

Aus der Neurologischen Universitätsklinik Tübingen

Abteilung Allgemeine Neurologie

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. J. Dichgans

**Neuroprotektion bei
fokaler zerebraler Ischämie**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Yvonne Michaela Jerger
aus
Donaueschingen**

2003

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichtstatter: Professor Dr. M. Bähr

2. Berichtstatter: Privatdozent Dr. J. B. Schulz

meinen Eltern

Gerhard und Marlies Jerger

gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Zerebrale Ischämie.....	1
1.2 Apoptose.....	3
1.2.1 Apoptose versus Nekrose.....	3
1.2.2 Die Bcl-2-Proteine	4
1.3 Mitochondrien und Zelltod	7
1.4 rt-PA	8
1.4.1 Vorkommen und Wirkungen	8
1.4.2 Therapie:	9
1.4.3 Neurotoxizität:	10
1.5 Protein-Transduktion	12
1.6 Fragestellung	14
2. Material und Methodik.....	15
2.1 Versuchsgruppen.....	15
2.2 Substanzen	16
2.3 Herstellung der Okklusionsfäden.....	16
2.4 Anästhesie	16
2.5 Laser-Doppler-Blutflußmessung	17
2.6 Tier-Präparation	17
2.7 Neurologisches Defizit.....	19

2.8	2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid-Färbung.....	19
2.9	Ausmessung und Auswertung der Infarktgröße.....	20
2.10	Statistik.....	20
3.	Ergebnisse	21
3.1	Laser-Doppler-Blutflußmessung	21
3.2	Infarktvolumen.....	25
3.3	Neurologisches Defizit.....	26
3.3	Neurologisches Defizit.....	27
4.	Diskussion	28
4.1	Wirkung von rt-PA	28
4.2	Wirkung von Bcl-X _L	29
4.3	Wirkung von Bcl-X _L bei Applikation von rt-PA.....	30
4.4	Wirkmechanismus.....	31
4.5	Ausblick.....	32
5.	Zusammenfassung.....	34
6.	Abkürzungsverzeichnis.....	36
7.	Abbildungen und Tabellen	37
8.	Literaturverzeichnis.....	38
9.	Danksagung.....	49
10.	Lebenslauf	50

1. Einleitung

1.1 Zerebrale Ischämie

Cerebrale Ischämien, früher auch als ‚Apoplex‘ oder zerebraler ‚Insult‘ bezeichnet, sind die häufigsten Ursachen für einen akuten Schlaganfall. Im Rahmen der Ischämie kommt es durch Verschluss eines Hirngefäßes, meist durch eine Thrombose, zu einem Untergang von Gehirngewebe oder Embolie (Caplan, 1991; Caplan, 1993). 20-30% der Patienten mit einem ischämischen Insult versterben innerhalb der ersten Woche nach Beginn der klinischen Symptomatik, und nur 35% der überlebenden Patienten zeigen spontan im Verlauf eine Besserung der Symptomatik (Diener, 2000).

Aktuelle Therapiekonzepte basieren auf zwei unterschiedlichen Strategien: Verbesserung der Durchblutungssituation sowie Maßnahmen zur Neuroprotektion. Zur Wiedereröffnung eines embolisch oder thrombotisch verschlossenen Gefäßes wendet man fibrinolytische Pharmaka an. Meist wird systemisch mit rt-PA oder lokal mit rt-PA oder Urokinase behandelt. Diese Behandlung kann man nur innerhalb eines engen Zeitfensters nach Beginn der Symptomatik durchführen (NINDS, 1995; del Zoppo et al., 1998). Die Antikoagulation mit Heparin oder ASS in der Akuttherapie ist umstritten, da mehrere Studien keine eindeutige Verbesserung gezeigt haben. Durch Behandlung des Hirnödems mit Mannitol oder Glycerol und Einstellung des Blutdrucks auf Werte im oberen Grenzbereich versucht man, die Perfusion und damit die Nährstoffversorgung des Hirngewebes zu verbessern. Eine Hyperglykämie muß ebenso verhindert bzw. behandelt werden wie eine Hyperthermie, da sie zur Vergrößerung des Gewebeschadens beitragen.

Schließlich zeigt sich experimentell eine weitere Therapiemöglichkeit mit Hilfe von Neuroprotektiva (Diener, 2000). Im Moment spielt dieser Aspekt noch keine

Rolle im klinischen Alltag, die bislang durchgeführten Studien waren erfolglos. Dies wird sich aber vermutlich in Zukunft ändern, da eine Reihe von neuen Strategien und Wirkstoffen in der Entwicklung sind und sowie die Studienplanung mit Hilfe neuer bildgebender Verfahren eine verbesserte Patientenselektion verspricht.

Die bisherigen klinischen Therapiemöglichkeiten sind unbefriedigend, da mit den bisher verfügbaren Medikamenten wie oben schon erwähnt nur über die Verbesserung der Durchblutungssituation in den Krankheitsprozeß eingegriffen werden kann.

Aufgrund der komplexen Pathophysiologie der fokalen zerebralen Ischämie wäre die Kombination der bisherigen Therapiemöglichkeiten mit einer neuroprotektiven Therapiestrategie sinnvoll, da diese unter Umständen Nebenwirkungen der Revaskularisierung sowie parallel ablaufende Pathomechanismen positiv beeinflussen könnte. So konnte z.B. mit einer Hemmung der Bildung Freier Radikale im Tierexperiment sowohl das Blutungsrisiko als auch der Gewebeschaden verringert werden (Asahi et al., 2000; Yang et al., 2000).

Dabei setzt man große Hoffnungen in Therapiemöglichkeiten, die am apoptotischen Neuronenuntergang ansetzen. Lange Zeit nahm man an, dass die Apoptose bei zerebraler Ischämie nur eine untergeordnete Rolle spielt. Neuere Untersuchungen zeigen jedoch zunehmend, dass ein großer Anteil des Zelluntergangs auf diesen Mechanismus zurückgeht. Vor allem die nach einer zerebralen Ischämie verzögert auftretenden Ausfallserscheinungen gehen auf apoptotische Vorgänge zurück, die noch Stunden und Tage nach dem eigentlichen Ereignis stattfinden. Gerade dieses verzögerte Eintreten von apoptotischem Zelluntergang macht ein therapeutisches Eingreifen interessant: Während die akuten Schädigungen in den allermeisten Fällen irreversibel sind, bis der betroffene Patient überhaupt therapeutisch versorgt werden kann, könnten durch eine effektive antiapoptotische Behandlung weitere Funktionsausfälle verhindert werden.

1.2 Apoptose

1.2.1 Apoptose versus Nekrose

Wenn Zellen aufgrund einer irreparablen Schädigung wie Sauerstoffmangel oder mechanischer Einwirkung, zugrunde gehen, spricht man von Nekrose. Histologisch beobachtet man ein Schwellen und Platzen der Zellen, weil der Wasser- und Elektrolythaushalt zusammenbricht. Als Folge davon werden intrazelluläre Substanzen und Mediatoren freigesetzt, die einen Entzündungsvorgang hervorrufen: Leukozyten wandern ein, phagozytieren die zugrundegegangenen Zellen und setzen weitere Mediatoren frei, so daß im weiteren Verlauf der Gewebeschaden durch diese sekundäre Entzündung noch viel größer werden kann als durch die direkte Schädigung (Ding et al., 1997).

Im Gegensatz dazu kann eine Zelle auch durch den Vorgang der Apoptose zugrundegehen. Diese Form des Zelltodes wurde zuerst von Kerr et al., 1972 beschrieben. Die Apoptose spielt eine wichtige Rolle in der Wachstumsregulation von Organismen. Während der Embryogenese und Organogenese gehen überflüssige Zellen durch Apoptose zugrunde; autoreaktive T-Zellen im Thymus und im Rahmen aktivierte T-Zellen werden nach der Immunantwort apoptotisch; auch die Entwicklung des Nervensystems wird durch apoptotischen Zelluntergang reguliert. Morphologisch kennzeichnend ist die Verdichtung und Anlagerung des Chromatins an die Kernmembran, und die Fragmentierung der Zelle zu membranumhüllten Vesikeln, den Apoptosekörpern, die von benachbarten Zellen oder Makrophagen phagozytiert werden; dadurch werden keine entzündungs-induzierenden Substanzen freigesetzt.

Zunächst dachte man, Apoptose fände ausschließlich während physiologischer Vorgänge statt, dann zeigten weitere Untersuchungen, daß auch geschädigte Zellen vor allem durch Apoptose zugrundegehen (Savitz und Rosenbaum, 1998). Geraten die Prozesse der Proliferation und Apoptose aus dem Gleichgewicht, führt dies zu Krankheiten; ein Zuviel an Apoptose herrscht vor bei neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer und Parkinson, außerdem bei

Epilepsie und Schlaganfällen; ein Zuwenig kann zu Autoimmunkrankheiten und Krebserkrankungen führen (Nicotera und Lipton, 1999).

1.2.2 Die Bcl-2-Proteine

Der apoptotische Zelluntergang scheint durch zwei Mechanismen ausgelöst zu werden: Die sogenannten Todesrezeptoren, dazu gehören der TNF-Rezeptor und CD95, leiten extrazelluläre Signale, die zur Apoptose führen, ins Zellinnere weiter. Der zweite Auslöser sind intrazelluläre Schäden, die, wenn sie ein gewisses Ausmaß erreichen, zum Zelluntergang führen. In die Vermittlung des intrazellulären Signals sind eine Familie von Proteinen eingeschaltet, deren Hauptvertreter Bcl-2 ist. Dabei handelt es sich um intrazelluläre Proteine, die auf noch unbekannte Weise das Ausmaß an intrazellulärem Schaden ausmachen und die Entscheidung, ob die Zelle überlebt oder mit Apoptose reagiert, beeinflussen. Die Familie der Bcl-2-ähnlichen Proteine beinhaltet sowohl pro- als auch antiapoptotisch wirkende Proteine, die untereinander heterodimerisieren können (Adams und Cory, 1998).

Bcl-2 verhindert neuronalen Zelluntergang nach Entzug von Wachstumsfaktoren wie NGF und IL-3 den Glutamat-induzierten Zelltod (Allsopp et al., 1993; Behl et al., 1993). Bald wurden weitere Moleküle entdeckt, darunter weitere antiapoptotisch wirkende wie Bcl-X_L, Bcl-w, Mcl-1 und A1, aber auch die Apoptose fördernde wie Bax, Bak, Bcl-X_S, Bad, Bid und Bik (Adams und Cory, 1998; Schulz et al., 1999).

Bcl-2 selbst, ein Apoptose-Inhibitor, sowie die meisten seiner Vertreter, ist als integrales Membranprotein in der Membran von Zellkern, ER und Mitochondrien lokalisiert (Celli, 1998) und reagiert vermutlich auf Schädigung dieser Kompartimente. Expression von Bcl-2 führt zu erniedrigten Konzentrationen an Sauerstoffradikalen, die eine wichtige Rolle während des Zelluntergangs spielen (Kane et al., 1993). Es beeinflusst auch den Kalzium-Haushalt der Zelle. Während apoptotische Zellen einen Kalzium-Ausstrom aus dem ER und damit verbunden einen Anstieg der Kalzium-Konzentration im Zytoplasma aufweisen, wird dies durch Überexpression von Bcl-2 dieser Kalzium-Ausstrom verhindert (Lam et al.,

1994). Charakterisiert sind die Mitglieder dieser Proteinfamilie durch den Besitz von mindestens einem von vier konservierten Gensequenzen, den sogenannten Bcl-2 homology domains (BH1-BH4), die für die Fähigkeit der Moleküle zu homo- und heterodimerisieren, verantwortlich sind (Adams and Cory, 1998).

Die Tatsache, dass die Vertreter der Bcl-2-Familie hauptsächlich Membranproteine sind und sowohl Calciumströme als auch den Austritt von Cytochrom c durch Membranen regulieren können, haben zu der Vermutung geführt, dass es sich dabei um Ionenkanäle handelt. Tatsächlich scheint die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur von Bcl-X_L diese Vermutung zu bestätigen; hierbei zeigte sich, dass Bcl-X_L Ähnlichkeit mit dem Aufbau bakterieller Toxine wie beispielsweise dem Diphtherietoxin, welches ebenfalls Ionenkanäle in Zellmembranen bildet, hat. Bcl-X_L bildet in Lipidmembranen einen Ionenkanal, der pH-abhängig ist und pH-Wert-abhängig permeabel für Kationen ist (Minn et al., 1997; Schendel et al., 1997). Reed konnte zeigen, dass Bcl-2, Bcl-X_L und Bax tatsächlich Kanäle in Lipidmembranen bilden (Reed, 1997).

