



**Die Rolle von Chronophin bei Schlaganfall-induziertem
Funktionsverlust der Blut-Hirn-Schranke**

**The role of chronophin in stroke-induced
loss of function of the blood-brain barrier**

Dissertation zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades
der Graduate School of Life Sciences,
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,
Klasse Biomedizin

vorgelegt von

Christian Wilhelm

aus

Bad Soden am Taunus

Würzburg, 2018

Eingereicht am: 5. Februar 2018

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzender: Prof. Dr. Cynthia Sharma

1. Betreuer: Prof. Dr. Antje Gohla

2. Betreuer: Prof. Dr. Guido Stoll

3. Betreuer: Prof. Dr. Katrin Heinze

Tag des Promotionskolloquiums: 29. Juni 2018

Doktorurkunden ausgehändigt am:

Der Promovend ist Arzt.

Für meine Eltern Karin und Jürgen

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Klinische Bedeutung des ischämischen Schlaganfalls	1
1.1.1 Klassifikation	1
1.1.2 Epidemiologie	1
1.1.3 Ätiologie und Pathophysiologie.....	2
1.1.4 Symptomatik und Diagnostik	4
1.1.5 Therapie.....	4
1.1.6 Prognose	6
1.2 Zelluläre Mechanismen des ischämischen Schlaganfalls	7
1.2.1 Begriffsdefinition von Infarktkern und Penumbra.....	7
1.2.2 Exzitotoxizität.....	8
1.2.3 Periinfarkt-Depolarisationen	9
1.2.4 Inflammation	10
1.2.5 Apoptose.....	11
1.2.6 Ödembildung	13
1.3 Das Modell der Blut-Hirn-Schranke.....	15
1.3.1 Die neurovaskuläre Einheit.....	15
1.3.2 Aufbau und Funktion des junktionalen Komplexes.....	17
1.3.3 Regulierung der endothelialen Permeabilität.....	19
1.4 Das Aktin-Zytoskelett und das aktinbindende Protein Cofilin.....	20
1.5 Die Bedeutung der Pyridoxal-Phosphatase Chronophin	22
1.6 ROCK als Gegenspieler von Chronophin bei der Phosphoregulation von Cofilin.....	24
1.7 Ziel der Arbeit.....	24
2. Material und Methoden.....	25
2.1 Materialien	25
2.1.1 Versuchstiere.....	25
2.1.2 Chemikalien	27
2.1.3 Antikörper	29
2.1.4 Puffer und Lösungen	31
2.1.5 Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	34

2.1.6 Software und statistische Auswertung	36
2.2 Methoden	37
2.2.1 tMCAO-Schlaganfallmodell.....	37
2.2.2 Histologie und Immunhistochemie	40
2.2.3 SDS-PAGE und Immunblot	43
2.2.4 Endothelialzellkultur und Fluoreszenzmikroskopie	46
3. Ergebnisse.....	50
3.1 Chronophin ist in murinem Hirngewebe exprimiert.	50
3.2 In Hirnschnitten von WT und KO lässt sich immunhistochemisch kein Unterschied der Blut-Hirn-Schranke darstellen.....	51
3.3 Pdxp-mRNA ist nach Schlaganfall im Infarktareal herunterreguliert.	54
3.4 Chronophin ist nach Schlaganfall ebenfalls im Infarktareal herunterreguliert.	56
3.5 KO-Mäuse zeigen größere Infarktareale und Hirnödeme nach Schlaganfall als der WT.....	60
3.6 Der neurologische Status von KO-Mäusen ist nach Schlaganfall schlechter als beim WT.	63
3.7 Adherens und Tight Junctions von Endothelzellen zeigen keine mikroskopisch erkennbaren Unterschiede bei WT und KO.....	66
3.8 E-KO-Mäuse zeigen weder signifikant vergrößerte Infarktareale oder Ödeme noch einen geringeren neurologischen Status nach Schlaganfall als der WT.....	71
3.9 Auch bei A-KO- und P-KO-Mäusen zeigen sich keine signifikanten Unterschiede in Infarkt- und Ödemgröße sowie neurologischem Status nach Schlaganfall.....	75
3.10 Zusammenfassung der Ergebnisse	79
4. Diskussion	80
4.1 Das tMCAO-Schlaganfallmodell	80
4.1.1 Allgemeine Bedeutung.....	80
4.1.2 Chronophin im Schlaganfallmodell	81
4.2 Einfluss von Chronophin auf die Funktion der Blut-Hirn-Schranke .	84

4.2.1 Immunhistochemie und Immunblot.....	84
4.2.2 Endothelialzellkultur.....	87
4.3 Die Rolle von Chronophin beim Schlaganfall	88
5. Zusammenfassung	91
6. Summary.....	92
7. Verzeichnisse	93
7.1 Literaturverzeichnis	93
7.2 Abbildungsverzeichnis.....	106
7.3 Abkürzungsverzeichnis.....	108

Danksagung

Curriculum vitae

Eidesstattliche Erklärung / Affidavit

1. Einleitung

1.1 Klinische Bedeutung des ischämischen Schlaganfalls

1.1.1 Klassifikation

Der ischämische Schlaganfall ist als akutes fokales neurologisches Defizit definiert, dessen Ursache eine umschriebene Durchblutungsstörung des Gehirns ist.¹ Er macht mit mehr als 80 % den Großteil der Schlaganfälle aus. Von ihm abzugrenzen ist der hämorrhagische Schlaganfall, der Folge einer intrazerebralen Blutung ist.² Als transitorisch ischämische Attacke (TIA) wird eine vorübergehende Episode eines durch Ischämie hervorgerufenen neurologischen Defizits ohne akute Infarktbildung bezeichnet.³

1.1.2 Epidemiologie

Der Schlaganfall stellt weltweit die zweithäufigste Todesursache dar und wird nur von der koronaren Herzkrankheit übertroffen. Weltweit erleiden jährlich etwa 15 Millionen Menschen einen Schlaganfall.⁴ Die jährliche Schlaganfallinzidenz liegt bei etwa 200 pro 100 000 Einwohnern.⁵ Während die Inzidenz in den letzten vier Jahrzehnten in den Industrieländern um mehr als 40 % abgenommen hat, hat sie sich in Ländern mit geringem und mittlerem Einkommen verdoppelt.⁶ Dies lässt sich auf die stetige Alterung der Weltbevölkerung zurückführen.⁷ Männer sind in der Regel häufiger und in früherem Lebensalter betroffen als Frauen. Die absolute Zahl betroffener Frauen ist jedoch höher, da diese durchschnittlich ein höheres Lebensalter erreichen.⁸

Im Jahr 2012 starben weltweit 6,7 Millionen Menschen an den Folgen eines Schlaganfalls, was eine Zunahme um etwa 18 % seit dem Jahr 2000 bedeutet.⁹

1.1.3 Ätiologie und Pathophysiologie

Es gibt drei mechanistische Subtypen der zerebralen Ischämie:¹⁰

1. Thrombosen – Die Thrombose bezeichnet eine Obstruktion des intravasalen Blutflusses, die durch einen lokalen okklusiven Prozess einer oder mehrerer Blutgefäße hervorgerufen wird.

Die häufigste Ursache für thrombotische Schlaganfälle stellt die arteriosklerotisch bedingte Makroangiopathie dar.¹¹ Fibröses und muskuläres Gewebe überwächst die Subintima und atherosklerotische Plaques werden eingelagert. Thrombozyten binden an die Plaques und bilden Klumpen, an denen sich Fibrin, Thrombin und Gerinnsel ablagern.¹² Poststenotische Minderperfusion und Plaqueruptur mit Embolien können die Folge sein.¹³ Betroffen sind hauptsächlich die großen extra- und intrakraniellen Arterien.¹⁴

Weitere, seltenere Ursachen für zerebrale Ischämien mit thrombotischer Genese sind arterielle Vasokonstriktionen bei Migräne¹⁵ und arterielle Gefäßdissektionen¹⁶. Letztere können traumatischer Genese sein, im Zuge einer Grunderkrankung wie dem Fibrodysplasie-Syndrom auftreten sowie idiopathisch oder iatrogen verursacht sein.¹⁷

2. Embolien – Embolien stellen Gefäßverschlüsse durch über den Blutfluss eingeschwemmtes Material dar.¹⁸ Sie lassen sich nach ihrem Ursprung in verschiedene Gruppen einteilen:

Embolien kardialen Ursprungs sind für etwa ein Viertel aller zerebralen Ischämien ursächlich.¹⁹ Das Vorliegen eines ischämischen Schlaganfalls kardioembolischer Genese ist sehr wahrscheinlich bei Patienten, die unter kardialen Vorerkrankungen wie einem Vorhofflimmern oder einer Herzklappenerkrankung leiden.²⁰

Eine weitere Gruppe bilden Embolien arteriellen Ursprungs. Sie bestehen aus Gerinnseln, Thrombozyten-Aggregaten oder Fragmenten von erodierten Gefäßplaques, die meist in den proximalen Gefäßen lokalisiert sind.^{18,21}

Schließlich gibt es idiopathische Embolien, bei denen es keinen Hinweis für einen kardialen oder arteriellen Ursprung gibt und deren Genese unklar bleibt.

Einleitung

Selten sind paradoxe Embolien aus dem systemischen venösen Kreislauf aufgrund von kardialen Defekten wie einem persistierenden Foramen ovale oder einem Atriumseptumdefekt.²²

3. Globale Hypoperfusion – Bei einer globalen Hypoperfusion wird das Hirngewebe aufgrund eines geringen systemischen Perfusionsdruckes unzureichend mit Blut versorgt. Häufige Gründe sind ein Herzversagen sowie eine systemische Hypotonie aufgrund von Blutverlust oder Hypovolämie.²³ Das Gehirn wird hierbei diffus mangelversorgt, wobei besonders die Grenzzonen, also die terminalen Versorgungsgebiete zwischen den Gefäßgebieten, betroffen sind. Daher wird diese Infarktform als Grenzzoneninfarkt bezeichnet.²⁴

Eine weitere, eher seltene Schlaganfallursache sind Erkrankungen des blutbildenden Systems wie beispielsweise die Sichelzellanämie, Polyzythämia vera und essentielle Thrombozythämie. Trotz ihrer geringen Inzidenz sollten sie vor allem bei jungen Patienten bedacht werden, da die mit den Erkrankungen einhergehende gesteigerte Koagulabilität zur Thrombusbildung und sekundären Embolien führen kann.²⁵

Infolge der durch die genannten Mechanismen hervorgerufenen Hirnischämie kommt es zu einem temporären oder permanenten Gewebeschaden, dessen Ausmaß von Dauer und Lokalisation der Mangelversorgung abhängig ist und der zu einem nachfolgenden Hirnödem führen kann.²³

Da die makroangiopathischen Veränderungen für einen Großteil der ischämischen Schlaganfälle verantwortlich sind, lassen sich als wichtigste behandelbare Risikofaktoren die arterielle Hypertonie, der Diabetes mellitus, die Hyperlipidämie sowie der Nikotinabusus feststellen.^{26,27}

1.1.4 Symptomatik und Diagnostik

Zur Unterscheidung der Subtypen des Schlaganfalles liefern der Beginn sowie der Verlauf der Symptome einen wichtigen Hinweis.^{10,28} Demnach zeichnen sich embolische Schlaganfälle häufig durch ein plötzliches Auftreten und eine schnelle Besserung aus, wohingegen thrombotische Schlaganfälle eher eine fluktuierende Symptomatik präsentieren. Ebenso sind die Symptome des ischämischen Schlaganfalles von der Lokalisation der arteriellen Okklusion abhängig. Leitsymptome des ischämischen Schlaganfalls sind motorische und sensible Halbseitensymptome und Sprachstörungen sowie Gesichtsfeldausfälle. Schweregrad und Größe des Infarktes können mit der National Institute of Health Stroke Scale (NIHSS) abgeschätzt werden.²⁹ Die schon präklinisch anwendbare Cincinnati Prehospital Stroke Scale, bei deren Erfassung die Elemente faciale Symmetrie, Armmotorik und Sprache untersucht werden,³⁰ konnte in einer Studie trotz häufig unspezifischer Symptomatik bereits 88,9 % der ischämischen Schlaganfälle identifizieren.³¹

Nach allgemeiner klinischer sowie neurologischer Untersuchung erfolgt zum Ausschluss einer intrazerebralen Hämorrhagie und zur Infarktlokalisierung unmittelbar eine zerebrale Bildgebung mittels kranialer Computertomographie (cCT) oder Magnetresonanztomographie (cMRT).² Eine bildgebende Gefäßdiagnostik darf den Therapiebeginn nicht verzögern.³² Die Zeit bis zur anschließenden Reperfusionstherapie beeinflusst das klinische Ergebnis maßgeblich, indem die Penumbra, das Gebiet relativer Ischämie mit reversiblen Zelluntergang, wiederversorgt wird. Daher gilt die Devise „Zeit ist Hirn“.³³

1.1.5 Therapie

Die Therapie von Patienten mit akutem Schlaganfallereignis setzt sich aus fünf Komponenten zusammen:

1. Allgemeine Behandlung/Basistherapie: Voraussetzung für eine adäquate spezifische Therapie ist das Schaffen von optimalen physiologischen Parametern. Dies umfasst neben der Behandlung und Erhaltung der

Einleitung

respiratorischen und kardialen Funktion den Ausgleich des Flüssigkeits- und Elektrolythaushalts sowie die Kontrolle und Therapie des Blutglukosespiegels und des Blutdrucks.¹

2. Rekanalisierende Behandlung: Empfohlen wird die intravenöse thrombolytische Therapie mit rekombinantem gewebespezifischem Plasminogenaktivator (rtPA) innerhalb eines 4,5-h-Fensters, welche zu einem signifikant verbesserten klinischen Ergebnis führt. Nach diesem Zeitraum überwiegt das Risiko den Nutzen.³⁴ Weiterhin ist eine mechanische Thrombektomie bei Patienten mit klinisch relevantem neurologischen Defizit und großem arteriellem Gefäßverschluss im vorderen Kreislauf bis zu 6 Stunden nach Symptombeginn empfohlen, bei fehlenden Kontraindikationen in Kombination mit rtPA. Dabei dürfen die mechanische Thrombektomie und die intravenöse Thrombolyse einander nicht verzögern.³⁵

3. Frühe Sekundärprophylaxe:³⁶ Ziel der Sekundärprophylaxe ist die Vermeidung einer erneuten TIA oder eines erneuten Schlaganfalls nach einem stattgehabten zerebrovaskulären Ereignis. Hierunter fällt neben dem Einsatz von Thrombozytenaggregationshemmern wie Acetylsalicylsäure (ASS)³⁷ die Behandlung der Hyperlipidämie mit Statinen³⁸, die orale Antikoagulation mit Vitamin-K-Antagonisten oder neuen Antikoagulanzen wie Dabigatran bei Vorhofflimmern³⁹ sowie die Behandlung der Hypertonie mit antihypertensiven Substanzklassen⁴⁰.

4. Erkennung, Vorbeugung und Behandlung von Komplikationen: Schlaganfälle prädisponieren für eine Vielzahl von medizinischen Komplikationen wie Infekte der Atemwege und des Harntrakts, Beinvenenthrombosen und Dekubitalgeschwüre, die Morbidität und Mortalität beeinflussen.^{1,41} Besonders Dysphagie und eine verminderte Vigilanz verursachen gehäuft Aspirationspneumonien, die mit einer erhöhten Mortalität bei Schlaganfallpatienten einhergehen.⁴² Zur Vermeidung und Behandlung dieser Komplikationen werden Frühmobilisation, Schluckdiagnostik, frühzeitige Therapie

von bakteriellen Infektionen und eine ausreichende Hydratation empfohlen.¹ Eine chirurgische Dekompressionsbehandlung bei erhöhtem intrakraniellm Druck und Hirnödem muss frühzeitig nach Symptombeginn erwogen werden, da sonst der weitere Krankheitsverlauf negativ beeinflusst wird.⁴³

5. Frührehabilitative Therapien: Bereits im Akutkrankenhaus sollte mit physio- und ergotherapeutischen sowie logopädischen Maßnahmen begonnen werden, um die spontane Wiedergewinnung von ausgefallenen Hirnfunktionen zu unterstützen. In neurologischen Rehabilitationskliniken sollte die Behandlung fortgesetzt werden.⁴⁴ Hierbei profitieren Patienten mit milden neurologischen Ausfällen eher als solche mit schweren Defiziten, und zwar hauptsächlich in den ersten drei bis sechs Monaten nach dem Schlaganfallereignis.^{45,46}

1.1.6 Prognose

Der Schlaganfall ist die häufigste Ursache für eine dauerhafte und komplexe Behinderung im Erwachsenenalter sowie für die damit einhergehende Pflegebedürftigkeit.⁴⁷ Die Prognose nach einem Schlaganfall ist abhängig vom Ausmaß der Hirnschädigung. Etwa ein Drittel der Betroffenen stirbt an den direkten Folgen eines Schlaganfalls, ein weiteres Drittel wird pflegebedürftig.⁴ Nur bei etwa zwei Dritteln der überlebenden Schlaganfallpatienten kann nach einem initialen motorischen Defizit eine klinische Besserung erreicht werden.⁴⁶ Fünf Jahre nach dem primären Schlaganfallereignis ist mehr als die Hälfte der Patienten verstorben.⁴⁸

Der Schlaganfall ist eine Krankheitsentität mit weitreichenden Folgen für das weltweite Gesundheitssystem. Allein in Europa verursachen Schlaganfälle jährliche Kosten in Höhe von schätzungsweise 64,1 Milliarden Euro.⁴⁹

Zur Senkung der Krankheitsprävalenz sowie zur Verbesserung des Therapieergebnisses und Senkung der Krankheitslast sind primär- und sekundärpräventive Maßnahmen ebenso wie die Erforschung neuartiger Therapieansätze und die Weiterentwicklung bestehender Therapien notwendig.

1.2 Zelluläre Mechanismen des ischämischen Schlaganfalls

1.2.1 Begriffsdefinition von Infarktkern und Penumbra

Das menschliche Gehirn wird mit bis zu 20 % des Herzzeitvolumens versorgt.⁵⁰ Bei Verminderung oder Ausbleiben des zerebralen Blutflusses und damit der Minderversorgung mit Sauerstoff und Glukose stellt das betroffene Hirnareal nach kurzer Zeit seine Funktion ein, und das Gewebe erleidet einen Schaden.⁵¹ Dabei gibt es bei Mensch und Tier jeweils mehrere Perfusionsgrenzen, bei denen die Hypoperfusion die neuronale Integrität unterschiedlich beeinflusst.⁵² Befindet sich das Hirngewebe in einem Perfusionsbereich, in dem es einem Funktionsverlust unterliegt, jedoch seine Integrität behält und bei rechtzeitiger Reperfusion die Funktion wiedererlangt, wird es als Penumbra bezeichnet. Wird das Gewebe über einen längeren Zeitraum unterhalb einer kritischen Perfusionsgrenze unzureichend mit Blut versorgt, bleibt es irreversibel geschädigt, und es bildet sich ein Infarkt.⁵³ Beim Menschen reicht der Abschnitt der Penumbra von etwa 15 bis 8 ml Blut/100 g Hirngewebe/min. Unterhalb von 8 ml/100 g/min kommt es zum irreversiblen Zusammenbruch des Strukturstoffwechsels.⁵⁴

Das Konzept der Rekanalisierungstherapie beim ischämischen Schlaganfall zielt damit darauf ab, die Größe des Infarktkerns möglichst gering zu halten und die Funktion des Gewebes relativer Ischämie bestmöglich wiederherzustellen.⁵² Die Entwicklung der strukturellen Läsion im betroffenen Hirnareal bei fehlender Reperfusion ist in Abbildung 1 dargestellt.

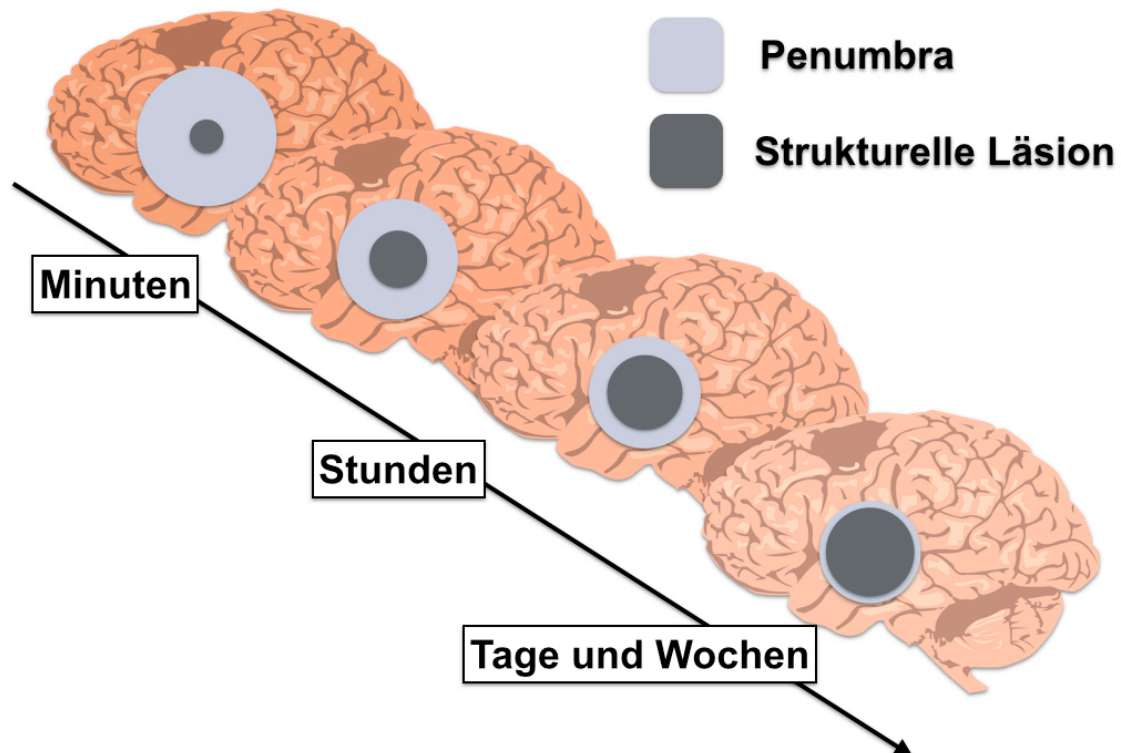


Abbildung 1: Rückgang des neurologischen Defizits als funktionelles Korrelat der Penumbra und Anstieg der strukturellen Läsion nach fokaler zerebraler Ischämie.

Zu Beginn eines Schlaganfalles repräsentieren die klinischen Symptome die zerebrale Funktionseinschränkung im Bereich der Penumbra und noch nicht zwangsläufig eine strukturelle Läsion. Im Laufe der Zeit können einige Regionen spontan oder aufgrund der Therapie ihre Funktion wiedererlangen, während die strukturelle Läsion wächst (adaptiert nach U. Dirnagl et al. 1999).

1.2.2 Exzitotoxizität

Ein wichtiger pathogenetischer Mechanismus zu Beginn des ischämischen Schlaganfalls ist die Exzitotoxizität. Sie beschreibt den schädigenden Einfluss auf Neurone durch hohe Dosen von exzitatorischen Neurotransmittern. Ein exzitatorischer Neurotransmitter, der eine besonders hohe Konzentration im Hirngewebe hat, ist Glutamat.

Die verminderte Versorgung der Neurone und Gliazellen mit Sauerstoff und Glukose beim ischämischen Schlaganfall führt zu einem Mangel an Energie in Form von Adenosintriphosphat (ATP). Infolgedessen kann das Ruhe-

membranpotential nicht mehr aufrechterhalten werden, und der aktive Ionentransport durch die Zellmembran versiegt. Die Zellen reagieren mit Depolarisationen und sezernieren vermehrt Glutamat. Glutamat bindet an Glutamat-abhängige Kalziumrezeptoren, deren Aktivierung zu einer intrazellulären Akkumulation von Kalzium führt.⁵⁵

Kalzium fungiert als Kofaktor für eine Vielzahl von Reaktionen des zellulären Metabolismus. Durch die hohe intrazelluläre Kalziumkonzentration werden Enzyme induziert, welche unter anderem Proteine des Zytoskeletts degradieren und freie Sauerstoffradikale bilden. Diese sind zytotoxisch, bringen die mitochondriale Atmungskette und damit die zelluläre Energiegewinnung zum Erliegen, beschädigen die zelluläre DNA und setzen dadurch apoptotische Prozesse in Bewegung.⁵¹

Infolge der Kalzium-Akkumulation erfolgt ein Wassereintritt entlang des osmotischen Gradienten, welcher die Zellen anschwellen lässt. Dies wird als zytotoxisches Ödem bezeichnet, weil es die Perfusion in Zellen der Penumbra weiter verschlechtert und so deren Übergang in den Infarktkern vorantreibt.⁵⁶

1.2.3 Periinfarkt-Depolarisationen

Ein weiterer zellschädigender Mechanismus, der schon früh beim ischämischen Schlaganfall einsetzt, sind Depolarisationen in der direkten Infarktumgebung. Diese werden als Periinfarkt-Depolarisationen bezeichnet.

Im Infarktkern folgt aufgrund des absoluten Versorgungsmangels auf die initialen Depolarisationen der Zelluntergang. Da in der Penumbra jedoch eine Restperfusion vorhanden ist, können die Zellen repolarisieren. Die fortschreitende extrazelluläre Akkumulation von exzitatorischen Neurotransmittern wie Glutamat führt zu repetitiven Depolarisationen, die Energie verbrauchen. Diese führen zum konsekutiven Neuronenuntergang und einer weiteren Größenzunahme des Infarktkerns.⁵⁷

1.2.4 Inflammation

In einer weiteren Phase der Ischämie-bedingten Zellschädigung kommt es zur vermehrten Expression von proinflammatorischen Genen. Auslöser sind die bestehende Hypoxie, die Zunahme freier Sauerstoffradikale und Aktivierung intrazellulärer Signalwege mit Kalzium als sekundärem Botenstoff.

So werden schon kurz nach Ischämiebeginn Astrozyten, Mikroglia, Endothelzellen und Leukozyten aktiviert.⁵² Astrozyten und Mikroglia ändern ihre Morphologie. Während erstere hypertrophieren, ziehen letztere ihre Fortsätze zurück und nehmen eine amöboide Morphologie an. Auf der Oberfläche der Endothelzellen nimmt die Anzahl an Adhäsionsmolekülen wie CD54 und verschiedenen Selektinen zu. Diese interagieren mit neutrophilen Granulozyten aus dem systemischen Blutkreislauf und ermöglichen deren transendotheliale Migration in das Hirnparenchym, was als Leukodiapedese bezeichnet wird. Makrophagen und Monozyten folgen den Neutrophilen nach und die Leukozyten akkumulieren im geschädigten Hirngewebe.⁵⁷

Entzündungsmediatoren wie der Plättchen-aktivierende Faktor (PAF), Tumornekrosefaktor α (TNF- α) und Interleukin 1 β (IL-1 β) werden von der geschädigten Mikroglia und den infiltrierenden Leukozyten sezerniert und treiben die entzündlichen Prozesse weiter voran.⁵⁸ So löst IL-1 β Fieber aus, steigert die Glutamat-vermittelte Exzitotoxizität und führt zur Bildung freier Sauerstoffradikale.⁵⁹

Weitere postischämische Schäden können entstehen, wenn die attrahierten Leukozyten sich in den Hirnkapillaren sammeln und mikrovaskuläre Obstruktionen verursachen. Letztlich sorgen die eingewanderten Immunzellen jedoch für eine Abtragung toter Zellen und ermöglichen die Geweberekonstruktion, die in den Tagen und Wochen nach der ischämischen Schädigung stattfindet.⁵⁷

1.2.5 Apoptose

Auf zellulärer Ebene gibt es für Penumbra und Infarktkern neben der Durchblutungssituation auch Unterschiede hinsichtlich des Zelluntergangs, welcher einen weiteren Mechanismus in der Pathogenese der zerebralen Ischämie darstellt:

In der Penumbra findet der Zelluntergang eher aufgrund von Apoptose statt, im Infarktkern kommt es hingegen hauptsächlich zu Nekrosen. Apoptose ist der programmierte Zelltod mit erhaltener Zellintegrität bei Fehlen einer Schädigung des umgebenden Gewebes. Bei der Nekrose kommt es durch absoluten Energiemangel zu einer Störung der zellulären Homöostase, die zur Zellyse, Entzündung und Ödembildung führt.

Erklären lässt sich dies dadurch, dass in der Penumbra eine mildere Ischämie herrscht, sodass genügend Energie zur Synthese von Apoptose-induzierenden Proteinen bereitgestellt wird.⁶⁰ Zu den Enzymen, die bei der Apoptose eine entscheidende Rolle spielen, gehört die Familie der Caspasen. Diese Proteasen bauen überlebenswichtige intrazelluläre Proteine ab und zerlegen die Zelle bis hin zu ihrem Tod. In einem Mausmodell der fokalen Ischämie wurde in für Caspase-1-defizienten Mäusen ein reduzierter Gewebeschaden im Vergleich zu Kontrollmäusen festgestellt.⁶¹ Dies verdeutlicht die Bedeutung der Apoptose bei der Entwicklung des ischämischen Schlaganfalls.

Der angenommene zeitliche Verlauf der schädigenden Mechanismen beim ischämischen Schlaganfall ist in Abbildung 2 dargestellt. Abbildung 3 illustriert die zellulären Prozesse, die durch diese Mechanismen ausgelöst werden und zum Zelluntergang führen.

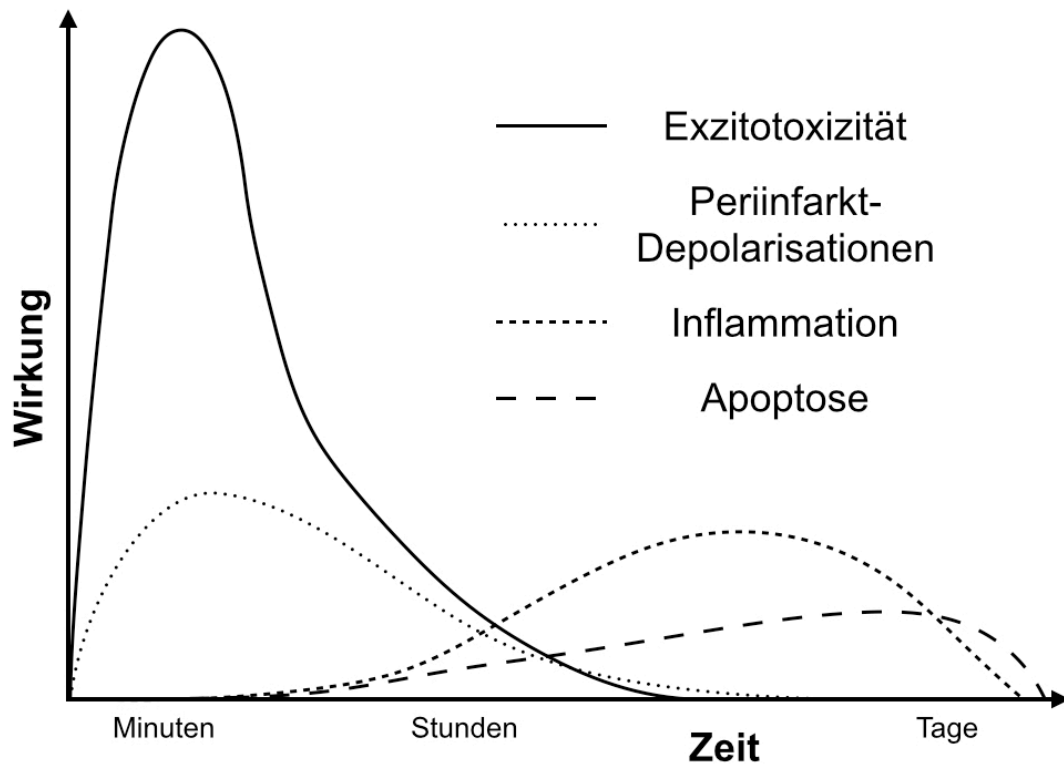


Abbildung 2: Schädigungskaskade bei zerebraler Ischämie.

Exzitotoxische Mechanismen schädigen Neuronen und Glia schon früh nach Eintreten des Perfusionsdefizits. Periinfarkt-Depolarisationen und später auch Inflammation sowie Apoptose tragen konsekutiv zum weiteren Gewebsuntergang bei. Während die x-Achse den zeitlichen Verlauf der Schädigungskaskade illustriert, soll die y-Achse die Auswirkung der einzelnen Mechanismen auf das Endresultat veranschaulichen (adaptiert nach U. Dirnagl et al. 1999).

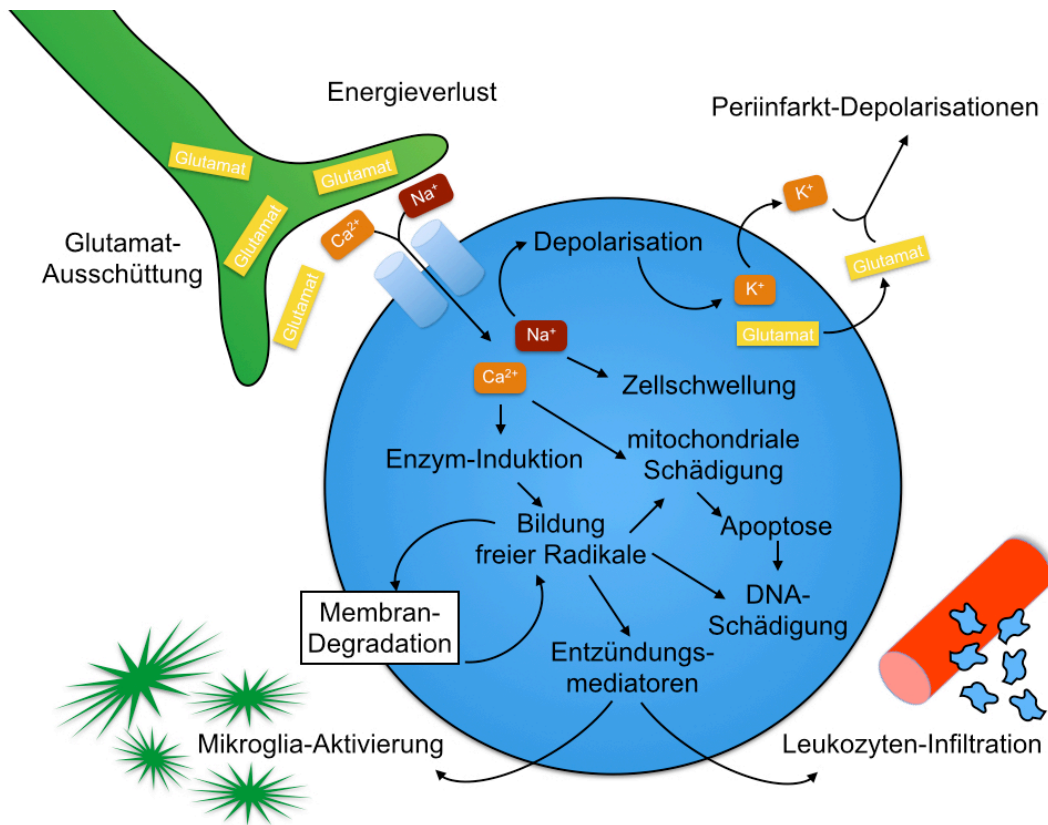


Abbildung 3: Mechanismen der Pathogenese beim ischämischen Schlaganfall.

