

Aus der Klinik für angeborene Herzfehler und Kinderkardiologie
des Deutschen Herzzentrum Berlin

DISSERTATION

Einfluss der Hypothermie und STAT3-Inhibition auf die
Neuroinflammation in einem Zell-Kultur-Modell mit
BV2-Mikrogliazellen

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Annemarie Krauß

aus Berlin

Datum der Promotion: 05.12.2014

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

<i>I. Abkürzungsverzeichnis</i>	5
<i>II. Abbildungsverzeichnis</i>	7
<i>III. Tabellenverzeichnis</i>	8
<i>IV. Zusammenfassung</i>	9
<i>V. Abstract</i>	11
1 Einleitung	13
1.1 Klinischer Hintergrund	13
1.2 Hypothermie und der kardiopulmonale Bypass	13
1.3 Überblick über Anwendungsgebiete der Hypothermie.....	15
1.4 Einfluss der Hypothermie auf intrazelluläre Signalkaskaden	16
1.4.1 Intrazelluläre Signalkaskaden: Transkriptionsfaktoren NF- κ B und STAT3.....	18
1.4.2 iNOS und Stickstoffmonoxid (NO).....	23
1.4.3 Medikamentöse Intervention: Blockade von intrazellulären Signalwegen ..	24
1.5 Duale Rolle der Mikrogliazellen: neuroprotektiv und neurotoxisch	25
1.6 Fragestellung.....	28
2 Material	29
2.1 Geräte	29
2.2 Zellkultur.....	29
2.3 Chemikalien.....	29
2.4 Antikörper	30
2.5 Kit Systeme	31
3 Methoden	32
3.1 BV2-Mikrogliazellen.....	32
3.2 Zeit-Temperatur-Protokoll.....	33
3.3 Immunhistologie	34
3.4 Vitalitätstests der BV2-Mikrogliazellen.....	35

3.4.1	Bestimmung der Stoffwechselaktivität mittels MTT-Assay	35
3.4.2	Bestimmung von Apoptose und Zellaktivierung mit Hilfe der Durchflusszytometrie	35
3.4.3	Zelltod und Apoptose	35
3.5	Der Oberflächenmarker ICAM-1 (CD 54)	37
3.6	Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	37
3.7	Stickstoffmonoxid (NO)-Messung mittels Griess-Assay	38
3.8	Western Blot	39
3.8.1	Proteingewinnung	39
3.8.2	Proteinaufreinigung und BCA-Messung	39
3.8.3	Auftrennung des Proteingemisches mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	40
3.8.4	Proteinblotting	41
3.8.5	Antikörper und Proteindetektion	41
3.8.6	Aufbereitung der nukleären Proteinfraction	43
3.9	Migrationsassay	44
3.10	STAT3-Inhibitor Stattic	44
3.11	Statistische Analyse	45
4	Ergebnisse	46
4.1	Hypothermie führt zu morphologischen Veränderungen der BV2-Mikrogliazellen	46
4.2	Hypothermie und Vitalität	48
4.2.1	MTT-Assay - mitochondriale Aktivität	48
4.2.2	Apoptose – FACS-Analyse Annexin V und PI	49
4.3	Hypothermie und Inflammation	51
4.3.1	Bestimmung von Zytokinen und Chemokinen: TNF- α -, IL-6- und MCP-1-Sekretion	51
4.3.2	Bestimmung von intrazellulären Signalkaskaden	53

4.3.3	Stickstoffmonoxid-Ausschüttung und iNOS-Expression.....	57
4.4	Hypothermie und Migration	59
4.4.1	Analyse des migrationsrelevanten Oberflächenmoleküls ICAM-1.....	59
4.4.2	Migrationsassay	60
4.5	Interventionstrategie: Stattic (Stat3 inhibitory compound)	61
4.5.1	Stattic und IL-6-Ausschüttung.....	62
4.5.2	Stattic und TNF- α -Ausschüttung.....	63
5	<i>Diskussion</i>	65
5.1	Hypothermie und morphologische Veränderungen	65
5.2	Hypothermie hat keinen Einfluss auf die Zellvitalität	66
5.3	Hypothermie und die Inflammationsreaktion : IL-6, TNF- α und MCP-1	67
5.4	Einfluss der Hypothermie auf Schlüsselproteine der Inflammationsreaktion	69
5.4.1	Transkriptionsfaktor NF- κ B	69
5.4.2	Transkriptionsfaktor STAT3	71
5.4.3	Inhibierung des STAT3-Signalweges und Auswirkungen auf die IL-6-und TNF- α -Sekretion.....	72
5.5	Hypothermie und reaktive Stickstoffspezies	74
5.6	Auswirkungen der Hypothermie auf die Zellmigration	75
5.7	Schlussfolgerung.....	76
6	<i>Literaturverzeichnis</i>	78
7	<i>Eidesstattliche Versicherung</i>	87
8	<i>Lebenslauf</i>	88
9	<i>Publikationsliste</i>	89
10	<i>Danksagung</i>	91

I. Abkürzungsverzeichnis

AREs	Adenosine uridine-rich elements
BDNF	Brain-derived nerve growth factor
CIRP	Cold inducible RNA binding protein
DAPI	Diamidino-2-phenylindole
DHCA	Deep hypothermic cardiac arrest
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonuclein acid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylene glycol tetraacetic acid
ELAM-1	endothelial-leukocyte adhesion molecule-1
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
eNOS	Endothelial nitric oxid synthase
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FCS	fetales Kälberserum
FICS	Fluoresceinisothiocyanat
gp130	Glykoprotein 130
IB 4	BS-I Isolectin B4
ICAM-1	Intercellular cell adhesion molecule-1
IKK	I κ B-spezifische Kinase
I κ B α	Inhibitory kappa B α
iNOS	Inducible nitric oxid synthase
IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
IL-10	Interleukin-10
IL-1ra	Interleukin-1 receptor antagonist
LPS	Lipopolysaccharid
MAPK	Mitogen aktivierte Protein-Kinasen
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein-1
MIP-1 α	Macrophage Inflammatory Protein-1 α
MIP-1 β	Macrophage Inflammatory Protein-1 β

NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Reaktive Stickstoffspezies
NF-κB	Nuclear factor-κB
PBS	Phosphate buffered saline
PBST	Phosphate buffered saline with Tween 20
Phospho-Stat3	P-Stat3
PI	Propidiumiodid
PAMPs	Pathogen-associated molecular patterns
PBMCs	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PI3K	Phosphoinositide 3-Kinase
PLL	Poly-L-Lysin
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RBM3	RNA-binding motif protein 3
RNI	Reactive nitrogen intermediates
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SIRS	Systemisches inflammatorisches response syndrom
SOCS	Suppressors of cytokine signalling
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
Stattic	STAT-3 inhibitory compound
TH	Therapeutische Hypothermie
TBST	Tris buffered saline with Tween 20
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TLR 4	Toll-like-receptor 4
TNFR	Tumor Nekrose Faktor Rezeptor
TNF-α	Tumor Nekrose Faktor-α
TMB	Tetramethylbenzedine
TRAF	TNF receptor associated factors
VCAM	vascular cell adhesion molecule
ZNS	Zentrales Nervensystem

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Auswirkungen der extrakorporalen Zirkulation auf den kindlichen Organismus.	15
Abbildung 2: Mechanismen der protektiven Effekte von Hypothermie.	18
Abbildung 3: Schematische Darstellung des STAT3 und NF- κ B Signalweges.	21
Abbildung 4: Schematische Darstellung des durch Stattic beeinflussten JAK/STAT-Signalweges.	25
Abbildung 5: Mikrogliazellen spielen eine große Rolle bei der Neuroinflammation	27
Abbildung 6: Schematische Darstellung des Zeit-Temperatur-Protokolls.	33
Abbildung 7: Immunfluoreszenz-Färbung der BV2-Mikrogliazellen	47
Abbildung 8: Relative Zellaktivität mit LPS Stimulation unter hypothermen und normothermen Bedingungen	48
Abbildung 9: Relative Zellaktivität ohne LPS Stimulation unter hypothermen und normothermen Bedingungen	48
Abbildung 10: Darstellung toter Zellen und apoptotischer Zellen (FACS Analyse)	49
Abbildung 11: Exemplarische Darstellung der Dot Plots der BV2-Mikrogliazellen	50
Abbildung 12: Exemplarische Darstellung der Dot Plots und der Histogramme der BV2 Mikrogliazellen.	50
Abbildung 13: Darstellung der Ausschüttung der Zytokine TNF- α und IL-6	52
Abbildung 14: Darstellung der Sekretion von MCP-1	52
Abbildung 15: Hypothermie verzögert die Translokation von Phospho-NF- κ B p65 in den Zellkern	53
Abbildung 16: Hypothermie stabilisiert den inhibitorischen I κ B α NF- κ B Komplex	54
Abbildung 17: Hypothermie verhindert die Phosphorylierung von STAT3	55
Abbildung 18: Hypothermie reduziert die Phosphorylierung von STAT3 am Serinrest.	56
Abbildung 19: Darstellung der Stickstoffmonoxidausschüttung	57
Abbildung 20: Auswirkungen der Hypothermie und Wiedererwärmung auf die iNOS-Expression.	58
Abbildung 21: Relative ICAM-1-Expression der mit LPS stimulierten BV2- Mikrogliazellen	59
Abbildung 22: Migrationsassay der BV2-Mikrogliazellen	60
Abbildung 23: Zytotoxizitätsreihe von Stattic mit BV2-Mikrogliazellen.	61
Abbildung 24: Darstellung der Auswirkungen verschiedener Konzentrationen des STAT3-Inhibitors Stattic auf die Ausschüttung von IL-6	63
Abbildung 25: Darstellung der Auswirkungen verschiedener Konzentrationen des STAT3-Inhibitors Stattic auf die Ausschüttung von TNF- α	64

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Anwendungsgebiete von therapeutischer Hypothermie	16
Tabelle 2: Zusammensetzung der Polyacrylamidgele	41
Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Antikörper	43

IV. Zusammenfassung

Tiefe Hypothermie wird vorwiegend bei herzchirurgischen Eingriffen von komplexen Vitiern, in Zusammenhang mit einem intraoperativ notwendigen Herz-Kreislaufstillstand, im Neugeborenen- und Säuglingsalter angewandt. Das Ziel ist den Organismus, und hier insbesondere das Gehirn, mit seiner sehr geringen Toleranz gegenüber Hypoxie vor den schwerwiegenden Folgen einer Organischämie zu schützen. Nach einer Operation kann als gravierende Komplikation ein systemisches inflammatorisches responsives Syndrom (SIRS) auftreten.

Vor diesem klinischen Hintergrund wurde ein Zell-Kultur-Modell mit immunkompetenten BV2-Mikrogliazellen etabliert, um die zellulären Mechanismen der Hypothermie und der Inflamationsreaktion zu untersuchen. Durch eine Stimulation mit LPS (Lipopolysaccharid) sollte die durch den kardiopulmonalen Bypass ausgelöste Endotoxinämie, die hauptsächlich durch gram-negative Bakterien verursacht wird, simuliert werden.

Die BV2-Mikrogliazellen wurden für vier Stunden mit 1µg/ml LPS stimuliert. Während der Stimulation wurden sie für zwei Stunden auf 17°C gekühlt, innerhalb von zwei Stunden wiedererwärmt und für 24 Stunden nachbeobachtet. Die Zellvitalität wurde mittels FACS-Analyse und MTT-Assay bestimmt, die Proteinanalyse (phospho-STAT3, phospho-NF-κB p65, IκBα, iNOS) erfolgte mittels Western Blot-Technik, die Ausschüttung von IL-6, TNF-α, und MCP-1 wurde mit einem ELISA und die NO-Ausschüttung mit dem Griess-Assay bestimmt. Des Weiteren wurde ein Migrationsassay durchgeführt. Um die Effekte einer phospho-STAT3-Inhibition auf die Sekretion von IL-6 und TNF-α zu untersuchen, wurde der STAT3-Inhibitor Stattic eingesetzt.

Es konnte gezeigt werden, dass tiefe Hypothermie keinen Einfluss auf die Zellvitalität hat und nicht zur Apoptose führt. Die Ausschüttung der Zytokine IL-6 und TNF-α und des Chemokins MCP-1 war zwei und vier Stunden nach Versuchsbeginn signifikant reduziert. Auch wurde die Proteinexpression von phospho-STAT3 durch die Kühlung (zwei Stunden nach Versuchsbeginn) signifikant reduziert. Tiefe Hypothermie konnte die Migration von phospho-NF-κB p65 in den Zellkern kurzfristig (30 Minuten nach Versuchsstart) vermindern und auch die Degradation von IκBα signifikant senken. Im Migrationsassay war eine verminderte, jedoch nicht statistisch signifikante Migration der

BV2-Zellen in den gekühlten Versuchsgruppen zu beobachten, während die Expression von ICAM-1 nicht von der Kühlung beeinflusst wurde. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine vierstündige Inkubation mit dem STAT3-Inhibitor Stattic dieselben Effekte auf die IL-6- und TNF- α -Sekretion hatte wie Kühlung und Wiedererwärmung. Zusammenfassend schwächte tiefe Hypothermie in BV2-Mikrogliazellen die durch LPS induzierte Inflammationsreaktion ab. Dieser Effekt war nach 28 Stunden nicht mehr nachweisbar. Dennoch könnte die Abschwächung der Inflammationsreaktion in BV2-Mikrogliazellen ein möglicher Mechanismus der durch die Hypothermie vermittelten Neuroprotektion sein. Stattic hat in Hinblick auf die IL-6- und TNF- α -Ausschüttung dieselben Effekte wie tiefe Hypothermie, sodass Stattic ein aussichtsreicher Kandidat zur Imitation der protektiven Wirkung der Kühlung zu sein scheint.

V. Abstract

Deep therapeutic hypothermia is a standard method for neuroprotection during complex pediatric cardiac surgery involving extracorporeal circulation and deep hypothermic cardiac arrest (DHCA). As the brain is the organ with the shortest ischemia time. The procedure, however, can provoke the vigorous systemic inflammatory response syndrome (SIRS), one of the most severe side effects associated with pediatric cardiac surgery. To date, the cellular inflammatory mechanisms induced by deep hypothermia remain to be elucidated. Therefore, the effects of deep hypothermia and rewarming on an immortalized murine microglial cell line (BV2) stimulated with lipopolysaccharide (LPS) (*Escherichia coli*) were investigated in this project.

BV2-microglial cells were exposed to 17°C for 2 hours, rewarmed to 37 °C within 2 hours, and observed under normothermic conditions for an additional 24 hours. In order to simulate cardiopulmonary bypass conditions, the BV2-microglial cells were stimulated with 1 µg/ml LPS for 4 hours. Cells were stained with 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) and isolectin B4 for morphological analysis, and cell viability was quantified by MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-iphenyltetrazoliumbromid) and FACS analysis. Protein expressions (phospho-STAT3, phospho-NF-κB p65, IκBα, iNOS) were quantified by Western blotting and microglial migration was quantified by a migration assay. IL-6, TNF-α, and MCP-1 secretions were measured by ELISA. Additionally, Stattic (STAT3 activation inhibitor) was used to investigate the effects on IL-6 and TNF-α expressions. Stattic was applied for 4 hours in place of deep hypothermia and rewarming.

Cell viability was observed to be temperature independent during the experimental period (28 hours). However, deep hypothermia led to morphological changes from a ramified and resting status under 37°C to amoeboid shaped cells under 17°C, even without LPS stimulation. IL-6, TNF-α, and MCP-1 secretions were significantly decreased 4 hours after the start of the experiment in the hypothermic group. The migration of phospho-NF-κB p65 was attenuated (30 minutes) and the IκBα degradation was delayed (2 hours) by deep hypothermia. Phospho-Stat3 expression was observed to be significantly down-regulated under deep hypothermic conditions, corresponding with the significant reduction in IL-6 and TNF-α expressions. Although not statistically significant, hypothermia appeared to attenuate microglial migration. Similar to the

effects of hypothermia, the application of Stattic under normothermic conditions resulted in significantly reduced IL-6 and TNF- α expressions.

Hypothermia reduces the inflammatory responses in LPS stimulated BV2-microglial cells, eluding to a possible mechanism of hypothermia-induced neuroprotection. In the future, attenuating IL-6 and TNF- α expressions by blocking the phospho-STAT3 may lead to the development of a neuroprotectant with a higher chance of showing clinical benefit.

1 Einleitung

1.1 Klinischer Hintergrund

Seit in der Mitte des letzten Jahrhunderts die ersten Kinder mit angeborenen Herzfehlern unter Hypothermie an der Herz-Lungen-Maschine operiert wurden, ist die Anwendung von Hypothermie eine Standardprozedur bei komplexen kardiochirurgischen Eingriffen [1-4]. In Deutschland liegt die Prävalenz von angeborenen Herzfehlern bei ca. 1%. Davon haben 48,9% der Kinder einen Ventrikelseptumdefekt gefolgt vom Vorhofseptumdefekt mit 17%. Deutlich seltener kommen zyanotische Herzfehler wie die Fallot'sche Tetralogie (2,5%), die Transposition der großen Arterie (2,2%) und univentrikuläre Herzen (2,8%) vor [5]. In der Kinderherzchirurgie wird die Hypothermie zur Organprotektion, insbesondere zur Neuroprotektion, eingesetzt. Das Ziel ist die Vermeidung einer längeren zerebralen Hypoxie und/oder Ischämie, welche als eine der Hauptursachen von neurologischen Kurz- und Langzeitkomplikationen angesehen wird [6]. Besonders Neugeborene und Säuglinge sind von neurologischen Komplikationen betroffen, da bei ihnen die Entwicklung des Gehirns, hauptsächlich der weißen Substanz, noch nicht abgeschlossen ist. Dadurch haben Veränderungen der Sauerstoffsättigung und der Perfusion während kardiochirurgischer Eingriffe besonders große Effekte auf die neurologische Entwicklung [7].

1.2 Hypothermie und der kardiopulmonale Bypass

Die Möglichkeiten der Diagnostik und der chirurgischen Therapie von angeborenen Herzfehlern wurden in den letzten Jahren weiterentwickelt. Die Frage nach der optimalen Temperatur für einen maximalen protektiven Effekt mit geringen Nebenwirkungen ist noch immer nicht abschließend geklärt [2, 8, 9]. Es ist bekannt, dass die Nebenwirkungen mit der Tiefe der Hypothermie zunehmen. In der Bostoner Circulatory Arrest-Studie konnte zumindest gezeigt werden, dass bei Operationen von kongenitalen Herzfehlern im neonatalen Alter mit tief hypothermem Herz-Kreislaufstillstand bei $<18^{\circ}\text{C}$ nach 42 Minuten ein Grenzwert erreicht ist, nach dessen überschreiten sich die neuromotorischen Leistungen der operierten Kinder im Langzeitverlauf deutlich verschlechtern [10]. Weitere unerwünschte Wirkungen sind Herzrhythmusstörungen wie Bradykardien ($>30^{\circ}\text{C}$) oder sogar maligne Herz-

rhythmusstörungen wie Kammertachykardien und Kammerflimmern ($<30^{\circ}\text{C}$). Diese Rhythmusstörungen stehen in Zusammenhang mit einer durch die Hypothermie induzierten renalen tubulären Dysfunktion, die zu Elektrolytstörung führen kann (Hypokaliämie, Hypomagnesiämie, Hypokaliämie). Des Weiteren können Störungen des Glukosestoffwechsels und des Gerinnungssystems, insbesondere der Thrombozytenfunktion, auftreten. Eine weitere Komplikation der Hypothermie ist eine erhöhte Infektionsanfälligkeit [11, 12].

Bis auf wenige Ausnahmen werden fast alle Operationen von angeborenen Herzfehlern an einer Herz-Lungen-Maschine (HLM) durchgeführt. Hierbei wird die Funktion des Herzens und der Lunge für den Operationszeitraum von der Herz-Lungen-Maschine übernommen. Eine mögliche postoperative Komplikation nach Einsatz der HLM ist das systemische inflammatorische Response Syndrom (SIRS). Die Ursachen des SIRS nach kardiopulmonalem Bypass sind vielfältig. Zum einen kommt das Patientenblut direkt mit den Fremdoberflächen der extrakorporalen Zirkulation in Kontakt. Zum anderen kann es nach Wiederherstellung des Kreislaufes, ausgelöst durch die vorausgegangene Gewebeischämie, zu einem Reperfusionsschaden kommen. Die Ursachen dieser Minderperfusion liegen in einer Kombination aus dem non-pulsatilen Blutfluss des kardiopulmonalen Bypasses, der zu einer Angiotensin 2-vermittelten Vasokonstriktion führt, und einer durch die Hämodilution ausgelösten nicht-okklusiven Ischämie. Besonders im Splanchnikusgebiet kann dies zu einer erhöhten Durchlässigkeit des Darmes besonders für Endotoxine führen [13, 14]. All diese Faktoren lösen eine unmittelbare Aktivierung des Komplementsystems und des Gerinnungssystems und die Ausschüttung von pro-inflammatorischen Zytokinen aus. Als Folge der dadurch erhöhten Gefäßpermeabilität kann ein Kapillar-Leck-Syndrom entstehen. Darüber hinaus wird die Integrität der Blut-Hirn-Schranke durch die systemische Immunantwort gestört. Über die Aktivierung des Komplementsystems können Leukozyten in das Gehirn migrieren und lösen dort verstärkt durch pro-inflammatorische Zytokine und Chemokine eine Inflammationsreaktion aus, die durch Neurone, Astrozyten und Mikrogliazellen aufrechterhalten wird [15].

Eine Schlüsselrolle bei der Immunantwort im Rahmen eines kardiopulmonalen Bypassverfahrens spielen die pro-inflammatorischen Zytokine IL-6, TNF- α und IL-1 β . In einer klinischen Studie von Hauser et al. wurde eine Korrelation von postoperativem IL-6-Serumspiegel und der Mortalität nachgewiesen [16]. Gleichzeitig werden im Rahmen des SIRS aber auch gegenregulatorische anti-inflammatorische Zytokine wie IL-10 und

IL-1ra ausgeschüttet [14]. Besonders Neugeborene und Säuglinge sind aufgrund ihrer Organunreife gefährdet, ein SIRS mit darauffolgendem Multiorganversagen und Kapillar-Leck-Syndrom zu entwickeln [17]. Aufgrund des erhöhten Flüssigkeitsumsatzes bei Neugeborenen kann es sehr schnell zu einer Flüssigkeitsverschiebung von intravaskulär nach extravaskulär kommen [18]. Des Weiteren besteht bei Neugeborenen und Säuglingen ein Missverhältnis zwischen dem eigenen Blutvolumen und dem Volumens des kardiopulmonalen Bypasses. Dieses kann das Zwei- bis Dreifache des physiologischen Blutvolumens überschreiten. Zusätzlich führt der höhere metabolische Grundumsatz von Säuglingen und Neugeborenen zu höheren Flussraten. Zusammenfassend lässt sich hieraus ableiten, dass das kindliche Blut stärker den Fremdoberflächen des Bypass-Kreislaufes ausgesetzt ist und dies in einer verstärkten Immunantwort resultieren kann [19].

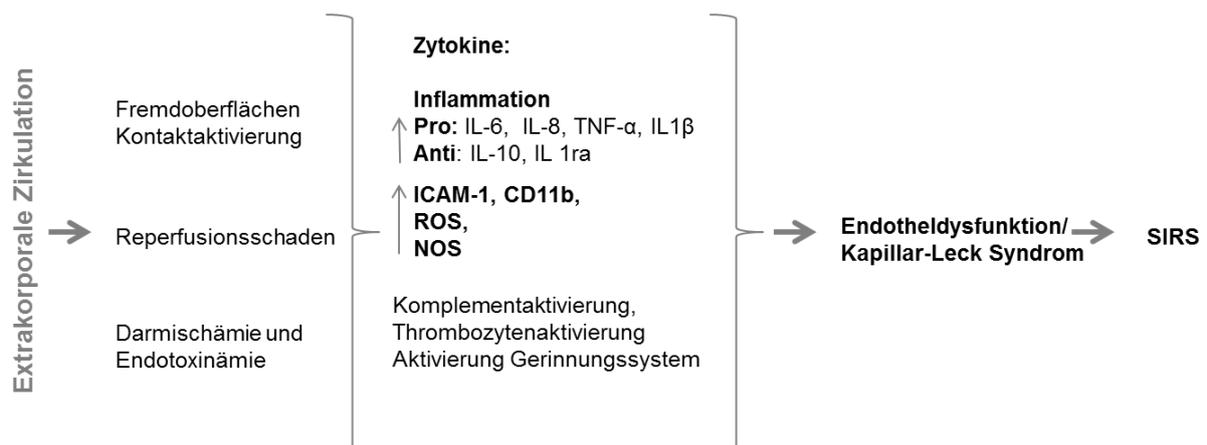


Abbildung 1: Auswirkungen der extrakorporalen Zirkulation auf den kindlichen Organismus. Modifiziert nach McGuinness und Kozik [13, 19].

1.3 Überblick über Anwendungsgebiete der Hypothermie

Die Hypothermie ist eines der ältesten medizinischen Verfahren zur Organprotektion. [20]. Unter Hypothermie wird das Absinken der Körpertemperatur auf unter 36°C definiert. Beim Säugling und Kleinkind werden 36,5°C als Grenze angesehen [21]. Die Tiefe der Hypothermie kann eingeteilt werden in [22]:

- milde Hypothermie: 34°C – 35,9°C
- moderate Hypothermie: 33°C – 33,9°C
- moderat-tiefe Hypothermie 30°C – 31,9°C
- tiefe Hypothermie < 30°C.

<u>Therapeutische Hypothermie</u>
Herz-Kreislaufstillstand [23-25]
Perinatale Asphyxie [26]
Intraoperative Hypothermie [27]
Schlaganfall [28]
Traumatische Schädel-Hirn-Verletzungen [29]

Tabelle 1: Anwendungsgebiete von therapeutischer Hypothermie [30, 31].

Die Anwendungsgebiete der therapeutischen Hypothermie (TH) sind vielfältig: So wird die TH bei Neugeborenen nach einer perinatal aufgetretenen Asphyxie eingesetzt. In einer multizentrischen, prospektiv randomisierten klinischen Studie konnte der positive Effekt von milder Hypothermie (33,5°C) auf die Mortalität und Morbidität von Neugeborenen belegt werden [32]. Des Weiteren wird die therapeutische Hypothermie bei erwachsenen Patienten nach einem Herz-Kreislaufstillstand, der außerhalb des Krankenhauses aufgetreten ist, in den Leitlinien des European Resuscitation Councils und der American Heart Association empfohlen [33]. Die Effektivität der TH konnte hier in einer multizentrischen, prospektiv randomisierten Studien nachgewiesen werden [34]. Dennoch wird die positive Wirkung der therapeutischen Hypothermie aktuell erneut diskutiert, da in einer im Dezember 2013 veröffentlichten multizentrischen, prospektiv randomisierten Studie keine Unterschiede zwischen 36°C und 33°C Kühlung nach Herz- Kreislaufstillstand festgestellt werden konnten [25]. Zur Therapie von anderen Erkrankungen wie zum Beispiel einem Schlaganfall, nach einem Schädel-Hirn-Trauma oder während kardiochirurgischer Eingriffe ist der Nutzen von TH noch nicht abschließend geklärt und in klinischen Studien untersucht [29, 35].

1.4 Einfluss der Hypothermie auf intrazelluläre Signalkaskaden

Die metabolische Rate des Gehirns sinkt um 5-7% pro 1°C Temperaturabfall [2, 36]. Die zellulären Effekte der Hypothermie beruhen nicht nur auf einer Verminderung des zellulären Stoffwechsels, sondern können auch zur Induktion von Signalkaskaden führen [14].

Die molekularen Mechanismen der Neuroprotektion durch therapeutische Hypothermie sind vielfältig [37]. Der neuronale Zelltod wird durch eine vermehrte Ausschüttung von exzitatorischen Neurotransmittern wie Glutamat und Dopamin induziert [38]. Daneben reduziert die TH die Ausschüttung von neurotoxischen exzitatorischen Transmittern wie z.B. von Glycin, das über die Aktivierung von NMDA-Rezeptoren zu einem erhöhten Kalzium Einstrom in die Zelle führt [39]. Dies resultiert in einer mitochondrialen Dysfunktion [40]. Ein weiterer belegter Mechanismus der Neuroprotektion durch TH ist die Erhaltung der neuronalen Integrität über die vermehrte Ausschüttung von neuronalen Wachstums- und Überlebensfaktoren, den Neurotrophinen wie z.B. dem brain-derived nerve growth factor (BDNF) [41]. Hypothermie induziert anti-apoptotische Effekte, welche sowohl auf einer Hemmung des intrinsischen als auch des extrinsischen apoptotischen Signalweges beruhen [42, 43].

Die Aktivierung von Astrogliazellen durch nekrotische Neuronen bewirkt deren Proliferation, eine gesteigerte Phagozytose, Migration und Ausschüttung von pro-inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen. Diese Prozesse werden durch TH abgeschwächt [44, 45]. Chemokine (MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β) stimulieren die Chemotaxis von Leukozyten, die die Blut-Hirn-Schranke daraufhin passieren können, sodass es zu einer Akkumulation von Immunzellen im Gehirn kommt. Der Prozess der Leukozytenmigration wird von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1, VCAM und ELAM-1 getriggert und führt zu einer gesteigerten Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke mit der Folge eines Hirnödems [46]. Durch die Anwendung von Hypothermie kann auch dieser pathologische Prozess abgeschwächt werden [22]. Die Ausschüttung von Zytokinen im Rahmen einer Immunantwort kann zum einen neuroprotektiv wirken, zum anderen auch neurotoxische Auswirkungen haben. In diesem Zusammenhang werden den Zytokinen TNF- α und IL-1 β in hohen Konzentrationen eher neurotoxische Eigenschaften zugeschrieben, während IL-10 neuroprotektiv wirkt [47]. Dennoch konnte in *in vitro* Studien gezeigt werden, dass TNF- α unter Hypothermie auch zu neuronalem Wachstum führen kann [48]. Des Weiteren spielt Stickstoffmonoxid eine Schlüsselrolle bei der Ausbildung des postischämischen Infarktareals [49]. Durch ein Ischämieereignis mit darauf folgender Reperfusion wird außerdem die Produktion von freien Sauerstoffradikalen begünstigt. Dies kann zur Peroxidation von Lipiden, Proteinen und Nukleinsäuren führen [50].