Bcl-X_L zeigt große Ähnlichkeit in Größe und Struktur mit Bcl-2 und zeigt auch ähnliche Wirkungen. Beide Moleküle besitzen die BH4-Region (bcl-2 homology domain), die mit Apaf-1 interagiert und möglicherweise auf diese Weise dessen Bindung und Aktivierung von Procaspase 9 verhindert (Pan et al., 1998). Interessanterweise wird aus dem kodierenden Gen, *bcl-X*, durch alternatives Splicing ein weiteres Protein exprimiert, Bcl-X_S, welches die Wirkung von Bcl-2 und Bcl-X_L antagonisiert (Boise et al., 1993).

Ein weiterer Gegenspieler ist Bax. Dieses Molekül vermittelt Apoptose; nach IL-3-Entzug ist es ein notwendiger Faktor auf dem Weg zum Zelluntergang (Deckwerth et al., 1996). Die im Zytosol gelösten Moleküle bilden Homodimere, anschließend kommt es zur Translokation in die Mitochondrien, in dessen weiteren Verlauf es dann zur mitochondrialen Dysfunktion und caspase-unabhängigem Zelltod kommt. Durch Bcl-2 wird dies verhindert. Dabei scheint es ein direkter Gegenspieler zu sein; es dimerisiert mit Bcl-2 und antagonisiert konzentrationsabhängig dessen anti-apoptotische Wirkung (Oltvai et al., 1993;

Knudson und Korsmeyer, 1997; Gross et al., 1998). Daß diese Prozesse auch beim Neuronenuntergang bei fokaler zerebraler Ischämie eine Rolle spielen, zeigen Untersuchungen zum Nachweis dieser Mediatoren durch Isenmann et al., 1998: im infarzierten Areal waren die Konzentration von Bax deutlich erhöht, während die Konzentrationen der anti-apoptotischen Mediatoren abnahmen (Isenmann et al., 1998).

So entscheidet das Verhältnis der beiden Proteine zueinander, ob die Apoptose eingeleitet wird oder nicht.

Auch auf oxidativen Streß, der beim Zelluntergang ebenfalls eine wichtige Rolle spielt und dessen Einfluß bei zerebraler Ischämie intensiv beforscht wird, zeigen die Vertreter der Bcl-2-Familie Einfluß. Während der Reoxygenierung nach zerebraler Ischämie, aber auch nach vielfältigen weiteren Apoptosestimuli wie TNF- α oder Fas-Aktivierung kommt es zu einem rapiden Anstieg an reaktiven Sauerstoffradikalen (Banki et al., 1999). Eine wichtige Rolle in der Situation spielen Antioxidantien wie Glutathion anderen Thiolverbindungen als Schutz vor oxidativem Streß. Ein Mangel an Glutathion bei Ischämie/Reperfusion hat eine erheblich stärkere oxidative Schädigung von Membranproteinen zur Folge (Hall., 1997). Bcl-2 führt zur Verlagerung von Glutathion in den Zellkern, wodurch die Caspasenaktivität verringert wird, was vermutlich zur antiapoptotischen Wirkung von Bcl-2 beiträgt (Voehringer et al., 1998). Des weiteren wird die oxidative Schädigung von Zellbestandteilen wie beispielsweise die Lipidperoxidation durch reaktive Sauerstoffprodukte verringert (Lawrence et al., 1996; Papadopoulos et al., 1998). Bcl-X_L führt zu erhöhten Spiegeln an Glutathion sowie Ferritin und unterstützt so die Fähigkeit der Zelle, oxidativem Streß entgegenzuwirken (Xu et al., 1999; Bojes et al, 1997). Die antiapoptotische Wirkung von Bcl-2 und seinen Vertretern könnte also bei zerebraler Ischämie zum großen Teil über den Einfluß auf oxidativen Streß zurückgeführt werden.

1.3 Mitochondrien und Zelltod

Eine Schlüsselrolle bei nekrotischem oder apoptotischem Zelltod spielen die Mitochondrien. Der wichtigste Mechanismus ist die Freisetzung von Zytochrom c (Yang et al., 1997). Im Zytosol befindliches Zytochrom c aktiviert Caspasen und wirkt so apoptotisch. Zytochrom c bildet mit Caspase 9, das auch aus den Mitochondrien freigesetzt wird, und Apaf-1 das sogenannte Apoptosom, das die Caspase-Aktivierung in Gang setzt (Krajewski et al., 1999). Aber es kann auch unabhängig von der Caspasen-Aktivierung zu einer langsameren Form des Zelluntergangs führen, die charakterisiert ist durch den Zusammenbruch des mitochondrialen Elektronentransports mit Bildung freier Radikale und Abfall von ATP (Green und Reed, 1998).

Auf der Suche nach der Ursache für die Zytochrom c-Freisetzung hat man einen Membrankanal identifiziert, den sogenannten *permeability transition pore (PT pore)*, der in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert ist. Dessen Öffnen führt zu einer Änderung des H^+ -Gradienten mit Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung; außerdem kommt es zum Zusammenbruch des inneren Transmembranpotentials und zur osmotischen Schwellung der inneren Membran, was möglicherweise zur Ruptur der äußeren Membran und infolgedessen zur Freisetzung von Zytochrom c führt.

Wie die Bcl-2-Proteine genau in diese Vorgänge einzugreifen ist noch unklar. Im Moment geht man davon aus, dass in Säugetierzellen Bcl-2 die Freisetzung von Zytochrom c aus den Mitochondrien regulieren kann. Die Vertreter der Bcl-2-Familie sind häufig auf der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert, und wie oben schon erwähnt können Bcl-2, Bcl-X_L und Bax in künstlichen Membranen Ionenkanäle bilden. Ob dies auch in vivo der Fall ist wird derzeit intensiv untersucht (Green und Reed, 1998).

Des Weiteren könnte die Caspasenaktivierung auch dadurch verhindert werden, dass Vertreter der Bcl-2-Familie direkt mit Apaf-1 interagieren; zumindest kann

Apaf-1 mit Bcl-2 bzw. Bcl-X_L und Caspasen ebenfalls Komplexe bilden und so die Aktivierung der Reaktionskaskade verhindern.

Auch p53 ist in diesen Prozeß eingebunden. Neuere Untersuchungen zeigen, dass auch diese proapoptotische Substanz im Prozeß der Aktivierung von Mitochondrien integriert ist; offensichtlich kommt es zur Umverteilung von p53 in die Mitochondrien, was wiederum der Zytocrom c-Freisetzung vorgeschaltet ist. Diese Umverteilung ist wiederum durch Bcl-2 und Bcl-X_L hemmbar (Marchenko et al., 2000).

1.4 rt-PA

Auch bei der zerebralen Ischämie hat man aufgrund tierexperimenteller Studien die Bedeutung des verzögerten Zelltods erkannt und interessiert sich nun natürlich dafür, welchen Einfluß verschiedene Behandlungsmöglichkeiten darauf haben. In diesem Zusammenhang hat die Lysetherapie mit rt-PA zunehmend Interesse erregt, die, bisher innerhalb eines kurzen Zeitintervalls nach einem thrombembolischen Ereignis durchgeführt, ausschließlich unter dem Aspekt der Durchblutungsverbesserung eingesetzt wurde, nun aber auch auf ihren direkten Einfluß auf den verzögerten Neuronenuntergang untersucht wird.

1.4.1 Vorkommen und Wirkungen

t-PA (= tissue Plasminogen Aktivator) ist ein Glykoprotein von 70 kD und kommt in unterschiedlichen Konzentrationen in den meisten Geweben vor. Es gehört zu den Serinproteasen und wird vor allem von Endothelzellen synthetisiert und gebunden und bei Thrombenbildung freigesetzt. Freies t-PA wird schnell von Protease-Inhibitoren gebunden und in der Leber abgebaut, die Halbwertszeit beträgt nur 3 Minuten. t-PA besitzt bereits in seiner Vorform enzymatische Aktivität und wird im Organismus durch Plasmin oder Kallikrein in eine zweikettige Form, das eigentlich aktive Enzym, gespalten. Beide Formen lagern

sich an fibrin gebundenes Plasminogen an und wirken daraufhin fibrinolytisch; in Abwesenheit von Fibrin, das heißt auch im Plasma, ist t-PA kaum aktiv. PAI-1 ist der Inhibitor von t-PA (Glusa et al., 1998; Petrides, 1997).

Abgesehen von der thrombolytischen Wirkung scheint t-PA weitere biologische Funktionen zu haben; Knock-out-Mäuse für rt-PA zeigen Defizite während der Langzeit-Potenzierung im Hippokampus (Huang et al., 1996). Die Transkription von *t-PA* in Hirngewebe korreliert mit Neuritenwachstum, Regenerations- und Migrationsvorgängen, was dafür spricht, daß t-PA auch bei der neuronalen Plastizität eine Rolle spielt (Tsirka, et al., 1995).

1.4.2 Therapie:

rt-PA ist Standard-Thrombolytikum in der Frühphase des akuten Hirninfarkts, bei akutem Myokardinfarkt, außerdem bei tiefen Venenthrombosen und Lungenembolie.

Die erste große Studie zu den Effekten der rt-PA-Therapie zeigte keine eindeutigen Ergebnisse (Hacke et al., 1995). Eine im gleichen Jahr durchgeführte klinische Studie, die National Institute of Neurological Disorders and Stroke study (s. Literaturverzeichnis), belegte jedoch, daß die intravenöse Gabe von rt-PA innerhalb drei Stunden nach Auftreten von Symptomen mit einer signifikant günstigeren Entwicklung der neurologischen Ausfälle verbunden war, obwohl das Risiko einer zerebralen Blutung erhöht war. Daraufhin empfahl die FDA (Food and Drug Administration) die Therapie mit rt-PA als erster Substanz für den Einsatz bei akuter fokaler zerebraler Ischämie (Vivien und Buisson, 2000). Dennoch ist die thrombolytische Therapie nach wie vor umstritten. Eine Metaanalyse von 1997 zeigt deutlich die Ambivalenz der thrombolytischen Therapie nach einem zerebralen Insult: Trotz der Verbesserung der Ausfälle steigt das Risiko schwerwiegender, zum Teil tödlicher Hirnblutungen (Wardlaw et al., 1997).

1.4.3 Neurotoxizität:

Tierversuche zeigen deutlich, dass der thrombolytische Effekt von rt-PA bei arterieller Applikation nach thrombembolischen Gefäßverschlüssen zur Verringerung der Infarktgröße und damit der Ausfälle führt (Kilic et al., 2000). Davon abgesehen scheint rt-PA jedoch weitere Wirkungen zu haben: 1995 führte Tsirka et al. Experimente durch, die zeigen, daß rt-PA auch neurotoxische Eigenschaften besitzt und zum Zelluntergang durch Exzitotoxizität beiträgt; Knock-out-Mäuse für t-PA zeigen sich resistent gegen Exzitotoxin-induzierten Zelluntergang. Hier wurde zum ersten Mal deutlich, daß rt-PA in der Therapie des ischämischen Hirninfarkts eine ambivalente Rolle spielen könnte, und zahlreiche Forschungsgruppen beschäftigten sich mit den Einflüssen von t-PA auf die Entwicklung von ischämischen Infarkten, mit interessanten Ergebnissen:

Untersuchungen zum Exzitotoxin-induzierten Nervenzelluntergang im Hippokampus führten zur These der synergistischen Wirkung von Exzitotoxinen und Plasminogen-System-Aktivierung: Gabe von t-PA vergrößert und ein Defizit an t-PA bzw. Gabe von PAI-1 verringern den Neuronenuntergang im Hippokampus nach Kainat-Injektion (Tsirka et al., 1995). Laminin, ein extrazelluläres Protein, ist nach Injektion von Exzitotoxin nicht mehr nachweisbar und darauf folgt wiederum der Nervenzelluntergang; wenn t-PA fehlt, passiert das nicht; schließlich kann mit Anti-Laminin-Antikörpern die Interaktion von Laminin mit Neuronen gehemmt werden, dies hat den gleichen Effekt wie der Einfluß von t-PA: die Neurone gehen zugrunde (Chen und Strickland, 1997).

Daraufhin nahm man an, daß t-PA zum Nervenzelluntergang beiträgt, indem es Plasminogen aktiviert, welches wiederum Laminin spaltet, und dieses zum Zelluntergang führt.

Diese Theorie der ließ sich jedoch für Infarkte im Kortex nicht bestätigen:

Eine Fadenokklusion der MCA in t-PA-defizienten Mäusen führt zwar ebenfalls zu kleineren Infarkten (etwa 50%) als in Wild-Typ-Mäusen. Ersetzt man experimentell rt-PA, so entstehen viel größere Infarktvolumina (Wang et al., 1998); dies steht noch im Einklang mit den bisherigen Beobachtungen.

