

**Die Wirkung des β -Laktam-Antibiotikums
Ceftriaxon im experimentellen Schlaganfall sowie
auf den astrozytären Glutamattransporter GLT-1**

Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

Eingereicht am Fachbereich Chemie, Biologie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

von

Christian Neumann

aus Berlin

September 2009

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juni 2003 bis Oktober 2008 am *Center for Cardiovascular Research* / Institut für Pharmakologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Thomas Unger angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Unger
2. Gutachter: Prof. Dr. Ronald Gust

Disputation am 25.01.2010

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich den Menschen danken, die entscheidenden Anteil am Entstehen dieser Arbeit haben.

Zuallererst ist hierbei Herr Prof. Dr. Thomas Unger zu nennen. Ohne sein Interesse, seine stete Unterstützung und seine Diskussions- und Hilfsbereitschaft wären mir diese Arbeit sowie die Durchführung des parallelen Medizinstudiums nicht möglich gewesen. Vielen Dank dafür!

Desweiteren möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Ronald Gust für seine Bereitschaft bedanken, für diese Arbeit als Gutachter zur Verfügung zu stehen.

Weiterhin gebührt Frau Dr. Christa Thöne-Reineke großer Dank, nicht zuletzt dafür, dass sie mitunter wieder Ordnung ins Chaos gebracht und mich wieder auf den rechten Weg zurückgeführt hat, ebenso Maxim Krikov für die Unterstützung bei den tierexperimentellen Arbeiten zu diesem Thema, Frau Prof. Heide Hörtnagel für die Hilfe bei der Hirnpräparation sowie Michael Godes für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung.

Ebenso möchte ich mich namentlich bei Kristin Lucht für die vielen Hilfen und die schöne Zeit, sowie bei Jan Schefe für die, mitunter entscheidende, theoretische und praktische Unterstützung im Labor und die vielen, teilweise „geistvollen“, teilweise auch kulinarischen, aber immer „geistreichen“ Abende bedanken. In diesem Zusammenhang will ich dann auch Christian Petrik und Uwe Vosgerau erwähnen, die ich zusammen mit Jan Schefe im Labor kennen-, im Leben schätzen- und beim Segeln mitunter fürchtengelern habe. Ahoi Jungs!

Auch wenn es mir ob der großen Anzahl nicht möglich ist, den Mitgliedern der Arbeitsgruppe um Prof. Unger namentlich zu danken, so möchte ich trotzdem allen gegenwärtigen und ehemaligen Mitarbeitern meinen Dank aussprechen. Ich bin mir der Unterstützung, die ich durch diese Menschen erfahren habe, bewusst!

Zuletzt, aber nicht letztens, möchte ich mich bei meiner Familie und bei den vielen Freunden und Bekannten bedanken, die mir so oft bewusst oder unbewusst an vielen Stellen geholfen haben. Ohne euch wäre mein Weg so nicht zu bestreiten gewesen.

Ich weiß das zu schätzen!

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung.....	1
1.1. Schlaganfall.....	1
1.2. Astrozyten.....	6
1.3. Glutamattransporter.....	11
1.4. Ceftriaxon.....	18
1.5. Hypothesen.....	24
2. Materialien und Methoden.....	25
2.1. verwendete Materialien und Geräte.....	25
2.1.1. Materialien.....	25
2.1.1.1. Chemikalien und Lösungen.....	25
2.1.1.2. Puffer und Lösungen.....	28
2.1.1.3. Primer und Vektoren.....	31
2.1.1.4. Enzyme.....	31
2.1.1.5. Antikörper.....	32
2.1.1.6. Kits.....	32
2.1.1.7. Prokaryonten.....	32
2.1.1.8. Eukaryonten.....	32
2.1.1.9. Verbrauchsmaterialien und Glasgeräte.....	33
2.1.2. Geräte.....	34
2.2. Methoden.....	37
2.2.1. Methoden der <i>in vivo</i> -Versuche.....	37
2.2.2. Methoden der Zellkultur.....	40
2.2.3. Methoden der Proteinanalytik.....	47
2.2.4. Methoden der Nukleotidanalytik.....	49
2.2.5. Methoden der Immunfluoreszenzchemie.....	54
2.2.6. Methoden zur Bestimmung der Transportaktivität.....	56
2.2.7. Methoden der Statistik.....	56

		Seite
3.	Ergebnisse	57
3.1.	Tierexperimentelle Untersuchungen zur Wirksamkeit von Ceftriaxon in einem Schlaganfallmodell der Ratte	57
3.2.	Nachweis der GLT-1-mRNA-Expression im Gehirn der Ratte unter Ceftriaxon-Behandlung	64
3.3.	Nachweis von GLT-1-Protein im Gehirn der Ratte unter Ceftriaxon-Behandlung	66
3.4.	Isolierung, Identifizierung und Kultur von Astrozyten aus der Ratte	68
3.5.	Untersuchungen zu Expression und Gehalt des GLT-1 in Astrozyten der Ratte	71
3.6.	Untersuchungen zur Aktivität des GLT-1-Promotors Astrozyten der Ratte unter Ceftriaxon-Behandlung	77
3.7.	Untersuchungen zur Glutamataufnahme in Astrozyten der Ratte unter Ceftriaxon-Behandlung	80
4.	Diskussion	82
5.	Zusammenfassung / Summary	105
6.	Literatur	109
7.	Abbildungsverzeichnis	130
8.	Tabellenverzeichnis	132
9.	Abkürzungsverzeichnis	133
10.	Curriculum vitae	138
11.	Publikationsliste	140

1. Einleitung

1.1. Schlaganfall

Der Schlaganfall ist eine der Hauptursachen für Tod oder Behinderung in den Industrieländern (Thom 2006) und belegt in der Bundesrepublik Deutschland in der Todesursachenstatistik den 3. Platz (Statistisches Jahrbuch 2003).

Laut der World Health Organisation (WHO) ist der Schlaganfall als ein Krankheitsbild definiert, bei dem sich die klinischen Zeichen einer fokalen oder globalen Störung zerebraler Funktionen rasch bemerkbar machen, mindestens 24 Stunden anhalten oder zum Tode führen und offensichtlich nicht auf andere als vaskuläre Ursachen zurückgeführt werden können. In der Literatur wird diese Definition insofern erweitert, als dass es sich hierbei um ein akut einsetzendes fokales oder globales neurologisches Defizit aufgrund einer umschriebenen oder globalen Durchblutungsstörung im Gehirn handelt, wobei die Durchblutungsstörung sowohl durch einen Durchblutungsmangel als auch durch eine Blutung auftreten kann. Generell kann beim Schlaganfall zwischen ischämischen Schlaganfällen, spontanen intrazerebralen Hämatomen, Subarachnoidalblutungen sowie Hirnvenen- und Sinusvenenthrombosen unterschieden werden (Eschenfelder 2006).

Der ischämische Schlaganfall, für den in Deutschland eine Inzidenz von 137 Fällen pro 100.000 Einwohner im Zeitraum von 1994-1996 kalkuliert wurde (Kolominsky-Rabas 2002), entsteht durch ein abruptes Sistieren der zerebralen Blutversorgung infolge des Verschlusses eines versorgenden Gefäßes. Als Ursache für einen ischämischen Hirnsult führt die Deutsche Schlaganfalldatenbank in der Reihenfolge sinkender Häufigkeit Gerinnungsthromben infolge kardialer Embolien, gefolgt von durch Makroangiopathien bedingte arterioarteriellen Embolien und Mikroangiopathien, welche zu lakunären Infarzierungen führen, auf (Grau 2001). Gemessen an der Gesamtzahl sind 90% aller Schlaganfälle auf eine ischämische Genese zurückzuführen (Thom 2006).

Infolge des Sistierens der zerebralen Blutversorgung kommt es beim ischämischen Schlaganfall zu einer umschriebenen oder globalen Minderversorgung des Hirngewebes mit Blut. Dadurch stehen den Neuronen, den Gliazellen und den in den umliegenden vaskulären Strukturen vorkommenden Zellen zu wenig Sauerstoff und Nährstoffe (vor allem Glucose) zur Verfügung. Das hat insofern eine entscheidende Bedeutung, als dass das Hirngewebe mit seinem im Vergleich zu anderen Geweben extrem hohen Sauerstoff- und Glucose-Bedarf sehr empfindlich gegenüber einer Unterbrechung der Blutversorgung ist. So liegen die Blutschwellenwerte bei zerebraler Ischämie zwischen $0,35 \text{ ml g}^{-1} \text{ min}^{-1}$ (Volumen Blut pro

Gewebsmasse pro Zeiteinheit) für die anaerobe Glykolyse und $0,15 \text{ ml g}^{-1} \text{ min}^{-1}$ für die anoxische Depolarisation (Eschenfelder 2006), während bei normaler Durchblutung im allgemeinen Werte für das gesamte Gehirn von $0,4\text{-}0,6 \text{ ml g}^{-1} \text{ min}^{-1}$ angegeben werden (Schmidt 1997). Dass trotz der geringen Differenz zwischen den physiologischen Blutflusswerten und den Schwellenwerten für einen gestörten Metabolismus der Hirnzellen in aller Regel eine adäquate Versorgung des Hirngewebes gewährleistet wird, ist auf das Vorhandensein eines Systems von Kollateralkreisläufen zurückzuführen, wobei mit dem *Circulus arteriosus cerebri* (*Circulus arteriosus Willisii*) hier nur der markanteste der Kollateralkreisläufe genannt werden soll (Trepel 1999).

Infolge der oben beschriebenen Unterbrechung der Blutzufuhr kommt es in den betreffenden Arealen des Gehirns zu einem abrupten Abfall des Sauerstoffpartialdrucks und Störungen des normalen Zellstoffwechsels. Je nach Dauer der Unterbrechung resultieren reversible oder irreversible Schäden. Bei einem Absinken des Blutflusses unter die Funktionsschwelle von $0,15\text{-}0,25 \text{ ml g}^{-1} \text{ min}^{-1}$ kommt es zuerst zu einem Ausfall der elektrischen Funktionen der Neuronen, was sich in einem klinisch erkennbaren Defizit äußert. Mit zunehmender Dauer der Minderversorgung macht sich die daraus resultierende Hypoxie immer stärker dadurch bemerkbar, dass infolge der anaeroben Glykolyse die Generierung energiereicher Substrate nicht mehr im erforderlichen Maße stattfinden kann. Dadurch kann die Wasser- und Ionen-Homöostase nicht mehr aufrechterhalten werden und es kommt zu einem Einstrom von Natrium- und Calcium-Ionen sowie Wasser in die Zelle. Gleichzeitig kommt es zur Ausschüttung exzitatorischer Neurotransmitter wie Glutamat, einer Produktion freier Radikale und aufgrund der anaeroben Glykolyse zur Akkumulation von Laktat in der Zelle. Weiterhin werden über verschiedene molekulare Wege inflammatorische und apoptotische Prozesse in Gang gesetzt (Castellanos 2006; Mattle 2003).

Diese Vorgänge führen zu einer direkten Schädigung der betreffenden Zelle und insbesondere durch die Ausschüttung von Glutamat und freien Radikalen auch zu einer Schädigung benachbarter oder weiter entfernter Zellen. Aus der Akkumulation von Wasser im Hirngewebe und einem daraus resultierenden Hirnödem mit einer entsprechenden Raumforderung und Erhöhung des intrakraniellen Drucks kann dabei unter Umständen eine globale Hirnschädigung hervorgehen (Mattle 2003).

Topographisch-pathologisch lassen sich in den geschädigten Gebieten verschiedene Zonen unterscheiden, deren Vorhandensein sich mit den regionalen Versorgungsverhältnissen erklären lassen. In der Kernzone eines Schlaganfalls, wo die Perfusion langanhaltend unterbrochen wurde und nicht durch Kollateralkreisläufe zumindest teilweise aufrechterhalten

werden konnte, finden sich die schwersten strukturellen Schäden aufgrund des Untergangs ganzer Zellpopulationen. Dieser Bereich wird als eigentliches Infarktgebiet bezeichnet. In der Randzone, wo durch Kollateralen eine, wenn auch reduzierte, Durchblutung gewährleistet werden kann, finden sich dagegen noch funktionsfähige Gliazellen und Neuronen. In dieser auch als *Penumbra* bezeichneten Randzone kommt es zu zeitabhängigen Schadensmustern an den Zellen, welche letztlich einen Einfluss auf die Infarktgröße und das Ausmaß an klinischen Defiziten haben (Astrup 1981; Heiss 2000). Um die *Penumbra* herum, und damit noch distaler von der Kernzone, kann dann noch das Gebiet der benignen Oligämie benannt werden, im welchen die zellulären Funktionen über eine suffiziente Versorgung mittels Kollateralen so gesichert sind, dass sich die Zellen nach Reperfusion spontan erholen (Bandera 2006). Aus diesem Drei-Zonen-Modell des Infarktgebietes resultiert auch die therapeutische Rationale für die Akuttherapie des Schlaganfalls, welche die *Penumbra* in den Mittelpunkt des Geschehens rückt. Kann die Reperfusion vor dem Untergang der Zellen in der *Penumbra* wiederhergestellt werden, resultiert daraus eine geringere Infarktgröße und damit unter Umständen auch ein geringer ausgeprägtes klinisches Bild der entsprechenden neurologischen Störung. Diese Zeitabhängigkeit, welche im klinischen Alltag auch plakativ mit dem Motto: „*time is brain*“ umschrieben werden kann, wird durch Kalkulationen bestätigt, die, ausgehend von einer Gesamtzahl von etwa 22 Milliarden Neuronen im humanen Frontalhirn berechnet haben, dass bei einem durchschnittlichen supratentoriellen ischämischen Schlaganfall mit einem Infarktvolumen von 54 ml und einem Ischämiedauer von 10 Stunden in jeder Minute der Ischämie 1,9 Millionen Neuronen und 14 Milliarden Synapsen absterben und 12 km myelinisierte Nervenfasern zerstört werden (Saver 2006).

Auf den direkten Zusammenhang zwischen der Zeit von der Manifestation der Durchblutungsstörung und dem Ausmaß des Schadens zielt demnach auch eine Vielzahl von Therapiekonzepten. Je schneller die Zirkulation wieder hergestellt wird, desto schneller können primär in ihrer Funktion nur supprimierte Zellen der *Penumbra* ihren normalen Stoffwechsel wieder aufnehmen und unter günstigen Voraussetzungen auch ihre Funktionen wieder erlangen. Je länger aber die Zeitspanne zwischen manifester Minderdurchblutung und Wiederaufnahme der Durchblutung dauert, umso größer ist andererseits die Zahl der Zellen, die irreversibel geschädigt werden. Neben der schnellen Rekanalisation spielt aber auch die Induktion neuroprotektiver Mechanismen in der *Penumbra* eine Rolle. Hier soll durch therapeutische und/oder pharmakologische Intervention erreicht werden, dass die Mechanismen der Schädigung nach zerebraler Ischämie, welche sowohl exzitotoxische, inflammatorische als auch apoptotische Prozesse umfassen, in den Zellen der *Penumbra*

effektiv unterbrochen werden. Ungeachtet dieser auf die Vorgänge in der *Penumbra* zielenden Konzepte in der Akutbehandlung des Schlaganfalls ist eine symptomatische Therapie entsprechend den Gegebenheiten jedes einzelnen Patienten durchzuführen.

Zum heutigen Zeitpunkt führen die beiden oben beschriebenen und auf die in der *Penumbra* ablaufenden Vorgänge zielenden Konzepte zur Akutbehandlung eines ischämischen Schlaganfalls zu unterschiedlichem Erfolg (Stingele 2006). Während eine frühzeitige, mit entsprechender Diagnostik und Indikationsstellung gesicherte, Rekanalisation mittels rekombinanten Gewebsplasminogen-Aktivator (*recombinant tissue plasminogen activator*; rt-PA) zu einem günstigeren klinischen Ergebnis führt (Hacke 2004) und auch in der Kombination von rt-PA mit Glykoprotein (GP) IIb/IIIa-Rezeptorantagonisten erste vielversprechende klinische Ergebnisse gesammelt werden konnten (Seitz 2003), sind auf dem Gebiet der neuroprotektiven Intervention bisher nur sehr wenig Erfolge zu verzeichnen. Zwar folgt die Behandlung mit Glutamatantagonisten, Radikalfängern, Ionenkanalblockern, Caspaseinhibitoren sowie Neurotrophinen plausiblen pathophysiologischen Ansätzen, nur leider zeigte eine Vielzahl von Studien entweder nicht den gewünschten Erfolg oder mussten vorzeitig abgebrochen werden (Cheng 2004), so dass sie bis zum heutigen Tage keine Rolle als alleinige Therapieoption spielen.

Um die Wirksamkeit verschiedener Therapieoptionen sinnvoll testen zu können, bedient man sich für *in vitro*-Untersuchungen der Zellkultur, während man den Tierversuch für *in vivo*-Experimente verwendet. Während die Zellkultur vor allem der Aufklärung möglicher molekularer Mechanismen dient und somit nur eine geringe Projizierbarkeit auf eine mögliche klinisch-therapeutische Anwendung erlaubt, wird der Tierversuch in erster Linie dafür eingesetzt, um die Wirksamkeit möglicher Interventionen direkt am lebenden Organismus zu überprüfen. Die Projizierbarkeit auf eine mögliche klinisch-therapeutische Anwendung ist hier zwar im größeren Maße als bei Zellkulturexperimenten möglich, doch gerade bei *in vivo*-Modellen des Schlaganfalls muss man immer beachten, dass 1.) der Glucose- und Sauerstoff-Metabolismus sowie der Blutfluss beispielsweise in der Ratte etwa dreimal höher ist als im Menschen und dass 2.) die Ausdehnungen und regionalen Verteilungen von infarzierten Arealen zwischen verschiedenen Tierarten variiert (Hoyte 2004; Tagaya 1997).

Für das *in vivo*-Modell des ischämischen Schlaganfalls verwendet man in der Regel ein Verfahren, bei welchem im Versuchstier ein definiertes Blutgefäß, welches an der Versorgung eines Gehirnteils beteiligt ist, verschlossen wird. Breite Verwendung hat der als *middle cerebral artery occlusion* (MCAO) bezeichnete Verschluss der mittleren Zerebralarterie zur Induktion eines experimentellen Schlaganfalls gefunden. Dabei wird dem Tier unter

geeigneter Narkose über die *Arteria carotis interna* ein Faden so in der *Arteria cerebri media* platziert, dass ein Verschluss dieses Gefäßes erreicht wird (Li 2005; Groth 2003; Dai 1999; Belayev 1996; Longa 1989). Nach einer definierten Zeit wird die Okklusion wieder aufgehoben und eine entsprechende Wundversorgung vorgenommen. Die funktionellen Einbußen, die durch den temporären Verschluss der *Arteria cerebri media* auftreten, lassen sich mittels verschiedener *Scores*, basierend auf Untersuchungen motorischer und sensorischer Qualitäten, bewerten (Durukan 2007; Garcia 1995) und innerhalb verschiedener Behandlungsgruppen miteinander vergleichen.

In der Zellkultur dagegen werden die verschiedenen Zelltypen des Zentralnervensystems (ZNS) entweder als immortalisierte Zelllinie oder als direkt aus dem Gehirn präparierte und kultivierte Zellen verwendet, welche in entsprechenden Zellkulturgefäßen unter standardisierten Bedingungen gehalten werden. Im Gegensatz zum Tiermodell, wo neben histologischen und radiologischen Befunden vor allem funktionelle und hirnpfysiologische Unterschiede gemessen werden können, sind in der Zellkultur molekulare Mechanismen einer Schädigung oder einer Protektion eher nachvollziehbar. Dazu können die Zellen je nach Versuchsbedingungen mit verschiedenen Stoffen behandelt und unterschiedlichen, an die Bedingungen im Schlaganfallareal angelehnten, Umweltbedingungen unterzogen werden.

Über viele Jahre hinweg konzentrierten sich dabei die *in vitro*-Untersuchungen zum ischämischen Hirnschaden auf die Vorgänge in den Neuronen, was nicht zuletzt mit der sehr ausgeprägten Vulnerabilität der Neuronen gegenüber einer Ischämie begründet wurde. Erst in den letzten Jahren rückten, nicht zuletzt vor dem Hintergrund neuerer Erkenntnisse über die Wechselwirkungen von Neuronen mit anderen im Gehirn vorkommenden Zellen, die Astrozyten als ebenfalls prominent im Gehirn vorkommende Zellpopulation näher in den Fokus der Schlaganfallforschung (Rossi 2007).

1.2. Astrozyten

Als Astrozyten (griech. für „Sternzelle“) werden eine Population von nicht-neuronalen Zellen im Gehirn bezeichnet, welche vielfältige Funktionen übernehmen. Sie bilden neben den Oligodendrozyten die Hauptzahl an Gliazellen im zentralen Nervensystem (ZNS). Ihren Namen erhielten die Gliazellen von Rudolf Virchow, welcher sie Mitte des 19. Jahrhunderts entdeckte und postulierte, dass ihre Funktion in einer passiven mechanischen Stützung und Formgebung des ZNS besteht (Verkhatsky 2006). Er verwendete daher den Begriff Neuroglia (griech. für „Nervenleim“). Die Gliazellen werden in Makro- und in Mikroglia unterteilt. In die Gruppe der Makroglia gehören neben den Astrozyten noch die Oligodendrozyten, Ependymzellen und Epithelzellen des *Plexus choroideus*. Als Mikroglia hingegen werden in ZNS ansässige mononukleare Zellen mesenchymalen Ursprungs bezeichnet, welche hauptsächlich Aufgaben der Immunabwehr übernehmen (Chan 2007).

Die Astrozyten kommen nur im ZNS vor und sind dort die größten aller Gliazellen. In den meisten Hirnregionen machen sie 20-50% der Gesamtmasse des Gehirns aus, wobei das Verhältnis der Anzahl von Neuronen zu Astrozyten in der Regel 1:10 beträgt. Die sternförmigen Zellen mit einem großen, chromatinarmen Zellkern enthalten in ihrem vergleichsweise kleinen Zytoplasma alle typischen Organellen wie Mitochondrien, raues endoplasmatisches Retikulum und *Golgi*-Apparat (Bucher 1989). Darüber hinaus befindet sich im Zytoplasma ein ausgeprägtes Zytoskelett mit Intermediärfilamenten wie Vimentin und dem gliären fibrillären sauren Protein (*glial fibrillary acidic protein*; GFAP), welches als Markerprotein für die immunzytologische Identifizierung von Astrozyten verwendet werden kann (Eng 2000). Ihre charakteristische Form, der die Astrozyten letztlich auch ihren Namen verdanken, erhalten sie durch die Vielzahl von sich verästelnden Plasmafortsätzen, die mit den Fortsätzen benachbarter Astrozyten ein dreidimensionales Netzwerk im Gehirn bilden und über *gap junctions* miteinander in Kontakt stehen (Abbildung 1.1.).

Dabei besitzen die Astrozyten jedoch eine polare Orientierung mit einer den Kapillaren zugewandten Zellseite und einer den Neuronen zugewandten Zellseite. Die den Kapillaren zugewandten Fortsätze bilden an ihren Endstücken sogenannte perivaskuläre Astrozytenscheiden aus, welche zusammen mit Zellen des Kapillarendothels für eine funktionierende Blut-Hirn-Schranke verantwortlich sind.

Die den Neuronen zugewandten Fortsätze, die sogenannten perineuralen Fortsätze der Astrozyten, bedecken das Perikaryon und die Dendriten des Neurons und haben mit Ausnahme der *Ranvier*'schen Schnürringe, keinen direkten Zugang zu den Axonen. Im

Bereich der Synapsen bilden die Astrozytenfortsätze einen Saum um den synaptischen Spalt und schließen diesen vollständig gegen die Umgebung ab.

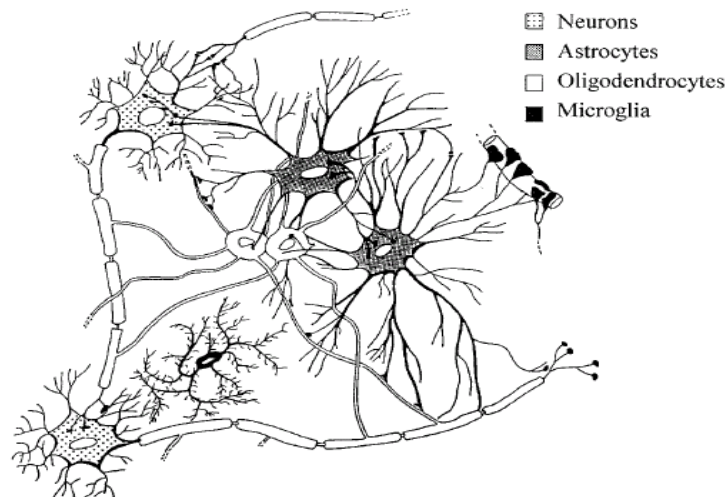


Abbildung 1.1. schematische Darstellung der Zellen des ZNS (aus Baumann und Pham-Dinh 2001).

Die Astrozyten stammen, ebenso wie Oligodendrozyten und Neuronen, von homogenen Stammzellpopulationen des neuroektodermalen Neuralrohres ab (Rao 2004). Dabei kann sich aus den Stammzellen eine Vielzahl von Vorläuferzellen entwickeln, die jeweils das Potential haben, sich zu Neuronen, Oligodendrozyten oder Astrozyten zu differenzieren (Liu 2004).

Die Funktionen der Astrozyten gehen bei weitem über die von Virchow beschriebene mechanische Stützfunktion hinaus.

Zu den wichtigsten Aufgaben der Astrozyten gehört die Versorgung der Neuronen mit Sauerstoff und Nährstoffen. Durch die perivaskulären Astrozytenscheiden können die Astrozyten in Abhängigkeit des Nährstoffangebots und Nährstoffbedarfs aktiv den Durchmesser von Hirnkapillaren und damit das lokale Sauerstoff- und Nährstoff-Angebot regulieren. Weiterhin kann durch Spaltung astrozytär gespeicherten Glykogens den Neuronen kurzfristig Glukose zur Verfügung gestellt werden. Das für den neuronalen Energiestoffwechsel bevorzugte Laktat entsteht in den Astrozyten durch Glykolyse mit nachfolgender Umwandlung von Pyruvat zu Laktat, welches, in direkter Abhängigkeit von neuronal produzierten und sezernierten Kohlendioxid, den Neuronen bereitgestellt wird (Deitmer 2000).

Zusätzlich zur Bereitstellung von Sauerstoff und Nährstoffen und der Entfernung von Metaboliten spielen die Astrozyten auch eine wichtige Rolle beim Abtransport von Ionen und

Neurotransmittern aus Bereichen erhöhter neuronaler Aktivität. So können die im Bereich gesteigerter neuronaler Aktivität auftretenden hohen Konzentrationen von extrazellulären Kalium-Ionen (K^+) durch die Astrozyten abgepuffert werden. Dieser auch als *spatial buffering* bezeichnete Prozess führt neben dem Abtransport lokal anfallender K^+ -Ionen über *gap junctions* auch zu einem retrograden Transport von Nährstoffen in Bereiche hoher neuronaler Aktivität (Kofuji 2004).

Neben extrazellulären K^+ -Ionen, welche schnell und effizient aus Bereichen hoher neuronaler Aktivität transportiert werden müssen, sind es vor allem Neurotransmitter wie Dopamin und Glutamat, welche aus dem synaptischen Spalt entfernt werden. Diese der synaptischen Signalübertragung dienenden Stoffe werden nach der Aufnahme in die Astrozyten entweder vesikulär gespeichert oder mit entsprechenden Enzymsystemen metabolisiert (Newman 2003). Für diese Prozesse stehen den Astrozyten zahlreiche spezielle Transportsysteme zur Verfügung.

Auch sind Astrozyten nicht nur in der Lage, Neurotransmitter aufzunehmen, sondern nach entsprechender Stimulierung diese auch wieder freizusetzen. So erfolgt eine Entleerung astrozytärer Vesikel mit Glutamat auf dem gleichen molekularen Wege wie die Transmitterfreisetzung an Synapsen (Montana 2004). Auf diesem Wege können Astrozyten direkt die Aktivität benachbarter Neurone regulieren (Newman 2003)

Neben Transportsystemen für Neurotransmitter exprimieren Astrozyten auch Rezeptoren für eine Vielzahl von im ZNS vorkommenden Signalstoffen. So lassen sich bei Astrozyten Rezeptoren für Glutamat (Yi 2006), γ -Aminobuttersäure (Fraser 1994), Adenosin (Daré 2007), Serotonin (Azmitia 2001), Adrenalin (Hertz 2004), Dopamin (Miyazaki 2004), Acetylcholin (Hösli 2000), Opioide (Stiene-Martin 2001), Eicosanoide (Kitanaka 1996) und verschiedene Neuropeptide wie vasoaktives intestinales Peptid (VIP) (Grimaldi 2000), Bradykinin (Hsieh 2006), Substanz P (Hamke 2006) oder atriales natriuretisches Peptid (ANP) (Paulding 1996) nachweisen.

Eine wichtige Rolle spielen Astrozyten bei ischämischen Prozessen im Gehirn. Kommt es im Rahmen eines ischämischen Insults zu einer temporären oder permanenten Unterbrechung der Sauerstoff- und Nährstoff-Zufuhr in den betreffenden Arealen, resultiert daraus unter anderem eine Störung des astrozytären Energiestoffwechsels, was zu einer direkten Schädigung von Neuronen und Astrozyten führt. Als unmittelbare Folge einer Ischämie kommt es bei allen Zellen im entsprechenden Areal zu einer Verlangsamung oder einem Stoppen der Synthese des Adenosintriphosphats (ATP) (Rossi 2007), was auf einen Mangel an Substraten und Sauerstoff zurückzuführen ist. Während für die Bereitstellung von Substraten der oxidativen

Phosphorylierung je nach Zelltyp noch alternative Stoffwechselwege zur Verfügung stehen, kann ein Mangel an Sauerstoff jedoch nicht durch alternative Wege ausgeglichen werden (Silver 1997). Während einer Ischämie sind Astrozyten aufgrund intrazellulärer Glykogenspeicher länger in der Lage, Substrate für die oxidative Phosphorylierung zu generieren und somit bestimmte ATP-Konzentrationen zu erhalten. Die bei der Glykogenolyse freiwerdende Glucose können die Astrozyten sowohl für den eigenen Stoffwechsel verwenden als auch den Neuronen zur Verfügung stellen (Rossi 2007). Gleichzeitig sind Astrozyten in der Lage, das mittels anaerober Glykolyse gebildete Laktat benachbarten Neuronen zur Verfügung zu stellen (Brown 2005b). Ein Nachteil der anaeroben Glykolyse mit der Freisetzung von Laktat liegt in einer anfangs noch lokal beschränkten Laktatazidose mit negativen Effekten auf den Ionenhaushalt und das Überleben der Zellen (Chesler 2005).

Die wichtigste Folge des ATP-Mangels liegt in der Inhibition der Na^+/K^+ -ATPase mit der Folge eines Verlustes des transmembranären Ionengradienten und einer daraus resultierenden Membrandepolarisation in Neuronen und Astrozyten (Hansen 1988). Durch den Verlust des Ionengradienten kommt es zu einem starken Anstieg der extrazellulären Glutamatkonzentration (Phillis 1996), was zu toxischen Effekten an Neuronen und Astrozyten führen kann (Schubert 1994; Duffy 1996). Dieser Anstieg der extrazellulären Glutamatkonzentration kommt durch eine Vielzahl von Mechanismen zustande (Rossi 2007). Wie bereits oben beschrieben, können Astrozyten Glutamat in vesikulären Strukturen speichern (Montana 2004). Im Rahmen einer Ischämie kann es jedoch infolge des Anstiegs der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration zu einer Freisetzung des Glutamats aus den intrazellulären Speichern in den Extrazellulärraum kommen (Montana 2006).

Eine Ischämie führt aber nicht nur zur Freisetzung von Glutamat aus astrozytären Vesikeln, sondern auch zu einer ATP-Freisetzung aus intrazellulären Speichern (Parkinson 2004). Dies kann dann infolge der Aktivierung von Purin-Rezeptoren wie dem P2X-Rezeptor zu einem Anstieg der extrazellulären Glutamat-Konzentrationen führen (Lämmer 2006).

Der oben beschriebene Zusammenbruch des Ionengradienten von Zellen in einem ischämischen Gebiet führt infolge des Na^+ -Einstroms in die Zellen auch zu einer Zellschwellung. Dadurch werden in Astrozyten sogenannte *volume-regulated anion channels* (VRAC) aktiviert, welche sich bei Zellschwellung öffnen und so den Efflux von Glutamat und anderen Aminosäuren erlauben. Dadurch soll infolge des Austritts osmotisch wirksamer Substanzen das Zellvolumen reduziert werden (Kimmelberg 1990), was aber ebenfalls zu einem Anstieg der extrazellulären Glutamatkonzentrationen führen kann (Kimmelberg 2005).

Weiterhin kommt es infolge der Unterbrechung der oxidativen Phosphorylierung auch zur Generierung reaktiver Sauerstoffspezies (Abramov 2007), welche in der Lage sind, Glutamattransporter in ihrer Funktion zu beeinträchtigen und somit zusätzlich die extrazellulären Glutamatkonzentrationen erhöhen können (Trotti 1997; Trotti 1996).

In den Randgebieten des Infarktes, der sogenannten *Penumbra*, kann es durch den hier nur moderaten Abfall der zellulären ATP-Konzentrationen dagegen zu wiederholten Depolarisationen, den sogenannten *transient ischemic depolarizations* (TID) kommen, die mitverantwortlich für einen Anstieg der extrazellulären Glutamatkonzentrationen in der *Penumbra* und einer Ausweitung der Infarktzone gemacht werden können (Higuchi 2002).

Ein weiterer wichtiger Punkt im Verhalten der Astrozyten während einer Ischämie ist im Vorhandensein sogenannter „halber *gap junctions*“ zu sehen. Wie oben bereits beschrieben, bilden Astrozyten über *gap junctions* mit benachbarten Zellen ein dreidimensionales Netzwerk, über welches Moleküle und Informationen ausgetauscht werden können. Sowohl Neuronen als auch Astrozyten sind aber auch in der Lage, vollständig geformte Connexin- und Pannexin-Moleküle zu bilden, die jedoch nicht in Kontakt mit einer Nachbarzelle stehen. Während einer Ischämie können sich diese „halben *gap junctions*“ öffnen und niedermolekularen Stoffen, wie zum Beispiel Glutamat, den Austritt in den Extrazellulärraum ermöglichen (Thompson 2006; Ye 2003).

Im Bezug auf die intrazellulären Glutamatkonzentrationen von Neuronen und Astrozyten, der beschriebenen Mechanismen einer Freisetzung von Glutamat und der Expression und Aktivität von Glutamattransportern in Neuronen und Astrozyten geht man derzeit in der Literatur davon aus, dass während einer Ischämie Glutamat zu großen Teilen von Neuronen freigesetzt wird, während die Astrozyten gleichzeitig bestrebt sind, durch Transportvorgänge das freigesetzte Glutamat wieder aufzunehmen (Rossi 2007). Diese Überlegung konnte durch quantitative immunzytochemische Untersuchungen (Ottersen 1996) bestätigt werden. Die Bedeutung der Glutamattransporter während einer zerebralen Ischämie konnte beispielsweise beim astrozytären Glutamattransporters GLT-1 durch Untersuchungen belegt werden, bei denen eine Blockade des GLT-1 zur vermehrten zerebraler Ödembildung sowie zur Exazerbation neuronaler Schäden nach zerebraler Ischämie geführt hatte (Namura 2002; Rao 2001b).

1.3. Glutamattransporter

Die endogene Aminosäure L-Glutaminsäure und das entsprechende Salz L-Glutamat erfüllen eine Vielzahl von Funktionen im menschlichen Organismus. Im ZNS gehört L-Glutamat neben L-Aspartat, dem Salz der L-Asparaginsäure, zu den erregenden (exzitatorischen) Neurotransmittern, die in nahezu alle physiologischen Vorgänge im ZNS involviert sind. So ist Glutamat essentiell für das Auswachsen neuronaler Fortsätze (Rajan 1998) und die Migration von Neuronen (Komuro 1993; Rossi 1993) während der Entwicklung des ZNS und spielt im Rahmen der *long term potentiation* eine entscheidende Rolle bei der Bildung des Langzeitgedächtnisses (Danbolt 2001). Seine Wirkung entfaltet L-Glutamat dabei über einen von vier Rezeptortypen, welche sich noch in zahlreiche Untertypen unterteilen lassen und im ZNS weit verbreitet sind (Ozawa 1998). Dem metabotropen G-Protein-gekoppelten Glutamatrezeptor (mGluR) stehen als ligandenaktivierte Ionenkanäle der Kainatrezeptor, der AMPA (α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionsäure)-Rezeptor und der NMDA (N-Methyl-D-Aspartat)-Rezeptor gegenüber (Kew 2005). Die Glutamatrezeptoren spielen eine wichtige Rolle bei der durch erhöhte extrazelluläre Glutamatkonzentrationen vermittelten Neurotoxizität. Diese auch als Exzitotoxizität bezeichnete Neurotoxizität extrazellulären Glutamats (Olney 1969; Choi 1992) liegt in einer Ligandenaktivierung von Glutamatrezeptoren, und hier insbesondere des NMDA-Rezeptors, durch pathologische Konzentrationen von L-Glutamat begründet, welche zu einem exzessiven Einstrom vom Ca^{2+} -Ionen in die Zelle führt (Hazell 2007). Dadurch werden eine Vielzahl von komplexen zellschädigenden Prozessen in Gang gesetzt. Primär daran beteiligt sind die Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies, die Aktivierung intrazellulärer Proteasen sowie eine mitochondriale Ca^{2+} -Überbeladung. Dieser Vorgang führt neben einer mitochondrialen Fehlfunktion vor allem zu Schäden an zellulären Proteinen, Membranen und Nukleinsäuren und letztlich zur Apoptose oder Nekrose der betreffenden Zellen (Arundine 2004; Nicholls 2007). Die Exzitotoxizität von Glutamat konnte an primären neuronalen Zellen demonstriert werden, bei denen es 24 Stunden nach kurzzeitiger Exposition von 100 μM Glutamat zum Absterben eines Großteils der Zellen gekommen ist (Choi 1987).

Die Homöostase des Glutamats, welches physiologisch in extrazellulären Konzentrationen von 1-3 μM und intrazellulären Konzentrationen von 10-100 mM im Gehirn vorliegt (Storm-Mathisen 1992), wird durch verschiedene Glutamattransportsysteme gewährleistet.

Diese Transportsysteme gehören zur *solute carrier family 1* (SLC1) und umfassen fünf hochaffine Glutamattransporter und zwei Na^+ -abhängige *neutral amino acid-transporter*. Aus

der Klasse der hochaffinen Glutamattransporter wurden in den letzten zwei Jahrzehnten insgesamt fünf verschiedene Typen identifiziert. Dazu gehören unter anderem der *Glutamat-Aspartat-Transporter*/GLAST (Storck 1992), der *Glutamate-Transporter 1*/GLT-1 (Pines 1992) und der *Excitatory Amino Acid Carrier 1*/EAAC1 (Kanai 1992), welche zuerst in Ratten und Kaninchen identifiziert werden konnten. Nach entsprechenden Homologieuntersuchungen an humanen Materialien wurde zur Vereinheitlichung der Nomenklatur vorgeschlagen, die entsprechenden Transporter mit dem Terminus *Excitatory Amino Acid Transporter*/EAAT und einer entsprechenden Nummerierung zu versehen (Arriza 1994). Durch Sequenzvergleiche wurde festgestellt, dass EAAT1 das menschliche Homolog zu GLAST, EAAT2 zu GLT-1 und EAAT3 zu EAAC1 ist. Im weiteren Verlauf der Untersuchungen wurden später noch der EAAT4 (Fairman 1995) und EAAT5 (Arriza 1997) sowie die ebenfalls zur SCL1-Familie gehörenden und als *Alanin-Serin-Cystein-Transporter*/ASCT1 bzw. ASCT2 bezeichneten Glutamat-Transportsysteme aus der Klasse der Na^+ -abhängigen *neutral amino acid*-Transporter (Arriza 1993; Kekuda 1996; Shafqat 1993; Utsunomiya-Tate 1996) entdeckt. Anzumerken ist, dass GLAST und GLT-1 zuerst in Astrozyten gefunden wurden, EAAC1 und EAAT4 dagegen zuerst in neuronalen Material identifiziert wurden und der EAAT5 erstmals in der Retina entdeckt wurde.

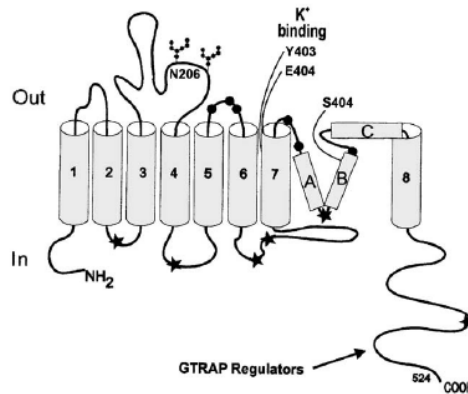


Abbildung 1.2. schematische Darstellung eines Glutamattransporters der SCL1-Familie (aus Kanai und Hedinger 2003).

Alle Glutamattransporter der SCL1-Familie (Abbildung 1.2.) sind transmembranäre Proteine mit acht α -helikalen Transmembrandomänen, einer großen, extrazellulär gelegenen, glykolysierten Schleife zwischen den Domänen 3 und 4 sowie einem für die SCL1-Familie typischen, hydrophoben Arm im Bereich des Carboxy-Terminus (Kanai 2003).

Der Transport von Glutamat entgegen eines Konzentrationsgradienten ist am Beispiel der EAAT-Klasse gut untersucht und beinhaltet den Cotransport von zwei oder drei Na^+ -Ionen

und einem Proton sowie dem Ausschleusen eines K^+ -Ions (Shigeri 2004). Untersuchungen an Na^+ -abhängigen Glutamattransportern haben gezeigt, dass die Bindung des Glutamats schnell abläuft, während der eigentliche Transportzyklus in die Zelle langsamer vonstatten geht (Lester 1996), so dass die Bindung des Glutamats am Transporter allein schon zu einer Entfernung des Glutamats aus dem synaptischen Spalt führt (Conti 1999). Dieser Transportvorgang ist insofern ATP-abhängig und damit einem Energiemangel gegenüber vulnerabel, als dass die Aktivität der Glutamattransporter auch vom ATP-abhängigen Na^+ -Gradienten entlang der Plasmamembran bestimmt wird (Camacho 2006).

Nachdem das Glutamat aus dem Extrazellulärraum in den Intrazellulärraum transportiert wurde, wird es dort entweder metabolisiert oder in vesikulären Strukturen gelagert. Der größte Teil des Glutamats durchläuft den ATP-abhängigen Glutamat-Glutamin-Zyklus, bei welchem Glutamat durch die astrozytäre Glutamin-Synthetase zu Glutamin umgesetzt wird (Fonnum 1984). Das bei dieser Reaktion anfallende Glutamin kann dann nach Freisetzung aus den Astrozyten von Neuronen aufgenommen und dort zur Resynthese von Glutamat verwendet werden (Sonnewald 1997). Alternativ kann das in den Astrozyten intrazellulär anfallende Glutamat mittels einer Transaminierungsreaktion über die Aspartat-Aminotransferase (ASAT) oder einer oxidativen Desaminierung über die Glutamat-Dehydrogenase umgesetzt werden, wobei jeweils α -Ketoglutarat entsteht, welches in den Citratzyklus eingeschleust wird (Dienel 2006). Weiterhin kann das intrazellulär aufgenommene Glutamat aber auch in vesikulären Strukturen im Astrozyten gespeichert und ähnlich wie in Synapsen, auf Ca^{2+} -abhängigen Wege, freigesetzt werden (Newman 2003).

Der GLT-1/EAAT2-Transporter gleicht in seinem Aufbau und seiner Arbeitsweise den anderen Vertretern der SCL1-Familie. Wie oben bereits angegeben, wurde er erstmals 1992 von der Arbeitsgruppe um G. Pines identifiziert und beschrieben (Pines 1992). Von seiner zellulären Lokalisation her betrachtet, ist der GLT-1 ein integrales Membranprotein mit intrazellulär gelegenen N- und C-Terminus (Slotboom 1999). Weiterhin weist der GLT-1, wie alle anderen Subtypen der Na^+ -abhängigen Glutamat-Transporter auch, intrazellulären Proteinkinasen zugängliche Phosphorylierungsstellen sowie extrazellulär gelegene N-Glykosylierungsstellen auf (Sims 1999).

Vom EAAT2-Subtyp konnten zahlreiche *splice*-Varianten identifiziert werden, bei denen keine funktionellen Unterschiede in der Transportaktivität festgestellt werden konnten, so dass postuliert wird, dass das alternative Spleißen eine Rolle beim *Targeting* des Transporters in spezifische Zelltypen spielt (Utsunomiya-Tate 1997; Chen 2002; Sullivan 2004).

Beim Menschen ist der EAAT2-Subtyp ausschließlich auf Astrozyten nachgewiesen worden (Milton 1997), während bei *in situ*-Untersuchungen am Rattenhirn der dem EAAT2 homologe Subtyp GLT-1 auch in Neuronen des Hippocampus gefunden werden konnte (Torp 1994). Weiterhin gibt es in der Literatur Hinweise dafür, dass der GLT-1 auch in Neuronen außerhalb des Hippocampus zu finden ist. So konnte ein neuronaler GLT-1-Transporter während der Embryogenese (Yamada 1998), nach einem ischämischen Insult (Martin 1997) und in neuronalen Zellkulturen (Brooks-Kayal 1998) gefunden werden. Als weiterer Zelltyp des ZNS sind auch Mikroglia in der Lage, den GLT-1 zu exprimieren (Persson 2005).

Im Bezug auf die regionale Verteilung des GLT-1/EAAT2 im Gehirn gehen einige Autoren von einer gleichmäßigen Verteilung über den gesamten Hirnbereich aus (Robinson 1998), während andere eine stärkere Expression im Vorderhirn gefunden haben (Lehre 1995).