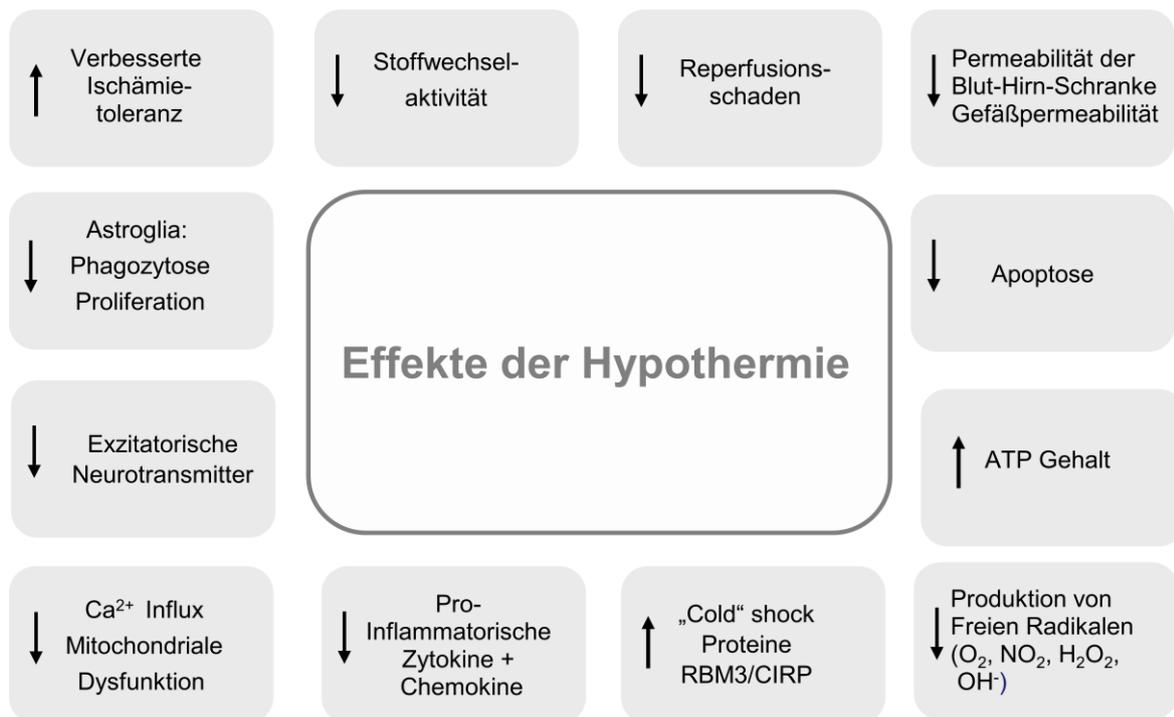


Abbildung 2: Mechanismen der protektiven Effekte von Hypothermie. Modifiziert nach Gonzales-Ibarra et al., Polderman und Tong et al. [22, 37, 51].

1.4.1 Intrazelluläre Signalkaskaden: Transkriptionsfaktoren NF- κ B und STAT3

Lipopolysaccharid (LPS) ist ein Zellwandbestandteil von gram-negativen Bakterien. Es bindet an den Toll-like-receptor 4 (TLR 4) und führt zur Induktion des Nuclear Factor- κ B (NF- κ B), einem ubiquitär vorkommenden Transkriptionsfaktors, der eine Schlüsselstellung in der Regulierung des Immunsystems einnimmt. Die Induktion von NF- κ B führt unter anderem zu einer gesteigerten Transkription von Zytokinen, Chemokinen und Adhäsionsmolekülen. Außerdem spielt NF- κ B eine wesentliche Rolle bei der Regulation von Zellproliferation und Apoptose und ist somit auch ein wichtiger Faktor der Tumorentstehung und -kontrolle [52-54]. Toll-like-Rezeptoren sind ein wichtiger Bestandteil des angeborenen Immunsystems. Sie erkennen über pattern recognition receptors (PRRs) evolutionär hochkonservierte pathogen-associated molecular patterns (PAMPs), die von vielen Prokaryonten exprimiert werden [55, 56]. LPS gehört zu der Gruppe der PAMPs.

Der Nuclear Factor- κ B beschreibt eine Familie aus sieben strukturell ähnlichen Transkriptionsfaktoruntereinheiten, die in variablen Kombinationen vorkommen. Die Aktivierung des Nuclear Factor- κ B kann über zwei verschiedene Signalwege ausgelöst

werden: dem *kanonischen* und dem *nicht-kanonisch* Signalweg [57]. Der kanonische Signalweg wird über den TLR 4 aktiviert. Im Zentrum des Signalweges steht ein Heterodimer bestehend aus der 65 kDa großen **Rel A** (p65)-Untereinheit und der 50 kDa großen DNA-bindenden Untereinheit **NF- κ B 1** (p50), welche durch das hemmend wirkende Inhibitory kappa B α (I κ B α) an der Translokation in den Kern gehindert wird. Durch die Aktivierung der NF- κ B-Signalkaskade wird I κ B α durch die I κ B spezifische Kinase (IKK) ubiquitiniert und proteasomal abgebaut, sodass die beiden NF- κ B Untereinheiten nicht mehr inhibiert werden und in den Kern wandern können. Die Phosphorylierung der Rel A-Untereinheit kann zusätzlich zu einer verstärkten transkriptionellen Aktivität führen [58]. Durch die nukleäre Translokation von NF- κ B kommt es zu einer verstärkten Expression der pro-inflammatorischen Zytokine IL-6, TNF- α und IL1 β sowie der Chemokine MCP-1 und IL-8. Da NF- κ B eine Schlüsselstellung in der Regulation der Inflammationskaskade einnimmt, wird die Aktivierung des Transkriptionsfaktors über viele verschiedene Signalwege kontrolliert und nach Funktionszustand der Zelle über Feedbackschleifen entweder verstärkt oder inhibiert [54]. Eine Stimulation von Zellen mit LPS führt zur Ausschüttung von Zytokinen, die ihrerseits wieder den Transkriptionsfaktor aktivieren. Gleichzeitig führt eine intensivierte Aktivierung von NF- κ B aber auch zu einer Synthesesteigerung von I κ B α , welches die Translokation von NF- κ B in den Kern inhibiert.

Die Ausschüttung von IL-6 nach einer LPS-Exposition führt zur Aktivierung von drei verschiedenen Signalwegen, die eine zentrale Rolle sowohl bei der Inflammation als auch bei der Regulation von Zellproliferation und -apoptose spielen. Interleukin-6 aktiviert die

1. Mitogen-aktivierten Protein Kinasen (MAPK)
 2. Phosphoinositide 3-kinase (PI3K) / AKT
 3. Janus Kinase (JAK) / Signal transducer and activator of transcription (STAT)
- [59, 60].

Der **JAK2/STAT3 Signalweg** wird auch als einer der Signalwege der Akuten-Phase Reaktion gesehen. Die Bedeutung des Signalweges wird dadurch verdeutlicht, dass ein STAT3 knock-out letal ist [61]. STAT3-defiziente Makrophagen schütten übermäßig Zytokine aus, die zu einem Ungleichgewicht der Interleukin-10-Regulation führen können [62]. Dies steht ganz im Gegensatz zu STAT3-defizienten T-Zellen, die nur noch mit einer deutlich verminderten Immunantwort auf eine Interleukin-6-Stimulation ansprechen [63]. Es konnte gezeigt werden, dass die Regulation des JAK2/STAT3-

Signalweges sehr komplex ist und Störungen dieses Signalweges zu verschiedensten Krankheiten führen können [63, 64].

Der JAK2/STAT3 Signalweg wird durch die Bindung von Interleukin-6 an einen Membranrezeptorkomplex induziert, der neben dem IL-6-Rezeptor zwei Domänen des Glykoproteins 130 enthält. Dies aktiviert eine Tyrosinkinase (Janus Kinase 2 - JAK2), welche STAT3 an einer Tyrosinbindungsstelle (tyr705) phosphoryliert [65]. Nach der Phosphorylierung können zwei STAT3-Moleküle über eine Src-Homologie-Domäne (SH2) einen stabilen Komplex ausbilden. Durch die Dimerisierung der STAT-Moleküle wird das nuclear translocation Signal exponiert, sodass das Dimer in den Kern wandern kann [59, 66, 67]. Im Kern bindet STAT3 an unterschiedliche Sequenzen und induziert unter anderem das Intercellular cell adhesion molecule-1 (ICAM-1), das C-reaktive Protein, das Lipopolysaccharidbindungsprotein, den Interferon Regulatory factor (IRF-1) und das heat-shock Protein Hsp90 [68-70]. ICAM-1 ist ein Oberflächenprotein, welches eine Bindung zwischen antigenpräsentierender Zelle und T-Zelle ermöglicht [71]. ICAM-1 kann an LFA-1 (Leukocyte function associated antigen = CD11a/CD11), einem Leukozytenantigen binden und somit die Inflammationskaskade verstärken [72]. Außerdem wird die Expression des Glykoproteins 130, einer Untereinheit des IL-6 Rezeptors, induziert [68]. Um eine überschießende Zytokinproduktion zu verhindern, werden sofort nach einer LPS/IL-6 Stimulation gegenregulatorische Prozesse induziert. Sobald IL-6 an seinen Rezeptor bindet, werden Suppressors of cytokine signalling (SOCS) aktiviert. Sie sind an der negativen Feedback-Regulation des JAK/STAT Signalwegs beteiligt [73]. Des Weiteren wird Interleukin 10, ein anti-inflammatorisches Zytokin, aktiviert [74].

STAT3 kann auch an seinem Serinrest phosphoryliert werden. Dies führt zur Aktivierung eines Signalweges, der unter anderem zu einem vermehrten Zellüberleben und einer gesteigerten Proliferation führt [75].

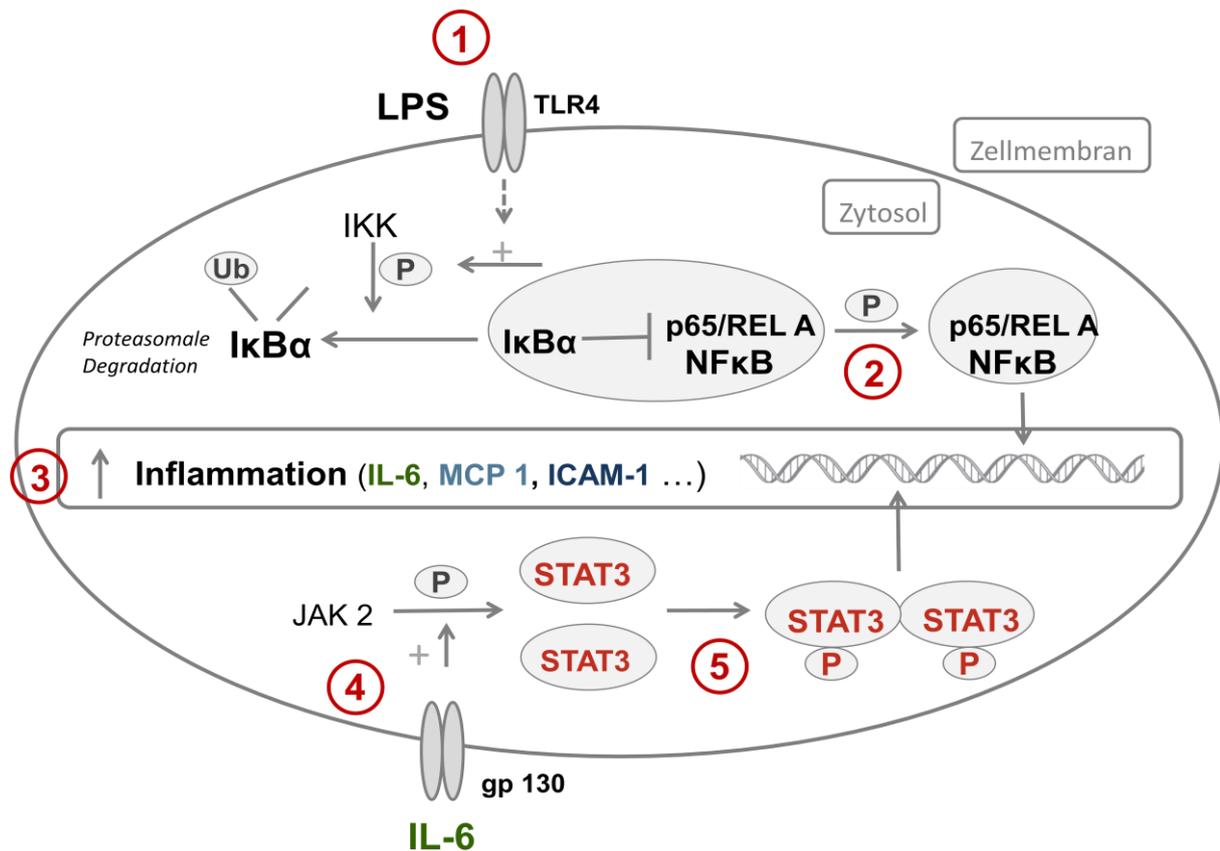


Abbildung 3: Schematische Darstellung des STAT3 und NF-κB Signalweges. 1. LPS induziert über den TLR 4 die proteasomale Degradation von IκBα. 2. Dadurch kann NF-κB nun phosphoryliert werden und in den Kern wandern. 3. Im Kern kommt es zu einer Induktion von pro-Inflammatorischen Zytokinen. 4. Das durch NF-κB induzierte IL-6 aktiviert STAT3. STAT3 wird phosphoryliert und wandert als Dimer in den Zellkern. Zytokine und Chemokine [57, 59, 60].

Zytokine sind Schlüsselregulatoren der angeborenen und erworbenen Immunität. Es sind Proteine, die im Gegensatz zu Hormonen nicht gespeichert, sondern direkt nach einer Stimulation synthetisiert und ausgeschüttet werden [68]. Die Ausschüttung von Zytokinen wird somit über die Transkriptionsrate reguliert [54].

Interleukin 6 ist ein pleiotropes Zytokin, welches eine Vielzahl von zellulären Funktionen erfüllt und von Endothelzellen, Makrophagen, T- und B-Lymphozyten sowie Mikrogliazellen ausgeschüttet wird [76]. IL-6 ist einer der Hauptakteure der Immunantwort und induziert Gene, die an der Zelldifferenzierung, dem Zellüberleben, der Zellproliferation und an der Apoptose beteiligt sind [66]. Die Sekretion von IL-6 führt während einer Inflamationsreaktion dazu, dass geschädigte Neuronen auch in einer sehr toxischen Umgebung überleben können [59]. IL-6 wird in der frühen Phase der Immunantwort ausgeschüttet und reguliert die Akute-Phase-Reaktion [76]. Je nach

Zelltyp und Funktionszustand kann IL-6 eine pro- oder anti- inflammatorische Wirkung zeigen.

Der **Tumor Nekrose Faktor- α (TNF- α)** gehört zur TNF (Tumor Nekrose Faktor)- und TNFR (Tumor Nekrose Faktor Rezeptor)-Superfamilie [77]. TNF- α besitzt ein sehr breites Wirkungsspektrum und spielt wie IL-6 eine zentrale Rolle in der Regulation der Immunantwort. TNF- α vermittelt seine Wirkung über eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B, der NO-Synthase und über die Expression der Zelloberflächenmoleküle MHC-Klasse I und II. Das Zytokin wird überwiegend von Makrophagen/Monozyten sowie im ZNS von Neuronen, Astrozyten und Mikrogliazellen synthetisiert [76]. Die Signalweiterleitung von TNF- α erfolgt über zwei verschiedene Signalwege. Zum einen über TNF receptor associated factors (TRAF), die den Transkriptionsfaktor NF- κ B aktivieren und zum anderen über „death domains“ (DD), die den programmierten Zelltod induzieren [78]. Die zentrale Rolle von TNF- α wird an TNF- α knock-out-Mäusen deutlich, die nach intraperitonealer LPS-Injektion im Gegensatz zu Wildtyp-Mäusen keinen Endotoxin-Schock erleiden und überleben [79].

Interleukin-10 (IL-10) ist ein immunmodulatorisches Zytokin, welches anti-inflammatorische Eigenschaften besitzt. Interleukin-10 ist essentiell für die Regulation der Immunantwort auf ein Pathogen und verhindert die überschießende Immunreaktion auf PAMPs wie LPS, die ein SIRS oder einen septischen Schock auslösen können. [80]. Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass die letale Dosis von LPS in IL-10-defizienten Mäusen 20 Mal niedriger ist als in Wildtyp-Mäusen [81]. Die genauen molekularen Mechanismen, die zu einer Abschwächung der Immunantwort führen, sind jedoch noch nicht vollständig geklärt. Interleukin-10 kann sowohl prä- als auch posttranskriptionell in die Regulation der Zytokin-Signalsysteme eingreifen. IL-10 ist in der Lage, mRNA von pro-inflammatorischen Zytokinen wie TNF- α und IL-6 zu destabilisieren und somit deren Abbau zu induzieren. Dazu im Gegensatz steht LPS, welches die mRNA von pro-inflammatorischen Zytokinen konsolidiert, indem Adenosine Uridine-Rich Elemente (AREs) stabilisiert werden und so die Translation ermöglicht wird. Außerdem induziert IL-10 Suppressors of Cytokine Signalling (SOCS) [80].

Monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) gehört zu der Gruppe der Chemokine. Chemokine bilden eine Superfamilie von kleinen Proteinen und binden an G-Proteingekoppelte Rezeptoren. Der Name Chemokin leitet sich von ihrer zuerst entdeckten Funktion als Mediatoren der Migration von Immunzellen zu Orten der Inflammation ab: chemotactic cytokines – Chemokine. Sie werden von den unterschiedlichsten Zellen

nach inflammatorischen Stimuli ausgeschüttet und modulieren sowohl angeborene als auch erworbene Immunität. Prinzipiell sind die Effektorzellen der Chemokine alle Zellen, die aus dem Knochenmark abstammen und mobil sind. Chemokine koordinieren die Migration von Leukozyten, haben aber auch Einfluss auf die Apoptose, die Gentranskription und den Zellzyklus [82, 83]. MCP-1 gehört zu der Familie der CC-Chemokine, die nach den ersten zwei der insgesamt vier Zysteinresten des Chemokinmoleküls benannt sind. MCP-1, auch Chemokin Ligand CCL2 genannt, bindet an den Chemokin-Rezeptor CCR2 und rekrutiert darüber Monozyten, T-Gedächtniszellen und natürliche Killerzellen in Bereiche der Inflammation und Ischämie [84]. Die Bedeutung von MCP-1 wird in Versuchen an MCP-1 knockout-Mäusen verdeutlicht, da ein Knockout dazu führt, dass die Migration von Monozyten komplett unterbrochen wird [84].

1.4.2 iNOS und Stickstoffmonoxid (NO)

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein lipid- und wasserlösliches Gas, welches im Rahmen der Immunantwort produziert wird. Im Gegensatz zu Zytokinen gibt es keinen spezifischen Rezeptor für NO, da es frei durch Membranen diffundieren kann. NO kann mit anorganischen Molekülen wie Sauerstoff (O_2), Superoxiden (O_2^-), Übergangsmetallen, Strukturen der DNA, prosthetischen Gruppen wie Häm oder Proteinen interagieren [85]. In Wasser kann NO mit Sauerstoff oder Sauerstoffradikalen entweder neue Radikale (z.B. NO_2), moderat stabile Anionen (z.B. NO_2^-), stabile Anionen (z.B. NO_3^-), instabile Stickoxide (z.B. N_2O_3) oder instabile Peroxide (z.B. $ONOO^-$) bilden [86]. Falls keine Sauerstoffradikale vorhanden sind, reagiert NO mit SH-Gruppen von Aminosäuren, die S-Nitrothiol bilden. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wird im Folgenden die Formel von NO stellvertretend für alle intermediären Reaktionsprodukte (RNI – reaktive nitrogen intermediates) benutzt. NO wird sowohl von Zellen des Immunsystems wie den dendritischen Zellen, Mastzellen, Makrophagen und Mikrogliazellen als auch von Gewebezellen wie zum Beispiel Endothelzellen, Zellen der glatten Muskulatur und Fibroblasten gebildet [85]. Es gibt drei verschiedene Isoformen der Nitric Oxid Synthase (NOS): endothelial NOS (eNOS), neuronal NOS (nNOS) und inducible NOS (iNOS) [86]. Alle drei Typen der NO Synthase oxidieren L-Arginin zu NO und L-Citrullin. Während die nNOS und eNOS konstitutiv exprimiert werden, muss die iNOS erst induziert und dann synthetisiert werden [87]. Die Expression der iNOS kann durch Zytokine und LPS reguliert werden, die sowohl eine de novo Synthese des Proteins als

auch eine Stabilisierung der iNOS-mRNA induzieren [85]. NO selbst hat je nach Konzentration positive oder negative Effekte auf die iNOS-Transkription. Niedrige Konzentrationen führen über eine Aktivierung von NF- κ B zu einer iNOS-Hochregulation, während hohe NO-Konzentrationen genau den gegenteiligen Effekt auf die NF- κ B Transkription haben [88, 89].

1.4.3 Medikamentöse Intervention: Blockade von intrazellulären Signalwegen

Interleukin-6 spielt eine Schlüsselrolle bei der durch den kardiopulmonalen Bypass induzierten systemischen Entzündungsreaktion. [16]. Daher könnte die Blockade der IL-6-Ausschüttung eine Möglichkeit zur Reduktion der durch den kardiopulmonalen Bypass ausgelösten postoperativen Komplikationen sein. IL-6 führt zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT3. Durch diese Aktivierung kommt es unter anderem wiederum zu einer Verstärkung der Expression von IL-6 [60]. Die Aktivierung des STAT3 Moleküls erfolgt über SH-Domänen [90]. Da die SH2-Domänen sowohl für die Tyrosin-Phosphorylierung als auch für die Dimerisierung des STAT3-Moleküls wichtig sind, eignen sie sich besonders als Zielmolekül für eine STAT3-Inhibition. Stattic (6-nitro-benzo[b]thiopene-1,1-dioxide) ist ein solches Molekül, welches in der Lage ist, die Translokation von STAT3 in den Kern zu verhindern. Stattic steht für **Stat three inhibitory compound** und inhibiert die Phosphotyrosin-Bindung des gp130-Rezeptors an die STAT SH2-Domäne. Der inhibierende Effekt von Stattic ist temperaturabhängig und am stärksten bei 37°C ausgeprägt [90].

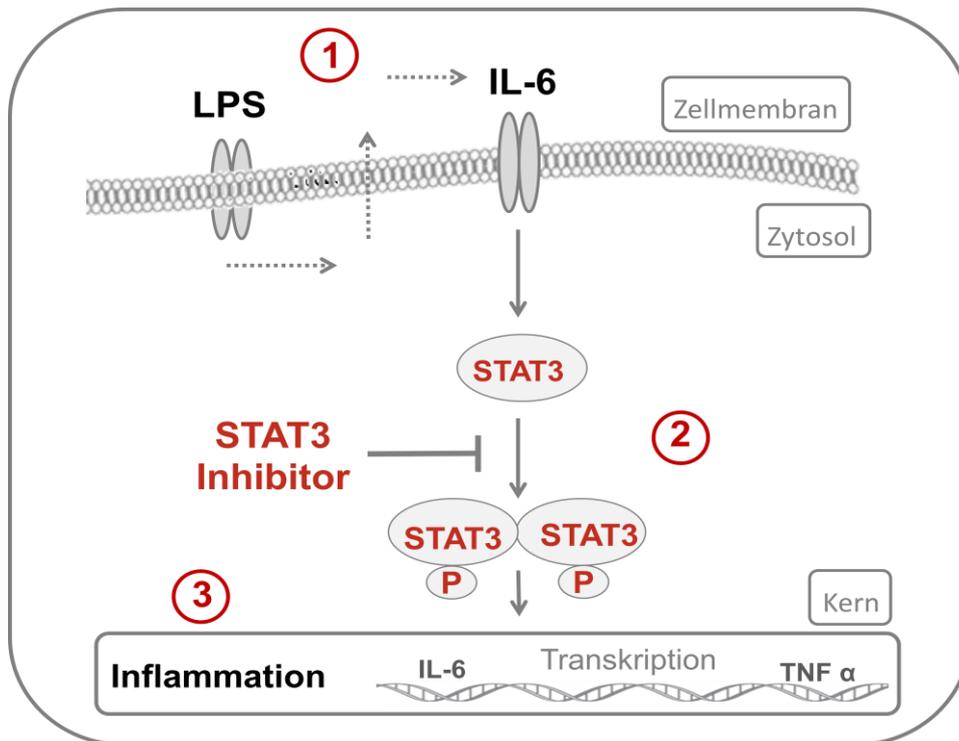


Abbildung 4: Schematische Darstellung des durch Statoc beeinflussten JAK/STAT-Signalweges. 1. Durch eine Stimulation mit LPS kommt es zu einer Ausschüttung von IL-6, welches den JAK/STAT-Signalweg induziert. 2. Die STAT3-Aktivierung wird durch einen STAT3-Inhibitor blockiert. 3. STAT3 wird an der Migration in den Zellkern gehindert. [60, 90]

1.5 Duale Rolle der Mikrogliazellen: neuroprotektiv und neurotoxisch

Mikrogliazellen sind immunkompetente Zellen des Gehirns, die zum angeborenen Immunsystem gehören und sowohl an physiologischen als auch an pathologisch-neuroinflammatorischen Prozessen beteiligt sind [91, 92]. Die Mikrogliazellpopulation des murinen Gehirns macht ungefähr 5-12% der Zellen aus, wobei die Zelldichte nach Organregion stark schwankt [93]. Mikrogliazellen wurden erstmals 1932 von Pio del Rio-Hortega beschrieben [94]. Im Gegensatz zu anderen Gliazellen wie Astrozyten und Oligodendrozyten, stammen sie nicht aus dem Neuroektoderm, sondern vom Mesoderm ab. Sie entwickeln sich aus im Blut zirkulierenden Monozyten, die während der Fetalperiode in das Gehirn migrieren. Nach dieser Zeit ist die Mikrogliazellpopulation des Gehirns relativ stabil und reproduziert sich durch Mitosen selbst, sodass der Austausch mit peripheren Monozyten gering ist [95]. Die Funktion der Mikrogliazellen hängt vom Funktionszustand des Gehirns ab. Die Mikrogliazellen sind in der Lage, ihren funktionellen Phänotyp an sich ändernde äußere Bedingungen

anzupassen. Zum einen kann man von „residenten“ Mikrogliazellen sprechen, die dadurch gekennzeichnet sind, dass sie nur wenig Oberflächenmoleküle, die mit einer Makrophagen-Aktivierung zu vergleichen sind, exprimieren. Zum anderen gibt es die „aktivierten“ Mikrogliazellen, die in ihrer Funktion den Makrophagen ähnlich sind. Die „residenten“ Mikrogliazellen sind keineswegs ruhend, sondern überwachen ihre Mikroumgebung konstant und sind aktiv an der Aufrechterhaltung der Homöostase beteiligt [96]. In Zeitraffer-Videoaufnahmen konnte gezeigt werden, dass die Zellausläufer der „residenten“ Mikrogliazellen durchgehend in Bewegung sind [97]. Daher wurde von Kettenmann und Hanisch vorgeschlagen, die Terminologie zu ändern und die residenten Mikrogliazellen als „überwachende“ Mikrogliazellen (surveying microglial cells) zu bezeichnen [98]. Der Übergang der eben erwähnten Funktionszustände ineinander ist fließend. Sobald die Mikrogliazellen Veränderungen der Homöostase wahrnehmen, kann sich ihr Funktionsprofil rapide ändern. So können Mikrogliazellen Neurone, die geschädigt wurden, durch die Ausschüttung von neurotrophen Faktoren (BDNF, NGF, NT3/4) unterstützen [99, 100]. Fällt die Schädigung massiver aus, zum Beispiel im Rahmen eines Infarktes oder eines Infektes, kann es zu einer weitergehenden Aktivierung von Mikrogliazellen kommen. Dies kann zu einer Umkehr der vorerst protektiven Rolle der Mikrogliazellen in einen für die Neuronen toxischen Funktionszustand führen. Es gibt zwei verschiedene Möglichkeiten, die eine Änderung des Funktionszustandes der Mikrogliazellen bewirken können. Zum einen können Faktoren, die sich üblicherweise nicht in der Umgebung der Mikrogliazellen befinden, zu einer Aktivierung führen. Dazu gehört unter anderem LPS, welches über die TLR der Mikrogliazellen erkannt wird [91]. Andere Signalmoleküle, die zu einer Änderung des Funktionszustandes führen, sind Komplementfaktoren (C5a, C1q), Zytokine, Chemokine, ATP oder verwandte Purine, Glutamat und NMDA. Zum anderen kann es durch einen Wegfall von sogenannten „calming“ Faktoren, die konstitutiv von Neuronen produziert werden, zu einer Aktivierung der Mikrogliazellen kommen. Dies macht deutlich, dass die Mikrogliazellantwort je nach Kontext sehr heterogen ausfallen kann und sie sowohl neuroprotektiv als auch neurotoxisch wirken kann [101]. Dennoch gibt es Anzeichen dafür, dass eine vollständige Aktivierung der Mikrogliazellen, wie sie zum Beispiel nach einer Stimulation mit LPS auslösbar ist, einen neuronalen Schaden vergrößern kann [102]. Mikrogliazellen sind in der Lage, neurotoxische Substanzen wie reaktive Sauerstoffradikale, Stickstoffmonoxid oder TNF- α zu produzieren. Dennoch sind Mikrogliazellen auch dazu befähigt nach einem

Ischämieereignis zur Läsion zu migrieren und die Neuronen vor dem Zelltod zu schützen. Dies wurde durch Versuche an transgenen Mäusen, bei denen die Mikrogliazellen durch einen modifizierten Herpesvirus und die darauffolgende Gabe von Gangciclovir an der Proliferation gehindert wurden, deutlich. Nach einer Ischämie konnten die Mikrogliazellen nicht mehr zum Ort des Schadens migrieren. Dies resultierte in einer signifikanten Vergrößerung des Infarktareals und einer Zunahme von apoptotischen Neuronen [103].

