vulnerabilität der hippocampalen CA1 und CA3 Regionen gezeigt werden²⁹. Mikrogliazellen können abhängig von ihrem Aktivierungsprofil neuroprotektive und neurotoxische Eigenschaften zeigen. Agieren sie proinflammatorisch, können sie durch Sezernierung von ROS, NO oder TNF- α Neurone schädigen³⁰. Diese Funktion ist von der Art des Stimulus und vom Zustand der Aktivierung abhängig²⁸. Die neuroprotektiven Eigenschaften der Mikrogliazellen wurden mehrfach demonstriert. Beispielsweise in einer Studie an einem transgenetischen Mausmodell, in welchem die Applikation von Ganciclovir zu einem Proliferationsstopp der Mikrogliazellen führt. Setzt man diese Mäuse einer transienten Okklusion der Arteria cerebri media unter Ganciclovir-Gabe aus, ist das Infarktareal signifikant größer als bei intakter mikroglialer Proliferation. Diese zunehmende Infarktgröße ist mit einer verstärkten neuronalen Apoptose assoziiert³¹. In weiteren Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass die Migration exogen zugeführter Mikrogliazellen zum Ort einer zerebral ischämischen Schädigung zu einer signifikanten Neuroprotektion führt^{32,33}. Diese Neuroprotektion war mit erhöhter Expression neurotrophischer Faktoren assoziiert, die aus dem Hirngewebe selbst und von den Gliazellen abstammten³². Neumann et al. konnten zeigen, dass die

mikroglialen Zellen ihre neuroprotektive Funktion in enger Zell-Zell-Interaktion mit den Neuronen ausführen³⁴. Die Mikrogliazellen sind also nicht nur für Inflammation und Immunabwehr, sondern auch für den ständigen Erhalt der Gewebshomöostase, Schutz vor pathogenen Faktoren, die die funktionelle und strukturelle Integrität des ZNS bedrohen, und Reparatur geschädigten Gewebes zuständig²⁸.

Interessanterweise kann Hypothermie ein Stimulus sein, welcher die Aktivierung der Mikrogliazellen in Richtung eines antiinflammatorischen Phänotyps fördert. So konnten Diestel et al. zeigen, dass Mikrogliazellen in einem Protokoll aus Kühlung und Wiedererwärmung unter Stimulation mit Lipopolysaccharid vermehrt die antiinflammatorischen Zytokine Interleukin-10 und Interleukin-1-Rezeptorantagonist exprimieren. Zudem wird der nukleäre Faktor κ B (NF κ B), ein zentraler Transkriptionsfaktor der Immunantwort, verstärkt inhibiert und die Phagozytose gesteigert³⁵. Mikrogliazellen könnten also an der Vermittlung der Hypothermie-induzierten Neuroprotektion beteiligt sein. In der vorliegenden Arbeit sollen somit in einem Zellkulturmodell aus Mikrogliazellen und Neuronen die neuroprotektiven Eigenschaften der therapeutischen Hypothermie (TH) nach hypoxisch-ischämischer Schädigung auf zellulärer und molekularer Ebene untersucht werden.

1.4 Therapeutische Hypothermie

TH bezeichnet die gezielte und kontrollierte Reduktion der Körperkerntemperatur. Dabei setzt sich die Intervention aus den drei Phasen Induktion, Aufrechterhaltung und Wiedererwärmung zusammen. Definitionsgemäß beginnt eine Hypothermie ab einer Körpertemperatur < 36 °C, während milde TH die gezielte Reduktion auf 34,0–35,9 °C und moderate TH den Zielbereich von 32,0–33,9 °C bezeichnet²⁶. Da die Zieltemperatur phasenabhängig ist, hat sich der Oberbegriff *targeted temperature management* (TTM) in der Klinik etabliert. Neben der TH, also einem hypothermen TTM, hat das normotherme TTM mit einer Zieltemperatur von ca. 36 °C zur Fiebervermeidung große Anerkennung in der Neurointensivmedizin nach einer Hirnschädigung gefunden³⁶.

1.4.1 Anwendung der therapeutischen Hypothermie nach Herzkreislaufstillstand

Die älteste klinisch wirksame Therapie zur Verbesserung des Outcomes und zur Linderung einer hypoxisch-ischämischen Hirnschädigung ist die TH²⁵. Bei Neugeborenen mit hypoxisch-

ischämischer Enzephalopathie in Folge perinataler Asphyxie konnte die Effektivität der TH im entwicklungsneurologischen Kurz- und Langzeit-Outcome gezeigt werden³⁷⁻⁴² und hat zu einer festen Integration der neuroprotektiven Intervention in die klinische Praxis geführt.

Ebenso konnte bei Erwachsenen, die nach einer erfolgreichen Reanimation eines OHCA komatös blieben, die Wirksamkeit einer Behandlung mit TH nachgewiesen werden^{43,44}. In der Studie von Bernard et al. zeigte sich eine signifikante Verbesserung des Outcomes, gemessen an den neurologischen Funktionen bei Krankenhausentlassung⁴³. Dies deckt sich mit den Ergebnissen der *Hypothermia after Cardiac Arrest Study Group*, die ein besseres neurologisches Outcome und eine Senkung der Mortalität 6 Monate nach OHCA durch TH zeigen konnten⁴⁵. Gegenstand kontroverser Diskussion ist allerdings, ob die TH, im Sinne eines hypothermen TTM, einem normothermen TTM überlegen ist^{46,47}.

Gegenstand intensiver Forschung ist darüber hinaus die Effektivität der TH in der pädiatrischen Population des OHCA. Moler et al. konnten zeigen, dass TH in 20 % zu einem 1-Jahres-Outcome mit guten neurologischen Funktionen führte, während das normotherme TTM nur in 12 % der Fälle mit guten neurologischen Funktionen nach einem Jahr assoziiert war. Nach einem Jahr hatten außerdem 38 % der Patienten nach TH und 29 % der Patienten nach normothermen TTM überlebt. Allerdings ergab die statistische Analyse keine Signifikanz der Ergebnisse⁴⁸. Dennoch demonstrieren die Resultate dieser großen multizentrisch randomisiert prospektiven Studie das große neuroprotektive Potential der TH nach einer hypoxisch-ischämischen Hirnschädigung. Die Fachgesellschaften empfehlen ein normothermes oder hypothermes TTM zur Neuroprotektion nach OHCA bei Kindern⁴⁹.

Ein differenziertes Assessment des Langzeit-Outcomes der Patienten ist notwendig, um einen möglichen Vorteil eines normothermen oder hypothermen TTM genauer zu untersuchen und die optimale Therapie für die Patienten etablieren zu können⁴⁹.

1.4.2 Neuroprotektive Mechanismen der therapeutischen Hypothermie in hypoxisch-ischämischer Hirnschädigung

Zu den akuten Effekten der TH zählen eine Suppression des Metabolismus und Reduktion des Sauerstoff- und Glukosebedarfs²⁵. Im Gehirn führt dies zu einer Senkung des zellulären Energiemetabolismus um 6–10 % pro gesenktes Grad der Körpertemperatur⁵⁰⁻⁵³. Folglich kommt es zu einer Erhaltung der energiereichen Phosphate⁵⁴ und Reduzierung der Laktatazidose der

Zellen. Hierdurch kann die Ionenhomöostase und somit das Membranpotential aufrechterhalten werden²⁰. Dies wiederum reduziert die Exzitotoxizität, auf mehreren Ebenen der destruierten Kaskade. Die Kühlung führt so unter anderem zu einer verringerten Ausschüttung von Glutamat in den extrazellulären Raum⁵⁵. Zudem reduziert sie den Ca^{2+} -Einstrom und folglich die Hyperexzitabilität der Neurone⁵⁶. Allerdings ist der temperaturabhängige Einfluss auf den Energiemetabolismus der Zelle bei weitem nicht der einzige zytoprotektive Mechanismus der TH, worauf die Effekte bei bereits milder Hypothermie deutlich hinweisen^{25,57}.

Darüber hinaus kommen subakute Mechanismen der TH zum Tragen und führen dazu, dass eine Initiierung der Kühlung auch nach Beendigung des schädigenden Ereignisses einen protektiven Effekt hat²⁰. Die Evidenz aus zahlreichen *in vitro* und *in vivo* Studien zeigt, dass TH in nahezu alle Signalkaskaden eingreift, die zum sekundären Zelltod infolge eines hypoxisch-ischämischen Ereignisses führen. Dazu zählen Apoptose, Inflammation, und oxidativer Stress²⁰.

Insbesondere die Apoptose kann noch über Stunden bis Tage nach Beendigung des hypoxisch-ischämischen Ereignisses zum neuronalen Zelltod beitragen und bietet daher ein gutes Ziel und relativ breites therapeutisches Fenster für die Hypothermie^{25,56}. Kühlung interferiert mit dem intrinsischen Signalweg des programmierten Zelltodes durch Hemmung der pro-apoptotischen Proteine aus der Bcl-2 Familie und Induktion des anti-apoptotischen Bcl-2. Zudem reduziert die TH die Freisetzung von Cytochrom c und schließlich die Aktivierung der Caspasen^{20,58}. Auch die extrinsische Kaskade der Apoptose-Induktion wird durch Kühlung beeinflusst. TH reduziert sowohl den Rezeptor Fas als auch seinen Liganden FasL und führt schließlich zu einer geringeren Aktivierung der Caspase 8⁵⁹.

Die Entzündungsreaktion nach einem hypoxisch-ischämischen Ereignis im ZNS kann den neuronalen Schaden exazerbieren. Kühlung schwächt die schädigenden Prozesse auf mehreren Ebenen ab. So reduziert TH die Zahl der neutrophilen Granulozyten und aktivierten Mikrogliazellen und die Sezernierung zahlreicher proinflammatorischer Mediatoren, wie ROS und NO^{60,61}. Auch die nukleäre Translokation und damit Wirkung von NF- κ B wird supprimiert⁶².

Weiterhin führt die mitochondriale Dysfunktion zur Bildung freier Radikale, welche entscheidend an der hypoxisch-ischämischen Schädigung der neuronalen Zellen beteiligt sind. Kühlung nach hypoxisch-ischämischer Schädigung und Reperfusion führt zu einer signifikanten Reduktion dieser Radikale und trägt so zur Attenuierung des Reperfusionsschadens bei^{21,63}.

Die Festlegung der optimalen Temperatur, Kühlungsrate, -dauer, sowie Wiedererwärmungsrate und -dauer sind stets Gegenstand aktueller Forschung und nicht abschließend determiniert⁵⁶. Auch der optimale Zeitpunkt des Kühlungsbeginns bleibt unklar. Tierexperimentelle und klinische Studien geben jedoch deutliche Hinweise darauf, dass das therapeutische Fenster für eine neuroprotektive Intervention eng ist und eine möglichst frühe Initiierung der TH essentiell für den protektiven Effekt ist⁶⁴. So wurde für die vorliegenden Experimente mit der HT-22/BV-2 Co-Kultur das von Tong und Walker publizierte Zeit-Temperatur-Protokoll mit einem intraischämischen Beginn der TH gewählt. In ihrem Modell aus HL-1 Kardiomyozyten konnten die beiden Autoren zeigen, dass die intraischämische Kühlung einer postischämischen überlegen ist⁵⁴. Um die Modalität der TH Intervention weiter zu optimieren ist weitere Forschung und ein besseres Verständnis der zugrunde liegenden molekularen und zellulären Mechanismen erforderlich.

1.5 Das Kälteschockprotein RBM3

Obwohl Hypothermie generell zu einer Reduktion der Stoffwechselrate und zu einer Suppression der Proteinexpression führt⁶⁵, wird die Expression einer kleinen Gruppe von Kälteschockproteinen durch Kühlung induziert. Dazu gehört auch das *RNA binding motif protein 3* (RBM3), welches eine Glycin-reiche Carboxyl-Endung besitzt und sowohl Ribonukleinsäure (RNA) als auch DNA binden kann^{66,67}. RBM3 ist, wie das homologe *Cold-inducible mRNA binding protein* (CIRP), evolutionär hoch konserviert. Es wird in Säugetieren vor allem in der frühen postnatalen Periode exprimiert und ist daraufhin in geringem Maße in multiplen Hirnregionen zu finden^{68,69}. Seine subzelluläre Lokalisation wurde in den Zellkernen und heterogenen Granula in den Dendriten der neuronalen Zellen beschrieben⁷⁰. Zudem konnten Smart et al. eine Co-Lokalisation des Kälteschockproteins mit Boten-RNA (mRNA) und den multiplen Komponenten des zellulären Translationsapparates beobachten. Es findet sich eine dynamische Regulation des Proteins im sich entwickelnden Gehirn mit Hinweisen auf einer Beteiligung an Prozessen wie Proliferation, Differenzierung und Plastizität⁶⁹.

In vielen Geweben jenseits des Entwicklungsstadiums bleibt die Fähigkeit der RBM3 Überexpression auf bestimmte Stress-Stimuli erhalten. Speziell für die Subgruppe der Glycin-reichen RNA-bindenden Proteine, wie RBM3, konnte gezeigt werden, dass sie durch Stress, insbesondere Kälte, induzierbar sind⁷¹. Die temperaturabhängige Regulation von RBM3 ist

hochsensibel, so reicht bereits eine Reduktion der Temperatur um 1 °C aus, um eine Induktion zu bewirken⁷². In hippocampalen Hirnschnitten konnte gezeigt werden, dass moderate Hypothermie (33,5 °C), jedoch nicht tiefe Hypothermie (17 °C) zu einer verstärkten Expression von RBM3 führt⁷³. Auch in neuronalen HT-22 Zellen und in einer HT-22/BV-2 Co-Kultur ließ sich eine RBM3 Hochregulation nach moderater, sowie tiefer Hypothermie beobachten. Diese blieb jedoch in einer reinen BV-2 Kultur aus⁷³. Hingegen führt Hyperthermie (39 °C) zu einer Suppression der RBM3 Level in *in vitro*⁶⁶ und *in vivo* Experimenten⁷⁴.

Auch Hypoxie kann als Stimulus auf die Regulation der Genexpression von RBM3 wirksam werden. In humanen und murinen Zelllinien konnte gezeigt werden, dass milde (8 % O₂), sowie schwere (1 % O₂) Hypoxie zu einer Induktion von RBM3 führen⁷⁵. In *in vivo* Studien führte eine schwere Hypoxie hingegen zu einer Herunterregulation von RBM3⁷⁶. Stress, wie Hypoxie, ist also nicht immer ein Induktor, sondern möglicherweise auch ein Inhibitor von RBM3⁷⁷.

Es wird angenommen, dass RBM3 eine Rolle bei der post-transkriptionalen Genregulation als Reaktion auf einen Kältestimulus spielt und dazu beiträgt, dass die Translation von RNA auch bei kälteren Temperaturen stattfinden kann⁶⁶. RBM3 fungiert als eine Art RNA Chaperon und ist an der Modifizierung des Mikro-RNA-Levels (miRNA), einem Faktor der post-transkriptionalen Regulation, beteiligt. So konnten Dresios et al. zeigen, dass RBM3 die globale Proteinsynthese steigern kann⁶⁷. RBM3 wird im Gehirn in zahlreichen Hirnregionen exprimiert. Eine Überexpression führte zur Verstärkung der globalen Translation, der Formation von Polyribosomen und der Aktivierung von Initiationsfaktoren. Die Autoren Smart et al. postulierten daher für RBM3 eine entscheidende Rolle bei der Verstärkung der Translation in neuronalen Zellen⁷⁰. Darüber hinaus wurden RBM3 anti-apoptotische und pro-proliferative, sowie protoonkogene Eigenschaften zugeschrieben, die für das Zellüberleben essentiell sind^{75,78}.

Interessanterweise konnte auch eine signifikante Hochregulation von RBM3 ubiquitär in allen Geweben des Winterschlaf haltenden Erdhörnchens, während der Wintermonate detektiert werden⁷⁹. Die Funktion von RBM3 als Überlebenspromotor insbesondere unter hypothermen Bedingungen macht das Protein zu einem potenten potentiellen Vermittler der Hypothermie-induzierten Neuroprotektion. Chip et al. konnten diese Rolle von RBM3 an hippocampalen Hirnschnitten eindrücklich zeigen⁶⁸. Auch in neurodegenerativen Erkrankungen spielt RBM3 eine Rolle, wie kürzlich in einer Studie von Peretti et al. demonstriert wurde. Ein Versagen der RBM3 Stressreaktion ist möglicherweise für den Untergang von Synapsen verantwortlich, während sich

die Hochregulation von RBM3 durch Hypothermie oder gentechnische Induktion als protektiv erwies. Die Autoren demonstrierten, dass RBM3 über eine Einflussnahme auf die synaptische Plastizität die neuronale Degeneration reduziert und den Krankheitsverlauf positiv beeinflusst⁸⁰.

Die weitere Charakterisierung der Funktion von RBM3 und seiner Rolle bei der Vermittlung endogener Reparatur- und Resistenzmechanismen sowie der Hypothermie-induzierten Neuroprotektion könnten zu einem besseren Verständnis der Wirkmechanismen der TH beitragen. Darüber hinaus könnte RBM3 als Ziel synergistischer Strategien zur Potenzierung der Neuroprotektion durch TH dienen. Die Dringlichkeit der Entwicklung neuer Strategien wird insbesondere vor dem Hintergrund potentieller Nebenwirkungen der physikalischen Kühlung²⁶ und der Grenzen der Durchführbarkeit deutlich, mit denen die frühe Kühlung eines OHCA-Überlebenden in der Erstversorgung konfrontiert sein kann^{20,81}. Zudem ist die Wirksamkeit der TH insbesondere bei schweren Fällen einer hypoxisch-ischämischen Hirnschädigung eingeschränkt^{38,41}. Ein pharmakologischer Induktor der RBM3 Expression könnte die breiten Effekte der TH auf die Zelltodkaskaden während einer hypoxisch-ischämischen Schädigung simulieren oder in Kombination mit TH potenzieren und wäre ein möglicher potenter Neuroprotektor. Dies könnte eine breitere klinische Wirksamkeit und Anwendung der TH ermöglichen.

1.6 Pharmakologische Neuroprotektion

1.6.1 [D-Ala2, D-Leu5] Enkephalin (DADLE)

Das Phänomen Winterschlaf in der Tierwelt ist das Resultat komplexer physiologischer Anpassungsreaktionen und ein Modell für endogene Toleranz gegenüber sauerstoff- und nährstoffarmen Bedingungen. Das große Interesse am Verständnis der zugrunde liegenden Prozesse und Mechanismen basiert auf der Hoffnung sie zur Induktion einer hypoxisch-ischämischen Toleranz im Rahmen pathologischer Ereignisse zu nutzen⁸². Auf der Suche nach Auslösern des Winterschlaf-Status wurde der *Hibernation induction trigger* (HIT), ein 88 kDa großes Polypeptid, mit einem Opioid-ähnlichen Wirkmechanismus identifiziert⁸³⁻⁸⁵. Insbesondere der δ -Opioid-Rezeptor (DOR) ist an der Wirkung dieses Proteins beteiligt und die Applikation des spezifischen Agonisten [D-Ala2, D-Leu5] Enkephalin (DADLE), dem metabolisch stabile Analogon des endogenen δ -Opioid Enkephalins, führt interessanterweise

ebenfalls zu einer Induktion des Winterschlaf-Status in Erdhörnchen ⁸⁶. Darüber hinaus ist das DOR-System an der Vermittlung organprotektiver Effekte einer ischämische Präkonditionierung beteiligt ⁸⁷. Aufgrund dieser potenten Fähigkeiten wurde DADLE gründlich hinsichtlich einer möglichen Toleranzsteigerung gegenüber Hypoxie-Ischämie und insbesondere neuroprotektiver Eigenschaften im Rahmen zahlreicher *in vivo* und *in vitro* Modelle untersucht ⁸².

Chien et al. konnten zeigen, dass DADLE und HIT die Überlebenszeit von Organtransplantaten um das Dreifache verlängern können ^{88,89} und dabei außerdem zu guten Organfunktionen führen ⁹⁰. Tsao et al. fanden darüber hinaus, dass DADLE auch neuroprotektive Eigenschaften aufweist. Sie demonstrierten, dass die systemische Applikation von DADLE vor dem Verlust dopaminerger Synapsen im Striatum infolge der Noxe Methamphetamin (METH) schützt. Dabei entfaltet DADLE seine Wirkung nicht nur über den DOR, sondern weist auch antioxidative Eigenschaften auf und trägt zur Eliminierung freier Radikale bei ⁹¹. Darüber hinaus wird DADLE auf genetischer Ebene aktiv und blockiert die METH-induzierte Genregulation von c-fos und p53 ⁹².

Neben der Protektion gegen die Noxe METH konnte die Wirksamkeit des DOR-Agonisten in einer Vielzahl weiterer zentralnervöser Schädigungsmodelle demonstriert werden. So konnte sich DADLE beispielsweise in einem Parkinson Mausmodell ebenfalls als neuroprotektiv erweisen ⁹³. Außerdem findet sich reichlich Evidenz für eine DADLE-vermittelte Protektion vor einer hypoxisch-ischämischen Schädigung im ZNS. Das Opioid schützt die neuronale PC12-Zelllinie und primäre corticale Neurone gegen einen ischämischen oder hypoxischen Schaden ^{94,95}. Die Applikation von DADLE in *in vivo* Hirninfarkt-Modellen konnte vor Nekrose und Apoptose schützen ^{96,97}. Der frühe protektive Effekt vor der Ischämie-Reperfusionsschädigung von DADLE war hierbei über den DOR vermittelt, während den späten Effekten das Abfangen freier Radikale, die antioxidative Eigenschaft und die Freisetzung neurotrophischer Faktoren zugrunde lagen ⁹⁶. Die zellulären Mechanismen der DADLE-induzierten Neuroprotektion umfassen zusammengefasst die Stabilisierung der Ionenhomöostase ^{98,99}, die Inhibierung der Exzitotoxizität, eine gesteigerte antioxidative Kapazität, Hemmung der Apoptosekaskaden, Stimulierung von Überlebenssignalen sowie schließlich die Steigerung der endogenen Opioid-Freisetzung und DOR-Expression ⁷.

RBM3 könnte einen möglichen Link zwischen DADLE und den durch das Opioid induzierten Anpassungsvorgängen zur Toleranzsteigerung gegenüber hypoxisch-ischämischen Bedingungen darstellen. Die Hochregulation von RBM3 in winterschlafenden Erdhörnchen konnte als

potentieller Mediator der Anpassungsvorgänge während des Winterschlafes identifiziert werden⁷⁹. RBM3 gilt zudem als zentraler Vermittler der Hypothermie-induzierten Neuroprotektion⁶⁸. Der Opioid-Agonist DADLE, als ein Induktor des Winterschlafes^{7,82} mit potenten neuroprotektiven Eigenschaften⁷, könnte somit möglicherweise über eine Hochregulation von RBM3 als Initiator endogener Anpassungsvorgänge fungieren und die Toleranzsteigerung der Zellen bewirken. Dadurch könnte DADLE die Effekte der TH imitieren oder potenzieren. Die Überlegung, dass DADLE die Protektion durch TH verstärken oder ersetzen könnte findet weiterhin Unterstützung durch experimentelle Evidenz, die zeigt, dass das DOR-System an der Vermittlung der Effekte der TH beteiligt ist¹⁰⁰. Besonders vor dem klinischen Hintergrund des Herz-Kreislaufstillstandes ist DADLE ein attraktiver Wirkstoff, da er neben den neuroprotektiven auch kardioprotektive Eigenschaften besitzt^{87,101}. In dieser Arbeit soll daher untersucht werden, ob die neuroprotektiven Effekte von DADLE mit denen der TH vergleichbar sind, einen Synergismus mit TH zeigen und über RBM3, den potentiell gemeinsamen Effektor, vermittelt werden. Nach unserem Kenntnisstand ist dies die erste Arbeit, die eine Regulation von RBM3 durch DADLE auf Protein- und Genexpressionsebene untersucht.

1.6.2 WIN-55,212-2

WIN-55,212-2, ein synthetischer Cannabinoid-Rezeptor Agonist, ist ein weiterer potentiell potenter Kandidat zur pharmakologischen Neuroprotektion. Er weist neuroprotektive Eigenschaften auf zellulärer Ebene auf und induziert darüber hinaus dosisabhängig eine Hypothermie durch Einfluss auf die hypothalamische Thermoregulation¹⁰². Cannabinoide und ihre Rezeptoren gehören einem endogenen System an, welches an der Kontrolle der synaptischen Transmission, der Gedächtnismodulation, Nozizeption, Thermoregulation und Steuerung des Appetits beteiligt ist¹⁰³. Darüber hinaus haben Cannabinoide auch zahlreiche Effekte auf periphere Organe, insbesondere auf das Immunsystem¹⁰⁴. Die physiologischen Endocannabinoide werden durch die Spaltung von Membranlipiden gebildet¹⁰⁵. Sie wirken, wie auch das synthetische Aminoalkylindol-Derivat WIN-55,212-2, über die Bindung an die spezifischen Membranrezeptoren CB₁ und CB₂¹⁰⁶. Der CB₁-Rezeptor, ein G-Protein gekoppelter Rezeptor, ist für die meisten Verhaltenseffekte und psychotropischen Wirkungen der Cannabinoide verantwortlich. Die aktivierten intrazellulären Signalkaskaden führen zum Schließen von Ca²⁺-Kanälen, Öffnen von K⁺-Kanälen, zur Inhibierung der Adenylzyklase und Aktivierung von Proteinkinasen. Das Ergebnis ist die Modulation synaptischer Transmission und die Änderung der

neuronalen Genexpression¹⁰⁵. Allerdings konnte auch ein Effekt in CB-null Mäusen gemessen werden, sodass die Existenz weiterer ähnlicher Rezeptoren, anzunehmen ist^{105,106}. Auch der CB₂-Rezeptor wird im ZNS exprimiert. Er ist insbesondere auf aktivierten Mikrogliazellen zu finden¹⁰⁶. Eine Aktivierung des CB₂-Rezeptors ist in die Endocannabinoid-gesteuerte Proliferationszunahme von Immunzellen und ihre Migration in Richtung geschädigter Neurone involviert^{107,108}. Zugleich wird die Sezernierung und Freisetzung neurotoxischer und proinflammatorischer Faktoren reduziert¹⁰⁶. Auch die Zelllinie der mikroglialen BV-2 Zellen exprimiert den CB₂-Rezeptor¹⁰⁷. WIN-55,212-2 zeigt eine etwa 2-fach höhere Affinität zum CB₂- als zum CB₁-Rezeptor¹⁰⁶.

