Aus dem Institut für Pathologie am Universitätsklinikum Ulm

Leiter: Prof. Dr. med. Peter Möller

„Einfluss der Wachstumsfaktoren BDNF und G-CSF auf die Neurotransmitter-Rezeptor-Regulation und die Proteinexpression Plastizitäts-assoziierter Markerproteine nach experimenteller zerebraler Ischämie“

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Universität Ulm

von

Angelika Brigitte Neder

geboren in Lichtenfels / Oberfranken

2010

Amtierender Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Clemens Sommer

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Albert Ludolph

Tag der Promotion: 10.02.2011

meiner lieben Familie und meinen

Großmüttern Maria Dietz und Dorothea Neder (*1910 - †2000)

gewidmet

Inhaltsverzeichnis ..I
Abkürzungsverzeichnis ..III
1. Einleitung ..01
1.1. Schlaganfall heute ..01
1.2. Pathophysiologische Mechanismen nach ischämischem Insult ..03
1.2.1. Akutphase ..03
1.2.2. Regenerationsphase ..05
1.3. Die Wachstumsfaktoren BDNF und G-CSF ..07
1.3.1. BDNF ..07
1.3.2. G-CSF ..08
1.4. Neuroprotektives Potenzial bei zerebraler Ischämie ..10
1.4.1. Neuroprotektion durch BDNF ..10
1.4.2. Neuroprotektion durch G-CSF ..12
1.5. Postischämisch untersuchte Neurotransmitterrezeptoren und ihre Untereinheiten ..13
1.5.1. Glutamaterge Rezeptoren ..13
1.5.1.1. NMDA-Rezeptor ..13
1.5.1.2. Die NR1-Untereinheit des NMDA-Rezeptors ..16
1.5.1.3. AMPA-Rezeptor ..16
1.5.1.4. Die GluR1-Untereinheit des AMPA-Rezeptors ..17
1.5.2. GABAerge Rezeptoren ..17
1.5.2.1. $GABA_A$-Rezeptor ..18
1.5.2.2. Die α2-Untereinheit des $GABA_A$-Rezeptors ..19
1.6. Postischämisch untersuchte neuronale Marker der Hirnplastizität ..19
1.6.1. Mikrotubuli-assoziierte Proteine ..20
1.6.1.1. MAP1B ..20
1.6.1.2. MAP2 ..21
1.6.2. Synaptophysin ..22
1.7. Fragestellung ..24
2. Material und Methoden ..25
2.1. Tiermodell ..25
2.2. Modell der photothrombotischen Ischämie ..25
2.2.1. Prämedikation und Überwachung ..25
2.2.2. Präparation ..26

2.3. Immunhistochemie 26
2.4. Neuropathologische Evaluation 28
2.5. Statistische Auswertung 30
2.6. Materialliste 30
3. Ergebnisse 31
3.1. N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor Untereinheit NR1 31
3.1.1. Cortex 31
3.1.2. Hippocampus 32
3.2. AMPA-Rezeptor Untereinheit GluR1 34
3.2.1. Cortex 34
3.2.2. Hippocampus 36
3.3. $GABA_A$-Rezeptor α2-Untereinheit 38
3.3.1. Cortex 38
3.3.2. Hippocampus 39
3.4. MAP1B 42
3.4.1. Cortex 42
3.4.2. Hippocampus 45
3.5. MAP2 47
3.5.1. Cortex 47
3.5.2. Hippocampus 48
3.6. Synaptophysin 50
3.6.1. Cortex 50
3.6.2. Hippocampus 52
4. Diskussion 54
4.1. Modulation des glutamatergen und Gabaergen Systems durch BDNF und G-CSF 6 Wochen nach photothrombotisch induzierter zerebraler Ischämie 54
4.2. Modulation der Proteinexpression Plastizitätsassoziierter Markerproteine 6 Wochen nach ischämischer Hirnläsion durch BDNF und G-CSF 56
4.3. Schlussfolgerungen 58
5. Zusammenfassung 59
6. Literaturverzeichnis 61
Anhang 85
Danksagung 87
Publikation 88

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ABC-Reaktion	„Avidin-Biotin-Complex“-Reaktion
AKT	synonym: Proteinkinase B, PKB
AMPA	α-Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure
ANOVA	„analysis of variance“
ATP	Adenosintriphosphat
Bax	“Bcl-2 associated protein X”
Bcl-2	“B cell lymphoma gene 2”
Bcl-xl	“B cell lymphoma gene”, lange splice-Variante
BDNF	“brain-derived neurotrophic factor”
CA1, CA3	Hippocampusregionen: Cornu ammonis 1, 3
Ca^{2+}	Calcium
Cl^-	Chlorid
CPS	“cryoprotectant solution”
DAB	Diaminobenzidin
DCX	“doublecortin”
DG	Gyrus dentatus
DNA	“deoxyribonucleic acid”
FAU	“forced arm use”
GABA	“γ-aminobutyric acid”
G-CSF	“granulocyte-colony stimulating factor”
GluR1, 2, 3, etc.	AMPA-Rezeptoruntereinheit 1, 2, 3, etc.
h	Stunde
H_2O_2	Wasserstoffperoxid
ERK	“extracellular signal-regulated kinase”
IL-1	Interleukin-1
IR	Immunreaktivität
JAK	Januskinase
JNK	c-jun N-terminale Kinase
IPSP	inhibitorisches postsynaptisches Potenzial
K^+	Kalium

kDa	Kilo-Dalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
LTD	“long-term depression”
LTP	“long-term potentation”
MAP1B, 2	Mikrotubuli-assoziiertes Protein 1B, 2
MCA	“middle cerebral artery”
MCP 1	“monocyte chemotactic protein 1”
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
min	Minute
mm	Millimeter
MK-801	= Dizocilpin
NaCl	Natriumchlorid
NGF	“nerve growth factor”
NT	Neurotrophin
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
NR1, 2	NMDA-Rezeptoruntereinheit 1, 2
NSS	“Neurological Severity Score”
PBS	“Phosphate buffered saline”
PBST	PBS mit Triton
PDK	“phosphoinositide-dependent kinase 1”
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP3	Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphat
PLC	Phospholipase C
PNS	peripheres Nervensystem
rt-PA	“recombinant tissue plasminogen activator”
SEM	“standard error of the mean”
s. g.	stratum granulare
s. m.	stratum moleculare

s. o.	stratum oriens
s. p.	stratum pyramidale
s. r.	stratum radiatum
SOS	“son of sevenless” (Ausdruck aus der Drosophila-Genetik), Nukleotid-Austauschfaktor
STAT3	“Signal Transducer and Activator of Transcription 3”
SVZ	“Subventricular Zone”
Trk	“Tyrosin related kinase”
Tab.	Tabelle
VEGF	“vascular endothelial growth factor”
W	Watt
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Einleitung

1.1. Schlaganfall heute

Als ischämischer Schlaganfall wird ein akutes fokales neurologisches Defizit aufgrund einer umschriebenen Durchblutungsstörung des Gehirns bezeichnet (Deutsche Gesellschaft für Neurologie).

Im Jahr 2004 rangierte der Schlaganfall unter den 10 häufigsten Todesursachen in Deutschland auf Platz 5 (Statistisches Bundesamt Deutschland, www.destatis.de/basis/d/gesu/gesutab20.php). Eindrücklich sind auch die Angaben zu Inzidenzen und Folgen eines Schlaganfalls: die Inzidenz flüchtiger Durchblutungsstörungen, sog. TIAs, liegt in Deutschland bei 50/100 000 EW pro Jahr, für ischämische Schlaganfälle bei 160-240/100 000 EW. Die Inzidenz nimmt mit steigendem Lebensalter zu, etwa die Hälfte aller Schlaganfallpatienten ist über 70 Jahre alt. Schon heute ist der Schlaganfall die häufigste Ursache dauerhafter Behinderung und in den Industrieländern die teuerste Krankheit überhaupt (Wolf et al., 1992). Ca. 40% versterben binnen eines Jahres und zwei Drittel der Patienten, die einen Schlaganfall überleben, sind behindert und auf fremde Hilfe angewiesen (Kompetenznetz Schlaganfall). Im Frühjahr 2006 hat ein Projekt des vom Bundesministerium für Bildung und Forschung geförderten Kompetenznetzes Schlaganfall, das Erlanger Schlaganfall Register, repräsentative Daten zu den direkten Kosten der Schlaganfallversorgung vorgestellt (Kolominsky-Rabas et al., 2006): so belaufen sich die *lebenslangen* direkten Behandlungskosten pro Schlaganfallpatient in Deutschland auf durchschnittlich 43.129 Euro. Nicht berücksichtigt sind in der Studie die „indirekten“ Kosten durch frühzeitige Erwerbsunfähigkeit oder durch unentgeltliche Pflege durch Angehörige und Bekannte. Da das Erkrankungsrisiko im Alter deutlich ansteigt (s.o.), könnte die Bedeutung des Schlaganfalls angesichts der demografischen Entwicklung in Deutschland weiter zunehmen. Die Studie berechnete ebenfalls unter Berücksichtigung der zu erwartenden Alters-Entwicklung, der Geschlechterverteilung und der anzunehmenden Teuerungsraten die Gesamtkosten der direkten Behandlung ischämischer Schlaganfälle für die nächsten zwanzig Jahre (2006 – 2025) und kommt zu dem Schluss, dass das Krankheitsbild Schlaganfall eine große Herausforderung für das Gesundheitssystem darstellt (Kompetenznetz Schlaganfall).

Sicher wäre es wünschenswert, innerhalb der Bevölkerung eine größere Sensibilisierung für das Thema zu erreichen und präventiv die einschlägigen Risikofaktoren für zerebralischämische Anfälle wie übermäßigen Alkohohlgenuss, Bewegungsmangel, zu

fettreiche Ernährung, Nikotinabusus und Übergewicht (Kompetenznetz Schlaganfall) durch einen gesünderen Lebensstil zu reduzieren. Was jedoch die Diagnostik und Behandlung bereits erfolgter Schlaganfälle anbelangt, so hat man sich auf momentane Richtlinien geeinigt: der Goldstandard der Diagnosestellung ist nach wie vor die Computertomographie. Ob das MRT das CT in seiner Nützlichkeit ersetzen kann, ist bislang noch nicht eindeutig belegt und erfordert weitergehende Studien (Adams H. et al., 2005).

Wesentlicher Pfeiler in der frühen Behandlung von Schlaganfallpatienten ist die Thrombolyse mit rtPA innerhalb von drei Stunden nach Beginn der Schlaganfallsymptomatik. Wichtig dabei ist, dass die Patienten sorgfältig ausgewählt sind, keine weiteren Risikofaktoren für Blutungskomplikationen aufweisen und eine zeitliche Verzögerung weitestgehend vermieden wird. Als nicht empfehlenswert hat sich die Gabe von Antikoagulanzien in der Frühphase der Behandlung erwiesen. Selbst wenn die rasche Heparinisierung von Schlaganfallpatienten weit verbreitet ist, gibt es keine Daten, die dieses Vorgehen unterstützen würden. Dagegen als sinnvoll wird die Verabreichung von Aspirin innerhalb der ersten 48h des Schlaganfalls erachtet. Jedoch ist die positive Wirkung von Aspirin so gering, dass es auf keinen Fall eine Alternative zur intravenösen Thrombolyse darstellt. Was die Möglichkeit einer mechanischen Thrombolyse anbelangt, so existieren zum jetzigen Zeitpunkt noch keine adäquaten Studien, die Rückschlüsse über die Effektivität zulassen. Ebenfalls als noch nicht empfehlenswert wird bislang die Anwendung neuroprotektiver Substanzen eingestuft (Adams H. et al., 2005). Letztere ließen in tierexperimentellen Studien zwar positive Rückschlüsse zu, die bislang in klinischen Studien, aber nicht am Menschen umgesetzt werden konnten. Da die Thrombolyse in der Akutphase allerdings stets einer begrenzten Patientenklientel vorbehalten sein wird, wird die Suche nach Faktoren, die die Regeneration in der chronischen Phase fördern, z.B. durch „constrained use“ oder pharmakologisch in Zukunft nicht an Dringlichkeit verlieren.

In Anbetracht der gesundheitsökonomischen Belastung und der gesellschaftlichen, aber auch persönlichen Folgen, die ein Schlaganfall verursacht, sei weitere Forschung zu diesem Krankheitsbild, ob experimentell oder klinisch, wünschenswert und zu fördern, so der gesundheitspolitische und gesellschaftliche Konsens.

1.2. Pathophysiologische Mechanismen nach Hirninfarkt

1.2.1. Akutphase

Als Akutphase bezeichnet man die Zeitspanne unmittelbar nach dem ischämischen Insult. Die pathophysiologischen Prozesse, die in dieser Phase stattfinden, sollen im Folgenden dargestellt werden. Da Hirngewebe einen hohen Verbrauch von Sauerstoff und Glukose hat, kann es Energie ausschließlich durch oxidative Phosphorylierung gewinnen. Insofern beeinträchtigt die fokale Verminderung des zerebralen Blutflusses die Substratzufuhr und damit einhergehend die Energieproduktion zur Aufrechterhaltung des zellulären Ionengradienten. Mit Erschöpfung der Energieressourcen geht das Membranpotenzial verloren und Neuron und Gliazellen depolarisieren. Sowohl somatodendritische als auch präsynaptische spannungsabhängige Ca^{2+}-Kanäle werden aktiviert und exzitatorische Aminosäuren werden vermehrt in den Extrazellulärraum abgegeben. Durch die Behinderung energieabhängiger Prozesse wie des Re-Uptakes exzitatorischer Aminosäuren durch Astrozyten und Nervenzellen, häuft sich Glutamat im Extrazellulärraum an. (Dirnagl et al., 1999; Doyle et al., 2008) Bedingt durch die Glutamat-vermittelte Überaktivierung treten Na^+ und Cl^- über Kanäle für monovalente Ionen in die Zellen ein. Da der Einstrom von Na^+ und Cl^- neben dem Einstrom von Ca^{2+} viel größer ist als der Ausstrom von K^+, strömt Wasser passiv nach und führt zu einer Zellschwellung. Das darauf folgende Ödem beeinträchtigt die Perfusion von Hirnregionen, die das Zentrum des Perfusionsdefizits umgeben und verursacht Schädigungen durch erhöhten intrakraniellen Druck, vaskuläre Kompression und Herniation. Das Hirnödem ist einer der bestimmenden Faktoren ob ein Patient die ersten Stunden nach einem Schlaganfall überlebt oder nicht.

Weiterhin kommt es auch zu Störungen im GABAergen System. (Buchkremer-Ratzmann et al., 1996; Domann et al., 1993; Eysel & Schmidt-Kastner, 1991; Mittmann et al., 1994; Neumann-Haefelin et al., 1995; Schiene et al., 1996) Wie bereits in verschiedenen experimentellen Modellen zum Hirninfarkt gezeigt werden konnte, kommt es in der ischämischen Penumbra zu einer Herunterregulation der $GABA_A$-Rezeptoren (Qü et al., 1998; Que et al., 2000; Neumann-Haefelin et al., 1998) und damit zu einer Verschiebung des Gleichgewichts zwischen Exzitation und Inhibition.

Antagonisiert werden kann die exzitotoxische Wirkung durch Aktivierung des Cl^--assoziierten $GABA_A$-Kanals, der die Zelle repolarisiert. (Muir et al., 1996)

Die Ausdehnung des ischämischen Hirnschadens ist auch von einem anderen Pathomechanismus, den Periinfarkt-Depolarisationen, abhängig: in Folge des Energiemangels und der Freisetzung von Kalium und Glutamat depolarisieren ischämische Neuronen und Gliazellen. In der Penumbra können Zellen als Antwort auf die erhöhten Glutamat- oder Kaliumkonzentrationen im Extrazellulärraum ebenfalls depolarisieren (Hossmann, KA, 1996) und in dem Maße wie die Depolarisationen zunehmen, wird der Infarkt größer.

Die Ca^{2+}-vermittelte Aktivierung von intrazellulären second-messenger-Systemen, der Anstieg freier Sauerstoff-Radikale und die Hypoxie selbst triggern die Expression einer Reihe proinflammatorischer Gene und induzieren die Synthese verschiedenster Transkriptionsfaktoren (O'Neill, LA and Kaltschmidt, 1997). Von verletzten Gehirnzellen werden zudem Entzündungsmediatoren produziert, was die Expression von Adhäsionsmolekülen auf der endothelialen Zelloberfläche induziert. Die Adhäsionsmoleküle interagieren mit komplementären Oberflächenrezeptoren von neutrophilen Granulozyten. Diese bleiben folglich am Endothel haften, durchwandern die Gefäßwand und dringen in das Hirnparenchym ein. Makrophagen und Monozyten folgen den Neutrophilen, wandern ins ischämische Gehirn und sind fünf bis sieben Tage nach dem ischämischen Ereignis die prädominanten Zellen. Chemokine, z.B. Interleukin 8 und MCP 1 werden im verletzten Gehirn produziert und leiten die Migration von Entzündungszellen aus dem Blut. Hirnzellen sind ebenso an der Entzündungsreaktion beteiligt. Vier bis sechs Stunden nach Eintritt der Ischämie werden Astrozyten hypertrophisch, wohingegen Mikrogliazellen eine amöboide Morphologie annehmen, die typisch für aktivierte Mikroglia ist. 24 Stunden nach dem MCA-Verschluss ist die Mikroglia-Reaktion gut entwickelt im ischämischen Gehirn.

Es gibt außerdem Anhaltspunkte dafür, dass post-ischämische Inflammationsprozesse zur Vergrößerung des Infarktvolumens beitragen (Feuerstein et al., 1998): Zerebralischämischer Hirnschaden wird nämlich dann reduziert, wenn die Infiltration von Neutrophilen durch Induktion einer systemischen Neutropenie verhindert wird, Adhäsionsmoleküle oder deren Rezeptoren durch neutralisierende Antikörper blockiert werden, wenn die Aktivität von entscheidenden Entzündungsmediatoren wie Il-1 blockiert wird oder in Mäusen, wenn das Gen deletiert wird, das für den Interferon Regulationsfaktor 1 kodiert.

Gehirnzellen, die durch exzessive Glutamatrezeptor-Aktivierung, Ca^{2+}-Überschuss, Sauerstoffradikale oder durch mitochondrialen und DNA-Schaden beeinträchtigt werden,

können entweder durch Nekrose oder Apoptose zu Grunde gehen. Diese Entscheidung hängt weitgehend von der Natur und Intensität des Stimulus sowie dem Zelltyp ab. Nekrotische Prozesse sind der vorherrschende Mechanismus bei akutem, permanentem Gefäßverschluss mit kompletter Ischämie, wohingegen bei inkompletter Ischämie der Zelltod mehr durch die Caspase-vermittelte Apoptose stattfindet, vor allem in der ischämischen Penumbra (Hossmann KA, 1994).

Man hat herausgefunden, dass Caspase-Inhibitoren nicht nur das Volumen des Hirninfarkts bei fokaler Ischämie verkleinern, sondern auch das neurologische Defizit verringern (Thornberry NA et al., 1998; Adams JM et al., 1998). Insofern stellen Caspase-Inhibitoren, die auch bei anderen experimentellen Hirnverletzungen – wie Kopftraumata – protektive Effekte aufweisen (Yakovlev, AG et al., 1997) ebenso eine potenzielle therapeutische Anwendungsmöglichkeit dar.

1.2.2. Regenerationsphase

Bislang war es unmöglich, den genauen Zeitpunkt des Beginns der Regenerationsphase zu determinieren. Es ist bekannt, dass die Prozesse, die die Regenerationsphase charakterisieren, bereits unmittelbar nach dem ischämischen Insult einsetzen und über Tage bis Wochen anhalten. Da die vorliegende Arbeit sich mit dem Einfluss von Wachstumsfaktoren auf die Vorgänge in der Regenerationsphase befasst, sollen letztere nachfolgend näher dargestellt werden:

Wochen bis Monate nach einem ischämischen Insult kommt es häufig zu einer spontanen Besserung im klinischen Verlauf, was beeinflusst wird durch die Reorganisationsprozesse und die Plastizität von Neuronen. (Chen R et al., 2002) So kann der motorische Schaden nach dem ischämischen Ereignis dadurch gelindert werden, dass benachbarte Cortex-Bereiche die Funktion der geschädigten Bereiche übernehmen oder sich alternative motorische Pathways ausbilden. Längerfristig gesehen spielen zusätzliche Mechanismen wie Neurogenese, axonale Regeneration und Sprouting der Neurone eine wichtige Rolle. Der Regenerationsprozess wird auch vom veränderten Gleichgewicht zwischen inhibitorischen und exzitatorischen Neurotransmitter-Rezeptoren beeinflusst. (Jolkkonen J et al., 2003; Müller HD et al., 2008) Zum einen ist richtig, dass die exzitotoxische Überaktivierung von Glutamat-Rezeptoren in der *hyperakuten* postischämischen Phase ein Schlüsselfaktor des neuronalen Zelltodes ist. In der hyperakuten Phase können mit NMDA-Rezeptor-Antagonisten (Lee J-M et al., 1999) oder AMPA-Rezeptor-Antagonisten (Schielke GP et al., 1999) neuroprotektive Effekte, wie z.B. eine

signifikante Reduktion des Infarktvolumens, erzielt werden. Die praktische Umsetzbarkeit dieser Erkenntnis in die Klinik ist allerdings schwierig, zumal der Therapiebeginn von Schlaganfall-Patienten oft erst zu einem Zeitpunkt stattfindet, an dem das therapeutische Zeitfenster für NMDA- oder AMPA-Rezeptor-Antagonisten bereits überschritten wurde. Wünschenswerte oder schädigende Effekte auf Ischämie-geschädigtes Hirngewebe sind z.B. für den NMDA-Rezeptor-Antagonisten MK-801 sehr vom Zeitpunkt der Verabreichung abhängig. (Barth et al., 1990) In einem Modell für Schädel-Hirn-Trauma bei Mäusen konnte gezeigt werden, dass die Hyperaktivierung von NMDA-Rezeptoren nur in der ersten Stunde nach der Verletzung statt findet, anschließend kommt es zu einem lang anhaltenden Funktionsverlust der Rezeptoren. (Biegon et al., 2004) Ausgehend von dieser Beobachtung wurde im gleichen Modell im Zeitraum ab 24 bis 48h *nach* dem Schädel-Hirn-Trauma, in einer Versuchsgruppe eine Stimulation der NMDA-Rezeptoren mit NMDA durchgeführt, was im Vergleich zu einer mit Kochsalz behandelten und einer anderen mit einer NMDA und MK-801 behandelten Mäusegruppe zu einem signifikant verbesserten funktionellen Outcomes bei den Tieren führte (getestet wurde nach dem Neurological Severity Score und dem Object Recognition Test). Anzumerken ist ebenfalls, dass die Ko-Administration des NMDA-Rezeptor-Agonisten und des NMDA-Rezeptor-Antagonisten MK-801 im Zeitraum 24 bis 48h nach dem Trauma sogar zu schlechteren Ergebnissen im funktionellen Outcome führte als die alleinige Verabreichung von Kochsalz. Das bedeutet, dass die neuroprotektive Aktivierung des GABAergen Systems in der Akutphase umgekehrt in der chronischen Phase eher negative Effekte entfaltet.

Sowie die exzitatorische Wirkung in der hyperakuten Phase zu Exzitotoxizität führen kann, so geht man also davon aus, dass die geschädigten Neurone in der Regenerationsphase von der exzitatorischen Aktivierung profitieren. Da der Fokus der vorliegenden Arbeit auf die Beeinflussung der Neurotransmitter-Rezeptoren-Regulation in der Regenerationsphase durch die Wachstumsfaktoren BDNF und GCSF gerichtet ist, sollen im Folgenden die Wachstumsfaktoren selbst und die experimentell untersuchten Neurotransmitter-Rezeptoren sowie die ebenfalls analysierten neuronalen Plastizitätsmarker näher dargestellt werden.

1.3. Die Wachstumsfaktoren BDNF und G-CSF

1.3.1. BDNF

Brain-derived neurotrophic factor, BDNF, ist ein Protein, das zur Genfamilie der Neurotrophine gehört. Neurotrophine regulieren das Überleben und die Differenzierung bestimmter Neuronenpopulationen in der embryonalen Entwicklung und gelten als Modulatoren im adulten peripheren und zentralen Nervensystem. (Lewin GR, Barde YA 1996) Neurotrophine werden von Neuronen oder Neuronen-assoziiertem Gewebe (Gliazellen, Schwannzellen) gebildet. Hinsichtlich struktureller Homologien umfasst die Familie der Neurotrophine die Nervenwachstumsfaktoren NGF (nerve growth factor), BDNF (brain-derived neurotrophic factor), NT-3 (neurotrophin-3), NT-4/5 (neurotrophin-4/5) und NT-6 (neurotrophin-6). (Levi-Montalcini R et al., 1995; Lewin GR, Barde YA 1996) BDNF wird sowohl im ZNS als auch im peripheren Nervensystem (PNS) in Regionen der Neurogenese und Differenzierung gebildet. Obwohl schon in sehr frühen Entwicklungsstadien vorhanden, treten die höchsten Konzentrationen an BDNF – im Gegensatz zu NT-3 – erst postnatal auf. (Das et al., 2001) Auch im adulten Hirn ist BDNF noch weit verbreitet, die höchste Expression ist im Hippokampus. Frühe neuronale Vorläuferzellen reagieren auf BDNF mit einer erhöhten Zellproliferation sowie Beendigung der Mitose und durchlaufen eine Differenzierung von multipotenten Zellen zu Zellen mit neuronalem Phänotyp. Ferner wirkt BDNF auf die synaptische Transmission (Levine ES, 1996; Kang H, Schuman EM, 1995) und fördert die Induktion der Langzeit-Potenzierung (long-term potentiation, LTP) im Hippokampus und im visuellen Kortex. (Akaneya Y et al., 1997; Figurov A et al., 1996) Es ist bekannt, dass BDNF in vitro eine große Anzahl unterschiedlicher neuronaler Zellen wie z.B. des Hippocampus, des dopaminergen Systems, des Cerebellums und des Cortex trophisch beeinflusst (Ernfors P et al., 1990; Hohn A et al., 1990; Hyman C et al., 1991; Ebendal T, 1992; Ip NY et al., 1993; Lindholm D et al., 1993; Shimohama S et al., 1995; Roback JD et al., 1995) und in vivo Motoneurone und dopaminerge Zellen der Substantia Nigra bei traumatischen und toxischen Hirnschäden schützt. (Oppenheim RW et al., 1992; Sendtner M et al., 1992)

Neurotrophine entfalten ihre Wirkung über zwei Rezeptorenklassen: zum einen über Rezeptoren mit Tyrosinkinase-Aktivität (trk), welche eine hohe Affinität zum jeweiligen Neurotrophin haben. Bislang sind drei verschiedene trk-Rezeptoren beschrieben: trkA für NGF, trkB für BDNF und NT-4 sowie trk C für NT-3. Durch Bindung von BDNF an den

trkB-Rezeptor wird die Tyrosinkinase aktiviert und es werden verschiedene intrazelluläre Signalkaskaden induziert.

Die Stimulierung des TrkB-Rezeptors induziert einen zweiten wichtigen intrazellulären Signalweg, dessen Charakteristika die Aktivierung der Lipidkinase Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-Kinase) und der Serin/Threonin- Proteinkinase AKT sind. (Thiel G et al., 2005) Eine weitere Rolle spielt die Phospholipase PLC-γ1, die auf Signaltransduktionswege wirkt, die beispielsweise synaptische Plastizität modulieren (Bibel M, Barde YA, 2000).

Zum anderen wirken Neurotrophine auch über den p75-Neurotrophin-Rezeptor ($p75^{NTR}$), der keine zytoplasmatische Kinase-Domäne aufweist. (Chao MV, Hempstead BL, 1995) $p75^{NTR}$ gehört zur Superfamilie der Tumor-Nekrose-Faktoren und bindet unspezifisch alle Neurotrophine (Barbacid M, 1995). Viele Neurone besitzen Bindungsstellen beider Rezeptorklassen (trk und $p75^{NTR}$). Obwohl vor allem die trk-Rezeptoren für die Vermittlung der Neurotrophineffekte verantwortlich sind, erleichtert $p75^{NTR}$ die Bindung der Liganden an die trk-Rezeptoren und kann die intrazelluläre Signaltransduktion auch unabhängig von trk initiieren. (Chao MV, Hempstead BL, 1995; Chao MV, 1994) Neben der Interaktion von $p75^{NTR}$ mit zytoplasmatischen Proteinen ist ein wichtiger Signaltransduktionsweg des Rezeptors durch die Beteiligung von JNK, p53 und Bax gekennzeichnet. (Aloyz RS et al., 1998; Friedman WJ, 2000). Die c-jun N-terminale Kinase (JNK) wird im Allgemeinen aktiviert, wenn eine Zelle verschiedenen Formen von Streß ausgesetzt wird. Ihre Rolle ist allerdings nicht völlig aufgeklärt, zumal JNK sowohl für Apoptose als auch für Überlebenssignale verantwortlich sein kann (Ip YT, Davis RJ, 1998). In pro-apoptotischen Szenarien bewirkt JNK durch Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors p53 dessen Stabilisierung (Davis RJ, 2000); die erhöhte p53-Konzentration als Antwort auf Streß-Signale bewirkt einen Zellzyklus-Stop und/oder Apoptose. Das Tumor-Suppressorgen *p53* gehört zu den bei Krebserkrankungen am häufigsten mutierten Genen und die Wiederherstellung seiner Funktion führt zu Tumorregression (Ventura A et al., 2007). Eines der transkriptionellen Zielmoleküle von p53 ist das pro-apoptotisch wirkende Bcl-Protein Bax. (Müllauer L et al., 2001)

1.3.2. G-CSF

Granulocyte-Colony Stimulating Factor, G-CSF, ist ein 19,6kDa großes Glykoprotein, das normalerweise bei der Behandlung von Neutropenien Anwendung findet. (Burgess AW, Metcalf D 1980; Frampton JE et al., 1994) Zu den bislang bekannten Quellen von G-CSF

zählen Monozyten, Mesothel- und Endothelzellen und Fibroblasten; Rezeptoren für G-CSF sind zu finden auf Vorläuferzellen von reifen neutrophilen Granulozyten, Monozyten, Thrombozyten und Endothelzellen. G-CSF stimuliert die Bildung von neutrophilen Granulozytenvorläuferzellen (Welte K et al., 1985) und reguliert maßgeblich das Überleben von reifen, d.h. postmitotischen Neutrophilen. (Begley CG et al., 1986)

Erst seit relativ kurzer Zeit ist bekannt, dass G-CSF und der G-CSF-Rezeptor auch neuronal exprimiert werden. (Schneider A et al., 2005) Unter den einzelnen Hirnregionen findet sich im Rattenhirn eine hohe Expressionsrate im Cortex (dort am ausgeprägtesten in den Schichten II und V), dem Hippocampus, der subventrikulären Zone (SVZ), dem Cerebellum (dort vor allem in den Purkinje-Zellen), aber auch in den Nuclei des Cerebellums und Hirnstamms sowie in den Mitralzellen des Bulbus olfactorius. Bedeutend ist in diesem Zusammenhang, dass sich korrespondierende neuronale Anfärbungsmuster auch im Hirngewebe von Menschen und Mäusen finden lassen. (Schneider A et al., 2005)

Die Expression des Liganden, G-CSF, findet sich in allen Hirnregionen, in denen der Rezeptor exprimiert wird, z. B. zeigt sich eine starke Expression im CA3-Feld des Hippocampus, dem Hilus und der subgranulären Zone des Gyrus Dentatus, in den Neuronen des entorhinalen Cortex und des Bulbus olfactorius sowie in mehreren Nuclei des Cerebellums und des Hirnstamms und in Zellen der SVZ. (Schneider A et al., 2005)

Die Funktion von G-CSF im Gehirn ist vergleichbar mit seiner Rolle im hämatopoetischen System: den programmierten Zelltod zu inhibieren und die Differenzierung neuronaler Vorläuferzellen zu stimulieren. (Schneider A et al. 2005) Über die Signaltransduktion von G-CSF an Neuronen im Rattenkortex weiß man, dass verschiedene Pathways aktiviert werden, nämlich STAT3, ERK und PI3K/AKT.