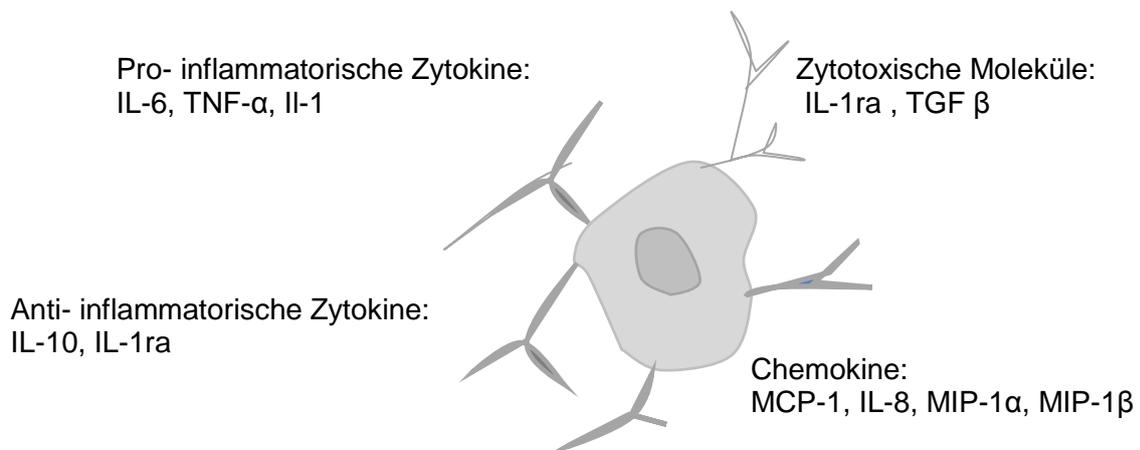


Abbildung 5: Mikrogliazellen spielen eine große Rolle bei der Neuroinflammation und sind sowohl in der Lage zu phagozytieren als auch verschiedene Zytokine und Chemokine zu produzieren. Die Abbildung ist modifiziert nach Francesca Aloisa [92].

1.6 Fragestellung

Die Anwendung von tiefer Hypothermie zur Organprotektion und insbesondere zur Neuroprotektion bei komplexen kardiochirurgischen Eingriffen bei Kindern mit angeborenen Herzfehlern ist ein etabliertes Verfahren. Dennoch sind pädiatrische Patienten, die im tief-hypothermen Kreislaufstillstand mit Hilfe einer Herz-Lungenmaschine operiert werden, besonders gefährdet, aufgrund ihrer Organunreife neurologische Folgeschäden zu erleiden. Die Ursachen sind hierbei vielfältig und können mit der von der Herz-Lungen-Maschine ausgelösten systemischen Inflammationsreaktion sowie mit der während der Operation auftretenden Hypoxie/Ischämie erklärt werden. Die Effekte der tiefen Hypothermie auf den kindlichen Organismus sind vielfältig und Gegenstand aktueller Forschung. Da der Einfluss der Hypothermie auf zellulärer Ebene noch nicht vollständig aufgeklärt ist, wurde ein Zell-Kultur-Modell aus BV2-Mikrogliazellen etabliert, um den Einfluss der Hypothermie zu untersuchen. Hierbei stand die Analyse von intrazellulären Signalwegen *in vitro* unter hypothermen Versuchsbedingungen im Mittelpunkt. Insbesondere der Einfluss von Hypothermie und Wiedererwärmung auf Signalwege, die im Rahmen einer Inflammationsreaktion eine Rolle spielen, war Gegenstand des Projektes.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Effekte von tiefer Hypothermie und anschließender Wiedererwärmung auf BV2-Mikrogliazellen anhand folgender Fragestellungen näher untersucht:

1. Welche Auswirkungen hat tiefe Hypothermie auf die Morphologie und Vitalität von BV2-Mikrogliazellen?
2. Kann tiefe Hypothermie, die durch LPS induzierte Inflammationsreaktion abschwächen?
3. Lässt sich das Migrationsverhalten von BV2-Mikrogliazellen durch tiefe Hypothermie beeinflussen?
4. Können die Effekte der tiefen Hypothermie auf die Sekretion von Zytokinen durch eine Blockade des STAT3-Signalweges imitiert werden?

2 Material

2.1 Geräte

BD FACSCalibur flow cytometer	BD Bioscience, San Jose, California, USA
Bio-Fuge primo / fresco (Zentrifugen)	Heraeus, Hanau, Deutschland
Brutschrank CO ₂ Inkubator, MCO-19AIC	Sanyo, USA
ChemiDoc XRSTM	Bio-Rad, München, Deutschland
Elektrophorese- / Blotting-Netzteil	Biometra, Göttingen, Deutschland
Elektrophoresekammer	Bio-Rad, München, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop Axio Imager. M1 + AxioCam mRC	Zeiss, Jena, Deutschland
Kühlbrutschrank CO ₂ Inkubator 55K	Mytron, Heiligenstadt, Deutschland
Magnetrührer	Roth, München, Deutschland
Multiskan Reader Ascent	Thermo Scientific, Karlsruhe, Deutschland
Phasenkontrastmikroskop Axiovert 40 CFL + uEye USB-Kamera	Zeiss, Jena, Deutschland IDS, Obersulm, Deutschland
Schüttler Promax	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Sicherheitswerkbank LaminAir	Heraeus, Hanau, Deutschland
Tank-Blot-System	Bio-Rad, München, Deutschland
Thermoblock	Biometra, Göttingen, Deutschland
Tiefkühlschrank (-80°C)	FRYKO, Esslingen, Deutschland
Wasserbad WB 10	Memmert, Schwabach, Deutschland

2.2 Zellkultur

24-Well-Platten	TPP, Trasadingen, Schweiz
96-Well Platten	TPP, Trasadingen, Schweiz
DMEM Dulbecco's MEM FG0435	Biochrom, Berlin, Deutschland
Deckgläser 18 x 18 mm	Roth, Karlsruhe
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
FCS	Biochrom, Berlin, Deutschland
LPS	SIGMA-ALDRICH, St.Louis, USA
Nitrozellulose Membran BioTrace™ NT	PALL Life Sciences, Port Washington, NY
PBS	Biochrom, Berlin, Deutschland
Poly-L-Lysin	SIGMA-ALDRICH, St.Louis, USA
Penicillin / Streptomycin	Biochrom, Berlin, Deutschland
PVDF Membranen Fluoro Trans®	PALL Life Sciences, Port Washington, NY
Serologische Pipetten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturflaschen 175 cm ²	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturröhrchen 15 ml + 50 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturschalen 60 cm ²	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Zellkulturschalen 22 cm ²	TPP, Trasadingen, Schweiz

2.3 Chemikalien

Acrylamid [30%]	Roth, München, Deutschland
APS-Lösung	Serva, Heidelberg, Deutschland
Adenosindiphosphat A5285	SIGMA-ALDRICH, München, Deutschland

BD FACSRinse Solution	BD Biosciences, San Diego, USA
BD FACS Clean Solution	BD Biosciences, San Diego, USA
BCA-Reagenz	Pierce, Rockford, USA
Bovines Serumalbumin (BSA)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
DMSO	SIGMA-ALDRICH, München, Deutschland
ECL-Detektionskit	Pierce, Rockford, USA
Ethanol [99%]	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Fibronectin aus Humanplasma L7117	Biochrome AG, Berlin
Fluorescent Mounting Medium	DAKO
Glycin	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
HCl [37%]	Merck, Darmstadt, Deutschland
Isopropanol	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Magermilchpulver	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Methanol	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
MTT-Reagenz	SIGMA-ALDRICH, München, Deutschland
Page Ruler Prestained Protein Ladder	FERMENTAS, St. Leon-Rot, Deutschland
Paraformaldehyd [4%] in PBS	Roth, Karlsruhe, Deutschland
PMSF	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Ponceau-Färbelösung	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
SDS	Roth, München, Deutschland
Stattic S7947	SIGMA-ALDRICH, München, Deutschland
Stripping-Puffer	Thermo Scientific, Karlsruhe, Deutschland
TEMED	Roth, München, Deutschland
TRIS	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Triton X-100	Roth, Karlsruhe, Deutschland

2.4 Antikörper

Annexin V + Propidium Iodid FITC Apoptosis Detection Kit II 556570	BD Bioscience, San Jose, California USA
Actin , N-terminal, rabbit A 2103	SIGMA-ALDRICH, München, Deutschland
Alpha Tubulin (11H10) Rabbit monoclonal 10376	Cell Signalling, Danvers, USA
BS-I Isolectin B4 FITC Conjugate L2895	SIGMA-ALDRICH, München, Deutschland
4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) D9542	Pierce, Rockford, USA
ICAM-1 (CD54) monoclonal Antibody FITC-Conjugated Hamster Anti-Mouse 553252	BD Bioscience, San Jose, California, USA
iNOS , rabbit polyclonal antibody	Enzo, Life Sciences, Farmingdale, USA
iNOS mouse monoclonal ab 49999	Abcam, Cambridge, Großbritannien
IκB-α , rabbit polyclonal 9242	Cell Signalling, Danvers, USA
Stat3 , rabbit Antibody 9132	Cell Signalling, Danvers, USA
Phospho STAT (Tyr705) (D3A7) XP™ rabbit monoclonal 9145	Cell Signalling, Danvers, USA
Phospho Stat3 (Ser727) 9134	Cell Signalling, Danvers, USA
Phospho-NF-κB p65 (Ser536)	Cell Signalling, Danvers, USA

(93H1), rabbit monoclonal 3034

Anti-Mouse IgG

Peroxidase-conjugated AffiniPure Donkey
715-035-150

Jackson Immuno Research, Bar Harbor, USA

Anti-Rabbit IgG

Peroxidase-conjugated AffiniPure Donkey
711-035-152

Jackson Immuno Research, Bar Harbor, USA

Nuclear Matrix Protein p84 rabbit polyclonal
ab 102684

Abcam, Cambridge, Großbritannien

2.5 Kit Systeme

BD OptEIA™ Set Mouse MCP-1

BD Biosciences, San Diego, USA

BD OptEIA™ Set Mouse TNFmono/mono

BD Biosciences, San Diego, USA

BD OptEIA™ Set Mouse IL-6

BD Biosciences, San Diego, USA

BD OptEIA™ Set Mouse IL-10

BD Biosciences, San Diego, USA

BD Pharmingen™ TMB Substrate Reagent
Set

BD Biosciences, San Diego, USA

Griess Reagent System

Promega, Madison, Wisconsin, USA

NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction
Kit

Thermo Scientific, Karlsruhe, Deutschland

Millicell 6 Well Cell Culture Inserts, 0,4µm,
30mm diameter

Millipore, Billerica, MA, USA

3 Methoden

3.1 BV2-Mikrogliazellen

Die BV2-Mikrogliazelllinie wurde von Prof. Dr. Dr. med. Oliver Ullrich, Anatomisches Institut Universität Zürich, freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), das 10% fetales Kälberserum (FBS), Penicillin G (10.000 U/mL), Streptomycin (10.000 µg/mL), NaHCO₃ (3,7 g/L), D-Glukose (4,5 g/L) und L-Glutamin (200 mM) enthielt und im Folgenden auch als Vollmedium bezeichnet werden wird, bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank kultiviert. Die verwendeten Zellkulturplatten waren zuvor mit 1 mg/ml Poly-L-Lysin vorbehandelt worden. Bei Erreichen eines konfluenten Zellrasens wurden die Zellen entweder in einem Verhältnis von 1:2 - 1:4 passagiert oder durch Abklopfen geerntet. Zur Langzeitkonservierung wurden die BV2-Mikrogliazellen als Kryokulturen in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Das Kryokulturmedium bestand aus 60% FBS, 20% DMSO und 20% Glycerol.

3.2 Zeit-Temperatur-Protokoll

In Anlehnung an Operationen, die in tiefer Hypothermie mit Herz-Kreislauf-Stillstand durchgeführt werden, wurde ein Zeit-Temperatur-Protokoll entwickelt. Hierbei werden Kühlungs-, Wiedererwärmungs- und postoperative Phase berücksichtigt.

Die BV2-Mikrogliazellen wurden in zwei Versuchsgruppen eingeteilt. Die erste Gruppe wurde für vier Stunden bei 37°C mit 1 µg/ml LPS stimuliert. Danach wurde das Medium gewechselt und die Zellen wurden für 24 Stunden nachbeobachtet. Diese Versuchsgruppe diente als normotherme Kontrollgruppe. Die zweite Gruppe wurde ebenfalls mit LPS stimuliert. Während der Stimulation wurden die BV2-Mikrogliazellen jedoch für 2 Stunden in einem Kühlbrutschrank bei 17°C gekühlt und über einen Zeitraum von 2 Stunden auf 37°C wiedererwärmt. Auch hier schloss sich eine 24-stündige Nachbeobachtungsphase an.

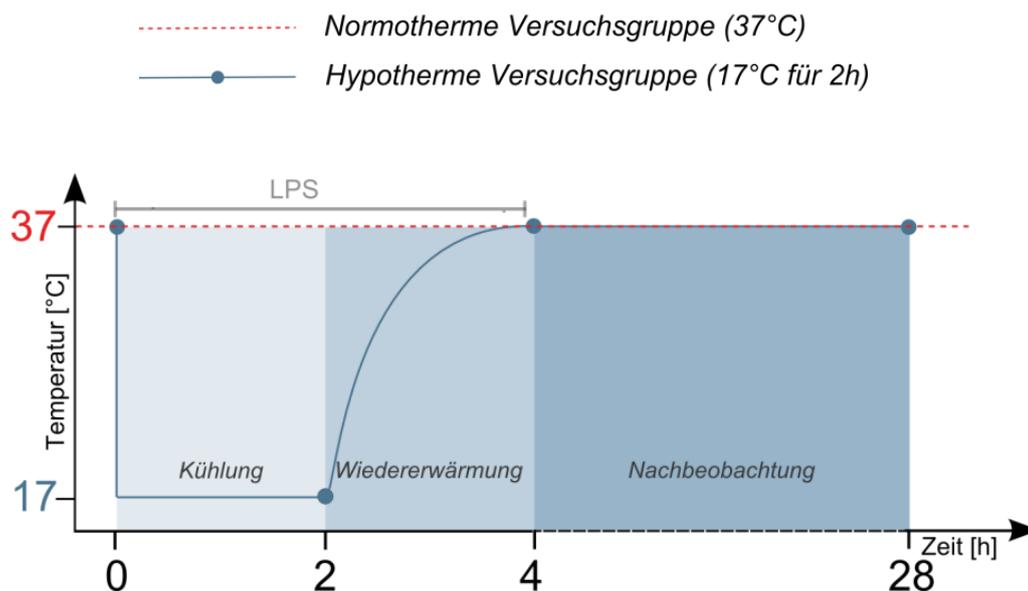


Abbildung 6: Schematische Darstellung des **Zeit-Temperatur-Protokolls**. Die BV2-Mikrogliazellen wurden in zwei Versuchsgruppen unterteilt. Beide Versuchsgruppen wurden mit 1 µg/ml LPS für 4 Stunden stimuliert. Während eine Versuchsgruppe bei 37°C belassen wurde, wurde die andere Versuchsgruppe für 2 Stunden auf 17°C gekühlt und danach auf 37°C wiedererwärmt. Beide Versuchsgruppen wurden für insgesamt 24 Stunden nachbeobachtet.

3.3 Immunhistologie

Für die immunhistologische Beurteilung der Mikrogliazellen wurden diese mit BS-I Isolectin B4 (IB4) (SIGMA) gefärbt. Hierbei handelt es sich um einen klassischen Mikrogliazellmarker [104], welcher an den fluoreszierenden Farbstoff FluoresceinIsothiocyanat (FITC) gekoppelt ist. Die Zellkerne wurden mit Diamidino-2-phenylindol (DAPI) (SIGMA), einem in die doppelsträngige DNA interkalierenden Farbstoff, angefärbt.

Hierzu wurden die BV2-Mikrogliazellen 24 Stunden vor Versuchsbeginn auf Objektträgern aus Glas in 24-Well-Platten in einer Zelldichte von $0,5 \times 10^5$ Zellen/ml ausplattiert. Die Proben wurden gemäß dem Zeit-Temperatur-Protokoll behandelt. Zu Versuchsbeginn, am Ende der Kühlungsphase und am Ende der Nachbeobachtungszeit wurde das Versuchsmedium abgenommen. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS wurden die in den Wells verbliebenen Zellen mit 500 μ l Paraformaldehyd (1%) für 15 Minuten fixiert und bei 4°C in PBS aufbewahrt. Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden die BV2-Mikrogliazellen nun mit PBS, welches mit 0,5% Triton X 100 und 5% FBS versetzt war, permeabilisiert. Unspezifische Bindungsstellen wurden durch das hinzugefügte FBS blockiert. Nach 15 Minuten Inkubationszeit wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Nun wurde der Antikörper IB4 in einer Verdünnung von 1:200 (Stammlösung: 1 mg/ml) zu den Proben gegeben und für 3 Stunden bei Raumtemperatur und Dunkelheit auf den mit Parafilm verschlossenen Proben belassen. Daraufhin wurde nochmals mit PBS gewaschen und die Zellkerne wurden mit 1 μ g/ml DAPI angefärbt. Nach einer Einwirkzeit von 10 Minuten wurden die Proben nochmals gründlich mit PBS gewaschen und anschließend wurden die Objektträger mit 3 μ l Fluorescent Mounting-Medium, einem Einbettmedium, welches gleichzeitig die Fluoreszenzfärbung stabilisiert, benetzt und Deckplättchen aufgesetzt. Nach 24 Stunden unter Lichtschutz und 4°C konnten die angefärbten BV2-Mikrogliazellen unter einem Fluoreszenzmikroskop (Axio Imager M.1) fotografiert werden. Die so aufgenommenen Fotos wurden mit der Zeiss-Software AxioVision 4.6 ausgewertet.

3.4 Vitalitätstests der BV2-Mikrogliazellen

3.4.1 Bestimmung der Stoffwechselaktivität mittels MTT-Assay

Der MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid)-Assay ist eine Methode zur Bestimmung der Stoffwechselaktivität von Zellen. In dem Assay können Rückschlüsse sowohl auf die Zellvitalität und -aktivität als auch auf die Zellproliferation gezogen werden. Das Prinzip der Methode beruht auf einer mitochondrialen Reduktion des gelben Tetrazoliumsalses 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) zu violetten Formazankristallen [105].

Dazu wurden die BV2-Mikrogliazellen in 96-Well-Platten in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml 20 Stunden vor Versuchsbeginn in Vollmedium ausplattiert. Zu den jeweiligen Untersuchungszeitpunkten (0, 4 und 28 Stunden nach Versuchsbeginn) wurde das MTT-Reagenz (5 mg/ml, in PBS gelöst) in einer Verdünnung von 1:10 in Vollmedium zu den Zellen gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden im Brutschrank wurde die Reaktion mit 100 μ l Extraktionspuffer (0,04 M HCl in 100% Isopropanol) gestoppt und es erfolgte eine photometrische Messung bei einer Wellenlänge von 570 nm im Multiscan Reader Ascent.

3.4.2 Bestimmung von Apoptose und Zellaktivierung mit Hilfe der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie oder englisch Fluorescence activated cell sorting (FACS) ist eine Methode, bei der einerseits Zellen aufgrund ihrer Eigenschaften wie Größe und Granularität identifiziert werden können und mit der man andererseits durch Kopplung mit an Fluoreszenzfarbstoffe gebundenen Antikörpern Rückschlüsse auf verschiedenste Eigenschaften der Zelle ziehen kann. Die Fluoreszenzfarbstoffe werden im Durchflusszytometer durch Laser angeregt und die emittierten Wellenlängen detektiert. Durch Kombination mehrerer Farbstoffe können verschiedene Eigenschaften einer Zelle gleichzeitig bestimmt werden. Für die hier beschriebenen Experimente wurde das Gerät FACS Calibur der Firma BD Bioscience benutzt.

3.4.3 Zelltod und Apoptose

Zur Bestimmung der Zelltodrate bei Versuchsende wurden die BV2-Mikrogliazellen mit dem in die DNA interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid (PI) angefärbt und durchflusszytometrisch gemessen. Da PI nur durch Membranen toter oder geschädigter

Zellen eindringen und an die DNA binden kann, ist der Farbstoff ein etablierter Marker für Zellschaden und Zelltod.

Die BV2-Mikrogliazellen wurden 24 Stunden vor Versuchsbeginn in einer Konzentration von $0,5 \times 10^6$ Zellen/ 22 cm^2 ausplattiert. Gemäß dem Versuchsprotokoll wurden diese mit LPS stimuliert, gekühlt und wiedererwärmt. Am Ende der Nachbeobachtungszeit wurden die Zellen von den Petrischalen abgeklopft und 2 Mal mit kaltem PBS gewaschen. Jeweils $0,5 \times 10^6$ Zellen wurden sodann in ein FACS-Röhrchen überführt, erneut gewaschen und für 10 Minuten mit $5 \mu\text{l}$ PI angefärbt. Nach einem erneuten Waschschrift wurden die Zellen im Durchflusszytometer gemessen. Die Auswertung der Messergebnisse erfolgte mittels der Software FlowJo, Version 7.2.2. Hierbei wurde der Anteil PI-positiver Zellen an der Gesamtpopulation ermittelt.

Zur Bestimmung apoptotischer Zellen wurde Annexin V (BD Bioscience), ein an Phosphatidylserin bindendes Protein, verwendet. Phosphatidylserin ist Bestandteil der Zellmembran und bei gesunden Zellen auf deren Innenseite lokalisiert. Während der Apoptose wird es auf die Membranaußenseite transloziert. Annexin V ist in der Lage, daran zu binden. Durch Kopplung von Annexin V an einen Fluoreszenzfarbstoff können apoptotische Zellen durchflusszytometrisch nachgewiesen werden. Da bedingt durch die Permeabilisierung der Membran diese Bindung auch bei toten Zellen, hier jedoch intrazellulär, stattfinden kann, ist es notwendig, zur Unterscheidung apoptotischer von nekrotischen Zellen eine Doppelfärbung mit Annexin V und PI durchzuführen. Apoptotische Zellen sind hierbei Annexin V-positiv, jedoch PI-negativ, wohingegen alle PI-positiven Zellen als nekrotisch eingestuft werden können.

Für die Versuche wurde das FITC Annexin V Apoptosis Detection KIT II der Firma BD Bioscience verwendet. Die BV2-Mikrogliazellen wurden 24 Stunden vor Versuchsbeginn in 22 cm^2 Petrischalen ausplattiert. Für den Versuchswert 4 Stunden nach Versuchsbeginn wurden $1,2 \times 10^6$ Zellen/Petrischale und für den Versuchswert 28 Stunden nach Versuchsbeginn $0,5 \times 10^6$ Zellen/Petrischale ausgesät. Zu den jeweiligen Versuchszeitpunkten wurden die Zellen geerntet und 2 Mal mit kaltem PBS gewaschen. $0,5 \times 10^6$ Zellen wurden dann in FACS-Röhrchen überführt und nochmals gewaschen. Danach wurden die Zellen in $100 \mu\text{l}$ Annexin V binding Puffer resuspendiert und mit $5 \mu\text{l}$ FITC Annexin V und $5 \mu\text{l}$ PI 10 Minuten bei Dunkelheit inkubiert, erneut gewaschen und sofort am Durchflusszytometer analysiert. Hierbei wurden pro Versuchsgruppe mindestens 1×10^5 Zellen gemessen. Die Auswertung der Messergebnisse erfolgte mittels der FlowJo-Software, TreeStar, Ashland OR, USA. Es wurde der Anteil der

Annexin V-positiven, PI-negativen Zellen bestimmt. Diese Versuche erfolgten in drei Durchgängen.

3.5 Der Oberflächenmarker ICAM-1 (CD 54)

Für die Messung der Expression des Oberflächenmoleküls ICAM-1 wurde der mit Fluorescein Isothiocyanate (FITC) direkt gekoppelte monoklonale Antikörper ICAM-1 von BD Bioscience verwendet. Dazu wurden die BV2-Mikrogliazellen 28 Stunden vor Versuchsbeginn in einer Zellzahl von $0,9 \times 10^6$ bzw. $0,4 \times 10^6$ Zellen/22cm²-Petrischale ausplattiert. Die Zellen durchliefen das oben beschriebene Zeit-Temperatur-Protokoll und wurden jeweils 4 bzw. 28 Stunden nach Versuchsstart unter Verwendung von kaltem PBS geerntet und anschließend gewaschen. Die Färbung erfolgte mit $0,5 \times 10^6$ Zellen pro FACS Röhrchen in je 2 ml FACS-Puffer und 10 µl des zuvor 1:10 mit FACS-Puffer vorverdünnten Antikörpers für 15 Minuten bei Dunkelheit und 4°C. Nach einem weiteren Waschschrift wurde zur Abgrenzung lebender von toten Zellen 15 Minuten mit 5 µl PI gefärbt und danach sofort im Durchflusszytometer gemessen.

FACS Puffer: Phosphatpuffer (PBS) versetzt mit 1% fetalem Kälber Serum (FBS) und 1 g/L NaN₃

3.6 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Der ELISA ist ein quantitativer Immunoassay, welcher zur Bestimmung von Proteinen im Zellkulturüberstand genutzt werden kann.

Die BV2-Mikrogliazellen wurden 24 Stunden vor Versuchsbeginn in 96-Well-Mikrotiterplatten in einer Zellzahl von 1×10^4 Zellen/Well in Zellkulturmedium ausplattiert. Die Zellen durchliefen das Zeit-Temperatur-Protokoll. In Abhängigkeit von dem zu untersuchenden Protein wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten die Zellkulturüberstände gewonnen. Hierzu wurden die Überstände abgenommen, kurz zentrifugiert und der Überstand wiederum abpipettiert, um eventuell vorhandene Zellen auszuschließen. In einem Eppendorf-Reaktionsgefäß konnte das gewonnene Material nun bei 4°C bis zu 7 Tage zur weiteren Verwendung gelagert werden. Zur Durchführung des ELISAs wurden Opteia ELISA Sets der Firma BD Biosciences benutzt und nach Herstelleranleitung angewandt. 96-Well-Mikrotiterplatten wurden mit 100 µl eines Capture-Antikörpers über Nacht inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit

Waschpuffer erfolgte für eine Stunde die Blockierung freier Proteinbindungsstellen zur Reduktion der Hintergrundaktivität mit 100 µl einer 10%igen PBS/FCS-Lösung. Die Platten wurden erneut gewaschen und sodann für 2 Stunden mit den Proben und der Standardverdünnungsreihe inkubiert. Sowohl Proben als auch Standards wurden als Doppelbestimmungen durchgeführt. Einige der Proben mussten wegen der hohen Konzentration des Zielproteins zuvor mit Zellkulturmedium verdünnt werden. Nach fünfmaligem Waschen konnte der an das Enzym Meerrettichperoxidase gekoppelte Detektionsantikörper für eine Stunde hinzugegeben werden. Anschließend wurde 7 Mal gewaschen und als Substratlösung 100 µl Tetramethylbenzidin/H₂O₂-Lösung zu den Wells hinzugefügt. Nach einer 30-minütigen Inkubation bei Dunkelheit wurde die Enzymreaktion mit 50 µl einer 1 M H₃PO₄ gestoppt, sodass bei einer Wellenlänge von 450 nm die Messung der Enzymprodukte im Photometer stattfinden konnte.

Coating Puffer pH 9,5 (IL-6): 0,1 M Natriumcarbonatlösung (7,13 g NaHCO₃, 1,59 g Na₂CO₃; q.s. auf 1,0 Liter; pH auf 9,5 einstellen mit 10 N NaOH)

Coating Puffer pH 6,5 (MCP-1, TNF und IL-10): 0.2 M Natriumphosphat (12,49 g Na₂HPO₄, 15,47 g NaH₂PO₄; q.s. auf 1,0 Liter; pH auf 6,5 einstellen)

Wasch Puffer: PBS mit 0,05% Tween-20

3.7 Stickstoffmonoxid (NO)-Messung mittels Griess-Assay

Der Griess-Assay ist eine von Peter Griess 1858 (Griess, P., Bemerkungen zu der Abhandlung der H.H. Weselsky und Benedikt "Über einige Azoverbindungen". Chem. Ber., 12, 426 (1879), in German) beschriebene Methode zur Detektion von Nitrit (NO₂⁻), einem von zwei stabilen Abbauprodukten von NO. Der Assay beruht auf der Reaktion von Sulfonamid und Nitrit mit *N*-1-naphthylethylenediaminedihydrochloride (NED) zu einem Azofarbstoffderivat. Der Assay ist somit eine Methode zum indirekten Nachweis von NO.

