

## 1. Einleitung

Akute Degeneration von Fasertrakten im zentralen Nervensystem (ZNS), wie sie durch traumatischen Hirnschaden (THS) oder Rückenmarksverletzung (RMV) induziert wird, hat eine anterograde (Wallersche) Degeneration der abgetrennten Axone zur Folge. In Abhängigkeit einer Reihe von Faktoren, wie z.B. Nähe der Läsion zum Zellkörper, verursacht sie des Weiteren oft eine retrograde Degeneration der axotomisierten Neurone. Zusätzlich sterben häufig Neurone, die nicht direkt beschädigt wurden. Das Sterben dieser sekundär beschädigten Neurone trägt wesentlich zu den neurologischen Defiziten bei (Raghupathi et al. 2000). Beispielsweise induziert kontrollierte Kortikalperkussion einen um zwei Wochen verspäteten, sekundären Verlust von Neuronen im Thalamus (Conti et al. 1998). Unter den vermuteten Ursachen dieses sekundären Schadens sind Ischämie-Reperfusion, Exzitotoxizität, Flüssigkeit-Elektrolyt-Störungen, Freisetzung oxidativer Radikale, inflammatorische/immunologische Prozesse oder eine Kombination dieser Faktoren (Waldmeier 2003).

Viele tierexperimentelle THS-Modelle verwenden Flüssigkeits- oder Stiftperkussion auf die freigelegte *Dura mater* oder lassen ein frei fallendes Gewicht auf den intakten Schädel stossen. Diese Modelle verursachen einen Schaden, der in verschiedener Hinsicht dem Schaden ähnelt, der bei menschlichen THS-Patienten gefunden wird (Laurer and McIntosh 1999). Jedoch bleiben die neuroanatomischen Verbindungen der empfindlichen Neurone zu der Läsionsstelle ungenau beschrieben und wegen der Komplexität des Schadens ist es schwierig festzulegen, ob die einzelnen sterbenden Zellen direkt (mechanisch) beschädigt wurden oder tatsächlich wegen eines sekundären Schadens degenerieren. Dieses Problem kann durch Anwenden des Modells der entorhinalen Cortexläsion (ECL) umgangen werden (Lynch et al. 1972). Die ECL induziert eine gut beschriebene, akute Degeneration des glutaminergen *Tractus perforans*, der aus der zweiten und dritten Schicht des entorhinalen Cortex entspringt und Synapsen an den distalen Segmenten von Körnerzeldendriten in der mittleren und äußeren Molekularschicht des *Gyrus dentatus* bildet. Wegen dieser schicht-spezifischen Synapsenbildung erlaubt die ECL eine genauere Untersuchung der Änderungen in den Zonen axonaler Degeneration. Die ECL ist daher eine etablierte Methode zur Untersuchung von axonaler Sprossungen (Deller et al. 2001, Del Turco et al. 2003, Frotscher et al. 1997), (Lynch et al. 1972), transsynaptischen dendritischen Änderungen (Nitsch and Frotscher 1992, Nitsch and Frotscher 1993), und inflammatorischen Antworten in denervierten kortikalen Schichten (Jensen et al. 1994, Jensen et al. 1997).

Programmierter Zelltod gilt als eine Ursache sekundärer Degeneration nach Neurotrauma. Untersuchungen, die sich mit den Mechanismen dieser Degeneration beschäftigen, zeigten,

daß der Apoptose-induzierende Ligand CD95L (FasL) nach ZNS-Schaden hochreguliert wird und Neurone nach Hirntrauma gegen CD95L-induzierte Apoptose empfindlich werden (Bechmann et al. 2000, Beer et al. 2000a, Felderhoff-Mueser et al. 2000, Felderhoff-Mueser et al. 2002, Martin-Villalba et al. 1999, Qiu et al. 2002). Nach Bindung von CD95L mit seinem Rezeptor CD95 (Fas) wird eine intrazelluläre Reaktionskette aktiviert, die zur Aktivierung von Caspase 3 führt. Nach seiner Aktivierung beginnt Caspase 3 für die Homeostase wichtige Proteine abzubauen, was den programmierten Zelltod zur Folge hat (Bratton et al. 2000). Caspase 3 wurde in Neuronen nach THS (Beer et al. 2000b) und RMV (Citron et al. 2000) entdeckt und scheint besser als TUNEL-Färbungen mit sterbenden Neuronen zu korrelieren (Knoblach et al. 2002). Es gibt zwei Mausstämme, welche natürlich vorkommende Mutationen haben, die die Produktion eines defizienten CD95- (lpr/bl6) oder CD95L- (gld/bl6) Proteins zur Folge haben. Deswegen werden für die Untersuchung CD95L-mediierter Apoptose unter verschiedenen pathologischen Umständen diese Mausstämme verwendet (Nagata and Suda 1995). Wenn das CD95/CD95L-System tatsächlich notwendig für eine gegebene Art der Degeneration ist, sollte ein Unterschied in der Menge der sterbenden Neurone und/oder Caspase 3-Aktivierung nachweisbar sein

Eine andere, CD95L-unabhängige Art des programmierten neuronalen Zelltodes wird durch Kalziumüberschuß während Exzitotoxizität initiiert und führt zu einer mitochondrialen Freisetzung von Cytochrom c und Aktivierung von Caspasen (Büki et al. 2000, Cid et al. 2003, Lok and Martin 2002, Luetjens et al. 2000, Tennesi et al. 1998, Zhang et al. 2002). Ein solcher exzitotoxischer Zelltod zeichnet sich durch folgende morphologische Aspekte aus: Sterbende Neurone zeigen unter dem Elektronenmikroskop geschwollene Mitochondrien und Kondenzierung sowie Fragmentierung von Chromatin (Büki et al 2000, Dietrich et al. 1992, Fix et al. 1993, Ishimaru et al. 1999, Olney 1994). Im endoplasmatischen Retikulum entstehen des weiteren Vakuolen. Die häufigsten exzitatorischen Rezeptoren im ZNS sind die AMPA- und NMDA-Rezeptoren, die primär durch Glutamat aktiviert werden. Neuronale Überreizung durch unkontrollierte Glutamat-Freisetzung führt zum zuvor beschriebenen intrazellulären Kalziumüberschuss und dadurch zu Exzitotoxizität. Tatsächlich konnten Sloviter und Mitarbeiter durch die wiederholte Reizung des *Tractus perforans* den Zelltod verschiedener neuronaler Populationen im Hippocampus hervorrufen (Sloviter et al. 1996). Hippocampale Neurodegenerierung nach ECL wurde noch nicht systematisch untersucht, aber es wurde gezeigt, daß die Hochregulierung des „frühen Gens“ c-fos in den postsynaptischen Körnerzellen mit dem nicht-kompetativen NMDA Antagonisten MK-801 blockiert werden kann (Nitsch and Frotscher 1992). Daraus läßt sich vermuten, daß die Läsion zu exzessiven

