

Aus der Klinik für Neonatologie, Campus Virchow-Klinikum
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

„Die Rolle der Caspase-1 abhängigen Cytokine, IL-1 β und IL-18, bei der
hyperoxie-induzierten Schädigung des unreifen Gehirns.“

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité –
Universitätsmedizin Berlin

von

Oliver Polley

aus Zossen

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. med. U. Felderhoff-Müser
 2. Prof. Dr. med. L. Gortner
 3. Priv.-Doz. Dr. med. A. Heep

Datum der Promotion: 12.10.2007

Danksagung

Die Durchführung dieser Arbeit wäre ohne zahlreiche Mitarbeiter, Freunde und Institutionen nicht möglich gewesen.

Großer Dank gilt Herrn Professor Dr. Michael Obladen, dem Direktor der Klinik für Neonatologie, Campus Virchow-Klinikum der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin, der mir ermöglichte, diese Arbeit zu schreiben.

Meiner Doktormutter PD Dr. med. Ursula Felderhoff-Müser gilt mein ganz besonderer Dank für das Überlassen des Themas und die hervorragende Betreuung. Mit ihrem Ideenreichtum, ihren motivierenden Worten und konstruktiven Kritiken hat sie mein Interesse an der Forschung wecken und meinen Werdegang fördern können.

Frau Professor Dr. Chrissanthy Ikonomidou und Herrn Professor Dr. Christoph Bühner danke ich für die Unterstützung, mein Stipendium der DFG im Graduiertenkolleg GRK 238 „Schadensmechanismen im Nervensystem – Einsatz von bildgebenden Verfahren“ zu erlangen. In diesem Zusammenhang möchte ich mich auch bei Herrn Professor Dr. Uwe Heinemann und Herrn Professor Dr. Helmut Kettenmann sowie bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft bedanken. Zu Dank verpflichtet bin ich auch dem Bundesministerium für Bildung und Forschung für die finanzielle Unterstützung.

In besonderer Weise danke ich allen Mitarbeitern unseres Labors, die mir mit Rat und Tat zur Seite standen. Frau Jessica Fassbender danke ich für die Hilfe, tierexperimentelle und histologische Methoden zu erlernen, Herrn Marco Sifringer bin ich überaus dankbar für seine geduldige Einweisung in die molekularbiologischen Methoden und seine humorvolle und immer freundlich hilfsbereite Präsenz und fachliche Beratung. Frau Dr. med. Bettina Gerstner und Herrn Dr. med. Mark Dzierko danke ich für die zahlreichen Ratschläge und ihre Hilfestellungen. Ein großes Dankeschön gilt allen hier nicht namentlich erwähnten Mitarbeitern und Freunden. Ganz besonders meiner lieben Freundin Stefanie Pietsch, die mir auch in schwierigen Zeiten geduldig zur Seite stand, danke ich für ihre Unterstützung und motivierenden Worte.

Von ganzen Herzen danke ich meinen lieben Eltern Jolanta und Detlef Polley für ihre liebevolle Unterstützung meines beruflichen wie auch privaten Werdegangs. Ohne ihre Zuwendung und Förderung wären mein Studium und diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|----|
| 1. Einleitung | 1 |
| 1.1. Fortschritte der modernen Neonatologie | 1 |
| 1.2. Sauerstoff | 1 |
| 1.3. Botenstoffe | 5 |
| 1.3.1. Zytokine, Inflammation und Neurodegeneration | 5 |
| 1.3.2. Caspase-1 | 6 |
| 1.3.3. Interleukin-1 β | 7 |
| 1.3.4. Interleukin-18 | 8 |
| 1.3.5. Der gemeinsame Weg der Signalübermittlung von IL-1 β und IL-18 | 10 |
| 1.4. IL-18 Bindungsprotein | 13 |
| 1.5. Die Phase des beschleunigten Hirnwachstums | 14 |
| 1.6. Der programmierte Zelltod | 15 |
| 1.7. Zentrale Fragestellung | 17 |
| | |
| 2. Material und Methoden | 18 |
| 2.1. Material | 18 |
| 2.1.1. Chemikalien | 18 |
| 2.1.2. Lösungen und Puffer | 20 |
| 2.1.3. Kits | 25 |
| 2.1.4. Enzyme und Proteine | 25 |
| 2.1.5. Antikörper | 25 |
| 2.1.6. Oligonukleotide | 26 |
| 2.1.7. Molekulargewichtsstandard | 26 |
| 2.1.8. Versuchstiere | 27 |
| 2.1.9. Geräte, Hilfsmittel und Verbrauchsmaterial | 27 |
| 2.1.10. Software und Datenbanken | 29 |
| 2.2. Methoden | 29 |
| 2.2.1. Durchführung der Tierversuche | 29 |
| 2.2.2. Aufarbeitung des Gewebes | 31 |
| 2.2.3. Histologische Methoden | 31 |