Zur Durchführung des Griess-Assays wurde das kommerziell erhältliche Griess-Reagent-System der Firma Promega benutzt. Die Detektion von NO₂⁻ erfolgte nach den Herstellerempfehlungen. Die BV2-Mikrogliazellen wurden hierzu 12 Stunden vor Versuchsbeginn in 24-Well-Platten ausplattiert und gemäß dem Zeit-Temperatur-Protokoll inkubiert.

4, 12 und 28 Stunden nach Versuchsbeginn wurde der Überstand der gekühlten und der Kontrollgruppe abgenommen und 10 Minuten bei 2000 U/min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Währenddessen wurde ein Nitrit-Standard aus einer 0,1 M Stammlösung hergestellt, sodass die Verdünnungsreihe Konzentrationen von 100 µM - 1,56 µM umfasste. Danach wurden 50 µl der Proben und der Standards in eine 96-Well-Mikrotiter-Platte aufgetragen. Es erfolgte jeweils eine Doppelbestimmung. Sowohl zur Standardreihe als auch zu den Proben wurde 50 µl Sulfanilamid gegeben. Nach 10 Minuten wurden 50 µl NED hinzugefügt und nach 5 - 10 Minuten konnte die Intensität des Farbumschlags nach Magenta photometrisch durch Bestimmung der Extinktion im Multiskan Reader Ascent gemessen werden. Anhand der über die Standardreihe errechneten Standardkonzentrationen konnte die Nitritkonzentration der einzelnen Proben ermittelt werden.

3.8 Western Blot

3.8.1 Proteingewinnung

Die BV2-Mikrogliazellen wurden 24 Stunden vor Versuchsbeginn auf 60 cm² große Petrischalen ausplattiert. Die Zellzahl betrug 1,2 x 10⁶ Zellen/ml für die Werte zu Versuchsbeginn (0 - 6 Stunden) und 0,6 x 10⁶ Zellen/ml für den Wert 28 Stunden nach Versuchsbeginn. Bis auf die zu Versuchsbeginn gewonnene Kontrolle wurden alle Zellen gemäß dem Zeit-Temperatur-Protokolls mit LPS stimuliert. Zu den jeweiligen Versuchszeitpunkten wurden die Zellen auf Eis gestellt, mit kaltem PBS gewaschen und in Lysis-Puffer, der mit Proteaseinhibitoren versetzt war, resuspendiert. Der Lysis-Puffer bestand aus 20 mM TRIS (pH 7,5) mit 150 mM NaCl, 1 mM Ethyleneglycoltetraacetic acid (EGTA), 1 mM Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) und 1% Triton X 100. Als Proteaseinhibitoren wurden Phenylmethanesulfonylfluoride (PMSF) und die Phosphatase-Inhibitor-Cocktails 2 und 3 (inhibieren Thyrosin/SerinPhosphatasen) von Sigma-Aldrich benutzt. Die Inhibitor-Cocktails wurden gemäß der Herstelleranleitung eingesetzt. Die so gewonnene Zellsuspension wurde bei -80°C eingefroren.

3.8.2 Proteinaufreinigung und BCA-Messung

Zur Aufreinigung der Proteine wurden die Proben schonend aufgetaut und anschließend mit ausgezogenen Pipettenspitzen resuspendiert und 10 Minuten bei 4°C

und 1200 U/min zentrifugiert. Ein Teil des so gewonnen Gesamtproteins wurde zur Proteinquantifizierung unter Verwendung des BCA Protein Assays (Pierce) benutzt. 20 µl der 1 : 10 mit Aqua bidest verdünnten Proben wurden in eine 96-Well-Mikrotiter-Platte pipettiert. Eine Albumin-Standardreihe wurde ebenfalls mitgeführt. Nach Zugabe des BCA-Reagenzes, bestehend aus Reagenz A und B im Verhältnis 50 : 1, wurde die Mikrotiterplatte 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach konnte die Extinktion bei einer Wellenlänge von 570 nm photometrisch im Multiskan Reader Ascent gemessen und die Proteinmenge anhand der ermittelten Standardkurve berechnet werden.

3.8.3 Auftrennung des Proteingemisches mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE ist eine Methode zur Auftrennung von Proteinen nach ihrer Molekularmasse. Es wurde mit einem Western Blot-System der Firma Bio-Rad gearbeitet.

Zur Vorbereitung der Gelelektrophorese wurden die Proben auf die gleiche Proteinmenge (20, 30 oder 40 µg/Tasche) eingestellt und mit Probenpuffer versetzt. Der Probenpuffer [Lane Marke Reducing Sample Buffer (5x)] bestand aus Natrium dodecyl sulfate (SDS) und Dithiothreitol (DTT). SDS ist ein anionisches Detergenz, welches die Proteine in ihre lineare Form überführt. Durch das zusätzlich im Probenpuffer enthaltene DTT werden die Proteine vollständig denaturiert. Die Proben wurden nun auf 90°C erhitzt und danach direkt auf das Gel aufgetragen. Zur Bestimmung der Proteingröße wurde außerdem ein standardisierter Proteinmarker aufgetragen. Das Trenngel bestand aus Polyacrylamid, N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) und Ammoniumpersulfat, welche zur Quervernetzung der Polyacrylamid-Monomere führten. Der Polyacrylamidanteil des Gels richtete sich nach der Molekularmasse des untersuchten Proteins und lag bei 7 bzw. 12%.

Gel	Aqua Bidest	Acrylamid	Puffer	10% SDS	TEMED	10%APS
Trenngel	abhängig vom Acrylamidgehalt	abhängig vom Molekulargewicht des Proteins	1,5 M TRIS/HCL pH 8,8	150 µl	30 µl	75 µl
Sammelgel	2,25 ml	810 µl	0,5 M TRIS/HCL pH 6,8	75 µl	19 µl	75 µl

Tabelle 2: Zusammensetzung der Polyacrylamidgele

Nach dem Auftragen der Proben auf das Sammelgel wurde zu Beginn eine Spannung von 50 - 80 mV angelegt. Nachdem sich die Proben gesammelt hatten, wurde die Spannung auf 80 - 110 mV bei einer Stromstärke von 400 mA erhöht.

Die Laufzeit der Proben variierte je nach Proteingröße und benutztem Gel zwischen 1,5 und 3 Stunden.

10x-Elektrophoresepuffer: 30,28 g TRIS, 144,12 g Glycin, 10 g SDS ad 1L Aqua Bidest

3.8.4 Proteinblotting

Im nächsten Schritt wurden die im Gel aufgetrennten Proteine auf Nitrocellulose- oder PVDF-Membranen transferiert. Das Blotting erfolgte nach der Tank-Blot-Methode. Hierfür wurde das Trenngel zwischen zwei Kunststoffgitter, Schaumstoffschwämme, Filterpapier und die Membran gespannt, welche zuvor in Blottingpuffer eingeweicht wurde. Die PVDF-Membranen wurden zusätzlich in Methanol gewässert. Für Nitrocellulosemembranen wurde für 60 Minuten eine Spannung von 100 mV bei einer maximalen Stromstärke von 300 mA angelegt. Beim Blotting der PVDF-Membranen wurde ebenfalls mit einer Spannung von 100 mV gearbeitet, jedoch war hier die Blottingzeit variabel, betrug aber mindestens 60 Minuten. Um den Proteintransfer zu überprüfen wurden die Membranen danach kurz mit dem roten Farbstoff Ponceau S (0,1% und 0,5% Essigsäure) angefärbt und danach luftgetrocknet.

10x-Blottingpuffer: 30,28 g TRIS, 144,2 g Glycin ad 800 ml Aqua Bidest

3.8.5 Antikörper und Proteindetektion

Bevor mit der Proteindetektion begonnen werden konnte, wurden die Membranen mit 5% Magermilchpulver, welches in PBST oder TBST gelöst war, inkubiert. Das Magermilchpulver blockiert unspezifische Bindungen und erhöht die Sensitivität der Western-Blot-Analyse. Nach diesem Arbeitsschritt wurde der Primärantikörper auf die

Membranen gegeben und über Nacht auf einem Schüttler bei 2 - 7°C auf den Membranen belassen. Die Verdünnung dieses Primärantikörpers wurde gemäß den Herstellerempfehlungen durchgeführt. Danach wurden die Membranen gewaschen, und es erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper für 1 - 2 Stunden. Anschließend wurden die Membranen nochmals gründlich gewaschen. Die Proteine wurden nun mittels eines Chemilumineszenzfarbstoffs untersucht. Hierzu wurde ein kommerziell erhältlicher Versuchskit (Thermo Scientific Pierce ECL Western Blotting Substrate), welches ein Peroxid und einen Lumineszenzverstärker enthält, gemäß den Herstellerangaben benutzt. Durch die Reaktion des Peroxids mit der an den Sekundärantikörper gekoppelten Meerrettichperoxidase kommt es zur Lumineszenz. Die Menge des umgesetzten Peroxids und damit die Lumineszenzintensität ist proportional zur Menge des auf der Membran durch die Antikörper detektierten Proteins. Die Membranen wurden hierfür eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Die Chemilumineszenz konnte nun in einem speziell dafür vorgesehenen Gerät, der ChemiDoc™, Bio-Rad, Hercules California, USA, mittels einer hochsensitiven Kamera fotografisch festgehalten und mit dem Programm Quantity One™, Bio-Rad, aufgenommen werden. Die Auswertung erfolgte mit der Software Image Lab 3.0.1. beta2 (Bio-Rad), wobei die Intensität der angefärbten Banden ermittelt werden konnte. Für jeden Versuch wurde die Intensität des Kontrollwertes (unstimulierte BV2-Mikrogliazellen) auf den Wert 1 festgelegt, sodass alle anderen Werte derselben Membran direkt mit der Intensität dieses Referenzwertes verglichen werden konnten. Außerdem wurde auf die Membranen ein Antikörper gegen Aktin, Alpha Tubulin oder Nuclear Matrix protein p85 als Proteinladekontrolle gegeben, sodass Unterschiede in der Proteinmenge der jeweiligen Probenaschen ausgeglichen werden konnten. Dazu wurde die Intensität der Banden durch die Intensität der Banden der Ladekontrolle geteilt. Im Falle von Phospho-STAT3 (Ser727 und Thr705) wurde die Intensität der Banden, die durch die phosphorylierten Antikörper hervorgerufen wurde, durch die Intensität der nicht-phosphorylierten STAT3-Antikörper geteilt.

1. Antikörper	Gel	Verdünnung	Blockierung	2. Antikörper
<u>Phospho-Stat3 (Ser727)</u>	12%	1 : 1000 in TBST	5% Magermilch in TBST	Goat Anti Rabbit 1 : 10 000
<u>Phospho-Stat3 (Tyr705)</u>	12%	1 : 1000 in TBST	5% Magermilch in TBST	Goat Anti Rabbit 1 : 10 000
<u>IκBα</u>	12%	1 : 1000 in TBST	5% Magermilch in PBST	Goat Anti Rabbit 1 : 10 000
<u>Phospho-NF-κB p65 (Ser536)</u>	12%	1 : 1000 in PBST	5% Magermilch in PBST	Goat Anti Rabbit 1 : 10 000
<u>iNOS</u>	7%	1 : 800 in TBST	5% Casein in TBST	Goat Anti Mouse 1 : 10 000
<u>Nuclear Matrix protein p85</u>	12%	1 : 2000 in PBST	5% Magermilch in PBST	Goat Anti Rabbit 1 : 10 000
<u>Aktin</u>	12%	1 : 15000 in PBST o. TBST	5% Magermilch in PBST oder TBST	Goat Anti Rabbit 1 : 10 000
<u>Alpha Tubulin</u>	7%	1 : 1000 in PBST o. TBST	5% Magermilch in PBST	Goat Anti Rabbit 1 : 10 000

Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Antikörper

3.8.6 Aufbereitung der nukleären Proteinfraction

Zur Extraktion der Zellkerne der BV2-Mikrogliazellen wurde das NE-PER® Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagent Kit (Thermo Scientific) benutzt. Die BV2-Mikrogliazellen wurden nach demselben Protokoll, welches auch bei der Proteingewinnung zur Anwendung kam, ausplattiert und mit 1 µg/ml LPS stimuliert. Die Zellen wurden nun alle 30 Minuten bis zum Ende der Wiedererwärmungsphase gemäß dem NE-PER®-Protokoll aufbereitet, sodass im Anschluss die Proteine der isolierten Zellkerne der BV2-Mikrogliazellen auf eine PVDF-Membran aufgetragen werden konnten. Sowohl für die Zytosol- als auch für die Kernfraktion wurde zu Beginn des Versuches ein nicht mit LPS stimulierter Kontrollwert, der nach demselben Protokoll wie die anderen Proben ausplattiert wurde, gewonnen.

Im Detail wurden die BV2-Mikrogliazellen mit Zellschabern von den Petrischalen abgeschabt, 2 Mal mit eiskaltem PBS gewaschen und bei 1200 x g 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert und verworfen, sodass das Zellpellet so trocken wie möglich war. Zu dem Pellet wurde eine im Protokoll genau definierte Menge eiskaltes Cytoplasmatic Extraction Reagents (CER I) gegeben. Das CER I wurde mit Proteaseinhibitoren gegen Serin- und Thyrosinkinase und PMSF in einer Verdünnung von 1 : 100 versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten wurde das Cytoplasmatic Extraction Reagent II hinzugefügt und für 5 Minuten mit 16000 x g zentrifugiert. Danach wurde der Überstand, der die zytoplasmatische Zellfraktion

enthielt, abgenommen und das Pellet mit Nuclear Extraction Reagent resuspendiert, welches mit Proteaseinhibitoren und PMSF versetzt war. Die Probe wurde nun über einen Zeitraum von 40 Minuten alle 10 Minuten für 15 Sekunden ausgiebig geschüttelt und danach bei 16000 x g für zehn Minuten zentrifugiert. Der Überstand mit der nukleären Zellfraktion wurde wiederum abgenommen. Beide Fraktionen wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

3.9 Migrationsassay

Zur Analyse des Migrationsverhaltens der BV2-Mikrogliazellen wurde ein Migrationsassay durchgeführt. 1×10^5 Zellen wurden hierzu auf einer Polykarbonatmembran mit einer Porengröße von 8 μm , die sich in den Vertiefungen einer 24-Well-Platte befand, mit Zellkulturmedium ausplattiert. Ziel des Versuches war es, zu beobachten, wie viele Zellen beim Durchlaufen des Zeit-Temperatur-Protokolls in der Lage sind, durch die Membran hindurch in das darunterliegende Well zu migrieren. Das Transwellsystem wurde vor Versuchsbeginn über Nacht mit 10 $\mu\text{g/ml}$ Fibronectin beschichtet. Nach einer Vorinkubationszeit der Zellen von 24 Stunden wurden die Membranen zweimal mit serumfreiem Medium gewaschen und für weitere 4 Stunden in diesem inkubiert. Danach durchliefen die Zellen das bereits beschriebene Versuchsprotokoll. Anstelle von LPS wurde dem serumfreien Medium zu Versuchsbeginn ADP in einer Konzentration von 1 mmol/L zugefügt. In der 24-stündigen Nachbeobachtungszeit wurden die Zellen in serumfreiem Medium mit ADP inkubiert. Am Ende dieser Zeit wurden die Wells mit PBS gewaschen und mit 0,5% Toluidinblau in einer 4%igen Paraformaldehydlösung für 5 Minuten fixiert und angefärbt. Die Zellen an der Oberseite der Membran wurden mit einem Wattestäbchen entfernt, sodass nur die migrierten Zellen an der Unterseite der Membran übrig blieben. Diese wurden anschließend bei 30-facher Vergrößerung mikroskopisch begutachtet. Für die quantitative Auswertung wurden pro Membran zehn Ausschnitte fotografiert, von zwei Personen ausgezählt und als Mittelwert dargestellt. Die Auswertung erfolgte verblindet.

3.10 STAT3-Inhibitor Stattic

Um den Effekt der Kühlung auf die IL-6-Ausschüttung zu imitieren, wurde **Stat three inhibitory compound** (Stattic) benutzt. Anstelle von Hypothermie und Wiedererwärmung

wurden die BV2-Mikrogliazellen mit 1 μM , 2,5 μM und 5 μM Stattic für 4 Stunden behandelt und danach für weitere 24 Stunden nachbeobachtet. Dieser Versuch wurde bei Normothermie durchgeführt. Die mit Stattic versetzte Versuchsgruppe ersetzte somit die hypotherme Versuchsgruppe. Um die maximal wirksame und nicht toxische Stattic-Konzentration zu ermitteln, wurde eine Konzentrationsreihe mit 5 verschiedenen Stattic-Konzentrationen (40 μM , 20 μM , 10 μM , 5 μM und 2,5 μM) angesetzt und ein MTT-Assay durchgeführt (3.4.1). Basierend auf den so gewonnenen Ergebnissen wurde mittels ELISA die IL-6-Ausschüttung mit den Stattic-Konzentrationen 1 μM , 2,5 μM und 5 μM untersucht.

3.11 Statistische Analyse

Die statistische Analyse und graphische Darstellung der Versuche wurde mit dem Programm Graph Pad Prism Version 5.0 durchgeführt. Alle Versuche wurden mindestens dreimal mit unterschiedlichen Zellpassagen und Zellstocks durchgeführt. Da nicht von einer Normalverteilung der Versuchsproben auszugehen ist, wurde für die statistische Auswertung der nicht gepaarten Proben der Mann-Whitney U-Test angewendet. P-Werte < 0,05 wurden mit *, p-Werte < 0,01 mit ** und p-Werte < 0,001 mit *** gekennzeichnet und als statistisch signifikant gewertet. Die p-Werte sind deskriptiv zu betrachten. In den graphischen Darstellungen sind die Mittelwerte und die Standardabweichungen angegeben.

4 Ergebnisse

4.1 Hypothermie führt zu morphologischen Veränderungen der BV2-Mikrogliazellen

Zu Beginn des Projektes wurden die Auswirkungen von tiefer Hypothermie und Wiedererwärmung auf die Morphologie der BV2-Mikrogliazellen untersucht. Dazu wurden die Mikrogliazellen nach dem zuvor beschriebenen Zeit-Temperatur-Protokoll (siehe 3.2) gekühlt und wiedererwärmt und anschließend immunhistochemisch angefärbt. Es gab insgesamt vier Versuchsgruppen. Sowohl unter hypothermen als auch unter normothermen Versuchsbedingungen erfolgte eine Stimulation mit 1 µg/ml LPS. Um die alleinigen Auswirkungen der Kühlung und Wiedererwärmung zu untersuchen, gab es auch Versuchsgruppen ohne LPS-Stimulation. Die BV2-Mikrogliazellen wurden am Ende der Kühlungsphase (2 Stunden nach Versuchsbeginn), am Ende der Wiedererwärmungsphase (4 Stunden nach Versuchsbeginn) und am Ende der Nachbeobachtungszeit (28 Stunden nach Versuchsbeginn) mit dem spezifischen mikroglialen Marker IB4 und dem DNA-Fluoreszenzfarbstoff DAPI angefärbt.

In den Versuchsgruppen, die weder mit LPS stimuliert noch gekühlt wurden, waren die Zellausläufer der BV2-Mikrogliazellen deutlich zu erkennen. Diese Zellform steht im Gegensatz zu der überwiegend amöboiden Zellform, die nach der Stimulation mit LPS in der normothermen und hypothermen Gruppe, aber auch in der hypothermen Gruppe ohne LPS-Stimulation erkennbar war. Besonders in den hypothermen Versuchsgruppen fielen die komplett abgerundeten Zellen auf, während in den mit LPS stimulierten Versuchsgruppen vereinzelte Zellen noch Zellausläufer zeigten (Abbildung 7).

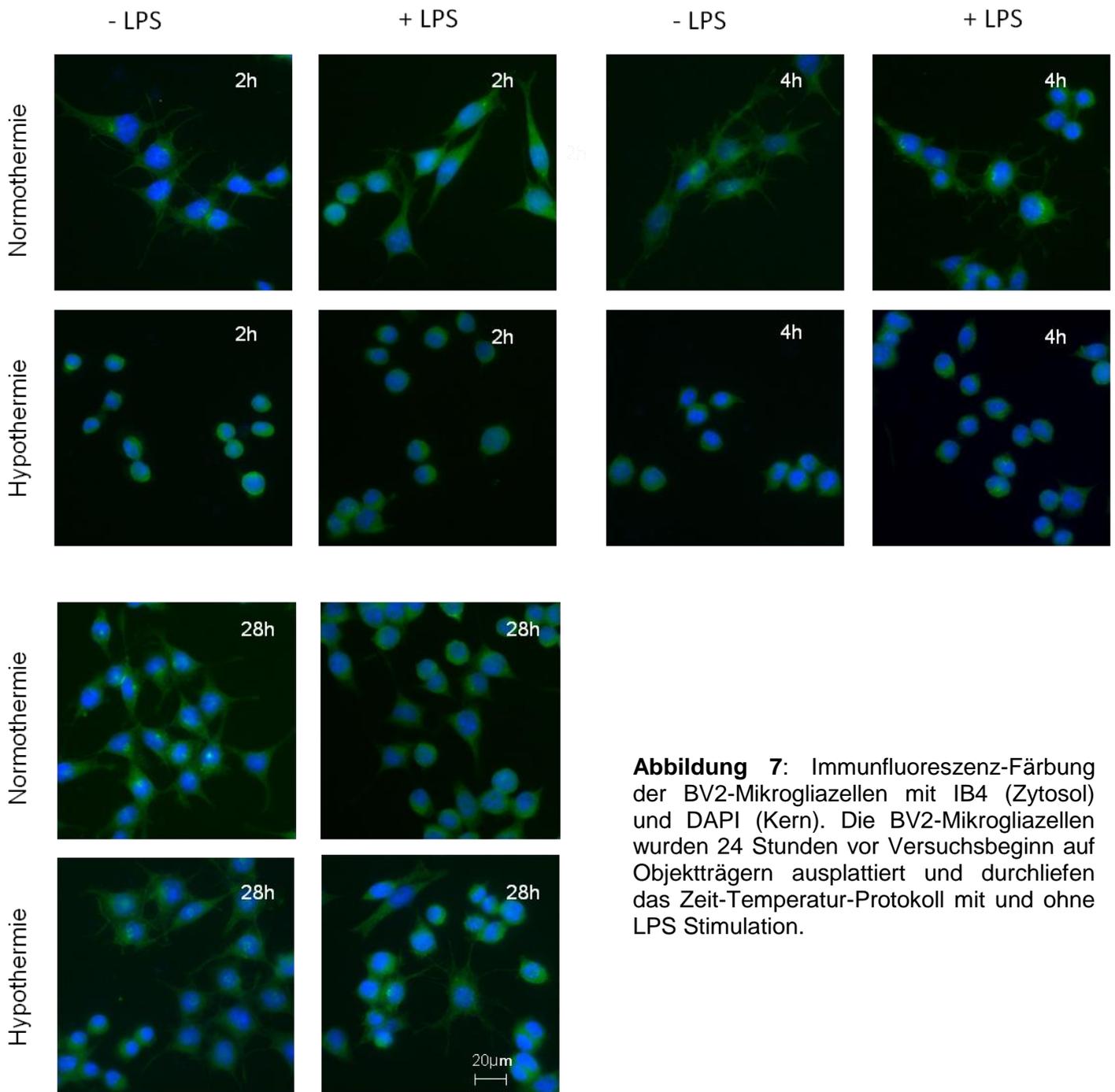


Abbildung 7: Immunfluoreszenz-Färbung der BV2-Mikrogliazellen mit IB4 (Zytosol) und DAPI (Kern). Die BV2-Mikrogliazellen wurden 24 Stunden vor Versuchsbeginn auf Objektträgern ausplattiert und durchliefen das Zeit-Temperatur-Protokoll mit und ohne LPS Stimulation.

4.2 Hypothermie und Vitalität

4.2.1 MTT-Assay - mitochondriale Aktivität

Der MTT-Assay beruht auf einer Reduktion des Tetrazoliumsalzes MTT und gibt Aufschluss über die mitochondriale Zellstoffwechselaktivität der Zellen. Über die Analyse der Stoffwechselaktivität können indirekt Rückschlüsse sowohl auf die Zellproliferation als auch auf die Zellvitalität geschlossen werden. In Abbildung 8 sind die Ergebnisse des MTT-Assays der Gruppe ohne LPS Stimulation dargestellt. In dem direkt nach der Kühlung und Wiedererwärmung durchgeführten MTT-Assay bestand kein Unterschied zwischen den Versuchsgruppen. Es ist auch zu erkennen, dass 28 Stunden nach Versuchsbeginn kein Unterschied zwischen der gekühlten und ungekühlten Gruppe bestand. In einem weiteren Versuch wurden die BV2-Mikrogliazellen mit LPS stimuliert (Abbildung 9). Auch die Stimulation mit LPS hatte sowohl nach der Kühlung auf 17°C und Wiedererwärmung als auch 28 Stunden nach Versuchsbeginn keinen Einfluss auf die Zellaktivität und Zellproliferation.

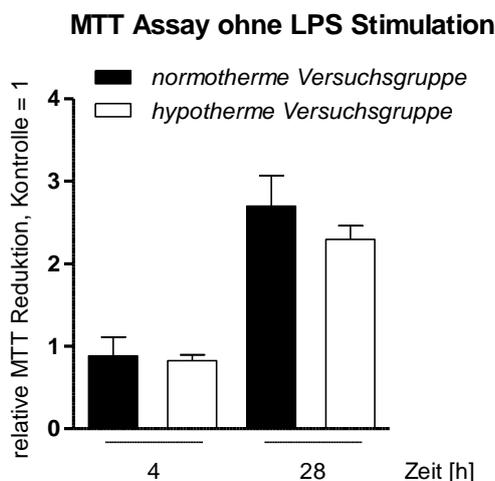


Abbildung 8: Relative Zellaktivität 4 und 28 Stunden nach Versuchsbeginn unter hypothermen und normothermen Bedingungen ohne LPS-Stimulation. Alle Werte wurden auf eine Kontrolle, die zu Versuchsbeginn gewonnen wurde, bezogen. Die Versuche wurden viermal wiederholt (n=4).

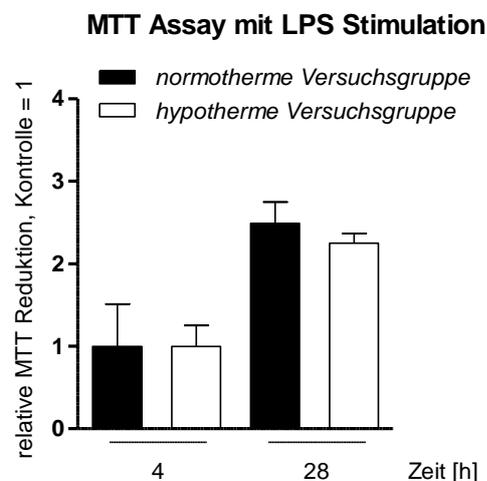
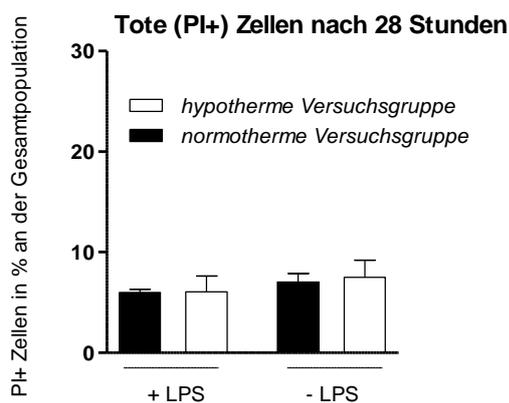


Abbildung 9: Relative Zellaktivität 4 und 28 Stunden nach Versuchsbeginn unter hypothermen und normothermen Bedingungen und mit LPS-Stimulation. Alle Werte wurden auf eine Kontrolle, die zu Versuchsbeginn gewonnen wurde, bezogen. Die Versuche wurden viermal wiederholt (n=4).

4.2.2 Apoptose – FACS-Analyse Annexin V und PI

Mittels der FACS-Analyse sollten die Auswirkungen von tiefer Hypothermie und Wiedererwärmung auf die Vitalität der BV2-Mikrogliazellen untersucht werden. Dazu wurden die Zellen mit Annexin V, einem Marker für Apoptose, und Propidiumiodid (PI), einem Marker für den Zelltod, angefärbt. Die Zellen durchliefen das Zeit-Temperatur-Protokoll und wurden in einer Versuchsgruppe mit LPS und in der anderen Versuchsgruppe ohne Stimulation 4 und 28 Stunden nach Versuchsbeginn durchflusszytometrisch analysiert. Dabei zeigte sich, dass tiefe Hypothermie und Wiedererwärmung nicht zu einer vermehrten Apoptose oder zu einem vermehrten Zelltod führten (Abbildung 10). Sowohl in den unstimulierten als auch in den mit LPS stimulierten Versuchsgruppen gab es keinen Anstieg der toten (PI+) oder apoptotischen Zellen (Annexin V+).

a)



b)

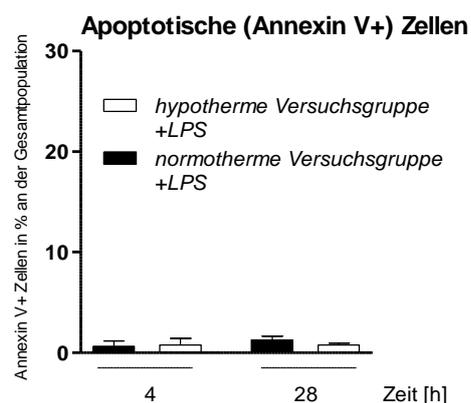


Abbildung 10: a) PI-positive (tote) Zellen 28 Stunden nach Versuchsbeginn mit (+LPS) und ohne (-LPS) Stimulation. b) Annexin V-positive (apoptotische) Zellen nach 4 und 28 Stunden mit LPS-Stimulation.