Zahlreiche Ergebnisse aus *in vitro* Studien legen eine enge Verknüpfung des Cannabinoid-Systems mit Neuroprotektion nahe. Die Effekte werden über eine Abschwächung der Exzitotoxizität durch Inhibierung des NMDA-Rezeptors, die Reduktion der Produktion proinflammatorischer Zytokine und des oxidativen Stresses vermittelt^{109,110}. Corticale Neurone werden durch WIN-55,212-2 vor einer Schädigung durch Oxygen-Glukose-Deprivation (OGD) geschützt, wobei dieser Effekt auf CB₁- und CB₂-unabhängigen Mechanismen beruht¹¹¹.

Auch *in vivo* konnte das neuroprotektive Potential von WIN-55,212-2 und weiteren Cannabinoiden gezeigt werden. So konnte bei Ferkeln mit einem globalen hypoxisch-ischämischen Ereignis der klinische und histologische Hirnschaden infolge einer Cannabidiol-Applikation signifikant reduziert werden, ohne dabei kurzzeitige systemische Nebenwirkungen zu erzeugen¹¹². In neonatalen Ratten mit hypoxisch-ischämischer Enzephalopathie konnte ebenfalls ein Magnetresonanz-morphologischer und histologischer neuroprotektiver Effekt nach WIN-55,212-2 Gabe demonstriert werden¹⁰³.

Der Anteil der Effekte durch die induzierte systemische Hypothermie neben den pharmakologischen zellulären Mechanismen an der Neuroprotektion durch Cannabinoide ist jedoch zu beachten¹⁰². Möglicherweise könnte diese pharmakologische Induktion von Hypothermie der physikalischen Kühlung mit ihren Nebenwirkungen und der begrenzten Durchführbarkeit überlegen sein¹¹³. Auch ein kombinierter Einsatz von WIN-55,212-2 und TH zur Wirkungsverstärkung ist denkbar¹¹⁴.

In unserem OGD-Modell einer HT-22/BV-2 Co-Kultur sollen die immunmodulatorischen und neuroprotektiven Effekte von WIN-55,212-2 und ein möglicher Synergismus mit TH untersucht

werden. Auch die Regulation von RBM3 als zentraler Mediator der Hypothermie-induzierten Neuroprotektion durch WIN-55,212-2 ist Gegenstand der Analysen.

1.7 Ziel der Arbeit

TH ist eine effektive Therapie zur Verbesserung der neurologischen Funktionen nach einem hypoxisch-ischämischen zerebralen Ereignis. Die Komplexität der Wirkmechanismen ist nicht vollständig verstanden, das neuroprotektive Potential der TH jedoch aufgrund zahlreicher experimenteller Evidenz anerkannt²⁵. Trotzdem sind die Ergebnisse klinischer Studien häufig nicht konklusiv und die Translation in die klinische Praxis bleibt schwierig. Zudem ist die Wirksamkeit der TH in besonders schweren Fällen einer hypoxisch-ischämischen Schädigung eingeschränkt^{38,41}. Ein besseres Verständnis der Mechanismen ist notwendig um die therapeutische Anwendung der Hypothermie optimieren zu können, die Effektivität zu steigern und die Translation in die klinische Praxis zu verbessern. Das bessere Verständnis ist außerdem der Schlüssel zur Entwicklung synergistischer pharmakologischer Therapien zur Potenzierung der Effekte der TH und Ausweitung der Wirksamkeit auf schwere Fälle einer hypoxisch-ischämischen Hirnschädigung.

In der vorliegenden Arbeit soll ein Zellkultur-Modell aus neuronalen HT-22 und mikroglialen BV-2 Zellen zur Simulation einer hypoxisch-ischämischen Schädigung und Reperfusion etabliert werden. An diesem Modell sollen ferner die Effekte der TH auf die Schädigung untersucht und die Rolle des Kälteschockproteins RBM3 analysiert werden. Dazu werden die Kulturen einer Oxygen-Glukose-Deprivation und anschließender Wiederherstellung der Sauerstoff- und Nährstoffversorgung (OGD/R) unter gekühlten und ungekühlten Bedingungen ausgesetzt. Die RBM3 Expression wird auf Proteinebene untersucht. Schließlich wird das neuroprotektive Potential der Wirkstoffe DADLE und WIN-55,212-2 in diesem Schädigungsmodell evaluiert und ein möglicher Synergismus mit den Effekten der TH untersucht. Es wird zudem geprüft, ob die Wirkstoffe DADLE und WIN-55,212-2 zu einer Hochregulation der RBM3 Proteinexpression führen. Schließlich werden die Ergebnisse der DADLE OGD/R Versuche in einem höherwertigen Zellmodell aus primären hippocampalen und corticalen Neuronen wiederholt.

Folgende Fragen sollen beantwortet werden:

1. Schützt TH vor einem OGD/R Schaden in einer HT-22/BV-2 Co-Kultur?

2. Führt TH in einer HT-22/BV-2 Co-Kultur zu einer Hochregulation von RBM3 auf Proteinebene?
3. Kann DADLE respektive WIN-55,212-2 den neuroprotektiven Effekt der TH simulieren oder weist es einen additiven Schutz in Kombination mit TH auf?
4. Korrelieren die potentiell protektiven Effekte von DADLE und WIN-55,212-2 mit der RBM3 Proteinexpression?
5. Lassen sich die Ergebnisse in einem Modell aus primären corticalen und hippocampalen Neuronen bestätigen?
6. Welchen Einfluss haben DADLE und TH in einer Kultur aus primären hippocampalen Neuronen auf RBM3 auf Protein- und Genexpressionsebene?

2 Material

2.1 Geräte

<i>BEZEICHNUNG</i>	<i>HERSTELLER</i>
Blotting-Kammer: Mini-Trans-Blot	Bio-Rad, München, Deutschland
Brutschrank (33,5 °C)	Sanyo Electric Biomedical Co., Tokyo, Japan
Brutschrank (37 °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 Kamera: AxioCam mRC	Zeiss/Axio, Göttingen, Deutschland
Fluoreszenz-Mikroskop: Axio Image M1	Zeiss/Axio, Göttingen, Deutschland
Hypoxiekammer	Binder, Tuttlingen, Deutschland
NanoDrop 2000c	Thermo Scientific, Karlsruhe, Deutschland

MATERIAL

PCR System: StepOnePlus™	Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland
Plattenphotometer: Multiskan Reader Ascent	Thermo Scientific, Karlsruhe, Deutschland
Schüttler	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Sterile Werkbank: LaminAir	Heraeus Instruments, Berlin, Deutschland
Stromversorgungsgerät: Power Pac 300	Bio-Rad, München, Deutschland
Thermoblock	Biometra, Göttingen, Deutschland
Wasserbad	P-D Ind.-Gesellschaft, Dresden, Deutschland
Zellkulturmikroskop	Motic, Wetzlar, Deutschland
Zellkulturmikroskop (Axiovert 40 CFL)	Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland
Zellkulturmikroskop Kamera: uEye	IDS, Obersulm, Deutschland
Zentrifuge 1: Bio-Fuge primo	Heraeus, Hanau, Deutschland
Zentrifuge 2: Bio-Fuge fresco	Heraeus, Hanau, Deutschland

2.2 Chemikalien

<i>BEZEICHNUNG</i>	<i>HERSTELLER</i>
Probenpuffer: 1 × Lane Marker Reducing Sample Buffer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
DAPI	Pierce, Rockford, USA
Acrylamid [30 %]	Roth, München, Deutschland
BSA	Bio-Rad, München, Deutschland
Cytotoxicity Detection Kit (LDH)	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
ECL Western Blotting Substrat	Pierce, Rockford, USA

MATERIAL

Ethanol [99 %]	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Isopropanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Magermilchpulver	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Methanol	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Page Ruler Prestained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
peqGold TriFast Kits	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen, Deutschland
Ponceau S 0,1 %, 5 % Essigsäure	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
RNase-freies Aqua bidest	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
SDS	Roth, München, Deutschland
SuperSignal West Dura Substrat	Pierce, Rockford, USA
TEMED	Roth, München, 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 Zellkultur allgemein

<i>BEZEICHNUNG</i>	<i>HERSTELLER</i>
96-Well Mikrotiter-Platten, weiß	Nunc, Langenselbold, Deutschland

MATERIAL

DADLE	Abcam, Cambridge, UK
Eppendorf-Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
FluoroTrans Transfer Membranes	Pall GmbH, Dreieich, Deutschland
L-Glutamin	Biochrom, Berlin, Deutschland
Multipipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Neubauer-Zählkammer	Brand, Wertheim, Deutschland
PBS	Biochrom, Berlin, Deutschland
Pen/Strep	Biochrom, Berlin, Deutschland
PLL	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Serologische Pipetten, 5-50 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Trypsin	Biochrom, Berlin, Deutschland
Zellkultur-Röhrchen 15 ml, 50 ml	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland

2.3.2 HT-22/BV-2 Co-Kultur

<i>BEZEICHNUNG</i>	<i>HERSTELLER</i>
DMEM	Biochrom, Berlin, Deutschland
DMEM ohne D-Glukose	Biochrom, Berlin, Deutschland
FBS	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Gewebekulturflaschen 75 cm ² , 175 cm ²	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Petrischalen, 22 cm ²	Sarstedt, Newton, USA
WIN-55,212-2	Enzo Life Sciences, Farmingdale, USA
Zellschaber 39 cm	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

2.3.3 Primäre Neurone

<i>BEZEICHNUNG</i>	<i>HERSTELLER</i>
B-27 Supplement	Gibco, Thermo Scientific Fisher, Watham, USA
DNase	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Glukose	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
HBSS	Biochrom, Berlin, Deutschland
MEM	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA)
NBM	Gibco, Thermo Scientific Fisher, Watham, USA
Pasteurpipetten, 150 mm	VWR, Radnor, USA
Petrischalen, 8,8 cm ²	Nalgene nunc, Rochester, USA
Pferdeserum	Biochrom, Berlin, Deutschland
Primocin	InvivoGen, Toulouse, Frankreich
Ziegenserum	Abcam, Cambridge, UK

2.4 Antikörper

<i>BEZEICHNUNG</i>	<i>HERSTELLER</i>
β-Tubulin mit Alexa Fluor 647 konjugiert, (Kaninchen, monoklonal)	Cell Signaling, Boston, USA
Esel anti-Kaninchen IgG, (Esel, polyklonal)	Dianova, Hamburg, Deutschland
RBM3, (Kaninchen, polyklonal)	Proteintech, Chicago, USA
β-Actin, (Kaninchen, polyklonal)	Cell Signaling, Boston, USA

2.5 Quantitative RT-PCR

<i>BEZEICHNUNG</i>	<i>HERSTELLER</i>
cDNA High-Capacity Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems, Foster City, USA
PCR MicroAmp 96-Well-Platte	Thermo Scientific Fisher, Watham, USA
Taqman-Sonden: GAPDH (Mn99999915 g1) RBM3 (Mn01609819 g1)	Thermo Scientific Fisher, Watham, USA

2.6 Software

<i>BEZEICHNUNG</i>	<i>HERSTELLER</i>
ImageLab™-Software	Bio-Rad, München, Deutschland
Prism 5	Graphpad Software Inc., La Jolla, USA
Quantity One	Bio-Rad, München, Deutschland

uEye-Software

IDS, Obersulm, Deutschland

3 Methoden

3.1 Zellkultur mit Zelllinien

3.1.1 HT-22 Neurone

Neuronale hippocampale HT-22 Zellen wurden aus der immortalisierten hippocampalen Maus-Zelllinie HT-4¹¹⁵ gewonnen und von der American Type Culture Collection (ATCC; Rockville, MD, USA) erworben. Die Kultivierung erfolgte in einem auf Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) basierenden Vollmedium. Der Brutschrank wurde dazu auf 37 °C temperiert und es herrschte ein Gasgemisch aus 95 % Luft und 5 % CO₂ bei 95 % Luftfeuchtigkeit. Die Passage der Zellen erfolgte mittels 0,25 % Trypsin (1:250 verdünnt) bei einer Zellkonfluenz von 70 %. Passagen bis zu P18 wurden unter regelmäßiger morphologischer, lichtmikroskopischer Kontrolle verwendet bis neue Zellen aus einem Kryovorrat aufgetaut und kultiviert wurden.

VOLLMEDIUM

DMEM

10 % FBS*

100 U/ml / 100 µg/ml Pen/Strep**

* hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum (FBS),

** Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)

3.1.2 BV-2 Mikrogliazellen

Bei den Mikrogliazellen handelt es sich um eine murine Zelllinie mit mikroglialer Differenzierung, welche durch stabile Transduktion primärer Mikrogliazellen mit einem v-raf/v-myc Onkogen mittels des J2-Retrovirus immortalisiert wurde. In den BV-2 Zellen sind die meisten immunologischen Eigenschaften der Mikrogliazellen, als Vermittler der zentralnervösen Immunantwort, erhalten. Sie eignen sich daher zur Untersuchung der Induktion und Expression biologischer Aktivität der Mikrogliazellen¹¹⁶. Die Zellen waren ein großzügiges Geschenk von Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Ullrich, Zürich, Schweiz. Die Kultivierung erfolgte separat in

Vollmedium und unter den gleichen Bedingungen wie die HT-22 Zellen. Passagierung erfolgte durch Abklopfen der Zellen und Überführung in eine neue Zellkulturflasche. Passagen bis zu P16 wurden unter morphologischer, lichtmikroskopischer Beobachtung verwendet bis neue Zellen aus einem Kryovorrat aufgetaut und kultiviert wurden. Eine Passagierung erfolgte bei 70 % Konfluenz der Zellen.

3.1.3 Direkte HT-22/BV-2 Co-Kultur

Zur Untersuchung der Interaktion zwischen Neuronen und Mikrogliazellen im Rahmen einer hypoxisch-ischämischen Schädigung und der potentiellen Neuroprotektion durch Hypothermie wurden die hippocampalen HT-22 und mikroglialen BV-2 Zellen in eine direkte Co-Kultur gebracht. Dazu wurden zunächst 3×10^5 HT-22 Zellen in 1 ml Vollmedium auf, mit $10 \mu\text{g/ml}$ Poly-L-Lysin (PLL) beschichtete, 22 cm^2 Petrischalen ausplattiert. Anschließend wurden 2×10^5 BV-2 Zellen in 1 ml Vollmedium dazu gegeben. Die Co-Kultivierung erfolgte präexperimentell für 48 h bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$, 95 % Luft- und 5 % CO_2 -Gasgemisch in einem voll befeuchteten Inkubator.

3.1.4 OGD/R und TH in der HT-22/BV-2 Co-Kultur

Die Simulation eines zerebralen hypoxisch-ischämischen Ereignisses in der HT-22/BV-2 Co-Kultur erfolgte mittels OGD (Abb. 1). Die OGD ist ein etabliertes *in vitro* Modell zur Untersuchung pathophysiologischer hypoxisch-ischämischer Prozesse. Das dazu verwendete Mangelmedium basierte auf einem Glukose-freien DME-Medium. 24 h vor Versuchsbeginn wurde das Medium bei 0,2 % O_2 und 5 % CO_2 bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ präequilibriert. Zu Versuchsbeginn wurde das Medium der OGD-Versuchsgruppen nach einmaligem Waschen zu Mangelmedium gewechselt und die Zellen anschließend in einen Brutschrank mit 0,2 % O_2 und $37 \text{ }^\circ\text{C}$ überführt. Durch Herunterkühlen des Inkubators auf $33,5 \text{ }^\circ\text{C}$ 3 h nach Beginn des Protokolls, wurde für eine OGD-Gruppe TH simuliert. Eine Kontrollgruppe mit Vollmedium wurde jeweils bei 95 % Luft und 5 % CO_2 bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$, sowie $33,5 \text{ }^\circ\text{C}$ nach 3 h gehalten. Für diese normoxen Gruppen erfolgte ein Mediumwechsel nach einmaligem Waschen zu frischem Vollmedium zu Beginn des Experimentes. Nach 6-stündiger OGD wurde die Reperfusion simuliert. Dazu erfolgte ein erneuter Wechsel zu Vollmedium und Transfer der Zellkulturen in einen Brutschrank mit 95 % Luft und 5 % CO_2 . Diese Wiederherstellung der Sauerstoff- und Nährstoffversorgung diente zur Simulation der Milieuänderungen während der Reperfusionsphase im ZNS. Allerdings beinhaltet dies in der Zellkultur eine statische Zustandsänderung und kein Durchfluss des Gewebes im Sinne einer

Perfusion. Zur Vereinfachung wird im Folgenden jedoch auch bezüglich der *in vitro* Experimente von Reperfusion gesprochen. Eine Nachbeobachtung der Zellen erfolgte für weitere 24 h, wobei die zuvor eingestellte Temperatur (37 °C oder 33,5 °C) für die normothermen, respektive hypothermen Gruppen aufrechterhalten wurde. Probenentnahmen erfolgten initial nach OGD, zum 6 h Zeitpunkt und nach OGD/R, 30 h nach Experimentstart.

MANGELMEDIUM

DMEM ohne D-Glukose

2 % L-Glutamin

100 U/ml / 100 µg/ml Pen/Strep

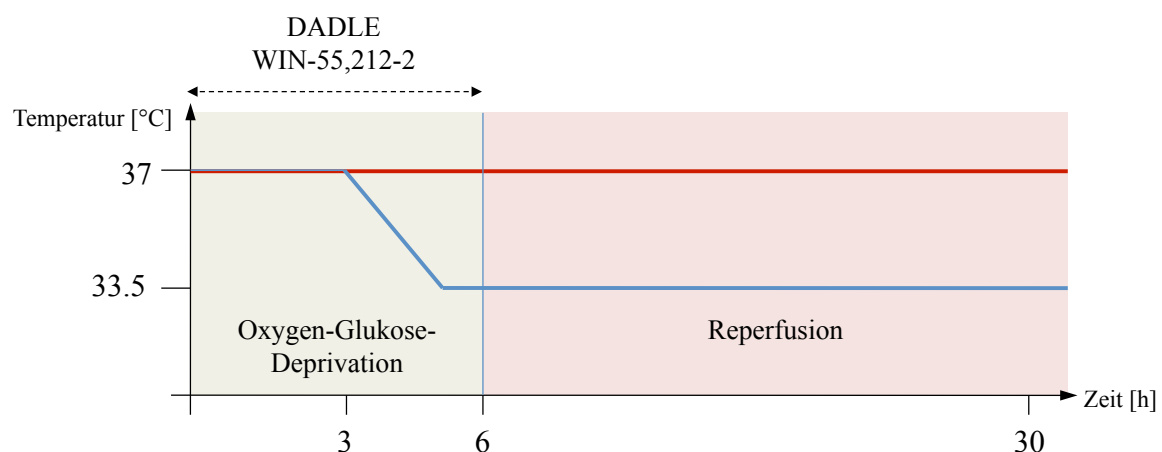


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Zeit-Temperatur-Protokolls des OGD/R-Experimentes der HT-22/BV-2 Co-Kultur. Rote Linie: normotherme Versuchsgruppe; blaue Linie: hypotherme Versuchsgruppe.

3.1.5 Phasenkontrastmikroskopie

Zur Beurteilung der morphologischen Reaktion der HT-22/BV-2 Co-Kultur auf die OGD/R-Schädigung und die TH wurden die Zellen 48 h nach Ausplattierung entsprechend dem Zeit-Temperatur-Protokoll (Abb. 1) prozessiert. Nach Durchführung des Protokolls erfolgte eine weitere Inkubation für 18 h bei normoxen Bedingungen und 37 °C bis phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen der Versuchsgruppen gemacht wurden.

3.1.6 Applikation von DADLE und WIN-55,212-2 in der HT-22/BV-2 Co-Kultur

Zur Ermittlung der Dosierung der Wirkstoffe DADLE und WIN-55,212-2 in der Co-Kultur konnte nicht auf Literaturangaben zurückgegriffen werden. Daher musste eine Konzentrationsreihe der jeweiligen Arzneistoffe auf ihre Zytotoxizität getestet werden.

Entsprechend dem Zeit-Temperatur-Protokoll für die OGD/R-Experimente in der Co-Kultur (Abb. 1) und dem geplanten Interventionszeitpunkt wurde der Wirkstoff in einer dezimalen Verdünnungsreihe in Mangelmedium für 6 h appliziert. Anschließend wurde das Medium zu Vollmedium ohne Wirkstoff gewechselt und wurden die Überstände zur Bestimmung der Zytotoxizität mittels Quantifizierung der Laktatdehydrogenase (LDH) gesammelt. Die LDH Aktivität im Überstand der Zellen korreliert mit dem Verlust der Zellintegrität und somit dem Zelltod. Die Bestimmung erfolgte wie unter 3.5 beschrieben. Die Normalisierung der Werte erfolgte gegen eine Kontrolle in Wirkstoff-freiem Mangelmedium zum 6 h und nach Mediumwechsel zum 30 h Zeitpunkt. Es erfolgte zudem eine Proteinextraktion, indem 200–300 μ l 1 \times Lane Marker Reducing Sample Buffer direkt auf die Kulturschalen gegeben wurden. Dies diente der Untersuchung des Einflusses der Wirkstoffe auf die RBM3 Proteinexpression. Die Analyse wurde entsprechend der unter 3.4 beschriebenen Methode durchgeführt. Die Applikation der Wirkstoffe im OGD/R-Experiment erfolgte zu Versuchsbeginn und für den 6-stündigen Zeitraum der OGD. Mit dem Mediumwechsel zu Vollmedium nach 6 h wurde auch der Wirkstoff eliminiert.

3.2 Zellkultur mit primären hippocampalen und corticalen Neuronen

3.2.1 Präparation und Kultivierung

C57/Bl6 Mäuse wurden von der Forschungseinrichtung für Experimentelle Medizin der Charité - Universitätsmedizin Berlin erworben. Die Mausembryonen wurden am 16. Embryonaltag (E16) aus den Uteri der Muttertiere herauspräpariert. Die Tiere wurden daraufhin dekapitiert und ihre Gehirne isoliert. Nach der Entfernung der Meningen erfolgte die Dissektion und Separation der Cortices und Hippocampi. Das gewonnene Gewebe wurde in Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) gewaschen und auf Eis gesammelt. Die Dissoziation des Gewebes erfolgte schließlich durch eine Trypsin-basierte Lyse (0,25 %, 1:250 verdünnt) der interzellulären Verbindungen und extrazellulären Matrix bei 37 °C. Der Verdau wurde nach etwa 15 min durch Austausch der

Verdaulösung mit Plattiermedium gestoppt. Durch Triturierung mit Hilfe einer hitzepolierten Pasteurpipette wurde eine Einzelzellsuspension erstellt. Nach der Sedimentation der Zellen wurden diese in frischem Plattiermedium mit einer Dichte von 34 000 Zellen/cm² ($3 \times 10^5/8,8 \text{ cm}^2$) in Petrischalen ausplattiert und bei einem 95 % Luft- und 5 % CO₂-Gasgemisch bei 37 °C in einem Brutschrank kultiviert. Die Petrischalen wurden zuvor mit 200 µg/ml PLL für 24 h vorbeschichtet und anschließend 3-mal mit phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) gewaschen. Nach 3 h wurde eine Adhärenz der Zellen erreicht und das Plattiermedium konnte durch Wachstumsmedium ersetzt werden. Die experimentelle Verwendung der Zellen erfolgte nach 10–11 Tagen *in vitro* (DIV 10–11). Entscheidend für die Beurteilung der *in vitro* Studien primärer Neurone ist das Alter der Zellen aufgrund der reifebedingten Expression spezifischer Rezeptoren und der Synaptogenese. Für diese Experimente wurden Zellen nach 10–11 Tagen *in vitro* verwendet, da in diesem Stadium die NMDA-Rezeptoruntereinheit NR1 und die AMPA-Rezeptoruntereinheit GluR2/GluR3 bereits maximal exprimiert sind ¹¹⁷. Diese Glutamatrezeptoren sind entscheidend bei der Vermittlung der Exzitotoxizität, einem der Hauptmechanismen der hypoxisch-ischämischen Schädigung der Neurone beteiligt. Ein Mediumwechsel während der präexperimentellen Periode erfolgte nicht.

PLATTIERMEDIUM	WACHSTUMSMEDIUM
Minimal Essential Medium (MEM)	Neurobasal Medium (NBM)
0,6 % Glukose	0,5 mmol/ml L-Glutamin
10 % Pferdeserum	2 % B-27
100 U/ml / 100 µg/ml Pen/Strep	100 U/ml / 100 µg/ml Pen/Strep
100 µg/ml Primocin	100 µg/ml Primocin

3.2.2 Fluoreszenzmikroskopie primärer Neurone

Zur Darstellung der Zellmorphologie und Untersuchung des Reinheitsgrades der primären neuronalen Zellkulturen wurde eine immunzytochemische Färbung durchgeführt. Dazu wurden die Zellen nach dem unter 3.2.1 beschriebenen Protokoll präpariert und für 4–5 Tage kultiviert. Das Medium wurde schließlich entfernt und die Zellen einmalig mit PBS gewaschen. Um die löslichen Antigene zu fixieren, wurden die Zellen daraufhin für 20 min bei Raumtemperatur mit 4 % Paraformaldehyd fixiert. Nach mehrmaligem Waschen mit einem Waschpuffer (0,1 % bovines

Serumalbumin (BSA) in PBS) wurden die Zellen mit 10 % Ziegenserum und 0,3 % Triton-X 100 in PBS permeabilisiert und unspezifische Proteinbindungen blockiert. Es erfolgte die Färbung mit dem neuronenspezifischen Antikörper β -Tubulin, welcher mit dem roten Farbstoff Alexa Fluor 647 markiert ist. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C und mit einer Verdünnung von 1:2000 in PBS mit 0,5 % BSA. Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer wurden die Zellkerne daraufhin mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) (1:4000 in PBS), interkalierend mit der DNA, gefärbt.

3.2.3 OGD/R und TH in primären hippocampalen und corticalen Neuronen

Die primären Kulturen wurden an DIV 10–11 verwendet. Zu Versuchsbeginn wurde das Wachstumsmedium zu OGD-Medium gewechselt und es erfolgte eine 24-stündige Inkubation bei 0 % O₂ und 5 % CO₂ (Abb. 2). Für die Kontrollgruppe erfolgte lediglich der Wechsel zu frischem Wachstumsmedium. Das OGD-Medium wurde 24 h vor Versuchsbeginn bei 0 % O₂ und 5 % CO₂ bei 37 °C präequilibriert. Nach OGD-Schädigung erfolgte der Wechsel zum Wachstumsmedium und der Rücktransfer in Inkubatoren mit 95 % Luft und 5 % CO₂. Diese Wiederherstellung der Sauerstoff- und Nährstoffversorgung simuliert die Milieuänderung während der Reperfusionphase und wird im Folgenden, wie bei den Co-Kultur-Experimenten, als Reperfusion bezeichnet. Die Kühlung auf 33,5 °C erfolgt für die hypotherme Versuchsgruppe von Beginn an in entsprechend temperierten Inkubatoren. Eine direkte Kühlung wurde gewählt, da zu weiteren Versuchsgruppen der Wirkstoff DADLE hinzugefügt wurde. Dieser konnte aus versuchstechnischen Gründen nur zu Beginn appliziert werden. Zudem war ein direkter Vergleich der Effekte der TH und des Wirkstoffes gewünscht, welcher durch den simultanen Beginn der Interventionen erleichtert wurde.