Energieverlust führt zur Depolarisation von Neuronen und Ausschüttung von Glutamat. Dadurch aktivierte Glutamat-abhängige Rezeptoren erhöhen die intrazelluläre Konzentration von Ca^{2+} und Na^+ , während K^+ in den Extrazellularraum freigegeben wird. Die Diffusion von K^+ und Glutamat nach extrazellulär ruft eine Welle von Depolarisationen angrenzender Neurone hervor (Periinfarkt-Depolarisationen). Der osmotische Gradient lässt vermehrt Wasser in die Zelle eintreten und lässt die Zelle anschwellen (Ödembildung). Durch Ca^{2+} überaktivierte Enzyme generieren freie Radikale, die die Zellmembran, Mitochondrien und DNA schädigen und so den programmierten Zelltod (Apoptose) induzieren. Durch die freien Radikale werden Entzündungsmediatoren sezerniert, die Mikroglia aktivieren und eine Infiltration der Blutgefäße durch Leukozyten hervorrufen (adaptiert nach U. Dirnagl et al. 1999).

1.2.6 Ödembildung

Infolge der vier beschriebenen Mechanismen kommt es nach einer zerebralen Ischämie zusätzlich zu einer Ödembildung. Das Hirnödem ist definiert als eine pathologische Flüssigkeitsakkumulation im Hirngewebe mit einer absoluten Zunahme des Hirnvolumens.⁶²

Einleitung

Es lässt sich in drei Phasen einteilen: Zunächst kommt es zu einem zytotoxischen Hirnödem. Dann folgt ein vasogenes Ödem mit Integritätsverlust der Blut-Hirn-Schranke (BHS). Die dritte Phase der endothelialen Dysfunktion führt zur hämorrhagischen Konversion.⁶³

Das zytotoxische Ödem ist eine Folge der Exzitotoxizität mit intrazellulärer Kalzium-Akkumulation und nachfolgender osmotischer Wassereinlagerung und wurde bereits beschrieben. Zusätzlich kommt es zum Einbau von Aquaporinen in die Zellmembran. Diese stellen Kanalproteine dar, die den Wasserdurchtritt erleichtern.⁶⁴ Die Blut-Hirn-Schranke ist hierbei noch intakt. Doch durch die intrazelluläre Elektrolyt- und Wassereinlagerung wird das Volumen des Extrazellulärraums vermindert. So entsteht durch das zytotoxische Ödem ein hydrostatischer und onkotischer Druckgradient zwischen Intravasal- und Extrazellulärraum, der als treibende Kraft für das nun folgende vasogene Ödem dient.⁶³ Für dessen Entwicklung ist jedoch eine zweite Voraussetzung notwendig, und zwar die Permeabilität der BHS.⁶⁵ Auf deren Aufbau, Funktionsweise und Integritätsverlust wird im folgenden Kapitelabschnitt eingegangen. Resultat der Permeabilität der BHS ist ein Ultrafiltrat des Blutes: Größere Bestandteile wie Serumproteine werden über die Gefäßgrenze in den zerebralen Extrazellulärraum transportiert, während zelluläre Bestandteile wie Erythrozyten noch nicht hindurchgelangen.⁶⁶

Erst in der dritten Phase der Ödembildung kommt es zur endothelialen Dysfunktion mit vollständigem Verlust der Integrität der BHS. Intravasales Blut tritt mit all seinen Bestandteilen ungehindert in das Hirnparenchym aus. Diese hämorrhagische Konversion tritt jedoch nur in etwa 30 bis 40 Prozent der ischämischen Schlaganfälle auf und ist häufig mit der Reperfusion nach therapeutischer Thrombolyse assoziiert.

Die Ödembildung erreicht ihr Maximum im Zeitraum von 24 bis 72 h nach dem ischämischen Schlaganfall.⁶⁷ Der Übergang zwischen den verschiedenen Phasen der Ödembildung ist dabei abhängig von Länge und Grad der Hypoxie. Demzufolge ist die Entwicklung einer hämorrhagischen Konversion eher im Bereich einer reperfundierten Kapillare des Infarktkerns als im Randgebiet der Penumbra zu erwarten.⁶³

1.3 Das Modell der Blut-Hirn-Schranke

Als Blut-Hirn-Schranke wird die Grenzfläche zwischen Blutkreislauf und Hirnparenchym im zerebralen Kapillar-Netzwerks bezeichnet. Als semipermeable Barriere dient sie dazu, das neuro-parenchymatöse Mikromilieu aufrechtzuerhalten. Dabei hält sie potentiell schädigende Moleküle vom Hirngewebe fern und stellt dessen adäquate Versorgung mit Nährstoffen sicher, indem sie Schwankungen in der Blutzusammensetzung abpuffert.⁶⁸

1.3.1 Die neurovaskuläre Einheit

Die BHS ist das funktionelle Korrelat eines dynamischen Verbundes von verschiedenen Zelltypen, den man als neurovaskuläre Einheit (NVE) bezeichnet (Abb. 4).

Die direkte Begrenzung des Gefäßlumens bilden die Endothelzellen. Diese sind frei von den für Endothelien sonst typischen Fenestrations und über den junctionalen Komplex miteinander verknüpft. Dadurch wird der parazelluläre Transport von hydrophilen Molekülen verhindert und die Hirnkapillaren erlangen eine bis zu 100-fach verringerte Permeabilität im Vergleich zu peripheren Kapillaren.⁶⁹ Die strukturelle Grundlage hierfür ist die Dichtigkeit der endothelialen Zell-Zell-Kontakte, welche im folgenden Kapitel erläutert werden.

Eine weitere beteiligte Zellart sind die Perizyten. Sie sind in unregelmäßigen Abständen an der vom Lumen abgewandten endothelialen Membran angeheftet. Über ihre Funktion ist bisher wenig bekannt. Aufgrund ihres Gehalts an kontraktilen Proteinen wird ihnen eine Beteiligung an der Regulierung des Blutflusses zugeschrieben.⁷⁰ Da das Fehlen von Perizyten im Mausmodell zu endothelialer Hyperplasie und einer abnormen Gefäßmorphologie führt, vermutet man eine Funktion bei der Bildung, Reifung und Aufrechterhaltung des zerebralen Endothels und der BHS.⁷¹

Endothelzellen und Perizyten sind von der Basalmembran umgeben. Diese besteht aus verschiedenen Strukturproteinen der extrazellulären Matrix wie Kollagen und Laminin und hat für die umgebenden Zellen über Matrixadhäsionsproteine eine stabilisierende Funktion.⁵⁰

Einleitung

An die Basalmembran grenzen als weitere Zellart der NVE die Astrozyten, die mit ihren Endfüßen die Kapillare ummanteln. Die Astrozytenendfüße sind das Bindeglied zwischen Kapillarendothel und Hirnparenchym. Durch Kalziumvermittelte Signaltransduktion werden die Endothelzellen bei der Modulierung der Permeabilität der BHS unterstützt. Über membranäre Ionenkanäle und Transportproteine wie die Aquaporine werden der Wasser- und Elektrolytgehalt des Gehirns reguliert und die Homöostase der Neurotransmitter sichergestellt.^{69,72}

Die lokal angrenzenden Neuronen stellen einen weiteren Bestandteil der NVE dar. Ihre Nähe zu den benachbarten nichtneuronalen Zellen ermöglicht die parakrinen Wirkungen, die für die Funktionalität des Gehirns notwendig sind. Dazu zählen die Regulation des Blutflusses, Matrix-Interaktionen, Inaktivierung von Neurotransmittern und neuro- sowie angiogenetische Effekte.⁷³

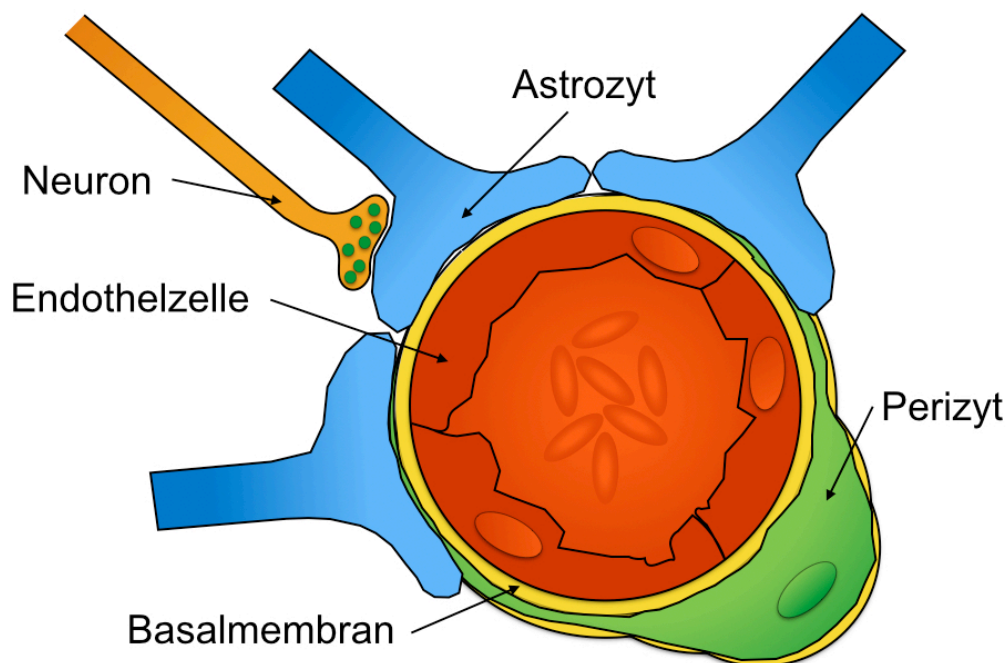


Abbildung 4: Neurovaskuläre Einheit der Blut-Hirn-Schranke.

Die Blut-Hirn-Schranke besteht zum Gefäßlumen hin aus dicht verschlossenen kapillären Endothelzellen, die von einer Basalmembran und den Perizyten sowie perivaskulär von astrozytischen Endfüßen umhüllt werden. Über die Astrozyten entsteht die Verbindung zu den Neuronen. Der dynamische Verbund dieser Zelltypen wird als neurovaskuläre Einheit bezeichnet (adaptiert nach N. Abbott et al. 2006).

1.3.2 Aufbau und Funktion des junctionalen Komplexes

Die zerebralen Endothelzellen der BHS sind eng miteinander verbunden und verhindern so den freien Übertritt von gelösten Substanzen aus dem Blut ins Hirngewebe und umgekehrt.⁵⁰ Sie sind über den junctionalen Komplex miteinander verbunden, der sich aus Tight (TJ) und Adherens Junctions (AJ) zusammensetzt (Abb. 5). Möglicherweise sind auch Gap Junctions (GJ) beteiligt, diese dienen jedoch der interzellulären Kommunikation und nicht der Permeabilitätsbarriere.

AJ vermitteln das Aneinanderhaften der Endothelzellen und sind an der zellulären Kontaktinhibition sowie an der Regulierung der parazellulären Permeabilität beteiligt.⁷³ Sie sind basal der TJ lokalisiert und bestehen zum Großteil aus dem vaskulär-endothelialen Cadherin (VE-Cadherin), einem endothelspezifischen und Kalzium-regulierten Membranprotein. Mit ihrer intrazellulären Domäne sind sie über Catenine und weitere Proteingruppen mit dem Aktin-Zytoskelett verbunden. Extrazellulär binden zwei VE-Cadherine benachbarter Endothelzellen aneinander und erreichen so einen lockeren Zusammenschluss.⁷⁴ Zwar kann der alleinige Verlust der AJ schon zur Permeabilitätssteigerung der BHS führen,⁷⁵ jedoch sind es primär die TJ, die für die geringe parazelluläre Permeabilität verantwortlich gemacht werden.

Die TJ befinden sich an der apikalen Spitze der lateralen Plasmamembran. Wie die AJ bestehen sie aus Transmembranproteinen, die über akzessorische Proteine eine Verbindung mit dem Aktin-Zytoskelett der Endothelzellen herstellen.⁷⁶

Zu den transmembranären Proteinen der TJ zählen die junctionalen Adhäsionsmoleküle (JAM), Occludin und die Claudine. Bei den akzessorischen zytoplasmatischen Proteinen spielen Zonula Occludens-Proteine (ZO) die wichtigste Rolle.⁷³

Von JAM sind bisher drei Unterformen bekannt. JAM-1 besteht aus einer kurzen intrazellulären, einer einzelnen transmembranären sowie einer langen extrazellulären Domäne, die den Interzellulärspalt bis zum korrespondierenden

Einleitung

JAM überspannt. JAM sind auch in Lymphozyten und Thrombozyten exprimiert und an der Leukodiapedese sowie der Thrombozytenaggregation beteiligt.⁷⁷

Occludin besteht aus vier transmembranären Domänen mit zwei extrazellulären Schleifen. Im Hirnendothel ist es kontinuierlich entlang der Zellgrenzen exprimiert.⁷⁸ Occludin erhöht zwar den elektrischen Widerstand von epithelialen TJ,⁷⁹ sein Verlust ist jedoch interessanterweise durch eine gesteigerte Expression von anderen Proteinen der TJ kompensierbar.⁸⁰ Es wird angenommen, dass Occludin die Barrierefunktion der TJ eher reguliert und unterstützt als sie selbst aufzubauen.

Die Claudine hingegen scheinen die wichtigste Funktion in der Aufrechterhaltung der Impermeabilität der BHS zu haben.⁶⁸ Aus der Proteinfamilie der Claudine wurden beim Menschen über 20 Mitglieder identifiziert, von denen Claudin-1, -3, -5 und -12 in der BHS beschrieben wurden.⁸¹ Wie Occludin beinhalten sie vier transmembranäre Domänen mit zwei extrazellulären Schleifen, über die sie in Verbindung stehen.⁷³ Jedes Claudin reguliert die Durchlässigkeit der BHS für Moleküle bestimmter Größen.⁵⁰ Claudin-5 verhindert den parazellulären Durchtritt von Molekülen < 800 Dalton und sein Verlust führt im Mausmodell 10 h postnatal zum Tod der Tiere. Somit spielt es für die Barrierefunktion der TJ eine zentrale Rolle.⁸²

Nach ischämischem Schlaganfall werden Claudin-5 und Occludin im Hirnendothel herunterreguliert und führen zu einer Öffnung der BHS.⁸³

Von den submembranären ZO sind die drei Proteine ZO-1, -2 und -3 bekannt. Sie besitzen drei Domänen, mit denen sie an der zellulären Signaltransduktion teilnehmen und die transmembranären TJ-Proteine mit dem Aktin-Zytoskelett verbinden.⁶⁸ Den größten Stellenwert für die Stabilität der TJ hat hierbei ZO-1, da seine Dissoziation vom junctionalen Komplex eine erhöhte Permeabilität der TJ verursacht.⁷³ ZO-2 wurde ebenfalls in der BHS gefunden, scheint funktionell redundant zu ZO-1 zu sein und kann dessen Aufgaben in Epithelien übernehmen.⁸⁴

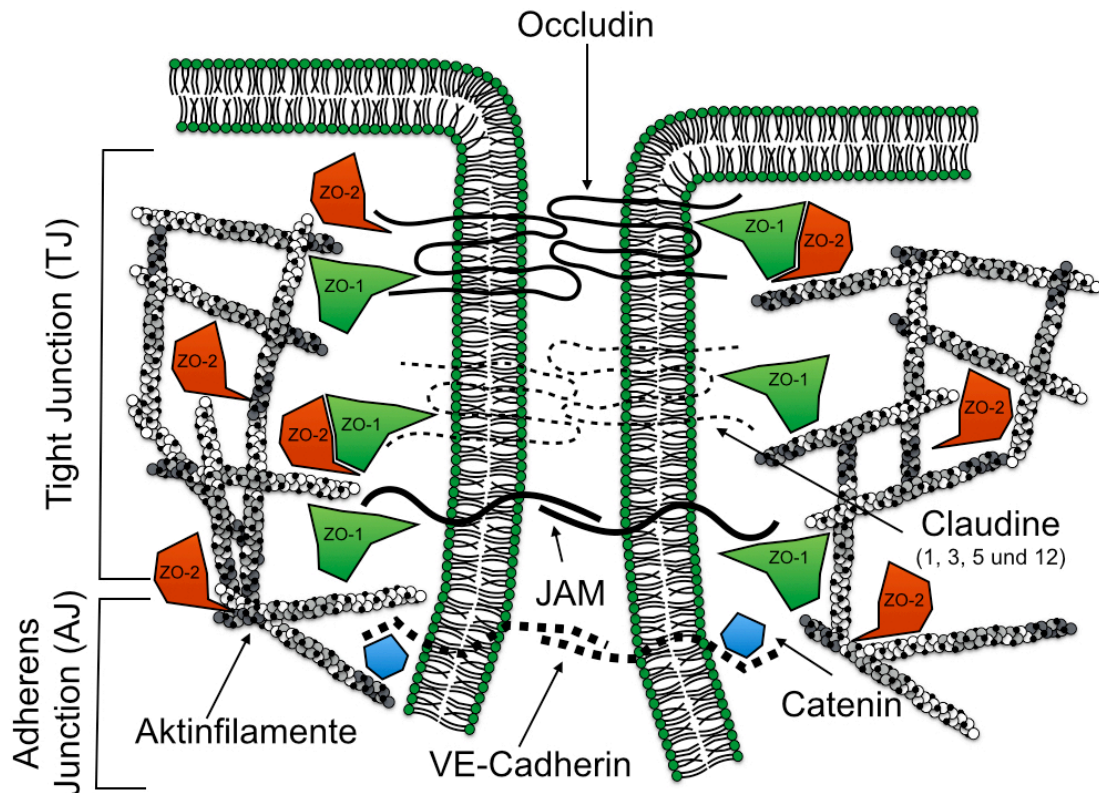


Abbildung 5: Organisation des junctionalen Komplexes der Blut-Hirn-Schranke.

Der junctionale Komplex zwischen zwei Endothelzellen besteht aus Adhärenz (AJ) und Tight Junction (TJ). In den basalen AJ steht das Membranprotein VE-Cadherin über Catenine mit dem Aktin-Zytoskelett in Verbindung. Die apikalen TJ beinhalten transmembranäre Proteine wie JAM, Claudine und Occludin, die über akzessorische Zonula Occludens-Proteine (ZO-1, -2) eine Verbindung zum Aktin-Zytoskelett herstellen (adaptiert nach B. Hawkins & T. Davis 2006).

1.3.3 Regulierung der endothelialen Permeabilität

Die endotheliale Permeabilität lässt sich durch eine Vielzahl an extrazellulären Stimuli sowie durch intrazelluläre Signaltransduktionewege beeinflussen. Ein direkter Einfluss auf Expression und Lokalisation der TJ-Proteine wird beispielsweise über Hormone oder Zytokine ausgeübt. Das Glukokortikoid Hydrokortison erniedrigt, Tumornekrosefaktor α (TNF- α) und Histamin erhöhen die Permeabilität durch Erhöhung bzw. Erniedrigung der Expression von Occludin und ZO-1.⁸⁵

Jedoch sind auch indirekte Wirkungen am junctionalen Komplex durch Veränderungen des Aktin-Zytoskeletts möglich, welches mit den TJ-Proteinen

verbunden ist. Eine Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts kann zu ultrastrukturellen Änderungen der TJ und zum Barriereverlust führen.⁸⁶ Mechanistisch wurde hierfür eine Caveolin-vermittelte Endozytose von Occludin beschrieben.⁸⁷

1.4 Das Aktin-Zytoskelett und das aktinbindende Protein Cofilin

Aktin ist das häufigste Protein in eukaryotischen Zellen und interagiert mit so vielen anderen Proteinen wie kein zweites. Es liegt entweder monomer als globuläres Aktin (G-Aktin) oder polymer als filamentäres Aktin (F-Aktin) vor. Mittels aktinbindender Proteine (ABP) oder durch ATP-Verbrauch kann es vom einen in den anderen Zustand übergehen. Dies macht es zu einem wichtigen Beteiligten bei zellulären Funktionen wie der Zellmotilität, intrazellulärem Transport sowie der Aufrechterhaltung der Zellmorphologie.⁸⁸

Die aktinbindenden Proteine erfüllen verschiedene Funktionen. Eine wichtige Funktion ist der Auf- und Abbau der Aktinfilamente, was unter anderem durch Polymerisation am (+)-Ende und Depolymerisation am (-)-Ende ermöglicht wird. Cofilin, das seinen Namen aufgrund seiner Cosedimentation mit filamentärem Aktin hat, gehört zur aktindepolymerisierender Faktor (ADF)/Cofilin-Familie. Beim Menschen sind ein ADF und zwei Formen von Cofilin bekannt. ADF wird hauptsächlich in Epithel- und Endothelzellen exprimiert, Cofilin-1 in den meisten embryonalen und adulten Geweben und Cofilin-2 ist muskelspezifisch.⁸⁹

Funktionell ist Cofilin am Auf- und Abbau der Aktinfilamente beteiligt: Die Spaltung von F-Aktin in zwei Filamente und die Depolymerisation am (-)-Ende des F-Aktins führen zum Abbau, die Stabilisierung von Filamenten und die Nukleation, also die Neubildung von F-Aktin aus durch Depolymerisation gewonnenen Aktinmonomeren, führen zum Aufbau.⁹⁰ Niedrige Cofilin-Konzentrationen führen dabei eher zur Spaltung und Abbau der Aktinfilamente,

Einleitung

hohe Konzentrationen führen zum Aufbau durch Nukleation (Abb. 6).⁹¹

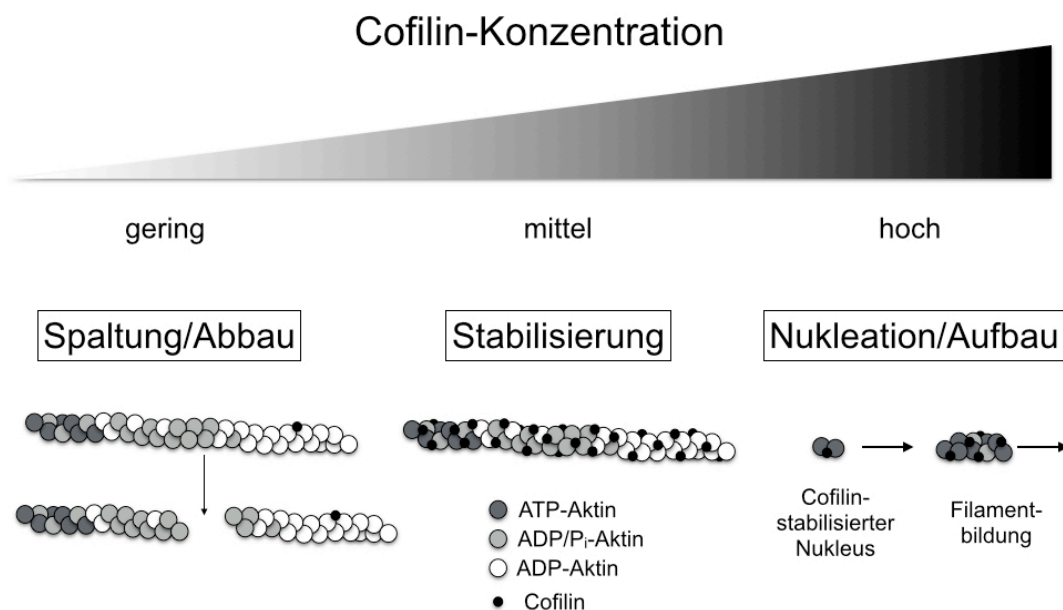


Abbildung 6: Konzentrationsabhängige Aktivität von Cofilin.

In geringer Konzentration führt Cofilin zu einer Spaltung von Aktinfilamenten und somit deren Abbau. In mittlerer Konzentration stabilisieren Cofilin-Moleküle das Gerüst der Aktinfilamente. In hoher Konzentration stabilisiert Cofilin als Nukleus bezeichnete Aktindimere und induziert so eine Neubildung von Aktinfilamenten (adaptiert nach M. Van Troys et al. 2008).

Da Cofilin damit eine große Bedeutung für die zelluläre Dynamik besitzt, unterliegt es einer strikten Regulierung. Durch Phosphorylierung des Serinrests an Position 3 (Ser3) der Aminosäurekette wird die Bindungsstelle für F-Aktin blockiert und damit die Aktivität von Cofilin gehemmt. Je zwei Kinasen aus zwei Familien können Ser3-Cofilin phosphorylieren: LIM1 und LIM2 von den LIM-(Lin-11/Isl-1/Mec-3-) Kinasen sowie TESK1 und TESK2 von den TES-(testikuläres Protein-)Kinasen.⁹² Dabei kann das Protein RhoA die Rho-assoziierte Proteinkinase (ROCK) aktivieren, welche wiederum die LIM-Kinasen aktivieren kann.⁹³

Die Abspaltung des Phosphatrests an Ser3-Cofilin durch Phosphatasen kann Cofilin wieder aktivieren. Bisher wurden die SSH-(Slingshot-)Phosphatasen SSH1, -2 und -3 sowie Chronophin als Cofilin-Phosphatasen identifiziert.⁹⁴

Einleitung

Abbildung 7 illustriert das zelluläre Gleichgewicht von Cofilin und seiner inaktiven Form Phospho-Cofilin sowie die beteiligten Regulationsmechanismen.

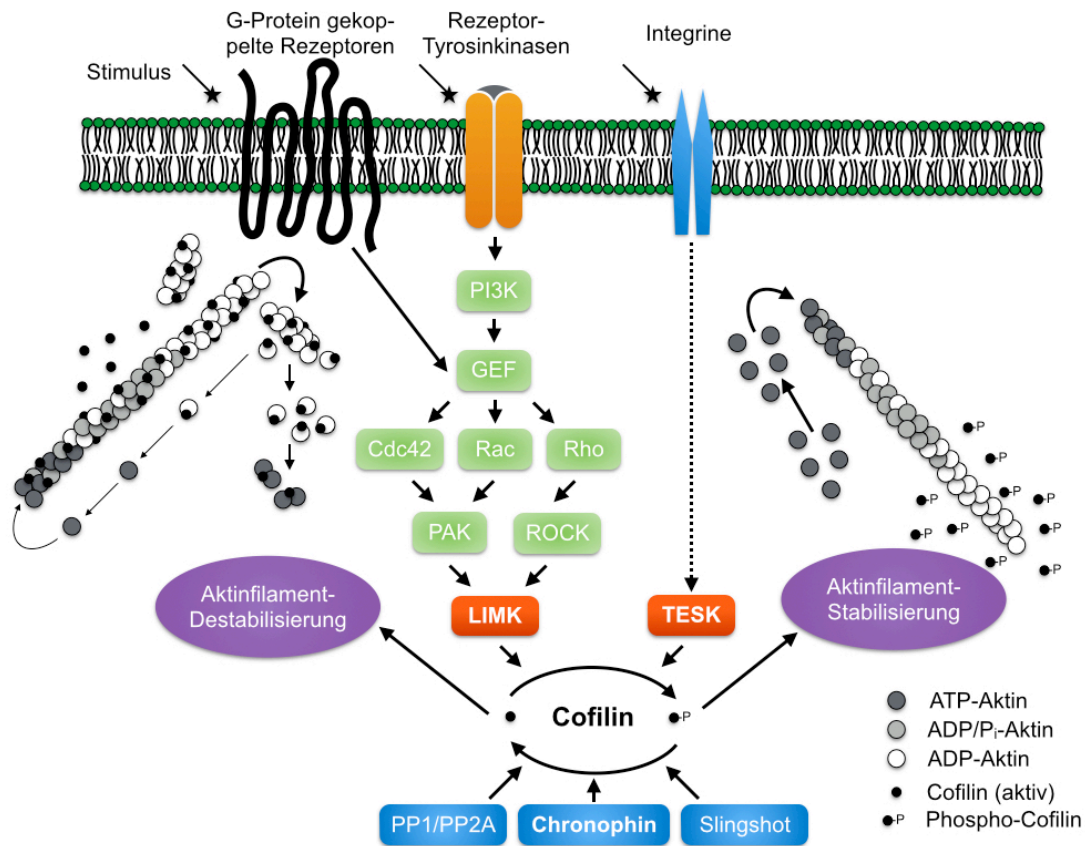


Abbildung 7: Der Signalweg von Cofilin.

Durch aktives Cofilin werden Aktinfilamente depolymerisiert, jedoch gleichzeitig Monomere zur Nukleation von neuen Filamenten bereitgestellt. Cofilin wird durch Phosphorylierung durch die Kinasen LIMK und TESK inaktiviert und durch die Phosphatasen Chronophin, Slingshot und PP1/PP2A reaktiviert (adaptiert nach O. Fedorchenko 2009).

1.5 Die Bedeutung der Pyridoxal-Phosphatase Chronophin

Chronophin ist eine Phosphatase aus der Superfamilie der Haloazid-Dehalogenasen (HAD). Die große Gruppe der HAD-Phosphatasen zeichnet sich durch ihre hohe Substratspezifität sowie ihren ungewöhnlichen Dephosphorylierungsmechanismus aus, bei dem ein Aspartatrest im aktiven Zentrum als Nukleophil fungiert.⁹⁵

Einleitung

Chronophin wurde initial als hochspezifische Cofilin-Phosphatase biochemisch aus Rinderhirn isoliert. Es ist in vielen adulten Geweben und in besonders hoher Konzentration im Gehirn exprimiert. Seine Herunterregulierung führt zu fehlerhaften Zellteilungen, erhöhter Aktin-Polymerisierung und Ausbildung von Zellfortsätzen, was seine Relevanz für die Zellmotilität und Interaktionen mit dem Aktin-Zytoskelett und der Zellmembran aufzeigt.⁹⁶ Außerdem konnte gezeigt werden, dass Chronophin Aggregate aus dephosphoryliertem Cofilin und Aktin bilden kann und an der Aktivierung von Cofilin in neutrophilen Granulozyten beteiligt ist.^{97,98} Chronophin fungiert neben seiner Funktion als Cofilin-Phosphatase auch als metabolische Phosphatase, die die co-enzymatisch aktive Form des Vitamins B₆ – Pyridoxal-5'-Phosphat (PLP) – desphosphoryliert.⁹⁹ Die molekulare Identität dieser Pyridoxal-Phosphatase konnte von Jang et al. aufgeklärt werden.¹⁰⁰ PLP ist als Cofaktor an über 160 Enzymreaktionen beteiligt, was einem Anteil von etwa 4 % der bisher bekannten Enzymaktivität entspricht.¹⁰¹ Eine tragende Rolle spielt es bei Funktionen des zellulären Energiemetabolismus wie der Glykogenolyse und der Aminosäuresynthese, der Häm-Biosynthese und damit der zellulären Oxygenierung sowie der Synthese einer Vielzahl von Neurotransmittern.¹⁰² Beispielsweise ist die Synthese des inhibitorischen Neurotransmitters γ -Aminobuttersäure (GABA) PLP-abhängig. GABA wird von der Glutamat-Decarboxylase (GAD) aus der Aminosäure Glutamat synthetisiert. GAD existiert in den zwei Isoformen GAD₆₅ und GAD₆₇, wobei GAD₆₇ für die basale GABA-Produktion verantwortlich ist und GAD₆₅ bei hohem GABA-Bedarf aktiv ist.¹⁰³ Aktuelle Untersuchungen legen eine relevante Beeinflussung der Aktivität dieser für neuronale Funktionen wichtigen Enzyme durch Chronophin nahe und werden im Diskussionsteil besprochen.

Trotz des Wissens über seine Substrate ist über biologische Funktionen von Chronophin noch wenig bekannt und die Gewinnung neuer Erkenntnisse daher Ziel aktueller Forschungen. Die hohe Konzentration von Chronophin in Hirngewebe und der Hinweis aus genetischen Studien, dass einige HAD-Phosphatasen an der Pathogenese von neurologischen Erkrankungen beteiligt sind, lenken den Fokus auf die Untersuchung der Funktion von Chronophin im Gehirn.⁹⁵

1.6 ROCK als Gegenspieler von Chronophin bei der Phosphoregulation von Cofilin

Durch Untersuchungen in glialen Tumorzellen ist bekannt, dass Chronophin als Cofilin-Phosphatase den invasiven Phänotyp, an dessen Entstehung ROCK mitbeteiligt ist, antagonisieren kann.¹⁰⁴ ROCK fördert die auf der Interaktion von Aktin und Myosin basierende Kontraktilität von Endothelzellen und die Delokalisation wichtiger TJ-Proteine wie Occludin, Claudin-5 und ZO-1 vom junctionalen Komplex.¹⁰⁵ Es ist beteiligt an der Vermittlung inflammatorischer Prozesse nach Gefäßschäden, Thrombozytenaktivierung und Thrombusbildung und kann die Gefäßpermeabilität beeinflussen.¹⁰⁶ Eine medikamentöse Antagonisierung von ROCK kann den zerebralen Blutfluss steigern und wirkt beim ischämischen Schlaganfall neuroprotektiv.¹⁰⁷

1.7 Ziel der Arbeit

Aufgrund dieser Bedeutung von ROCK ist es von besonderem Interesse, ebenfalls die Rolle seines funktionellen Gegenspielers Chronophin beim ischämischen Schlaganfall zu charakterisieren. Hierfür soll im murinen Schlaganfallmodell untersucht werden, ob Chronophin einen Einfluss auf Infarktgröße und Ödembildung sowie den neurologischen Status der Tiere hat. Immunhistochemische Färbungen von Hirnschnitten, proteinchemische Untersuchungen von Hirnlysaten sowie zellbiologische Analysen des junctionalen Komplexes von Endothelzellen sollen die Befunde aus dem Schlaganfallmodell aufschlüsseln und mögliche Funktionen von Chronophin für die Integrität der BHS aufklären. Möglicherweise können die Ergebnisse zukünftig dazu beitragen, die Therapien und Prognose von Schlaganfallpatienten zu verbessern.