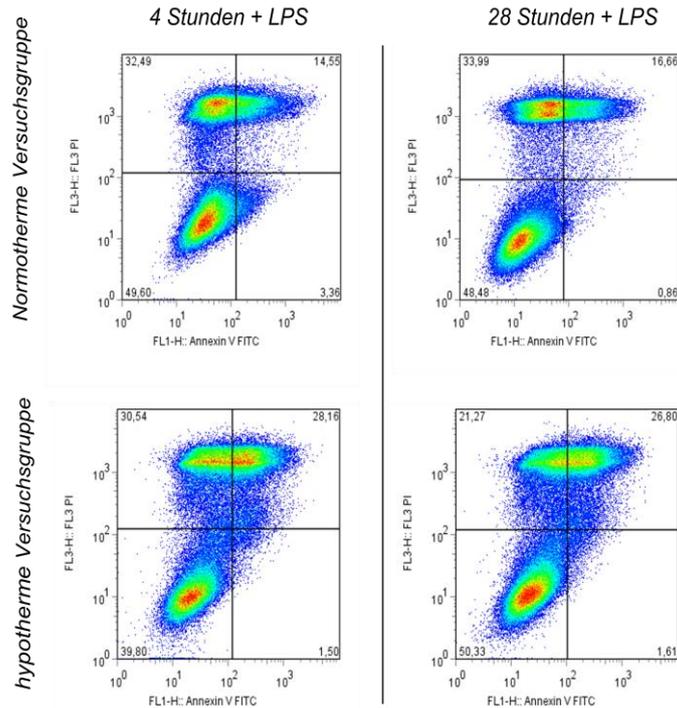


Abbildung 11: Exemplarische Darstellung der Dot Plots der BV2-Mikrogliazellen 4 und 28 Stunden nach Versuchsbeginn und einer Stimulation mit LPS. Im linken oberen Quadranten befinden sich die PI+ und Annexin V- Zellen (tote Zellen). Im linken unteren Quadranten sind die weder mit PI noch Annexin V anfärbbaren Zellen zu sehen (lebende Zellen). Im rechten oberen Quadranten befinden sich PI+ und Annexin V+ Zellen (tote Zellen) und im rechten unteren Quadranten nur Annexin V+ und PI- Zellen (apoptotische Zellen).

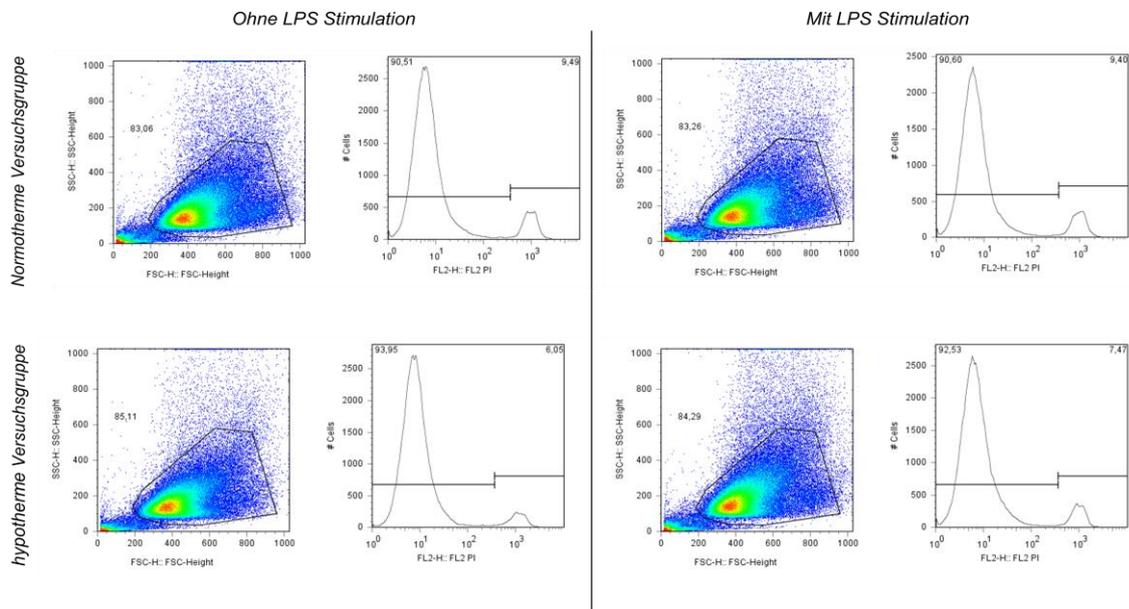


Abbildung 12: Exemplarische Darstellung der Dot Plots und der Histogramme 28 Stunden nach Versuchsbeginn. Es wurde der Anteil der PI-positiven Zellen an der Gesamtzellpopulation bestimmt.

4.3 Hypothermie und Inflammation

4.3.1 Bestimmung von Zytokinen und Chemokinen: TNF- α -, IL-6- und MCP-1-Sekretion

Die Ausschüttung der Zytokine IL-6 und TNF- α und des Chemokins MCP-1 wurde im Zellkulturüberstand mittels Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) gemessen. Die BV2-Mikrogliazellen durchliefen wie unter 3.2 beschrieben das Zeit-Temperatur-Protokoll.

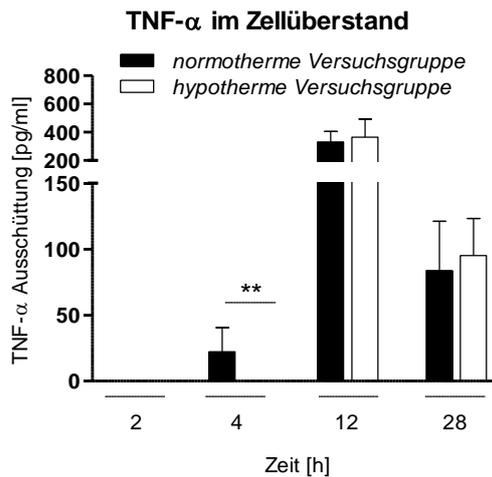
Die Sekretion von TNF- α lag zwei Stunden nach Versuchsbeginn in beiden Versuchsgruppen unter der Detektionsgrenze des ELISA Kits von 15,6 pg/mL. Vier Stunden nach Versuchsbeginn stieg die Ausschüttung von TNF- α in der ungekühlten Versuchsgruppe auf durchschnittlich $22,3 \pm 18,2$ pg/ml an. In der gekühlten Versuchsgruppe lag die Sekretion von TNF- α weiter unter der Detektionsgrenze. Nach 12 und 28 Stunden nahm die Ausschüttung von TNF- α deutlich zu. Es gab jedoch zwischen den beiden Versuchsgruppen keinen signifikanten Unterschied (Abbildung 13a).

Die in Zellkulturüberständen der BV2-Mikrogliazellen gemessene Ausschüttung des Zytokins IL-6 war in der hypothermen Versuchsgruppe (2 Stunden und 4 Stunden nach Versuchsbeginn) im Vergleich zur normothermen Versuchsgruppe signifikant reduziert. Nach zwei Stunden lag die IL-6 Sekretion in der gekühlten Versuchsgruppe unter der Detektionsgrenze von 15,6 pg/ml während sie in der normothermen Versuchsgruppe auf durchschnittlich $103,5 \pm 53,9$ pg/ml anstieg. Auch nach vier Stunden fiel der Anstieg der IL-6-Sekretion in der gekühlten Versuchsgruppe mit durchschnittlich $59,5 \pm 54,1$ pg/ml signifikant niedriger als in der normothermen Gruppe mit $247,8 \pm 176,1$ pg/ml aus (Abbildung 13). Nach 12 und 28 Stunden Beobachtungszeit verschwand der Effekt der Kühlung. Es gab keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen mehr (Abbildung 13b).

Die Ausschüttung des Chemokins MCP-1 wurde 2, 4, 6, 12 und 28 Stunden nach Versuchsbeginn im Zellkulturüberstand gemessen. Vier Stunden nach Versuchsbeginn wurde wie im Versuchsprotokoll vorgesehen das Zellkulturmedium gewechselt. Sowohl nach der Kühlungs- als auch nach der Wiedererwärmungsphase (nach 2 und 4 Stunden) gab es einen signifikanten Unterschied zwischen der normothermen und hypothermen Versuchsgruppe. Während die Ausschüttung von MCP-1 in der normothermen Versuchsgruppe nach vier Stunden auf $900,3 \pm 320,8$ pg/ml anstieg, fiel

der Anstieg in der gekühlten Versuchsgruppe mit $270,6 \pm 59,7$ pg/ml signifikant geringer aus. Dieser signifikante Unterschied blieb auch 6 und 28 Stunden nach Versuchsbeginn bestehen. Nach 12 Stunden hingegen waren keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen sichtbar (Abbildung 14).

a)



b)

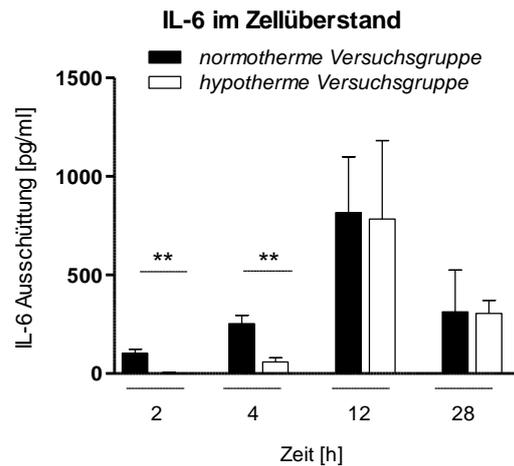


Abbildung 13: Darstellung der Ausschüttung der Zytokine TNF-α und IL-6 in pg/ml 2, 4, 12 und 28 Stunden nach Versuchsbeginn. **a)** Es gibt vier Stunden nach Versuchsbeginn einen signifikanten Unterschied zwischen der gekühlten und ungekühlten Gruppe bei der Sekretion von TNF-α (n=5; ** p < 0,01). **b)** Die IL-6 Ausschüttung ist zwei und vier Stunden nach Versuchsbeginn in der gekühlten Versuchsgruppe signifikant reduziert (n=7; ** p < 0,01)

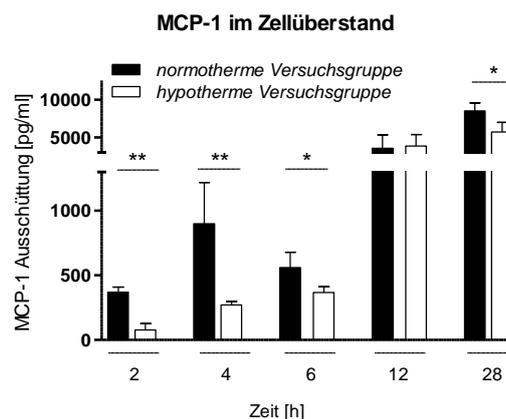


Abbildung 14: Ausschüttung von MCP-1 2, 4, 6 und 24 Stunden nach Versuchsbeginn. Nach vier Stunden erfolgte ein Wechsel des Mediums. Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen den gekühlten und ungekühlten Versuchsgruppen nach 2, 4, 6 und 28 Stunden (n=5; * p < 0,5; ** p < 0,01)

4.3.2 Bestimmung von intrazellulären Signalkaskaden

NF-κB-Komplex pp65/RelA

Zur Analyse der Auswirkungen von tiefer Hypothermie und Wiedererwärmung auf den Transkriptionsfaktor NF-κB wurde zu definierten Versuchszeitpunkten ausschließlich die Kernfraktion der BV2-Mikrogliazellen gewonnen und mittels Western Blot-Technik aufbereitet und densitometrisch ausgewertet. Als Ladekontrolle wurde ein Antikörper gegen das Nuclear Matrix Protein p84, welcher vorwiegend im Zellkern vorkommt, benutzt. Nach dem Versuchsstart wurden alle 30 Minuten Proben gewonnen. Es ist erkennbar, dass 30 Minuten nach Versuchsbeginn ein deutlicher Anstieg der phosphorylierten Form des phospho-NF-κB-Komplexes p65 in der normothermen Versuchsgruppe zu sehen ist. Dieser Anstieg fällt in der auf 17°C gekühlten Versuchsgruppe im Vergleich zur 37°C warmen Versuchsgruppe signifikant geringer aus. Zu den darauffolgenden Versuchszeitpunkten unterscheiden sich die Ergebnisse der beiden Versuchsgruppen nicht mehr signifikant voneinander (Abbildung 15).

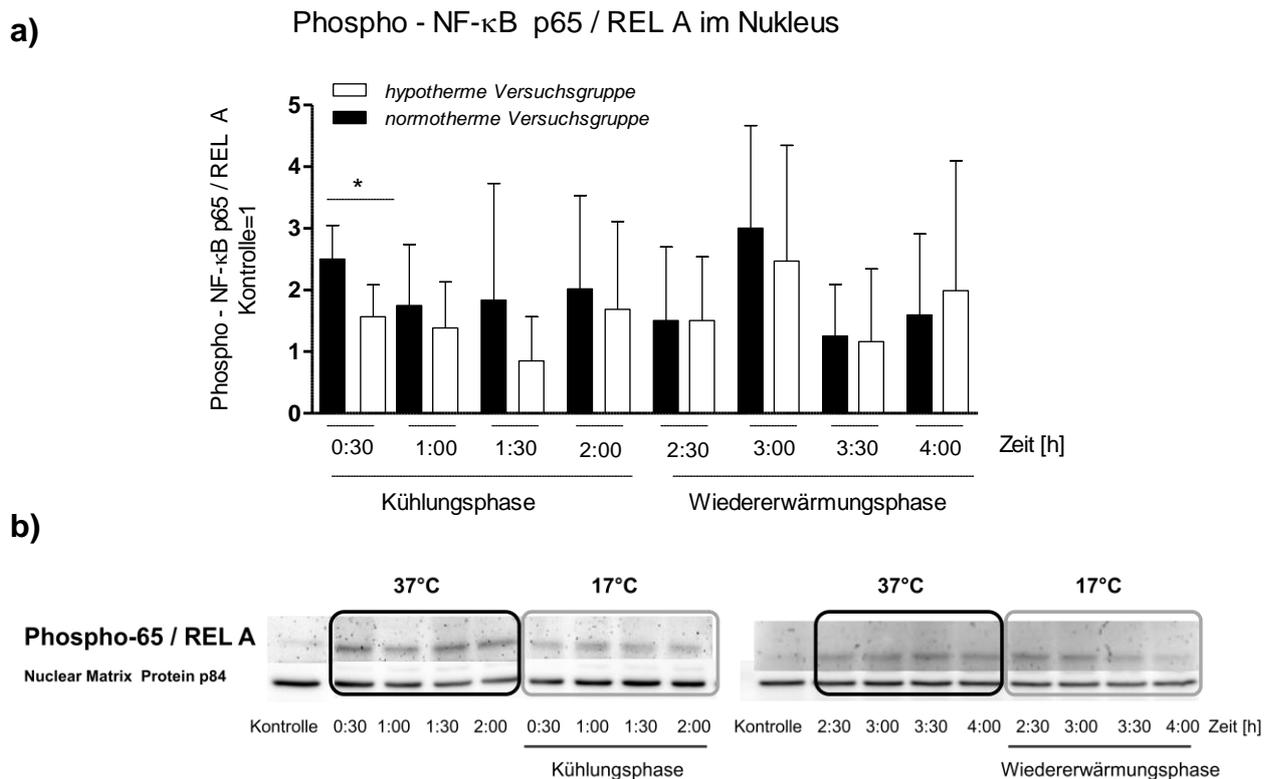
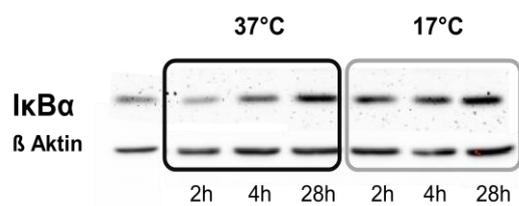


Abbildung 15: Hypothermie verzögert die Translokation von Phospho-NF-κB p65 in den Kern
a) Western Blots von Phospho-65/REL A. Nach der Stimulation der BV2-Mikrogliazellen mit LPS wurden während der Kühlungs- und Wiedererwärmungsphase alle 30 Minuten Proben gewonnen. Das Nuclear Matrix Protein p85 wurde als Ladekontrolle der Kernfraktion verwendet.
b) Densitometrische Auswertung der Western Blots. Die Ladekontrolle wurde auf den Wert 1 gesetzt. (n=5; * p <.0,05)

I κ B α -Expression

I κ B α ist ein Protein, welches die Translokation von NF- κ B in den Kern inhibiert. Die I κ B α -Proteinexpression wurde im Zytosol 2, 4 und 28 Stunden nach Versuchsbeginn mittels Western-Blot Technik untersucht. Direkt nach der Kühlungsphase auf 17°C ist ein signifikanter Unterschied zwischen der I κ B α Expression in der normothermen und der hypothermen Versuchsgruppe zu beobachten. Nach vier Stunden ist dieser Effekt nicht mehr nachweisbar. Die I κ B α -Expression liegt dann wieder auf dem Niveau der normothermen Versuchsgruppe.

a)



b)

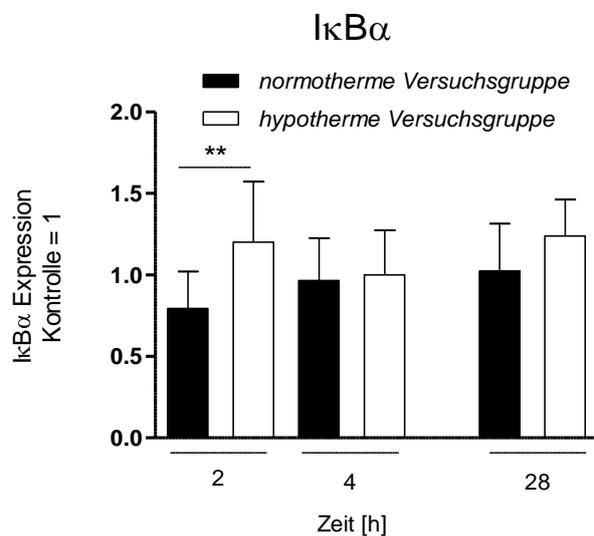


Abbildung 16: Hypothermie stabilisiert den inhibitorischen I κ B- α NF- κ B Komplex

a) Western Blot von I κ B α 2, 4 und 28 Stunden nach Versuchsstart. Die BV2-Mikrogliazellen wurden während der Kühlungs- und Wiedererwärmungsphase mit 1 μ g/ml LPS stimuliert. b) Densitometrische Auswertung der Western Blots, n=5, * p < 0,05.

Phospho-STAT3 (Thy 705)-Expression

Durch die Aktivierung der BV2-Mikrogliazellen durch LPS wird das Zytokin IL-6 ausgeschüttet und daraufhin der Transkriptionsfaktor STAT3 aktiviert und am Tyrosin phosphoryliert. Unter normothermen Versuchsbedingungen ist ein Anstieg der phosphorylierten Form in Bezug auf die nicht mit LPS stimulierte Kontrolle zu erkennen. In der auf 17°C gekühlten Versuchsgruppe bleibt dieser Anstieg aus. Erst in der Wiedererwärmungsphase steigt in der hypothermen Versuchsgruppe der Anteil der phosphorylierten Form von STAT3 an. Die Regulation von Phospho-STAT3 entspricht der Regulation von IL-6 (siehe Abbildung 13).

a)

b)

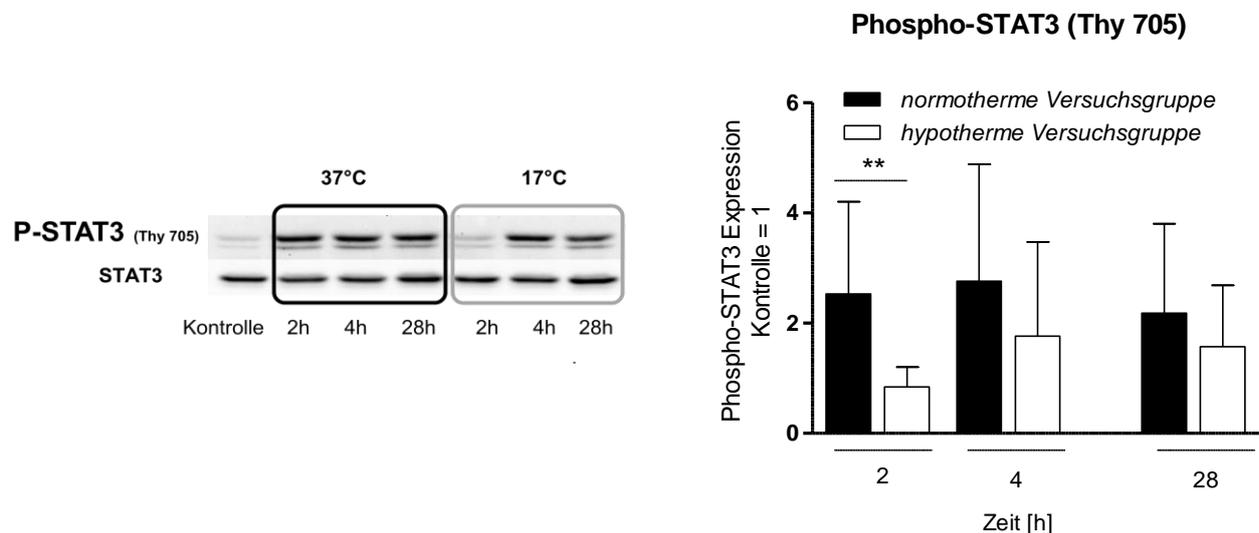
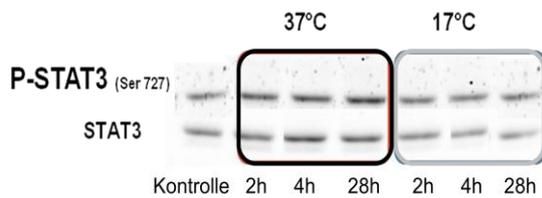


Abbildung 17: Hypothermie verhindert die Phosphorylierung von STAT3 nach LPS-Stimulation **a)** Western Blot von P-STAT3 (Thy 705) 2, 4 und 28 Stunden nach Versuchsstart. Die BV2-Mikrogliazellen wurden während der Kühlungs- und Wiedererwärmungsphase mit 1 µg/ml LPS stimuliert. Als Kontrolle dienten zu Versuchsbeginn gewonnene unstimulierte BV2-Mikrogliazellen **b)** Densitometrische Auswertung der Western Blots. Alle Versuchsproben wurden in Relation zur Kontrolle dargestellt. Die Expression von Phospho-STAT3 wurde auf die Gesamt-STAT3-Expression bezogen. Die Versuche wurden insgesamt fünfmal durchgeführt (n=5; ** p < 0,01).

Phospho-STAT3 (Ser 727)-Expression

Die Applikation von tiefer Hypothermie führte in den BV2 Mikrogliazellen zu einer signifikanten Abnahme der Expression des am Serinrest (727) phosphorylierten STAT3. Am Ende der Wiedererwärmungsphase wurde dieser Unterschied wieder aufgehoben. Am Ende des Versuches nach 28 Stunden erschien die Expression von Phospho-STAT3 in der gekühlten Versuchsgruppe vermindert. Dies war jedoch bei einem p-Wert von 0,556 nicht statistisch signifikant

a)



b)

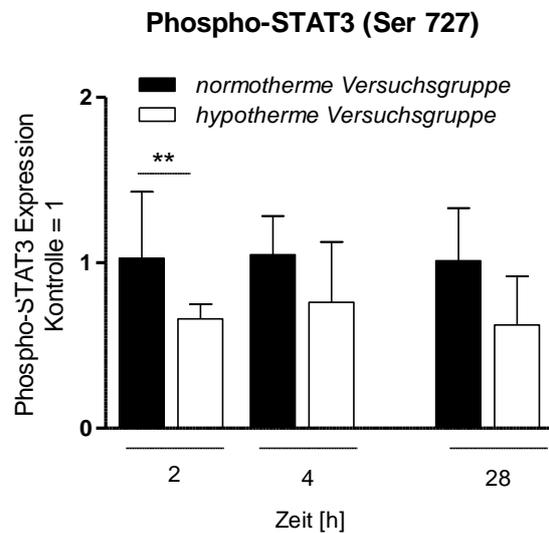


Abbildung 18: Hypothermie reduziert die Phosphorylierung von STAT3 am Serinrest.

a) Western Blot von P-STAT3 (Ser 272) 2, 4 und 28 Stunden nach Versuchsstart. Die BV2-Mikrogliazellen wurden während der Kühlungs- und Wiedererwärmungsphase mit 1µg/ml LPS stimuliert. Die Kontrolle zeigt unstimulierte BV2-Mikrogliazellen, die zu Versuchsbeginn gewonnenen wurden. **b)** Densitometrische Auswertung der Western Blots. Die Bandenintensität der mit dem Antikörper gegen Phospho-STAT3 markierten Proteine wurde durch die Bandenintensität der mit dem Antikörper gegen Gesamt-STAT3 markierten Proteine dividiert. Die Versuche wurden fünfmal durchgeführt (n=5). * p < 0,05.

4.3.3 Stickstoffmonoxid-Ausschüttung und iNOS-Expression

Die Produktion von freien Stickstoffradikalen wie Stickstoffmonoxid spielt eine Rolle bei der durch LPS induzierten Immunreaktion. Um den Einfluss von Hypothermie und Wiedererwärmung auf die Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) zu untersuchen, wurden die Expression der iNOS mittels Western Blot-Technik und die Produktion von NO mittel Griess-Assays untersucht.

Die Menge an Stickstoffmonoxid wurde im Zellkulturüberstand 4, 12 und 28 Stunden nach Versuchsbeginn analysiert. Die NO Ausschüttung wurde indirekt über die Detektion von Nitrit (NO_2^-), einem von zwei stabilen Abbauprodukten von NO, gemessen. Nach 4 Stunden lag die Nitrit-Ausschüttung in beiden Versuchsgruppen in fast allen Proben unter der Detektionsgrenze des Griess-Assays von $1,56 \mu\text{M}$. Die Ausschüttung von Nitrit war 12 Stunden nach Versuchsbeginn in der für 2 Stunden auf 17°C gekühlten Versuchsgruppe im Vergleich zur normothermen Versuchsgruppe signifikant reduziert. Nach 28 Stunden gab es zwischen der normothermen und der hypothermen Versuchsgruppe keine signifikanten Unterschiede mehr. Die Ausschüttung von NO_2^- war 28 Stunden nach Versuchsbeginn in beiden Gruppen gleich hoch (Abbildung 19).

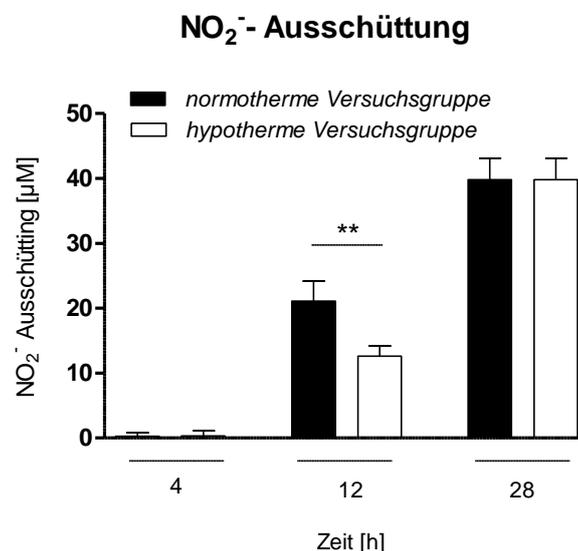
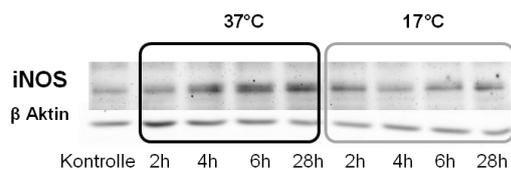


Abbildung 19: Darstellung der Stickstoffmonoxidausschüttung 4, 12 und 28 Stunden nach Versuchsbeginn. Nach einer vierstündigen Stimulation mit LPS lag die Stickstoffmonoxidausschüttung nur knapp über dem Detektionslevel des verwendeten Nachweiskits. Es waren keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen sichtbar. Nach 12 Stunden kam es zu einem Anstieg des Stickstoffmonoxids. Der Anstieg fiel in der auf 17°C gekühlten und wiedererwärmten Gruppe signifikant geringer aus. Nach 28 Stunden ließ sich kein Unterschied mehr zwischen den Versuchsgruppen feststellen ($n=5$; $** p < 0,01$)

Über eine durch LPS vermittelte de novo-Synthese von iNOS wird die Ausschüttung von Stickstoffmonoxid induziert. In der Kontrollgruppe, die nicht mit LPS stimuliert wurde, war zu erkennen, dass die basale iNOS Expression wie erwartet sehr niedrig war. Nach einer Stimulation mit LPS wurde die Expression von iNOS hochreguliert. In Analogie zur NO_2^- -Sekretion kam es am Ende der Wiedererwärmungsphase und sechs Stunden nach Versuchsstart in der hypothermen Versuchsgruppe zu einem signifikant geringeren Anstieg der iNOS-Expression. Nach 28 Stunden Beobachtungszeit war die Expression von iNOS in der nicht gekühlten Gruppe wieder herabreguliert, sodass kein Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen beobachtet wurde (Abbildung 20).

a)



b)

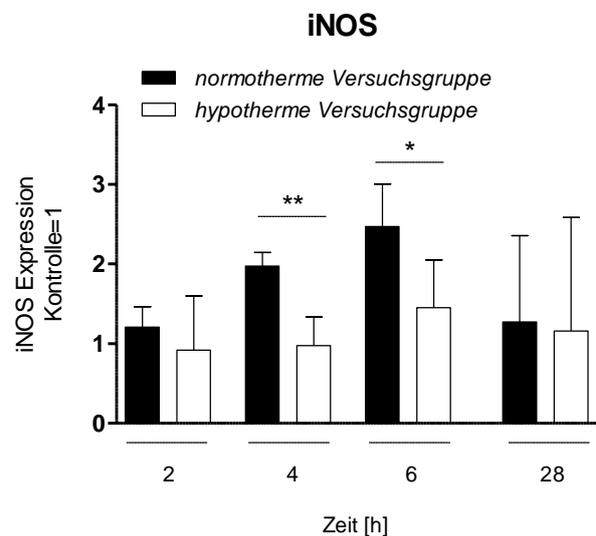


Abbildung 20: Auswirkungen der Hypothermie und Wiedererwärmung auf die iNOS-Expression. **a)** Es wurden Proteinproben der BV2-Mikrogliazellen 2, 4, 6 und 28 Stunden nach Versuchsstart mittels Western Blot-Technik analysiert. Als Kontrolle dienten unstimulierte BV2-Mikrogliazellen. Die Bande für iNOS wurde auf einer Höhe von 131 kDa detektiert. **b)** Densitometrische Analyse und Auswertung der iNOS-Proteinexpression (n=6; * p < 0,05).