OGD-MEDIUM

HBSS

0,5 mmol/ml L-Glutamin

100 μ g/ml Primocin

100 U/ml / 100 μ g/ml Pen/Strep

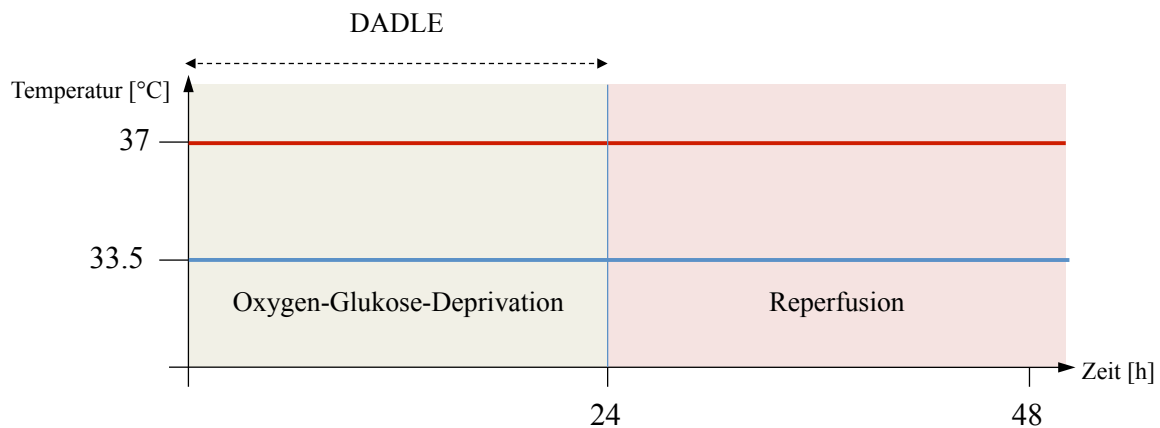


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Zeit-Temperatur-Protokolls des OGD/R-Experimentes primärer Neurone. Rote Linie: normotherme Versuchsgruppe; blaue Linie: hypotherme Versuchsgruppe.

3.2.4 Applikation von DADLE in den primären hippocampalen und corticalen Neuronen

Zur Ermittlung der adäquaten Dosis für eine DADLE-Intervention wurde eine Literaturrecherche durchgeführt. Auf eine Toxizitätstestung in den primären hippocampalen und corticalen Neuronenkulturen wurde aufgrund einer guten Studienlage und zur Einsparung von Versuchstieren verzichtet. Zhang et al. konnten zeigen, dass die Applikation von $10 \mu\text{M}$ DADLE während einer 24-stündigen hypoxischen Schädigung 8 Tage alter primärer corticaler Neurone den Schaden signifikant attenuieren kann⁹⁵. In einem vergleichbaren Modell hypoxischer Schädigung 8 Tage alter primärer corticaler Neurone von Kim et al. zeigte sich eine 24-stündige Vorbehandlung mit einer Konzentration von $10 \mu\text{M}$ DADLE vor einer 24-stündigen Sauerstoff-Deprivation als protektiv¹¹⁸. Basierend auf diesen Ergebnissen wurde für die folgenden Experimente mit hippocampalen und corticalen Neuronen eine Konzentration von $10 \mu\text{M}$ DADLE verwendet. Die Applikation des Opioids erfolgte zu Versuchsbeginn für die 24-stündige OGD-Schädigung entsprechend dem Zeit-Temperatur-Protokoll (Abb. 2). Anschließend wurde der Wirkstoff mit dem Wechsel zu Wachstumsmedium eliminiert.

3.3 Analyse der Genexpression

3.3.1 Isolierung und Aufreinigung von Protein und RNA

Die sukzessive Isolierung von RNA und Protein erfolgte unter Verwendung des peqGold TriFast Kits entsprechend der Anleitung des Herstellers. Die Aufreinigung und Isolierung basiert hierbei auf einer Guanidinisothiocyanat/Phenolmethode. Dazu wurden die Überstände der Versuchsschalen zunächst abgenommen und für weitere Analysen gesichert. Der Monolayer aus adhärennten Zellen wurde mit PBS gewaschen. Daraufhin wurde mit dem TriFast-Protokoll entsprechend den Herstellerangaben fortgefahren. Das aufgereinigte und getrocknete Proteinpellet wurde schließlich in 1 × Lane Marker Reducing Sample Buffer gelöst (100 μ l primären Zellen; 200–300 μ l Co-Kultur) und bei – 20 °C bis zur weiteren Analyse gelagert. Die RNA-Isolierung erfolgte entsprechend der Herstelleranleitung für die Proben der primären hippocampalen Neurone. Das getrocknete RNA-Pellet wurde anschließend in 10 μ l RNase-freiem Aqua bidest gelöst und bis zum weiteren Prozessieren bei – 80 °C gelagert.

3.3.2 Bestimmung der RNA-Konzentration

Die totale RNA-Konzentration der Proben wurde mit Hilfe des UV/Vis Spektrophotometers NanoDrop 2000c bestimmt. Dafür wurde 1 μ l der Proben auf die Messoberfläche pipettiert. Das Messprinzip dieser Methode ist die Bestimmung der konzentrationsabhängigen optischen Dichte der Probe bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260$ nm. Hier liegt das Maximum des substanzspezifischen Absorptionsspektrums von Nukleinsäuren. Eine Kontamination der Probe mit Proteinen wurde mittels der 260 nm/280 nm-Ratio überprüft und bei einem Verhältnis von 2,0 als rein betrachtet ¹¹⁹.

3.3.3 Reverse Transkription

Die RNA wurde mit dem High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit und einer darin enthaltenen MultiScribe reversen Transkriptase in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Dafür wurden 2 μ g der RNA-Proben mit 10 μ l cDNA Mastermix umgesetzt. Das Zeit-Temperatur-Programm der Umschreibung beinhaltete 10 min bei 25 °C, 120 min bei 37 °C gefolgt von 5 min bei 85 °C und schließlich die Kühlung der Proben auf 4 °C.

cDNA MASTERMIX

10 × reverse Transkriptase Puffer

25 × Desoxynucleosidtriphosphate (dNTP)

10 × reverse Transkriptase Random Primer

Multiscribe Reverse Transkriptase

RNase Inhibitor

Diethyldicarbonat-H₂O

3.3.4 *Quantitative RT-PCR*

Mit Hilfe der quantitativen Real-Time-Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR) wurden die Zielabschnitte der umgeschriebenen cDNA vervielfältigt und in Echtzeit quantifiziert. Die hier benutzte Methode beruht auf dem Einsatz einer TaqMan-Sonde. Diese besteht aus einem Oligonukleotid, welches am 5'-Ende ein fluoreszierendes Molekül (6-Carboxyfluorescein, FAM), den sogenannten Reporter trägt. Am 3'-Ende besitzt es zudem ein Quencher-Fluoreszenzmolekül (6-carboxy-tetramethylrhodamine, TAMRA). Ist die TaqMan-Sonde intakt und mit dem cDNA Einzelstrang hybridisiert, liegen die beiden Moleküle so dicht beieinander, dass das emittierte Licht des Reporters von dem Quencher absorbiert und somit ausgelöscht wird. Kommt es nun zur Duplikation des cDNA Stranges durch die Taq-Polymerase wird durch ihre Exonukleaseaktivität der Reporter vom Quencher getrennt und das emittierte Licht des FAM Farbstoffes kann detektiert werden. Je mehr DNA synthetisiert wird, desto stärker ist das FAM-Signal¹²⁰. Die Auswertung erfolgte aufgrund der C_T-Werte. Sie geben die Anzahl der erforderlichen PCR-Zyklen an, um das Fluoreszenzsignal der amplifizierten Probe über einem definierten Schwellenwert zu messen. Der C_T-Wert hängt von der Anzahl der cDNA Kopien in den Proben ab und wird in der exponentiellen Phase der Reaktionskinetik gemessen¹²¹. Als Referenzgen wurde die ubiquitär exprimierte Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) verwendet, ein Enzym der Glykolyse mit stabiler Genexpression. Es wurde zu der normoxen Versuchsgruppe bei 37 °C in Vollmedium des jeweiligen Versuchszeitpunktes normalisiert. Ein StepOnePlus™ Real-Time PCR System wurde verwendet. Die Reaktionszyklusparameter wurden wie folgt eingestellt: Zur Enzymaktivierung 2 min bei 50 °C gefolgt von 10 min bei 95 °C. Daraufhin 95 °C für 15 sek und 60 °C für 1 min über 40 Zyklen. Anschließend wurden die Proben auf 4 °C gekühlt.

Verwendete TaqMan-Sonden:

RBM3	<i>Mm01609819_g1</i>
GAPDH	<i>Mm99999915_g1</i>

3.4 Analyse der Proteinexpression

3.4.1 SDS-PAGE

Die Analyse der Proteinexpression von RBM3 erfolgte mittels einer 15%igen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE). Durch den Zusatz des Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) kommt es zur Auflösung höherer Eiweißstrukturen und der Entfaltung des Proteins in seine primäre Struktur. Der Zusatz der Substanz Dithiothreitol (DTT) führt zur Reduktion der Disulfidbrücken und vollständigen Denaturierung der Proteine, um die Trennung der Proteine aufgrund ihrer Molekularmasse zu gewährleisten¹²². Dazu wurden die extrahierten Proteine in Probenpuffer (300 μ l Co-Kultur-Proben; 100 μ l primäre Zellen-Proben) gelöst und bei 95 °C für 5 min gekocht. Daraufhin erfolgte eine kurze Zentrifugierung um das gesamte Probenvolumen am Boden der Eppendorfgefäße zu sammeln. Die Proben wurden nun in die Taschen des 15%igen Gels pipettiert (50 μ l Co-Kultur-Proben; 30 μ l primäre Zellen-Proben). Zur Zuordnung der aufgetrennten Proteinbanden zu einer Molekulargröße wurde Page Ruler Prestained Protein Ladder als Marker aufgetragen. Durch das Anlegen einer Spannung von 60 mV für etwa 20 min wurden die Proteinproben zunächst im Sammelgel konzentriert und schließlich bei 110 mV im Trenngel separiert.

3.4.2 Western Blot

Immunoblotting wurde genutzt um die RBM3 Proteinexpression zu untersuchen. Der Transfer der aufgetrennten Proteine auf eine Polyvinylidendifluorid-Membran (PVDF) erfolgte über Nacht in einem Tank Blotting Transfer System bei 4 °C entlang einer angelegten Stromspannung von 30 V. Der erfolgreiche Transfer der Proteine auf die PVDF-Membranen wurde mit Hilfe des Farbstoffs Ponceau S (0,1 % + 5 % Essigsäure) bestätigt. Die Membranen wurden daraufhin in 5 % Magermilch in PBS und 0,05 % Tween (PBST) für 1 h inkubiert. Dies diente der Blockade

unspezifischer Proteinbindungen. Die Inkubation mit dem primären polyklonalen Antikörper gegen RBM3 erfolgte mit einer 1:800 Verdünnung in dem oben genannten Blockpuffer über Nacht. Die Membranen wurden anschließend 3×10 min mit PBST gewaschen und mit einem Peroxidase-konjugierten Antikörper gegen Kaninchen IgG als sekundären Antikörper mit einer Verdünnung von 1:20 000 in PBST für 2 h inkubiert. Die Visualisierung der Proteinbanden erfolgte mit dem SuperSignal West Dura Chemiluminescent Substrate. Zur Ladungskontrolle wurden die Membranen in einem weiteren Schritt mit einem β -Actin Antikörper mit einer Verdünnung von 1:15 000 in 5 % Magermilch in PBST über Nacht inkubiert. Die Visualisierung dieses Antikörpers erfolgte ebenfalls mit dem oben genannten sekundären Antikörper für 2 h und einem ECL Western Blotting Substrat. Die Detektion des Chemilumineszenz-Signals, welches durch die Umsetzung des Substrats durch die an den sekundären Antikörper gekoppelte Peroxidase entsteht, wurde mit Hilfe eines ChemiDoc MP Systems durchgeführt.

Die densitometrische Quantifizierung wurde in der Image Lab Software durchgeführt. Die Normalisierung der RBM3 Proben erfolgte gegen die jeweilige Ladungskontrolle β -Actin, ein Strukturprotein, dessen Expression ubiquitär und stabil ist. Dieser Quotient wurde erneut gegen die Summe aller Quotienten aus RBM3 und β -Actin normalisiert wie von Degasperi et al.¹²³ beschrieben. Im Folgenden werden die Rezepturen für die Gele und Puffer der Western Blot Analyse aufgeführt.

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
ELEKTROPHORESEPUFFER	BLOTTINGPUFFER
Glycin, 250 mM	Glycin, 192 mM
TRIS-Base, 25 mM	TRIS-Base, 25 mM
SDS, 0,1 %	Methanol, 20 %
* Ammoniumperoxodisulfat (APS);	** Tetramethylethylendiamin (TEMED);
*** Tri-Hydroxymethyl-Aminomethan (TRIS)	

3.5 Zytotoxizitätsassay

Die ubiquitäre Laktatdehydrogenase (LDH) ist ein zytosolisches Enzym des Glukosestoffwechsels, das stabil exprimiert wird. Durch Verlust der Membranintegrität geschädigter Zellen wird dieses Enzym rasch freigesetzt, sodass seine Aktivität im Extrazellularraum zur Quantifizierung des Zelltodes herangezogen werden kann. In den Überständen der Zellkultur und der primären hippocampalen und corticalen Neurone wurde die

Aktivität der LDH mittels des Cytotoxicity Detection Kit gemessen. Es basiert auf dem kolorimetrischen Nachweis der LDH. Diese katalysiert eine Redoxreaktion, bei der Pyruvat zu Laktat oxidiert und NAD⁺ zu NADH/H⁺ reduziert wird. In einer zweiten enzymatischen Reaktion wird durch die entstandenen Protonen das in dem Testreagenz enthaltene gelbe 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, welches bei einem Absorptionsmaximum von 500 nm nach einer definierten Reaktionsdauer gemessen wird. Zu den entsprechenden Messzeitpunkten wurde das Zellmedium als Überstand abgenommen und bei 845 g für 5 min zentrifugiert, sodass der zellfreie Überstand isoliert werden konnte. Für die Messung wurden die Proben der Co-Kultur 1:5 mit dem entsprechenden Zellmedium der Versuchsgruppe verdünnt, während die Überstände der primären Zellen unverdünnt eingesetzt wurden. Die Messungen sind in einer Dreifachbestimmung durchgeführt worden. Das Probenvolumen wurde schließlich entsprechend der Anleitung des Herstellers mit der Reaktionslösung gemischt. Diese 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 im Dunkeln wurden die Proben bei 492 nm photometrisch ausgelesen. Von der gemessenen Absorption der Proben wurde jeweils der Leerwert des jeweils eingesetzten Mediums abgezogen. Die Darstellung der Werte und statistische Analyse erfolgte nach Normalisierung zur normoxen Kontrollgruppe bei 37 °C zum jeweiligen Versuchszeitpunkt.

3.6 Statistische Analyse

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe der GraphPad Prism Software. Für die Analyse der Western Blot Daten wurde der *unpaired t test* für den Vergleich der entsprechenden Gruppen wiederholt. Die Varianzanalyse des *1way ANOVA* mit *Bonferroni Posttest for selected pairs of columns* wurde für die Auswertung der Zytotoxizitäts-, sowie RT-qPCR-Daten verwendet. P-Werte < 0,05 wurden als signifikant betrachtet. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte +/- Standardabweichung dargestellt. Es wurde eine Normalverteilung der Daten angenommen.

4 Ergebnisse

4.1 Direkte HT-22/BV-2 Co-Kultur

4.1.1 Eine 6-stündige Schädigung durch OGD resultiert in signifikant mehr Zelltod als durch alleinigen Glukoseentzug

In einleitenden Experimenten wurde zunächst das Schädigungsmodell zur Simulation eines hypoxisch-ischämischen Ereignisses etabliert. Dazu wurde mittels LDH Quantifizierung das Ausmaß des Zelltodes infolge einer 6-stündigen Inkubation in glukosefreiem Mangelmedium im Vergleich zur Inkubation in Mangelmedium unter zusätzlich hypoxischen Bedingungen (0,2 % O₂) betrachtet. Unter den Versuchsbedingungen mit Mangelmedium und Hypoxie, im Sinne einer OGD, zeigte sich signifikant mehr Zelltod gemessen an der LDH Aktivität im Überstand. Der zusätzliche Entzug von Sauerstoff führte zu einem additiven Schaden. Es handelt sich also um ein valides Modell, welches eine Annäherung an eine hypoxisch-ischämische Schädigung darstellt¹²⁴. Daher wurde die OGD in den folgenden Experimenten verwendet (Abb. 1).

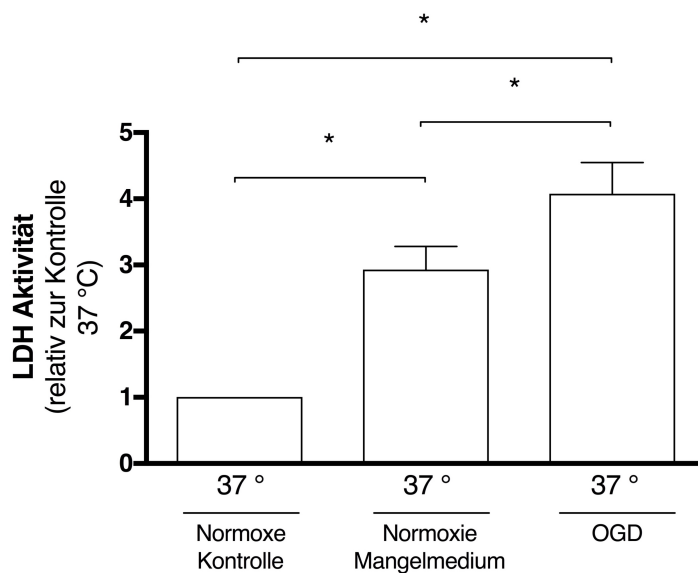


Abbildung 3: LDH Freisetzung in der HT-22/BV-2 Co-Kultur nach 6-stündiger OGD im Vergleich zu Glukose-Deprivation. Normoxie Kontrolle = DMEM + Glukose bei 21 % O₂; Mangelmedium = DMEM – Glukose bei 21 % O₂, OGD = DMEM - Glukose bei 0,2 % O₂. * = p < 0,05. 1 way ANOVA mit Bonferroni Post Test. n = 4.

4.1.2 TH schützt vor dem Schaden durch OGD/R

Unter Verwendung des Zeit-Temperatur-Protokolls (Abb. 1) in Anlehnung an das klinische Ereignis eines OHCA untersuchten wir den Einfluss einer 6-stündigen OGD gefolgt von einer 24-stündigen OGD/R auf den Zelltod. Zudem wurde TH simuliert und eine mögliche Protektion durch diese Intervention evaluiert. Es konnte gezeigt werden, dass die 6-stündige OGD die extrazelluläre LDH Aktivität zum Zeitpunkt direkt nach Schädigung, entsprechend den Vorversuchen (Abb. 3), signifikant erhöht (Abb. 4.A). Darüber hinaus zeigte sich eine späte Schädigung nach OGD/R (Abb. 4.B). Diese war in Folge der erfolgten 24-stündigen Wiederherstellung der Nährstoff- und Sauerstoffversorgung, also 30 h nach Versuchsbeginn, signifikant zu messen. Der Nachweis des zweigipfligen Zelltodes zeigt, dass es sich um ein valides *in vitro* Modell einer hypoxisch-ischämischen Schädigung, mit einem initialen Schaden sowie einem Reperfusionsschaden handelt. Ein protektiver Effekt der TH, im Sinne einer Reduktion der LDH Ausschüttung konnte erst nach OGD/R zum 30 h Zeitpunkt gemessen werden (Abb. 4.B). Die Kühlung, welche bereits intranschämisch nach 3-stündiger OGD initiiert wurde, konnte also keine signifikant messbare Reduktion des frühen Schadens bewirken. Allerdings ist zum 6 h Zeitpunkt bereits ein Trend zur Reduktion des Zelltodes durch TH zu verzeichnen (Abb. 4.A).

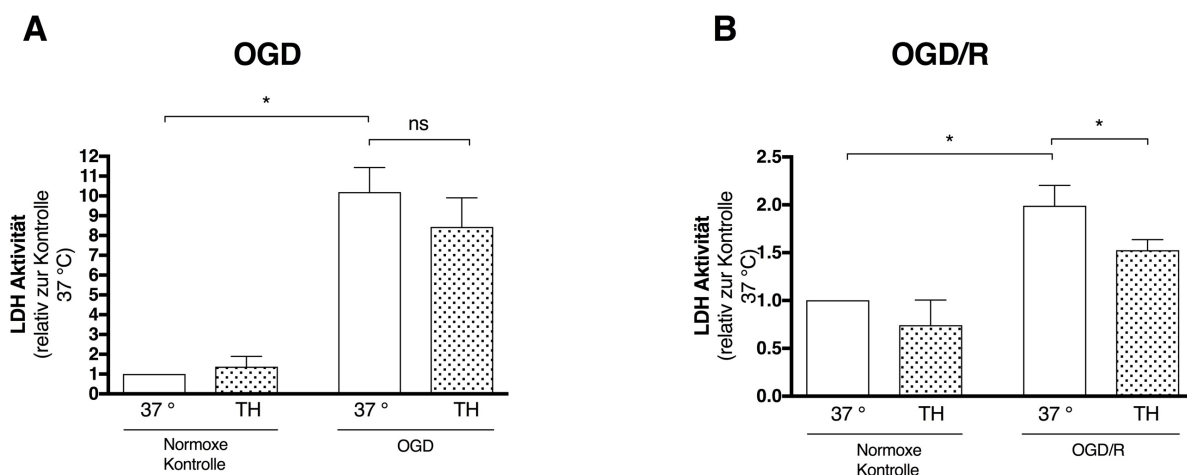


Abbildung 4: LDH Freisetzung in der HT-22/BV-2 Co-Kultur nach A) OGD nach 6 h und B) OGD/R nach 30 h. TH = therapeutische Hypothermie bei 33,5 °C; Normoxie Kontrolle = DMEM + Glukose bei 21 % O₂; OGD = DMEM - Glukose bei 0,2 % O₂; OGD/R = Vollmedium und Normoxie für 24 h nach vorangegangener OGD für 6 h. A) n = 3; B) n = 3. * = p < 0,05. 1way ANOVA mit Bonferroni Post Test.

4.1.3 OGD/R führt zur Migration der BV-2 Zellen in Richtung der HT-22 Zellen

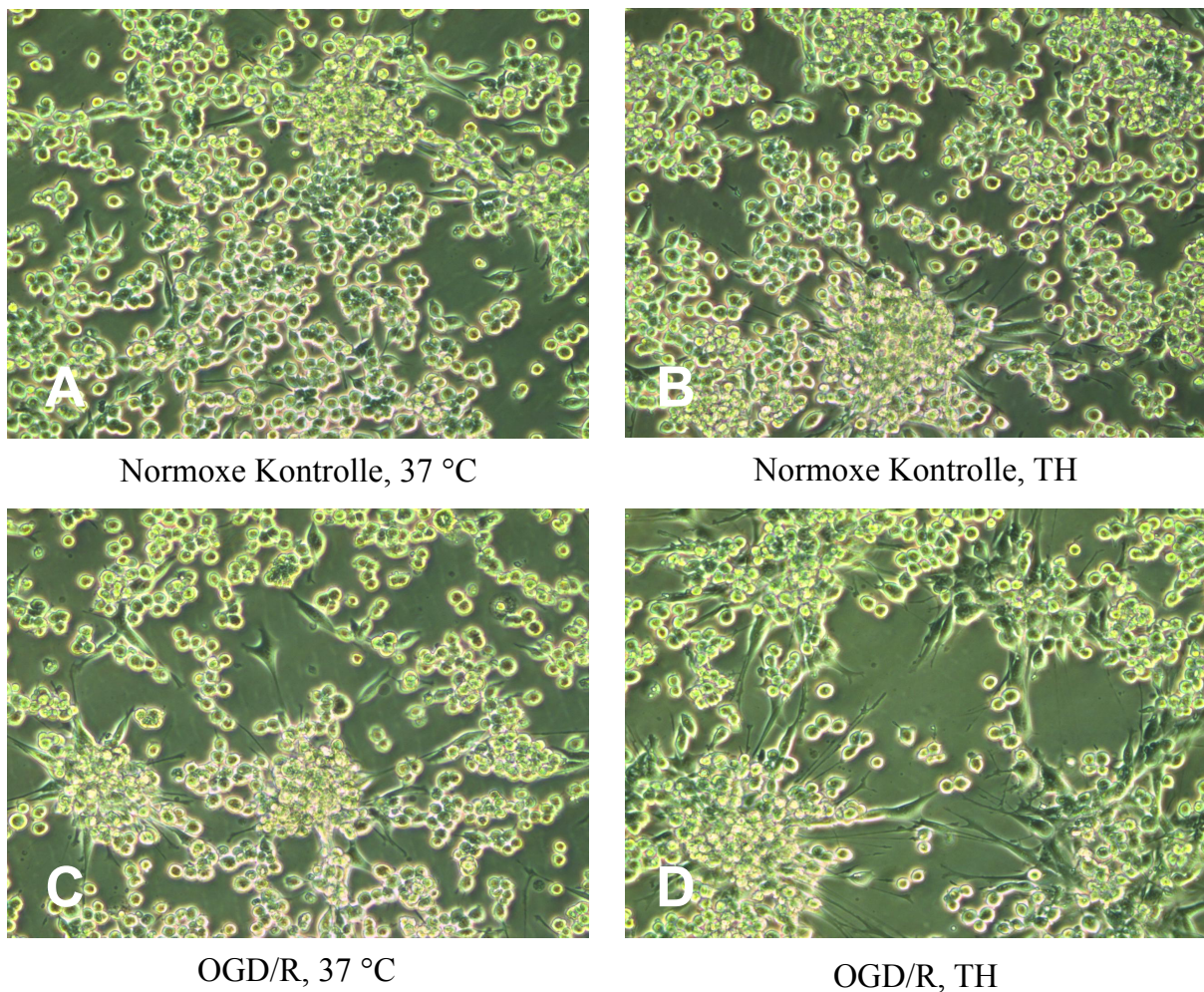


Abbildung 5: Einfluss des OGD/R-Experimentes auf die Morphologie der HT-22/BV-2 Co-Kultur. TH = therapeutische Hypothermie bei 33,5 °C; Normoxie Kontrolle = DMEM + Glukose bei 21 % O₂; OGD = DMEM - Glukose bei 0,2 % O₂; OGD/R = Vollmedium und Normoxie für 24 h nach vorangegangener OGD für 6 h. Für die Aufnahmen wurden die Kulturen nach Versuchsdurchführung für weitere 18 h bei 37 °C unter normoxen Bedingungen und mit Vollmedium inkubiert. 40-fache Vergrößerung.