Knock-out-Mäuse für Plasminogen entwickeln nach MCA-Verschluß jedoch signifikant größere Infarkte, ebenso wie Tiere, deren Gen für PAI-1 defekt ist, während ein Mangel an α_2 -Antiplasmin, einem Inhibitor von Plasmin, zu kleineren Infarkten führt (Nagai et al., 1999). Diese Beobachtungen lassen vermuten, daß es einen weiteren Wirkungsmechanismus für t-PA gibt, der unabhängig von der Plasminogenaktivierung ist.

t-PA trägt außerdem zum Zelluntergang bei, indem es das Einwandern von Leukozyten in das ischämische Areal fördert. Durch t-PA exprimieren nämlich die Endothelzellen verstärkt ICAM-1, welches durch Adhäsion von Neutrophilen zum Entzündungsprozeß und damit zur Infarktentwicklung beiträgt (Stanimirovic et al., 1997; Kitagawa et al., 1999).

Schließlich scheint t-PA über die Aktivierung von Mikroglia zu weiterer Gewebsschädigung zu führen (Tsirka et al., 1997)

Um die Effekte des therapeutisch angewendeten rt-PA genauer zu untersuchen, wurden weitere Experimente an zerebraler Ischämie durchgeführt, bei denen die thrombolytische Wirkung von rt-PA keine Rolle spielt.

Eine globale Ischämie von 10 Minuten Dauer als auch eine fokale Ischämie von 60-120 Minuten durch experimentelle Gefäßverschlüsse zeigten keine signifikanten Größenunterschiede, wenn mit Beginn der Reperfusion rt-PA infundiert wurde (Klein et al., 1999). In einer weiteren Untersuchung waren bei den mit rt-PA behandelten Tieren die Infarkte sogar kleiner als in der Kontrollgruppe. Hier wurde bereits während der Ischämie rt-PA infundiert, was zu einer bedeutenden Verbesserung der Reperfusion im betroffenen Areal führte. Diese verbesserte Durchblutung verhindert vermutlich wiederum den Untergang von Nervengewebe und kaschiert die neurotoxischen Effekte (Kilic et al., 1999).

1.5 Protein-Transduktion

Um in einen Prozeß wie den verzögerten Zelluntergang nach fokaler zerebraler Ischämie effektiv eingreifen zu können, hat die Dauer, bis der Wirkstoff, in diesem Fall das antiapoptotisch wirkende Bcl_{XI}, an seinen Wirkort gelangt, großen Einfluß auf den Effekt. Dazu kommt, dass in diesen Versuchen der verwendete Stoff intrazellulär agiert, das heißt, er muß nicht nur in möglichst kurzer Zeit die Blut-Hirn-Schranke, sondern auch die neuronalen Zellmembranen passieren, um an seinen Wirkort zu gelangen. Eine Möglichkeit, um Proteine effizient in den Intrazellulärraum zu transportieren, die Kopplung an sogenannte Transduktionsproteine, wurde in dieser Untersuchung eingesetzt.

Schon seit längerem sind Proteine bekannt, die die Fähigkeit haben, biologische Membranen ohne Hilfe von Rezeptoren, Transportern oder Endozytose zu passieren. Diese Fähigkeit zur Transduktion wurde zuerst an dem im HIV vorkommenden TAT-Protein beobachtet (Green und Loewenstein, 1988; Frankel und Pabo, 1988). Später identifizierte man weitere Proteine mit dieser Eigenschaft, darunter den Transkriptionsfaktor Antp aus *Drosophila Antennapedia* (Joliot et al., 1991) und VP22 aus dem Herpes-Simplex-Virus (Elliott und O'Hare, 1997). Über den Mechanismus der Transduktion ist nur wenig bekannt. Man vermutet, daß eine Sequenz basischer Aminosäuren, die den drei obengenannten Proteinen gemeinsam ist, mit der negativ geladenen Membranoberfläche in Wechselwirkung tritt. Diese Sequenz ist für die Transduktion notwendig und wird PTD (Protein-Transduktions-Domäne) genannt. Außerdem scheint die helikale Sekundärstruktur nicht notwendig zu sein für die Transduktionsfähigkeit (Schwarze et al., 2000).

Fawell et al., 1994 konnte zeigen, daß die TAT-PTD chemisch mit einem Peptid verknüpft werden kann und auch in dieser Form ihre Eigenschaften behält und das betreffende Peptid ins Zellinnere transportiert.

Die PTDs können fast beliebig mit Peptiden, Nukleotiden und ganzen Proteinen wie der β -Galaktosidase (120 kD) verknüpft werden, um diese in Zellen einzuschleusen (Schwarze et al., 1999). Bisher war das Erreichen von wirksamen intrazellulären Konzentrationen durch Diffusion nur für Moleküle bis zu einer

Größe von ca. 600 D möglich. Außerdem werden in sehr kurzer Zeit maximale intrazelluläre Konzentrationen erreicht. Schwarze et al. konnte bereits 20 Minuten nach intraperitonealer Injektion bei Mäusen Fusionsproteine in 100% von Blutzellen, Milzgewebe, außerdem in Hirn- und Muskelgewebe nachweisen. Außerdem konnte er zeigen, daß die transduzierten Proteine auch biologisch aktiv sind. In sämtlichen Hirnregionen konnte biologisch aktive β -Galaktosidase nachgewiesen werden.

Wenn Fusionsproteine mit Hilfe der TAT-PTD durch biologische Membranen transduzieren, verlieren die Moleküle zumindest zeitweise ihre Aktivität, vermutlich weil bei dem Transduktionsprozeß die für ihre Funktion notwendige Faltung verändert wird und intrazellulär erst mit Hilfe von Chaperonen wieder ihre biologisch aktive Form erlangen (Bonifaci et al., 1995)

Diese neue Methode der Proteintransduktion zeigt einige wichtige Vorteile gegenüber herkömmlichen Anwendungsformen: Es können fast beliebig große Moleküle an ihren Zielort, das Zellinnere, gebracht werden. Außerdem ist die Zeitdauer bis zum Erreichen des Wirkortes sehr kurz. Des Weiteren stellt die Blut-Hirn-Schranke kein Hindernis dar, und die Substanz erreicht sämtliche Gewebe im Organismus.

1.6 Fragestellung

Verschiedene experimentelle Untersuchungen haben gezeigt, dass endogenes t-PA über verschiedene Mechanismen zum Nervenzelluntergang beiträgt. Welche Bedeutung diese Eigenschaft von t-PA im therapeutischen Einsatz hat, ist noch nicht eindeutig abzusehen. Die neurotoxische Wirkung von rt-PA beziehungsweise die Rolle, die diese möglicherweise bei der thrombolytischen Behandlung thrombembolischer Hirninfarkte spielt, ist allerdings von großer klinischer Bedeutung. Eine mögliche Konsequenz, die sich aus den Ergebnissen der klinischen Forschung ergibt, ist der Versuch, rt-PA zur Thrombolyse weiterhin anzuwenden, die unerwünschte neurotoxische Wirkung jedoch durch Kombination mit einem apoptose-hemmenden Medikament auszuschalten.

In der vorliegenden Arbeit wurde dieser Ansatz experimentell umgesetzt. Um die zellschädigende Wirkung von rt-PA zu antagonisieren, wurde Bcl-X_L verwendet, ein Molekül, dessen anti-apoptotische Wirkung zur Zeit Gegenstand intensiver Forschungsarbeit ist. Daß Bcl-2 zur Neuroprotektion bei zerebraler Ischämie beiträgt, wurde schon gezeigt: Bcl-2-Knockout-Mäuse weisen nach fokaler zerebraler Ischämie weitaus größere Infarkte auf als Wildtyp-Mäuse (Hata et al., 1999). Auch Unterdrückung der endogenen Bcl-2 Expression durch Antisense-Oligodesoxynukleotide führt zu größeren Infarkten (Chen et al., 2000).

Wir verwendeten Bcl-X_L, da sich gezeigt hat, dass diese Substanz bei zerebraler Ischämie einen deutlichen neuroprotektiven Effekt hat. Es antagonisiert vor allem oxidative Prozesse, die in wesentlichem Ausmaß zum apoptotischen Zelluntergang nach zerebraler Ischämie beitragen (Hall., 1997); (s.o.).

Eine Besonderheit ist die Applikationsweise: das Gehirn stellt aufgrund der Blut-Hirn-Schranke ein für eine medikamentöse Therapie schlecht zugängliches Organ dar. Um einen hohen Wirkungsgrad im betroffenen Gewebe zu erreichen, wurde daher die Bcl-2-DNA mit einer PTD verknüpft. Mit diesem Vorgehen erhält man die Möglichkeit, im Gehirn in sehr kurzer Zeit ausreichende Konzentrationen an Bcl-2 zu erreichen.

2. Material und Methodik

2.1 Versuchsgruppen

Alle experimentellen Versuche wurden gemäß den an der Universität Tübingen geltenden sowie den NIH Richtlinien zur Durchführung von Tierversuchen ausgeführt und von den zuständigen Stellen genehmigt (Az. des Vorhabens: N3/98). Als Versuchstiere wurden C57BL/6 J Mäuse mit einem Gewicht zwischen 21-28 g verwendet. Die Tiere wurden in die folgenden 5 Gruppen zu jeweils 5 Tieren eingeteilt:

- Gruppe 1: 90 Minuten Ischämie; Infusion von PBS
- Gruppe 2: 90 Minuten Ischämie; Infusion von rt-PA
- Gruppe 3: 90 Minuten Ischämie; Infusion von rt-PA und TAT-Bcl-X_L
- Gruppe 4: 90 Minuten Ischämie; Infusion von TAT-Bcl-X_L
- Gruppe 5: 90 Minuten Ischämie; Infusion von TAT-β-gal

Gruppe 2 und 4 dienen der Darstellung des Effektes der beiden für die Kombination gewählten Substanzen rt-PA und TAT-Bcl-X_L ; Gruppe 3 soll den Effekt der Kombination von TAT-Bcl- X_L mit der rt-PA-Behandlung deutlich machen; Gruppe 1 dient als Kontrolle für Gruppe 2 sowie Gruppe 5 als Kontrolle für Gruppe 4.

2.2 Substanzen

Die Kodierungssequenz von Bcl-X_L wurde aus der cDNA aus dem Gehirn von C57BL/6J-Mäusen mittels PCR amplifiziert. Dazu wurden die Primer 5'-cactgctcgagatgtctcagagcaaccggga-3' und 5'-cactggaattctcacttccgactgaagagtg-3' verwendet (92°C 2 min; 94°C 20s; 55°C 30s; 74°C 40s, 40 Zyklen; 74°C 7 min). Die aufgereinigten PCR-Fragmente wurden mittels Klonierung in die XhoI/EcoRI-Sequenz des pTAT-HA-Vektors (freundlichst zur Verfügung gestellt von Dr. Steven F. Dowdy, St. Louis) eingefügt. Die TAT-β-Galaktosidase und die TAT-GFP-Vektoren wurden ebenfalls von Dr. Steven F. Dowdy zur Verfügung gestellt.

Die verwendeten Substanzen rt-PA und TAT-Bcl-X_L wurden von Gunnar Dietz zur Verfügung gestellt.

2.3 Herstellung der Okklusionsfäden

Zur Herstellung der Okklusionsfäden wurde 8-0 monofiler Polyamidfaden (ETHILON; Ethicon, Norderstedt, Deutschland) verwendet. Von diesem wurden jeweils 11 mm lange Stücke abgeteilt und diese an einem Ende über eine Länge von 4 mm mit Silikon-2-Komponentenkleber (Xantopren; Heraeus Kulzer, Dormagen, Deutschland) beschichtet. Nachdem die Fadenstücke abgetrocknet waren, wurden unter dem Mikroskop die Fäden aussortiert, die nicht den gewünschten Durchmesser von $195 \pm 5 \mu\text{m}$ aufwiesen (Hata et al. 1998).

2.4 Anästhesie

Die Experimente wurden an männlichen C57BL/6 J Mäusen durchgeführt. Die Haltung der Tiere erfolgte unter kontrollierten Bedingungen mit Tag-Nacht-Rhythmus und Zugang zu Nahrung und Wasser ad libitum.

Die Anästhesie erfolgte über Inhalation mit Halothan. Die Narkose wurde eingeleitet mit 1,5% Halothan und weitergeführt mit 1% Halothan in 70% N₂O und 30% O₂.

Die Körpertemperatur wurde kontinuierlich rektal mittels einer Sonde gemessen und mit Hilfe einer Feedback-gesteuerten Heizunterlage, auf der das Tier während des Versuchs fixiert war, auf 36,5°C gehalten.