Glutamatspiegeln führt. Deswegen wurde von uns spekuliert, daß eine Läsion im ZNS nicht nur eine retrograde Degeneration der axotomisierten Zellen verursacht (Bechmann et al. 2002), sondern auch zu einem Glutamat-medierten sekundären Zelltod der Zielzellen führen könnte.

## **2. Zielstellung**

Es wurde von uns gezeigt, daß nach ECL CD95L auf Astrozyten hochreguliert wurde, ohne daß nach drei Tagen sterbende Zellen morphologisch nachweisbar waren (Bechmann et al. 2000). Da CD95L in empfindlichen Zellen Apoptose auslösen kann und apoptotische Zellen schnell phagozytiert werden, haben wir nach einem kürzeren Zeitabstand das Hirngewebe untersucht und Immunocytochemie gegen aktivierte Caspase 3 angewendet. Erste Ergebnisse 24 Stunden nach der Läsion zeigten Caspase 3-positive Neurone im Gyrus dentatus. Daraufhin folgten Experimente, mit denen wir versuchten, Verlauf und Ursache dieser Apoptose zu beschreiben.

Auch während der normalen Entwicklung des Gehirns sterben viele Neurone durch Apoptose, ohne daß die genauen Ursachen dafür bekannt sind. Es wurde berichtet, daß der Apoptose-induzierende Rezeptor CD95 auf Neuronen im Cornu amonis (CA) des Hippocampus von Ratten und Mäusen während der Entwicklung des Gehirns exprimiert wird. Trotz dieser Beobachtung wurde nie von einer Anomalie in der Zahl der Neurone im Hippocampus oder der Größe des Gehirns unter den CD95- (lpr) oder CD95L- (gld) defizienten Mausstämmen berichtet. Eine solche Anomalie würde man erwarten, sollte das CD95/CD95L-System eine wichtige Rolle in der entwicklungsbedingten Apoptose spielen. Deswegen haben wir die Hippocampi von jungen (20 Tage alten) Mäusen, die ein funktionierendes CD95/CD95L-System (C57) haben, mit Mäusen, deren CD95/CD95L System nicht funktioniert (lpr/gld), verglichen.

### 3. Methodik

*Tiere:* Folgende bl6 ("black six") Mäusestämme wurden für die Experimente verwendet: lpr, gld und C57. Diese Stämme sind mit Ausnahme der kodierenden Gene von CD95 (lpr) und CD95L (gld) genetisch identisch, wobei der C57-Stamm ein Wildtyp-Inzuchtstamm ist (Cohen and Eisenberg 1992, Froidevaux et al. 1991, Montecino-Rodriguez and Looor 1991, Nagata and Suda 1995). Die Experimente zur Untersuchung von transsynaptischem Zelltod wurden mit erwachsenen (6 bis 8 Wochen alten) Mäuse durchgeführt. Für die Untersuchungen, ob CD95/CD95L eine Rolle in der Entwicklung des Gehirns spielt, wurden 20 Tage alte Mäuse verwendet.

*Entorhinale Cortexläsion:* Mäuse wurden mit Ketamin (1mg/kg Körpergewicht) narkotisiert. Danach wurde die Maus in einem stereotaktischen Gerät befestigt und der Schädel freigelegt. Vom Lambdapunkt aus wurde die Klinge 0,4mm lateral und 1,2mm dorsoventral gesetzt. An dieser Stelle wurde schließlich ein Loch in den Schädel und die Dura gebohrt und die Klinge bis zur Schädelbasis geführt.

*MK-801:* Um eine mögliche Glutamatrezeptor-Überreizung als Apoptose-Ursache zu prüfen, wurde der nicht-kompetative NMDA-Rezeptor Antagonist MK-801 benutzt. Es erwies sich, daß eine Dosis von 1mg/kg Körpergewicht (KG) für die Tiere gut verträglich ist und die "Retraktion" von Dendriten sowie die c-fos-Expression in Neuronen im Hippocampus nach der Läsion verhindert (Nitsch and Frotscher 1992). Um die NMDA-Rezeptoren zu blockieren, wurde MK-801 in 0,1 M Phosphatpuffer (PB) gelöst, und 1mg/kg KG wurde intraperitoneal 30 Minuten vor und alle 12 Stunden nach der ECL bis zur Perfusion injiziert. Nachdem eine Reduktion des transsynaptischen Zelltodes durch diese Behandlung gefunden wurde, wurden acht Mäuse mit einer Dosis von 2mg/kg KG nach dem selben Schema behandelt, um die Möglichkeit einer kompletten Reduktion der Aktivierung von Caspase 3 zu versuchen.

*Perfusion:* Nachdem die Mäuse mit Ketamin tief narkotisiert wurden, wurden sie transkardial zuerst mit 50ml einer 0,9-prozentigen NaCl-Lösung, danach mit einer vierprozentigen Paraformaldehydlösung (PFA) perfundiert. Für Tiere, deren Gewebe später elektronenmikroskopisch untersucht werden sollte, wurde zusätzlich einprozentiges Glutaraldehyd zu der vierprozentigen PFA zugesetzt. Nach der Perfusion wurden die Gehirne entnommen und in vierprozentiger PFA über Nacht nachfixiert.