Die Regulation der Zahl beziehungsweise der Aktivität des GLT-1-Transporters kann auf den Ebenen der Transkription, der Translation, des Transports des translatierten Proteins in die Zellmembran sowie in der Interaktion mit Botenstoffen (Beart 2007; Kanai 2003) erfolgen. So ist bekannt, dass Astrozyten-reiche Kulturen aus kortikalen Geweben in Abwesenheit von gleichzeitig kultivierten Neuronen nur geringe Level an GLT-1-Protein exprimieren, während die Expressionslevel bei Anwesenheit von Neuronen signifikant ansteigen (Schlag 1998). Die Ergebnisse von Untersuchungen zur Ursache dieser Expressionssteigerungen sind widersprüchlich. So konnte auf der einen Seite durch entsprechende Experimente kein Beweis dafür erbracht werden, dass das von den Neuronen ausgeschüttete Glutamat als Ursache für die gestiegene GLT-1-Expression in Frage kommt (Schlag 1998), während in anderen Untersuchungen Hinweise gefunden werden konnten, dass GLT-1-mRNA-Level in kultivierten Astrozyten unter Behandlung mit Glutamat oder mit Liganden von Glutamatrezeptoren ansteigen (Thorlin 1998). Andererseits wurden als Ursache dieser von Neuronen abhängigen Regulation neuronale Faktoren wie das *pituitary adenylate cyclase-activating peptide* (PACAP) und der *brain-derived neurothrophic factor* (BDNF) (Figiel 2000; Gegelashvili 2000) postuliert. Als Stoffe mit einem Einfluss auf den Transport des funktionsfähigen GLT-1-Proteins aus dem Intrazellulärraum in die Plasmamembran sind die Proteinkinase C, Phosphoinositol-3-Kinase und *mitogen-activated protein kinase* (MAP-Kinase), der *epidermal growth factor* (EGF), das *vasoactive intestinal peptide* (VIP) sowie einige Strukturproteine zu nennen (Beart 2007). Während EGF und VIP vor allem über ihre Rezeptoren die als *trafficking* bezeichneten Prozesse der Verlagerung des Transporterproteins in die Zellmembran beeinflussen können, wirken Strukturproteine wie die *Glutamate transporter-associated proteins* (GTRAP) oder *Ajuba* in Verbindung mit dem intrazellulären

Actin-System (Lin 2001; Marie 2002). Ebenfalls wichtig für Lokalisation und Funktion des GLT-1 sind an Cholesterin reiche Membrankompartimente, sogenannte *Cholesterol-rich lipid rafts* (Butchbach 2004). Weiterhin ist beschrieben worden, dass die Expression des GLT-1 auch über astrozytäre *gap junctions* moduliert werden kann (Fiegel 2007).

Über eine Beeinflussung der Expression und/oder Aktivität des GLT-1 durch exogene Substanzen sind in der Literatur weitaus weniger Hinweise zu finden. So bewirkt das seit langem bei *in vitro*-Untersuchungen zum GLT-1 als Positivkontrolle eingesetzte Dibutyryl-cAMP (dbcAMP), welches ein synthetisches und die Zellmembran permeierendes Analogon des zyklischen Adenosinmonophosphats (*cyclic adenosine monophosphate*, cAMP) darstellt, eine effektive Expressionssteigerung des GLT-1 (Schlag 1998, Eng 1997). Einige Autoren sehen aber den cAMP-Effekt weniger in einer direkten transkriptionellen Beeinflussung als vielmehr in einer Induktion der Differenzierung und/oder einer Änderung des metabolischen Zustandes der Zelle (Gochenauer 2001). Weiterhin werden zur direkten Modulation von Glutamattransportern sogenannte Strukturanaloga des Glutamats verwendet, welche jedoch eine sehr geringe pharmakologische Selektivität für einzelne Subtypen der SLC1-Familie besitzen (Beart 2007). Einzig mit Kainat und Dihydrokainat konnte eine spezifische Aktivierung von EAAT1- und EAAT2-Subtypen festgestellt werden (Arriza 1994). Desweiteren wurde in den letzten Jahren eine Reihe von Nicht-Substrat-Inhibitoren mit einer Selektivität für den GLT-1/EAAT2-Subtyp vorgestellt (Dunlop 2005, Dunlop 2003).

Als selektive Induktoren des GLT-1 werden in der Literatur der Neuroimmunophilin-Ligand GPI-1046 und das β -Laktam-Antibiotikum Ceftriaxon beschrieben (Ganel 2006; Rothstein 2005). Letzteres wurde im Rahmen eines Screenings von 1040 verschiedenen Arzneistoffen und Nahrungsergänzungsmitteln an kultivierten Rückenmarksschnitten postpartaler Ratten gefunden (Rothstein 2005). Die Autoren fanden dabei neben einem Anstieg der GLT-1/EAAT2-Expression auch neuroprotektive Effekte von Ceftriaxon in einem *in vivo*-Modell der amyotrophen Lateralsklerose (ALS).

Die Suche nach modulatorisch auf den GLT-1 wirkenden Substanzen liegt im Einfluss des GLT-1 auf die Glutathomöostase begründet, welcher durch Untersuchungen an GLT-1-*knockout*-Mäusen bestätigt wurde, bei denen die GLT-1-defizienten Tiere spontane epileptische Anfälle mit letalem Ausgang sowie eine Manifestation akuter kortikaler Schäden zeigten (Tanaka 1997). Als histologisches Korrelat konnte bei diesen Tieren unter anderen eine neuronale Degeneration im Hippocampus nachgewiesen werden (Rothstein 1996).

Unabhängig von solchen Modellorganismen mit ihrem fulminanten Phänotyp scheinen aber auch geringere Änderungen der Expression und/oder Aktivität des GLT-1/EAAT2 eine

pathologische Relevanz zu besitzen. So konnte im motorischen und sensorischen Cortex von Patienten, die an einer sporadischen Form der ALS leiden, eine Reduktion des Gehalts von GLT-1 in den entsprechenden Arealen gefunden werden (Rothstein 1995). Weiterhin wurden in humanen Proben bei Epilepsie (Hoogland 2004), Morbus Alzheimer (Li 1997), Chorea Huntington (Arzberger 1997), Multipler Sklerose (Werner 2001) und Schizophrenie (Smith 2001) GLT-1-assoziierte Veränderungen gefunden.

Eine wichtige Rolle spielt der GLT-1 auch bei ischämischen Bedingungen im Gehirn infolge eines Schlaganfalls. Im Rahmen eines ischämischen Prozesses kommt es im Gehirn zu einer Minderversorgung des Gewebes mit Blut, was sich in einem regionalen Mangel von Sauerstoff, Glucose und anderen Nährstoffen sowie in einer Akkumulation von Stoffwechselprodukten im Areal der Ischämie äußert. Als Folge der regionalen Minderversorgung zum einem und der Akkumulation schädlicher Metabolite zum anderen kommt es zu einer gestörten Glutathomöostase. Dies zeigt sich in einer drastischen Zunahme der extrazellulären Glutamatkonzentration und daraus resultierenden exzitotoxischen Effekten auf die betreffenden Neuronen. Die Zunahme des extrazellulären Glutamats ist dabei auf 1.) einen abnehmenden Glutamattransport vom Extrazellulärraum zum Intrazellulärraum, 2.) einer verminderten Expression von Transporterprotein und 3.) einem reversen Glutamattransport zurückzuführen (Camacho 2006).

Die Abnahme des Glutamattransports kann auf eine Interaktion von peri-ischämisch gebildeten freien Radikalen (Peters 1998) mit Sulfhydrylgruppen des Transporterproteins (Trotti 1996; Trotti 1997) sowie auf die lokal im Ischämie-Gebiet vorliegende Laktatazidose (Swanson 1995) zurückgeführt werden.

Eine verminderte Expression von GLT-1 nach Hypoxie ist beschrieben und zeigt sich in einer Abnahme der entsprechenden mRNA- und Protein-Konzentrationen meist schon vor dem Auftreten neuronaler Zellschäden (Rao 2001a, Raghavendra Rao 2000).

Das Auftreten eines reversen Transports durch Glutamattransporter (Abbildung 1.3) entlang des Konzentrationsgradienten von intrazellulär nach extrazellulär wird im Allgemeinen auf Änderungen von Elektrolytgradienten entlang der Zellmembran zurückgeführt (Rossi 2000).

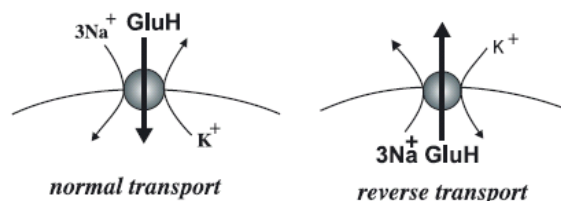


Abbildung 1.3. schematische Darstellung des normalen und reversen Glutamattransportes (aus Kanai 2003).

Diese sind auf einen Anstieg der intrazellulären Na^+ -Konzentration, verursacht durch einen lokalen ATP-Mangel, zurückzuführen (Longuemare 1999).

Die Bedeutung des GLT-1 im Schlaganfall belegen Experimente mit heterozygoten Mäusen, denen ein Allel des GLT-1 fehlt. Bei diesen Tieren zeigte sich nach experimentell induzierter Ischämie ein vergrößertes Hirnödem (Namura 2002). Ähnliche Beobachtungen konnten beim experimentellen Tierversuch im Schlaganfall gemacht werden, wenn den Tieren *antisense*-Nukleotide gegen den GLT-1 verabreicht wurden. Hier zeigten sich bei der Behandlungsgruppe eine Zunahme des Infarkt Volumens und eine gestiegene Mortalität (Rao 2001b).

Diese Untersuchungen belegen aber nicht nur den Einfluss des GLT-1 auf das Geschehen im ischämischen und post-ischämischen Gehirn, sondern zeigen auch das Potential einer möglichen Modulation des GLT-1 im Schlaganfallgeschehen. Wie oben bereits erwähnt, konnten Rothstein *et al.* in einem großangelegten *Screening* das β -Laktam-Antibiotikum Ceftriaxon als Modulator der GLT-1-Expression identifizieren (Rothstein 2005). Wenn sich diese Modulation auch in *in vitro*- und *in vivo*-Modellen des Schlaganfalls bestätigen ließe, stände ein potentiell Therapeutikum zur Verfügung, welches die negativen Effekte des exzitotoxischen Glutamats in ischämischen oder postischämischen Arealen vermindern könnte.

Dass dabei die astrozytären Glutamattransporter im Fokus der Untersuchungen stehen, lässt sich durch folgende Betrachtung relativ leicht herleiten. Die Neuronen auf der einen Seite werden mit ihren hohen intrazellulären Glutamatkonzentrationen, ihrer Vulnerabilität gegenüber einer Sauerstoff- und Nährstoffdepletion und der Möglichkeit des reversen Transports über Glutamattransporter zu einem großen Anteil an einer Erhöhung der extrazellulären Glutamatkonzentrationen während einer Ischämie verantwortlich sein. Die Astrozyten auf der anderen Seite werden dagegen aufgrund der hohen Anzahl von Glutamattransportern in den Zellmembranen sowie der geringeren intrazellulären Glutamatkonzentration, die das Ausmaß eines reversen Transports einschränkt, um so mehr in der Lage sein, erhöhte Konzentrationen an extrazellulärem Glutamat während und nach einer Ischämie effektiv zu senken. Würde man diese astrozytäre „Eigenschaft“ bewusst therapeutisch steuern können, hätte man ein effektives Therapeutikum für die Behandlung eines Schlaganfalls sowie dessen Folgen in der Hand. Mit Ceftriaxon scheint sich, wie oben beschrieben, ein möglicher Kandidat für eine Steuerung der astrozytären Glutamataufnahme zu präsentieren (Rothstein 2005).

1.4. Ceftriaxon

Das seit mehr als zwanzig Jahren in der Therapie bakterieller Infektionen verwendete Antibiotikum Ceftriaxon gehört als Vertreter der Cephalosporine zu der Gruppe der β -Laktam-Antibiotika und wurde 1982 von der Firma Roche unter dem Handelsnamen *Rocephin* auf den Markt gebracht.

Als β -Laktame werden Stoffe bezeichnet, die in ihrem Molekül als strukturgebendes Element ein zyklisches Amid (Abbildung 1.4.) enthalten, welches durch eine intramolekulare Kondensationsreaktion aus einer Amino- und einer Hydroxyl-Gruppe entsteht. Substanzen mit einer β -Laktam-Struktur werden von einer Vielzahl von Pilzen und Bakterien produziert und dienen dem produzierendem Organismus als Schutz vor (bakterieller) Besiedelung.

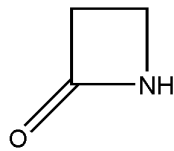


Abbildung 1.4. β -Laktam-Struktur

Der Nachweis der antimikrobiellen Eigenschaften dieser Substanzen gelang als erstem Robert Fleming im Jahre 1928, als er auf einer mit *Staphylococcus aureus* beimpften Agarplatte ein Areal ohne Bakterienwachstum um eine Kolonie von *Penicillium notatum*, welcher als unerwünschte Kontamination auf dieser Platte wuchs, bemerkte. Er isolierte den Pilz in Reinkultur und konnte aus diesem das *Penicillium* (Penicillin) gewinnen, welches zum einem das Wachstum zahlreicher humanpathogener Keime auch in Anwesenheit physiologischer Stoffe hemmen konnte und zum anderen eine erstaunliche „Ungiftigkeit“ gegenüber Wirbeltieren aufwies. Nachdem in ersten klinischen Behandlungsserien die Wirksamkeit des Penicillins bei schweren bakteriellen Infektionen gezeigt werden konnte, begann in den Jahren nach dem zweiten Weltkrieg eine großangelegte Suche nach weiteren antimikrobiell wirksamen Naturstoffen. So konnte bereits 1953 aus dem Pilz *Cephalosporium acremonium* das Cephalosporin C isoliert werden, welches gegenüber den Penicillinen den Vorteil einer erhöhten Festigkeit gegenüber Staphylokokken-Penicillinase besaß. Als weiterer Vorteil stellte sich in späteren Untersuchungen dann die erhöhte Hydrolysestabilität gegenüber Säuren dar, die das Cephalosporin-Grundgerüst (Abbildung 1.5.) partialchemischen Strukturabwandlungen zugänglicher machte (Hamilton-Miller 2000; Friedrich 2006).

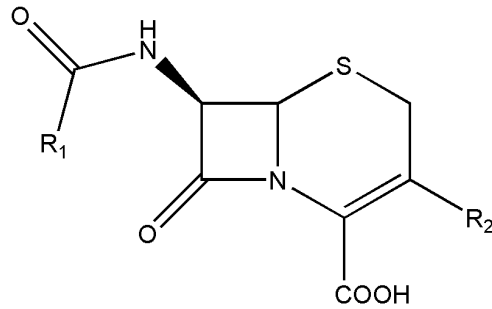


Abbildung 1.5. Cephalosporin-Grundgerüst

Ihre bakteriostatische Wirkung gegenüber Bakterien entfalten die β -Laktame, zu denen neben den Penicillinen und Cephalosporinen auch die Monobactame und die Carbapeneme gehören, über eine Hemmung der bakteriellen Zellwandsynthese. Die für die Proliferation der Bakterien essentielle Zellwandsynthese wird über Peptidoglykansynthesen (Mureinsynthesen) vermittelt, welche als Transpeptidasen die Glykanstränge des Mureingerüsts quervernetzen und somit stabilisieren. Die β -Laktam-Antibiotika sind aufgrund der Strukturverwandtschaft zur terminalen D-Alanyl-D-Alanin-Gruppe der unvernetzten Peptidoglykanbausteine des Mureins in der Lage, an das beim Menschen nicht vorhandene Enzym D-Alanin-Transpeptidase zu binden und dieses in einer Acylierungsreaktion unter Bildung eines stabilen Transpeptidase-Penicillosäure-Derivates zu inhibieren. Infolge der Inhibition dieser auch „Penicillin-bindende Proteine“ genannten Enzymsysteme können die Einzelbausteine des Mureins während des bakteriellen Wachstums nicht mehr vernetzt werden, so dass die Bakterienzellwand ihre physikalische und physiologische Integrität verliert. Über die bakteriostatische Wirkung der β -Laktame hinaus wird aber auch eine direkte Bakteriolyse durch Aktivierung von Murein-Hydrolasen diskutiert (Bayles 2000; Heisig 2006).

Resistenzen gegenüber diesen Substanzen treten infolge chromosomal vermittelter Veränderungen der „Penicillin-bindenden Proteine“, einer Induktion von Effluxmechanismen zur Ausschleusung der Antibiotika, einer vermehrten Produktion β -Laktam-hydrolysierender Enzyme (β -Laktamasen) sowie einer strukturell veränderten Zellwand, die die Penetration der β -Laktame erschwert, auf. Die beschriebenen Resistenzmechanismen können dabei plasmidvermittelt auch über Speziesgrenzen hinweg übertragen werden (Tenover 2006; Heisig 2006; Davies 1994).

Aufgrund der Stabilität der 7-Aminocephalosporansäure (7-ACS) bei gleichzeitig guter Zugänglichkeit der Substituenten an Position 3 und Position 7 der 7-ACS kam es zur Entwicklung zahlreicher Cephalosporin-Derivate, die aufgrund ihrer unterschiedlichen

Säurestabilität in Cephalosporine zur parenteralen Anwendung und in Cephalosporine zur oralen Anwendung unterschieden werden können. Nach Empfehlung der Paul-Ehrlich-Gesellschaft werden die Cephalosporine innerhalb dieser Gruppen entsprechend ihres Wirkspektrums und ihrer Stabilität gegenüber β -Laktamasen in fünf Untergruppen unterteilt (Paul-Ehrlich-Gesellschaft 1994).

Ceftriaxon (Abbildung 1.6.) gehört laut dieser Einteilung zu den parenteralen Cephalosporinen der 3. Generation und zeichnet sich gegenüber den Cephalosporinen der 1. und 2. Generation durch eine höhere Stabilität gegenüber bakteriellen β -Laktamasen und einem veränderten Wirkspektrum aus. Durch Einführung einer Oximether-Struktur in Nachbarschaft zu einem Aminothiazolyl-Ring sowie eines Triazin-Rings an Position 3 der 7-ACS konnte eine hohe Stabilität des Arzneistoffs gegenüber bakteriellen β -Laktamasen erreicht werden. Gleichzeitig ist jedoch eine nur geringe orale Bioverfügbarkeit zu beobachten, die eine parenterale Anwendung nötig macht (Richards 1984).

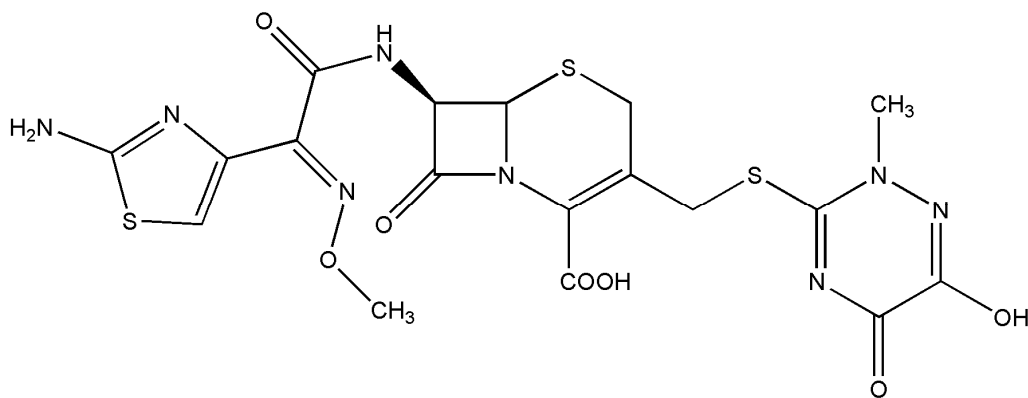


Abbildung 1.6. Strukturformel von Ceftriaxon

Das Wirkspektrum von Ceftriaxon gegenüber grampositiven Erregern ist im Vergleich zu den Cephalosporinen der 1. und 2. Generation leicht abgeschwächt, wohingegen bei gramnegativen Erregern eine verstärkte Empfindlichkeit gegenüber Ceftriaxon zu beobachten ist. Die für Cephalosporine typische Nichtwirksamkeit gegenüber *Enterococcus*-Arten (sog. Enterokokken-Lücke) aufgrund der erregerspezifischen Synthese von „Penicillin-bindenden Proteinen“ mit einer nur geringen Affinität zu β -Laktam-Strukturen (Fontana 1990) ist auch bei Ceftriaxon zu finden. Desweiteren ist Ceftriaxon, wie alle β -Laktam-Antibiotika, aufgrund seines Wirkmechanismus grundsätzlich ohne Wirkung bei zellwandlosen Bakterien wie *Mycoplasma sp.*, obligat intrazellulär wachsenden Bakterien wie *Chlamydia sp.*, obligat

intrazellulär parasitierenden Bakterien wie *Brucella sp.* und langsam wachsenden Bakterien wie *Mycobacterium sp.* (Forth 2001).

Von diesen Ausnahmen abgesehen, besitzt Ceftriaxon ein breites Wirkspektrum gegenüber grampositiven und gramnegativen Bakterien sowie gegenüber einigen Anaerobiern. Es ist hoch aktiv gegenüber den meisten Vertretern der *Enterobacteriaceae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalacticae* und *Streptococcus viridians*. Weiterhin ist es in niedrigen Konzentrationen hoch aktiv gegen β -Laktamase-positive und β -Laktamase-negative Stämme von *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae* und *Neisseria meningitidis*. Im Allgemeinen erzielt Ceftriaxon gegenüber solchen Erregern eine antimikrobielle Aktivität, bei denen eine Minimale Hemmkonzentration (MHK) von ≤ 1 mg/l Ceftriaxon vorliegt (Emmerson 1985). Eine geringere Aktivität zeigt es gegenüber Penicillinempfindlichen und Penicillin-resistenten Stämmen von *Staphylococcus aureus*. Gegenüber *Pseudomonas aeruginosa* und *Enterococcus sp.* besteht eine natürliche Resistenz.

Von pharmakokinetischer Seite ist die lange Halbwertszeit, die gute Penetration in Gewebe und Körperflüssigkeiten und die dosisabhängig sättigbare Serumeiweißbindung von Ceftriaxon hervorzuheben. So liegt die Plasma-Halbwertszeit unabhängig von Dosierung und Applikation bei 6-9 Stunden, während bei den meisten anderen Cephalosporinen Halbwertszeiten von 0,6 bis 4,4 Stunden erreicht werden. Nach intravenöser Einmalgabe von 0,5 g, 1 g oder 2 g Ceftriaxon werden maximale Serumkonzentrationen (C_{\max}) von 82, 151 und 257 mg/l erreicht, während bei intramuskulärer Gabe von 0,5 g oder 1 g Ceftriaxon nach 2 Stunden C_{\max} -Werte von 38 und 76 mg/l im Serum gemessen wurden. Selbst 24 Stunden nach einer intravenösen Gabe von 2 g Ceftriaxon wurden noch Serumkonzentrationen von 12-20 mg/l gemessen (Lamb 2002). Eine Besonderheit weist Ceftriaxon bei der Serumeiweißbindung auf. So ist Ceftriaxon im Bereich normaler Dosierungen in der Lage, alle verfügbaren Proteinbindungsstellen zu besetzen und damit zu sättigen (Stoeckel 1984). Daraus resultiert bei höheren Dosierungen eine erhöhte Serumkonzentration von freiem Ceftriaxon, welches antibiotisch wirksam ist und in der freien Form auch leichter in verschiedene Körperflüssigkeiten diffundieren kann. Weiterhin wird durch die vollständige Proteinbindung, und im geringeren Ausmaß auch durch die Verteilung in anderen Körperflüssigkeiten, eine verlängerte Halbwertszeit erreicht, da der proteingebundene Anteil der renalen Eliminierung nicht zur Verfügung steht. Die Anreicherung in transzellulären Flüssigkeiten und der hohen Plasmaeiweißbindung erklärt indes auch das hohe Verteilungsvolumen von 5,8 -15,5 Litern (Lamb 2002).

Unter pharmakodynamischen Gesichtspunkten betrachtet, gehört Ceftriaxon wie die anderen β -Laktame und die Makrolide auch, zu den zeitabhängig wirkenden Antibiotika (Perry 2001). Bei einer zeitabhängigen Wirkung muss die Serumkonzentration des Antibiotikums während des gesamten Zeitraums über der jeweiligen minimalen Hemmkonzentration (MHK) des Erregers liegen, um eine sichere Wirkung zu garantieren. Diese Forderung wird bei Ceftriaxon aufgrund seiner gesättigten Proteinbindung und der langen Halbwertszeit auch bei einer täglichen Einmalgabe erreicht.

Aufgrund der oben beschriebenen Eigenschaften findet Ceftriaxon eine vielfältige klinische Anwendung. So ist Ceftriaxon bei schweren Infektionen der Atemwege, im HNO-Bereich, der Nieren und Harnwege, der Haut und Weichteilgeweben, der Geschlechtsorgane, einschließlich *Gonorrhoe*, im Bauchraum, der Knochen und Gelenke, bei Sepsis und Meningitis sowie bei der Lyme-Borreliose indiziert.

Dieses breite Spektrum an Anwendungsmöglichkeiten wird durch eine im Allgemeinen gute Verträglichkeit von Ceftriaxon ergänzt, die, wie bei den anderen β -Laktam-Antibiotika auch, aus der Wirkungsweise und der daraus resultierenden fehlenden Interferenz mit Zielstrukturen im humanen Organismus erklärt werden kann. Als relativ häufige Nebenwirkungen sind ein Anstieg von Leberenzymen im Serum, Reaktionen an der Applikationsstelle (Phlebitis, Thrombophlebitis), zentralnervöse Beschwerden wie Kopfschmerzen und Schwindel, gastrointestinale Störungen und ein Anstieg des Serumkreatinins zu nennen. Als weitere, in der klinischen Anwendung zwar seltene, aber trotzdem relevante Nebenwirkungen sind Inkompatibilitäten mit Ca^{2+} - enthaltenden *Iniektabilia*, eine Nephrotoxizität sowie die bei anderen Antibiotika auch zu beobachtende pseudomembranöse Kolitis aufzuführen (Marquardt 2004; Hurley 2002).

Weiterhin zu beachten ist, wie bei allen anderen β -Laktam-Antibiotika auch, das allergene Potential der β -Laktam-Struktur. Infolge eines nukleophilen Angriffs der Aminogruppe von Proteinen des Plasmas oder der Gefäßwände auf die Cephalosporin-Gruppe kann es zur Bildung einer Cephalosporoyl-Struktur kommen, welche antigene Eigenschaften besitzt (Madaan 2004, Kelkar 2001).

Wie bereits oben beschrieben, eignet sich Ceftriaxon auch zur Behandlung bakterieller Infektionen im Gehirn. Dies beruht auf dem Erreichen relativ hoher Ceftriaxon-Konzentrationen im Liquor. So konnten bei Kindern mit Meningitis nach Applikation von 50-100 mg/kg Ceftriaxon *i.v.* oder *i.m.* Liquorkonzentrationen von 18,3 mg/l vier Stunden nach Applikation und 2,8 mg/l 24 Stunden nach Applikation gemessen werden (Martin 1983).

Bei Patienten mit einer neurologischen Manifestation der Lyme-Borreliose, bei denen die Funktion der Blut-Hirn-Schranke nur unwesentlich eingeschränkt war, wurden nach Gabe von 2 g Ceftriaxon *i.v* maximale Ceftriaxon-Konzentrationen von 2,25 mg/l im Liquor gemessen, welche 24 Stunden nach Applikation auf Werte von 1,36 mg/l abgesunken waren (Pfister 1991).

Für diese, auch über die Zeit deutlich über den MHK-Werten der meisten im ZNS zu findenden bakteriellen Erreger liegenden, Konzentrationen werden zwei Mechanismen verantwortlich gemacht. Zum einem führt die bereits oben beschriebene, schon in normalen Dosierungen gesättigte, Plasmaproteinbindung von Ceftriaxon zu einer hohen Konzentration von freiem, nicht gebundenen und damit ZNS-permeablen Ceftriaxon. Der zweite Mechanismus liegt in der geringen Affinität von Ceftriaxon zu Transportsystemen im *Plexus choroideus*, welche unter anderem für die *Clearance* der Zerebrospinalflüssigkeit von endogenen Metaboliten und Fremdstoffen verantwortlich sind, begründet (Spector 1987). Der Transport von Ceftriaxon von der Blutbahn über die Blut-Hirn-Schranke ins Gehirn erfolgt aufgrund der geringen Lipophilie und der ausgeprägten Ionisation nur langsam, wobei das Antibiotikum über passive Diffusion entlang eines Konzentrationsgradienten parazellulär durch die Blut-Hirn-Schranke gelangt (Lutsar 2000). Durch die hohe Konzentration von nichtproteingebundenen Ceftriaxon wird dabei ein hoher Konzentrationsgradient für die passive Diffusion sichergestellt.

Diese gut untersuchte ZNS-Gängigkeit auch entlang einer intakten Blut-Hirn-Schranke auf der einen Seite und neu beschriebene Effekte auf astrozytäre Glutamattransportsysteme auf der anderen Seite lassen Ceftriaxon mittlerweile auch in den Fokus der Schlaganfallforschung rücken, wobei ein Hauptaugenmerk dabei auf dem astrozytären Glutamattransporter GLT-1 und dessen Beeinflussung durch Ceftriaxon liegt (Lee 2008, Lipski 2007, Rothstein 2005).

1.5. Hypothesen

Wie in der Einleitung beschrieben, führt eine lokale Ischämie im Gehirn zu einem Anstieg der extrazellulären Glutamatkonzentration. Durch einen verstärkten Transports des Glutamats aus dem Extrazellulärraum kann die exzitotoxische Wirkung des Glutamats auf Neurone verringert werden. Durch Rothstein *et al.* ist beschrieben worden, dass Ceftriaxon neuroprotektive Eigenschaften im Gehirn entwickeln kann, welche auf eine Expressionssteigerung des astrozytären Glutamattransporters GLT-1 zurückzuführen seien (Rothstein 2005). Da diese Untersuchungen jedoch im Kontext der amyotrophen Lateralsklerose durchgeführt und diskutiert wurden, soll in dieser Arbeit der Einfluss von Ceftriaxon auf den GLT-1 im Zusammenhang mit dem Schlaganfall untersucht werden.

Somit können folgende Hypothesen für diese Arbeit formuliert werden:

1. Ceftriaxon ist in der Lage, *in vivo* die Expression des GLT-1 zu steigern.
2. Mittels Ceftriaxon kann in einem *in vivo*-Schlaganfallmodell die neurologische Situation nach einem zerebralen ischämischen Ereignis positiv beeinflusst werden.
3. Durch Ceftriaxon kann das aus einem Schlaganfall resultierende Infarktvolume gegenüber einer Kontrolle reduziert werden.
4. Mit Ceftriaxon kann die Überlebensrate nach einem Schlaganfall im Tiermodell erhöht werden.

Ergänzt werden sollen die *in vivo*-Experimente durch *in vitro*-Untersuchungen, für die folgende Hypothesen aufgestellt werden:

5. Ceftriaxon ist in der Lage, in kultivierten Astrozyten die Expression von GLT-1-mRNA zu steigern.
6. Mittels Ceftriaxon kann der zelluläre Gehalt an GLT-1-Protein erhöht werden.
7. Durch Ceftriaxon kann somit *in vitro* eine Erhöhung der Glutamataufnahme in die Astrozyten erreicht werden.

2. Materialien und Methoden

2.1. verwendete Materialien und Geräte

2.1.1. Materialien

2.1.1.1. Chemikalien und Lösungen

Chemikalien, allgemein:

- bei allen Chemikalien: wenn nicht anders angegeben, in *p.a.*-Qualität
- bei allen Lösungen: wenn nicht anders angegeben, *Aqua bidest* als Lösungsmittel

Ammoniumpersulfat	SIGMA, Taufkirchen, D
Bromphenolblau	SIGMA, Taufkirchen, D
Calciumchlorid (CaCl ₂)	SIGMA, Taufkirchen, D
Dimethylsulfoxid (DMSO)	SIGMA, Taufkirchen, D
Dithiothreitol (DTT)	SIGMA, Taufkirchen, D
Ethylendiamino-N,N,N',N'- tetraessigsäure (EDTA)	SIGMA, Taufkirchen, D
Ethylenglykol-bis(aminoethylether) -N,N'-tetraessigsäure (EGTA)	SIGMA, Taufkirchen, D
Ethanol (70% v/v)	Mallinckrodt Baker, Deventer, NL
<i>para</i> -Formaldehyd	SIGMA, Taufkirchen, D
Glutaraldehyd-Lösung (25% m/v)	SIGMA, Taufkirchen, D
Glycerol	Roth, Karlsruhe, D
Glycin	Roth, Karlsruhe, D
Essigsäure	Merck, Darmstadt, D
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt, D
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Roth, Karlsruhe, D
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Aldrich, Steinheim D
Methanol	Mallinckrodt Baker, Deventer, NL
Milchpulver	Roth, Karlsruhe, D
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt, D
Natriumdeoxycholat	SIGMA, Taufkirchen, D
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva, Heidelberg, D

Natriumfluorid (NaF)	SIGMA, Taufkirchen, D
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt, D
Polyethylenglykol 6000/8000 (PEG 6000/8000)	SIGMA, Taufkirchen, D
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt, D
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris) als Tris-Base und Tris-HCl	SIGMA, Taufkirchen, D
Triton X-100	FLUKA, Buchs, CH
Tween 20	SIGMA, Taufkirchen, D)

Chemikalien für die *in vivo*-Versuche

Buprenorphin (<i>Temgesic</i>)	essex pharma, München, D
Chloralhydrat	SIGMA, Taufkirchen, D
Isofluran (<i>Forene</i>)	Abbot, Wiesbaden, D
Sauerstoff, medizinisch	Hausversorgung

Medien, Zusätze und Lösungen für die Zellkultur

Alpha MEM Eagle Medium	PAN Biotech, Aidenbach, D
Bovines Serum-Albumin (BSA)	SIGMA, Taufkirchen, D
Na-N ⁶ ,2'-O-Dibutyryl-3',5'-zyklisches Adenosin-monophosphat (dbcAMP)	SIGMA, Taufkirchen, D
Fetales Kälberserum (FCS)	PAN Biotech, Aidenbach, D
Gentamycinsulfat-Lösung (10mg/ml)	PAN, Aidenbach, D
D-(+)-Glucose-Lösung (10% m/v)	SIGMA, Taufkirchen, D
<i>Hank's</i> Salzlösung (HBSS)	SIGMA, Taufkirchen, D
LB-Agar; Miller	Beckton Dickenson, Sparks, USA
LB-Broth; Miller	Beckton Dickenson, Sparks, USA
Opti-MEM Medium	Invitrogen, Karlsruhe, D
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS)	PAN Biotech, Aidenbach, D
Ceftriaxon-Dinatrium·3,5H ₂ O (<i>Rocephin</i>)	Hoffmann-La Roche, Grenzach-Wyhlen, D
Ceftriaxon-Dinatrium	SIGMA, Taufkirchen, D
Trypsin/EDTA (0,25% w/v / 0,5 mM)	PAN Biotech, Aidenbach, D

Chemikalien und Lösungen für die Proteinanalytik

Acrylamid/Bis-Lösung (30% w/v)	Serva, Heidelberg, D
Complete Mini-Protease-Inhibitor-Lösung	Roche Diagnostics, Mannheim, D
PageRuler Prestained Protein Ladder	Fermentas, St.Leon-Rot, D
Ponceau-S-Lösung	SIGMA, Taufkirchen, D
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	SIGMA, Taufkirchen, D
ECL Western Blotting - Detection Reagents	Amersham, Little Chalfont, UK

Chemikalien und Lösungen für die Nukleotidanalytik

Ampicillin	SIGMA, Taufkirchen, D
Desoxynukleosid-Triphosphate (dNTP)	Promega, Mannheim, D
Ethidiumbromid (1% m/v)	Roth, Karlsruhe, D
GeneRuler 100 bp DNA Ladder	Fermentas, St.Leon-Rot, D
GeneRuler 1 kb DNA Ladder	Fermentas, St.Leon-Rot, D
Glycerol	Roth, Karlsruhe, D
MgCl ₂ (50 mM)	Promega, Mannheim, D
5x M-MLV-Puffer	Promega, Mannheim, D
NP40 (10% (v/v))	SIGMA, Taufkirchen, D
Orange G	Roth, Karlsruhe, D
PCR-Puffer	Promega, Mannheim, D
10x PCR-Puffer	Promega, Mannheim, D
ROX	Invitrogen, Karlsruhe, D
SYBR Green RT-PCR Mastermix	Applied Biosystems, Darmstadt, D
Transfektions-Reagenz FuGENE 6	Roche Diagnostics, Mannheim, D
Transfektions-Reagenz GeneJuice	Merck, Darmstadt, D
TRIzol Reagenz	Invitrogen, Karlsruhe, D
Wasser (Ultra-Pure)	PAN Biotech, Aidenbach, D

Chemikalien und Lösungen für die Immunzytofluoreszenzchemie

4',6'-Diamino-2-phenylindol·HCl (DAPI) Invitrogen, Karlsruhe, D
 Fluorescent Mounting Medium DAKO, Glostrup, DK

Chemikalien für die Bestimmung der Transporteraktivität

L-[G-³H] Glutaminsäure
 (250 µCi; 1,0 mCi/ml; 52,0 Ci/mmol) Amersham, Little Chalfont, UK

2.1.1.2. Puffer und Lösungen

Puffer und Lösungen für die Proteinanalytik

1x RIPA-Puffer/ Proteinlysepuffer:	4 M NaCl	3,5 ml
	1 M Tris pH 8,0	1 ml
	10% SDS	1 ml
	Triton X-100	1 ml
	Natriumdeoxycholat	0,1 g
	250 mM EDTA pH 7,4	400 µl
	250 mM EGTA pH 8,0	400 µl
	200 mM Na ₃ VO ₄	500 µl
	200 mM NaF	500 µl
	H ₂ O _{bidest}	ad 100 ml

vor Gebrauch 10 ml 1x RIPA-Puffer mit 1 Tablette
 Complete Mini-Protease-Inhibitor versetzen

4x Trenngelpuffer:	Tris-Base	36,3 g
(1,5 M Tris-Base, pH 8,8)	H ₂ O _{bidest}	ad 200 ml
	HCl	ad pH 8,8

4x Sammelgelpuffer:	Tris-Base	3,0 g
(0,5 M Tris-Base, pH 6,8)	H ₂ O _{bidest}	ad 50 ml
	HCl	ad pH 6,8

1x Elektrophoresepuffer:	Tris Base	3,03 g
	Glycin	14,4 g
	10 % SDS	10 ml
	H ₂ O _{bidest}	ad 1000 ml

Materialien und Methoden

6x Probenpuffer:	1 M Tris-HCl pH 6,8 SDS Glycerol DTT Bromphenolblau 2%	7 ml 1 g 3 ml 0,93 g 60 µl
<i>Towbin</i> -Puffer (Nass-Blot Puffer):	Tris-Base Glycin 10% SDS Methanol H ₂ O _{bidest}	3,03 g 14,4 g 5 ml 200 ml <i>ad</i> 1000 ml
10x TBS:	Tris (Base) NaCl H ₂ O _{bidest} HCl	24,2 g 80 g <i>ad</i> 1000 ml <i>ad</i> pH 7,6
1x TBS-T:	10x TBS Tween 20 H ₂ O _{bidest}	100 ml 1 ml <i>ad</i> 1000 ml
Block-Puffer:	10x TBS Tween 20 Milchpulver H ₂ O _{bidest}	10 ml 100 µl 2 g <i>ad</i> 100 ml
	<i>rec.par.</i>	
Antikörper-Puffer:	10x TBS H ₂ O _{bidest} Tween 20 Milchpulver	1 ml 9 ml 5 µl 0,5 g
	<i>rec.par.</i>	
Strip-Lösung:	Glycin HCl	100 mM <i>ad</i> pH 2,8

Puffer und Lösungen für die Nukleotidanalytik

50x TAE-Puffer: (Tris-Acetat-EDTA)	Tris-HCl	40 mM
	Na-Acetat	5 mM
	EDTA	1 mM
	H ₂ O _{bidest}	<i>ad</i> 1000 ml
	Essigsäure	<i>ad</i> pH 8,0

TBE-Puffer: (Tris-Borat-EDTA)	Tris	89 mM
	Borsäure	89 mM
	EDTA	2 mM
	H ₂ O _{bidest}	<i>ad</i> 1000 ml
	HCl / NaOH	<i>ad</i> pH 8,0

Ladepuffer:	Glycerol	10% v/v
	Orange G	0,01% v/v
	in H ₂ O (Ultra-Pure)	

TSB:	DMSO	5% v/v
	MgSO ₄	10 mM
	MgCl ₂	10 mM
	PEG 6000/8000	10% w/v
		in LB-Medium

5x KCM: (Transformationsmix)	KCl	500 mM
	CaCl ₂	150 mM
	MgCl ₂	250 mM
		in H ₂ O _{bidest}

Lösungen für die Bestimmung der Transporteraktivität

Inkubationspuffer:	NaCl	125 mM
	KCl	4,5 mM
	CaCl ₂	1,2 mM
	MgCl ₂ ·6H ₂ O	1,2 mM
	Glucose	5 mM
		in H ₂ O _{bidest}

2.1.1.3. Primer und Vektoren

Random Hexamer Primer	Promega, Mannheim, D
Gen-spezifische Primer:	SIGMA, Taufkirchen, D

18S-rRNA

forward	5'-CCG CAG CTA GGA ATA ATG GAA TA-3'
reverse	5'-TCT AGC GGC GCA ATA CGA CGA AT-3'

GLT-1

forward	5'- AGC CAT CTT CAT AGC CCA GA-3'
reverse	5'- ATA CTG GCT GCA CCA ATG CT-3'

Klonierungs-Primer für GLT-1 Promotor: SIGMA, Taufkirchen, D

forward	5'- GAGGAG GTCGAG GTTGGTGGAAGAGATACGTCT TC-3'
reverse	5'- GAGGAG AAGCTT CATGGCGTGGGGAACGCCCCCTCCTCC-3'

Luciferase Reporter Vektor pGL3basic	Promega, Mannheim, D
<i>Renilla</i> -Luciferase Vektor phRL	Promega, Mannheim, D
<i>Endogenous Green Fluorescent Protein</i> Vektor pEGFP-N1	Clontech, Mountain View, USA

2.1.1.4. Enzyme

RNasin	Promega, Mannheim, D
T4 DNA-Ligase mit Puffer	Fermentas, St.Leon-Rot, D
M-MLV Reverse Transkriptase	Promega, Mannheim, D
Taq-Polymerase	Invitak, Berlin, D
Restriktions-Endonukleasen XhoI/HindIII	Fermentas, St.Leon-Rot, D
Restriktionspuffer Buffer R	Fermentas, St.Leon-Rot, D

2.1.1.5. Antikörper

Mouse anti-GAPDH IgG	Chemicon, Temecula, USA
Rabbit anti-GFAP IgG	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
Mouse anti-GFAP IgG	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Rabbit anti-GLT1/EAAT2 IgG	Alpha Diagnostic, San Antonio, USA
Goat anti-GLT1/EAAT2 IgG	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
ECL sheep anti-mouse IgG, Horseradish-Peroxidase linked whole antibody	Amersham, Little Chalfont, UK
Rabbit Anti-Goat Immunoglobulins/HRP	DAKO, Glostrup, DK
Swine Anti-Rabbit IgG/HRP	DAKO, Glostrup, DK
Cy3-conjugated Donkey anti-Mouse IgG	Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA
Fluorescein (FITC)-conjugated Donkey anti-Rabbit IgG	Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA

2.1.1.6. Kits

Kits für die Proteinanalytik

BCA Protein Assay Reagent Kit	Perbio Science, Bonn, D
-------------------------------	-------------------------

Kits für die Nukleotidanalytik

Dual-Luciferase Reporter Assay	Promega, Mannheim, D
NucleoSpin Extract II	Macherey-Nagel, Düren, D
NucleoSpin Plasmid Quick Pure	Macherey-Nagel, Düren, D
StrataPrepR PCR Purification Kit	Stratagene, La Jolla, USA

2.1.1.7. Prokaryonten

<i>Escherichia coli</i> , XL1-Blue	Stratagene, La Jolla, USA
------------------------------------	---------------------------

2.1.1.8. Eukaryonten

<i>Rattus norvegicus</i> , HsdCpb: WU	Harlan Winkelmann, Borcheln, D
---------------------------------------	--------------------------------

2.1.1.9. Verbrauchsmaterialien und Glasgeräte

Verbrauchsmaterialien wie Pipetten, Pipettenspitzen, Eppendorfgefäße etc. sowie Glasgeräte wurden über den zentralen Einkauf der Charité bestellt und geliefert.