G-CSF führt auch zu einem lang anhaltenden (mindestens acht Stunden), aber gemeinhin moderaten Anstieg des STAT3-Targets bcl-xl, einem potenten antiapoptotischen Faktor in Neuronen. (Graham SH et al., 2000) Bezüglich der ERK-Familie der Kinasen ist bekannt, dass ERK 1/2, das im Zusammenhang mit sowohl pro- als auch antiapoptotischen Vorgängen in Neuronen steht (Schneider et al., 2005; Seo SR et al., 2001; Anderson CN, Tolkovsky AM, 1999), nur schwach und vorübergehend durch G-CSF aktiviert wird. Hingegen zeigte die ERK5 Kinase ein starkes und dauerhaftes Aktivierungsmuster. Das gewinnt Bedeutung im Rahmen einer Studie über die Aktivierung von ERK5, die zu vom trk-Rezeptor ausgehenden Überlebenssignalen in Neuronen führt. (Watson FL et al., 2001) Einer der potentesten antiapoptotischen Transduktions-Pathways in allen Zellen –

auch in Neuronen – ist der PI3K/Akt-Pathway. (Dudek H et al., 1997) Bei Verabreichung von G-CSF steigt die Menge von phosphoryliertem Akt bereits nach fünf Minuten stark an und bleibt für mindestens eine Stunde erhöht, was somit einer Aktivierung des Pathways entspricht. Man nimmt also an, dass G-CSF dem programmierten Zelltod über die oben beschriebenen Transduktionswege entgegenwirkt.

1.4. Neuroprotektives Potenzial bei zerebraler Ischämie

Für beide Wachstumsfaktoren, sowohl BDNF als auch G-CSF, konnte bisher überzeugend dargestellt werden, dass sie in der Akutphase nach fokaler zerebraler Ischämie neuroprotektiv wirken, was zum Beispiel zu einer bedeutenden Reduktion des Infarktvolumens bei den mit diesen Substanzen behandelten Tieren führt. (Schäbitz et al., 1997, 2000, 2003; Schneider et al., 2005; Yamashita et al., 1997; Minnerup et al., 2008)

1.4.1. Neuroprotektion durch BDNF

Offensichtlich verbessert die Applikation von BDNF nach fokaler zerebraler Ischämie in Ratten das postischämische neurologische Outcome (24h nach Ischämie gemessen). Ebenso wird das Infarktvolumen reduziert, jedoch sind signifikante Reduktionen nur in kortikalen und nicht in subkortikalen Strukturen zu finden. Ferner reduziert die Behandlung mit BDNF signifikant die Expression des pro-apoptotischen Proteins Bax in kortikalen Neuronen der Penumbra, wohingegen das anti-apoptotische Protein Bcl-2 in diesem Bereich hochreguliert wird. Die Expression von Bcl-2 wird aber auch im Kortex der Sham-operierten Kontrolltiere nach BDNF-Infusion hochreguliert. (Schäbitz et al., 2000)

Der Effekt von BDNF auf die postischämische Regulation exzitatorischer (NMDA-, AMPA-) und inhibitorischer ($GABA_A$-) Rezeptoren wurde ebenfalls untersucht. (Sommer et al., 2003) Mittels quantitativer Rezeptorautoradiographie wurde die postischämische Ligandenbindung von [^{3}H]MK-801, [^{3}H]AMPA und [^{3}H]muscimol im Ischämiebereich, der Penumbra und den korrespondierenden Bereichen der kontralateralen Hemisphäre bestimmt. Im Rahmen der Versuche wurde gezeigt, dass die experimentell verursachte transiente fokale Ischämie zu einer Reduktion der Bindung von [^{3}H]muscimol an die $GABA_A$-Rezeptoren in der kortikalen Penumbra Placebo-behandelter Ratten führt. Dieser Effekt kann durch die exogene Zufuhr von BDNF verhindert werden. Ebenso sind in der kortikalen Penumbra und in den korrespondierenden Bereichen der kontralateralen Hemisphäre reduzierte Bindungswerte für [^{3}H]MK-801 und [^{3}H]AMPA, also den

Liganden für den NMDA- und AMPA-Rezeptor, zu finden. Das legt natürlich die Annahme nahe, dass der neuroprotektive Effekt des BDNFs in der kortikalen Penumbra zumindest teilweise über die Aufrechterhaltung der inhibitorischen Aktivität das GABAergen Systems vermittelt wird. (Sommer C et al., 2003)

Zwei weitere Aspekte zum neuroprotektiven Potenzial von BDNF verdeutlichten Schäbitz et al. 2007. In der tierexperimentellen Studie wurde gezeigt, dass das sensomotorische Defizit im Tiermodell der photothrombotischen Ischämie unter BDNF-Behandlung deutlich geringer ausfällt (Messzeitpunkte 2, 3, 4, 5 und 6 Wochen nach Ischämieereignis). Untersucht wurde ebenfalls die postischämische Auswirkung von BDNF auf die Neurogenese im Kortex, nachdem bereits nachgewiesen wurde, dass die Neurogenese in vivo bei unversehrten, gesunden Tieren durch BDNF induziert werden kann. (Pencea V et al., 2001; Zigova T et al., 1998 ; Benraiss A et al., 2001; Scharfman H et al., 2005)

Es ergaben sich folgende Resultate: 1. Ischämie im Cortex stimuliert neuronale Vorläuferzellen aus der SVZ hin zur Läsionsstelle, BDNF alleine nicht. 2. BDNF erhöht nach Läsion des Cortex die Migration von Vorläuferzellen aus der SVZ ins ipsilaterale Striatum. 3. Neurogenesis wird nach kortikalem Stroke durch BDNF-Applikation im Hippocampus erhöht. (Schäbitz WR et al., 2007)

Eine interessante Studie im Zusammenhang mit der aktuellen Fragestellung dieser Arbeit ist ein Experiment von Müller et al. 2008, in der die Langzeitauswirkungen von BDNF im Vergleich mit FAU (forced arm use) nach photothrombotischer Ischämie dargestellt wurden.

In einem Teil der Arbeit wurde untersucht, wann der optimale postischämische Zeitpunkt für den Beginn von FAU wäre, nachdem man Untersuchungen vorliegen hat, in denen gezeigt wurde, dass FAU das motorische Outcome postischämisch verbessern könnte (Taub E et al., 2002), ein zu früher Beginn der Therapie das klinische Outcome allerdings verschlechtern würde. (Humm JL et al., 1998; Risedal A et al., 1999) Der andere Teil der Arbeit von Müller et al. untersuchte den Zusammenhang von klinischem Outcome in BDNF- versus FAU-behandelten Ratten und der Rezeptordichte exzitatorischer Glutamat- und inhibitorischer $GABA_A$-Rezeptoren. Hier lag die bereits weiter oben ausgeführte Annahme zu Grunde, dass postischämische Defizite und die Erholungsphase durch das veränderte Gleichgewicht zwischen exzitatorischen und inhibitorischen Neurotransmitter-Rezeptoren beeinflusst werden. (Jolkkonen J et al., 2003) Die Rezeptordichte wurde mittels Rezeptorautoradiographie 3 und 6 Wochen nach Ischämie bestimmt. Für FAU

fand man, dass es in der postischämischen Erholungsphase (funktionelle Tests – NSS, Beam-Balance-Test, Rotarod-Test, Adhesive-Removal-Test -wurden durchgeführt vor, 3, 4, 5 und 6 Wochen nach Ischämie) keinen vorteilhaften Einfluss hat. Der Benefit von BDNF für die regenerativen Prozesse wurde nochmals überzeugend belegt. Mit einer Ausnahme im Adhesive-Removal-Test schnitten die Tiere der BDNF-Gruppe zu allen postischämischen Messzeitpunkten (3, 4, 5 und 6 Wochen nach Ischämie) in den Tests am besten ab Es konnte außerdem mittels der Rezeptorautoradiographie gezeigt werden, dass das bessere klinische / funktionelle Outcome der BDNF-behandelten Tiere mit einer zeitgleichen periläsionalen Hochregulation der NMDA- und AMPA-Rezeptoren einhergeht, was die Messung zum Zeitpunkt 3 Wochen nach Ischämieereignis anbelangte. Interessanterweise kam es aber zum Messzeitpunkt 6 Wochen nach Ischämie zu einer signifikanten Abnahme der NMDA-Rezeptorbindungsdichte im Periläsionssaum. Das legte die Hypothese nahe, dass der Benefit durch postischämischen Anstieg der exzitatorischen Neurotransmission zeitlich begrenzt ist. (Müller HD et al., 2008)

1.4.2. Neuroprotektion durch G-CSF

Die neuroprotektive Wirkung von G-CSF nach zerebraler Ischämie wurde bereits anhand verschiedener Experimente demonstriert. (Schäbitz et al., 2003) So reduziert G-CSF in Zellkulturen von Granulazellen des Cerebellums den exzitotoxischen Effekt von Glutamat. Zum anderen wird durch G-CSF das Infarktvolumen zeitnah nach fokaler Ischämie signifikant reduziert. Außerdem kommt es nach Gabe von G-CSF in der Penumbra der Infarktregion zu einer erhöhten Expression des STAT3-Proteins, welches antiapoptotisch über die Aktivierung von bcl-2 wirkt. (Schäbitz et al., 2003)

Hinsichtlich der bedeutenden Rolle, die der GABA-Rezeptor in der Akutphase nach ischämischem Insult einnimmt, wurde der Einfluss von G-CSF auf den $GABA_A$-Rezeptor untersucht. Es zeigte sich, dass G-CSF signifikant die Herunterregulation von $GABA_A$-Rezeptoren in der ischämischen Penumbra verhindert. (Müller et al., 2003)

Es ist ebenso bemerkenswert, dass bereits durch den ischämischen Stimulus selbst eine Hochregulation sowohl des G-CSF-Rezeptors als auch des Liganden G-CSF stattfindet. Ebenso wurde durch Zugabe Apoptose-induzierender bzw. –stimulierender Substanzen wie Camptothecin oder NO die anti-apoptotische Wirkung des G-CSFs untersucht und belegt. Desweiteren ließ sich in vitro veranschaulichen, dass G-CSF eine funktionelle Rolle bei der Regulation der Differenzierung von adulten neuralen Stammzellen spielt. In vivo ließ sich die G-CSF-getriggerte Stimulierung neuronaler Vorläuferzellen

veranschaulichen. Daneben wurde für G-CSF behandelte Ratten ein besseres sensorimotorisches Outcome bei tierexperimentellen Tests (NSS, Beam Balance Test, Rotarod and adhesive tape removal test) sechs Wochen nach ischämischem Stimulus gefunden. (Schneider A et al., 2005) Eine zwischenzeitlich publizierte Metaanalyse zum neuroprotektiven Effekt von G-CSF bei experimenteller Ischämie belegt eindrücklich das therapeutische Potenzial dieser Substanz. (Minnerup et al., 2008)

1.5. Postischämisch untersuchte Neurotransmitterrezeptoren und ihre Untereinheiten

1.5.1. Glutamaterge Rezeptoren

L-Glutamat ist der häufigste exzitatorische Neurotransmitter im ZNS von Säugetieren. Er kann eine Vielzahl ionotroper, d.h. Liganden-regulierter Ionenkanäle, und metabotroper, d.h. G-Protein-gekoppelter, Rezeptoren aktivieren. Die *metabotropen* Glutamat-Rezeptoren bestehen aus einer Gruppe von acht Rezeptorsubtypen (mGluR 1 – 8), die entsprechend ihrer Sequenz, Aktivierung von second messenger-Systemen und der Pharmakologie in drei Gruppen eingeteilt werden. Bei den *ionotropen* Glutamat-Rezeptoren gibt es drei Haupttypen, die benannt wurden nach den Agonisten, die ursprünglich dazu dienten, die Rezeptoren selektiv zu aktivieren: N-methyl-D-aspartate (NMDA)-, α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoazole-propionic acid (AMPA)- und 2-carboxy-3-carboxymethyl-4-isopropenylpyrrolidine (kainate)- Rezeptoren.

1.5.1.1. NMDA-Rezeptor

Der NMDA-Rezeptor spielt eine zentrale Rolle bei einer Vielzahl neuronaler Prozesse, so z.B. der LTP und LTD, dem Lernen und Gedächtnis, der neuronalen Differenzierung, der Neurodegeneration sowie der Motorik. (Villmann C et al., 2007; Hardingham GE, Bading H, 2003; Monaghan DT et al., 1998; Sheng M, Kim MJ, 2002)

Die NMDA-Rezeptor-Familie besteht aus sieben Untereinheiten: NR1, NR2A – D, NR3A und B. Der NMDA-Rezeptor ist ein Hetero-Tetramer, das aus zwei Untereinheits-Paaren – Dimeren - besteht. (Schorge S, Colquhoun D, 2003; Mayer ML, Armstrong N, 2004). Ein funktionstüchtiger NMDA-Rezeptor besteht aus zwei NR1-Untereinheiten und mindestens einer NR2-Untereinheit. Die verschiedenen Untereinheiten besitzen ein extrazelluläres Aminoende mit einem S1-Abschnitt sowie 4 hydrophobe Abschnitte (M1-M4), von denen 3 Segmente (M1, M3 und M4) eine transmembrane Lokalisation haben.

Zwischen den Segmenten M3 und M4 befindet sich eine extrazelluläre Schleifenregion (S2-Segment) und das intrazelluläre Carboxylende der Untereinheiten reicht in das Zellinnere (Qian A, Johnson JW, 2002).

Das Vorkommen der verschiedenen Untereinheiten ist sowohl von der Hirnregion, als auch von den unterschiedlichen Neuronentypen abhängig (Küppenbender KD et al., 2000; Mori H, Mishina M, 1995): die Expression der NR2- und NR3-Untereinheiten ist im Hirn von Säugetieren spezifischen Lokalisationen zugeordnet und von der zeitlichen Entwicklung abhängig. (Watanabe M et al., 1992; Monyer H et al., 1992; Sheng M et al., 1994; Zhong J et al., 1995; Wenzel A et al., 1997) Zur Verteilung der Untereinheiten im Gehirn: sowohl im Hirn von Nagetieren als auch von Menschen sind NR2A und NR2B die prädominant exprimierten Untereinheiten im Vorderhirn, während sich NR2C zum größten Teil in zerebellären Nervenzellen und in mehreren Nuclei findet. Die Expression von NR2D beschränkt sich weitgehend auf das Dienzephalon und das Mittelhirn und ist ausgeprägter in der frühen Entwicklungsphase. (Kutsuwada T et al., 1992; Monyer H et al., 1992, 1994; Ishii T et al., 1993) Die NR3-Untereinheiten zeigen eine ebenfalls räumlich und zeitlich begrenzte Verteilung. NR3A wird überwiegend während der Hirnentwicklung exprimiert, aber auch bei bestimmten Neuronenpopulationen im Erwachsenen. Die NR3B - Untereinheit ist vor allem begrenzt auf somatische Motoneuronen des Hirnstamms und des Rückenmarks. (Nishi M et al., 2001) Die NR3-Untereinheiten können in der Kombination mit NR1 oder NR2 alleine (d.h. Rezeptoren bestehend aus NR1/NR3 oder NR2/NR3) keinen funktionstüchtigen NMDA-Rezeptor bilden. In Kombination mit sowohl NR1-Untereinheiten als auch NR2-Untereinheiten (d.h. Rezeptoren bestehend aus NR1/NR2/NR3) setzt die NR3-Untereinheit den NMDA-Kanal-typischen Leitwert und die Ca^{2+} - Permeabilität in Relation zu Rezeptoren herab, die nur aus NR1/NR2-Untereinheiten bestehen. (Ciabarra AM et al., 1995; Nishi M et al., 2001; Matsuda K et al., 2002; Sasaki YF et al., 2002) Man weiß, dass es in Mäusen, denen die NR3A-Untereinheit fehlt, zu vermehrten NMDA-vermittelten Prozessen und erhöhter Dichte an Dornfortsätzen kortikaler Neuronen kommt. (Das S et al., 1998) NMDA-Rezeptoren bestehen also aus der NR1-Untereinheit in Kombination mit einer oder mehreren NR2-Untereinheiten oder aus NR1 kombiniert mit NR2- und NR3-Untereinheiten.

Nach heutigem Kenntnisstand werden NMDA-Rezeptoren erst durch die Bindung von 2 Glutamatmolekülen an die NR2–Untereinheiten eines Rezeptors aktiviert. (Danysz W, Parsons CG, 1998) An den NMDA-Rezeptor müssen zusätzlich zum Glutamat 2 Moleküle

des Ko-Agonisten Glycin an eine NR1-Untereinheit binden, um eine Ionenkanal-Öffnung zu initiieren.

Der Ionenkanal wird von allen Untereinheiten des NMDA-Rezeptors gebildet und deren M2-Region scheint hauptverantwortlich für dessen Eigenschaften zu sein. (Mori H, Mishina M, 1995) Der Ionenkanal des NMDA-Rezeptors ist an der nicht-depolarisierten Membran durch Mg^{2+}-Ionen blockiert. (Danysz W et al., 1995; Magnusson KR, 1998) Weitere NMDA-Rezeptor-Bindungsstellen sind für Polyamine, Ifenprodil, Protonen, Redoxreagenten und Zn^{2+}-Ionen bekannt. (Kemp JA, McKernan RM, 2002; Magnusson KR, 1998) Zn^{2+}-Ionen stellen potente und selektive Inhibitoren der NR2A-Untereinheiten dar, in höheren Konzentrationen weitet sich diese Eigenschaft auch auf die NR2B- und NR2C-Untereinheiten aus. (Monaghan DT et al., 1998) Protonen haben einen inhibitorischen Einfluss, Redoxreagenten (wie z.B. das Dithiotreitol) einen potenzierenden Einfluss auf die NMDA-Rezeptoren. (Mori H, Mishina M, 1995)

Zur Funktion des NMDA-Rezeptors: in physiologischen Mg^{2+}-Konzentrationen wird der Ionenkanal des NMDA-Rezeptors blockiert. Diese Blockade kann nur durch eine vorangegangene partielle Depolarisation der Zellmembran, z.B. durch die Aktivierung von AMPA-Rezeptoren, aufgehoben werden. Erst dann führt die Bindung des Glutamats und des Ko-Agonisten Glycins über eine Konformationsänderung des Ionenkanals zum Einstrom von Na^{+}- und Ca^{2+}-Ionen in die Zelle mit der Folge einer Depolarisation der Zellmembran und einer Ca^{2+}-bedingten Aktivierung intrazellulärer Enzyme, wie der Phospholipase C, Phospholipase A2, Kinase C und NOS. (Hardingham GE, Bading H, 2003; Mori H, Mishina M, 1995; Qian A, Johnson JW, 2002) Die NMDA-Rezeptor-vermittelte Neurotransmission ist relativ langsam und lang anhaltend. (Ozawa S et al., 1998) Über einen Ca^{2+}-Calmodulin-gekoppelten Prozess kann die NOS aktiviert werden, welche zur NO-Freisetzung führt. (Bogdanov MB, Wurtman RJ, 1997) Über diesen Mechanismus erfolgt ein Großteil der Wirkung der NMDA-Rezeptoren auf andere Neurotransmittersysteme. So wird davon ausgegangen, dass über NO die striatale Dopamin-, Glutamat- und Acetylcholinfreisetzung erhöht wird. (Bogdanov MB, Wurtman RJ, 1997; Buchholzer ML, Klein J, 2002; West AR, Galloway MP, 1997b) Unter pathologischen Bedingungen kann NO mit entstandenen Superoxiden das hochneurotoxische Peroxynitrit bilden. (Deckel AW et al., 2002) Eine Überaktivierung von NMDA-Rezeptoren kann über Erhöhung des intrazellulären Ca^{2+}-Spiegels in Nervenzellen zu einer Depolarisation von Mitochondrienmembranen und zum Zelltod führen. (Hardingham GE, Bading H, 2003)

1.5.1.2. Die NR1-Untereinheit des NMDA-Rezeptors

Wie bereits erwähnt (s.o.) wurde in den experimentellen Untersuchungen dieser Arbeit die NR1-Untereinheit des NMDA-Rezeptors immunhistochemisch detektiert. Zum einen kommt die NR1-Untereinheit als obligater Bestandteil der NMDA-Rezeptoren ubiquitär im Gehirn vor. Zum anderen wird sie außer im adulten Gehirn auch besonders stark in der frühen Entwicklungsphase und während der Maturationsprozesse von Neuronen exprimiert, (Pujic Z et al., 1993) was sie im Hinblick auf die Fragestellung, die auf die Regulation von Neurotransmitter-Rezeptoren in der Regenerationsphase nach ischämischem Insult fokussiert, besonders attraktiv erscheinen lässt.

1.5.1.3. AMPA-Rezeptor

AMPA-Rezeptoren vermitteln schnelle synaptische Transmissionen an exzitatorischen Synapsen im ZNS und sind äußerst wichtig bei der neuronalen Entwicklung, synaptischer Plastizität und strukturellen Veränderungen. In allen Gehirnregionen von Säugetieren sind Untereinheiten des AMPA-Rezeptors in unterschiedlicher Zusammensetzung und Verbreitung lokalisiert (Beneyto M, Meador- Woodruff JH, 2004; Bernard V et al., 1997). Die AMPA-Rezeptoren gelten als therapeutische Zielstruktur für verschiedene neurologische Erkrankungen, wie etwa Epilepsie, Demenz, Alzheimer'sche Krankheit, Schizophrenie und motorische Störungen (Franciosi S, 2001; Lees GJ, 2000).

Außerdem sind AMPA-Rezeptoren, denen die GluR2-Untereinheit fehlt, für Ca^{2+} und Zn^{2+} durchlässig. Eine verminderte Expression der GluR2-Untereinheit kann zum Untergang von Nervenzellen führen (Pellegrini-Giampietro DE et al., 1997) Die Untereinheiten-Zusammensetzung und die Ca^{2+}-Durchlässigkeit der AMPA-Rezeptoren sind nicht statisch. Sie werden Zell- und Synapsenspezfisch während der Entwicklung und als Antwort auf neuronale Aktivität, sensorische Erfahrungen und neuronale Schädigung dynamisch ummodelliert (Liu SJ et al., 2007).

AMPA-Rezeptoren sind Membranglykoproteine, die aus einer Familie von vier Untereinheiten bestehen (GluR1 – 4, auch GluRA - D), die sich zu tetrameren Komplexen zusammenlagern. (Rosenmund C et al., 1998) Anders als NMDA-Rezeptoren sind AMPA-Rezeptoren auch funktionsfähig, wenn sie aus vier gleichen Untereinheiten aufgebaut sind. (Hennegriff M et al., 1997). Ihrer Struktur nach besitzen die AMPA-Rezeptor-Untereinheiten drei Transmembran-Domänen (M1, M3 und M4) und eine zum Zytoplasma geöffnete, in die Membran ein- und wieder austretende Schleife (M2). Der N-Terminus liegt extra-, der C-Terminus intrazellulär. Am Zelläußeren mit den

Transmembrandomänen verknüpft bestehen zudem zwei Liganden-bindende Domänen (S1 und S2). (Dingledine R et al., 1999).

Charakteristisch und funktionell bedeutend ist vor allem die sog. Q/R-Region des M2-Segmentes, die die Ca^{2+}-Permeabilität von AMPA-Rezeptoren determiniert. In Rezeptoren, in denen die GluR2-Untereinheit nicht exprimiert wird, zeigen sich in den AMPA-Rezeptor-vermittelten Strömen stark rektifizierende Strom-Spannungskurven (Bowie D, Mayer ML, 1995).

Die Verteilung der AMPA-Rezeptor-Untereinheiten variiert regional sehr und hängt von den Neuronentypen ab. (Beneyto M, Meador- Woodruff JH, 2004) Legt man die Western-Blot-Untersuchungen an Rattenhirnen von Fitzgerald LW et al., 1995 zu Grunde, dann findet man sowohl die GluR1- als auch die GluR2-Untereinheit in allen Hirnregionen mit Ausnahme von Thalamus, Hypothalamus, Pons / Medulla und der Substantia nigra. Im Neostriatum von Ratten wurde hingegen eine Verteilung der Untereinheiten GluR1 – 4 abhängig von den Neuronentypen (Projektionsneurone / Interneurone, differenziert in PV^+-, cholinerge und NOS^+- Interneurone) gefunden. (Küppenbender KD et al., 2000, Bernard V et al., 1997)

1.5.1.4. Die GluR1-Untereinheit des AMPA-Rezeptors

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die postischämische Regulation der GluR1-Untereinheit des AMPA-Rezeptors immunhistochemisch detektiert. Zum einen ist die GluR1-Untereinheit im Rattenhirn physiologischerweise in den untersuchten Hirnregionen (Hippocampus, Cortex) zu finden, (Rogers SW et al., 1991) was als Referenz hilfreich für die Auswertung der Hirnschnitte von Ischämiegeschädigten und mit Wachstumsfaktoren behandelten Ratten im Rahmen dieser Arbeit war. Auf der anderen Seite bilden sich speziell GluR1-Cluster an der Zellmembran von Zellkörpern und Dendriten sich entwickelnder Neurone, (Martin LJ et al., 1998) was diese Untereinheit bei der Untersuchung postischämischer Regenerationsvorgänge besonders interessant erscheinen lässt.

1.5.2. GABAerge Rezeptoren

GABA oder γ-Aminobuttersäure ist der häufigste im Hirn vorkommende inhibitorische Neurotransmitter. Die Rezeptorengruppe, die GABA bindet, ist sehr vielgestaltig. Es gibt ionotrope ($GABA_A$ und $GABA_C$) und metabotrope GABA-Rezeptoren ($GABA_B$).

1.5.2.1. $GABA_A$-Rezeptor

Der $GABA_A$-Rezeptor findet sich sehr häufig im Gehirn von Säugetieren und zeigt unterschiedliche topographische Verteilungsmuster. (de Blas AL et al., 1988) Der Rezeptor ist ein pentamerer, Liganden-regulierter Chlorid-Kanal. (MacDonald RL et al., 1994) Er hat fünf Hauptbindungsstellen für GABA, Benzodiazepine, Barbiturate, Steroide und Picrotoxin (Sieghart W, 1995; Smith GB, Olsen RW, 1995) und gehört zu einer Superfamilie von Liganden-regulierten, ionotropen Rezeptoren, zu der beispielsweise auch der Nikotin-Acetylcholin-Rezeptor gehört. (Schofield PR et al., 1987) Bei Säugetieren konnten sieben Klassen von Untereinheiten identifiziert werden, wobei die meisten Untereinheiten mehrere Isoformen besitzen: α1-6, β1-4, γ1-3, δ, ε, θ, and ρ1-2. (MacDonald RL et al., 1994; Sieghart W, 1995) Die Untereinheiten von einer (α) oder zwei Klassen (α und β) können bereits unter experimentellen Bedingungen einen funktionierenden GABA-Rezeptor bilden. Allerdings werden Untereinheiten von wenigstens drei Klassen (entweder $\gamma_{1\text{-}3}$-, δ-, ε-, π- oder θ-Untereinheiten) für die vollständige Rezeptorfunktion benötigt. (Whiting PJ, 1999; Bowery NG et al., 2002)

Die Verteilungsmuster der $GABA_A$-Rezeptor-Untereinheiten sind sehr unterschiedlich: von ubiquitär (α1) bis zu lokal sehr begrenzt (wie die α6-Untereinheit, die normalerweise nur in Körnerzellen des Cerebellums und dem Nucleus cochlearis gefunden wurde). (Kato K, 1990, Varecka L et al., 1994) Einige Neuronenpopulationen exprimieren eine große Anzahl verschiedener Untereinheiten. So werden im Neocortex, Hippocampus und Putamen komplexe Expressionsmuster gefunden, was darauf hindeutet, das diese Hirnareale wahrscheinlich eine große Vielfalt an $GABA_A$-Rezeptoren aufweist. In vielen Arealen findet sich eine Ko-Expression von α1, β2, beides Untereinheiten, die neben der γ1-Untereinheit die häufigste Isoform des Rezeptors bilden. (Wisden W et al., 1992) Die Kombination von α1 und β2 ist sehr ausgeprägt im Bulbus olfactorius, dem Globus pallidus, Colliculus inferior, der Pars Reticulata der Substantia nigra, dem subthalamische Nucleus, im Septum mediale und dem Cerebellum. Häufig findet sich auch eine Ko-Lokalisation von α2 und β3 wie z.B. in der Amygdala und dem Hypothalamus. (Wisden W et al., 1992)

Für die Aktivierung des $GABA_A$-Rezeptors, d.h. genau genommen für die Öffnung des Chloridkanals, ist die GABA-Bindungsstelle zuständig. Es ist schon lange bekannt, dass es eine Vielzahl von Agonisten gibt, die eine dem GABA entsprechende Wirkung haben (z.B. Muscimol). Die Bindung von GABA am Rezeptor führt zu einer Erhöhung der Membranleitfähigkeit, was einhergeht mit einer Membranhyperpolarisation, die zu einer

neuronalen Inhibition führt. Ausgelöst wird die Reduktion des Membranwiderstands durch den von GABA abhängigen Cl^-Influx durch den Rezeptor-assoziierten Kanal.
Elektrophysiologische Untersuchungen haben gezeigt, dass es am $GABA_A$-Rezeptor-Komplex zwei Bindungs- bzw. Erkennungsstellen für GABA geben muss. Ein Anstieg der GABA-Konzentration führt zu einer Verlängerung der Öffnung des Chloridkanals, was man auf die Besetzung zweier Bindungsstellen zurückführt. (DeLorey TM, Olsen RW, 1992)
Wird im Gehirn GABA freigesetzt bzw. ein Wirkstoff mit GABA-Wirkung zugeführt, so führt dies an der postsynaptischen Membran zu einer neuronalen Inhibition. Man bezeichnet das als IPSP (inhibitorisches postsynaptisches Potenzial). IPSPs sind wesentlich an der Feinabstimmung neuronaler Aktivitäten beteiligt und verhindern, z.B. in Stresssituationen, ein Entgleiten der neuronalen Aktivität. Insofern ist das Augenmerk auf dem GABA-Rezeptor im Allgemeinen und den $GABA_A$-Rezeptor im Speziellen ein wichtiger Ansatzpunkt in der Schlaganfall- oder Epilepsieforschung.

1.5.2.2. Die α2-Untereinheit des $GABA_A$-Rezeptors

Die α2-Untereinheit ist eine für den $GABA_A$-Rezeptor in Hippocampus und Cortex repräsentative Untereinheit. (Wisden et al., 1992) Darüber hinaus konnte in einer Untersuchung zur Kinetik der $GABA_A$-Untereinheiten-Verteilung während der Hirnmaturation (Yu Zy et al., 2006) bei Wistar-Ratten gezeigt werden, dass die α2-Untereinheit (neben der α5-Untereinheit) in den ersten post-natalen Tagen außerordentlich stark im Cortex exprimiert wird. In den darauf folgenden Wochen nahm die Expression anderer Untereinheiten zu (α1, α2, α3, γ2) während die der α5-Untereinheit abnahm. Nach drei Monaten fand sich eine zunehmende Herunterregulation der α3-, α5- und γ2-Untereinheiten, wo hingegen die α1- und α2-Untereinheiten im Cortex auf einem stabil hohen Expressionslevel blieben. Daher bietet die α2-Untereinheit zwei wesentliche Kriterien für den Untersuchungsgegenstand dieser Arbeit (Repräsentativität und Expression in der frühen Maturationsphase von Neuronen).