*Immunocytochemie:* 50µm dicke Schnitte wurden zuerst 5 Minuten lang in dreiprozentiger H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung eingelegt, um die endogenen Peroxidasen zu blockieren. Danach inkubierten wir die Schnitte in zehnprozentigen Ziegen Serum in PB, um eine unspezifische Antikörperbindung zu vermeiden. Daraufhin wurden die Schnitte mit polyklonalen

Antikörpern gegen aktivierte Caspase 3 von Mäusen aus Kaninchen (1:1000 Lösung) über Nacht in einer Kühlzelle inkubiert; danach erfolgte eine Inkubation mit einem biotinylierten Zweitantikörper aus Ziege (1:250 Lösung) für zwei Stunden, so daß die Antikörper-Antikörper-Komplexe durch ein Standardprotokoll nach Verstärkung mit Avidin-Biotin mit Diaminobenzidin (DAB) sichtbar gemacht werden konnte.

*Hoechst 33342-Färbung:* Hoechst 33342 ist ein Farbstoff, der an doppelsträngige DNA bindet. Einige anti-Caspase 3-DAB-gefärbte Schnitte wurden gegengefärbt, um die kondensierte und fragmentierte DNA innerhalb von Caspase 3-positiven Neurone darzustellen.

*Silberfärbung:* Unbehandelte Schnitte von lädierten Mäusen wurden zusätzlich mit der DeOlmos Technik eingefärbt. Diese Versilberungstechnik führt zur Darstellung degenerierender Zellen und Fasern (DeOlmos and Ingram 1971).

*Statistik:* Von den untersuchten Bereichen wurden Bilder mit einer Digitalkamera gemacht. Die Bilder wurden verschlüsselt und an zwei Untersucher gegeben, die mit Histologie vertraut sind, die alle Caspase 3-positiven Neurone im Gyrus Dentatus eines Schnittes zählten. Für die Quantifizierung von Caspase 3-positiven Zellen wurden die Daten von C57-Mäuse mit denen von gld- und lpr-Mäusen in einem t-Test verglichen. Ebenfalls wurde der Unterschied zwischen Mäusen mit und ohne MK-801-Behandlung mit einem t-Test verglichen.

Für das Experiment hinsichtlich des Effekts von CD95/CD95L auf die Hirnentwicklung wurde ein Programm geschrieben, mit dem die Fläche vom Cornu ammonis in Nissl-gefärbten Schnitten erfolgreich gemessen werden konnte. Der Cornu ammonis kann in vier Untereinheiten, abgekürzt CA1 bis 3, eingeteilt werden. Diese Untereinheiten wurden fotografiert, verschlüsselt und gezählt wie oben. Diese Rohdaten von den drei Gruppen C57 (n=5), gld (n=5) und lpr (n=5) wurden gesammelt und analysiert. Um auf signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen zu testen, kam für paarweise Vergleiche der Mann-Whitney-Test und für den Vergleich aller drei Gruppen der Kruskal-Wallis-Test zum Einsatz.

## 4. Ergebnisse

### 1. *Transsynaptischer Zelltod*

Für die Caspase 3-Studie wurden C57-Mäuse zu den folgenden Zeitpunkten untersucht: 12, 24, 36, 48, 60, 72, und 96 Stunden nach ECL (hpl; *hours post lesion*). Caspase 3-positive Neurone konnten zwischen 24 und 48 hpl mit einem Gipfel zwischen 24 und 36 hpl gefunden werden. Zum Zeitpunkt dieser Gipfel waren 0 bis 185 Caspase 3-positive Neurone auf einzelnen Schnitten zu sehen. Am häufigsten bildeten sich Gruppen von 25 bis 40 positiven Neuronen im Scheitelpunkt des Gyrus dentatus. Die Morphologie dieser Zellen glich der von Körnerzellen. Ein Vergleich der Verteilung von Caspase 3-positiven und Parvalbumin-positiven GABAergen Interneuronen zeigte keine Überlappung. Um einen topographischen Zusammenhang zur Läsionsstelle festzustellen, wurden auch Frontalschnitte angefertigt. In diesen Frontalschnitten konnten Caspase 3-positive Neurone in der gesamten longitudinalen Achse des Hippocampus, also auch weit entfernt vom Läsionsort im entorhinalen Cortex gefunden werden.

Auch andere Methoden zum Nachweis von Zelltod wurden angewendet, um die Degeneration der Caspase 3-positiven Neurone zu bestätigen. Semidünnschnitte (1µm), mit Toluidinblau gefärbt, zeigten Neurone mit kondensierten und fragmentierten Kernen. Auch die DeOlmos-Silberfärbung zeigte Gruppen von sterbenden Neuronen im Scheitelpunkt des Hippocampus 36 hpl. Hoechst 33342 wurde angewendet, um die Kerne von mit DAB-gefärbten Caspase 3-Neuronen gegenzufärben. Diese Doppelfärbung stellte Caspase 3-positive Neurone mit kondensierten und teils schon fragmentierten Zellkernen dar. Die Elektronenmikroskopie zeigte mit DAB-Präzipitat gefüllte Neurone, die auch morphologische Zeichen der Apoptose aufwiesen: Geschwollene Mitochondrien, kondensierte Kerne und Abschnürungen der Zellmembran.

### 2. *Effekte von NMDA-Blockade auf transsynaptischen Zelltod*

Durch einen Vergleich von C57 mit *gld*- und *lpr*-Mäusen konnte keine maßgebliche Rolle des CD95/CD95L-Systems bei der Apoptose nach ECL nachgewiesen werden. Dagegen gab es eine deutliche Reduzierung der Zahl Caspase 3-positiver Neurone nach der Gabe von 1mg MK-801/kg KG. Dieser Effekt konnte mit einer Dosis von 2mg/kg KG verstärkt werden, die zu einer nahezu kompletten Protektion der Körnerzellen führte. Der Effekt der MK-801-Gabe war permanent, d.h. Mäuse, die alle 12 Stunden nach ECL MK-801 bis 36 hpl bekamen, hatten keine Caspase 3-positiven Neurone bei 48, 60, oder 72 hpl.