Materialien für die *in vivo*-Versuche

Nahtmaterial Ethilon, nicht resorbierbar, monofil, 4-0	Ethicon, Norderstedt, D
Nahtmaterial Prolene, nicht resorbierbar, monofil, 4-0	Ethicon, Norderstedt, D
Bosworth Trim Allzweckkunststoff	Bosworth, Skokie, USA

Materialien für die Zellkultur

Lab-Tek ChamberSlides	Nunc, Wiesbaden, D
Filtereinheit FP30/0.2 CA-S	Whatman, Dassel, D
Spritzen Omnifix	Braun Melsungen, Melsungen, D
Kanülen Sterican	Braun Melsungen, Melsungen, D
CryoTube Kryoröhrchen	Nunc, Roskilde, DK
Verbrauchsmaterialien für die Zellkultur	Sarstedt, Nümbrecht, D Nunc, Wiesbaden, D Beckton Dickinson, Le Pont De Claix, F Eppendorf, Hamburg, D Whatman, Dassel, D

Materialien für die Proteinanalytik

Hyperfilm ECL Chemilumineszenz-Film	Amersham, Little Chalfont, UK
Whatman Filterpapier	Whatman, Brentford, UK
Hybond-C extra Blotting-Membran	Amersham, Little Chalfont, UK

Materialien für die Nukleotidanalytik

96-well Multiply PCR-Platten	Sarstedt, Nümbrecht, D
Klebefolie, optisch klar	Sarstedt, Nümbrecht, D
PCR Tubes und Caps	Biozym, Hessisch Oldendorf, D

Materialien für die Bestimmung der Transporteraktivität

MicroBeta Minivial 4ml	PerkinElmer, Waltham, USA
OptiPhase Supermix Szintillationsflüssigkeit	Wallac, Turku, FI

2.1.2. Geräte

Geräte, allgemein

Analysenwaage BL 310	Sartorius, Göttingen, D
Analysenwaage BL 150S	Sartorius, Göttingen, D
Magnetrührer RET basic C	IKA-Werke, Staufen, D
pH-Meter pH 211	Hanna Instruments, Woonsocket, USA
pH-meter pH 340	WTW, Weilheim, D
Pipettierhilfe pippetus-akku	Hirschmann, Eberstadt, D
Präzisionswaage SC2	Sartorius, Göttingen, D
Schüttelgerät Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Bohema, USA
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, D
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, D
Zentrifuge Micro 20	Hettich, Tuttlingen, D
Wasserbad WB14	Memmert, Schwabach, D
Zentrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg, D

Geräte für die *in vivo*-Versuche

<i>monitoring</i> -System 1025 (MR-kompatibel)	SA Instruments, Stony Brook, USA
PharmaScan 70/16 MRT-Gerät	Bruker Biospin, Ettlingen, D (Standort: NWFZ Berlin)
Analyze 5.0 Visualisations- und Analysen-Software	AnalyzeDirect, Overland Park, USA
PeriFlux System 5000 zur Laser-Doppler-basierten Durchflussmessung	Perimed, Järfälla, SE
Heizmatten	Anfertigung von Bettina Roeder, CCR Berlin, D
Isofluran-Verdampfer	Völker, Kaltenkirchen, D
Radiometer ABL 555 zur Blutgasanalyse	Radiometer medical, Kopenhagen, DK

Geräte für die Zellkultur

CO ₂ -Inkubator HERACell 150	Kendro, Langenselbold, D
Mikroskop DM IL	Leica, Wetzlar, D
Pipettierhilfe pippetus-akku	Hirschmann, Eberstadt, D
Sicherheitswerkbank Safe2010	Heto-Holten, Allerød, DK
Vakuumsaugpumpe	KNF Neuberger, Freiburg, D
Wasserbad WB14	Memmert, Schwabach, D
Zentrifuge 32R	Hettich, Tuttlingen, D

Geräte für die Proteinanalytik

Film-Entwicklungsautomat Curix 60	Agfa, Köln, D
Horizontalschüttler HS 260	IKA-Werke, Staufen, D
Mini-Protean 3 System für <i>Western blot</i>	Bio-Rad, Hercules, USA
Naßblott-Kammer	Bio-Rad, Hercules, USA
Netzteil Power Pack 200	Bio-Rad, Hercules, USA
Rotator Stuart SB3	Barloworld Scientific, Stone, UK
Schüttelgerät Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Bohema, USA
Spektrophotometer SmartSpec 3000	Bio-Rad, Hercules, USA
Zentrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg, D
Ultraschall-Homogenisator Bandelin Sonoplus HD2070	Bandelin, Berlin, D
Rollenmischgerät RM5	Karl Hecht, Sondheim, D

Geräte für die Nukleotidanalytik

Elektrophoresekammer 250 EX	Whatman, Brentford, UK
Elektrophorese-System Midi/Maxi	Harnischmacher, Kassel, D
Gel-Dokumentations-System ChemiDoc	Bio-Rad, Hercules, USA
Luminometer Monolight 3010	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
<i>Real-time</i> PCR-System Mx3000P	Stratagene, La Jolla, USA
PCR-Cycler iCycler	Bio-Rad, Hercules, USA
Spektrophotometer DU 530	Beckman, Fullerton, USA
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, D
Zentrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg, D

Inkubationsschüttler Unitron

Infors HAT, Bottmingen, CH

Geräte für die Immunzytofluoreszenzchemie

Fluoreszenzmikroskop DM IRE2

Leica, Wetzlar, D

Software Openlab 3.1.7.

Improvision, Coventry, UK

Geräte für die Bestimmung der Transporteraktivität

MicroBeta Trilux Flüssigszintillations-
und Lumineszenzzähler

PerkinElmer, Waltham, USA

2.2. Methoden

2.2.1. Methoden der *in vivo*-Versuche

Haltung und Pflege der Ratten

Die Haltung der Ratten erfolgte mit Genehmigung und unter Aufsicht des Landesamtes für Gesundheit und Soziales (LaGeSo) Berlin in der tierexperimentellen Einrichtung des *Center for Cardiovascular Research (CCR)* der Charité Universitätsmedizin Berlin.

Die Ratten wurden mit einem Gewicht von 180-200 g vom Lieferanten bezogen und unter standardisierten Bedingungen (22°C, 55% absolute Luftfeuchtigkeit, 4-5 Tiere/Käfig, 12-Stunden-Rhythmus sowie freier Zugang zu Einheitsfutter und Wasser) in keimarmen (*special pathogen free-SPF*) Umgebung gehalten.

Behandlung der Ratten mit Ceftriaxon

Unter Berücksichtigung der Adaptationszeiten wurde mit der Behandlung der Tiere frühestens 5-7 Tage nach Eingang in der tierexperimentellen Einrichtung begonnen.

Das Ceftriaxon wurde in einer Dosierung entsprechend des Körpergewichts (KG) des jeweiligen Tieres gegeben, die NaCl-Lösung in einem Volumen, welches dem bei anderen Tieren applizierten Volumen der Ceftriaxon-Lösung entsprach.

Mittels randomisierter Einteilung wurden die Tiere fünf verschiedenen Behandlungsgruppen zugeordnet: Vehikel + MCAO; Ceftriaxon prä-OP + MCAO; Ceftriaxon post-OP + MCAO; Vehikel + *Sham* OP, Ceftriaxon + *Sham* (Schein)-OP.

Die Ceftriaxon-Dosierungen sowie das Behandlungsregime entsprechend den Vorgaben von Rothstein *et al.* (Rothstein 2005) übernommen.

Den Tieren der Ceftriaxon-Gruppe wurden einmal täglich 200 mg/kg KG Ceftriaxon *i.p.* appliziert, wobei die Behandlung bei den Tieren der Gruppen Ceftriaxon prä-OP + MCAO und Ceftriaxon + *Sham* (Schein)-OP fünf Tage vor dem MCAO-Eingriff beziehungsweise dem Schein-Eingriff begonnen wurde, während den Tieren der Gruppe Ceftriaxon post-OP + MCAO einmalig 90 Minuten nach MCAO eine Ceftriaxon-Dosis von 200 mg/kg KG *i.p.* appliziert wurde. In der Gruppe der Vehikel-Behandlungen erhielten die Tiere einmal täglich *intraperitoneal* ein Volumen an isotoner NaCl-Lösung appliziert, welches dem Volumen der in den Ceftriaxon-Gruppen applizierten Ceftriaxon-Lösung adäquat war.

Induktion des Schlaganfalls mittels *middle cerebral artery occlusion* (MCAO) im Tiermodell und Messung des zerebralen Blutflusses mittels Laser-Doppler-Messung

Alle tierexperimentellen Arbeiten zur Induktion eines Schlaganfalls in der Ratte wurden durch das genehmigte Versuchsvorhaben G0088/04 beim Landesamt für Gesundheit und Soziales (LaGeSo) Berlin angezeigt.

Die operativen Tätigkeiten wurden von Maxim Krikov aus der Arbeitsgruppe Unger, *Center for Cardiovascular Research*, Campus Charité Mitte durchgeführt.

Zur Induktion eines Schlaganfalls in der Ratte wurde die *middle cerebral artery occlusion* (MCAO) verwendet. Bei dieser Methode, die das Geschehen eines vorübergehenden „Media-Infarktes“ beim Menschen gut simulieren kann, wird die rechte *Arteria cerebri media* der Tiere temporär verschlossen, wobei nach Entfernen der Okklusion eine Reperfusion des ischämischen Gebietes erfolgen kann (Li 2005; Groth 2003; Dai 1999; Belayev 1996; Longa 1989).

Nach Narkotisieren der Tiere mit Chloralhydrat (400 mg/kg KG *i.p.*) und dem Lagern auf Heizmatten wurde die rechte *Arteria carotis communis* inklusive der beiden Hauptäste freigelegt. Nach Ligation der *Arteria carotis externa* erfolgte eine stumpfe Präparation der *Arteria carotis interna* bis zur *Bifurcatio carotidis* sowie eine Eröffnung der *Arteria carotis communis* mittels einer Mikroschere. In die eröffnete *Arteria carotis communis* wurde ein monofiler Faden der Größe 4,0 etwa 1,8 mm nach kranial in die *Arteria carotis interna* geschoben und dort mittels einer lockeren Ligatur kurz oberhalb der *Bifurcatio carotidis* fixiert. Durch diesen in die *Arteria carotis interna* platzierten Faden ist ein Verschluss der *Arteria cerebri media* gewährleistet. Die Blutversorgung im Bereich der Versorgungsgebiete der *Arteria carotis externa* bleibt trotz der bestehenden Ligation durch Kollateralen gewährleistet, so dass der Verschluss über den gesamten Zeitraum der MCAO bestehen bleiben kann.

Durch Freilegen der Schädeldecke im Bereich des Versorgungsgebietes der *Arteria cerebri media* sowie dem Fixieren des Messkopfes mittels Kunststoff konnte über Laser-Doppler-Flußmessung die Reduktion des Blutflusses im Bereich der *Arteria cerebri media* verfolgt werden.

Nach 90 Minuten wurden der Faden in der *Arteria carotis interna* sowie die Ligaturen an der *Arteria carotis communis* und *Arteria carotis externa* wieder entfernt, so dass eine Reperfusion der betreffenden Areale erfolgen konnte.

Bei den Sham (Schein-)operierten Tieren erfolgte lediglich eine Präparation der Gefäße, wobei auf das Platzieren des Fadens in der *Arteria carotis interna* verzichtet wurde.

Die Wunden wurden im Anschluss chirurgisch verschlossen und die Tiere bis zum Erwachen aus der Narkose auf Heizmatten gelagert. Zur postoperativen Schmerzprophylaxe wurde den Tieren nach dem Eingriff Buprenorphin (0,2 mg/kg KG *s.c.*) appliziert.

Darstellung der zerebralen Gefäße vor, während und nach der *middle cerebral artery occlusion* (MCAO) in Ratten

Zur Darstellung der zerebralen Gefäße vor, während und nach einer MCAO wurde ein sich am Neurowissenschaftlichen Forschungszentrum am Campus Charité Mitte befindlicher 7-T-Kleintier-Magnetresonanztomograph (Kleintier-MRT) verwendet. Diese Untersuchungen wurden, ebenso wie die später beschriebenen Messungen des intrazerebralen Schadens nach MCAO, durch Susanne Müller von der Arbeitsgruppe Prof. Villringer unterstützt.

Diese Untersuchung wurde, im Gegensatz zur Laser-Doppler-gestützten Messung des zerebralen Blutflusses, nur an einer kleinen Anzahl von Tieren angewendet und diente der Visualisierung der durch MCAO veränderten Durchblutungsverhältnisse im Gehirn.

Peri-operative Messung verschiedener klinisch-chemischer Parameter im gemischt-venösen Blut

Zur peri-operativen Bewertung einzelner Stoffwechselfparameter wurde den Ratten während des MCAO-Eingriffs mittels eines angespitzten Kapillarröhrchens aus dem retrobulbären Venenplexus Blut abgenommen, welches von einem Blutgasanalyse-Automaten auf die Parameter Sauerstoffpartialdruck (paO_2), Kohlendioxidpartialdruck (paCO_2), pH-Wert, Glucosekonzentration ([Glucose]), Hämatokrit (Hk), Na^+ -Konzentration ($[\text{Na}^+]$) und K^+ -Konzentration ($[\text{K}^+]$) hin untersucht wurde.

Messung der neurologischen Parameter

Zur Messung des neurologischen Schadens der Tiere nach MCAO wurde eine Bewertungsskala verwendet, bei der der Untersucher, welcher bezüglich der Gruppeneinteilung verblindet wurde, eine Erhebung der folgenden Parameter durchführt und mit einem Rangwert von 3 (ohne Einschränkungen) bis 0 (Ausfall) bewertet: Spontanaktivität; Symmetrie der Bewegung der vier Gliedmaßen; Ausstrecken der Vorderpfoten; Klettern an einem Stahlgitter; Propriozeption und Reaktion auf Berührung der Tasthaare. Per Definition

können gesunde Tiere einen maximalen Summenwert von 18 erzielen, während der Minimalwert nicht unter 2 sinken kann (Garcia 1995).

Messung der hirnorganischen Schädigung mittels Magnetresonanztomographie (MRT)

Das Messen und Bewerten der hirnorganischen Schädigung erfolgte nichtinvasiv mittels der der Magnetresonanztomographie. Dazu wurden die Tiere unter Isofluran-Narkose und Lagerung auf einer Wärme- und Überwachungsmatte mittels des MRT-Schlittens in die 38 mm-Volumenspule des 7-Tesla (7-T)-MRT-Gerätes verbracht. Unter Verwendung einer T2-gewichteten, 2D Turbo-Spin-Echo Sequenz mit Fettunterdrückung wurden 35 axiale Schnitte mit einer jeweiligen Schnittdicke von 0,5 mm aufgenommen und Volumen der hyperintens erscheinenden, ödematösen Regionen mittels der in der Auswerteeinheit integrierten Software (Analyze 5.0) kalkuliert.

Hirnentnahme und Präparation separater Hirnareale

Bei Tieren, die für 5 Tage mit 200 mg/kg KG Ceftriaxon *i.p.* behandelt wurden und die nicht einem MCAO-Eingriff unterzogen wurden, erfolgte eine Hirnentnahme nach folgender Prozedur. Nach Dekapitation ohne vorherige Narkose wurde der Schädel, wie unter 2.2.5. beschrieben, eröffnet, das Hirn entnommen und unverzüglich in Trockeneis eingefroren. Die Präparation von Hippocampus, Stammhirn, Amygdala, Striatum, Hypothalamus und frontalem Cortex erfolgte nach den Vorgaben aus einem Atlas des Rattengehirns (Paxinos 1996) auf einer gekühlten Arbeitsfläche mit ebenfalls gekühltem Präparationsbesteck. Die einzelnen Hirnareale wurden nach der Präparation unverzüglich auf Trockeneis verbracht und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

2.2.2. Methoden der Zellkultur

Alle Arbeiten mit Zellen erfolgten unter keimarmen Bedingungen in einer entsprechend ausgestatteten Sicherheitswerkbank.

Bereiten des Zellkulturmediums

Zu 450 ml Alpha-MEM werden 50 ml FCS und 5 ml einer Lösung von Gentamycinsulfat (10 mg/ml) gegeben und gemischt.

Gewinnung und Kultivierung primärer Astrozyten der Ratte

Alle Organentnahmen zur Gewinnung primärer Astrozyten aus der Ratte wurden durch die Tötungsanzeige T0059/05 beim Landesamt für Gesundheit und Soziales (LaGeSo) Berlin angezeigt.

Das Protokoll orientiert sich an einer Methode zur Gewinnung humaner Astrozyten (De Groot 1997).

Ratten im Alter von 1-3 Tagen wurden durch Dekapitation getötet und das Gehirn steril entnommen, indem der Schädel mittels einer kleinen, spitzen Schere vom *Foramen magnum* entlang der *Sutture sagittalis* nach rostral geöffnet wurde. Bei dieser Prozedur ist streng darauf zu achten, dass das darunter liegende Gewebe nicht verletzt wird. Danach wurde das Kleinhirn und das Mittelhirn vom Großhirn getrennt, wobei das Großhirn von den anhaftenden Meningen befreit und bis zur weiteren Verarbeitung in einem Falcon-Gefäß (50 ml) mit eiskaltem Kulturmedium (Alpha-MEM mit 10% FCS und 100 µg/ml Gentamycinsulfat) aufbewahrt wurde.

Alle weiteren Arbeiten erfolgten unter Beachtung steriler Kautelen in der Sicherheitswerkbank. Von den entnommenen Hirnteilen wurde das Medium vorsichtig abgesaugt, das Hirngewebe einmal mit eiskaltem PBS gewaschen und durch eine Lösung, bestehend aus 20 ml HBSS, 3 ml Glucose-Lösung und 0,5 ml Trypsin/EDTA-Lösung ersetzt. Anschließend wurden die Fragmente in der Lösung durch das mehrmalige Aufziehen in Pipetten suspendiert, wobei die Lumina der Pipetten mit jedem Suspensierungsschritt verringert wurden. Eine optimale Zerkleinerung konnte mit einem letztmaligen Aufziehen der Fragmente durch eine Pasteurpipette erreicht werden. Die so erhaltene Suspension wurde anschließend bei 37°C für 30 Minuten im Wasserbad inkubiert.

Nach der Inkubation erfolgte eine Zentrifugation des Gemisches bei 25°C und 1500 rpm für 5 Minuten. Danach wurde der Überstand abgesaugt, das Pellet mit 15 ml Kulturmedium resuspendiert, diese Suspension in eine T75-Zellkulturflasche gegeben und bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach 24 Stunden wurde mikroskopisch kontrolliert, ob sich Gewebsfragmente am Boden der Flasche abgesetzt haben und ob aus diesen Gewebsstücken erste Astrozyten wachsen. War dies der Fall, wurde vorsichtig die Hälfte der Kulturmediums abgesaugt und durch frisches Kulturmedium ersetzt. Haben sich zu diesem Zeitpunkt noch keine Zellausläufer aus den Gewebsstücken gebildet, wurde mit dem Mediumwechsel noch weitere 24 Stunden gewartet.

In jedem Fall erfolgte ein kompletter Mediumwechsel frühestens drei Tage nach der Präparation. Die Kultivierung wurde bis zur vollständigen Konfluenz fortgesetzt. Danach konnten die Zellen in neue Zellkulturgefäße umgesetzt werden.

Umsetzen der Zellen

Zum Umsetzen wurden die Zellen nach Absaugen des Zellkulturmediums einmalig mit einer ausreichenden Menge warmen PBS gewaschen und dann mit 1-2 ml Trypsin/EDTA-Lösung versetzt. Nach vollständiger Benetzung des Zellrasens mit der Trypsin/EDTA-Lösung wurde der Verlauf des Ablöses der Zellen mikroskopisch beobachtet. Bei beginnenden Ablösen der Zellen konnte die Trypsin/EDTA-Lösung abgesaugt werden. Im Anschluss daran wurde die Zellkulturflasche für ca. 5 Minuten bei 37°C im Inkubator gelagert. Danach konnte durch sanftes Schlagen gegen die Flasche der Zellrasen soweit gelöst werden, dass die Zellen problemlos mit einer entsprechenden Menge Zellkulturmedium abgespült und suspendiert werden konnten.

Die so gewonnene Zellsuspension wurde nach entsprechendem Verdünnen mit Medium, gemäß den experimentellen Anforderungen, auf die benötigten Zellkulturgefäße verteilt.

Einfrieren der Zellen

Bei Präparation größerer Mengen an primären Astrozyten konnte der nicht benötigte Teil aliquotiert und eingefroren werden, wobei die Zellen in einer T175-Kulturflasche im konfluenten Stadium in der Regel auf zwei Aliquote mit je 1 ml aufgeteilt wurden.

Zum Einfrieren wurden die Zellen, sobald sie das konfluente Stadium erreicht haben, wie in den Vorgaben zum Umsetzen der Zellen beschrieben, vom Zellkulturgefäß abgelöst. Die gewonnene Zellsuspension wurde dann bei 25°C und 1000 rpm für 3 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet mit Einfriermedium, bestehend aus Alpha-MEM mit 10% DMSO und 20% FCS, resuspendiert und in Kryoröhrchen zu jeweils 1 ml aliquotiert. Diese wurden sofort bei -80°C für 24 Stunden gelagert und danach in einen Vorratstank mit flüssigem Stickstoff überführt.

Auftauen der Zellen

Zum Auftauen der Zellen wurde der Inhalt zweier Kryoröhrchen mit jeweils 1 ml Zellsuspension in einer T75-Kulturflasche in Kultur gebracht.

Vor dem Auftauen wurde durch Zugabe von FCS die Serumkonzentration in einer definierten Menge Zellkulturmedium von 10% auf 20% erhöht. Pro Kryoröhrchen wurden 10 ml dieses Hochserum-Zellkulturmediums mit einer Temperatur von 37°C vorgelegt.

Nach Entnahme der Kryoröhrchen aus dem flüssigen Stickstoff wurden diese einzeln im Wasserbad bei 37°C unter leichtem Schütteln aufgetaut. Sofort nach dem Auftauen wurde die Zellsuspension tropfenweise in das vorgelegte Hochserum-Zellkulturmedium pipettiert und danach bei 25°C und 1000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde verworfen, während das entstandene Zellpellet in Zellkulturmedium mit einem Anteil von 20% FCS resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt wurde. Wenn sich nach 24 Stunden bei mikroskopischer Betrachtung eine Adhäsion der Zellen am Flaschenboden zeigte, wurde die Hälfte des Mediums abgesaugt und durch frisches Zellkulturmedium ersetzt. Zeigte sich dagegen keine oder nur eine geringe Adhäsion, wurde mit dem Mediumwechsel noch weitere 24 Stunden gewartet. Nach 72 Stunden erfolgte in jedem Fall ein kompletter Mediumwechsel.

Behandeln der Astrozyten mit Ceftriaxon

Zum Behandeln der Zellen wurde das als *Rocephin* im Handel erhältliche Ceftriaxon-Dinatrium·3,5H₂O (M_R: 661,6 g/mol) verwendet. Dazu wurde unter normalen Laborbedingungen eine definierte Menge Ceftriaxon eingewogen, im mitgelieferten *Aqua ad iniectabilia* gelöst, diese Lösung dann unter sterilen Bedingungen in einer Sicherheitswerkbank sterilfiltriert und als Stammlösung zum Verdünnen in 0,9% NaCl bis zur gewünschten Konzentration verwendet. Für Konzentrationen von 1 mM - 100 µM wurde eine Stammlösung von 10 mM verwendet, für Konzentrationen von 10 µM - 1 µM wurde eine Stammlösung von 100 µM verwendet. Im Allgemeinen wurden für eine 10 mM-Stammlösung 6,616 mg *Rocephin* in 1 ml Lösungsmittel gelöst. Mit dieser Stammlösung konnte dann auch die 100 µM-Stammlösung hergestellt werden. Um Wirkverluste durch Abbau des Ceftriaxons im Zellkulturmedium so gering wie möglich zu halten, wurde das mit Ceftriaxon versehene Zellkulturmedium nicht länger als 48 Stunden auf den Zellen belassen und dann gegen neues Medium ausgetauscht.

Um das *Rocephin* mit einem nur für Laboruntersuchungen verwendetem Ceftriaxon von SIGMA vergleichen zu können, welches aufgrund als Ceftriaxon-Dinatrium ein verändertes Molekulargewicht (M_R: 598,6 g/mol) aufweist, wurden die Einwaagen entsprechend des veränderten Molekulargewichts angepasst, um äquimolare Konzentrationen an Ceftriaxon zu erreichen.

Behandeln der Astrozyten mit dbcAMP

Zum Behandeln der Zellen mit dbcAMP wurde eine definierte Menge dbcAMP unter Laborbedingungen eingewogen, mit Wasser für Injektionszwecke zu einer Stammlösung der dbcAMP-Konzentration von 20 mg/ml gelöst, sterilfiltriert und dann in entsprechender Verdünnung zu den Zellen gegeben, wobei die dbcAMP-Lösung jedes Mal frisch angesetzt wurde.

Die Stammlösung mit einer Konzentration von 20 mg/ml wurde in einer 1:100-Verdünnung zu den Zellen gegeben. Simultan zur Behandlung der Zellen mit Ceftriaxon wurde auch hier nach jeweils 48 Stunden das alte Zellkulturmedium abgesaugt und gegen neues, dbcAMP-haltiges Zellkulturmedium ausgetauscht.

Transfektion der Astrozyten

Vor der eigentlichen Transfektion der primären Astrozyten musste zuerst die Transfektionsfähigkeit der Zellen überprüft werden. Dazu wurden die Astrozyten transient mit einem Vektor für das *Endogenous Green Fluorescenting Protein* transfiziert. Für diese Transfektion wurden 0,6 µg Vektor mit 1,8 µl FuGENE 6 versetzt und zu den Zellen gegeben, welche in 6-well-Platten kultiviert wurden. Nach 24 Stunden konnte in den entsprechend transfizierten Zellen mithilfe der Fluoreszenzmikroskopie die Bildung des grün fluoreszierenden *Endogenous Green Fluorescenting Protein* beobachtet werden.

Nach diesem Vorversuch und der Feststellung der Transfektionsfähigkeit wurden Zellen in 6-well-Platten bis zu einer Konfluenz von 60-70% kultiviert. Unter sterilen Bedingungen in einer Sicherheitswerkbank erfolgte dann in Eppendorfgefäßen die Vereinigung von 0,75 µg/well des Luciferase-Reporter-Vektor pGL3basic-Glt1 (Herstellung siehe 2.2.4.) mit 0,25 µg/well *Renilla*-Luciferase-Vektor phRL. Als separate Kontrolle wurden in einem weiteren Ansatz 0,75 µg/well des Luciferase-Reporter-Vektor pGL3basic und 0,25 µg/well *Renilla*-Luciferase-Vektor phRL vermengt. Weiterhin wurden in einem separaten Eppendorfgefäß vorsichtig 3 µl/well GeneJuice in 50 µl/well Opti-MEM pipettiert und für 10-15 Minuten bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Danach wurde der GeneJuice/Opti-MEM-Mix in das jeweilige DNA-Gemisch pipettiert und für 10-15 Minuten bei RT inkubiert. Während der Inkubationszeit erfolgte das Absaugen des Zellkulturmediums von den Zellen und das Ersetzen des normalen Zellkulturmediums durch 500 µl/well Opti-MEM. Nach Ablauf der Inkubation des DNA-/Opti-MEM-Gemisches wurde der Gesamtansatz mit einem Volumen von 50 µl/well zu den Zellen gegeben. Nach 8 Stunden wurde das Opti-MEM von den Zellen entfernt und durch normales Zellkulturmedium ersetzt. Entsprechend der

Versuchsbedingungen (siehe unten) wurde dem Zellkulturmedium je nach Ansatz noch 100 μ M Ceftriaxon oder ein adäquates Volumen Vehikel (0,9% NaCl) zugesetzt. Am Tag 2 und Tag 4 der Transfektion erfolgte dann bei allen Zellen ein kompletter Mediumwechsel, wobei dem Medium entsprechend des Versuchsplans Ceftriaxon, 0,9% NaCl oder dbcAMP zugesetzt wird. Am Tag 5 wurden die Zellen, nachdem das Medium abgesaugt wurde, mit 500 μ l/well PBS gespült, mit 200 μ l/well Passive Lysis Buffer des Dual-Luciferase Reporter Assay versetzt, für 15 Minuten bei RT auf dem Horizontalschüttler geschüttelt und danach für mindestens 30 Minuten bei -80°C gelagert. Danach wurden gemäß den Vorgaben des Dual-Luciferase Reporter Assays 20 μ l des Lysats in Reagenzröhrchen gefüllt und im Luminometer vermessen.

Schema der Transfektion und der nachfolgenden Behandlung:

- Tag 1: Transfektion der Zellen, nach 8 Stunden Mediumwechsel mit
 - Medium +100 μ M Ceftriaxon (Ceftriaxon-Ansatz)
 - Medium + 0,9% NaCl (Negativkontrolle)
 - Medium (Positivkontrolle)

- Tag 2: Mediumwechsel mit
 - Medium +100 μ M Ceftriaxon (Ceftriaxon-Ansatz)
 - Medium + 0,9% NaCl (Negativkontrolle)
 - Medium + 200 μ g/ml dbcAMP (Positivkontrolle)

- Tag 4: Mediumwechsel mit
 - Medium +100 μ M Ceftriaxon (Ceftriaxon-Ansatz)
 - Medium + 0,9% NaCl (Negativkontrolle)
 - Medium + 200 μ g/ml dbcAMP (Positivkontrolle)

- Tag 5: Lyse der Zellen und luminometrische Auswertung

Präparieren der Zellen für die Proteinanalytik

Zur Gewinnung von Proteinen aus der Zellkultur wurden die Zellen in 9 cm-Petrischalen kultiviert. Nach Abschluss des entsprechenden Behandlungsschemas wurden die Zellen, nach

Absaugen des Zellkulturmediums, mit 10 ml eiskalten PBS gewaschen und danach in 1 ml eiskaltem PBS mit Hilfe eines Zellkulturschabers von der Petrischale gelöst, in einem Eppendorfgefäß aufgenommen und bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gelagert.

Zur Entfernung des PBS wurden die Zellen in einer Kühlzentrifuge bei 4°C und 5000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das so gewonnene Pellet konnte entweder direkt weiterverarbeitet oder bei -80°C gelagert werden.

Präparieren der Zellen für die Nukleotidanalytik

Zur Gewinnung von Proteinen aus der Zellkultur wurden die Zellen in 6-well-Platten kultiviert, wobei pro Ansatz zur RNA-Gewinnung zwei Wells verwendet wurden.

Nach Abschluss des entsprechenden Behandlungsschemas wurden die Zellen, nach Absaugen des Zellkulturmediums, mit 1 ml eiskalten PBS gewaschen und danach mit 1 ml TRIzol-Reagenz versetzt. Nach intensiven Spülen der Zellen mit TRIzol wurde das entstandene Gemisch in das zweite Well des Ansatzes überführt, um dort ebenfalls die Zellen zu lysieren. Das so gewonnene Gemisch konnte entweder direkt weiterverarbeitet oder bei -80 °C gelagert werden.

Kultivieren der Zellen für die Immunzytofluoreszenzchemie

Für die Versuche der Immunzytofluoreszenzchemie wurden die Zellen entweder in Lab-Tek ChamberSlides (zur Zellidentifizierung) oder auf runden Plastik-Deckgläschen mit einem Durchmesser von 2 cm (zur Detektion verschiedener Proteine) kultiviert, welche in die Löcher einer 12-well-Platte gelegt wurden. Beim Verwenden der Lab-Tek ChamberSlides wurde in allen Kammern das Medium abgesaugt und vorsichtig dreimal mit PBS gewaschen. Beim Kultivieren der Zellen auf Deckgläschen in der 12-well-Platte wurden nach Ablauf des entsprechenden Behandlungsschemas die Zellen in den entsprechenden Löchern nach Absaugen des Zellkulturmediums einmal mit PBS gewaschen und entsprechend weiterverwendet.

2.2.3. Methoden der Proteinanalytik

Aufschluss der Zellen und Gewinnung der enthaltenen Proteine

Zum Aufschluss der Zellen wurde das Pellet mit 50-100 μ l RIPA-Puffer versetzt und intensiv gemischt. Im Anschluss daran wurde das entstandene Gemisch zur weiteren Homogenisation mittels Ultraschall (10 Impulse mit jeweils 60%) behandelt. Nach Ablauf der Homogenisation wurde die Suspension bei 4°C und 13200 rpm für 30 Minuten zentrifugiert, der Rückstand verworfen und das Zentrifugat als Proteinlösung weiterverwendet.

Aufschluss von Körpergewebe und Gewinnung der enthaltenen Proteine

Die zur Proteinisolation bestimmten Gehirnteile wurden mit Hilfe von flüssigem Stickstoff in einem Mörser zerkleinert. Das dabei gewonnene Gewebepulver wurde in einem Eppendorfgefäß aufgenommen und mit einer adäquaten Menge (100-400 μ l) RIPA-Puffer versetzt. Zum besseren Aufschluss wurde die Suspension durch eine Kanüle (18 G / 20 G) gezogen und danach mittels Ultraschall (10 Impulse mit jeweils 60% der Geräteleistung) homogenisiert. Nach Zentrifugation bei 4°C und 13200 rpm für 30 Minuten wurde das verbleibende Pellet verworfen und das Zentrifugat als Proteinlösung weiterverwendet.

Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde das BCA-Protein Assay Reagent Kit verwendet, welches mithilfe der Bicinchoninsäure (BCA)-Methode die photometrische Quantifizierung von Proteinen erlaubt. Die Proteinlösungen wurden gemäß dem Protokoll des Herstellers aufgearbeitet und vermessen, wobei unter Verwendung von Standardkurven lineare Bereiche in der Beziehung von Extinktion und Proteinkonzentration ermittelt wurden, die zur Berechnung der Proteinkonzentrationen in den Proben herangezogen werden konnten.

SDS-PAGE und *Western blotting*

In einem ersten Schritt wurden unter Verwendung der entsprechenden Utensilien Gele mit einer Dicke von 1,5 mm, einer SDS-Konzentration von 12% und einer Breite des Sammelgels von 15-20 mm nach folgender Rezeptur hergestellt:

Materialien und Methoden

Trenngel:	H ₂ O	3,35 ml
	4x Trenngelpuffer	2,5 ml
	10% SDS-Lösung	100 µl
	Acrylamid/Bis-Lösung	4 ml
	10% Ammoniumpersulfat	50 µl
	TEMED	5 µl

Dabei wurde das Gemisch für das Trenngel bis ca. 2 cm unter den Unterrand zwischen die Glasplatten gegossen, mit Isopropanol bedeckt und für 45 Minuten ausgehärtet.

Sammelgel:

	H ₂ O	3,05 ml
	4x Sammelgelpuffer	1,25 ml
	10% SDS-Lösung	50 µl
	Acrylamid/Bis-Lösung	650 µl
	10% Ammoniumpersulfat	50 µl
	TEMED	6 µl

Anschließend wurde das über dem Trenngel stehende Isopropanol mit Wasser entfernt und das Trenngel mittels Filterpapier vorsichtig getrocknet, bevor das Gemisch für das Sammelgel auf das Trenngel gegeben wurde. In das noch flüssige Gemisch für das Sammelgel wurde dann der Kamm für die Probestaschen eingesetzt und das Gel für 45 Minuten gehärtet.

Zum Durchführen der SDS-PAGE wurden 30 µg Protein mit RIPA-Puffer und 6x Probenpuffer zu einem Gesamtvolumen von 30 µl/Tasche (bei Verwendung von Gelen mit insgesamt 10 Probestaschen) bzw. 16 µl/Tasche (bei Verwendung von Gelen mit insgesamt 15 Probestaschen) gemischt und bei 95°C für 5 Minuten geschüttelt. In einem parallelen Ansatz wurden etwa 5 µl/Gel PageRuler Prestained Protein Ladder (Protein-Leiter) bei 40°C für 1 Minute inkubiert. Danach wurden die Protein-Leiter und die Proteinproben in die entsprechenden Probestaschen pipettiert und unter Verwendung des Mini-Protean 3 Systems und 1x Elektrophoresepuffer bei 100 V für 90 Minuten elektrophoretisch aufgetrennt.

Nach der SDS-PAGE wurden die in dem Gel aufgetrennten Proteine mittels einer Nass-Blott-Kammer (Mini-Protean 3 System) unter Verwendung von *Towbin*-Puffer gemäß den Vorgaben des Herstellers bei 100 V für 60 Minuten auf eine Hybond-C extra Blotting-Membran transferiert. Zum Abschluss des Blottings erfolgte eine Kontrolle des Transfers mittels Anfärben der Membran mit Ponceau-S-Lösung. Bei erfolgreichem Transfer wurde die Membran bei RT für 90 Minuten mit Block-Puffer behandelt und danach bei 4°C über Nacht

mit einer Lösung des entsprechenden Primärantikörpers in Antikörper-Puffer inkubiert. Im Anschluss daran wurde die Membran dreimal für jeweils 10 Minuten mit einer ausreichenden Menge TBS-T gewaschen, bevor der Sekundärantikörper in entsprechender Verdünnung in Antikörper-Puffer bei RT für 1 Stunde auf die Membran gebracht wurde. Nach Ablauf der Inkubation wurde die Membran wieder dreimalig für je 10 Minuten mit TBS-T gewaschen. Anschließend wurde mithilfe der ECL Western Blotting-Detection Reagenzien ein Chemilumineszenz-Film gemäß den Angaben des Herstellers belichtet und entwickelt. Nach erfolgreicher Belichtung konnte die Membran mit Strip-Lösung von den Antikörpern befreit werden und nach erneutem Inkubieren mit Block-Puffer wieder mit Primär- und Sekundär-Antikörpern gemäß dem oben angeführten Vorschriften behandelt werden.

2.2.4. Methoden der Nukleotidanalytik

Lyse der Zellen und Gewinnung der enthaltenen RNA

Nachdem die Zellen, wie in den Anleitungen zum Präparieren der Zellen für die Nukleotidanalytik beschrieben, mit TRIzol-Reagenz von den Zellkulturgefäßen angelöst wurden, erfolgte die Präparation der RNA aus den Zellen gemäß den Angaben des TRIzol-Protokolls.

Lyse von Körpergewebe und Gewinnung der enthaltenen RNA

Die zur RNA-Isolation bestimmten Gehirnteile wurden mit Hilfe von flüssigem Stickstoff in einem Mörser zerkleinert. Das dabei gewonnene Gewebepulver wurde in einem Eppendorf-Gefäß aufgenommen, mit 1 ml TRIzol-Reagenz versetzt und gemäß den Angaben des Herstellers weiterverarbeitet.

Bestimmung der RNA-Konzentration

Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte in einer 1:25-Verdünnung mittels UV-Photometrie bei einer Wellenlänge von $\lambda=260$ nm, wobei eine parallel durchgeführte Messung bei einer Wellenlänge von $\lambda=280$ nm der Kontrolle auf eventuelle Verunreinigungen durch verschleppte Proteine diene.

Gewinnung von cDNA

Zur Gewinnung von komplementärer DNA (cDNA) wurde die vorhandene RNA mittels des folgenden Protokolls mit einer Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Dazu wurden 1 µg mRNA mit 0,5 µl Random Hexamer Primer versetzt und der Ansatz mit Wasser zu einem Gesamtvolumen von 15 µl verdünnt und bei 70°C für 5 Minuten inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Ansatz sofort auf Eis gelagert und mit einem Gemisch, bestehend aus 0,75 µl RNasin; 5 µl 5x M-MLV-Puffer; 1,25 µl 10 mM dNTP's; 0,5 µl M-MLV Reverse Transkriptase und 2,5 µl Wasser, versetzt und bei 37°C für 60 Minuten inkubiert. Eine entsprechende Negativkontrolle (im folgenden RT(-) genannt), in deren Ansatz die Reverse Transkriptase durch ein adäquates Volumen an Wasser ersetzt wurde, ist bei allen RT-Reaktionen mitgeführt worden und wurde ebenfalls den nachfolgenden PCR-Untersuchungen unterzogen.

Qualitative RT-PCR

Die qualitative PCR wurde durchgeführt, um vor quantitativen Messungen sicherzustellen, dass die zu untersuchende mRNA in den Proben vorhanden ist und deren Expression in den untersuchten Proben untereinander verglichen werden kann. Dazu wurden in speziellen PCR-Gefäßen die angeführten Bestandteile vorsichtig gemischt und anschließend in einem PCR-Cycler dem unten aufgeführten Reaktionszyklus unterzogen. Im Anschluss daran erfolgte eine elektrophoretische Auftrennung der Reaktionsansätze.

Reaktionsansatz:	10x PCR-Puffer	2,5 µl
	50 mM MgCl ₂ -Lösung	1 µl
	10 mM DNTP's	0,5 µl
	10 µM Primer <i>forward</i>	0,5 µl
	10 µM Primer <i>reverse</i>	0,5 µl
	Wasser	17,75 µl
	5 U/µl Taq-Polymerase	0,25 µl
	cDNA (~50 ng)	1 µl

Reaktionszyklus: 94°C für 5 Minuten
94°C für 30 Sekunden
60°C für 30 Sekunden
72°C für 40 Sekunden
Durchlauf 30-40x wiederholen
72°C für 10 Minuten
4°C bis zur weiteren Bearbeitung

Simultan zu den Proben sowie den RT(-)-Kontrollen wurden bei jeder RT-PCR Reaktion sogenannte „Wasserproben“ durchgeführt, bei denen der oben angeführte Reaktionsansatz anstelle der cDNA ein adäquates Volumen von Wasser enthält.

Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

Für die in der qualitativen PCR gewonnenen Produkte wurde in einem Horizontal-Elektrophorese-System ein Gel, bestehend aus 1,5% Agarose, welche in 1x TAE-Puffer durch Aufkochen gelöst und mit 0,2 µg/ml Ethidiumbromid versetzt wurde, gegossen. Nach dem Erkalten des Gels wurden die Proben dem PCR-Cycler entnommen, pro Ansatz mit Ladepuffer im Verhältnis 5:1 versetzt und mit einem Volumen von 10-15 µl/Tasche in die entsprechenden Taschen pipettiert. Weiterhin wurden in weitere Probenaschen geeignete Molekulargewichtsmarker sowie Wasserproben und RT(-)-Ansätze als Negativkontrollen gebracht. Anschließend erfolgte die Elektrophorese in 1x TAE-Puffer bei 80-100 V für 45-60 Minuten. Nach Ablauf der Elektrophorese wurde das Gel unter UV-Licht betrachtet und fotografiert.

Quantitative *Real-time* PCR

Bei der quantitativen *Real-time* PCR kann der gesamte Amplifikationsprozeß *in statu nascendi* mittels Fluoreszenzdetektion verfolgt werden. Bei dieser Methode können entweder genspezifische, fluoreszenzmarkierte Sonden oder unspezifische, nur an Doppelstrang-DNA (dsDNA) bindende Fluoreszenzfarbstoffe (z. Bsp. SYBR Green) eingesetzt werden (Wittwer 1997). Die SYBR Green-Methode zeichnet sich dadurch aus, dass hierbei die gleichen Primer wie bei der qualitativen PCR verwendet werden können. Grundlage dieser Meßmethode ist die Wechselwirkung des SYBR Green Farbstoffs mit der bei jedem Amplifikationsschritt gebildeten dsDNA.

Für die quantitative *Real-time* PCR wurden in eine 96-well-Platte entsprechend der Versuchsplanung 10 µl/well cDNA pipettiert und diese mit einem Gemisch, bestehend aus 15 µl SYBR Green RT-PCR Mastermix, jeweils 0,6 µl forward-/reverse-Primer (10 mM), 3,725 µl Wasser und 0,075 µl Taq-Polymerase (5 U/µl) zu einem Gesamtvolumen von 25 µl/well versetzt. Danach wurde die gesamte Platte mittels einer Klebefolie verschlossen und bei 4°C und 4000 rpm für 1 Minute zentrifugiert. Im Anschluss daran wurde die Platte in den *Real-time* PCR-Cycler verbracht und der entsprechende Reaktionszyklus gestartet. Die Auswertung erfolgt mit der zum Gerät gehörenden Software.

Jede Probe wurde dreimal vermessen und dann auf die Expression eines stabil exprimierten Genes, hier auf das Gen für die ribosomale 18S-RNA-Untereinheit (18S-rRNA), bezogen. Eine gleichzeitig durchgeführte Wasserprobe wurde ebenfalls auf jeder Platte vermessen, wobei es sich bei der „Wasserprobe“ um einen Reaktionsansatz handelt, der anstelle von cDNA ein äquivalentes Volumen an Wasser enthält.

Herstellen kompetenter *E.coli*-Stämme

Eine Kolonie *Escherichia coli* (*E.coli*; XL1-blue) wurde in 10 ml LB-Medium inokuliert und bei 37°C über Nacht inkubiert. Anschließend wurde 1 ml dieser Kultur in 100 ml LB-Medium gebracht und bei 37°C und 200 rpm in Inkubationsschüttler kultiviert, bis eine OD₆₀₀ (optische Dichte bei 600 nm) von 0,4 - 0,6 erreicht worden ist. Dann wurde bei RT und 2500 g für 10 Minuten zentrifugiert und das entstehende Pellet in 7,5 ml TSB-Medium resuspendiert und für 60 Minuten auf Eis gelagert. Diese Suspension wurde dann in 100 µl-Aliquots geteilt, bei -196°C in flüssigen Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Klonieren des GLT-1-Promotors

Zu Beginn der Klonierung des GLT-1-Promotors wurde mit cDNA von unbehandelten Astrozyten und speziellen, auf die Schnittstellen der verwendeten Endonukleasen konzipierten, Klonierungsprimern eine qualitative PCR durchgeführt. Hiermit wurde eine Amplifikation des Promotors mit flankierenden Schnittstellen-spezifischen Sequenzen erreicht.

Im Anschluss dazu wurde das PCR-Produkt elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Bestätigung einer Größensimilarität mit dem vorher theoretisch „berechneten“ Produkt konnte das

entsprechende PCR-Produkt aus dem Gel geschnitten und mittels eines PCR-Aufreinigungs-Kits präpariert werden.

Zur Vorbereitung der Ligation der DNA wurden sowohl der pGL3-basic-Vektor als auch die spezifische GLT1-Promotor-DNA über einen Restriktionsverdau geschnitten, indem jeweils 1 µg Plasmid bzw. GLT1-Promotor-DNA mit 10 U XhoI, 10 U HindIII und 10 µl 10x Puffer R *ad* 100 µl versetzt wurden und bei 37°C über Nacht inkubiert wurden. Zur Kontrolle des Restriktionsverdaus erfolgte eine elektrophoretische Auftrennung beider Produkte im Agarosegel. Im Anschluss daran wurden der linearisierte pGL3-basic-Vektor mit GLT1-Promotor-DNA, 5 U Ligase und 2 µl 10x Ligase-Puffer in 20 µl Gesamtansatz bei 4°C über Nacht inkubiert. Eine parallele Re-Ligation des pGL3-basic-Vektors ohne Promotor-DNA als Restriktionskontrolle fand gleichzeitig statt.

Im nächsten Schritt wurde ein 100 µl-Aliquot der kompetenten E.coli auf Eis aufgetaut und mit 80 µl eines Gemisches von 5 µl Ligationsansatz und 75 µl Wasser versetzt. Nach Zugabe von 20 µl 5x KCM-Puffer und Durchmischung wurde der Ansatz auf Eis für 20 Minuten inkubiert. Nach dieser Zeit wurde der Ansatz für weitere 10 Minuten bei RT belassen, bevor 1 ml LB-Medium hinzugegeben werden konnte. Nach einer mindestens einstündigen Inkubation in einem Inkubationsschüttler bei 750 rpm und 37°C wurde die Kultur auf Agarplatten, welche Ampicillin enthalten, plattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert. Da der verwendete Vektor für eine durch das Plasmid bedingte Ampicillinresistenz kodiert, konnten auf den Kulturplatten nur Kolonien wachsen, bei denen die Transformation und damit die Aufnahme des Vektors in die Bakterien vonstatten gegangen war. Zur weiteren Vermehrung dieser transformierten E.coli wurden mittels einer Pipettenspitze 8-10 Kolonien vorsichtig von der Platte gehoben und jeweils einzeln in Erlenmeyer-Kolben, in welchen sich Ampicillin-haltiges LB-Medium befand, überführt und bei 37°C und 200 rpm über Nacht inkubiert. Aus diesen Ansätzen wurden im Anschluss an diese Inkubation mittels des NucleoSpin Plasmid Quick Pure Kits die Plasmid-DNA präpariert und der DNA-Gehalt mittels UV-Photometrie bestimmt. Mit 500 ng DNA wurde dann der bereits beschriebene Restriktionsverdau erneut durchgeführt und das Produkt elektrophoretisch aufgetrennt. Waren in diesem Agarosegel getrennte Banden für sowohl die DNA des pGL3-basic-Vektors als auch für die spezifische GLT-1-Promotor-DNA zu finden, wurde die aus der Präparation gewonnene DNA einer Sequenzierung zugeführt. Die jetzt noch vorhandenen transformierten Bakterien konnten durch Kultivierung in 250 ml Ampicillin-haltigem LB-Medium bei 200 rpm und 37°C über Nacht in größerem Maßstab vermehrt werden und zur Präparation größerer Mengen an Plasmiden mit insertierter GLT-1-Promotor-DNA verwendet werden.