1.6. Postischämisch untersuchte neuronale Marker der Hirnplastizität

In der vorliegenden Arbeit wurden neben den oben aufgeführten Neurotransmitterrezeptor-Untereinheiten, ebenso MAP1B, MAP2 und Synaptophysin als molekulare Marker für neuronale und synaptische Plastizität untersucht.

1.6.1. Mikrotubuli-assoziierte Proteine

MAPs – Mikrotubulus-assoziierte Proteine – sind Proteine, die die Mikrotubuli als Bestandteil des Zystoskeletts einer Zelle stabilisieren. Das Zytoskelett ist für die Form der Zellen, für die Bewegung, für Materialtransport, für Zellteilung und Zelldifferenzierung verantwortlich. Es besteht aus drei Fasersystemen: den Aktinfilamenten, den Intermediärfilamenten und den Mikrotubuli. Diese Fasern können sich aus Protein-Untereinheiten selbständig auf- und wieder abbauen, d. h. sie sind dynamisch und haben die Fähigkeit der „Selbstorganisation“. Hinzu kommen zahlreiche Proteine, die an die Fasern andocken, Fasern miteinander verbinden oder Verbindungen mit anderen Zellkomponenten, z. B. der äußeren Zellmembran oder der Kernmembran, herstellen können. Ein bekanntes Beispiel für das Zusammenspiel verschiedener Zytoskelett-Proteine ist die Zellteilung; dabei bilden Mikrotubuli einen Spindelapparat aus, der die Chromosomen mithilfe von Motorproteinen auseinanderziehen kann. Bei den Nervenzellen stellen Mikrotubuli die „Gleise“ für den Transport in den Zellfortsätzen (Axone, Dendriten) dar, wo Lasten über weite Entfernungen zu den Nervenendigungen (Synapsen) geliefert werden müssen. (Mandelkow, E, Mandelkow E-M, 1995)

Die strukturellen MAPs fördern die Tubulin-Polymerisation und tragen zur Stabilisierung der Mikrotubuli bei (Murphy et al., 1975). Die ursprüngliche Einteilung der MAPs erfolgte in zwei Gruppen. Nach ihrem Molekulargewicht wurden sie in MAPs mit niedrigem Molekulargewicht (von 50 bis 70 kDa) und MAPs mit hohem Molekulargewicht (über 200 kDa) eingeteilt. In die Gruppe der hochmolekularen MAPs gehören MAP1, MAP2 und MAP4 mit Molekulargewichten von 330 kDa, 280 kDa, und 190-210 kDa, die in der Reihenfolge ihrer Entdeckung benannt wurden.

1.6.1.1. MAP1B

Mikrotubulus-assoziiertes Protein 1B, MAP1B, wurde ursprünglich als 320 kDa großes Protein identifiziert. (Greene et al., 1983) MAP1B wird im Gehirn während der Frühphase der postnatalen Entwicklung am stärksten exprimiert. (Schoenfeld et al., 1989) Es besteht aus zwei Isoformen, die sich aus unterschiedlicher Phosphorylierung ergeben. (Ma et al., 1997) Die Translation der mRNA von MAP1B führt zur Bildung eines Polyproteins, das anschließend in zwei Proteine gespalten wird, bestehend aus der NH_2-terminalen Domäne mit 2200 Aminosäuren, welche als schwere Kette, und der COOH-terminalen Domäne mit 250 Aminosäuren, die als leichte Kette von MAP1B bezeichnet wird. (Hammarback et al., 1991) Die genaue Stelle, an der das Polyprotein getrennt wird, ist nicht bekannt,

wurde aber auf einen Bereich von ca. 20 Aminosäuren eingegrenzt. Schwere und leichte Kette bilden einen Komplex. Die Bindungsstelle für die leichte Kette wurde auf einem 120 kDA großen Bereich gefunden, der die NH_2-terminale Hälfte der schweren Kette umfasst.

Beim Erwachsenen bleibt die Expression von MAP1B in den Hirnregionen erhöht, in denen eine hohe Aktivität bei axonalem Wachstum und synaptischer Plastizität beibehalten wird. (Tucker et al., 1989) Eine genaue immunhistochemische Analyse ergab, dass MAP1B in Axonen, Zellkörpern und den Dendriten von Neuronen und Gliazellen vorhanden ist. (Bloom et al., 1985) Immunelektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten, dass MAP1B ein Bestandteil der Mikrotubulus-assoziierten fibrillären Matrix von Axonen ist (Hirokawa et al., 1985) Mittels für phosphoryliertes MAP1B spezifischen monoklonalen Antikörpern konnte dargestellt werden, dass das Protein abhängig von seiner Expression in Neuronen oder Gliazellen, seiner subzellulären Lokalisation und der Entwicklungsphase an verschiedenen Stellen unterschiedlich phosphoryliert wird. (Sato-Yoshitake et al., 1989; Harrison et al., 1993) Offensichtlich fanden sich auch hohe MAP1B-Konzentrationen in den distalen Axonen sich differenzierender Neuronen in Zellkulturen. (Black et al., 1994)

Im Hinblick auf diese Studienergebnisse besteht also die Annahme, dass das Protein MAPIB bei der neuronalen Differenzierung beteiligt ist und die Mikrotubuli-Dynamik wachsender Axone reguliert.

1.6.1.2. MAP2

Mikrotubulus-assoziiertes Protein 2, MAP2, ist eines der wichtigsten Proteine des Zytoskeletts von Neuronen. Radioimmunoassays einer Vielzahl von Gewebeproben ergaben, dass nur Hirngewebe signifikante Mengen von MAP2 enthält. (Izant et al., 1980)

Es ist selektiv lokalisiert im somatodendritischen Kompartiment von Neuronen (Caceres et al., 1984), wo es sowohl polymerisiertes Tubulin stabilisiert als auch die Anordnung von Mikrotubuli und die Verknüpfung von Aktinfilamenten reguliert. MAP2 gilt als verlässlicher Marker der strukturellen Integrität von Neuronen, da es beiträgt zur morphologischen Stabilisation dendritischer Prozesse. (Tucker RP, 1990)

MAP2 ist ein thermostabiles Fadenmolekül. Mittels begrenzter Proteolyse werden zwei Hauptdomänen von ungefähr 30 – 40 kDa und 240 kDa erzeugt. (Aizawa et al., 1987), von denen man annimmt, dass sie jeweils die Mikrotubuli-Bindungs- und Projektionsdomäne des Moleküls darstellen. Es konnte mittels domänspezifischer

Antikörper gezeigt werden, dass die Bindungsdomäne etwa ein Drittel der Länge des Moleküls einnimmt. (Gottlieb et al., 1985) Von MAP2-Fragmenten, die die Tubulin-Bindungsdomäne enthalten, nimmt man an, dass sie auch das N-Terminal des Moleküls umfassen. (Hernandez et al., 1987) Wie MAP1 ist MAP2 ein Phosphoprotein. Es wurden mehrere verschiedene Kinasen identifiziert, die MAP2 im Gehirn in vitro phosphorylieren. Das Ausmaß der MAP2-Phosphorylierung beeinflusst die Assemblierung und Disassemblierung der Mikrotubuli in vitro. (Jameson et al., 1981; Burns et al., 1984) Extensive Phosphorylierung hemmt etwa die Bindung von MAP2 zu ausgebildeten Mikrotubuli. (Murthy et al., 1983)

Außerdem konnte man anhand von Untersuchungen am Rattenhirn nachweisen, dass sich MAP2 biochemisch im neonatalen Gewebe von der adulten Form unterscheidet. Bei letzterem ist z.B. die Stimulation der Mikrotubuli-Assemblierungsrate weniger effizient. (Francon et al., 1982)

Untersuchungen bei Wüstenrennmäusen haben gezeigt, dass es ischämiebedingt zu einer Abnahme von MAP2 im Gehirn kommt, (Yamashita et al., 1986; Kitagawa et al., 1989; Yanagihara et al., 1990; Tomimoto et al., 1992; Matesic et al., 1994) was nahe legt, dass MAP2 ischämiesensibel ist. Der Verlust von MAP2 trägt in der Akutphase zur neuronalen Dysfunktion bei. Der Ausfall der Dendritenfunktion kann bereits 1 Stunde nach zerebraler Ischämie als Frühmarker der Neurodegeneration betrachtet werden. (Dawson et al., 1996) Darüber hinaus ist MAP2 bei Neuronenwachstum, -Differenzierung und –Plastizität wichtig, da es eine Schlüsselrolle bei der neuronalen Reaktion auf Wachstumsfaktoren, Neurotransmitter, synaptische Aktivität und Neurotoxine einnimmt. (Johnson et al., 1992)

1.6.2. Synaptophysin

Synaptophysin ist ein 38 kDa großes Glykoprotein in der Membran synaptischer Vesikel von Neuronen und neuroendokriner Zellen und wird im Gehirn ubiquitär exprimiert. (Marquèze-Pouey, B et al., 1991) Das Protein besitzt vier Transmembrandomänen. Die terminalen Amino- und Carboxylgruppen sind zur zytoplasmatischen Seite der Vesikel gerichtet, wodurch die zwei Schleifen des Proteins zur luminalen Seite der Vesikel zeigen. Jeder dieser Schleifen wird durch Disulfidbrücken zwischen Cysteinresten stabilisiert. Synaptophysin kommt auf synaptischen Vesikeln in Form von homooligomeren Komplexen vor, welche durch nichtkovalente Wechselwirkungen zwischen den Untereinheiten gebildet werden. (Thomas et al., 1988) Durch chemische Quervernetzung in intakten Zellen konnten Komplexe aus bis zu vier Untereinheiten gefunden werden.

(Johnston et al., 1990) Dieses für die synaptischen Vesikel essentielle Protein ermöglicht in sich entwickelnden Synapsen eine individuelle Anpassung an erhöhte und verminderte Transmitterfreisetzung.

In Studien zur Synaptogenese wird Synaptophysin als präsynaptisch lokalisiertes Vesikelprotein häufig als Marker verwendet. Da man annimmt, dass die Synaptophysinmengen in Nervenendigungen konstant bleiben (Südhof TC et al., 1991), kann man sie idealerweise zur Quantifizierung der Anzahl von Nervenendigungen heranziehen. (Masliah et al., 1991, LeClerc et al., 1989) Offensichtlich scheint die Akkumulation des Proteins z.B. in der postnatalen Entwicklung von Mäusegehirnen mit der Synaptogenese korreliert zu sein. (Knaus P. et al., 1986) Man weiß auch, dass der Verlust von Synapsen bei der Alzheimer-Erkrankung und anderen Demenz-Störungen zum Teil bedingt ist durch den Verlust von Synaptophysin in der Membran präsynaptischer Vesikel. (Morrison JH, 2003)

1.7. Fragestellung

Obwohl sich gezeigt hat, dass sich die Vorgänge in der chronischen Phase nach einem hirnischämischen Ereignis von denen in der Akutphase völlig unterscheiden können, wurden bislang nur wenige Studien durchgeführt, die die Langzeit-Regulation und Modulation der Zusammensetzung exzitatorischer und inhibitorischer Neurotransmitter untersucht hätten.

Da sowohl BDNF wie auch G-CSF die Neuroregeneration und das funktionelle Outcome in der Reorganisationsphase nach Apoplex signifikant verbessern (Schäbitz et al., 2004; Müller et al., 2008; Schneider et al., 2005), lag die Frage nahe ob diese Vorgänge auf molekularer Ebene auch durch Modifikationen exzitatorischer und inhibitorischer Neurotransmitter-Rezeptoren reflektiert werden. Wir analysierten daher die postischämische Proteinexpression repräsentativer Untereinheiten der NMDA-, AMPA- und $GABA_A$-Rezeptoren sechs Wochen nach photothrombotischer Ischämie mit Antikörper gegen die NR1-, GluR1- und α2-Untereinheiten. Darüber hinaus untersuchten wir die postischämische Proteinexpression von MAP1B, MAP2 und Synaptophysin um mögliche Unterschiede bei der Proteinexpression dieser Plastizitäts-assoziierten Moleküle nach unterschiedlicher Behandlung herausarbeiten zu können, die möglicherweise unterschiedliche Pathways reflektieren, die durch diese Moleküle aktiviert werden.

2. Material und Methoden

2.1. Tiermodell

Die Experimente wurden an erwachsenen männlichen Wistar Ratten mit einem Gewicht von 280 bis 320gr wie bereits in früheren Arbeiten beschrieben (Schäbitz et al., 2007; Schneider et al., 2005) durchgeführt und Schnitte dieser Rattenhirne für die vorliegende Studie verwendet. Alle Tierversuche fanden in Übereinstimmung mit nationalen und internationalen Vorschriften zum Tierschutz statt und wurden von einer lokalen Ethikkommission geprüft und genehmigt.

Die Tiere wurden randomisiert und in folgende Untesuchungsgruppen eingeteilt: A (Kontrollgruppe, n = 6), Ischämie, Behandlung mit 0,5ml 0,9%iger Kochsalzlösung als i.v.-Bolusinfusion, Behandlungsbeginn 1h nach Ischämieereignis; B (BDNF-Gruppe, n = 6), Ischämie, Behandlung mit 20µg BDNF in 0,5ml 0,9%iger Kochsalzlösung als i.v.-Bolusinfusion, Behandlungsbeginn 1h nach Ischämieereignis; C (GCSF-Gruppe, n = 6), Ischämie, Behandlung mit 15µg GCSF in 0,5ml 0,9%iger Kochsalzlösung als i.v.-Bolusinfusion, Behandlungsbeginn 1h nach Ischämieereignis; D (Sham operierte Gruppe, n = 6), Sham-Operation ohne Ischämie, Behandlung mit 0,5ml 0,9%iger Kochsalzlösung als i.v.-Bolusinfusio, Behandlungsbeginn 1h nach Sham-OP; E (Sham operierte und mit BDNF behandelte Gruppe, n = 6), Sham-OP ohne Ischämie, Behandlung mit 20µg BDNF in 0,5ml 0,9%iger Kochsalzlösung als i.v.-Bolusinfusion, Behandlungsbeginn 1h nach Ischämieereignis; F (Sham operierte mit GCSF behandelte Gruppe, n = 6), Sham-OP ohne Ischämie, Behandlung mit 15µg GCSF in 0,5ml 0,9%iger Kochsalzlösung als i.v.-Bolusinfusion, Behandlungsbeginn 1h nach Ischämieereignis; G (nicht-operierte Gruppe, n = 6), Behandlung mit 0,5ml 0,9%iger Kochsalzlösung als i.v.-Bolusinfusion. Alle Tiere erhielten nachfolgend wiederholt i.v.-Bolusinfusionen am 3. und 5. Tag über die Vene am Rattenschwanz. (Gruppen A und D: Kochsalzlösung; Gruppen B und E: BDNF; Gruppen C und F: G-CSF).

2.2. Modell der photothrombotischen Ischämie

2.2.1. Prämedikation und Überwachung

Die Tiere wurden mit einer intramuskulären Injektion von 100mg/kg KG Ketaminhydrochlorid / Ketanest (WDT, Garbsen, Deutschland) und von 8mg/kg KG Xylazinhydrochlorid (Rompun) anästhesiert. Die Anästhesie wurde mit 50mg/kg

Körpergewicht Ketanest bei Bedarf aufrechterhalten. Ein PE-50 Polyethylen-Sonde wurde zum kontinuierlichen Monitoring des mittleren arteriellen Blutdruckes und der Blutgase in die rechte Femoralarterie eingeführt. In die rechte Femoralvene wurde ein PE-50-Schlauch für die zu verabreichenden Infusionen eingelegt. Während des Experiments fand ebenfalls ein Monitoring der rektalen Temperatur statt, die mit einem thermostatisch kontrollierten Heizkissen bei 37°C aufrechterhalten wurde. (Föhr Medical Instruments, Deutschland)

2.2.2. Präparation

In der vorliegenden Arbeit wurde das Modell der photochemisch induzierten fokalen Ischämie im parietalen Kortex bei männlichen Wistar-Ratten nach der Methode von Watson et al. (Watson et al., 1985) angewandt. Die Ratten wurden in einem stereotaktischen Rahmen platziert, die Kopfhaut mit einem Skalpell inzidiert und zur Seite gezogen um den Schädel frei zu legen. Ein fiberoptisches Kabel (Durchmesser 1,5 mm) wurde auf dem Schädel 4,0 mm posterior zum Bregma und 4,0mm rechts lateral von der Mittellinie positioniert. Der Schädel wurde über das fiberoptische Kabel mit einem weißen Kaltlichtstrahl (150W) für 20 min. bestrahlt. Während der ersten zwei Minuten der Bestrahlung wurde der Farbstoff Bengalrosa (0,133 ml/kg Körpergewicht, 10 mg/ml Kochsalzlösung) langsam intravenös injiziert. Die Sham-operierten Tiere durchliefen die gleichen experimentellen Schritte wie eben beschrieben, allerdings ohne Infusion des Farbstoffs Bengalrosa und ohne Bestrahlung mit dem fiberoptischen Kabel. Nach dem Eingriff wurden die Katheter entfernt, die Tiere konnten sich ausreichend von der Betäubung erholen und hatten Zugang zu Futter und Wasser ad libitum. Die Tiere wurden sechs Wochen nach dem photothrombotischen Ereignis getötet und ihre Gehirne sofort zur weiteren Verarbeitung entnommen. Die Bestimmung der Infarktvolumina wies keine statistisch signifikanten Differenzen zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen auf (Schäbitz et al, 2007; Schneider et al, 2005). In den für diese Studie verwendeten Schnitten war der kortikale Infarkt auf den medialen Teil des primären somatosensorischen Kortex begrenzt. (Abb.1)

2.3. Immunhistochemie

Die immunhistochemischen Untersuchungen wurde mit folgenden Antikörpern durchgeführt: rabbit anti-NMDAR1 (polyclonal, Verdünnung 1:100), rabbit anti-GluR1 (polyclonal, Verdünnung 1:200), rabbit anti-$GABA_A$ receptor α2 subunit (polyclonal,

Verdünnung 1:250), mouse anti-MAP1B (monoclonal, Verdünnung 1:400), mouse anti-MAP2 (monoclonal, Verdünnung 1:3000) and mouse anti-synaptophysin (monoclonal, Verdünnung 1:700). Die Hirnschnitte wurden koronar mit einer Dicke von 50 µm an einem Vibratom geschnitten und bei -20°C kryoprotektiv bis zur immunhistochemischen Verarbeitung gelagert.

Die für die einzelnen immunhistochemischen Anfärbungen verwendeten Vibratomschnitte waren in Eppendorfer Röhrchen (1,5ml) in einer CPS-Lösung (1-Liter-Ansatz: 250 ml Glycerin wasserfrei- ≥ 99%, p.a., 250 ml Ethylenglycol, 500 ml 0,1 M P-Puffer (115 ml NaH_2PO_4 0,2M, 385 ml Na_2HPO_4 0,2M, 500 ml Aqua dest.)) tiefgefroren und wurden mit einem feinen Haarpinsel aus der Lösung geholt. Sie wurden in eine Petrischale (VWR international) gebracht und in einer Phosphat gepufferten Kochsalzlösung (8g NaCl, 0,2g KCl, 1,44g Na_2HPo_4, 0,24g KH_2PO_4 in 1l Aqua dest.) gewaschen. Anschließend wurden die Vibratomschnitte auf Well-Platten mit je 24 Ausstanzungen gebracht, wobei alle Schnitte getrennt voneinander bearbeitet werden konnten. Im ersten Schritt der immunhistochemischen Anfärbung wurden die endogenen Peroxidasen im Gewebe blockiert, welche den unspezifischen Hintergrund einer DAB-Reaktion erhöhen (s.u.). Dabei wurden die Vibratomschnitte 20 min. mit 1ml H_2O_2 30% (Wasserstoffperoxid 30%) in 100ml Methanol/PBS (1:1) inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte 1 mal 10 min. mit je 1ml PBS und 2 mal 10 min. mit je 1 ml PBST (200 µl Triton in 100ml PBS) gewaschen. Es erfolgte eine 30-minütige Inkubation mit je 250 µl Normalem Schweineserum 5% in PBST. Die Lösung aus Normalem Schweineserum und 0,3%-igen Triton X-100 diente dazu, unspezifische Anbindungsstellen für die Antikörper zu blocken. Das Detergenz Triton X-100 permeabilisiert das Gewebe für die Antikörper durch Herauslösen von Lipiden aus der Zellmembran. Die Vibratomschnitte wurden nun für 48h bei 4°C mit 250 µl des Primärantikörpers, verdünnt in 5% Normalem Schweineserum/PBST inkubiert (Konzentrationen des jeweiligen Primärantikörpers s.o.). Um eine gleichmäßige Inkubation zu gewährleisten, wurden die Well-Platten während der Inkubationszeit im Kühlraum auf einen Schüttler gestellt, der bei Stufe 2 lief. Nach der 48-stündigen Inkubation wurden die Schnitte 4 mal 15 min. mit je 1 ml PBST gewaschen um nicht gebundene primäre Antikörper zu entfernen. Es erfolgte eine weitere 30-minütige Inkubation mit dem 2. Antikörper (biotinyliert) bei Raumtemperatur. Pro Well wurden 3 Tropfen der Gebrauchslösung des 2. Antikörpers (50 µl 2. AK Stammlösung in 10 ml PBST) und je 150 µl PBST eingebracht. Die Visualisierung dieser Antikörperkaskade erfolgte über die ABC-DAB-Methode (s.u.). Die Schnitte wurden

anschließend wieder 4 mal 15 min. mit je 1 ml PBST gewaschen. Danach wurde 30 min. mit dem ABC-Komplex (Vectastain, ABC Kit) inkubiert. Pro Well wurden 3 Tropfen des ABC-Komplex (100 µl A plus 100 µl B in 5 ml PBST) und je 150 µl PBST eingebracht. Die in der ABC-Reaktion verwendeten sekundären Antikörper waren am C-terminalen Ende mit dem Vitamin Biotin konjugiert, welches als Anbindungsstelle für weitere Reaktionskomponenten diente. Mit Hilfe der folgenden DAB-Reaktion wurde die Immunreaktion visualisiert.

Avidin-Biotin-Reaktion (ABC-Methode): Das Grundprinzip der Antikörperfärbung nach der ABC-Methode besteht darin, dass ein unmarkierter Erstantikörper, der an das Ziel-Antigen bindet, durch einen biotinylierten Zweitantikörper mit dem „Vectastain ABC Standart Kit“ detektiert werden kann. Die einzelnen Reaktionskomponenten des ABC-Kit bestehen aus dem Eiweißglykoprotein Avidin (A) und dem Vitamin Biotin (B), an dem das Enzym Meerrettichperoxidase (P) konjugiert ist und bilden einen stabilen Komplex. Durch Zugabe von H_2O_2 als Katalysator bilden die Peroxidase und das H_2O_2 einen Komplex, der chromogene Stoffe oxidieren kann.

Im Weiteren wurden die Schnitte 2 mal 15 min. mit je 1 ml PBST und 2 mal 15 min. mit je 1 ml PBS gewaschen. Es kann dann die Färbung mit Diaminobenzidin erfolgen. 40 mg DAB wurden mit 100 ml Tris, pH 7,6 (Trizma Pre-Set, Crystals) gemischt, unmittelbar vor der Färbung wurde noch 25 µl H_2O_2 30% hinzu gegeben. Pro Well wurde 1 ml DAB und je 25 µl Verstärker (Nickel/Kobalt) (Ni-sulfate-6-hydrate; Cobalt chloride(hexahydrate)) durch einen Filter (0,2 oder 0,4µm Porenweite) pipettiert.

DAB-Reaktion – Diaminobenzidin-Reaktion: es wurde eine DAB-Reaktion durchgeführt um das Antigen im Gewebe zu visualisieren. Bei der DAB-Reaktion wird grundsätzlich durch eine Peroxidase das zunächst farblose Chromogen 3,3’-Diaminobenzidin durch einen Oxidationsprozess in ein bräunliches Produkt umgewandelt.

Die Reaktion wurde unmittelbar im Anschluss 2 mal 5 min. mit PBS abgestoppt. Die Schnitte wurden auf Objektträger (ca. 76 x 26mm) aufgezogen, beschriftet, über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet und mit Eindeckmedium (Microscopy Aquatex®) eingedeckt.

2.4. Neuropathologische Auswertung

Zur semi-quantitativen Analyse der Immunreaktivität wurden die Schnitte unter dem Mikroskop (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) ausgewertet. Die optische Densitometrie wurde nach dem bereits von Sommer & Kiessling, 2002, beschriebenen Verfahren durchgeführt. Die Bilder wurden unter stets gleichen Bedingungen (Beleuchtung,

Blendenöffnung, Fokuseinstellung) mit einer CoolSNAP CCD Kamera mit hohem Auflösungsvermögen gescannt. Die photothrombotische Läsion wurde am Monitor markiert und die optische Dichte wurde automatisch im Randsaum der Läsion oder Läsionssaum („ischemic border zone“), dem sich unmittelbar anschließenden Kortexareal oder Periläsionssaum („adjacent cortex“) und dem korrespondierenden kontralateralen Kortexbereich mit der MCID Imaging Research Software bestimmt. Bei der Auswertung der immunhistochemischen Anfärbung der Tiere ohne Läsion wurde ein Durchschnittswert der optischen Dichte beider Seiten verwendet. (Abb. 1)

Die optische Dichte im Hippocampus wurde ipsi- und kontralateral im Stratum pyramidale, dem Stratum radiatum und Stratum oriens in CA1 und CA3 wie auch im Stratum moleculare und Stratum granulare des Gyrus dentatus gemessen. Die Analyse der immunhistochemischen Färbung bei Tieren ohne Läsion wurde anhand von Durchschnittswerten beider Hippocampusseiten durchgeführt. Die optische Dichte des Corpus callosum diente als Referenzwert für die Hintergrundfärbung. (Abb. 2)

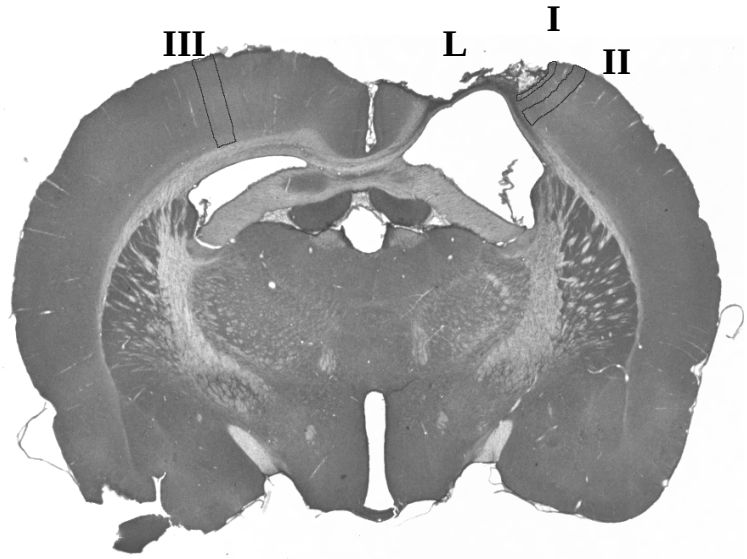


Abb. 1: *Repräsentativer Koronarschnitt, der für die α2-Untereinheit des $GABA_A$-Rezeptors sechs Wochen nach der Induktion der photothrombotischen Läsion angefärbt wurde. Eingezeichnet sind die Bereiche, in denen die semiquantitative Auswertung durchgeführt wurde. Die photothrombotische Läsion (L) wurde am Bildschirm ausgewählt, anschließend die optische Dichte in unmittelbarer Nähe zur Läsionsstelle, dem Läsionssaum (I), dem daran anschließenden Cortexareal, dem Periläsionssaum (II) und im korrespondierenden kontralateralen Cortex (III) bestimmt. Die optische Dichte des Corpus callosum wurde als Referenzwert für die Hintergrundanfärbung verwendet.*

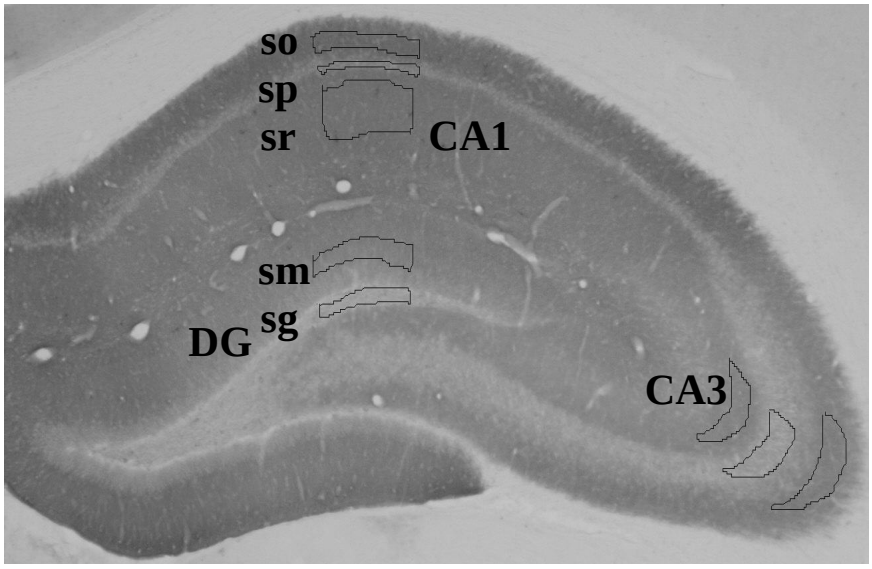


Abb. 2: *Repräsentativer ipsilateraler Hippocampus, der sechs Wochen nach der induzierten photo-thrombotischen Läsion für die GluR1-Untereinheit des AMPA-Rezeptors immunhistochemisch angefärbt wurde. Darstellung der untersuchten Hippocampusareale für die semiquantitative Auswertung: CA1, CA3: **C**ornu **A**mmonis 1, 3 mit stratum oriens (so), stratum pyramidale (sp), stratum radiatum (sr) und DG: Gyrus dentatus mit stratum moleculare (sm), stratum granulare (sg). Auch hier wurde die optische Dichte des Corpus callosum als Referenzwert für die Hintergrundanfärbung verwendet.*

2.5. Statistische Auswertung

Alle Daten wurden statistisch mit dem allgemeinen Statistikmodul von Analyse-it für Microsoft Excel ausgewertet. Die Werte wurden als Durchschnittswerte ± Standardabweichung (standard error of the mean – SEM) in Prozent der jeweiligen Kontrollen angegeben. Alle experimentellen Gruppen wurden paarweise verglichen. Es wurde hierzu eine ANOVA mit Bonferroni Fehlersicherung mit einem Signifikanzniveau von $P < 0,05$ durchgeführt.