### 3. *Bedeutung von CD95/CD95L auf hippocampale Entwicklung*

Statistische Untersuchungen der Fläche des Cornu ammonis ergaben keinen statistisch relevanten Unterschied zwischen den drei Stämmen. Mit einer statistischen Untersuchung der Zahl von Neuronen in den Regionen CA 1 bis 3 konnten kleine, statistisch signifikante Unterschiede zwischen C57- und gld-Mäusen in den CA2- und CA4-Regionen nachgewiesen werden. Im Ergebnis kann man davon ausgehen, daß die defiziente Expression des CD95L zu einer minimalen Erhöhung der neuronalen Dichte in diesen Bereichen führt. Diese Effekte sind im Vergleich zu sogenannten Knockout-Mäusen, deren Caspase 3 oder 9 Gene verändert wurden, minimal, denn diese Mäuse sterben mit aufgeblähten Gehirnen ohne Schädelbruch (Kuida et al. 1996), so daß die von uns gefundenen Unterschiede eher darauf hinweisen, daß das CD95L keine wesentliche Bedeutung für embryonale Apoptose hat oder durch andere Mechanismen kompensiert werden kann.

#### *4. Bedeutung von CD95/CD95L für transsynaptische Apoptose*

Der Vergleich des Auftretens von Caspase 3-positiven Neuronen in gld-, lpr-, und Wildtypmäusen ergab keinen Anhalt für die Bedeutung von CD95/CD95L für die transsynaptische Neurodegeneration.

## 5. Diskussion

Neben der Degeneration direkt beschädigter Zellkörper und axotomierter Neurone tritt nach Traumata im ZNS eine sekundäre Neurodegeneration in vom Läsionsort weit entfernten Regionen auf. Hypothese dieser Arbeit war es, daß neben retrograder Degeneration axotomierter Neurone, auch Zielzellen lädierter Fasertrakte untergehen können. Die neuroanatomische Beziehung sterbender Zellen zu Läsionsorten ist aber in üblichen Modellen von Neurotrauma nur bedingt zu bestimmen. Das ECL-Model erlaubt dagegen aufgrund der Verschaltung des entorhino-hippocampalen Systems eine klare Differenzierung zwischen anterograden, retrograden, und transsynaptischen Veränderungen. Mit der ECL beschreibt diese Arbeit eine Population von Zielzellen zerstörter Axone, die unabhängig von ihrer Nähe zur Läsionsstelle sterben. Dieses Prinzip einer solchen akuten transsynaptischen Degeneration könnte auch für andere Formen von ZNS-Schädigung wie etwa Rückenmarksläsionen gelten, so daß ihre weitere Untersuchung von großen klinischen Interesse ist.

Die beobachtete CD95/CD95L-unabhängige Aktivierung von Caspase 3 und der darauf folgende Zelltod geschieht binnen 48 Stunden nach Läsion. Dieser Zeitraum unterscheidet sich von der vorher beschriebene Zielzellendegeneration im Nucleus mammillarius medialis nach Fimbria-Fornix-Trennung in Ratten (Ginsberg et al. 2002), die erst Wochen nach der Läsion stattfindet sowie von der Degeneration von CA 3-Neuronen, die mehrere Monate nach ECL bei Affen stattfindet (Poduri et al. 1995). Da die hier beschriebene, akute Induzierung von Caspase 3 und Zelltod mit der Anwendung von MK-801 signifikant reduziert werden kann, läßt sich vermuten, daß die akute Glutamat-Freisetzung von beschädigten Axonen eine Art exzitotoxischen Zelltod induziert. Auch die Beobachtung der prinzipiellen Möglichkeit der Protektion von Neuronen durch Antagonisierung der Glutamatbindung am NMDA-Rezeptor vor dieser transsynaptischen Apoptose könnte von großer klinischer Relevanz sein, etwa wenn sich herausstellt, daß dieser Zelltod auch nach Querschnittsläsion auftritt.

Die Anwendung MK-801 muß wegen ihrer Nebenwirkungen, u.a. Unterkühlung (Buchan and Pulsinelli 1990), Hypertonie und Tachykardie (Lewis et al. 1989), Psychose und neuronalem Tod (Olney et al. 2002) kritisch betrachtet werden. Die Substanz wurde dennoch angewendet, weil spezifischere NMDA-Rezeptor-Antagonisten wie AP-5 und CPP eine schlechtere Blut-Hirn-Schrank-Permeabilität und eine kürzere Halbwertszeit im Vergleich zu MK-801 haben (Chapman et al. 1991). Dagegen wurde in Vorexperimenten ein gut verträgliches Dosierungsschema etabliert, das denervierte Dendriten vor Retraktion nach ECL schützt und die „early Gene“ Aktivierung unterdrückt (Nitsch und Frotscher 1992). Da das Forschungsziel nicht die therapeutische Anwendung für MK-801 war, sondern nur eine Feststellung, ob die

neuronale Apoptose exzitotoxisch ist, wurde MK-801 benutzt. Die beobachtete Reduzierung der Neurodegeneration nach MK-801-Behandlung und die Morphologie der apoptotischen Neurone sprechen in der Tat dafür, daß die neuronale Apoptose exzitotoxisch ist. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß die Neuroprotektion durch MK-801 lediglich wegen Unterkühlung stattfindet.