Sequenzierung des GLT-1 Promotors

Sämtliche Sequenzierungen sind am Institut für Genetik der Humboldt-Universität zu Berlin unter Leitung von Dr. M. Meixner, an einem ABI 373/377 BigDye-Terminator-Chemie durchgeführt worden.

2.2.5. Methoden der Immunzytofluoreszenzchemie

Identifizierung der primären Astrozyten mittels Immunzytofluoreszenzchemie

Nachdem die Zellen in Lab-Tek ChamberSlides gemäß den Vorgaben der Methoden der Zellkultur kultiviert worden sind, wurden sie mit 3% *para*-Formaldehyd und 1% Glutaraldehyd in PBS bei RT für 10 Minuten fixiert. Anschließend erfolgte ein dreimaliges Waschen mit PBS sowie, nach einmaligem Vorspülen, eine Inkubation mit 0,1% Triton X-100 in PBS bei RT für 10 Minuten. Danach wurden die Zellen für 60 Minuten bei RT mit FCS geblockt. Im Anschluss daran erfolgte ein dreimaliges Waschen mit 0,1% Triton X-100 in PBS. Nach diesem Waschen wurden die Zellen mit dem Primärantikörper (Mouse anti-GFAP) in einer Verdünnung von 1:100 in 0,3% Triton X-100 und 3% BSA in PBS bei RT für 60 Minuten inkubiert. Im Anschluss daran wurde, nach dreimaligem Waschen mit 0,1% Triton X-100 in PBS, der Sekundärantikörper (Donkey anti-Mouse, CY3-markiert) in einer Verdünnung von 1:200 in 0,3% Triton X-100 und 3% BSA in PBS bei RT für 30 Minuten auf die Zellen gebracht. Nach Ablauf der Inkubationszeit erfolgte auch hier ein dreimaliges Waschen mit 0,1% Triton X-100 in PBS. Vor dem Entfernen des Kammeraufsatzes wurden die Zellen letztmalig mit PBS gewaschen. Der Objektträger mit den fixierten und markierten Zellen wurde dann mit einem Deckgläschen und *Mounting*-Medium luftdicht abgeschlossen.

Zur Kontrolle eventueller unspezifischer Bindungen des Sekundärantikörpers wurde bei dieser Untersuchung gleichzeitig eine entsprechende Negativkontrolle durchgeführt, bei der anstelle des Primärantikörpers nur das adäquate Volumen 0,3% Triton X-100 und 3% BSA in PBS zu den Zellen gegeben wurde.

Identifizierung verschiedener zellulärer Proteine mittels Immunzytofluoreszenzchemie

Bei diesen Versuchen verblieben die Plastikdeckgläschen mit den darauf gewachsenen Zellen bis zum Fixieren auf einem Objektträger in der 12-well-Platte.

In einem ersten Schritt wurde das Medium abgesaugt und durch eiskaltes Methanol ersetzt. Danach wurden die Zellen mit dem Methanol bei -20°C für 10 Minuten gelagert. Anschließend wurde das Methanol abgesaugt und die Zellen an der Luft getrocknet, bevor sie einmal mit TBS-T gewaschen wurden. Zum Blocken wurden die Zellen mit 5% Milchpulver und 1% BSA in TBS-T bei RT für 60 Minuten inkubiert, bevor der entsprechende Primärantikörper (Verdünnungen siehe unten) in 5% Milchpulver in TBS-T bei 4°C über Nacht zu den Zellen gegeben wurde. Nach der Entfernung der Antikörperlösung von den Zellen wurde jede Vertiefung (Well) der 12-well-Platte dreimal mit TBS-T gewaschen, bevor die Zellen mit dem entsprechenden Sekundärantikörper (Verdünnungen siehe unten) in 5% Milchpulver in TBS-T bei RT für 60 Minuten inkubiert wurden. Danach wurde auch diese Antikörperlösung abgesaugt und die Zellen dreimal mit TBS-T gewaschen. Für eine Anfärbung der Zellkerne wurde eine Lösung des für den Zellkern spezifischen Farbstoffs DAPI (100 ng/ml PBS) bei RT für 30 Minuten zu den Zellen gegeben. Abschließend wurden die Wells dreimal mit TBS-T gewaschen und die in den Wells befindlichen Deckgläschen mithilfe einer an den Rand des Gläschens gestochenen Kanüle aus der Platte gehoben. Die Deckgläschen wurden kurz in Wasser geschwenkt und dann mit Mounting-Medium auf einem Objektträger fixiert, welcher zusätzlich mittels handelsüblichen Nagellacks mit einem größeren Deckgläschen luftdicht verschlossen wurde.

Zur Kontrolle eventueller unspezifischer Bindungen der Sekundärantikörpers wurden bei diesen Untersuchungen gleichzeitig entsprechende Negativkontrollen durchgeführt, bei der anstelle des jeweiligen Primärantikörpers die Zugabe eines adäquaten Volumens von 0,3% Triton X-100 und 3% BSA in PBS zu den Zellen erfolgte.

Verdünnungen der Antikörper (jeweils durch Titrationen der Antikörper ermittelt)

Rabbit anti-GLT1/EAAT2 IgG	5 $\mu\text{g/ml}$
FITC-conjugated anti-Rabbit IgG	1:100
Mouse-anti-GFAP IgG IgG	1:100
Cy3-conjugated anti-Mouse IgG	1:200

Die fluoreszenzmikroskopische Auswertung erfolgte mittels eines Fluoreszenzmikroskops unter Verwendung entsprechender, auf die Fluoreszenzfarbstoffe abgestimmter Filter und einer zum Mikroskopsystem gehörenden Bildbearbeitungssoftware.

2.2.6. Methoden zur Bestimmung der Transportaktivität

Bestimmung der Transportaktivität des GLT-1

Alle Arbeiten mit radioaktiven Materialien wurden unter Beachtung der geltenden gesetzlichen Bestimmungen in speziell dafür ausgerüsteten Räumen am *Center for Cardiovascular Research (CCR)* durchgeführt.

Zur Bestimmung der Transportaktivität wurden primäre Astrozyten in 12-well-Platten bis zu einer Konfluenz von 60-70% kultiviert. Danach wurden die Zellen in die Behandlungsgruppen Vehikel, 1 μ M Ceftriaxon, 10 μ M Ceftriaxon, 100 μ M Ceftriaxon und 200 μ g/ml dbcAMP geteilt und entsprechend den Methoden der Zellkultur behandelt. Nach Ablauf der Behandlung wurden die Zellen auf eine Temperatur von 25°C äquilibriert und nach dem Absaugen des Mediums mit 500 μ l/well Inkubationspuffer versetzt. Die Zugabe der L-[G-³H]-Glutaminsäure in einer Endkonzentration von 500 nM zu dem Inkubationspuffer erfolgte im Anschluss daran. Nach einer Inkubationszeit von 10 min bei 25°C wurden die Zellen zweimal mit 500 μ l Inkubationspuffer gewaschen und danach mit 500 μ l 0,25 mM NaOH über Nacht lysiert. Die Messung der Radioaktivität erfolgte nach Versetzen von 200 μ l Lysat mit 2 ml Szintillationsflüssigkeit in einem Flüssigszintillations- und Lumineszenzzähler. Die Messung der Proteinkonzentration erfolgte aus Gründen der Strahlensicherheit mit einer äquivalent kultivierten Platte mit jeweils gleichem Behandlungsschema, jedoch ohne Zugabe von L-[G-³H]-Glutaminsäure unter Verwendung von 50 μ l Lysat mittels der unter Methoden der Proteinanalytik beschriebenen BCA-Methode.

2.2.7. Methoden der Statistik

Die statistische Bearbeitung erfolgte mit dem SPSS-Computerprogramm zur statistischen Datenanalyse in der Version 12.0 (SPSS, Chicago, USA).

Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm Standardfehler dargestellt. Differenzen zwischen den Gruppen wurden mittels Mann-Whitney U-Test, *analysis of variance* (ANOVA) und Studentischen t-Tests verglichen. Signifikanzen in der Mortalität wurden mittels des Chi-Quadrat-Tests und dem exaktem Test nach Fisher bestimmt. Alle Tests wurden zweiseitig durchgeführt und ein $p < 0,05$ wurde als signifikant bewertet.

Die Berechnungen zur Akutmortalität nach MCAO wurden mithilfe von Michael Godes, *Center for Cardiovascular Research* der Charité Berlin, durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1. Tierexperimentelle Untersuchungen zur Wirksamkeit von Ceftriaxon in einem Schlaganfallmodell der Ratte

Peri-operative Messung des zerebralen Blutflusses während der *middle cerebral artery occlusion* (MCAO) in Ratten

Um belegen zu können, dass es mittels der in 2.2.1. genannten Prozeduren durch den Verschluss der *Arteria cerebri media* zu einem nachweisbaren Sistieren der zerebralen Blutversorgung kommt, wurde bei einer Anzahl von Tieren, welche aus den jeweiligen Behandlungsgruppen stammten, eine lasergestützte Messung des zerebralen Blutflusses durchgeführt. Bei dieser nichtinvasiven Methode können mithilfe des Doppler-Prinzips Veränderungen des intrakraniellen Blutflusses vor, während und nach einem MCAO-Eingriff dokumentiert werden. In Abbildung 3.1. sind die Ergebnisse der Messungen des Blutflusses vor dem MCAO-Eingriff, fünf Minuten nach dem Verschluss der *Arteria cerebri media*, achtzig Minuten nach Okklusion des Gefäßes sowie fünfzehn Minuten nach dem Öffnen der okkludierten Arterie graphisch dargestellt. Wie dabei zu erkennen ist, sind vor dem Gefäßverschluss keine signifikanten Unterschiede zwischen den Werten der einzelnen Gruppen erkennbar. Während der Okklusion kommt es in den Tieren, die einem MCAO-Eingriff unterzogen wurden, zu einem signifikanten Absinken des zerebralen Blutflusses gegenüber den Werten von Tieren, die nur einem Schein-Eingriff unterzogen wurden. Diese Ergebnisse konnten sowohl zu einem frühen als auch zu einem späten Zeitpunkt des Gefäßverschlusses gefunden werden und zeigten auch keine signifikanten Unterschiede in den einzelnen Behandlungsgruppen. Durch Entfernen des Fadens aus dem Gefäßlumen zum Ende des MCAO-Eingriffs konnte eine rasche Wiederherstellung der normalen Blutflussverhältnisse erzielt werden, was sich in den Werten des zerebralen Blutflusses fünfzehn Minuten nach dem Ende des Eingriffs widerspiegelt. So sind die Werte des zerebralen Blutflusses wieder auf die gemessenen Werte vor dem Eingriff gestiegen und zeigen im Vergleich zur Gruppe, die nur einer Schein-Operation unterzogen wurde, keinerlei signifikante Unterschiede im zerebralen Blutfluss.

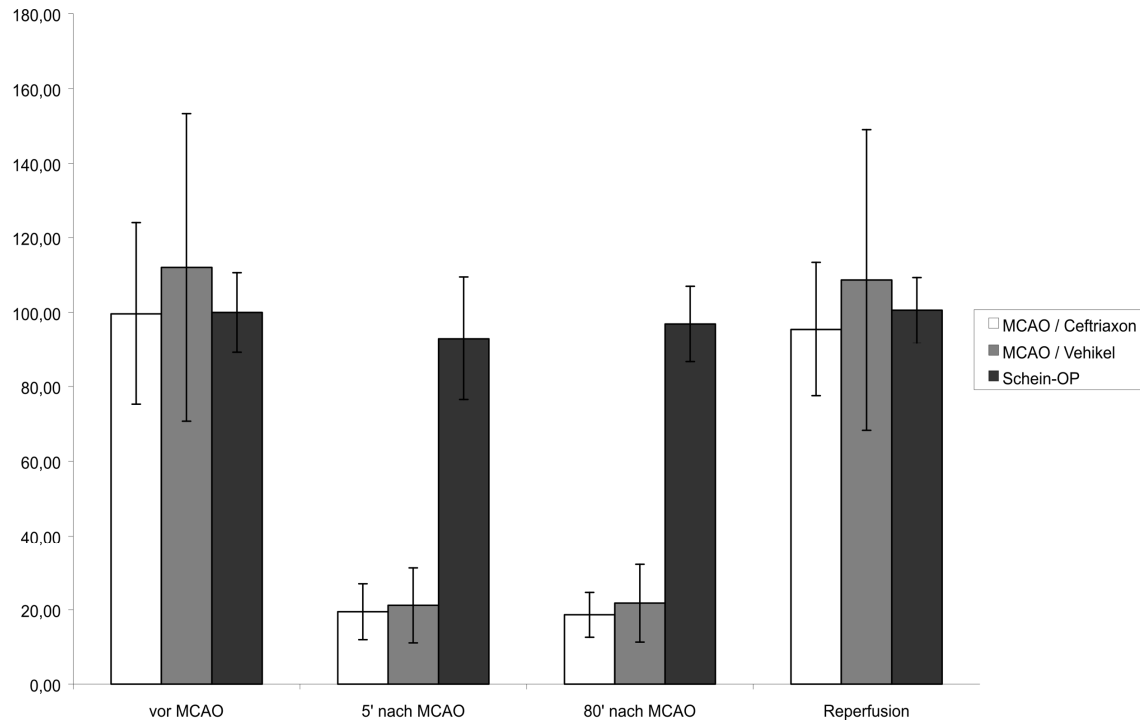


Abbildung 3.1. Darstellung des zerebralen Blutflusses bei Ratten mit MCAO und Ceftriaxon-Behandlung (n=6; weiß), bei Tieren mit MCAO und Vehikel-Behandlung (n=6; grau) oder mit Schein-OP (n=3; schwarz); jeweils vor MCAO, 5 Minuten nach MCAO-Beginn, 80 Minuten nach MCAO-Beginn und während der Reperfusionsphase

Peri-operative Messung verschiedener klinisch-chemischer Parameter im gemischten venösen Blut

Während des in 2.2.1. beschriebenen Eingriffs zum Verschluss der *Arteria cerebri media* wurde den Ratten über den retrobulbären Venenplexus Blut entnommen, was auf die Parameter Sauerstoffpartialdruck (paO_2), Kohlendioxidpartialdruck (paCO_2), pH-Wert, Glucosekonzentration, Hämatokrit (Hk), Na^+ -Konzentration ($[\text{Na}^+]$) und K^+ -Konzentration ($[\text{K}^+]$) hin untersucht wurde. Die Ergebnisse dieser Messungen sind in Tabelle 3.1. aufgeführt. Dabei zeigte sich in keinem der untersuchten Parameter ein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen, die einer MCAO unterzogen wurden und den Gruppen, an denen nur ein Schein (Sham)-Eingriff vorgenommen wurde.

	MCAO/ Ceftriaxon	MCAO/ Vehikel	Schein-OP/ Ceftriaxon	Schein-OP/ Vehikel
n	11	12	7	8
paO₂ in mmHg	80,68 (± 10,68)	87,58 (± 6,18)	72,68 (± 13,69)	80,06 (± 9,36)
paCO₂ in mmHg	43,89 (± 4,47)	43,13 (± 5,10)	47,1 (± 5,92)	42,65 (± 5,14)
pH	6,69 (± 0,17)	7,06 (± 0,29)	7,09 (± 0,17)	7,04 (± 0,30)
[Glucose] in mM	9,82 (± 0,26)	9,78 (± 0,58)	9,37 (± 0,42)	9,64 (± 0,69)
[Na⁺] in mM	130,91 (± 2,39)	130,33 (± 4,21)	133,43 (± 3,99)	131,00 (± 4,63)
[K⁺] in mM	4,58 (± 0,47)	4,93 (± 0,78)	5,23 (± 0,99)	4,96 (± 0,42)
Hk	41,62 (± 1,21)	43,40 (± 1,92)	41,20 (± 2,53)	43,74 (± 1,73)

Tabelle 3.1. Übersicht über die in der Blutgasanalytik gemessenen Parameter in den verschiedenen Behandlungsgruppen

Darstellung der zerebralen Gefäße vor, während und nach der *middle cerebral artery occlusion* (MCAO) in Ratten

Zur Darstellung der zerebralen Gefäße vor, während und nach einer MCAO wurde ein sich am Neurowissenschaftlichen Forschungszentrum der Charité Berlin befindlicher 7-T-Kleintier-Magnetresonanztomograph (Kleintier-MRT) verwendet. Diese Untersuchungen wurden, ebenso wie die später beschriebenen Messungen des intrazerebralen Schadens nach MCAO, durch Susanne Müller von der Arbeitsgruppe Prof. Villringer unterstützt.

Wie in der Abbildung 3.2. zu sehen ist, lassen sich die Gefäße des zerebralen Kreislaufs in der MRT-Aufnahme gut darstellen. Das dabei dem Stromgebiet der *Arteria cerebri media* entsprechende Areal ist weiß eingekreist. In der linken Aufnahme, welches vor dem MCAO-Eingriff aufgenommen wurde und in der rechten Aufnahme, welches nach dem Entfernen des

Fadens aus der *Arteria cerebri media* aufgenommen wurde, ist die *Arteria cerebri media* im Areal des weißen Kreises gut zu erkennen. In der mittleren Aufnahme, die die zerebralen Gefäße während der MCAO darstellt, ist im Areal des weißen Kreises die *Arteria cerebri media* nicht dargestellt, was einen Verschluss des Gefäßes beweist.

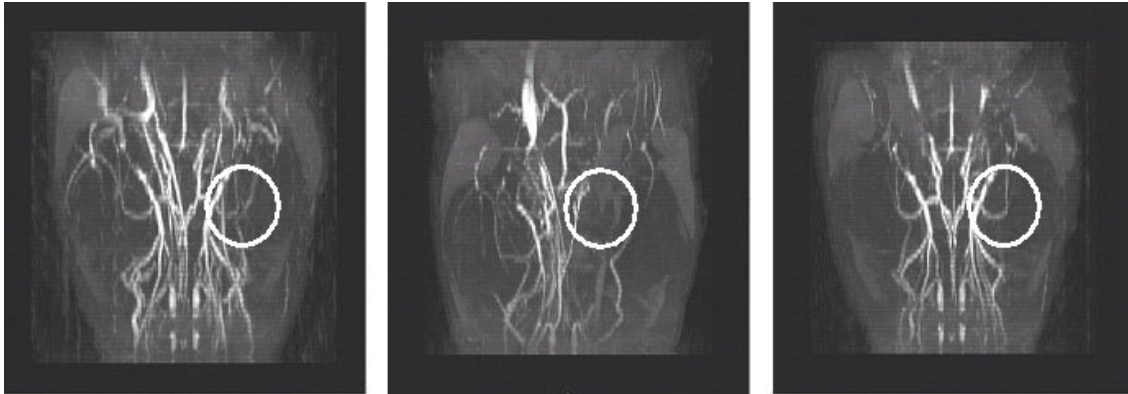


Abbildung 3.2. Darstellung der MRT-Angiographie bei Ratten vor (links), während (Mitte) und nach (rechts) einem MCAO-Eingriff; der weiße Kreis markiert das Areal der *Arteria cerebri media*; Ansicht von kranial.

Untersuchung der Akutmortalität 24 Stunden nach *middle cerebral artery occlusion* (MCAO) in Ratten unter Ceftriaxon-Behandlung

Um Aussagen über eine protektive Wirkung von Ceftriaxon zu erhalten, wurde die Sterblichkeit von Tieren untersucht, in deren Gehirn im Rahmen einer *middle cerebral artery occlusion* (MCAO) ein dem Schlaganfall adäquates Schadensmuster erzeugt wurde. Wie unter 2.2.1. dargestellt, wurden die verwendeten Tiere entsprechend der Behandlungsmodi in die Gruppen: Vehikel + MCAO; Ceftriaxon prä-OP + MCAO; Ceftriaxon post-OP + MCAO; Vehikel + Schein-OP, Ceftriaxon + Schein-OP eingeteilt, wobei die applizierte Ceftriaxon-Dosis 200 mg/kg KG *i.p.* betrug und als Vehikellösung 0,9% NaCl-Lösung verwendet wurde. In Tabelle 3.2. sind die entsprechenden Daten für die Tiere, an denen eine MCAO vollzogen wurde und die entsprechend der Gruppeneinteilung mit 0,9% NaCl *i.p.* präoperativ, 200 mg/kg KG *i.p.* Ceftriaxon präoperativ oder 200 mg/kg KG *i.p.* Ceftriaxon postoperativ behandelt wurden, dargestellt. Die Sterblichkeit wurde 24 Stunden nach dem MCAO-Eingriff erhoben und stellt die Akutmortalität dar. Darunter wird die Sterblichkeit von Tieren in einer Behandlungsgruppe nach einem MCAO-Eingriff, bezogen auf die Anzahl der Tiere in der jeweiligen Behandlungsgruppe, verstanden.

Ergebnisse

Behandlung	Tiere pro Gruppe (n)	Mortalität (n)	Mortalität (%)
Vehikel	29	10	34,5
Ceftriaxon präoperativ	33	4	12,1*
Ceftriaxon postoperativ	19	0	0**

Tabelle 3.2. Übersicht über die Anzahl an Tieren in den einzelnen Behandlungsgruppen und der Mortalität nach MCAO (*p<0,05, **p<0,001 vs. Vehikel im Chi-Quadrat-Test).

Bei Betrachtung der Daten zeigt sich im Vergleich der Gruppen eine signifikante Senkung der Akutmortalität in der Gruppe der prä-operativen Ceftriaxon-Behandlung gegenüber der Gruppe der mit NaCl-Lösung behandelten Tiere. Hochsignifikant fällt der Unterschied beim Vergleich der Gruppe der postoperativen Ceftriaxon-Behandlung mit der Gruppe der NaCl-Applikation aus.

Beurteilung des neurologischen Schadens einer *middle cerebral artery occlusion* (MCAO) in Ratten

Zum Beurteilen der neurologischen Schäden infolge des MCAO-Eingriffs wurde eine Bewertungsskala verwendet, die sich auf eine Arbeit von Garcia *et al.* stützt (Garcia 1995) und sensorische sowie motorische Qualitäten bewertet. Beurteilt werden dabei neben Spontanaktivität die Symmetrie der Bewegung der vier Gliedmaßen, das Ausstrecken der Vorderpfoten, das Klettern an einem Stahlgitter, die Reaktion auf Berührung der Tastaare sowie die allgemeine Propriozeption. Der neurologische Status der Tiere wurde dementsprechend 24 Stunden nach dem Eingriff von einem geblindeten Untersucher untersucht und evaluiert. In Abbildung 3.3. sind die zusammengefassten Werte der Evaluation zu sehen. Bei der neurologischen Evaluation, wie sie in dieser Arbeit angewandt wurde, ist anzumerken, dass der Maximalwert von 18 Punkten nicht überschritten und der Minimalwert von 2 Punkten nicht unterschritten werden kann.

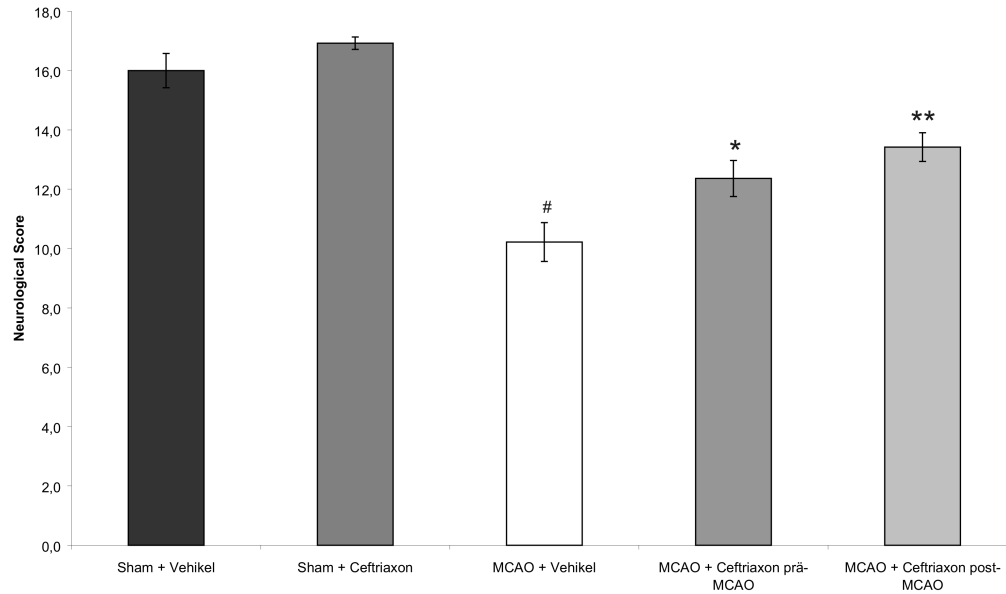


Abbildung 3.3. graphische Darstellung der Mittelwerte des neurologischen Defizit-scores bei Ratten nach MCAO oder Schein-OP, erhoben 24 Stunden nach MCAO-Eingriff; in Gruppen mit Schein-OP und Vehikelbehandlung (n=8), mit Schein-OP und Ceftriaxon-Behandlung (n=13), mit MCAO-Eingriff und Vehikel-Behandlung (n=18), mit MCAO-Eingriff und prä-operativer Ceftriaxon-Behandlung (n=22) sowie mit MCAO-Eingriff und postoperativer Ceftriaxon-Behandlung (n=19); # p<0,001; * p<0,05; ** p<0,01 vs. MCAO+Vehikel.

In der graphischen Darstellung ist zu sehen, dass sich der *score* der Tiere, bei denen nur eine Schein-Operation vorgenommen wurde, im Bereich von 15 bis 18 Punkten bewegt. Bei der Gruppe, die mit 0,9% NaCl *i.p.* behandelt wurde und an der eine MCAO vorgenommen wurde, ist eine signifikante Verschlechterung des *scores* gegenüber der ebenfalls mit 0,9% NaCl *i.p.* behandelten und nur Schein-operierten Gruppe zu beobachten. Im Vergleich zur Schein-operierten Gruppe mit NaCl-Behandlung fallen die Mittelwerte des *scores* für Tiere der Gruppen, die einer MCAO unterzogen wurden und Ceftriaxon prä- oder postoperativ erhalten haben, ebenfalls signifikant schlechter aus. Der Vergleich der MCAO-Gruppen untereinander zeigt jedoch eine signifikante Verbesserung der *score*-Mittelwerte bei Ceftriaxon-behandelten Tieren.

Beurteilung des intrazerebralen Schadens nach *middle cerebral artery occlusion* (MCAO) in Ratten mittels MRT

Zur Beurteilung des durch den *middle cerebral artery occlusion* (MCAO)-Eingriffs in Ratten induzierten intrazerebralen Schadens wurde das bereits bei der peri-operativen Darstellung der Hirngefäße während einer MCAO beschriebene Kleintier-MRT benutzt. Wie in Abbildung 3.4. zu sehen, stellt sich ein durch den MCAO-Eingriff induzierter Schaden in der

T2-Wichtung als hyperintensives, flüssigkeitsreiches Areal in der betroffenen Hemisphäre dar. Eine Kontrolluntersuchung an einem nicht operierten Tier zeigt dagegen keine radiologisch detektierbaren Unterschiede zwischen den Hemisphären.

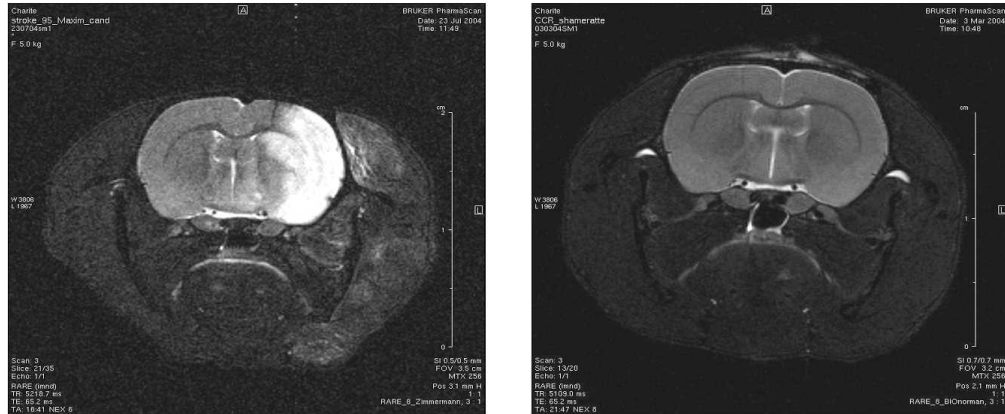


Abbildung 3.4. repräsentative MRT-Aufnahmen bei Ratten mit einer MCAO-Operation (links) und ohne entsprechenden Eingriff (rechts), Ansicht jeweils von kaudal.

Messung des intrazerebralen Infarkt volumens nach *middle cerebral artery occlusion* (MCAO) in Ratten unter Ceftriaxon-Behandlung

Um eine genaue Aussage über das Infarktvolumen treffen zu können, wurde die unter 2.2.1. beschriebene MRT-Technik verwendet. Nachdem gezeigt werden konnte, dass sich infolge des MCAO-Eingriffs geschädigte Areale sicher darstellen lassen, wurden die entsprechend ihrer Gruppeneinteilung behandelten Tiere 48 Stunden nach dem operativen Eingriff im MRT vermessen. Die dabei visualisierten Schadensareale in den einzelnen Schichten wurden mithilfe eines Computerprogramms (Analyze 5.0) dreidimensional zusammengefasst und als Infarktvolumen angegeben.

In Abbildung 3.5. ist eine graphische Darstellung der Mittelwerte der Infarktvolumina für die Tiere, an denen eine MCAO vollzogen wurde und die entsprechend der Gruppeneinteilung mit 0,9% NaCl *i.p.* präoperativ, 200 mg/kg KG *i.p.* Ceftriaxon präoperativ oder 200 mg/kg KG *i.p.* Ceftriaxon postoperativ behandelt wurden, zu sehen.

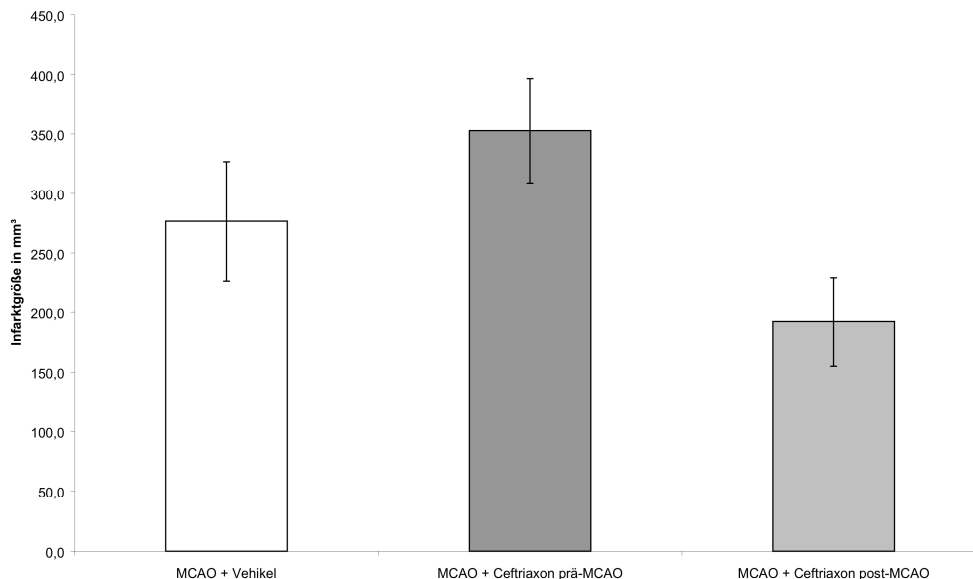


Abbildung 3.5. graphische Darstellung der Infarkt volumina bei Ratten nach MCAO-Eingriff ; Anzahl der Vehikel-behandelten Tiere (weiß) n=14; Anzahl der präoperativ Ceftriaxon-behandelten Tiere (dunkelgrau) n=22; Anzahl der postoperativ Ceftriaxon-behandelten Tiere (hellgrau) n=19.

Im Vergleich der Gruppen sind keine signifikanten Unterschiede feststellbar, auch wenn beim Betrachten der Abbildung 3.5. zu erkennen ist, dass sich die mittlere Infarktgröße bei den Tieren, welche postoperativ mit Ceftriaxon behandelt wurden, im Vergleich zu den beiden anderen Behandlungsgruppen tendenziell verringert hat.

3.2. Nachweis der GLT-1-mRNA-Expression im Gehirn der Ratte unter Ceftriaxon-Behandlung

Quantitativer Nachweis der GLT-1-mRNA-Expression in verschiedenen Hirnarealen der Ratte unter Ceftriaxon-Behandlung

Um die Expression von GLT-1-mRNA *in vivo* messen zu können, wurde Ratten entsprechend dem unter 2.2.1. angegebenen Behandlungsprotokoll Ceftriaxon in der Konzentration von 200 mg/kg KG *i.p.* oder ein adäquates Volumen an 0,9% NaCl *i.p.* appliziert. Nach fünftägiger Behandlung wurden die Tiere mittels Dekapitation getötet, das Gehirn entnommen und daraus gemäß den Vorgaben aus 2.2.1. durch Frau Prof. Hörtnagl, Institut für Pharmakologie der Charité Berlin, einzelne Hirnbestandteile präpariert. Aus der Gruppe der Ceftriaxon-behandelten Ratten wurden dazu sieben Tiere, aus der Gruppe der mit NaCl-Lösung behandelten Tiere wurden sechs Ratten, verwendet. Nach der Präparation wurden die Proben aus dem Hippocampus, dem Stammhirn, der Amygdala, dem frontalen Cortex, dem

Striatum und dem Hypothalamus bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C tiefgefroren und für die mRNA- und Protein-Analytik verwendet.

Die Präparation der RNA aus den einzelnen Arealen erfolgte wie in 2.2.4. beschrieben. Nach dem Umschreiben in cDNA wurde eine quantitative PCR mit GLT-1-spezifischen Primern unter gleichzeitiger 18S-rRNA-Expressionsbestimmung durchgeführt. In Abbildung 3.6. sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen als Ausmaß der GLT-1-mRNA-Expression im Bezug auf die 18S-rRNA-Expression dargestellt.

Bei den Untersuchungen konnten in keinem der untersuchten Hirnareale Unterschiede in der GLT-1-mRNA-Expression zwischen Ceftriaxon-behandelten Tieren und Kontrolltieren festgestellt werden.

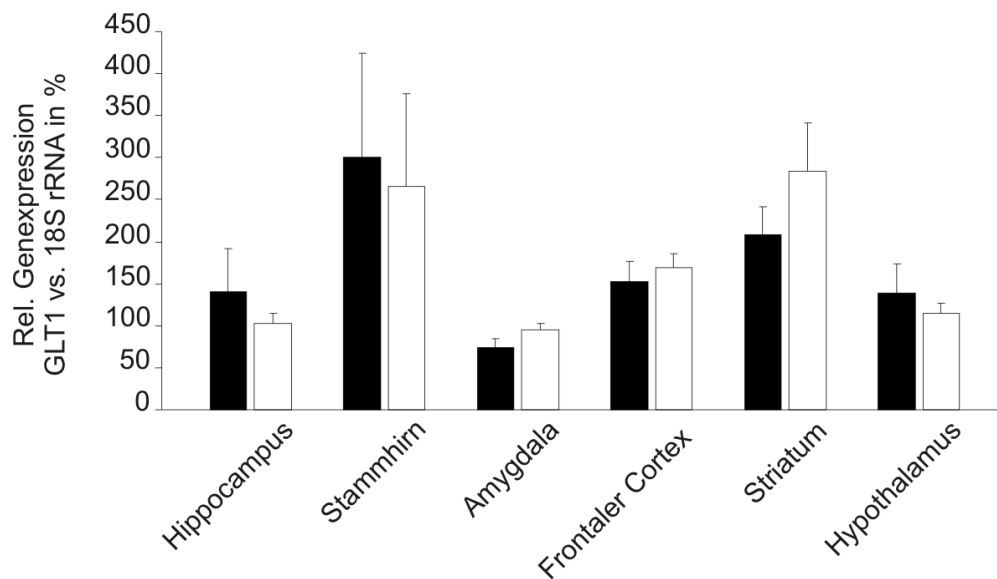


Abbildung 3.6. graphische Darstellung der relativen GLT-1-mRNA Expression in verschiedenen Hirnarealen der Ratte, dargestellt in Prozent, normalisiert auf 18S-rRNA-Expression; Anzahl der Vehikel-behandelten Tiere (weiß) n=6; Anzahl der Ceftriaxon-behandelten Tiere (schwarz) n=7.

3.3. Nachweis von GLT-1-Protein im Gehirn der Ratte unter Ceftriaxon-Behandlung

Nachweis von GLT-1-Protein in verschiedenen Hirnarealen der Ratte unter Ceftriaxon-Behandlung

Simultan zu den Untersuchungen zur GLT-1-mRNA-Expression in verschiedenen Hirnarealen wurde gemäß den Vorgaben aus 2.2.1. aus Gehirnen von Tieren, die für fünf Tage einmal täglich entweder Ceftriaxon in einer Dosierung von 200 mg/kg KG *i.p.* oder ein adäquates Volumen von 0,9% NaCl *i.p.* erhalten haben, spezifische Hirnregionen präpariert, aus welchen Proteinproben nach der Vorschrift 2.2.3. isoliert wurden. Bei den Hirnregionen handelt es sich wie bei den Untersuchungen zur GLT-1-mRNA-Expression um den Hippocampus, das Stammhirn, die Amygdala, den frontalen Cortex, das Striatum sowie den Hypothalamus. Für diese Untersuchungen wurden aus der Ceftriaxon-Gruppe vier Tiere und aus der Kontrollgruppe drei Tiere verwendet.

Die gewonnenen Proteinproben, die den Bestand an Gesamtprotein der einzelnen Regionen zum Zeitpunkt der Präparation repräsentieren, wurden mittels der unter 2.2.1. und 2.2.3. beschriebenen Methoden aufbereitet, elektrophoretisch getrennt und mit Antikörpern gegen das GLT-1-Protein sowie gegen das ubiquitär in tierischen Zellen vorkommende Enzym Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) inkubiert und entsprechend detektiert. Durch die Markierung der GAPDH-Banden konnten eventuelle Inhomogenitäten bei der Proteinbeladung detektiert werden.

Die in Abbildung 3.7. dargestellten Ausschnitte aus dem entsprechend den Vorgaben in 2.2.3. entwickelten Films als Resultat des *Western blots* auf GLT-1-Protein und GAPDH-Protein zeigen jeweils den Ausschnitt der Membran, der die Banden des GLT-1-Proteins bei 70 kDa sowie die Banden des gleichzeitig durchgeführten GAPDH-Nachweises bei 24 kDa repräsentiert. Wie im Bereich der GAPDH-Bande zu erkennen ist, wurden bei der Beladung des SDS-PAGE-Gels äquivalente Proteinmengen verwendet, was sich in homogenen Intensitäten der GAPDH-Banden darstellt.

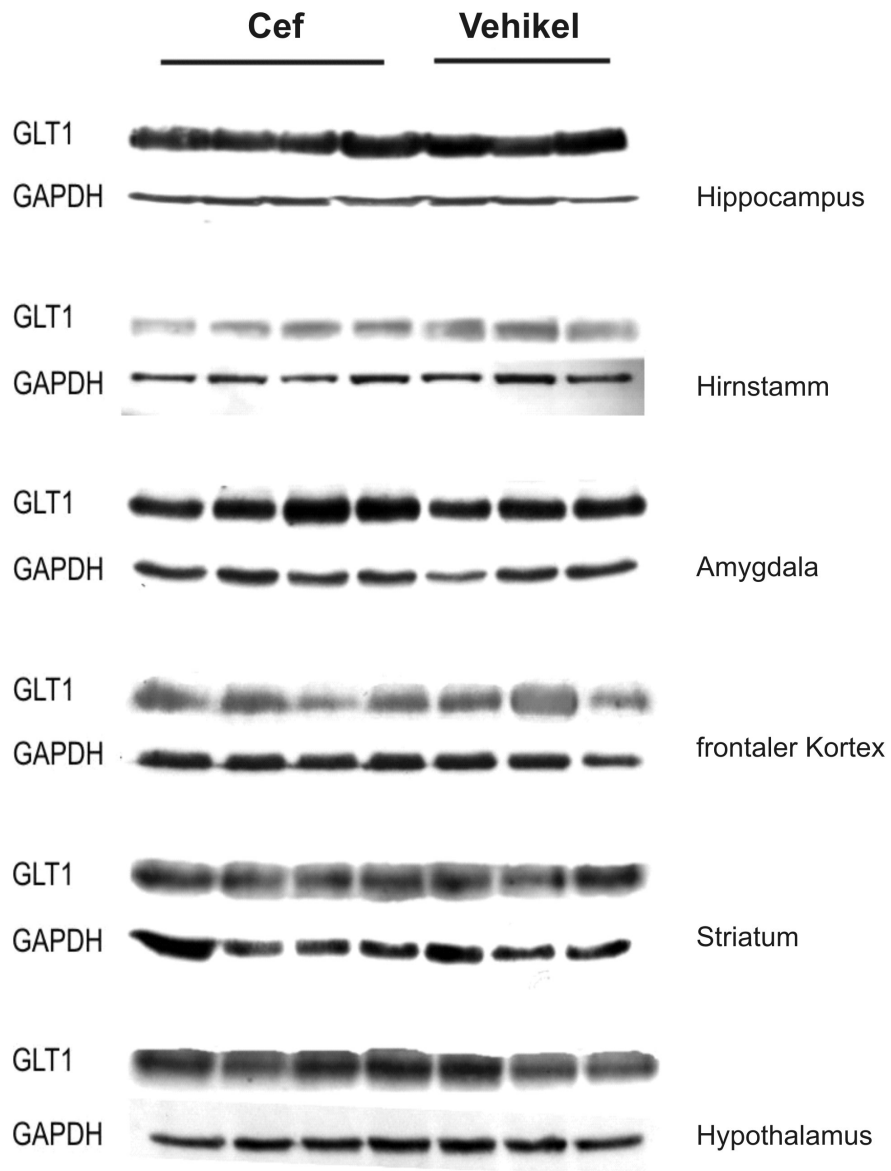


Abbildung 3.7. Ausschnittsweise Darstellung des *Western blot*-Films mit Proben aus verschiedenen Hirnarealen der Ratte, dargestellt sind die Banden des GLT-1- und GAPDH-Proteins.

Wie in der Abbildung 3.7. zu sehen ist, sind keine Unterschiede in der Konzentration des GLT-1-Proteins innerhalb der untersuchten Hirnregionen zwischen den mit Ceftriaxon behandelten Tieren und den mit NaCl-Lösung behandelten Tieren zu beobachten.

3.4. Isolierung, Identifizierung und Kultur von Astrozyten aus der Ratte

Isolierung primärer Astrozyten der Ratte

Als Grundlage aller in Folge beschriebenen *in vitro*-Ergebnisse dienten Untersuchungen an primären Astrozyten der Ratte. Diese wurden, wie unter 2.2.2. beschrieben, aus neonatalen Ratten im Alter von maximal drei Tagen *post partum* gewonnen. Unter mikroskopischer Betrachtung imponieren die solitär wachsenden Astrozyten, also Astrozyten ohne Kontakt zu Nachbarzellen, als sternförmige Zellen mit einer durchschnittlichen Größe von 10-12 μm und den charakteristischen Plasmafortsätzen, die diesen Zellen ihren Namen gaben. In Abbildung 3.8. ist das mikroskopische Bild mehrerer solitär wachsender Zellen in einer 200-fachen Vergrößerung zu sehen.

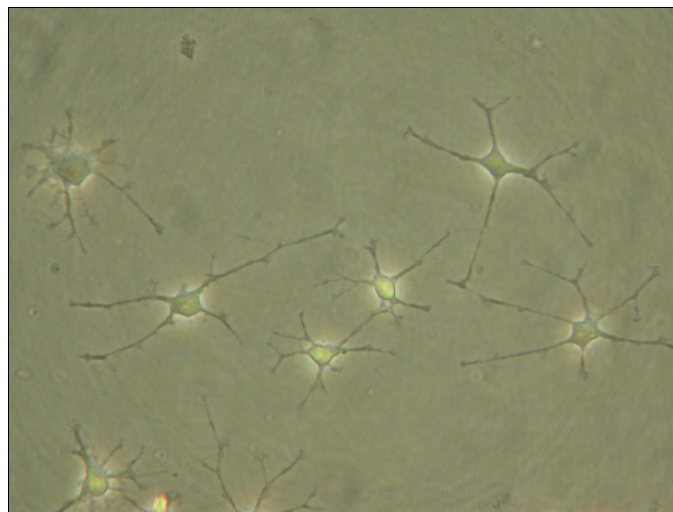


Abbildung 3.8. Lichtmikroskopische Darstellung solitär wachsender Astrozyten in Primärkultur (Vergrößerung 200x).

Im Zellverband, in dem sich alle Zellen konfluent auf dem Boden des Zellkulturgefäßes und mit unmittelbarem Kontakt zu den jeweiligen Nachbarzellen befinden, zeigen sich die Zellen in einer Fibroblasten-ähnlichen Form. In Abbildung 3.9. ist das mikroskopische Bild eines Zellverbandes in einer 100-fachen Vergrößerung dargestellt. Die amorphen braunen Stücke stellen Gewebsreste aus der Präparation dar.

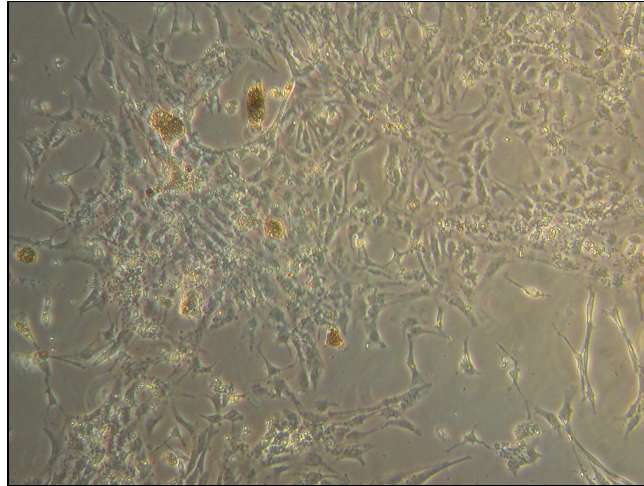


Abbildung 3.9. Lichtmikroskopische Darstellung im Zellverbund wachsender Astrozyten in Primärkultur (Vergrößerung 100x).