2.6. Materialliste

Materialliste siehe Anhang

3. Ergebnisse

3.1. N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor Untereinheit NR1

3.1.1. Cortex

Sowohl in den unbehandelten als auch Sham-operierten Kontrollratten war das charakteristische Bild der NR1-Immunreaktivität mit markierten Neuronen in allen Schichten des Neocortex vorhanden. (Gardoni et al., 2003) Weder die Behandlung mit BDNF oder G-CSF führte bei den Sham-operierten Ratten zu signifikanten Veränderungen hinsichtlich Verteilung oder Intensität der NR1-Immunreaktivität (IR) im Vergleich zu unbehandelten Tieren. (Abb. 3) Sechs Wochen nach photothrombotischer Ischämie zeigten sich in den jeweiligen untersuchten Cortex-Arealen keine signifikanten Veränderungen der IR für NR1 in den unterschiedlichen experimentellen Gruppen. (Abb. 4)

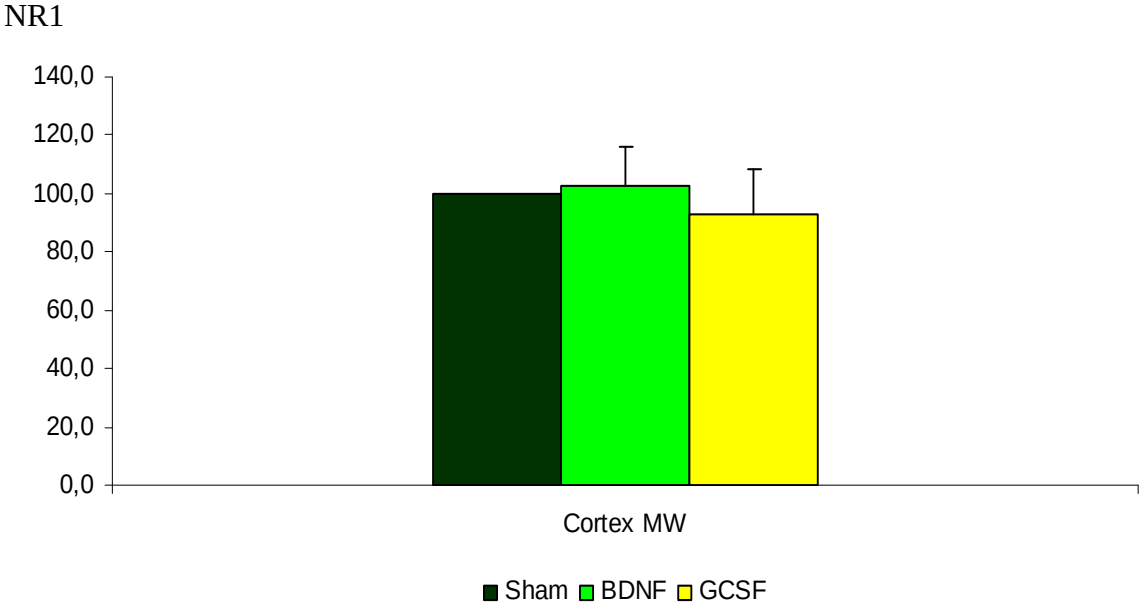


Abb. 3: *Semiquantitative Auswertung der kortikalen Immunreaktivität für die NMDA-Rezeptoruntereinheit 1 (NR1) bei den Sham-Tieren. Die Werte werden als Mittelwerte ± „standard error of the mean“ (SEM) als % der mit Kochsalz (NaCl) behandelten Kontrolltiere angegeben (*: signifikant, $p < 0.05$; „analysis of variance“ (ANOVA) all pairwise und Bonferroni error protection)*

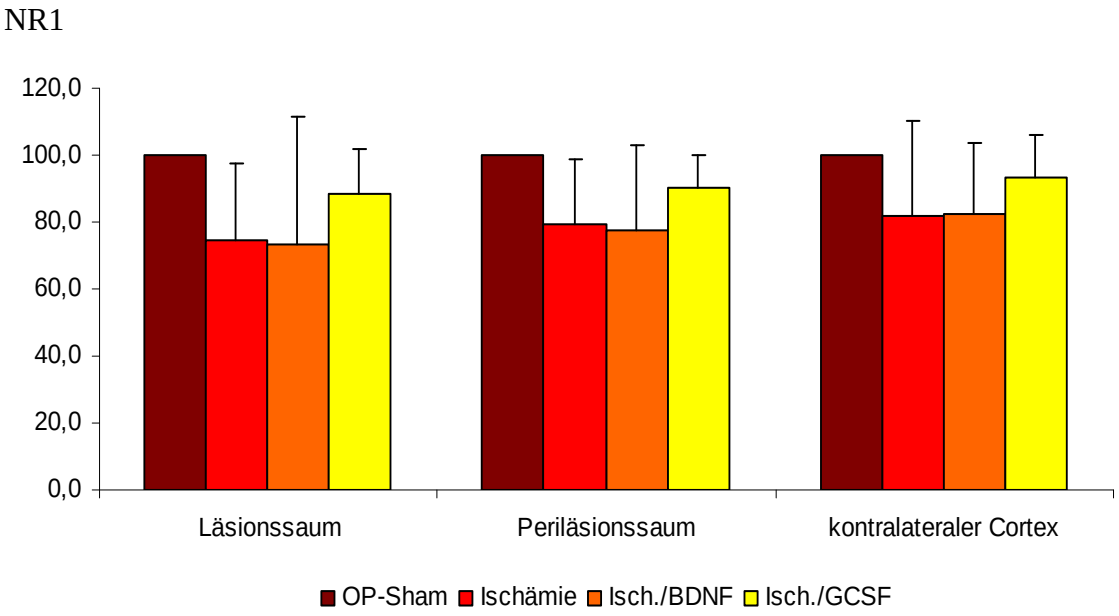


Abb. 4: *Semiquantitative Auswertung der postischämischen kortikalen Immunreaktivität (IR) von der NMDA-Rezeptoruntereinheit 1 (NR1) bei mit Kochsalz- (NaCl-), „brain-derived neurotrophic factor“- (BDNF-) und „granulocyte-colony stimulating factor“- (G-CSF-) behandelten Ratten. Die Proteinexpression der Rezeptoruntereinheit NR1 in den verschiedenen Ischämiegruppen ergab weder ipsi- noch kontralateral zur Läsion signifikante Unterschiede. (*: signifikant, $p < 0.05$; „analysis of variance” (ANOVA) all pairwise und Bonferroni error protection)*

3.1.2. Hippocampus

Im Hippocampus war die IR für NR1 in Übereinstimmung mit der Literatur vorwiegend in der dendritischen Schicht des Stratum pyramidale sowie im Stratum moleculare des Gyrus dentatus zu sehen (Petralia et al., 1994) Bei den Sham-operierten Ratten war die IR für NR1 nach Behandlung mit BDNF und G-CSF weitgehend unverändert. (Abb. 5) Photothrombotische Ischämie führte zu keinen signifikanten Unterschieden zwischen den verschiedenen Ischämie-Gruppen in den Hippocampus-Strukturen auf der Läsions-Seite (Abb. 6). Im kontralateralen Hippocampus war die IR für NR1 in der BDNF-Gruppe verglichen zur G-CSF-Gruppe sowohl im Stratum granulare als auch moleculare des Gyrus dentatus signifikant reduziert. Es waren jedoch keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur mit Kochsalzlösung behandelten Ischämie-Gruppe feststellbar (Abb. 7).

NR1

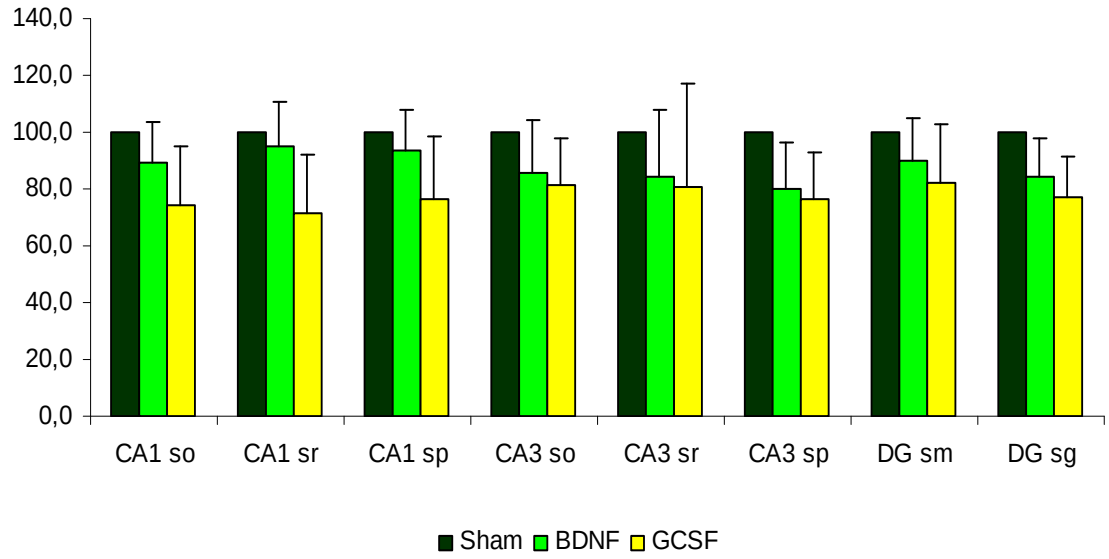


Abb. 5: *Semiquantitative Auswertung der Immunreaktivität (IR) im Hippocampus für die NMDA-Rezeptoruntereinheit 1 (NR1) bei den Sham-Tieren. (*: signifikant, p < 0.05; „analysis of variance" (ANOVA) all pairwise und Bonferroni error protection.)*

NR1 **ipsilateral**

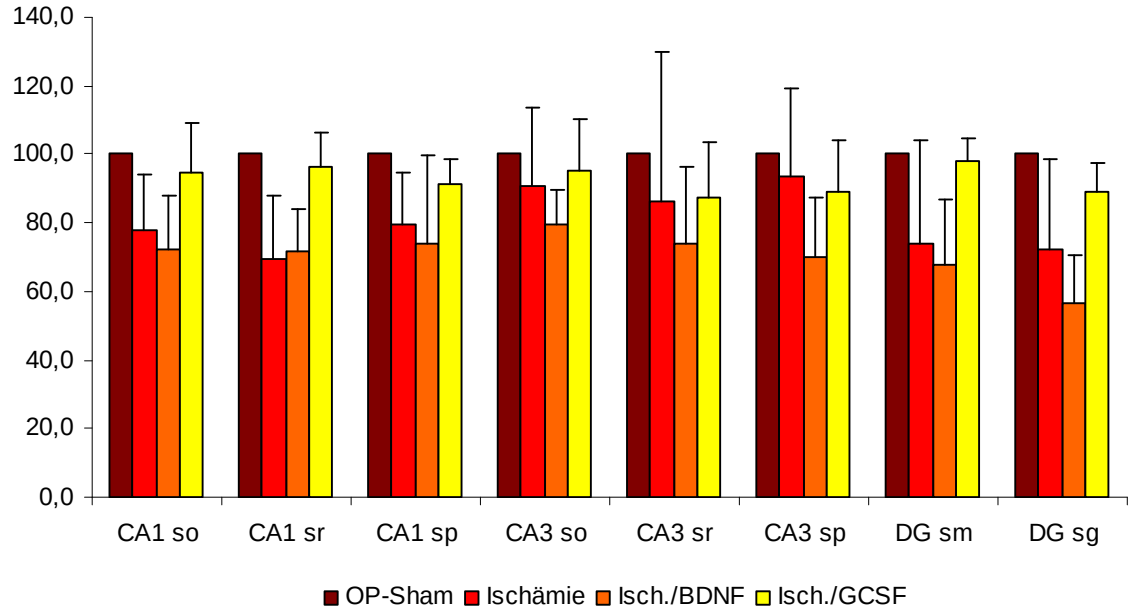


Abb. 6: *Semiquantitative Auswertung der postischämischen Immunreaktivität (IR) im ipsilateralen Hippocampus für die NMDA-Rezeptoruntereinheit 1 (NR1) bei mit Kochsalz- (NaCl-), „brain-derived neurotrophic factor"- (BDNF-) und „granulocyte-colony stimulating factor"- (G-CSF-) behandelten Ratten. (*: signifikant, p < 0.05; „analysis of variance" (ANOVA) all pairwise und Bonferroni error protection)*

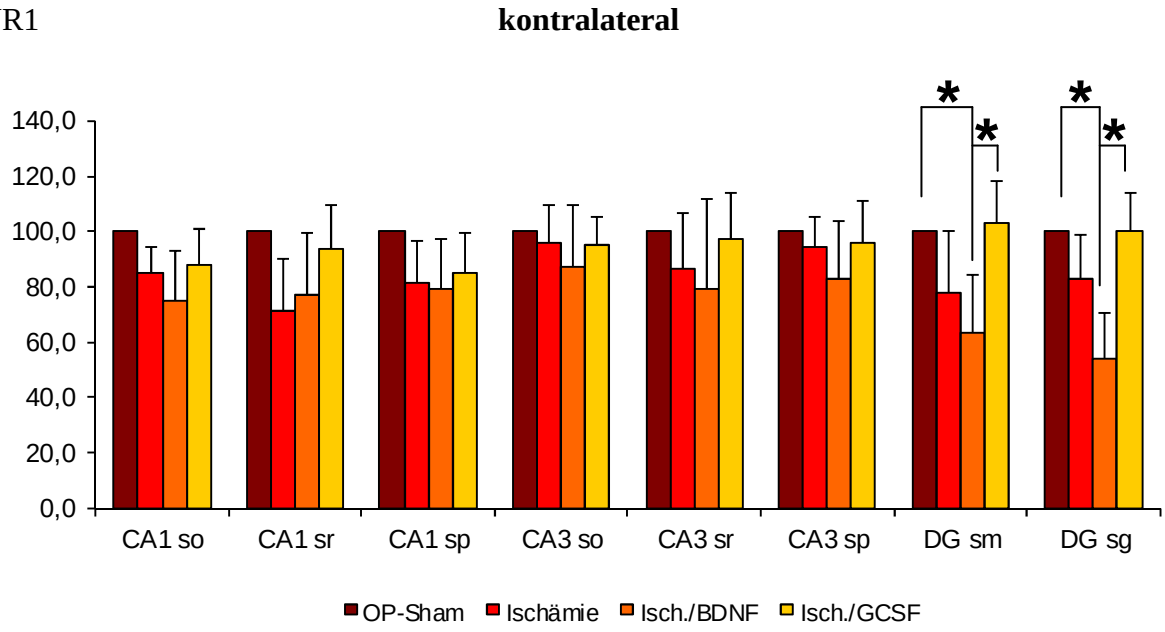


Abb. 7*: Semiquantitative Auswertung der postischämischen Immunreaktivität (IR) im kontralateralen Hippocampus für die NMDA-Rezeptoruntereinheit (NR1) bei mit Kochsalz- (NaCl-), „brain-derived neurotrophic factor"- (BDNF-) und „granulocyte-colony stimulating factor"- (G-CSF-) behandelten Ratten. Im kontralateralen Hippocampus war die IR für NR1 in der BDNF-Gruppe verglichen zur G-CSF-Gruppe sowohl im Stratum granulare als auch moleculare des Gyrus dentatus signifikant reduziert. Es ergaben sich jedoch keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur mit Kochsalzlösung behandelten Ischämie-Gruppe. (*: signifikant, $p < 0.05$; „analysis of variance" (ANOVA) all pairwise und Bonferroni error protection)*

3.2. AMPA-Rezeptor Untereinheit GluR1

3.2.1. Cortex

Die immunhistochemische Färbung der GluR1-Untereinheit des AMPA-Rezeptors zeigte das typische Bild (Martin et al., 1993) mit der stärksten IR in den Neocortex-Schichten V und VI bei unbehandelten und Sham-operierten Ratten. Ähnlich wie bei NR1 induzierte weder die BDNF- noch die G-CSF-Behandlung der Sham-operierten Ratten signifikante Veränderungen hinsichtlich Verteilung oder Intensität der kortikalen GluR1 IR (Abb. 8). Sechs Wochen nach Ischämie-Induktion waren in allen untersuchten Kortex-Regionen keine signifikanten Unterschiede der Färbungsintensität zwischen den verschiedenen Ischämie-Gruppen vorhanden (Abb. 9).

GluR1

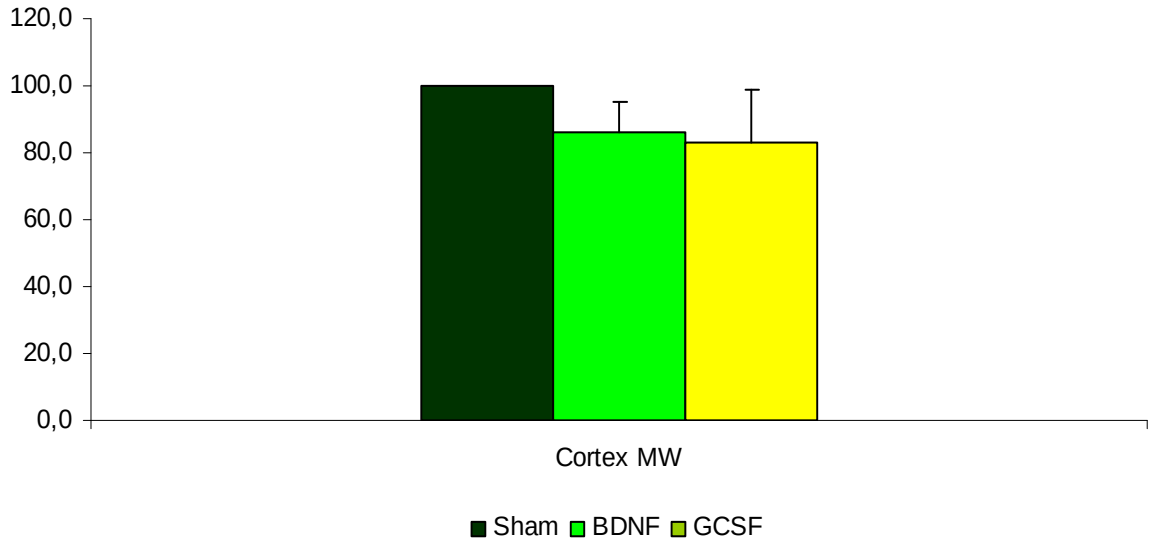


Abb. 8: *Semiquantitative Auswertung der kortikalen Immunreaktivität (IR) für die AMPA-Rezeptoruntereinheit 1 (GluR1) bei den Sham-Tieren. (*: signifikant, p < 0.05; „analysis of variance" (ANOVA) all pairwise und Bonferroni error protection)*

GluR1

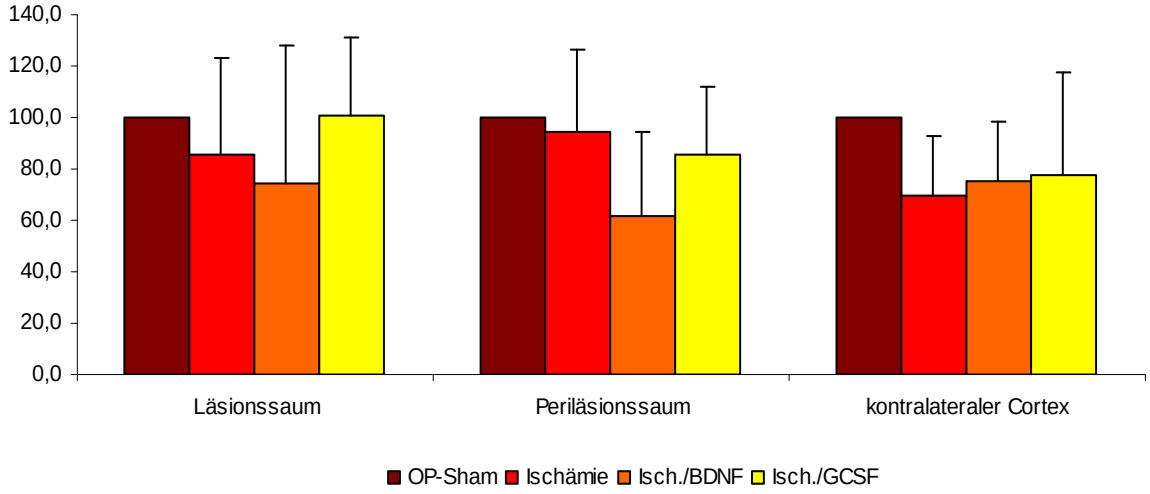


Abb. 9: *Semiquantitative Auswertung der postischämischen kortikalen Immunreaktivität (IR) von der AMPA-Rezeptoruntereinheit 1 (GluR1) bei mit Kochsalz- (NaCl-), „brain-derived neurotrophic factor"- (BDNF-) und „granulocyte-colony stimulating factor"- (G-CSF-) behandelten Ratten. Die Proteinexpression der Rezeptoruntereinheit GluR1 in den verschiedenen Ischämiegruppen ergab weder ipsi- noch kontralateral zur Läsion signifikante Unterschiede. (*: signifikant, p < 0.05; „analysis of variance" (ANOVA) all pairwise und Bonferroni error protection)*

3.2.2. Hippocampus

Die IR für GluR1 im Hippocampus war in den Zellkörpern der Pyramidenzellen und hilärer Interneurone sowie in den Körnerzellen und der dendritische Schicht im Gyrus dentatus nachweisbar. (Sommer et al., 2001) Bei den Sham-operierten Ratten waren weder bei den BDNF- noch bei den G-CSF-behandelten Tieren signifikante Unterschiede zu sehen (Abb. 10). Die photothrombotische Ischämie induzierte eine Reduktion der IR im Gyrus dentatus in allen Ischämie-Gruppen verglichen zu den Sham-Kontrollen. Es konnten jedoch keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Ischämie-Gruppen detektiert werden (Abb. 11, Abb. 12).

GluR 1

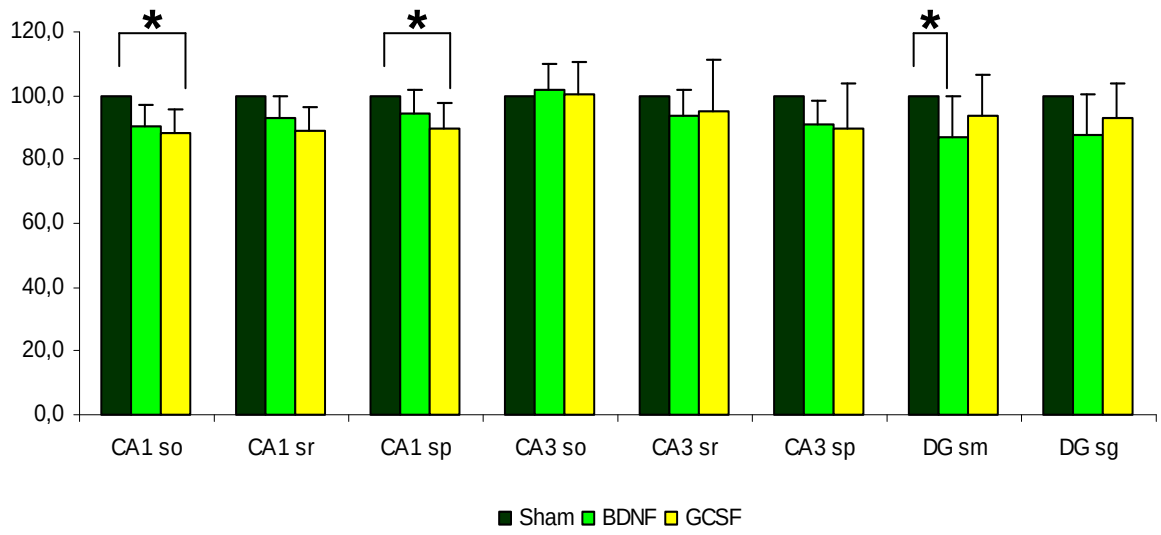


Abb. 10: *Semiquantitative Auswertung der Immunreaktivität (IR) im Hippocampus für die AMPA-Rezeptoruntereinheit 1 (GluR1) bei den Sham-Tieren. (*: signifikant, $p < 0.05$; „analysis of variance“ (ANOVA) all pairwise und Bonferroni error protection)*

GluR1 **ipsilateral**

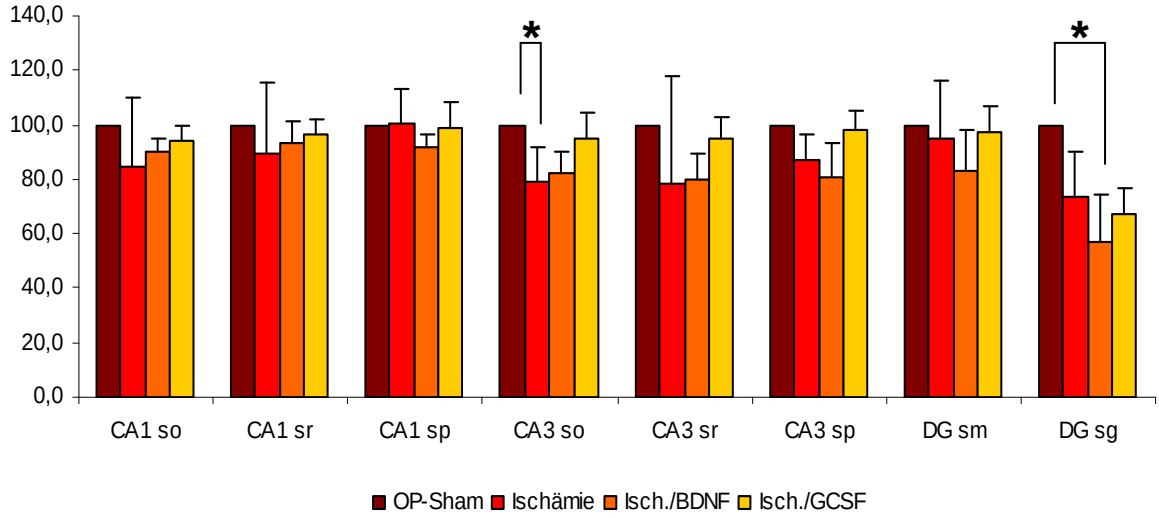


Abb. 11: *Semiquantitative Auswertung der postischämischen Immunreaktivität (IR) im ipsilateralen Hippocampus für die AMPA-Rezeptoruntereinheit 1 (GluR1) bei mit Kochsalz- (NaCl-), „brain-derived neurotrophic factor"- (BDNF-) und „granulocyte-colony stimulating factor"- (G-CSF-) behandelten Ratten. Die Proteinexpression der GluR1-Untereinheit des AMPA-Rezeptors unterschied sich ipsilateral nicht signifikant zwischen den verschiedenen Ischämie-Behandlungsgruppen. (*: signifikant, $p < 0.05$; „analysis of variance" (ANOVA) all pairwise und Bonferroni error protection)*

GluR1 **kontralateral**

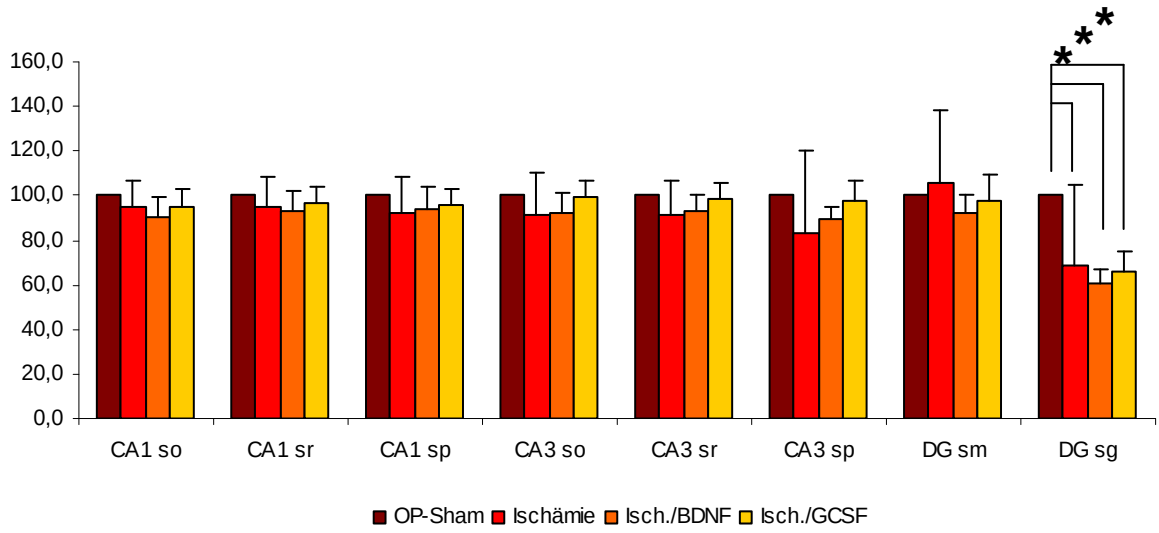


Abb. 12: *Semiquantitative Auswertung der postischämischen Immunreaktivität (IR) im kontralateralen Hippocampus für die AMPA-Rezeptoruntereinheit 1 (GluR1) bei mit Kochsalz- (NaCl-), „brain-derived neurotrophic factor"- (BDNF-) und „granulocyte-colony stimulating factor"- (G-CSF-) behandelten Ratten. Die Proteinexpression der GluR1-Untereinheit des AMPA-Rezeptors unterschied sich kontralateral nicht signifikant zwischen den verschiedenen Ischämie-Behandlungsgruppen. (*: signifikant, $p < 0.05$; „analysis of variance" (ANOVA) all pairwise und Bonferroni error protection)*

3.3. $GABA_A$-Rezeptor α2-Untereinheit

3.3.1. Cortex

Die Verteilung der α2-Untereinheit des $GABA_A$-Rezeptors bei Tieren der unbehandelten und der Sham-operierten Kontrollgruppe war in Einklang mit bereits veröffentlichten Daten. (Redecker et al., 2000) Weder die Gabe von BDNF noch G-CSF verursachte signifikante Änderungen der kortikalen IR bei den Sham-operierten im Vergleich zu unbehandelten Ratten (Abb. 13). Die photothrombotische Ischämie induzierte eine geringfügige Reduktion der IR der α2-Untereinheit des $GABA_A$-Rezeptors im Periläsionssaum. Im korrespondierenden kontralateralen Cortex war die Ischämie verbunden mit einer reduzierten IR in allen Ischämie-Gruppen (Abb. 14).