Mittels der Phasenkontrastmikroskopie ließ sich die Morphologie der Co-Kulturen in Folge des OGD/R-Experimentes observieren. Dazu durchliefen die Versuchsgruppen das Zeit-Temperatur-Protokoll (Abb. 1) und wurden anschließend für weitere 18 h unter normoxen Bedingungen bei 37 °C und in Vollmedium kultiviert. Unter allzeitig normoxen Kontrollbedingungen bei 37 °C zeigte sich eine homogene Verteilung der BV-2 und HT-22 Zellen entsprechend des ausplattierten Verhältnisses (Abb. 5.A). Die HT-22 Zellen, erkennbar an den

langen Zellausläufern und sternförmigen Soma, bilden untereinander zahlreiche interzelluläre Verbindungen. Sie sind auf dem Kulturschalenuntergrund adhärent, während sie von den mikroglialen BV-2 Zellen gleichmäßig übersiedelt werden. Die BV-2 Zellen zeichnen sich durch ihren kleinen abgerundeten Zellkörper aus. In den durch OGD/R geschädigten Kulturen mit und ohne TH zeigte sich eine Abnahme der Zelldichte und eine clusterartige Neuordnung der Neurone (Abb. 5.C; D). Zudem konnte eine deutliche Reaktion der BV-2 Zellen im Sinne einer Migration in Richtung der Neuronengruppen beobachtet werden. Dies fand abgeschwächt auch unter normoxen aber gekühlten Versuchsbedingungen statt (Abb. 5.B). Diese Beobachtungen weisen auf eine zelluläre Interaktion der beiden Zelltypen und Änderung des Aktivierungsphänotyps der Mikrogliazellen als Reaktion auf die OGD/R in dem direkten Co-Kulturmodell hin.

4.1.4 Konzentrationsreihen von DADLE und WIN-55,212-2

Um die Versuchskonzentrationen von DADLE und WIN-55,212-2 zu bestimmen, wurde jeweils eine dezimale Konzentrationsreihe der Wirkstoffe im Rahmen des OGD/R Zeit-Temperatur-Protokolls getestet (Abb. 1). Die Wirkstoffkonzentrationen wurden entsprechend in Mangelmedium appliziert und nach 6 h durch reines Vollmedium ersetzt. Es folgte eine Nachbeobachtung für weitere 24 h. Es herrschten allzeitig normoxe Kulturbedingungen. Als Kontrolle wurde eine Co-Kultur unter gleichen Medium- und Inkubationsbedingungen, jedoch ohne Wirkstoff kultiviert. Ein LDH Assay wurde durchgeführt, um die Toxizität anhand des Zelltodes zu bestimmen. Für DADLE konnte in der getesteten Konzentrationsreihe in Kombination mit dem experimentell eingesetzten Mangelmedium weder zum 6 h noch zum 30 h Zeitpunkt eine signifikant nachweisbare Toxizität im Vergleich zur Kontrolle gefunden werden. Ähnlich verhielt es sich mit dem Wirkstoff WIN-55,212-2. Lediglich für eine Konzentration von 100 μ M WIN-55,212-2 ließ sich zum 30 h Zeitpunkt eine signifikante Zunahme des Zelltodes und somit Toxizität messen (Abb. 6).

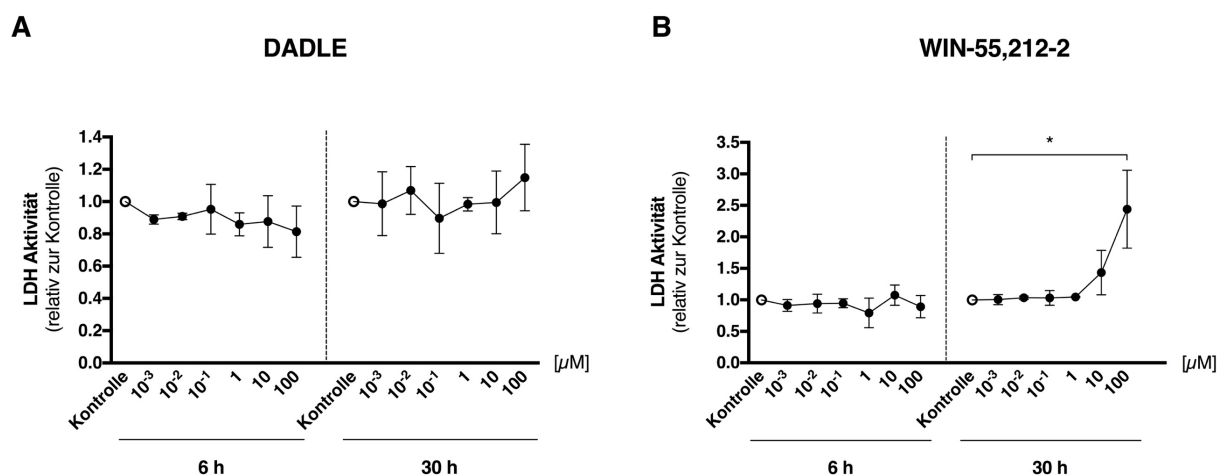


Abbildung 6: Toxizitätsprüfung für DADLE und WIN-55,212-2 mittels LDH Assay in der HT-22/BV-2 Co-Kultur. A) DADLE, B) WIN-55,212-2. Durchführung für alle Gruppen in Mangelmedium mit entsprechendem Wirkstoffzusatz für 6 h gefolgt von einem Mediumwechsel zu Vollmedium für eine 24-stündige Nachbeobachtung. Normalisierung zur Kontrolle (ohne Wirkstoff). n = 3.

4.1.5 DADLE und WIN-55,212-2 führen tendenziell zu einer reversiblen Suppression der Proteinexpression von RBM3

Weiterhin wurde in diesem Versuchsaufbau eine mögliche Regulation der Proteinexpression von RBM3, als potentieller Mediator der Neuroprotektion, mittels Western Blot Analyse untersucht. Es zeigte sich keine signifikante Veränderung der RBM3 Proteinexpression weder zum 6 h noch zum 30 h Zeitpunkt. Tendenziell war das RBM3 Level jedoch nach 6-stündiger Wirkstoffapplikation supprimiert. Die RBM3 Proteinexpression zum 30 h Zeitpunkt hatte sich jedoch auf Kontrollniveau erholt und zeigte gegebenenfalls eine leichte Tendenz zur Hochregulation für DADLE 10 nM sowie WIN-55,212-2 100 nM im Vergleich zu den übrigen Wirkstoffkonzentrationen (Abb. 7). In der Zusammenschau mit der im LDH Assay gezeigten ausbleibenden Toxizität dieser Wirkstoffkonzentrationen wurden diese für die weiteren Experimente ausgewählt. Eine RBM3 Proteinquantifizierung wurde in den Proben nach Inkubation mit 100 μM WIN-55,212-2 zum 30 h Zeitpunkt aufgrund des Materialverlustes durch Zelltod nicht durchgeführt.

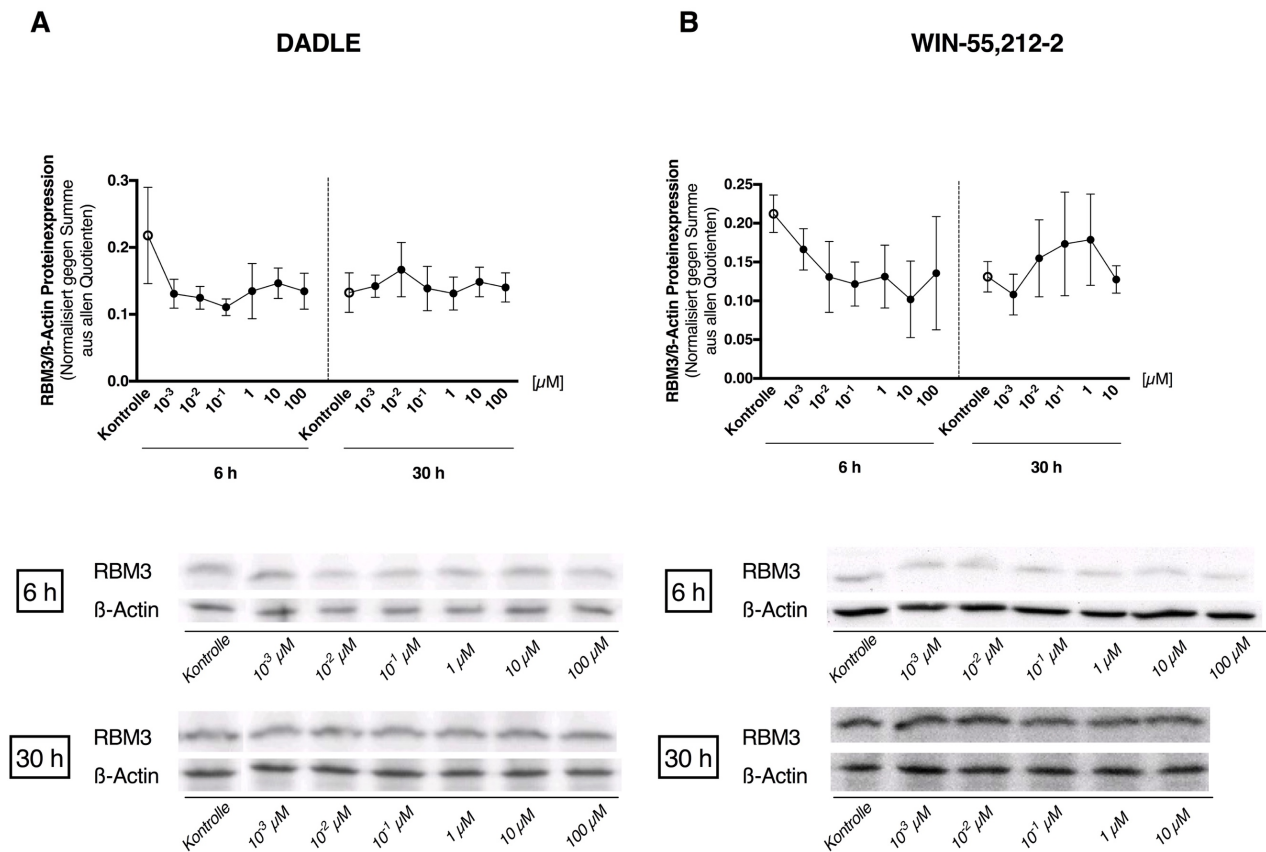


Abbildung 7: Regulation der RBM3 Proteinexpression durch DADLE und WIN-55,212-2 in der HT-22/BV-2 Co-Kultur. A) DADLE, B) WIN-55,212-2. Durchführung für alle Gruppen in Mangelmedium mit entsprechender Wirkstoffkonzentration für 6 h gefolgt von einem Mediumwechsel zu Vollmedium für eine 24-stündige Nachbeobachtung. Normalisierung zur Kontrolle (ohne Wirkstoff). n = 3.

4.1.6 10 nM DADLE wirken ebenso protektiv wie TH gegen den Schaden nach OGD/R; WIN-55,212-2 zeigt weder einen alleinigen noch additiven protektiven Effekt in Kombination mit TH

Das OGD/R-Experiment der Co-Kultur wurde mit dem Zusatz von 10 nM DADLE respektive 100 nM WIN-55,212-2 zur Untersuchung des protektiven Potentials der Substanzen mit und ohne zusätzliche TH wiederholt. Die Applikation der Wirkstoffe erfolgte jeweils zu Versuchsbeginn simultan mit dem Beginn der Schädigung durch OGD (Abb. 1). Nach 6 h erfolgte dann die Wiederherstellung der Sauerstoff- und Nährstoffversorgung, im Sinne einer Reperfusion. Durch den Wechsel zu reinem Vollmedium erfolgte die Eliminierung des jeweiligen Wirkstoffes. Die Kulturen wurden in normoxen Inkubatoren transferiert. Zum 6 h Zeitpunkt zeigte sich in allen Versuchsgruppen ein Trend zu geringerer LDH Ausschüttung in den jeweils gekühlten Kulturen. Es fand sich jedoch kein Hinweis auf einen alleinigen oder zusätzlich protektiven Effekt der

Wirkstoffe DADLE und WIN-55,212-2 nach 6 h. Nach OGD/R beobachteten wir neben der bereits beschriebenen Protektion durch TH (Abb. 4.B) eine signifikante Reduktion des Zelltodes durch die singuläre Applikation des Opioids DADLE. Dieser Effekt war jedoch der Protektion durch TH nicht überlegen. Die Kombination des Opioids mit der TH brachte außerdem keinen additiven Schutz im Vergleich zu alleiniger TH. Das Cannabinoid WIN-55,212-2 hingegen reduzierte den Zelltod nur in Kombination mit TH. Im Vergleich zur TH allein war jedoch auch hier kein signifikant additiver Effekt zu messen. Lediglich eine Tendenz zur additiven Reduktion ließ sich beobachten (Abb. 8).

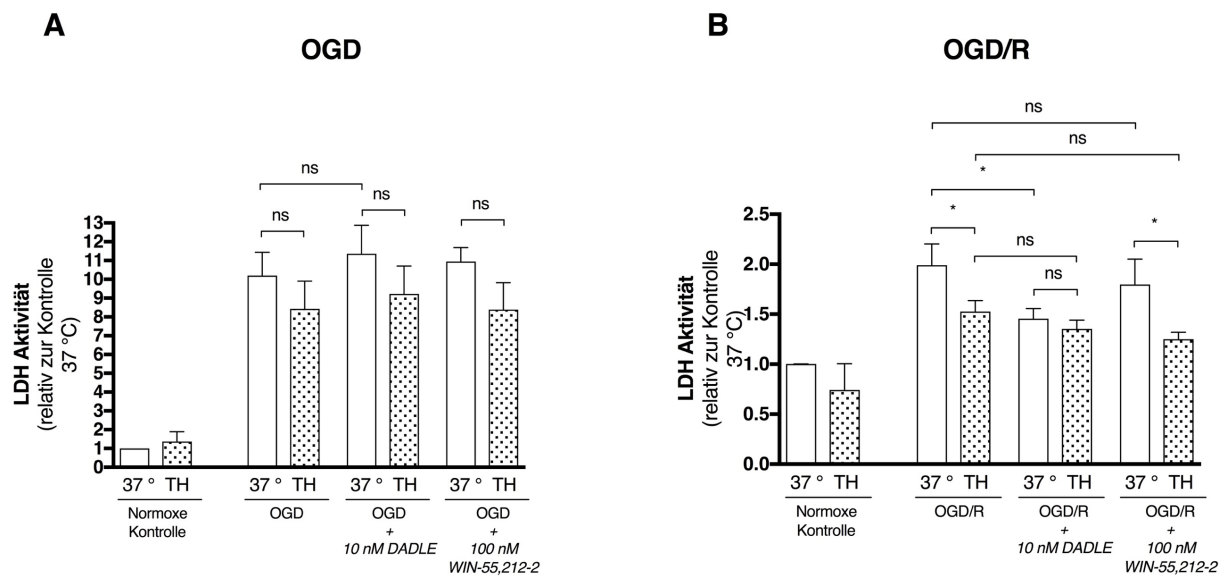


Abbildung 8: LDH Freisetzung in der HT-22/BV-2 Co-Kultur nach A) OGD nach 6 h und B) OGD/R nach 30 h unter Zusatz von 10 nM DADLE respektive 100 nM WIN-55,212-2. TH = therapeutische Hypothermie bei 33,5 °C; Normoxie Kontrolle = DMEM + Glukose bei 21 % O₂; OGD = DMEM - Glukose bei 0,2 % O₂; OGD/R = Vollmedium und Normoxie für 24 h nach vorangegangener OGD für 6 h. A) n = 3; B) n = 3. * = p < 0,05. 1way ANOVA mit Bonferroni Post Test.

4.1.7 TH führt mit und ohne DADLE zu einer Induktion der RBM3 Proteinexpression nach OGD/R

Zur Untersuchung, ob die beobachtete Protektion der Co-Kultur vor dem späten Schaden nach OGD/R mit einer verstärkten RBM3 Proteinexpression einhergeht, wurde eine Western Blot Analyse durchgeführt. Nach 6-stündiger OGD ist das RBM3 Level gegenüber der normoxen Kontrolle allgemein signifikant reduziert. Es konnte jedoch eine signifikant erhöhte Expression des Proteins nach OGD und TH gegenüber der normothermen Vergleichsgruppe gemessen

werden. In der Gruppe nach TH und DADLE Applikation unter OGD war lediglich ein Trend zur Mehrexpression von RBM3 im Vergleich zum normothermen Pendant zu verzeichnen. Dieser Effekt zeigte sich nicht in den Kulturen, die zusätzlich zur TH den Wirkstoff WIN-55,212-2 erhielten. Auch die alleinige Wirkstoffapplikationen von DADLE oder WIN-55,212-2 ohne TH führte nicht zu einer Mehrexpression des untersuchten Kälteschockproteins. Nach OGD/R zum 30 h Zeitpunkt zeigte sich eine signifikante Hochregulation der RBM3 Proteinexpression infolge TH. Ferner fand sich eine signifikante Mehrexpression in der Versuchsgruppe, welche die Kombination DADLE und TH erhalten hatte. Interessanterweise konnte in den Kulturen, die DADLE allein erhielten, trotz des gezeigten signifikant reduzierten Zelltodes (Abb. 8.B), keine Hochregulation der RBM3 Expression gemessen werden. Die Kulturen nach WIN-55,212-2 Applikation zeigten weder mit noch ohne TH eine verstärkte RBM3 Proteinexpression. In den normoxen Kontrollen konnte nach 30 h eine deutliche Tendenz zur Mehrexpression von RBM3 beobachtet werden, diese war jedoch statistisch nicht signifikant.

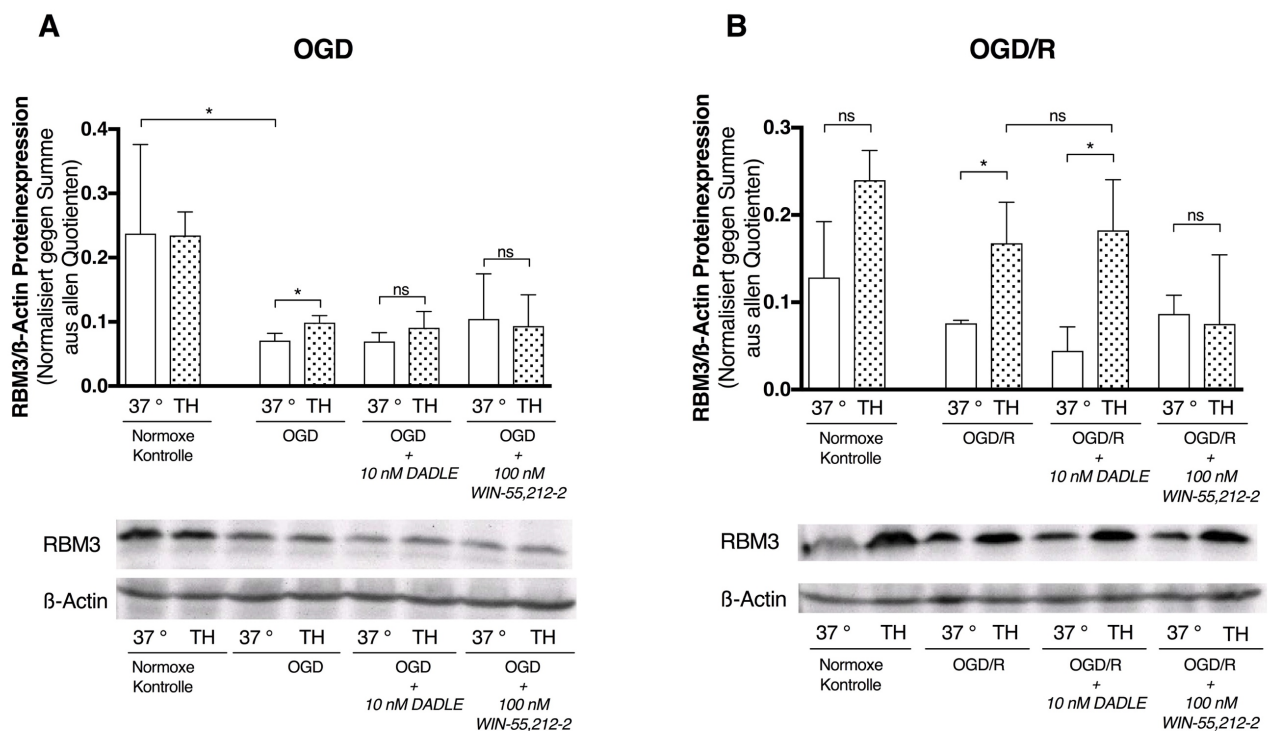


Abbildung 9: RBM3 Proteinexpressionslevel in der HT-22/BV-2 Co-Kultur nach A) OGD nach 6 h und B) OGD/R nach 30 h unter Zusatz von 10 nM DADLE respektive 100 nM WIN-55,212-2. TH = therapeutische Hypothermie bei 33,5 °C; Normoxe Kontrolle = DMEM + Glukose bei 21 % O₂; OGD = DMEM - Glukose bei 0,2 % O₂; OGD/R = Vollmedium und Normoxie für 24 h nach vorangegangener OGD für 6 h. A) n = 3; B) n = 3. * = p < 0,05. Repeated unpaired t test.

4.2 Primäre corticale und hippocampale Neurone

4.2.1 Reinheit und Morphologie der primären Neuronenkultur

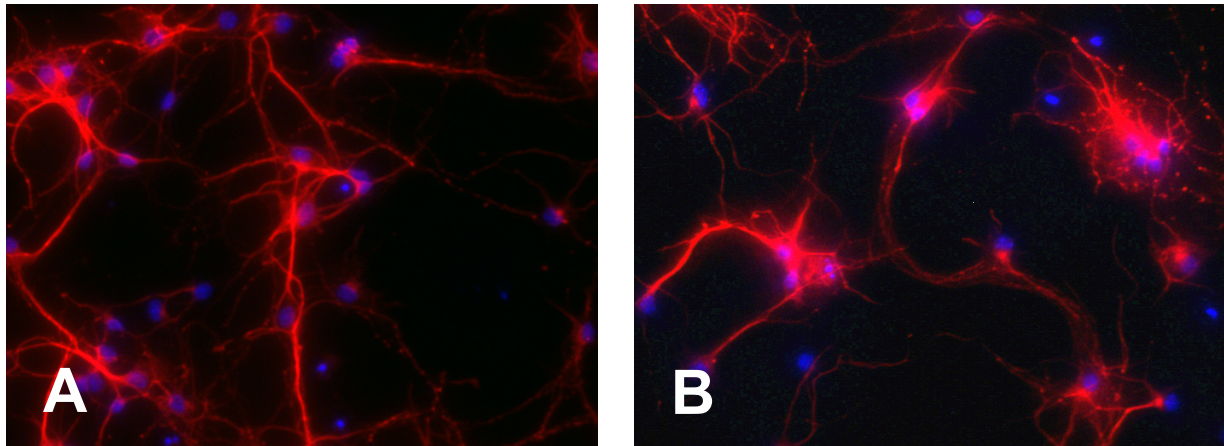


Abbildung 10: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen primärer corticaler Neurone nach A) 4 Tagen *in vitro* und B) 5 Tagen *in vitro*. Färbung mit β -Tubulin (Rot) und DAPI (Blau). 40-fache Vergrößerung.

Zur weiteren Untersuchung der neuroprotektiven Effekte der TH und des Wirkstoffes DADLE präparierten wir separate primäre Kulturen corticaler und hippocampaler Neurone. Die primären Zellkulturen sind genetisch nicht modifiziert oder immortalisiert und gelten daher als höherwertigere Modelle für *in vitro* Studien. Die exemplarischen fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigen primäre corticale neuronale Kulturen nach DIV 4–5. Anhand der spezifischen Färbung mit β -Tubulin für neuronale Strukturen und DAPI für Nuclei ist zu sehen, dass es sich nicht um eine reine Kultur neuronaler Zellen handelt. Zellkerne, hier in Blau, sind auch unabhängig von neuronalen Strukturen, hier in Rot, zu sehen (Abb. 10). Eine Quantifizierung des Reinheitsgrades ist nicht erfolgt.

4.2.2 Primäre corticale Neurone zeigen nur einen Schaden nach OGD/R; TH und DADLE sind nicht protektiv

Aufgrund des unterschiedlichen Verhaltens der primären Zellen auf die OGD/R-Schädigung wurde das Zeit-Temperatur-Protokoll modifiziert (Abb. 2). In Anlehnung an die Protokolle der Studien von Zhang et al. und Kim et al., wurde eine 24-stündige Schädigungsdauer gefolgt von einer 24-stündigen Nachbeobachtung nach Wiederherstellung der Sauerstoff- und Nährstoffversorgung (Abb. 2) durchgeführt^{95,118}. Die TH wurde bereits zu Experimentbeginn

initiiert um die Effekte mit denen der zu Beginn applizierten Substanz DADLE vergleichen zu können. Basierend auf der Literaturrecherche wurde DADLE in einer 10 μ M Konzentration eingesetzt (siehe 3.2.4) ^{95,118}. Auf eine ausführliche Toxizitätstestung mittels einer Konzentrationsreihe wurde zur Minimierung der erforderlichen Versuchstierzahl bei guter Datenlage verzichtet. WIN-55,212-2 wurde aufgrund des ausbleibenden Nachweises der Neuroprotektion in der HT-22/BV-2 Co-Kultur nicht weiter untersucht.

In den Kulturen der corticalen Neurone zeigte sich nach OGD-Schädigung kein mittels LDH Assay messbarer direkter Schaden. Erst zum späten 48 h Zeitpunkt, nach OGD/R, erwies sich die LDH Aktivität in den Versuchsgruppen als signifikant höher als in der Kontrollgruppe. Weder die TH, noch der Wirkstoff DADLE oder die Kombination aus beidem konnte eine Reduktion der LDH Ausschüttung erzielen (Abb. 11).