Glutamat-induzierte Exzitotoxizität ist ein wichtiger Mechanismus sekundärer Degeneration nach Neurotrauma (Brown et al. 1998, Nitsch und Frotscher 1993), und viele Studien korrelierten Caspase 3-Aktivierung mit Exzitotoxizität nach Hirn- oder Rückenmarkschaden (Beer et al. 2000b, Büki et al. 2000, Citron et al. 2000, Lok and Martin 2002, Puig and Ferrer 2002, Tenneti et al. 1998, Yakovlev et al. 2001). In den sterbenden Neuronen wurden geschwollene Mitochondrien gefunden, was typisch für sowohl Apoptose als auch Exzitotoxizität ist (Ishimaru et al. 1999, Luetjens et al. 2000, Olney 1994, White and Reynolds 1996). Die Cytochrom c-Freisetzung von beschädigten Mitochondrien führt zur Formation eines Caspase 3-Aktivierungskomplexes, der aus Cytochrom c, APAF-1, und Caspase 9 besteht (Wang 2001, Yakovlev et al. 2001). Diese post-mitochondriale Aktivierung von Caspase 3 kann das Todessignal durch die zusätzliche Aktivierung von Caspase 8 verstärken (Tang et al. 2000, Wieder et al. 2001). Diese Daten bestätigen zum einen die Existenz eines Zusammenhangs zwischen axonaler Schädigung und Exzitotoxizität-induzierter Aktivierung von Caspase 3 und zum anderen, daß dieser Mechanismus für die sekundäre Neurodegeneration *in vivo* relevant ist. Künftige Untersuchungen, in denen die Aktivierung der einzelnen Signalproteine nach ECL blockiert wird, könnten hier ansetzen und den intrazellulären Weg von NMDA-Rezeptor-Überreizung zu neuronalem Zelltod beleuchten.

Neurodegeneration nach ECL hat lediglich eine bestimmte Population Körnerzellen betroffen. Die Mehrheit der Neurone im *Gyrus dentatus* haben keine Anzeichen von Neurodegeneration gezeigt. Caspase 3-positive Pyramidenzellen im CA3, die ebenfalls vom Tractus perforans innerviert werden, wurden innerhalb des Zeitrahmens dieser Untersuchung nicht gefunden. Die Empfindlichkeit einzelner Neurone kann von einer Vielzahl von Faktoren abhängen, wie z.B. der Dichte glutamatergischer Synapsen, der differenzierten Expression Kalzium-bindender Proteine, Glutamatrezeptoren mit unterschiedlichen Untereinheiten oder einer fehlenden Inhibierung durch Interneurone. Eine Möglichkeit wäre die schnelle Apoptose der Interneurone nach Läsion oder ein temporärer Funktionsverlust von Interneuronen nach ECL. Die fehlende Kolokalisation von Caspase 3 und Parvalbumin könnte vom schnellen Katabolismus dieses Kalzium-bindenden Proteins sowie von einer fehlenden Ersetzung des

Proteins vom beschädigten, nicht-funktionalen Interneuron herrühren. Die Theorie der nicht-funktionierenden oder toten Interneurone würde die Verteilung in Gruppen anstatt Einzelzellen im Gyrus dentatus erklären. Exzitotoxizität kann direkt, d.h. durch Glutamatüberschuß, und indirekt, also durch fehlende GABAerge Inhibition, den selben pathologischen Mechanismen aktivieren wie bei Krankheiten wie Morbus Alzheimer, chronischem Alkoholismus, und Fetalalkohol-Syndrom (Dodd 2002, Ikonomidou et al. 1999, Ikonomidou et al. 2000, Olney et al. 2002). Zur Zeit gibt es keine Erklärung für die Lokalisation der sterbenden Neurone, da wir keine Evidenz für den Zelltod von Interneuronen gewinnen konnten. Die genauen Mechanismen, die die Empfindlichkeit gegenüber exzitotoxischem Zelltod nach Deafferentation beeinflussen, könnten weiter mit dem ECL Modell erforscht werden

Nachdem als Ursache der Apoptose die NMDA-Überreizung festgestellt werden konnte, wurden die morphologischen Aspekte der degenerierenden Neurone untersucht. Nachweise von glutamatischer Toxizität (geschwollene Neurone), und Apoptose (Chromatinkondensierung und Zellkernfragmentierung) konnten gefunden werden. Wichtig ist zu betonen, daß „programmierter Zelltod“ und „Apoptose“ nicht das selbe sind. Programmierter Zelltod benötigt Genexpression und Induktion intrazellulärer Botenstoffe, die zur Selbstverdauung von Proteinen und DNA-Spaltung führen. Apoptose wurde ursprünglich in Hepatozyten beschrieben (Kerr et al. 1972, Kerr 2002) und wurde auf der Basis der auftretenden morphologischen Veränderungen definiert. Die Morphologie von Zellen, die an programmiertem Zelltod sterben, erfüllt nicht immer alle Bedingungen für Apoptose und kann auch Aspekte von Nekrose oder andere atypischen Morphologien aufweisen (Sperandio et al. 2000, Vercammen et al. 1998). Von solchen „gemischten Morphologien“ wurde bei Neurodegeneration mehrmals berichtet (Colbourne et al. 1999, Dal Canto and Gurney 1994, Stadelmann et al. 1999). Man kann daraus folgern, daß eine Zelle mit einer nekrotischen Morphologie auch an einer Art programmierten Zelltodes gestorben sein kann (Colbourne et al. 1999, Fix et al. 1993). In therapeutischer Hinsicht ist es bedenkenswert, daß die Blockierung von Signalkaskaden des programmierten Zelltodes die Neurodegeneration nicht wirklich unterdrücken, sondern lediglich einen eher nekrotischen Zelltod hervorrufen könnte (Vercammen et al. 1998). Weil Apoptose wenig oder keine Entzündung auslöst, und sogar eine Immunantwort unterdrücken kann (Stuart et al. 2002), könnte eine solche Inhibition die Immunantwort auf die Neurodegeneration verstärken und dadurch sekundäre Schädigung befördern (Bechmann und Nitsch 2001, Popovich et al. 1999, Schwartz et al. 1999). Trotzdem kann die Inhibition von programmiertem Zelltod den Verlust von Neuronen unter einer

Vielzahl von Bedingungen reduzieren (Beattie et al. 2002, Braun et al. 1999, Gimenez y Ribotta et al. 2002, Schwartz et al. 1999, Viswanath et al. 2000, Waldmeier 2003). Es wird in der Zukunft zu zeigen sein, ob etwa durch Inhibition von Caspasen der Zelltod tatsächlich blockiert oder nur in Richtung Nekrose verschoben wird, und ob sich funktionsrelevante Verbesserungen durch solche Strategien erzielen lassen.