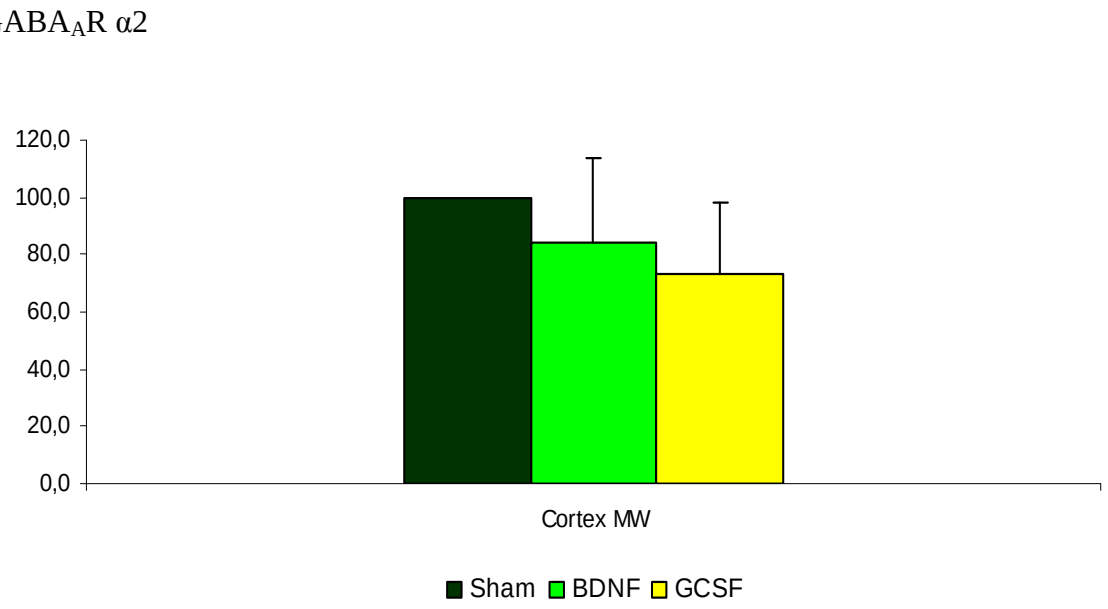


Abb. 13: *Semiquantitative Auswertung der kortikalen Immunreaktivität (IR) für die α2-Untereinheit des $GABA_A$-Rezeptors ($GABA_AR$ α2) bei den Sham-Tieren. (*: signifikant, $p < 0.05$; „analysis of variance" (ANOVA) all pairwise und Bonferroni error protection)*

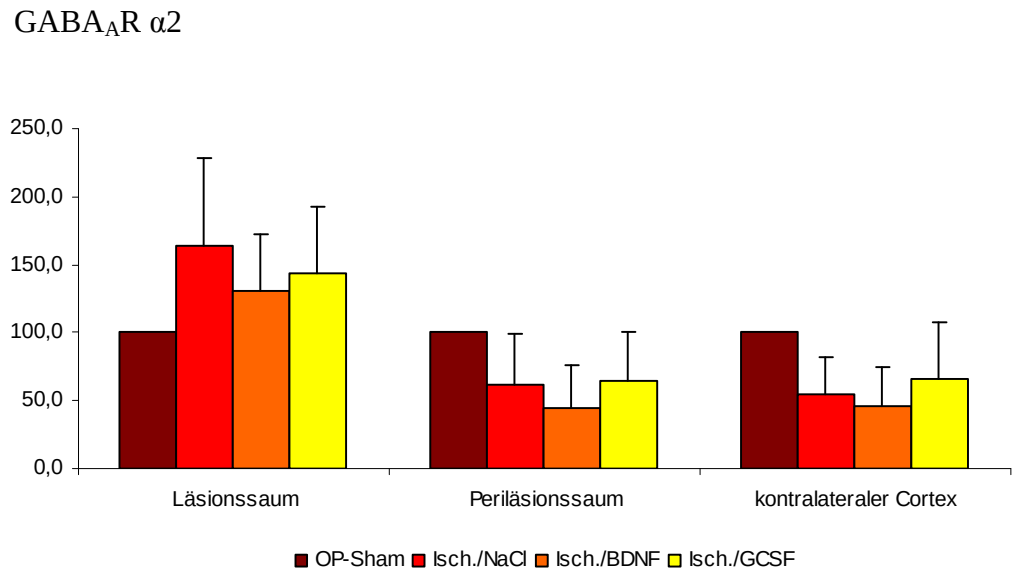


Abb. 14: *Semiquantitative Auswertung der postischämischen kortikalen Immunreaktivität (IR) von der α2-Untereinheit des GABA$_A$-Rezeptors (GABA$_A$R α2) bei mit Kochsalz- (NaCl-), „brain-derived neurotrophic factor"- (BDNF-) und „granulocyte-colony stimulating factor"- (G-CSF-) behandelten Ratten. Die Proteinexpression der Rezeptoruntereinheit GABA$_A$R α2 in den verschiedenen Ischämiegruppen ergab weder ipsi- noch kontralateral zur Läsion signifikante Unterschiede. (*: signifikant, $p < 0.05$; „analysis of variance" (ANOVA) all pairwise und Bonferroni error protection)*

3.3.2. Hippocampus

Im Hippocampus induzierte weder die BDNF- noch die G-CSF-Behandlung der Sham-operierten Tiere signifikante Veränderungen hinsichtlich Verteilung oder Intensität der IR verglichen mit den unbehandelten Ratten (Abb. 15). Sechs Wochen nach photothrombotischer Ischämie führte die BDNF-Behandlung zu einer deutlichen Reduktion der IR der α2-Untereinheit des GABA$_A$-Rezeptors in allen Schichten von CA3. Das Signifikanzniveau gegen alle anderen Untersuchungsgruppen wurde jedoch nur kontralateral zur Läsionsseite erreicht (Abb. 16, Abb. 17, Abb. 18).

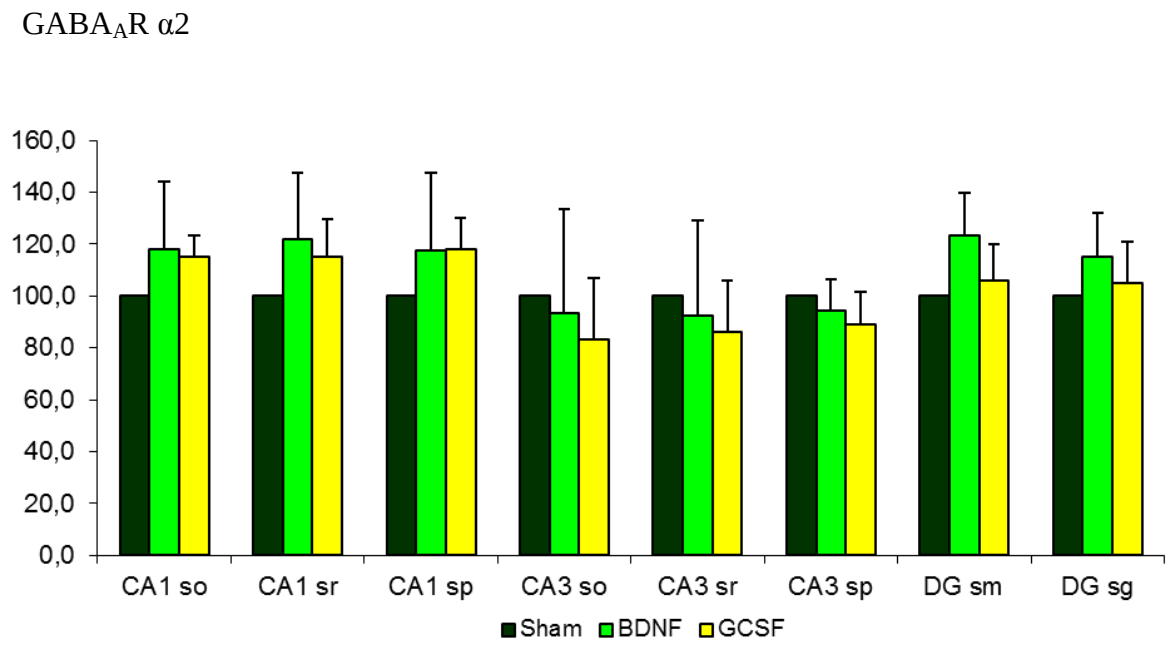


Abb. 15: *Semiquantitative Auswertung der Immunreaktivität (IR) im Hippocampus für die α2-Untereinheit des GABA$_A$-Rezeptors (GABA$_A$R α2) bei den Sham-Tieren. (*: signifikant, p < 0.05; „analysis of variance“ (ANOVA) all pairwise und Bonferroni error protection)*

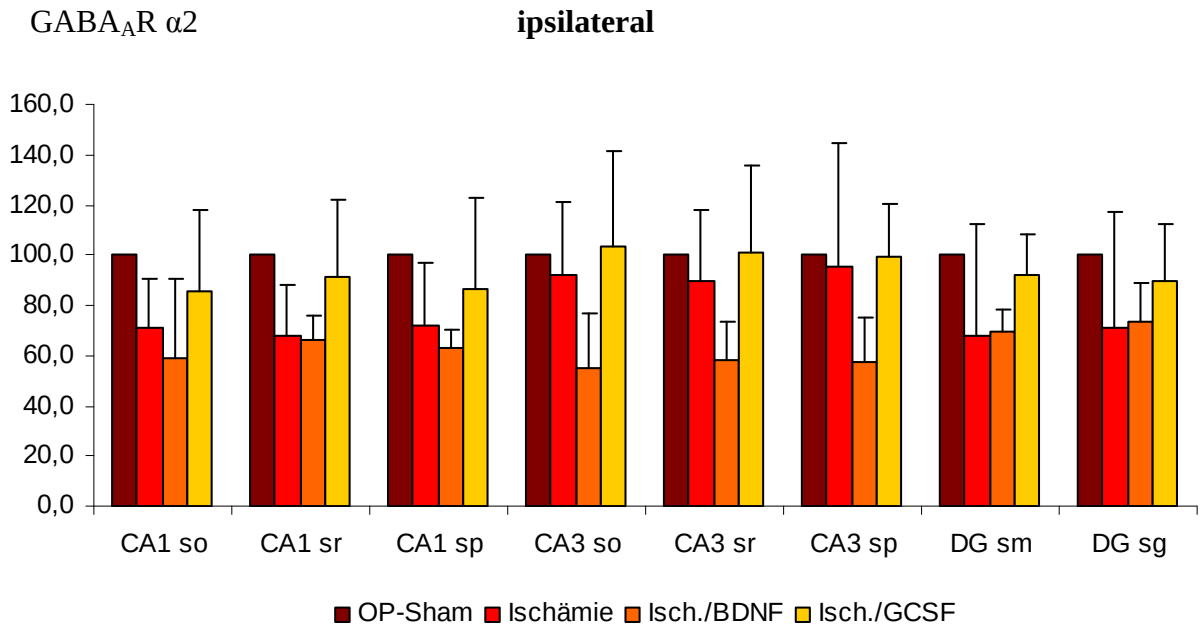


Abb. 16: *Semiquantitative Auswertung der postischämischen Immunreaktivität (IR) im ipsilateralen Hippocampus von der α2-Untereinheit des GABA$_A$-Rezeptors (GABA$_A$R α2) bei mit Kochsalz- (NaCl-), „brain-derived neurotrophic factor“- (BDNF-) und „granulocyte-colony stimulating factor“- (G-CSF-) behandelten Ratten. Die IR der inhibitorischen α2-Untereinheit des GABA$_A$-Rezeptors war bei BDNF-behandelten Ratten im Cornu Ammonis 3 (CA3) des Hippocampus herunterreguliert, erreichte aber kein Signifikanzniveau. (*: signifikant, p < 0.05; „analysis of variance“ (ANOVA) all pairwise und Bonferroni error protection)*

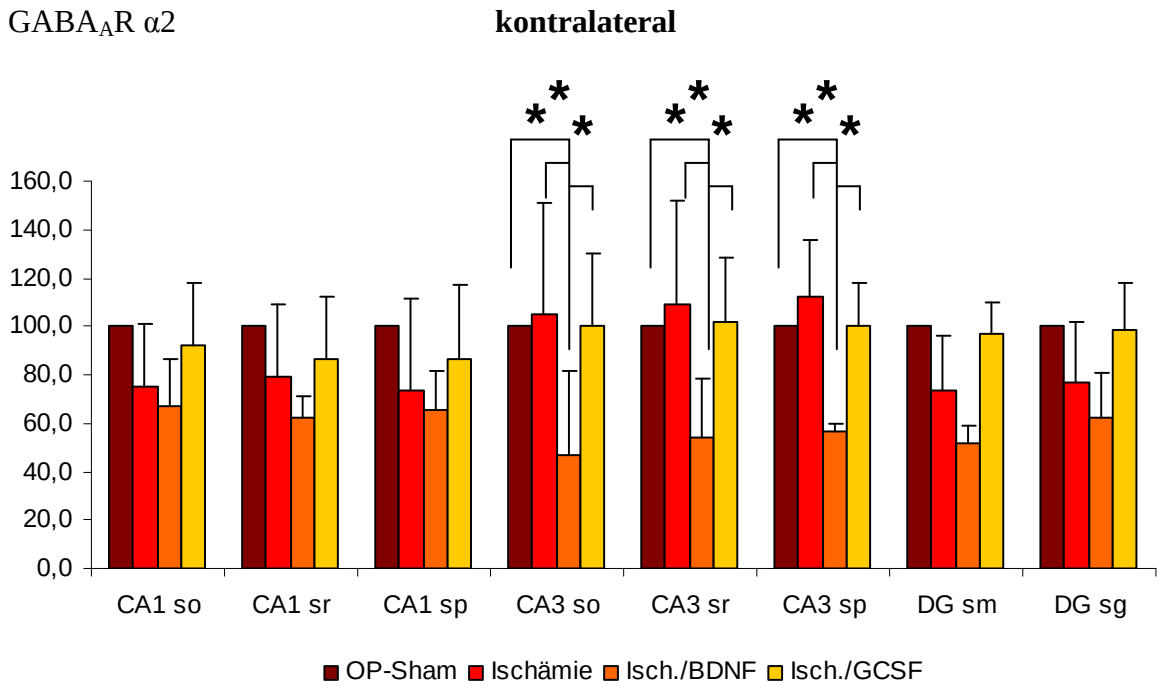


Abb. 17: *Semiquantitative Auswertung der postischämischen Immunreaktivität (IR) im kontralateralen Hippocampus von der α2-Untereinheit des GABA$_A$-Rezeptors (GABA$_A$R α2) bei mit Kochsalz- (NaCl-), „brain-derived neurotrophic factor"- (BDNF-) und „granulocyte-colony stimulating factor"- (G-CSF-) behandelten Ratten. Die IR der inhibitorischen α2-Untereinheit des GABA$_A$-Rezeptors war bei BDNF-behandelten Ratten im Cornu Ammonis 3 (CA3) des Hippocampus herunterreguliert, allerdings nur kontralateral mit signifikanten Werten. (*: signifikant, $p < 0.05$; „analysis of variance" (ANOVA) all pairwise und Bonferroni error protection)*

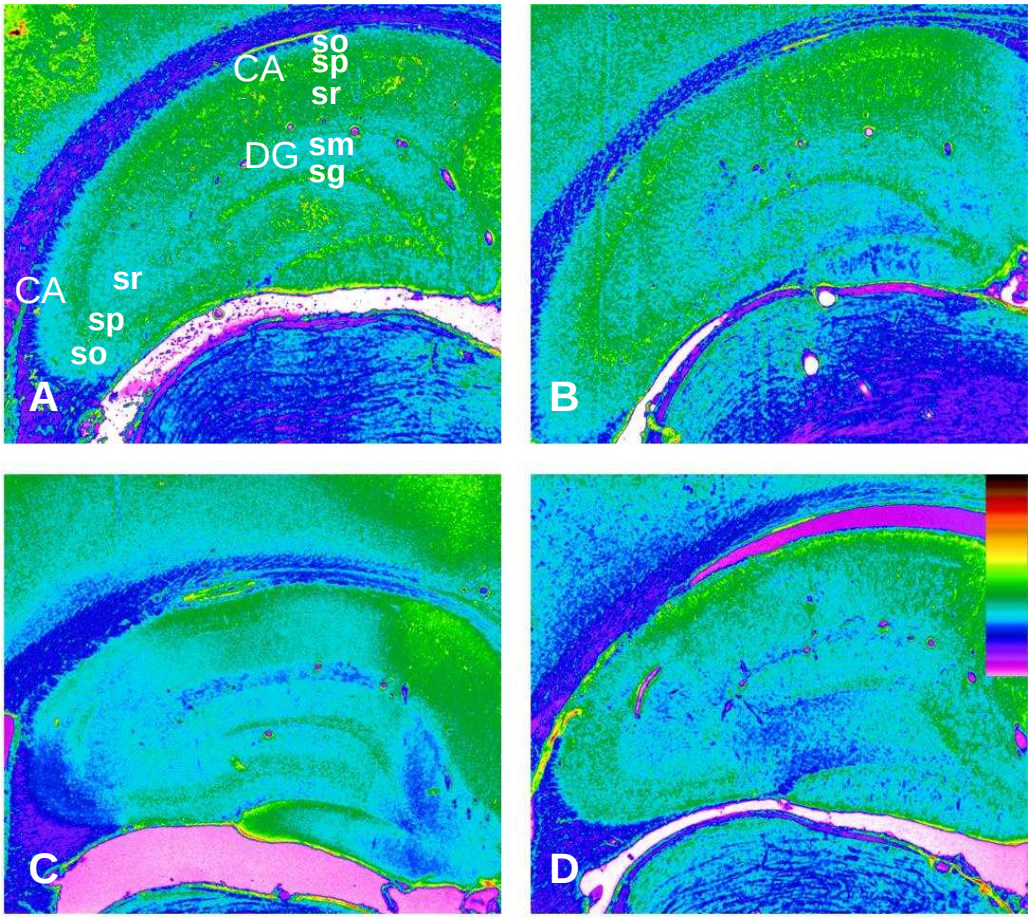


Abb. 18: *Repräsentative farbkodierte Photographien der postischämischen Immunreaktivität (IR) der α2-Untereinheit des $GABA_A$-Rezeptors ($GABA_AR$ α2) im Hippocampus bei den Sham-Kontrolltieren (A), den Kochsalz- (NaCl-) (B), „brain-derived neurotrophic factor"- (BDNF-) (C) und „granulocyte-colony stimulating factor"- (G-CSF-) behandelten (D) Ratten mit ischämischer Läsion. Auffallend ist die Abnahme der IR der α2-Untereinheit des $GABA_A$-Rezeptors insbesondere im Cornu Ammonis 3- (CA3-) Sektor des Hippocampus bei BDNF-behandelten Ratten (so: stratum oriens; sp: stratum pyramidale; sr: stratum radiatum; sm: stratum moleculare; sg: stratum granulare; DG: dentate gyrus).*

3.4. MAP1B

3.4.1. Cortex

Sowohl bei unbehandelten als auch Sham-operierten Ratten war die IR von MAP1B im perinuklearen Zytoplasma und in Fortsätzen kortikaler Neurone akzentuiert in den mittleren Cortexschichten vorhanden. Interessanterweise führte die Verabreichung von BDNF und G-CSF bei Sham-behandelten Ratten zu einer deutlichen Reduktion der

kortikalen IR von MAP1B, wobei signifkante Unterschiede jedoch nur in der Sham-G-CSF-Gruppe auftraten (Abb. 19). Sechs Wochen nach der Ischämie-Induktion war die IR von MAP1B im Läsionssaum in der Ischämie-Kontrollgruppe und noch ausgeprägter in der BDNF-behandelten Gruppe hochreguliert (Abb. 20). Die G-CSF-Behandlung führte allerdings zu keiner signifikant gesteigerten Intensität der immunhistochemischen Anfärbung (Abb. 20). Darüber hinaus war der Anstieg der Intensität der MAP1B IR signifkant höher in der BDNF- als in der G-CSF-behandelten Gruppe (Abb. 20, Abb. 21). Sowohl im Periläsionssaum als auch im korrespondierenden kontralateralen Cortex blieb die Intensität der IR von MAP1B weitgehend unverändert.

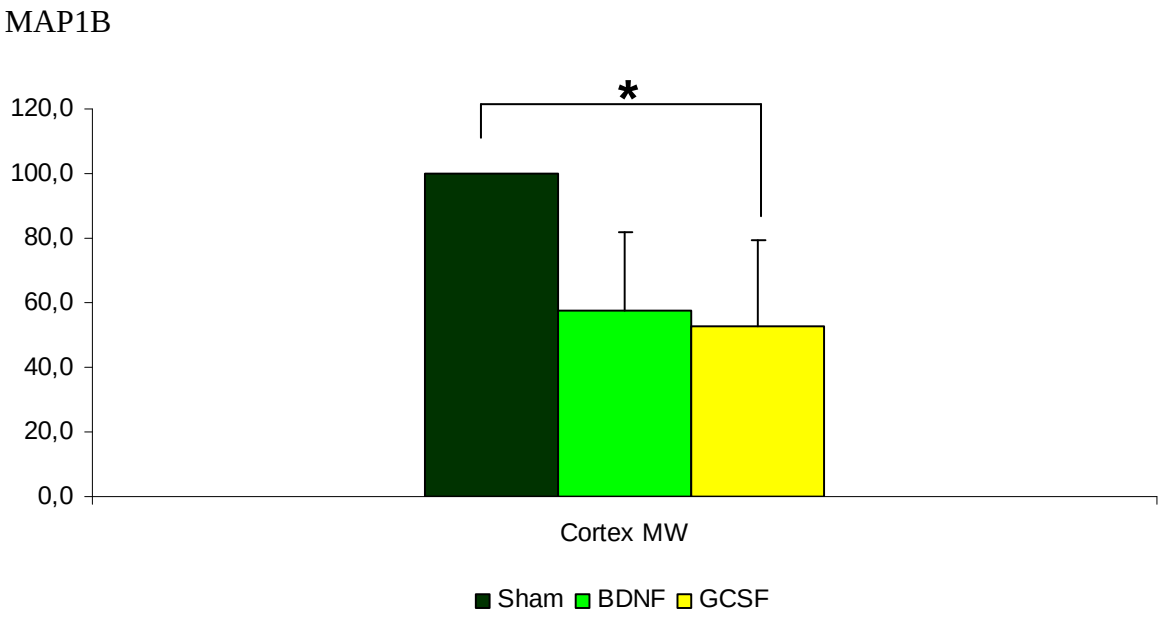


Abb. 19: *Semiquantitative Auswertung der kortikalen Immunreaktivität (IR) für Mikrotubuli-assoziiertes Protein 1B (MAP1B) bei den Sham-Tieren. (*: signifikant, $p < 0.05$; „analysis of variance“ (ANOVA) all pairwise und Bonferroni error protection)*

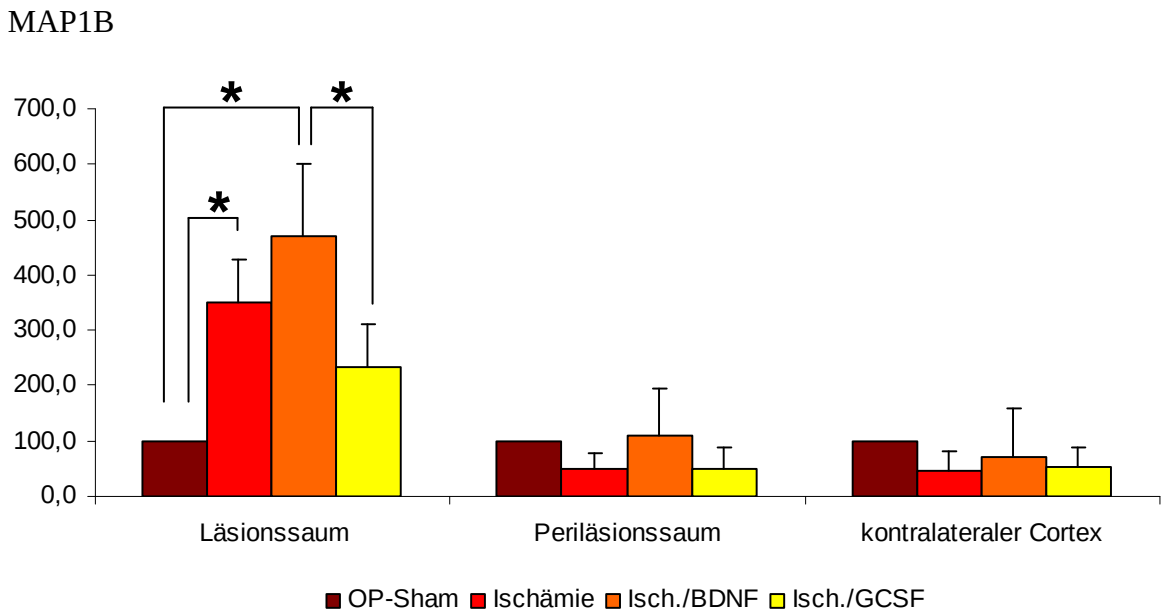


Abb. 20: *Semiquantitative Auswertung der kortikalen Immunreaktivität (IR) für Mikrotubuli-assoziiertes Protein 1B (MAP1B) bei den Ischämie-Tieren. (*: signifikant, $p < 0.05$; „analysis of variance“ (ANOVA) all pairwise und Bonferroni error protection)*

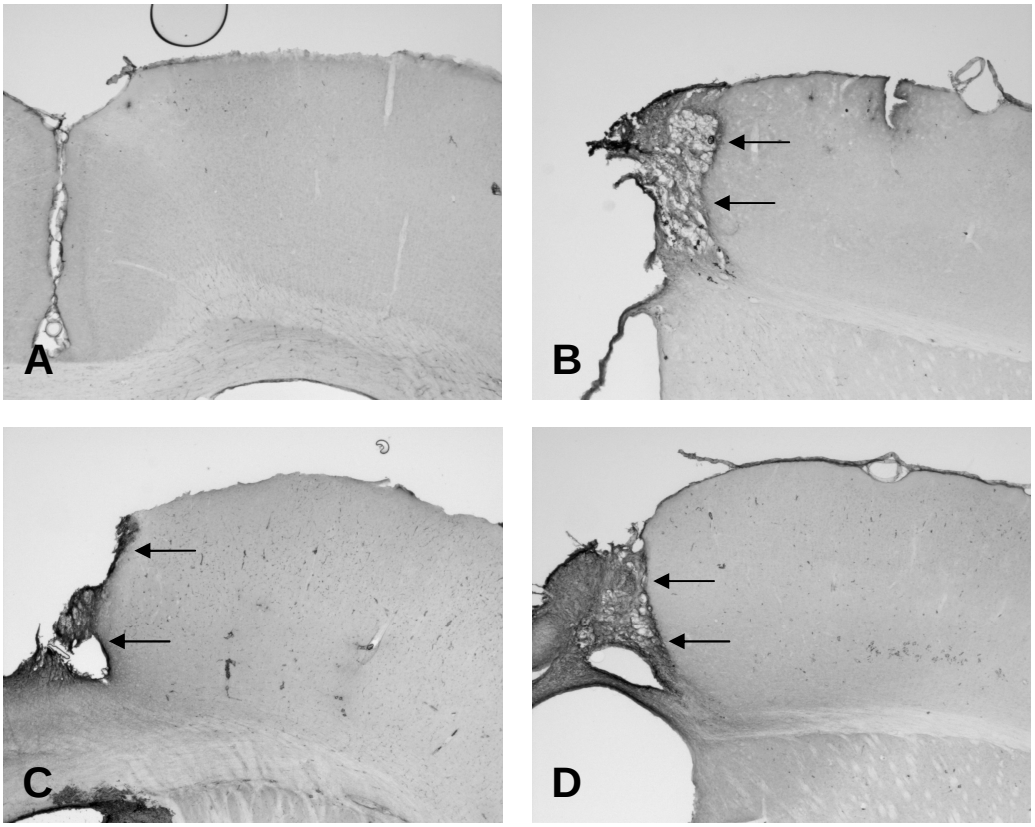


Abb. 21: *Repräsentative Bilder der postischämischen kortikalen Immunreaktivität (IR) für Mikrotubuli-assoziiertes Protein 1B (MAP1B) bei den Sham-Kontrolltieren (A), den mit Kochsalz- (NaCl-) (B), „brain-derived neurotrophic factor"- (BDNF-) (C) und „granulocyte-colony stimulating factor"- (G-CSF-) behandelten (D) Ratten mit photothrombotischer Läsion. Bemerkenswert ist der selektive Anstieg der IR von MAP1B im Läsionssaum (Pfeile) der BDNF-behandelten Ratten.*

3.4.2. Hippocampus

Im Hippocampus waren keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich Intensität der IR von MAP1B zwischen Sham-operierten und BDNF- oder G-CSF-behandelten Ratten zu erkennen. (Abb. 22) Die photothrombotische Ischämie führte ebenfalls zu keinen signifikanten Veränderungen der MAP1B IR zwischen den verschiedenen Untersuchungsgruppen im ipsi- und kontralateralen Hippocampus (Abb. 23, Abb. 24).