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Versuchstiere

Die wildtypischen Mäuse des Stammes C57BL/6 stammten von Charles River, Sulzfeld, Deutschland. Zur Untersuchung der *in-vivo*-Wirkungen von Chronophin wurden Mausmodelle mit globalem und zellspezifischem Chronophin-Knockout (KO) generiert. Diese transgenen Cre-Linien wurden von der Firma Jackson Labs bezogen. Da die katalytische Funktion von Chronophin (Genname: *Pdxp*) auf Exon 1 liegt, wurde dieses mit loxP-Sequenzen flankiert („gefloxt“) und mittels einer E1a-Cre-Mauslinie zunächst global depletiert (B6.FVB-Tg(E1a-cre)C5379Lmgd/J, Abb. 8). Durch Kreuzung der gefloxten Tiere mit Tie2-Cre(B6.Cg-Tg(Tek-cre)1Ywa/J)-, Gfap-Cre(B6.Cg-Tg(Gfap-cre)73.12Mvs/J)- und Pf4-Cre(Tg(Pf4-icre)Q3Rsko/J)-Stämmen wurden in unserer Arbeitsgruppe Mäuse mit Endothelzell-, Astrozyten- und Megakaryozyten/Thrombozyten-spezifischer Chronophin-Ablation generiert.¹⁰⁸

Diese werden in der vorliegenden Arbeit folgendermaßen bezeichnet:

- C57BL/6J-Wildtyp oder „gefloxt“ Maus: WT
- globaler KO (*Pdxp*^{fl/fl}; *E1a-Cre*^{+/-}): KO
- Endothelzell-spezifischer KO (*Pdxp*^{fl/fl}; *Tie2-Cre*^{+/-}): E-KO
- Astrozyten-spezifischer KO (*Pdxp*^{fl/fl}; *Gfap-Cre*^{+/-}): A-KO
- Megakaryozyten-/Thrombozyten-spezifischer KO (*Pdxp*^{fl/fl}; *Pf4-Cre*^{+/-}): P-KO

Material und Methoden

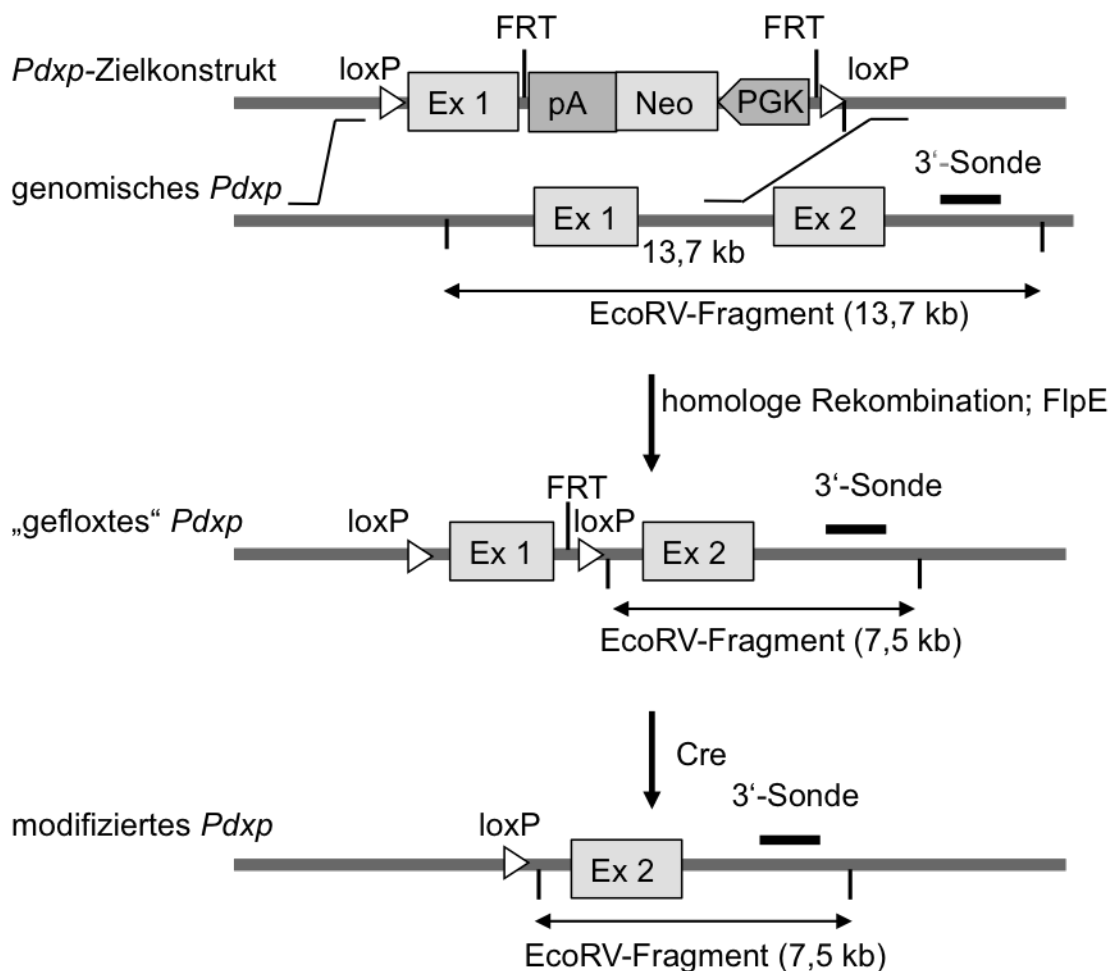


Abbildung 8: Generierung konditional Chronophin-defizienter Mäuse.

Zur konditionalen Deletion von Chronophin wurde Exon 1 des für Chronophin kodierenden *Pdxp*-Gens mit *loxP*-Sequenzen flankiert (Ozgene, Perth, Australien). Die „gefloxte“ Zielmaus wird nun mit einer gewebespezifischen Cre-Maus (z. B. *Gfap-Cre* für Astrozyten) verkreuzt. Die Cre-Expression kann durch gewebespezifische Promotoren kontrolliert werden. Die Abbildung wurde freundlicherweise von Frau Dr. Elisabeth Jeanclos zur Verfügung gestellt.

Material und Methoden

2.1.2 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Acrylamid	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Avidin-Enzym-Komplex Kit	Vector Laboratories, Burlingame (Kalifornien), USA
bovines Fibronektin	Merck Millipore, Billerica (Massachusetts), USA
Bradykinin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
BSA	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
DAB	Vector Laboratories, Burlingame (Kalifornien), USA
DAPI	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
DMEM	Pan-Biotech, Aidenbach, Deutschland
ECL-Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham (Massachusetts), USA
EDTA	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Eindeckmedium für Immunhistochemie	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Essigsäure	J. T. Baker, Center Valley (Pennsylvania), USA
Evans Blau	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
FCS	Pan-Biotech, Aidenbach,

Material und Methoden

	Deutschland
Fluoromount-G Eindeckmedium	SouthernBiotech, Birmingham (Alabama), USA
GAPDH (TaqMan® vorgefertigte Untersuchungsreagenzien für die Genexpression, Teilnummer: 4352339E)	Thermo Fisher Scientific, Waltham (Massachusetts), USA
H ₂ O ₂	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
HEPES-Puffer	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Histamin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Methanol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Molekulargewichts-Standardmarker	Bio-Rad Laboratories, Hercules (Kalifornien), USA
NGS	Pan-Biotech, Aidenbach, Deutschland
PBS	Pan-Biotech, Aidenbach, Deutschland
Penicillin/Streptomycin (100 U/ml; 100 µg/ml)	Pan-Biotech, Aidenbach, Deutschland
Paraformaldehyd	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ponceau S	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Roti-Histol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Saponin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
SDS	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
TaqMan® Reverses Transkriptions- Reagenz	Thermo Fisher Scientific, Waltham (Massachusetts), USA
TaqMan® Universal 2x PCR Master Mix	Thermo Fisher Scientific, Waltham (Massachusetts), USA

Material und Methoden

TEMED	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Thrombin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Tissue Tek	Sakura Finetek, Alphen aan Den Rijn, Niederlande
TNF- α	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Tris-Base	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
TRIzol-Reagenz®	Thermo Fisher Scientific, Waltham (Massachusetts), USA
Trockenmilchpulver, fettfrei	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trypanblau	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Trypsin-EDTA (0,05/0,2 %)	Pan-Biotech, Aidenbach, Deutschland
TTC	Sigma-Aldrich, St. Louis (Missouri), USA
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis (Missouri), USA

2.1.3 Antikörper

Primärantikörper	Hersteller	Katalognummer
anti-Aktin	Merck Millipore, Billerica (Massachusetts), USA	MAB1501
anti-CD31	BD Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland	553369
anti-CD102	BD Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland	553326
anti-Chronophin (Klon C85E3)	Cell Signaling Technologies, Danvers (Massachusetts), USA	4686X
anti-Claudin-1	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland	51-9000

Material und Methoden

anti-Claudin-5	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland	32-2500
anti-E-Cadherin	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland	33-4000
anti-Laminin	Dako, Hamburg, Deutschland	Z0097
anti-Occludin	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland	33-1500 / 71-1500
anti-VE-Cadherin (C-19)	Santa Cruz Biotechnology, Dallas (Texas), USA	Sc-6458
anti-ZO-1	Sigma-Aldrich, St. Louis (Missouri), USA	A82665
anti-ZO-1	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland	33-9100 / 61-7300

Sekundärantikörper	Hersteller	Katalognummer
Alexa Fluor 488 anti-Maus	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland	A11029
Alexa Fluor 488 anti-Kaninchen	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland	A11034
Alexa Fluor 488 anti-Ratte	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland	A21208
Alexa Fluor 488 anti-Ziege	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland	A11056
Alexa Fluor 546 anti-Maus	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland	A11030
Alexa Fluor 546 anti-Kaninchen	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland	A11035
Alexa Fluor 546 anti-Ziege	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland	A11056
Alexa Fluor 546 Phalloidin	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland	A22283
Alexa Fluor 633	Life Technologies, Darmstadt,	A22284

Material und Methoden

Phalloidin	Deutschland	
anti-Maus Meerrettichperoxidase	Thermo Fisher Scientific, Waltham (Massachusetts), USA	31437
anti-Kaninchen Meerrettichperoxidase	Thermo Fisher Scientific, Waltham (Massachusetts), USA	31463
anti-Kaninchen biotinyliert	Vector Laboratories, Burlingame (Kalifornien), USA	BA-1000
anti-Ratte biotinyliert	BD Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland	559286
anti-Ratte Dynabeads	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland	11035
anti-Ziege biotinyliert	Vector Laboratories, Burlingame (Kalifornien), USA	BA-5000
anti-Maus biotinyliert	Vector Laboratories, Burlingame (Kalifornien), USA	BA-9200

2.1.4 Puffer und Lösungen

SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Laemmli Probenpuffer (pH 6,8)	62,5 mM	Tris-HCl
	10 % (v/v)	Glycerol
	2 % (w/v)	SDS
	5 % (v/v)	β-Mercaptoethanol
	0,02 % (w/v)	Bromphenolblau
		Aqua dest.
Trenngel (12-prozentig)	12 %	Acrylamid
	0,1 %	SDS
	375 mM	Tris-HCl (pH 8,8)
	0,05 %	APS
	0,003 %	TEMED
		Aqua dest.

Material und Methoden

Trenngel (8-prozentig)	8 %	Acrylamid
	0,1 %	SDS
	375 mM	Tris-HCl (pH 8,8)
	0,05 %	APS
	0,003 %	TEMED
		Aqua dest.
Sammelgel	4 %	Acrylamid
	0,1 %	SDS
	375 mM	Tris-HCl (pH 6,8)
	0,02 %	APS
	0,002 %	TEMED
		Aqua dest.
Laufpuffer	250 mM	Tris-Base
	2 M	Glycin
	10 %	SDS
		Aqua dest.
Anodenpuffer I	0,3 M	Tris-Base
	40 % (für Proteine < 40kDa) / 20 % (für Proteine > 40kDa)	Methanol
		Aqua dest.
Anodenpuffer II	25 mM	Tris-Base
	40 % (für Proteine < 40 kDa) / 20 % (für Proteine > 40 kDa)	Methanol
		Aqua dest.
Kathodenpuffer	25 mM	Tris-Base
	40 mM	Glycin
	10 %	Methanol

Material und Methoden

	0,005 % (nur für Proteine > 40 kDa)	SDS
		Aqua dest.
Ponceau S-Lösung	0,1 % (w/v)	Ponceau S
	5 %	Essigsäure
		Aqua dest.

Immunblot

Antikörper-Verdünnungslösung (pH 7,4)	10 mM	HEPES-Puffer
	0,5 M	NaCl
	1 %	BSA
	0,2 %	Tween-20
	0,02 %	NaN ₃
Blotto-Puffer (pH 8,0)	50 mM	Tris-HCl
	80 mM	NaCl
	2 mM	CaCl ₂
	5 % (w/v)	Trockenmilchpulver, fettfrei
	0,2 %	NP-40

Immunhistochemie

TBS	50 mM	Tris-Base (pH 7,5)
	150 mM	NaCl
		Aqua dest.
Saponin	10 %	Saponin
	90 %	Aqua dest.
Avidin-Enzym-Komplex	2,5 ml	TBS
	1 Tropfen	Lösung A
	1 Tropfen	Lösung B
DAB-Reagenz	2,5 ml	Aqua dest.

Material und Methoden

	1 Tropfen	Stammpuffer
	2 Tropfen	DAB Stammlösung
	1 Tropfen	H ₂ O ₂
Natriumcitrat-Puffer (pH 6,0)	10 mM	Natriumcitrat
	0,05 %	Tween 20

Zellkultur

PBS	2,7 mM	KCl
	1,8 mM	KH ₂ PO ₄
	10 mM	Na ₂ HPO ₄
	137 mM	NaCl
		Aqua dest.
Kulturmedium	500 ml	DMEM
	50 ml (~10 %)	FCS
	5 ml (~1 %)	Pen/Strep
Hungermedium	500 ml	DMEM
	5 ml (~1 %)	Pen/Strep

2.1.5 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Analysenwaage Kern ACJ 120-4M	Hartenstein, Würzburg, Deutschland
BBD 6220 CO ₂ Inkubator	Thermo Fisher Scientific, Waltham (Massachusetts), USA
Dako Pen	Pathology Products Dako, Hamburg, Deutschland
Deckgläser	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
FACS-Röhrchen	Thermo Fisher Scientific, Waltham (Massachusetts), USA
Gelgießkammern, -kassetten und -kämme	BioRad, München, Deutschland
Gewebekulturschalen	Thermo Fisher Scientific, Waltham (Massachusetts), USA

Material und Methoden

Greiner-Röhrchen (Falcon™-Tubes) 15 mL, 50 mL	BD Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
ImageQuant LAS 4000 Bildsystem	GE Healthcare Europe, Freiburg, Deutschland
Kryostat-Mikrotom CM3050 S	Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland
Konfokales Laser-Scan-Mikroskop TCS SP5	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Magnetständer DynaMag	Thermo Fisher Scientific, Waltham (Massachusetts), USA
Micra D-8 Homogenisierer	ART Prozess- & Labortechnik, Müllheim, Deutschland
Mikroskop Leica DM4000 B	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Mini-Zentrifuge Rotilabo®	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Nadel 20 G	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Neubauer-Zählkammer (0,1 mm * 0,0025 mm ² pro Kleinstquadrat)	Paul Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland
Nitrocellulosemembran	GE Healthcare Europe, Freiburg, Deutschland
Pasteurpipetten, 230 mm	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Pipettenspitzen 10 µL, 200 µL, 1000 µL	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Plattformschüttler Unimax 1010	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
PowerPac HC (SDS-Page)	Bio-Rad Laboratories, Hercules (Kalifornien), USA
Reaktionsgefäße 0,5 mL, 1,5 mL, 2 mL	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Rotationsmikrotom	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Schneidematrix für Mäusehirne	Harvard Apparatus, Holliston (Massachusetts), USA

Material und Methoden

Semidry-Blotapparatur	Bio-Rad Laboratories, Hercules (Kalifornien), USA
Spritze 10ml, 20ml	B. Braun, Melsungen, Deutschland
StepOnePlus™ Real-Time-PCR-System	Thermo Fisher Scientific, Waltham (Massachusetts), USA
Superfrost Objektträger	Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Vortex VF2	IKA®-Werke, Staufen, Deutschland
Wasserbad WB6	GK Sondermaschinenbau Labortechnik Medingen, Arnsdorf, Deutschland
Werkbank (Laminar Flow)	BDK Luft- und Reinraumtechnik, Sonnenbühl-Genkingen, Deutschland
Whatman-Papier	Hartenstein, Würzburg, Deutschland
Zellsieb, 70 µm Porengröße	BD Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Zentrifugen 5424 / 5424 R / 5415 D	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

2.1.6 Software und statistische Auswertung

ImageJ 10.2	National Institute of Health, Bethesda (Maryland), USA
ImageQuant LAS 4000	Fujifilm, Tokio, Japan
Microsoft Office 2010	Microsoft, Redmond (Washington), USA
GraphPad Prism 6.0	GraphPad Software, San Diego (Kalifornien), USA

Die statistische Auswertung erfolgte mit GraphPad Prism 6. Graphiken zeigen das arithmetische Mittel der Einzelwerte sowie den Standardfehler des Mittelwerts (S.E.M.). Die Anzahl an unabhängigen Versuchen wird mit „n“ gekennzeichnet. Zweigruppen-Vergleiche wurden mit dem Student's t-test (ungepaart, zweiseitig), Mehrgruppenvergleiche mittels Varianzanalyse (ANOVA)

durchgeführt. Das Signifikanzniveau wird mit * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$) bzw. „ns“ (nicht signifikant) angegeben.

2.2 Methoden

2.2.1 tMCAO-Schlaganfallmodell

Zur Charakterisierung der pathophysiologischen Prozesse, die nach einer akuten fokalen zerebralen Ischämie stattfinden, wurden bereits diverse *in-vivo*-Modelle etabliert. Dabei lassen sich die induzierten Ischämien einerseits nach ihrer Ätiologie unterteilen, nämlich in intravasale Genese durch beispielsweise Emboli und extravasale Genese durch Ligation oder Kompression von Gefäßen. Andererseits ermöglichen die Modelle eine Differenzierung nach der Ischämie-lokalisierung, indem entweder globale oder auf eine Hemisphäre beschränkte oder fokal begrenzte Ischämien induziert werden.

Die fokalen Ischämie-Modelle kommen dem realen Geschehen beim ischämischen Schlaganfall des Menschen am nächsten.¹⁰⁹ Die ersten erfolgreich etablierten Tiermodelle der fokalen zerebralen Ischämie waren zunächst bei größeren Säugern wie Primaten, Hunden und Katzen zu verzeichnen.^{110–112} Später wurden *in-vivo*-Schlaganfallmodelle in Ratten und Mäusen beschrieben.^{113,114}

Grundlage dieser ischämischen Schlaganfallmodelle ist die operative Okklusion extra- und intrakranieller Arterien. Für diese Arbeit wurde das Modell der transienten Media-Okklusion (*transient middle cerebral artery occlusion*, tMCAO) der Maus eingesetzt, wie es von Clark et al. 1997 beschrieben wurde.¹¹⁵ Dieses basiert auf dem Einbringen eines monofilen Fadens in die Arteria cerebri media und einem temporären Verschluss dieses Gefäßes unter inhalativer Anästhesie.

Die Durchführung des experimentellen Schlaganfalls an den Mäusen, die Erhebung des neurologischen Status sowie die Aufbereitung und Evaluation der Gewebe nach dem folgenden Protokoll oblag Frau Dr. rer. nat. Eva Geuss aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Christoph Kleinschnitz an der

Neurologischen Klinik der Universität Würzburg. Die Tierversuche wurden von der Regierung von Unterfranken genehmigt (Aktenzeichen 55.2 DMS-2532-2-99). Die eigene Beteiligung zu diesem Versuchsteil begann erst mit der Weiterverarbeitung und Immunfärbung der Hirnschnitte und der Nutzung der Hirnlysate für den Immunblot.

Operativer Eingriff

Der operative Eingriff wurde nach der etablierten und publizierten Methodik der Arbeitsgruppe von Prof. Kleinschnitz durchgeführt.¹¹⁶ Die Mäuse wurden sediert und die Haut im seitlichen Halsbereich inzidiert. Anschließend wurden die Arteria carotis communis und die Arteria carotis externa ligiert und ein Nylonfaden eingeführt und über die Arteria carotis interna vorgeschoben, um den Ursprung der Arteria cerebri media zu verschließen. Der Faden verblieb nun 60 min in situ. Dann wurden die Tiere erneut sediert und der das Gefäß verschließende Faden herausgezogen, um die Reperfusion zu ermöglichen. Zu verschiedenen Zeitpunkten bis zu 23 h nach Reperfusion konnte das Hirngewebe präpariert und analysiert werden. Bei der Schein-Operation wurde der Eingriff ebenso wie beschrieben durchgeführt, ohne dass ein Nylonfaden eingeführt wurde. Anästhesie- sowie Operationsdauer entsprachen dem Eingriff mit tMCAO.

Neurologischer Status

Der neurologische Status der Mäuse wurde von zwei unabhängigen und bezüglich der Tiere verblindeten Untersuchern 24 h nach dem Eingriff erhoben. Die globale Bewertung der neurologischen Funktion wurde nach Bederson et al. ausgewertet.¹¹⁷ Auf einer Skala von 0-5 bedeutete „0“ kein Defizit, „1“ eine Flexion der vorderen Gliedmaße, „2“ einen verringerten Widerstand auf seitlichen Druck, „3“ ein Kreisen in eine Richtung, „4“ ein längsverlaufendes Drehen und „5“ keine vorhandenen Bewegungen.

Die motorische Funktion orientierte sich am String-Test nach Barclay et al.¹¹⁸ Dabei wurde die Maus mit den vorderen Gliedmaßen mittig an eine zwischen zwei Stützen gespannten Schnur gehängt und ihr Verhalten ebenfalls auf einer Skala von 0-5 bewertet: „0“ bei sofortigem Herunterfallen, „1“ bei freiem Hängen

Material und Methoden

an der Schnur mit einer oder beiden Vorderpfoten, „2“ bei einem Versuch auf die Schnur zu klettern, „3“ beim Hängen an der Schnur mit einer oder beiden Vorder- sowie einer oder beiden Hinterpfoten, „4“ bei zusätzlichem Umwickeln der Schnur mit dem Schwanz, „5“ bei erfolgreicher Flucht entlang der Schnur und an den Stützen herab.

Infarktgröße

Zur Bestimmung der Infarktgröße wurden die Tiere 24 h nach dem Eingriff getötet. Die Hirne wurden schnell entfernt und aus ihnen drei jeweils 2 mm dicke Frontalschnitte mittels einer Schneidematrix für Mäusehirne angefertigt. Die Schnitte wurden für 20 min bei 37 ° C mit 2 % TTC in PBS gefärbt, um das Infarktareal sichtbar zu machen. Die Infarktgrößen wurden auf zwei Arten nach Messung der Flächen mit ImageJ berechnet: Die direkte Infarktgröße wurde ohne Korrektur für die Ödembildung und die indirekte mit folgender Korrekturformel zum Ausschluss des entstandenen Ödems berechnet:

$$V_{\text{indirekt}}(\text{mm}^3) = V_{\text{Infarkt}} \times (1 - (V_i - V_k)/V_k),$$

wobei der Term $(V_i - V_k)$ die Volumendifferenz zwischen ipsi- und kontralateraler Hemisphäre repräsentiert und $(V_i - V_k)/V_k$ diese Differenz als prozentualen Anteil an der kontralateralen Hemisphäre ausdrückt.

Ödembildung

Zur Bestimmung der Ödembildung wurden die Tiere ebenfalls 24 h nach dem Eingriff getötet, ihre Hirne entfernt und die Großhirn-Hemisphären getrennt, um deren Nassgewicht (G_n) zu bestimmen. Anschließend wurden die Hemisphären 72 h bei 60° C getrocknet und das Trockengewicht (G_t) gemessen. Der Wassergehalt einer Hemisphäre in % wurde dann mittels folgender Gleichung berechnet: $((G_n - G_t)/G_n) \times 100$.

Pdxp-mRNA-Expression

Für die Quantifizierung der Genexpression von *Pdxp* wurden die ipsi- und kontralateralen Neokortices und Basalganglien der WT-Mäuse 6, 12 und 23 h

nach Reperfusion zusammen mit den Gewebeproben von scheinoperierten Mäusen analysiert. Die Gewebshomogenisierung, RNA-Isolierung und *real-time* RT-PCR erfolgte folgendermaßen:

Die Gesamt-RNA wurde mit dem Micra D-8 Homogenisierer und dem TRIzol-Reagenz® präpariert und anschließend spektrophotometrisch quantifiziert. Ein µg der Gesamt-RNA wurde mit dem TaqMan® Reverse Transkriptions-Reagenz nach dem Herstellerprotokoll mittels zufälliger Hexamere revers transkribiert. Die relativen Expressionslevel von *Pdyp* wurden mit der TaqMan® Fluoreszenz-Technologie quantifiziert. GAPDH wurde als endogene Kontrolle genutzt, um die Menge an Proben-RNA zu normalisieren. Die PCR wurde mit gleichen Mengen an cDNA im StepOnePlus™ Real-Time-PCR-System mit dem TaqMan® Universal 2x PCR Master Mix durchgeführt.

Die Reaktionsansätze (Gesamtvolumen 12,5 µl) wurden bei 50° C für 2 min und bei 95° C für 10 min inkubiert, gefolgt von 40 Zyklen von je 15 Sekunden bei 95° C und 1 Minute bei 60° C. Kontrollansätze mit Wasser wurden zur Sicherstellung der Spezifität ebenfalls in den Versuch eingeschlossen. Jede Probe wurde dreimal gemessen und die relative Quantifizierung der Genexpression mittels der von Livak et al. beschriebenen $\Delta\Delta Ct$ -Methode vorgenommen.¹¹⁹

2.2.2 Histologie und Immunhistochemie

Zur Gewinnung von Hirnpräparaten von Tieren, die nicht einem experimentellen Schlaganfall zugeführt wurden, wurden die Tiere dekapitiert und ihre Kopfhaut sowie die Schädeldecke mit einer Schere medial und longitudinal durchtrennt, sodass das Gehirn zum Vorschein kam. Mit einem Löffel wurde das Hirn entnommen und je nach gewünschter Einbettungsart weiterbehandelt:

Gehirne, die als Gefrierpräparat vorliegen sollten, wurden von Tissue Tec umgeben und direkt unter flüssigem Stickstoff eingefroren.

Für eine Einbettung in Paraffin wurden die Hirne in 4 % PFA gegeben und über Nacht bei 4° C gelagert. Am folgenden Tag wurden die Präparate im Institut für Pathologie der Universitätsklinik Würzburg nach deren Methodik eingebettet.

Material und Methoden

Sobald immunhistochemische Färbungen durchgeführt werden sollten, wurden die eingebetteten Präparate am Kryostat- bzw. Rotationsmikrotom geschnitten. Die Gewebe wurden jeweils in einer Dicke von 5 µm geschnitten und je nach geplantem Versuchsaufbau mit zwei bis drei Schnitten auf einen Objektträger übertragen. Nicht direkt im Anschluss benötigte Gefrierschnitte wurden bei -80° C gelagert, Paraffinschnitte bei Raumtemperatur.

Die Inkubationsschritte der Färbeverfahren wurden – soweit nicht anders angegeben – in einer Feuchtkammer durchgeführt.

Immunfluoreszenzfärbung

Vorbereitung der Kryopräparate:

- Auftauen der Objektträger mit den eingebetteten Geweben bzw. Trocknen für 45 min bei 41° C, falls die Gewebe frisch geschnitten wurden.
- Rehydrieren in einer mit TBS gefüllten Küvette für 10 min und Umranden des Gewebes mittels Fettstift zur Schaffung einer hydrophoben Barriere.

Vorbereitung der Paraffinpräparate:

- Deparaffinierung der Präparate nach folgendem Schema:
 - 2 x 5 min in Roti-Histol
 - 2 x 3 min in 100 % Ethanol
 - 1 x 2 min in 70 % Ethanol
 - 1 x 5 min in Aqua dest.
 - 2 x 5 min in TBS
- Überführen der Objektträger in ein Behältnis mit Natriumcitrat-Puffer.
- Hitze-induzierte Antigen-Rückgewinnung in der Mikrowelle.
 - 4 min erhitzen bei 900 W
 - 7,5 min erhitzen bei 600 W
 - 7,5 min erhitzen bei 360 W
- Abkühlen lassen für 30 min.
- Zweimaliges Waschen für 10 min in TBS.
- Umranden des Gewebes mittels Fettstift zur Schaffung einer hydrophoben Barriere.

Material und Methoden

Gemeinsames Protokoll:

1. Blocken der Oberflächenantigene für 60 min in jeweils 150 µl TBS + 10 % NGS + 0,3 % Saponin bei Raumtemperatur.
2. Inkubieren mit Primärantikörper (Verdünnung je nach Antikörper und Erfahrungswert) in jeweils 150 µl TBS + 0.3 % Saponin + 1 % NGS bei 4° C über Nacht.
3. Am nächsten Tag dreimaliges Waschen in TBS + 0.3 % Saponin für 5 min.
4. Zugabe von jeweils 150 µl des Sekundärantikörpers, 1:200 verdünnt in TBS + 5 % NGS für 90 min bei Raumtemperatur.
5. Dreimaliges Waschen in TBS + 0.3 % Saponin für 5 min.
6. Färbung der Zellkerne mit jeweils 150 µl verdünnten DAPIs (1 µg/ml TBS) für 10 min.
7. Zweimaliges Waschen in TBS für 5 min.
8. Eindecken mit Fluoromount-G Eindeckmedium und Deckglas.
9. Trocknen für einige Stunden unter dem Abzug.

Immunhistochemie

Die Vorbereitung der Präparate erfolgte analog zur Immunfluoreszenzfärbung.

Gemeinsames Protokoll:

1. Quenchen der endogenen Peroxidase-Aktivität durch Inkubieren des Präparats mit jeweils 150 µl des Peroxidase-Block-Reagenzes (3 % H₂O₂ in Methanol) für 15 min.
2. Spülen des Präparats und vorsichtiges Waschen in einer mit TBS gefüllten Küvette für 5 min.
3. Blocken der Oberflächenantigene in jeweils 150 µl TBS mit 0,3 % Saponin und 10 % NGS für 60 min bei Raumtemperatur.
4. Inkubieren mit Primärantikörper (Verdünnung je nach Antikörper und Erfahrungswert) in jeweils 150 µl TBS mit 0,3 % Saponin und 1 % NGS über Nacht.
5. Am nächsten Tag dreimaliges Waschen in TBS mit 0,3 % Saponin für 5 min.
6. Zugabe des Biotin-konjugierten Sekundärantikörpers, 1:200 verdünnt jeweils 150 µl in TBS + 1 % BSA, und Inkubation für 60 min bei Raumtemperatur.

7. Frisches Zubereiten des Avidin-Enzym-Komplexes.
8. Zugabe von jeweils 150 µl des Avidin-Enzym-Komplexes und 30-minütige Inkubation.
9. Dreimaliges Waschen in TBS für 5 min.
10. Frisches Zubereiten des DAB-Reagenzes.
11. Zugabe von jeweils 150 µl des DAB-Reagenzes und Entwicklung für 15 min bei Raumtemperatur.
12. Spülen in Leitungswasser für 5 min.
13. Gegenfärben in Mayers Hämalaun für 2 min.
14. Spülen in Leitungswasser für 5 min.
15. Dehydrierung in Alkohol nach folgendem Schema:
 - 1 x 1 Minute 70 %-ig
 - 4 x 2 min 100 %-ig
16. Einbettung für 2 x 3 min in Roti-Histol.
17. Eindecken mit Eindeckmedium für Immunhistochemie und Deckglas.
18. Trocknen für einige Stunden unter dem Abzug.

Sofern eine Quantifizierung des gefärbten Anteils innerhalb der mikroskopischen Aufnahmen eines Hirnschnittes durchgeführt wurde, wurden die Flächen der gefärbten Areale mittels ImageJ gemessen und ins Verhältnis zur Gesamtfläche des abgebildeten Gewebes gebracht. Auf diese Weise ließen sich die Signale verschiedener Primärantikörper messen. Die Expression von TJ-Proteinen wurde im Verhältnis zu Laminin als Marker für die Basallaminae der NVE quantifiziert. Es wurden je Präparat drei Aufnahmen ausgewertet.

2.2.3 SDS-PAGE und Immunblot

SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese)

Mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese lassen sich Proteine hinsichtlich ihres Molekulargewichts auftrennen. Für diese Arbeit wurde ein diskontinuierliches Puffersystem auf Polyacrylamidbasis nach Laemmli¹²⁰ verwendet. Zuvor mussten die zu untersuchenden Zellen im Laemmli-Probenpuffer lysiert worden sein. Der Puffer enthielt das anionische Tensid

Material und Methoden

Natriumdodecylsulfat (SDS) und β -Mercaptoethanol. Durch das SDS wurden die Proteine unter Verlust ihrer Quartär- und Tertiärstrukturen denaturiert. Zusätzlich wurde die Eigenladung der Proteine durch die negativen Ladungen des gebundenen SDS überdeckt, sodass eine Auftrennung anhand ihres Molekulargewichtes erfolgen konnte. Das enthaltene β -Mercaptoethanol sorgte als reduzierende Thiolverbindung für das Aufbrechen der Disulfidbrücken in den Proteinen.

Vor dem Auftragen in die Geltaschen wurden die bei -20°C gelagerten Lysate für 5 min bei 95°C erhitzt und nach ihrer Abkühlung kurz abzentrifugiert. In die erste Geltasche wurden jeweils 3 μl des standardisierten Molekulargewichtsmarkers gegeben, die weiteren Taschen wurden mit jeweils 10 μl der benötigten Lysate befüllt, nachdem diese gut durchmischt worden waren. Die Elektrophorese erfolgte im Laufpuffer konstant bei 80 V, bis die Trenngel-/Sammelgel-Grenze erreicht war. Ab dann erfolgte die Separierung der Proteinproben bei 150 V.

Immunblot

Beim Immunblot werden die in der SDS-PAGE erhaltenen Gele verwendet, um die darin befindlichen Proteine auf eine Nitrocellulosemembran zu transferieren.¹²¹ Für den Transfer eines Gels wurden sechs Whatman Filterpapiere und eine Nitrocellulosemembran auf Gelgröße zugeschnitten. Die Anordnung nach Einlegen in die Semidry-Blotapparatur illustriert Abbildung 9. Der Transfer erfolgte konstant bei 70 mA pro Membran für 30 min. Nach erfolgtem Transfer wurde die geblottete Membran in Ponceau S-Lösung gefärbt, um zu überprüfen, ob der Proteintransfer auf die Membran gleichmäßig erfolgt war. Die gefärbte Membran wurde zu Dokumentationszwecken eingescannt und digitalisiert.



Abbildung 9: Aufbau der Blotting-Apparatur.

Auf zwei in Anodenpuffer I getränkte Filterpapiere folgt ein in Anodenpuffer II getränktes Filterpapier. Darauf kommt die Nitrozellulosemembran zum Liegen, welche zuvor kurz in Aqua dest. gespült und dann in Anodenpuffer II getränkt wird. Nun folgen das SDS-Gel sowie drei weitere Filterpapiere in Kathodenpuffer. Aufgrund der Überlagerung der Eigenladungen der Proteine durch das stark negative SDS wandern die Proteine in Richtung Anode.

Proteindetektion

Nach erfolgtem Immunblot sind die Proteine irreversibel auf der Membran gebunden. Durch das Entfernen des SDS kommt es zu einer teilweisen Renaturierung der Proteine, was eine Detektion nativer Epitope und Bindung durch entsprechende Antikörper ermöglicht. Hierfür wurden zunächst unspezifische Bindungsstellen auf der Membran nach Markierung der Banden des Molekulargewichts-Standardmarkers durch eine 30-minütige Inkubation in Blotto-Puffer auf dem Schüttler und bei Raumtemperatur abgesättigt. Dann wurde die Membran nach kurzem Spülen unter Aqua dest. über Nacht bei 4° C und unter ständiger Rotation im Primärantikörper inkubiert, welcher zuvor im für

den jeweiligen Antikörper optimalen Verhältnis in Antikörper-Verdünnungslösung verdünnt worden war. Am nächsten Tag wurde die Membran erneut mit Aqua dest. gewaschen, um unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen. Für den Nachweis der gebundenen Antikörper wurde die Membran in einem dem Ursprungstier des Primärantikörpers entsprechenden Meerrettichperoxidasegekoppelten Sekundär-Antikörper für 60 min bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert, nachdem der Antikörper im Verhältnis 1:10000 im Blotto-Puffer verdünnt worden war. Nach erneutem Waschen in Aqua dest. erfolgte der Nachweis des gebundenen Sekundärantikörpers mittels verstärkter Chemilumineszenz (ECL).¹²² Hierfür wurden die im ECL-Kit enthaltenen Lösungen im Verhältnis 1:1 vermischt und die Membranen für 5 min darin inkubiert. Die Chemilumineszenz-Signale wurden direkt im Anschluss mittels des ImageQuant LAS 4000 Bildsystems detektiert und die Aufnahmen digitalisiert. Die digitale Bildanalyse und Quantifizierung der Signale erfolgte mit ImageJ. Die verwendeten Membranen wurden für spätere Versuche bei -20° C gelagert.