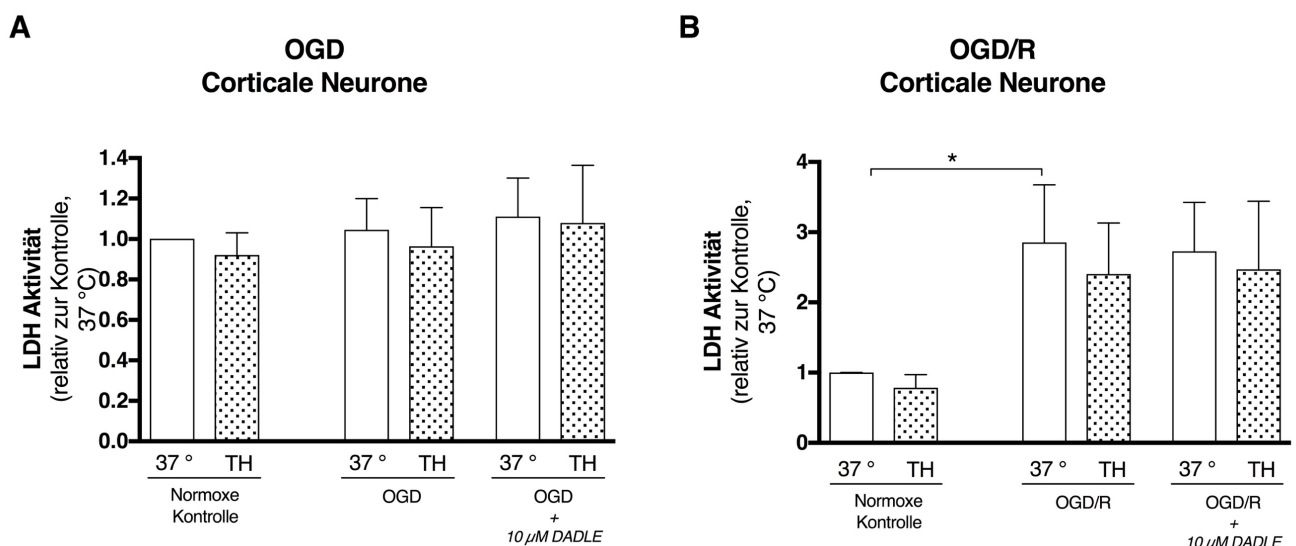


Abbildung 11: LDH Freisetzung in primären corticalen Neuronen nach A) OGD nach 24 h und B) OGD/R nach 48 h unter Zusatz von 10 μ M DADLE. TH = therapeutische Hypothermie bei 33,5 °C; Normoxie = 21 % O₂, Vollmedium = Wachstumsmedium; OGD = OGD-Medium bei 0,2 % O₂; OGD/R = Vollmedium und Normoxie für 24 h nach vorangegangener OGD für 24 h. A) n = 4-6; B) n = 4-6. * = p < 0,05. 1way ANOVA mit Bonferroni Post Test.

4.2.3 Primäre hippocampale Neurone sind signifikant geschädigt nach OGD und OGD/R; die Kombination aus DADLE und TH ist protektiv

Ebenso wie die corticalen Neurone wurden die hippocampalen Neurone entsprechend dem OGD Protokoll für primäre Zellen behandelt (Abb. 2). Nach 24-stündiger OGD ist hier bereits ein signifikant erhöhter Zelltod anhand der LDH Aktivität messbar. Keine der getesteten

Interventionen, TH, DADLE oder die Kombination aus beidem, konnten eine Reduktion der LDH Ausschüttung erzielen. Nach weiteren 24 h in Folge OGD/R ist jedoch ein protektiver Effekt der Kombination DADLE plus TH anhand eines signifikant erniedrigten LDH Levels zu messen. Die alleinige TH kann den Zelltod ebenso wenig wie DADLE allein reduzieren (Abb. 12). Aufgrund der größeren Sensitivität der hippocampalen Neurone auf die OGD/R-Schädigung, nach dem hier verwendeten Zeit-Temperatur-Protokoll, im Vergleich zu den corticalen Zellen¹²⁵, wurden im Folgenden nur die hippocampalen Neurone weiter untersucht.

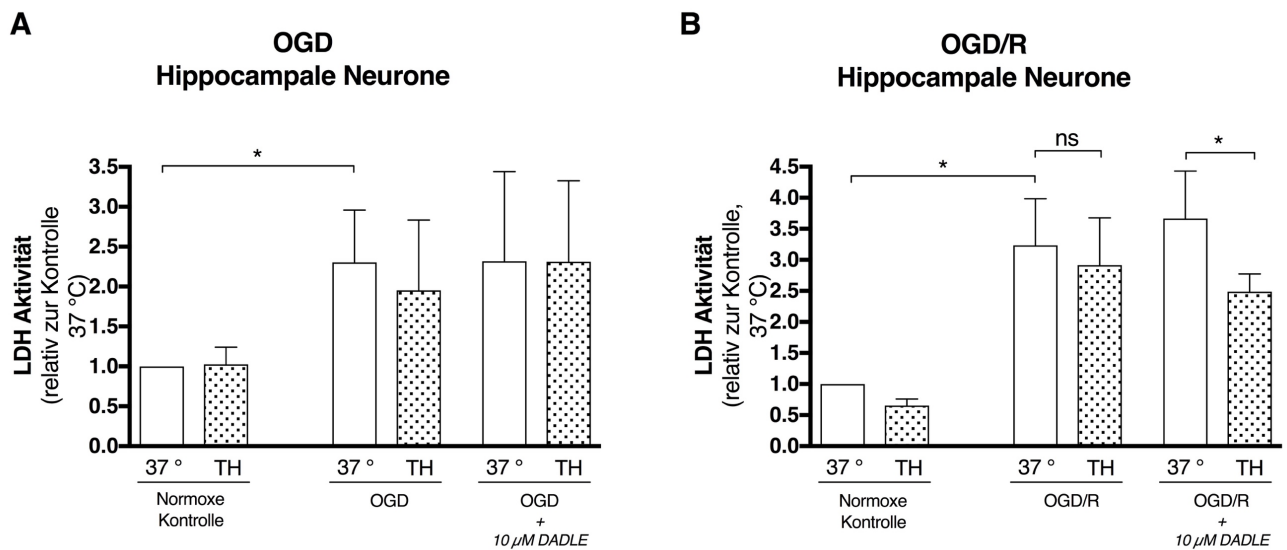


Abbildung 12: LDH Freisetzung in primären hippocampalen Neuronen nach A) OGD nach 24 h und B) OGD/R nach 48 h unter Zusatz von 10 μM DADLE. TH = therapeutische Hypothermie bei 33,5 °C; Normoxie = 21 % O₂, Vollmedium = Wachstumsmedium; OGD = OGD-Medium bei 0,2 % O₂; OGD/R = Vollmedium und Normoxie für 24 h nach vorangegangener OGD für 24 h. A) n = 4-6; B) n = 4-6. * = p < 0,05. 1way ANOVA mit Bonferroni Post Test.

4.2.4 Die RBM3 mRNA Transkription in hippocampalen Neuronen nach OGD ist induziert infolge TH und TH plus DADLE

Um zu eruieren, ob der reduzierte Zelltod durch die Kombination DADLE und TH in den primären hippocampalen Zellen mit einer RBM3 Induktion auf Transkriptionsebene einhergehend führten wir eine RT-qPCR durch. Zum 24 h Zeitpunkt nach OGD zeigten alle Versuchsgruppen, die TH allein oder in Kombination mit dem Opioid DADLE erhalten hatten, eine signifikante Hochregulation der RBM3 mRNA gegenüber ihren ungekühlten Vergleichsgruppen. Das mRNA Level war in den Kulturen nach der Kombination TH und DADLE tendenziell höher als nach alleiniger TH, wobei dieser Unterschied statistisch nicht signifikant war. Zum 48 h Zeitpunkt, nach OGD/R, war

lediglich ein Trend zur verstärkten RBM3 Genexpression in den Versuchsgruppen nach TH zu beobachten (Abb. 13).

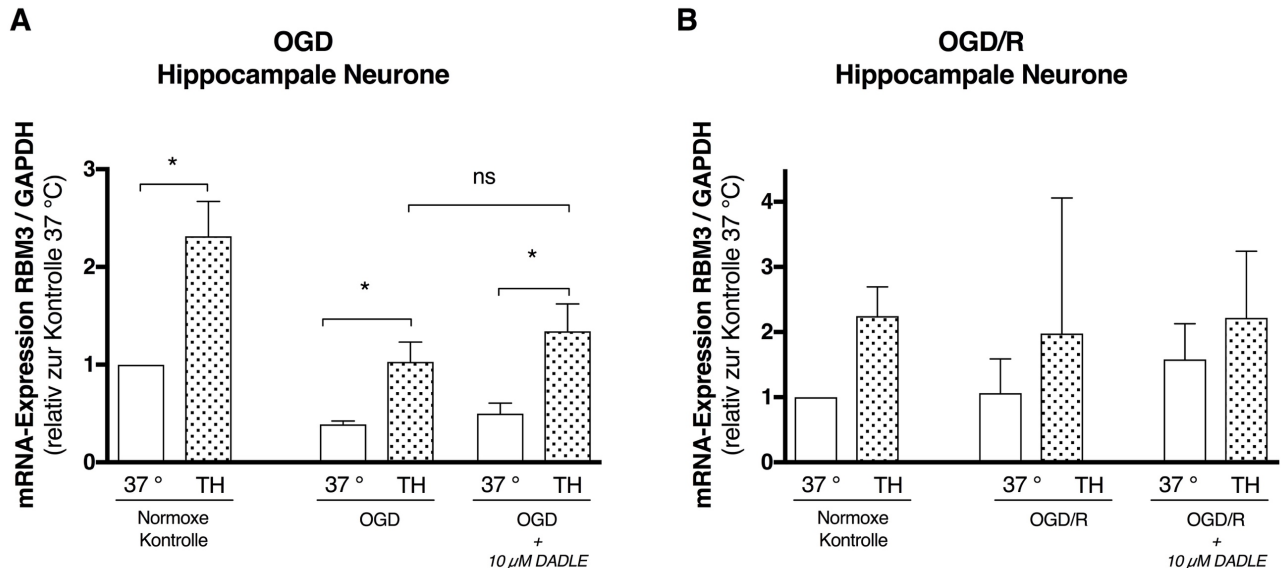


Abbildung 13: RBM3 mRNA Expression in primären hippocampalen Neuronen nach A) OGD nach 24 h und B) OGD/R nach 48 h unter Zusatz von 10 μ M DADLE. TH = therapeutische Hypothermie bei 33,5 °C; Normoxie = 21 % O₂, Vollmedium = Wachstumsmedium; OGD = OGD-Medium bei 0,2 % O₂; OGD/R = Vollmedium und Normoxie für 24 h nach vorangegangener OGD für 24 h. A) n = 3; B) n = 3. * = p < 0,05. 1way ANOVA mit Bonferroni Post Test.

4.2.5 TH plus DADLE führt zu einer früheren Induktion der RBM3 Proteinexpression als TH allein in primären hippocampalen Neuronen unter OGD

Mittels einer Western Blot Analyse wurde darüber hinaus die Translation der RBM3 mRNA Information in Protein in den hippocampalen Neuronen untersucht. Zum 24 h Zeitpunkt nach OGD-Schädigung zeigte sich eine generelle Suppression des RBM3 Proteinlevels in den Versuchsgruppen, welche der OGD ausgesetzt waren, gegenüber der normoxen Kontrolle. Im Vergleich zum ungekühlten Pendant fand sich jedoch eine signifikante Mehrexpression von RBM3 in der DADLE plus TH Versuchsgruppe. Reine TH führte nach 24 h nur tendenziell zu einer Mehrexpression des Kälteschockproteins RBM3 gegenüber seiner ungekühlten Vergleichsgruppe. Nach 48 h, in Folge OGD/R, war dieser Unterschied als signifikant zu messen. Hingegen ließ sich die Hochregulation von RBM3 nach DADLE Applikation und TH gegenüber normothermer DADLE Applikation zu diesem Zeitpunkt nicht mehr nachweisen. In den primären

Neuronen, welche keine OGD Schädigung erhalten hatten zeigte sich eine signifikante Hochregulation der Proteinexpression nach Kühlung zum 48 h Zeitpunkt.

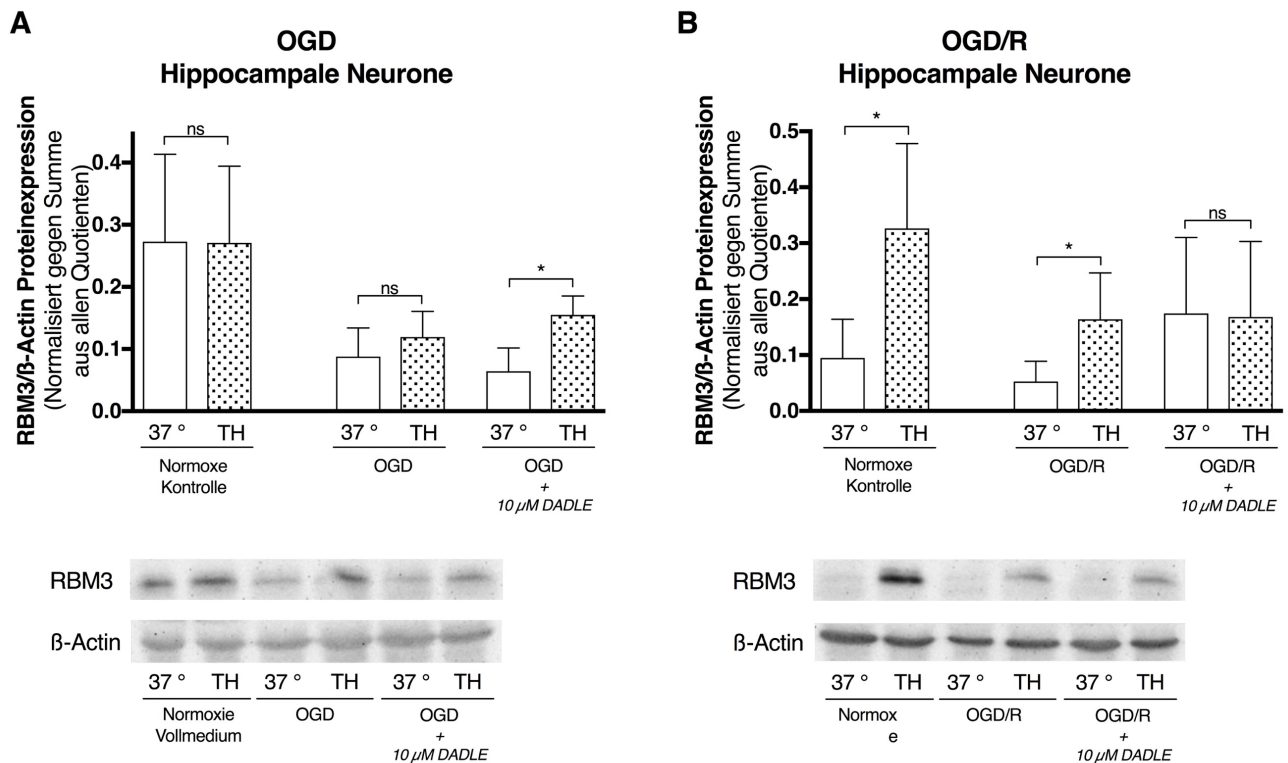


Abbildung 14: RBM3 Proteinexpressionslevel in primären hippocampalen Neuronen nach A) OGD nach 24 h und B) OGD/R nach 48 h unter Zusatz von 10 μ M DADLE. TH = therapeutische Hypothermie bei 33,5 °C; Normoxie = 21 % O₂, Vollmedium = Wachstumsmedium; OGD = OGD-Medium bei 0,2 % O₂; OGD/R = Vollmedium und Normoxie für 24 h nach vorangegangener OGD für 24 h. A) n = 4; B) n = 4. * = p < 0,05. Repeated unpaired t test.

5 Diskussion

TH ist die älteste etablierte Therapie zur Neuroprotektion im Rahmen einer hypoxisch-ischämischen Schädigung. Für die perinatale Asphyxie, sowie für den Herzkreislaufstillstand bei Erwachsenen ist sie als therapeutisches Konzept etabliert und in die Leitlinien der Fachgesellschaften integriert. Trotz der klinischen Evidenz und der vielversprechenden Daten aus *in vivo* und *in vitro* Studien ist die Translation in die klinische Praxis für den Herzkreislaufstillstand bei Kindern noch nicht vollständig vollzogen. Insbesondere der pädiatrische OHCA ist ein Ereignis mit hoher Mortalität und Morbidität aufgrund des schweren hypoxisch-ischämischen Hirnschadens, für den bisher keine therapeutische Intervention zur

Verfügung steht. Ein genaueres Verständnis der Mechanismen der Hypothermie-induzierten Neuroprotektion ist dringend erforderlich, um eine Optimierung, effektive Anwendung und schließlich breite Translation dieser therapeutischen Intervention in die Klinik zu gewährleisten. Die Aufdeckung und das Verständnis der zugrunde liegenden zellulären und systemischen Prozesse im Rahmen der TH ist außerdem der Schlüssel zu Entwicklung alternativer oder synergistischer Strategien zur Neuroprotektion.

In dieser Arbeit wurden die Effekte der TH in zwei Zellkulturmodellen bestehend aus Neuronen und Mikrogliazellen, sowie primären hippocampalen und corticalen Neuronen untersucht. Ein besonderer Fokus lag dabei auf der Eruierung der Rolle des Proteins RBM3, als potentieller zentraler Mediator der Hypothermie-induzierten Neuroprotektion im Rahmen einer OGD/R. Darüber hinaus wurden die Wirkstoffe DADLE und WIN55,212-2 auf ihr neuroprotektives Potential untersucht und analysiert, ob RBM3 auch hier an der Vermittlung eines protektiven Effektes beteiligt sein könnte.

5.1 Etablierung eines *in vitro* OGD/R-Schädigungsmodells

5.1.1 OGD/R-Schädigung in der HT-22/BV-2 Co-Kultur

Der 6-stündige Entzug von Sauerstoff und Glukose in Form der OGD führte in der HT-22/BV-2 Co-Kultur zu einem signifikant größeren Schaden als der Entzug von Sauerstoff allein (Abb. 3). Bei der OGD handelt es sich um ein etabliertes Modell einer hypoxisch-ischämischen Schädigung *in vitro*¹²⁵, welches daher in der Zellkultur dieser Arbeit angewandt wurde. Auch die Zellschädigung durch OGD/R war zum 30 h Zeitpunkt signifikant messbar (Abb. 4). Diese zweigipflige Schädigung spiegelt das pathophysiologische Konzept der hypoxisch-ischämischen Hirnschädigung wieder, welches initial durch Energiedefizit und nekrotischen Zelltod geprägt ist und später durch oxidativen Stress, Inflammation sowie den apoptotischen Zelltod in Folge der Reperfusion dominiert wird¹⁴. Das Design des Zeit-Temperatur-Protokolls erfolgte in Anlehnung an das klinische Ereignis des pädiatrischen OHCA unter der Berücksichtigung, dass eine bereits intraintrischämisch initiierte Kühlung in *in vitro* Modellen zu einem größeren protektiven Effekt führt^{54,64,126,127}. Zudem gilt zu beachten, dass *in vivo* das zerebral hypoxisch-ischämische Ereignis selbst nach der Wiederherstellung des Kreislaufes für mehrere Stunden persistieren kann. Dies resultiert aus einer inadäquaten Sauerstoffversorgung des Gehirns in der Post-Reanimationsphase¹²⁸. Bei

einer frühen Initiierung der Kühlung findet die TH *in vivo* also noch unter zerebralen hypoxisch-ischämischen Bedingungen statt, sodass durch einen intraintrischämischen Kühlungsbeginn in dem hier genutzten *in vitro* Modell eine bessere Annäherung an das klinische Ereignis anzunehmen ist.

5.1.2 OGD/R-Schädigung in primären Neuronen und selektive Vulnerabilität primärer hippocampaler und corticaler Neurone

Die Durchführung der OGD/R Experimente mit den primären hippocampalen und corticalen Neuronen führte zu einem sehr divergierenden Ausmaß an Zelltod in den beiden Zellpopulationen. So zeigten die corticalen Neurone erst nach OGD/R zum 48 h Zeitpunkt einen signifikanten Zelltod im Vergleich zur Kontrollgruppe. Nach 24-stündiger OGD hingegen war keine Zunahme des Zelltodes messbar (Abb. 11). Im Gegensatz dazu zeigten die hippocampalen Neurone bereits nach 24-stündiger OGD einen signifikanten Anstieg der LDH Ausschüttung, welcher auch nach OGD/R zum 48 h Zeitpunkt noch bestehen blieb (Abb. 12). Während bei den corticalen Neuronen ein protektiver Effekt weder durch TH noch durch DADLE gezeigt werden konnte, war die Kombination aus TH und 10 μ M DADLE protektiv gegen den OGD/R-Schaden in den primären hippocampalen Neuronen (Abb. 12). Es ist anzunehmen, dass die fehlende Protektion der corticalen Neurone auch auf das unzureichende Schädigungsniveau zurückzuführen ist. Die gezeigte selektive Vulnerabilität der corticalen und hippocampalen Neurone wurde bereits von Xiang et al. in unreifen (DIV 6–8) Neuronen beschrieben. In ihren Experimenten konnten Xiang et al. diese Unterschiede auf eine schwächere antioxidative Abwehr in den hippocampalen Neuronen zurückführen¹²⁵. In der vorliegenden Studie wurde allerdings zu dem OGD-Medium das B-27 Supplement hinzugefügt. Dieser Ergänzungsstoff enthält Antioxidantien und limitiert den Schädigungseffekt sowie insbesondere den oxidativen Stress¹²⁹. Dies weist auf die zahlreichen weiteren Mechanismen hin, die neben der antioxidativen Abwehr zu einer höheren Vulnerabilität der hippocampalen Neurone führen und in der vorliegenden Arbeit zum Tragen gekommen sind. So spielen zusätzlich Unterschiede in der Ca^{2+} -Sensitivität, der DNA-Reparaturkapazität und der Regulation der Apoptose-Gene eine Rolle¹²⁵. Neben den intrinsischen zellulären Unterschieden in der Sensitivität führen auch Differenzen in der neuronalen Konnektivität und Interaktionen zwischen neuronalen und glialen Zellen zu regionalen Vulnerabilitätsunterschieden¹³⁰. Vor allem letztere können in diesem Modell aus isolierten primären Zellen nicht nachempfunden werden und erfordern Experimente mit organotypischen Hirnschnitten oder *in vivo* Studien¹³⁰. Dennoch

spiegeln die vorliegenden Ergebnisse die *in vivo* beobachtete selektive Vulnerabilität wieder¹³¹ und eignen sich daher als OGD/R-Schädigungsmodell zur Untersuchung der neuroprotektiven Eigenschaften von TH, des Wirkstoffs DADLE und eines möglichen therapeutischen Synergismus.

Die Notwendigkeit einer 24-stündigen Schädigungsdauer zur Erzielung eines signifikanten Schadens in primären Neuronen, gegenüber einer 6-stündigen Schädigung in der Co-Kultur, verweist auf die grundsätzlichen Unterschiede der beiden *in vitro* Modelle. Primäre Neurone sind postmitotische Zellen, die keine Proliferation *in vitro* zeigen und dessen Stoffwechselrate daher geringer im Vergleich zur proliferativen Zelllinie ist. Auch der Zusatz des antioxidativen B-27 Supplement zum OGD-Medium der primären Zellen kann zu der deutlich größeren Resistenz der Zellen beigetragen haben. Weiterhin ist anzumerken, dass in dem OGD-Medium der primären Neurone NBM durch HBSS ersetzt wurde, um eine Nährstoffdeprivation zu erzielen. Allerdings handelt es sich bei dem HBSS um eine balancierte Salzlösung, die ebenfalls Glukose enthält. Die Konzentration ist mit 1000 mg/l deutlich reduziert gegenüber einer Konzentration von 4500 mg/l im NBM. Damit führt das OGD-Medium jedoch nicht zu einem gänzlichen Entzug von Glukose und kann daher zu der deutlich erhöhten Resistenz der primären neuronalen Zellen gegenüber OGD/R geführt haben.

5.2 Protektive Effekte therapeutischer Hypothermie

5.2.1 Effekte der TH auf Zellüberleben und Morphologie unter OGD/R in der HT-22/BV-2 Co-Kultur

Eine nach 3-stündiger OGD initiierte TH führt nicht zu einer signifikanten Reduktion des Zelltodes zum 6 h Zeitpunkt, gemessen an der Ausschüttung von LDH. Es zeigt sich lediglich ein Trend zu geringerem Zelltod durch TH. Der ausbleibende protektive Effekt kann auf den relativ kurzen 3-stündigen Kühlungszeitraum zurückgeführt werden. Hier ist anzunehmen, dass dieser zu kurz ist, um signifikante Unterschiede zu generieren. Zudem muss beachtet werden, dass das Herunterkühlen des Inkubators erst mit einer Verzögerung zur Zieltemperatur von 33,5 °C führt. Nach OGD/R hingegen führt die TH zu einer signifikanten Reduktion der LDH Konzentration im Zellüberstand (Abb. 4). Dieses Ergebnis deckt sich mit zahlreicher Evidenz aus *in vitro* und *in vivo* Studien, die einen neuroprotektiven Effekt durch TH zeigen konnten¹²⁶. Neben Experimenten an murinen primären neuronalen Zellen⁵⁸ und neuronalen Zelllinien¹³² konnte auch an Neuronen aus

humanen embryonalen Stammzellen der protektive Effekt der TH im Rahmen einer OGD/R-Schädigung demonstriert werden^{127,132}. Antonic et al. fanden in ihrem Modell aus humanen Neuronen eine Reduktion der LDH Ausschüttung nach OGD/R durch TH. Hierbei war der Effekt je größer, desto früher die Kühlung initiiert wurde. Die zusätzliche Anwendung der TUNEL-Methode, einer Darstellung apoptotischer Zellkerne, ergab eine Reduktion der Apoptose durch TH¹²⁷. Auch Xu et al. kamen zu diesem Schluss in ihrem Modell aus primären Mausneuronen, die sie einer Serumdeprivation unter TH aussetzten⁵⁸. Eine den Experimenten an einer HT-22/BV-2 Co-Kultur vergleichbare Studie liegt jedoch unseres Wissens nicht vor. Die Kombination der neuronalen HT-22 Zellen mit den mikroglialen BV-2 Zellen erlaubt es, die pathophysiologischen Prozesse unter der Präsenz der immunmodulatorischen Mikrogliazellen²⁸ und damit einem vollständigeren Bild der Vorgänge während OGD/R zu untersuchen. Der Aktivierungsphänotyp der Mikrogliazellen kann durch Kühlung in Richtung neuroprotektiver Eigenschaften verschoben werden, wie Diestel et al. demonstrierten³⁵. Somit sind die Mikrogliazellen potentielle Vermittler der Hypothermie-induzierten Neuroprotektion. Ein Vergleich der Effekte der TH in der Co-Kultur mit einer HT-22 Monokultur wurde allerdings nicht durchgeführt. In den vorliegenden Experimenten wurde mittels lichtmikroskopischer Observierung eine clusterartige Neuordnung der Neurone als Reaktion auf die Schädigung beobachtet. Möglich wäre auch, dass dieser Eindruck durch den Untergang der übrigen Zellen entsteht. Weiterhin ist zu beobachten, dass die zuvor homogen verteilten BV-2 Zellen eine Migration in Richtung der Neuronengruppen zeigen. Die Fähigkeit der mikroglialen Zellen in Richtung der Schädigung zu wandern, um dort aktiv am Abbau von Zellüberresten und der Reparatur mitzuwirken ist ein bekanntes Phänomen^{27,28}. Auch Kühlung kann ein Stimulus sein, der die Transformation der Mikrogliazellen in den amöboiden und damit mobilen Phänotyp bewirkt⁶⁷. In dem hier verwendeten Modell konnte keine Aussage über den Unterschied zwischen gekühlten und ungekühlten Co-Kulturen nach OGD/R bezüglich der Migrationsrate der Mikrogliazellen gemacht werden. Dazu wäre eine genauere Beobachtung über die Zeit erforderlich. Die Migration selbst ist jedoch ein Hinweis auf die rege Zell-Zell-Interaktion zwischen den Neuronen und Mikrogliazellen und unterstützt die Wertigkeit dieser Co-Kultur als Modell einer hypoxisch-ischämischen Schädigung *in vitro*. Die unterschiedlichen Aktivierungscharakteristika der Mikrogliazellen in der Co-Kultur nach OGD/R mit und ohne TH, wie von Diestel et al. und Schmitt et al. beschrieben, sollten Gegenstand weiterer Experimente sein^{35,133}.