Unter denen in 2.2.2. genannten Bedingungen wachsen die Zellen im Allgemeinen innerhalb von 10-12 Tagen nach der Präparation zur nahezu völligen Konfluenz heran.

Um Entdifferenzierungsprozesse innerhalb der Kultur zu vermeiden, wurden für die *in vitro*-Experimente in Übereinstimmung mit entsprechenden Beobachtungen aus der Literatur keine Zellen verwendet, die über die 4. Passage hinaus kultiviert wurden (Pertusa 2007; Campisi 1992).

Identifizierung der gewonnenen Astrozyten aus der Ratte

Zur Identifizierung der Astrozyten wurde eine Immunzytofluoreszenzchemie mit Antikörpern gegen das gliäre fibrilläre saure Protein (*glial fibrillary acidic protein* – GFAP), welches als Markerprotein für Astrozyten gilt (Eng 2000), durchgeführt. Ein gleichzeitig verwendetes Immunglobulin, welches gegen die anti-GFAP-Antikörper gerichtet und mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3 konjugiert ist, dient der visuellen Identifizierung der Zellen nach Anregung des Farbstoffs im Fluoreszenzmikroskop.

In Abbildung 3.10. ist auf der linken Seite eine lichtmikroskopische Aufnahme von Zellen zu sehen, die nach den unter 2.2.2. beschriebenen Methoden isoliert und kultiviert wurden. Auf der rechten Seite dieser Abbildung ist das entsprechende fluoreszenzmikroskopische Korrelat des linken Bildes zu sehen. Hierbei fällt auf, dass nicht alle Zellen des Zellkonglomerats das Fluoreszenzsignal in der für den Antikörper-markierenden Fluoreszenzfarbstoff typischen Farbe zeigen. Dieser Befund lässt darauf schließen, dass aufgrund der Konfluenz der Zellen nicht jede Zelle der Antikörpermarkierung zugänglich war.

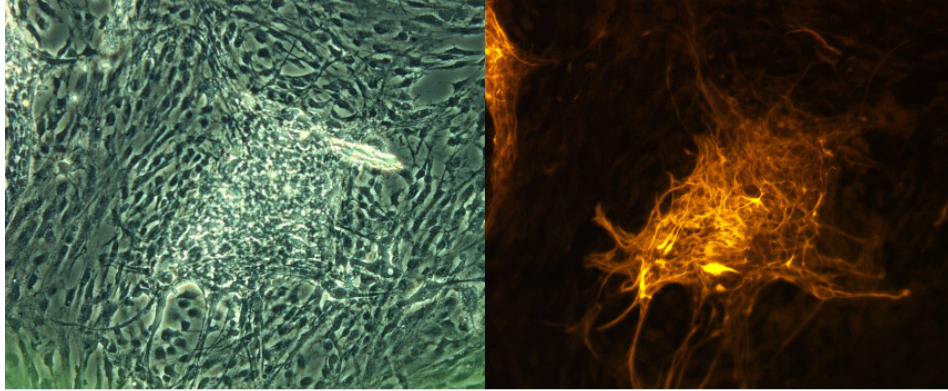


Abbildung 3.10. Lichtmikroskopische (links) und fluoreszenzmikroskopische (rechts) Darstellung eines Zellverbandes von Astrozyten (Vergrößerung 100x).

Zur sicheren Identifizierung der Zellen wurden zudem Präparate mit weniger konfluent wachsenden Zellen entsprechend den Vorgaben aus 2.2.5. behandelt und fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet. In Abbildung 3.11. ist ein solitär wachsender Astrozyt in der Fluoreszenzmikroskopie dargestellt. Man erkennt hierbei das den gesamten Zellkörper umfassende Fluoreszenzsignal

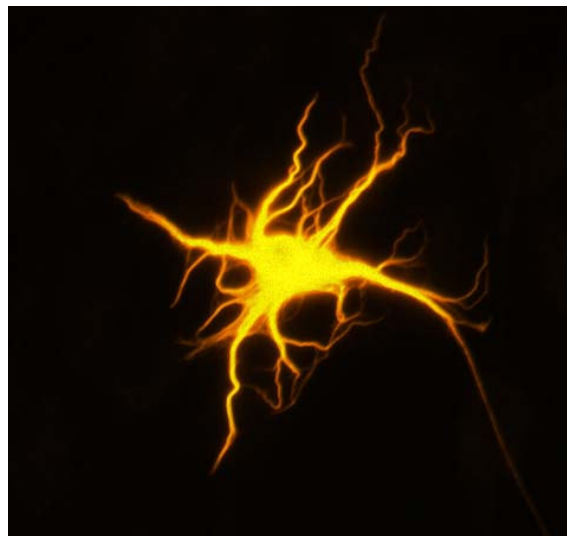


Abbildung 3.11. Fluoreszenzmikroskopische Darstellung eines einzelnen, GFAP-positiven Astrozyten (Vergrößerung 500x).

3.5. Untersuchungen zu Expression und Gehalt des GLT-1 in Astrozyten der Ratte

Nachweis der GLT-1-mRNA in Astrozyten der Ratte mittels qualitativer RT-PCR

Zum Nachweis der GLT-1-mRNA in primären Astrozyten der Ratte wurde RNA aus Astrozyten verwendet, welche entweder für fünf Tage mit 0,9% NaCl-Lösung inkubiert oder für den gleichen Zeitraum mit 100 µM Ceftriaxon behandelt wurden. In Abbildung 3.12. sind die in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennten Reaktionsprodukte der Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase Chain Reaction* - PCR) mit GLT-1- und 18S-rRNA-spezifischen Primern dargestellt. Eine gleichzeitig aufgetrennte „DNA-Leiter“ dient dem Größenvergleich. Eine gleichzeitig durchgeführte „Wasserprobe“ zeigte sowohl bei der GLT-1- als auch bei der 18S-rRNA-PCR-Reaktion keine Produkte und wurde daher in der Abbildung nicht dargestellt. Wie in der Abbildung 3.12. dargestellt, ist in beiden Behandlungsgruppen eine homogene Expression der 18S-rRNA und der GLT-1-mRNA erkennbar, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die kultivierten Zellen GLT-1-mRNA exprimieren.

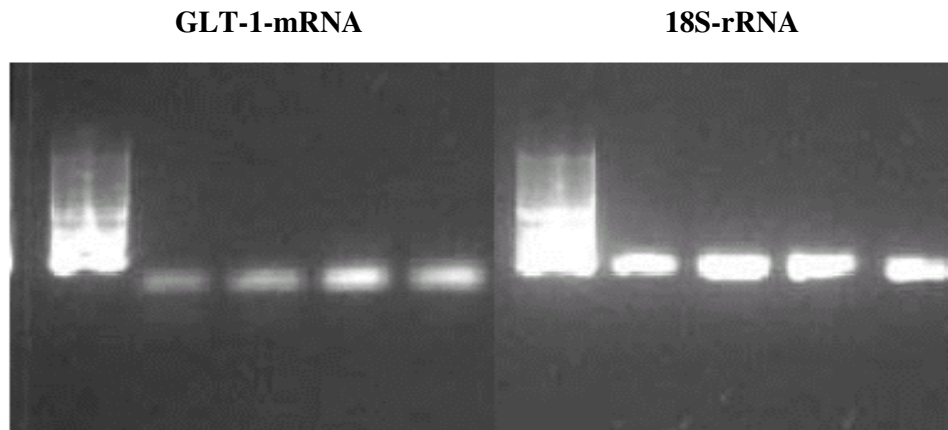


Abbildung 3.12. Bilder von Agarosegelen unter UV-Betrachtung mit Produkten der RT-PCR auf GLT-1-mRNA (links) und 18S-rRNA (rechts) aus RNA-Proben kultivierter Astrozyten; Beladung jeweils von links nach rechts: DNA-Leiter - Vehikel - Vehikel - Ceftriaxon - Ceftriaxon.

Nachweis von GLT-1-Protein mittels Immunfluoreszenzmikroskopie in primären Astrozyten der Ratte

Zum Nachweis des GLT-1-Transporters und des glialen Markerproteins *glial fibrillary acidic protein* (GFAP) in der Immunfluoreszenzmikroskopie wurden kultivierte Astrozyten der Ratte gemäß den Protokollen in 2.2.2. und 2.2.5. entweder mit 100 μ M Ceftriaxon, mit 200 μ g/ml dbcAMP oder mit 0,9% NaCl-Lösung behandelt und entsprechend aufbereitet. Zur Markierung wurden Primärantikörper gegen das GLT-1- und GFAP-Protein, die entsprechenden Sekundärantikörper sowie ein als DAPI bezeichneter Kernfarbstoff verwendet. In Abbildung 3.13. ist eine repräsentative Zusammenstellung von Aufnahmen der Fluoreszenzmikroskopie mit identischen Belichtungszeiten zu sehen. In der oberen Bildzeile sind Zellen dargestellt, welche als Negativkontrolle mit einer 0,9% NaCl-Lösung behandelt wurden. Die mittlere Bildzeile stammt von Zellen, die für fünf Tage mit 100 μ M Ceftriaxon behandelt wurden, während in der unteren Bildzeile Zellen zu sehen sind, die als Positivkontrolle mit 200 μ g/ml dbcAMP für drei Tage behandelt wurden. Eine gleichzeitig durchgeführte Kontrolle mit Zellen ohne fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper ergab keinerlei Autofluoreszenz, so dass auf eine Abbildung dieser Aufnahmen verzichtet wurde.

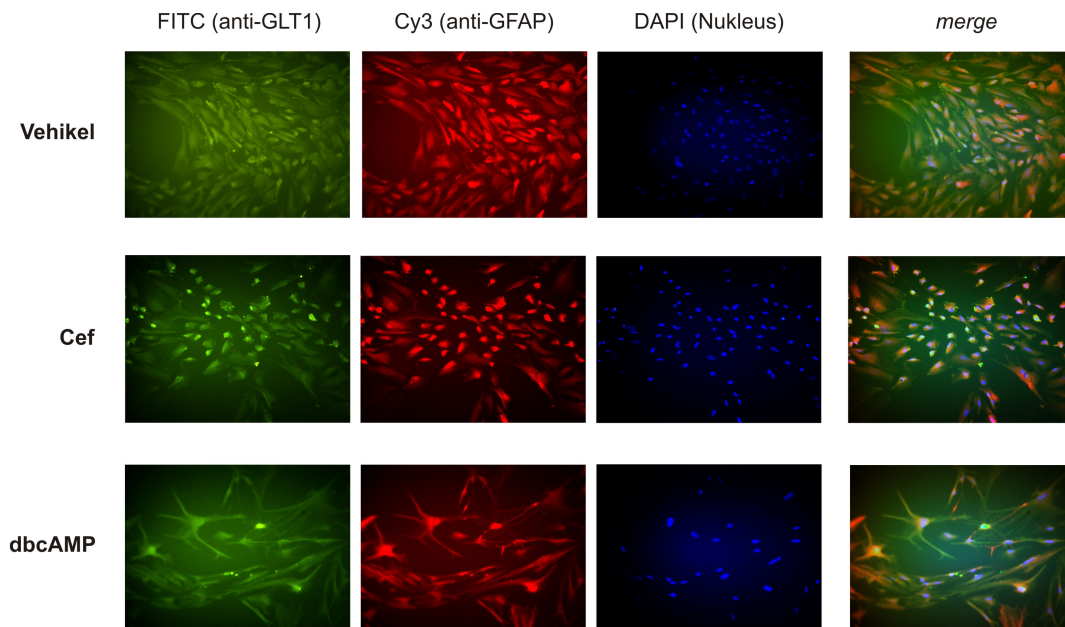


Abbildung 3.13. Zusammenstellung von Bildern der Immunfluoreszenzmikroskopie auf verschiedene Proteine sowie einer DAPI-Färbung bei jeweils gleichen Astrozyten (Vergrößerung 200x).

In der linken Bildspalte sind die Aufnahmen zu sehen, die durch Interaktion des GLT-1-Proteins der Zellen mit den entsprechend spezifischen Primär- und Sekundärantikörpern zustande gekommen sind. In der zweiten Bildspalte von links sind entsprechende Aufnahmen zum Nachweis des glialen Markerproteins GFAP zu sehen, während die dritte Spalte von links die Bilder einer nicht zellspezifischen, aber zellorganellspezifischen Kernfärbung mittels DAPI enthält. Auf der ganz rechten Seite sind dann die Kompositionen der vom im Mikroskop integrierten Software (Openlab 3.1.7.) übereinandergelegten (*merge*-Modus) Bilder zu sehen.

Die Ergebnisse der Immunfluoreszenzmikroskopie zeigen, dass alle untersuchten Zellen das GLT-1-Protein enthalten. Bei der vergleichenden Betrachtung ist jedoch kein signifikanter Unterschied im GLT-1-Gehalt zwischen den Behandlungsgruppen zu erkennen, wobei selbst in der Positivkontrolle keine signifikante Steigerung des GLT-1-Signals zu beobachten war.

Quantitativer Nachweis der GLT-1-mRNA-Expression in Astrozyten der Ratte

Zur quantitativen Bestimmung der GLT-1-mRNA-Expression wurden kultivierte Astrozyten gemäß der unter 2.2.2. beschriebenen Vorschrift für fünf Tage mit Ceftriaxon in einer Konzentration von 100 μ M behandelt. Als Positivkontrolle für die GLT-1 Expression dienten Zellen, welche für drei Tage mit dbcAMP in einer Konzentration von 200 μ g/ml behandelt wurden, während für die Negativkontrolle Zellen verwendet wurden, die anstelle Ceftriaxon ein adäquates Volumen an 0,9% NaCl-Lösung erhalten haben. Nach dem Ende der Behandlungsmodi wurde nach den in 2.2.4. beschriebenen Methoden aus den Zellen RNA gewonnen. Der quantitative Nachweis der GLT-1-mRNA- und 18S-rRNA-Expression erfolgte durch eine *Real-time* RT-PCR. In Abbildung 3.14. ist die graphische Darstellung dieser Untersuchung zu sehen. Die Expressionsdaten stammen aus jeweils drei unterschiedlichen Ansätzen, wobei jede Gruppe dreifach vermessen wurde. Die „Wasserprobe“ als interne Kontrolle genomischer DNA-Kontaminationen von Primern und Chemikalien wurde sowohl für die GLT-1- als auch für die 18S-rRNA-PCR durchgeführt.

Wie in der Abbildung 3.14. ersichtlich, zeigen die Expressionswerte für die GLT-1-mRNA, jeweils bezogen auf die 18S-rRNA, in der Gruppe der Ceftriaxon-behandelten Zellen keine signifikante Veränderung im Vergleich zu den Expressionswerten der Kontrollgruppe. Bei der Positivkontrolle lässt sich dagegen eine signifikant gesteigerte Expression der GLT-1-mRNA gegenüber der Kontrollgruppe beobachten.

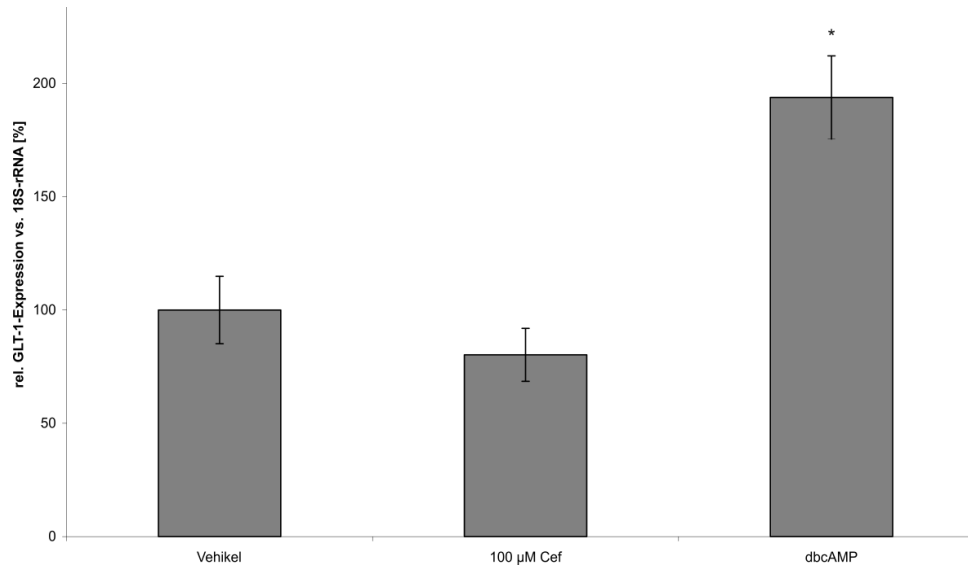


Abbildung 3.14. Graphische Darstellung der relativen GLT-1-mRNA Expression in kultivierten Astrozyten, dargestellt in Prozent, normalisiert auf 18S-rRNA-Expression; n=3; * p<0,05 vs. Vehikel.

Quantitativer Nachweis der GLT-1-mRNA-Expression in Astrozyten der Ratte unter Ceftriaxon-Behandlung mit verschiedenen Ceftriaxon-Chargen

Bei diesem Experiment wurden, wie im vorigen Experiment auch, Astrozyten gemäß der unter 2.2.2. beschriebenen Vorschrift für fünf Tage mit Ceftriaxon in einer Konzentration von 100 µM behandelt. Als Positivkontrolle für die GLT-1-Expression dienten Astrozyten, die für drei Tage mit dbcAMP in einer Konzentration von 200 µg/ml behandelt wurden. Die Kontrollgruppe wurde aus Zellpopulationen gebildet, die anstelle von Ceftriaxon NaCl-Lösung in der Konzentration von 0,9% in einem der Ceftriaxon-Lösung äquivalenten Volumen erhalten haben. Die Ceftriaxon-Gruppe wurde hier aber nochmals differenziert. Eine Gruppe erhielt das in den vorherigen Versuchen schon verwendete und als Human-Arzneimittel zugelassene Ceftriaxon der Firma Roche, welches unter dem Handelsnamen *Rocephin* vertrieben wird. Einer anderen Gruppe von Zellen wurde dagegen das nur für Laboruntersuchungen zugelassene Ceftriaxon der Firma SIGMA in das Medium appliziert. Nach dem Ende der Behandlungsmodi wurde nach den in 2.2.4. beschriebenen Methoden die mRNA aus den Zellen präpariert. Diese mRNA wurde dann analog zum vorherigen Experiment in cDNA umgeschrieben, welche dann mittels GLT-1- und 18S-rRNA-spezifischer Primer auf die Expression von GLT-1-mRNA und 18S-rRNA in der *Real-time* PCR untersucht wurde. In Abbildung 3.15. sind die Ergebnisse dieser Untersuchung dargestellt.

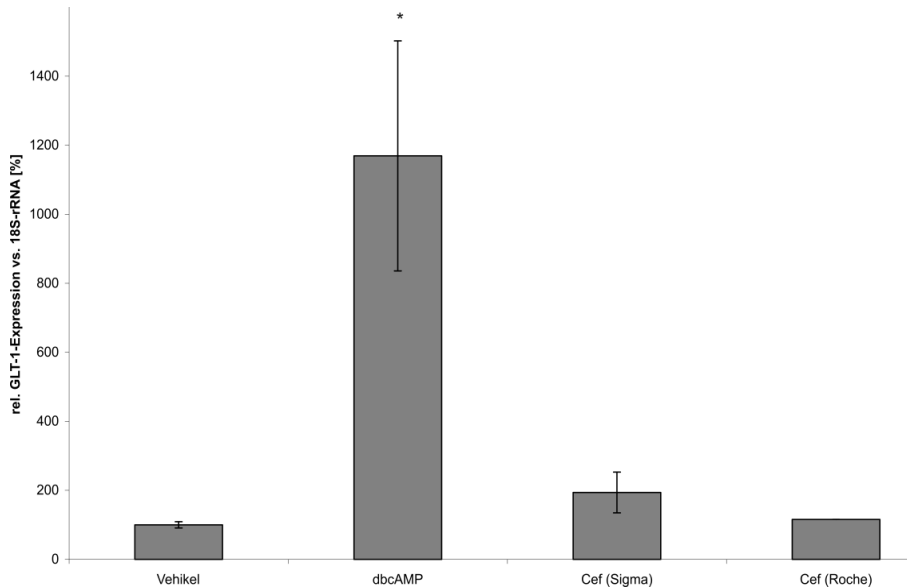


Abbildung 3.15. graphische Darstellung der relativen GLUT-1-mRNA Expression in Prozent, normalisiert auf 18S-rRNA-Expression; n=3; * p<0,05 vs. Vehikel.

Wie in der vorigen Untersuchung auch, zeigt sich im Vergleich zwischen der Kontrollgruppe und den beiden Ceftriaxon-Gruppen keine signifikant erhöhte Expression von GLUT-1-mRNA, während die Zellen, welche mit dbcAMP behandelt wurden, signifikant erhöhte GLUT-1-mRNA-Expressionswerte zeigen.

Quantitativer Nachweis der GLUT-1-mRNA-Expression in Astrozyten der Ratte unter Ceftriaxon-Behandlung in verschiedenen Ceftriaxon-Konzentrationen

Für diese Untersuchung wurden Astrozyten gemäß der unter 2.2.2. beschriebenen Prozedur mit Ceftriaxon für fünf Tage in Konzentrationen von 1 mM, 100 µM, 10 µM und 1 µM Ceftriaxon behandelt. Als Negativkontrolle dienten Zellen, welche anstelle von Ceftriaxon im gleichen Behandlungszeitraum eine sterile isotone NaCl-Lösung (0,9%) gleichen Volumens erhalten haben.

Nach dem Ablauf der Behandlung wurde aus den Zellen die RNA isoliert und mittels einer RT-Reaktion in cDNA umgeschrieben. Danach wurde die cDNA wie in unter 2.2.4. beschriebenen Untersuchungen einer quantitativen Analyse der GLUT-1-mRNA- und 18S-rRNA-Expression unterzogen.

In Abbildung 3.16. ist die graphische Darstellung dieser Untersuchung zu sehen. Die Expressionsdaten stammen aus drei unterschiedlichen Versuchsansätzen, wobei jede Gruppe jeweils dreifach vermessen wurde.

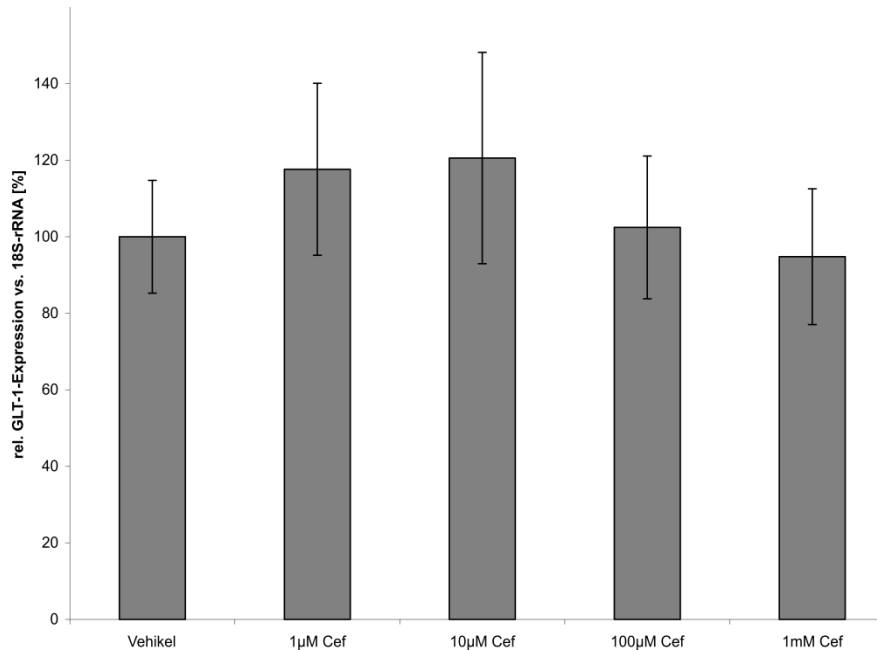


Abbildung 3.16. graphische Darstellung der relativen GLT-1-mRNA Expression in kultivierten Astrozyten, dargestellt in Prozent, normalisiert auf 18S-rRNA-Expression; n=3.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigen, dass keine der hier gewählten Ceftriaxon-Konzentrationen zu einer im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant gesteigerten GLT-1-mRNA-Expression geführt hat.

Nachweis von GLT-1-Protein in Astrozyten der Ratte unter Ceftriaxon-Behandlung

Für die hier gezeigten *Western blot* Untersuchungen wurden primäre Astrozyten der Ratte nach Erreichen der entsprechenden Konfluenz mit 100 µM Ceftriaxon für fünf Tage behandelt. Als gleichzeitige Positivkontrolle wurde ein separater Ansatz von Zellen mit 200 µg/ml dbcAMP für drei Tage behandelt. Als Negativkontrolle dienten Zellen, welche anstelle von Ceftriaxon im gleichen Behandlungszeitraum eine sterile isotone NaCl-Lösung (0,9%) gleichen Volumens erhalten haben.

Die dieser *Western blot*-Untersuchung zugrundeliegenden Proteingemische wurden aus jeweils drei verschiedenen Ansätzen gewonnen, während sich die Kontrollgruppe aus zwei verschiedenen Ansätzen zusammensetzt. In Abbildung 3.17. sind die untersuchten Gruppen im Abschnitt des entsprechend belichteten Films zu sehen, der dem Größenbereich des GLT-1-Proteins (70 kDa) und dem des GAPDH-Proteins (24 kDa) entspricht.

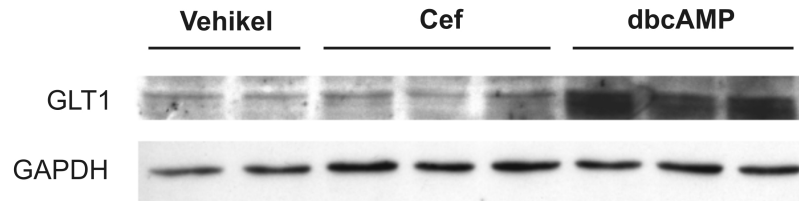


Abbildung 3.17. Ausschnittsweise Darstellung des *Western blot* Films mit Proteinproben kultivierter Astrozyten, dargestellt sind die Banden des GLUT-1- und GAPDH-Proteins.

Die in Abbildung 3.17. dargestellten Ausschnitte aus dem entsprechend den Vorgaben in 2.2.2. entwickelten Films als Resultat des *Western blots* auf GLUT-1- und GAPDH-Protein zeigt oben den Ausschnitt, der neben einigen Nebenbanden die Banden des GLUT-1-Proteins bei 70 kDa präsentiert, und unten das Areal des simultanen GAPDH-Nachweises bei 24 kDa. Wie im Bereich der GAPDH-Bande zu erkennen ist, wurden bei der Beladung des SDS-PAGE-Gels äquivalente Proteinmengen verwendet, was sich in homogenen Bandenintensitäten für GAPDH zeigt. Im Bereich der GLUT-1-Banden ist erkennbar, dass sich die Bandenintensitäten zwischen der Gruppe der mit der Vehikellösung behandelten Zellen und der mit 100 μM Ceftriaxon behandelten Zellen in nur sehr geringem Maße unterscheiden. Weiterhin lässt sich erkennen, dass die Bandenintensitäten der Gruppe der mit 200 $\mu\text{g/ml}$ dbcAMP behandelten Zellen sehr viel ausgeprägter als in den Gruppen der mit der Vehikellösung behandelten Zellen und der mit 100 μM Ceftriaxon behandelten Zellen sind.

3.6. Untersuchungen zur Aktivität des GLUT-1-Promotors in Astrozyten der Ratte unter Ceftriaxon-Behandlung

Untersuchungen zur Transfektion primärer Astrozyten der Ratte

Um Untersuchungen zur Aktivität des GLUT-1-Promotors, wie unter 2.2.2. und 2.2.4. beschrieben, durchführen zu können, musste die Eignung der Zellen für eine adäquate Transfektion überprüft werden, da die Promotoraktivität über einen mittels Transfektion in die Zelle gebrachten exogenen Promotor untersucht wird. Da zur Transfektion primärer Astrozyten der Ratte keine Angaben in der Literatur angegeben waren, wurde mittels Transfektion eines pEGFP-N1-Plasmids, welches für das *Endogenous Green Fluorescenting Protein* kodiert, überprüft, inwieweit sich unter dem in 2.2.2. beschriebenen Verfahren die

Zellen transfizieren lassen. Das Ergebnis einer erfolgreichen Transfektion kann dann mittels der Fluoreszenzmikroskopie verifiziert werden.

In Abbildung 3.18. sind die aus der Fluoreszenzmikroskopie gewonnenen Bilder in einer 100-fachen Vergrößerung zu sehen. Auf der rechten Seite ist eine Zellpopulation zu sehen, welche als Negativkontrolle anstelle des pEGFP-N1-Plasmids mit einem entsprechenden Leer-Plasmid bei sonst identischer Methodik transfiziert wurde.

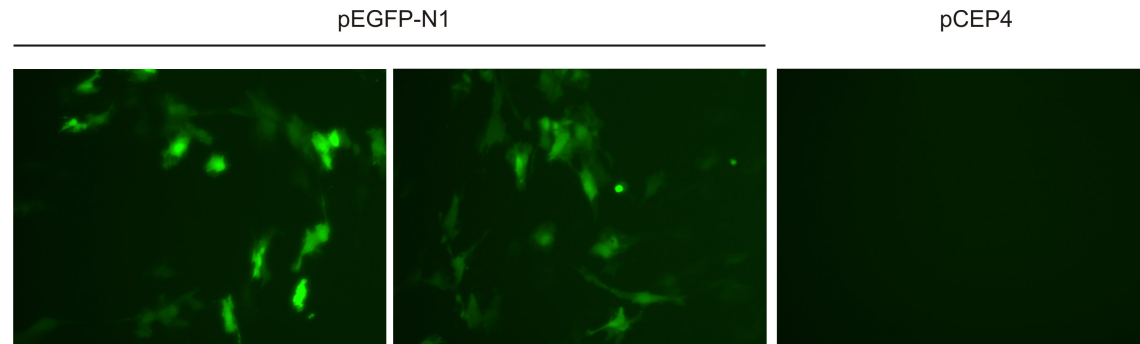


Abbildung 3.18. Fluoreszenzmikroskopische Übersichtsaufnahme von kultivierten Astrozyten, die mit dem pEGFP-N1-Vektor (links und Mitte) oder mit dem pCEP4 Leer-Vektor (rechts) transfiziert wurden (Vergrößerung 100x).

Wie in der Abbildung 3.18. zu sehen ist, konnte bei zahlreichen Zellen, eine deutliche Grünfärbung unter entsprechender Fluoreszenzanregung beobachtet werden, was eine erfolgreiche Transfektion mit dem pEGFP-N1-Plasmid beweist. Bei einer ebenfalls durchgeführten Transfektion der Zellen mit einem entsprechenden Leer-Plasmid war dagegen keinerlei grüne Fluoreszenz feststellbar. Somit konnte nachgewiesen werden, dass die verwendeten Astrozyten einer chemischen Transfektion nach der in dieser Arbeit verwendeten Methode zugänglich sind.

Klonierung und Sequenzierung des GLT-1-Promotors der Ratte

Der GLT-1-Promotor wurde entsprechend den unter 2.2.4. aufgeführten Vorgaben kloniert. Da in der Literatur und in entsprechenden Datenbanken die Sequenz des GLT-1-Promotors der Ratte noch nicht beschrieben wurde, ist an dem entsprechenden Promotorklon eine Sequenzanalyse durchgeführt wurden. In Abbildung 3.19 ist die vollständige Sequenz des Promotors mit einer Größe von 1288 Basen *upstream* des translationalen Startpunkts aufgeführt.

Unter der Kennung DQ489741.1 GI:94958152 ist diese Sequenz in der „*NCBI gene-bank*“ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nucore&id=94958152>) veröffentlicht worden.

```

GTTGGTGGAA GAGATACGTC TCCAGCACTT GGCCTGGGGA GTGGGGGTGG GGGTGGGAGT
GGGGGTTAGG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG AGAGAGAGAG
AGAGAGAGAT TATGGCCTCC CTCACACCCC GCCCGCCCTC GGAGAACCAC ATTAATATTA
ATATAGACGA ATGATCGAAT GTCCGGGATT TATTCGGGCC CCGGCGATGA AGGACCCGCA
GCTGGGTGCG GGTTCTTCC GGCACCTGA GTGTTTCTGC AGCTCAGATT CTGTGGGACT
CCCCATCCCA GAAGTGGTAG GATGAGGGTG GGTGTGCCGG TCTGTGTGAT GTGAGCACGA
GCAGATGTCC AGGGAGTGAT GGGGACCGCC AAGGCTTCTC CAAGGATTGG GGACGAGGG
GCATCCCGGG TCTCAGCACT TGGCCAGCA CAGGGTGACC CGGGGCCACT CGGACGCGAG
AAGAAACAAT AGCGACTCCT TAGACCCTGG GATCCTGCCA CTGGCTGTCC AAAGCGTTCC
CGGACTACCG GCAGAGCCTT TTTTTTTTTT TTTTTTTTTT TGGTTAATTT ATGACTGGAG
ACTGGTGGGG GGAGGGACAA CAGAAGAGGG ACAGCGTCTA AAGATGGGGG GCAGGGGCAA
CGGTTAAAGA AGTCGCCCCA GGCTGAGGCT CGGGTGATGT CAGCTCTGGA CAAAATAGA
GAGCGATCGC CTGCAATCC CCAGCTCCGG CGGGGCTAAA CCTTGCAATC CCTCTTCGGC
CGGCGCCGAG CCAGGGCGCA GCAGCCTCCA CCGCCTCCCC CGGCGCGCAC ACACCAGCAC
ACGCGCACGC ACGCACACAC TCCCCCGCAC TCGCACTCCC GGCCTTCCCC AATCCCGCTC
GGTGACGGCC ACTCGTGGTA CGGTCTGCC CCGCGCGGAA GCACAGACAC AGGTGGCGGC
CAGGACGCAG GGAGCGTGTT CCTGCAGCCC TCGCACCAGC GCGACCTTGC AGGAGCCGGT
GTAAGATCCC CGTAGCTCCT CTCGGAGCGC TGGCCGCGAG CCGTTCACGG GAACCGGGAC
CGCGCGCGGT GGAAAGCCAG GACGTGGATT AGCGCCCGCA GCAGCCTCCG CGCGCGCCGA
GGCGCTAAGG GCTTACCCAG GAGGGGGTG CGAGGGCGGA GAGAGGCTGC CCGTAAATA
CCGCTCCCG CCGCACTCCG GGCTACCCA GCTCGTCGCC ACTGTCTCCA GACCGTCCCC
GGGAGGAGGG GTCGTTACC ACGCCATG

```

Abbildung 3.19. Sequenz des GLT-1-Promotors der Ratte mit endständigem Transkriptionsstartpunkt ATG.

Untersuchungen zur Aktivität des GLT-1-Promotors in primären Astrozyten der Ratte unter Ceftriaxon-Behandlung

Nachdem in einem Vorversuch mittels Transfektion des pEGFP-N1-Plasmids in kultivierten Astrozyten die Transfektionsfähigkeit der Zellen gezeigt werden konnte, wurde die Aktivität des GLT-1-Promotors in diesem Zellsystem unter Ceftriaxon-Behandlung untersucht. Die Zellen wurden gemäß dem unter 2.2.2. beschriebenen Protokoll mit dem zuvor klonierten GLT-1-Promotor transfiziert und danach entsprechend mit 100 µM Ceftriaxon, mit einem äquivalenten Volumen an 0,9% NaCl als Negativkontrolle oder mit 200 µg/ml dbcAMP als Positivkontrolle behandelt. Im Anschluss an die Behandlung wurden die Zellen entsprechend den Vorgaben aufbereitet und die relative Luciferase-Aktivität (RLA) als Maß für die Aktivierung des GLT-1-Promotors gemessen. In Abbildung 3.20. sind die Ergebnisse dieser Untersuchung dargestellt. Pro Behandlungsgruppe wurden drei Ansätze untersucht.

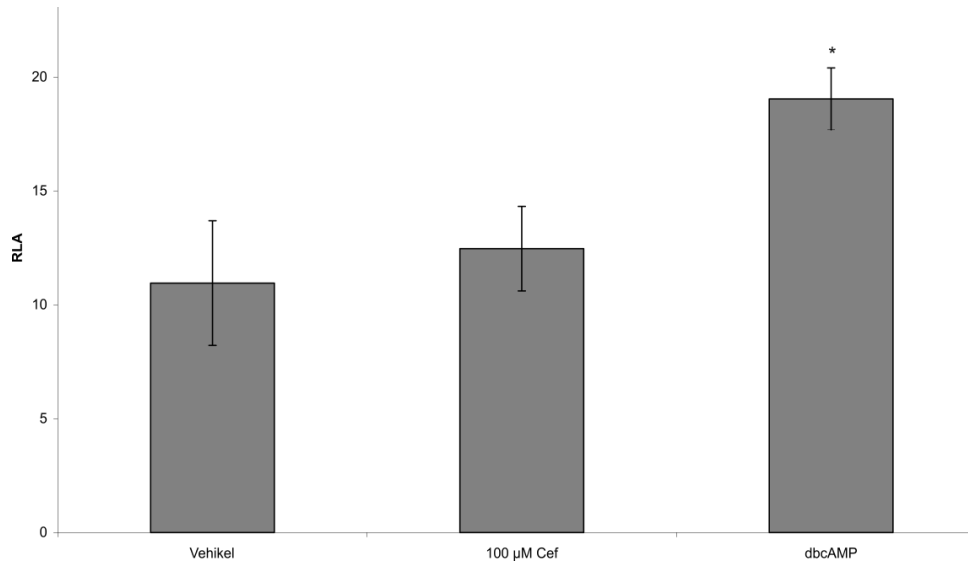


Abbildung 3.20. Graphische Darstellung der relativen Renilla-Luciferase Aktivität (RLA) in transfizierten Astrozyten der Ratte; n=3; * p<0,05 vs. Vehikel.

In der Abbildung 3.20. ist eine im Vergleich zur Kontrollgruppe fast um das Doppelte erhöhte Aktivität des GLT-1-Promotors in den Zellen, welche einer dbcAMP-Behandlung unterzogen wurden, zu beobachten, wobei dieser Unterschied nach statistischer Berechnung mit $p < 0,05$ als signifikant eingestuft werden kann. Kein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrollgruppe findet sich dagegen in der Aktivität des GLT-1-Promotors bei den mit Ceftriaxon behandelten Zellen.

3.7. Untersuchungen zur Glutamataufnahme in Astrozyten der Ratte unter Ceftriaxon-Behandlung

Um die Aktivität von transmembranären Transportern bestimmen zu können, kann man auf radioaktiv markierte Substrate, welche spezifisch für den untersuchten Transporter sind, zurückgreifen. In dieser Untersuchung wurden primäre Astrozyten, die gemäß den Vorschriften unter 2.2.1. für fünf Tage entweder mit $1 \mu\text{M}$ Ceftriaxon, mit $10 \mu\text{M}$ Ceftriaxon oder mit $100 \mu\text{M}$ Ceftriaxon behandelt wurden, im Anschluss an diese Behandlung mit Glutaminsäure inkubiert, bei der die ^1H -Protonen des Grundgerüsts der Aminosäure durch isotope ^3H -Atome ausgetauscht wurden. Nach der Inkubationszeit von 10 Minuten wurde der Überstand entfernt und nach Zelllyse die aufgenommene Glutamatmenge über die Messung der emittierten β -Strahlung im Lysat bestimmt. Eine parallel durchgeführte Proteinmessung in den Lysaten stellte eine homogene Verteilung der Zellen in den einzelnen Behandlungsgruppen sicher. In Abbildung 3.21. sind die Ergebnisse dieser Untersuchung,

einschließlich der gleichzeitig durchgeführten Messung an einer nur mit 0,9% NaCl gleichen Volumens als Kontrolle behandelten Zellpopulation sowie einer mit 200 µg/ml dbcAMP als Positivkontrolle behandelten Zellpopulation aufgeführt. Die Werte sind dabei als relative Radioaktivität, normalisiert auf die Radioaktivität der Vehikel-behandelten Gruppe, dargestellt.

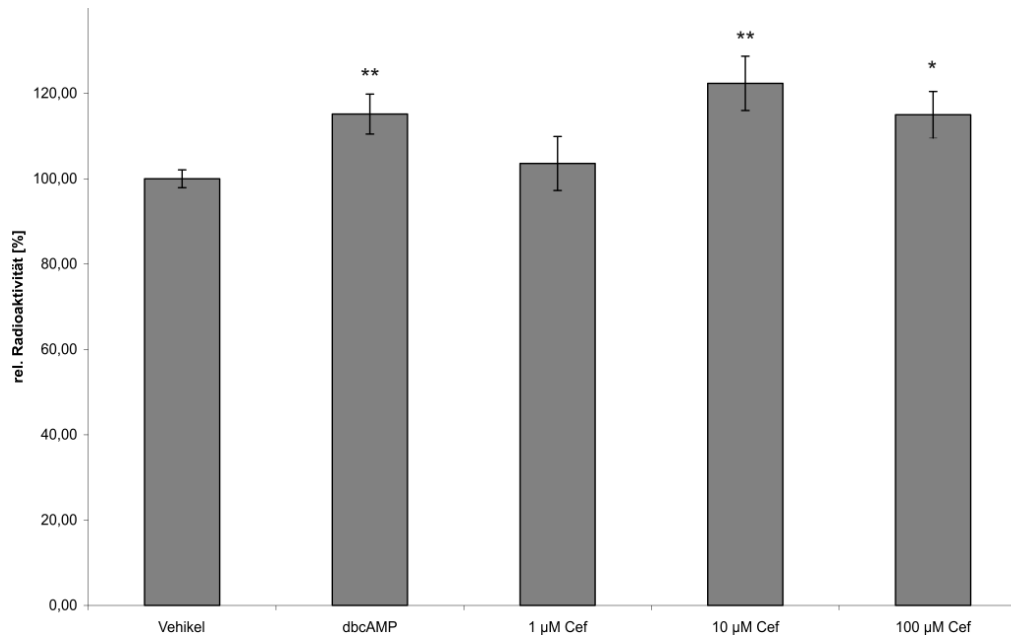


Abbildung 3.21. Graphische Darstellung der relativen Aktivität der Lysate von kultivierten Astrozyten in Prozent; n=4; * p<0,05 vs. Vehikel; ** p<0,01 vs. Vehikel.

Jede Untersuchungsgruppe umfasste jeweils vier Ansätze von jeweils unterschiedlichen Zellpopulationen. Wie aus der Abbildung 3.21. zu ersehen, führt eine Ceftriaxon-Behandlung für fünf Tage in einer Konzentration von 10 µM und 100 µM ebenso wie eine dreitägige dbcAMP-Behandlung zu einer signifikant erhöhten Radioaktivität im Zelllysate und damit zu einer erhöhten Glutamataufnahme.

4. Diskussion

Betrachtet man die Möglichkeiten einer pharmakologischen Intervention nach einem Schlaganfall, so muss man konstatieren, dass sich diese zur heutigen Zeit auf die Option einer raschen medikamentösen Revaskularisierung mittels Fibrinolytika beschränken (Stingele 2006). Trotz vieler Jahre intensiver Forschung ist man einem Wirkstoff, der in der Akutphase nach einem Schlaganfall gegeben werden kann und der die Mortalität, das Ausmaß des neurologischen Schadens oder die Größe des geschädigten Areals positiv im Sinne des Patienten beeinflussen kann, noch nicht näher gekommen. Zwar verbesserte eine Vielzahl von Stoffen die neurologische Situation im Tierversuch, doch erwiesen sich diese potentiellen Medikamente letztendlich nicht als effektiv im klinischen Test (Cheng 2004; Meisel 2004; Onal 1997) oder vermochten die akute Mortalität im Tierversuch beziehungsweise in einer klinischen Studie nicht zu verbessern (Meisel 2004; Onal 1997).

Bei der Überlegung, wie eine Substanz wirken muss, damit sie die Mortalität, das Ausmaß des neurologischen Schadens oder die Größe des durch den Schlaganfall geschädigten Areals positiv beeinflussen kann, kommt man grundsätzlich auf zwei verschiedene, mögliche Strategien. Während die erste Strategie über eine schnelle Wiederherstellung der Perfusion nach einem ischämischen Verschluss auf eine Reduktion des neurologischen Schadens und die Größe der infarzierten Areals zielt (Schaller 2004), hat die zweite Strategie weniger die Ursache des ischämischen Infarkts, sondern vielmehr die biochemischen und metabolischen Veränderungen, die in Folge des sistierten Blutflusses im Schadensgebiet auftreten, im Visier (Mehta 2007).

Bei diesen biochemischen und metabolischen Veränderungen handelt es sich um eine Vielzahl komplexer und miteinander verknüpfter Prozesse der Apoptose, der Inflammation, des oxidativen Stresses, der neurovaskulären Schädigung, der Genese elektrophysiologischer Abnormitäten sowie der durch Glutamat vermittelten Exzitotoxizität (Mehta 2007; Dirnagl 1999). Über eine exogen vermittelte Beeinflussung dieser Prozesse müsste den Neuronen die Möglichkeit gegeben werden, eine ischämische Phase und deren Folgen besser zu tolerieren, so dass sich auf diesem als Neuroprotektion bezeichneten Wege die Schäden nach einem Schlaganfall reduzieren lassen.

Eine weitere Möglichkeit, die zwar weniger Einfluss auf das Ausmaß des neurologischen Schadens und die Größe des Infarktolumens hat, dafür aber bei der Mortalität infolge von Begleitinfektionen nach einem Schlaganfall eine umso bedeutendere Rolle spielt, ist eine

effektive antibiotische Wirkung der potentiellen Substanz, welche die klinischen Folgen einer durch den Schlaganfall induzierten Immunsuppression senken kann (Meisel 2004).

Gerade der an zweiter Stelle genannte Mechanismus der Neuroprotektion ist über die Jahre durch eine Vielzahl von Untersuchungen genauer beleuchtet worden (Mehta 2007). Eine wichtige Komponente im Konzept der Neuroprotektion ist dabei die Prävention oder Reduktion exzitotoxischer Effekte, die durch erhöhte extrazelluläre Konzentrationen des exzitatorisch wirkenden Glutamats bedingt sind (Hazell 2007).