2.2.4 Endothelialzellkultur und Fluoreszenzmikroskopie

Ziel der Kultivierung war die Etablierung eines möglichst reinen endothelialen Monolayers. Hierfür wurde im Rahmen der Arbeit unter anderem mit der verwendeten Menge an Medien bzw. Lösungen und vor allem der Kultivierungsdauer variiert, bis ein adäquates Ergebnis erreicht worden war. Die Unterteilung in mehrere Aufreinigungs-Schritte sollte die Reinheit der Kultur verbessern. Hierbei wurden im ersten Schritt CD31-beschichtete magnetische Dynabeads verwendet. CD31 kommt in hohen Mengen auf der Oberfläche von Endothelzellen vor. Mit den magnetischen Dynabeads konnten diese unter der Vielzahl an Zellen des murinen Lungengewebes aufgereinigt werden. Die zweite Aufreinigung erfolgte mit CD102-beschichteten Beads. CD102 ist ein Glykoprotein, das ebenfalls in Endothelzellen stark exprimiert wird. Durch eine Vielzahl von Waschschritten wurde die Reinheit der Kultur ebenfalls gesteigert. Dennoch ließ sich eine Kontamination durch Fibroblasten, welche nach wenigen Tagen die Endothelzellen überwuchsen, nicht vollends vermeiden. Durch Reduktion der Kultivierungsdauer konnte die Kontamination minimiert werden.

Material und Methoden

Gewinnung der Endothelzellen und erste Aufreinigung

1. Sterilfiltration von 0,2 % Kollagenase in 30 ml DMEM.
2. Dekapitation von je drei 7 bis 9 Tage alten Mäusejungen (WT und KO).
3. Fixieren der Tierkörper, Eröffnen des Thorax mittels Schere und Pinzette, Entfernen der Lungenflügel und Überführen in 5 ml eisgekühltes DMEM.
4. Entfernung des Mediums und Zerdrücken des Lungengewebes zu einem feinen Brei mittels einer Rasierklinge unter der Werkbank.
5. Verdauen des Breis in jeweils 15 ml der Kollagenase-Lösung für WT und KO unter 60-minütiger Inkubation bei 37° C.
6. Nach 30-minütiger Inkubation 10-maliges Aufnehmen des Breis in eine Spritze und Herauspressen durch eine Nadel des Kalibers 20G über ein Zellsieb. Danach Spülen des Zellsiebs mit 20 % FCS in 15 ml DMEM.
7. Wiederholen von Schritt 6 nach Inkubationsende.
8. 5-minütiges Zentrifugieren bei Raumtemperatur.
9. Resuspendieren der Zellen in 3 ml 0,1 % BSA/PBS in einem FACS-Röhrchen.
10. Zugabe von 20 µl CD31-beschichteter magnetischer Dynabeads und 30-minütige Rotation bei 4° C.
11. Aufteilen der Zellen auf 3 Zentrifugenröhrchen zu je 1 ml im Magnetständer, 5-maliges Reinigen durch Entfernung des Mediums nach Anlagerung am Rand des Röhrchens und Resuspendierung in 1 ml frischem 0,1 % BSA/PBS.
12. Bedecken einer Kulturschale mit 2 % Gelatine.
13. Resuspendieren der Zellen aus allen drei Röhrchen in 1 ml Vasculife, Bedecken der Kulturschale mit 9 ml Vasculife und Hinzufügen der Zellen (=10 ml).
14. Inkubation im Brutschrank bei 37° C und 5 % CO₂.

Zweite Aufreinigung nach drei Tagen und Aussäen auf dem Objektträger

15. Entfernen des Mediums, Waschen der Kulturschale mit 5 ml PBS, Zugabe von 2 ml Trypsin und 10-minütige Inkubation bei 37° C.
16. Reaktionsstopp durch Zugabe von 20 % FCS in 2 ml DMEM.

Material und Methoden

17. Resuspendieren der Endothelzellen
18. 5-minütiges Zentrifugieren bei 300 g.
19. Entfernen des Überstandes und Resuspendieren des Pellets in 2 ml gekühltem 0,1 % BSA/PBS in einem FACS-Röhrchen.
20. Zugabe von 10 µl CD102-beschichteter magnetischer Dynabeads und 30-minütige Rotation bei 4° C.
21. Waschschritte wie in 11.
22. Resuspendieren der Zellen aus allen drei Röhrchen in 5 ml Vasculife.
23. Bedecken eines Objektträgers (mit 12-Kammer-Einlage) mit 10 µl Fibronectin/ml PBS
24. Entfernen des Fibronectins, Waschen mit PBS.
25. 15-minütiges Rehydrieren mit 250 µl Vasculife je Einlagekammer.
26. Zählen der Zellen aus 10 µl Zellsuspension in der Neubauer-Zählkammer.
27. 5-minütiges Zentrifugieren der Endothelzellen bei 300 g.
28. Resuspendieren der Endothelzellen auf 10⁶ Zellen/ml Vasculife.
29. Entfernen von 100 µl Vasculife je Kammer und Hinzufügen von je 10⁵ Zellen in 100 µl Vasculife.
30. Inkubation bei 37° C und 5 % CO₂.

Aktivierung und Färbung der Endothelzellen

31. Wechseln des Mediums zu Hungermedium.
32. Zugabe von je 50 µl eines Aktivators pro Kammer in folgender Menge:
10 µM Histamin oder Bradykinin / 100 µM TNF-α / 0,05 U Thrombin.
33. 15-minütige Inkubation bei Raumtemperatur.
34. Entfernen des Mediums und Zugabe von 4 % PFA (150 µl pro Kammer) über 10 min.
35. Entfernen des PFA und Zugabe von 150 µl 0,5 % Triton/PBS pro Kammer über 10 min.
36. Entfernen des Triton und Zugabe von 250 µl 3 % BSA/PBS pro Kammer über 60 min.
37. Entfernen des BSA und Zugabe des Primärantikörpers für TJ-Proteine, 1:200 verdünnt in 250 µl 1 % BSA/PBS, über 60 min.

Material und Methoden

38. Dreimaliges Waschen mit PBS.
39. Zugabe des Sekundärantikörpers, 1:400 verdünnt in 250 µl 1 % BSA/PBS, und des Phalloidin-Farbstoffs, 1:600 verdünnt in 250 µl 1 % BSA/PBS.
40. Zweimaliges Waschen mit PBS.
41. Zugabe von DAPI, 1:1000 verdünnt in 1 % BSA in PBS, über eine Minute.
42. Eindecken des Objektträgers mit einem Deckglas.

Mikroskopische Begutachtung am Fluoreszenzmikroskop

Die Zellen wurden mit dem Konfokalmikroskop SP5 von Leica begutachtet. Dabei wurden Fluoreszenzaufnahmen im blauen (DAPI), grünen (488 nm) und roten (546 nm) Lichtspektrum sowie eine deckungsgleiche Überlagerung von bis zu drei Aufnahmen angefertigt.

3. Ergebnisse

3.1 Chronophin ist in murinem Hirngewebe exprimiert.

Zur Untersuchung der zellulären Lokalisation von Chronophin im Gehirn und besonders in den Zellen der neurovaskulären Einheit wurden immunhistochemische Färbungen an wildtypischen Mäusehirnen durchgeführt.

Im Paraffinschnitt konnte bei einer Konzentration des Primärantikörpers anti-Chronophin von 1:4000 im WT eine ubiquitäre Färbung gezeigt werden, die die zerebralen Zellen deutlich sichtbar macht. Bei Verwendung des 20x-Objektivs waren hirneigene Gefäße unterschiedlichen Kalibers im Auflichtmikroskop gut zu erkennen. Dabei waren im WT neuronale Perikarya mit darinliegendem Zellkern (*), Astrozyten mit ovalem Zellkern (+), die umgebende als Neuropil bezeichnete Matrix (-) sowie flache, dem Gefäß anliegende Endothelzellen (<) und Perizyten (>) kräftig angefärbt, sodass von einer Chronophin-Expression in den Zellen der neurovaskulären Einheit ausgegangen werden kann. In KO-Paraffinschnitten war keine Chronophin-Färbung vorhanden (Abb. 10).

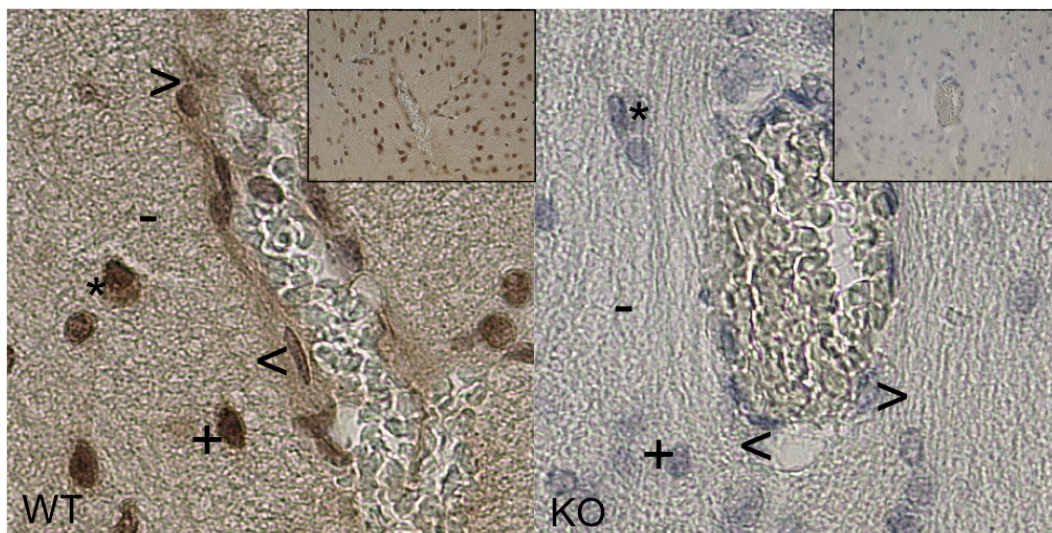


Abbildung 10: Immunhistochemische Färbung von in Paraffin eingebetteten Hirnschnitten wildtypischer und Chronophin-defizienter Mäuse mit anti-Chronophin-Antikörpern.

Dargestellt sind jeweils Gefäßanschnitte im murinen Hirn. Im WT ist Chronophin Neuronen (*), Astrozyten (+), dem umgebenden Neuropil (-) sowie Endothelzellen (<) und Perizyten (>) exprimiert, im KO zeigt sich keine Färbung. Konzentration des Primärantikörpers 1:4000, 20x-Objektiv im Auflichtmikroskop, Ausschnitt 4fach vergrößert.

3.2 In Hirnschnitten von WT und KO lässt sich immunhistochemisch kein Unterschied der Blut-Hirn-Schranke darstellen.

Die Expression von TJ-Proteinen im Gehirn und besonders in den Zellen der neurovaskulären Einheit wurde durch immunhistochemische Färbungen von kryokonservierten wildtypischen und KO-Mäusehirnen untersucht. Die Abbildungen zeigen Ausschnitte der Neokortices nach Inkubation mittels Primärantikörper für Occludin und Claudin-5 und Signal-Amplifizierung mittels DAB-Reagenz. Es zeigt sich für beide Proteine eine gleichmäßig braune Färbung der hirneigenen Gefäßstrukturen ohne Unterschiede zwischen WT und KO (Abb. 11 und 12).

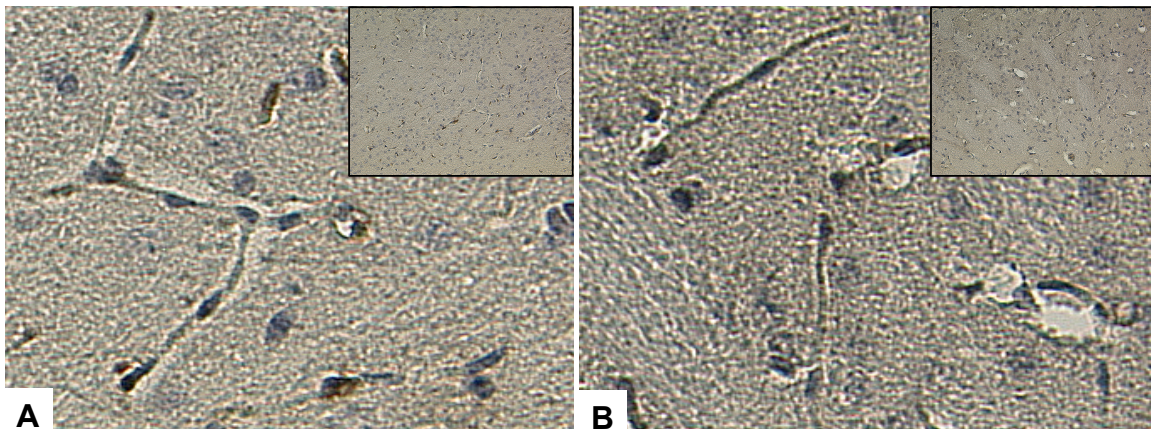


Abbildung 11: Immunhistochemische Färbung von kryokonservierten Hirnschnitten wildtypischer und Chronophin-defizienter Mäuse mit anti-Claudin-5-Antikörpern.

(A) WT (B) KO. Die braune Anfärbung der angeschnittenen Gefäße erscheint im Vergleich ohne auffällige Unterschiede zwischen WT und KO. Konzentration des Primärantikörpers 1:200, 20x-Objektiv im Auflichtmikroskop, Ausschnitt 4fach vergrößert.

Ergebnisse

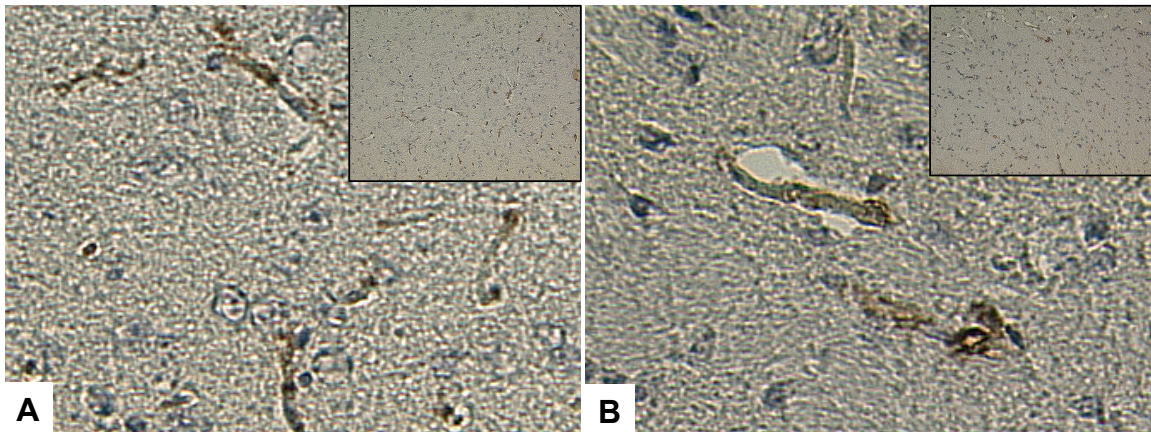


Abbildung 12: Immunhistochemische Färbung von kryokonservierten Hirnschnitten wildtypischer und Chronophin-defizienter Mäuse mit anti-Occludin-Antikörpern.

(A) WT (B) KO. Auch hier ergeben sich keine Unterschiede im Färbungsverhalten der Gefäßstrukturen zwischen WT und KO. Konzentration des Primärantikörpers 1:200, 20x-Objektiv im Auflichtmikroskop, Ausschnitt 4fach vergrößert.

Weiterhin wurden Färbungen in Hirnschnitten nach tMCAO durchgeführt. Immunfluoreszenz-Färbungen für die AJ- und TJ-Proteine E-Cadherin und Occludin lieferten ein ähnlich verteiltes Muster angefärbter Gefäßanschnitte.

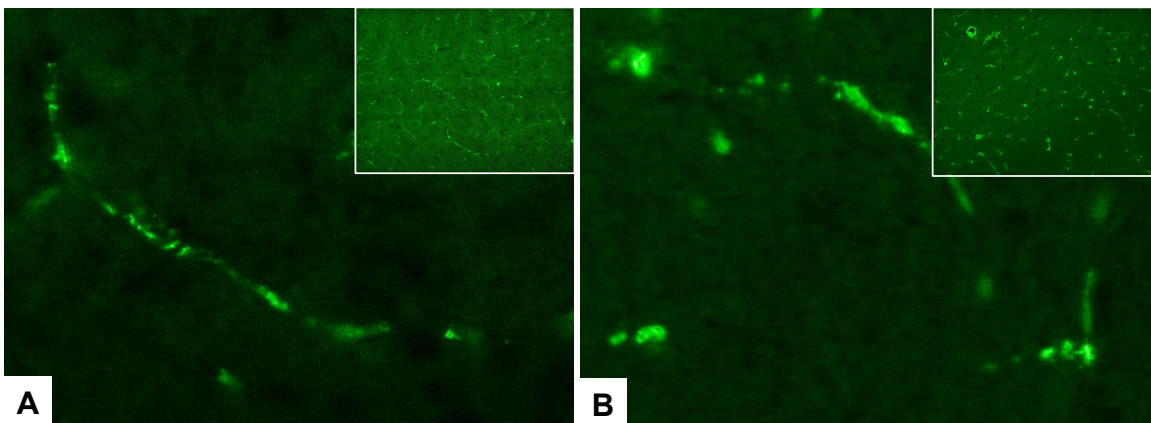


Abbildung 13: Immunfluoreszenz-Färbung von kryokonservierten Hirnschnitten wildtypischer und Chronophin-defizienter Mäuse nach tMCAO mit anti-E-Cadherin-Antikörpern.

Die Färbungsmuster und -intensität der Gefäße erscheinen ähnlich. Konzentration des Primärantikörpers 1:200, 20x-Objektiv im Auflichtmikroskop, Ausschnitt 4fach vergrößert.

Ergebnisse

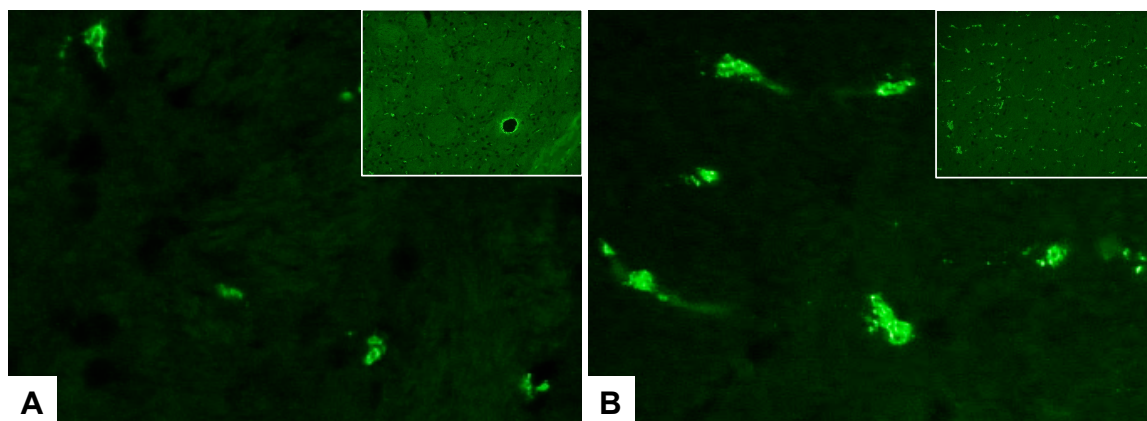


Abbildung 14: Immunfluoreszenz-Färbung von kryokonservierten Hirnschnitten wildtypischer und Chronophin-defizienter Mäuse nach tMCAO mit anti-Occludin-Antikörpern.

Auch hier zeigt sich ein ähnliches Färbungsverhalten. Konzentration des Primärantikörpers 1:200, 20x-Objektiv im Auflichtmikroskop, Ausschnitt 4fach vergrößert.

Um den Anteil des für ein TJ-Protein positiven Signals und so eine mögliche Änderung der Expression in Hirnschnitten nach tMCAO zu quantifizieren, wurden die Schnitte parallel mit einem anti-Laminin-Antikörper als Marker für die Basallaminae der NVE und dem anti-Claudin-5-Antikörper inkubiert. Es wurden je neun ipsilaterale und kontralaterale Aufnahmen einer WT- und einer KO-Maus (drei Aufnahmen des Neocortex von je drei Hirnschnitten) im Auflichtmikroskop angefertigt. Durch Zählung der Bildpixel mit einem Fluoreszenzsignal sowie Vermessung der Gesamtfläche der Aufnahme mittels ImageJ wurde der Anteil der gefärbten Fläche für Laminin und Claudin-5 bestimmt. Dabei wurden je Aufnahme mit dem 20x-Objektiv etwa 200-300 Gefäßanschnitte identifiziert.

Um nun den Anteil von Claudin-5-gefärbten Gefäßen an allen mit Laminin gefärbten Gefäßen zu bestimmen, wurde der Quotient aus der Claudin-5-positiven und der Laminin-positiven Fläche gebildet.

Bei KO-Mäusen war der Mittelwert des Verhältnisses Claudin-5-positiv Fläche/Laminin-positiv Fläche in der Infarktregion mit 0,54 etwas größer als kontralateral (0,49). Im WT betrug der Mittelwert in beiden Regionen 0,63, womit dieser insgesamt höher lag als bei KO-Mäusen. Es waren keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Expression von Claudin-5 festzustellen (Abb. 15).

Ergebnisse

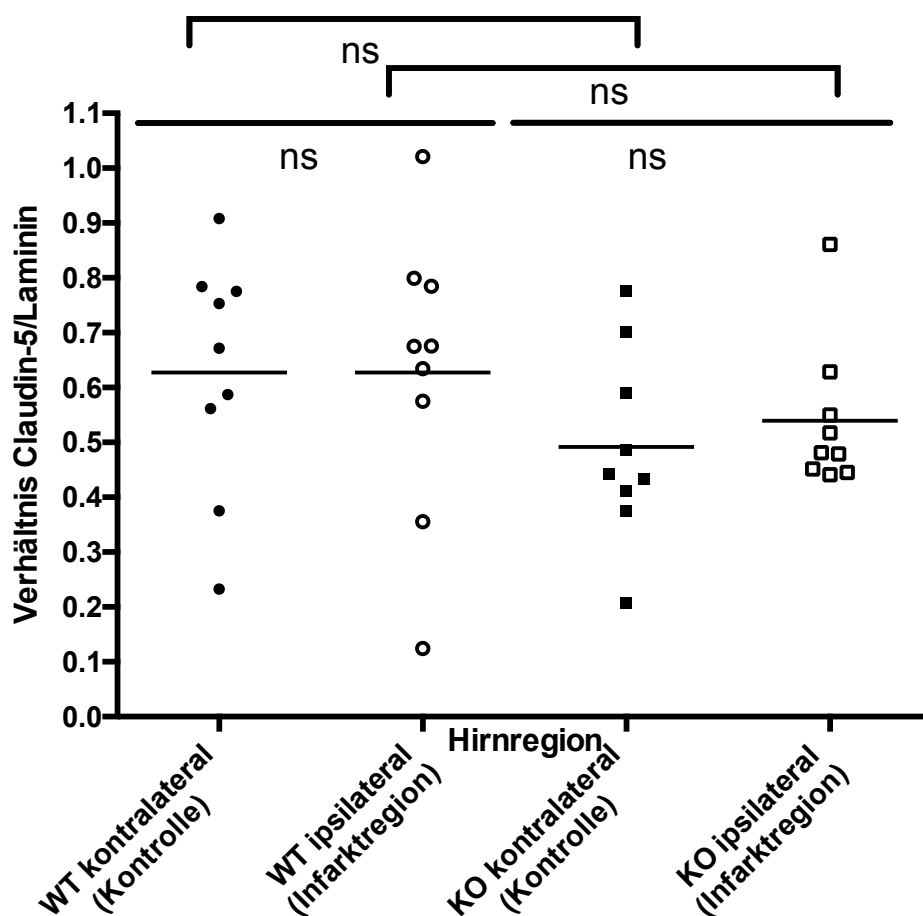


Abbildung 15: Verhältnis von Claudin-5- zu Laminin-positiver Fläche in Hirnschnitten wildtypischer und Chronophin-defizienter Mäuse nach tMCAO.

In den neun untersuchten Regionen aus insgesamt drei Hirnschnitten waren zwischen KO- und WT-Hirnen je einer Maus in Infarkt- und Kontrollregion keine signifikanten Unterschiede im Verhältnis der Claudin-5- zu Laminin-positiven Fläche zu verzeichnen.

3.3 *Pdxp*-mRNA ist nach Schlaganfall im Infarktareal herunterreguliert.

Für die Erfassung von möglichen Änderungen in der Expression von *Pdxp*-mRNA nach einem ischämischen Ereignis im Gehirn wurden wildtypische Mäuse dem tMCAO-Schlaganfallmodell zugeführt. Dabei konnte die folgende Menge an Gewebeproben von ipsilateralen und kontralateralen Neokortices und Basalganglien analysiert werden:

Ergebnisse

Kortex: 4 (scheinoperiert), 4/4/5 (6/12/23 h nach Reperfusion); 17 Mäuse.

Basalganglien: 5 (scheinoperiert), 4/5/4 (6/12/23 h nach Reperfusion); 18 Mäuse.

Im Kortex zeigte sich im Vergleich zu scheinoperierten Mäusen 6 h nach Reperfusion zunächst eine Zunahme der Expression auf etwa 127 %, nach 12 h ein Rückgang auf 106 % und nach 23 h eine nicht signifikante Abnahme der Expression auf knapp 41 % des Wertes bei scheinoperierten Mäusen ($p=0,051$, Abb. 16).

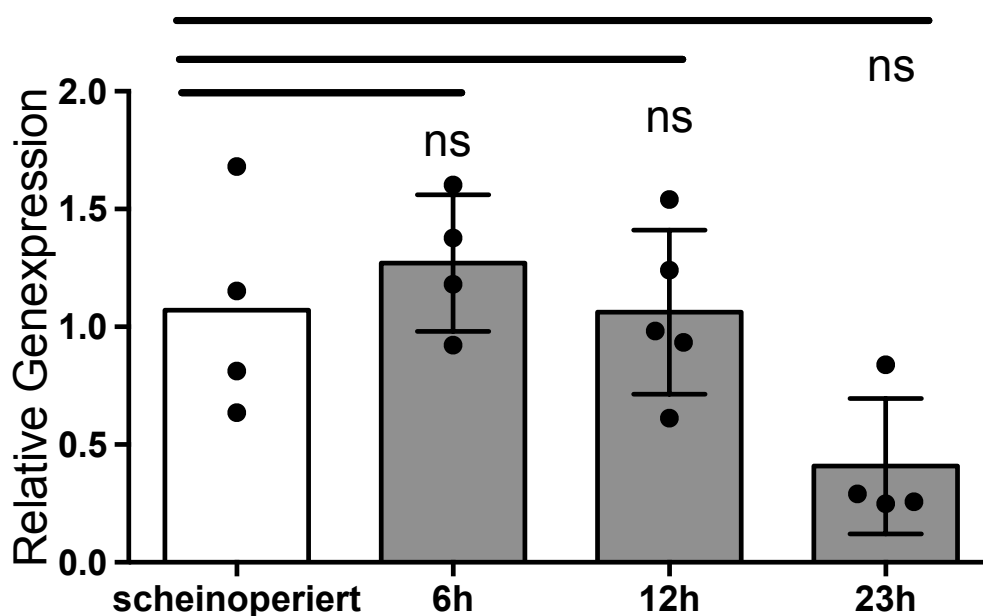


Abbildung 16: *Pdxp*-mRNA-Expression im Kortex.

Es zeigt sich ein Anstieg nach 6 h, ein Rückgang nach 12 h und eine nicht signifikante Abnahme nach 23 h.

In den Basalganglien war nach 6 und 12 h ein nicht signifikanter Rückgang der Expression auf etwa 90 % und 78 % zu verzeichnen, nach 23 h war eine Expression von etwa 43 % des Wertes scheinoperierter Mäuse erreicht, wobei eine statistische Signifikanz gegeben war ($p=0,017$, Abb. 17).

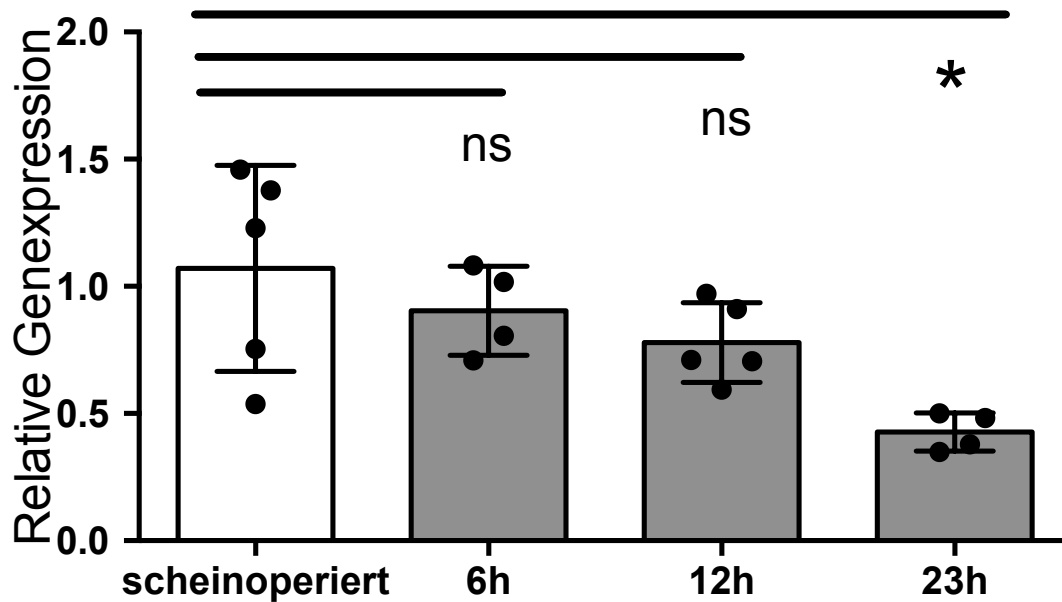


Abbildung 17: *Pdxp*-mRNA-Expression in den Basalganglien.

Es zeigen sich stetige Abnahmen nach 6 und 12 h sowie eine signifikante Abnahme nach 23 h.

3.4 Chronophin ist nach Schlaganfall ebenfalls im Infarktareal herunterreguliert.

Die Hirnlysate von wildtypischen Mäusen nach experimentellem Schlaganfall wurden mittels Immunblot hinsichtlich einer möglichen Änderung der Proteinmenge von Chronophin untersucht. Die anschließend in Ponceau S-Lösung gefärbten Membranen zeigten einen gleichmäßig erfolgten Proteintransfer. Beispielfhaft sei hier eine Membran mit sechs Proteinspuren aus Lysaten der Kerngebiete gezeigt (Abb. 18).

Ergebnisse

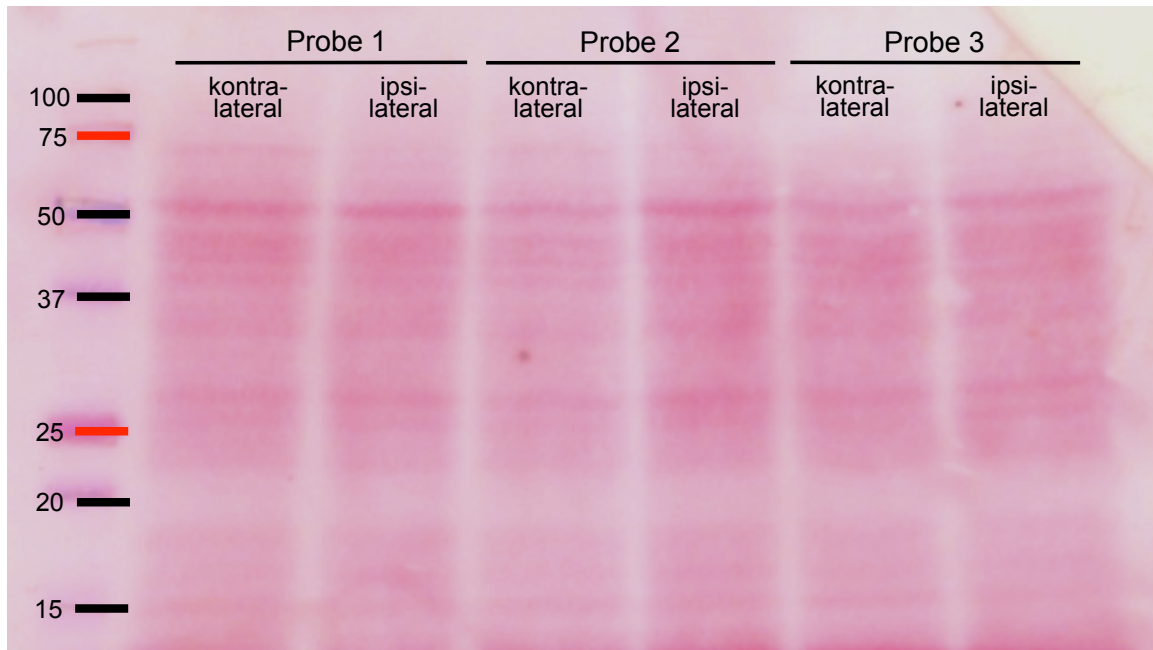


Abbildung 18: Exemplarische Darstellung eines gleichmäßigen Proteintransfers bei einer in Ponceau S-Lösung gefärbten Nitrocellulosemembran.

Die sechs Spuren enthalten Proteine von murinen Hirnlysaten aus den Basalganglien, die in einem 12 %-igen Gel elektrophoretisch aufgetrennt wurden.

Nach der Inkubation der Membranen mit Primär- und Sekundärantikörpern erfolgte die Detektion von Chronophin- und Aktin-Banden mittels verstärkter Chemilumineszenz. Dabei waren auf den einzelnen Membranen häufig schwächere Chronophinbanden schon mit bloßem Auge zu erkennen. Im Folgenden ist eine Membran mit den ipsi- und kontralateralen Spuren dreier Hirnlysate gezeigt (Abb. 19).