5.2.2 Effekte der TH auf das Zellüberleben primärer hippocampaler Neurone unter OGD/R

TH schützt primäre hippocampale Neurone nicht vor einer OGD/R-Schädigung. Zwar ist eine tendenzielle Reduktion der LDH Ausschüttung gegenüber der ungekühlten Vergleichsgruppe zu sehen, die statistische Analyse ergab jedoch keine Signifikanz (Abb. 12). Die Neuroprotektion durch TH *in vitro* wurde mehrfach beschrieben, wie unter 5.2.1 ausgeführt. Ein fehlender Nachweis des Effektes in dem hier untersuchten Modell aus primären hippocampalen Neuronen kann möglicherweise auf die Modalitäten des Zeit-Temperatur-Protokolls zurückgeführt werden (Abb. 2). Durch den direkten, mit der OGD simultanen, Beginn der Kühlung in diesem Modell erfahren die Kulturen letztlich eine TH über den gesamten 48-stündigen Versuchszeitraum. Gao et al. beschrieben einen Verlust des protektiven Effektes in Folge einer Prolongierung der TH¹³⁴. In ihrem OGD-Modell aus primären Neuronen erzielte eine 4,5-stündige postischämische Kühlung den größten protektiven Effekt, während eine längere Dauer diesen aufhob¹³⁴. Dass die Vergleichbarkeit des Modelles von Gao et al. und dem in dieser Arbeit verwendeten eingeschränkt ist, zeigt sich an der Dauer der OGD, die für die Erzeugung eines signifikanten Schadens ausreichend war. Während Gao et al. die Zellen lediglich 1,5 h einer OGD exponieren mussten, um einen signifikanten Schaden zu messen, waren in dem hier gebrauchten Modell 24h erforderlich. Dies kann auf die unterschiedliche Reife der Neurone zurückgeführt werden, da diese mit der Vulnerabilität gegenüber Exitotoxizität korreliert¹³⁵. Gao et al. verwendeten primäre Neurone an DIV 5–6¹³⁴, während in der vorliegenden Arbeit eine Kultivierung für 10–11 Tage erfolgte. Nichtsdestotrotz kann eine zu lange Kühlungsperiode sich negativ auf die Protektion der hippocampalen Neurone ausgewirkt haben. Zudem gilt zu beachten, dass der Zusatz des antioxidativen B-27 Supplement in der vorliegenden Arbeit den Schaden durch OGD vermutlich abgeschwächt hat und der Schutz vor oxidativem Stress durch TH²⁰ daher nicht zum Tragen kommen konnte. Auch die Verwendung die Mediums HBSS anstelle eines glukosefreien NB Mediums, wie bei Gao et al., könnte zu der Abschwächung der Schädigung durch OGD geführt haben¹³⁴. Auf die Limitationen des in der vorliegenden Arbeit gebrauchten OGD/R Modells wird unter 5.1.2 näher eingegangen. Zusammenfassend könnten diese zu einer Abschwächung der Schädigung und so zu einer Minderung des protektiven Effektes der TH gegenüber den ungekühlten Kulturen geführt haben.

5.3 Einfluss der TH auf die RBM3 Proteinexpression

5.3.1 Effekte der TH auf die RBM3 Proteinexpression in der HT-22/BV-2 Co-Kultur unter OGD/R

TH führt zu einer signifikanten Hochregulation der RBM3 Proteinexpression in der HT-22/BV-2 Co-Kultur nach OGD und OGD/R im Vergleich zu seinem ungekühlten Pendant (Abb. 9). Bereits eine 3-stündige intraschämische Kühlung ist ausreichend um das RBM3 Proteinniveau gegenüber der ungekühlten Vergleichsgruppe geringfügig, aber signifikant zu erhöhen. Die früheste Induktion von RBM3 wurde von Danno et al. nach 6 h in Nierenkarzinomzellen beschrieben⁶⁶. Es kommt jedoch in der hier verwendeten Co-Kultur unter den Bedingungen der OGD zu einer generellen Abnahme der RBM3 Proteinexpression, was durch das Mangelmedium und den Sauerstoffentzug und folglich eine Suppression des Stoffwechsels unter zellulären Stressbedingungen zu erklären sein kann (Abb. 9.A). Im Gegensatz dazu fanden Wellmann et al. eine Hochregulation der RBM3 Proteinexpression durch Hypoxie in Zelllinien aus lymphoblastisch leukämischen Z-33 B-Zellen und epithelialen HeLa Zellen⁷⁵. Es handelte sich jedoch um eine reine Hypoxie, anders als die hier angewandte OGD. Zudem wäre es möglich, dass diese hypoxische Regulation von RBM3 nicht für neuronale Zellen gilt. So zeigten Trollmann et al., dass Hypoxie *in vivo* zu einer Herunterregulation von RBM3 im sich entwickelnden Gehirn führt⁷⁶. Stress kann also nicht nur ein Induktor, sondern auch ein Inhibitor der RBM3 Proteinexpression sein⁷⁷. In der vorliegenden Arbeit führt die OGD zu einer Inhibierung.

Die TH hingegen wirkt der Reduktion des RBM3 Levels gegenüber der ungekühlten Vergleichsgruppe entgegen, sodass es nach OGD/R wieder das Kontrollniveau erreicht (Abb. 9). Diese Hypothermie-induzierte Regulation des Kälteschockproteins in neuronalen Zellen ist vielfach beschrieben worden^{68,73,80}. Milde TH führt zu einer Hochregulation der RBM3 Protein- und Genexpression gegenüber der ungekühlten Vergleichsgruppe nach 24 h Kühlung in einer HT-22/BV-2 Co-Kultur⁷³. Auch in der reinen HT-22 Monokultur konnte diese RBM3 Induktion von Tong et al. gezeigt werden, während eine BV-2 Monokultur keine RBM3 Regulation aufwies⁷³. Diese Daten deuten auf die neuronalen Zellen als Ursprung der nachgewiesenen RBM3 Mehrexpression in der Co-Kultur hin. Die von Tong et al. beobachtete RBM3 Regulation durch moderate TH unter normoxen Bedingungen konnte in der vorliegenden Studie zum 30 h Versuchszeitpunkt in den Kontrollgruppen nur in Form eines deutlichen Trends

beobachtet werden ⁷³. Die deutliche Hochregulation des RBM3 Proteins durch TH nach OGD/R geht mit einer signifikanten Neuroprotektion gegenüber der ungekühlten Vergleichsgruppe einher (Abb. 8.B). Initial nach 6-stündiger OGD ist mit der Hochregulation von RBM3 lediglich ein statistisch nicht signifikanter Trend zur Neuroprotektion zu beobachten (Abb. 8.A). Trotz der deutlichen Korrelation der RBM3 Proteinregulation und der Neuroprotektion können die vorliegenden Ergebnisse keine Kausalität herstellen. Dazu müsste eine Analyse der zugrunde liegenden Signalkaskaden erfolgen, um die Mechanismen einer RBM3-vermittelten Neuroprotektion genauer zu untersuchen. Zudem wäre ein Gen-Knock-down mittels einer *small interfering* RNA erforderlich um ein besseres Verständnis der Funktion von RBM3 zu erlangen. Dennoch legen die vorliegenden Daten und zahlreiche weitere Studien die Rolle von RBM3 als zentralen Mediator der Hypothermie-induzierten Neuroprotektion nahe. Sie konnte von Chip et al. in hippocampalen organotypischen Hirnschnitten, primären corticalen Neuronen und der neuronalen PC12 Zelllinie demonstriert werden ⁶⁸. In ihrer Arbeit konnte gezeigt werden, dass das RBM3 Level, induziert oder inhibiert, mit der Resistenz gegen eine Apoptose-Induktion in neuronalen Zellen korreliert ⁶⁸. Auch Peretti et al. beschrieben das neuroprotektive Potential von RBM3 und insbesondere seinen Effekt auf die strukturelle Plastizität im ZNS ⁸⁰. In *in vivo* Modellen neurodegenerativer Erkrankungen, konnten sie zeigen, dass RBM3 in endogene Reparaturmechanismen involviert ist, und die fehlende Induzierbarkeit des Proteins an der Genese neurodegenerativer Erkrankungen beteiligt sein könnte ⁸⁰.

Die vorliegende Arbeit gibt deutliche Hinweise darauf, dass RBM3 in einem *in vitro* Modell einer hypoxisch-ischämischen Hirnschädigung an der Vermittlung der Hypothermie-induzierten Neuroprotektion beteiligt ist. Weitere Experimente zur Aufdeckung und zum Verständnis der involvierten Signalkaskaden und Mechanismen sind erforderlich.

5.3.2 Effekte der TH auf die RBM3 Protein- und Genexpression in primären hippocampalen Neuronen unter OGD/R

TH führt nach 24 h zu einer signifikanten Induktion der RBM3 mRNA unter normoxen Kontrollbedingungen. Auch nach OGD-Schädigung ist das RBM3 mRNA Level in den Kulturen, die TH erhalten haben signifikant erhöht (Abb. 13). Dies zeigt, dass TH ein Induktor der RBM3 Genexpression ist. Das Genexpressionsniveau ist zwar unter OGD-Bedingungen gegenüber dem Kontrolllevel reduziert, TH führt jedoch zu einem Erhalt des RBM3 mRNA Niveaus unter OGD. Nach OGD/R ist der Effekt nur noch in Form eines Trends vorhanden, mit einer limitierend großen

Standardabweichung (Abb. 13). Die Translation der mRNA Information in Protein erfolgt in den primären hippocampalen Neuronen allerdings erst nach 48 h, betrachtet man die Kulturen nach OGD und TH. Diese Ergebnisse decken sich mit den bereits unter 5.3.1 ausgeführten Resultaten zahlreicher *in vitro* Studien, die eine Hypothermie-abhängige Induktion von RBM3 demonstrieren konnten^{68,73,80}. Eine präzise Beschreibung der Kinetik der RBM3 Geninduktion durch Hypothermie liegt in der Arbeit von Tong et al. vor. Die Induktion der RBM3 mRNA in hippocampalen Hirnschnitten beginnt nach 4 h und erreicht ihr Maximum nach 24 h Kühlung⁷³. Auch die in der vorliegenden Arbeit beobachtete verspätete Translation in RBM3 Protein (nach 48 h), deckt sich mit den Daten von Tong et al, die eine signifikante Mehrexpression des Proteins RBM3 erst nach 48 h messen konnten. Die Mechanismen dieser verzögerten Translation sind bisher nicht geklärt. Ob ein Energiedefizit die Ursache darstellen könnte, muss in weiteren Experimenten untersucht werden.

5.4 DADLE in der HT-22/BV-2 Co-Kultur und den primären hippocampalen Neuronen

5.4.1 Protektive Effekte in der HT-22/BV-2 Co-Kultur

Die alleinige Applikation von 10 nM DADLE schützt die HT-22/BV-2 Co-Kultur vor einem OGD/R-Schaden ebenso effektiv wie die TH (Abb. 8.B). Durch die Kombination TH und DADLE lässt sich kein synergistisch oder additiv protektiver Effekt beobachten. Direkt nach OGD zum 6 h Zeitpunkt ist weder DADLE noch die Kombination aus Opioid und TH protektiv. Der Schutz durch DADLE vor dem OGD/R Schaden, mit vergleichbarer Effektivität wie TH, geht mit den Ergebnissen aus *in vitro* OGD/R-Experimenten mit der embryonalen Nierenzelllinie HEK293 einher¹⁰⁰.

Darüber hinaus konnten Kaneko et al. jedoch einen additiven Effekt der Kombination von DADLE und TH zeigen¹⁰⁰. Anders als in der vorliegenden Arbeit wurde allerdings die Zellvitalität und mitochondriale Aktivität als Maß der Zytoprotektion genutzt, wodurch die Funktionalität der lebenden Zellen erfasst wird. In der vorliegenden Arbeit wurde hingegen das Ausmaß des Zelltodes anhand von LDH quantifiziert, und damit ein Endpunkt des Zellunterganges erhoben. Letztlich handelt es sich außerdem in der Studie von Kaneko et al. um eine renale Zelllinie, die sich möglicherweise anders verhält als die HT-22/BV-2 Co-Kultur. Weitere Experimente der

Arbeitsgruppe an primären Rattenneuronen zeigten darüber hinaus, dass der protektive Effekt einer Kombinationstherapie aus TH und mesenchymalen Stammzellen durch den Einsatz des Opioidantagonisten Naltrexon gehemmt werden kann. Dies gibt Hinweise darauf, dass das Opioid-System, insbesondere der DOR, an der Vermittlung der Neuroprotektion beteiligt ist ¹⁰⁰.

Der in der vorliegenden Arbeit gezeigte Schutz vor einem OGD/R-Schaden durch DADLE deckt sich ferner mit Resultaten zahlreicher Studien, welche zeigen, dass DADLE primäre corticale Neurone und eine neuronale PC12 Zelllinie gegen eine Schädigung durch Hypoxie, Serumdeprivation sowie OGD schützen kann ^{94,95,136}. In der Studie von Hayashi et al. wurde DADLE für den gesamten 48-stündigen Zeitraum der Serumdeprivation appliziert ⁹⁴. Auch in der Arbeit von Zhang et al. wurde der Wirkstoff über den gesamten Versuchszeitraum von 72 h appliziert und sogar eine erneute Dosis nach 36 h hinzugefügt ⁹⁵. Im Vergleich zu den vorliegenden Experimenten wurde DADLE also für eine deutlich längere Versuchsperiode appliziert. Zu beachten ist auch, dass in den experimentellen Designs bei Zhang et al., Hayashi et al. oder Ke et al. keine einer Reperfusion vergleichbare Phase folgte ^{94,95}. Umso interessanter ist es, dass in der vorliegenden Arbeit der protektive Effekt des Opioids nach 30 h und erfolgter OGD/R trotz lediglich 6-stündiger Applikation zu beobachten war. Ähnliche Resultate erhielten Borlongan et al. in ihrem Schlaganfallmodell in Ratten, nach einer Vorbehandlung mit DADLE. Die Verabreichung der DOR-Agonisten konnten den strukturellen, sowie funktionalen Schaden nach einem Schlaganfallereignis mit Reperfusion reduzieren ⁹⁶. Dies deutet auf die komplexen Mechanismen der DADLE Wirkung hin, die von He et al. zusammengefasst wurden und sich in akute und nicht-akute Effekte unterteilen lassen ⁷. Eine genauere Beschreibung erfolgt unter 1.6.1. Da die Protektion in den vorliegenden Experimenten erst nach OGD/R messbar ist, ist davon auszugehen, dass DADLE während der OGD zu Anpassungsvorgängen geführt hat, die zu einer größeren Toleranz gegenüber der Reperfusion führten. Entsprechende Mechanismen wurden von Wang et al. und Borlongan et al. beschrieben und involvieren den PI3K/Akt und p53 Signalweg ^{96,137} und wirken antiapoptotisch sowie antinekrotisch ⁹⁶. Weitere Studien zum genaueren Verständnis der involvierten komplexen Mechanismen stehen aus ¹³⁷.

In der vorliegenden Arbeit wurde insbesondere untersucht, ob DADLE im Vergleich zur TH als alternative oder synergistische Therapie im Rahmen einer neuronalen Schädigung durch OGD angewandt werden könnte. Weitere Experimente zur Determinierung des optimalen

Applikationszeitpunktes und -raumes und zur Erueierung der zugrunde liegenden Wirkmechanismen des DOR-Agonisten stehen aus.

5.4.2 Effekte auf die RBM3 Proteinexpression in der HT-22/BV-2 Co Kultur

Das Kälteschockprotein RBM3 wird infolge der TH in Kombination mit dem Wirkstoff DADLE nach OGD/R zum 30 h Zeitpunkt signifikant mehr exprimiert als in seiner ungekühlten Vergleichsgruppe (Abb. 9). Interessanterweise führt die alleinige Applikation von DADLE trotz des beobachteten protektiven Effektes nach OGD/R (Abb. 8) nicht zu einer Hochregulation der RBM3 Proteinexpression (Abb. 9). Die Kombination aus DADLE und TH führt nach 30 h zwar zu einer signifikanten Hochregulation gegenüber normothermer DADLE Applikation, der Effekt entspricht jedoch dem von Kühlung allein und zeigt keine additive Steigerung des RBM3 Proteinlevels (Abb. 9). Dies ist nach unserem Kenntnisstand die erste Untersuchung zur Regulation des Kälteschockproteins RBM3 durch einen DOR-Agonisten. Die Studienlage weist auf die mögliche Verknüpfung von DADLE mit dem Überlebensprotein RBM3 hin. Sowohl DADLE als auch RBM3 sind mit dem Phänomen des Winterschlafs und der dabei induzierten endogenen Toleranzsteigerung gegen hypoxisch-ischämische Bedingungen durch zahlreiche Evidenz in Verbindung gebracht worden. Eine Hochregulation des Proteins RBM3 wurde in winterschlafenden Erdhörnchen beobachtet⁷⁹ und DADLE als Induktor eines Winterschlaf-ähnlichen Zustandes identifiziert^{82,96}. Die Resultate der vorliegenden Experimente zeigen, dass zumindest zum 30 h Zeitpunkt keine Hochregulation der RBM3 Proteinexpression durch den DOR-Agonisten messbar ist. Ob diese allerdings zu einem Zeitpunkt zwischen 6 und 30 h temporär vorhanden war, kann mit den vorliegenden Daten nicht beantwortet werden und bedarf weiterer Experimente.

Neben eine Induktion der RBM3 Proteinexpression kann der protektive Effekt durch DADLE durch zahlreiche andere, vorbeschriebene Wirkungen der Substanz vermittelt sein. Beispielsweise nimmt DADLE Einfluss auf die Apoptose-Kaskaden^{96,137}, welche hier nicht untersucht wurden. Auch der frühe Zeitpunkt und begrenzte Zeitraum der DADLE Applikation könnte für den fehlenden Nachweis einer RBM3 Proteinexpressionssteigerung verantwortlich sein. Allerdings ist anzumerken, dass die Experimente zur Dosierung von DADLE und dosisabhängiger RBM3 Proteinregulation ebenfalls keinen Hinweis auf eine Induktion von RBM3 durch DADLE zum 30 h Zeitpunkt geben konnten (Abb. 7). Darüberhinaus zeigt sich nach 6-stündiger Inkubation mit

DADLE eine generelle dosisunabhängige Suppression der RBM3 Proteinexpression, welche nach 30 h vollständig reversibel ist (Abb. 7) ohne sich zytotoxisch auf die Zellen auszuwirken (Abb. 6). Dieses Ergebnis geht mit der von Tian et al. beobachteten DADLE-induzierten reversiblen Reduktion des Transkriptionslevels in primären corticalen Neuronen einher. Das Opioid induziert also einen, von Tian et al. als Winterschlaf-ähnlich bezeichneten, Zustand, welcher für die neuroprotektive Wirkung verantwortlich ist¹³⁸. Interessanterweise geht dies, anders als bei winterschlafenden Erdhörnchen beobachtet⁷⁹, in der DADLE-Konzentrationsreihe der HT-22/BV-2 Co-Kultur nicht mit einer Induktion der RBM3 Proteinexpression einher. In den OGD/R-Experimenten konnte außerdem keine Suppression der RBM3 Proteinexpression im Vergleich zu Kulturen ohne DADLE beobachtet werden. Vermutlich lag dies darin begründet, dass die Induktion der OGD selbst bereits als starker Suppressor der Proteinexpression wirkte (Abb. 9). Auch konnte TH stets als Induktor des RBM3 Proteinlevels unter gleichzeitiger DADLE Gabe fungieren. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass der protektive Effekt einer alleinigen DADLE Applikation nach OGD/R in der Co-Kultur nicht über das Kälteschockprotein RBM3 vermittelt wird.

5.4.3 Protektive Effekte in primären hippocampalen Neuronen

Die Kombination aus 10 μ M DADLE und TH führt zu einer signifikanten Reduktion der LDH Ausschüttung nach OGD/R in primären hippocampalen Neuronen. Die singuläre Applikation des DOR-Agonisten, sowie die alleinige TH sind nicht protektiv (Abb. 12). Diese Ergebnisse deuten auf einen synergistischen Effekt von TH und DADLE hin und decken sich mit den Resultaten von Kaneko et al. Sie fanden eine additive Protektion durch die Kombination DADLE und Kühlung (34 °C) vor einem OGD/R-Schaden in renalen Zellen. Im Gegensatz zu den vorliegenden Ergebnissen, konnte jedoch auch ein alleiniger protektiver Effekt sowohl des Opioids, als auch der TH auf die HEK293 Zellen gemessen werden¹⁰⁰. Wie unter 5.4.1, beschrieben wurden jedoch die Zellvitalität und mitochondriale Dysfunktion als Maß für die Protektion herangezogen. Zudem erfolgte die Applikation des Wirkstoffes DADLE für den Reperfuisionszeitraum und nicht wie in der vorliegenden Arbeit die OGD-Phase. Weiterhin stehen die Ergebnisse aus den Versuchen mit primären hippocampalen Neuronen im Gegensatz zu den vorliegenden Ergebnissen aus Versuchen mit der HT-22/BV-2 Co-Kultur. Es wäre möglich, dass der Unterschied aus der Interaktion der Neurone und Mikrogliazellen in der Co-Kultur resultiert und die jeweiligen Monokulturen ein individuelles Reaktionsmuster auf die Behandlung mit DADLE unter OGD/R zeigen. Hierzu sind

weitere Experimente und die Aufklärung der Mechanismen der Neuroprotektion durch DADLE erforderlich. Zudem unterscheiden sich die Zeit-Temperatur-Protokolle und Schädigungsmodalitäten der beiden Zellkultur-Modelle, wie unter 5.7 genauer erläutert wird, sodass die Vergleichbarkeit eingeschränkt ist.

5.4.4 Effekte auf die RBM3 Protein- und Genexpression in primären hippocampalen Neuronen

Die alleinige Applikation von DADLE ohne TH führt nicht zu einer Induktion der RBM3 Genexpression (Abb. 13). Dies spiegelt auch die ausbleibende Steigerung der RBM3 Proteinexpression wieder (Abb. 14). Die Kombination aus TH und DADLE hingegen führt zu einer signifikanten Hochregulation von RBM3 auf Gen- und Proteinebene bereits nach 24 h. Infolge der Reperfusion nach 48 h und damit der Elimination des Wirkstoffes ist der Effekt jedoch nicht mehr nachweisbar. Im Vergleich zur Induktion der RBM3 Gen- und Proteinexpression durch alleinige TH kommt es zu einer früheren Translation der RBM3 mRNA in Protein. Diese frühere Translation könnte für den protektiven Effekt der Kombinationstherapie gegenüber alleiniger TH nach OGD/R verantwortlich sein. Der Mechanismus dieser früheren Mehrexpression von RBM3 auf Proteinebene infolge TH und DADLE unter OGD bleibt jedoch zu eruieren. Möglich wäre, dass die Kombination zu einem Erhalt der Energiereserven der Zelle führt, sodass die Umsetzung in Protein bereits unter den Deprivationsbedingungen der OGD stattfinden kann. Zur weiteren Klärung dieser Überlegung wären weiterführende Experimente und Analysen erforderlich. Um zudem eine veränderte Kinetik der RBM3 Proteinexpression infolge der Kombinationstherapie genauer untersuchen zu können, müssten zahlreiche weitere Zeitpunkte analysiert werden. RBM3 gilt als Vermittler endogener Reparatur-⁸⁰ und Toleranzmechanismen und scheint eine zentrale Rolle bei der Induktion des Winterschlafzustandes in einigen Säugetieren zu spielen⁷⁹. Ebenso an diesem physiologischen Anpassungsvorgang beteiligt, sind das DOR-System und sein spezifischer Agonist DADLE^{82,96}. Diese Eigenschaften legen eine Verknüpfung der beiden Systeme nahe. Anhand der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnte dieser mögliche Link jedoch nicht weiter untermauert werden. Es bleibt zu prüfen, wie sich das RBM3 Level *in vivo* infolge einer Applikation von DADLE allein oder in Kombination mit TH verhält. Darüber hinaus sind weitere Experimente notwendig um einen möglichen RBM3-unabhängigen Mechanismus der Neuroprotektion aufzuklären und einen Synergismus der beiden protektiven Strategien TH und DADLE auf subzellulärer Ebene zu finden.