Da sich durch einige Veröffentlichungen in der letzten Zeit die Hinweise gemehrt haben, dass Ceftriaxon über eine Modulation des GLT-1-Systems im Gehirn eine potentielle Neuroprotektion vermitteln kann (Rothstein 2005; Chu 2007), wurde in dieser Arbeit unter anderem untersucht, welchen Einfluss Ceftriaxon auf die Akutmortalität, die neurologische Situation und die Größe des infarzierten Areals nach einem Schlaganfall *in vivo* hat.

Dazu wurden Ratten einem als *middle cerebral artery occlusion* (MCAO) bezeichneten Eingriff unterzogen, der zu einer lokalen Ischämie und einem daraus resultierenden ischämischen Schaden im Gehirn der Tiere führt. Der Nachweis der Wirksamkeit des Verschlusses der *Arteria cerebri media* durch die in dieser Arbeit verwendeten Methode konnte sowohl durch eine, an einzelnen Tieren exemplarisch angewendeten, MRT-gestützten Angiographie der zerebralen Gefäße und als auch durch die regelhaft durchgeführte transkraniale, Laser-basierte Dopplermessung des zerebralen Blutflusses erbracht werden. Bei beiden Methoden zeigt sich nach dem Platzieren des Fadens im Gefäß eine Reduktion des Blutflusses, welche jedoch nach Entfernen des Fadens reversibel war.

Um sicherzustellen, dass eventuelle Unterschiede in Akutmortalität, Infarktgröße und neurologisch-funktionellem Defizit nicht auf mögliche Stoffwechselveränderungen während des MCAO-Eingriffs zurückzuführen sind, wurde ein peri-operatives *monitoring* von Stoffwechselfparametern im Blut durchgeführt, bei dem jedoch keine Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen beobachtet werden konnten.

Ein wichtiges Kriterium zur Überprüfung möglicher neuroprotektiver Wirkungen von Ceftriaxon ist die Bestimmung der Akutmortalität oder akuten Sterblichkeit im Vergleich zwischen den Behandlungsgruppen. Der Terminus ‚akut‘ bezieht sich dabei auf den Zeitraum von 24 Stunden nach dem Eingriff.

Die erhobenen Daten zur Akutmortalität nach einem MCAO-Eingriff sind in Tabelle 3.2. aufgeführt und zeigen, dass in den Gruppen der mit Ceftriaxon behandelten Tiere eine signifikant verringerte Sterblichkeit nach einem MCAO-Eingriff im Vergleich zur Kontrollgruppe zu beobachten war. Auffällig bei dieser Untersuchung war weiterhin die

Tatsache, dass in der Gruppe von Tieren, welche nur post-operativ nach dem MCAO-Eingriff Ceftriaxon erhalten haben, kein einziges Tier innerhalb von 24 Stunden nach dem Eingriff verstorben war. Dieses Ergebnis konnte durch interne Untersuchungen an einer Gruppe von weiteren acht Tieren bestätigt werden, die nach einem MCAO-Eingriff täglich 200 mg/kg KG Ceftriaxon erhalten hatten. Von dieser Gruppe, die vier Wochen lang nach der MCAO-Operation observiert wurde, starb ebenfalls kein Tier. Da hier aber keine Ergebnisse zum Langzeitüberleben einer Kontrollpopulation erhoben wurden, erlauben diese zuletzt genannten Daten jedoch keine vergleichenden Aussagen.

Stellt man diese Werte bereits publizierten Mortalitätsdaten anderer Arbeitsgruppen gegenüber, so ergibt sich ein widersprüchliches Bild. So konnte in Untersuchungen zum Einfluss der neuronalen Stickstoffmonoxid-Synthetase auf die Überlebensrate nach einer zerebralen Ischämie festgestellt werden, dass in der Gruppe der Tiere mit einem MCAO-Eingriff über 120 Minuten von 53 Ratten des verwendeten Wistar-Stammes 15 Tiere innerhalb 24 Stunden nach dem Eingriff verstorben waren, was einer Mortalitätsrate von 28% entspricht (Vannucchi 2007). Dieser Wert liegt ungefähr auch im Bereich der in dieser Arbeit beobachteten Mortalitätsrate von 34,5% in der Vehikel-behandelten Gruppe. Verwendet man zum Vergleich der in dieser Arbeit gefundenen Mortalitätsraten dagegen Daten aus einem Tierexperiment, welches den protektiven Einfluss von Endothelin-Antagonisten nach einem 120-minütigen MCAO-Eingriff in Ratten untersucht, so findet man hier in der Kontrollgruppe nach 24 Stunden eine Mortalitätsrate von 71,4%, während sich die Mortalitätsrate der Behandlungsgruppe mit 33,3% nahezu halbierte (Matsuo 2001). Im Vergleich zur hier diskutierten Arbeit liegen beide Werte höher, was seine Ursache in der unterschiedlichen Dauer des Verschlusses der *Arteria cerebri media* haben kann.

Neben der Berechnung der post-ischämischen Akutmortalität wurde zur Evaluation möglicher Ceftriaxon-Effekte nach einem Schlaganfall auch die Diagnose und Bewertung neurologisch manifester Schäden und Ausfälle herangezogen.

Beim Menschen umfasst eine klinisch-neurologische Untersuchung zur Diagnose und Bewertung neurologisch manifester Schäden und Ausfälle eine Vielzahl von Tests, die unter anderem Reflexe, Muskelfunktionen und kognitive Leistungen erfassen sollen (Kasner 2006; Goldstein 2005). Bei einem Tier, welches durch einen MCAO-Eingriff einem experimentell induzierten Schlaganfall erlitten hat, werden ebenfalls standardisierte Tests verwendet, bei denen entsprechend eines Untersuchungsbefundes für einzelne Tests Punkte nach festgelegten Bewertungskriterien vergeben und später zusammengefasst werden. Die Zusammenfassung der Einzelpunkte zu einem Gesamt-*score* erlaubt dann im Sinne der Reproduzierbarkeit und

Vergleichbarkeit eine Aussage zum Ausmaß funktioneller Schädigungen des Gehirns im Vergleich zu anderen Tieren (Durukan 2007).

In Abbildung 3.3. sind die Ergebnisse der neurologisch-funktionellen Evaluation dargestellt. Wie es für den Schein-Eingriff nicht anders zu erwarten war, liegen die erreichten Bewertungspunkte bei den entsprechenden Tieren nahe dem Maximalwert von 18. Dies hängt damit zusammen, dass bei einem Schein-Eingriff zu keiner direkten Schädigung des Gehirns kommt, da die zerebrale Blutversorgung durch das Präparieren der Karotiden nicht unterbrochen wird. Die geringfügig unter dem Maximalwert liegenden Bewertungspunkte können auf die post-operative Analgesierung oder durch Beeinträchtigungen der Motorik oder Sensorik infolge des Wundareals am Hals der Tiere zurückgeführt werden.

In den Gruppen, die einer MCAO-Operation unterzogen wurden, zeigten sich dagegen schwere Beeinträchtigungen der neurologisch-funktionellen Leistungen des Gehirns, die ihre Ursache in der 90-minütigen Unterbrechung der Blutzufuhr in der *Arteria cerebri media* haben. Dementsprechend sind die *scores* für die einzelnen Gruppen im Vergleich zur nur Schein-operierten Kontrollgruppe mit gleicher Therapie signifikant niedriger. Der quantitativ schlechteste Durchschnitt, was gleichbedeutend mit den in ihrem Ausmaß schwersten funktionellen Schädigungen war, wurde in der Gruppe von Tieren erzielt, die nur mit NaCl-Lösung behandelt wurden und einem MCAO-Eingriff unterzogen wurden. Deutlich bessere Ergebnisse konnten im Vergleich dazu bei den Tieren festgestellt werden, die ebenfalls einem MCAO-Eingriff unterzogen wurden, jedoch prä-operativ oder post-operativ Ceftriaxon erhalten haben. Diese zeigten in der Auswertung signifikant weniger neurologisch-funktionelle Einschränkungen, was sich in einer erhöhten Punktzahl der Bewertungsskala zeigt. Somit führt die Ceftriaxon-Behandlung neben einer geringeren Sterblichkeit auch zu einer Verbesserung der funktionell-neurologischen Situation nach einem MCAO-Eingriff. Dabei zeigte sich, in Analogie zu den Ergebnissen der Akutmortalität, der Vorteil einer erst nach der Schlaganfall-Induktion durchgeführten Ceftriaxon-Behandlung im Vergleich zur bereits vor dem Eingriff durchgeführten Ceftriaxon-Gabe.

Als weiteres Kriterium zur Beurteilung möglicher neuroprotektiver Effekte von Ceftriaxon wurde neben der Mortalitätsberechnung und der Bewertung der neurologischen Defizite nach dem MCAO-Eingriff auch die Größe bzw. das Volumen des geschädigten Areals im Gehirn der Tiere herangezogen. Die Bestimmung der Ausdehnung des ischämischen Schadens kann sowohl im lebenden Tier als auch im zuvor getöteten Tier erfolgen. Während eine *post mortem*-Untersuchung mittels Vitalfärbung am präparierten und in Schnitten gleicher Dicke zerteilten Gehirn den Vorteil eines geringen apparativen Aufwand mit sich bringt (Bederson

1986, Goldlust 1996, Lundy 1986), haben radiologische Untersuchungen mithilfe der Magnetresonanztomographie (MRT) am lebenden Tier unter anderen den Vorteil einer sehr viel genaueren Volumenberechnung (Weber 2006).

Nachdem durch Vorversuche die sichere Darstellung des post-ischämischen Schadens im Gehirn mittels MRT gezeigt werden konnte, wurde an allen Tieren, die einem MCAO-Eingriff unterzogen wurden, nach 48 Stunden eine MRT-Untersuchung durchgeführt. In Abbildung 3.5. sind in Form von Diagrammen die Ergebnisse der MRT-gestützten Bestimmung der Infarktvolumina bei verschiedenen Versuchsgruppen zusammengefasst. Dabei zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und den einzelnen Behandlungsgruppen.

Somit stehen die Ergebnisse der Bestimmung des Infarktvolumens im Dissens zu den zuvor dargelegten Resultaten der Mortalitätsberechnung und der Bewertung des neurologischen Schadens nach MCAO-Eingriff, auch wenn die Mittelwerte der Infarktvolumina in der Gruppe der Tiere, welche erst nach dem MCAO-Eingriff einmalig Ceftriaxon erhalten haben, tendenziell geringer ausfallen als in den beiden anderen betrachteten Gruppen.

Inwiefern letztlich aber eine positive Korrelation zwischen der Größe des geschädigten Areals und dem Ausmaß an neurologischen Defiziten besteht, wird in der Literatur kontrovers diskutiert. So finden sich auf der einen Seite Arbeiten, die sowohl beim Menschen (Schiemanck 2006; Schiemanck 2005; Saver 1999) als auch bei der Ratte (Nedelmann 2007) eine direkte Korrelation zwischen Infarktvolumen und funktionell-neurologischen Schaden zeigen konnten. Auf der anderen Seite sind Ergebnisse aus MRT-Untersuchungen publiziert worden, die radiologisch evaluierte Befunde im Gehirn von Ratten ohne korrespondierende sensomotorische Defizite gefunden haben (Wegener 2005).

So lässt in einer ersten Zusammenfassung der bisher diskutierten *in vivo*-Daten auf der einen Seite unter Ceftriaxon-Behandlung eine signifikante Reduktion der Mortalität nach MCAO bei gleichzeitiger Verbesserung der neurologischen Situation feststellen, jedoch kann man auf der anderen Seite keine radiologisch evaluierte Reduktion des Infarktvolumens unter Ceftriaxon-Gabe beobachten.

Vergleicht man diese *in vivo*-Ergebnisse mit den eingangs dieser Arbeit aufgestellten Hypothesen zur Beeinflussung von Mortalität, neurologischer Situation und Infarktvolumen mittels Ceftriaxon, so wird man feststellen dass die Hypothesen bestätigt werden konnten, die für Ceftriaxon einen positiven Effekt auf die neurologische Situation sowie die Überlebensrate nach einem MCAO-Eingriff formulierten.

Somit sind positive Effekte des Ceftriaxons bei einem experimentell induzierten Schlaganfall im Tier zu beobachten, jedoch fehlt zu diesem Zeitpunkt eine schlüssige Erklärung für die Verbesserung der Mortalität beziehungsweise der neurologischen Situation.

Postuliert man einen fibrinolytischen oder durchblutungsfördernden Effekt von Ceftriaxon, so müsste man durch die Verbesserung der Perfusion jedoch eine Reduktion des Infarkt Volumens erwarten können, so dass ein Einfluss von Ceftriaxon auf die Perfusion im Schadensgebiet als unwahrscheinlich gilt.

Ebenso scheint die antibiotische Wirkung des Ceftriaxons nicht allein die beobachtete Verbesserung der neurologischen Situation und die Senkung der Mortalität zu erklären. Dass Antibiotika in der Lage sind, die Mortalität nach einem Schlaganfall zu senken, ist aus tierexperimentellen Untersuchungen und aus der klinischen Praxis bekannt. So ist beschrieben, dass es infolge eines Schlaganfalls zu einem als „*stroke induced immunosuppression syndrome* (SIDS)“ bekannten Phänomen der schnellen und langwirksamen Suppression der zellulären Immunantwort kommen kann (Meisel 2005; Prass 2003), die für das Auftreten lebensbedrohlicher Infektionen wie Pneumonien in der akuten Phase nach Schlaganfall verantwortlich ist. Tierexperimentelle Untersuchungen konnten beispielsweise einen protektiven Effekt von Moxifloxacin in der Dosis von 600 mg/kg KG in einem Modell des induzierten Schlaganfalls in der Maus zeigen (Meisel 2004). Im Gegensatz zu den hier beschriebenen Effekten auf die Mortalität, die sich bereits 24 Stunden nach Induktion des Schlaganfalls manifestierten, führte in den von Meisel *et al.* durchgeführten Versuchen die Behandlung mit dem antibiotisch wirkenden Therapeutikum jedoch erst nach drei beziehungsweise fünf Tagen zu einer signifikanten Senkung der Mortalität und einer Verbesserung der neurologischen Situation (Meisel 2004). Diese verzögerte Wirkung kann sehr gut mit der Verhinderung schwerer Infektionen durch das Antibiotikum im Rahmen des SIDS erklärt werden. Da in dieser Arbeit aber die Mortalität bereits nach 24 Stunden bestimmt wurde, kann ausgeschlossen werden, dass eine Prävention von Folgeinfektionen im Zusammenhang mit einem sich entwickelnden SIDS der alleinige Grund für die Verbesserung der Überlebenschancen durch Ceftriaxon ist. Dass Ceftriaxon in Studien mit längeren Beobachtungsdauern nach MCAO den Verlauf eines SIDS positiv beeinflussen kann, steht aufgrund seiner antibiotischen Eigenschaften gegenüber einem breiten Spektrum von Erregern klinisch relevanter Infektionen außer Frage, nur erklärt seine antibiotische Wirkung nicht die in dieser Arbeit gefundenen *in vivo*-Ergebnisse.

Die bis jetzt gefundenen Resultate lassen sich jedoch mit einer möglichen Neuroprotektion über den Eingriff in die Glutathionhomöostase durch Ceftriaxon in Einklang bringen. Wenn

Ceftriaxon, wie in der Hypothese formuliert und in der Literatur bereits publiziert (Rothstein 2005), in der Lage ist, den astrozytären Glutamattransporter GLT-1 zu beeinflussen, so kann über die verringerte extrazelluläre Glutamatkonzentration und eine Verminderung von exzitotoxischen Wirkungen auf die Neuronen eine Neuroprotektion stattfinden, die sich nicht zwingend in einem verringerten Infarkt volumen, wohl aber in einer verringerten Mortalität und einer verbesserten neurologischen Situation äußern würde.

Um die These vom Einfluss des Ceftriaxons auf das GLT-1-System belegen zu können, wurden unter Berücksichtigung der Arbeiten von Rothstein *et al.* (Rothstein 2005) die GLT-1-mRNA-Expression und der GLT-1-Proteingehalt in Gehirnen entsprechend mit Ceftriaxon behandelten Tieren untersucht. Dabei wurde sich sowohl bei der Dosierung von Ceftriaxon als auch der Behandlungsdauer an die Vorgaben aus der Arbeit von Rothstein *et al.* orientiert (Rothstein 2005). Somit wurden Ratten, die mit 200 mg/kg KG Ceftriaxon *i.p.* oder einem identischen Volumen an NaCl-Lösung *i.p.* behandelt wurden, die Gehirne entnommen und in diesen die Expression von GLT-1-mRNA und der Gehalt von GLT-1-Protein untersucht.

In Abbildung 3.6. sind die Daten zur Expression der GLT-1-mRNA in verschiedenen Hirnarealen von Ceftriaxon-behandelten Ratten und von Kontrolltieren dargestellt. Wie in dieser Abbildung ersichtlich ist, konnte in keinem der untersuchten Hirnareale ein signifikanter Unterschied in der relativen GLT-1-mRNA-Expression zwischen den Ceftriaxon-behandelten Tieren und den Tieren der Kontrollgruppe festgestellt werden. Auffällig ist die, unabhängig von der Vorbehandlung der Tiere, regional unterschiedliche Verteilung der relativen GLT-1-mRNA-Expressionen. So finden sich in Stammhirn und Striatum höhere Expressionswerte als im frontalen Cortex, Hypothalamus und Hippocampus, während die Amygdala ihrerseits wiederum geringere Expressionswerte als die vorgenannten Hirnareale zeigt. Dies steht im Widerspruch zu bisher in der Literatur veröffentlichten Daten, die entweder auf eine homogene Verteilung des GLT-1-Subtyps im Gehirn hinweisen (Robinson 1998) oder eine stärkere Expression im Vorderhirn vermuten lassen (Lehre 1995). Gerade der letztgenannte Befund konnte mit den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen nicht bestätigt werden, da hier für den frontalen Cortex und den Hypothalamus als „Bestandteile“ des Vorderhirns im Vergleich zum Stammhirn und Striatum geringere Expressionswerte für GLT-1 mRNA gefunden wurden.

Wie in Abbildung 3.7. erkennbar, zeigt sich bei der Untersuchung des Gehalts von GLT-1-Protein im Gehirn der Ratte nach einer Ceftriaxon-Behandlung ein ähnliches Bild. Auch hier lassen sich keine Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen feststellen, die auf eine Beeinflussung des GLT-1-Protein-Gehalts in verschiedenen Hirnarealen durch Ceftriaxon

hindeuten. Es finden sich zwar Unterschiede in der Bandenstärke des GLT-1-Proteins in den einzelnen Arealen, doch ergeben sich keine Unterschiede zwischen den jeweiligen Behandlungsgruppen.

Anders als bei den Untersuchungen zur Expression der GLT-1-mRNA stehen die Ergebnisse zum Gehalt von GLT-1-Protein im Gehirn der Ratte nach einer Ceftriaxon-Behandlung in Übereinstimmung zu bereits publizierten Daten anderer Arbeitsgruppen. So konnten Lipski *et al.*, die sich ebenfalls mit möglichen neuroprotektiven Effekten von Ceftriaxon im Schlaganfall beschäftigt haben, im *Western blot* keinerlei Unterschiede in der Konzentration von GLT-1-Protein im isolierten Hippocampus oder in hippocampalen Schnitten unter einer Ceftriaxon-Behandlung feststellen (Lipski 2007).

Da somit auch auf dieser Ebene *in vivo* keine Anhalte für eine transkriptionelle oder translationale Regulation des GLT-1-Glutamatttransporters gefunden wurden, die als Erklärung für die signifikante Mortalitätssenkung und die deutliche Verbesserung der neurologisch-funktionellen Situation in Ratten nach MCAO dienen können, wurden in einem weiteren Schritt Untersuchungen auf zellulärer Ebene durchgeführt. Dazu wurden als Untersuchungsobjekt kultivierte Astrozyten der Ratte verwendet, da sich der GLT-1 fast ausschließlich auf dieser Zellpopulation im Gehirn befindet (Milton 1997).

Für die Zellkultur wurden die Gehirne neonataler Ratten aufbereitet und die darin enthaltenden Astrozyten isoliert und kultiviert, wobei sich das Protokoll der Gewinnung und Kultivierung an Prozeduren orientierte, die in einer Arbeit über die Gewinnung und Kultivierung post-mortaler humaner Astrozyten veröffentlicht wurden (De Groot 1997).

Die Identifizierung der gewonnenen Zellen erfolgte mittels Immunfluoreszenz-Nachweis des fast ausschließlich in Astrozyten vorkommenden Strukturproteins *glial fibrillary acidic protein* (GFAP). Dieses Protein wird sowohl in der Pathologie als Marker für Zellspezies glialen Ursprungs als auch in der Grundlagenforschung zur Identifizierung von Astrozyten verwendet (Eng 2000). Auf einen gleichzeitigen Nachweis neuronaler Markerproteine wurde verzichtet, da Neuronen sich zum Zeitpunkt der Präparation und Gewinnung der Zellen bereits in einer dauerhaften G₀-Phase befinden und sich somit nicht mehr teilen und vermehren können (Yang 2007). Aus diesem Grund werden eventuell mit in der Astrozytenkultur kultivierte Neuronen aufgrund der fehlenden Proliferationsfähigkeit schnell von den Astrozyten überwachsen, zumal die in der Zellkultur verwendeten Medien und Bedingungen nicht auf die in Kultur sehr viel empfindlicheren Neuronen abgestimmt sind. Die Protokolle zur Präparation und Kultur endothelialer Zellen aus dem Gehirn, welche ebenfalls als Kontaminante in einer Astrozytenkultur in Frage kommen können, unterscheiden

sich von den Bedingungen der beschriebenen Astrozytenpräparation und -kultur sowie bei lichtmikroskopischer Betrachtung (Shi 1994), so dass diese Zellen als mögliche „Verunreinigung“ auch nicht in Betracht kommen und somit nicht über entsprechende Methoden identifiziert werden mussten. Die ebenfalls in Erwägung zu ziehenden Mikroglia-Zellen sind in „Astrozyten-angereicherten“ Kulturen in aller Regel zu finden (Saura 2007), wobei diese Zellen in der Regel kein GFAP besitzen (Saura 2007), jedoch in der Lage sind, den GLT-1 zu exprimieren (Persson 2005). Auf eine Betrachtung dieses Zelltyps wurde jedoch ebenfalls verzichtet, da durch entsprechende GFAP-Untersuchungen während der Zellpassagen verifiziert werden konnte, dass die Kulturen als überwiegend aus Astrozyten bestehende Kulturen betrachtet werden können.

Für eine erste, orientierende Untersuchung mittels RT-PCR wurde den Zellen Ceftriaxon zugesetzt, um zu diesem Zeitpunkt der Untersuchungen schon mögliche Effekte von Ceftriaxon zu erkennen. In Analogie zu den *in vivo*-Untersuchungen wurde sich auch bei den *in vitro*-Experimenten an die Dosierungen und Behandlungszeiträume von Rothstein *et al.* orientiert, bei denen Effekte auf die Expression von GLT-1-mRNA und auf den Gehalt von GLT-1-Protein beschrieben worden sind (Rothstein 2005).

Bei bloßem Betrachten fällt zwischen der Negativkontrolle und der mit Ceftriaxon behandelten Gruppe keine deutliche Expressionssteigerung der GLT-1-mRNA auf. Eine dezidierte Aussage bezüglich einer möglichen Expressionsveränderung kann man bei dieser Methode aufgrund ihres qualitativen Charakters jedoch nicht treffen. Eine weiterhin in der Literatur beschriebene Beobachtung, dass im Vergleich zu kultivierten Hirnschnitten isoliert kultivierte Astrozyten eine nur geringe Expression von GLT-1-mRNA zeigen (Kimmelberg 2000), kann ebenfalls aufgrund des rein qualitativen Charakters der hier verwendeten PCR-Methode nicht weiter verifiziert werden.

Eine Untersuchung verschiedener zellulärer Proteine in den isolierten Zellen mittels Immunfluoreszenzmikroskopie ergab verschiedene Ergebnisse.

Zum einem konnte durch der Verwendung von anti-GFAP-Antikörpern ein nochmaliger Nachweis erbracht werden, dass es sich bei den verwendeten Zellen um Astrozyten handelt (Eng 2000).

Weiterhin konnte in diesem Experiment ebenfalls bestätigt werden, dass die Zellen den GLT-1-Glutamattransporter exprimieren.

Durch die Verwendung einer Ceftriaxon-behandelten Zellpopulation, einer Vehikel-behandelten Negativkontrolle sowie einer dbcAMP-behandelten Positivkontrolle sollte die

Möglichkeit geschaffen werden, das GLT-1-Signal in den verschiedenen Gruppen miteinander zu vergleichen.

Ein Vergleich der Signale für das GLT-1-Protein zeigt, von einigen punktuellen Signalverstärkungen abgesehen, keine wesentlichen Unterschiede zwischen den Gruppen, so dass auf eine quantitative Auswertung des Experiments verzichtet wurde. Insbesondere das Fehlen eines signifikanten Unterschieds in den GLT-1-Signalen bei der dbcAMP-Gruppe bestätigt die Nichteignung dieser Methode zum Treffen definitiver Aussagen bezüglich der GLT-1-Expression oder GLT-1-Konzentration.

Dass das dbcAMP, welches als Positivkontrolle in Untersuchungen zum GLT-1 verwendet werden kann (Schlag 1998), in einer ausreichend hohen Konzentration verwendet wurde, zeigt sich an einigen spezifischen Veränderungen der Zellen, welche mit dbcAMP behandelt wurden. So ist in Abbildung 3.13. bei den mit dbcAMP behandelten Zellen eine Zunahme der Zellgröße, der Kerngröße sowie der Länge der Zellfortsätze zu beobachten. In der Literatur ist für Astrozyten, welche mit dbcAMP behandelt wurden, beschrieben, dass in diesen Zellen Prozesse der Zellreifung und Differenzierung aktiviert werden, welche sich unter anderem morphologisch durch einen Wechsel der Zellform zeigen (Schlag 1998). Dabei ändert sich die annähernd polygonale Form der „juvenilen“ Zellen in die sternförmige Form der „adulten“ Astrozyten (Schlag 1998), was auch in dem hier beschriebenen Experiment zu beobachten war.

Um mögliche quantitative Unterschiede in der Expression von GLT-1-mRNA in Astrozyten, die mit Ceftriaxon behandelt wurden, feststellen zu können, wurde als nächster Schritt eine quantitative *Real-time* RT-PCR durchgeführt. Als Vergleich dienten hier analog zu den vorangegangenen Experimenten eine Vehikel-behandelte Negativkontrolle und eine dbcAMP-behandelte Positivkontrolle.

Auch in diesem Experiment zeigt sich keine signifikante Steigerung der GLT-1-mRNA-Expression in der Gruppe der Ceftriaxon-behandelten Zellen, während sich in der Positivkontrolle eine gegenüber der Negativkontrolle signifikante Steigerung der GLT-1-mRNA-Expression beobachten lässt, was auf die beschriebenen dbcAMP-Effekte zurückzuführen ist (Su 2003; Schlag 1998; Eng 1997)

Um auszuschließen, dass eventuelle chemische oder galenische Unterschiede zwischen Ceftriaxon-Zubereitungen verschiedener Anbieter einen Einfluss auf mögliche Veränderungen der GLT-1-Expression haben können, wurden in einem parallel durchgeführten Versuch kultivierte Astrozyten zum einem mit dem als Human-Arzneimittel zugelassenem Ceftriaxon-Präparat der Firma Roche (*Rocephin*) behandelt und zum anderen

mit einer nur für Laboruntersuchungen verwendeten Ceftriaxon-Formulierung der Firma SIGMA in der Konzentration von 100 μ M behandelt, wobei Unterschiede in der Molekularmasse entsprechend stöchiometrisch bei der Einwaage Berücksichtigung fanden. Auch bei dieser *Real-time* RT-PCR-Untersuchung fand sich, wie in Abbildung 3.15. erkennbar, kein signifikanter Unterschied in der GLT-1-mRNA-Expression gegenüber der Negativkontrolle. Somit zeigt dieses Ergebnis keine Abhängigkeit der mRNA-Expression von der chemischen und/oder galenischen Formulierung zweier verschiedener Ceftriaxon-Präparate.

In einem weiteren Experiment wurden die kultivierten Astrozyten nach gleichem Schema mit unterschiedlichen Konzentrationen von Ceftriaxon behandelt, um auszuschließen, dass sich eine signifikante Veränderung in der GLT-1-Expression bei niedrigeren oder höheren Ceftriaxon-Konzentrationen zeigt. Wie in Abbildung 3.16. zu sehen, findet sich auch hier in der *Real-time* RT-PCR keine signifikante Veränderung Expression von GLT-1-mRNA in den Ceftriaxon-behandelten Zellen, so dass auch eine konzentrationsabhängige Beeinflussung der GLT-1-Expression durch Ceftriaxon ausgeschlossen werden kann.

Auch wenn in allen *Real-time* RT-PCR-Untersuchungen von mRNA-Proben aus den *in vitro*-Experimenten kein Hinweis auf eine signifikante Veränderung der GLT-1-Expression in Ceftriaxon-behandelten Zellen gegenüber einer Kontrollgruppe zu finden waren, so fällt bei Betrachtung der Ergebnisse der *Real-time* RT-PCR-Untersuchungen eine Besonderheit auf. Beim Vergleich der Ergebnisse der *Real-time* RT-PCR untereinander zeigen sich erhebliche Schwankungen in der Expression der GLT-1-mRNA bei den jeweils mit dbcAMP behandelten Zellen. Dabei ist die Expression zwar in jedem Experiment signifikant gegenüber der Expression in der jeweiligen Kontrollgruppe erhöht, jedoch schwankt diese Steigerung in einem Bereich von 200% bis zu 1200%, jeweils normiert auf die 18S-rRNA und bezogen auf die Expression der jeweiligen Kontrollgruppe.

Diese Schwankungen können ihre Ursache in der chemischen Natur des dbcAMP haben. Wie in der Abbildung 4.1 zu sehen, besitzt das dbcAMP-Molekül im Gegensatz zum natürlich vorkommenden cAMP eine mit Buttersäure veresterte Hydroxylgruppe am C₂-Atom der Ribose und einen weiteren Buttersäure-Rest, der über eine Amid-Bindung mit der Aminogruppe des Adenins verknüpft ist. Da durch das Einführen der beiden Buttersäure-Reste die Lipophilie und damit die Permeationsfähigkeit durch die Zellmembran erhöht werden, wirkt sich eine Hydrolyse der Verbindung vor der eigentlichen Verwendung als hindernd für die Penetration durch die zelluläre Membran aus. So steigt im Vergleich zum cAMP, dessen Lipophilie ein relativer Wert von 1 zugeordnet wird, die Lipophilie von

dbcAMP durch Einführen der beiden Buttersäure-Reste auf einen relativen Wert von 21, während das Produkt der dbcAMP-Hydrolyse, ein nur an der Aminogruppe des Adenins mit Buttersäure amidiertes cAMP-Molekül (siehe Abbildung 4.1.), einen relativen Lipophilie-Wert von 3,5 aufweist (Schwede 2000). Somit ist bei einer partiellen Hydrolyse des Butyryl-Restes an der Hydroxylgruppe des C₂-Atoms der Ribose eine ausreichende Membrangängigkeit des Hydrolyseprodukts nicht mehr gegeben und das Molekül kann seine Wirkung dementsprechend nicht mehr im selben Maße wie das dbcAMP entfalten.

Diese Hydrolyse kann somit auch die während der Experimente beobachteten Unterschiede im makroskopischen Bild verschiedener dbcAMP-Chargen erklären. So präsentierte sich der Großteil der verwendeten Chargen als weißes, feinpudriges Pulver, während einige Chargen, welche aufgrund des Sichtbefundes dann auch nicht verwendet wurden, sich als gelbes, klumpiges Pulver darstellten. Jedoch konnte bei den makroskopisch einwandfreien Chargen aufgrund der geringen Mengen an dbcAMP, der hohen Kosten und der aufwendigen Analytik keine Gehaltsbestimmung und somit eine Evaluierung des Hydrolysegrades durchgeführt werden. Damit kann aber nicht ausgeschlossen werden, dass eine geringergradige Hydrolyse in den verwendeten dbcAMP-Chargen stattgefunden hat, was letztlich zu einem Verlust der Zellmembran-Permeabilität von dbcAMP und damit zu einem unterschiedlichen Ausmaß der Expressionssteigerung von GLT-1-mRNA geführt haben kann. Nichtsdestotrotz ist dbcAMP für *in vitro*-Untersuchungen im Bereich der GLT-1-Expression eine häufig verwendete Positivkontrolle (Schlag 1998), bei welcher der Mechanismus der cAMP-abhängigen Transkriptionssteigerung für GLT-1-mRNA im Detail aufgeklärt werden konnte (Su 2003)

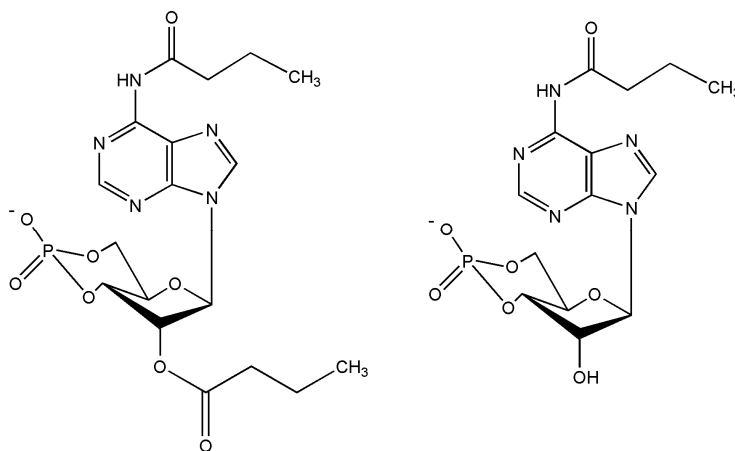


Abbildung 4.1. Strukturformeln von dbcAMP (links) und des Hydrolyseproduktes von dbcAMP (rechts).

Nachdem sich also, abgesehen von den gerade diskutierten „Nebenbefunden“, in der *Real-time* RT-PCR ebenfalls kein Hinweis auf eine GLT-1-Expressionssteigerung durch Ceftriaxon ergeben hatte, wurde der Gehalt an GLT-1-Protein in kultivierten Astrozyten bestimmt. Hierbei wurde aus Astrozyten, welche mit Ceftriaxon, dbcAMP oder Vehikellösung behandelt wurden, das Gesamtprotein isoliert, welches dann mittels der *Western blot*-Technik auf den Gehalt von GLT-1-Protein hin untersucht wurde. Dabei konnte in Analogie zu den *in vivo*-Befunden keine Steigerung im Gehalt von GLT-1-Protein in den Ceftriaxon-behandelten Astrozyten festgestellt werden, während bei den mit dbcAMP behandelten Zellen eine erhöhte Konzentration an GLT-1-Protein zu beobachten war. Dieses Ergebnis deckt sich insofern mit den bisher gefundenen Resultaten der *in vitro*-Untersuchungen, als dass in der Immunfluoreszenzmikroskopie ebenfalls kein erhöhter Gehalt an GLT-1-Protein unter Ceftriaxon-Behandlung zu beobachten war.

Obwohl an dieser Stelle entlang einer hier nur recht plakativ und vereinfacht dargestellten „molekularbiologischen Kausalkette“, welche von der Synthese entsprechender mRNA-Transkripte an einem für ein Protein kodierenden DNA-Abschnitt bis zur Translation und damit Synthese des Proteins, basierend auf den mRNA-Informationen, reicht (Gahtan 2002), bereits bewiesen ist, dass Ceftriaxon in den kultivierten Astrozyten nicht in der Lage ist, die Expression oder den Gehalt des GLT-1-Glutamatttransporters zu beeinflussen, sollte in einem weiteren Experiment der initiale Startpunkt der Transkription untersucht werden. Diese Entscheidung fußt dabei auf verschiedenen Überlegungen. So ist die Untersuchung des Promotors als Startpunkt der Transkription in den meisten Fällen sensitiver als eine Untersuchung der Konzentration der mRNA-Moleküle als Produkte der Transkription, da aufgrund verschiedener posttranskriptioneller Ereignisse mit einem Einfluss auf die mRNA-Stabilität (Eberhardt 2007; Guhaniyogi 2001) eine Promotoraktivierung nicht zwangsläufig zu einer erhöhten Anzahl an Transkripten führen muss. In einem postulierten Fall kann es durch eine exogen zugeführte Substanz, über den Promotor vermittelt, zu einer Aktivierung der Transkription kommen, die sich aber aufgrund gleichzeitig ablaufender Prozesse mit negativen Einfluss auf die mRNA-Stabilität nicht in einer mittels PCR messbaren Änderung der mRNA-Konzentration niederschlägt. Bei Messung der Promotoraktivierung auf der einen Seite und der Konzentration der spezifischen mRNA-Transkripte auf der anderen Seite kann man somit das Ausmaß eventueller posttranskriptioneller Prozesse genauer bestimmen und deren möglichen Einfluss auf die Untersuchungen bewerten.

Für die Untersuchung der Promotoraktivität waren verschiedene Vorversuche nötig. So musste einerseits geklärt werden, ob sich die kultivierten Astrozyten der Ratte mit einer

gängigen Methode der chemischen Transfektion so behandeln lassen, dass sie das entsprechende Plasmid mit dem Promotor aufnehmen und somit Untersuchungen zur Aktivität des GLT-1-Promotor zugänglich sind. Um die Transfektionsfähigkeit der Astrozyten zu überprüfen, wurden die Zellen nach einem gängigen Protokoll mit einem Vektor transfiziert, der die genetischen Informationen für das *Endogenous Green Fluorescenting Protein* trägt. Dieses Protein kann, wenn es nach erfolgreicher Transfektion in den Zellen synthetisiert wird, mittels Fluoreszenzmikroskopie detektiert werden (Chalfie 1994; Tsuchiya 2002). Wie in Abbildung 3.18. zu sehen ist, fluoreszieren Bestandteile der transfizierten Zellen nach entsprechender Fluoreszenzanregung. Da diese Fluoreszenz jedoch nicht in Zellen auftritt, die lediglich mit einem leeren Plasmid transfiziert wurden, kann man davon ausgehen, dass die beobachtete Fluoreszenz in den Zellen, welche mit dem pEGFP-N1-Plasmid transfiziert wurden, nicht auf eine Auto-Fluoreszenz der Zellen zurückzuführen ist.

Desweiteren musste vor den eigentlichen Untersuchungen zum Einfluss von Ceftriaxon auf die Aktivität des GLT-1-Promotors noch der eigentliche GLT-1-Promotor kloniert und aufgrund fehlender Sequenzdaten sequenziert werden. Dazu wurde der Promotor in einem ersten Schritt nach der unter 2.2.4. beschriebenen Methode kloniert und dann am Institut für Genetik der Humboldt-Universität zu Berlin sequenziert. Die daraus gewonnene Sequenz mit einer Länge von 1288 Basen (Abbildung 3.19.) wurde in der „*NCBI Gene Bank*“ unter der Kennung [DQ DQ489741.1](#) [GI:94958152](#) veröffentlicht.

Die Untersuchung der Promotoraktivität erfolgte mit Hilfe eines Luciferase-Assay, bei dem die Aktivität des Promotors über die direkt mit der Promotoraktivierung gekoppelte Bildung von Luciferase bestimmt wird. Wie in Abbildung 3.20. zu sehen, unterscheidet sich die relative Luciferase-Aktivität in den Zellen, welche 100 µM Ceftriaxon für fünf Tage erhalten haben, nicht signifikant von der relativen Luciferase-Aktivität in den Zellen, welche ein adäquates Volumen an 0,9% NaCl für fünf Tage erhalten haben. Bei Zellen, die für drei Tage mit dbcAMP in einer Konzentration von 200 µg/ml behandelt wurden, stieg dagegen die relative Luciferase-Aktivität gegenüber der relativen Luciferase-Aktivität der Kontrollzellen signifikant an. Der Effekt des dbcAMP auf die Induktion der Promotoraktivität erklärt sich aus dem Mechanismus, mit dem cAMP und Zellmembran-permeable cAMP-Analoga wie dbcAMP den GLT-1-Promotor über die Proteinkinase A aktivieren können (Su 2003).

Somit lässt sich an dieser Stelle über den Einfluss von Ceftriaxon auf kultivierte Astrozyten der Ratte unter den in dieser Arbeit gegebenen Kultivierungs-, Behandlungs- und Untersuchungsbedingungen folgendes feststellen: Ceftriaxon ist weder in der Lage, den Promotor des GLT-1-Gens zu beeinflussen, noch kann es die Anzahl der GLT-1-mRNA-

Transkripte oder den Gehalt an GLT-1-Protein in der Zelle steigern. Dabei decken sich die Ergebnisse der mRNA- und Protein-Untersuchungen mit den Ergebnissen aus dem Tierversuch, wo ebenfalls keine erhöhte Konzentration von GLT-1-mRNA und GLT-1-Protein unter Ceftriaxon-Behandlung gefunden wurden.

Vergleicht man diese *in vitro*-Ergebnisse mit den zu Beginn der Arbeit aufgestellten Hypothesen, so wird man konstatieren müssen, dass zwei der drei formulierten Hypothesen nicht bestätigt werden konnten. Sowohl bei der GLT-1-mRNA-Expression als auch beim zellulären Gehalt an GLT-1-Protein wurden keine Ceftriaxon-bedingten Veränderungen festgestellt. Damit fehlt zwar weiterhin eine Erklärung für die signifikante Senkung der Mortalität und der signifikanten Verbesserung der neurologischen Situation in Ratten nach MCAO-Eingriff, wenn die Tiere mit Ceftriaxon behandelt wurden. Der Schlüssel für diese Erklärung sollte aber in der letzten, für die *in vitro*-Untersuchungen formulierten Hypothese liegen. Darin wurde schlussfolgernd postuliert, dass durch die Effekte des Ceftriaxons auf GLT-1-Expression und GLT-1-Gehalt die astrozytäre Glutamataufnahme gesteigert werden kann. Dass trotz der bis dahin nicht belegten Wirkungen des Ceftriaxons eine Bestimmung der Transportaktivität des GLT-1 durchgeführt wurde, hat seine Ursache in Arbeiten, die nicht nur eine Modulation der GLT-1-Expression, sondern auch eine Änderung der GLT-1-Aktivität als ursächlich für eine Beeinflussung der Glutathomöostase durch GLT-1 sehen (Sheldon 2007; Robinson 2006; Lipski 2007).

Um die Aktivität eines Transporters zu bestimmen, kann man sich verschiedener Methoden bedienen. Eine Möglichkeit besteht darin, den zu untersuchenden Zellen ein radioaktiv markiertes Transportsubstrat anzubieten und dann nach einer gewissen Latenz die Radioaktivität in den Zellen oder in dem sie umgebenden Medium zu messen. In dieser Arbeit wurde als Transportsubstrat eine Tritium-markierte Glutaminsäure verwendet, welche als L-[G-³H]-Glutaminsäure bezeichnet wird. Dabei wird zwar anstelle von Glutamat die entsprechend protonierte Glutaminsäure zum Ansatz gegeben, jedoch deprotoniert die Glutaminsäure mit einem pKs-Wert von 4,75 im gepufferten, pH-neutralen Zellkulturmedium schnell zu Glutamat (Zander 2002), welches dem Transportprozess zugänglich ist (Levy 1998). Wie in Abbildung 4.2. zu sehen, hat die Deprotonierung der Glutaminsäure keinen Einfluss auf die Radioaktivität des Glutamats, da bei der L-[G-³H]-Glutaminsäure nur die Protium-Atome (Protonen) des Kohlenstoff-Grundgerüsts gegen Tritium-Atome ausgetauscht wurden, nicht aber die bei der Deprotonierung beteiligten Protonen der Carboxyl-Gruppen.

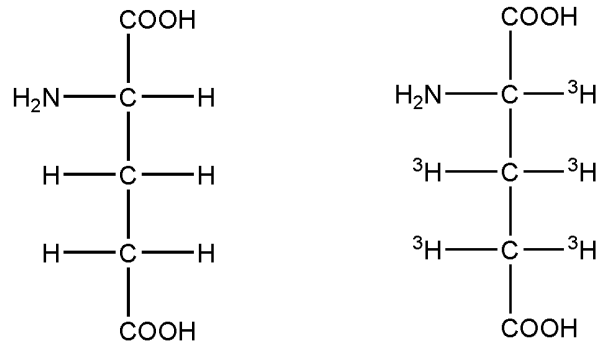


Abbildung 4.2. Strukturformeln der L-Glutaminsäure (links) und der L-[G-³H]-Glutaminsäure (rechts); Tritium-Atome sind mit ³H und Protium-Atome mit H gekennzeichnet.

Als Positivkontrolle konnte in diesem Experiment, auch in Analogie zu den anderen *in vitro*-Experimenten, das cAMP-Analogon dbcAMP verwendet werden, da in der Literatur gezeigt werden konnte, dass Zellmembran-permeable Derivate des cAMP wie das 8-Bromo-cAMP in der Lage sind, nicht nur die Expression des GLT-1 zu steigern, sondern auch die zelluläre Glutamataufnahme zu erhöhen (Kim 2003).

In Abbildung 3.21. sind die Ergebnisse der Untersuchung zur Transportaktivität dargestellt. Man kann erkennen, dass die Radioaktivität in den Lysaten der Zellen, die für fünf Tage mit 10 μ M oder 100 μ M Ceftriaxon ebenso signifikant gegenüber der Negativkontrolle erhöht war, wie in Zelllysaten von Astrozyten, welche für drei Tage mit dbcAMP behandelt wurden. Durch das zweimalige Waschen der Zellen nach Inkubation mit der markierten Aminosäure wurde sichergestellt, dass die später durch Lyse der Zellen freigesetzte Aktivität nur aus dem Intrazellulärraum stammen kann. Da im Gehirn bis auf wenige Ausnahmen die Glutamataufnahme in die Zellen durch zelluläre Glutamattransporter vermittelt wird (Danbolt 2001) und sich in dem hier verwendeten *in vitro*-System fast ausschließlich Astrozyten befinden, kann die Aufnahme der markierten Aminosäure nur durch die astrozytären Glutamattransporter GLAST und GLT-1 erfolgen. Auf eine Differenzierung zwischen dem GLAST-vermittelten Glutamattransport und dem GLT-1-gesteuerten Influx von Glutamat mittels des GLT-1-selektiven Inhibitors Dihydrokainat (Arriza 1994) wurde in dieser Arbeit jedoch verzichtet. Als Grund hierfür kann angeführt werden, dass bereits Chu *et al.* zeigen konnten, dass sich *in vivo*-Effekte des Ceftriaxons durch Dihydrokainat als selektiven GLT-1-Inhibitor unterdrückt lassen (Chu 2007).