4.4 Hypothermie und Migration

4.4.1 Analyse des migrationsrelevanten Oberflächenmoleküls ICAM-1

Die Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 wurde mittels FACS-Analyse gemessen. Die BV2-Mikrogliazellen wurden direkt nach der Kühlungs- und Wiedererwärmungsphase und nach 28 Stunden Beobachtungszeit auf die Expression von ICAM-1 untersucht. Die Stimulation mit LPS führt zu einer verstärkten Expression von ICAM-1. Die Kühlung hatte keinen statistisch signifikanten Einfluss auf die ICAM-1-Expression (Abbildung 21).

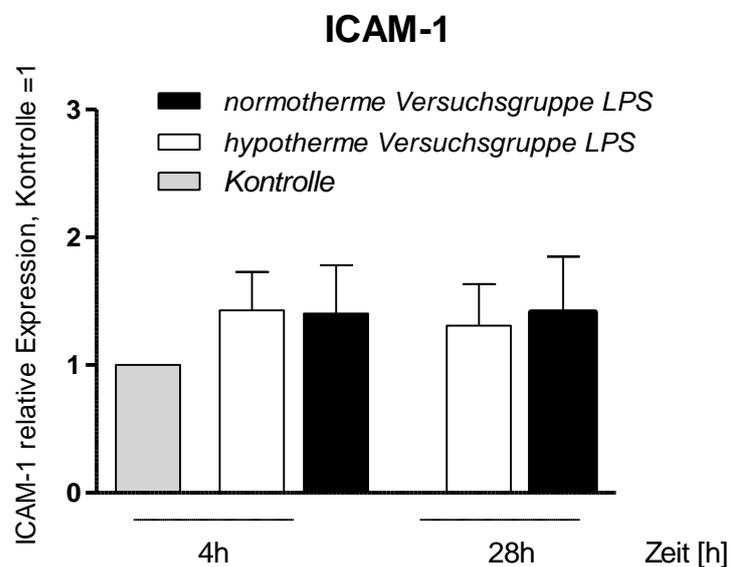
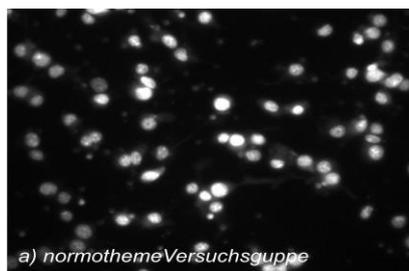


Abbildung 21: Relative ICAM-1-Expression der mit LPS stimulierten BV2- Mikrogliazellen in Bezug auf die unstimulierte Kontrolle 4 und 28 Stunden nach Versuchsbeginn (n=3)

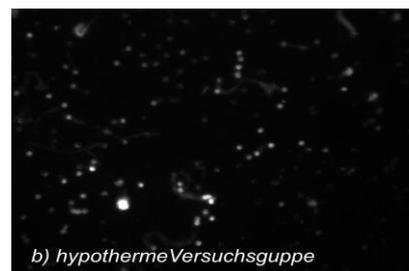
4.4.2 Migrationsassay

Die BV2-Mikrogliazellen wurden in einem Transwell-System ausplattiert und durchliefen das Zeit-Temperatur-Protokoll, jedoch ohne die Zugabe von LPS. Stattdessen erfolgte eine Stimulation mit 1 mmol/l ADP für die nachfolgenden 28 Stunden. Zur Quantifizierung der über die Membran migrierten BV2-Mikrogliazellen wurden die Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) angefärbt, fotodokumentiert und anschließend ausgezählt. Es war deutlich zu erkennen, dass die BV2-Mikrogliazellen nach der Kühlung auf 17°C und darauffolgender Wiedererwärmung ein anderes Migrationsverhalten als unter normothermen Versuchsbedingungen zeigten. In der hypothermen Versuchsgruppe waren weniger Zellen in der Lage, über die Membran zu migrieren als in der normothermen Kontrollgruppe. Dieser Unterschied war jedoch bei einem p-Wert von 0,068 nur als Trend zu werten.

a)



b)



c)

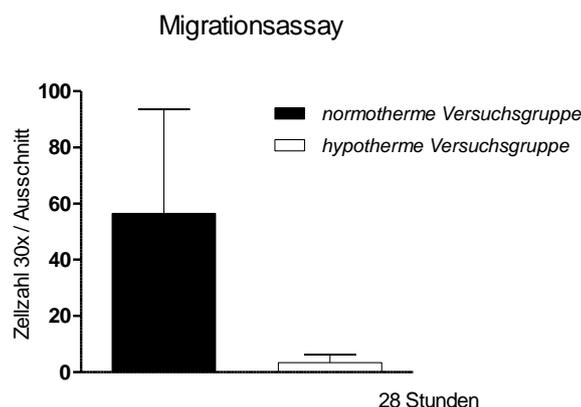


Abbildung 22: Migrationsassay der BV2-Mikrogliazellen 28 Stunden nach Versuchsbeginn. **a + b)** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (30-fache Vergrößerung) der mit DAPI angefärbten BV2-Mikrogliazellen **a)** Aufnahme der normothermen Kontrollgruppe. **b)** Aufnahme der hypothermen Versuchsgruppe. **c)** Graphische Darstellung des Migrationsverhaltens. In der normothermen Versuchsgruppe migrierten im Mittel $56,5 \pm 21,4$ und in der hypothermen Versuchsgruppe durchschnittlich $3,4 \pm 1,6$ Zellen durch die Membran. Die Versuche wurden dreimal durchgeführt ($n=3$) und pro Versuch wurden in zehn Gesichtsfeldausschnitten die Zellen von zwei verblindeten Untersuchern ausgezählt.

4.5 Interventionstrategie: Stattic (Stat3 inhibitory compound)

Um die Rolle von STAT3 (Tyr705) auf die IL-6- und TNF α -Ausschüttung zu untersuchen, wurden die BV2-Mikrogliazellen für vier Stunden mit verschiedenen Konzentrationen des STAT3 (Tyr705)-Inhibitors Stattic behandelt. Bevor die Effekte der Inhibition von STAT3 auf die Ausschüttung von IL-6 und TNF α analysiert werden konnten, wurde ein Zytotoxizitätsassay mit Stattic durchgeführt. Hierbei sollten in verschiedenen Versuchsreihen zelltoxische Konzentration von Stattic ermittelt werden. Dazu wurden die Proben mit unterschiedlichen Konzentrationen Stattic (40-1,25 μ M) behandelt. Nach 28 Stunden wurde ab einer Stattic Konzentration von 10 μ M eine signifikante Reduktion der mitochondrialen Aktivität der BV2-Mikrogliazellen belegt (Abbildung 23). Daher wurden für die nachfolgenden Versuche Stattic-Konzentrationen von 1,25 – 5 μ M gewählt.

Zytotoxizitätsreihe von Stattic nach 28 Stunden

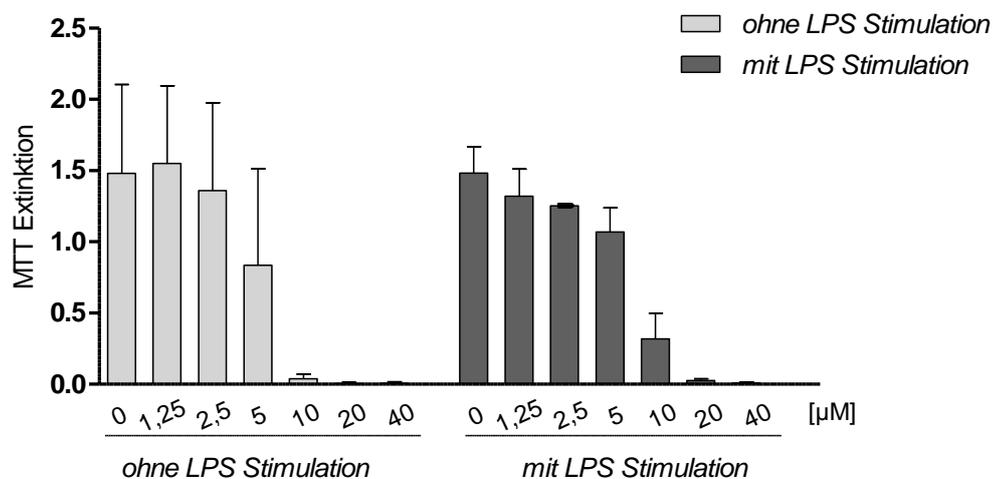


Abbildung 23: Zytotoxizitätsreihe von Stattic mit BV2-Mikrogliazellen. Stattic wurde in unterschiedlichen Konzentrationen (40 - 1,25 μ M) für insgesamt 4 Stunden auf den Zellen belassen. Nach 28 Stunden wurde die mitochondriale Zellaktivität mit dem MTT-Test gemessen. Der Versuch erfolgte bei 37°C. Dargestellt ist die mittels MTT-Test gemessene Extinktion ohne und mit Stimulation (1 μ g/ml LPS). Die Versuche wurden mindestens 3 Mal durchgeführt (n=3).

4.5.1 Stattic und IL-6-Ausschüttung

Interleukin 6 ist ein pro-inflammatorisches Zytokin, welches nach einer LPS Stimulation von Mikrogliazellen ausgeschüttet wird. Nach einem kardiochirurgischen Eingriff mit einer Herz-Lungen-Maschine steigt IL-6 in Folge einer durch den kardiopulmonalen Bypass getriggerten systemischen Inflammationsreaktion an. Tiefe Hypothermie vermindert die IL-6-Sekretion signifikant. Nach einem Eingriff unter dem Einsatz einer Herz-Lungen-Maschine können schwerwiegende Komplikationen auftreten, die teilweise als Nebenwirkung der Hypothermie interpretiert werden [10-12, 106]. Daher wurden die BV2-Mikrogliazellen nach einer Stimulation mit LPS anstelle einer tiefen Kühlung mit dem STAT3-Inhibitor Stattic (Stat three inhibitory compound) behandelt. Stattic hemmt die Phosphorylierung und Dimerisierung von STAT3 über eine Bindung an die SH2-Domänen. Durch die Inhibition von STAT3 konnte die Ausschüttung von IL-6 4 Stunden nach Versuchsbeginn bei einer Stattic-Konzentration von 1,25 und 2,5 μM auf das Niveau der gekühlten und wiedererwärmten Versuchsgruppe gesenkt werden. Eine Stattic-Konzentration von 5 μM führte sogar zu einer signifikant geringeren IL-6 Ausschüttung ($9,8 \pm 15,4$ pg/ml) als unter Kühlung und Wiedererwärmung ($59,5 \pm 54,1$ pg/ml) (Abbildung 24). Die Inkubationszeit mit Stattic betrug 4 Stunden. Daran schloss sich eine Nachbeobachtungszeit von 24 Stunden an. In der mit 5 μM Stattic behandelten Versuchsgruppe blieb die IL-6-Ausschüttung auch in der Nachbeobachtungszeit signifikant reduziert im Vergleich zur normothermen Kontrollgruppe ($182,8 \pm 124$ vs. $400,5 \pm 186,6$ pg/ml) (Abbildung 26). Wie bereits in Abbildung 13 gezeigt, gibt es nach einer Nachbeobachtungszeit von 24 Stunden zwischen der Kontrollgruppe (37°C) und der gekühlten Gruppe (17°C) keinen statistisch signifikanten Unterschied.

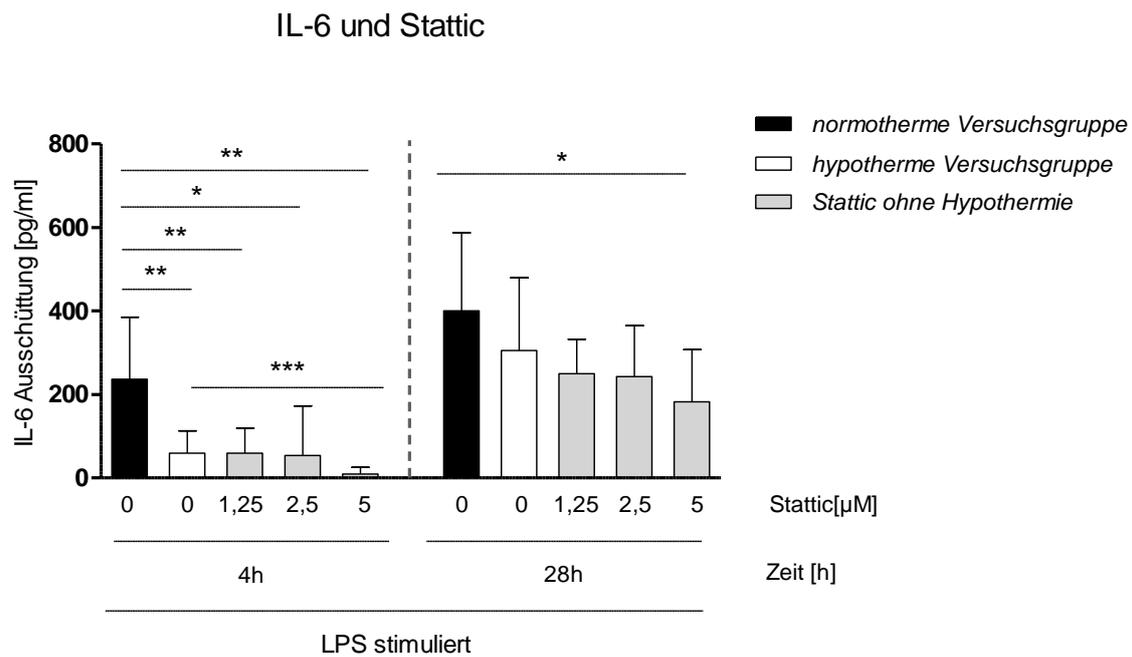


Abbildung 24: Darstellung der Auswirkungen verschiedener Konzentrationen des STAT3-Inhibitors Static auf die Ausschüttung von IL-6 in BV2-Mikrogliazellen 4 Stunden und 28 Stunden nach Versuchsbeginn. Während der LPS-Stimulation wurden die Zellen für 4 Stunden mit 5, 2,5 und 1,25 μM Static behandelt und danach für 24 Stunden nachbeobachtet. Die Versuche wurden mindestens sechs Mal durchgeführt ($n=6$; *** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,1$)

4.5.2 Static und TNF- α -Ausschüttung

TNF- α ist ein pro-inflammatorisches Zytokin, welches im Rahmen einer Operation am kardiopulmonalen Bypass vermehrt ausgeschüttet wird. In Abbildung 13 konnte gezeigt werden, dass durch tiefe Hypothermie und Wiedererwärmung die TN- α -Sekretion signifikant gesenkt werden kann. In Analogie zur IL-6-Ausschüttung wurde auch die TNF- α -Sekretion mittels ELISA nach der Applikation von Static analysiert. Hierbei konnte gezeigt werden, dass nach 4 Stunden die TNF- α -Ausschüttung in den mit 1,25 und 2,5 μM behandelten Versuchsgruppen auf das Niveau der gekühlten und wiedererwärmten Gruppe gesenkt werden konnte. In Analogie zu den Resultaten des IL-6-ELISAs wurde auch die TNF- α -Sekretion durch die Applikation von 5 μM Static signifikant sogar noch unter das Niveau der gekühlten und wiedererwärmten Versuchsgruppe gesenkt (0 ± 0 vs. $10,8 \pm 17,9$ pg/ml) (siehe Abbildung 25).

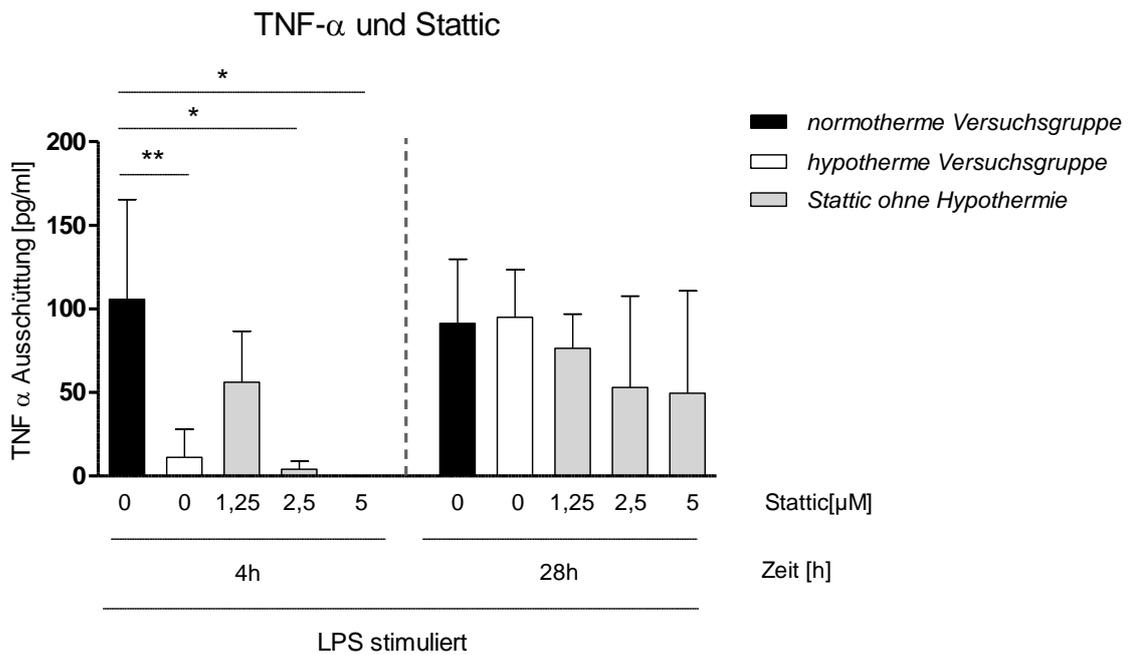


Abbildung 25: Darstellung der Auswirkungen verschiedener Konzentrationen des STAT3-Inhibitors Stattic auf die Ausschüttung von TNF- α in BV2-Mikrogliazellen 4 Stunden und 28 Stunden nach Versuchsbeginn. Während der LPS-Stimulation wurden die Zellen für 4 Stunden mit 5, 2,5 und 1,25 μ M Stattic behandelt und danach für 24 Stunden nachbeobachtet. Die Versuche wurden mindestens vier Mal durchgeführt (n=4; **p < 0,01; * p < 0,1)

5 Diskussion

Operationen im tief hypothermen Herz-Kreislaufstillstand können nur mit Hilfe einer Herz-Lungen-Maschine durchgeführt werden. Besonders in der Kinderherzchirurgie wird auf die tiefe Hypothermie zum Schutz des noch unreifen Gehirns zurückgegriffen [1-4]. Dabei besteht postoperativ ein erhebliches Risiko für das Auftreten eines durch den kardiopulmonalen Bypass ausgelösten systemisch inflammatorischen responsiven Syndroms (SIRS). Die Ursachen des SIRS sind vielfältig und zum einen *extrinsischer* (z.B. Kontaktaktivierung des Blutes durch die Fremdoberflächen des extrakorporalen Kreislaufes) zum anderen *intrinsischer* (z.B. Ischämie/Reperfusionsschaden, Endotoxinämie, Kapillarleck) Natur [13, 14].

Vor diesem klinischen Hintergrund wurde in der vorliegenden Arbeit ein Zell-Kultur-Modell, bestehend aus immunkompetenten Mikrogliazellen, entwickelt, welches die Auswirkungen von tiefer Hypothermie und Wiedererwärmung in Zusammenhang mit einer Inflammationsreaktion untersuchen sollte. Dazu wurden murine BV2-Mikrogliazellen verwendet, die ähnliche Eigenschaften wie primäre Mikrogliazellen aufzeigen und in Zellkulturstudien häufig benutzt werden und etabliert sind [107-110]. Durch eine Stimulation mit LPS sollte im Zell-Kultur-Modell die durch den kardiopulmonalen Bypass ausgelöste Endotoxinämie, die hauptsächlich durch gram-negative Bakterien verursacht wird, simuliert werden [13, 14]. Die LPS-Stimulation kann somit nur einen Aspekt der komplexen Inflammationsreaktion imitieren und erlaubt keine Rückschlüsse, sondern nur Hinweise auf die deutlich komplexere Situation *in vivo*. Vor dem Hintergrund des kardiopulmonalen Bypasses wurde ein Zeit-Temperatur-Protokoll etabliert, welches eine zweistündige Kühlungsphase mit einer anschließenden Wiedererwärmungsphase vorsah (siehe Abbildung 6).

5.1 Hypothermie und morphologische Veränderungen

Ausgehend von Georg Kreutzberg, der bereits 1996 einen Zusammenhang zwischen der Zellmorphologie und dem Funktionszustand der Mikrogliazellen aufzeigen konnte, wurden die BV2-Mikrogliazellen immunochemisch angefärbt [111]. Dabei zeigte sich, dass bereits die alleinige Kühlung auf 17°C ohne Stimulation mit LPS zu einer Veränderung der Zellform führte (Abbildung 7). Kreutzberg deutet eine Transformation der Zellmorphologie von ramifiziert in amöboid als Änderung von ruhend zu aktiviert. Auch Beynon und Walker beschreiben, dass unter physiologischen Bedingungen die

Mikrogliazellen eine eher ramifizierte Zellmorphologie zeigen und dass sich die Zellmorphologie nach einem Stimulus über eine Verkürzung der Zellausläufer rasch ändern und in einer amöboiden Zellform resultieren kann [112]. In dem hier vorgestellten *in vitro*-Modell konnte gezeigt werden, dass tiefe Kühlung einen direkten Einfluss auf die BV2-Mikrogliazellform hatte (Abbildung 7). Es ist somit anzunehmen, dass sich die tiefe Kühlung auf das Funktionsprofil der Zellen auswirkt. Unter dem Einfluss von tiefer Hypothermie nahmen die BV2-Mikrogliazellen eine amöboide Zellform an. Diese Ergebnisse stimmen mit Diestel et al. und Schmitt et al. überein. Auch sie konnten morphologische Veränderungen unter hypothermen Versuchsbedingungen sowohl an BV2-Mikrogliazellen als auch an primären Mikrogliazellen nachweisen [113, 114]. Das von Diestel et al. etablierte Zeit-Temperatur-Protokoll sah eine Kühlung auf 20°C für 20 Minuten vor. Die Zellmorphologie wurde mittels Zeitraffer-Videomikroskopie dargestellt und auch nach einer im Vergleich kurzen Kühlungsdauer konnte gezeigt werden, dass sich die Zellen bei 20°C abrunden. Schmitt et al. wählten eine Kühlungsdauer von 30 Stunden bei 30°C. Insgesamt lässt sich festhalten, dass Hypothermie (17°C, 20°C und 30°C) im Zell-Kultur-Modell zu morphologischen Veränderungen von Mikrogliazellen führt, die einer Änderung des Funktionszustandes entsprechen.

5.2 Hypothermie hat keinen Einfluss auf die Zellvitalität

Tiefe Hypothermie beeinflusste nicht die mittels MTT-Assay gemessene Vitalität der BV2-Mikrogliazellen. Sowohl in der mit LPS stimulierten als auch in der unstimulierten Versuchsgruppe hatte die Hypothermie keinen Einfluss auf die mitochondriale Aktivität (siehe Abbildung 8 und 9). Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung zu Diestel et al., die auch keine Unterschiede in der mitochondrialen Aktivität sowohl von BV2-Mikrogliazellen als auch von primären Mikrogliazellen nachweisen konnten. Allerdings unterscheidet sich das von Diestel et al. verwendete Zeit-Temperatur-Protokoll von dem in dieser Arbeit verwendeten (Abbildung 6) dahingehend, dass die Zellen innerhalb von 60 Minuten auf 20°C gekühlt, für 20 Minuten bei 20°C belassen und innerhalb von 60 Minuten auf 37°C wiedererwärmt wurden. Zusätzlich konnten Seo et al. zeigen, dass auch eine Dauerkühlung für 24 Stunden auf 29°C keinen Einfluss auf die Zellvitalität hat [115].

Der MTT-Assay misst die mitochondriale Aktivität der Zellen und ist somit nur eine indirekte Methode zu Messung der Zellvitalität. [116]. Daher wurden in der hier vorliegenden Arbeit die durch die MTT-Analyse gewonnenen Ergebnisse mit einer weiteren Methode verifiziert. Die BV2-Mikrogliazellen wurden daher zusätzlich mit Propidiumiodid (PI) und Annexin V angefärbt und durchflusszytometrisch analysiert (siehe 4.2.2). Der Beginn der Apoptose ist durch Veränderungen an der Integrität der Zellmembran gekennzeichnet. So kommt es zu einer Translokation des auf der zytosolischen Seite der Membran verankerten Phospholipids Phosphatidylserin auf die Außenseite der Membran. Annexin V ist ein phospholipid-bindendes Protein mit einer hohen Affinität zu Phosphatidylserin. Das an das Fluoreszin FITC gekoppelte Annexin V konnte durchflusszytometrisch detektiert werden. PI ist ein in die DNA interkalierender Farbstoff und kann die DNA anfärben, sobald die Zellmembran durchlässig wird [117]. Auch durchflusszytometrisch konnte gezeigt werden, dass tiefe Hypothermie keinen Einfluss auf das Zellüberleben hat (siehe Abbildung 10). Weder nach vier noch nach 28 Stunden unterschieden sich die Versuchsgruppen hinsichtlich ihrer gemessenen Fluoreszenzintensität. Der Anteil der apoptotischen Annexin V-positiven Zellen (FITC⁺/PI⁺) an der Gesamtpopulation lag in allen Versuchsgruppen unter 2%.

5.3 Hypothermie und die Inflammationsreaktion : IL-6, TNF- α und MCP-1

In verschiedenen klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass Operationen in Hypothermie am kardiopulmonalem Bypass zu einer Aktivierung des Immunsystems führen [118, 119]. Ausgehend von diesen klinischen Studien wurden im Zell-Kultur-Modell die auch im menschlichen Organismus relevanten Zytokine IL-6 und TNF- α und das Chemokin MCP-1 gemessen.

Interleukin 6 ist ein pleiotropes Zytokin, welches eine Vielzahl von zellulären Funktionen erfüllt und in der frühen Phase der Immunantwort ausgeschüttet wird [66]. In Versuchen mit primären Mikrogliazellen konnten Maekawa et al. zeigen, dass die IL-6-Sekretion nach einer Stimulation mit LPS bereits bei 30°C signifikant verringert wurde [44]. Die Arbeitsgruppe untersuchte jedoch nicht die Effekte der Wiedererwärmung auf die IL-6-Sekretion. Auch in einem murinen Hirnschnittmodell wurde von Yanagawa et al. nach einer Schädigung ein Anstieg von IL-6 nachgewiesen, der durch milde Hypothermie

abgeschwächt wurde [120]. Auch diese Arbeitsgruppe zeigte nur die Effekte der Kühlung und nicht der Wiedererwärmung.

Durch die Etablierung einer Wiedererwärmungsphase in dem hier vorgestellten Projekt konnten die beschriebenen Forschungsergebnisse auf für die Klinik relevante Aspekte der Wiedererwärmung ergänzt werden. Es wurde gezeigt, dass auch nach der Wiedererwärmung die IL-6-Sekretion signifikant abgeschwächt bleibt (siehe Abbildung 13b). Dieser Effekt verschwand jedoch nach 28 Stunden. Dies könnte zum einen mit der hohen Proliferationsrate der BV2-Mikrogliazellen und zum anderen auch damit erklärt werden, dass die Kühlung nur einen kurzzeitigen Effekt auf die Zellen ausübt. Die Vermutung, dass durch tiefe Kühlung keine Langzeiteffekte *in vitro* erkennbar sind, konnte durch Schmitt et al. bestätigt werden. Die Arbeitsgruppe analysierte die IL-6-Ausschüttung in murinen hippocampalen Hirnschnitten, die ähnlich wie in dem hier vorgestellten Zeit-Temperatur-Protokoll behandelt wurden. Auch sie sahen keine Unterschiede zwischen den gekühlten und ungekühlten Versuchsgruppen nach 24 Stunden [48]. Zur Verbesserung des Verständnisses der Rolle von IL-6 unter Hypothermie sind jedoch weitere Untersuchungen vor allem in *in vivo* Modellen notwendig.