Trotz des offensichtlichen Neuronverlusts im Gyrus dentatus nach ECL wurde von einer niedrigeren Neurondichte bisher noch nicht berichtet. Eine Erklärung dafür könnte die Ersetzung der sterbenden Neurone sein. Es gibt Hinweise für Neurogenese nach ECL (Cameron et al. 1995) und für die Integrierung dieser neuen Neurone in die entorhino-hippocampale Verschaltung (van Praag et al. 2002). Hippocampale neurale Vorläuferzellen sind im *Hilus* an der Grenze des *Gyrus dentatus* beschrieben worden (Kaplan und Hinds 1977). Diese neuronalen Vorzellen vermehren sich durchgängig auch im Erwachsenenalter und haben die Fähigkeit Zellen zu ersetzen, die durch mechanische oder exzitotoxische Läsion oder Ischämie verloren wurden (Gould und Tanapat 1997). Interessanterweise kann diese Vermehrung nach Ischämie mit MK-801 unterdrückt werden (Arvidsson et al. 2001). Wenn die Vorzellen durch den exzitotoxischen Zelltod ihrer Nachbarn oder direkt durch toxische Glutamatspiegel stimuliert werden, könnte ECL eine wichtige Rolle in der Erforschung der Mechanismen von transneuronaler Degeneration und Stammzelleaktivierung *in vivo* erlangen.

## 6. Literatur

- Arvidsson A, Kokaia Z, Lindvall O (2001) N-methyl-D-aspartate receptor-mediated increase of neurogenesis in adult rat dentate gyrus following stroke. *Eur J Neurosci* 14: 10-18
- Beattie MS, Hermann GE, Rogers RC, Bresnahan JC (2002) Cell death in models of spinal cord injury. *Prog Brain Res* 137: 37-47
- Bechmann I, Lossau S, Steiner B, Mor G, Gimsa U, Nitsch R (2000) Reactive astrocytes upregulate Fas (CD95) and Fas ligand (CD95L) expression but do not undergo programmed cell death during the course of anterograde degeneration. *Glia* 32: 25-41
- Bechmann I, Nitsch R (2001) Plasticity following lesion: help and harm from the immune system. *Restor Neurol Neurosci* 19: 189-198
- Bechmann I, Diano S, Warden CH, Bartfai T, Nitsch R, Horvath TL. (2002) Brain mitochondrial uncoupling protein 2 (UCP2): a protective stress signal in neuronal injury. *Biochem Pharmacol* 64:363-367
- Beer R, Franz G, Schopf M, Reindl M, Zelger B, Schmutzhard E, Poewe W, Kampfl A (2000a) Expression of Fas and Fas ligand after experimental traumatic brain injury in the rat. *Neuroscience* 20: 669-677
- Beer R, Franz G, Srinivasan A, Hayes RL, Pike BR, Newcomb JK, Zhao X, Schmutzhard E, Poewe W, Kampfl A (2000b) Temporal profile and cell subtype distribution of activated caspase-3 following experimental traumatic brain injury. *J Neurochem* 75: 1264-1273
- Bratton SB, MacFarlane M, Cain K, Cohen GM (2000) Protein complexes activate distinct caspase cascades in death receptor and stress-induced apoptosis. *Exp Cell Res* 256: 27-33
- Braun JS, Novak R, Herzog KH, Bodner SM, Cleveland JL, Tuomanen EI (1999) Neuroprotection by a caspase inhibitor in acute bacterial meningitis. *Nat Med* 5: 298-302
- Brown JJ, Baker AJ, Konasiewicz SJ, Moulton RJ (1998) Clinical significance of CSF glutamate concentrations following severe traumatic brain injury in humans. *J Neurotrauma* 15: 253-263
- Buchan A, Pulsinelli WA (1990) Hypothermia but not the N-methyl-D-aspartate antagonist, MK-801, attenuates neuronal damage in gerbils subjected to transient global ischemia. *J Neurosci*. 10:311-316
- Büki A, Okonkwo DO, Wang KK, Povlishock JT (2000) Cytochrome c release and caspase activation in traumatic axonal injury. *J Neurosci* 20: 2825-2834
- Cameron HA, McEwen BS, Gould E (1995) Regulation of adult neurogenesis by excitatory input and NMDA receptor activation in the dentate gyrus. *J Neurosci* 15: 4687-4692
- Chapman AG, Graham JL, Patel S, Meldrum BS (1991) Anticonvulsant activity of two orally active competitive N-methyl-D-aspartate antagonists, CGP 37849 and CGP 39551, against

sound-induced seizures in DBA/2 mice and photically induced myoclonus in *Papio papio*. *Epilepsia* 32:578-587

Cid C, Alvarez-Cermeno JC, Regidor I, Salinas M, Alcazar A (2003) Low concentrations of glutamate induce apoptosis in cultured neurons: Implications for amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurol Sci* 206: 91-95

Citron BA, Arnold PM, Sebastian C, Qin F, Malladi S, Ameenuddin S, Landis ME, Festhoff BW (2000) Rapid upregulation of caspase 3 in rat spinal cord after injury: mRNA, protein, and cellular localization correlates with apoptotic cell death. *Exp Neurol* 166: 213-226

Cohen PL, Eisenberg RA (1992) The *lpr* and *gld* genes in systemic autoimmunity: life and death in the Fas lane. *Immunol Today* 13: 427-428

Colbourne F, Sutherland GR, Auer RN (1999) Electron microscopic evidence against apoptosis as the mechanism of neuronal death in global ischemia. *J Neurosci* 19: 4200-4210

Conti AC, Raghupathi R, Trojanowski JQ, McIntosh TK (1998) Experimental brain injury induces regionally distinct apoptosis during the acute and delayed post-traumatic period. *J Neurosci* 18: 5663-5672

Dal Canto MC, Gurney ME (1994) Development of central nervous system pathology in a murine transgenic model of human amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Pathol* 145: 1271-1279