| | |
|---|----|
| 2.2.3.1. DeOlmos Kupfer-Silber-Färbung | 31 |
| 2.2.3.2. Fluoro-Jade-B-Färbung | 32 |
| 2.2.3.3. Immunhistochemische Färbungen für Caspase-3, IL-18 und IL-18R α | 33 |
| 2.2.3.4. Stereologisch-optische Dissektionsmethode | 34 |
| 2.2.3.5. Statistische Auswertung der histologischen Arbeiten | 35 |
| 2.2.4. Molekularbiologische Methoden | 36 |
| 2.2.4.1. Arbeitsschritte der molekularbiologischen Verfahren | 36 |
| 2.2.4.2. Extraktion von Gesamt-RNA aus Hirngewebe | 37 |
| 2.2.4.3. RNA-Behandlung mit DNase I | 37 |
| 2.2.4.4. Gelelektrophoretische Trennung der RNA | 38 |
| 2.2.4.5. Reverse Transkription | 38 |
| 2.2.4.6. PCR mit internem Standard | 39 |
| 2.2.4.7. Nichtdenaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese | 43 |
| 2.2.4.8. Silberfärbung der Polyacrylamidgele und densitometrische Auswertung | 44 |
| 2.2.5. Proteinchemische Methoden | 46 |
| 2.2.5.1. Arbeitsschritte der proteinchemischen Verfahren | 46 |
| 2.2.5.2. Proteinextraktion | 47 |
| 2.2.5.3. BCA-Methode zur Bestimmung der Proteinkonzentration | 47 |
| 2.2.5.4. Elektrophorese in SDS-Polyacrylamidgelen | 48 |
| 2.2.5.5. Western Blotting | 49 |
| 2.2.5.6. Immundetektion der membrangebundenen Proteine | 50 |
| 2.2.5.7. Entfernen gebundener Antikörper von membrangebundenen Proteinen | 52 |
| | |
| 3. Ergebnisse | 53 |
| 3.1. Physiologische Parameter der Versuchstiere | 53 |
| 3.2. Caspase-1 (ICE): mRNA- und Proteinexpression | 53 |
| 3.3. Interleukin-1 β : mRNA- und Proteinexpression | 55 |
| 3.4. Interleukin-18 und Interleukin-18R α : mRNA- und Proteinexpression | 56 |
| 3.5. Immunhistologischer Nachweis von IL-18, IL18R α und Caspase-3 | 58 |
| 3.6. IL-18BP wirkt im Hyperoxiemodell neuroprotektiv | 60 |
| 3.7. Reduktion der hyperoxie-induzierten Hirnschädigung bei IRAK-4 (-/-) Mäusen | 63 |

| | |
|--|----|
| 4. Diskussion | 65 |
| 4.1. Allgemeine Betrachtung | 65 |
| 4.2. Hyperoxie bedingt gesteigerte Genexpression von Caspase-1 | 65 |
| 4.3. Verstärkte Expression von IL-1 β bei Hyperoxie | 67 |
| 4.4. Verstärkte Expression von IL-18 bei Hyperoxie | 68 |
| 4.5. IL-18BP birgt die potenzielle Fähigkeit für einen therapeutischen Einsatz | 70 |
| 4.6. IRAK-4 – Ansatzpunkt für die therapeutische Intervention | 71 |
| 4.7. Sauerstofftherapie in der kritischen Phase der Gehirnentwicklung | 72 |
| 5. Zusammenfassung | 74 |
| 6. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis | 76 |
| 6.1. Abbildungen | 76 |
| 6.2. Tabellen | 77 |
| 7. Abkürzungsverzeichnis | 78 |
| 8. Literaturverzeichnis | 82 |