Ergebnisse

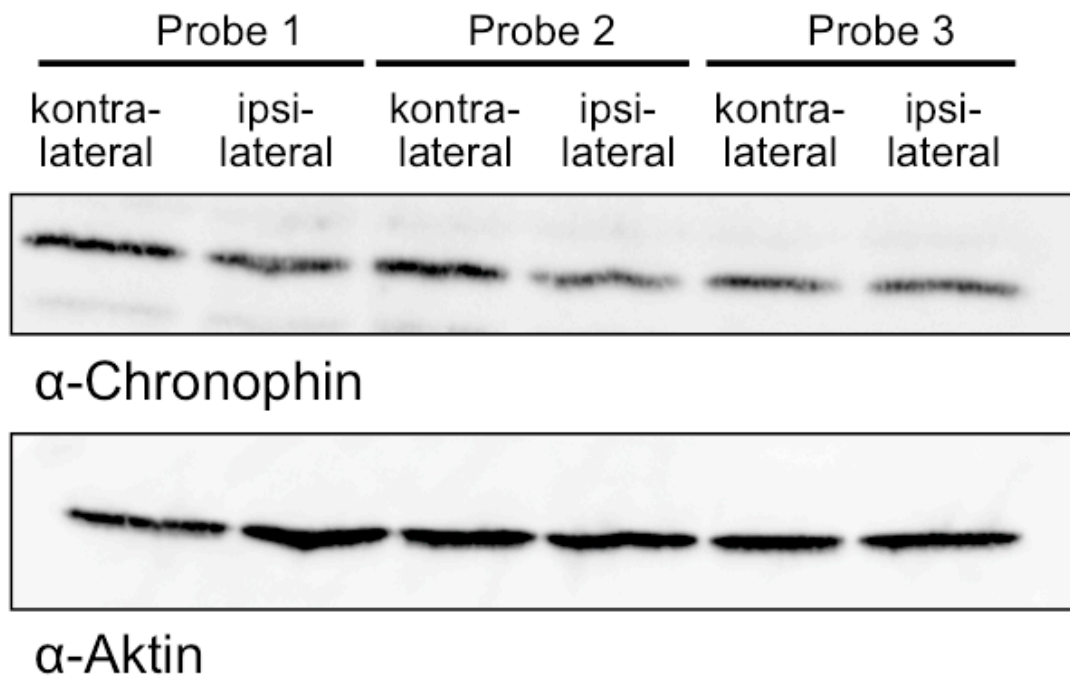


Abbildung 19: Mittels Western Blotting nachgewiesene Proteinbanden von Chronophin und Aktin in ipsi- und kontralateralen Basalganglien-Lysaten von drei wildtypischen Mäusen.

Auf dem Blot sind bei Proben aus dem (ipsilateralen) Infarktareal schwächere Chronophinbanden zu erkennen.

Die graphische Darstellung der Signale derselben Membran nach Normalisierung mit der Ladekontrolle Aktin zeigt eine nicht signifikante Herunterregulierung von Chronophin in den ipsilateralen Basalganglien der drei Lysatpaare (Abb. 20).

Ergebnisse

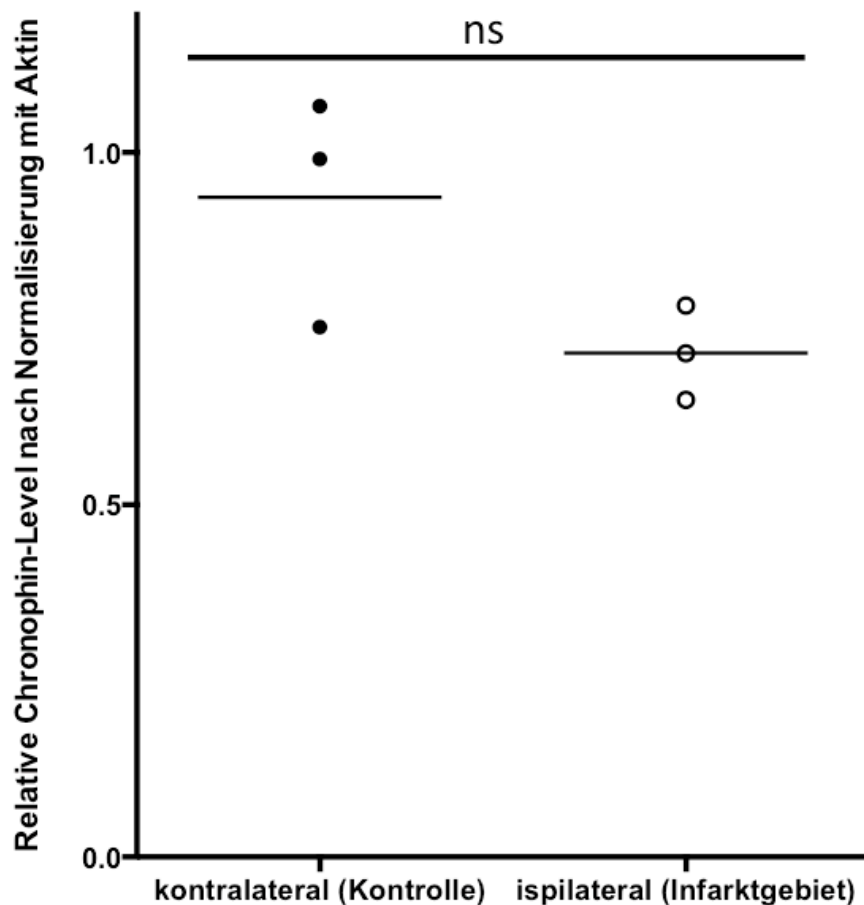


Abbildung 20: Graphische Darstellung der Chronorphin-Level in den drei Basalganglien-Lysaten wildtypischer Mäuse nach Normalisierung mit Aktin.

Es zeigt sich eine nicht signifikante Herunterregulierung im Infarktgebiet.

Die Quantifizierung der relativen Chronorphin-Level erfolgte bei je sechs Lysaten aus Kortex und Basalganglien ($n=6$) und jeweils zweimal durchgeführtem Immunblot, dessen Ergebnisse gemittelt wurden. Zusammenfassend konnte sowohl in Kortexarealen als auch in den Basalganglien eine ipsilaterale Verminderung der Chronorphin-Level erhoben werden. Dabei zeigte sich nur bei kortikalen Lysaten eine signifikante Herunterregulierung ($p=0,01$) auf $60,8 \pm 10,9$ %, in den Kerngebieten war die Abnahme auf $72,4 \pm 11,5$ % nicht signifikant ($p=0,16$; Abb. 21).

Ergebnisse

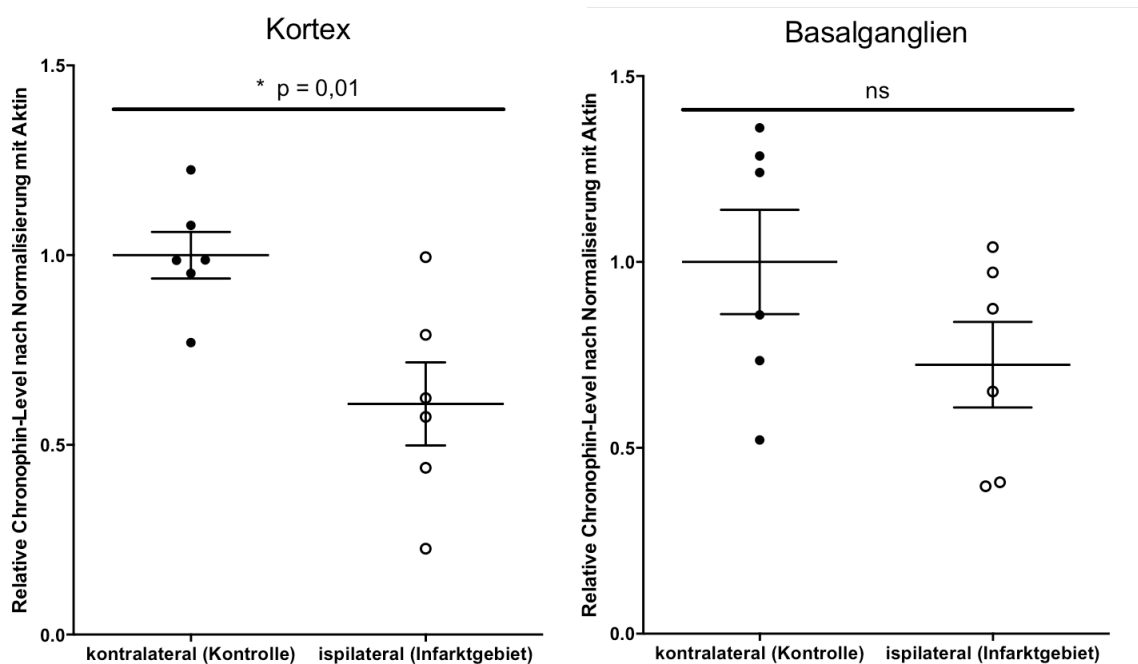


Abbildung 21: Graphische Darstellung der relativen Chronophin-Level nach Normalisierung mit Aktin.

Je 6 Lysate aus Kortex und Basalganglien wildtypischer Mäuse 24 h nach tMCAO wurden zweimal geblottet und die Ergebnisse gemittelt. Es zeigt sich eine signifikante Abnahme von Chronophin im kortikalen Infarktgebiet sowie eine nicht signifikante Abnahme in den ipsilateralen Basalganglien.

3.5 KO-Mäuse zeigen größere Infarktareale und Hirnödeme nach Schlaganfall als der WT.

Für den Vergleich von WT und KO im tMCAO-Schlaganfallmodell wurden 19 bzw. 20 Mäuse verwendet. Die Mortalität beim WT betrug 24 % (5 von 19 Mäusen starben), beim KO betrug sie 30 % (6 von 20 Mäusen starben). Somit wurde bei jeweils 14 Mäusen die TTC-Färbung und das Wiegen der Hirne zur Bestimmung der Infarktgröße und Ödembildung durchgeführt.

Die Infarktgröße betrug beim WT $31,54 \pm 2,34$ % (n=14) und bei den KO-Mäusen $37,52 \pm 1,66$ % (n=14). Dies entspricht einem um etwa 19 % größeren

Ergebnisse

Infarktvolumen bei global Chronophin-defizienten Mäusen, wobei der Unterschied mit $p=0,048$ statistisch signifikant war (Abb. 22).

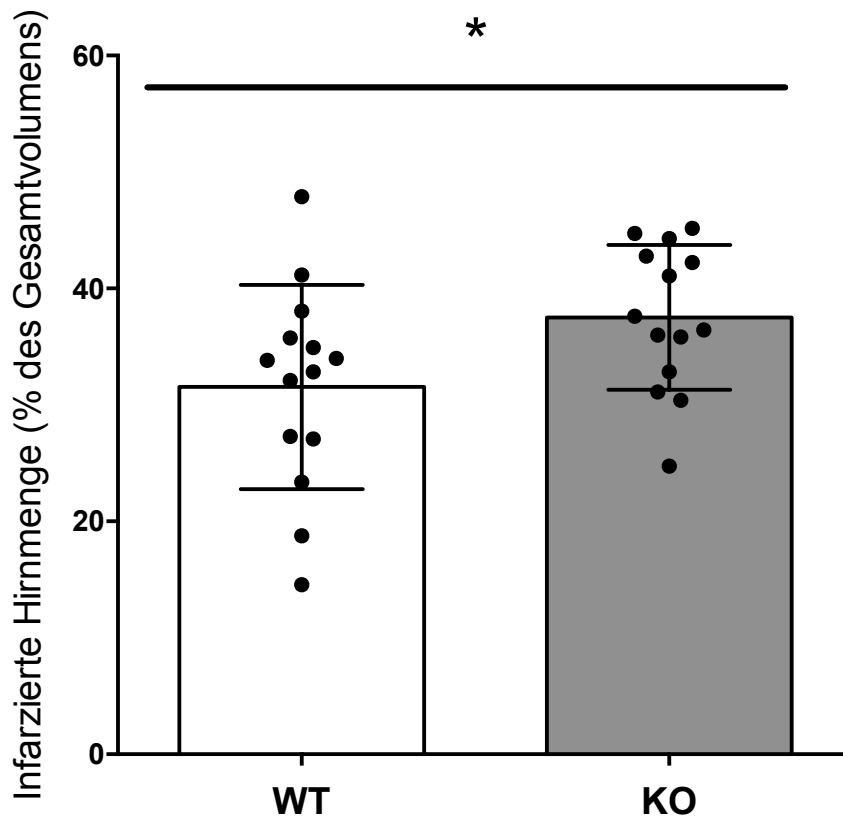


Abbildung 22: Infarktgröße von WT- und KO-Mäusen nach tMCAO.

Es liegt ein signifikant größeres Infarktvolumen in global Chronophin-defizienten Mäusen vor.

Die Hirnödembildung nach tMCAO betrug im WT $11,72 \pm 1,22$ % ($n=14$) und im KO-Modell $16,31 \pm 1,43$ % ($n=14$). Dies entspricht einer um etwa 39 % gesteigerten Ödembildung bei global Chronophin-defizienten Mäusen. Hierbei war der Unterschied mit $p=0,022$ ebenfalls statistisch signifikant (Abb. 23).

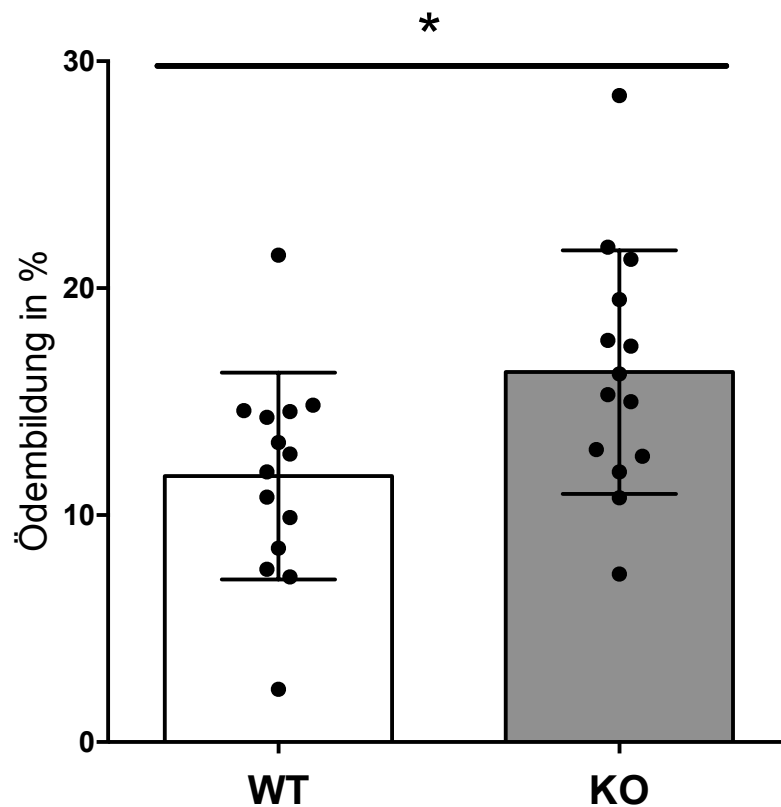


Abbildung 23: Hirnödembildung von WT- und KO-Mäusen nach tMCAO.

Die Ödembildung ist in global Chronophin-defizienten Mäusen signifikant höher.

Weiterhin erfolgte über die im Methodenteil dargestellte Formel eine Korrektur des gemessenen Infarktvolumens hinsichtlich der Ödembildung, indem das Ödemvolumen von der gesamten infarzierten Hirnmenge subtrahiert wurde. Das Ödem-korrigierte Infarktvolumen betrug beim WT $90,4 \pm 6,4 \text{ mm}^3$ (n=14) und beim KO $91,7 \pm 5,0 \text{ mm}^3$ (n=14). Damit waren keine signifikanten Unterschiede zwischen WT und KO vorhanden (Abb. 24).

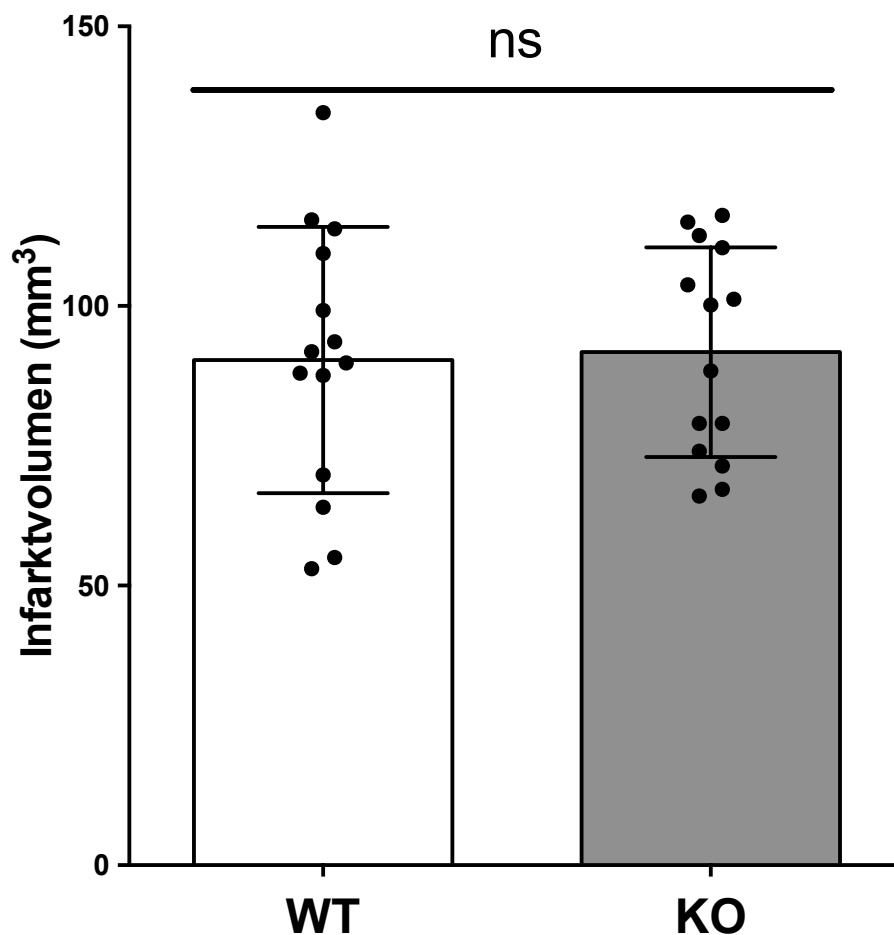


Abbildung 24: Ödem-korrigiertes Infarktvolumen von WT- und KO-Mäusen nach tMCAO.
 Nach Subtraktion des Hirnödems zeigen sich zwischen WT- und KO-Mäusen keine Unterschiede im Infarktvolumen.

3.6 Der neurologische Status von KO-Mäusen ist nach Schlaganfall schlechter als beim WT.

Weiterhin wurde bei den jeweils 14 wildtypischen bzw. global Chronophin-defizienten Mäusen der neurologische Status in Form des Bederson-Scores und des String-Tests erhoben.

Die Erhebung der globalen neurologischen Hirnfunktion mittels Bederson-Score ergab nahezu gleiche Mittelwerte (WT: $3,00 \pm 0,78$ und KO: $3,21 \pm 0,70$; $n=14$) mit dem häufigsten Resultat des „Kreisens in eine Richtung“ (Score 3). Bei 3 Mäusen bzw. 1 Maus ergab sich eine mit dem Score 2 bessere Hirnfunktion, bei

Ergebnisse

2 bzw. 3 Mäusen zeigte sich ein schlechteres neurologisches Ergebnis in Form eines Bederson-Scores von 4 und 5 (keine vorhandenen Bewegungen). Somit ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen WT- und KO-Mäusen (Abb. 25).

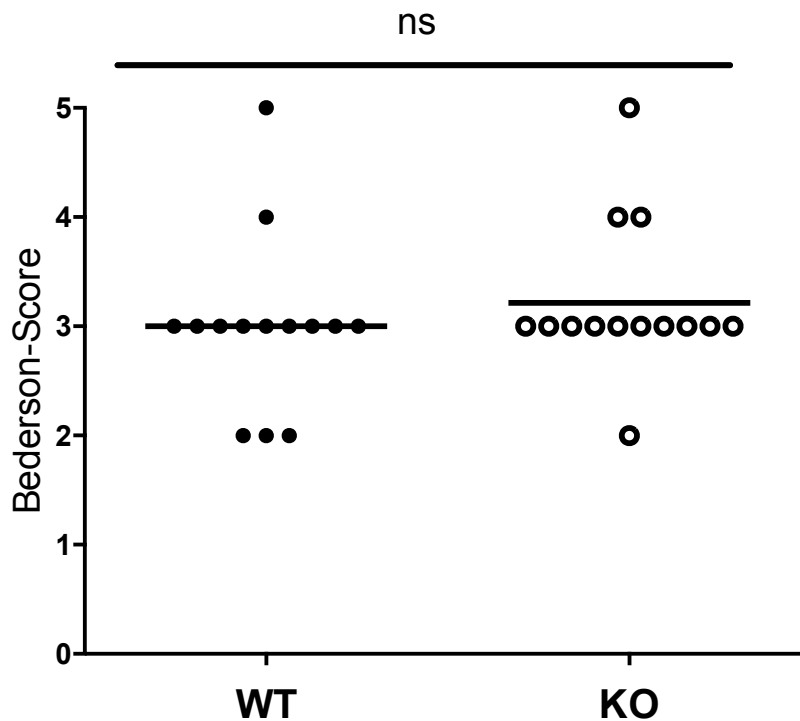


Abbildung 25: Neurologischer Status von WT und KO im Bederson-Score.

Es zeigt sich jeweils ein gemittelter Score von 3 ohne statistisch signifikante Unterschiede zwischen WT- und KO-Mäusen.

Die Evaluation der motorischen Funktion mittels String-Test ergab im WT einen gemittelten Score von $3,07 \pm 1,14$ ($n=14$) und im KO-Modell einen Score von $1,36 \pm 1,39$ ($n=14$). Damit erreichten die Chronophin-defizienten Mäuse einen um fast zwei Punktwerte schlechteren Score als der WT. Nur 4 wildtypische Mäuse erhielten einen Score von 4 (Umwickeln der Schnur mit dem Schwanz) bzw. 5 (erfolgreiche Flucht) und der schlechteste Score, nämlich ein sofortiges Herunterfallen von der Schnur, wurde im WT bei nur einem Tier, im KO hingegen bei 6 Tieren beobachtet. Der Unterschied zwischen WT und KO im String-Test war mit $p=0,002$ hoch signifikant (Abb. 26).

Ergebnisse

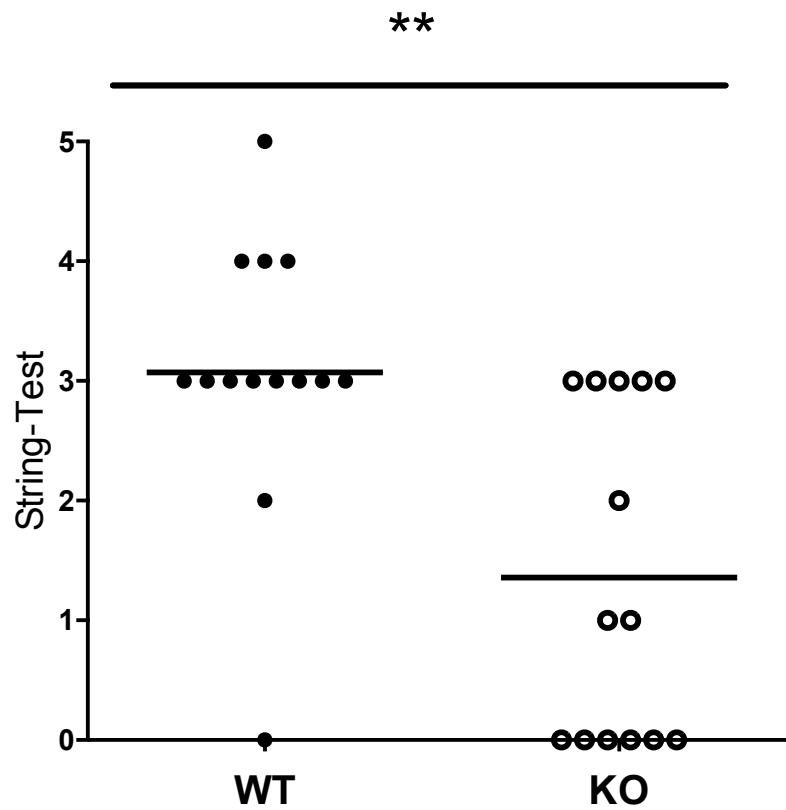


Abbildung 26: Neurologischer Status von WT und KO im String-Test.

Die global Chronophin-defizienten Mäuse zeigten eine hoch signifikant schlechtere motorische Funktion.

3.7 Adherens und Tight Junctions von Endothelzellen zeigen keine mikroskopisch erkennbaren Unterschiede bei WT und KO.

Um die interzellulären Kontakte der Endothelzellen von WT- und KO-Mäusen gezielter zu untersuchen, wurden Immunfluoreszenz-Färbungen von kultivierten, murinen Lungenendothelzellen mit Markern der Tight und Adherens Junctions durchgeführt. Die Methode war zum Zeitpunkt der Arbeit noch nicht in der Arbeitsgruppe etabliert, sodass ein Großteil der Versuche der Erstellung eines optimalen Protokolls zur Isolierung, Kultivierung und Färbung der Endothelzellen aufgewendet wurde. Das Ergebnis dieser Vorarbeiten findet sich im Methodenteil dieser Arbeit. Zur Visualisierung der AJ bzw. TJ wurde der Primärantikörper anti-VE-Cadherin bzw. anti-ZO-1 verwendet. Die Kernfärbung erfolgte mit DAPI. Dabei zeigte sich im WT sowie bei Endothelzellen aus KO-Mäusen eine dichte endotheliale Einzelschicht, bei der an den zellulären Grenzbereichen eine durchgehende Färbung mit VE-Cadherin und ZO-1 vorhanden war. Die Intensität der Färbung war bei ZO-1 geringer als bei VE-Cadherin. Es waren keine offensichtlichen Unterschiede zwischen wildtypischen und Chronophin-defizienten Endothelzellen hinsichtlich der Signalstärke oder subzellulären Verteilung von VE-Cadherin und ZO-1 und somit einer möglichen Differenz in der Expression dieser AJ- und TJ-Proteine erkennbar (Abb. 27 und 28).

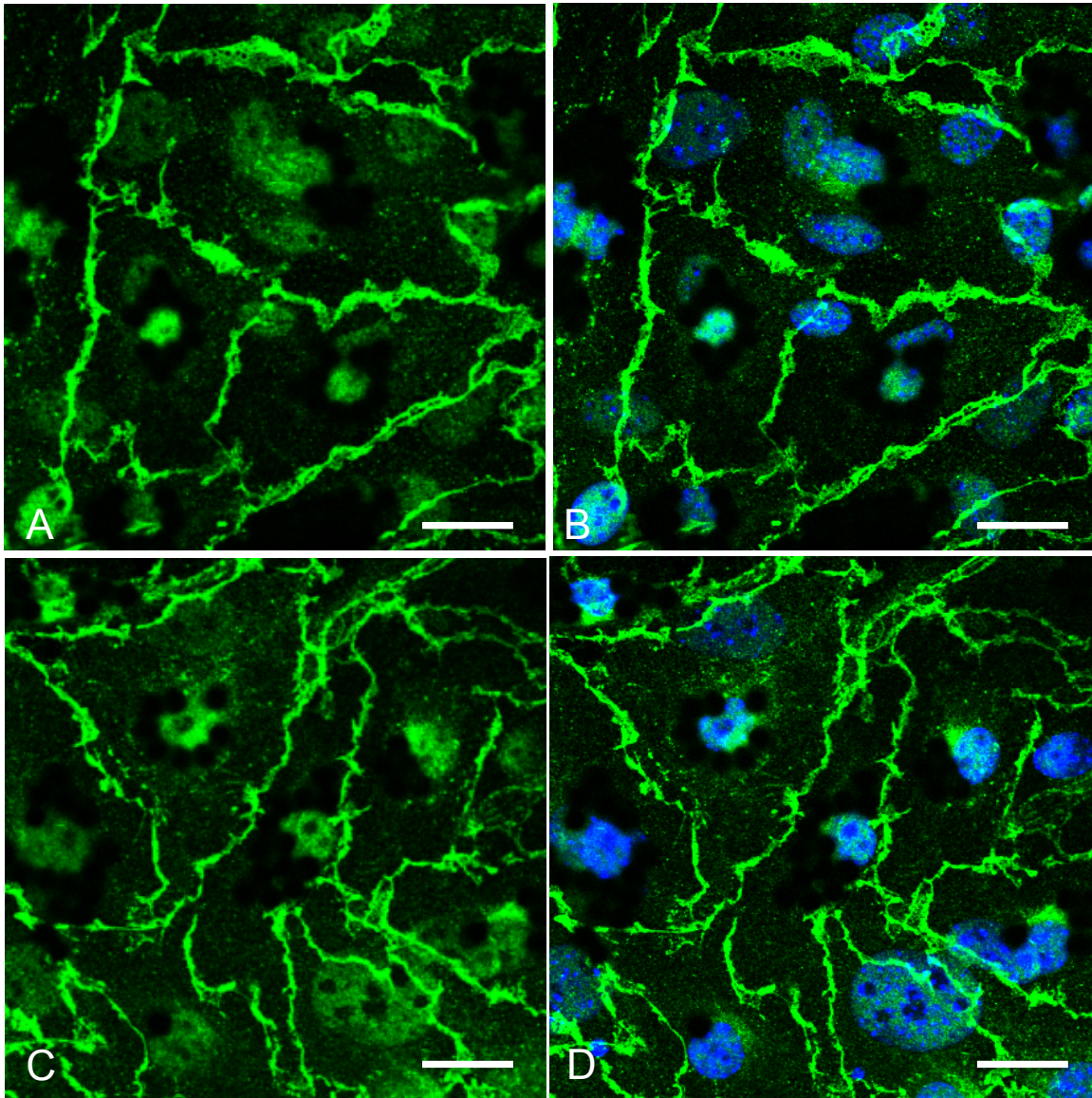


Abbildung 27: Immunfluoreszenz-Färbung der Adherens Junction von wildtypischen und Chronophin-defizienten Endothelzellen.

(A) anti-VE-Cadherin-Färbung im WT (B) zusätzliche DAPI-Kernfärbung (C) anti-VE-Cadherin-Färbung in Chronophin-defizienten Endothelzellen (D) zusätzliche DAPI-Kernfärbung. Es zeigt sich eine geschlossene Einzelschicht von Endothelzellen, die randständig an den Stellen der VE-Cadherin-Färbung miteinander in Verbindung stehen. Die DAPI-Kofärbung zeigt eine perinukleäre Akkumulation der für die Zellseparierung erforderlichen Dynabeads. Konzentration des Primärantikörpers 1:200, 20x-Objektiv im Konfokalmikroskop, Ausschnitt 2fach vergrößert, Maßstabsbalken 20 μm .

Ergebnisse

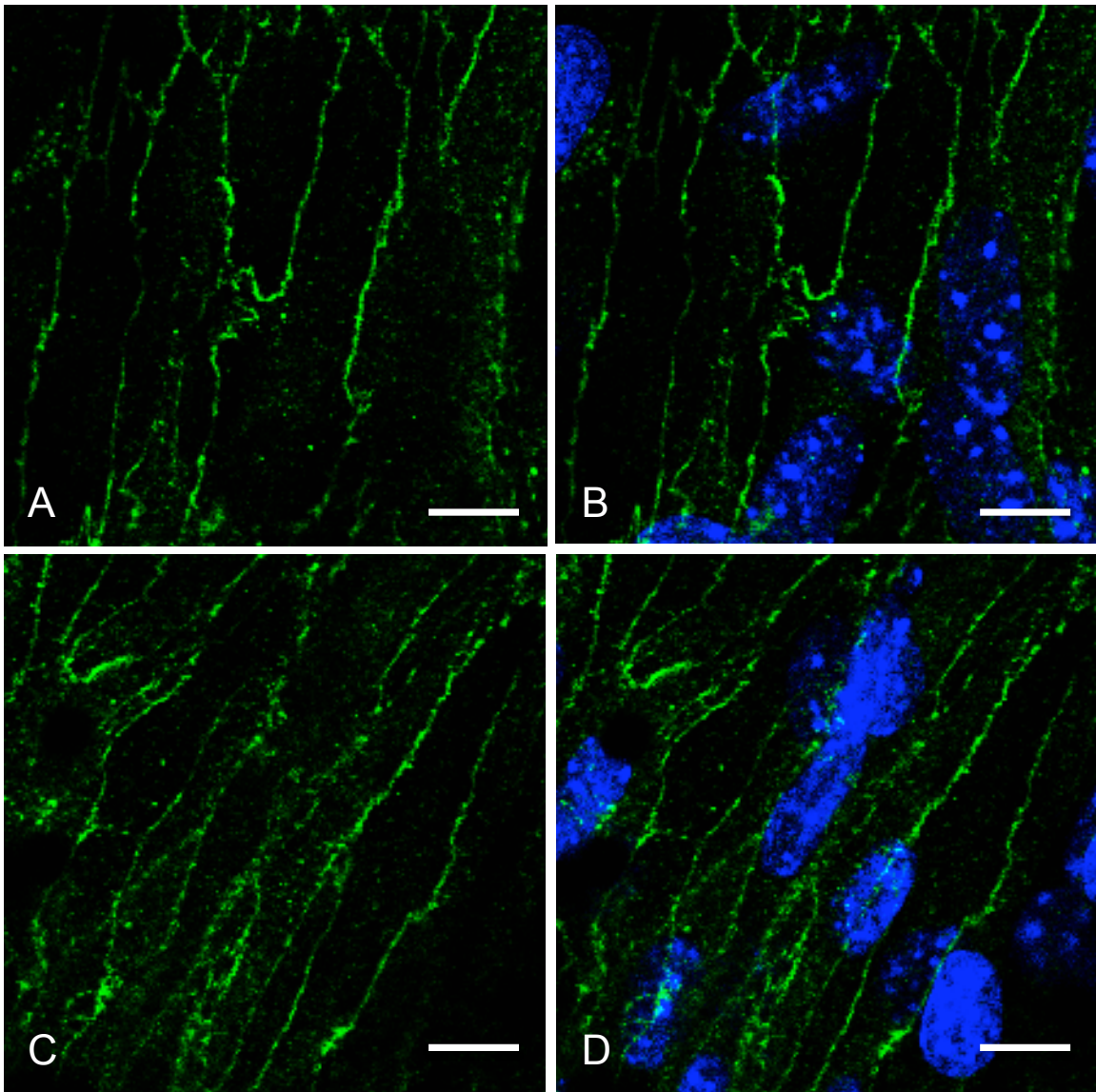


Abbildung 28: Immunfluoreszenz-Färbung der Tight Junction von wildtypischen und Chronophin-defizienten Endothelzellen.

(A) anti-ZO-1-Färbung im WT (B) zusätzliche DAPI-Kernfärbung (C) anti-ZO-1-Färbung in Chronophin-defizienten Endothelzellen (D) zusätzliche DAPI-Kernfärbung. Es zeigt sich eine der AJ ähnliche, jedoch schwächere Färbung der endothelialen Zellgrenzen. Konzentration des Primärantikörpers 1:200, 20x-Objektiv im Konfokalmikroskop, Ausschnitt 4fach vergrößert, Maßstabsbalken 10 μm .

Um den Effekt eines Schlaganfalles auf die BHS bei den aus murinen Lungengewebe gewonnenen Endothelzellen zu simulieren, wurden diese mit den Mediatoren Bradykinin, Thrombin, TNF- α und Histamin stimuliert. Aufgrund methodischer Probleme wie einem vermehrten Wachstum von Fibroblasten in den Endothelzellkulturen konnten jedoch nicht alle Aufnahmen der durch die

Ergebnisse

verschiedenen Agonisten stimulierten Endothelzellen ausgewertet werden. Zunächst wurde der Effekt auf wildtypische Endothelzellen untersucht. Dabei konnte konfokalmikroskopisch eine diffuse Kontinuitätstrennung der endothelialen Tight Junction identifiziert werden. Exemplarisch ist eine Färbung des TJ-Proteins ZO-1 nach 15-minütiger Stimulation mit Thrombin sowie zur Kontrolle dieselbe Färbung ohne vorherige Stimulation dargestellt (Abb. 29).