TNF- α besitzt wie IL-6 ein sehr breites Wirkungsspektrum. Erhöhte Werte des Zytokins werden unter anderem mit verschiedenen neurologischen Erkrankungen wie Multipler Sklerose und dem Morbus Parkinson in Zusammenhang gebracht [121]. Sriram et al. gehen davon aus, dass TNF- α eine duale Rolle erfüllt und je nach Gehirnregion sowohl neuroprotektiv als auch neurotoxisch wirken kann.

Es konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass tiefe Hypothermie die TNF- α -Sekretion nach der Wiedererwärmungsphase signifikant vermindert (siehe 4.3.1). Die Unterschiede verschwanden jedoch, genau wie bei der IL-6 Ausschüttung, nach 28 Stunden (siehe Abbildung 13b). Dies deckt sich mit Ergebnissen von Maekawa et al., die primäre Mikrogliazellen mit LPS stimulierten und bei 30°C dauerhaft kühlten. Auch sie sahen, dass unter Kühlung die TNF- α -Ausschüttung kurzfristig (nach sechs Stunden) abnahm, sich dann aber wieder an die normotherme Versuchsgruppe anglich [44]. Dieselben Ergebnisse konnten Seo et al. auf mRNA-Ebene bei einer Kühlung auf 29°C untermauern [115].

In einem von Han et al. etablierten Tiermodell, in dem Ratten nach einer transienten Ischämie durch eine Okklusion der A. cerebri media bis zu 24 Stunden auf 33°C gekühlt wurden, war die TNF- α -Expression auf mRNA-Ebene signifikant reduziert [122]. Ein

möglicher Signalweg, über den das von Mikrogliazellen sezernierte TNF- α Neurone schädigt, wurde von Taylor et al. beschrieben [123]. Die Stimulation des mikroglialen mGlu2-Rezeptors führte zur Ausschüttung von TNF- α , welches in Neuronen über eine Caspase-3-Aktivierung zur Apoptose führte. Das lässt vermuten, dass tiefe Hypothermie im Zell-Kultur-Modell durch die Abschwächung der TNF- α -Ausschüttung zur Neuroprotektion beiträgt.

MCP-1 ist an der Koordination der Leukozytenmigration beteiligt und wurde im Rahmen dieser Arbeit von den BV2-Mikrogliazellen durch Hypothermie signifikant vermindert sezerniert (siehe 4.3.1). Dies bestätigten auch Versuche von Diestel et al., die bei einer Kühlung auf 20°C mit primären Mikrogliazellen zu vergleichbaren Ergebnissen gelangten [113].

Zusammenfassend konnten in den durchgeführten Versuchen eine durch Hypothermie induzierte Reduktion von pro-inflammatorischen Zytokinen und dem Chemokin MCP-1 gezeigt werden.

5.4 Einfluss der Hypothermie auf Schlüsselproteine der Inflammationsreaktion

5.4.1 Transkriptionsfaktor NF- κ B

Der Transkriptionsfaktor NF- κ B steht im Zentrum der Inflammationskaskade. Die Effekte von tiefer Hypothermie und Wiedererwärmung auf die Aktivierung von NF- κ B sind weitestgehend unklar, während die Effekte von moderater Hypothermie auf die Aktivierung von NF- κ B bereits in *in vitro*- und *in vivo*-Modellen, teils jedoch mit widersprüchlichen Ergebnissen, untersucht wurden [108, 122, 124].

NF- κ B ist ein Heterodimer, welches aus der p65/REL A- und der p50/NF- κ B-Untereinheit besteht, nach einer Stimulation mit LPS in den Zellkern migriert und dort zur Transkription von an der Inflammationsreaktion beteiligten Genen führt. [54]. Die p65/Rel A-Untereinheit kann außerdem an Ser536 phosphoryliert werden, was zu einer Verstärkung der transkriptionellen Aktivität führt [58, 125, 126]. NF- κ B wird in Homöostase durch I κ B α an der Translokation in den Zellkern gehindert. Eine Degradierung von I κ B α führt zur Aktivierung des Translokationssignals von NF- κ B.

In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass tiefe Kühlung *in vitro* die Proteinexpression von phospho-NF- κ B p65/REL A im Kern 30 Minuten nach

Versuchsbeginn signifikant reduzierte (Abbildung 15). Somit verzögerte tiefe Hypothermie die durch die Stimulation mit LPS ausgelöste Translokation von NF- κ B in den Kern. Die zeitversetzte Aktivierung von NF- κ B könnte für kurzfristige neuroprotektive Effekte der tiefen Kühlung verantwortlich sein. Dennoch muss beachtet werden, dass die Translokation von NF- κ B in den Kern nur verzögert wurde und dieser Effekt bereits nach einer Stunde wieder aufgehoben war.

Auch die Tiefe der Kühlung scheint einen Einfluss auf die NF- κ B-Translokation zu haben, da Gibbons et al. zeigen konnten, dass moderate Hypothermie (33°C) in BV2-Mikrogliazellen nicht zu einer verminderten NF- κ B Aktivierung führte [108]. In Versuchen mit primären Mikrogliazellen, die auf 33°C gekühlt wurden, konnte jedoch eine durch Hypothermie verringerte NF- κ B-Aktivität im Zellkern nachgewiesen werden, obwohl die regulatorischen NF- κ B-Proteine (IKK, I κ B α) nicht durch Hypothermie reguliert wurden [124]. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu Fairchild et al., die in einer Makrophagen-Zelllinie nachweisen konnten, dass die Protein-Expression von NF- κ B p65/RELA nach einer Stimulation mit LPS und einer Kühlung auf 28°C und 32°C im Zellkern sogar erhöht war [127]. Sie zeigten, dass zwei Stunden nach Beginn der Kühlung die NF- κ B p65/RELA-Expression in den hypothermen Versuchsgruppen verstärkt wurde, während sie in den normothermen Versuchsgruppen wieder sank. Dieser Effekt wurde von Fairchild et al. mit einer verzögerten Re-Expression von I κ B α unter hypothermen Versuchsbedingungen in Zusammenhang gebracht. In einem *in vivo*-Mausmodell für fokale zerebrale Ischämie konnten Han et al. zeigen, dass milde Hypothermie (33°C) die NF- κ B p65/RELA-Expression im Kern verringert [122]. Diese kontroversen Beobachtungen lassen sich am ehesten durch die verschiedenen Zellkultur- bzw. Tiermodelle begründen, die jeweils in den Versuchen von Gibbons et al., Fairchild et al., Webster et al. und Han et al. zum Einsatz kamen [108, 122, 124, 127].

In Folge der Aktivierung von NF- κ B werden auch gleichzeitig inhibitorische Proteine aktiviert, um einer überschießenden NF- κ B-Aktivierung vorzubeugen. I κ B α , welches NF- κ B responsive elements in der Promotorregion besitzt, wird nach einer NF- κ B-Hochregulation verstärkt transkribiert [128]. Tiefe Hypothermie scheint diesen Effekt in BV2-Mikrogliazellen zu verstärken, da die Kühlung zu einem Anstieg des Gesamt-I κ B α im Zytosol führte (Abbildung 16). Nach der Wiedererwärmungsphase sank die zytosolische I κ B α -Expression jedoch wieder auf Basalwerte. Durch die Wiedererwärmung wurden die anti-inflammatorischen Effekte der Kühlung wieder

aufgehoben. Interessant ist somit, dass tiefe Kühlung nicht nur hemmenden Einfluss auf intrazelluläre Signalkaskaden hat, sondern durchaus auch zur Induktion von Proteinen führen kann, wie es bereits für die Kälteschockproteinen RBM3 und CIRP bekannt ist [51]. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu Diestel et al., die keine verstärkte Expression von I κ B α nach einer Kühlungsphase von 20 Minuten auf 20°C in BV2-Mikrogliazellen feststellen konnten [113]. Der Effekt von tiefer Hypothermie auf die transkriptionelle Induktion von I κ B α scheint von der Dauer der Kühlung abhängig zu sein.

Zusammengefasst führt tiefe Kühlung zu einer verzögerten Translokation von phospho-NF- κ B p65/REL A in den Zellkern und zu einer Verstärkung der Proteinexpression von I κ B α im Zytosol. Dieser Mechanismus liefert eine mögliche Erklärung für die Mikrogliazell-vermittelte neuroprotektive Wirkung, die unter Hypothermie beobachtet wurde.

5.4.2 Transkriptionsfaktor STAT3

Der JAK2/STAT3-Signalweg spielt eine wichtige Rolle bei der Mikrogliaaktivierung [129, 130]. Interleukin 6, welches nach Operationen am kardiopulmonalen Bypass vermehrt ausgeschüttet wird [131], aktiviert den JAK/STAT-Signalweg über den gp130-Rezeptor [68, 131]. Eine Aktivierung des gp130-Rezeptors führt zur Phosphorylierung von JAK2 und anschließend zur Phosphorylierung und Dimerisierung von STAT3. Das Phospho-STAT3-Dimer kann daraufhin in den Kern wandern und induziert dort die Transkription von verschiedenen an der Inflammationsantwort beteiligten Gene [68]. Hierbei kann STAT3 je nach Zell- und Gewebetyp entweder anti-inflammatorische Signalkaskaden (IL-10, SOCS3) oder pro-inflammatorische Signalkaskaden (IL-6, IL 1 β) initiieren [132, 133].

In Tierversuchen mit Ratten, bei denen durch die Ligatur der A. cerebri media eine Ischämie ausgelöst wurde, konnten außerdem die neurotoxischen Auswirkungen einer vermehrten Phosphorylierung von STAT3 gezeigt werden, da eine Blockade dieses Signalweges zu einem signifikant kleineren Infarktvolume sowie weniger Apoptose und neurologischen Defiziten führte. Die in diesem Zusammenhang untersuchte Phosphorylierung von STAT3 konnte interessanterweise vorwiegend in Mikrogliazellen nachgewiesen werden [134]. Diese Arbeit von Satriotomo et al. verdeutlicht, dass Mikrogliazellen an der nach einem Ischämieereignis auftretenden Schädigung beteiligt

sind. Bisher gibt es keine Arbeiten, die den Effekt von tiefer Hypothermie auf eine STAT3- und somit Mikrogliazellaktivierung untersucht haben.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass tiefe Hypothermie die durch LPS induzierte und über IL-6 vermittelte Phosphorylierung von STAT3 auf das Niveau der nicht LPS-stimulierten Kontrollgruppe abschwächte (siehe Abbildung 17). Phospho-STAT3 blieb in der gekühlten Versuchsgruppe im Vergleich zur nicht gekühlten Versuchsgruppe signifikant herunterreguliert. Nach der Wiedererwärmungsphase verschwand dieser Effekt wieder. Dies bedeutet, dass tiefe Hypothermie keine über die Kühlungsphase hinausgehenden Effekte auf die STAT3-Phosphorylierung besaß.

5.4.3 Inhibierung des STAT3-Signalweges und Auswirkungen auf die IL-6- und TNF- α -Sekretion

Die Anwendung von tiefer Hypothermie hat nicht nur protektive Effekte, sondern ist teils auch mit gravierenden Nebenwirkungen verbunden [135]. Vor diesem Hintergrund wurde im Zell-Kultur-Modell nach einer Möglichkeit gesucht, die Ausschüttung von IL-6 nicht durch die Applikation von physikalischer Hypothermie, sondern durch die Applikation einer chemischen Substanz zu unterdrücken. Die Arbeitshypothese lautete, dass die Ausschüttung von IL-6 und TNF- α durch den Transkriptionsfaktor STAT3 reguliert ist und dass eine Blockade von STAT3 die gleichen Effekte wie tiefe Hypothermie auf die IL-6- und TNF- α -Sekretion haben sollte.

Hierzu wurde der STAT3-Inhibitor Stattic (STAT3 inhibitory compound) gewählt, der die Tyrosin Phosphorylierung (Tyr705) des STAT3-Moleküls und somit die Dimerisierung und die darauffolgende Translokation von STAT3 in den Zellkern hemmt [90]. Stattic bindet an die SH2-Bindungsdomäne des STAT3-Moleküls und kann somit selektiv die Tyrosin-Phosphorylierung hemmen. Die Phosphorylierung am Serinrest (Ser727) ist von der Blockade unbeeinflusst [90].

Außerdem erfolgte die Inhibition der STAT-Phosphorylierung und -Dimerisation unter der Annahme, dass eine Blockade dieses Signalweges an möglichst zentraler Stelle verhindern würde, dass andere kompensatorische Mechanismen aktiviert werden würden. In mehreren multizentrischen, prospektive randomisierten, kontrollierten Studien konnte kein Überlebensvorteil für erwachsene Patienten gezeigt werden, die im Rahmen einer Sepsis oder eines septischen Schocks einen murinen monoklonalen TNF- α -Antikörper erhielten [136]. Ein möglicher Grund für das Versagen der

Antikörpertherapie könnte die Induktion von anderen kompensatorischen Mechanismen wie zum Beispiel eine verstärkte NF- κ B-Aktivierung sein.

Die Arbeitsgruppe um Samavati et al. konnte als eine der ersten in einer Zellkulturstudie mit einer Makrophagenzelllinie zeigen, dass eine 45-minütige Inkubation mit Stattic eine mit LPS induzierte IL-6-Ausschüttung hemmt. Sie konnten außerdem nachweisen, dass die IL-6-Expression auch auf mRNA-Ebene nach einer Behandlung mit Stattic nahezu vollständig verschwand [60]. In der hier vorgestellten Arbeit konnten die von Samavati et al. gezeigten Auswirkungen von Stattic auf die IL-6-Sekretion bestätigt werden.

Vor Beginn der Versuche wurde eine Zytotoxizitätsreihe mit Stattic durchgeführt (siehe 4.5). Dabei zeigte sich, dass ab einer Konzentration von 10 μ M die mitochondriale Aktivität, die als Indikator der Gesamtzellaktivität gesehen wurde, deutlich abnahm. Daher wurden die weiteren Versuche mit Konzentrationen zwischen 1,25 bis 5 μ M durchgeführt. Der Einsatz einer Kombination aus tiefer Hypothermie und Stattic scheint nicht sinnvoll, da die Effekte von Stattic temperaturabhängig sind [90].

Die BV2-Mikrogliazellen wurden gemäß dem Zeit-Temperatur-Protokoll mit LPS stimuliert. Anstelle der Kühlungs- und Wiedererwärmungsphase trat die 4 stündige Inkubation mit Stattic. Es konnte eine signifikante Abnahme der IL-6-Ausschüttung nach der vierstündigen Inkubationsphase mit Stattic nachgewiesen werden (Abbildung 24). Somit konnte die IL-6-Sekretion durch die Applikation von Stattic auf das gleiche Niveau wie unter Kühlung und Wiedererwärmung gesenkt werden. Die Verwendung von 5 μ M Stattic führte darüber hinaus zu einer Abnahme der IL-6-Ausschüttung unter das Niveau der Kühlung und Wiedererwärmung. Nach 28 Stunden blieb die IL-6-Ausschüttung in der mit 5 μ M behandelten Versuchsgruppe signifikant vermindert ($9,8 \pm 15,4$ vs. $59,5 \pm 54,1$ pg/ml). Hingegen stieg die IL-6-Sekretion in der gekühlten und wiedererwärmten Versuchsgruppe auf das Niveau der Kontrollgruppe an.

In der vorliegenden Zellkulturstudie mit BV2-Mikrogliazellen konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von STAT3 am Tyrosinrest 705 maßgeblich an der IL-6-Expression beteiligt ist. Diese Ergebnisse stehen auf den ersten Blick im Gegensatz zu Daten aus einem Sepsis Mausmodell, in dem Makrophagen und neutrophile Granulozyten mit einem STAT3-knock out verwendet wurden. Hier kam es zu einer gesteigerten Ausschüttung von pro-inflammatorischen Zytokinen wie IL-6, TNF- α und IL-1 β sowie auch dem anti-inflammatorischen Zytokin IL-10 [62]. Diese multifunktionelle Rolle von STAT3 kann möglicherweise durch die komplexen Interaktionen des Transkriptionsfaktors mit anderen Transkriptionsfaktoren erklärt werden, die nach einem

STAT3-knock-out kompensatorisch aktiviert werden. So wurde von Yasuhiro et al. nachgewiesen, dass Stat3 mit der RELA/p65 Untereinheit von NF-κB interagiert. Durch eine Bindung des nicht am Tyrosinrest phosphorylierten STAT3 an die RELA/p65 Untereinheit von NF-κB steht weniger freies STAT3 zur Verfügung, welches durch IL-6 aktiviert werden kann [137-139].

Auch die Auswirkungen einer Blockade des STAT3-Signalweges auf die TNF-α Sekretion sind von der Konzentration des Inhibitors Stattic abhängig. Während eine Konzentration des Inhibitors von 1,25 μM keine signifikante Reduktion der TNF-α-Ausschüttung bewirkte, führten Konzentrationen von 2,5 und 5 μM Stattic zu einer signifikanten Reduktion der TNF-α-Sekretion (siehe Abbildung 25). Interessanterweise führte eine Konzentration von 5μM sogar zu einer Abnahme der TNF-α-Ausschüttung unter das Niveau der hypothermen Versuchsgruppe (0 ± 0 vs. $10,8 \pm 17,9$ pg/ml, siehe 4.5.2). Nach 28 Stunden gab es, im Gegensatz zu den Effekten von Stattic auf die IL-6-Ausschüttung, keine Auswirkungen auf die TNF-α-Sekretion.

Bis zum jetzigen Zeitpunkt gibt es noch keine anderen Arbeiten, die die Auswirkungen einer Blockade von STAT3 auf die TNF-α-Sekretion in Mikrogliazellen untersucht haben. Die Arbeitsgruppe um de Jong et al. analysierte mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMC), die von pädiatrischen Patienten mit angeborenen Herzfehlern nach einer Operation am kardiopulmonalen Bypass gewonnen wurden. Dabei zeigte sich, dass die mit LPS *ex vivo* stimulierten PBMCs nach einer Operation am kardiopulmonalen Bypass weniger TNF-α ausschütteten als die Kontrollen. Nach einer Hemmung von STAT3 verschwand dieser Effekt und die TNF-α-Sekretion nahm zu [140]. Um die unterschiedlichen Auswirkungen der STAT3-Blockade auf die TNF-α-Ausschüttung zu analysieren, sind somit weitere Studien *in vitro* und *in vivo* erforderlich. Die Inhibition von STAT3 könnte in Zukunft eine Möglichkeit darstellen, die durch den kardiopulmonalen Bypass ausgelöste systemische Inflammationsreaktion zu beeinflussen und/oder eine Option sein, die Effekte der Hypothermie ohne Hypothermie-assoziierte Nebenwirkungen zu imitieren.

5.5 Hypothermie und reaktive Stickstoffspezies

Das freie Stickstoffradikal Stickstoffmonoxid (NO) ist ein Gas, welches frei durch Zellmembranen diffundieren kann und von Mikrogliazellen gebildet wird [141]. NO wird mit Hilfe der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) aus L-Arginin gebildet. Eine

übermäßige Ausschüttung von NO kann zum neuronalen Zelltod führen. Dies konnte sowohl in *in vitro* [142]- als auch in *in vivo* [143]-Experimenten gezeigt werden. Das neurotoxische Potential von NO konnte außerdem in Versuchen, bei denen die Aktivität der iNOS inhibiert wurde, bestätigt werden [144]. Um Effekte von tiefer Hypothermie und Wiedererwärmung auf die Expression der iNOS und der Ausschüttung von NO zu untersuchen, wurden die BV2-Mikrogliazellen wie in Abschnitt 3.2 beschrieben mit LPS stimuliert, gekühlt und wiedererwärmt. Dabei zeigte sich, dass tiefe Hypothermie die Ausschüttung von NO um fast die Hälfte von $21,1 \pm 3,1$ auf $12,6 \pm 1,6$ μM 12 Stunden nach Versuchsbeginn senkte. Nach 28 Stunden verschwand dieser Effekt wieder und die Ausschüttung von NO war in beiden Versuchsgruppen gleich hoch (Abbildung 19). Wie erwartet blieb auch die Expression der iNOS in der gekühlten Versuchsgruppe unterhalb der nicht gekühlten Versuchsgruppe. Nach 4 und 6 Stunden war die Expression der iNOS in der hypothermen Versuchsgruppe signifikant reduziert (Abbildung 20). Durch die Analyse der iNOS-Expression konnten die Resultate des Griess-Assays bestätigt werden. Auch Gibbons et. al konnten bereits in einem Zellkulturmodell zeigen, dass milde Hypothermie (33°C) die Expression von iNOS und konsekutiv die Ausschüttung von NO senkte. Die neuroprotektiven Wirkungen von Hypothermie könnten somit auf eine Abschwächung der NO-Ausschüttung von Mikrogliazellen zurückzuführen sein.

5.6 Auswirkungen der Hypothermie auf die Zellmigration

Bei einer Schädigung des Gehirngewebes migrieren die Mikrogliazellen in die betroffene Region [145]. Die Arbeitsgruppe um Seo et al. konnte zeigen, dass die Migration von BV2- und primären Mikrogliazellen sowohl bei 33°C als auch bei 29°C signifikant vermindert wird [115]. Aufbauend auf diesen Ergebnissen wurden die BV2-Mikrogliazellen in dem hier vorgestellten Projekt mit ADP, welches von geschädigten Neuronen ausgeschüttet wird, stimuliert [146]. Auch hier zeigte sich, dass 17°C die Migration der BV2-Mikrogliazellen abschwächte, obwohl aufgrund der großen Standardabweichungen keine statistische Signifikanz erreicht werden konnte (Abbildung .22). Auch Deng et al. konnten in einem Ischämie-Mausmodell nachweisen, dass unter hypothermen Versuchsbedingungen (33°C für 2 Stunden) weniger Mikrogliazellen als unter normothermen Versuchsbedingungen in einer geschädigten Region mit IB4/ED-1 angefärbt werden konnten [147]. Außerdem wurde vor dem

Hintergrund der Neuroinflammation das für die Migration von Leukozyten relevante Oberflächenmolekül ICAM-1 untersucht. Deng et al. konnten hier zeigen, dass moderate Hypothermie die ICAM-1 Expression nach einer Stimulation mit LPS im Mausmodell signifikant senkte [147]. Daher stellte sich die Frage, ob eine Kühlung auf 17°C die gleichen Effekte wie eine Kühlung auf 33°C auf die ICAM-1 Expression haben würde. Es stellte sich heraus, dass tiefe Hypothermie keinen Einfluss auf die ICAM-1-Expression, nachgewiesen mit Hilfe der FACS-Analyse, hatte (siehe 4.4.1).

Zusammen mit der verminderten Ausschüttung von IL-6, TNF- α , und MCP-1 könnte die ebenfalls eingeschränkte Migrationsfähigkeit der BV2-Mikrogliazellen einen möglichen Weg der durch Hypothermie vermittelten Neuroprotektion darstellen.

5.7 Schlussfolgerung

Die eingangs in Kapitel 1.6 gestellten Fragen konnten schlussendlich wie folgt beantwortet werden:

1. Hypothermie führt zu morphologischen Veränderungen der BV2-Mikrogliazellen, die auch auf eine Änderung des Funktionsprofils deuten.
2. Tiefe Hypothermie reduziert in BV2-Mikrogliazellen die durch LPS induzierte Inflamationsreaktion. So wurde die Ausschüttung von IL-6, TNF- α und MCP-1 durch Hypothermie signifikant vermindert. Dieser Effekt war jedoch in der Langzeitbeobachtung nicht mehr nachweisbar. Auch die Expression der Transkriptionsfaktoren P-STAT3 und NF- κ B war zunächst durch Kühlung signifikant abgeschwächt, jedoch waren nach der Widererwärmungsphase keine Unterschiede mehr sichtbar. Obwohl die Effekte der Kühlung nur kurzfristig nachweisbar waren, könnte die Abschwächung der Inflamationsreaktion in BV2-Mikrogliazellen ein möglicher Mechanismus der durch die Hypothermie vermittelten Neuroprotektion sein.
3. Es zeigte sich, dass eine Kühlung auf 17°C die Migration der BV2-Mikrogliazellen abschwächte. Es wurde jedoch keine statistische Signifikanz erreicht.
4. Stattic hat in Hinblick auf die IL-6- und TNF- α -Ausschüttung dieselben Effekte wie tiefe Hypothermie, sodass Stattic ein aussichtsreicher Kandidat zur Imitation der protektiven Wirkung der Kühlung zu sein scheint.

Diese mit der BV2-Mikrogliazelllinie gewonnenen Ergebnisse bieten eine gute Grundlage für Folgeexperimente. So könnten weitere an der Inflammationsreaktion beteiligte Signalkaskaden, wie zum Beispiel die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies, untersucht werden. Des Weiteren könnte die Ausschüttung neuroprotektiver Substanzen wie der *Brain-derived neurotrophic factor* (BDNF), der Glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF) sowie die Neurotrophine (NT3 und NT4) im Rahmen der Hypothermie untersucht werden. Eine weitere Möglichkeit wäre die Analyse der „cold-shock“ Proteine RBM3 und CIRP. Werden sie auch unter tief hypothermen Versuchsbedingungen induziert? Bewirkt ihre Ausschüttung nach einer Schädigung zu mehr Zellüberleben? Welche Rolle spielt die Länge der Wiedererwärmung? Außerdem könnten aufbauend auf den mit der Zelllinie gewonnenen Ergebnissen die aussagekräftigsten Resultate an primären Zellen evaluiert werden.

Eine aus dieser Arbeit entstandene neue Studie untersucht bereits in einem Ko-Kultur-Modell bestehend aus Mikrogliazellen und Neuronen den Einfluss der Hypothermie auf diese beiden Zelltypen. Mit diesem Modell lassen sich aktuell weitere Erkenntnisse über die Wirkung der Mikrogliazellen auf Neuronen gewinnen. Wirken sie unter hypothermen Versuchsbedingungen neuroprotektiv? Ein weiterer Schritt könnte es sein, die Rolle der Mikrogliazellen in einem Gewebeverband, zum Beispiel in hippocampalen Hirnschnitten, zu untersuchen.

6 Literaturverzeichnis

1. Grismer, J., *Open-heart pioneers*. Minn Med, 2003. **86**(9): p. 32-4.
2. Arrica, M. and B. Bissonnette, *Therapeutic Hypothermia*. Seminars in cardiothoracic and vascular anesthesia, 2007. **11**(1): p. 6-15.
3. Cohn, L.H., *Fifty Years of Open-Heart Surgery*. Circulation, 2003. **107**(17): p. 2168-2170.
4. Stoney, W.S., *Evolution of Cardiopulmonary Bypass*. Circulation, 2009. **119**(21): p. 2844-2853.
5. Lindinger, A., G. Schwedler, and H.W. Hense, *Prevalence of congenital heart defects in newborns in Germany: Results of the first registration year of the PAN Study (July 2006 to June 2007)*. Klin Padiatr, 2010. **222**(5): p. 321-6.
6. Toet, M.C., et al., *Cerebral oxygen saturation and electrical brain activity before, during, and up to 36 hours after arterial switch procedure in neonates without pre-existing brain damage: its relationship to neurodevelopmental outcome*. Exp Brain Res, 2005. **165**(3): p. 343-50.
7. Hövels-Gürich, H.H., *Psychomotorische Entwicklung von Kindern mit angeborenem Herzfehler*. Monatsschrift Kinderheilkunde, 2012. **160**(2): p. 118-128.
8. Lopez-de-Sa, E., et al., *Hypothermia in Comatose Survivors From Out-of-Hospital Cardiac Arrest: Pilot Trial Comparing 2 Levels of Target Temperature*. Circulation, 2012. **126**(24): p. 2826-33.
9. Drabek, T. and P.M. Kochanek, *Therapeutic Hypothermia on Its 10th Anniversary: Is it Time to Turn the Thermostat Down?* Circulation, 2012. **126**(24): p. 2803-5.
10. Wypij, D., et al., *The effect of duration of deep hypothermic circulatory arrest in infant heart surgery on late neurodevelopment: The Boston Circulatory Arrest Trial*. The Journal of thoracic and cardiovascular surgery, 2003. **126**(5): p. 1397-1403.
11. Rivera-Lara, L., J. Zhang, and S. Muehlschlegel, *Therapeutic hypothermia for acute neurological injuries*. Neurotherapeutics, 2012. **9**(1): p. 73-86.
12. Scirica, B.M., *Therapeutic Hypothermia After Cardiac Arrest*. Circulation, 2013. **127**(2): p. 244-250.
13. McGuinness, J., D. Bouchier-Hayes, and J.M. Redmond, *Understanding the inflammatory response to cardiac surgery*. The Surgeon, 2008. **6**(3): p. 162-171.
14. Laffey, J.G., J.F. Boylan, and D.C. Cheng, *The systemic inflammatory response to cardiac surgery: implications for the anesthesiologist*. Anesthesiology, 2002. **97**(1): p. 215-52.
15. Schmidt, O.I., et al., *Closed head injury--an inflammatory disease?* Brain Res Brain Res Rev, 2005. **48**(2): p. 388-99.
16. Hauser, G.J., et al., *Interleukin-6 levels in serum and lung lavage fluid of children undergoing open heart surgery correlate with postoperative morbidity*. Intensive care medicine, 1998. **24**(5): p. 481-6.
17. Amir, G., et al., *Neonatal Brain Protection and Deep Hypothermic Circulatory Arrest: Pathophysiology of Ischemic Neuronal Injury and Protective Strategies*. The Annals of thoracic surgery, 2005. **80**(5): p. 1955-1964.
18. Seghaye, M.C., *The clinical implications of the systemic inflammatory reaction related to cardiac operations in children*. Cardiol Young, 2003. **13**(3): p. 228-39.