5.5 WIN-55,212-2 in der HT-22/BV-2 Co-Kultur

5.5.1 Protektive Effekte

Die Applikation von 100 nM WIN-55,212-2 schützt die HT-22/BV-2 Co-Kultur nicht vor einem Schaden durch OGD und OGD/R. Allerdings lässt sich ein protektiver Effekt der Kombinationstherapie aus TH und WIN-55,212-2 nach OGD/R zeigen, dieser ist jedoch gegenüber dem Effekt durch singuläre TH nur tendenziell stärker. In der 1way ANOVA Analyse mit Bonferroni Post Test zeigte sich dieser Unterschied nicht statistisch signifikant (Abb. 8). Die neuroprotektive Rolle von WIN-55,212-2 wurde vielfach *in vivo*^{102,103,111,112} und *in vitro*^{111,139} beschrieben. Allerdings scheint die Cannabinoid-induzierte Hypothermie einen deutlichen Anteil an der Neuroprotektion zu haben¹⁰². In der Studie von Fernandez-Lopez et al. an neonatalen Ratten mit hypoxisch-ischämischer Enzephalopathie wurden keine Daten zur Temperatur der Versuchsratten publiziert, sodass davon auszugehen ist, dass diese nicht kontrolliert wurde und eine Hypothermie als Confounder der WIN-55,212-2-Wirksamkeit anzunehmen ist¹⁰³. In unserem *in vitro* Modell lässt sich lediglich ein Effekt der Kombination aus WIN-55,212-2 und TH auf die LDH Ausschüttung nach OGD/R zeigen. Dies entspricht den Ergebnissen von Bonfils et al., aus *in vivo* Experimenten globaler und fokaler zerebraler Ischämie, die einen additiven Effekt durch die Cannabinoid-induzierte Hypothermie ergaben¹⁰². Sie fanden jedoch darüber hinaus einen signifikant protektiven Effekt durch die WIN-55,212-2 Applikation unter normothermen Bedingungen¹⁰², welcher in unserem Co-Kulturmodell nicht beobachtet werden konnte. Auch *in vitro* ist das neuroprotektive Potential von WIN-55,212-2 vielfach gezeigt worden. In OGD Experimenten mit Hirnschnitten und primären Neuronen schützt WIN-55,212-2 durch Reduktion von Exitotoxizität, proinflammatorischen Zytokinen und oxidativem Stress^{111,139}. Die Diskrepanz zwischen unseren *in vitro* Resultaten und denen anderer Arbeitsgruppen liegt wahrscheinlich in den Modalitäten der Experimente begründet. Nagayama et al. benutzten DIV 18 primäre Neurone, im Gegensatz zu hier benutzen Co-Kultur aus hippocampalen und mikroglialen Zelllinien, und setzen diese einem Protokoll aus 8 h OGD und 16 h simulierter Reperfusion aus¹¹¹. Die Wirkstoffkonzentration von WIN-55,212-2 war mit 10 μ M ähnlich der in den vorliegenden Experimenten eingesetzten Dosis von 100 nM. Die Applikation erfolgte ebenfalls für den Zeitraum der OGD. Neben den subtilen Unterschieden im Versuchsdesign könnte die Diskrepanz zu unseren Ergebnissen auch in der Methode zur Messung des protektiven Effektes begründet sein. So benutzen Nagayama et al. einen auf Alamar Blue basierenden Vitalitätsassay, während die

vorliegende Arbeit die Ergebnisse auf einen Zelltodassay mittels LDH Bestimmung stützt. Nicht zuletzt unterstreichen die unterschiedlichen Resultate die Limitationen des Zellkulturmodells, auf welche im Folgenden unter 5.7 näher eingegangen wird. Die Zytotoxizitätstestung von WIN-55,212-2 in der HT-22/BV-2 Co-Kultur hat eine signifikante Toxizität bei einer Konzentration von 100 μ M ergeben (Abb. 6.B). Typischerweise zeigen Cannabinoid-Derivate eine Affinität zum CB₁- und CB₂-Rezeptor im nanomolaren Bereich. Mikromolare Konzentration führen wahrscheinlich zu unspezifischen Rezeptorbindungen und letztendlich zur Toxizität¹⁰⁶. Interessanterweise exprimieren vor allem Mikrogliazellen den CB₂-Rezeptor, zu dem WIN-55,212-2 ein fast doppelt so hohe Affinität wie zum CB₁-Rezeptor zeigt¹⁰⁶. Daher ist anzunehmen, das vor allem die BV-2 Zellen in der untersuchten Co-Kultur das Ziel der Cannabinoid-Wirkung darstellen¹⁰⁷. Ein Einfluss auf das Zytokin-Expressionsmuster der Mikrogliazellen, als Hinweis auf das Aktivierungsprofil und eine mögliche Immunmodulation durch WIN-55,212-2 wurde nicht untersucht und sollte Gegenstand weiterer Experimente sein. Weiterhin ist die erneute Testung von WIN-55,212-2 in einem modifizierten Zeit-Temperatur-Protokoll notwendig, um zu eruieren ob darunter ein protektiver Effekt zu erzielen ist.

5.5.2 Effekte auf die RBM3 Proteinexpression

Die Applikation des Wirkstoffs WIN-55,212-2 führt weder mit noch ohne TH zu einer Induktion der RBM3 Proteinexpression (Abb. 9). Interessanterweise zeigen auch die Kulturen nach der Kombinationstherapie mit TH und WIN-55,212-2, welche sich als protektiv nach OGD/R erwiesen hatte (Abb. 8.B), keine Induktion der RBM3 Expression gegenüber der ungekühlten Vergleichsgruppe. Der Vergleich mit den Vorversuchen zur Konzentrationstestung von WIN-55,212-2 zeigt, dass zum 30 h Zeitpunkt keine generelle Suppression der RBM3 Expression erfolgt (Abb. 7.B). Es zeigt sich, dass unter OGD/R Bedingungen WIN-55,212-2 zu einer Hemmung der Hypothermie-induzierten Mehrexpression von RBM3 gegenüber der ungekühlten Vergleichsgruppe führt. Wodurch diese Suppression erfolgt, bleibt zu eruieren. Weiterhin stellt sich die Frage, ob die Protektion in Folge der Kombinationstherapie durch einen RBM3-unabhängigen Mechanismus erfolgt ist. Abschließend ließe sich die Frage nach alternativen RBM3-unabhängigen Mechanismen nur durch weitere Experimente mit einem RBM3 Knock down und eine genauere Analyse der involvierten Signalkaskaden beantworten. Es bleibt zu klären welchen modulatorischen Einfluss das Cannabinoid auf die mikroglialen BV-2 Zellen in

der Co-Kultur ausübt und ob dies schließlich zu einer Hemmung der RBM3 Expression in den neuronalen Zellen geführt haben könnte. Die HT-22 Zellen, die in dieser Arbeit untersuchten Co-Kultur, sind die Quelle der RBM3 Proteinexpression, wie Tong et al. in ihren Experimenten zur Kinetik der RBM3 Regulation durch Hypothermie zeigen konnten⁷³. Die RBM3 Suppression könnte daher das Resultat einer interzellulären Modulation durch die BV-2 Zellen sein. Möglich ist auch, dass der Zusatz des Cannabinoids zu einer Veränderung der Kinetik der RBM3 Regulation durch Hypothermie führt. Hierüber könnte die Analyse der Expression zu weiteren Zeitpunkten Aufschluss geben. In der Literatur ist keine Verknüpfung von RBM3 und WIN-55,212-2 vorbeschrieben.

5.6 Klinische Relevanz

Insbesondere vor dem klinischen Hintergrund des Herz-Kreislaufstillstandes wäre die Entwicklung einer therapeutischen Strategie mit DADLE attraktiv, da der Wirkstoff nicht nur das Gehirn, sondern auch das Herz vor den Folgen des hypoxisch-ischämischen Ereignisses schützt^{87,101}. Der potentielle Synergismus mit Kühlung könnte zu einer breiteren klinischen Translation der experimentellen Evidenz zur Neuroprotektion durch TH führen. Auch bezüglich der analgetischen Eigenschaften¹⁴⁰ und möglichen Effektivität gegen Kühlungs-assoziierte Nebenwirkungen, wie Muskelzittern¹⁴¹, könnte DADLE klinische Anwendung finden. Hierzu sind jedoch zunächst weitere *in vivo* Experimente zur Charakterisierung des systemischen Wirkspektrums und besseren Verständnisses der protektiven Eigenschaften notwendig.

Aufgrund der Erfahrungen mit TH in der Anwendung bei neonataler hypoxisch-ischämischer Enzephalopathie und adultem Herz-Kreislaufstillstand wird deutlich, dass die Intervention mit Nebenwirkungen und Schwierigkeiten bei der Durchführbarkeit assoziiert sein kann^{20,126}. Zudem ist die Wirksamkeit der TH bei schweren Fällen der hypoxisch-ischämischen Hirnschädigung eingeschränkt^{38,41}. Die Ablösung oder Ergänzung der physikalischen TH durch eine pharmakologische Intervention mit neuroprotektiven Effekten wäre daher eine aussichtsreiche Entwicklung. Das Cannabinoid WIN-55,212-2 ist diesbezüglich ein vielversprechender Kandidat, dessen neuroprotektives Potenzial in vielfachen Studien demonstriert wurde. Das Verständnis der Wirkmechanismen *in vitro* und systemischen Effekte *in vivo* ist allerdings bisher unzureichend und bedarf weiterer Forschung. Zudem bleibt zu eruieren, ob die in Nagetieren gezeigte Induktion

einer Hypothermie durch WIN-55,212-2 potent genug ist um vergleichbare Effekte in größeren Säugetieren und schließlich dem Menschen zu erzeugen.

5.7 Limitation der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wurden eine neuronale und mikrogliale Zelllinie in eine direkte Co-Kultur gebracht, um die Effekte der TH in einem *in vitro* OGD-Modell zu testen. Die Mikrogliazellen spielen eine wichtige immunmodulatorische Rolle im Rahmen von zellulärem Stress und sind entscheidend an der Balance zwischen Neuroprotektion und Neurotoxizität beteiligt²⁸. Allerdings stellt das in dieser Studie gebrauchte Zellmodell lediglich eine grobe Vereinfachung der komplexen zerebralen interzellulären Beziehungen dar und klammert den Einfluss anderer Protagonisten des zellulären Milieus im ZNS komplett aus. So nehmen beispielsweise die Astrozyten eine ebenso wichtige Rolle beim Schutz der Neurone ein¹⁴². Des Weiteren handelt es sich bei den Zelllinien um genetisch modifizierte und immortalisierte Populationen von Zellen, deren Proliferationsverhalten und Genexpressionsmuster verändert sind und sich von denen humaner Neurone im intakten zerebralen Gewebe grundlegend unterscheiden. Aus diesem Grund wurden die Experimente an Monokulturen primärer neuronaler Zellen wiederholt. Da insbesondere in Folge eines hypoxisch-ischämischen Schadens eine selektive Vulnerabilität der Hirnregionen zu beobachten ist¹²⁵, wurden hippocampale und corticale Neurone separat kultiviert. Um die primären Zellen jedoch in einem Co-Kulturmodell zu etablieren, bedarf es weiterer Experimente, sodass die Verwendung primärer Zellen in einer Monokultur erneut Limitationen aufweist. Zudem ist anzumerken, dass es sich nicht um eine reine Monokultur handelt (siehe 4.2.1 und Abb. 10), womit ein Einfluss weiterer Zelltypen nicht ausgeschlossen werden kann. Allen Zellkulturexperimenten ist zudem gemein, dass sie die neuroanatomischen Gegebenheiten nicht simulieren können und wichtige Faktoren wie Konnektivität und Struktur bei der Untersuchung der Pathophysiologie nicht berücksichtigt werden.

Die Analyse des Zelltodes in der vorliegenden Arbeit erfolgte lediglich anhand der extrazellulär messbaren LDH Aktivität, welche als Indikator für die Zellintegrität und damit den Zelluntergang verwendet wurde. Hiermit ließ sich jedoch nicht die Modalität des Zelltodes (apoptotisch versus nekrotisch) differenzieren. Darüber hinaus konnten keine Aussagen über eine Zu- oder Abnahme der Vitalität oder mitochondriale Dysfunktion, als Vorstufen des Zelltodes, in Folge einer Intervention gemacht werden.

Die Untersuchung der RBM3 Proteinexpression erfolgte mittels Western Blot. Dazu wurden die Zellen mit Hilfe des Probenpuffers lysiert. Dieses Verfahren führt nicht zu einer Trennung der nukleären und zytosolischen Proteinfractionen, welche eine genauere Untersuchung des Expressions- und Lokalisationsmusters des Proteins erlaubt hätte. Anhand der Ergebnisse zur Proteinexpression kann keine Aussage über eine Kausalität der Induktion der RBM3 Proteinexpression und die beobachtete Neuroprotektion gemacht werden. Es wurden keine Signalkaskaden untersucht, die in die Mechanismen der RBM3-abhängigen Neuroprotektion involviert sein könnten.

Wie bereits unter 5.1.2 thematisiert, handelt es sich bei dem OGD/R-Modell der primären Neurone um eine unvollständige Glukosedeprivation, da mit dem Puffer HBSS lediglich eine Glukose-reduzierte Lösung eingesetzt wurde. Neben dem Zusatz des antioxidativen B-27 Supplementes führte dies zu einer unzureichenden Schädigung und der Notwendigkeit zur Verlängerung der Schädigungsdauer. Dies resultierte in einer hypoxisch-ischämischen Schädigung in den primären Neuronen von eher chronischem Charakter, gegenüber der akuten Schädigung in der Co-Kultur. Das OGD/R-Modell der primären Neurone kann somit nur bedingt die Verhältnisse eines zerebralen hypoxisch-ischämischen Ereignisses wie im Rahmen eines OHCA simulieren und die Vergleichbarkeit mit dem OGD/R-Modell der Co-Kultur ist eingeschränkt.

5.8 Schlussfolgerung und Ausblick

TH schützt neuronale Zellen vor einem Schaden durch OGD/R und führt zu einer Induktion der Gen- und Proteinexpression von RBM3. Die intraischämische Applikation des Wirkstoffes DADLE führt Zellmodell-abhängig allein und/oder in Kombination mit TH ebenfalls zu einer Neuroprotektion. Dabei zeigt DADLE ein potentes neuroprotektives Potential und ist mit RBM3-unabhängigen Mechanismen sowie einer früheren Translation der RBM3 mRNA assoziiert. WIN-55,212-2 zeigt lediglich in Kombination mit TH einen protektiven Effekt unter OGD/R, wobei die Hypothermie-induzierte RBM3 Induktion ausbleibt.

TH ist eine effektive neuroprotektive Strategie, die teilweise bereits eine etablierte klinische Anwendung findet. Dennoch sind die Wirkmechanismen noch nicht vollständig verstanden und die Funktionen des Proteins RBM3 nicht vollständig geklärt. Eine bessere Aufklärung der

Mechanismen könnte zu einer breiteren Translation in die klinische Praxis führen. Ebenfalls in dem Zusammenhang sind DADLE und WIN-55,212-2 vielversprechende Kandidaten, die eine Alternativ- oder Kombinationstherapie mit TH darstellen und die Effektivität der TH steigern könnten.

Um ein besseres Verständnis der Wirkung von DADLE zu erlangen sollte das Rezeptorspektrum welches an der Vermittlung des Effektes beteiligt ist genauer untersucht werden. DADLE ist ein spezifischer DOR-Agonist. In hohen Konzentrationen kann er jedoch auch zu einer Aktivierung des μ -Opioid-Rezeptors (MOR) führen und damit zytotoxisch werden⁹⁴. Das Expressionsmuster des DOR und Rezeptor-unabhängige Signalkaskaden sollten Gegenstand weiterer Forschung sein. Bekannt ist, dass corticale Neurone eine höhere Dichte an DOR exprimieren als hippocampale Neurone und damit sensibler auf die Effekte des DOR-Agonisten reagieren müssten¹⁴³. In der hippocampalen Region ist zudem eine größere Präsenz der MOR zu finden¹⁴³, sodass Nebenwirkungen einer DADLE Applikation über eine unspezifische Bindung an DOR eher zu erwarten sind. In weiteren Experimenten könnte die Untersuchung der corticalen Neurone in einem modifizierten Zeit-Temperatur-Protokoll weitere Aufschlüsse über eine mögliche regional selektive Wirkung des Opioids DADLE liefern.

Schließlich sollten unterschiedliche Applikationszeitpunkte und -räume für WIN-55,212-2 und DADLE untersucht werden, um insbesondere die klinische relevante post-hypoxisch-ischämische Wirkung zu untersuchen. Besonders hinsichtlich einer klinischen Translation sind das systemische Wirkspektrum von DADLE und WIN-55,212-2 und seine ungewünschten Nebenwirkungen in einem *in vivo* Tiermodell genau zu prüfen, da diese von hoher Relevanz für die klinische Anwendbarkeit sind.

Die in dieser Arbeit untersuchte Regulation von RBM3 durch TH und die Wirkstoffe DADLE und WIN-55,212-2 sollte präziser hinsichtlich mehrerer Versuchszeitpunkte untersucht werden. Um eine Aussage über die Kausalität einer RBM3 Induktion und die Neuroprotektion machen zu können sind weitergehende Experimente mit einem Gen-Knock-down mittels einer *small interfering RNA* erforderlich. Außerdem wäre es von Interesse eingehend zu prüfen über welche Mechanismen DADLE und WIN-55,212-2 ihre neuroprotektiven Effekte vermitteln und auf welcher Ebene der beobachtete Synergismus mit TH stattfindet.

6 Bibliographie

1. Donoghue AJ, Nadkarni V, Berg RA, Osmond MH, Wells G, Nesbitt L, Stiell IG, CanAm Pediatric Cardiac Arrest I. Out-of-hospital pediatric cardiac arrest: an epidemiologic review and assessment of current knowledge. *Ann Emerg Med* 2005;46:512-22.
2. Atkins DL, Everson-Stewart S, Sears GK, Daya M, Osmond MH, Warden CR, Berg RA. Epidemiology and outcomes from out-of-hospital cardiac arrest in children: the Resuscitation Outcomes Consortium Epistry-Cardiac Arrest. *Circulation* 2009;119:1484-91.
3. Nadkarni VM, Larkin GL, Peberdy MA, Carey SM, Kaye W, Mancini ME, Nichol G, Lane-Truitt T, Potts J, Ornato JP, Berg RA, National Registry of Cardiopulmonary Resuscitation I. First documented rhythm and clinical outcome from in-hospital cardiac arrest among children and adults. *Jama* 2006;295:50-7.
4. Moler FW, Silverstein FS, Holubkov R, Slomine BS, Christensen JR, Nadkarni VM, Meert KL, Clark AE, Browning B, Pemberton VL, Page K, Shankaran S, Hutchison JS, Newth CJL, Bennett KS, Berger JT, Topjian A, Pineda JA, Koch JD, Schleien CL, Dalton HJ, Ofori-Amanfo G, Goodman DM, Fink EL, McQuillen P, Zimmerman JJ, Thomas NJ, van der Jagt EW, Porter MB, Meyer MT, Harrison R, Pham N, Schwarz AJ, Nowak JE, Alten J, Wheeler DS, Bhalala US, Lidsky K, Lloyd E, Mathur M, Shah S, Wu T, Theodorou AA, Sanders RCJ, Dean JM. Therapeutic Hypothermia after Out-of-Hospital Cardiac Arrest in Children. *New England Journal of Medicine* 2015;372:1898-908.
5. Young KD, Gausche-Hill M, McClung CD, Lewis RJ. A prospective, population-based study of the epidemiology and outcome of out-of-hospital pediatric cardiopulmonary arrest. *Pediatrics* 2004;114:157-64.
6. Fink EL, Prince DK, Kaltman JR, Atkins DL, Austin M, Warden C, Hutchison J, Daya M, Goldberg S, Herren H, Tijssen JA, Christenson J, Vaillancourt C, Miller R, Schmicker RH, Callaway CW, Resuscitation Outcomes C. Unchanged pediatric out-of-hospital cardiac arrest incidence and survival rates with regional variation in North America. *Resuscitation* 2016;107:121-8.

7. Girotra S, Spertus JA, Li Y, Berg RA, Nadkarni VM, Chan PS, American Heart Association Get With the Guidelines-Resuscitation I. Survival trends in pediatric in-hospital cardiac arrests: an analysis from Get With the Guidelines-Resuscitation. *Circulation Cardiovascular quality and outcomes* 2013;6:42-9.
8. Meert KL, Slomine BS, Christensen JR, Telford R, Holubkov R, Dean JM, Moler FW, Therapeutic Hypothermia after Pediatric Cardiac Arrest Trial I. Family Burden After Out-of-Hospital Cardiac Arrest in Children. *Pediatric critical care medicine : a journal of the Society of Critical Care Medicine and the World Federation of Pediatric Intensive and Critical Care Societies* 2016;17:498-507.
9. Maryniak A, Bielawska A, Walczak F, Szumowski L, Bieganowska K, Rekawek J, Paszke M, Szymaniak E, Knecht M. Long-term cognitive outcome in teenage survivors of arrhythmic cardiac arrest. *Resuscitation* 2008;77:46-50.
10. Morris RD, Krawiecki NS, Wright JA, Walter LW. Neuropsychological, academic, and adaptive functioning in children who survive in-hospital cardiac arrest and resuscitation. *Journal of learning disabilities* 1993;26:46-51.
11. Ronco R. Outcome and Cost at a Children's Hospital Following Resuscitation for Out-of-Hospital Cardiopulmonary Arrest. *Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine* 1995;149:210.
12. Peberdy MA, Callaway CW, Neumar RW, Geocadin RG, Zimmerman JL, Donnino M, Gabrielli A, Silvers SM, Zaritsky AL, Merchant R, Vanden Hoek TL, Kronick SL, American Heart Association. Part 9: post-cardiac arrest care: 2010 American Heart Association Guidelines for Cardiopulmonary Resuscitation and Emergency Cardiovascular Care. *Circulation* 2010;122:S768-86.
13. Pulsinelli WA. Selective neuronal vulnerability: morphological and molecular characteristics. *Prog Brain Res* 1985;63:29-37.
14. Doyle KP, Simon RP, Stenzel-Poore MP. Mechanisms of ischemic brain damage. *Neuropharmacology* 2008;55:310-8.
15. Martin RL, Lloyd HG, Cowan AI. The early events of oxygen and glucose deprivation: setting the scene for neuronal death? *Trends Neurosci* 1994;17:251-7.

16. Puyal J, Ginet V, Clarke PG. Multiple interacting cell death mechanisms in the mediation of excitotoxicity and ischemic brain damage: a challenge for neuroprotection. *Prog Neurobiol* 2013;105:24-48.
17. Love S. Oxidative stress in brain ischemia. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)* 1999;9:119-31.
18. Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* 1999;22:391-7.
19. Bano D, Nicotera P. Ca²⁺ signals and neuronal death in brain ischemia. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 2007;38:674-6.
20. Yenari MA, Han HS. Neuroprotective mechanisms of hypothermia in brain ischaemia. *Nature reviews Neuroscience* 2012;13:267-78.
21. Globus MY, Busto R, Lin B, Schnippering H, Ginsberg MD. Detection of free radical activity during transient global ischemia and recirculation: effects of intraischemic brain temperature modulation. *Journal of neurochemistry* 1995;65:1250-6.
22. Eguchi Y, Shimizu S, Tsujimoto Y. Intracellular ATP levels determine cell death fate by apoptosis or necrosis. *Cancer research* 1997;57:1835-40.
23. Leist M, Single B, Castoldi AF, Kuhnle S, Nicotera P. Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *The Journal of experimental medicine* 1997;185:1481-6.
24. Small DL, Morley P, Buchan AM. Biology of ischemic cerebral cell death. *Progress in Cardiovascular Diseases* 1999;42:185-207.
25. Polderman KH. Mechanisms of action, physiological effects, and complications of hypothermia. *Crit Care Med* 2009;37:S186-202.
26. Polderman KH, Herold I. Therapeutic hypothermia and controlled normothermia in the intensive care unit: practical considerations, side effects, and cooling methods. *Crit Care Med* 2009;37:1101-20.

27. Kettenmann H, Hanisch UK, Noda M, Verkhratsky A. Physiology of microglia. *Physiological reviews* 2011;91:461-553.
28. Hanisch UK, Kettenmann H. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nature neuroscience* 2007;10:1387-94.
29. van Weering HR, Boddeke HW, Vinet J, Brouwer N, de Haas AH, van Rooijen N, Thomsen AR, Biber KP. CXCL10/CXCR3 signaling in glia cells differentially affects NMDA-induced cell death in CA and DG neurons of the mouse hippocampus. *Hippocampus* 2011;21:220-32.
30. Block ML, Zecca L, Hong JS. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nature reviews Neuroscience* 2007;8:57-69.
31. Lalancette-Hebert M, Gowing G, Simard A, Weng YC, Kriz J. Selective ablation of proliferating microglial cells exacerbates ischemic injury in the brain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2007;27:2596-605.
32. Imai F, Suzuki H, Oda J, Ninomiya T, Ono K, Sano H, Sawada M. Neuroprotective effect of exogenous microglia in global brain ischemia. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 2007;27:488-500.
33. Kitamura Y, Takata K, Inden M, Tsuchiya D, Yanagisawa D, Nakata J, Taniguchi T. Intracerebroventricular injection of microglia protects against focal brain ischemia. *Journal of pharmacological sciences* 2004;94:203-6.
34. Neumann J, Gunzer M, Gutzeit HO, Ullrich O, Reymann KG, Dinkel K. Microglia provide neuroprotection after ischemia. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2006;20:714-6.
35. 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.

36. Zeiner A, Holzer M, Sterz F, Schorkhuber W, Eisenburger P, Havel C, Kliegel A, Laggner AN. Hyperthermia after cardiac arrest is associated with an unfavorable neurologic outcome. *Archives of internal medicine* 2001;161:2007-12.
37. Eicher DJ, Wagner CL, Katikaneni LP, Hulseley TC, Bass WT, Kaufman DA, Horgan MJ, Languani S, Bhatia JJ, Givelichian LM, Sankaran K, Yager JY. Moderate hypothermia in neonatal encephalopathy: efficacy outcomes. *Pediatr Neurol* 2005;32:11-7.
38. Gluckman PD, Wyatt JS, Azzopardi D, Ballard R, Edwards AD, Ferriero DM, Polin RA, Robertson CM, Thoresen M, Whitelaw A, Gunn AJ. Selective head cooling with mild systemic hypothermia after neonatal encephalopathy: multicentre randomised trial. *Lancet* 2005;365:663-70.
39. Edwards AD, Azzopardi DV. Therapeutic hypothermia following perinatal asphyxia. *Archives of disease in childhood Fetal and neonatal edition* 2006;91:F127-31.
40. Shankaran S, Laptook AR, Ehrenkranz RA, Tyson JE, McDonald SA, Donovan EF, Fanaroff AA, Poole WK, Wright LL, Higgins RD, Finer NN, Carlo WA, Duara S, Oh W, Cotten CM, Stevenson DK, Stoll BJ, Lemons JA, Guillet R, Jobe AH, National Institute of Child H, Human Development Neonatal Research N. Whole-body hypothermia for neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy. *N Engl J Med* 2005;353:1574-84.
41. Azzopardi DV, Strohm B, Edwards AD, Dyet L, Halliday HL, Juszczak E, Kapellou O, Levene M, Marlow N, Porter E, Thoresen M, Whitelaw A, Brocklehurst P. Moderate hypothermia to treat perinatal asphyxial encephalopathy. *N Engl J Med* 2009;361.
42. Azzopardi D, Strohm B, Marlow N, Brocklehurst P, Deierl A, Eddama O, Goodwin J, Halliday HL, Juszczak E, Kapellou O, Levene M, Linsell L, Omar O, Thoresen M, Tusor N, Whitelaw A, Edwards AD. Effects of hypothermia for perinatal asphyxia on childhood outcomes. *N Engl J Med* 2014;371:140-9.
43. Bernard SA, Gray TW, Buist MD, Jones BM, Silvester W, Gutteridge G, Smith K. Treatment of comatose survivors of out-of-hospital cardiac arrest with induced hypothermia. *N Engl J Med* 2002;346:557-63.
44. Group HaCAS. Mild therapeutic hypothermia to improve the neurologic outcome after cardiac arrest. *N Engl J Med* 2002;346:549-56.