2.5 Laser-Doppler-Blutflußmessung

Um die Laser-Doppler-Blutflußmessung durchzuführen, wurde auf der linken Seite zwischen Mittellinie und linkem Ohr über der Schädelkalotte eine Inzision durchgeführt und die Oberfläche der Schädelkalotte freipräpariert. Die Laser-Sonde wurde über dem Versorgungsgebiet der Arteria cerebri media, d.h. 2 mm kaudal und 6 mm lateral des Bregma, mit Hilfe eines Tissue Adhesive fixiert (Aron Alpha; Toa, Tokyo, Japan). Die Blutflussmessungen wurden während des gesamten Versuchs sowie über die anschließenden 120 Minuten kontinuierlich angezeigt und aufgezeichnet. Veränderungen der Durchblutung wurden im Verhältnis zum Basiswert der Blutflusses vor Beginn der Fadenokklusion angegeben.

2.6 Tier-Präparation

Die zerebrale Ischämie wurde herbeigeführt durch die Methode der Fadenokklusion der Arteria cerebri media (Hara et al., 1996; Hata et al., 1998). Das Versuchstier wurde narkotisiert (s.o.) und in Rückenlage fixiert. Nach Inzision im Halsbereich in der Mittellinie wurde die linke Arteria carotis communis mit deren Aufzweigung in die Arteria carotis externa und interna freipräpariert. Die A. carotis communis und A. carotis externa wurden ligiert und

die A. carotis interna mit Hilfe einer Mikro-Gefäß-Klemme verschlossen. Außerdem wurde um die A. carotis interna eine Schlinge gelegt, um beim Entfernen der Gefäßklemme das Gefäß ligieren zu können. Nach Inzision der A. carotis communis wurde der Okklusionsfaden eingeführt und die Ligationsschlinge angezogen. Nach Entfernen der Gefäß-Klemme wurde der Okklusionsfaden 9 mm weit distal der Karotisaufzweigung bis zur Abzweigung der A. cerebri media vorgeschoben, somit wurde die Durchblutung des Media-Gebietes unterbunden. Als Kontrolle diente die Laser-Doppler-Blutflußmessung.

Vor Beendigung der Ischämie wurde sowohl die Schwanzvene und bei Versuchsgruppe 3 zusätzlich die Vena femoralis freipräpariert, ligiert und nach Inzision des Gefäßes ein Katheter eingeführt.

90 Minuten nach Beginn der Ischämie wurde der Okklusionsfaden wieder zurückgezogen, vollständig entfernt und die A. carotis interna ligiert. Gleichzeitig mit der Beendigung der Ischämie wurden im Verlauf von 10 Minuten mittels eines Dauerperfusors die Proben infundiert:

<u>Gruppe 1:</u>	Infusion von 0.2 ml PBS 0.1 M in die Schwanzvene
<u>Gruppe 2:</u>	Infusion von 0.2 ml rt-PA 10 mg/kg in die Schwanzvene
<u>Gruppe 3:</u>	Infusion von 0.2 ml rt-PA 10 mg/kg in die Schwanzvene sowie 0.6 nmol TAT-Bcl-X_L in 0.1 ml PBS 0.1 M in die Vena femoralis
<u>Gruppe 4:</u>	Infusion von 0.6 nmol TAT-Bcl-X_L in 0.1 ml PBS 0.1 M in die Vena femoralis
<u>Gruppe 5:</u>	Infusion von 0.6 nmol TAT-β-gal in 0.1 ml PBS 0.1 M in die Vena femoralis

Abbildung 1: Versuchsgruppen

2.7 Neurologisches Defizit

24 Stunden nach der Gefäßokklusion wurde bei den Versuchstieren der Grad der neurologischen Schädigung ermittelt und statistisch ausgewertet. Dazu wurde die folgende Einteilung verwendet (Hata et al., 1998):

0 =	normale Funktion, keine Beeinträchtigung
1 =	beim Anheben des Tieres am Schwanz erfolgt eine Beugung des Rumpfes und des kontralateralen Vorderbeines
2 =	in Ruhe unauffällige Haltung; beim Fortbewegen Abweichen zur kontralateralen Seite
3 =	in Ruhe Abweichen zur kontralateralen Seite
4 =	keine spontane motorische Aktivität

Abbildung 2: Gradeinteilung des Neurologischen Defizites

2.8 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid-Färbung

24 Stunden nach Beginn der Ischämie wurden die Tiere mit einer Überdosis Halothan betäubt und getötet. Das Gehirn wurde freipräpariert, entnommen und mit Hilfe einer Maushirn-Schnittform in Sagittalebene 5 2-mm dicke Schnitte angefertigt. Diese wurden in 2%iger 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid-Lösung 30 Minuten lang angefärbt (Bederson et al., 1986).

2.9 Ausmessung und Auswertung der Infarktgröße

Die Hinterfläche der gefärbten Gehirnschnitte wurde mit einer Kamera aufgenommen und digital gespeichert. Die Aufnahmen wurden anschließend mit Hilfe eines Auswertungssystems (MCID) folgendermaßen ausgewertet:

Die Infarktgrenzen wurden markiert, ebenso der Umfang der Hirnhemisphäre, und damit die Fläche des gesunden Gewebes der ipsilateralen Hemisphäre berechnet. Ebenso wurden die Gesamtflächen der linken und rechten Hemisphäre ermittelt. Anschließend wurde die Infarktfläche berechnet, indem der nicht infarzierte Anteil der ipsilateralen Hemisphäre von der Gesamtfläche der kontralateralen Hemisphäre subtrahiert wurde.

Durch Addition der Volumina der einzelnen Hirnschnitte, d.h. der Fläche des jeweiligen Hirnschnittes multipliziert mit der Schnittdicke von 2 mm, wurde das Infarktvolumen berechnet.

2.10 Statistik

Die Differenzen zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen bezüglich zerebralem Blutfluß, Infarktvolumen und Hirnödem wurden mit Hilfe des Faktors ANOVA mit anschließenden LSD-Tests berechnet. Alle Werte sind angegeben in der Form Mittelwert \pm S.E.M. Werte für $p < 0.05$ sind signifikant.

3. Ergebnisse

Alle Tiere überlebten den ersten Teil des Experiments, d.h. die Narkose und operativen Eingriff mit der Fadenokklusion der Arteria cerebri media über 90 Minuten. Während der 24 Stunden nach dem Eingriff starben zwei Tiere aus der Versuchsgruppe 3 (Infusion von rt-PA und TAT-Bcl-X_L).

3.1 Laser-Doppler-Blutflußmessung

Dargestellt sind die Aufzeichnungen des zerebralen Blutflusses während der 90 minütigen Ischämie sowie die darauffolgenden 120 Minuten.

Während der 90minütigen Ischämiephase unterliegen alle 5 Versuchsgruppen noch den gleichen Versuchsbedingungen. Der Abfall der zerebralen Durchblutung liegt jedesmal weit unter dem angestrebten Maximum von 30% und bleibt auch während der gesamten 90 Minuten fast konstant. Die Kontrollgruppe weist eine Durchblutungsrate von $8,99 \% \pm 3,18$ auf. Demgegenüber liegt die Durchblutungsrate der mit rt-PA behandelten Gruppe im Maximum bei $17,93 \% \pm 3,23$, ist also fast doppelt so hoch wie in der Gruppe ohne Behandlung. Infusion von TAT-Bcl-X_L führt zu Raten von $7,515 \% \pm 5,47$, die Kontrolle mit TAT-β-Gal zu Raten von $10,93 \% \pm 5,68$. Die Versuchsgruppe mit der Kombinationsbehandlung von rt-PA und TAT-Bcl-X_L liegt bei $11,126 \% \pm 3,84$. Insgesamt werden also vergleichbare Durchblutungsraten während der Ischämie erreicht, deren Variationsbreite ohne Effekt auf die Versuchseffekte bleiben dürfte. Einzig die Werte in der anschließend mit rt-PA behandelten Versuchsgruppe liegen deutlich höher als in den anderen, vor allem im Vergleich mit der Kontrollgruppe mit einer fast um 100% erhöhten Durchblutung.

Die Reperfusion führt in der Kontrollgruppe zu einer Mehrdurchblutung, die nach 10 Minuten bei $108,4 \% \pm 31,05$ liegt und nach 20 Minuten ihren Gipfel bei $136,2 \% \pm 60,35$ erreicht. Bei Infusion von rt-PA steigt die Durchblutung sehr steil an und persistiert auf höherem Niveau: Nach 10 Minuten beträgt die Rate mit $152,7 \% \pm 14,72$ bereits mehr als das Eineinhalbfache der Durchblutung von Ischämie. Der Gipfel mit $167,8 \% \pm 20,61$ wird nach 15 Minuten erreicht, dann erfolgt ein leichtes Absinken auf hohem Niveau. Insgesamt resultiert eine deutliche Mehrdurchblutung, bedingt vor allem durch den steilen Initialanstieg.

Die Behandlung nur mit TAT-Bcl-X_L zeigt einen gegenteiligen Effekt: es resultiert eine Minderdurchblutung im Vergleich zur Durchblutungsrate vor Ischämie. Nach 10 Minuten liegt die Rate bei $87,10 \% \pm 25,71$. Dabei ist die Reperfusionsskurve im Vergleich zu den schon besprochenen Gruppen deutlich abgeflacht. Der höchste Bereich liegt zwischen 20 und 25 Minuten nach Beginn der Reperfusion bei $94,26 \% \pm 23,10$.

Bei Kombinationsbehandlung wird nach 10 Minuten Reperfusion eine Rate von $145,71 \% \pm 32,35$ erreicht, mit einem Gipfel von $161,59 \% \pm 26,45$ nach 25 Minuten. Bei Kontrollbehandlung mit TAT-β-Gal erhält man nach 10 Minuten $92,98 \% \pm 76,41$. Erst nach 15 Minuten kommt es zu einer Mehrdurchblutung mit einem Gipfel von $111,76 \% \pm 105,35$. Es zeigt sich also ein Effekt im Vergleich zur Kontrollgruppe in Form einer während der gesamten Reperfusion verminderten Durchblutung bei ähnlichem Kurvenverlauf. Der bei Behandlung mit TAT-Bcl-X_L beobachtete Effekt, nämlich die deutliche Abflachung der Durchblutungskurve mit fast konstanten Werten, ist hier nicht auszumachen.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß rt-PA-Applikation zu einem steilen Anstieg mit einer Mehrdurchblutung von bis zu 162 % führt, während Bcl-X_L eine entgegengesetzte Wirkung, nämlich eine Minderdurchblutung und eine starke Abflachung der Reperfusionsskurve bewirkt. Auch in Kombination tritt diese Wirkung auf, wobei die Mehrdurchblutung an sich weniger beeinflußt wird, dafür jedoch der Kurvenverlauf in Form einer Abschwächung des bei Applikation von rt-PA auftretenden steilen Kurvenverlaufs.