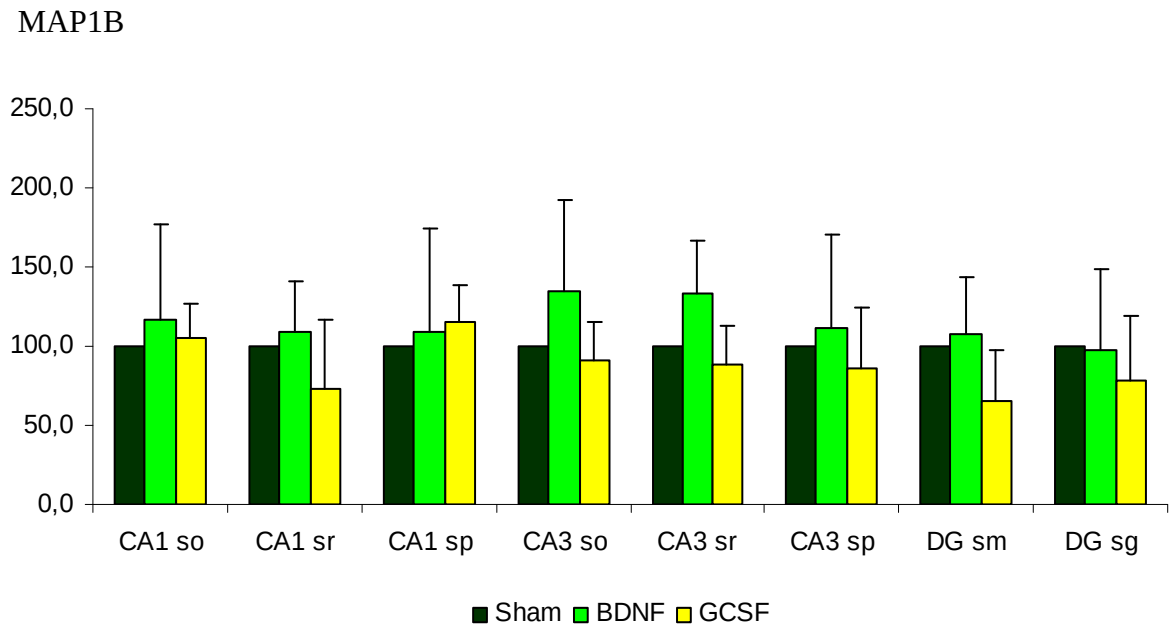


Abb 22: *Semiquantitative Auswertung der Immunreaktivität (IR) im Hippocampus für Mikrotubuli-assoziiertes Protein 1B (MAP1B) bei den Sham-Tieren. (*: signifikant, p < 0.05; „analysis of variance“ (ANOVA) all pairwise und Bonferroni error protection)*

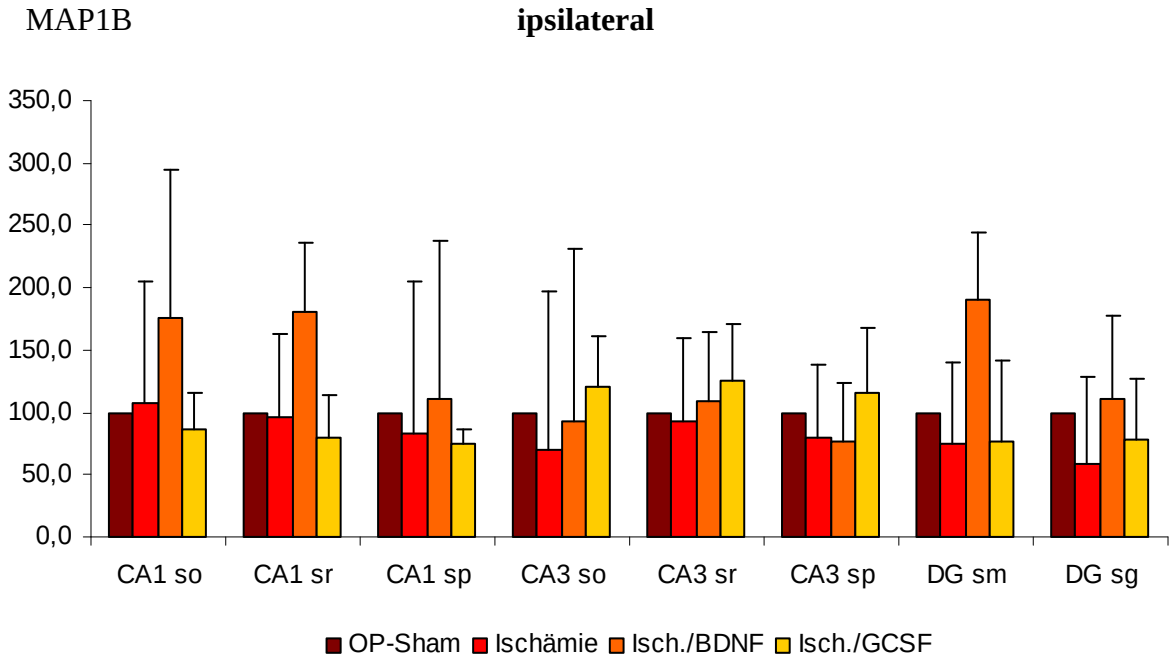


Abb. 23: *Semiquantitative Auswertung der Immunreaktivität (IR) im ipsilateralen Hippocampus für Mikrotubuli-assoziiertes Protein 1B (MAP1B) bei den Ischämie-Tieren. (*: signifikant, p < 0.05; „analysis of variance“ (ANOVA) all pairwise und Bonferroni error protection)*

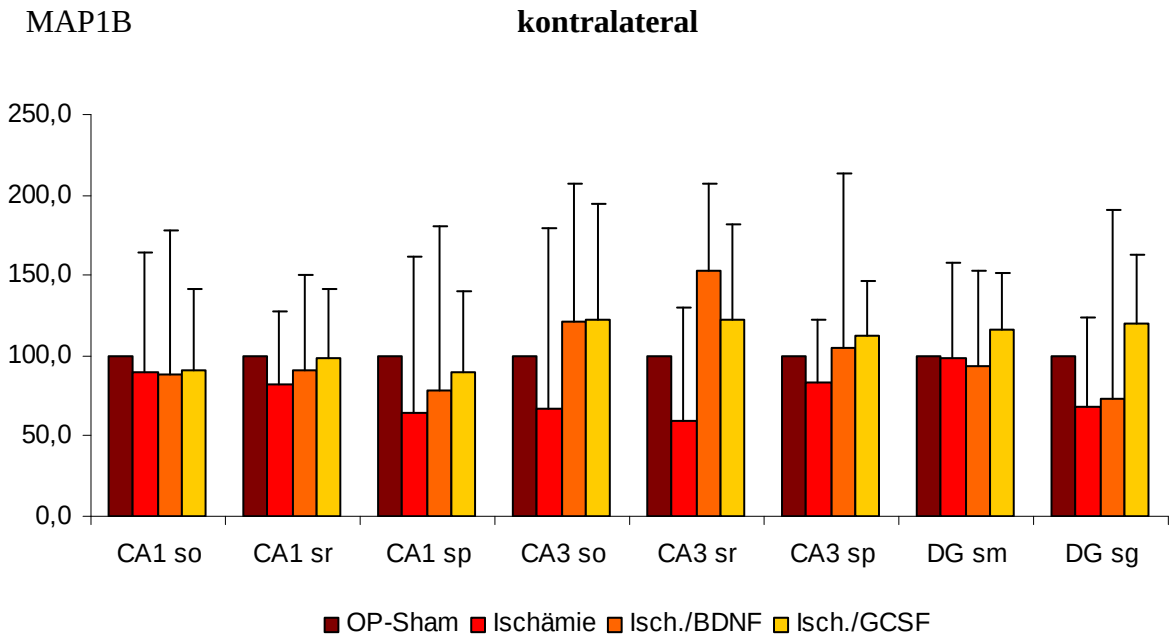


Abb. 24: *Semiquantitative Auswertung der Immunreaktivität (IR) im kontralateralen Hippocampus für Mikrotubuli-assoziiertes Protein 1B (MAP1B) bei den Ischämie-Tieren. (*: signifikant, $p < 0.05$; „analysis of variance“ (ANOVA) all pairwise und Bonferroni error protection)*

3.5. MAP2

3.5.1. Cortex

Die IR von MAP2 war besonders in den äußeren Cortexschichten von Kontrolltieren sehr intensiv. Zwischen den verschiedenen Untersuchungsgruppen ergaben sich weder mit noch ohne Ischämie für keine der untersuchten Hirnregionen statistisch signifikante Unterschiede. (Abb. 25, Abb. 26)

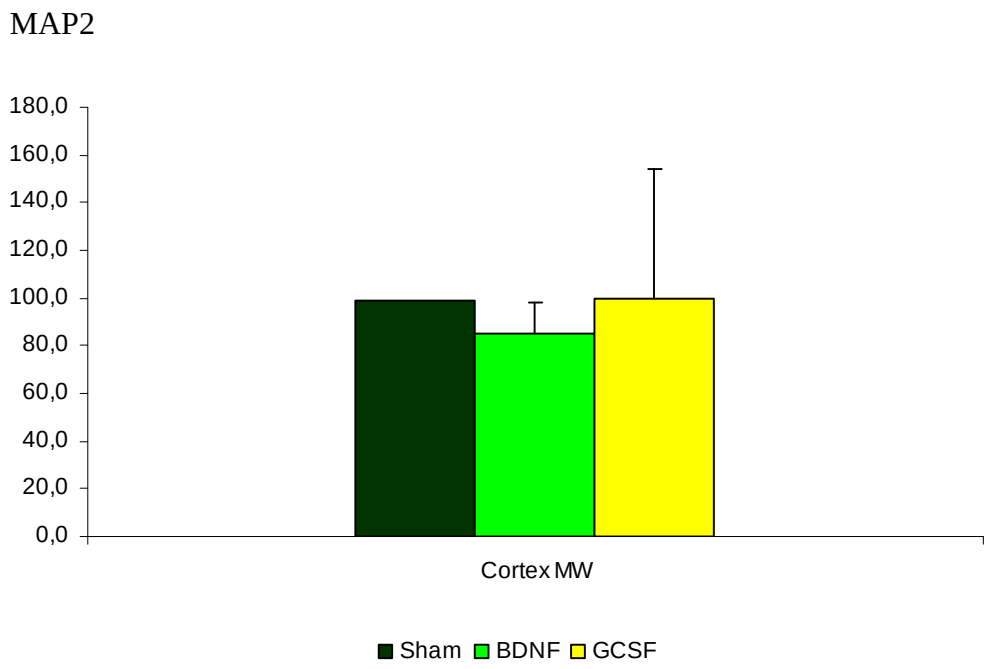


Abb. 25: *Semiquantitative Auswertung der kortikalen Immunreaktivität (IR) für Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2 (MAP2) bei den Sham-Tieren. (*: signifikant, p < 0.05; „analysis of variance“ (ANOVA) all pairwise und Bonferroni error protection)*

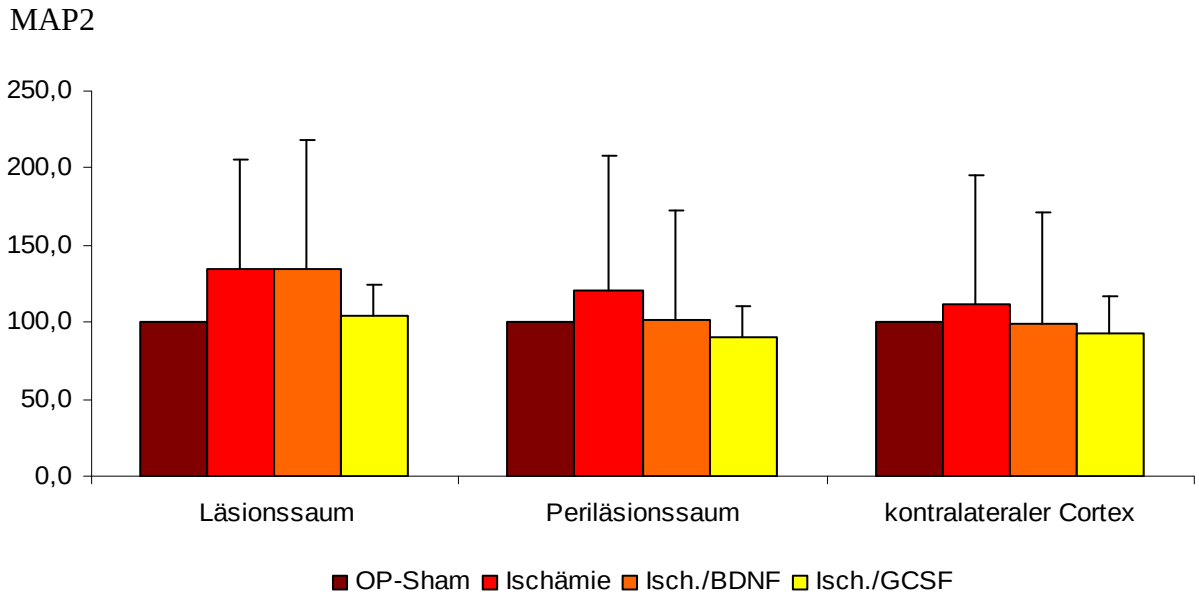


Abb. 26: *Semiquantitative Auswertung der kortikalen Immunreaktivität (IR) für Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2 (MAP2) bei den Ischämie-Tieren. (*: signifikant, p < 0.05; „analysis of variance“ (ANOVA) all pairwise und Bonferroni error protection)*

3.5.2. Hippocampus

Gleichermaßen waren in keiner der analysierten Hippocampusregionen statistisch signifikante Unterschiede in den Sham- und den Ischämie-Gruppen nachweisbar (Abb. 27, Abb. 28, Abb. 29)

MAP2

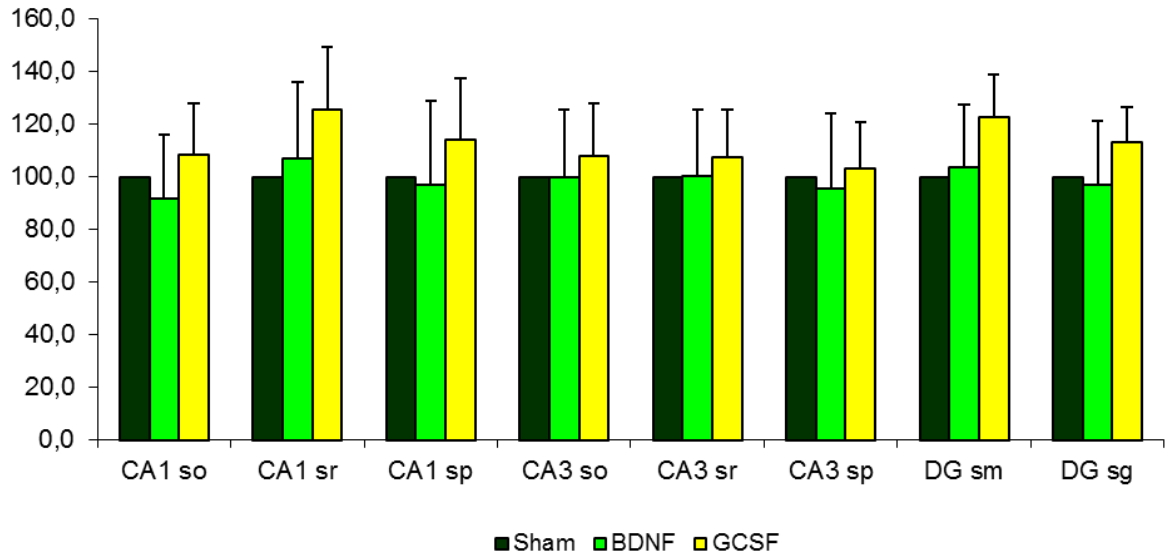


Abb. 27: *Semiquantitative Auswertung der Immunreaktivität (IR) im Hippocampus für Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2 (MAP2) bei den Sham-Tieren. (*: signifikant, p < 0.05; „analysis of variance“ (ANOVA) all pairwise und Bonferroni error protection)*

MAP2 **ipsilateral**

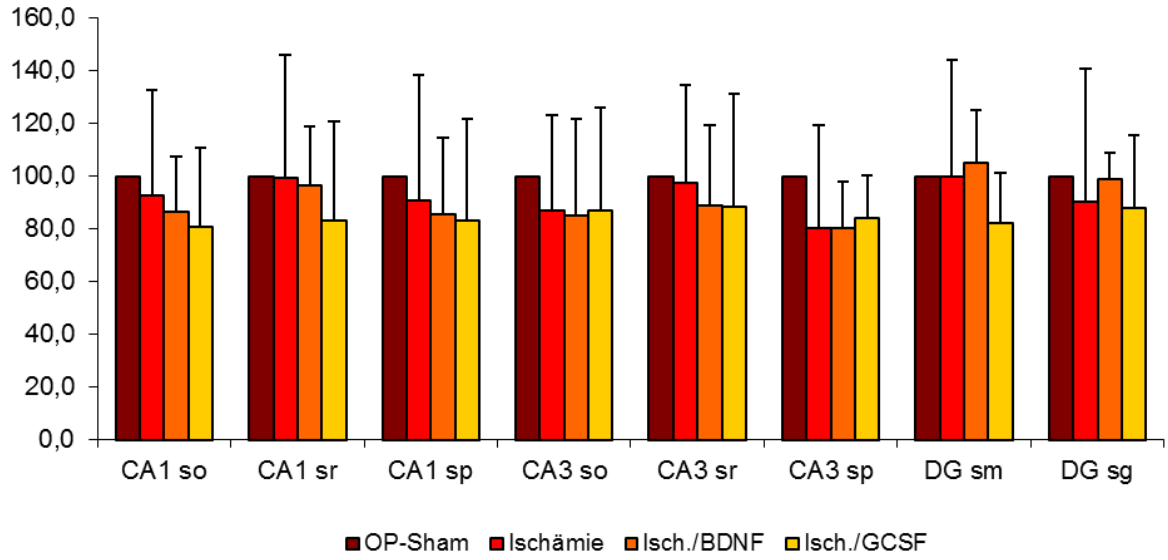


Abb. 28: *Semiquantitative Auswertung der Immunreaktivität (IR) im ipsilateralen Hippocampus für Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2 (MAP2) bei den Ischämie-Tieren. (*: signifikant, p < 0.05; „analysis of variance“ (ANOVA) all pairwise und Bonferroni error protection)*

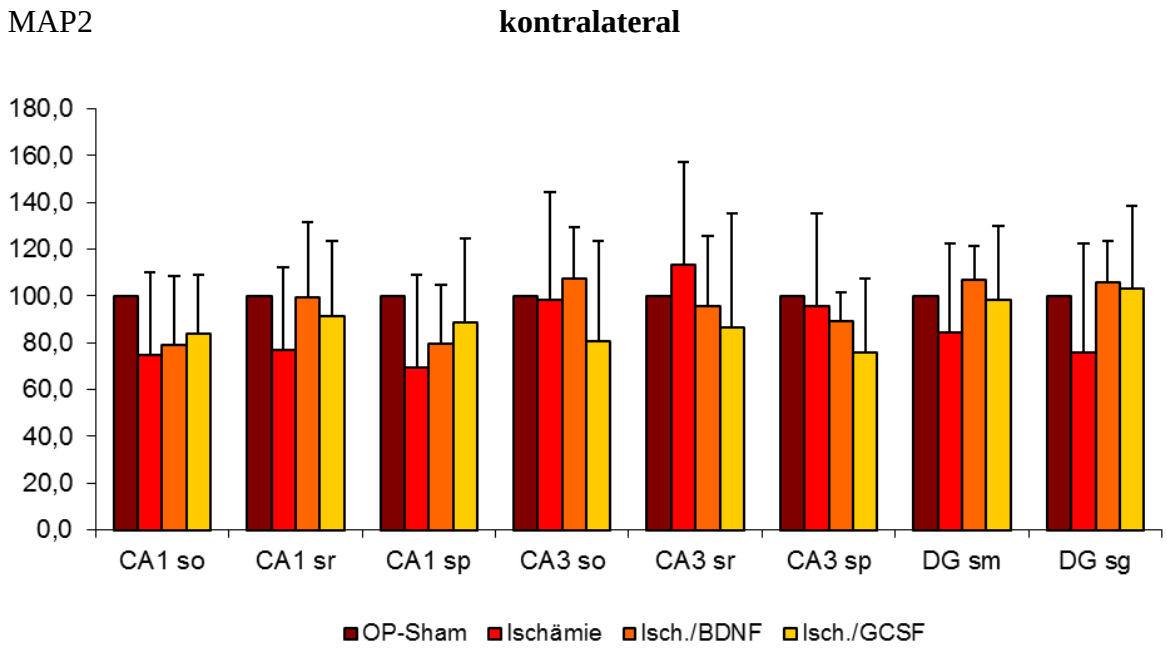


Abb. 29: *Semiquantitative Auswertung der Immunreaktivität (IR) im kontralateralen Hippocampus für Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2 (MAP2) bei den Ischämie-Tieren. (*: signifikant, $p < 0.05$; „analysis of variance" (ANOVA) all pairwise und Bonferroni error protection)*

3.6. Synaptophysin

3.6.1. Cortex

Die IR von Synaptophysin war durchgehend in allen Cortexschichten der Sham-behandelten oder völlig unbehandelten Kontrolltiere zu finden. Weder BDNF noch G-CSF induzierte auffallende Veränderungen in der Proteinexpression von Synaptophysin bei Tieren ohne photothrombotische Läsion (Abb. 30). Sechs Wochen nach photothrombotischer Ischämie kam es allerdings in der BDNF-Gruppe zu einem Anstieg der IR von Synaptophysin im Läsionssaum. Im Periläsionssaum und dem korrespondierenden Cortex auf der kontralateralen Seite blieb die Synaptophysin-Proteinexpression in allen Untersuchungsgruppen unverändert (Abb. 31).

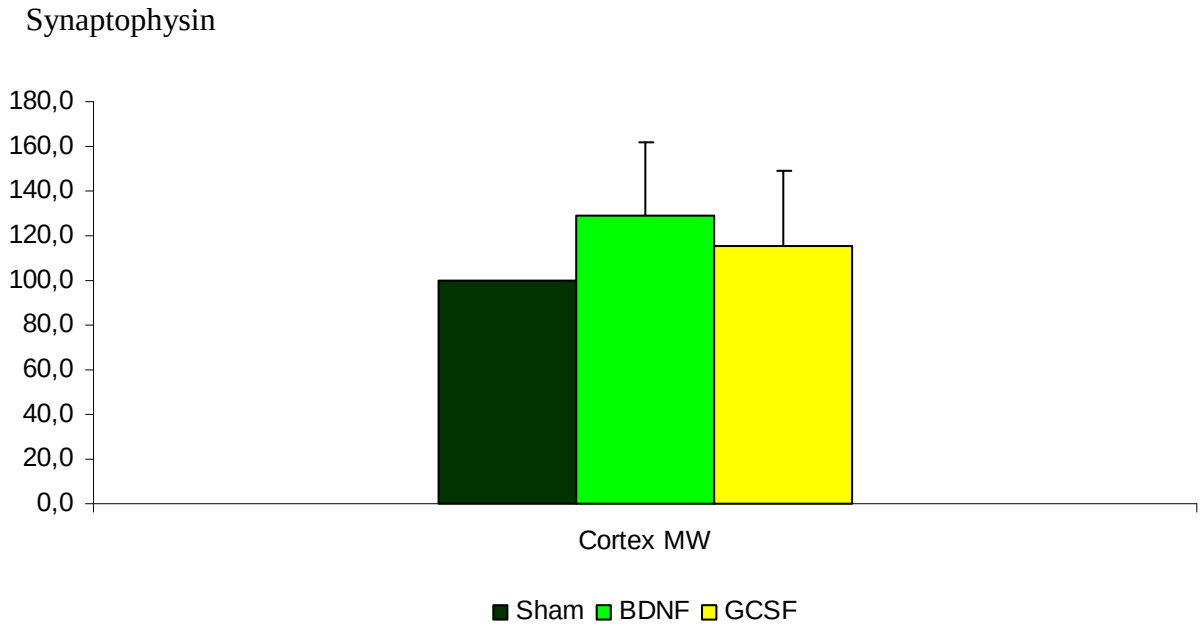


Abb. 30: *Semiquantitative Auswertung der kortikalen Immunreaktivität (IR) für Synaptophysin bei den Sham-Tieren. (*: signifikant, p < 0.05; „analysis of variance“ (ANOVA) all pairwise und Bonferroni error protection)*

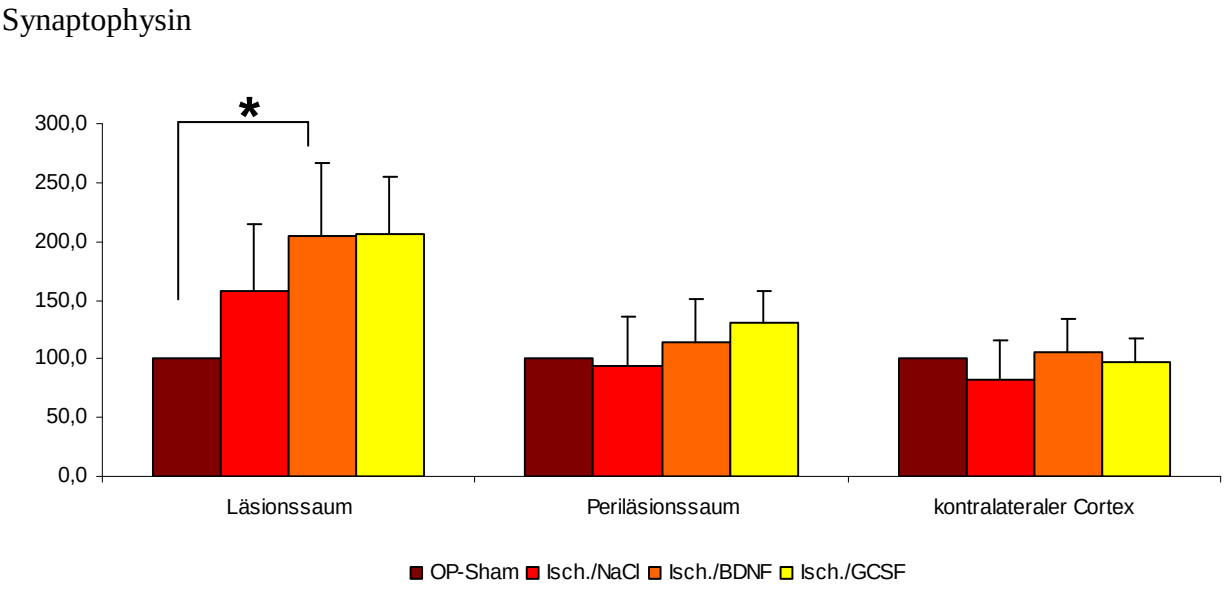


Abb. 31: *Semiquantitative Auswertung der kortikalen Immunreaktivität (IR) von Synaptophysin bei den Ischämie-Tieren. (*: signifikant, p < 0.05; „analysis of variance” (ANOVA) all pairwise und Bonferroni error protection)*

3.6.2. Hippocampus

Im Hippocampus waren keine signifikanten Unterschiede zwischen BDNF- und G-CSF behandelten Sham-operierten Ratten vorhanden. (Abb. 32) Auch die Photothrombose führte zu keiner signifikanten Veränderung der IR von Synaptophysin im Hippocampus zwischen den verschiedenen Ischämie-Untersuchungsgruppen, weder ipsi- noch kontralateral zur Läsionsseite (Abb. 33, Abb. 34).

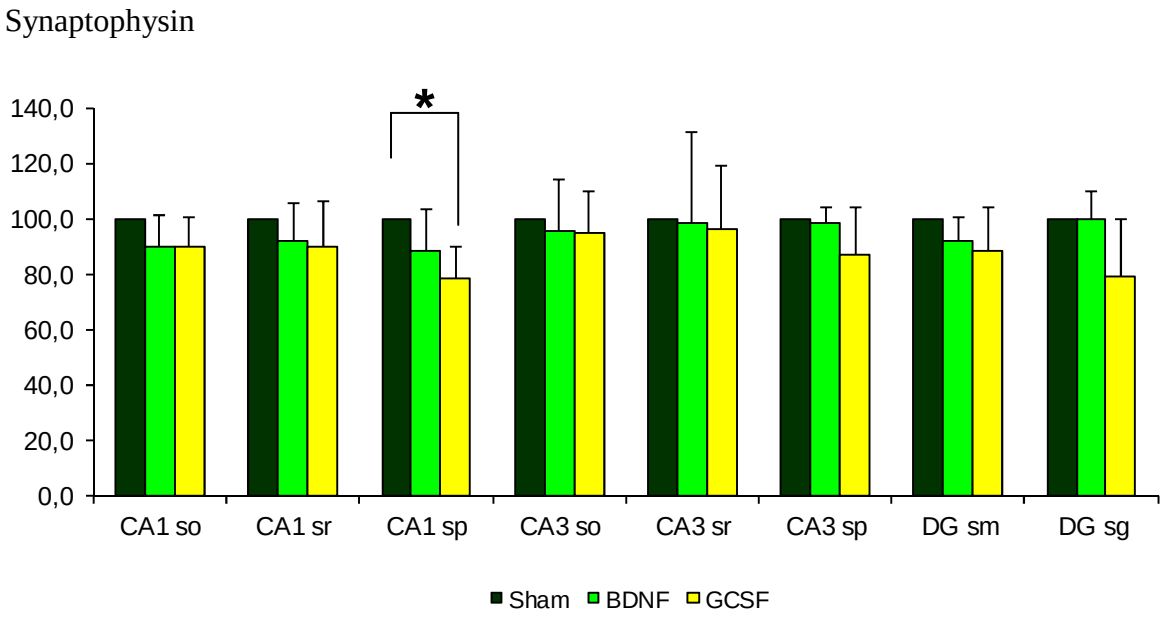


Abb. 32: *Semiquantitative Auswertung der Immunreaktivität (IR) im Hippocampus für Synaptophysin bei den Sham-Tieren. (*: signifikant, $p < 0.05$; „analysis of variance“ (ANOVA) all pairwise und Bonferroni error protection)*

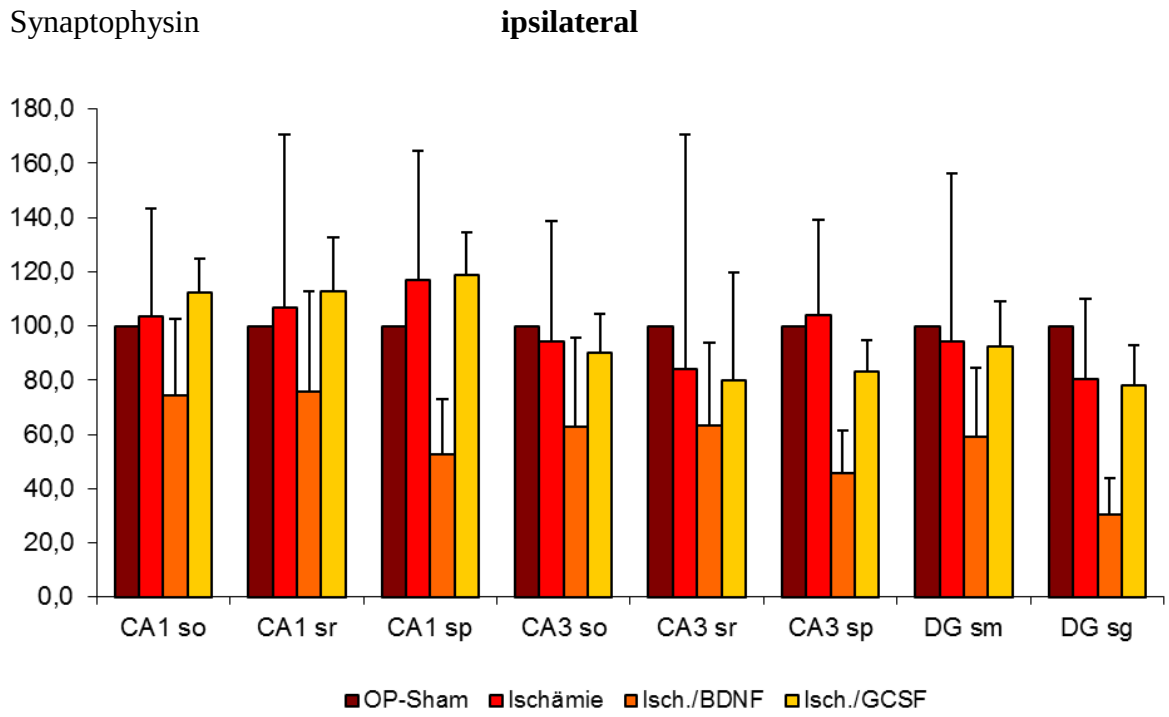


Abb. 33: *Semiquantitative Auswertung der Immunreaktivität (IR) im ipsilateralen Hippocampus für Synaptophysin bei den Ischämie-Tieren. (*: signifikant, p < 0.05; „analysis of variance“ (ANOVA) all pairwise und Bonferroni error protection)*

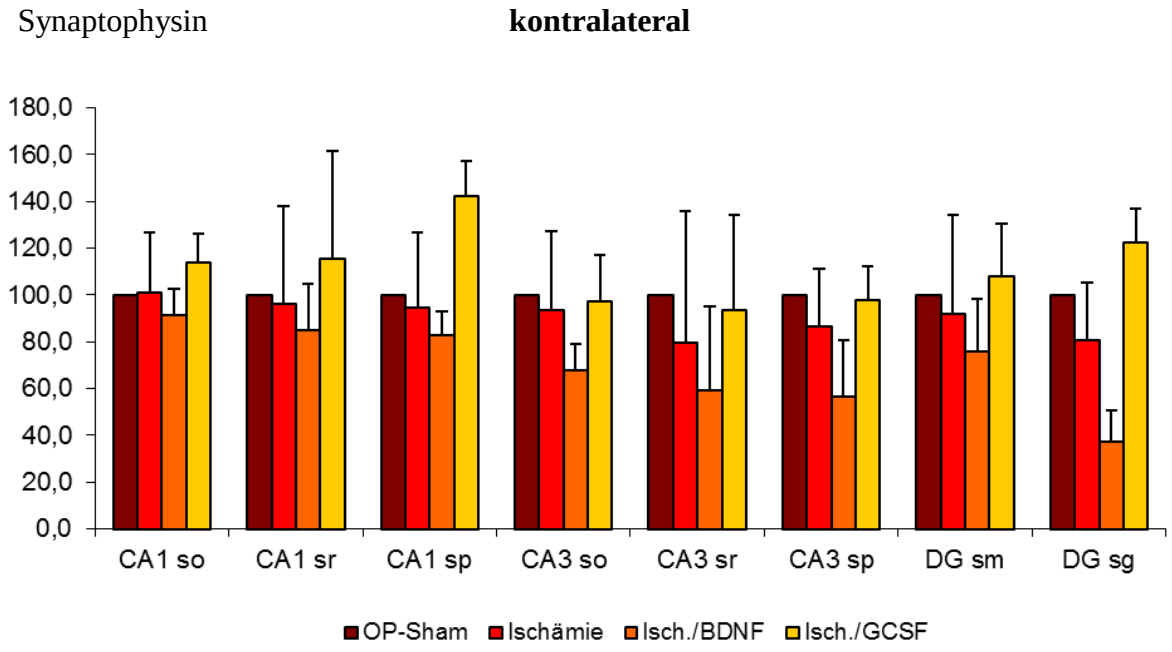


Abb. 34: *Semiquantitative Auswertung der Immunreaktivität (IR) im kontralateralen Hippocampus für Synaptophysin bei den Ischämie-Tieren. (*: signifikant, p < 0.05; „analysis of variance“ (ANOVA) all pairwise und Bonferroni error protection)*

4. Diskussion

4.1. Modulation des glutamatergen und GABAergen Systems durch BDNF und G-CSF 6 Wochen nach photothrombotisch induzierter zerebraler Ischämie

Neben ihrem neuroprotektiven Potenzial wurde sowohl für BDNF als auch G-CSF bereits demonstriert, dass sie auch neuroregenerative Effekte in der chronischen Phase nach einer fokalen zerebralen Ischämie aufweisen. (Schäbitz et al., 2004; Müller et al., 2008; Schneider et al., 2005) In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die Gabe dieser Wachstumsfaktoren die postischämische Proteinexpression repräsentativer Untereinheiten exzitatorischer Glutamat- oder inhibitorischer $GABA_A$-Rezeptoren im primär unbeschädigten Gewebe, in der Umgebung der Läsionsstelle oder in daran unmittelbar angrenzende ipsilaterale sowie korrespondierende kontralaterale Hirnregionen im Vergleich zu Sham- und Ischämie-Kontrollen modifiziert. Ebenso wurde die postischämische Proteinexpression dieser Untereinheiten im ipsi- und kontralateralen Hippocampus untersucht.