45. Hypothermia after Cardiac Arrest Study G. Mild therapeutic hypothermia to improve the neurologic outcome after cardiac arrest. *N Engl J Med* 2002;346:549-56.
46. Nielsen N, Wetterslev J, Cronberg T, Erlinge D, Gasche Y, Hassager C, Horn J, Hovdenes J, Kjaergaard J, Kuiper M, Pellis T, Stammedt P, Wanscher M, Wise MP, Aneman A, Al-Subaie N, Boesgaard S, Bro-Jeppesen J, Brunetti I, Bugge JF, Hingston CD, Juffermans NP, Koopmans M, Kober L, Langorgren J, Lilja G, Moller JE, Rundgren M, Rylander C, Smid O, Werer C, Winkel P, Friberg H, Investigators TTMT. Targeted temperature management at 33 degrees C versus 36 degrees C after cardiac arrest. *N Engl J Med* 2013;369:2197-206.
47. Polderman KH, Varon J. How low should we go? Hypothermia or strict normothermia after cardiac arrest? *Circulation* 2015;131:669-75.
48. Moler FW, Silverstein FS, Holubkov R, Slomine BS, Christensen JR, Nadkarni VM, Meert KL, Clark AE, Browning B, Pemberton VL, Page K, Shankaran S, Hutchison JS, Newth CJ, Bennett KS, Berger JT, Topjian A, Pineda JA, Koch JD, Schleien CL, Dalton HJ, Ofori-Amanfo G, Goodman DM, Fink EL, McQuillen P, Zimmerman JJ, Thomas NJ, van der Jagt EW, Porter MB, Meyer MT, Harrison R, Pham N, Schwarz AJ, Nowak JE, Alten J, Wheeler DS, Bhalala US, Lidsky K, Lloyd E, Mathur M, Shah S, Wu T, Theodorou AA, Sanders RC, Jr., Dean JM, Investigators TT. Therapeutic hypothermia after out-of-hospital cardiac arrest in children. *N Engl J Med* 2015;372:1898-908.
49. de Caen AR, Maconochie IK, Aickin R, Atkins DL, Biarent D, Guerguerian AM, Kleinman ME, Kloeck DA, Meaney PA, Nadkarni VM, Ng KC, Nuthall G, Reis AG, Shimizu N, Tibballs J, Veliz Pintos R, Pediatric Basic Life S, Pediatric Advanced Life Support Chapter C. Part 6: Pediatric Basic Life Support and Pediatric Advanced Life Support: 2015 International Consensus on Cardiopulmonary Resuscitation and Emergency Cardiovascular Care Science With Treatment Recommendations. *Circulation* 2015;132:S177-203.
50. Hägerdal M, Harp J, Nilsson L, Siesjö BK. The Effect of Induced Hypothermia Upon Oxygen Consumption in the Rat Brain. *Journal of neurochemistry* 1975;24:311-6.
51. Palmer C, Vannucci RC, Christensen MA, Brucklacher RM. Regional cerebral blood flow and glucose utilization during hypothermia in newborn dogs. *Anesthesiology* 1989;71:730-7.

52. Ehrlich MP, McCullough JN, Zhang N, Weisz DJ, Juvonen T, Bodian CA, Griep RB. Effect of hypothermia on cerebral blood flow and metabolism in the pig. *The Annals of thoracic surgery* 2002;73:191-7.
53. Erecinska M, Thoresen M, Silver IA. Effects of hypothermia on energy metabolism in Mammalian central nervous system. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 2003;23:513-30.
54. Tong G, Walker C, Buhner C, Berger F, Miera O, Schmitt KR. Moderate hypothermia initiated during oxygen-glucose deprivation preserves HL-1 cardiomyocytes. *Cryobiology* 2015;70:101-8.
55. Auer RN. Non-pharmacologic (physiologic) neuroprotection in the treatment of brain ischemia. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2001;939:271-82.
56. Schmitt KR, Tong G, Berger F. Mechanisms of hypothermia-induced cell protection in the brain. *Mol Cell Pediatr* 2014;1:7.
57. Busto R, Dietrich WD, Globus MY, Valdes I, Scheinberg P, Ginsberg MD. Small differences in intraischemic brain temperature critically determine the extent of ischemic neuronal injury. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 1987;7:729-38.
58. 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.
59. Liu L, Kim JY, Koike MA, Yoon YJ, Tang XN, Ma H, Lee H, Steinberg GK, Lee JE, Yenari MA. FasL shedding is reduced by hypothermia in experimental stroke. *Journal of neurochemistry* 2008;106:541-50.
60. Perrone S, Szabo M, Bellieni CV, Longini M, Bango M, Kelen D, Treszl A, Negro S, Tataranno ML, Buonocore G. Whole body hypothermia and oxidative stress in babies with hypoxic-ischemic brain injury. *Pediatr Neurol* 2010;43:236-40.

61. Han HS, Qiao Y, Karabiyikoglu M, Giffard RG, Yenari MA. Influence of mild hypothermia on inducible nitric oxide synthase expression and reactive nitrogen production in experimental stroke and inflammation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2002;22:3921-8.
62. Han HS, Karabiyikoglu M, Kelly S, Sobel RA, Yenari MA. Mild hypothermia inhibits nuclear factor-kappaB translocation in experimental stroke. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 2003;23:589-98.
63. Globus MY, Alonso O, Dietrich WD, Busto R, Ginsberg MD. Glutamate release and free radical production following brain injury: effects of posttraumatic hypothermia. *Journal of neurochemistry* 1995;65:1704-11.
64. Wolff B, Machill K, Schumacher D, Schulzki I, Werner D. Early achievement of mild therapeutic hypothermia and the neurologic outcome after cardiac arrest. *International journal of cardiology* 2009;133:223-8.
65. Burdon RH. Temperature and animal cell protein synthesis. *Symposia of the Society for Experimental Biology* 1987;41:113-33.
66. Danno S, Nishiyama H, Higashitsuji H, Yokoi H, Xue JH, Itoh K, Matsuda T, Fujita J. Increased transcript level of RBM3, a member of the glycine-rich RNA-binding protein family, in human cells in response to cold stress. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;236:804-7.
67. 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. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:1865-70.
68. Chip S, Zelmer A, Ogunshola OO, Felderhoff-Mueser U, Nitsch C, Buhner C, Wellmann S. The RNA-binding protein RBM3 is involved in hypothermia induced neuroprotection. *Neurobiol Dis* 2011;43:388-96.
69. 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 Res* 2009;1258:12-24.

70. Smart F, Aschrafi A, Atkins A, Owens GC, Pilotte J, Cunningham BA, Vanderklish PW. Two isoforms of the cold-inducible mRNA-binding protein RBM3 localize to dendrites and promote translation. *Journal of neurochemistry* 2007;101:1367-79.
71. Carpenter CD, Kreps JA, Simon AE. Genes encoding glycine-rich *Arabidopsis thaliana* proteins with RNA-binding motifs are influenced by cold treatment and an endogenous circadian rhythm. *Plant physiology* 1994;104:1015-25.
72. Jackson TC, Manole MD, Kotermanski SE, Jackson EK, Clark RS, Kochanek PM. Cold stress protein RBM3 responds to temperature change in an ultra-sensitive manner in young neurons. *Neuroscience* 2015;305:268-78.
73. Tong G, Endersfelder S, Rosenthal LM, Wollersheim S, Sauer IM, Buhner 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 Res* 2013;1504:74-84.
74. Danno S, Itoh K, Matsuda T, Fujita J. Decreased expression of mouse *Rbm3*, a cold-shock protein, in Sertoli cells of cryptorchid testis. *The American journal of pathology* 2000;156:1685-92.
75. Wellmann S, Buhner C, Moderegger E, Zelmer A, Kirschner R, Koehne P, Fujita J, Seeger K. Oxygen-regulated expression of the RNA-binding proteins RBM3 and CIRP by a HIF-1-independent mechanism. *J Cell Sci* 2004;117:1785-94.
76. Trollmann R, Rehrauer H, Schneider C, Krischke G, Huemmler N, Keller S, Rascher W, Gassmann M. 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.
77. Zhu X, Buhner C, Wellmann S. Cold-inducible proteins CIRP and RBM3, a unique couple with activities far beyond the cold. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 2016;73:3839-59.
78. Sureban SM, Ramalingam S, Natarajan G, May R, Subramaniam D, Bishnupuri KS, Morrison AR, Dieckgraefe BK, Brackett DJ, Postier RG, Houchen CW, Anant S. Translation regulatory factor RBM3 is a proto-oncogene that prevents mitotic catastrophe. *Oncogene* 2008;27:4544-56.

79. Williams DR, Epperson LE, Li W, Hughes MA, Taylor R, Rogers J, Martin SL, Cossins AR, Gracey AY. Seasonally hibernating phenotype assessed through transcript screening. *Physiological genomics* 2005;24:13-22.
80. Peretti D, Bastide A, Radford H, Verity N, Molloy C, Martin MG, Moreno JA, Steinert JR, Smith T, Dinsdale D, Willis AE, Mallucci GR. RBM3 mediates structural plasticity and protective effects of cooling in neurodegeneration. *Nature* 2015;518:236-9.
81. Topjian A, Hutchins L, DiLiberto MA, Abend NS, Ichord R, Helfaer M, Berg RA, Nadkarni V. Induction and maintenance of therapeutic hypothermia after pediatric cardiac arrest: efficacy of a surface cooling protocol. *Pediatric critical care medicine : a journal of the Society of Critical Care Medicine and the World Federation of Pediatric Intensive and Critical Care Societies* 2011;12:e127-35.
82. Borlongan CV, Wang Y, Su TP. Delta opioid peptide (D-Ala 2, D-Leu 5) enkephalin: linking hibernation and neuroprotection. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 2004;9:3392-8.
83. Horton ND, Kaftani DJ, Bruce DS, Bailey EC, Krober AS, Jones JR, Turker M, Khattar N, Su TP, Bolling SF, Oeltgen PR. Isolation and partial characterization of an opioid-like 88 kDa hibernation-related protein. *Comparative biochemistry and physiology Part B, Biochemistry & molecular biology* 1998;119:787-805.
84. Bruce DS, Cope GW, Elam TR, Ruit KA, Oeltgen PR, Su TP. Opioids and hibernation. I. Effects of naloxone on bear HIT'S depression of guinea pig ileum contractility and on induction of summer hibernation in the ground squirrel. *Life sciences* 1987;41:2107-13.
85. Oeltgen PR, Bergmann LC, Spurrier WA, Jones SB. Isolation of a hibernation inducing trigger(s) from the plasma of hibernating woodchucks. *Prep Biochem* 1978;8:171-88.
86. Oeltgen PR, Nilekani SP, Nuchols PA, Spurrier WA, Su T-P. Further studies on opioids and hibernation: Delta opioid receptor ligand selectively induced hibernation in summer-active ground squirrels. *Life sciences* 1988;43:1565-74.
87. Karck M, Tanaka S, Bolling SF, Simon A, Su TP, Oeltgen PR, Haverich A. Myocardial protection by ischemic preconditioning and delta-opioid receptor activation in the isolated working rat heart. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2001;122:986-92.

88. Chien S, Oeltgen PR, Diana JN, Salley RK, Su TP. Extension of tissue survival time in multiorgan block preparation with a delta opioid DADLE ([D-Ala², D-Leu⁵]-enkephalin). *J Thorac Cardiovasc Surg* 1994;107:964-7.
89. Chien S, Oeltgen PR, Diana JN, Shi X, Nilekani SP, Salley R. Two-day preservation of major organs with autoperfusion multiorgan preparation and hibernation induction trigger. A preliminary report. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1991;102:224-34.
90. Oeltgen PR, Horton ND, Bolling SF, Su TP. Extended lung preservation with the use of hibernation trigger factors. *The Annals of thoracic surgery* 1996;61:1488-93.
91. Tsao LI, Ladenheim B, Andrews AM, Chiueh CC, Cadet JL, Su TP. Delta opioid peptide [D-Ala²,D-leu⁵]enkephalin blocks the long-term loss of dopamine transporters induced by multiple administrations of methamphetamine: involvement of opioid receptors and reactive oxygen species. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 1998;287:322-31.
92. Hayashi T, Hirata H, Asanuma M, Ladenheim B, Tsao LI, Cadet JL, Su TP. Delta opioid peptide [D-Ala², D-Leu⁵]enkephalin causes a near complete blockade of the neuronal damage caused by a single high dose of methamphetamine: examining the role of p53. *Synapse (New York, NY)* 2001;39:305-12.
93. Borlongan CV, Su TP, Wang Y. Treatment with delta opioid peptide enhances in vitro and in vivo survival of rat dopaminergic neurons. *Neuroreport* 2000;11:923-6.
94. Hayashi T, Tsao LI, Su TP. Antiapoptotic and cytotoxic properties of delta opioid peptide [D-Ala⁽²⁾,D-Leu⁽⁵⁾]enkephalin in PC12 cells. *Synapse (New York, NY)* 2002;43:86-94.
95. Zhang J, Gibney GT, Zhao P, Xia Y. Neuroprotective role of delta-opioid receptors in cortical neurons. *American journal of physiology Cell physiology* 2002;282:C1225-34.
96. Borlongan CV, Hayashi T, Oeltgen PR, Su TP, Wang Y. Hibernation-like state induced by an opioid peptide protects against experimental stroke. *BMC Biol* 2009;7:31.
97. Su DS, Wang ZH, Zheng YJ, Zhao YH, Wang XR. Dose-dependent neuroprotection of delta opioid peptide [D-Ala², D-Leu⁵] enkephalin in neuronal death and retarded behavior induced by forebrain ischemia in rats. *Neuroscience letters* 2007;423:113-7.

98. Chao D, Balboni G, Lazarus LH, Salvadori S, Xia Y. Na⁺ mechanism of delta-opioid receptor induced protection from anoxic K⁺ leakage in the cortex. *Cellular and molecular life sciences* : CMLS 2009;66:1105-15.
99. Chao D, He X, Yang Y, Bazy-Asaad A, Lazarus LH, Balboni G, Kim DH, Xia Y. DOR activation inhibits anoxic/ischemic Na⁺ influx through Na⁺ channels via PKC mechanisms in the cortex. *Exp Neurol* 2012;236:228-39.
100. Kaneko Y, Tajiri N, Su TP, Wang Y, Borlongan CV. Combination treatment of hypothermia and mesenchymal stromal cells amplifies neuroprotection in primary rat neurons exposed to hypoxic-ischemic-like injury in vitro: role of the opioid system. *PloS one* 2012;7:e47583.
101. Rungatscher A, Linardi D, Giacomazzi A, Tessari M, Menon T, Mazzucco A, Faggian G. Cardioprotective effect of delta-opioid receptor agonist vs. mild therapeutic hypothermia in a rat model of cardiac arrest with extracorporeal life support. *Resuscitation* 2013;84:244-8.
102. Bonfils PK, Reith J, Hasseldam H, Johansen FF. Estimation of the hypothermic component in neuroprotection provided by cannabinoids following cerebral ischemia. *Neurochemistry international* 2006;49:508-18.
103. Fernandez-Lopez D, Pazos MR, Tolon RM, Moro MA, Romero J, Lizasoain I, Martinez-Orgado J. The cannabinoid agonist WIN55212 reduces brain damage in an in vivo model of hypoxic-ischemic encephalopathy in newborn rats. *Pediatric research* 2007;62:255-60.
104. Klein TW. Cannabinoid-based drugs as anti-inflammatory therapeutics. *Nature reviews Immunology* 2005;5:400-11.
105. Piomelli D. The molecular logic of endocannabinoid signalling. *Nature reviews Neuroscience* 2003;4:873-84.
106. Stella N. Cannabinoid and cannabinoid-like receptors in microglia, astrocytes, and astrocytomas. *Glia* 2010;58:1017-30.
107. Walter L, Franklin A, Witting A, Wade C, Xie Y, Kunos G, Mackie K, Stella N. Nonpsychotropic cannabinoid receptors regulate microglial cell migration. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 2003;23:1398-405.

108. Carrier EJ, Kearns CS, Barkmeier AJ, Breese NM, Yang W, Nithipatikom K, Pfister SL, Campbell WB, Hillard CJ. Cultured rat microglial cells synthesize the endocannabinoid 2-arachidonylethanolamide, which increases proliferation via a CB2 receptor-dependent mechanism. *Molecular pharmacology* 2004;65:999-1007.
109. Shen M, Thayer SA. Cannabinoid receptor agonists protect cultured rat hippocampal neurons from excitotoxicity. *Molecular pharmacology* 1998;54:459-62.
110. Mechoulam R, Panikashvili D, Shohami E. Cannabinoids and brain injury: therapeutic implications. *Trends Mol Med* 2002;8:58-61.
111. Nagayama T, Sinor AD, Simon RP, Chen J, Graham SH, Jin K, Greenberg DA. Cannabinoids and neuroprotection in global and focal cerebral ischemia and in neuronal cultures. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 1999;19:2987-95.
112. Alvarez FJ, Lafuente H, Rey-Santano MC, Mielgo VE, Gastiasoro E, Rueda M, Pertwee RG, Castillo AI, Romero J, Martinez-Orgado J. Neuroprotective effects of the nonpsychoactive cannabinoid cannabidiol in hypoxic-ischemic newborn piglets. *Pediatric research* 2008;64:653-8.
113. Mulder M, Geocadin RG. Will the promise of drug-induced therapeutic hypothermia be fulfilled? *Crit Care Med* 2014;42:221-3.
114. Gonzalez FF, Ferriero DM. Therapeutics for neonatal brain injury. *Pharmacol Ther* 2008;120:43-53.
115. Morimoto BH, Koshland DE, Jr. Induction and expression of long- and short-term neurosecretory potentiation in a neural cell line. *Neuron* 1990;5:875-80.
116. Blasi E, Barluzzi R, Bocchini V, Mazzolla R, Bistoni F. Immortalization of murine microglial cells by a v-raf/v-myc carrying retrovirus. *Journal of neuroimmunology* 1990;27:229-37.
117. Lesuisse C, Martin LJ. Long-term culture of mouse cortical neurons as a model for neuronal development, aging, and death. *Journal of neurobiology* 2002;51:9-23.

118. Kim H, Lee SW, Park JS, Min JH, Kim HK. Genomic analysis of [d-Ala², d-Leu⁵] enkephalin preconditioning in cortical neuron and glial cell injury after oxygen deprivation. *Brain Res* 2012;1447:91-105.
119. Desjardins P, Conklin D. NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids. *J Vis Exp* 2010.
120. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonak J, Lind K, Sindelka R, Sjoback R, Sjogreen B, Strombom L, Stahlberg A, Zoric N. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* 2006;27:95-125.
121. Mülhardt C, Beese EW. 4 - The Polymerase Chain Reaction. In: Beese CMW, ed. *Molecular Biology and Genomics*. Burlington: Academic Press; 2007:65-94.
122. Luttmann W. *Der Experimentator: Immunologie*. 4., vollst. überarb. und korr. Aufl. ed. Berlin [u.a.]: Berlin [u.a.] : Springer Spektrum; 2014.
123. Degasperi A, Birtwistle MR, Volinsky N, Rauch J, Kolch W, Kholodenko BN. Evaluating strategies to normalise biological replicates of Western blot data. *PloS one* 2014;9:e87293.
124. Fernandez-Lopez D, Martinez-Orgado J, Casanova I, Bonet B, Leza JC, Lorenzo P, Moro MA, Lizasoain I. Immature rat brain slices exposed to oxygen-glucose deprivation as an in vitro model of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Journal of neuroscience methods* 2005;145:205-12.
125. Jiang X, Mu D, Manabat C, Koshy AA, Christen S, Tauber MG, Vexler ZS, Ferriero DM. Differential vulnerability of immature murine neurons to oxygen-glucose deprivation. *Exp Neurol* 2004;190:224-32.
126. Polderman KH. Application of therapeutic hypothermia in the intensive care unit. Opportunities and pitfalls of a promising treatment modality--Part 2: Practical aspects and side effects. *Intensive care medicine* 2004;30:757-69.
127. Antonic A, Dottori M, Leung J, Sidon K, Batchelor PE, Wilson W, Macleod MR, Howells DW. Hypothermia protects human neurons. *International journal of stroke : official journal of the International Stroke Society* 2014;9:544-52.

128. Oku K, Kuboyama K, Safar P, Obrist W, Sterz F, Leonov Y, Tisherman SA. Cerebral and systemic arteriovenous oxygen monitoring after cardiac arrest. Inadequate cerebral oxygen delivery. *Resuscitation* 1994;27:141-52.
129. Chang S, Jiang X, Zhao C, Lee C, Ferriero DM. Exogenous low dose hydrogen peroxide increases hypoxia-inducible factor-1alpha protein expression and induces preconditioning protection against ischemia in primary cortical neurons. *Neuroscience letters* 2008;441:134-8.
130. Bernaudin M, Nouvelot A, MacKenzie ET, Petit E. Selective neuronal vulnerability and specific glial reactions in hippocampal and neocortical organotypic cultures submitted to ischemia. *Exp Neurol* 1998;150:30-9.
131. Schmidt-Kastner R, Freund TF. Selective vulnerability of the hippocampus in brain ischemia. *Neuroscience* 1991;40:599-636.
132. Dalen ML, Frøyland E, Saugstad OD, Mollnes TE, Rootwelt T. Post-hypoxic hypothermia is protective in human NT2-N neurons regardless of oxygen concentration during reoxygenation. *Brain Research* 2009;1259:80-9.
133. Schmitt KR, Diestel A, Lehnardt S, Schwartlander R, Lange PE, Berger F, Ullrich O, Abdul-Khaliq H. Hypothermia suppresses inflammation via ERK signaling pathway in stimulated microglial cells. *Journal of neuroimmunology* 2007;189:7-16.
134. Gao XY, Zhu SZ, Xiang W, Huang KB, Hu YF, Gu Y, Pan SY. Prolonged hypothermia exposure diminishes neuroprotection for severe ischemic-hypoxic primary neurons. *Cryobiology* 2016;72:141-7.
135. Brewer LD, Thibault O, Staton J, Thibault V, Rogers JT, Garcia-Ramos G, Kraner S, Landfield PW, Porter NM. Increased vulnerability of hippocampal neurons with age in culture: temporal association with increases in NMDA receptor current, NR2A subunit expression and recruitment of L-type calcium channels. *Brain Res* 2007;1151:20-31.
136. Ke S, Dian-san S, Xiang-rui W. Delta opioid agonist [D-Ala2, D-Leu5] enkephalin (DADLE) reduced oxygen-glucose deprivation caused neuronal injury through the MAPK pathway. *Brain Res* 2009;1292:100-6.

137. Wang S, Duan Y, Su D, Li W, Tan J, Yang D, Wang W, Zhao Z, Wang X. Delta opioid peptide [D-Ala2, D-Leu5] enkephalin (DADLE) triggers postconditioning against transient forebrain ischemia. *European journal of pharmacology* 2011;658:140-4.
138. Tian J, Gu Y, Sun K, Wang B, Chen J, Wang X, Su D. [D-Ala2, D-Leu5] encephalin (DADLE) reversibly inhibits cellular transcription in neurons without causing cell injury. *Brain Res* 2014;1565:1-7.
139. Fernandez-Lopez D, Martinez-Orgado J, Nunez E, Romero J, Lorenzo P, Moro MA, Lizasoain I. Characterization of the neuroprotective effect of the cannabinoid agonist WIN-55212 in an in vitro model of hypoxic-ischemic brain damage in newborn rats. *Pediatric research* 2006;60:169-73.
140. Suh HH, Tseng LF. Different types of opioid receptors mediating analgesia induced by morphine, DAMGO, DPDPE, DADLE and beta-endorphin in mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1990;342:67-71.
141. Vybiral S, Jansky L. Hibernation triggers and cryogens: do they play a role in hibernation? *Comp Biochem Physiol A Physiol* 1997;118:1125-33.
142. Aschner M, Sonnewald U, Tan KH. Astrocyte modulation of neurotoxic injury. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)* 2002;12:475-81.
143. Xia Y, Haddad GG. Ontogeny and distribution of opioid receptors in the rat brainstem. *Brain Res* 1991;549:181-93.

7 Eidesstattliche Versicherung

Ich, Maria Feldmann, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „*Hypothermie zur Neuroprotektion nach hypoxisch-ischämischer Schädigung durch Regulation des Kälteschockproteins RBM3: Eine Zellkulturstudie 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 dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

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

Datum

Unterschrift

8 Lebenslauf

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

9 Publikationsliste

Journalpublikation

Feldmann M, Pathipati P, Sheldon RA, Jiang X, Ferriero DM. Isolating astrocytes and neurons sequentially from postnatal murine brains with a magnetic cell separation technique. *J Biol Methods* 2014;1(2):e11. doi: 10.14440/jbm.2014.33

Posterpräsentation mit Abstractveröffentlichung

Feldmann M, Tong G, Fabig V, Krauss A, Berger F, Schmitt KRL. Mild Therapeutic Hypothermia is Neuroprotective during Ischemia: A Cell Co-Culture Modell Study *Symposium of the European Resuscitation Council, Krakau, Polen, Oktober 2013*

Tong G, Feldmann M, Walker C, Berger F, Schmitt KRL. Intra-Ischemia vs Post-Ischemia Hypothermia Induced Neurological and Cardiac Protection via RBM3 Up-Regulation *5th International Hypothermia and Temperature Management Symposium, Edinburgh, Schottland, September 2014*

Vortrag

Feldmann M, Pathipati P, Sheldon RA, Jiang X, Ferriero DM. Paracrine signaling of HIF and downstream targets after oxidative stress in neonatal ischemia *International Academy of Life Sciences/Biomedical Sciences Exchange Program, Student Conference, Boston, USA, Mai 2014*

10 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt PD Dr. med. Katharina Schmitt für die herausragende Betreuung und das wegweisende Mentoring sowie Giang Tong, PhD für die großartige Einführung in die Grundlagenforschung und das stetige Teilen seiner Expertise.

Nora Ebermann, danke ich herzlich für ihr Engagement bei der Präparation der primären Zellen, ihre allzeitige Hilfe bei labortechnischen Fragen und ansteckend gute Laune.

Mein Dank gilt außerdem den Doktoranden Christoph Walker, Lisa-Maria Rosenthal, Annemarie Krauss, Sylvia Wowro, Jana Krech und besonders Vivienne Fabig für den starken Zusammenhalt und die gegenseitige Unterstützung.

Ich danke Prof. Dr. med. Christoph Bühner, Dr. rer. nat. Stefanie Endesfelder und Ruth Herrmann für die Bereitstellung der Hypoxiekammer und die gute Zusammenarbeit.