Bestätigt wurden diese Befunde zur Ceftriaxon-vermittelten Beeinflussung der Transportaktivität durch Ergebnisse von Rothstein *et al.* (Rothstein 2005) und durch Untersuchungen von Lipski *et al.* (Lipski 2007). Die letztgenannte Arbeitsgruppe konnte

mittels *Patch-Clamp*-Technik an hippocampalen CA1-Pyramiden-Neuronen der Ratte feststellen, dass nach Ceftriaxon-Behandlung der Tiere eine größere Potenzierung eines durch Glutamat induzierten N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Stroms nach Gabe von DL-threo-Benzyloxy-Asparaginsäure (TBOA) in den entnommenen Zellen erfolgte, was nach Meinung der Autoren auf eine gesteigerte Aktivität von Glutamattransportern zurückgeführt werden kann (Lipski 2007). Wie oben bereits diskutiert, konnten jedoch auch diese Autoren auf der Ebene des GLT-1-Proteins keine Steigerung der GLT-1-Expression im Hippocampus oder in hippocampalen Organschnitten feststellen. Zu beachten ist, dass bei diesen mittels der *Patch-Clamp*-Technik durchgeführten Untersuchungen zur Aktivität des Glutamattransports hippocampale Neuronen untersucht wurden, wobei aber bekannt ist, dass diese Zellen den GLT-1 ebenfalls exprimieren (Torp 1994).

Somit kann diese beobachtete Steigerung der Aktivität des astrozytären Glutamattransports eine mögliche Erklärung für die Senkung der Mortalität und die Verbesserung der neurologischen Situation nach einer Ischämie im Gehirn sein. Diese Steigerung des Glutamatinfux in die Astrozyten, welche einen Großteil des während einer Ischämie in den Extrazellulärraum freigesetzten Glutamats aufnehmen (Rossi 2007, Ottersen 1996), führt zu einer geringeren extrazellulären Glutamatkonzentration, was zu verringerten exzitotoxischen Effekten und zu einer geringeren räumlichen Ausdehnung des Infarktareals führen kann. Am Beispiel von Citicolin, einem neuroprotektiv wirkenden Cholin-Derivat mit einem diskutierten Einfluss auf den dem GLT-1 analogen EAAT2-Glutamattransporter konnte gezeigt werden, dass es durch den Einsatz von Citicolin infolge einer Senkung der extrazellulären Glutamatkonzentration zu einem reduzierten Infarktvolumen und/oder einer Reduktion neurologischer Defizite kam (Adibhatla 2002; Hurtado 2005). Auf der anderen Seite ist gezeigt worden, dass es durch eine Blockade des astrozytären Glutamattransports zu einer verstärkten intrazerebralen Schädigung und einer Verschlechterung der neurologischen Situation nach einem Schlaganfall kommen kann (Namura 2002; Rao 2001b).

Interessant ist hierbei, dass sich die Aktivitätszunahme nicht mit einer Zunahme des Gehalts an GLT-1-mRNA und GLT-1-Protein in den Zellen erklären lässt. Dass sich die Aktivität von Glutamattransportern unabhängig von der Expression modulieren lässt ist in der Literatur vielfach beschrieben (Robinson 2002). Eine Reihe von Arbeiten führt als möglichen Mechanismus eine Regulation der als *Trafficking* bezeichneten Verlagerung des Transporterproteins vom Zytoplasma zur Plasmamembran durch diverse Signalmoleküle auf (O'Shea 2006; Guilett 2005; Zhou 2004; Kalandadze 2002; Duan 1999). Weiterhin wird eine

Regulation der katalytischen Aktivität der Transporter durch einen bisher noch unklaren Mechanismus diskutiert (Robinson 2006).

Für Transportsysteme des Serotonins und des Dopamins konnten derartige Modulationen der Transportaktivität bereits beschrieben und die Mechanismen der Regulation aufgeklärt werden (Rausch 2005; Page 2004; Carvelli 2002).

Welche Rolle die Entfernung des extrazellulären Glutamats für die Neuronen im Schadensgebiet hat, ist im Rahmen der Einleitung und Diskussion bereits mehrfach erörtert worden. Dass die Senkung der Glutamatkonzentrationen auch einen Einfluss auf die Neuronen in der weiteren Peripherie um ein ischämisches Gebiet herum hat, wurde spätestens durch die Entdeckung sogenannter *transient ischemic depolarizations* (TID) deutlich. Diese TID's führen auch in der *Penumbra* zu einer Vielzahl von Zelluntergängen und damit zu einem weiteren Anstieg der extrazellulären Glutamatkonzentration, welche sich letztendlich in einem weiteren Ausbreiten der Schadenszone (Takagi 1993) und einem größeren Ausmaß der neurologisch-funktionellen Schädigung (Butcher 1990) determinieren. In diesem Kontext sind auch die Ergebnisse von Studien an Schlaganfallpatienten zu sehen. Hier wiesen hohe Glutamatkonzentrationen in Blut und Liquor auf eine Progression des akuten ischämischen Schlaganfalls hin (Castillo 1997) oder gingen mit einem erhöhten neurologischen Defizit einher (Castillo 1996).

Versucht man die *in vivo* gefundenen Verbesserungen der neurologischen Situation und der Mortalität nach Schlaganfall mit einer Steigerung der astrozytären Aufnahme von Glutamat zu erklären, so muss man jedoch die Aussage des Experiments zur Bestimmung der Transportaktivität in den Astrozyten genauer diskutieren. Hier finden sich signifikant erhöhte Radioaktivitätswerte in den Lysaten der Zellen, die mit 10 μM Ceftriaxon beziehungsweise mit 100 μM Ceftriaxon behandelt wurden, was auf eine verstärkte Aufnahme von L-[G- ^3H]-Glutamat infolge gesteigerter Transportaktivität spricht. Hier erscheint jedoch die Steigerung gegenüber der unbehandelten Gruppe mit ca. 20 % als nicht sehr beeindruckend. Dabei muss man aber beachten, dass die Zellen bereits 10 Minuten nach der Zugabe der L-[G- ^3H]-Glutaminsäure lysiert wurden, so dass an dieser Stelle die Aufnahme von markierten Glutamat gestoppt wurde. Dies ist der radioaktiven Markierung der Aminosäure geschuldet, die aufgrund der Emission von β -Strahlung über einen längeren Zeitraum zellschädigende Prozesse initiieren würde, die der Untersuchung entgegenstehen würden (Damberg 1977). Somit kann es durch das experimentelle *Setting* möglich sein, dass den Zellen nicht die erforderliche Zeit gegeben worden ist, das aufgenommene Glutamat mittels der Glutaminsynthetase in Glutamin umzuwandeln und dadurch über eine Verringerung der intrazellulären

Glutamatkonzentration eine weitere Aufnahme von extrazellulärem Glutamat zu gewährleisten (Deitmer 2000). Bei Verwendung einer anderen Messmethodik (Zakir Hossain 2007) wäre somit unter Umständen mit einer sehr viel höheren Glutamataufnahme zu rechnen gewesen.

Dass Antibiotika neben ihrer antibiotischen Wirkung noch neuroprotektive Effekte vermitteln können, ist am Beispiel des Minocyclins bereits gezeigt worden (Elewa 2006, Morimoto 2005, Hewlett 2006, Lampl 2007). Diesem halbsynthetischen Tetracyclin-Derivat konnten in einer Reihe von Untersuchungen sowohl antiinflammatorische (Yrjänheikki 1999; Yrjänheikki 1998) als auch antiapoptotische (Wang 2004) Wirkungen sowie eine Hemmung von Matrix-Metalloproteinasen (Rifkin 1993) nachgewiesen werden.

Für Ceftriaxon sind solche „Nebenwirkungen“ im Sinne von Wirkungen neben dem eigentlichen antibiotischen Effekt im Bereich des Zentralnervensystems ebenfalls beschrieben. In einer Arbeit, welche die Wirkung von Minocyclin und Ceftriaxon auf Neuronen untersucht, die ionisierender Strahlung ausgesetzt wurden, konnte festgestellt werden, dass beide Substanzen *in vitro* antiapoptotisch und damit neuroprotektiv wirken (Tikka 2001). Im Gegensatz zu Minocyclin konzentriert sich die Forschung in den letzten Jahren aber mehr und mehr auf die Beeinflussung von Glutamattransportern durch Ceftriaxon. Den „Startpunkt“ für diese Forschungen gab die hier schon mehrfach erwähnte Arbeit von Rothstein *et al.* aus dem Jahre 2005 (Rothstein 2005), in der Ceftriaxon günstige Effekte sowohl in einem Tiermodell der amyotrophen Lateralsklerose (ALS) als auch in einem *in vitro*-Modell der zerebralen Ischämie durch Glucose- und Sauerstoffentzug in Neuronen gezeigt hatte. Insbesondere die viel versprechenden Befunde im ALS-Tiermodell sorgten zum Zeitpunkt der Veröffentlichung für großes Interesse in der Wissenschaftsgemeinde (Brown 2005a, Miller 2005). Als Mechanismus postulierten Rothstein *et al.* einen Anstieg der GLT-1-Expression, welchen sie unter Ceftriaxon-Behandlung in kultivierten Rückenmarksschnitten der Ratte, im Rückenmark der als ALS-Modell verwendeten G93A-Maus (Gurney 1997), in neuronalen Kulturen, in humanen Astrozyten und im Rattenhirn *ex vivo* beobachten konnten. Diese Ergebnisse konnten durch andere Arbeitsgruppen in Experimenten an hippocampalen Schnittkulturen (Ouyang 2007), an humanen fetalen Astrozyten (Lee 2008) und im Gehirn von Ratten (Chu 2007) bestätigt werden, wobei die letztgenannte Arbeitsgruppe die Befunde sogar noch auf den Bereich des Schlaganfalls ausdehnen konnte. So zeigten Chu *et al.* bei Untersuchungen des Gehirns von *Sprague-Dawley*-Ratten, welche mit Ceftriaxon in einer Dosis von 200 mg/kg KG *i.p.* behandelt wurden, eine Steigerung der Expression von GLT-1-mRNA nach drei Tagen und eine Steigerung des Gehalts an GLT-1-Protein nach fünf Tagen.

Gleichzeitig konnte die Arbeitsgruppe auch ein Absinken der Konzentration proinflammatorisch wirkender Zytokine, von Matrix-Metalloproteinasen und von Apoptose-Induktoren sowie eine Reduktion des Infarktvolumens und eine Verbesserung der funktionell-neurologischen Situation beobachten (Chu 2007). Interessanterweise finden die Autoren eine Reduktion des Infarktvolumens jedoch nur bei einer präventiven Gabe des Antibiotikums, d.h. bei einer Ceftriaxon-Applikation dreißig Minuten vor dem MCAO-Eingriff. Demgegenüber stehen die Ergebnisse der hier diskutierten Arbeit, die sowohl bei einer Ceftriaxon-Gabe vor MCAO als auch bei einer Applikation nach MCAO keine Reduktion des Infarktvolumens zeigen konnte. Wenig vergleichbar sind dagegen die Aussagen von Chu *et al.* bezüglich der Verbesserung der funktionell-neurologischen Situation, da die Autoren mit dem *modified limb placing test* (MLPT) einen anderen Test zur Bestimmung des ‚*neurological outcome*‘ verwendet haben (Puurunen 2001). Zur Mortalität in den verschiedenen Behandlungsgruppen finden sich in den publizierten Ergebnissen keine Aussagen.

In einer anderen Arbeit zum Einfluss von Ceftriaxon auf den GLT-1 konnten Lee *et al.* bei Untersuchungen an humanen fetalen Astrozyten nach einer zweitägigen Behandlung mit 10 μ M Ceftriaxon feststellen, dass es in den Zellen zu einer Steigerung der GLT-1-mRNA-Expression und des GLT-1-Protein-Gehalts gekommen war (Lee 2008). Gleichzeitig zeigte die Arbeitsgruppe eine Aktivierung des GLT-1-Promotors und eine Steigerung der Aufnahme von Glutamat in die Zellen und konnte weiterhin den Mechanismus der Aktivierung des GLT-1-Promotors durch Ceftriaxon aufklären. Diese Ergebnisse stehen bis auf die Steigerung der Glutamataufnahme im Widerspruch zu den in dieser Arbeit gefundenen Resultaten, wobei es letzten Endes jedoch nicht klar ist, auf welchem Wege die Steigerung der Glutamataufnahme zustande gekommen ist. Während man bei Betrachten der Resultate von Lee *et al.* zu dem Schluss kommen kann, dass die vermehrte Glutamataufnahme ein Resultat des vermehrt vorliegenden GLT-1-Proteins ist, kann man andererseits auch postulieren, dass es, wie bereits beschrieben, auch zu einer stimulierenden Modulation der bereits in der Membran vorhandenen GLT-1-Transporter gekommen sein kann (Sheldon 2007; Robinson 2006; Lipski 2007). Hilfreich bei dieser Diskussion wäre sicherlich, nach dem Detektieren eines erhöhten GLT-1-Proteingehalts im Lysat der gesamten Zelle nochmals eine differenzierte Untersuchung verschiedener Zellkompartimente wie Zellmembran oder Zytoplasma durchzuführen. Damit wäre unter Umständen erkennbar, ob eine Zunahme der Glutamataufnahme durch ein erhöhtes GLT-1-Aufkommen in der Zellmembran oder durch eine Aktivitätszunahme der in der Zellmembran befindlichen Transportproteine bei eventuell

gleichzeitig durch erhöhte Neusynthese in zytoplasmatischen Vesikeln vermehrt vorliegenden GLT-1-Proteinen zu erklären ist.

Mit zunehmenden Interesse an der Arbeit von Rothstein *et al.* (Rothstein 2005) häuften sich dagegen, nicht zuletzt in Kreisen der mit der ALS-Forschung beschäftigten Wissenschaftler, Berichte darüber, dass die darin publizierten Ergebnisse von verschiedenen Arbeitsgruppen nicht reproduziert werden konnten (Lipski 2007, www.als.net). Insbesondere die Arbeit von Lipski *et al.* zeigte in Analogie zu der hier diskutierten Arbeit keine Zunahme des Gehalts an GLT-1-Protein bei einer gleichzeitigen Zunahme der Transportaktivität, wobei sich die Untersuchungen dieser Arbeitsgruppe mehr auf den GLT-1 in hippocampalen Zellen und Gewebe als auf den astrozytär gelegenen GLT-1 fokussierten (Lipski 2007).

Sowohl die hier durchgeführten Experimente als auch die von anderen Arbeitsgruppen publizierten Untersuchungen zeigen jedoch die Gemeinsamkeit, dass es möglich zu sein scheint, durch das β -Laktam-Antibiotikum Ceftriaxon, über eine im Moment noch nicht schlussendlich geklärte Art und Weise eine Wirkung am GLT-1 zu erzielen und somit in die Glutathomöostase einzugreifen. Betrachtet man dabei die oben genannten Anforderungen an eine Substanz, welche die Folgen nach einem Schlaganfall mindern kann, so finden sich sowohl in dieser Arbeit als auch in der zu diesem Thema publizierten Literatur Hinweise darauf, dass Ceftriaxon in Laboruntersuchungen die Kriterien einer neuroprotektiv wirkenden Substanz erfüllt. Dass dabei neben der Verhinderung exzitotoxischer Effekte auch eine Beeinflussung der Inflammation und Apoptose sowie ein positiver Einfluss auf das SIDS gesehen beziehungsweise vermutet werden kann, prädestiniert diese Substanz für weitere, vor allem klinischen Untersuchungen. Wie jedoch die Vergangenheit gezeigt hat, ist es in der Schlaganfallforschung besonders schwer, die in Laboruntersuchungen gewonnenen Erkenntnisse und Befunde auf die klinische Praxis zu übertragen (Pérez de la Ossa 2007).

Vorteilhaft für Ceftriaxon wäre sicherlich seine antibiotische Wirkung, die zusätzlich zu den neuroprotektiven Effekten einen positiven Einfluss auf das oben beschriebene SIDS haben wird, seine relativ geringen Nebenwirkungen sowie die klinische Erfahrung, die mit dieser Substanz in dem letzten Vierteljahrhundert gesammelt werden konnte. Einschränkungen in der Wirksamkeit sind, wie bei allen im Schlaganfall potentiell neuroprotektiv wirkenden Substanzen auch, dagegen durch die geringe Verfügbarkeit im Schadensgebiet gegeben (Donnan 2008). Dabei ist nicht nur die generell verschlechterte Perfusion des Infarktareals zu beachten, die der Substanz das Transportmedium nimmt, sondern auch die Frage nach der allgemeinen Liquorgängigkeit der in Frage kommenden Substanz (Donnan 2008).

Vergleicht man die Liquorkonzentrationen von Ceftriaxon, die bei verschiedenen Krankheiten mit und ohne Störung der Blut-Hirn-Schranke bestimmt wurden, mit den in dieser Arbeit *in vitro* verwendeten Ceftriaxon-Konzentrationen, so wird man feststellen, dass die in den *in vitro*-Untersuchungen verwendeten Konzentrationen deutlich höher liegen als die im humanen Liquor gemessenen Konzentrationen. Am Beispiel der entzündlichen Meningitis, einer Erkrankung mit einer erheblichen Störung der Blut-Hirn-Schranke (Moody 2006), wurden in Kindern nach einmal täglicher Gabe von 50-100 mg/kg KG Ceftriaxon Liquorkonzentrationen von 18,3 mg/l vier Stunden nach Applikation und von 2,8 mg/l 24 Stunden nach Applikation gemessen (Martin 1983), was einer Konzentration von 5 μ M bis 32 μ M Ceftriaxon entspricht. Im Gegensatz dazu findet man bei der zerebral manifestierten Lyme-Borreliose, welche eine Erkrankung mit einer sehr viel geringer ausgeprägten Störung der Blut-Hirn-Schranke darstellt, sehr viel niedrigere Liquorkonzentrationen an Ceftriaxon. Diese bewegen nach einer einmal täglichen Gabe von 2 g Ceftriaxon in einem Bereich von 2,25 mg/l (Maximalwert) bis 1,36 mg/l (24 Stunden nach Applikation), was gleichbedeutend einer Ceftriaxon-Konzentration von 3,9 μ M beziehungsweise 2,4 μ M im Liquor ist (Pfister 1991). Ähnliche Resultate konnten in Menschen mit einem externen Ventrikulostoma festgestellt werden. Im Liquor dieser Patienten, die nicht an einer Entzündung der Meningen gelitten haben, wurden Maximalwerte der Ceftriaxon-Konzentration von 0,14 mg/l bis 1,81 mg/l Liquor gemessen, was einem molaren Konzentrationsbereich von 245 nM bis 3,2 μ M entspricht (Nau 1993).

Dagegen liegt die in der Literatur beschriebene mittlere effektive Konzentration (EC_{50}) für eine gesteigerte GLT-1-Expression bei 3,5 μ M Ceftriaxon (Rothstein 2005) und somit knapp oberhalb der maximalen Ceftriaxon-Konzentration bei intakter Blut-Hirn-Schranke.

Bei den *in vivo* verwendeten Ceftriaxon-Dosen zeigt sich dagegen in der Literatur ein anderes Bild. So konnten bei Kaninchen mit einer experimentellen Pneumokokken-Meningitis, welche einmal täglich 200 mg/kg KG Ceftriaxon erhalten hatten, im Liquor Ceftriaxon in der Konzentration von durchschnittlich 11,6 mg/l, entsprechend 20,3 μ M, gefunden werden (Lutsar 1997). Diese Konzentration liegt somit sowohl deutlich über der von Rothstein *et al.* berechneten EC_{50} als auch über der Konzentration, bei der in dieser Arbeit an kultivierten Astrozyten eine Steigerung der Glutamataufnahme erreicht werden konnte. Bei diesem Vergleich ist aber zu beachten, dass die verwendeten Tiere durch die induzierte Meningitis eine erhebliche Schrankenstörung aufwiesen. Somit konnten mittels *in vivo*-Mikrodialyse in gesunden Ratten, welchen kontinuierlich 18 mg/h Ceftriaxon zugeführt wurde, in der Zerebrospinalflüssigkeit des lateralen Ventrikels auch nur Ceftriaxon-Konzentrationen von

durchschnittlich 0,71 mg/l, entsprechend 1,24 μ M bestimmt werden (Granero 1995). Bei der Diskussion der *in vitro* verwendeten und der *in vivo* vorliegenden Ceftriaxon-Konzentrationen muss aber auch beachtet werden, dass es infolge eines Schlaganfalls auch zu pathophysiologischen Veränderungen an der Blut-Hirn-Schranke kommen kann, die letztendlich zu einer Schrankenstörung führen können (Ballabh 2004). Von daher ist nicht ausgeschlossen, dass die Verfügbarkeit des Pharmakons im Schadensgebiet deutlich höher liegen kann als im ungeschädigten Gehirn.

Sollte sich durch weitere Untersuchungen ergeben, dass Ceftriaxon im akut geschädigten Gehirn während eines Schlaganfalls in Konzentrationen vorliegt, die *in vitro* einen Effekt auf die astrozytäre Glutamataufnahme haben, so sind nach meiner Ansicht die Voraussetzungen geschaffen, diese Substanz im klinischen Kontext an Patienten mit einem akuten Schlaganfall zu testen. Für die Substanz spricht a) die jahrzehntelange klinische Erfahrung im Umgang mit diesem Pharmakon, b) die Ungefährlichkeit der Substanz, c) die problemlose Applikation, d) der positive Einfluss auf das SIDS und e) die in Zeiten steigender Gesundheitsausgaben nicht zu vernachlässigende Preisgünstigkeit des Präparats. Sollte Ceftriaxon in den klinischen Studien zeigen können, dass es in der Lage ist, die neurologische Situation und/oder die Mortalität nach einem Schlaganfall zu senken, so würde dem klinischen Neurologen ein wirksames und gut verträgliches Pharmakon in die Hand gegeben, welches bereits im Tierversuch eine Mortalitätssenkung beim Schlaganfall zeigen konnte, wie sie in der Fachliteratur für andere Stoffe zuvor selten beschrieben wurde.

5. Zusammenfassung

Die Wirkung des β -Laktam-Antibiotikums Ceftriaxon im experimentellen Schlaganfall sowie auf den astrozytären Glutamattransporter GLT-1

Bei Untersuchungen in einem *in vivo*-Modell der amyotrophen Lateralsklerose konnte gezeigt werden, dass β -Laktam-Antibiotika und hier insbesondere Ceftriaxon neuroprotektive Effekte vermitteln können. Diese Effekte werden mit einer erhöhten Expression und Aktivität des astrozytären Glutamattransporters GLT-1 erklärt.

Da die ischämisch bedingten neuronalen Schädigungen während eines Schlaganfalls unter anderem auch auf eine erhöhte Konzentration von Glutamat im Extrazellulärraum zurückzuführen sind, wurden in dieser Arbeit die potentiell neuroprotektiven Effekte von Ceftriaxon in einem *in vivo*-Modell des Schlaganfalls untersucht. Hierzu wurden die neurologische Situation, die Infarktgröße und die Mortalität in Ceftriaxon-behandelten und unbehandelten Tieren bestimmt. Gleichzeitig erfolgten Messungen der GLT-1-mRNA- und GLT-1-Protein-Konzentrationen in verschiedenen Hirnarealen von Ceftriaxon-behandelten Ratten sowie in kultivierten Astrozyten der Ratte. Weiterhin erfolgten in den Astrozyten Untersuchungen des GLT-1-Promotors und der Glutamataufnahme in die Zellen.

Für die *in vivo*-Untersuchungen wurden männliche Wistar-Ratten einer Okklusion der Arteria cerebri media (*middle cerebral artery occlusion*; MCAO) für 90 Minuten mit nachfolgender Reperfusion unterzogen. Die Tiere erhielten Ceftriaxon (200 mg/kg intraperitoneal) entweder einmal täglich für fünf Tage vor dem MCAO-Eingriff oder als Einmalgabe 90 Minuten nach dem MCAO-Eingriff. Die neurologische Situation wurde mittels eines 18-Punkte Scores bewertet, die Infarktgröße mittels Magnetresonanztomographie bestimmt und die Mortalitätsdaten 24 Stunden nach MCAO erhoben. Die Konzentrationen von GLT-1-mRNA und GLT-1-Protein sowohl in den Hirnregionen als auch in den kultivierten Astrozyten wurden mittels *real-time*-PCR und *Western Blot* bestimmt. Für die Promotor-Untersuchungen wurde ein Luciferase-Assay verwendet. Die Bestimmung der zellulären Glutamataufnahme erfolgte mittels radioaktiv-markierten Glutamats.

Die Behandlung mit Ceftriaxon führt zu keiner signifikanten Reduktion der Infarktgröße in den Tieren mit MCAO-Eingriff. Dagegen kommt es zu einer drastischen Reduktion der Mortalität sowie zu einer signifikanten Verbesserung der neurologischen Situation bei den mit Ceftriaxon behandelten Tieren. Weder *in vivo* noch *in vitro* konnten Unterschiede im Gehalt

an GLT-1-mRNA und GLT-1-Protein unter Ceftriaxon-Behandlung festgestellt werden. Im Rahmen der *in vitro*-Promotor-Untersuchungen, bei denen erstmals der GLT-1-Promotor der Ratte sequenziert wurde, konnten ebenfalls keine Unterschiede zwischen den Ceftriaxon-behandelten und unbehandelten Zellen festgestellt werden. In Untersuchungen zur Glutamataufnahme der Zellen zeigte sich jedoch eine Erhöhung der Transportaktivität durch eine Ceftriaxonbehandlung.

Zusammenfassend konnte somit in dieser Arbeit demonstriert werden, dass Ceftriaxon auch beim ischämisch bedingten Schlaganfall neuroprotektive Effekte im Rattenmodell aufweist, welche jedoch nicht mit einer erhöhten Expression des astrozytären Glutamattransporters GLT-1 erklärt werden konnte, sondern am ehesten das Ergebnis einer Ceftriaxon-induzierten Mehraufnahme von Glutamat aus dem Extrazellulärraum sind.

5. Summary

Effect of β -lactam-antibiotic ceftriaxone in experimental stroke and its influence on astrocytic glutamate transporter GLT-1

In experiments in an animal model of amyotrophic lateral sclerosis, it has been shown that β -lactam antibiotics and, in particular, ceftriaxone mediate neuroprotective effects. These effects have been attributed to an increased expression and activity of astrocytic glutamate transporter GLT-1.

Since neuronal damage in ischemic brain areas is mediated by increased extracellular glutamate levels, this work is focused on the examination of possible neuroprotective effects of ceftriaxone in cerebral ischemia. Therefore, the effectiveness of ceftriaxone on neurological outcome, infarct size and mortality was tested in an *in vivo* model of cerebral ischemia. Simultaneously, the effects of ceftriaxone on expression of GLT-1-mRNA und GLT-1-Protein in different brain areas as well as in cultivated rat astrocytes were determined. Additionally, experiments concerning the GLT-1 promoter and the cellular glutamate uptake were performed.

In the *in vivo* experiments, male normotensive Wistar rats were subjected to right middle cerebral artery occlusion (MCAO) for 90 min with subsequent reperfusion. Animals received ceftriaxone (200 mg/kg bodyweight intraperitoneal once daily) either starting 5 days prior to MCAO or as a single injection 90 minutes after MCAO. Neurological evaluation was performed using an 18-point neurological scoring system. Infarct size was measured by MRT, and mortality was documented 24 hours after MCAO. Concentrations of GLT-1 mRNA and GLT-1-protein in different brain areas as well as in cultivated astrocytes were measured by real time PCR and *western blotting*, respectively. For promoter experiments a luciferase assay was utilized. Measurements of cellular glutamate uptake were carried out by using radiolabeled glutamate.

Treatment of rats with ceftriaxone did not lead to a significant reduction of infarct size after MCAO. Nevertheless, ceftriaxone significantly improved neurological outcome and dramatically reduced mortality after ischemic brain damage. Neither *in vivo* nor *in vitro* differences in concentrations of GLT-1-mRNA und GLT-1-Protein under ceftriaxone treatment were detectable. Studies on rat GLT-1 promoter (including a first time sequencing of the promoter) did not show any ceftriaxone effects on GLT-1 promoter activity. In contrast,

an increased glutamate transport activity, mediated by different concentrations of ceftriaxone, was measured by using radiolabeled glutamate in cultivated astrocytes.

In summary, this work was able to demonstrate that ceftriaxone is able to act as a neuroprotective agent in ischemic brain damage. These neuroprotective effects could not be explained by an increased expression of the astrocytic glutamate transporter GLT-1, but more likely by an increased glutamate uptake mediated by ceftriaxone.

6. Literaturverzeichnis

- Abramov AY, Scorziello A, Duchen MR** (2007) Three distinct mechanisms generate oxygen free radicals in neurons and contribute to cell death during anoxia and reoxygenation. *J Neurosci.* 27(5):1129-1138.
- Adibhatla RM, Hatcher JF, Dempsey RJ** (2002) Citicoline: neuroprotective mechanisms in cerebral ischemia. *J Neurochem.* 80(1):12-23.
- Arriza, JL, Eliasof S, Kavanaugh MP, Amara SG** (1997) Excitatory amino acid transporter 5, a retinal glutamate transporter coupled to a chloride conductance. *Proc Natl Acad Sci USA.* 94(8):4155-4160.
- Arriza JL, Fairman WA, Wadiche JI, Murdoch GH, Kavanaugh MP, Amara SG** (1994) Functional comparisons of three glutamate transporter subtypes cloned from human motor cortex. *J Neurosci.* 14(9):5559-5569.
- Arriza JL, Kavanaugh MP, Fairman WA, Wu YN, Murdoch GH, North RA, Amara SG** (1993) Cloning and expression of a human neutral amino acid transporter with structural similarity to the glutamate transporter gene family. *J Biol Chem.* 268(21):15329-15332.
- Arundine M, Tymianski M** (2004) Molecular mechanisms of glutamate-dependent neurodegeneration in ischemia and traumatic brain injury. *Cell Mol Life Sci.* 61(6):657-668.
- Arzberger T, Krampfl K, Leimgruber S, Weindl A** (1997) Changes of NMDA receptor subunit (NR1, NR2B) and glutamate transporter (GLT1) mRNA expression in Huntington's disease- an in situ hybridization study. *J Neuropathol Exp Neurol.* 56(4):440-454.
- Astrup J, Siesjo BK, Symon L** (1981) Thresholds in cerebral ischemia-the ischemic penumbra. *Stroke.* 12(6):723-5.
- Azmitia EC** (2001) Modern views on an ancient chemical: serotonin effects on cell proliferation, maturation and apoptosis. *Brain Res Bull.* 56(5):413-24.
- Ballabh P, Braun A, Nedergaard M** (2004) The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation and clinical implications. *Neurobiol Dis.* 16(1):1-13.
- Bandera E, Botteri M, Minelli C, Sutton A, Abrams KR, Latronico N** (2006) Cerebral blood flow threshold of ischemic penumbra and infarct core in acute ischemic stroke: a systematic review. *Stroke.* 37(5):1334-9.

- Baumann N, Pham-Dinh D** (2001) Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiol Rev.* 81(2):871-927.
- Bayles KW** (2000) The bactericidal action of penicillin: new clues to an unsolved mystery. *Trends Microbiol.* 8(6):274-8.
- Beart PM, O'Shea RD** (2007) Transporters for L-glutamate: an update on their molecular pharmacology and pathological involvement. *Br J Pharmacol.* 150(1):5-17.
- Bederson JB, Pitts LH, Germano SM, Nishimura MC, Davis RL, Bartkowski HM** (1986) Evaluation of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a stain for detection and quantification of experimental cerebral infarction in rats. *Stroke.* 17(6):1304-8.
- Belayev L, Alonso OF, Busto R, Zhao W, Ginsberg MD** (1996) Middle cerebral artery occlusion in the rat by intraluminal suture. Neurological and pathological evaluation of an improved model. *Stroke.* 27(9):1616-22.
- Brooks-Kayal AR, Munir M, Jin H, Robinson MB** (1998) The glutamate transporter, GLT-1, is expressed in cultured hippocampal neurons. *Neurochem Int.* 33(2):95-100.
- Brown RH Jr** (2005a) Amyotrophic lateral sclerosis--a new role for old drugs. *N Eng J Med.* 352(13):1376-8.
- Brown AM, Sickmann HM, Fosgerau K, Lund TM, Schousboe A, Waagepetersen HS, Ransom BR** (2005b) Astrocyte glycogen metabolism is required for neural activity during aglycemia or intense stimulation in mouse white matter. *J Neurosci Res.* 79(1-2):74-80.
- Butchbach ME, Tian G, Guo H, Lin CL** (2004) Association of excitatory amino acid transporters, especially EAAT2, with cholesterol-rich lipid raft microdomains: importance for excitatory amino acid transporter localization and function. *J Biol Chem.* 279(33):34388-96.
- Butcher SP, Bullock R, Graham DI, McCulloch J** (1990) Correlation between amino acid release and neuropathologic outcome in rat brain following middle cerebral artery occlusion. *Stroke.* 21(12):1727-33.
- Camacho A, Massieu L** (2006) Role of glutamate transporters in the clearance and release of glutamate during ischemia and its relation to neuronal death. *Arch Med Res.* 37(1):11-18.
- Campisi A, Renis M, Russo A, Sorrenti V, Di Giacomo C, Castorina C, Vanella A** (1992) Transglutaminase activity in primary and subcultured rat astroglial cells. *Neurochem Res.* 17(12):1201-5.

- Carvelli L, Morón JA, Kahlig KM, Ferrer JV, Sen N, Lechleiter JD, Leeb-Lundberg LM, Merrill G, Lafer EM, Ballou LM, Shippenberg TS, Javitch JA, Lin RZ, Galli A** (2002) PI 3-kinase regulation of dopamine uptake. *J Neurochem.* 81(4):859-69.
- Castellanos M, Sobrino T, Castillo J** (2006) Evolving paradigms for neuroprotection: molecular identification of ischemic penumbra. *Cerebrovasc Dis.* 21(Suppl. 2):71-9.
- Castillo J, Dávalos A, Noya M** (1997) Progression of ischaemic stroke and excitotoxic aminoacids. *Lancet.* 349(9045):79-83.
- Castillo J, Dávalos A, Naveiro J, Noya M** (1996) Neuroexcitatory amino acids and their relation to infarct size and neurological deficit in ischemic stroke. *Stroke.* 27(6):1060-65.
- Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC** (1994) Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science.* 263(5148):802-5.
- Chan WY, Kohsaka S, Rezaie P** (2007) The origin and cell lineage of microglia: new concepts. *Brain Res Rev.* 53(2):344-54.
- Chen W, Aoki C, Mahadomrongkul V, Gruber CE, Wang GJ, Blitzblau R, Irwin N, Rosenberg PA** (2002) Expression of a variant form of the glutamate transporter GLT1 in neuronal cultures and in neurons and astrocytes in the rat brain. *J Neurosci.* 22(6):2142-2152.
- Cheng YD, Al-Khoury L, Zivin JA** (2004) Neuroprotection for ischemic stroke: two decades of success and failure. *NeuroRx.* 1(1):36-45.
- Chesler M** (2005) Failure and function of intracellular pH regulation in acute hypoxic-ischemic injury of astrocytes. *Glia.* 50(4):398-406.
- Choi DW** (1992). Excitotoxic cell death. *J Neurobiol.* 23(9):1261-76.
- Choi DW, Maullucci-Gedde M, Kriegstein AR** (1987) Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *J Neurosci.* 7(2):357-368.
- Chu K, Lee ST, Sinn DI, Ko SY, Kim EH, Kim JM, Kim SJ, Park DK, Jung KH, Song EC, Lee SK, Kim M, Roh JK** (2007) Pharmacological induction of ischemic tolerance by glutamate transporter-1 (EAAT2) upregulation. *Stroke.* 38(1):177-182.
- Conti F, Weinberg RJ** (1999) Shaping excitation at glutamatergic synapses. *Trends Neurosci.* 22(10):451-458.
- Dai W J, Funk A, Herdegen T, Unger T, Culman J** (1999) Blockade of central angiotensin AT(1) receptors improves neurological outcome and reduces expression of AP-1 transcription factors after focal brain ischemia in rats. *Stroke.* 30(11):2391-2398.

- Damberg R, Kidson C** (1977) Differential radiosensitivity of mouse embryonic neurons and glia in cell culture. *J Neuropathol Exp Neurol.* 36(3):576-85.
- Danbolt NC** (2001) Glutamate uptake. *Prog Neurobiol.* 65(1):1-105.
- Daré E, Schulte G, Karovic O, Hammarberg C, Fredholm BB** (2007) Modulation of glial cell functions by adenosine receptors. *Physiol Behav.* 92(1-2):15-20.
- Davies J** (1994) Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Science.* 264(5157):375-82.
- Deitmer JW** (2000) Wie Gliazellen Neurone stark machen. *Biol Unserer Zeit.* 30(6):333-340.
- De Groot CJ, Langeveld CH, Jongenelen CA, Montagne L, Van Der Valk P, Dijkstra CD** (1997) Establishment of human adult astrocyte cultures derived from postmortem multiple sclerosis and control brain and spinal cord regions: immunophenotypical and functional characterization. *J Neurosci Res.* 49(3):342-54.
- Dienel GA, Cruz NF** (2006) Astrocyte activation in working brain: energy supplied by minor substrates. *Neurochem Int.* 48(6-7):586-95.
- Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA** (1999) Pathobiology of ischemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci.* 22(9):391-397
- Donnan GA** (2008) The 2007 Feinberg lecture: a new road map for neuroprotection. *Stroke.* 39(1):242-248.
- Duan S, Anderson CM, Stein BA, Swanson RA** (1999) Glutamate induces rapid upregulation of astrocyte glutamate transport and cell-surface expression of GLAST. *J Neurosci.* 19(23):10193-200.
- Duffy S, MacVicar BA** (1996) In vitro ischemia promotes calcium influx and intracellular calcium release in hippocampal astrocytes. *J Neurosci.* 16(1):71-81.
- Dunlop J, McIlvain HB, Carrick TA, Jow B, Lu Q, Kowal D, Lin S, Greenfield A, Grosanu C, Fan K, Petroski R, Williams J, Foster A, Butera J** (2005) Characterization of novel aryl-ether, biaryl, and fluorene aspartic acid and diamino propionic acid analogs as potent inhibitors of the high-affinity glutamate transporter EAAT2. *Mol Pharmacol.* 68(4):974-82.
- Dunlop J, Eliasof S, Stack G, McIlvain HB, Greenfield A, Kowal D, Petroski R, Carrick T** (2003) WAY-855 (3-amino-tricyclo[2.2.1.0^{2,6}]heptane-1,3-dicarboxylic acid): a novel, EAAT2-preferring, nonsubstrate inhibitor of high-affinity glutamate uptake. *Br J Pharmacol.* 140(5):839-846.

- Durukan A, Tatlisumak T** (2007) Acute ischemic stroke: overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia. *Pharmacol Biochem Behav.* 87(1):179-97.
- Eberhardt W, Doller A, Akool el-S, Pfeilschifter J** (2007) Modulation of mRNA stability as a novel therapeutic approach. *Pharmacol Ther.* 114(1):56-73.
- Elewa HF, Hilali H, Hess DC, Machado LS, Fagan SC** (2006) Minocycline for short-term neuroprotection. *Pharmacotherapy.* 26(4):515-21.
- Emmerson AM, Lampport PA, Reeves DS, Bywater MJ, Holt HA, Wise R, Andrews J, Hall MJ** (1985) The in vitro antibacterial activity of ceftriaxone in comparison with nine other antibiotics. *Curr Med Res Opin.* 9(7):480-93.
- Eng DL, Lee YL, Lal PG** (1997) Expression of glutamate uptake transporters after dibutyryl cyclic AMP differentiation and traumatic injury in cultured astrocytes. *Brain Res.* 778(1):215-21.
- Eng LF, Ghirnikar RS, Lee YL** (2000) Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochem Res.* 25(9-10):1439-51.
- Eschenfelder CC, Zeller JA, Stinglele R** (2006) Schlaganfall: Ursachen und Klassifikation. *Hamostaseologie.* 26(4):298-308.
- Fairman WA, Vandenberg RJ, Arriza JL, Kavanaugh MP, Amara SG** (1995) An excitatory amino-acid transporter with properties of a ligand-gated chloride channel. *Nature.* 375(6532):599-603.
- Figiel M, Allritz C, Lehmann C, Engele J** (2007) Gap junctional control of glial glutamate transporter expression. *Mol Cell Neurosci.* 35(1):130-137.
- Figiel M, Engele J** (2000) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP), a neuron-derived peptide regulating glial glutamate transport and metabolism. *J Neurosci.* 20(10):3596-3605.
- Fonnum F** (1984) Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. *J. Neurochem.* 42(1):1-11.
- Fontana R, Canepari P, Lleo MM, Satta G** (1990) Mechanisms of resistance of enterococci to beta-lactam antibiotics. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 9(2):103-5.
- Fraser DD, Mudrick-Donnon LA, MacVicar BA** (1994) Astrocytic GABA receptors. *Glia.* 11(2):83-93.
- Friedrich C** (2006) Zwischen Zufall und gezielter Entwicklung: Die Geschichte der β -Lactam-Antibiotika. *Pharm Unserer Zeit.* 35(5):392-8.

- Gahtan V, Olson ET, Sumpio BE** (2002) Molecular biology: a brief overview. *J Vasc Surg.* 35(3):563-8.
- Ganel R, Ho T, Maragakis NJ, Jackson M, Steiner JP, Rothstein JD** (2006) Selective up-regulation of the glial Na⁺-dependent glutamate transporter GLT1 by a neuroimmunophilin ligand results in neuroprotection. *Neurobiol Dis.* 21(3):556-67.
- Garcia JH, Wagner S, Liu KF, Hu XJ** (1995) Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats. Statistical validation. *Stroke.* 26(4):627-634.
- Gegelashvili G, Dehnes Y, Danbolt NC, Schousboe A** (2000) The high-affinity glutamate transporters GLT1, GLAST, and EAAT4 are regulated via different signalling mechanisms. *Neurochem Int.* 37(2-3):163-170.
- Gochenauer GE, Robinson MB** (2001) Dibutyryl-cAMP (dbcAMP) up-regulates astrocytic chloride-dependent L-[3H]glutamate transport and expression of both system xc⁻ subunits. *J Neurochem.* 78(2):276-286.
- Goldlust EJ, Paczynski RP, He YY, Hsu CY, Goldberg MP** (1996) Automated measurement of infarct size with scanned images of triphenyltetrazolium chloride-stained rat brains. *Stroke.* 27(9):1657-62.
- Goldstein LB, Simel DL** (2005) Is this patient having a stroke? *JAMA.* 293(19):2391-402.
- Granero L, Santiago M, Cano J, Machado A, Peris JE** (1995) Analysis of ceftriaxone and ceftazidime distribution in cerebrospinal fluid of and cerebral extracellular space in awake rats by in vivo microdialysis. *Antimicrob Agents Chemother.* 39(12):2728-31.
- Grau AJ, Weimar C, Buggle F, Heinrich A, Goertler M, Neumaier S, Glahn J, Brandt T, Hacke W, Diener HC** (2001) Risk factors, outcome, and treatment in subtypes of ischemic stroke: the Germanstroke data bank. *Stroke.* 32(11):2559-66.
- Grimaldi M, Cavallaro S** (2000) Expression and coupling of PACAP/VIP receptors in cortical neurons and type I astrocytes. *Ann NY Acad Sci.* 921:312-6.
- Groth W, Blume A, Gohlke P, Unger T, Culman J** (2003) Chronic pretreatment with candesartan improves recovery from focal cerebral ischaemia in rats. *J Hypertens.* 21(11):2175-2182.
- Guhaniyogi J, Brewer G** (2001) Regulation of mRNA stability in mammalian cells. *Gene.* 265(1-2):11-23.
- Guillet BA, Velly LJ, Canolle BFMM, Nieoullon AL, Pisano P** (2005) Differential regulation by protein kinases of activity and cell surface expression of glutamate transporters in neuron-enriched cultures. *Neurochem Int.* 46(4):337-346.

- Gurney ME** (1997) The use of transgenic mouse models of amyotrophic lateral sclerosis in preclinical drug studies. *J Neurol Sci.* 152(Suppl 1):S67-73.
- Hacke W, Donnan G, Fieschi C, Kaste M, von Kummer R, Broderick JP, Brott T, Frankel M, Grotta JC, Haley EC Jr, Kwiatkowski T, Levine SR, Lewandowski C, Lu M, Lyden P, Marler JR, Patel S, Tilley BC, Albers G, Bluhmki E, Wilhelm M, Hamilton S; ATLANTIS Trials Investigators; ECASS Trials Investigators; NINDS rt-PA Study Group Investigators** (2004) Association of outcome with early stroke treatment: pooled analysis of ATLANTIS, ECASS, and NINDS rt-PA stroke trials. *Lancet.* 363(9411):768-74.
- Hamilton-Miller JM** (2000) Sir Edward Abraham's contribution to the development of the cephalosporins: a reassessment. *Int J Antimicrob Agents.* 15(3):179-84.
- Hamke M, Herpfer I, Lieb K, Wandelt C, Fiebich BL** (2006) Substance P induces expression of the corticotropin-releasing factor receptor 1 by activation of the neurokinin-1 receptor. *Brain Res.* 1102(1):135-44.
- Hansen AJ, Nedergaard M** (1988) Brain ion homeostasis in cerebral ischemia. *Neurochem Pathol.* 9:195-209.
- Hazell AS** (2007) Excitotoxic mechanisms in stroke: an update of concepts and strategies. *Neurochem Int.* 50(7-8):941-953.
- Heisig P** (2006) Wirkungs- und Resistenzmechanismen der β -Lactam-Antibiotika. Penicillin-bindende Proteine, β -Lactamasen und Signalproteine. *Pharm Unserer Zeit.* 35(5):400-8.
- Heiss WD** (2000) Ischemic penumbra: evidence from functional imaging in man. *J Cereb Blood Flow Metab.* 20(9):1276-93.
- Hertz L, Chen Y, Gibbs ME, Zang P, Peng L** (2004) Astrocytic adrenoceptors: a major drug target in neurological and psychiatric disorders? *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord.* 3(3):239-67.
- Hewlett KA, Corbett D** (2006) Delayed minocycline treatment reduces long-term functional deficits and histological injury in a rodent model of focal ischemia. *Neuroscience.* 141(1):27-33.
- Higuchi T, Takeda Y, Hashimoto M, Nagano O, Hirakawa M** (2002) Dynamic changes in cortical NADH fluorescence and direct current potential in rat focal ischemia: relationship between propagation of recurrent depolarization and growth of the ischemic core. *J Cereb Blood Flow Metab.* 22(1):71-79.