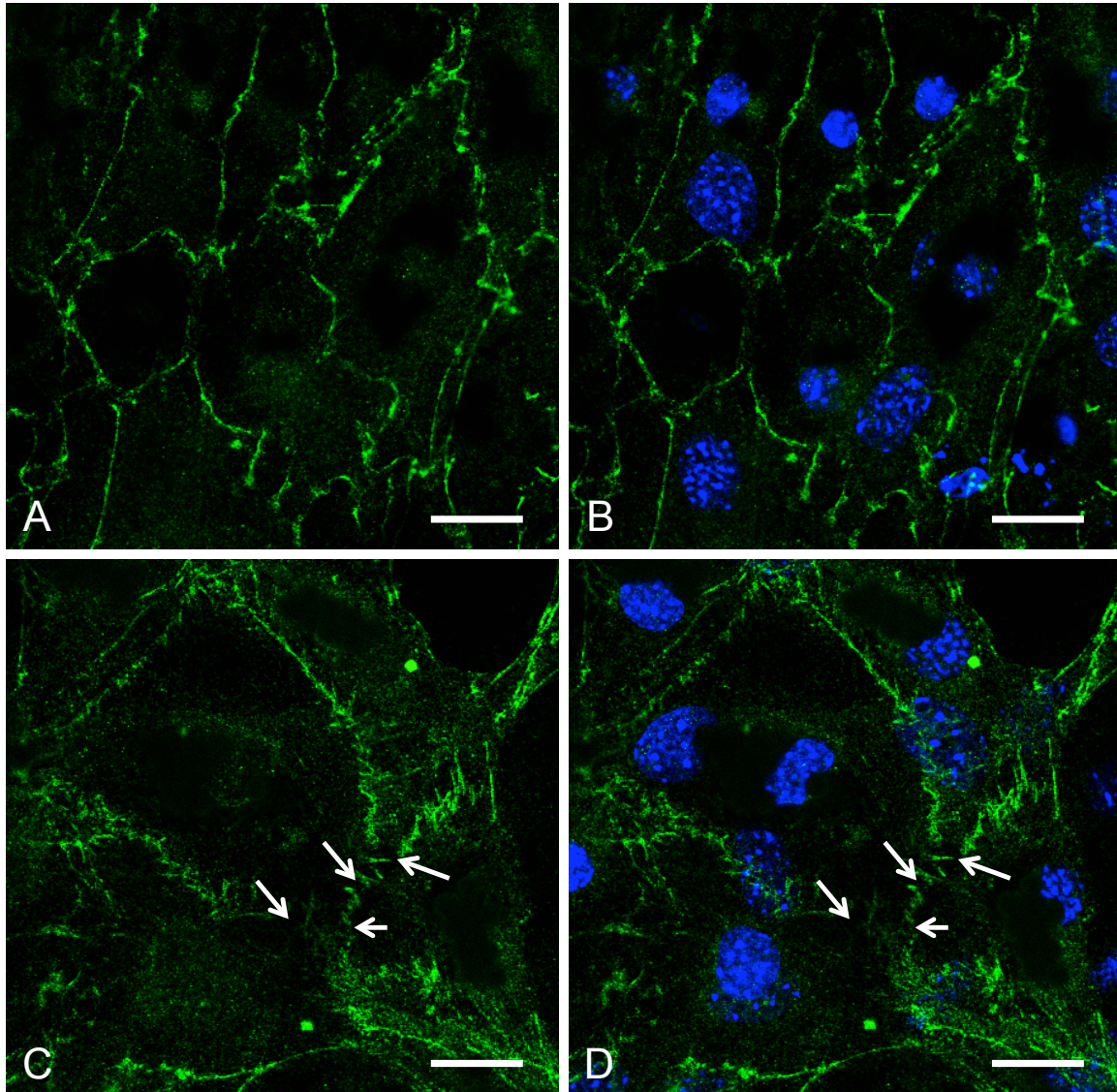


Abbildung 29: Immunfluoreszenz-Färbung der Tight Junction von wildtypischen Endothelzellen mit und ohne Stimulation durch Thrombin.

(A) anti-ZO-1-Färbung ohne Stimulation (B) zusätzliche DAPI-Kernfärbung (C) anti-ZO-1-Färbung mit Stimulation (D) zusätzliche DAPI-Kernfärbung. Nach Stimulation zeigt sich eine diffuse Kontinuitätstrennung der endothelialen Tight Junction (weiße Pfeile). Die Stimulation erfolgte über 15 min mit 0,05 U Thrombin, Konzentration des Primärantikörpers 1:200, 20x-Objektiv im Konfokalmikroskop, Ausschnitt 2fach vergrößert, Maßstabsbalken 20 μm .

Ergebnisse

Anschließend wurden die Effekte der Stimulation mittels Mediatoren auf Endothelzellen von WT- und KO-Mäusen verglichen. Dabei waren keine Unterschiede in den Tight und Adherens Junctions erkennbar. Exemplarisch ist eine Färbung des AJ-Proteins VE-Cadherin nach 15-minütiger Stimulation mit Thrombin in Endothelzellen von WT und KO dargestellt (Abb. 30).

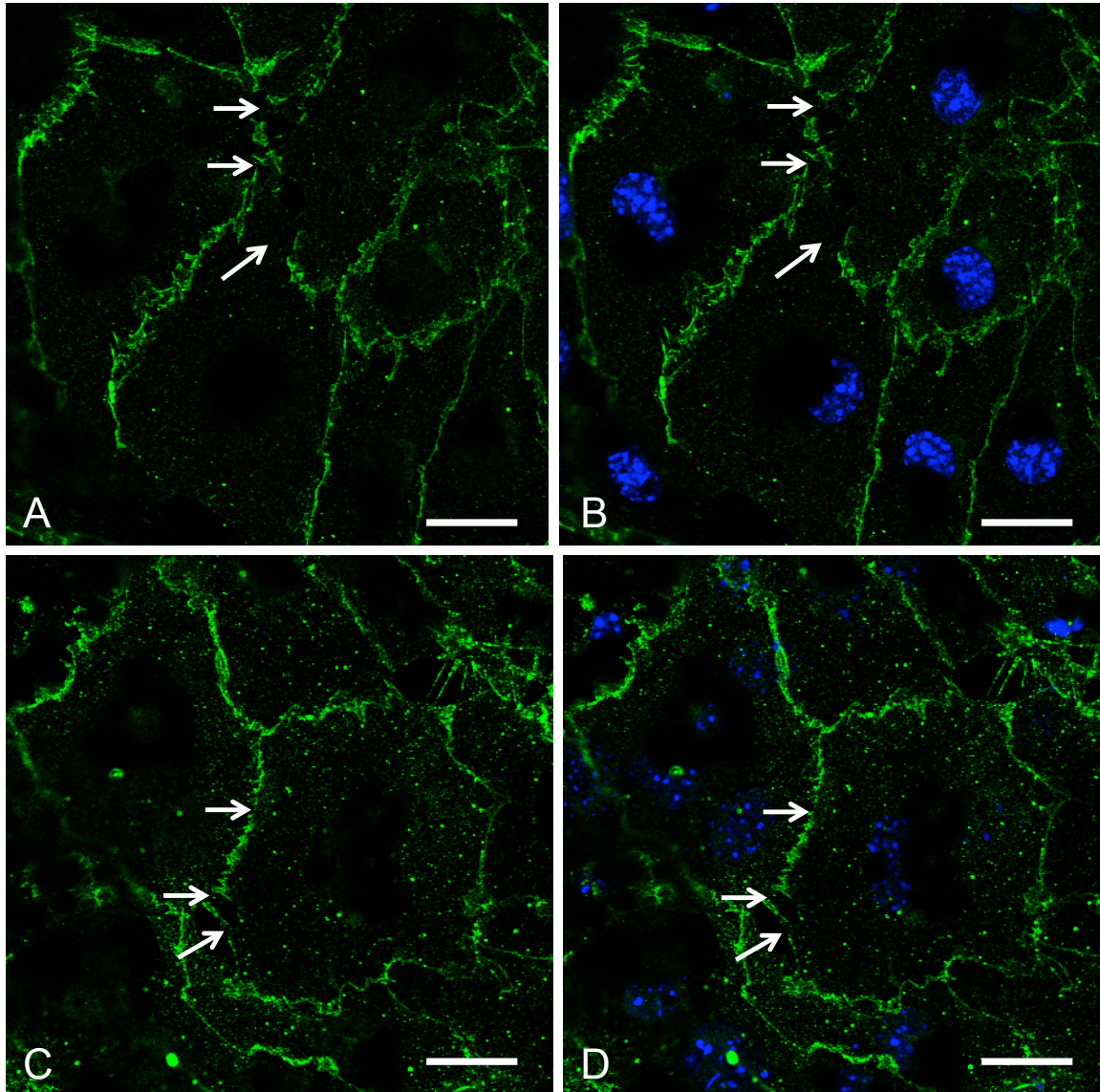


Abbildung 30: Immunfluoreszenz-Färbung der Adherens Junction von wildtypischen und Chronophin-defizienten Endothelzellen nach Stimulation durch Thrombin.

(A) anti-VE-Cadherin-Färbung im WT nach Stimulation (B) zusätzliche DAPI-Kernfärbung (C) anti-VE-Cadherin-Färbung in Chronophin-defizienten Endothelzellen mit Stimulation (D) zusätzliche DAPI-Kernfärbung. Nach Stimulation zeigt sich bei wildtypischen und Chronophin-defizienten Endothelzellen eine mäßige Zerrüttung der Adherens Junction (weiße Pfeile). Die Stimulation erfolgte über 15 min mit 0,05 U Thrombin, Konzentration des Primärantikörpers 1:200, 20x-Objektiv im Konfokalmikroskop, Ausschnitt 2fach vergrößert, Maßstabsbalken 20 μ m.

3.8 E-KO-Mäuse zeigen weder signifikant vergrößerte Infarktareale oder Ödeme noch einen geringeren neurologischen Status nach Schlaganfall als der WT.

Um die Ergebnisse des tMCAO bei global Chronophin-defizienten Mäusen zu konkretisieren, wurden Zell-spezifische Knockouts generiert. Zunächst sollte überprüft werden, ob Endothelzellen – wie in den immunhistochemischen Hirnfärbungen und der Endothelialzellkultur bereits in vitro festgestellt – auch in vivo nicht für die aggravierten Schlaganfälle bei Chronophin-Defizienz verantwortlich gemacht werden können. Daher wurden Schlaganfälle bei E-KO-Mäusen induziert und das Resultat mit dem WT verglichen. Es wurden je 10 Mäuse verwendet. Die Mortalität beim WT war 0 (alle Mäuse überlebten), beim E-KO betrug sie 10 % (1 von 10 Mäusen starb). Beim WT mussten zwei Mäuse wegen fehlender Infarzierung bzw. fehlender Reperfusion ausgeschlossen werden, beim E-KO wurden zwei Mäuse wegen fehlender Infarzierung bzw. einer Blutung ausgeschlossen. Somit wurde bei 8 Mäusen im WT und bei 7 E-KO-Mäusen die TTC-Färbung der Hirne zur Bestimmung der Infarkt- und Ödemflächen durchgeführt.

Die Infarktgröße betrug beim WT $27,95 \pm 1,65$ % (n=8) und bei den E-KO-Mäusen $29,10 \pm 2,73$ % (n=7). Dies entspricht einem um etwa 4 % größeren Infarktvolumen bei Mäusen mit Endothelzell-spezifischer Chronophin-Defizienz, wobei der Unterschied statistisch nicht signifikant war (Abb. 31).

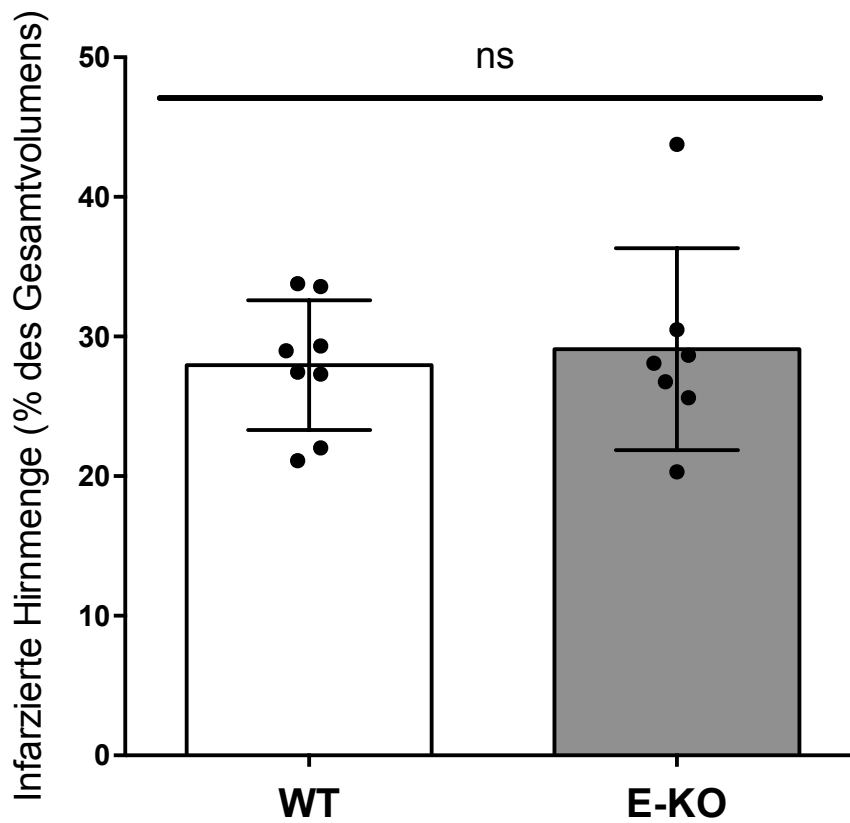


Abbildung 31: Infarktgröße von WT- und E-KO-Mäusen nach tMCAO.

Es liegt kein statistisch signifikanter Unterschied im Infarktvolumen bei wildtypischen und Mäusen mit Endothelzell-spezifischer Chronophin-Defizienz vor.

Die Hirnödembildung nach tMCAO betrug im WT $11,01 \pm 0,59$ % (n=8) und im KO-Modell $12,76 \pm 1,94$ % (n=7). Dies entspricht einer um etwa 16 % gesteigerten Ödembildung bei Mäusen mit Endothelzell-spezifischer Chronophin-Defizienz, wobei der Unterschied statistisch nicht signifikant war (Abb. 32).

Ergebnisse

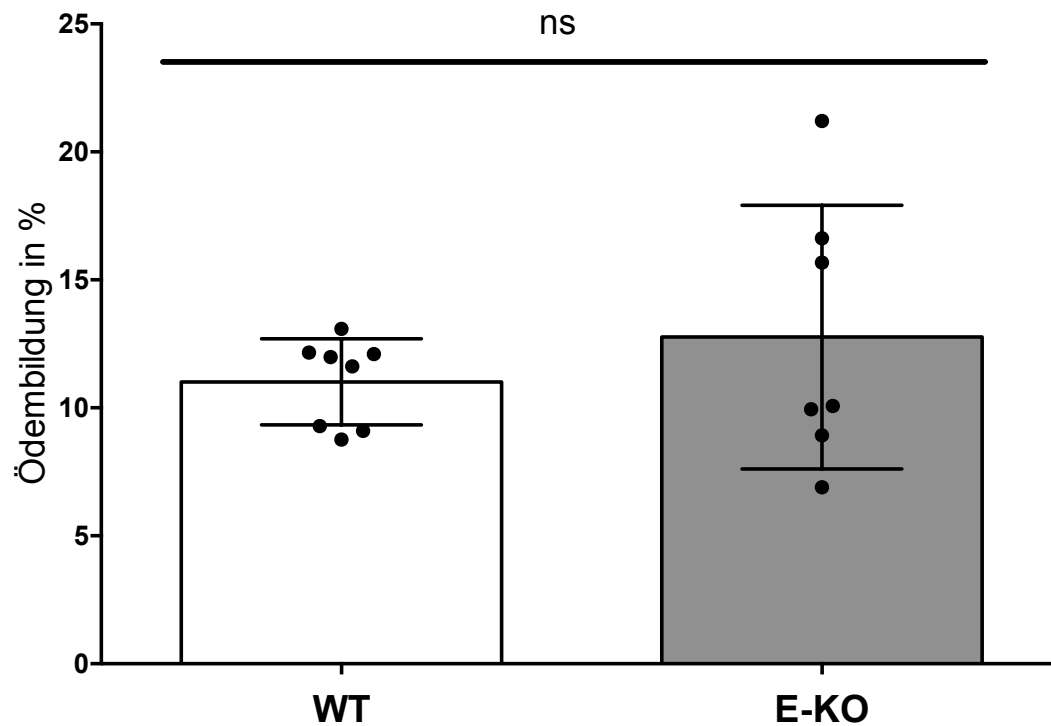


Abbildung 32: Hirnödembildung von WT- und E-KO-Mäusen nach tMCAO.

Die Ödembildung ist bei Mäusen mit Endothelzell-spezifischer Chronophin-Defizienz nicht signifikant erhöht.

Die Erhebung der globalen neurologischen Hirnfunktion mittels Bederson-Score ergab ähnliche Mittelwerte (WT: $2,13 \pm 0,30$; $n=8$ und E-KO: $1,86 \pm 0,51$; $n=7$), wobei die Resultate im WT weniger gestreut waren (ausschließlich Scores 1 bis 3), bei E-KO hingegen alle Scores von 0 bis 4 mindestens einmal vorhanden waren. Somit ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen WT- und E-KO-Mäusen (Abb. 33).

Ergebnisse

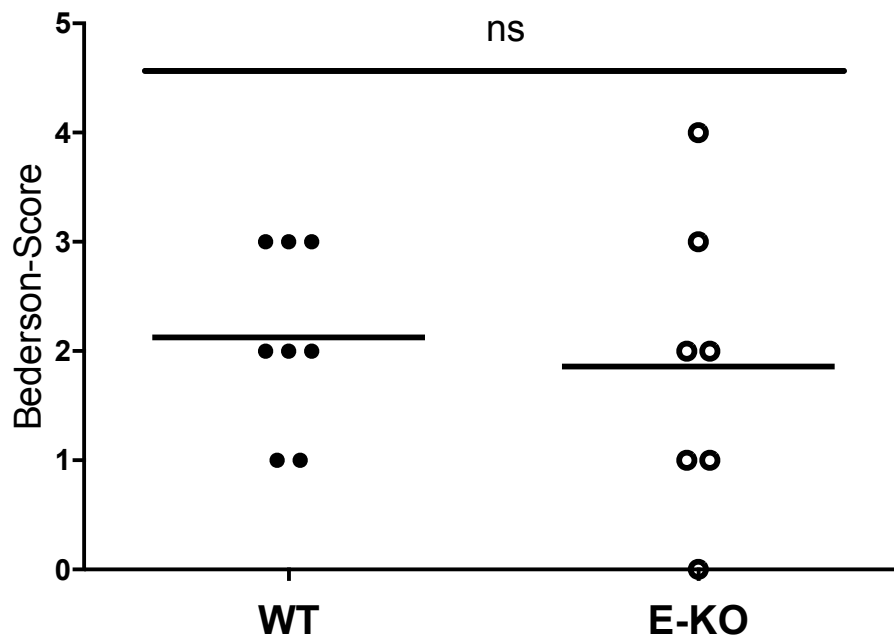


Abbildung 33: Neurologischer Status von WT und E-KO im Bederson-Score.

Die gemittelten Scores liegen etwa bei 2, unterscheiden sich jedoch deutlich in der Streuung der Einzelwerte. Unterschiede zwischen WT und Mäusen mit Endothelzell-spezifischer Chronophin-Defizienz sind statistisch nicht signifikant.

Die Evaluation der motorischen Funktion mittels String-Test ergab im WT einen gemittelten Score von $3,38 \pm 0,57$ ($n=8$) und im E-KO-Modell einen Score von $3,14 \pm 0,70$ ($n=7$). Damit liegen die gemittelten Scores jeweils bei etwa 3. Auffällig ist, dass der schlechteste Score, nämlich ein sofortiges Herunterfallen von der Schnur, bei jeweils einem Tier beobachtet wurde, während sich die weiteren Scores beim WT zwischen 3 und 5 und bei E-KO-Mäusen zwischen 2 und 5 bewegte. Der Unterschied zwischen WT und E-KO im String-Test war statistisch nicht signifikant (Abb. 34).

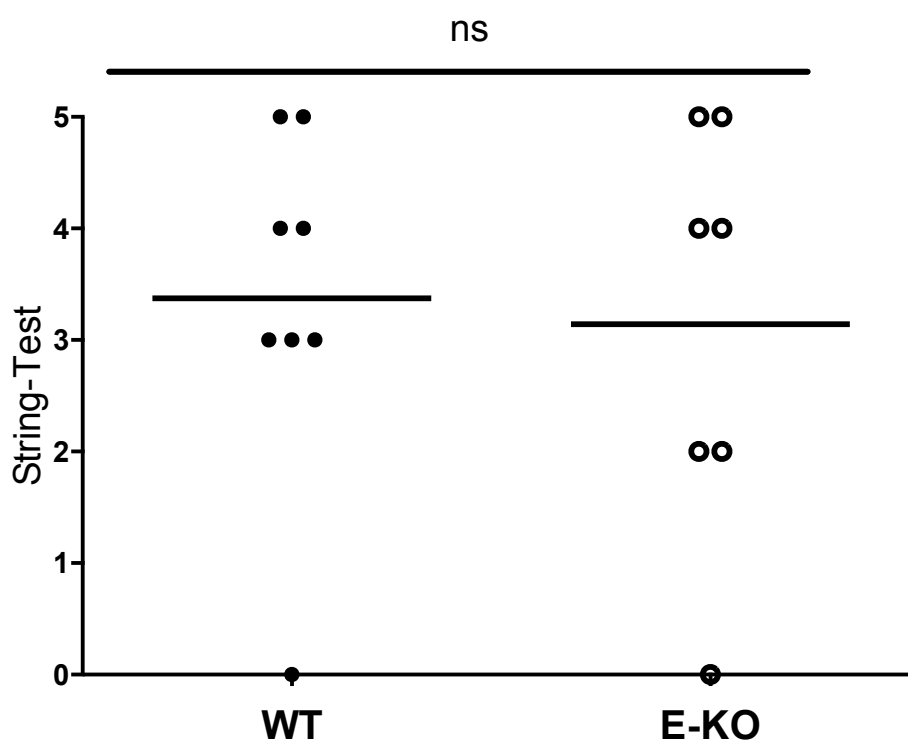


Abbildung 34: Neurologischer Status von WT und E-KO im String-Test.

Die geringen Unterschiede zwischen WT und Mäusen mit Endothelzell-spezifischer Chronophin-Defizienz sind statistisch nicht signifikant.

3.9 Auch bei A-KO- und P-KO-Mäusen zeigen sich keine signifikanten Unterschiede in Infarkt- und Ödemgröße sowie neurologischem Status nach Schlaganfall.

Um weitere Zellarten auf die Rolle von Chronophin bei der Manifestierung eines Schlaganfalles zu untersuchen, wurden Zell-spezifische Knockouts für Astrozyten (A-KO) und Megakaryozyten/Thrombozyten (P-KO) generiert und im tMCAO-Modell behandelt. Es wurden je 10 A-KO- und P-KO-Mäuse verwendet und mit 9 bzw. 10 wildtypischen Mäusen verglichen. Die Mortalität betrug beim A-KO 10 % (1 von 10 Mäusen starb) und beim P-KO 20 % (2 von 10 Mäusen starben), beim WT lag sie bei 22 % (2 von 9 Mäusen starben) bzw. 30 % (3 von 10 Mäusen starben). Bei der ersten WT-Kohorte musste eine Maus wegen fehlender Infarzierung ausgeschlossen werden. Somit wurde bei 9 A-KO- und 8 P-KO-

Ergebnisse

Mäusen sowie bei 6 bzw. 7 Mäusen im WT die TTC-Färbung und das Wiegen der Hirne zur Bestimmung der Infarktgröße und Ödembildung durchgeführt.

Die Infarktgröße betrug bei den A-KO-Mäusen $27,24 \pm 1,94$ % (n=9) und beim entsprechenden WT $25,59 \pm 3,71$ % (n=6). Bei den P-KO-Mäusen betrug sie $27,76 \pm 3,69$ % (n=8) und beim entsprechenden WT $25,98 \pm 3,42$ % (n=7). Dies entspricht einem um etwa 6 % bzw. 7 % größeren Infarktvolumen bei Mäusen mit Astrozyten- bzw. Megakaryozyten-/Thrombozyten-spezifischer Chronophin-Defizienz, wobei der Unterschied in keinem der Fälle statistisch signifikant war (Abb. 37).

Die Hirnödembildung nach tMCAO betrug im A-KO-Modell $11,43 \pm 1,42$ % (n=9) und im entsprechenden WT $9,22 \pm 1,97$ % (n=6). Im P-KO-Modell betrug sie $7,80 \pm 1,31$ % (n=8) und im entsprechenden WT $9,78 \pm 1,72$ % (n=7). Dies entspricht einer um etwa 24 % gesteigerten Ödembildung bei Mäusen mit Astrozyten-spezifischer Chronophin-Defizienz und einer um etwa 25 % verminderten Ödembildung bei Mäusen mit Megakaryozyten-/Thrombozyten-spezifischer Chronophin-Defizienz, wobei der Unterschied in keinem der Fälle statistisch signifikant war (Abb. 35).

Ergebnisse

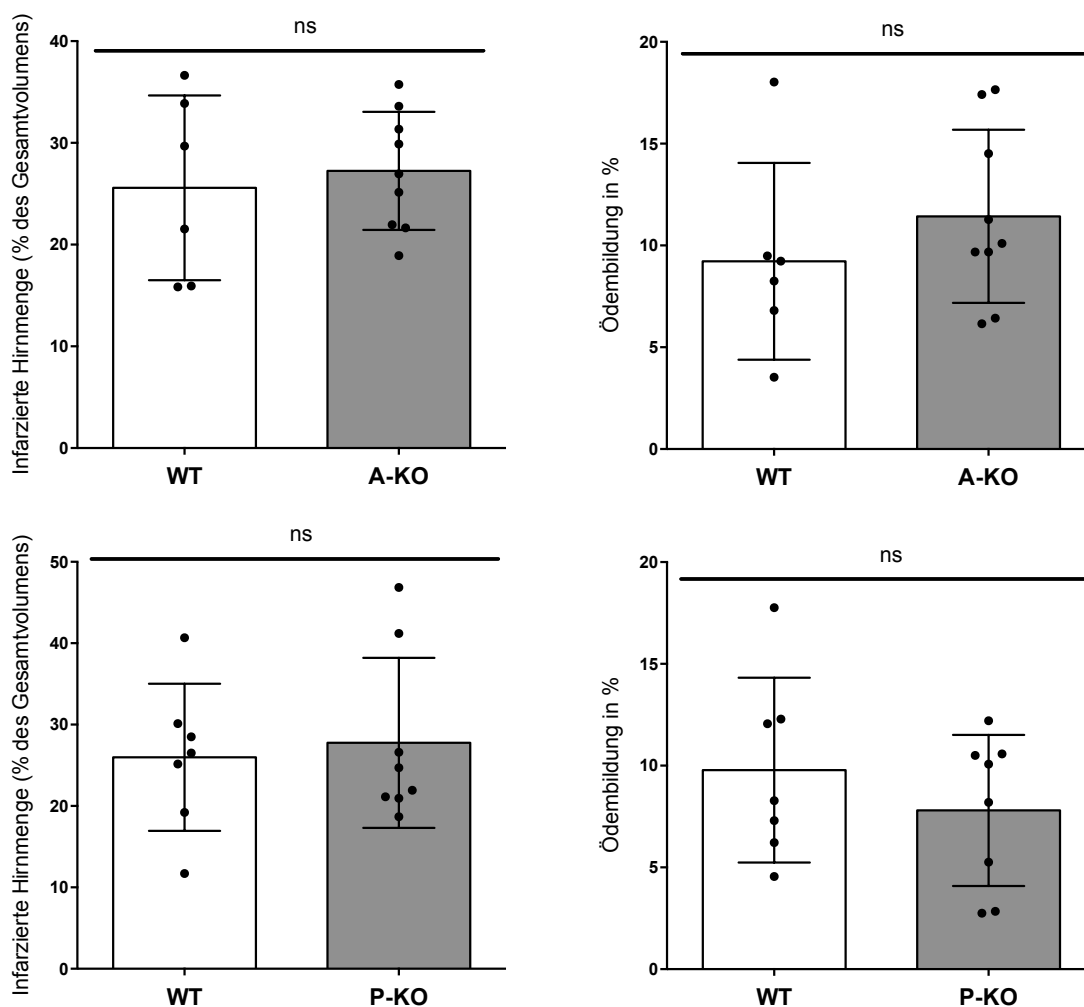


Abbildung 35: Infarktgröße und Hirnödembildung von WT- und A-KO- sowie P-KO-Mäusen nach tMCAO.

Es liegt ein nicht signifikant größeres Infarktvolumen bei beiden Chronophin-defizienten Mausmodellen vor. Die Ödembildung ist im Astrozyten-spezifischen Knockout tendenziell größer, im Megakaryozyten-/Thrombozyten-spezifischen Knockout eher geringer als im WT, die Unterschiede sind jedoch nicht statistisch signifikant.

Die Erhebung der globalen neurologischen Hirnfunktion mittels Bederson-Score ergab nahezu gleiche Mittelwerte im Astrozyten-spezifischen Knockout (A-KO: $2,44 \pm 0,18$ mit $n=9$ und WT: $2,50 \pm 0,22$ mit $n=6$) und einen höheren mittleren Score im Megakaryozyten-/Thrombozyten-spezifischen Knockout (P-KO: $2,88 \pm 0,35$ mit $n=8$ und WT: $2,14 \pm 0,14$ mit $n=7$). Bei WT und A-KO waren ausschließlich die Scores 2 und 3 vorhanden, bei P-KO war ein Score von 5 bei einem Tier für den höheren Mittelwert mitverantwortlich. Es ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen WT und E-KO- bzw. P-KO Mäusen.

Ergebnisse

Die Evaluation der motorischen Funktion mittels String-Test ergab im A-KO-Modell einen gemittelten Score von $3,44 \pm 0,38$ ($n=9$), im P-KO-Modell einen Score von $3,25 \pm 0,31$ ($n=8$) und im entsprechenden WT $3,33 \pm 0,21$ ($n=6$) bzw. $3,29 \pm 0,29$ ($n=7$). Damit sind annähernd gleiche Scores bei einer etwas größeren Streuung im A-KO-Modell erreicht worden. Die Unterschiede zwischen E-KO- bzw. P-KO Mäusen und dem WT im String-Test waren statistisch nicht signifikant (Abb. 36).

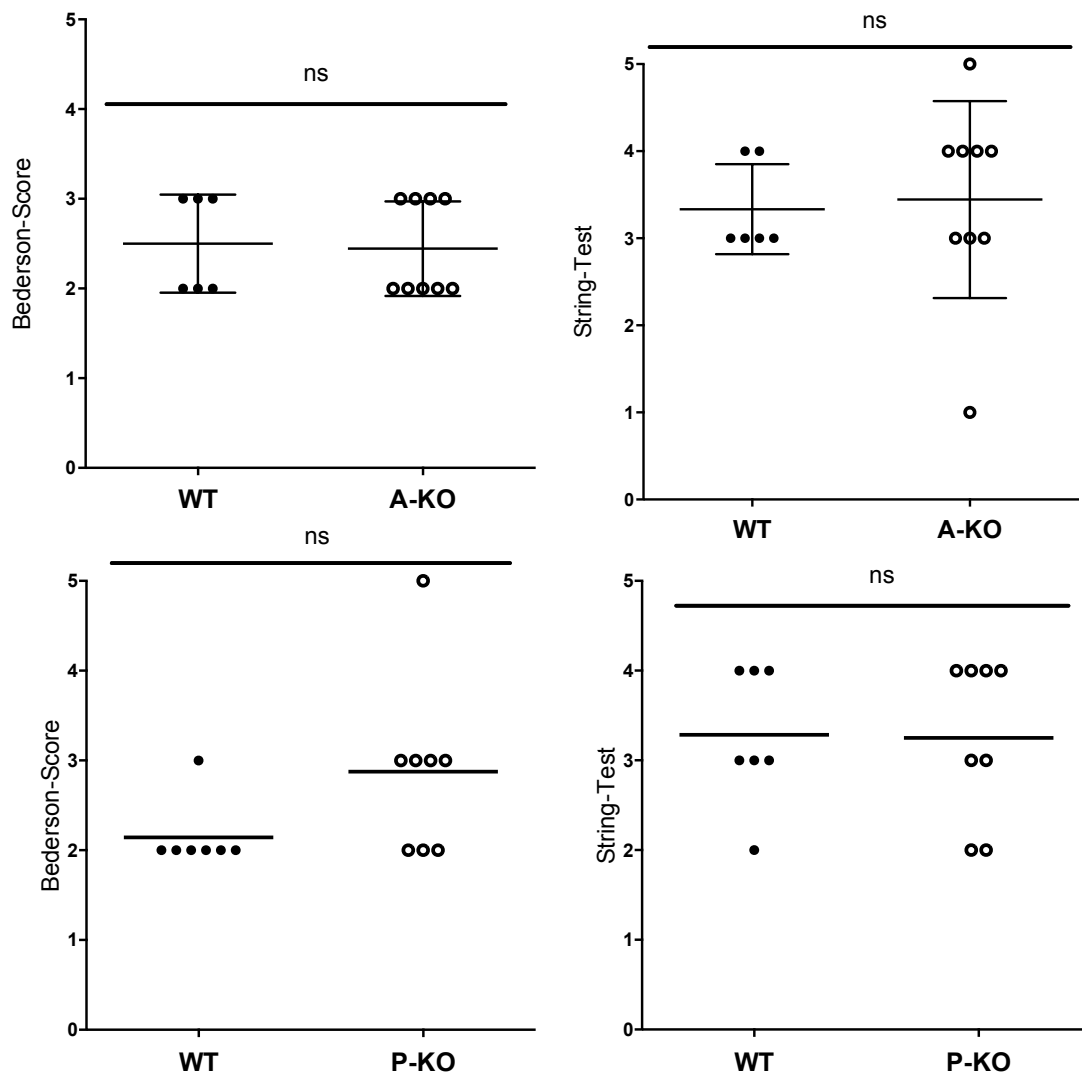


Abbildung 36: Neurologischer Status von WT- und A-KO- sowie P-KO-Mäusen in Bederson-Score und String-Test.

Der Bederson-Score entsprach bei A-KO etwa dem WT und war im P-KO leicht erhöht, jedoch ohne statistisch signifikanten Unterschied. Im String-Test zeigten sich keine Unterschiede.