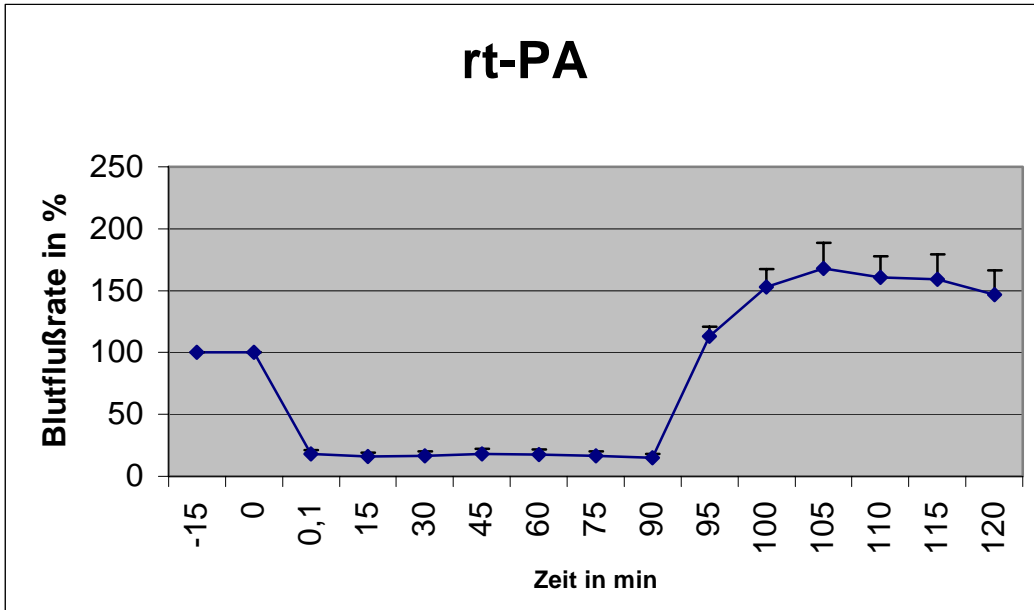


Abbildung 3: Diagramm Blutflussverlauf Versuchsgruppe mit rt-PA

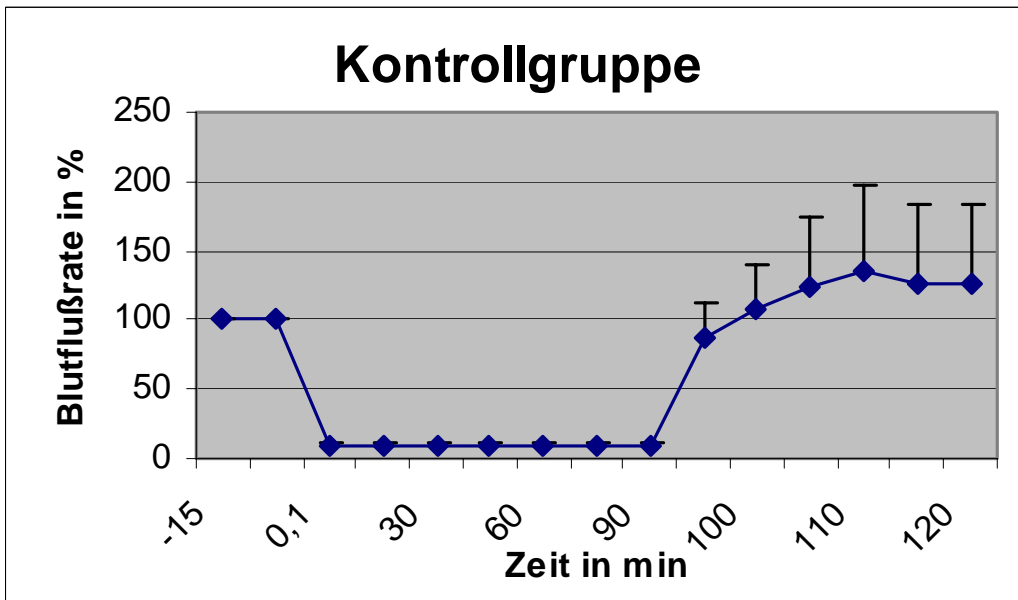


Abbildung 4: Diagramm Blutflussverlauf Kontrollgruppe

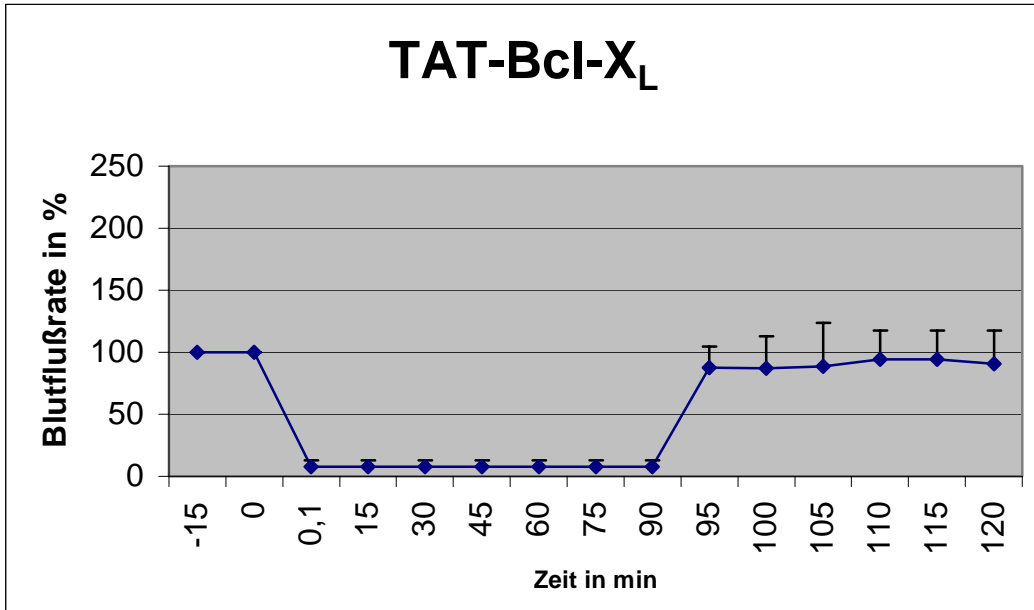


Abbildung 5: Diagramm Blutflussverlauf Versuchsgruppe mit TAT-Bcl-X_L

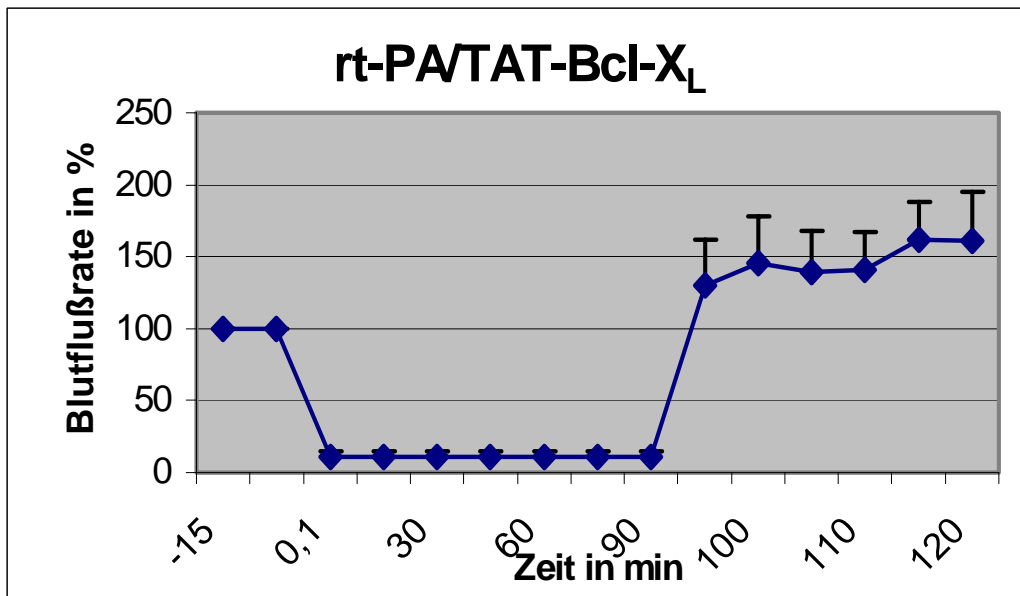


Abbildung 6: Diagramm Blutflussverlauf Versuchsgruppe mit rt-PA/TAT-Bcl-X_L

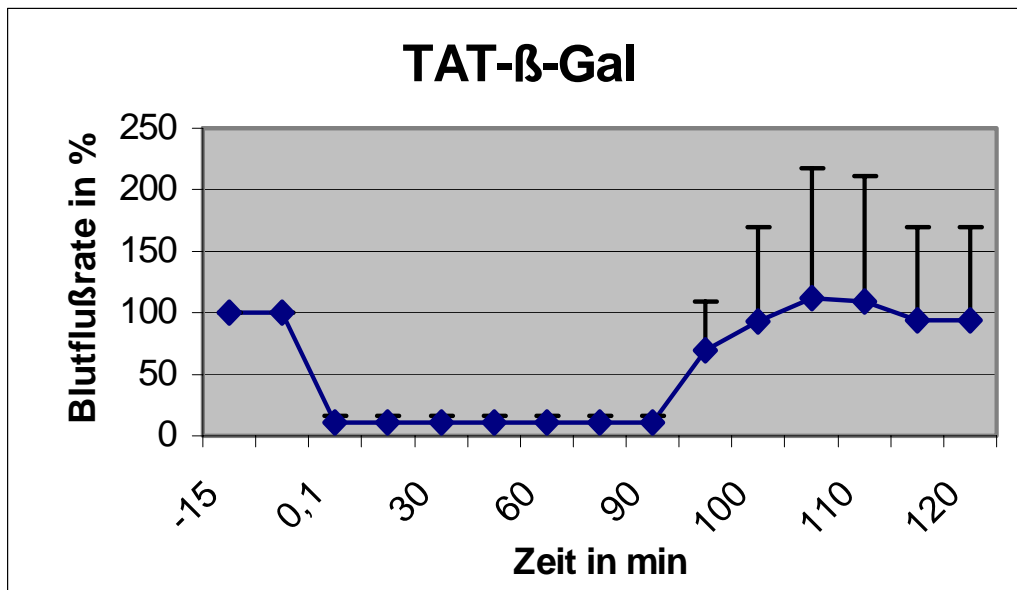


Abbildung 7: Diagramm Blutflussverlauf Versuchsgruppe mit β -Gal

3.2 Infarktvolu

Das Infarktvolu

Dagegen führte die Kombination von rt-PA mit TAT-Bcl-X_L zu einer Reduktion des Infarktvolu

35,56 % im Vergleich zur alleinigen Applikation von rt-PA. bzw. um 36,24 % im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Die mit TAT-Bcl-X_L behandelte Gruppe wies ein Infarktvolumen von 26,83 ± 10,00 mm³ auf. Schon die Anwendung von TAT-Bcl-X_L allein führte also schon zu einer statistisch signifikanten Verminderung der Infarktgröße um 46,56 % gegenüber der rt-PA-Versuchsgruppe bzw. um 47,12 % gegenüber der Vergleichsgruppe.

Die mit TAT-β-Gal behandelte Kontrollgruppe zeigte ein Infarktvolumen von 55,56 ± 7,83 mm³. Die Infarktminderung von TAT-Bcl-X_L gegenüber TAT-β-Gal ist somit ebenfalls statistisch signifikant.

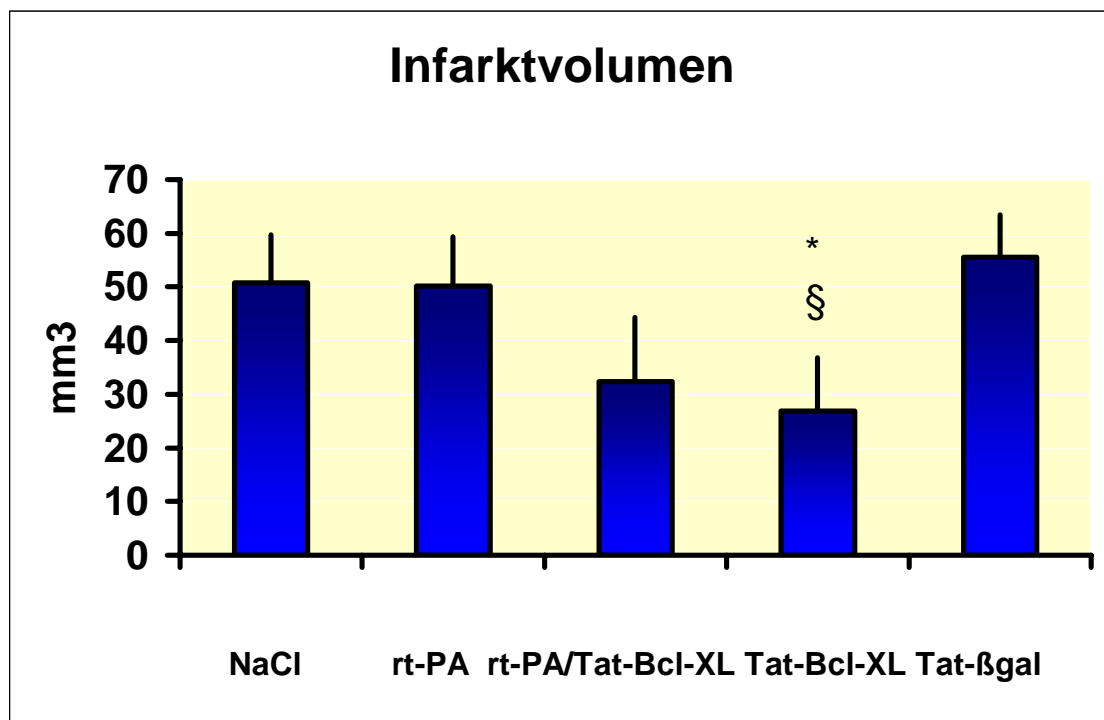


Abbildung 8: Diagramm Infarktvolumen der Versuchsgruppen

- * signifikant bezogen auf rt-PA
- § signifikant bezogen auf TAT-β-Gal

3.3 Neurologisches Defizit

Die neurologische Beeinträchtigung der verschiedenen Gruppen korreliert mit der Größe der Infarkte: Die rt-PA-Gruppe wies einen Score von 2 ± 0 auf, im Vergleich zur PBS-Gruppe mit einem Score von $1,75 \pm 0,31$ etwas stärker ausgeprägt. Die Kombination von rt-PA mit TAT-Bcl-X_L verringerte die Ausfälle wiederum gegenüber beiden Gruppen auf $0,87 \pm 0,375$. Auch hier führt TAT-Bcl-X_L allein mit $1,2 \pm 0,27$ schon zu einem positiven Effekt gegenüber der rt-PA-Gruppe bzw. der Vergleichsgruppe. Daß dieser Effekt auf die protektive Wirkung von Bcl-X_L zurückzuführen ist, zeigt sich auch hier im Vergleich zur TAT-β-Gal-Gruppe, die einen Score von $1,8 \pm 0,16$ aufweist. Hier ist analog zu den histologisch ermittelten Infarktgrößen kein Effekt von TAT-β-Gal zu erkennen, der Grad der Ausfälle ist durchaus vergleichbar den Werten der PBS-Gruppe. Dagegen führt TAT-Bcl-X_L im Vergleich zu TAT-β-Gal zu einer statistisch signifikanten Reduktion um 33,33 %.