Die semiquantitative Analyse der Immunreaktivität der verschiedenen Rezeptoruntereinheiten ließ in den untersuchten Cortex-Regionen zwischen den einzelnen Untersuchungsgruppen keine signifikanten Unterschiede erkennen. Im CA3-Sektor des Hippocampus wurde die α2-Untereinheit des $GABA_A$-Rezeptors durch BDNF ipsi- und kontralateral nach sechs Wochen herunterreguliert, wobei jedoch nur im kontralateralen Hippocampus Signifikanzniveau erreicht wurde (Abb. 16, Abb. 17). Ferner wurde die NR1-Untereinheit des NMDA-Rezeptors im kontralateralen Gyrus dentatus bei den mit BDNF behandelten Tieren im Vergleich zu einer G-CSF-Behandlung signifikant herunterreguliert (Abb. 7).

Es ist bekannt, dass fokale kortikale Infarkte ausgedehnte und lang anhaltende Veränderungen des GABAergen Systems verursachen, was zu einer verminderten postischämischen Inhibition führt, (Buchkremer-Ratzmann et al., 1996; Buchkremer-Ratzmann & Witte, 1997; Redecker et al., 2002; Reinecke et al., 1999), die zusätzlich die exzitotoxische Nervenzellschädigung in der Akutphase potenziert (Que et al., 1999; Qü et al., 1998; Schiene et al., 1996) und das Risiko für die Entstehung epileptischer Anfälle in der chronischen Phase nach Ischämie erhöht. (Karhunen et al., 2007) Wie erst kürzlich

von Frahm und Kollegen gezeigt wurde, ist diese Reduktion der Inhibition weder auf den Verlust GABAerger Neurone (Frahm et al., 2004b) noch auf eine geänderte Expression des GABA-Transporters zurückzuführen. (Frahm et al., 2004a; Frahm et al., 2006) Wir konnten in unserer Arbeitsgruppe in einer vorausgegangenen Studie, bei der das gleiche Ischämiemodell verwendet wurde, mittels Rezeptorautoradiographie zeigen, dass die kortikale Liganden-Bindungsdichte von Musimol, das die Gesamtanzahl der $GABA_A$-Rezeptoren markiert, weder abfiel noch sich bei BDNF-behandelten Ratten von den Ischämie-Kontroll-Tieren unterschied. (Müller et al., 2008) Dennoch schließen diese Ergebnisse eine veränderte postischämische Funktion des $GABA_A$-Rezeptors in Folge einer veränderten Untereinheitenzusammensetzung nicht aus. Unsere Ergebnisse decken sich mit Ergebnissen einer Studie von Neumann-Haefelin und Mitarbeitern (Neumann-Haefelin et al., 1998), die zeigte, dass die kortikale Immunreaktivität der α2-Untereinheit bei Ratten nach photochemisch induziertem Infarkt weitgehend unverändert bleibt, abgesehen von einer schwachen Reduktion ipsilateral zur ischämischen Läsion in einigen Abschnitten. Obwohl die α2-Untereinheit ein integraler Bestandteil der meisten funktionalen $GABA_A$-Rezeptoren ist, können andere mögliche Veränderungen der Untereinheitenzusammensetzung des $GABA_A$-Rezeptors nicht ausgeschlossen werden. Immerhin besteht die Familie der Untereinheiten aus mindestens 15 verschiedenen Untereinheiten. Bei einer pentameren Rezeptorarchitektur ist zumindest theoretisch eine Unmenge von Kombinationen denkbar. (Moss and Smart, 2001)

In der Hippocampusformation war hingegen sechs Wochen nach photothrombotischem Infarkt eine postischämische Reduktion der α2-Untereinheit des $GABA_A$-Rezeptors zu erkennen, mit signifikanten Werten im CA1-Sektor und im Gyrus dentatus des kontralateralen Hippocampus. (Neumann-Haefelin et al., 1998) Korrespondierend zu diesen Ergebnissen war die IR der α2-Untereinheit des $GABA_A$-Rezeptors in unserer vorliegenden Arbeit ebenso in den hippocampalen Sektoren CA1 und DG reduziert. Nur die Behandlung mit BDNF verursachte jedoch eine signifikante Reduktion im Vergleich zu mit Kochsalz- und G-CSF behandelten Ratten mit Ischämie im kontralateralen CA3-Sektor des Hippocampus (Abb. 17, Abb. 18). Die ipsilaterale Herrunterregulation war in gleicher Größenordnung ohne jedoch Signifikanzniveau zu erreichen. Berücksichtigt man, dass die α2-haltigen $GABA_A$-Rezeptoren im Hippocampus sehr dicht gepackt und zahlreich an den Synapsen des Initialsegmentes des Axons von Pyramidenzellen vorhanden sind (Nusser et al., 1996; Fritschy et al., 1998), was auf eine strategisch entscheidende Position bei der Hemmumg der Entstehung von Aktionspotenzialen in

diesen Neuronen hindeutet (Miles et al., 1996; Maccaferri et al., 2000; Megias et al., 2001), dann könnte die postischämische Herunterregulation genau dieser Untereinheit durch BDNF die neuronalen Schaltkreise im Hippocampus wesentlich modifizieren und zu Nebeneffekten wie etwa einer auf lange Sicht erhöhten Epileptogenese führen, was in zukünftigen Studien noch untersucht werden muss. Auf der anderen Seite könnte die gleichzeitige Herunterregulation der NR1-Untereinheit des NMDA-Rezeptors im kontralateralen Gyrus Dentatus (Abb. 7) der reduzierten Inhibition entgegenwirken.
Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass BDNF und G-CSF zu spezifischen Unterschieden in der Proteinexpression hippocampaler Rezeptoren führen, was wenigstens teilweise unterschiedliche neuroregenerative Pathways nahe legt.

4.2. Modulation der Proteinexpression Plastizitätsassoziierter Markerproteine 6 Wochen nach ischämischer Hirnläsion durch BDNF und G-CSF

Im zweiten Teil der vorliegenden Studie untersuchten wir potenzielle durch BDNF versus G-CSF induzierte Unterschiede in der postischämischen Reorganisation, wobei MAP1B, MAP2 und Synaptophysin als molekulare Marker für neuronale und synaptische Plastizität verwendet wurden.
Während die IR für MAP2 in allen Versuchsgruppen unverändert blieb, führte die Behandlung mit BDNF sechs Wochen nach photothrombotischer Ischämie im Vergleich zur mit G-CSF behandelten Tiergruppe zu einer signifikant vermehrten Immunfärbung von MAP1B im Läsionssaum (Abb. 20, Abb. 21). Dies ist in mehrfacher Hinsicht ein interessanter Befund. Sowohl für BDNF als auch G-CSF konnte gezeigt werden, dass sie die Neurogenese fördern und das funktionelle Outcome nach experimentell verursachtem Hirninfarkt verbessern. (Schäbitz et al., 2007; Schneider et al., 2005) Für den Wachstumsfaktor BDNF konnte gezeigt werden, dass er das dendritische Wachstum in vitro fördert (Horch et al., 2002), wohingegen bislang Daten fehlen, die auf einen vergleichbaren Effekt von G-CSF hinweisen würden. Erst vor kurzem wurde in einer Studie gezeigt, dass exogen zugeführtes BDNF vorübergehend die IR von MAP1B im Periläsionssaum nach photothrombotischer Ischämie erhöht, was mit einer verbesserten Erholung motorischer Funktionen verknüpft war. (Schäbitz et al., 2004) Die lang anhaltende periläsionale Hochregulation von MAP1B in der BDNF-Gruppe in der vorliegenden Studie bestätigt diese eben genannten Resultate nochmals. Die Spezifität dieses Befundes wird dadurch hervorgehoben, dass es keine signifikanten Veränderungen

von MAP2 gab. MAP2, das als „spätes“ MAP gilt, soll bei der Stabilisierung und dem Erhalt synaptischer Kreisläufe im reifen Hirn beteiligt sein. (Tucker, 1990)

Die synaptische Reorganisation nach Hirninfarkt ist für die Verbesserung des funktionellen Outcomes unabdingbar. Ein hilfreicher Marker um eine erhöhte Synaptogenese zu bestimmen ist das präsynaptisch lokalisierte Vesikelprotein Synaptophysin. Da man annimmt, dass die Synaptophysinmenge in den Nervenendigungen konstant bleibt (Südhof & Jahn, 1991), kann man sie idealerweise verwenden um die Anzahl der Nervenendigungen quantitativ zu erfassen. (Masliah et al., 1991, LeClerc et al., 1989) Die erhöhte Synaptophysinprotein-Expression in der ischämischen Randzone ist assoziiert mit einem verbesserten funktionellen Outcome und kann nach Behandlung mit ganz unterschiedlichen Neuroprotektiva und / oder neuroregenerativen Substanzen wie Anti-Oxidantien, Statinen oder Stromazellen des Knochenmarks nachgewiesen werden. (Gonzales-Perez et al., 2002; Chen et al., 2003; Zhang et al., 2006) Interessanterweise konnte kürzlich gezeigt werden, dass der plastizitätsfördernde Effekt von Atorvastatin nach ischämischem Schlaganfall bei Mäusen durch die Induktion von VEGF und BDNF vermittelt wird. (Chen et al., 2005) Diese Ergebnisse werden hinsichtlich der erhöhten IR von Synaptophysin im Läsionssaum in der BDNF-behandelten Tiergruppe von unseren aktuellen Daten bekräftigt (Abb. 31). Betrachtet man jedoch MAP1B, das bereits in der Sham-Gruppe durch die alleinige Gabe von G-CSF signifikant herunterreguliert war, dann kann postuliert werden, dass die G-CSF induzierte postischämische Hirnplastizität andere Pathways als BDNF einbezieht, welche nichtsdestotrotz zu ähnlichen Ergebnissen hinsichtlich des funktionellen Outcomes führen.

.

4.3. Schlussfolgerungen

BDNF nicht jedoch G-CSF führte sechs Wochen nach photothrombotischer Ischämieinduktion zu einer reduzierten Proteinexpression der NR1-Untereinheit des NMDA-Rezeptors und der alpha2-Untereinheit des $GABA_A$-Rezeptors im Hippocampus.

Die postischämische Herunterregulation der alpha2-Untereinheit des $GABA_A$-Rezeptors im Hippocampus durch BDNF könnte die Erregungsmuster im Hippocampus wesentlich modifizieren und langfristig zu Nebeneffekten wie einer erhöhten Epileptogenese führen. Das müsste allerdings Untersuchungsgegenstand zukünftiger Studien sein. Auf der anderen Seite könnte die gleichzeitige Herunterregulation der NR1-Untereinheit des NMDA-Rezeptors im kontralateralen Gyrus Dentatus der reduzierten Inhibition entgegenwirken. Insofern ließe sich in diesem Kontext lediglich eine Arbeitshypothese für weiter führende Studien aufstellen.

Desweiteren führte im unmittelbar an den Infarkt grenzenden kortikalen Gewebe nur BDNF - verglichen mit G-CSF - zu einer erhöhten Proteinexpression von MAP1B, einem Marker für neuronale Plastizität.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sowohl BDNF als auch G-CSF das postischämische funktionelle Outcome in ähnlichem Ausmaß verbessern. Die exogene Verabreichung dieser Wachstumsfaktoren führt aber, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, zu unterschiedlichen strukturellen Reorganisationsprozessen. Daher kann postuliert werden, dass BDNF und G-CSF unterschiedliche Pathways aktivieren, die jedoch letztlich mit einem ähnlich verbesserten klinisch-neurologischen Endergebnis vergesellschaftet sind.

5. Zusammenfassung

Die Inzidenz des Schlaganfalls wird in den Industrieländern mit der absehbaren demographischen Entwicklung in den kommenden Jahren noch zunehmen. Schon heute ist der Schlaganfall die häufigste Ursache dauerhafter Behinderung und in den Industrieländern die teuerste Krankheit überhaupt. Da die Thrombolyse in der Akutphase allerdings stets einer begrenzten Patientenklientel vorbehalten sein wird, gilt die Suche nach Faktoren, die die Regeneration in der chronischen Phase fördern, als wichtiger Forschungsgegenstand. Es ist bekannt, dass die Wachstumsfaktoren „brain-derived neurotrophic factor“ (BDNF) und „granulocyte-colony stimulating factor” (G-CSF) in der Akutphase nach zerebralem Infarkt im Tiermodell neuroprotektiv wirksam sind, was z.B. zu einer deutlichen Reduktion des Infarktvolumens führt. Neben einer Aktivierung anti-apoptotischer Pathways verhindern sowohl BDNF als auch G-CSF postischämisch Störungen im „γ-aminobutyric acid“- (GABA)-ergen System und wirken damit einer Verschiebung in Richtung Exzitotoxizität und somit dem neuronalen Zelltod entgegen. Obwohl man mittlerweile weiß, dass die Vorgänge in der chronischen Phase nach zerebralem Infarkt anders gelagert sind, gibt es bislang wenige Untersuchungen zur langfristigen Modulation exzitatorischer und inhibitorischer Neurotransmitterrezeptoren. Da die Wachstumsfaktoren BDNF und G-CSF auch in der Reorganisationsphase nach zerebralem Infarkt die Neuroregeneration und das klinische / funktionelle Outcome verbessern, wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, inwiefern die Modulation verschiedener Neurotransmitterrezeptoren sowie verschiedener Plastizitätsassoziierter Markerproteine dabei eine Rolle spielt.

Hierzu wurde das Modell der photochemisch induzierten fokalen Ischämie im parietalen Kortex bei männlichen Wistar-Ratten angewandt. Den Tieren wurde anschließend jeweils Natriumchlorid (NaCl), BDNF oder G-CSF verabreicht. Die Tiere wurden sechs Wochen nach dem photothrombotischen Ereignis getötet und ihre Gehirne sofort zur weiteren Verarbeitung entnommen. Dann wurde jeweils die postischämische Proteinexpression der N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptoruntereinheit 1 (NMDA-Rezeptoruntereinheit NR1), der α-Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure-Rezeptoruntereinheit 1 (AMPA-Rezeptoruntereinheit GluR1) und der alpha2-Untereinheit des $GABA_A$-Rezeptors im Randsaum der Läsion („ischemic border zone“), dem sich unmittelbar anschließenden Kortexareal oder Periläsionssaum („adjacent cortex“) und dem korrespondierenden kontralateralen Kortexbereich semiquantitativ bestimmt. Analog hierzu wurde die Proteinexpression dieser Untereinheiten auch im Hippocampus ipsi- und kontralateral im

Stratum pyramidale, Stratum radiatum und Stratum oriens in den Hippocampusregionen „Cornu ammonis“ 1 und 3 (CA1 und CA3) wie auch im Stratum moleculare und Stratum granulare des Gyrus dentatus gemessen. Die strukturelle Plastizität wurde mittels Antikörpern gegen Mikrotubuli-assoziiertes Protein 1B (MAP1B), Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2 (MAP2) und Synaptophysin immunhistochemisch analysiert und ebenfalls semiquantitativ ausgewertet.
Als wesentliches Ergebnis zeigte sich, dass BDNF- nicht jedoch G-CSF-Gabe sechs Wochen nach photothrombotischer Ischämieinduktion eine reduzierte Proteinexpression der NR1-Untereinheit des NMDA-Rezeptors und der alpha2-Untereinheit des $GABA_A$-Rezeptors im Hippocampus verursachte. Desweiteren führte im unmittelbar an den Infarkt grenzenden kortikalen Gewebe nur BDNF - verglichen mit G-CSF - zu einer erhöhten Proteinexpression von MAP1B, einem Marker für neuronale Plastizität.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sowohl BDNF als auch G-CSF das postischämische funktionelle Outcome in ähnlichem Ausmaß verbessern. Die exogene Verabreichung dieser Wachstumsfaktoren führt aber, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, zu unterschiedlichen strukturellen Reorganisationsprozessen. Daher kann postuliert werden, dass BDNF und G-CSF unterschiedliche Pathways aktivieren, die jedoch letztlich mit einem ähnlich verbesserten klinisch-neurologischen Endergebnis vergesellschaftet sind.

6. Literaturverzeichnis

1. Adams H, Adams R, Del Zoppo G, Goldstein LB (2005) Guidelines for the early management of patients with ischemic stroke: 2005 guidelines update: a scientific statement from the Stroke Council of the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*; 36: 916–923

2. Adams JM, Cory S (1998) The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science;* 281: 1322–1326

3. Akaneya Y, Tsumoto T, Kinoshita S, Hatanaka H (1997) Brain-derived neurotrophic factor enhances long-term potentiation in rat visual cortex. *J Neurosci*; 17: 6707-6716

4. Aizawa H, Murofushi H, Kotani S, Hisanaga S, Hirokawa N, and Sakai H (1987) Limited chymotryptic digestion of bovine adrenal 190,000-Mr microtubule- associated protein and preparation of a 27,000-Mr fragment which stimulates microtubule assembly. *J Biol Chem;* 262: 3782–3787

5. Aloyz RS, Bamji SX, Pozniak CD, Toma JG, Atwal J, Kaplan DR, Miller FD (1998) p53 is essential for developmental neuron death as regulated by the TrkA and p75 neurotrophin receptors. *J Cell Biol*; 143: 1691-1703

6. Anderson CN, Tolkovsky AM (1999) A role for MAPK/ERK in sympathetic neuron survival: protection against a p53-dependent, JNK-independent induction of apoptosis by cytosine arabinoside. *J Neurosci*; 19: 664-673

7. Barbacid M (1995) Structural and functional properties of the TRK family of neurotrophin receptors. *Ann N Y Acad Sci*; 766: 442-458

8. Barth TM, Grant ML, Schallert T (1990) Effects of MK-801 on recovery from sensorimotor cortex lesions. *Stroke*; 21: III153-157

9. Begley CG, Lopez AF, Nicola NA, Warren DJ, Vadas MA, Sanderson CJ, Metcalf D (1986) Purified colony-stimulating factors enhance the survival of human neutrophils and eosinophils in vitro: a rapid and sensitive microassay for colony-stimulating factors. *Blood*; 68: 162-166

10. Beneyto M, Meador-Woodruff JH (2004) Expression of transcripts encoding AMPA receptor subunits and associated postsynaptic proteins in the macaque brain. *J Comp Neurol*; 468: 530-554

11. Benraiss A, Chmielnicki E, Lerner K, Roh D, Goldman SA (2001) Adenoviral brain-derived neurotrophic factor induces both neostriatal and olfactory neuronal recruitment from endogenous progenitor cells in the adult forebrain. *J Neurosci*; 21: 6718–6731

12. Bernard V, Somogyi P, Bolam JP (1997) Cellular, subcellular, and subsynaptic distribution of AMPA-type glutamate receptor subunits in the neostriatum of the rat. *J Neurosci*; 17: 819-833

13. Bibel M, Barde YA (2000) Neurotrophins: key regulators of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system. *Genes Dev*; 14: 2919-2937

14. Biegon A, Fry PA, Paden CM, Alexandrovich A, Tsenter J, Shohami E (2004) Dynamic changes in N-methyl-D-aspartate receptors after closed head injury in mice: Implications for treatment of neurological and cognitive deficits. *Proc Natl Acad Sci USA*; 101: 5117-5122.

15. Black MM, Slaughter T, Fischer I (1994) Microtubule-associated protein 1B (MAP1B) is concentrated in the distal region of growing axons. *J Neurosci;* 14: 857-870

16. Bloom G, Luca F, Vallee R (1985) Microtubule-associated protein 1B: identification of a major component of the neuronal cytoskeleton. *Proc Natl Acad Sci USA;* 82: 5404-5408

17. Bogdanov MB, Wurtman RJ (1997) Possible involvement of nitric oxide in NMDA-induced glutamate release in the rat striatum: an in vivo microdialysis study. *Neurosci Lett*; 221: 197-201

18. Bowery NG, Bettler B, Froestl W, Gallagher JP, Marshall F, Raiteri M, Bonner TI, Enna SJ (2002) International Union of Pharmacology. XXXIII. Mammalian gamma-aminobutyric acid (B) receptors: structure and function. *Pharmacol Rev*; 54: 247-264

19. Bowie D, Mayer ML (1995) Inward rectification of both AMPA and kainate subtype glutamate receptors generated by polyamine-mediated ion channel block. *Neuron*; 15: 453-462

20. Buchholzer ML, Klein J (2002) NMDA-induced acetylcholine release in mouse striatum: role of NO synthase isoforms. *J Neurochem*; 82: 1558-1560

21. Buchkremer-Ratzmann I, August M, Hagemann G, Witte OW (1996) Electrophysiological transcortical diaschisis after cortical photothrombosis in rat brain. *Stroke;* 27: 1105-1109

22. Buchkremer-Ratzmann I, Witte OW (1997) Extended brain disinhibition following small photothrombotic lesions in rat frontal cortex. *Neuroreport;* 8: 519-522

23. Burgess AW, Metcalf D (1980) Characterization of a serum factor stimulating the differentiation of myelomonocytic leukemic cells. *Int J Cancer*; 26: 647-654

24. Burns RG, Islam K, Chapman R (1984) The multiple phosphorylation of the microtubule-associated protein MAP2 controls the MAP2:tubulin interaction. *Eur J Biochem;* 141: 609–615

25. Caceres A, Binder LI, Payne MR, Bender P, Rebhun L, Steward O (1984) Differential subcellular localization of tubulin and the microtubule-associated

protein MAP2 in brain tissue as revealed by immunocytochemistry with monoclonal hybridoma antibodies. *J Neurosci*; 4: 394–410

26. Chao MV (1994) The p75 neurotrophin receptor. *J Neurobiol*; 25: 1373-1385

27. Chao MV, Hempstead BL (1995) p75 and Trk: a two-receptor system. *Trends Neurosci*; 18: 321-326

28. Chen J, Zhang ZG, Li Y, Wang Y, Wang L, Jiang H, Zhang C, Lu M, Katakowski M, Feldkamp CS, Chopp M (2003) Statins induce angiogenesis, neurogenesis, and synaptogenesis after stroke. *Ann Neurol;* 53: 743-751; (2005) Erratum in: *Ann Neurol;* 58: 818

29. Chen J, Zhang C, Jiang H, Li Y, Zhang L, Robin A, Katakowski M, Lu M, Chopp M (2005) Atorvastatin induction of VEGF and BDNF promotes brain plasticity after stroke in mice. J Cereb Blood Flow Metab; 25: 281-290

30. Chen R, Cohen LG, Hallett M (2002) Nervous system reorganization following injury. *Neuroscience*; 111: 761-773

31. Ciabarra AM, Sullivan JM, Gahn LG, Pecht G, Heinemann S, Sevarino KA (1995) Cloning and characterization of chi-1: a developmentally regulated member of a novel class of the ionotropic glutamate receptor family. *J Neurosci*; 15: 6498-6508

32. Danysz W, Zajaczkowski W, Parsons CG (1995) Modulation of learning processes by ionotropic glutamate receptor ligands. *Behav Pharmacol*; 6: 455-474

33. Danysz W, Parsons CG (1998) GlycineB recognition site of NMDA receptors and its antagonists. *Amino Acids*; 14: 205-206

34. Das KP, Chao SL, White LD, Haines WT, Harry GJ, Tilson HA, Barone S Jr (2001) Differential patterns of nerve growth factor, brain-derived neurotrophic

factor and neurotrophin-3 mRNA and protein levels in developing regions of rat brain. *Neuroscience*; 103: 739-761

35. Das S, Sasaki YF, Rothe T, Premkumar LS, Takasu M, Crandall JE, Dikkes P, Conner DA, Rayudu PV, Cheung W, Chen HS, Lipton SA, Nakanishi N (1998) Increased NMDA current and spine density in mice lacking the NMDA receptor subunit NR3A. *Nature*; 393: 377-381

36. Davis RJ (2000) Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell*; 103: 239-52

37. Dawson DA, Hallenbeck JM (1996) Acute focal ischemia-induced alterations in MAP2 immunostaining: description of temporal changes and utilization as a marker for volumetric assessment of acute brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab*; 16: 170–174

38. de Blas AL, Vitorica J, Friedrich P (1988) Localization of the $GABA_A$ receptor in the rat brain with a monoclonal antibody to the 57,000 Mr peptide of the $GABA_A$ receptor/benzodiazepine receptor/Cl- channel complex. *J Neurosci*; 8: 602-614

39. Deckel AW, Tang V, Nuttal D, Gary K, Elder R (2002) Altered neuronal nitric oxide synthase expression contributes to disease progression in Huntington's disease transgenic mice. *Brain Res*; 939: 76-86

40. DeLorey TM, Olsen RW (1992) Gamma-aminobutyric acidA receptor structure and function. *J Biol Chem*; 267: 16747-16750

41. Dingledine R, Borges K, Bowie D, Traynelis SF (1999) The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev*; 51: 7-61

42. Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA (1999) Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci*; 22: 391-397

43. Domann R, Hagemann G, Kraemer M, Freund HJ, Witte OW (1993) Electrophysiological changes in the surrounding brain tissue of photochemically induced cortical infarcts in the rat. *Neurosci Lett;* 155: 69-72

44. Doyle KP, Simon RP, Stenzel-Poore MP (2008) Mechanisms of ischemic brain damage. *Neuropharmacology*; 55: 310-318

45. Dudek H, Datta SR, Franke TF, Birnbaum MJ, Yao R, Cooper GM, Segal RA, Kaplan DR, Greenberg ME (1997) Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. *Science*; 275: 661-665

46. Ebendal T (1992) Function and evolution in the NGF family and its receptors *J Neurosci Res*; 32: 461–470

47. Ernfors P, Ibanez CF, Ebendal T, Olson L, Persson H (1990) Molecular cloning and neurotrophic activities of a protein with structural similarities to nerve growth factor: developmental and topographical expression in the brain. *Proc Natl Acad Sci USA*; 87: 5454–5458

48. Eysel UT, Schmidt-Kastner R (1991) Neuronal dysfunction at the border of focal lesions in cat visual cortex. *Neurosci Lett;* 131: 45-48

49. Feuerstein GZ, Wang X, Barone FC (1998) Inflammatory mediators and brain injury: the role of cytokines and chemokines in stroke and CNS diseases. In: Ginsberg MD, Bogousslavsky J, eds. *Cerebrovascular Disease: Pathophysiology, Diagnosis, and Management.* Boston, Mass: Blackwell Science; 1: 507-531

50. Fitzgerald LW, Deutch AY, Gasic G, Heinemann SF, Nestler EJ (1995) Regulation of cortical and subcortical glutamate receptor subunit expression by antipsychotic drugs. *J Neurosci*; 15: 2453-2461

51. Figurov A, Pozzo-Miller LD, Olafsson P, Wang T, Lu B (1996) Regulation of synaptic responses to high-frequency stimulation and LTP by neurotrophins in the hippocampus. *Nature*; 381: 706-709

52. Frahm C, Haupt C, Weinandy F, Siegel G, Bruehl C, Witte OW (2004a) Regulation of GABA transporter mRNA and protein after photothrombotic infarct in rat brain. *J Comp Neurol;* 478: 176-188

53. Frahm C, Haupt C, Witte OW (2004b) GABA neurons survive focal ischemic injury. *Neuroscience;* 127: 341-346

54. Frahm C, Siegel G, Grass S, Witte OW (2006) Stable expression of the vesicular GABA transporter following photothrombotic infarct in rat brain. *Neuroscience;* 140: 865-877

55. Frampton JE, Lee CR, Faulds D (1994) Filgrastim. A review of its pharmacological properties and therapeutic efficacy in neutropenia. *Drugs*; 48: 731-760

56. Franciosi S (2001) AMPA receptors: potential implications in development and disease. *Cell Mol Life Sci*; 58: 921-930

57. Francon J, Lennon AM, Fellous A, Mareck A, Pierre M, Nunez J (1982) Heterogeneity of microtubule-associated proteins and brain development. *Eur J Biochem;* 129: 465–471

58. Friedman WJ (2000) Neurotrophins induce death of hippocampal neurons via the p75 receptor. *J Neurosci*; 20: 6340-6346

59. Fritschy JM, Johnson DK, Mohler H, Rudolph U (1998) Independent assembly and subcellular targeting of $GABA_A$-receptor subtypes demonstrated in mouse hippocampal and olfactory neurons in vivo. *Neurosci Lett;* 249: 99-102

60. Gardoni F, Pagliardini S, Setola V, Bassanini S, Cattabeni F, Battaglia G, Di Luca M (2003) The NMDA receptor complex is altered in an animal model of human cerebral heterotopia. *J Neuropathol Exp Neuro;* 62: 662-675

61. Gonzalez-Perez O, Gonzalez-Castañeda RE, Huerta M, Luquin S, Gomez-Pinedo U, Sanchez-Almaraz E, Navarro-Ruiz A, Garcia-Estrada J (2002) Beneficial effects of alpha-lipoic acid plus vitamin E on neurological deficit, reactive gliosis and neuronal remodeling in the penumbra of the ischemic rat brain. *Neurosci Lett;* 321: 100-104

62. Gottlieb RA, Murphy DB (1985) Analysis of the microtubule-binding domain of MAP2. *J Cell Biol*; 101: 1782–1789

63. Graham SH, Chen J, Clark RS (2000) Bcl-2 family gene products in cerebral ischemia and traumatic brain injury. *J Neurotrauma*; 17: 831-841

64. Greene, LA, Liem RKH, and Shelanski ML (1983) Regulation of a high molecular weight microtubule-associated protein in PC12 cells by nerve growth factor. *J Cell Biol;* 96: 76-83

65. Hammarback, JA, Obar RA, Hughes SM and Vallee RB (1991) MAP1B is encoded as a polyprotein that is processed to form a complex N-terminal microtubule-binding domain. *Neuron;* 7: 129-139

66. Hardingham GE, Bading H (2003) The Yin and Yang of NMDA receptor signalling. *Trends Neurosci*; 26: 81-89

67. Harrison L, Cheetham ME, Calvert RA (1993) Investigations of the changes in neuronal distribution and phosphorylation state of MAP1X during development. *Dev Neurosci;* 15: 68-76