3.10 Zusammenfassung der Ergebnisse

Bevor Chronophin im Schlaganfallmodell untersucht wurde, konnte zunächst immunhistochemisch gezeigt werden, dass Chronophin in murinem Hirngewebe exprimiert ist (3.1). Hinsichtlich der Expression von Tight und Adherens Junction-Proteinen, die für die Funktion der Blut-Hirn-Schranke essentiell sind, konnten immunhistochemisch weder basale Unterschiede in wildtypischen und Chronophin-defizienten Mäusen noch deren Änderungen nach Schlaganfall-Induktion festgestellt werden (3.2). Die Transkription von *Pdxp*-mRNA wird nach Schlaganfall mit steigender Reperfusiondauer in betroffenen Kortexarealen und Basalganglien herunterreguliert (3.3). Bisherige Untersuchungen hatten gezeigt, dass Chronophin über einen längeren Zeitraum stabil ist. Aus diesem Grund erschienen weitergehende Untersuchungen der murinen Proben auf Proteinebene sinnvoll. Dabei konnte sowohl in Kortexarealen wie auch in den Basalganglien eine ipsilaterale Verminderung der Chronophin-Level erhoben werden (3.4). Im murinen tMCAO-Schlaganfallmodell führte der globale Chronophin-Verlust zu größeren Infarkten, gesteigerter Hirnödembildung (3.5) und zu einem deutlich verschlechterten neurologischen Status der Tiere (3.6). Damit rückte Chronophin als möglicher neuer Faktor für die Funktion der Blut-Hirn-Schranke in den Fokus. Daher drängte sich die Frage auf, welche Zellen Chronophin beim Schlaganfall reguliert. In murinen Lungenendothelzellen konnten keine Chronophin-abhängigen Unterschiede hinsichtlich der Expression von Tight- und Adherens Junction-Proteinen festgestellt werden (3.7). Die Ergebnisse bestätigten sich im Schlaganfall-Modell bei Mäusen mit Endothelzell-spezifischem Chronophin-Verlust: Hier konnten die Auswirkungen des globalen Chronophin-Verlustes nicht repliziert werden (3.8). Ebenso konnten bei Mäusen mit Astrozyten- und Megakaryozyten-/Thrombozyten-spezifischem Chronophin-Verlust keine signifikanten Unterschiede zum Wildtyp gezeigt werden (3.9).

4. Diskussion

Das Ziel dieser Arbeit war es, die pathophysiologische Beteiligung von Chronophin beim ischämischen Schlaganfall zu untersuchen.

Die Vermutung einer möglichen Beteiligung lag nahe, da Chronophin als funktioneller Gegenspieler des ROCK/LIM-Kinase-Signalwegs fungiert.¹²³ ROCK spielt eine zentrale Rolle für zerebrovaskuläre Erkrankungen wie den ischämischen Schlaganfall.¹²⁴ Seine medikamentöse Antagonisierung bewirkt in Ratten eine Reduzierung der Infarktgröße und eine Verbesserung der neurologischen Funktion.^{125,126}

Zur Charakterisierung der Rolle von Chronophin wurde das murine Schlaganfallmodell der transienten Mediaokklusion gewählt. Nach Evaluierung von Infarktgrößen und neurologischer Funktion wurden Hirnlysate gewonnen und proteinchemisch untersucht sowie Hirnschnitte immunhistochemisch gefärbt. Zellbiologische Analysen des junktionalen Komplexes von Endothelzellen sollten die Befunde aus dem Schlaganfallmodell weiter aufschlüsseln.

4.1 Das tMCAO-Schlaganfallmodell

4.1.1 Allgemeine Bedeutung

Auf dem Feld der Schlaganfallforschung werden große Mühen unternommen, um neue Therapieprinzipien zu erarbeiten, die das aktuelle Behandlungsschema unterstützen sollen, welches hauptsächlich allgemein-intensivmedizinische Verfahren und den Versuch einer Reperfusion von betroffenen Hirnarealen beinhaltet.¹²⁷ Dabei beschränken sich neue Therapieansätze nicht auf den alleinigen Schutz neuronaler Zellen, sondern es wird eine Protektion aller an der neurovaskulären Einheit beteiligten Zelltypen angestrebt.¹²⁸ Auf Grundlage dieser Ansätze konnte jedoch noch kein neues Medikament zugelassen werden, die Zulassung des letzten und bislang einzigen Medikaments für die Akuttherapie des Schlaganfalls – rt-PA – liegt über 15 Jahre zurück.¹²⁹ Umso wichtiger sind

valide Forschungen, bei denen das pathophysiologische Geschehen eines Schlaganfalls im Modell imitiert wird, um so mögliche Zielmoleküle zu identifizieren. Ein häufig genutztes Modell ist die transiente Mediaokklusion der Maus. Hierbei wird ein monofiler Faden operativ in die *Arteria cerebri media* einer Gehirnhälfte eingebracht und so in einem umschriebenen Areal ein ischämischer Schlaganfall induziert. Nach einer Zeit von beispielsweise 60 min wird der Faden entfernt und das ischämische Hirnareal reperfundiert. Das neurologische Ergebnis kann nun durch motorische Funktionstests bewertet werden, Infarktgröße und Ödembildung werden durch Entnahme und Färbung der Gehirne ermittelt. Damit stellt die transiente Mediaokklusion ein robustes Modell des ischämischen Schlaganfalls dar, das zwar nicht dem realen Krankheitsprozess exakt gleicht, aber die Pathophysiologie des Gewebes Schadens nach Gefäßverschluss gut darstellt. Denn eine exakte Widerspiegelung eines realen Schlaganfalles kann allein durch die beim Menschen vorhandene meist lange Phase der Vorerkrankungen wie Diabetes mellitus und arterieller Hypertonie im Tierversuch nicht realisiert werden. Daher sollten die Versuche, die meist an gesunden Jungtieren durchgeführt werden, stets in älteren Tieren wiederholt werden. Weiterhin gibt es anatomische Unterschiede zwischen Mensch und Nagetier: Das menschliche Hirn hat einen höheren Anteil an weißer Substanz. Es ist daher nicht anzunehmen, dass eine Behandlung, die im Nager neuroprotektiv wirksam ist, auch beim Menschen eine klinisch relevante Wirkung entfalten kann.¹³⁰ Zusätzlich ist die Vernetzung zwischen experimenteller Schlaganfallforschung und Anwendung in der Klinik nicht optimal: Trotz einiger vielversprechender Substanzen, die Phase-II- und Phase-III-Studien erreicht haben, gibt es kein Medikament, das nachweislich vor einem Schlaganfall schützt. Eine ursächliche Rolle könnten statistische Mängel der durchgeführten Studien spielen, da oft wegen geringer Kohortengrößen keine statistische Relevanz gegeben ist.¹³¹

4.1.2 Chronophin im Schlaganfallmodell

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein globaler Chronophin-Verlust im Schlaganfallmodell die Infarktfläche vergrößert und die Ödembildung steigert. Die

Diskussion

Infarktfläche war in Mäusen mit Chronophin-Defizienz etwa 19 % größer als im Wildtyp, die Ödembildung war um etwa 39 % gesteigert. Beide Ergebnisse waren statistisch signifikant. Die neurologische Funktion der Mäuse zeigte im globalen Bederson-Score keine relevanten Unterschiede, die motorische Funktion war mit einem Abfall des Scores im String-Test von etwa 3,1 zu 1,4 signifikant eingeschränkt. Die weiterhin gute Funktion im Bederson-Score lässt sich möglicherweise darauf zurückführen, dass aufgrund der Versorgung des Gehirns durch angrenzende Gefäße des *Circulus arteriosus cerebri* globale Funktionseinschränkungen kompensiert werden können. Die spezielle Motorik der Vorderpfoten, die für das Festhalten der Mäuse im String-Test benötigt wird, könnte jedoch durch den Infarkt der *Arteria cerebri media* eingeschränkt sein und so zu einem signifikanten Abfall im String-Test-Score geführt haben.

Die Ergebnisse deuten auf eine wichtige Rolle von Chronophin bei der Entwicklung des Infarktes und der durch Funktionsverlust der BHS eintretenden Ödembildung hin. Dabei stellte sich einerseits die Frage, welche Zellarten an diesem Prozess ursächlich beteiligt sind. Andererseits war zu klären, ob Chronophin eine schützende Funktion auf das ischämische Hirngewebe ausübt oder ob seine Expression bei Schlaganfall-Ereignissen verändert wird und es möglicherweise eine schädigende Rolle spielt.

Um die Frage nach den beteiligten Zellarten zu klären, wurden Mäuse mit Zellart-spezifischer Chronophin-Defizienz im Schlaganfallmodell untersucht. Dabei zeigte sich für Endothelzellen, Astrozyten und Thrombozyten/Megakaryozyten im Vergleich zum Wildtyp kein signifikanter Unterschied in Infarktgröße, Ödembildung und den funktionellen neurologischen Scores. Damit konnten die Ergebnisse aus dem globalen Mausmodell nicht repliziert werden. Ursächlich hierfür könnte sein, dass weitere, hier nicht untersuchte Zellarten hauptsächlich beteiligt sind oder ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Zellarten vorliegt, das erst in seiner Gesamtheit das signifikante Ergebnis des globalen Chronophin-Verlustes hervorruft. Ein besonderes Augenmerk sollte hierbei für weitere Untersuchungen auf neuronale Zellen gelegt werden. Hier könnte mittels der Mauslinie Nestin-Cre eine neuronale Chronophin-Ablation generiert und im Schlaganfallmodell untersucht werden.¹³² Ebenfalls interessant wären

Diskussion

Untersuchungen der Perizyten. Hierfür könnten Tamoxifen-induzierbare PDGFR β -CreER^{T2}-Mäuse im Schlaganfallmodell untersucht werden.^{133,134}

Wie bereits diskutiert, führte ein globaler Chronophin-Verlust zu einer Aggravierung im Schlaganfallmodell. Eine weitere wichtige Frage war nun, ob auch in wildtypischen Mäusen in den ersten Stunden nach Schlaganfall bereits Änderungen der Expression von Chronophin stattfinden, die eine Erklärung für die Ergebnisse im Schlaganfallmodell bieten. Hierzu wurde die mRNA in Kortex und Basalganglien von wildtypischen Mäusen nach Schlaganfall quantifiziert sowie die Proteinmenge im Immunblot untersucht.

Die mRNA war 23 h nach Reperfusion sowohl in Kortex als auch in den Basalganglien herunterreguliert, wobei der Unterschied nur in den Basalganglien signifikant war. Dabei sank die mRNA-Menge in den Basalganglien stetig über die Zeiträume von 6 und 12 h auf knapp 43 % nach 23 h, während im Kortex zunächst ein Anstieg und erst nach 23 h ein rascher Abfall auf 41 % zu verzeichnen war. Dies deutet darauf hin, dass die Beteiligung von Chronophin an den zellulären Prozessen nach einem ischämischen Ereignis je nach untersuchter Hirnregion zeitlich unterschiedlich verläuft. Die verringerte Expression könnte hierbei jedoch in beiden Hirnregionen Ausdruck eines induzierten Zellunterganges sein, der auf Proteinebene näher untersucht werden sollte (s. 4.2.1).

Einschränkend ist neben der beschränkten Auswahl an transgenen Mausmodellen zu den vorliegenden Ergebnissen im Schlaganfallmodell zu sagen, dass die Untersuchungen mit eher kleinen Kohortengrößen durchgeführt wurden. Die Anzahl von je knapp 10 Mäusen pro Kohorte ist zwar in der experimentellen Schlaganfallforschung allgemein üblich und war hilfreich, um erste Hinweise zu erhalten.¹³⁵ Für validere Ergebnisse sollten jedoch Wiederholungen mit größeren Kohorten durchgeführt werden. Weiterhin kann es sinnvoll sein, verschiedene Zeiten der Ischämie und anschließenden Reperfusion zu wählen. Beispielsweise könnte eine milde Ischämie von 30 min Dauer und eine anschließende Probenverwertung auch nach 3 oder 7 Tagen sinnvoll sein, um frühe sowie langfristige zelluläre Veränderungen festzustellen.

Eine weitere wichtige Limitation der Ergebnisse im tMCAO sind die indirekten Infarktgrößen, die sich durch Herausrechnen der Ödembildung aus der absoluten Infarktgröße errechnen ließ. Hierbei standen im WT Ödem-korrigierte Infarktgrößen von $90,4 \pm 6,4 \text{ mm}^3$ denjenigen in global Chronophin-defizienten Mäusen von $91,7 \pm 5,0 \text{ mm}^3$ gegenüber. Damit war nahezu kein Unterschied in der indirekten Infarktgröße mehr auszumachen und die Auswirkungen des Schlaganfalls beschränkten sich hauptsächlich auf die Ödembildung als Resultat eines Funktionsverlustes der BHS. Daher sollte ein wichtiges Augenmerk der folgenden Untersuchungen auf der Analyse der Integrität der BHS liegen.

4.2 Einfluss von Chronophin auf die Funktion der Blut-Hirn-Schranke

4.2.1 Immunhistochemie und Immunblot

Die Methoden der Immunhistochemie und des Immunblots haben gemein, dass sie darauf abzielen, Proteine in Zellen bzw. Geweben zu bestimmen. Dabei unterscheiden sie sich jedoch in der Art des Nachweises: Während immunhistochemische Verfahren die Lokalisation des gesuchten Proteins in Erfahrung zu bringen versuchen, wird im Immunblot die Proteinmenge eines Zelllysats unabhängig von der Lokalisation des Proteins innerhalb der Zelle quantifiziert.

Vor der immunhistochemischen Untersuchung von Proteinen der BHS wurden Immunblots durchgeführt, um die Veränderungen der Chronophin-Menge nach Schlaganfall auf Proteinebene zu untersuchen. Hier zeigten sich bei 60-minütiger Ischämie in den ipsilateralen Lysaten 23 h nach Reperfusion im Vergleich zur kontralateralen Kontrollseite um etwa 30 bis 40 % verminderte Chronophin-Mengen. Diese Ergebnisse decken sich mit Analysen des Proteoms, die Koh et al. nach Induktion einer fokalen Ischämie in männlichen Ratten durchgeführt haben. In kortikalen Regionen wurden Proteine identifiziert, die sich nach

Diskussion

Schlaganfall in ihrer Intensität um den Faktor 3 verändert hatten. Dabei zeigte sich für Chronophin 24 h nach Ischämiebeginn eine Reduzierung der Proteinmenge auf nur noch 18 %. Die Autoren schlussfolgern, dass Chronophin neben weiteren identifizierten Proteinen nach dem Schlaganfallereignis zu einer Induktion des Zelltodes führen könnte.¹³⁶ Hwang et al. konnten im murinen tMCAO-Modell mit 5-minütiger Okklusion nach 30 min und 3 h eine Herunterregulierung von Chronophin in der hippocampalen Region CA1 auf knapp 50 % des Ausgangswertes feststellen. Nach längeren Reperfusionzeiten war hingegen ein Anstieg von Chronophin mit einem Spitzenwert nach 2 Tagen zu verzeichnen, der dem doppelten des Ausgangswertes entsprach.¹³⁷ Die abweichenden Ergebnisse der genannten Studien lassen sich hierbei einerseits durch die unterschiedlichen Ischämie- und Reperfusionsdauern und andererseits durch die untersuchten Hirnregionen erklären. Interessanterweise konnte auch bereits in anderen Modellen neurologischer Erkrankungen eine Beteiligung von Chronophin gezeigt werden. Kim et al. berichten von einem Anstieg von Chronophin in Körnerzellen des hippocampalen Gyrus dentatus und reaktiven Astrozyten von Ratten nach einem Status epilepticus.¹³⁸ Weitergehende Untersuchungen lieferten einen Anstieg von Chronophin in Astrozyten, die nach einem Status epilepticus einem Apoptose-ähnlichen Vorgang unterlagen, der nach Meinung der Autoren von Chronophin initiiert wird.¹³⁹ Schließlich konnten die Autoren Chronophin als wichtigen Faktor für die Regulierung der synaptischen Plastizität identifizieren.¹⁴⁰

Die immunhistochemischen Färbungen konnten Chronophin in den Zellen der neurovaskulären Einheit identifizieren. Während Färbungen an kryokonservierten Hirnschnitten eine starke Hintergrundfärbung ergaben, waren in paraffinierten Schnitten Gefäßanschnitte und angrenzende Zellen angefärbt. Um den Einfluss des Schlaganfalls auf die BHS bei wildtypischen und Chronophin-defizienten Mäusen zu untersuchen, wurden immunhistochemische und Immunfluoreszenz-Färbungen für TJ- und AJ-Proteine in Hirnschnitten nach tMCAO durchgeführt. Neben den Ergebnissen im tMCAO war ausschlaggebend, dass ROCK, der funktionelle Gegenspieler von Chronophin, eine Rezeptor-vermittelte und Aktomyosin-basierte Kontraktilität von Endothelzellen sowie die Desintegration

Diskussion

von TJ-Proteinen fördert.¹⁰⁵ Jedoch zeigten sich bei Chronophin-Defizienz in Hirnschnitten keine direkt erkennbaren Unterschiede der Expressionsstärke und subzellulären Verteilung der TJ-Proteine.

Daher wurde eine Quantifizierung mit anschließender Normalisierung der gefärbten Bereiche für TJ-Proteine auf den Gefäßmarker Laminin durchgeführt.¹⁴¹ Diese ergab, dass Claudin-5 beim Wildtyp in 63 % der Gefäßfläche von Infarkt- und Kontrollregion positiv war, während in Hirnschnitten von Chronophin-defizienten Mäusen jeweils nur 54 bzw. 49 % der Fläche positiv war. Somit konnte keine veränderte Expression von TJ-Proteinen nach tMCAO gezeigt werden. Vielmehr könnte schon ein basaler Unterschied in der Gefäßarchitektur Chronophin-defizienter Mäuse vorliegen, der weiterer Untersuchungen bedarf. Hierfür würde sich neben den in 4.2.2 diskutierten Zellkultur-Experimenten an Endothelzellen eine dreidimensionale Rekonstruktion der zerebralen Gefäße mittels Lichtscheibenmikroskopie anbieten.¹⁴²

Im Gegensatz zu den nicht vorhandenen Änderungen der TJ-Protein-Expression in den eigenen Versuchen berichten Yang et al. von einem im tMCAO-Modell der Ratte bereits 3 h nach Reperfusion eintretenden Zusammenbruch der BHS mit Fragmentierung von TJ-Proteinen innerhalb der endothelialen Interzellulärspalten und einer Abnahme der Proteinmenge von Claudin-5 und Occludin im Immunblot. Gleichzeitig stieg das Signal für kleinere Molekulargewichte der jeweiligen TJ-Proteine, was die Autoren als Fragmentierung derselben bewerteten.⁸³ In eigenen Immunblots von Hirnlysaten konnten zwischen Infarkt- und Kontrollregion von wildtypischen und Chronophin-defizienten Mäusen bei Vorliegen methodischer Probleme keine Unterschiede für TJ-Proteine wie Occludin, Claudin-5 und ZO-1 ausgemacht werden (Ergebnisse nicht gezeigt). Witt et al. konnten jedoch bei regelrechter Methodik mit Hypoxie-Reoxygenierungs-Versuchen an Ratten zeigen, dass bei den TJ-Proteinen Claudin-3 und ZO-1 im Immunblot keine Signaländerung im Vergleich zu Kontrolltieren vorhanden war, während bei Occludin nur eine Zunahme der dephosphorylierten Form zu verzeichnen war.¹⁴³ Dies macht deutlich, dass Expressionsänderungen von TJ-Proteinen als Nachweis einer BHS-Störung in Immunfärbungen und Immunblot nur bedingt nachweisbar sind, während eine

Reorganisation oder enzymatische Regulationen der Proteine besser erkennbar ist. Möglicherweise spielt die Phosphatase Chronophin auch bei der Dephosphorylierung von TJ-Proteinen eine Rolle. Hier bieten sich für das Schlaganfallmodell weitergehende Untersuchungen im Hinblick auf den Phosphorylierungsstatus von TJ-Proteinen und eine Beteiligung von Chronophin an. Ebenso wäre insbesondere im Hinblick auf die Beteiligung der Cofilin-regulierenden Proteine Chronophin und ROCK die Untersuchung des Phosphorylierungsstatus von Cofilin in wildtypischen und Chronophin-defizienten Mäusen nach Schlaganfall bzw. Schein-Operation sinnvoll.

4.2.2 Endothelialzellkultur

Um die Rolle von Chronophin für die TJ und AJ der BHS auch außerhalb der aus dem Schlaganfallmodell gewonnenen Hirnlysate und -schnitte zu untersuchen, wurden Endothelzellen aus wildtypischen und Chronophin-defizienten Mäusen isoliert und kultiviert. Huber et al. konnten zeigen, dass Inflammation das Expressionsmuster der TJ-Proteine in Ratten verändert: Die Expression von Occludin nahm ab, während Claudin-1 unverändert blieb.¹⁴⁴ Daher wurden Färbungen der TJ- und AJ-Proteine von unbehandelten Endothelzellen sowie nach Induktion einer Inflammation mittels verschiedener Mediatoren durchgeführt. Hierfür wurden unter anderem Thrombin und TNF- α verwendet, die sich als wirksame BHS-regulierende Faktoren erwiesen haben.^{145,146} Es konnte in den proinflammatorisch behandelten Endothelzellen im Vergleich mit unbehandelten Zellen ein Zusammenbruch der interzellulären Kontakte visualisiert werden. Beim Vergleich der Endothelzellen von wildtypischen und Chronophin-defizienten Mäusen zeigten sich jedoch keine relevanten Unterschiede im Expressionsmuster der untersuchten TJ- und AJ-Proteine.

Einschränkend ist festzustellen, dass es sich bei den isolierten Zellen um murine Lungenendothelzellen (MLEC) handelte, die nicht die Barriere-Eigenschaften der Mikrovaskulatur des Gehirns besitzen.¹⁴⁷ Daher sollten die Zellkultur-Experimente mit murinen Hirnendothelzellen (MBEC) wiederholt werden.¹⁴⁸ Weiterhin könnten sich aussagekräftigere Ergebnisse generieren lassen, wenn zusätzlich zur Färbung der Proteine der TJ und AJ eine Messung des

transendothelialen elektrischen Widerstandes (TEER, transendothelial electrical resistance) und damit der Dichtigkeit der TJs durchgeführt würde.¹⁴⁹

4.3 Die Rolle von Chronophin beim Schlaganfall

Biologische Funktionen von Chronophin im kardiovaskulären System sind bisher nicht bekannt. Lediglich in Bezug auf seine Rolle im Gehirn konnten in den vergangenen Jahren wichtige Erkenntnisse gewonnen werden: Am stärksten wird Chronophin in kortikalen Regionen exprimiert, während in den Basalganglien Werte von 54 - 74 % bestimmt werden konnten.¹⁵⁰ Kim et al. konnten zeigen, dass die Proteinlevel von Chronophin nach Status epilepticus in Astrozyten ansteigen und es über den Cofilin-Signalweg Apoptoseprozesse induziert.^{138,139} Galluzzi et al. beschrieben, dass der Verlust von Chronophin Tumorzellen für physikalische und chemische Stressoren sensibilisiert und ebenfalls deren Apoptose einleitet.¹⁵¹ Möglicherweise moduliert Chronophin auf diesem Weg auch beim Schlaganfall die physiologische Reaktion auf den hypoxischen Stress. Schulze et al. identifizierten die Cofilin-Phosphatase Chronophin als Regulator von Wachstum und Invasivität glialer Tumore.¹⁰⁴ Der Cofilin-Signalweg ist für den funktionellen Gegenspieler ROCK bereits im ischämischen Schlaganfall untersucht worden. Seine medikamentöse Hemmung führte zu günstigen Effekten im Schlaganfallmodell.¹⁰⁷

Die vorherrschende Form von Cofilin im Hirn ist N-Cofilin.¹⁵² Seine Funktion ist die Verwertung von G-Aktin-Monomeren durch Depolymerisation und Spaltung von F-Aktin.⁹¹ Die Umbauprozesse und Stabilisierung von Aktinfilamenten verläuft hierbei konzentrationsabhängig.⁹⁰ Die Aktivität von Cofilin wird durch Kinasen und Phosphatasen wie Chronophin reguliert.⁹² Cofilin-regulierende Phosphatasen selbst können durch verschiedene Mechanismen aktiviert werden: Für reaktive Sauerstoffspezies konnte eine Aktivierung der Cofilin-Phosphatase Slingshot gezeigt werden¹⁵³ und sinkende intrazelluläre ATP-Level führen zu einer Aktivierung von Chronophin.⁹⁷ Unter ischämischen Bedingungen führt die Inaktivierung der Na⁺/K⁺-ATPase zu einem Anstieg der intrazellulären Calcium-Level und einer erhöhten Exzitotoxizität.¹⁵⁴ Erhöhte intrazelluläre Calcium-Level

Diskussion

aktivieren Slingshot über das Calcium-bindende Protein Calmodulin.¹⁵⁵ Dieses konnte in Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe als direkter Interaktionspartner von Chronophin und Regulator seiner Aktivität identifiziert werden. Das von Chronophin regulierte Cofilin ist ein wichtiger Modulator der Zell-Zell-Interaktionen innerhalb der NVE. Alhadidi et al. beschreiben wichtige Beteiligungen von Cofilin beim pathophysiologischen Geschehen nach ischämischen Schlaganfall. Durch oxidativen Stress und Exzitotoxizität wird Cofilin aktiviert und führt zum Untergang zahlreicher Zellarten im Gehirn, es reguliert die Gliazell-Aktivierung beim Entzündungsprozess nach Ischämie sowie die Öffnung der BHS über eine Aktin-medierte Neuverteilung von TJ-Proteinen.¹⁵⁶ Daher postulieren die Autoren, dass eine pharmakologische Hemmung der Cofilin-Aktivität eine neuroprotektive Wirkung entfalten könnte. Diese Erkenntnis steht im Gegensatz zu unseren Ergebnissen zur Rolle der Cofilin-aktivierenden Phosphatase Chronophin, bei denen ein Verlust von Chronophin im murinen Schlaganfallmodell zu ausgeprägteren Infarkten und Ödemen führte. Jedoch sind die grundlegenden Erkenntnisse zu Cofilin in Zellkultur-basierten Studien gewonnen worden, sodass zukünftige *in-vivo*-Untersuchungen eine klarere Evidenz zur Rolle von Cofilin und Chronophin schaffen könnten.

Ein weiterer Erklärungsansatz für die nicht konkordanten Ergebnisse zu Chronophin und seinem Substrat Phospho-Cofilin ist die Tatsache, dass mit PLP ein zweites Substrat von Chronophin existiert.¹⁰⁰ Als aktive Form des Vitamin B₆ ist es als Cofaktor an einer Vielzahl von enzymatischen Reaktionen beteiligt und als der vielseitigste organische Katalysator bekannt.¹⁵⁷ Vor allem die Synthese des inhibitorischen Neurotransmitters GABA ist nur unter Beteiligung von PLP möglich.¹⁵⁸ Für Astrozyten konnten Kim et al. bereits feststellen, dass Chronophin eine Hauptrolle im Vitamin B₆-Metabolismus spielt.¹³⁸ Hwang et al. stellten einen verringerten Zelluntergang 4 Tage nach einem ischämischen Ereignis fest, wenn den Mäusen 30 min zuvor PLP zugeführt worden war. Diesen protektiven Effekt schrieben sie einer erhöhten Konzentration von GABA zu.¹³⁷ In der eigenen Arbeitsgruppe konnten erste Hinweise für eine Erhöhung von PLP sowie von Neurotransmittern wie GABA in Hirnlysaten Chronophin-defizienter

Diskussion

Mäuse gesammelt werden. Weitere Untersuchungen konnten PLP-abhängige Enzyme wie GAD als mögliche Erklärung für eine veränderte Neurotransmitter-Synthese nach Chronophinverlust liefern (Jeanclos et al., Publikation der Daten in Vorbereitung).

Seit vielen Jahrzehnten ist bekannt, dass verringerte PLP-Level zu einer Senkung der GAD-Aktivität und der GABA-Synthese und konsekutiv aufgrund einer gesteigerten Neurotransmission zu epileptischen Anfällen führen.¹⁵⁹

Interessanterweise konnten Salazar et al. jedoch zeigen, dass eine intrazerebrale Gabe von PLP bei Ratten ebenfalls zu epileptischen Anfällen führt.¹⁶⁰

Die Datenlage zu dem Chronophin-Substrat PLP ist demnach nicht eindeutig.

Folgendes Konzept lässt sich aus den Ergebnissen entwickeln: In der Regel ist GABA neuroprotektiv wirksam, indem es die exzitotoxischen Effekte von Glutamat durch Hyperpolarisation der neuronalen Zellmembran umkehrt.¹⁶¹

Jedoch könnte eine erhöhte tonische Aktivität zu Hypoexzitotoxizität in Peri-Infarktregionen und damit zu einer Inhibition der initialen neuroregenerativen Prozesse nach Schlaganfall führen, was einen Erklärungsansatz für die verstärkten Schlaganfälle nach Chronophinverlust bieten würde.

Mit diesen interessanten Ergebnissen erscheint die weitere Untersuchung von Chronophin, seinem Substrat PLP und der Konsequenzen von erhöhten PLP-Levels in Chronophin-defizienten Mäusen auf weitere Vitamin B₆-abhängige Enzyme sinnvoll. Besonders ein genetischer Nachweis der Relevanz von Chronophin in GABAergen Neuronen, beispielsweise mittels Chronophin-Depletion via *Gad2-Cre*-Mausstämmen¹⁶², sowie elektrophysiologische Untersuchungsmethoden kommen hierbei in Frage.

Möglicherweise können zukünftige Untersuchungen einen Zusammenhang zwischen der Aggravierung von Schlaganfällen nach Chronophin-Verlust und der Regulierung des Vitamin B₆-Metabolismus herstellen, um so Ansätze zur Verbesserung der Therapie und Prognose von Schlaganfallpatienten zu entwickeln.

5. Zusammenfassung

Der ischämische Schlaganfall ist mit einer jährlichen Inzidenz von 200/100 000 Einwohnern die häufigste Gefäßerkrankung in Deutschland. Atherothrombose, arterielle Hypertonie und Embolien unterschiedlichen Ursprungs sind die wesentlichen Ursachen des ischämischen Schlaganfalls. Die neurologischen Defizite nach einem Schlaganfall resultieren aus einem gestörten zerebralen Blutfluss und somit einer insuffizienten Sauerstoffversorgung. Zusätzlich ist die Ödembildung, welche von einer gesteigerten Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke verursacht wird, am neuronalen Zelltod beteiligt.

Chronophin ist eine Aktinzytoskelett-regulierende Serin-Phosphatase. In einem ischämischen Schlaganfall-Modell konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass der globale Verlust von Chronophin zu einer vermehrten Ödembildung und einem aggravierten neurologischen Zustand der Mäuse im Vergleich zu wildtypischen Kontrollen führte. Hirnlysate von wildtypischen Mäusen zeigten verringerte Chronophin-Level in der vom Schlaganfall betroffenen Hemisphäre. Jedoch konnten initiale immunhistochemische und zellbiologische Untersuchungen weder Chronophin-abhängige Veränderungen der Blut-Hirn-Schranke feststellen noch einen zerebralen Zelltyp identifizieren, der für den schützenden Effekt von Chronophin verantwortlich ist.

Diese Ergebnisse weisen auf einen komplexen, vielzelligem Mechanismus hin, dem die schützende Rolle von Chronophin im ischämischen Schlaganfall unterliegt. Die Entschlüsselung dieses Mechanismus ist Aufgabe künftiger Untersuchungen.

6. Summary

Ischemic stroke is the most common vessel disease with a yearly incidence of more than 200/100 000 inhabitants in Germany. Atherothrombosis, hypertension and embolisms of different origin are major causes of ischemic stroke. The neurological deficits following stroke result from impaired cerebral blood flow and thus insufficient oxygen supply. In addition, edema formation caused by an increased permeability of the blood-brain barrier also contributes to neural cell death.

Chronophin is an actin cytoskeleton regulating serine phosphatase. Employing an ischemic stroke model, this work shows that the whole-body loss of chronophin resulted in increased edema formation and an aggravated neurological state of mice compared to the wildtype controls. Brain lysates of wildtype mice showed decreased levels of chronophin on the ipsilateral hemisphere after experimental stroke. However, initial immunohistochemical and cell biological investigations could neither determine chronophin-dependent changes of the blood-brain barrier, nor identify a cerebral cell type which is responsible for the protective effect of chronophin.

These findings suggest a complex, multicellular mechanism that underlies the protective role of chronophin in ischemic stroke. This mechanism has to be decoded in further studies.

7. Verzeichnisse

7.1 Literaturverzeichnis

1. Veltkamp R. Akuttherapie des ischämischen Schlaganfalls. In: Diener HC, Weimar C, editors. Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie. Stuttgart: Thieme Verlag; 2012. p. 1–17.
2. Hennerici MG. Diagnostik akuter zerebrovaskulärer Erkrankungen. In: Diener HC, Weimar C, editors. Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie. Stuttgart: Thieme Verlag; 2012. p. 1–14.
3. Easton JD, Saver JL, Albers GW, et al. Definition and evaluation of transient ischemic attack: a scientific statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association Stroke Council; Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia; Council on Cardio. *Stroke*. 2009;40:2276–2293.
4. Mackay J, Mensah G. Global burden of stroke. In: The Atlas of Heart Disease and Stroke. Geneva: World Health Organization; 2004. p. 50.
5. Thrift AG, Cadilhac D a, Thayabaranathan T, et al. Global stroke statistics. *Int. J. Stroke*. 2014;9:6–18.
6. Ferri CP, Schoenborn C, Kalra L, et al. Prevalence of stroke and related burden among older people living in Latin America, India and China. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. 2011;82:1074–1082.
7. Di Carlo A. Human and economic burden of stroke. *Age Ageing*. 2009;38:4–5.
8. Wyller TB. Stroke and gender. *J. Gend. Specif. Med.* 2:41–45.
9. World Health Organization. The 10 leading causes of death in the world, 2000 and 2012. 2014;310:1–4.
10. Caplan LR. Basic pathology, anatomy, and pathophysiology of stroke, 4th ed. In: Caplan's Stroke: A Clinical Approach. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2009. p. 22.
11. Babikian VL, Caplan LR. Brain embolism is a dynamic process with variable

Verzeichnisse

- characteristics. *Neurology*. 2000;54:797–801.
12. Weiss HJ. Platelet Physiology and Abnormalities of Platelet Function. *N Engl J Med*. 1975;293:531–541.
 13. Goertler M, Blaser T, Guhr S, et al. Reduced frequency of embolic signals in severe carotid stenosis with poststenotic flow velocity reduction. *Cerebrovasc. Dis*. 2005;19:229–233.
 14. Fisher CM, Gore I, Okabe N. Atherosclerosis of the carotid and vertebral arteries-extracranial and intracranial. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1965;24:455–476.
 15. Pezzini A, Del Zotto E, Giossi A, et al. The Migraine-Ischemic Stroke Connection: Potential Pathogenic Mechanisms. *Curr. Mol. Med*. 2009;9:215–226.
 16. Thomas LC, Rivett DA, Attia JR, et al. Risk factors and clinical features of craniocervical arterial dissection. *Man. Ther*. 2011;16:351–356.
 17. Redekop GJ. Extracranial carotid and vertebral artery dissection: A review. *Can. J. Neurol. Sci*. 2008;35:146–152.
 18. Caplan LR. Basic pathology, anatomy, and pathophysiology of stroke, 4th ed. In: *Caplan's Stroke: A Clinical Approach*. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2009. p. 23–24.
 19. Arboix A, Alio J. Acute cardioembolic cerebral infarction: answers to clinical questions. *Curr. Cardiol. Rev*. 2012;8:54–67.
 20. Ay H, Furie KL, Singhal A, et al. An evidence-based causative classification system for acute ischemic stroke. *Ann. Neurol*. 2005;58:688–697.
 21. Lyaker MR, Tulman DB, Dimitrova GT, et al. Arterial embolism. *Int. J. Crit. Illn. Inj. Sci*. 2013;3:77–87.
 22. Gautier JC, Dürr A, Koussa S, et al. Paradoxical Cerebral Embolism with a Patent Foramen ovale. *Cerebrovasc. Dis*. 1991;1:193–202.
 23. Caplan LR. Basic pathology, anatomy, and pathophysiology of stroke, 4th ed. In: *Caplan's Stroke: A Clinical Approach*. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2009. p. 25–26.
 24. Romanul FCA. Changes in Brain and Pial Vessels in Arterial Border Zones. *Arch. Neurol*. 1964;11:40.
 25. Flemming KD, Brown RD, Petty GW, et al. Evaluation and management of transient ischemic attack and minor cerebral infarction. *Mayo Clin. Proc*.