Deller T, Haas CA, Frotscher M (2001) Sprouting in the hippocampus after entorhinal cortex lesion is layer- specific but not translaminal: which molecules may be involved? *Restor Neurol Neurosci* 19: 159-167

Del Turco D, Woods AG, Gebhardt C, Phinney AL, Jucker M, Frotscher M, Deller T (2003) Comparison of commissural sprouting in the mouse and rat fascia dentate after entorhinal cortex lesion. *Hippocampus* 13:685-99

DeOlmos JS, Ingram WR (1971) An improved cupric-silver method for impregnation of axonal and terminal degeneration. *Brain Res* 33: 523-529

Dietrich WD, Halley M, Alonso O, Globus MY, Busto R (1992) Intraventricular infusion of N-methyl-D-aspartate. 2. Acute neuronal consequences. *Acta Neuropathol (Berl)* 84: 630-637

Dodd PR (2002) Excited to death: different ways to lose your neurones. *Biogerontology* 3: 51-56

Felderhoff-Mueser U, Taylor DL, Greenwood K, Kozma M, Stibenz D, Joashi UC, Edwards AD, Mehmet H (2000) Fas/CD95/APO-1 can function as a death receptor for neuronal cells in vitro and in vivo and is upregulated following cerebral hypoxic-ischemic injury to the developing rat brain. *Brain Pathol* 10: 17-29

Felderhoff-Mueser U, Sifringer M, Pesditschek S, Kuckuck H, Moysich A, Bittigau P, Ikonomidou C (2002) Pathways leading to apoptotic neurodegeneration following trauma to the developing rat brain. *Neurobiol Dis* 11: 231-245

- Fix AS, Horn JW, Wightman KA, Johnson CA, Long GG, Storts RW, Farber N, Wozniak DF, Olney JW (1993) Neuronal vacuolization and necrosis induced by the noncompetitive N-methyl-D-aspartate (NMDA) antagonist MK(+)-801 (dizocilpine maleate): a light and electron microscopic evaluation of the rat retrosplenial cortex. *Exp Neurol* 123: 204-215
- Froidevaux S, Kuntz L, Velin D, Looz F (1991) Different nature of the proliferation defects of GLD, LPR and MEV C57BL/6 mouse lymphoid cells. *Autoimmunity* 10: 233-240
- Frotscher M, Heimrich B, Deller T (1997) Sprouting in the hippocampus is layer-specific. *Trends Neurosci* 20: 218-223
- Gimenez y Ribotta M, Gaviria M, Menet V, Privat A (2002) Strategies for regeneration and repair in spinal cord traumatic injury. *Prog Brain Res* 137: 191-212
- Ginsberg SD, Martin LJ (2002) Axonal transection in adult rat brain induces transsynaptic apoptosis and persistent atrophy of target neurons. *J Neurotrauma* 19: 99-109
- Gould E, Tanapat P (1997) Lesion-induced proliferation of neuronal progenitors in the dentate gyrus of the adult rat. *Neuroscience* 80: 427-436
- Ikonomidou C, Bosch F, Miksa M, Bittigau P, Vockler J, Dikranian K, Tenkova TI, Stefovskova V, Turski L, Olney JW (1999) Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Science* 283: 70-74
- Ikonomidou C, Bittigau P, Ishimaru MJ, Wozniak DF, Koch C, Genz K, Price MT, Stefovskova V, Horster F, Tenkova T, Dikranian K, Olney JW (2000) Ethanol-induced apoptotic neurodegeneration and fetal alcohol syndrome. *Science* 287: 1056-1060
- Ishimaru MJ, Ikonomidou C, Tenkova TI, Der TC, Dikranian K, Sesma MA, Olney JW (1999) Distinguishing excitotoxic from apoptotic neurodegeneration in the developing rat brain. *J Comp Neurol* 408: 461-476
- Jensen MB, Gonzalez B, Castellano B, Zimmer J (1994) Microglial and astroglial reactions to anterograde axonal degeneration: a histochemical and immunocytochemical study of the adult rat fascia dentata after entorhinal perforant path lesions. *Exp Brain Res* 98: 245-260
- Jensen MB, Finsen B, Zimmer J (1997) Morphological and immunophenotypic microglial changes in the denervated fascia dentata of adult rats: correlation with blood-brain barrier damage and astroglial reactions. *Exp Neurol* 143: 103-116
- Kaplan MS, Hinds JW (1977) Neurogenesis in the adult rat: electron microscopic analysis of light radioautographs. *Science* 197: 1092-1094
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26: 239-257
- Kerr JF (2002) History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. *Toxicology* 181-182: 471-474

- Knoblach SM, Nikolaeva M, Huang X, Fan L, Krajewski S, Reed JC, Faden AI (2002) Multiple caspases are activated after traumatic brain injury: evidence for involvement in functional outcome. *J Neurotrauma* 19: 1155-1170
- Kuida K, Zheng TS, Na S, Kuan C, Yang D, Karasuyama H, Rakic P, Flavell RA (1996) Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice. *Nature* 384: 368-372
- Laurer HL, McIntosh TK (1999) Experimental models of brain trauma. *Curr Opin Neurol* 12: 715-721
- Lewis SJ, Barres C, Jacob HJ, Ohta H, Brody MJ (1989) Cardiovascular effects of the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist MK-801 in conscious rats. *Hypertension* 13:759-765
- Lok J, Martin LJ (2002) Rapid subcellular redistribution of Bax precedes caspase-3 and endonuclease activation during excitotoxic neuronal apoptosis in rat brain. *J Neurotrauma* 19: 815-828
- Luetjens CM, Bui NT, Sengpiel B, Munstermann G, Poppe M, Krohn AJ, Bauerbach E, Kriegelstein J, Prehn JH (2000) Delayed mitochondrial dysfunction in excitotoxic neuron death: cytochrome c release and a secondary increase in superoxide production. *J Neurosci* 20: 5715-5723
- Lynch G, Matthews DA, Mosko S, Parks T, Cotman C (1972) Induced acetylcholinesterase-rich layer in rat dentate gyrus following entorhinal lesions. *Brain Res* 42: 311-318
- Martin-Villalba A, Herr I, Jeremias I, Hahne M, Brandt R, Vogel J, Schenkel J, Herdegen T, Debatin KM (1999) CD95 ligand (Fas-L/APO-1L) and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand mediate ischemia-induced apoptosis in neurons. *J Neurosci* 19: 3809-3817
- Montecino-Rodriguez EM, Loores F (1991) Haematopoietic cell transfers between C57BL/6 mice differing at the *lpr* or *gld* locus. *Immunology* 74: 127-131
- Nagata S, Suda T (1995) Fas and Fas ligand: *lpr* and *gld* mutations. *Immunol Today* 16: 39-43
- Nitsch R, Frotscher M (1992) Reduction of posttraumatic transneuronal "early gene" activation and dendritic atrophy by the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist MK-801. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 5197-5200
- Nitsch R, Frotscher M (1993) Transneuronal changes in dendrites of GABAergic parvalbumin-containing neurons of the rat fascia dentata following entorhinal lesion. *Hippocampus* 3: 481-490
- Olney JW (1994) Excitatory transmitter neurotoxicity. *Neurobiol Aging* 15: 259-260
- Olney JW, Wozniak DF, Jevtovic-Todorovic V, Farber NB, Bittigau P, Ikonomidou C (2002) Drug-induced apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Brain Pathol* 12: 488-498