- Hösli E, Hösli L** (2000) Colocalization of neurotransmitter receptors on astrocytes in explant cultures of rat CNS. *Neurochem Int.* 36(4-5):301-11.
- Hoogland G, van Oort RJ, Proper EA, Jansen GH, van Rijen PC, van Veelen CW, van Nieuwenhuizen O, Troost D, de Graan PN** (2004) Alternative splicing of glutamate transporter EAAT2 RNA in neocortex and hippocampus of temporal lobe epilepsy patients. *Epilepsy Res.* 59(2-3):75-82.
- Hoyte L, Kaur J, Buchan AM** (2004) Lost in translation: taking neuroprotection from animal models to clinical trials. *Exp Neurol.* 188(2):200-204.
- Hsieh HL, Wu CY, Hwang TL, Yen MH, Parker P, Yang CM** (2006) BK-induced cytosolic phospholipase A2 expression via sequential PKC-delta, p42/p44 MAPK, and NF-kappaB activation in rat brain astrocytes. *J Cell Physiol.* 206(1):246-54.
- Hurley BW, Nguyen CC** (2002) The spectrum of pseudomembranous enterocolitis and antibiotic-associated diarrhea. *Arch Intern Med.* 162(19):2177-84.
- Hurtado O, Moro MA, Cárdenas A, Sánchez V, Fernández-Tomé P, Leza JC, Lorenzo P, Secades JJ, Lozano R, Dávalos A, Castillo J, Lizasoain I** (2005) Neuroprotection afforded by prior citicoline administration in experimental brain ischemia: effects on glutamate transport. *Neurobiol Dis.* 18(2):336-345.
- Kalandadze A, Wu Y, Robinson MB** (2002) Protein kinase C activation decreases cell surface expression of the GLT-1 subtype of glutamate transporter. Requirement of a carboxyl-terminal domain and partial dependence on serine 486. *J Biol Chem.* 277(48):45741-50.
- Kanai Y, Hediger MA** (2003) The glutamate and neutral amino acid transporter family: physiological and pharmacological implications. *Eur J Pharmacol.* 479(1-3):237-247.
- Kanai Y, Hediger MA** (1992) Primary structure and functional characterization of a high-affinity glutamate transporter. *Nature.* 360(6403):467-471.
- Kasner SE** (2006) Clinical interpretation and use of stroke scales. *Lancet Neurol.* 5(7):603-12.
- Kekuda R, Prasad PD, Fei YJ, Torres-Zamorano V, Sinha S, Yang-Feng, TL, Leibach FH, Ganapathy V** (1996) Cloning of the sodium-dependent, broad-scope, neutral amino acid transporter Bo from a human placental choriocarcinoma cell line. *J Biol Chem.* 271(31):18657-18661.
- Kelkar PS, Li JT** (2001) Cephalosporin allergy. *N Engl J Med.* 345(11):804-9.
- Kew JN, Kemp JA** (2005) Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. *Psychopharmacology (Berl).* 179(1):4-29.

- Kim SY, Choi SY, Chao W, Volsky DJ** (2003) Transcriptional regulation of human excitatory amino acid transporter 1 (EAAT1):cloning of the EAAT1 promoter and characterization of its basal and inducible activity in human astrocytes. *J Neurochem.* 87(6):1485-498.
- Kimelberg HK** (2005) Astrocytic swelling in cerebral ischemia as a possible cause of injury and target for therapy. *Glia.* 50(4):389-397.
- Kimelberg HK, Scholls GP, Cai Z, Zhou M** (2000) Freshly isolated astrocyte (FIA) preparations: a useful single cell system for studying astrocyte properties. *J Neurosci Res.* 61(6):577-587.
- Kimelberg HK, Goderie SK, Higman S, Pang S, Waniewski RA** (1990) Swelling-induced release of glutamate, aspartate, and taurine from astrocyte cultures. *J Neurosci.* 10(5):1583-1591.
- Kitanaka J, Hashimoto H, Gotoh M, Kondo K, Sakata K, Hirasawa Y, Sawada M, Suzumura A, Marunouchi T, Matsuda T, Baba A** (1996) Expression pattern of messenger RNAs for prostanoid receptors in glial cell cultures. *Brain Res.* 707(2):282-7.
- Kofuji P, Newman EA** (2004) Potassium buffering in the central nervous system. *Neuroscience.* 129(4):1045-56.
- Kolominsky-Rabas PL, Heuschmann PU** (2002) Incidence, etiology and long-term prognosis of stroke. *Fortschr Neurol Psychiatr.* 70(12):657-62.
- Komuro H, Rakic P** (1993) Modulation of neuronal migration by NMDA receptors. *Science.* 260(5104):95-7.
- Lamb HM, Ormrod D, Scott LJ, Figgitt DP** (2002) Ceftriaxone: an update of its use in the management of community-acquired and nosocomial infections. *Drugs.* 62(7):1041-89.
- Lämmer A, Günther A, Beck A, Krügel U, Kittner H, Schneider D, Illes P, Franke H** (2006) Neuroprotective effects of the P2 receptor antagonist PPADS on focal cerebral ischaemia-induced injury in rats. *Eur J Neurosci.* 23(10):2824-8.
- Lampl Y, Boaz M, Gilad R, Lorberboym M, Dabby R, Rapoport A, Anca-Hershkowitz M, Sadeh M** (2007) Minocycline treatment in acute stroke. *Neurology.* 69(14):1404-1410.
- Lee SG, Su ZZ, Emdad L, Gupta P, Sarkar D, Borjabad A, Volsky DJ, Fisher PB** (2008) Mechanism of ceftriaxone induction of excitatory amino acid transporter-2 expression and glutamate uptake in primary human astrocytes. *J Biol Chem.* 283(19):13116-23.

- Lehre KP, Levy LM, Ottersen OP, Storm-Mathisen J, Danbolt NC** (1995) Differential expression of two glial glutamate transporters in the rat brain: quantitative and immunocytochemical observations. *J Neurosci.* 15(3):1835-1853.
- Lester HA, Cao Y, Mager S** (1996) Listening to neurotransmitter transporters. *Neuron* 17(5):807-810.
- Levy LM, Warr O, Attwell D** (1998) Stoichiometry of the glial glutamate transporter GLT-1 expressed inducibly in a Chinese hamster ovary cell line selected for low endogenous Na⁺-dependent glutamate uptake. *J Neurosci.* 18(23):9620-9628.
- Li J, Culman J, Hörtnagl H, Zhao Y, Gerova N, Timm M, Blume A, Zimmermann M, Seidel K, Dirnagl U, Unger T** (2005) Angiotensin AT₂ receptor protects against cerebral ischemia-induced neuronal injury. *FASEB J.* 19(6):617-619.
- Li S, Mallory M, Alford M, Tanaka S, Masliah E** (1997) Glutamate transporter alterations in Alzheimer disease are possibly associated with abnormal APP expression. *J Neuropathol Exp Neurol.* 56(8):901-911.
- Lin CI, Orlov I, Ruggiero AM, Dykes-Hoberg M, Lee A, Jackson M, Rothstein JD** (2001) Modulation of the neuronal glutamate transporter EAAC1 by the interacting protein GTRAP3-18. *Nature.* 410(6824):84-8.
- Lipski J, Wan CK, Bai JZ, Pi R, Li D** (2007) Neuroprotective potential of ceftriaxone in in vitro models of stroke. *Neuroscience.* 146(2):617-629.
- Liu Y, Rao MS** (2004) Glial progenitors in the CNS and possible lineage relationships among them. *Biol Cell.* 96(4):279-90.
- Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R** (1989) Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke.* 20(1):84-91.
- Longuemare MC, Rose CR, Farrell K, Ransom BR, Waxman SG, Swanson RA** (1999) K⁽⁺⁾-induced reversal of astrocyte glutamate uptake is limited by compensatory changes in intracellular Na⁽⁺⁾. *Neuroscience.* 93(1):285-292.
- Lundy EF, Solik BS, Frank RS, Lacy PS, Combs DJ, Zelenock GB, D'Alecy LG** (1986) Morphometric evaluation of brain infarcts in rats and gerbils. *J Pharmacol Methods.* 16(3):201-14.
- Lutsar I, Friedland IR** (2000) Pharmacokinetics and pharmacodynamics of cephalosporins in cerebrospinal fluid. *Clin Pharmacokinet.* 39 (5):335-43.

- Lutsar I, Ahmed A, Friedland IR, Trujillo M, Wubbel L, Olsen K, McCracken GH Jr** (1997) Pharmacodynamics and bactericidal activity of ceftriaxone therapy in experimental cephalosporin-resistant pneumococcal meningitis. *Antimicrob Agents Chemother.* 41(11):2414-7.
- Madaan A, Li JT** (2004) Cephalosporin allergy. *Immunol Allergy Clin North Am.* 24(3):463-76,vi-vii.
- Marie H, Billups D, Bedford FK, Dumoulin A, Goyal RK, Longmore GD Moss SJ, Attwell D** (2002) The amino terminus of the glial glutamate transporter GLT-1 interacts with the LIM protein Ajuba. *Mol Cell Neurosci.* 19(2):152-164.
- Martin E** (1983) Once-daily administration of ceftriaxone in the treatment of meningitis and other serious infections in children. *Eur J Clin Microbiol.* 2(5):509-15.
- Martin LJ, Brambrink AM, Lehmann C, Portera-Cailliau C, Koehler R, Rothstein J, Traystman RJ** (1997) Hypoxia-ischemia causes abnormalities in glutamate transporters and death of astroglia and neurons in newborn striatum. *Ann Neurol.* 42(3):335-348.
- Matsuo Y, Mihara S, Ninomiya M, Fujimoto M** (2001) Protective effect of endothelin type A receptor antagonist on brain edema and injury after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke.* 32(9):2143-2148.
- Mattle HP, Hennerici M, Sztajzel R** (2003) Pathophysiologie, Ätiologie und Diagnose des Schlaganfalls. *Ther Umsch.* 60(9):499-507.
- Mehta SL, Manhas N, Raghubir R** (2007) Molecular targets in cerebral ischemia for developing novel therapeutics. *Brain Res Rev.* 54(1):34-66.
- Meisel C, Schwab JM, Prass K, Meisel A, Dirnagl U** (2005) Central nervous system injury-induced immune deficiency syndrome. *Nat Rev Neurosci.* 6(10):775-786.
- Meisel C, Prass K, Braun J, Victorov I, Wolf T, Megow D, Halle E, Volk HD, Dirnagl U, Meisel A** (2004) Preventive antibacterial treatment improves the general medical and neurological outcome in a mouse model of stroke. *Stroke.* 35(1):2-6.
- Miller TM, Cleveland DW** (2005) Medicine. Treating neurodegenerative diseases with antibiotics. *Science.* 307(5708):361-2.
- Milton ID, Banner S J, Ince PG, Piggott NH, Fray AE, Thatcher N, Horne CH, Shaw PJ** (1997) Expression of the glial glutamate transporter EAAT2 in the human CNS: an immunohistochemical study. *Brain Res Mol Brain Res.* 52(1):17-31.

- Miyazaki I, Asanuma M, Diaz-Corrales FJ, Miyoshi K, Ogawa N** (2004) Direct evidence for expression of dopamine receptors in astrocytes from basal ganglia. *Brain Res.* 1029(1):120-3.
- Montana V, Malarkey EB, Verderio C, Matteoli M, Parpura V** (2006) Vesicular transmitter release from astrocytes. *Glia.* 54(7):700-715.
- Montana V, Ni Y, Sunjara V, Hua X, Parpura V** (2004) Vesicular glutamate transporter-dependent glutamate release from astrocytes. *J Neurosci.* 24(11):2633-2642.
- Moody DM** (2006) The blood-brain barrier and blood-cerebral spinal fluid barrier. *Semin Cardiothorac Vasc Anesth.* 10(2):128-31.
- Morimoto N, Shimazawa M, Yamashima T, Nagai H, Hara H** (2005) Minocycline inhibits oxidative stress and decreases in vitro and in vivo ischemic neuronal damage. *Brain Res.* 1044(1):8-15.
- Namura S, Maeno H, Takami S, Jiang XF, Kamichi S, Wada K, Nagata I** (2002) Inhibition of glial glutamate transporter GLT1 augments brain edema after transient focal cerebral ischemia in mice. *Neurosci Lett.* 324(2):117-120.
- Nau R, Prange HW, Muth P, Mahr G, Menck S, Kolenda H, Sörgel F** (1993). Passage of cefotaxime and ceftriaxone into cerebrospinal fluid of patients with uninflamed meninges. *Antimicrob Agents Chemother.* 37(7):1518-24.
- Nedelmann M, Wilhelm-Schwenkmezger T, Alessandri B, Heimann A, Schneider F, Eicke BM, Dieterich M, Kempfski O** (2007) Cerebral embolic ischemia in rats: correlation of stroke severity and functional deficit as important outcome parameter. *Brain Res.* 1130(1):188-96.
- Newman EA** (2003) New roles for astrocytes: regulation of synaptic transmission. *Trends Neurosci.* 26(10):536-542.
- Nicholls DG, Johnson-Cadwell L, Vesce S, Jekabsons M, Yadava N** (2007). Bioenergetics of mitochondria in cultured neurons and their role in glutamate excitotoxicity. *J Neurosci Res.* 85(15):3206-12.
- O'Shea RD, Lau CL, Farso MC, Diwakarla S, Zagami CJ, Svendsen BB, Feeney SJ, Callaway JK, Jones NM, Pow DV, Danbolt NC, Jarrott B, Beart PM** (2006) Effects of lipopolysaccharide on glial phenotype and activity of glutamate transporters: Evidence for delayed up-regulation and redistribution of GLT-1. *Neurochem Int.* 48(6-7):604-10.
- Olney JW** (1969) Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. *Science.* 164(880):719-21.

- Onal MZ, Fisher M** (1997) Acute ischemic stroke therapy. A clinical overview. *Eur Neurol.* 38(3):141-54.
- Ottersen OP, Laake JH, Reichelt W, Haug FM, Torp R** (1996) Ischemic disruption of glutamate homeostasis in brain: quantitative immunocytochemical analyses. *J Chem Neuroanat.* 12(1):1-14.
- Ouyang YB, Voloboueva LA, Xu LJ, Giffard RG** (2007) Selective dysfunction of hippocampal CA1 astrocytes contributes to delayed neuronal damage after transient forebrain ischemia. *J Neurosci.* 27(16):4253-4260.
- Ozawa S, Kamiya H, Tsuzuki K** (1998) Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol.* 54(5):581-618.
- Page G, Barc-Pain S, Pontcharraud R, Cante A, Piriou A, Barrier L** (2004) The up-regulation of the striatal dopamine transporter's activity by cAMP is PKA-, CaMK II- and phosphatase-dependent. *Neurochem Int.* 45(5):627-32.
- Parkinson FE, Xiong W** (2004) Stimulus- and cell-type-specific release of purines in cultured rat forebrain astrocytes and neurons. *J Neurochem.* 88(5):1305-1312.
- Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V.** (1994) Konsensuskonferenz: Cephalosporine zur parenteralen Applikation. *Chemother J.* 3:101-15.
- Paulding WR, Sumners C** (1996) Protein kinase C modulates natriuretic peptide receptors in astroglial cultures from rat brain. *Am J Physiol.* 270(3):C740-7.
- Pérez de la Ossa N, Dávalos A** (2007) Neuroprotection in cerebral infarction: the opportunity of new studies. *Cerebrovasc Dis.* 24(Suppl. 1):153-6.
- Perry TR, Schentag JJ** (2001) Clinical use of ceftriaxone: a pharmacokinetic-pharmacodynamic perspective on the impact of minimum inhibitory concentration and serum protein binding. *Clin Pharmacokinet.* 40(9):685-94.
- Persson M, Brantefjord M, Hansson E, Rönnbäck L** (2005) Lipopolysaccharide increases microglial GLT-1 expression and glutamate uptake capacity in vitro by a mechanism dependent on TNF-alpha. *Glia.* 51(2):111-20.
- Pertusa M, García-Matas S, Rodríguez-Farré E, Sanfeliu C, Cristòfol R** (2007) Astrocytes aged in vitro show a decreased neuroprotective capacity. *J Neurochem.* 101(3):794-805.
- Peters O, Back T, Lindauer U, Busch C, Megow D, Dreier J, Dirnagl U** (1998) Increased formation of reactive oxygen species after permanent and reversible middle cerebral artery occlusion in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab.* 18(2):196-205.

- Pfister HW, Preac-Mursic V, Wilske B, Schielke E, Sorgel F, Einhaupl KM** (1991) Randomized comparison of ceftriaxone and cefotaxime in Lyme neuroborreliosis. *J Infect Dis.* 163(2):311-8.
- Phillis JW, O'Regan MH** (1996) Mechanisms of glutamate and aspartate release in the ischemic rat cerebral cortex. *Brain Res.* 730(1-2):150-64.
- Pines G, Danbolt NC, Bjørås M, Zhang Y, Bendahan A, Eide L, Koepsell H, Storm-Mathisen J, Seeberg E, Kanner BI** (1992) Cloning and expression of a rat brain L-glutamate transporter. *Nature.* 360(6403):464-467.
- Prass K, Meisel C, Höflich C, Braun J, Halle E, Wolf T, Ruscher K, Victorov IV, Priller J, Dirnagl U, Volk HD, Meisel A** (2003) Stroke-induced immunodeficiency promotes spontaneous bacterial infections and is mediated by sympathetic activation reversal by poststroke T helper cell type1-like immunostimulation. *J Exp Med.* 198(5):725-36.
- Puurunen K, Jolkkonen J, Sirviö J, Haapalinna A, Sivenius J** (2001) An alpha(2)-adrenergic antagonist, atipamezole, facilitates behavioral recovery after focal cerebral ischemia in rats. *Neuropharmacology.* 40(4):597-606.
- Raghavendra Rao VL, Rao AM, Dogan A, Bowen KK, Hatcher J, Rothstein JD, Dempsey RJ** (2000) Glial glutamate transporter GLT-1 down-regulation precedes delayed neuronal death in gerbil hippocampus following transient global cerebral ischemia. *Neurochem Int.* 36(6):531-537.
- Rajan I, Cline HT** (1998) Glutamate receptor activity is required for normal development of tectal cell dendrites in vivo. *J Neurosci.* 18(19):7836-46.
- Rao M** (2004) Stem and precursor cells in the nervous system. *J Neurotrauma.* 21(4):415-27.
- Rao VL, Bowen KK, Dempsey RJ** (2001a) Transient focal cerebral ischemia down-regulates glutamate transporters GLT1 and EAAC1 expression in rat brain. *Neurochem Res.* 26(5):497-502.
- Rao VL, Dogan A, Todd KD, Bowen KK, Kim BT, Rothstein JD, Dempsey RJ** (2001b) Antisense knockdown of the glial glutamate transporter GLT-1, but not the neuronal glutamate transporter EAAC1, exacerbates transient focal cerebral ischemia-induced neuronal damage in rat brain. *J Neurosci.* 21(6):1876-1883.
- Rausch JL** (2005) Initial conditions of psychotropic drug response: studies of serotonin transporter long promoter region (5-HTTLPR), serotonin transporter efficiency, cytokine and kinase gene expression relevant to depression and antidepressant outcome. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 29(6):1046-61.

- Richards DM, Heel RC, Brogden RN, Speight TM, Avery GS** (1984) Ceftriaxone. A review of its antibacterial activity, pharmacological properties and therapeutic use. *Drugs*. 27(6):469-527.
- Rifkin BR, Vernillo AT, Golub LM** (1993) Blocking periodontal disease progression by inhibiting tissue-destructive enzymes: a potential therapeutic role for tetracyclines and their chemically-modified analogs. *J Periodontol*. 64(8 Suppl.):819-27.
- Robinson MB** (2006) Acute regulation of sodium-dependent glutamate transporters: a focus on constitutive and regulated trafficking. *Handb Exp Pharmacol*. (175):251-75.
- Robinson MB** (2002) Regulated trafficking of neurotransmitter transporters: common notes but different melodies. *J Neurochem*. 80(1):1-11.
- Robinson MB** (1998) The family of sodium-dependent glutamate transporters: a focus on the GLT-1/EAAT2 subtype. *Neurochem Int*. 33(6): 479-491.
- Rossi DJ, Brady JD, Mohr C** (2007) Astrocyte metabolism and signaling during brain ischemia. *Nat Neurosci*. 10(11):1377-1386.
- Rossi DJ, Oshima T, Attwell D** (2000) Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake. *Nature*. 403(6767):316-321.
- Rossi DJ, Slater NT** (1993) The developmental onset of NMDA receptor-channel activity during neuronal migration. *Neuropharmacology*. 32(11):1239-48.
- Rothstein JD, Patel S, Regan MR, Haenggeli C, Huang YH, Bergles DE, Jin L, Dykes-Hoberg M, Vidensky S, Chung DS, Toan SV, Bruijn LI, Su ZZ, Gupta P, Fisher PB** (2005) Beta-lactam antibiotics offer neuroprotection by increasing glutamate transporter expression. *Nature*. 433(7021):73-7.
- Rothstein JD, Dykes-Hoberg M, Pardo CA, Bristol LA, Jin L, Kuncl RW, Kanai Y, Hediger MA, Wang Y, Schielke JP, Welty DF** (1996) Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron*. 16(3):675-686.
- Rothstein JD, Van Kammen M, Levey AI, Martin LJ, Kuncl RW** (1995) Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol*. 38(1):73-84.
- Saura J** (2007) Microglial cells in astroglial cultures: a cautionary note. *J Neuroinflammation*. 4:26.
- Saver JL** (2006) Time is brain--quantified. *Stroke*. 37(1):263-6.

- Saver JL, Johnston KC, Homer D, Wityk R, Koroshetz W, Truskowski LL, Haley EC** (1999) Infarct volume as a surrogate or auxiliary outcome measure in ischemic stroke clinical trials. The RANTTAS Investigators. *Stroke*. 30(2):293-8.
- Schaller B, Graf R** (2004) Cerebral ischemia and reperfusion: the pathophysiologic concept as a basis for clinical therapy. *J Cereb Blood Flow Metab*. 24(4):351-71.
- Schiemanck SK, Kwakkel G, Post MW, Prevo AJ** (2006) Predictive value of ischemic lesion volume assessed with magnetic resonance imaging for neurological deficits and functional outcome poststroke: A critical review of the literature. *Neurorehabil Neural Repair*. 20(4):492-502.
- Schiemanck SK, Post MW, Kwakkel G, Witkamp TD, Kappelle LJ, Prevo AJ** (2005) Ischemic lesion volume correlates with long-term functional outcome and quality of life of middle cerebral artery stroke survivors. *Restor Neurol Neurosci*. 23(3-4):257-63.
- Schlag BD, Vondrasek JR, Munir M, Kalandadze A, Zeleniaia OA, Rothstein JD, Robinson MB** (1998) Regulation of the glial Na⁺-dependent glutamate transporters by cyclic AMP analogs and neurons. *Mol Pharmacol*. 53(3):355-369.
- Schubert P, Keller F, Nakamura Y, Rudolphi K** (1994) The use of ion-sensitive electrodes and fluorescence imaging in hippocampal slices for studying pathological changes of intracellular Ca²⁺ regulation. *J Neural Transm Suppl*. 44:73-85.
- Schwede F, Maronde E, Genieser H, Jastorff B** (2000) Cyclic nucleotide analogs as biochemical tools and prospective drugs. *Pharmacol Ther*. 87(2-3):199-226.
- Seitz RJ, Hamzavi M, Junghans U, Ringleb PA, Schranz C, Siebler M** (2003) Thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator and tirofiban in stroke: preliminary observations. *Stroke*. 34(8):1932-5.
- Shafqat S, Tamarappoo BK, Kilberg MS, Puranam RS, McNamara JO, Guadano-Ferraz A, Fremeau RT Jr** (1993) Cloning and expression of a novel Na⁽⁺⁾-dependent neutral amino acid transporter structurally related to mammalian Na⁺/glutamate cotransporters. *J Biol Chem*. 268(21):15351-15355.
- Sheldon AL, Robinson MB** (2007) The role of glutamate transporters in neurodegenerative diseases and potential opportunities for intervention. *Neurochem Int*. 51(6-7):333-55.
- Shi F, Audus KL** (1994) Biochemical characteristics of primary and passaged cultures of primate brain microvessel endothelial cells. *Neurochem Res*. 19(4):427-33.
- Shigeri Y, Seal RP, Shimamoto K** (2004) Molecular pharmacology of glutamate transporters, EAATs and VGLUTs. *Brain Res Rev*. 45(3):250-265.

- Silver IA, Deas J, Erecinska M** (1997) Ion homeostasis in brain cells: differences in intracellular ion responses to energy limitation between cultured neurons and glial cells. *Neuroscience*. 78(2):589-601.
- Sims KD, Robinson MB** (1999) Expression patterns and regulation of glutamate transporters in the developing and adult nervous system. *Crit Rev Neurobiol*. 13(2):169-197.
- Slotboom DJ, Konings WN, Lolkema JS** (1999) Structural features of the glutamate transporter family. *Microbiol Mol Biol Rev*. 63(2):293-307.
- Smith RE, Haroutunian V, Davis KL, Meador-Woodruff JH** (2001) Expression of excitatory amino acid transporter transcripts in the thalamus of subjects with schizophrenia. *Am J Psychiatry*. 158(9):1393-1399.
- Sonnwald U, Westergaard N, Schousboe A** (1997) Glutamate transport and metabolism in astrocytes. *Glia*. 1997;21(1):56-63.
- Spector R** (1987) Ceftriaxone transport through the blood-brain barrier. *J Infect Dis*. 156(1):209-11.
- Stiene-Martin A, Knapp PE, Martin K, Gurwell JA, Ryan S, Thornton SR, Smith FL, Hauser KF** (2001) Opioid system diversity in developing neurons, astroglia, and oligodendroglia in the subventricular zone and striatum: impact on gliogenesis in vivo. *Glia*. 36(1):78-88.
- Stingle R, Eschenfelder CC, Zeller J** (2006) Therapie des akuten Schlaganfalls. *Hamostaseologie*. 26(4):316-25.
- Stoeckel K, Koup JR** (1984) Pharmacokinetics of ceftriaxone in patients with renal and liver insufficiency and correlation with a physiologic nonlinear protein binding model. *Am J Med*. 77(4C):26-32.
- Storck T, Schulte S, Hofmann K, Stoffel W** (1992) Structure, expression, and functional analysis of a Na⁺-dependent glutamate/aspartate transporter from rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA*. 89(22):10955-10959.
- Storm-Mathisen J, Danbolt NC, Rothe F, Torp R, Zhang N, Aas JE, Kanner BI, Langmoen I, Ottersen OP** (1992) Ultrastructural immunocytochemical observations on the localization, metabolism and transport of glutamate in normal and ischemic brain tissue. *Prog Brain Res*. 94:225-41.
- Su ZZ, Leszczyniecka M, Kang DC, Sarkar D, Chao W, Volsky DJ, Fisher PB** (2003) Insights into glutamate transport regulation in human astrocytes: cloning of the promoter for excitatory amino acid transporter 2 (EAAT2). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100(4):1955-60.

- Sullivan R, Rauen T, Fischer F, Wiessner M, Grewer C, Bicho A, Pow DV** (2004) Cloning, transport properties, and differential localization of two splice variants of GLT-1 in the rat CNS: implications for CNS glutamate homeostasis. *Glia* 45(2):155-169.
- Swanson RA, Farrell K, Simon RP** (1995) Acidosis causes failure of astrocyte glutamate uptake during hypoxia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 15(3):417-424.
- Tagaya M, Liu KF, Copeland B, Seiffert D, Engler R, Garcia JH, del Zoppo GJ** (1997) DNA scission after focal brain ischemia. Temporal differences in two species. *Stroke.* 28(6):1245-1254.
- Takagi K, Ginsberg MD, Globus MY, Dietrich WD, Martinez E, Kraydieh S, Busto R** (1993) Changes in amino acid neurotransmitters and cerebral blood flow in the ischemic penumbral region following middle cerebral artery occlusion in the rat: correlation with histopathology. *J Cereb Blood Flow Metab.* 13(4):575-85.
- Tanaka K, Watase K, Manabe T, Yamada K, Watanabe M, Takahashi K, Iwama H, Nishikawa T, Ichihara N, Kikuchi T, Okuyama S, Kawashima N, Hori S, Takimoto M, Wada K** (1997) Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1. *Science* 276(5319):1699-1702.
- Tenover FC** (2006) Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *Am J Infect Control.* 34(5 Suppl. 1):S3-10.
- Thom T, Haase N, Rosamond W, Howard VJ, Rumsfeld J, Manolio T, Zheng ZJ, Flegal K, O'Donnell C, Kittner S, Lloyd-Jones D, Goff DC Jr, Hong Y, Adams R, Friday G, Furie K, Gorelick P, Kissela B, Marler J, Meigs J, Roger V, Sidney S, Sorlie P, Steinberger J, Wasserthiel-Smoller S, Wilson M, Wolf P; American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee** (2006) Heart disease and stroke statistics--2006 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation.* 113(6):e85-151.
- Thompson RJ, Zhou N, MacVicar BA** (2006) Ischemia opens neuronal gap junction hemichannels. *Science.* 312(5775):924-927.
- Thorlin T, Roginski RS, Choudhury K, Nilsson M, Rönnâck L, Hansson E, Eriksson PS** (1998) Regulation of the glial glutamate transporter GLT-1 by glutamate and δ -opioid receptor stimulation. *FEBS Letters* 425(3):453-459.

- Tikka T, Usenius T, Tenhunen M, Keinänen R, Koistinaho J** (2001) Tetracycline derivatives and ceftriaxone, a cephalosporin antibiotic, protect neurons against apoptosis induced by ionizing radiation. *J Neurochem.* 78(6):1409-14.
- Torp R, Danbolt NC, Babaie E, Bjoras M, Seeberg E, Storm-Mathisen J, Ottersen OP** (1994) Differential expression of two glial glutamate transporters in the rat brain: an in situ hybridization study. *Eur J Neurosci.* 6(6):936-942.
- Trotti D, Rizzini BL, Rossi D, Haugeto O, Racagni G, Danbolt NC, Volterra A** (1997) Neuronal and glial glutamate transporters possess an SH-based redox regulatory mechanism. *Eur J Neurosci.* 9(6):1236-1243.
- Trotti D, Rossi D, Gjeslad O, Levy LM, Racagni G, Danbolt NC, Volterra A** (1996) Peroxynitrite inhibits glutamate transporter subtypes. *J Biol Chem.* 271(11):5976-5979.
- Tsuchiya R, Yoshiki F, Kudo Y, Morita M** (2002) Cell type-selective expression of green fluorescent protein and the calcium indicating protein, yellowameleon, in rat cortical primary cultures. *Brain Res.* 956(2):221-9.
- Utsunomiya-Tate N, Endou H, Kanai Y** (1996) Cloning and functional characterization of a system ASC-like Na⁺-dependent neutral amino acid transporter. *J Biol Chem.* 271(25):14883-14890.
- Utsunomiya-Tate N, Endou H, Kanai Y** (1997) Tissue specific variants of glutamate transporter GLT-1. *FEBS Lett.* 416(3):312-316.
- Vannucchi MG, Bizzoco E, Corsani L, Gianfriddo M, Pedata F, Fausone-Pellegrini MS** (2007) Relationships between neurons expressing neuronal nitric oxide synthase, degree of microglia activation and animal survival. A study in the rat cortex after transient ischemia. *Brain Res.* 1132(1):218-227.
- Verkhatsky A** (2006) Patching the glia reveals the functional organisation of the brain. *Pflugers Arch.* 453(3):411-20.
- Wang J, Wei Q, Wang C, Hill WD, Hess DC, Dong Z** (2004) Minocycline upregulates Bcl-2 and protects against cell death in mitochondria. *J Biol Chem.* 279(19):19948-54.
- Weber R, Ramos-Cabrer P, Hoehn M** (2006) Present status of magnetic resonance imaging and spectroscopy in animal stroke models. *J Cereb Blood Flow Metab.* 26(5):591-604.
- Wegener S, Weber R, Ramos-Cabrer P, Uhlenkueken U, Wiedermann D, Kandal K, Villringer A, Hoehn M** (2005) Subcortical lesions after transient thread occlusion in the rat: T2-weighted magnetic resonance imaging findings without corresponding sensorimotor deficits. *J Magn Reson Imaging.* 21(4):340-6.

- Werner P, Pitt D, Raine CS** (2001) Multiple sclerosis: altered glutamate homeostasis in lesions correlates with oligodendrocyte and axonal damage. *Ann Neurol.* 50(2):169-180.
- Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP** (1997) Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques* 22(1):130-138.
- Yamada K, Watanabe M, Shibata T, Nagashima M, Tanaka K, Inoue Y** (1998) Glutamate transporter GLT1 is transiently localized on growing axons of the mouse spinal cord before establishing astrocytic expression. *J Neurosci.* 18(15):5706-5713.
- Yang Y, Herrup K** (2007) Cell division in the CNS: protective response or lethal event in post-mitotic neurons? *Biochim Biophys Acta.* 1772(4):457-66.
- Ye ZC, Wyeth MS, Baltan-Tekkok S, Ransom BR** (2003) Functional hemichannels in astrocytes: a novel mechanism of glutamate release. *J Neurosci.* 23(9):3588-3596.
- Yi JH, Hazell AS** (2006) Excitotoxic mechanisms and the role of astrocytic glutamate transporters in traumatic brain injury. *Neurochem Int.* 48(5):394-403.
- Yrjänheikki J, Tikka T, Keinänen R, Goldsteins G, Chan PH, Koistinaho J** (1999) A tetracycline derivative, minocycline, reduces inflammation and protects against focal cerebral ischemic with a wide therapeutic window. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96(23):13496-500.
- Yrjänheikki J, Keinänen R, Pellikka M, Hokfelt T, Koistinaho J** (1998) Tetracyclines inhibit microglial activation and are neuroprotective in global brain ischemia. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95(26):15769-74.
- Zakir Hossain SM, Shinohara H, Wang F, Kitano H** (2007) Real-time detection of L-glutamate released from C6 glioma cells using a modified enzyme-luminescence method. *Anal Bioanal Chem.* 389(6):1961-6.
- Zander R** (2002) Base excess and lactate concentration in infusion solutions and blood products. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther.* 37(6):359-63.
- Zhou J, Sutherland ML** (2004) Glutamate transporter cluster formation in astrocytic processes regulates glutamate uptake activity. *J Neurosci.* 24(28):6301-6.

- Statistisches Jahrbuch** (2003) Wiesbaden: Statistisches Bundesamt.
- Bucher O, Wartenberg H** (1989) Cytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen. 11., vollst. überarb. Aufl. Bern; Stuttgart; Toronto: Hans Huber Verlag.
- Forth W, Henschler D, Rummel W, Förstermann U, Starke K** (2001) Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. 8., völlig überarb. Aufl. München; Jena: Urban & Fischer.
- Marquardt H, Schäfer S** (2004) Lehrbuch der Toxikologie. 2., völlig neu bearb. Auflage. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH.
- Paxinos G, Watson C** (1996) The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, third edition. San Diego, London, Boston, New York, Sydney, Tokyo, Toronto: Academic Press, Harcourt Brace & Company.
- Schmidt R, Thews G** (1997) Physiologie des Menschen. 27. korr. u. aktualisierte Auflage. Berlin; Heidelberg; New York; Barcelona; Budapest; Hongkong; London; Mailand; Paris; Santa Clara; Singapur; Tokio: Springer.
- Trepel M** (1999) Neuroanatomie. 2., komplett überarb. Aufl. München, Jena: Urban & Fischer.

ALS Therapy Development Institute (ALSTDI): www.als.net

7. Abbildungsverzeichnis

- 1.1. schematische Darstellung der Zellen des ZNS (S.7)
- 1.2. schematische Darstellung eines Glutamattransporters der SLC1-Familie (S.12)
- 1.3. schematische Darstellung des normalen und reversen Glutamattransportes (S.16)
- 1.4. β -Laktam-Struktur (S.18)
- 1.5. Cephalosporin-Grundgerüst (S.19)
- 1.6. Strukturformel von Ceftriaxon (S.20)
- 3.1. Darstellung des zerebralen Blutflusses bei Tieren mit MCAO oder Schein-OP (S.58)
- 3.2. Darstellung der MRT-Angiographie vor, während und nach einem MCAO-Eingriff (S.60)
- 3.3. graphische Darstellung der Mittelwerte des neurologischen Defizit-scores (S.62)
- 3.4. repräsentative MRT-Aufnahmen bei Ratten mit und ohne MCAO-Eingriff (S.63)
- 3.5. graphische Darstellung der Infarkt volumina (S.64)
- 3.6. graphische Darstellung der relativen GLT-1-mRNA-Expression in verschiedenen Hirnarealen (S.65)
- 3.7. ausschnittsweise Darstellung eines *Western blot*-Film mit Banden des GLT-1-Proteins und GAPDH-Proteins in verschiedenen Hirnarealen (S.67)
- 3.8. lichtmikroskopische Darstellung solitär wachsender Astrozyten in Primärkultur (S.68)
- 3.9. lichtmikroskopische Darstellung im Zellverbund wachsender Astrozyten in Primärkultur (S.69)
- 3.10. lichtmikroskopische und fluoreszenzmikroskopische Darstellung eines Zellverbandes von Astrozyten (S.70)
- 3.11. fluoreszenzmikroskopische Darstellung eines einzelnen, GFAP-positiven Astrozyten (S.70)

- 3.12.** Bilder von Agarosegelen unter UV-Betrachtung mit Produkten der RT-PCR auf GLT-1-mRNA und 18S-rRNA in Astrozyten (S.71)
- 3.13.** Zusammenstellung von Bildern der Immunfluoreszenzmikroskopie auf verschiedene Proteine und DAPI-Färbung bei jeweils gleichen Astrozyten (S.72)
- 3.14.** graphische Darstellung der relativen GLT-1-mRNA-Expression in kultivierten Astrozyten unter Ceftriaxon- oder dbcAMP-Behandlung (S.74)
- 3.15.** graphische Darstellung der relativen GLT-1-mRNA-Expression in kultivierten Astrozyten unter Ceftriaxon- oder dbcAMP-Behandlung bei Verwendung verschiedener Ceftriaxon-Präparate (S.75)
- 3.16.** graphische Darstellung der relativen GLT-1-mRNA-Expression in kultivierten Astrozyten unter Ceftriaxon- oder dbcAMP-Behandlung bei Verwendung verschiedener Ceftriaxon-Konzentrationen (S.76)
- 3.17.** Ausschnittsweise Darstellung des *Western blot* Films mit Proteinproben kultivierter Astrozyten, dargestellt sind die Banden des GLT-1- und GAPDH-Proteins. (S.77)
- 3.18.** Fluoreszenzmikroskopische Übersichtsaufnahme von kultivierten Astrozyten, die mit dem pEGFP-N1-Vektor (links und Mitte) oder mit dem pCEP4 Leer-Vektor (rechts) transfiziert wurden (S.78)
- 3.19.** Sequenz des GLT-1-Promotors der Ratte mit endständigem Transkriptionsstartpunkt ATG (S.79)
- 3.20.** graphische Darstellung der relativen Renilla-Luciferase-Aktivität (RLA) in kultivierten Astrozyten unter Ceftriaxon- oder dbcAMP-Behandlung (S.80)
- 3.21.** graphische Darstellung der relativen Radioaktivität der Lysate aus kultivierten Astrozyten unter Ceftriaxon- oder dbcAMP-Behandlung (S.81)
- 4.1.** Strukturformeln von dbcAMP und des Hydrolyseproduktes von dbcAMP (S.93)
- 4.2.** Strukturformeln der L-Glutaminsäure und der L-[G-³H]-Glutaminsäure (S.97)

8. Tabellenverzeichnis

- 3.1.** Übersicht über die peri-operativ in der Blutgasanalytik gemessenen Parameter (S.59)
- 3.2.** Übersicht über die Mortalität der Ratten nach MCAO (S.61)

9. Abkürzungen

ACS	Aminocephalosporansäure
ALS	amyotrophe Lateralsklerose
AMPA	<i>Aminohydroxymethylisoxazolpropionic acid</i> ; Aminohydroxymethylisoxazolpropionsäure
ANP	atriales natriuretisches Peptid
ASAT	Aspartat-Aminotransferase
ASCT	Alanin-Serin-Cystein-Transporter
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	<i>Bicinchonic acid</i> ; Bicinchoninsäure
BDNF	<i>brain-derived neurothrophic factor</i>
bp	<i>base pair</i> ; Basenpaar
BSA	Bovines Serum-Albumin
ca.	zirka
Ca	Calcium
CaCl ₂	Calciumchlorid
cAMP	<i>cyclic adenosine monophosphate</i> ; zyklisches Adenosinmonophosphat
CCR	<i>Center for Cardiovascular Research</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i> ; komplementäre DNA
Ci	Curie
cm	Zentimeter
C _{max}	maximale Serumkonzentration
CO ₂	Kohlendioxid
DAPI	Diaminophenylindol
dbcAMP	Dibutyryl-cAMP

Abkürzungen

DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> ; Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosid-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
EAAC	<i>Excitatory Amino Acid Carrier</i> ; Transporter exzitatorischer Aminosäuren
EAAT	<i>Excitatory Amino Acid Transporter</i> ; Transporter exzitatorischer Aminosäuren
EDTA	Ethylendiamino-tetraessigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i> ; epidermaler Wachstumsfaktor
EGFP	<i>Endogenous Green Fluorescenting Protein</i> ; endogenes grün fluoreszierendes Protein
EGTA	Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-tetraessigsäure
FCS	<i>fetal calf serum</i> ; Fetales Kälberserum
FITC	Fluorescein
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFAP	<i>glial fibrillary acidific protein</i> ; gliäres fibrilläres saures Protein
GLAST	Glutamat-Aspartat-Transporter
GLT	Glutamat-Transporter
GP	Glykoprotein
HBSS	<i>Hanks balanced salt solution</i> ; Bilanzierte Salzlösung nach <i>Hanks</i>
HCl	Salzsäure
Hk	Hämatokrit
HNO	Hals-Nasen-Ohren
HRP	<i>Horseradish-Peroxidase</i> ; Meerrettich-Peroxidase

Abkürzungen

H ₂ O	Wasser
Ig	Immunglobulin
i.m.	intramuskulär
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
K	Kalium
kb	<i>kilo base</i> ; Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
km	Kilometer
l	Liter
LaGeSo	Landesamt für Gesundheit und Soziales
MAP-Kinase	<i>mitogen-activated protein</i> -Kinase; Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MCAO	<i>middle cerebral artery occlusion</i> ; Okklusion der <i>Arteria cerebri media</i>
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
mGluR	metabotroper Glutamat-Rezeptor
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
MHK	minimalen Hemmkonzentration
MLV	murines Leukämievirus
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	millimolar

Abkürzungen

M _R	relative Molekülmasse
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i> ; Boten-Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanz-Tomographie
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
NaOH	Natriumhydroxid
nM	nanomolar
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
<i>p.a.</i>	<i>pro analysi</i>
PACAP	<i>pituitary adenylate cyclase-activating peptide</i> ; hypophysäres Adenylatcyclase-aktivierendes Protein
paCO ₂	Kohlendioxid-Partialdruck
paO ₂	Sauerstoff-Partialdruck
PBS	<i>Phosphate buffered salt solution</i> ; Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> ; Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
pH	<i>potentia Hydrogenii</i> ; Wasserstoffionen-Exponent
<i>rec.par.</i>	<i>recenter paratum</i> ; frisch bereitet
RLA	relative Luciferase-Aktivität
rpm	<i>rotation per minute</i> ; Umdrehung pro Minute
rRNA	ribosomale RNA
RT	Reverse Transkriptase
s.c.	subkutan
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese

Abkürzungen

SLC	<i>solute carrier</i> ; löslicher Transporter
sp.	<i>species</i> ; Art
SPF	<i>special pathogen free</i> ; frei von Pathogenen
T	Tesla
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TEMED	Tetrameethylethylendiamin
TID	<i>transient ischemic depolarizations</i> ; transiente ischämische Depolarisationen
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>Unit</i> ; (Enzym-) Einheit
V	Volt
VIP	vasoaktives intestinales Peptid
VRAC	<i>volume-regulated anion channels</i> ; Volumenregulierte Anionenkanäle
WHO	<i>World Health Organisation</i> ; Weltgesundheitsorganisation
ZNS	Zentralnervensystem
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	mikromolar
°C	Grad Celsius
[Glucose]	Glucose-Konzentration
[Na ⁺]	Konzentration an Na ⁺ -Ionen
[K ⁺]	Konzentration an K ⁺ -Ionen

10. *Curriculum vitae*

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

11. Publikationsliste

- (1) **Neumann C**, Bednarski PJ. Development, validation and application of an improved enzyme method for GSH, based on GSH-reductase substrate recycling. Arch Pharm (Weinheim) 2002;335(Suppl.1):92.
- (2) **Neumann C**, Boubakari, Grünert R, Bednarski PJ. Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-regenerating system coupled to a glutathione-reductase microtiter method for determination of total glutathione concentrations in adherent growing cancer cell lines. Anal Biochem. 2003;320(2):170-8.
- (3) Thöne-Reineke C, Zimmermann M, **Neumann C**, Krikov M, Li J, Gerova N, Unger T. Are angiotensin receptor blockers neuroprotective? Curr Hypertens Rep. 2004;6(4):257-66.
- (4) Boubakari, Bracht K, **Neumann C**, Grünert R, Bednarski PJ. No correlation between GSH levels in human cancer cell lines and the cell growth inhibitory activities of platinum diamine complexes. Arch Pharm. (Weinheim). 2004;337(12):668-71.
- (5) Schefe JH, **Neumann C**, Goebel M, Danser J, Kirsch S, Gust R, Kintscher U, Unger T, Funke-Kaiser H. Prorenin engages the (pro)renin receptor like renin and both ligand activities are unopposed by aliskiren. J Hypertens. 2008;26(9):1787-1795.
- (6) Thöne-Reineke C, **Neumann C**, Namsolleck P, Schmerbach K, Krikov M, Schefe JH, Lucht K, Hörtnagl H, Godes M, Müller S, Rumschüssel K, Funke-Kaiser H, Villringer A, Steckelings UM, Unger T. The β -lactam antibiotic, ceftriaxone, dramatically improves survival, increases glutamate uptake and induces neurotrophins in stroke. J Hypertens. 2008;26(12):2426-2435.