- 2004;79:1071–1086.
26. Harmsen P, Lappas G, Rosengren A, et al. Long-term risk factors for stroke: twenty-eight years of follow-up of 7457 middle-aged men in Göteborg, Sweden. *Stroke*. 2006;37:1663–1667.
 27. Grysiwicz RA, Thomas K, Pandey DK. Epidemiology of ischemic and hemorrhagic stroke: incidence, prevalence, mortality, and risk factors. *Neurol. Clin.* 2008;26:871–895.
 28. Caplan LR, Gorelick PB, Hier DB. Race, sex and occlusive cerebrovascular disease: A review. *Stroke*. 17:648–655.
 29. Jauch EC, Saver JL, Adams HP, et al. Guidelines for the early management of patients with acute ischemic stroke: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*. 2013;44:870–947.
 30. Dittmar MS, Vatankhah B, Horn M. Präklinische neurologische Untersuchung von Schlaganfallpatienten. *Der Notarzt*. 2004;20:163–167.
 31. Kleindorfer DO, Miller R, Moomaw CJ, et al. Designing a message for public education regarding stroke: does FAST capture enough stroke? *Stroke*. 2007;38:2864–2868.
 32. Szabo K, Lanczik O, Hennerici MG. Vascular diagnosis and acute stroke: what, when and why not? *Cerebrovasc. Dis.* 2005;20 Suppl 2:11–18.
 33. Khatri P, Abruzzo T, Yeatts SD, et al. Good clinical outcome after ischemic stroke with successful revascularization is time-dependent. *Neurology*. 2009;73:1066–1072.
 34. Lees KR, Bluhmki E, von Kummer R, et al. Time to treatment with intravenous alteplase and outcome in stroke: an updated pooled analysis of ECASS, ATLANTIS, NINDS, and EPITHET trials. *Lancet*. 2010;375:1695–1703.
 35. Ringleb PA, Hamann GF, Röther J, et al. Akuttherapie des ischämischen Schlaganfalls - Rekanalisierende Therapie: Ergänzung 2015. *Aktuelle Neurol*. 2016;43:82–91.
 36. Endres M. Sekundärprophylaxe des ischämischen Insults. In: Diener HC, Weimar C, editors. Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie. Stuttgart: Thieme Verlag; 2012. p. 1–27.

37. Diener HC. Stroke prevention: anti-platelet and anti-thrombolytic therapy. *Neurol. Clin.* 2000;18:343–355.
38. Vergouwen MDI, de Haan RJ, Vermeulen M, et al. Statin treatment and the occurrence of hemorrhagic stroke in patients with a history of cerebrovascular disease. *Stroke.* 2008;39:497–502.
39. Saxena R, Koudstaal P. Anticoagulants versus antiplatelet therapy for preventing stroke in patients with nonrheumatic atrial fibrillation and a history of stroke or transient ischemic attack. *Cochrane Database Syst Rev.* 2004;1–14.
40. Lakhan SE, Sapko MT. Blood pressure lowering treatment for preventing stroke recurrence: a systematic review and meta-analysis. *Int. Arch. Med.* 2009;2:30.
41. Koennecke H-C, Belz W, Berfelde D, et al. Factors influencing in-hospital mortality and morbidity in patients treated on a stroke unit. *Neurology.* 2011;77:965–972.
42. Martino R, Martin RE, Black S. Dysphagia after stroke and its management. *CMAJ.* 2012;184:1127–1128.
43. Davalos A, Toni D, Iweins F, et al. Neurological deterioration in acute ischemic stroke Potential predictors and associated factors in the European Cooperative Acute Stroke Study (ECASS) I. *Stroke.* 1999;30:2631–2635.
44. Langhorne P, Bernhardt J, Kwakkel G. Stroke rehabilitation. *Lancet.* 2011;377:1693–1702.
45. Cramer SC. Repairing the human brain after stroke: I. Mechanisms of spontaneous recovery. *Ann. Neurol.* 2008;63:272–287.
46. Hendricks HT, van Limbeek J, Geurts AC, et al. Motor recovery after stroke: A systematic review of the literature. *Arch. Phys. Med. Rehabil.* 2002;83:1629–1637.
47. Adamson J, Beswick A, Ebrahim S. Is stroke the most common cause of disability? *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.* 2004;13:171–177.
48. Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM, et al. Heart disease and stroke statistics--2012 update: a report from the American Heart Association. *Circulation.* 2012;125:e2–e220.
49. Gustavsson A, Svensson M, Jacobi F, et al. Cost of disorders of the brain in Europe 2010. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 2011;21:718–779.
50. Zlokovic B V. The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative

Verzeichnisse

- disorders. *Neuron*. 2008;57:178–201.
51. Girouard H, Iadecola C. Neurovascular coupling in the normal brain and in hypertension, stroke, and Alzheimer disease. *J. Appl. Physiol.* 2006;100:328–335.
52. Jovin TG, Demchuk AM, Gupta R. Pathophysiology of Acute Ischemic Stroke. *Contin. Lifelong Learn. Neurol.* 2008;14:28–45.
53. Baron J. Perfusion thresholds in human cerebral ischemia: historical perspective and therapeutic implications. *Cerebrovasc. Dis.* 2010;11:2–8.
54. Lydtin H, Wilms K, Lindner UK, et al. Ischämischer Schlaganfall. *Internist (Berl)*. 1998;39:623–643.
55. Lai TW, Zhang S, Wang YT. Excitotoxicity and stroke: identifying novel targets for neuroprotection. *Prog. Neurobiol.* 2014;115:157–188.
56. Hossmann K-A. Pathophysiology and Therapy of Experimental Stroke. *Cell. Mol. Neurobiol.* 2006;26:1055–1081.
57. Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci.* 1999;22:391–397.
58. Hopkins SJ, Rothwell NJ. Cytokines and the nervous system I: expression and recognition. *Trends Neurosci.* 1995;18:83–88.
59. Doyle KP, Simon RP, Stenzel-poore MP. Neuropharmacology. 2008;55:310–318.
60. Bhardwaj A, Alkayed NJ, Kirsch JR, et al. Mechanisms of ischemic brain damage. *Curr. Cardiol. Rep.* 2003;5:160–167.
61. Schielke GP, Yang GY, Shivers BD, et al. Reduced ischemic brain injury in interleukin-1 beta converting enzyme-deficient mice. *J. Cereb. blood flow Metab.* 1998;18:180–185.
62. Klatzo I. Pathophysiological aspects of brain edema. *Acta Neuropathol.* 1987;72:236–239.
63. Simard JM, Kent TA, Chen M, et al. Brain oedema in focal ischaemia: molecular pathophysiology and theoretical implications. *Lancet. Neurol.* 2007;6:258–268.
64. Manley GT, Fujimura M, Ma T, et al. Aquaporin-4 deletion in mice reduces brain edema after acute water intoxication and ischemic stroke. *Nat. Med.* 2000;6:159–163.
65. Starling EH. On the Absorption of Fluids from the Connective Tissue Spaces. *J. Physiol.* 1896;19:312–326.

Verzeichnisse

66. Vorbrodt AW, Wisniewski ASLHM, Suzuki R, et al. Ultrastructural Observations on the Transvascular Route of Protein Removal in Vasogenic Brain Edema. *Acta Neuropathol.* 1985;66:265–273.
67. Rosenberg GA. Ischemic brain edema. *Prog. Cardiovasc. Dis.* 42:209–216.
68. Wolburg H, Lippoldt A. Tight junctions of the blood-brain barrier: development, composition and regulation. *Vascul. Pharmacol.* 2002;38:323–337.
69. Abbott NJ, Rönnbäck L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat. Rev. Neurosci.* 2006;7:41–53.
70. Bandopadhyay R, Orte C, Lawrenson JG, et al. Contractile proteins in pericytes at the blood-brain and blood-retinal barriers. *J. Neurocytol.* 2001;30:35–44.
71. Hellström M, Gerhardt H, Kalén M. Lack of pericytes leads to endothelial hyperplasia and abnormal vascular morphogenesis. *J. Cell Biol.* 2001;153:543–553.
72. Simard M, Nedergaard M. The neurobiology of glia in the context of water and ion homeostasis. *Neuroscience.* 2004;129:877–896.
73. Hawkins BT, Davis TP. The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol. Rev.* 2005;57:173–85.
74. Vincent PA, Xiao K, Buckley KM, et al. VE-cadherin: adhesion at arm's length. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2004;286:987–997.
75. Abbruscato TJ, Davis TP. Protein expression of brain endothelial cell E-cadherin after hypoxia/aglycemia: influence of astrocyte contact. *Brain Res.* 1999;842:277–286.
76. Vorbrodt AW, Dobrogowska DH. Molecular anatomy of intercellular junctions in brain endothelial and epithelial barriers: electron microscopist's view. *Brain Res. Rev.* 2003;42:221–242.
77. Bazzoni G. The JAM family of junctional adhesion molecules. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2003;15:525–530.
78. Lippoldt A, Kniessel U, Liebner S, et al. Structural alterations of tight junctions are associated with loss of polarity in stroke-prone spontaneously hypertensive rat blood–brain barrier endothelial cells. *Brain Res.* 2000;885:251–261.
79. McCarthy KM, Skare IB, Stankewich MC, et al. Occludin is a functional component of the tight junction. *J. Cell Sci.* 1996;109:2287–2298.

Verzeichnisse

80. Saitou M, Furuse M, Sasaki H, et al. Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. *Mol. Biol. Cell.* 2000;11:4131–4142.
81. Haseloff RF, Dithmer S, Winkler L, et al. Transmembrane proteins of the tight junctions at the blood–brain barrier: Structural and functional aspects. *Semin. Cell Dev. Biol.* 2015;38:16–25.
82. Nitta T, Hata M, Gotoh S, et al. Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *J. Cell Biol.* 2003;161:653–660.
83. Yang Y, Estrada EY, Thompson JF, et al. Matrix metalloproteinase-mediated disruption of tight junction proteins in cerebral vessels is reversed by synthetic matrix metalloproteinase inhibitor in focal ischemia in rat. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2007;27:697–709.
84. Umeda K, Matsui T, Nakayama M, et al. Establishment and Characterization of Cultured Epithelial Cells Lacking Expression of ZO-1. *J. Biol. Chem.* 2004;279:44785–44794.
85. Harhaj NS, Antonetti DA. Regulation of tight junctions and loss of barrier function in pathophysiology. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2004;36:1206–1237.
86. Bacallao R, Garfinkel A, Monke S, et al. ATP depletion: a novel method to study junctional properties in epithelial tissues. I. Rearrangement of the actin cytoskeleton. *J. Cell Sci.* 1994;107:3301–3313.
87. Shen L, Turner JR. Actin depolymerization disrupts tight junctions via caveolae-mediated endocytosis. *Mol. Biol. Cell.* 2005;16:3919–3936.
88. Dominguez R, Holmes KC. Actin structure and function. *Annu. Rev. Biophys.* 2011;40:169–186.
89. Dos Remedios CG, Chhabra D, Kekic M, et al. Actin Binding Proteins: Regulation of Cytoskeletal Microfilaments. *Physiol. Rev.* 2003;83:433–473.
90. Van Troys M, Huyck L, Leyman S, et al. Ins and outs of ADF/cofilin activity and regulation. *Eur. J. Cell Biol.* 2008;87:649–667.
91. Andrianantoandro E, Pollard TD. Mechanism of Actin Filament Turnover by Severing and Nucleation at Different Concentrations of ADF/Cofilin. *Mol. Cell.* 2006;24:13–23.
92. Maciver SK, Hussey PJ. The ADF/cofilin family: actin-remodeling proteins. *Genome Biol.* 2002;3:1–12.

Verzeichnisse

93. Maekawa M. Signaling from Rho to the Actin Cytoskeleton Through Protein Kinases ROCK and LIM-kinase. *Science* (80-.). 1999;285:895–898.
94. Huang TY, DerMardirossian C, Bokoch GM. Cofilin phosphatases and regulation of actin dynamics. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2006;18:26–31.
95. Seifried A, Schultz J, Gohla A. Human HAD phosphatases: structure, mechanism, and roles in health and disease. *FEBS J.* 2013;280:549–571.
96. Gohla A, Birkenfeld J, Bokoch GM. Chronophin, a novel HAD-type serine protein phosphatase, regulates cofilin-dependent actin dynamics. *Nat. Cell Biol.* 2005;7:21–29.
97. Huang TY, Minamide LS, Bamburg JR, et al. Chronophin mediates an ATP-sensing mechanism for cofilin dephosphorylation and neuronal cofilin-actin rod formation. *Dev. Cell.* 2008;15:691–703.
98. Sun CX, Magalhães MAO, Glogauer M. Rac1 and Rac2 differentially regulate actin free barbed end formation downstream of the fMLP receptor. *J. Cell Biol.* 2007;179:239–245.
99. Fonda ML. Purification and characterization of vitamin B6-phosphate phosphatase from human erythrocytes. *J. Biol. Chem.* 1992;267:15978–15983.
100. Jang YM, Kim DW, Kang T-C, et al. Human pyridoxal phosphatase. Molecular cloning, functional expression, and tissue distribution. *J. Biol. Chem.* 2003;278:50040–50046.
101. Percudani R, Peracchi A. The B6 database: a tool for the description and classification of vitamin B6-dependent enzymatic activities and of the corresponding protein families. *BMC Bioinformatics.* 2009;10:273.
102. Whittaker JW. Intracellular trafficking of the pyridoxal cofactor. Implications for health and metabolic disease. *Arch. Biochem. Biophys.* 2016;592:20–26.
103. Fenalti G, Law RHP, Buckle AM, et al. GABA production by glutamic acid decarboxylase is regulated by a dynamic catalytic loop. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2007;14:280–286.
104. Schulze M, Fedorchenko O, Zink TG, et al. Chronophin is a glial tumor modifier involved in the regulation of glioblastoma growth and invasiveness. *Oncogene.* 2015;1–15.
105. Luissint A-C, Artus C, Glacial F, et al. Tight junctions at the blood brain barrier:

- physiological architecture and disease-associated dysregulation. *Fluids Barriers CNS*. 2012;9:23.
106. Zhou Q, Gensch C, Liao JK. Rho-associated coiled-coil-forming kinases (ROCKs): potential targets for the treatment of atherosclerosis and vascular disease. *Trends Pharmacol. Sci*. 2011;32:167–173.
107. Rikitake Y, Kim H-H, Huang Z, et al. Inhibition of Rho kinase (ROCK) leads to increased cerebral blood flow and stroke protection. *Stroke*. 2005;36:2251–2257.
108. Rajewsky K, Gu H, Kühn R, et al. Conditional gene targeting. *J. Clin. Invest*. 1996;98:600–603.
109. Molinari GF, Laurent JP. A Classification of Experimental Models of Brain Ischemia. *Stroke*. 1976;7:14–17.
110. Molinari GF. Experimental Cerebral Infarction. I. Selective Segmental Occlusion of Intracranial Arteries in the Dog. *Stroke*. 1970;1:224–237.
111. Hudgins WR, Garcia JH. Transorbital Approach to the Middle Cerebral Artery of the Squirrel Monkey: A Technique for Experimental Cerebral Infarction Applicable to Ultrastructural Studies. *Stroke*. 1970;1:107–111.
112. O'Brien MD. Ischemic Cerebral Edema. *Arch. Neurol*. 1974;30:456.
113. Ogata J, Fujishima M, Morotomi Y, et al. Cerebral infarction following bilateral carotid artery ligation in normotensive and spontaneously hypertensive rats: a pathological study. *Stroke*. 1976;7:54–60.
114. Chiamulera C, Terron A, Reggiani A, et al. Qualitative and quantitative analysis of the progressive cerebral damage after middle cerebral artery occlusion in mice. *Brain Res*. 1993;606:251–258.
115. Clark WM, Lessov NS, Dixon MP, et al. Monofilament intraluminal middle cerebral artery occlusion in the mouse. *Neurol. Res*. 1997;19:641–648.
116. Kleinschnitz C, Blecharz K, Kahles T, et al. Glucocorticoid insensitivity at the hypoxic blood-brain barrier can be reversed by inhibition of the proteasome. *Stroke*. 2011;42:1081–9.
117. Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, et al. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke*. 17:472–476.
118. Barclay LL, Gibson GE, Blass JP. The string test: an early behavioral change in

Verzeichnisse

- thiamine deficiency. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1981;14:153–157.
119. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods.* 2001;25:402–408.
120. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970;227:680–685.
121. Gershoni JM, Palade GE. Protein blotting: Principles and applications. *Anal. Biochem.* 1983;131:1–15.
122. Whitehead TP, Kricka LJ, Carter TJN, et al. Analytical luminescence: Its potential in the clinical laboratory. *Clin. Chem.* 1979;25:1531–1546.
123. Mizuno K. Signaling mechanisms and functional roles of cofilin phosphorylation and dephosphorylation. *Cell. Signal.* 2013;25:457–469.
124. Shimokawa H, Takeshita A. Rho-kinase is an important therapeutic target in cardiovascular medicine. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2005;25:1767–1775.
125. Satoh SI, Utsunomiya T, Tsurui K, et al. Pharmacological profile of hydroxy fasudil as a selective rho kinase inhibitor on ischemic brain damage. *Life Sci.* 2001;69:1441–1453.
126. Toshima Y, Satoh S, Ikegaki I, et al. A new model of cerebral microthrombosis in rats and the neuroprotective effect of a Rho-kinase inhibitor. *Stroke.* 2000;31:2245–2250.
127. Kleinschnitz C, Plesnila N. Experimental therapy approaches for ischemic stroke. *Nervenarzt.* 2012;83:1275–1281.
128. Zhang L, Zhang ZG, Chopp M. The neurovascular unit and combination treatment strategies for stroke. *Trends Pharmacol. Sci.* 2012;33:415–422.
129. Schulz JC, Hajjar K, Bozkurt B, et al. Thrombolyse beim akuten ischämischen zerebralen insult. *Arzneimitteltherapie.* 2014;32:125–132.
130. Fisher M, Feuerstein G, Howells DW, et al. Update of the stroke therapy academic industry roundtable preclinical recommendations. *Stroke.* 2009;40:2244–2250.
131. Dirnagl U. Bench to bedside: the quest for quality in experimental stroke research. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2006;26:1465–1478.
132. Dubois NC, Hofmann D, Kaloulis K, et al. Nestin-Cre transgenic mouse line Nes-Cre1 mediates highly efficient Cre/loxP mediated recombination in the nervous

- system, kidney, and somite-derived tissues. *Genesis*. 2006;44:355–360.
133. Feil S, Valtcheva N, Feil R. Inducible Cre mice. *Methods Mol. Biol.* 2009;530:343–363.
134. Lindahl P. Pericyte Loss and Microaneurysm Formation in PDGF-B-Deficient Mice. *Science*. 1997;277:242–245.
135. Van Der Worp HB, De Haan P, Morrema E, et al. Methodological quality of animal studies on neuroprotection in focal cerebral ischaemia. *J. Neurol.* 2005;252:1108–1114.
136. Koh P. Proteomic Analysis of Focal Cerebral Ischemic Injury in Male Rats. *J. Vet. Med. Sci.* 2010;72:181–185.
137. Hwang IK, Yoo K-Y, Kim DH, et al. Time course of changes in pyridoxal 5'-phosphate (vitamin B6 active form) and its neuroprotection in experimental ischemic damage. *Exp. Neurol.* 2007;206:114–125.
138. Kim JE, Kim D-W, Kwak S-E, et al. Potential role of pyridoxal-5'-phosphate phosphatase/chronopin in epilepsy. *Exp. Neurol.* 2008;211:128–140.
139. Kim JE, Ryu HJ, Kim MJ, et al. Pyridoxal-5'-phosphate phosphatase/chronopin induces astroglial apoptosis via actin-depolymerizing factor/cofilin system in the rat brain following status epilepticus. *Glia*. 2010;58:1937–1948.
140. Kim JE, Kim Y-J, Lee D-S, et al. PLPP/CIN regulates bidirectional synaptic plasticity via GluN2A interaction with postsynaptic proteins. *Sci. Rep.* 2016;6:26576.
141. Krueger M, Härtig W, Reichenbach A, et al. Blood-brain barrier breakdown after embolic stroke in rats occurs without ultrastructural evidence for disrupting tight junctions. *PLoS One*. 2013;8:e56419.
142. Jährling N, Becker K, Dodt H-U. 3D-reconstruction of blood vessels by ultramicroscopy. *Organogenesis*. 2009;5:227–230.
143. Witt KA, Mark KS, Hom S, et al. Effects of hypoxia-reoxygenation on rat blood-brain barrier permeability and tight junctional protein expression. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* 2003;285:2820–2831.
144. Huber JD, Witt KA, Hom S, et al. Inflammatory pain alters blood-brain barrier permeability and tight junctional protein expression. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2001;280:1241–1248.

145. Siddiqui MR, Mayanil CS, Kim KS, et al. Angiotensin-1 regulates brain endothelial permeability through PTPN-2 mediated tyrosine dephosphorylation of occludin. *PLoS One*. 2015;10:1–13.
146. Kakei Y, Akashi M, Shigeta T, et al. Alteration of Cell–Cell Junctions in Cultured Human Lymphatic Endothelial Cells with Inflammatory Cytokine Stimulation. *Lymphat. Res. Biol.* 2014;12:136–143.
147. Neuhaus W, Samwer F, Kunzmann S, et al. Lung endothelial cells strengthen, but brain endothelial cells weaken barrier properties of a human alveolar epithelium cell culture model. *Differentiation*. 2012;84:294–304.
148. Göbel K, Pankratz S, Schneider-Hohendorf T, et al. Blockade of the kinin receptor B1 protects from autoimmune CNS disease by reducing leukocyte trafficking. *J. Autoimmun.* 2011;36:106–114.
149. Srinivasan B, Kolli AR, Esch MB, et al. TEER Measurement Techniques for In Vitro Barrier Model Systems. *J. Lab. Autom.* 2015;20:107–126.
150. Kang JH, Hong ML, Kim DW, et al. Genomic organization, tissue distribution and deletion mutation of human pyridoxine-5'-phosphate oxidase. *Eur. J. Biochem.* 2004;271:2452–2461.
151. Galluzzi L, Vitale I, Senovilla L, et al. Prognostic impact of vitamin B6 metabolism in lung cancer. *Cell Rep.* 2012;2:257–269.
152. Bellenchi GC, Gurniak CB, Perlas E, et al. cycle control in the cerebral cortex N-cofilin is associated with neuronal migration disorders and cell cycle control in the cerebral cortex. *Genes Dev.* 2007;23:47–2357.
153. Kim J-S, Huang TY, Bokoch GM. Reactive oxygen species regulate a slingshot-cofilin activation pathway. *Mol. Biol. Cell.* 2009;20:2650–2660.
154. Park S, Jung Y. Combined actions of Na/K-ATPase, NCX1 and glutamate dependent NMDA receptors in ischemic rat brain penumbra. *Anat. Cell Biol.* 2010;43:201–210.
155. Wang Y, Shibasaki F, Mizuno K. Calcium signal-induced cofilin dephosphorylation is mediated by slingshot via calcineurin. *J. Biol. Chem.* 2005;280:12683–12689.
156. Alhadidi Q, Bin Sayeed MS, Shah ZA. Cofilin as a Promising Therapeutic Target for Ischemic and Hemorrhagic Stroke. *Transl. Stroke Res.* 2016;7:33–41.
157. Coburn SP. Neuronal Tissue-Nonspecific Alkaline Phosphatase (TNAP). In: Fonta

Verzeichnisse

- C, Négyessy L, editors. *Subcellular Biochemistry*. 2015. p. 207–238.
158. Chen CH, Battaglioli G, Martin DL, et al. Distinctive interactions in the holoenzyme formation for two isoforms of glutamate decarboxylase. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics*. 2003;1645:63–71.
159. Tapia R, Pasantes H. Relationships between pyridoxal phosphate availability, activity of vitamin B6-dependent enzymes and convulsions. *Brain Res*. 1971;29:111–122.
160. Salazar P, Tapia R. Seizures induced by intracerebral administration of pyridoxal-5'-phosphate: effect of GABAergic drugs and glutamate receptor antagonists. *Neuropharmacology*. 2001;41:546–553.
161. Gagliardi RJ. Neuroprotection, excitotoxicity and NMDA antagonists. *Arq. Neuropsiquiatr*. 2000;58:583–588.
162. Taniguchi H, He M, Wu P, et al. A Resource of Cre Driver Lines for Genetic Targeting of GABAergic Neurons in Cerebral Cortex. *Neuron*. 2011;71:995–1013.

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Rückgang des neurologischen Defizits als funktionelles Korrelat der Penumbra und Anstieg der strukturellen Läsion nach fokaler zerebraler Ischämie.	8
Abbildung 2: Schädigungskaskade bei zerebraler Ischämie.	12
Abbildung 3: Mechanismen der Pathogenese beim ischämischen Schlaganfall.	13
Abbildung 4: Neurovaskuläre Einheit der Blut-Hirn-Schranke.	16
Abbildung 5: Organisation des junctionalen Komplexes der Blut-Hirn-Schranke.	19
Abbildung 6: Konzentrationsabhängige Aktivität von Cofilin.....	21
Abbildung 7: Der Signalweg von Cofilin.....	22
Abbildung 8: Generierung konditional Chronophin-defizienter Mäuse.	26
Abbildung 9: Aufbau der Blotting-Apparatur.	45
Abbildung 10: Immunhistochemische Färbung von in Paraffin eingebetteten Hirnschnitten wildtypischer und Chronophin-defizienter Mäuse mit anti-Chronophin-Antikörpern.	50
Abbildung 11: Immunhistochemische Färbung von kryokonservierten Hirnschnitten wildtypischer und Chronophin-defizienter Mäuse mit anti-Claudin-5-Antikörpern.....	51
Abbildung 12: Immunhistochemische Färbung von kryokonservierten Hirnschnitten wildtypischer und Chronophin-defizienter Mäuse mit anti-Occludin-Antikörpern.	52
Abbildung 13: Immunfluoreszenz-Färbung von kryokonservierten Hirnschnitten wildtypischer und Chronophin-defizienter Mäuse nach tMCAO mit anti-E-Cadherin-Antikörpern.	52
Abbildung 14: Immunfluoreszenz-Färbung von kryokonservierten Hirnschnitten wildtypischer und Chronophin-defizienter Mäuse nach tMCAO mit anti-Occludin-Antikörpern.	53
Abbildung 15: Verhältnis von Claudin-5- zu Laminin-positiver Fläche in Hirnschnitten wildtypischer und Chronophin-defizienter Mäuse nach tMCAO.	54

Verzeichnisse

Abbildung 16: <i>Pdyp</i> -mRNA-Expression im Kortex.....	55
Abbildung 17: <i>Pdyp</i> -mRNA-Expression in den Basalganglien.	56
Abbildung 18: Exemplarische Darstellung eines gleichmäßigen Proteintransfers bei einer in Ponceau S-Lösung gefärbten Nitrocellulosemembran.	57
Abbildung 19: Mittels Western Blotting nachgewiesene Proteinbanden von Chronophin und Aktin in ipsi- und kontralateralen Basalganglien-Lysaten von drei wildtypischen Mäusen.	58
Abbildung 20: Graphische Darstellung der Chronophin-Level in den drei Basalganglien-Lysaten wildtypischer Mäuse nach Normalisierung mit Aktin.	59
Abbildung 21: Graphische Darstellung der relativen Chronophin-Level nach Normalisierung mit Aktin.....	60
Abbildung 22: Infarktgröße von WT- und KO-Mäusen nach tMCAO.	61
Abbildung 23: Hirnödembildung von WT- und KO-Mäusen nach tMCAO.	62
Abbildung 24: Ödem-korrigiertes Infarktvolumen von WT- und KO-Mäusen nach tMCAO.....	63
Abbildung 25: Neurologischer Status von WT und KO im Bederson-Score.	64
Abbildung 26: Neurologischer Status von WT und KO im String-Test.	65
Abbildung 27: Immunfluoreszenz-Färbung der Adherens Junction von wildtypischen und Chronophin-defizienten Endothelzellen.	67
Abbildung 28: Immunfluoreszenz-Färbung der Tight Junction von wildtypischen und Chronophin-defizienten Endothelzellen.....	68
Abbildung 29: Immunfluoreszenz-Färbung der Tight Junction von wildtypischen Endothelzellen mit und ohne Stimulation durch Thrombin.	69
Abbildung 30: Immunfluoreszenz-Färbung der Adherens Junction von wildtypischen und Chronophin-defizienten Endothelzellen nach Stimulation durch Thrombin.	70
Abbildung 31: Infarktgröße von WT- und E-KO-Mäusen nach tMCAO.	72
Abbildung 32: Hirnödembildung von WT- und E-KO-Mäusen nach tMCAO.....	73
Abbildung 33: Neurologischer Status von WT und E-KO im Bederson-Score. ...	74
Abbildung 34: Neurologischer Status von WT und E-KO im String-Test.....	75
Abbildung 35: Infarktgröße und Hirnödembildung von WT- und A-KO- sowie P- KO-Mäusen nach tMCAO.....	77

Verzeichnisse

Abbildung 36: Neurologischer Status von WT- und A-KO- sowie P-KO-Mäusen in Bederson-Score und String-Test. 78

7.3 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABP	aktinbindendes Protein
ADF	aktindepolymerisierender Faktor
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ASS	Acetylsalicylsäure
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BSA	bovines Serumalbumin
CA1	Cornu ammonis 1 (Region des Hippocampus)
cCT	kraniale Computertomographie (<i>cranial CT</i>)
cDNA	komplementäre DNS (<i>complementary DNA</i>)
cMRT	kraniale Magnetresonanztomographie (<i>cranial MRT</i>)
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
ECL	verstärkte Chemilumineszenz (<i>enhanced chemiluminescence</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
F-Aktin	filamentäres Aktin
FCS	fetales Kälberserum
g	a) Gramm; b) Schwerebeschleunigung
G-Aktin	globuläres Aktin
GABA	γ -Aminobuttersäure

Verzeichnisse

	<i>(gamma-Aminobutyric acid)</i>
GAD	Glutamat-Decarboxylase
GADPH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFAP	saures Gliafaserprotein (<i>glial fibrillary acidic protein</i>)
g/ml/min	Gramm pro Milliliter pro Minute (zerebraler Blutfluss)
h	Stunde(n)
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HAD	Haloazid-Dehalogenase
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
IL-1 β	Interleukin 1 β
KO	<i>Knockout</i>
LIM	Lin-11/Is1-1/Mec-3
MBEC	murine Hirnendothelzelle <i>(mouse brain endothelial cell)</i>
min	Minute(n)
MLEC	murine Lungenendothelzelle <i>(mouse lung endothelial cell)</i>
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger ribonucleic acid</i>)
NGS	normales Ziegenserum (<i>normal goat serum</i>)
NIHSS	<i>National Institute of Health Score Scale</i>
NVE	neurovaskuläre Einheit
PAF	Plättchen-aktivierender Faktor
PBS	phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion <i>(reverse transcription polymerase chain reaction)</i>
PFA	Paraformaldehyd
PLP	Pyridoxal-5'-Phosphat
ROCK	Rho-assoziierte Proteinkinase <i>(Rho-associated, coiled-coil-containing protein kinase)</i>

Verzeichnisse

rtPA	rekombinanter gewebespezifischer Plasminogenaktivator (<i>recombinant tissue-type plasminogen activator</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyle sulfate</i>)
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung (<i>tris buffered saline</i>)
TEER	transendothelialer elektrischer Widerstand (<i>transendothelial electrical resistance</i>)
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TES	testikuläres Protein
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
TIA	transitorisch ischämische Attacke
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TTC	2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid
Tween-20	Polyoxyethylen-(20)-sorbitanmonolaurat
U/ml	Einheiten pro Milliliter (<i>Units per millilitre</i>)
V	Volt
VE-Cadherin	vaskulär-endotheliales Cadherin
v/v	Volumen pro Volumen (<i>volume per volume</i>)
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen (<i>weight per volume</i>)
ZO	Zonula Occludens (Protein)
μ l	Mikroliter

Danksagung

Mein Dank gilt allen Personen, die maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Ich danke:

- im Besonderen Frau Prof. Dr. Antje Gohla dafür, dass Sie mir dieses gleichsam interessante wie anspruchsvolle Projekt überlassen und mir dessen Durchführung in ihrer Arbeitsgruppe am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Würzburg ermöglicht hat. Ich danke ihr für die herausragende Betreuung meiner Arbeit in jeglicher Hinsicht, sei es durch ihre Unterstützung bei der Versuchsplanung, die kompetente Diskussion der erlangten Ergebnisse, die Vorbereitung der Publikation und die ständige Bereitschaft, aufkommende Probleme umgehend zu lösen.
- Herrn Prof. Dr. Kleinschnitz dafür, dass die experimentellen Schlaganfälle an Mäusen in seiner Arbeitsgruppe an der Klinik und Poliklinik für Neurologie des Universitätsklinikums Würzburg durchgeführt werden konnten.
- Herrn Prof. Dr. Guido Stoll und Frau Prof. Dr. Katrin Heinze für die Mitbetreuung der Arbeit.
- Frau Dr. Eva Geuss für die Durchführung der experimentellen Schlaganfallversuche, neurologischen Funktionstests sowie Aufbereitung der Proben für Immunhistochemie und Western Blot und die stets freundliche und zielführende Zusammenarbeit.
- Frau Dr. Elisabeth Jeanclos für die kompetente Einführung in die Laborarbeit und ihre Hilfsbereitschaft bei aufkommenden Fragen.
- allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Gohla sowie des gesamten Instituts für Pharmakologie und Toxikologie für ihre Hilfsbereitschaft und Kollegialität.
- der Graduiertenschule für Lebenswissenschaften und der medizinischen Fakultät der Universität Würzburg sowie der Deutschen Herzstiftung für die Unterstützung mit einem Promotions- bzw. dem Kaltenbach-Stipendium.
- meiner Familie und Freunden, die durch Gespräche und ihre Unterstützung das Voranschreiten dieser Arbeit gefördert haben.
- meiner Frau Madleine für die stetige Motivation und ihre bedingungslose Liebe.

Eidesstattliche Erklärung / Affidavit

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation

„Die Rolle von Chronophin bei Schlaganfall-induziertem
Funktionsverlust der Blut-Hirn-Schranke“

eigenständig, d. h. insbesondere selbstständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Würzburg, den 29.06.2018

Affidavit

I hereby confirm that my thesis entitled

"The role of chronophin in stroke-induced
loss of function of the blood-brain barrier"

is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and / or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I confirm that this thesis has not yet been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Wuerzburg, 29.06.2018