- Poduri A, Beason-Held LL, Moss MB, Rosene DL, Hyman BT (1995) CA3 neuronal degeneration follows chronic entorhinal cortex lesions. *Neurosci Lett* 197: 1-4
- Popovich PG, Guan Z, Wei P, Huitinga I, van Rooijen N, Stokes BT (1999) Depletion of hematogenous macrophages promotes partial hindlimb recovery and neuroanatomical repair after experimental spinal cord injury. *Exp Neurol* 158: 351-365
- Puig B, Ferrer I (2002) Caspase-3-associated apoptotic cell death in excitotoxic necrosis of the entorhinal cortex following intraperitoneal injection of kainic acid in the rat. *Neurosci Lett* 321: 182-186
- Qiu J, Whalen MJ, Lowenstein P, Fiskum G, Fahy B, Darwish R, Aarabi B, Yuan J, Moskowitz MA (2002) Upregulation of the Fas receptor death-inducing signaling complex after traumatic brain injury in mice and humans. *J Neurosci* 22: 3504-3511
- Raghupathi R, Graham DI, McIntosh TK (2000) Apoptosis after traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 17: 927-938
- Schwartz M, Moalem G, Leibowitz-Amit R, Cohen IR (1999) Innate and adaptive immune responses can be beneficial for CNS repair. *Trends Neurosci* 22: 295-299
- Sloviter RS, Dean E, Sollas AL, Goodman JH (1996) Apoptosis and necrosis induced in different hippocampal neuron populations by repetitive perforant path stimulation in the rat. *J Comp Neurol* 366: 516-533
- Sperandio S, de Belle I, Bredesen DE (2000) An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 14376-14381
- Stadelmann C, Deckwerth TL, Srinivasan A, Bancher C, Bruck W, Jellinger K, Lassmann H (1999) Activation of caspase-3 in single neurons and autophagic granules of granulovacuolar degeneration in Alzheimer's disease. Evidence for apoptotic cell death. *Am J Pathol* 155: 1459-1466
- Stuart LM, Lucas M, Simpson C, Lamb J, Savill J, Lacy-Hulbert A (2002) Inhibitory effects of apoptotic cell ingestion upon endotoxin-driven myeloid dendritic cell maturation. *J Immunol* 168: 1627-1635
- Tang D, Lahti JM, Kidd VJ (2000) Caspase-8 activation and bid cleavage contribute to MCF7 cellular execution in a caspase 3-dependent manner during staurosporine-mediated apoptosis. *J Biol Chem* 275: 9303-9307
- Tenneti L, D'Emilia DM, Troy CM, Lipton SA (1998) Role of caspases in N-methyl-D-aspartate-induced apoptosis in cerebrocortical neurons. *J Neurochem* 71: 946-959
- van Praag H, Schinder AF, Christie BR, Toni N, Palmer TD, Gage FH (2002) Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature* 415: 1030-1034
- Vercammen D, Brouckaert G, Denecker G, Van de Craen M, Declercq W, Fiers W, Vandenameele P (1998) Dual signaling of the Fas receptor: initiation of both apoptotic and necrotic cell death pathways. *J Exp Med* 188: 919-930

Viswanath V, Wu Z, Fonck C, Wei Q, Boonplueang R, Andersen JK (2000) Transgenic mice neuronally expressing baculoviral p35 are resistant to diverse types of induced apoptosis, including seizure-associated neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 2270-2275

Waldmeier PC (2003) Prospects for antiapoptotic drug therapy of neurodegenerative diseases. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 27: 303-321

Wang X (2001) The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 15: 2922-2933

White RJ, Reynolds IJ (1996) Mitochondrial depolarization in glutamate-stimulated neurons: an early signal specific to excitotoxin exposure. *J Neurosci* 16: 5688-5697

Wieder T, Essmann F, Prokop A, Schmelz K, Schulze-Osthoff K, Beyaert R, Dorken B, Daniel PT (2001) Activation of caspase-8 in drug-induced apoptosis of B-lymphoid cells is independent of CD95/Fas receptor-ligand interaction and occurs downstream of caspase-3. *Blood* 97: 1378-1387

Yakovlev AG, Ota K, Wang G, Movsesyan V, Bao WL, Yoshihara K, Faden AI (2001) Differential expression of apoptotic protease-activating factor-1 and caspase 3 genes and susceptibility to apoptosis during brain development and after traumatic brain injury. *J Neurosci* 21: 7439-7446

Zhang C, Shen W, Zhang G (2002) N-methyl-D-aspartate receptor and L-type voltage-gated Ca(2+) channel antagonists suppress the release of cytochrome c and the expression of procaspase-3 in rat hippocampus after global brain ischemia. *Neurosci Lett* 328: 265-268