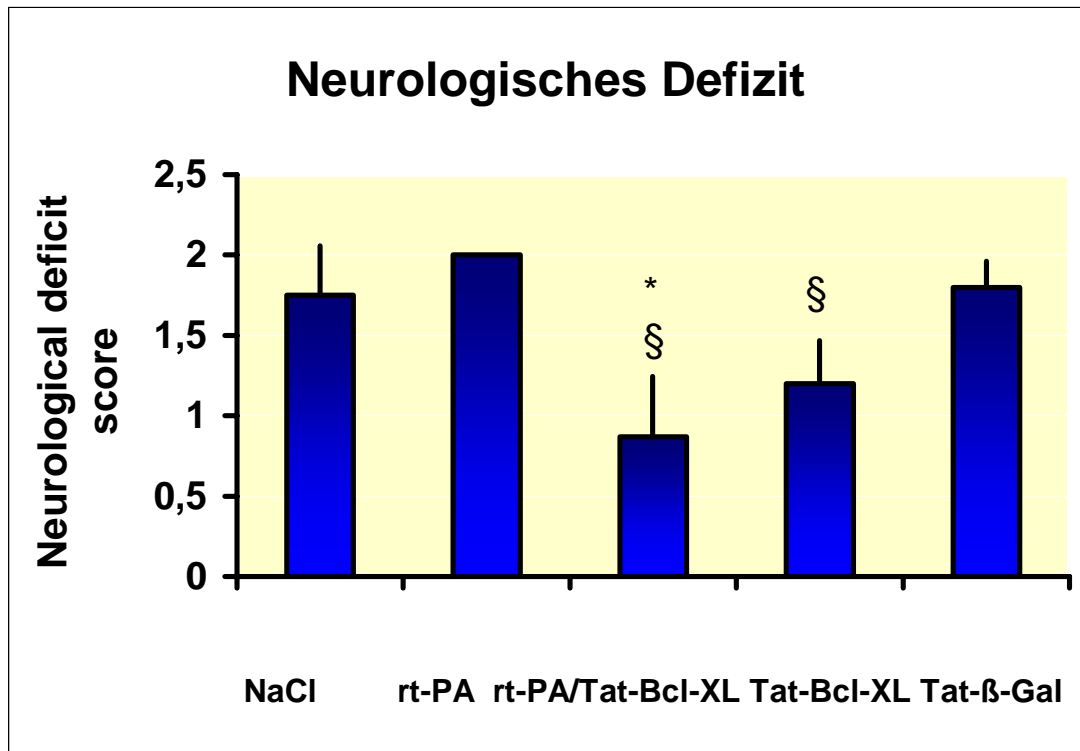


Abbildung 9: Diagramm Grad des Neurologischen Defizites der Versuchsgruppen

- * signifikant bezogen auf rt-PA
- § signifikant bezogen auf TAT-β-Gal

4. Diskussion

4.1 Wirkung von rt-PA

Die Ergebnisse dieser Studie stehen nicht im Einklang mit früheren Experimenten, die zeigen, daß t-PA-defiziente Mäuse bis zu 50% geringere Infarktvolumina aufweisen und die Infusion von rt-PA sowohl in Knockout- als auch Wildtyp-Mäusen zu einer deutlichen Vergrößerung der Infarkte führt (Wang et al., 1998). Vielmehr bestätigen sie die Beobachtung anderer Untersuchungen, die keine exzitotoxischen Effekte von rt-PA nachweisen konnten (Kilic et al., 1999). Allerdings konnte die letztere Arbeitsgruppe sogar einen protektiven Effekt beobachten, während hier kein signifikanter Einfluß einer rt-PA-Applikation gezeigt werden konnte.

Vermutlich spielt der Zeitpunkt der Applikation eine große Rolle. Eine Infusion von rt-PA während der Fadenokklusion der MCA führt zu einer deutlichen Hyperperfusion der betroffenen Hirnareale nach Wiedereröffnen des Gefäßes und damit zu einer verbesserten Durchblutungssituation, die zur schnellen Erholung des Zellstoffwechsels beiträgt (Kilic et al., 1999). Es wurde diskutiert, dass dieser Effekt die schädigende Wirkkomponente von rt-PA aufheben und so insgesamt zu einer Verbesserung gegenüber Vergleichsgruppen führen könnte. In dieser Untersuchung wurde erst mit Beendigung der Ischämie rt-PA infundiert. Bei diesem Vorgehen ist dieser durchblutungsfördernde Effekt nicht ausreichend, um zu einer protektiven Wirkung zu führen. Andererseits steht auch nicht die in den anderen schon erwähnten Untersuchungen beobachtete exzitotoxische Wirkung von rt-PA mit vergrößerten Infarktvolumina oder stärker ausgeprägten neurologischen Ausfällen im Vordergrund.

Dennoch wurde auch in dieser Untersuchung deutlich, daß rt-PA zu einer deutlichen Mehrdurchblutung des betroffenen Hirnareals führt, mit einem steilen

Anstieg schon in den ersten Minuten und einer weiteren Mehrdurchblutung auf hohem Niveau. Dennoch hat dieser Effekt von rt-PA keine messbare Auswirkung auf die Infarkt volumina bzw. den Grad der neurologischen Ausfälle. Entweder ist diese beobachtete Mehrdurchblutung von der schädigenden Wirkung unabhängig und wirkt dieser eventuell sogar entgegen, oder gerade diese initiale Mehrdurchblutung trägt zum zellschädigenden Effekt bei. Dahinter könnte die Theorie stehen, daß bei Reperfusion eines ischämisch geschädigten Areals das plötzliche Wiedereinsetzen des Stoffwechsels in geschädigten Zellen zu einer Anhäufung von toxischen Stoffwechselprodukten wie Sauerstoffradikalen führt, die wiederum zu sekundärem Zelluntergang führen.

4.2 Wirkung von Bcl-X_L

Gegenstand dieser Experimente war es, zu untersuchen, ob dieser nachgewiesene neurotoxische Effekt von rt-PA durch eine Kombination mit einer neuroprotektiv wirkenden Substanz verringert oder gar verhindert werden kann. Dazu wurde einer dritten Versuchsgruppe rt-PA und zusätzlich noch TAT-Bcl-X_L infundiert.

Einer Gruppe wurde zum Vergleich TAT-β-Gal appliziert, um differenzieren zu können, ob beobachtbare Effekte auf die Wirkung von Bcl-X_L zurückgeführt werden können, oder ob auch die Verwendung der TAT-PTD an sich schon einen Einflussfaktor darstellt. Der Vergleich mit dieser Kontrollgruppe macht deutlich, daß es tatsächlich zu einer Abnahme der Schädigung kommt, die auf die Bcl-X_L -Wirkung zurückzuführen ist. Die Tatsache, dass das Infarktvolumen der TAT-β-Gal –Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe keinen signifikanten Unterschied zeigt, sondern im Gegenteil bei gleicher Streubreite fast identisch ist, schließt einen unabhängigen neuroprotektiven Einfluß der TAT-PTD sicher aus. Bcl-X_L besitzt also trotz und unabhängig von der Kopplung mit der TAT-PTD anti-apoptotische Wirkung (Pan, 1998; Boise, 1993).

Auch die Unterschiede in der Ausprägung der neurologischen Funktionsausfälle machen dies deutlich: Die TAT-β-Gal-Versuchsgruppe zeigt Einbußen

vergleichbar der Kontrollgruppe, während TAT- Bcl-X_L zu einer ausgeprägten Minderung der Funktionsausfälle um ca. 30% führt. Die neuroprotektive Behandlung allein zeigt also übereinstimmend morphologisch und klinisch deutlich positive Wirkung.

4.3 Wirkung von Bcl-X_L bei Applikation von rt-PA

Die Kombinationsbehandlung mit rt-PA und Bcl-X_L führte zu einer signifikanten Minderung der Gewebsuntergangs gegenüber der Behandlung mit rt-PA allein bzw. gegenüber der Kontrollgruppe. Die Reduktion des Infarktolumens gegenüber den mit rt-PA behandelten Tieren betrug über 35%, gegenüber der Kontrollgruppe über 36 %, was eindeutig zeigt, daß durch Bcl-X_L die sowohl histologisch als auch klinisch eine neuroprotektive Wirkung erzielt wird, die von der Applikation von rt-PA nicht beeinflusst wird. Allerdings war in dieser Untersuchung kein signifikanter negativer Einfluß von rt-PA auf das Ausmaß der ischämischen Schädigung nachweisbar. Daher konnte die Frage, ob mit dieser Methode die andernorts beobachtete Wirkung der rt-PA-Applikation antagonisiert werden kann, nicht beantwortet werden.

Der Effekt auf die Reperfusion ist konsistent mit den Beobachtungen in den anderen Versuchsgruppen: Während die rt-PA-Infusion zu einem steilen Anstieg mit einer Mehrdurchblutung von bis zu 162 % führt, zeigt Bcl-X_L einen gegenteiligen Effekt, nämlich eine Minderdurchblutung und eine starke Abflachung der Reperfusionsskurve ohne betonten Peak der Durchblutung. Die Wirkung bei Kombination von rt-PA mit Bcl-X_L ist auch hier wiederum eine Abschwächung des bei rt-PA beobachteten Effekts: Während die Mehrdurchblutung an sich weniger verringert ist im Vergleich zur alleinigen Applikation von rt-PA, kommt es vor allem zu einem Abflachen der Steigung in den ersten Minuten der Reperfusion mit einer Verzögerung des Durchblutungsgipfels. Ob diese Beobachtung zum positiven Einfluß der Kombination von rt-PA mit dem Neuroprotektivum beiträgt, ist wiederum

diskussionswürdig, vor allem, da die Mehrdurchblutung sich quantitativ kaum unterscheidet, lediglich der Verlauf der Reperfusion sich verändert. Eventuell hat dieser langsamere Anstieg eine positive Wirkung, genauso gut könnte es sein, daß diese doch sehr schwachen Effekte keine große Rolle für die Entwicklung der Schädigung spielen bzw. in der Form keine große Aussagekraft haben. Um hier mehr Klarheit zu erhalten, wären zum einen genauere Messungen der Durchblutungssituation und zum anderen auch die Überwachung der Reperfusion über einen längeren Zeitraum sinnvoll.

Der Vergleich der neurologischen Defizite bestätigt wiederum die histologischen Daten: Nach der Kombinationsbehandlung lag der Neurological Deficit Score um 56,5 % niedriger als bei der rt-PA-Gruppe und um 50% niedriger gegenüber der Kontrollgruppe.

Damit stellt diese Behandlung eine effektive Strategie einer systemischen antiapoptotischen Therapie dar. Des weiteren wurden damit ein weiteres Mal die hervorragenden pharmakokinetischen Eigenschaften des verwendeten Vehikelproteins bestätigt: Die Protein-Transduktions-Domäne, mit der Bcl_{XL} gekoppelt war, garantiert ein Erreichen ausreichender Konzentrationen wirksamer Substanz intrazellulär trotz Blut-Hirn-Schranke in kürzester Zeit, ohne die Wirkung der transduzierten Substanz merkbar zu beeinflussen.

4.4 Wirkmechanismus

Noch unklar ist, wie die beiden Agentien auf molekularer Ebene wirken bzw. zusammenwirken. Ein großer Teil der Nervenzellen, die durch ischämische Schädigung apoptotisch zugrundegehend, tut dies aufgrund von sogenannten exzitotoxischen Prozessen, und man weiß, daß endogenes t-PA dabei eine essentielle Rolle spielt. Die therapeutische Anwendung von rt-PA führt zusätzlich zur Schädigung durch die Induktion exzitotoxischer Prozesse (Tsirka et al., 1995). Bcl-X_L agiert erst viel später im Apoptose-Prozeß, sozusagen auf der gemeinsamen Endstrecke, wo die Mitochondrien eine Schlüsselrolle spielen.