19. Kozik, D.J. and J.S. Tweddell, *Characterizing the Inflammatory Response to Cardiopulmonary Bypass in Children*. The Annals of thoracic surgery, 2006. **81**(6): p. S2347-S2354.
20. Benson, D.W., et al., *The use of hypothermia after cardiac arrest*. Anesthesia and analgesia, 1959. **38**: p. 423-8.
21. Depenbusch-Landgraber, G., *Perioperative Temperaturregulation bei Kindern*. Intensiv, 2009. **17**(3): p. 122.
22. Polderman, K., *Mechanisms of action, physiological effects, and complications of hypothermia*. Critical care medicine, 2009. **37**: p. S186 - 202.
23. Nikolov, N.M. and A.J. Cunningham, *Mild therapeutic hypothermia to improve the neurologic outcome after cardiac arrest*. Survey of Anesthesiology, 2003. **47**(4): p. 219-220.
24. Nolan, J.P., et al., *European Resuscitation Council guidelines for resuscitation 2005. Section 4. Adult advanced life support*. Resuscitation, 2005. **67**(Suppl 1): p. S39-86.
25. Nielsen, N., et al., *Targeted Temperature Management at 33Â°C versus 36Â°C after Cardiac Arrest*. New England Journal of Medicine, 2013. **369**(23): p. 2197-2206.
26. Shankaran, S., et al., *Whole-body hypothermia for neonates with hypoxic-ischemic encephalopathy*. The New England journal of medicine, 2005. **353**(15): p. 1574-84.
27. Bachet, J. and D. Guilmet, *Brain Protection During Surgery of the Aortic Arch*. Journal of Cardiac Surgery, 2002. **17**(2): p. 115-124.
28. Olsen, T.S., U.J. Weber, and L.P. Kammersgaard, *Therapeutic hypothermia for acute stroke*. The Lancet Neurology, 2003. **2**(7): p. 410-416.
29. Peterson, K., S. Carson, and N. Carney, *Hypothermia treatment for traumatic brain injury: a systematic review and meta-analysis*. J Neurotrauma, 2008. **25**(1): p. 62-71.
30. Frink, M., et al., *Facts and fiction: the impact of hypothermia on molecular mechanisms following major challenge*. Mediators Inflamm, 2012. **762840**(10): p. 13.
31. Song, S. and P. Lyden, *Overview of Therapeutic Hypothermia*. Current Treatment Options in Neurology, 2012. **14**(6): p. 541-548.
32. Shankaran, S., et al., *Whole-Body Hypothermia for Neonates with Hypoxic-Ischemic Encephalopathy*. New England Journal of Medicine, 2005. **353**(15): p. 1574-1584.
33. Deakin, C.D., et al., *European Resuscitation Council guidelines for resuscitation 2010 section 4. Adult advanced life support*. Resuscitation, 2010. **81**(10): p. 1305.
34. *Mild Therapeutic Hypothermia to Improve the Neurologic Outcome after Cardiac Arrest*. New England Journal of Medicine, 2002. **346**(8): p. 549-556.
35. Groysman, L.I., et al., *Therapeutic hypothermia in acute ischemic stroke*. Neurosurgical FOCUS, 2011. **30**(6): p. E17.
36. Hägerdal, M., et al., *THE EFFECT OF INDUCED HYPOTHERMIA UPON OXYGEN CONSUMPTION IN THE RAT BRAIN*. Journal of Neurochemistry, 1975. **24**(2): p. 311-316.
37. Gonzalez-Ibarra, F.P., J. Varon, and E.G. Lopez-Meza, *Therapeutic hypothermia: critical review of the molecular mechanisms of action*. Frontiers in neurology, 2011. **2**: p. 4.

38. Benveniste, H., et al., *Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis*. J Neurochem, 1984. **43**(5): p. 1369-74.
39. Ooboshi, H., et al., *Hypothermia inhibits ischemia-induced efflux of amino acids and neuronal damage in the hippocampus of aged rats*. Brain Research, 2000. **884**(1-2): p. 23-30.
40. Baker, A.J., et al., *Hypothermia prevents ischemia-induced increases in hippocampal glycine concentrations in rabbits*. Stroke, 1991. **22**(5): p. 666-73.
41. D'Cruz, B.J., et al., *Hypothermic reperfusion after cardiac arrest augments brain-derived neurotrophic factor activation*. J Cereb Blood Flow Metab, 2002. **22**(7): p. 843-51.
42. Yang, D., et al., *Hypothermia attenuates ischemia/reperfusion-induced endothelial cell apoptosis via alterations in apoptotic pathways and JNK signaling*. FEBS letters, 2009. **583**(15): p. 2500-6.
43. Pastuszko, P., et al., *The effect of hypothermia on neuronal viability following cardiopulmonary bypass and circulatory arrest in newborn piglets*. European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery, 2009. **35**(4): p. 577-81.
44. Maekawa, S., et al., *Differential effects of lowering culture temperature on mediator release from lipopolysaccharide-stimulated neonatal rat microglia*. Critical care medicine, 2002. **30**(12): p. 2700-4.
45. Hachimi-Idrissi, S., et al., *Postischemic mild hypothermia reduces neurotransmitter release and astroglial cell proliferation during reperfusion after asphyxial cardiac arrest in rats*. Brain Res, 2004. **3**: p. 1-2.
46. Harlan, J.M., et al., *Mechanisms and consequences of leukocyte-endothelial interaction*. West J Med, 1991. **155**(4): p. 365-9.
47. Merrill, J.E. and E.N. Benveniste, *Cytokines in inflammatory brain lesions: helpful and harmful*. Trends in Neurosciences, 1996. **19**(8): p. 331-338.
48. Schmitt, K.R., et al., *Hypothermia-induced neurite outgrowth is mediated by tumor necrosis factor-alpha*. Brain Pathol, 2010. **20**(4): p. 771-9.
49. Siesjo, B.K., et al., *Calcium, excitotoxins, and neuronal death in the brain*. Ann N Y Acad Sci, 1989. **568**: p. 234-51.
50. Globus, M.Y., et al., *Detection of free radical activity during transient global ischemia and recirculation: effects of intraischemic brain temperature modulation*. J Neurochem, 1995. **65**(3): p. 1250-6.
51. Tong, G., et al., *Effects of moderate and deep hypothermia on RNA-binding proteins RBM3 and CIRP expressions in murine hippocampal brain slices*. Brain Res, 2013. **8**(13): p. 00137-6.
52. DiDonato, J.A., F. Mercurio, and M. Karin, *NF-kappaB and the link between inflammation and cancer*. Immunological reviews, 2012. **246**(1): p. 379-400.
53. Li, X. and G.R. Stark, *NFkappaB-dependent signaling pathways*. Exp Hematol, 2002. **30**(4): p. 285-96.
54. Blackwell, T.S. and J.W. Christman, *The role of nuclear factor-kappa B in cytokine gene regulation*. American journal of respiratory cell and molecular biology, 1997. **17**(1): p. 3-9.
55. Olson, J.K. and S.D. Miller, *Microglia Initiate Central Nervous System Innate and Adaptive Immune Responses through Multiple TLRs*. The Journal of Immunology, 2004. **173**(6): p. 3916-3924.

56. Qin, H., et al., *Molecular mechanism of lipopolysaccharide-induced SOCS-3 gene expression in macrophages and microglia*. J Immunol, 2007. **179**(9): p. 5966-76.
57. Gilmore, T.D., *Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives*. Oncogene, 2006. **25**(51): p. 6680-4.
58. Brasier, A., *The NF-kB regulatory network*. Cardiovascular Toxicology, 2006. **6**(2): p. 111-130.
59. Hodge, D.R., E.M. Hurt, and W.L. Farrar, *The role of IL-6 and STAT3 in inflammation and cancer*. European Journal of Cancer, 2005. **41**(16): p. 2502-2512.
60. Samavati, L., et al., *STAT3 tyrosine phosphorylation is critical for interleukin 1 beta and interleukin-6 production in response to lipopolysaccharide and live bacteria*. Molecular Immunology, 2009. **46**(8-9): p. 1867-1877.
61. Akira, S., *Roles of STAT3 defined by tissue-specific gene targeting*. Oncogene, 2000. **19**(21): p. 2607-11.
62. Matsukawa, A., et al., *Stat3 in Resident Macrophages as a Repressor Protein of Inflammatory Response*. The Journal of Immunology, 2005. **175**(5): p. 3354-3359.
63. O'Shea, J.J., M. Gadina, and R.D. Schreiber, *Cytokine Signaling in 2002: New Surprises in the Jak/Stat Pathway*. Cell, 2002. **109**(2, Supplement 1): p. S121-S131.
64. Shuai, K. and B. Liu, *Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system*. Nature reviews. Immunology, 2003. **3**(11): p. 900-11.
65. Kaptein, A., V. Paillard, and M. Saunders, *Dominant Negative Stat3 Mutant Inhibits Interleukin-6-induced Jak-STAT Signal Transduction*. Journal of Biological Chemistry, 1996. **271**(11): p. 5961-5964.
66. Heinrich, P.C., et al., *Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation*. The Biochemical journal, 2003. **374**(Pt 1): p. 1-20.
67. Sasse, J., et al., *Mutational analysis of acute-phase response factor/Stat3 activation and dimerization*. Mol Cell Biol, 1997. **17**(8): p. 4677-86.
68. Heinrich, P.C., et al., *Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway*. The Biochemical journal, 1998. **334**(Pt 2): p. 297-314.
69. Bode, J.G., et al., *LPS and TNFalpha induce SOCS3 mRNA and inhibit IL-6-induced activation of STAT3 in macrophages*. FEBS letters, 1999. **463**(3): p. 365-70.
70. Kim, D.H., et al., *Anti-inflammatory effects of 8-hydroxydeoxyguanosine in LPS-induced microglia activation: suppression of STAT3-mediated intercellular adhesion molecule-1 expression*. Experimental & molecular medicine, 2006. **38**(4): p. 417-27.
71. KIM, D.H., et al., *Anti-inflammatory effects of 8-hydroxydeoxyguanosine in LPS-induced microglia activation : suppression of STAT3-mediated intercellular adhesion molecule-1 expression*. Vol. 38. 2006, Seoul, COREE, REPUBLIQUE DE: Korean Society of Medical Biochemistry and Molecular Biology. 11.
72. Hailer, N.P., et al., *Adhesion molecule expression on phagocytic microglial cells following anterograde degeneration of perforant path axons*. Hippocampus, 1997. **7**(3): p. 341-349.
73. MITSUYAMA, K., et al., *Therapeutic Strategies for Targeting the IL-6/STAT3 Cytokine Signaling Pathway in Inflammatory Bowel Disease*. Anticancer Research, 2007. **27**(6A): p. 3749-3756.

74. Cassatella, M.A., et al., *Interleukin 10 (IL-10) inhibits the release of proinflammatory cytokines from human polymorphonuclear leukocytes. Evidence for an autocrine role of tumor necrosis factor and IL-1 beta in mediating the production of IL-8 triggered by lipopolysaccharide.* The Journal of Experimental Medicine, 1993. **178**(6): p. 2207-2211.
75. Dominguez, E., et al., *SOCS3-Mediated Blockade of JAK/STAT3 Signaling Pathway Reveals Its Major Contribution to Spinal Cord Neuroinflammation and Mechanical Allodynia after Peripheral Nerve Injury.* The Journal of Neuroscience, 2010. **30**(16): p. 5754-5766.
76. Hanisch, U.K., *Microglia as a source and target of cytokines.* Glia, 2002. **40**(2): p. 140-155.
77. Locksley, R.M., N. Killeen, and M.J. Lenardo, *The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology.* Cell, 2001. **104**(4): p. 487-501.
78. Gaur, U. and B.B. Aggarwal, *Regulation of proliferation, survival and apoptosis by members of the TNF superfamily.* Biochemical pharmacology, 2003. **66**(8): p. 1403-1408.
79. Dumitru, C.D., et al., *TNF- α Induction by LPS Is Regulated Posttranscriptionally via a Tpl2/ERK-Dependent Pathway.* Cell, 2000. **103**(7): p. 1071-1083.
80. Grutz, G., *New insights into the molecular mechanism of interleukin-10-mediated immunosuppression.* J Leukoc Biol, 2005. **77**(1): p. 3-15.
81. Berg, D.J., et al., *Interleukin-10 is a central regulator of the response to LPS in murine models of endotoxic shock and the Shwartzman reaction but not endotoxin tolerance.* The Journal of clinical investigation, 1995. **96**(5): p. 2339-47.
82. Gerard, C. and B.J. Rollins, *Chemokines and disease.* Nat Immunol, 2001. **2**(2): p. 108-115.
83. Le, Y., et al., *Chemokines and chemokine receptors: their manifold roles in homeostasis and disease.* Cell Mol Immunol, 2004. **1**(2): p. 95-104.
84. Charo, I.F. and R.M. Ransohoff, *The Many Roles of Chemokines and Chemokine Receptors in Inflammation.* New England Journal of Medicine, 2006. **354**(6): p. 610-621.
85. Bogdan, C., *Nitric oxide and the immune response.* Nat Immunol, 2001. **2**(10): p. 907-916.
86. MacMicking, J., Q.-w. Xie, and C. Nathan, *NITRIC OXIDE AND MACROPHAGE FUNCTION.* Annual review of immunology, 1997. **15**(1): p. 323-350.
87. Xie, Q.W., et al., *Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages.* Science (New York, N.Y.), 1992. **256**(5054): p. 225-228.
88. Umansky, V., et al., *Co-stimulatory effect of nitric oxide on endothelial NF- κ B implies a physiological self-amplifying mechanism.* European Journal of Immunology, 1998. **28**(8): p. 2276-2282.
89. Connelly, L., et al., *Biphasic Regulation of NF- κ B Activity Underlies the Pro- and Anti-Inflammatory Actions of Nitric Oxide.* The Journal of Immunology, 2001. **166**(6): p. 3873-3881.
90. Schust, J., et al., *Stattic: A Small-Molecule Inhibitor of STAT3 Activation and Dimerization.* Chemistry & Biology, 2006. **13**(11): p. 1235-1242.
91. Kettenmann, H., et al., *Physiology of Microglia.* Physiological Reviews, 2011. **91**(2): p. 461-553.
92. Aloisi, F., *Immune function of microglia.* Glia, 2001. **36**(2): p. 165-179.

93. Lawson, L.J., et al., *Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain*. Neuroscience. 1990;39(1):151-70.
94. Rio-Hortega, P.D., *Microglia*. Cytology and Cellular Pathology of the Nervous System 1932, New York. 482–534.
95. Chan, W.Y., S. Kohsaka, and P. Rezaie, *The origin and cell lineage of microglia—New concepts*. Brain Research Reviews, 2007. **53**(2): p. 344-354.
96. Kreutzberg, G.W., *Microglia: a sensor for pathological events in the CNS*. Trends in Neurosciences, 1996. **19**(8): p. 312-318.
97. Nimmerjahn, A., F. Kirchhoff, and F. Helmchen, *Resting Microglial Cells Are Highly Dynamic Surveillants of Brain Parenchyma in Vivo*. Science, 2005. **308**(5726): p. 1314-1318.
98. Hanisch, U. and H. Kettenmann, *Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain*. Nature Neurosci, 2007. **10**: p. 1387 - 1394.
99. Coull, J.A., et al., *BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain*. Nature. 2005 Dec 15;438(7070):1017-21.
100. Lessmann, V. and T. Brigadski, *Mechanisms, locations, and kinetics of synaptic BDNF secretion: an update*. Neurosci Res. 2009 Sep;65(1):11-22. doi: 10.1016/j.neures.2009.06.004. Epub 2009 Jun 11.
101. Gomes-Leal, W., *Microglial physiopathology: how to explain the dual role of microglia after acute neural disorders?* Brain Behav, 2012. **2**(3): p. 345-56.
102. Block, M., L. Zecca, and J. Hong, *Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms*. Nat Rev Neurosci, 2007. **8**: p. 57 - 69.
103. Lalancette-Hebert, M., et al., *Selective ablation of proliferating microglial cells exacerbates ischemic injury in the brain*. J Neurosci, 2007. **27**(10): p. 2596-605.
104. Lünemann, A., et al., *Macrophage/microglia activation factor expression is restricted to lesion-associated microglial cells after brain trauma*. Glia, 2006. **53**(4): p. 412-419.
105. Mosmann, T., *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays*. Journal of Immunological Methods, 1983. **65**(1–2): p. 55-63.
106. Iwata, Y., et al., *Postoperative hypothermia and blood loss after the neonatal arterial switch procedure*. Ann Thorac Surg. 2007 Nov;84(5):1627-32.
107. Gibbons, H. and M. Dragunow, *Microglia induce neural cell death via a proximity-dependent mechanism involving nitric oxide*. Brain Res, 2006. **1084**: p. 1 - 15.
108. Gibbons, H., T. Sato, and M. Dragunow, *Hypothermia suppresses inducible nitric oxide synthase and stimulates cyclooxygenase-2 in lipopolysaccharide stimulated BV-2 cells*. Brain Res Mol Brain Res, 2003. **110**: p. 63 - 75.
109. Aloisi, F., et al., *IL-12 production by central nervous system microglia is inhibited by astrocytes*. J Immunol, 1997. **159**(4): p. 1604-1612.
110. Jeon, N.R., et al., *MMHD [(S,E)-2-methyl-1-(2-methylthiazol-4-yl) hexa-1,5-dienol], a novel synthetic compound derived from epoethilone, suppresses nuclear factor-kappaB-mediated cytokine expression in lipopolysaccharide-stimulated BV-2 microglia*. Journal of pharmacological sciences, 2010. **112**(2): p. 158-66.
111. Kreutzberg, G., *Microglia: a sensor for pathological events in the CNS*. Trends Neurosci, 1996. **19**: p. 312 - 318.
112. Beynon, S.B. and F.R. Walker, *Microglial activation in the injured and healthy brain: what are we really talking about? Practical and theoretical issues associated with the measurement of changes in microglial morphology*. Neuroscience, 2012. **225**: p. 162-71.

113. Diestel, A., et al., *Mechanisms of hypothermia-induced cell protection mediated by microglial cells in vitro*. Eur J Neurosci, 2010. **31**: p. 779 - 787.
114. Schmitt, K.R.L., et al., *Hypothermia suppresses inflammation via ERK signaling pathway in stimulated microglial cells*. Journal of Neuroimmunology, 2007. **189**(1-2): p. 7-16.
115. Seo, J.-W., et al., *Time-dependent effects of hypothermia on microglial activation and migration*. Journal of Neuroinflammation, 2012. **9**(1): p. 164.
116. Mosmann, T., *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays*. Journal of Immunological Methods, 1983. **65**(1-2): p. 55-63.
117. Vermes, I., et al., *A novel assay for apoptosis flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled annexin V*. Journal of Immunological Methods, 1995. **184**(1): p. 39-51.
118. Wollersheim, S., et al., *Establishment of a coculture model for studying inflammation after pediatric cardiopulmonary bypass: from bench to bedside*. J Interferon Cytokine Res, 2012. **32**(6): p. 269-76.
119. Algra, S.O., et al., *Cerebral ischemia initiates an immediate innate immune response in neonates during cardiac surgery*. J Neuroinflammation, 2013. **10**(1): p. 24.
120. Yanagawa, Y., M. Kawakami, and Y. Okada, *Moderate hypothermia alters interleukin-6 and interleukin-1 α reactions in ischemic brain in mice*. Resuscitation, 2002. **53**(1): p. 93-99.
121. Sriram, K., et al., *Deficiency of TNF receptors suppresses microglial activation and alters the susceptibility of brain regions to MPTP-induced neurotoxicity: role of TNF- α* . The FASEB Journal, 2006. **20**(6): p. 670-682.
122. Han, H., et al., *Mild hypothermia inhibits nuclear factor-kappaB translocation in experimental stroke*. J Cereb Blood Flow Metab, 2003. **23**: p. 589 - 598.
123. Taylor, D.L., et al., *Stimulation of microglial metabotropic glutamate receptor mGlu2 triggers tumor necrosis factor α -induced neurotoxicity in concert with microglial-derived Fas ligand*. The Journal of Neuroscience, 2005. **25**(11): p. 2952-2964.
124. Webster, C.M., et al., *Inflammation and NF[kappa]B activation is decreased by hypothermia following global cerebral ischemia*. Neurobiology of Disease, 2009. **33**(2): p. 301-312.
125. Madrid, L.V., et al., *Akt Stimulates the Transactivation Potential of the RelA/p65 Subunit of NF- κ B through Utilization of the I κ B Kinase and Activation of the Mitogen-activated Protein Kinase p38*. Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(22): p. 18934-18940.
126. Jiang, X., et al., *The NF- κ B Activation in Lymphotoxin β Receptor Signaling Depends on the Phosphorylation of p65 at Serine 536*. Journal of Biological Chemistry, 2003. **278**(2): p. 919-926.
127. Fairchild, K.D., et al., *Hypothermia enhances phosphorylation of I{kappa}B kinase and prolongs nuclear localization of NF- κ B in lipopolysaccharide-activated macrophages*. Am J Physiol Cell Physiol, 2005. **289**(5): p. 22.
128. Ito, C.Y., A.G. Kazantsev, and A.S. Baldwin, *Three NF- χ B sites in the I χ B- α promoter are required for induction of gene expression by TNF α* . Nucleic acids research, 1994. **22**(18): p. 3787-3792.
129. Yang, X., et al., *The role of the JAK2-STAT3 pathway in pro-inflammatory responses of EMF-stimulated N9 microglial cells*. Journal of Neuroinflammation, 2010. **7**(1): p. 54.

130. Kim, O., et al., *JAK-STAT signaling mediates gangliosides-induced inflammatory responses in brain microglial cells*. The Journal of biological chemistry, 2002. **277**: p. 40594 - 40601.
131. Steinberg, J.B., et al., *Cytokine and complement levels in patients undergoing cardiopulmonary bypass*. The Journal of thoracic and cardiovascular surgery, 1993. **106**(6): p. 1008-1016.
132. Jacoby, J.J., et al., *Cardiomyocyte-restricted knockout of STAT3 results in higher sensitivity to inflammation, cardiac fibrosis, and heart failure with advanced age*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2003. **100**(22): p. 12929-12934.
133. Zhang, L., et al., *IL-6 signaling via the STAT3/SOCS3 pathway: Functional Analysis of the Conserved STAT3 N-domain*. Molecular and Cellular Biochemistry, 2006. **288**(1-2): p. 179-189.
134. Satriotomo, I., K.K. Bowen, and R. Vemuganti, *JAK2 and STAT3 activation contributes to neuronal damage following transient focal cerebral ischemia*. Journal of Neurochemistry, 2006. **98**(5): p. 1353-1368.
135. Murphy, G.J. and G.D. Angelini, *Side effects of cardiopulmonary bypass: what is the reality?* J Card Surg, 2004. **19**(6): p. 481-8.
136. Abraham, E., *Why immunomodulatory therapies have not worked in sepsis*. Intensive care medicine, 1999. **25**(6): p. 556-566.
137. Yoshida, Y., et al., *Interleukin 1 Activates STAT3/Nuclear Factor- κ B Cross-talk via a Unique TRAF6- and p65-dependent Mechanism*. Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(3): p. 1768-1776.
138. Bode, J.G., et al., *Hepatic acute phase proteins – Regulation by IL-6- and IL-1-type cytokines involving STAT3 and its crosstalk with NF- κ B-dependent signaling*. European Journal of Cell Biology, 2012. **91**(6–7): p. 496-505.
139. ACARIN, L., B. GONZÁLEZ, and B. CASTELLANO, *STAT3 and NF[κ]B Activation Precedes Glial Reactivity in the Excitotoxically Injured Young Cortex but not in the Corresponding Distal Thalamic Nuclei*. Journal of Neuropathology & Experimental Neurology, 2000. **59**(2): p. 151-163.
140. de Jong, P.R., et al., *STAT3 regulates monocyte TNF-alpha production in systemic inflammation caused by cardiac surgery with cardiopulmonary bypass*. PLoS One, 2012. **7**(4): p. 10.
141. Possel, H., et al., *Selective upregulation of inducible nitric oxide synthase (iNOS) by lipopolysaccharide (LPS) and cytokines in microglia: In vitro and in vivo studies*. Glia, 2000. **32**(1): p. 51-59.
142. Boje, K.M. and P.K. Arora, *Microglial-produced nitric oxide and reactive nitrogen oxides mediate neuronal cell death*. Brain Research, 1992. **587**(2): p. 250-256.
143. He, Y., et al., *Role of nitric oxide in rotenone-induced nigro-striatal injury*. Journal of Neurochemistry, 2003. **86**(6): p. 1338-1345.
144. Gibbons, H.M. and M. Dragunow, *Microglia induce neural cell death via a proximity-dependent mechanism involving nitric oxide*. Brain Research, 2006. **1084**(1): p. 1-15.
145. Aloisi, F., *Immune function of microglia*. Glia, 2001. **36**: p. 165 - 179.
146. Davalos, D., et al., *ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo*. Nat Neurosci, 2005. **8**(6): p. 752-758.
147. Deng, H., et al., *Mild Hypothermia Inhibits Inflammation After Experimental Stroke and Brain Inflammation*. Stroke, 2003. **34**(10): p. 2495-2501.

7 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Annemarie Krauß, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Einfluss der Hypothermie und STAT3-Inhibition auf die Neuroinflammation in einem Zell-Kultur-Modell mit BV2-Mikrogliazellen“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

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

Datum

Unterschrift

8 Lebenslauf

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

9 Publikationsliste

Posterpräsentationen mit Abstract-Veröffentlichung

Hypothermia reduces inflammation in a co-culture model of neuronal and microglial cells. J. Mochner, S. Wollersheim, G. Tong, A. Krauss, F. Berger, K.R.L. Schmitt.

46th Annual Meeting of the Association for European Paediatric and Congenital Cardiology, Istanbul, Juni 2012

Is mild hypothermia cool enough to protect cardiac cells after hypoxia? How does propofol affect this effect? P. Soltani, S. Wollersheim, A. Krauss, G. Tong, F. Berger, K.R.L. Schmitt.

45th Annual Meeting of the Association for European Paediatric and Congenital Cardiology, Granada, Mai 2011

Deep Hypothermia affects morphological changes and decreases the IL-6 and MCP-1 release in LPS stimulated BV-2 microglial cells. A. Krauss, S. Wollersheim, P. Soltani, F. Berger, K.R.L.Schmitt.

Ninth Göttingen Meeting of the German Neuroscience Society, Göttingen, März 2011

Cardioprotective Effect of Early Moderate Hypothermia during Ischemia. V.Fabig, C. Drescher, A. Krauss, G.Tong, C. Walker, F. Berger, K.R.L. Schmitt. *45. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pädiatrische Kardiologie e.V., Weimar, November 2013*

Stattic: Can a new drug reduce inflammatory responses after cardiopulmonary bypass surgery? A. Krauss, J. Mochner, S. Wollersheim, G.Tong, F. Berger, K.R.L. Schmitt.

45. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pädiatrische Kardiologie e.V., Weimar, November 2013

Vortragspräsentation mit Abstract-Veröffentlichung

Hypothermia suppresses inflammation via NF- κ B and pSTAT3 signalling pathway in stimulated microglial cells. A. Krauss, S. Wollersheim, P. Soltani, G. Tong, F. Berger, K.R.L. Schmitt.

45th Annual Meeting of the Association for European Paediatric and Congenital Cardiology, Granada, Mai 2011

Inhibition des Stat 3 Signalweges in der Zellkultur – Eine neue Möglichkeit, um Inflammationsreaktionen am kardiopulmonalen Bypass abzuschwächen? A. Krauss, J. Mochner, S. Wollersheim, G.Tong, F. Berger, K.R.L. Schmitt. *49. Arbeitstagung Pädiatrische Forschung, Düsseldorf, September 2013*

10 Danksagung

Zu Beginn möchte ich mich bei meiner Doktormutter Frau PD Dr. Katharina Schmitt, die mich mit ihrem außergewöhnlichen Engagement immer unterstützt hat, für die Betreuung dieser Doktorarbeit bedanken.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Professor Dr. med. Felix Berger, Direktor der Klinik für angeborene Herzfehler und Kinderkardiologie des Deutschen Herzzentrums Berlin für die Unterstützung meiner wissenschaftlichen und klinischen Tätigkeit.

Natürlich möchte ich mich auch bei der gesamten Arbeitsgruppe „Hypothermie zur Organprotektion“ bedanken, ohne die dieses Projekt niemals hätte umgesetzt werden können. Poya Soltani danke ich ganz besonders für die unbegrenzte Unterstützung und die gute Laune im Labor. Dr. med. Sonja Wollersheim, Anke Jurisch, Giang Tong, Ph.D., Johannes Mochner, Nora Ebermann, Maria Feldmann und Sylvia Wowro bin ich aufgrund ihrer Diskussions- und Hilfsbereitschaft sowie ihrem unerschöpflichen Fundus an wissenschaftlichen Anregungen zu großem Dank verpflichtet.