Neben der exzitotoxischen Aktivierung induzieren auch der Entzug von Wachstumsfaktoren oder intrazelluläre Schädigungen durch Entstehung freier Radikale und den Zusammenbruch des mitochondrialen Transmembranpotentials diesen Endprozeß. Damit verhindert Bcl-X_L unabhängig von rt-PA-Einwirkung apoptotische Nervenzelluntergänge und trägt zusätzlich zur Erhaltung von Nervengewebe bei ischämischer Schädigung bei. Man profitiert nicht nur von der Hemmung der rt-PA-Wirkung, sondern auch noch von der primär neuroprotektiven Eigenschaft, bzw. verhindert auch Einflüsse anderer apoptose-induzierender Prozesse bzw. Substanzen. Auf diese von rt-PA unabhängige Wirkung sind auch die Ergebnisse dieser Untersuchung zurückzuführen. Aufgrund des fehlenden Effektes der rt-PA-Applikation und der vergleichbaren signifikanten Reduktion der Werte gegenüber rt-PA- und Kontrollgruppe steht hier die primäre neuroprotektive Wirkung im Vordergrund. Damit ist dieser Therapieansatz theoretisch auf ein breites Feld pathologischer Prozesse übertragbar.

4.5 Ausblick

Die vorliegende Untersuchung zeigt, daß Bcl-X_L nicht nur antiapoptotisch wirkt, sondern daß diese Eigenschaft tatsächlich auch therapeutisch eingesetzt werden kann, um neurodegenerative Schäden durch Apoptose im klinischen Fall zu verhindern. Damit gewinnt die Option einer neuroprotektiven Therapie mit Bcl-X_L oder vergleichbaren Substanzen weiter an Interesse. Auch die Pharmakokinetik der TAT-PTD wurde wieder erfolgreich genutzt und stellt eine Option für zukünftige Therapieformen dar.

Ob dieser Therapieansatz auch Einfluß auf den schon mehrmals beschriebenen neurotoxischen Effekt von rt-PA hat, konnte mit dieser Untersuchung nicht beantwortet werden, ist aber weiterhin von Interesse. Wenn die therapeutische Anwendung von rt-PA tatsächlich bei klinischer Anwendung zu zusätzlicher Schädigung von Nervengewebe führt, wäre mit diesem Ansatz eine Möglichkeit

gegeben, diese Wirkungskomponente von rt-PA auszuschalten, um dennoch von seiner thrombolytischen Wirkung weiter zu profitieren. Die Überlegungen zum Wirkungsmechanismus führen außerdem zu dem Schluß, daß TAT-Bcl-X_L nicht nur in dieser Konstellation die rt-PA-induzierte Schädigung antagonisieren kann, sondern auch, in dieser Anwendungsform mit der TAT-PTD, potentiell die Option für die Behandlung weiterer neurodegenerativer Prozesse bietet. Allerdings sind noch weitere Untersuchungen notwendig, die dazu beitragen, die Rolle von Bcl-X_L und anderen Bcl-2 ähnlichen Proteinen aufzuklären und mögliche Nebenwirkungen der Therapie aufzudecken, bevor diese neue Therapiestrategie auch auf den Menschen übertragen werden kann.

5. Zusammenfassung

Eine Reihe neuerer Untersuchungen lassen vermuten, dass eine revaskularisierende Therapie, z.B. mit rekombinantem Gewebs-Plasminogen-Aktivator (rt-PA), nicht alleine ausreicht, um das minderperfundierte Gehirngewebe und speziell die Nervenzellen vor dem Zelltod zu schützen. Einige Studien lassen sogar vermuten, dass rt-PA eine neurotoxische Wirkkomponente besitzt. Da rt-PA schon seit Jahren klinisch eingesetzt wird, um akute zerebrale Ischämien zu therapieren, ist die Frage auch klinisch relevant, ob durch eine Kombinationstherapie die Effizienz der revaskularisierenden Therapie mit rt-PA gesteigert werden kann. Dazu bietet sich die direkte Kombination mit einer neuroprotektiv wirkenden Substanz an, die es ermöglicht, von der gewünschten Wirkkomponente von rt-PA, nämlich der Fibrinolyse, zu profitieren, während der schädigende Effekt ausgeschaltet wird.

Durch die Kombination mit dem anti-apoptotisch wirkenden Bcl-X_L in der vorliegenden Untersuchung wurde ein solcher Therapieansatz experimentell verwirklicht. Sowohl histologisch als auch ‚klinisch‘ konnte die Schädigung, ausgelöst durch eine experimentelle fokale zerebrale Ischämie, mit dieser Strategie der Kombinationsbehandlung signifikant reduziert werden. Dies war möglich durch die Kopplung von Bcl-X_L an eine TAT-PTD, ein Transfermolekül, das es ermöglicht, das therapeutisch wirksame Bcl-X_L in wenigen Minuten sowohl über die Blut-Hirn-Schranke als auch in den Intrazellulärraum zu transportieren, wo es seine antiapoptotische Wirkung entfaltet. Damit ist in diesem Versuch auch die Effektivität dieses Therapieansatzes zumindest tierexperimentell nachgewiesen.

Allerdings konnte im Unterschied zu Voruntersuchungen in dieser Studie ein signifikanter neurotoxischer Effekt einer rt-PA-Applikation nicht beobachtet

werden. Infolgedessen war es auch nicht möglich, einen hemmenden Einfluß von Bcl-X_L auf diesen Effekt nachzuweisen.

6. Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
ASS	Acetylsalizylsäure
ATP	Adenosintriphosphat
Az.	Aktenzeichen
CD	cluster of differentiation
CDNA	complementäre DNA
D	Dalton
d.h.	das heißt
ER	endoplasmatisches Retikulum
FDA	Food And Drug Administration
HIV	Human Immunodeficiency Virus
ICAM	intercellular adhesion molecules
IL-3	Interleukin 3
kD	Kilo-Dalton
MCA	middle cerebral artery; Arteria cerebri media
NGF	nerval growth factor
PAI	plasminogen activator inhibitor
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
PTD	Protein-Transduktions-Domäne
rt-PA	recombinant tissue Plasminogen Aktivator)
S.E.M.	Standardfehler
s.o.	siehe oben
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
t-PA	tissue Plasminogen Activator

7. Abbildungen und Tabellen

<i>Abbildung 1: Versuchsgruppen</i>	18
<i>Abbildung 2: Gradeinteilung des Neurologischen Defizites</i>	19
<i>Abbildung 3: Diagramm Blutflussverlauf Versuchsgruppe mit rt-PA</i>	23
<i>Abbildung 4: Diagramm Blutflussverlauf Kontrollgruppe</i>	23
<i>Abbildung 5: Diagramm Blutflussverlauf Versuchsgruppe mit TAT-Bcl-X_L</i>	24
<i>Abbildung 6: Diagramm Blutflussverlauf Versuchsgruppe mit rt-PA/TAT-Bcl-X_L</i>	24
<i>Abbildung 7: Diagramm Blutflussverlauf Versuchsgruppe mit β-Gal</i>	25
<i>Abbildung 8: Diagramm Infarktvolumen der Versuchsgruppen</i>	26
<i>Abbildung 9: Diagramm Grad des Neurologischen Defizites der Versuchsgruppen</i>	27

8. Literaturverzeichnis

- 1) Adams J.M., Cory S. (1998)
The Bcl-2 Protein Family: Arbiters of Cell Survival
Science, 281, 1322-1326
- 2) Allsopp T.E., Wyatt S., Paterson H.F., Davies A.M. (1993)
The proto-oncogene bcl-2 can selectively rescue neurotrophic factor-dependent neurons from apoptosis
Cell, 73, 295-307
- 3) Asahi M., Asahi K., Wang X., Lo E. H. (2000)
Reduction of tissue plasminogen activator-induced hemorrhage and brain injury by free radical spin trapping after embolic focal cerebral ischemia in rats
Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism, 20, 452-457
- 4) Banki K., Hutter E., Gonchoroff N.J., Perl A. (1999)
Elevation of mitochondrial transmembrane potential and reactive oxygen intermediate levels are early events and occur independently from activation of caspases in Fas signaling
Journal of Immunology, 162, 1466-1479
- 5) Bederson J.B., Pitts L.H., Germano S.M., Nishimura M.C., Davis R.L., Bartkowski H.M. (1986)
Evaluation of 2,3,5-Triphenyltetrazolium Chloride as a Stain for Detection and Quantification of experimental cerebral Infarction in Rats
Stroke, 17, 1304-1308

- 6) Behl C., Hovey L., Krajewski S., Schubert D., Reed J.C. (1993)
BCL-2 prevents killing of neuronal cells by glutamate but not by amyloid beta protein
Biochem Biophys Res Commun, 197, 949-956
- 7) Boise L.H., Gonzalez-Garcia M., Postema C.E., Ding L., Lindsten T., Turka L.A., Mao X., Nunez G., Thompson C.B. (1993)
bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death
Cell, 74, 597-608
- 8) Bojes H.K., Datta K., Xu J., Chin A., Simonian P., Nunez G., Kehrer J.P. (1997)
Bcl-xL overexpression attenuates glutathione depletion in FL5.12 cells following interleukin-3 withdrawal
Biochemical Journal, 325, 315-319
- 9) Bonifaci N., Sitia R., Rubartelli A. (1995)
Nuclear translocation of an exogenous fusion protein containing HIV Tat requires unfolding
AIDS, 9, 995-1000
- 10) Caplan L.R. (1991)
Of birds and nests and brain emboli
Rev Neurol, 147, 265-273
- 11) Caplan L.R. (1993)
Brain embolism, revisited
Neurology, 43, 1281-1287
- 12) Celli A., Que F.G., Gores G.J., LaRusso N.F. (1998)
Glutathione depletion is associated with decreased Bcl-2 expression and increased apoptosis in cholangiocytes
American Journal of Physiology, 275, G749-G757

- 13) Chen J., Simon R.P., Nagayama T., Zhu R., Loeffert J.E., Watkins S.C., Graham S.H. (2000)
Suppression of Endogenous bcl-2 Expression by Antisense Treatment Exacerbates Ischemic Neuronal Death
Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism, 20, 1033-1039
- 14) Chen Z.L., Strickland S. (1997)
Neuronal death in the hippocampus is promoted by plasmin-catalyzed degradation of laminin
Cell, 91, 917-925
- 15) Deckwerth T.L., Elliott J.L., Knudson C.M., Johnson E.M., Snider W.D., Korsmeyer S.J. (1996)
BAX is required for neuronal death after trophic factor deprivation and during development
Neuron, 17, 401-411
- 16) Del Zoppo G.J., Higashida R.T., Furlan A.J., Pessin M.S., Rowley H.A., Gent M. (1998)
PROACT: a phase II randomized trial of recombinant pro-urokinase by direct arterial delivery in acute middle cerebral artery stroke. PROACT Investigators.
Prolyse in Acute Cerebral Thromboembolism
Stroke, 29, 4-11
- 17) Diener, H.-C. (2000)
Zerebrale Ischämie, 271-294
in: Brand, T.; Dichgans, J.; Diener, H.-C.: Therapie und Verlauf neurologischer Erkrankungen; 3. überarbeitete Auflage, Kohlhammer, Stuttgart Berlin Köln
- 18) Ding Y., Hua Y., Duan A. (1997)
Clinico-transcranial Doppler sonography monitoring on vasospasm and delayed cerebral ischemia after resection of intracranial tumors
Zhonghua Wai Ke Za Zhi, 35, 522-526

- 19) Elliot G., O'Hare P. (1997)
Intercellular trafficking and protein delivery by a herpesvirus structural protein
Cell, 88, 223-233
- 20) Fawell S., Seery J., Daikh Y., Moore C., Chen L.L., Pepinsky B., Barsoum J. (1994)
Tat-mediated delivery of heterologous Proteins into Cells
Proceedings of the National Academy of Science of the USA, 91, 664-668
- 21) Frankel A.D., Pabo C.O. (1988)
Cellular Uptake of the Tat protein from Human Immunodeficiency Virus
Cell, 55, 1189-1193
- 22) Glusa E., Wenzel E., Forth W., Rummel W. 1998
Physiologische Bedeutung des Gerinnungs- und Fibrinolyse systems, 473-501
in: Forth W., Henschler D., Rummel W., Starke K.: Allgemeine und spezielle
Pharmakologie und Toxikologie;
7. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin Oxford
- 23) Green M., Loewenstein P.M. (1988)
Autonomous Functional Domains of Chemically Synthesized Human
Immunodeficiency Virus Tat *Trans*-Activator Protein
Cell, 55, 1179-1188
- 24) Green D.R., Reed J.C. (1998)
Mitochondria and apoptosis
Science, 281, 1309-1312
- 25) Gross A., Jockel J., Wei M.C., Korsmeyer S.J. (1998)
Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial
dysfunction and apoptosis
EMBO J, 17, 3878-3885
- 26) Hacke W., Kaste M., Fieschi C., Toni D., Lesaffre E., von Kummer R.,
Boysen G., Bluhmki E., Hoxter G., Mahagne M.H., et al (1995)

- Intravenous thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator for acute hemispheric stroke. The European Cooperative Acute Stroke Study (ECASS)
JAMA, 274, 1017-1025
- 27) Hall N.C., Carney J.M., Plante O.J., Cheng M., Butterfield D.A. (1997)
Effect of 2-cyclohexene-1-one-induced glutathione diminution on ischemia/reperfusion-induced alterations in the physical state of brain synaptosomal membrane proteins and lipids
Neuroscience, 77, 283-290
- 28) Hara H., Huang P.L., Panahian N., Fishman M.C., Moskowitz M.A. (1996)
Reduced brain edema and infarction volume in mice lacking the neuronal isoform of nitric oxide synthase after transient MCA occlusion
Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism, 16, 605-611
- 29) Hata R., Mies G., Wiessner C., Fritze K., Hesselbarth D., Brinker G., Hossmann K. A. (1998)
A Reproducible Model of Middle Cerebral Artery Occlusion in Mice: Hemodynamic, Biochemical, and Magnetic Resonance Imaging
Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism, 18, 367-375
- 30) Hata R., Gillardon F., Michaelidis T.M., Hossmann K.A. (1999)
Targeted disruption of the bcl-2 gene in mice exacerbates focal ischemic brain injury
Metab Brain Dis, 14, 117-124
- 31) Huang Y.Y., Bach M.E., Lipp H.P., Zhuo M., Wolfer D.P., Hawkins R.D., Schoonjans L., Kandel E.R., Godfraind J.M., Mulligan R., Collen D., Carmeliet P. (1996)
Mice lacking the gene encoding tissue-type plasminogen activator show a selective interference with late-phase long-term potentiation in both Schaffer collateral and mossy fiber pathways
Proceedings of the National Academy of Science of the USA, 93, 8699-8704

- 32) Isenmann S., Stoll G., Schroeter M., Krajewski S., Reed J.C., Bähr M. (1998)
Differential Regulation of Bax, Bcl-2, and Bcl-X Proteins in Focal Cortical Ischemia in the Rat
Brain Pathology, 8, 49-63
- 33) Joliot A. Pernelle C., Deagostini-Bazin H., Prochiantz A. (1991)
Antennapedia homeobox peptide regulates neural morphogenesis
Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 88, 1864-1868
- 34) Kane D.J., Sarafian T.A., Anton R., Hahn H., Gralla E.B., Valentine J.S., Ord T., Bredesen D.E. (1993)
Bcl-2 inhibition of neural death: decreased generation of reactive oxygen species
Science, 262, 1274-1277
- 35) Kerr J.F., Wyllie A.H., Currie A.R. (1972)
Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics
Br J Cancer, 26, 239-257
- 36) Kilic E., Hermann D.M., Hossmann K.A. (1999)
Recombinant tissue plasminogen activator reduces infarct size after reversible thread occlusion of middle cerebral artery in mice
Neuroreport, 10, 107-111
- 37) Kilic E., Hermann D.M., Hossmann K.A. (2000)
Recombinant tissue-plasminogen activator-induced thrombolysis after cerebral thromboembolism in mice
Acta Neuropathol, 99, 219-222
- 38) Kitagawa K., Matumoto M., Hori M., Yanagihara T. (1999)
Microcirculatory derangement and apoptosis in ischemia-reperfusion injury (in japanese)
Rinsho Shinkeigaku, 39, 1291-1294

- 39) Klein G.M., Li H., Sun P., Buchan A.M. (1999)
Tissue plasminogen activator does not increase neuronal damage in rat models
of global and focal ischemia
Neurology, 52, 1381-1384
- 40) Knudson C.M., Korsmeyer S.J. (1997)
Bcl-2 and Bax function independently to regulate cell death
Nat Genet, 16, 358-363
- 41) Krajewski S., Krajewska M., Ellerby L.M., Welsh K., Xie Z., Deveraux Q.L.,
Salvesen G.S., Bredesen D.E., Rosenthal R.E., Fiskum G., Reed J.C. (1999)
Release of caspase-9 from mitochondria during neuronal apoptosis and
cerebral ischemia
Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 96, 5752-5757
- 42) Lam M., Dubyak G., Chen L., Nunez G., Miesfeld R.L., Distelhorst C.W.
(1994)
Evidence that BCL-2 represses apoptosis by regulating endoplasmic
reticulum-associated Ca²⁺ fluxes
Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 91, 6569-6573
- 43) Lawrence M.S., Ho D.Y., Sun G.H., Steinberg G.K., Sapolsky R.M. (1996)
Overexpression of Bcl-2 with herpes simplex virus vectors protects CNS
neurons against neurological insults in vitro and in vivo
Journal of Neuroscience, 16, 486-496
- 44) Marchenko N.D., Zaika A., Moll U.M. (2000)
Death Signal-induced Localization of p53 Protein to Mitochondria
The Journal of Biological Chemistry, 275, 16202-16212
- 45) Minn A.J., Velez P., Schendel S.L., Liang H., Muchmore S.W., Fesik S.W.,
Fill M., Thompson C.B. (1997)
Bcl-x(L) forms an ion channel in synthetic lipid membranes
Nature, 385, 353-357

- 46) Nagai N., De Mol M., Lijnen H.R., Carmeliet P., Collen D. (1999)
Role of Plasminogen System Components in Focal Cerebral Ischemic Infarction: A Gene Targeting and Gene Transfer Study in Mice
Circulation, 99, 2440-2444
- 47) The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rtPA Stroke Study Group (1995)
Tissue Plasminogen Activator for Acute Ischemic Stroke
N Engl J Med, 333, 1581-1587
- 48) Nicotera P., Lipton S.A. (1999)
Excitotoxins in Neuronal Apoptosis and Necrosis
Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism, 19, 583-591
- 49) Oltvai Z.N., Milliman C.L., Korsmeyer S.J. (1993)
Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death
Cell, 74, 609-619
- 50) Pan G., O'Rourke K., Dixit V.M. (1998)
Caspase-9, Bcl-XL, and Apaf-1 form a ternary complex
Journal of Biol Chem, 273, 5841-5845
- 51) Papadopoulos M.C., Koumenis I.L., Xu L., Giffard R.G. (1998)
Potentiation of murine astrocyte antioxidant defence by bcl-2: protection in part reflects elevated glutathione levels
European Journal of Neuroscience, 10, 1252-1260
- 52) Petrides P.E. (1997)
Blut, 879-947
in: Löffler G., Petrides P.E.: *Biochemie und Pathobiochemie*;
5. Auflage, Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York

- 53) Reed J.C. (1997)
Cytochrome c: Can't live with it-Can't live without it
Cell, 91, 559-562
- 54) Savitz S.I., Rosenbaum D.M. (1998)
Apoptosis in Neurological Disease
Neurosurgery, 42, 555-574)
- 55) Schendel, S.L., Xie Z., Montal M.O., Matsuyama S., Montal M., Reed J.C.
(1997)
Channel formation by antiapoptotic protein Bcl-2
Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 94, 5113-5118
- 56) Schulz J.B., Weller M., Moskowitz M.A. (1999)
Caspases as treatment targets in stroke and neurodegenerative diseases
Ann Neurol, 45, 421-429
- 57) Schwarze S.R., Ho A., Vocero-Akbani A., Dowdy S.F. (1999)
In Vivo Protein Transduction: Delivery of a Biologically Active Protein into
the Mouse
Science, 285, 1569-1572
- 58) Schwarze S.R., Hruska K.A., Dowdy S.F. (2000)
Protein Transduction: unrestricted delivery into all cells?
Trends in cell biology, 10, 290-295
- 59) Stanmirovic D., Shapiro A., Wong J., Hutchison J., Durkin J. (1997)
The induction of ICAM-1 in human cerebrovascular endothelial cells
(HCEC) by ischemia-like conditions promotes enhanced neutrophil/HCEC
adhesion
Journal of Neuroimmunology, 76, 193-205

- 60) Tsirka S.E., Gualandris A., Amaral D.G., Strickland S. (1995)
Excitotoxin-induced neuronal degeneration and seizure are mediated by tissue plasminogen activator
Nature, 377, 340-344
- 61) Tsirka S.E., Rogove A.D., Bugge T.H., Degen J.L., Strickland S. (1997)
An extracellular proteolytic cascade promotes neuronal degeneration in the mouse hippocampus
Journal of Neuroscience, 17, 543-552
- 62) Vivien D., Buisson A. (2000)
Serine Protease Inhibitors: Novel Therapeutic Targets for Stroke?
Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism, 20, 755-764
- 63) Voehringer D.W., McConkey D.J., McDonnell T.J., Brisbay S., Meyn R.E. (1998)
Bcl-2 expression causes redistribution of glutathione to the nucleus
Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 95, 2956-2960
- 64) Wang Y.F., Tsirka S.E., Strickland S. Stieg P.E., Soriano S.G., Lipton S.A. (1998)
Tissue plasminogen activator (tPA) increases neuronal damage after focal cerebral ischemia in wild-type and tPA-deficient mice
Nature Medicine, 4, 228-231
- 65) Wardlaw J.M., Warlow C.P., Counsell C. (1997)
Systematic Review of Evidence on Thrombolytic Therapy for Acute Ischaemic Stroke
Lancet, 350, 607-614
- 66) Xu L., Koumenis I.L., Tilly J.L., Giffard R.G. (1999)
Overexpression of bcl-xL protects astrocytes from glucose deprivation and is associated with higher glutathione, ferritin, and iron levels
Anesthesiology, 91, 1036-1046

- 67) Yang J., Liu X., Bhalla K., Kim C.N., Ibrado A.M., Cai J., Peng T.I., Jones D.P., Wang X. (1997)
Prevention of apoptosis by Bcl-2: Release of cytochrome c from mitochondria blocked
Science, 275, 1081-1082
- 68) Yang Y., Li Q., Miyashita H., Howlett W., Siddiqui M., Shuaib A. (2000)
Usefulness of postischemic thrombolysis with or without neuroprotection in a focal embolic model of cerebral ischemia
Journal of neurosurgery, 92, 841-847

9. Danksagung

Besonderen Dank möchte ich meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Bähr aussprechen, für die Überlassung des Themas sowie für seine tatkräftige Unterstützung und sein Einsatz für meine Arbeit.

Herzlich danke ich auch E. Kilic für die Einweisung in das tierexperimentelle Arbeiten sowie für seine Unterstützung und Geduld in allen möglichen praktischen und theoretischen Fragen und Problemen, die während der Arbeit aufgetreten waren, für die hilfreichen fachlichen Diskussionen, schließlich auch für seine Hilfe bei der Verfassung der Arbeit.

Auch bei Herrn G. Dietz möchte ich mich bedanken, dass ich ihn zu jeder Tages- und Nachtzeit für die Klärung inhaltlicher, organisatorischer und technischer Fragen in Anspruch nehmen durfte.

Herrn Dr. D. Herrmann möchte ich für die Einweisung in die verschiedenen Labortechniken sowie für die Unterstützung bei der Literaturrecherche danken.

Mein besonderer Dank auch an alle Mitarbeiter der Arbeitsgruppe von Prof. Bähr sowie der anderen im Verfügungsgebäude der Morgenstelle beschäftigten Labormitarbeiter für die tatkräftige Unterstützung in Laborangelegenheiten und die gute Zusammenarbeit.

10. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name:	Yvonne Michaela Jerger
Geburtstag:	10. 08.1976
Geburtsort:	Donaueschingen
Staatsangehörigkeit:	Deutsch
Familienstand:	ledig
Eltern:	Gerhard und Marlies Jerger
Geschwister:	1 Schwester, Corinna Jerger

Schulischer Werdegang:

1983-1987	Grundschule Niedereschach
1987-1993	Progymnasium St. Ursula, Villingen-Schwenningen
1993-1996	Gymnasium am Romäusring, Villingen-Schwenningen
Abitur am 25.06.1996; Note 1,2 ; Fachrichtung Neusprachlich II (Englisch, Latein, Französisch)	

Studium:

Seit April 1997 Studium der Humanmedizin an der Universität Tübingen

- **Ärztliche Vorprüfung** am 30.03.1999; Note 1,33
- **1. Staatsexamen** am 23.03.2000; Note 2
- **2. Staatsexamen** am 16.09.2002; Note 1,33
- **3. Staatsexamen** am 04.11.2003; Note 1

Auslandsfamulatur in Lausanne, Schweiz, vom 1.4.`02 bis 15.5.`02

Sprachkenntnisse:

Englisch, Französisch, Spanisch, Latein

Besondere Interessen:

Radfahren, Bergwandern, Skifahren, Tanzen, Lesen, Gitarre spielen