68. Hennegriff M, Arai A, Kessler M, Vanderklish P, Mutneja MS, Rogers G, Neve RL, Lynch G (1997) Stable expression of recombinant AMPA receptor

subunits: binding affinities and effects of allosteric modulators. *J Neurochem*; 68: 2424-2434

69. Hernandez MA, Wandosell F, Avila J (1987) Localization of the phosphorylation sites for different kinases in the microtubule-associated protein MAP2. *J Neurochem;* 48: 84-93

70. Hirokawa N, Bloom GS, Vallee RB (1985) Cytoskeletal architecture and immunocytochemical localization of microtubule-associated proteins in regions of axons associated with rapid axonal transport: the β,β'-iminodipropionitrile-intoxicated axon as a model system. *J Cell Biol;* 101: 227-239

71. Hohn A, Leibrock J, Bailey K, Barde YA (1990) Identification and characterization of a novel member of the nerve growth factor brain-derived neurotrophic factor family. *Nature*; 344: 339–341

72. Horch HW, Katz LC (2002) BDNF release from single cells elicits local dendritic growth in nearby neurons. *Nat Neurosci;* 5: 1177-1184

73. Hossmann KA (1994) Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia. *Ann Neurol;* 362: 557-565

74. Hossmann KA (1996) Periinfarct depolarizations. *Cerebrovasc Brain Metab Rev;* 8: 195-208

75. Humm JL, Kozlowski DA, James DC, Gotts JE, Schallert T (1998) Use-dependent exacerbation of brain damage occurs during an early post-lesion vulnerable period. *Brain Res;* 783: 286-292

76. Hyman C, Hofer M, Barde YA, Juhasz M, Yancopoulos GD, Squinto SP, Lindsay RM (1991) BDNF is a neurotrophic factor for dopaminergic neurons of the substantia nigra. *Nature*; 350: 230–232

77. Ip NY, Li Y, Yancopoulos GD, Lindsay RM (1993) Cultured hippocampal neurons show response to BDNF, NT-3 and NT-4, but not NGF. *J Neurosci*; 13: 3394–3405

78. Ip YT, Davis RJ (1998) Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK) - from inflammation to development. *Curr Opin Cell Biol*; 10: 205-219

79. Ishii T, Moriyoshi K, Sugihara H, Sakurada K, Kadotani H, Yokoi M, Akazawa C, Shigemoto R, Mizuno N, Masu M (1993) Molecular characterization of the family of the N-methyl-D-aspartate receptor subunits. *J Biol Chem*; 268: 2836-2843

80. Izant JG, McIntosh JR (1980) Microtubule-associated proteins: a monoclonal antibody to MAP2 binds to differentiated neurons. *Proc Natl Acad Sci USA*; 77: 4741–4745

81. Jameson L, Caplow M (1981) Modification of microtubule steady-state dynamics by phosphorylation of the microtubule-associated proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*; 78: 3413–3417

82. Johnson GVW, Jope RS (1992) The role of microtubule-associated protein 2 (MAP2) in neuronal growth, plasticity and degeneration. *J Neurosci Res*; 33: 505–512

83. Johnston PA, Jahn R, Südhof TC (1989) Transmembrane topography and evolutionary conservation of synaptophysin. *J Biol Chem*; 264: 1268-1273

84. Jolkkonen J, Gallagher NP, Zilles K, Sivenius J (2003) Behavioral deficits and recovery following transient focal cerebral ischemia in rats: glutamatergic and GABAergic receptor densities. *Behav Brain Res*; 138: 187-200

85. Kang H, Schuman EM (1995) Long-lasting neurotrophin-induced enhancement of synaptic transmission in the adult hippocampus. *Science*; 267: 1658-1662

86. Karhunen H, Bezvenyuk Z, Nissinen J, Sivenius J, Jolkkonen J, Pitkänen A (2007) Epileptogenesis after cortical photothrombotic brain lesion in rats. *Neuroscience;* 148: 314-324

87. Kato K (1990) Novel $GABA_A$ receptor alpha subunit is expressed only in cerebellar granule cells. *J Mol Biol*; 214: 619-624

88. Kemp JA, McKernan RM (2002) NMDA receptor pathways as drug targets. *Nat Neurosci*; 5 Suppl: 1039-1042

89. Kitagawa K, Matsumoto M, Niinobe M, Mikoshiba K, Hata R, Veda H, Handa N, Fukunaqa R, Isaka Y, Kimura K, Kamada T (1989) Microtubule-associated protein 2 as a sensitive marker for cerebral ischemic damage: immunohistochemical investigation of dendritic damage. *Neuroscience;* 31: 401–411

90. Knaus P, Betz H, Rehm H (1986) Expression of synaptophysin during postnatal development of the mouse brain. *J Neurochem*; 47: 1302-1304

91. Kolominsky-Rabas PL, Heuschmann PU, Marschall D, Emmert M, Baltzer N, Neundorfer B, Schoffski O, Krobot KJ (2006) Lifetime cost of ischemic stroke in Germany: results and national projections from a population-based stroke registry: the Erlangen Stroke Project. *Stroke*; 37: 1179-1183

92. Küppenbender KD, Standaert DG, Feuerstein TJ, Penney JB Jr, Young AB, Landwehrmeyer GB (2000) Expression of NMDA receptor subunit mRNAs in neurochemically identified projection and interneurons in the human striatum. *J Comp Neurol*; 419: 407-421

93. Kutsuwada T, Kashiwabuchi N, Mori H, Sakimura K, Kushiya E, Araki K, Meguro H, Masaki H, Kumanishi T, Arakawa M, Mishina M (1992) Molecular diversity of the NMDA receptor channel. *Nature*; 358: 36-41

94. Leclerc N, Beesley PW, Brown I, Colonnier M, Gurd JW, Paladino T, Hawkes R (1989) Synaptophysin expression during synaptogenesis in the rat cerebellar cortex. *J Comp Neurol;* 280: 197-212

95. Lee JM, Zipfel GJ, Choi DW (1999) The changing landscape of ischaemic brain injury mechanisms. *Nature;* 399: A7-A14

96. Lees GJ (2000) Pharmacology of AMPA/kainate receptor ligands and their therapeutic potential in neurological and psychiatric disorders. *Drugs*; 59: 33-78

97. Levi-Montalcini R, Dal Toso R, della Valle F, Skaper SD, Leon A (1995) Update of the NGF saga. *J Neurol Sci;* 130: 119-127

98. Levine ES, Dreyfus CF, Black IB, Plummer MR (1996) Selective role for trkB neurotrophin receptors in rapid modulation of hippocampal synaptic transmission. *Brain Res Mol Brain Res;* 38: 300-303

99. Lewin GR, Barde YA (1996) Physiology of the neurotrophins. *Annu Rev Neurosci*; 19: 289-317

100. Lindholm D, Dechant G, Heisenberg CP, Thoenen H (1993) Brain-derived neurotrophic factor is a survival factor for cultured rat cerebellar granule neurons and protects them against glutamate-induced neurotoxicity. *Eur J Neurosci*; 5: 1455–1464

101. Liu SJ, Zukin RS (2007) Ca^{2+}-permeable AMPA receptors in synaptic plasticity and neuronal death. *Trends Neurosci*; 30: 126–134

102. Ma D, Nothias F, Boyne LJ, Fischer I (1997) Differential regulation of microtubule-associated protein 1B (MAP1B) in rat CNS and PNS during development. *J Neurosci Res*; 49: 319-332

103. Maccaferri G, Roberts JD, Szucs P, Cottingham CA, Somogyi P (2000) Cell surface domain specific postsynaptic currents evoked by identified GABAergic neurones in rat hippocampus in vitro. *J Physiol;* 524: 91-116

104. Macdonald RL, Olsen RW (1994) $GABA_A$ receptor channels. *Annu Rev Neurosci*; 17: 569-602

105. Magnusson KR (1998) Aging of glutamate receptors: correlations between binding and spatial memory performance in mice. *Mech Ageing Dev*; 104: 227-248

106. Mandelkow E, Mandelkow EM (1995) Microtubules and microtubule-associated proteins. *Curr Opin Cell Biol;* 7: 72-81

107. Marquèze-Pouey B, Wisden W, Malosio ML, Betz H (1991) Differential expression of synaptophysin and synaptoporin mRNAs in the postnatal rat central nervous system. *J Neurosci*; 11: 3388-3397

108. Martin LJ, Blackstone CD, Levey AI, Huganir RL, Price DL (1993) Cellular localizations of AMPA glutamate receptors within the basal forebrain magnocellular complex of rat and monkey. *J Neurosci;* 13: 2249-2263

109. Martin LJ, Furuta A, Blackstone CD (1998) AMPA receptor protein in developing rat brain: glutamate receptor-1 expression and localization change at regional, cellular and subcellular levels with maturation. *Neuroscience*; 83: 917-928

110. Masliah E, Fagan AM, Terry RD, DeTeresa R, Mallory M, Gage FH (1991) Reactive synaptogenesis assessed by synaptophysin immunoreactivity is associated with GAP-43 in the dentate gyrus of the adult rat. *Exp Neurol;* 113: 131-142

111. Matesic DF, Lin RCS (1994) Microtubule-associated protein 2 as an early indicator of ischemia-induced neurodegeneration in the gerbil forebrain. *J Neurochem;* 63: 1012–1020

112. Matsuda K, Kamiya Y, Matsuda S, Yuzaki M (2002) Cloning and characterization of a novel NMDA receptor subunit NR3B: a dominant subunit that reduces calcium permeability. *Brain Res Mol Brain Res*; 100: 43-52

113. Mayer ML, Armstrong N (2004) Structure and function of glutamate receptor ion channels. *Annu Rev Physiol*; 66: 161-181

114. Megias M, Emri Z, Freund TF, Gulyas AI (2001) Total number and distribution of inhibitory and excitatory synapses on hippocampal CA1 pyramidal cells. *Neuroscience;* 102: 527-540

115. Miles R, Toth K, Gulyas AI, Hajos N, Freund TF (1996) Differences between somatic and dendritic inhibition in the hippocampus. *Neuron;* 16: 815-823

116. Minnerup J, Heidrich J, Wellmann J, Rogalewski A, Schneider A, Schäbitz WR (2008) Meta-analysis of the efficacy of Granulocyte-colony stimulating factor in animal models of focal cerebral ischemia. *Stroke;* 39: 1855-1861

117. Mittmann T, Luhmann HJ, Schmidt-Kastner R, Eysel UT, Weigel H, Heinemann U (1994) Lesion-induced transient suppression of inhibitory function in rat neocortex in vitro. *Neuroscience;* 60: 891-906

118. Monaghan DT, Andaloro VJ, Skifter DA (1998) Molecular determinants of NMDA receptor pharmacological diversity. *Prog Brain Res;* 116: 171-190

119. Monyer H, Sprengel R, Schoepfer R, Herb A, Higuchi M, Lomeli H, Burnashev N, Sakmann B, Seeburg PH (1992) Heteromeric NMDA receptors: molecular and functional distinction of subtypes. *Science*; 256: 1217-1221

120. Monyer H, Burnashev N, Laurie DJ, Sakmann B, Seeburg PH (1994) Developmental and regional expression in the rat brain and functional properties of four NMDA receptors. *Neuron*; 12: 529-540

121. Mori H, Mishina M (1995) Structure and function of the NMDA receptor channel. *Neuropharmacology;* 34: 1219-1237

122. Morrison JH (2003) Aging and mammalian cerebral cortex: monkeys to humans. *Alzheimer Dis Assoc Disord*; 17 Suppl 2: 51-53

123. Moss SJ, Smart TG (2001) Constructing inhibitory synapses. *Nat Rev Neurosci;* 2: 240-250

124. Muir JK, Lobner D, Monyer H, Choi DW (1996) $GABA_A$ receptor activation attenuates excitotoxicity but exacerbates oxygen-glucose deprivation-induced neuronal injury in vitro. *J Cereb Blood Flow Metab;* 6: 1211-1218

125. Müllauer L, Gruber P, Sebinger D, Buch J, Wohlfart S, Chott A (2001) Mutations in apoptosis genes: a pathogenetic factor for human disease. *Mutat Res;* 488: 211-231

126. Müller HD, Hanumanthiah KM, Diederich K, Schwab S, Schäbitz WR, Sommer C (2008) BDNF but not forced arm use improves long-term outcome after photothrombotic stroke and transiently upregulates binding densities of excitatory glutamate receptors in the rat brain. *Stroke;* 39: 1012-1021

127. Müller HD, Kollmar R, Schwab S, Schäbitz WR, Sommer C (2003) Neuroprotective effect of G-CSF is associated with maintained ligand binding to $GABA_A$ receptors in the ischemic cortical penumbra. *Acta Neuropathol (Berl);* 106: 393

128. Murphy DB, Borisy GG (1975) Association of High Molecular Weight Proteins with Microtubules and their role in Microtubule Assembly in vitro. *Proc Natl Acad Sci;* 72: 2696-2700

129. Murthy ASN, Flavin M (1983) Microtubule assembly using the microtubule-associated protein MAP2 prepared in defined states of phosphorylation with protein kinase and phosphatase. *Eur J Biothem;* 137: 37-46

130. Neumann-Haefelin T, Hagemann G, Witte OW (1995) Cellular correlates of neuronal hyperexcitability in the vicinity of photochemically induced cortical infarcts in rats in vitro. *Neurosci Lett;* 193: 101-104

131. Neumann-Haefelin T, Staiger JF, Redecker C, Zilles K, Fritschy JM, Möhler H, Witte OW (1998) Immunohistochemical evidence for dysregulation of the GABAergic system ipsilateral to photochemically induced cortical infarcts in rats. *Neuroscience;* 87: 871-879

132. Nishi M, Hinds H, Lu HP, Kawata M, Hayashi Y (2001) Motoneuron-specific expression of NR3B, a novel NMDA-type glutamate receptor subunit that works in a dominant-negative manner. *J Neurosci*; 21: RC185

133. Nusser Z, Sieghart W, Benke D, Fritschy JM, Somogyi P (1996) Differential synaptic localization of two major γ-aminobutyric acid type A receptor α subunits on hippocampal pyramidal cells. *Proc Natl Acad Sci USA;* 93: 11939-11944

134. Oppenheim RW, Qin-Wei Y, Prevette D, Qiao Y (1992) Brain-derived neurotrophic factor rescues developing avian motoneurons from cell death. *Nature;* 360: 755–757

135. O'Neill LA, Kaltschmidt C (1997) NF-kappa B: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function. *Trends Neurosci*; 20: 252-258

136. Ozawa S, Kamiya H, Tsuzuki K (1998) Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol*; 54: 581-618

137. Petralia RS, Yokotani N, Wenthold RJ (1994) Light and electron microscope distribution of the NMDA receptor subunit NMDAR1 in the rat nervous system using a selective anti-peptide antibody. *J Neurosci;* 14: 667-696

138. Pellegrini-Giampietro DE, Gorter JA, Bennett MV, Zukin RS (1997) The GluR2 (GluR-B) hypothesis: Ca^{2+}-permeable AMPA receptors in neurological disorders. *Trends Neurosci;* 20: 464-470

139. Pencea V, Bingaman KD, Wiegand SJ, Luskin MB (2001) Infusion of brain-derived neurotrophic factor into the lateral ventricle of the adult rat leads to new neurons in the parenchyma of the striatum, septum, thalamus, and hypothalamus. *J Neurosci;* 21: 6706–6717

140. Pujic Z, Matsumoto I, Wilce PA (1993) Expression of the gene coding for the NR1 subunit of the NMDA receptor during rat brain development. *Neurosci Lett;* 162: 67-70

141. Que M, Witte OW, Neumann-Haefelin T, Schiene K, Schroeter M, Zilles K (1999) Changes in GABA(A) and GABA(B) receptor binding following cortical photothrombosis: a quantitative receptor autoradiographic study. *Neuroscience;* 93: 1233-1240

142. Que M, Witte OW, Zilles K (2000) Transient up-regulation of gamma-aminobutyric acid(A) receptor binding by lubeluzole after neocortical specify lesion in rats. *Neurosci Lett;* 296: 125-128

143. Qian A, Johnson JW (2002) Channel gating of NMDA receptors. *Physiol Behav;* 77: 577-582

144. Qü M, Buchkremer-Ratzmann I, Schiene K, Schroeter M, Witte OW, Zilles K (1998) Bihemispheric reduction of $GABA_A$ receptor binding following focal cortical photothrombotic lesions in the rat brain. *Brain Res;* 813: 374-380

145. Redecker C, Luhmann HJ, Hagemann G, Fritschy JM, Witte OW (2000) Differential downregulation of $GABA_A$ receptor subunits in widespread brain regions in the freeze-lesion model of focal cortical malformations. *J Neurosci;* 20, 5045-5053

146. Redecker C, Wang W, Fritschy JM, Witte OW (2002) Widespread and long-lasting alterations in $GABA_A$-receptor subtypes after focal cortical infarcts in rats: mediation by NMDA-dependent processes. *J Cereb Blood Flow Metab;* 22: 1463-1475

147. Reinecke S, Lutzenburg M, Hagemann G, Bruehl C, Neumann-Haefelin T, Witte OW (1999) Electrophysiological transcortical diaschisis after middle cerebral artery occlusion (MCAO) in rats. *Neurosci Lett;* 261: 85-88

148. Risedal A, Zeng J, Johansson BB (1999) Early training may exacerbate brain damage after focal brain ischemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab;* 19: 997-1003

149. Roback JD, Marsh HN, Downen M, Palfrey HC, Wainer BH (1995) BDNF-activated signal transduction in rat cortical glial cells. *Eur J Neurosci;* 7: 849–862.

150. Rogers SW, Hughes TE, Hollmann M, Gasic GP, Deneris ES, Heinemann S (1991) The characterization and localization of the glutamate receptor subunit GluR1 in the rat brain. *J Neurosci;* 11: 2713-2724

151. Rosenmund C, Stern-Bach Y, Stevens CF (1998) The tetrameric structure of a glutamate receptor channel. *Science*; 280: 1596-1599

152. Sasaki YF, Rothe T, Premkumar LS, Das S, Cui J, Talantova MV, Wong HK, Gong X, Chan SF, Zhang D, Nakanishi N, Sucher NJ, Lipton SA (2002) Characterization and comparison of the NR3A subunit of the NMDA receptor in recombinant systems and primary cortical neurons. *J Neurophysiol;* 87: 2052-2063

153. Sato-Yoshitake R, Shiomura Y, Miyasaka H, Hirokawa N (1989) Microtubule-associated protein 1B: molecular structure, localization and phosphorylation-dependent expression in developing neurons. *Neuron;* 3: 229-238

154. Schäbitz WR, Berger C, Kollmar R, Seitz M, Tanay E, Kiessling M, Schwab S, Sommer C (2004) Effect of brain-derived neurotrophic factor treatment and forced arm use on functional motor recovery after small cortical ischemia. *Stroke;* 35: 992-997

155. Schäbitz WR, Kollmar R, Schwaninger M, Juettler E, Bardutzky J, Scholzke MN, Sommer C, Schwab S (2003) Neuroprotective effect of granulocyte colony-stimulating factor after focal cerebral ischemia. *Stroke;* 34: 745-751

156. Schäbitz WR, Schwab S, Spranger M, Hacke W (1997) Intraventricular brain-derived neurotrophic factor reduces infarct size after focal cerebral ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab;* 17: 500-506

157. Schäbitz WR, Sommer C, Zoder W, Kiessling M, Schwaninger M, Schwab S (2000) Intravenous brain-derived neurotrophic factor reduces infarct size and counterregulates Bax and Bcl-2 expression after temporary focal cerebral ischemia. *Stroke;* 31: 2212-2217

158. Schäbitz WR, Steigleder T, Cooper-Kuhn CM, Schwab S, Sommer C, Schneider A, Kuhn HG (2007) Intravenous brain-derived neurotrophic factor enhances poststroke sensorimotor recovery and stimulates neurogenesis. *Stroke;* 38: 2165-2172

159. Scharfman H, Goodman J, Macleod A, Phani S, Antonelli C, Croll S (2005) Increased neurogenesis and the ectopic granule cells after intrahippocampal BDNF infusion in adult rats. *Exp Neurol;* 192: 348–356

160. Schielke GP, Kupina NC, Boxer PA, Bigge CF, Welty DF, Iadecola C (1999) The neuroprotective effect of the novel AMPA receptor antagonist PD152247 (PNQX) in temporary focal ischemia in the rat. *Stroke;* 30: 1472-1477

161. Schiene K, Bruehl C, Zilles K, Qü M, Hagemann G, Kraemer M, Witte OW (1996) Neuronal hyperexcitability and reduction of $GABA_A$-receptor

expression in the surround of cerebral photothrombosis. *J Cereb Blood Flow Metab;* 16: 906-914

162. Schneider A, Kruger C, Steigleder T, Weber D, Pitzer C, Laage R, Aronowski J, Maurer MH, Gassler N, Mier W, Hasselblatt M, Kollmar R, Schwab S, Sommer C, Bach A, Kuhn HG, Schäbitz WR (2005) The hematopoietic factor G-CSF is a neuronal ligand that counteracts programmed cell death and drives neurogenesis. *J Clin Invest;* 115: 2083-2098

163. Schoenfeld TA, McKerracher L, Obar R, Vallee RB (1989) MAP1A and MAP1B are structurally related microtubule associated proteins with distinct developmental patterns in the CNS. *J Neurosci;* 9: 1712-1730

164. Schofield PR, Darlison MG, Fujita N, Burt DR, Stephenson FA, Rodriguez H, Rhee LM, Ramachandran J, Reale V, Glencorse TA, Seeburg PH, Barnard EA (1987) Sequence and functional expression of the GABA(A) receptor shows a ligand-gated receptor super-family. *Nature;* 328: 221-227

165. Schorge S, Colquhoun D (2003) Studies of NMDA receptor function and stoichiometry with truncated and tandem subunits. *J Neurosci;* 23: 1151-1158

166. Sendtner M, Holtmann B, Kolbeck R, Thoenen H, Barde Y-A (1992) Brain-derived neurotrophic factor prevents the death of motoneurons in newborn rats after nerve section. *Nature;* 360: 757–759

167. Seo SR, Chong SA, Lee SI, Sung JY, Ahn YS, Chung KC, Seo JT (2001) Zn^{2+}-induced ERK activation mediated by reactive oxygen species causes cell death in differentiated PC12 cells. *J Neurochem;* 78: 600-610

168. Sheng M, Cummings J, Roldan LA, Jan YN, Jan LY (1994) Changing subunit composition of heteromeric NMDA receptors during development of rat cortex. *Nature;* 368: 144-147

169. Sheng M, Kim MJ (2002) Postsynaptic signaling and plasticity mechanisms. *Science;* 298: 776-780

170. Shimohama S, Tamura Y, Akaike A, Tsukahara T, Ohara O, Watanabe S, Kimura J (1993) Brain-derived neurotrophic factor pretreatment exerts a partially protective effect against glutamate-induced neurotoxicity in cultured rat cortical neurons. *Neurosci Lett;* 164: 55–58

171. Sieghart W (1995) Structure and pharmacology of gamma-aminobutyric $acid_A$ receptor subtypes. *Pharmacol Rev;* 47: 181-234

172. Smith GB, Olsen RW (1995) Functional domains of $GABA_A$ receptors. *Trends Pharmacol Sci;* 16: 162-168

173. Sommer C, Kiessling M (2002) Ischemia and ischemic tolerance induction differentially regulate protein expression of GluR1, GluR2, and AMPA receptor binding protein in the gerbil hippocampus: GluR2 (GluR-B) reduction does not predict neuronal death. *Stroke;* 33: 1093-1100

174. Sommer C, Kollmar R, Schwab S, Kiessling M, Schäbitz WR (2003) Exogenous brain-derived neurotrophic factor prevents postischemic downregulation of [^{3}H]muscimol binding to GABA(A) receptors in the cortical penumbra. *Brain Res Mol Brain Res;* 111: 24-30.

175. Sommer C, Roth SU, Kiessling M (2001) Kainate induced epilepsy alters protein expression of AMPA receptor binding protein (ABP) in the rat hippocampus. *Acta Neuropathol;* 101: 460-468

176. Südhof TC, Jahn R (1991) Proteins of synaptic vesicles involved in exocytosis and membrane recycling. *Neuron;* 6: 665-677

177. Taub E, Uswatte G, Elbert T (2002) New treatments in neurorehabilitation founded on basic research. *Nat Rev Neurosci;* 3: 228-236

178. Thiel G, Bauer I, Rössler O (2005) Wie Nervenzellen sich vor dem programmierten Zelltod schützen. *magazin forschung, Universität des Saarlandes*

179. Thomas L, Hartung K, Langosch D, Rehm H, Bamberg E, Franke WW, Betz H (1988) Identification of synatophysin as a hexameric channel protein of the synaptic vesicle membrane. *Science;* 242: 1050-1053

180. Thornberry NA, Lazebnik Y (1998) Caspases: enemies within. *Science;* 281: 1312-1316

181. Tomimoto H, Yanagihara T (1992) Immunoelectron microscopic study of tubulin and microtubule-associated proteins after transient cerebral ischemia in gerbils. *Acta Neuropathol (Berl);* 84: 394–399

182. Tucker RP, Garner CC, Matus A (1989) In situ localization of microtubule-associated protein mRNA in the developing and adult rat brain. *Neuron;* 2: 1245-1256

183. Tucker RP (1990) The roles of microtubule-associated proteins in brain morphogenesis: a review. *Brain Res Brain Res Rev;* 15: 101-120

184. Varecka L, Wu C-H, Rotter A, Frostholm A (1994) $GABA_A$/benzodiazepine receptor α6 subunit mRNA in granule cells of the cerebellar cortex and cochlear nuclei: expression in developing and mutant mice. *J Comp Neurol;* 339: 341-352

185. Villmann C, Becker CM (2007) On the hypes and falls in neuroprotection: targeting the NMDA receptor. *Neuroscientist*; 13: 594-615

186. Watanabe M, Inoue Y, Sakimura K, Mishina M (1992) Developmental changes in distribution of NMDA receptor channel subunit mRNAs. *Neuroreport;* 3: 1138-1140

187. Watson BD, Dietrich WD, Busto R, Wachtel MS, Ginsberg MD (1985) Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis. *Ann Neurol;* 17: 497-504

188. Welte K, Platzer E, Lu L, Gabrilove JL, Levi E, Mertelsmann R, Moore MA (1985) Purification and biochemical characterization of human pluripotent hematopoietic colony-stimulating factor. *Proc Natl Acad Sci USA;* 82: 1526-1530

189. Wenzel A, Fritschy JM, Mohler H, Benke D (1997) NMDA receptor heterogeneity during postnatal development of the rat brain: differential expression of the NR2A, NR2B, and NR2C subunit proteins. *J Neurochem;* 68: 469-478

190. West AR, Galloway MP (1997) Endogenous nitric oxide facilitates striatal dopamine and glutamate efflux in vivo: role of ionotropic glutamate receptor-dependent mechanisms. *Neuropharmacology;* 36: 1571-1581

191. Whiting PJ (1999) The GABA-A receptor gene family: New targets for therapeutic intervention. *Neurochem Int;* 34: 387-390

192. Wisden W, Laurie DJ, Monyer H, Seeburg PH (1992) The distribution of 13 $GABA_A$ receptor subunit mRNAs in the rat brain. I. Telencephalon, diencephalon, mesencephalon. *J Neurosci;* 12: 1040-1062

193. Wolf, PA, Cobb JL, D'Agostino RB (1992) Epidemiology of stroke. In: Barnett HJM, Mohr JP, Stein BM, Yatsu FM, eds. *Stroke*: Pathophysiology, Diagnosis and Management. *Churchill Livingston Inc;* 2nd ed. New York, NY: 3–27

194. Yakovlev AG, Knoblach SM, Fan L, Fox GB, Goodnight R, Faden AI (1997) Activation of CPP32-like caspases contributes to neuronal apoptosis and neurological dysfunction after traumatic brain injury. *J Neurosci;* 17: 7415-7424

195. Yamashita K, Wiessner C, Lindholm D, Thoenen H, Hossmann KA (1997) Post-occlusion treatment with BDNF reduces infarct size in a model of permanent occlusion of the middle cerebral artery in rat. *Metab Brain Dis;* 12: 271-280

196. Yamashita T, Tada K, Sobue D, Niigawa H, Suzuki H, Hariguchi S, Nishimura T (1986) Effect of transient ischemia on brain proteins in Mongolian gerbil. *Neurochem Res;* 11: 1728–1729

197. Yanagihara T, Brengman JM, Mushynski WE (1990) Differential vulnerability of microtubule components in cerebral ischemia. *Acta Neuropathol (Berl);* 80: 499–505

198. Yu ZY, Wang W, Fritschy JM, Witte OW, Redecker C (2006) Changes in neocortical and hippocampal $GABA_A$ receptor subunit distribution during brain maturation and aging. *Brain Res;* 1099: 73-81

199. Zhang C, Li Y, Chen J, Gao Q, Zacharek A, Kapke A, Chopp M (2006) Bone marrow stromal cells upregulate expression of bone morphogenetic proteins 2 and 4, gap junction protein connexin-43 and synaptophysin after stroke in rats. *Neuroscience;* 141: 687-695

200. Zhong J, Carrozza DP, Williams K, Pritchett DB, Molinoff PB (1995) Expression of mRNAs encoding subunits of the NMDA receptor in developing rat brain. *J Neurochem;* 64: 531–539

201. Zigova T, Pencea V, Wiegand SJ, Luskin MB (1998) Intraventricular administration of BDNF increases the number of newly generated neurons in the adult olfactory bulb. *Mol Cell Neurosci;* 11: 234–245

Anhang

Materialliste

- Vibratom
- Eppendorfer Röhrchen – Eppendorf, 1,5ml
- CPS-Lösung: 1l-Ansatz:
    1. 250 ml Glycerin wasserfrei- ≥ 99%, p.a., Glycin $C_2H_5NO_2$, Carl Roth GmbH + Co KG Karlsruhe
    2. 250 ml Ethylenglycol – (Fa. Sigma)
    3. 500 ml 0,1 M P-Puffer (Sörenson: 115 ml NaH_2PO_4 0,2M, 385 ml Na_2HPO_4 0,2M, 500 ml Aqua dest.) –
- Petrischalen – VWR international
- PBS-Lösung: Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (PBS von Cambrex, Verviers)
- Well-Platten - Multiwell™ 24 Well, Polystyrene, Nonpyrogenic, Becton Dickinson Labware U.S.A.
- H_2O_2 30% - Wasserstoffperoxid 30%, Apotheke des Klinikums der Uni Ulm
- Methanol / PBS – J.T. Baker, Deventer, Holland
- Pipetten – eppendorf research, Physio Care Concept, 100 – 1000 µl
- Pipettenspitzen – Star Lab GmbH, Tip one, 101 – 1000 µl Filter Tips
- Triton –
- Normales Schweineserum – Dako
- Rüttler / Schüttler: Heidolph Polymax 1040, Stufe 2
- Primärantikörper:
    1. rabbit anti-NMDAR1 (polyclonal; Chemicon, Temecula, CA, USA)
    2. rabbit anti-GluR1 (polyclonal; Chemicon)
    3. rabbit anti-$GABA_A$ receptor α2 subunit (polyclonal; Chemicon)
    4. mouse anti-MAP1B (monoclonal; Chemicon)
    5. mouse anti-MAP2 (monoclonal, Chemicon)
    6. mouse anti-synaptophysin (monoclonal, Dako, Glostrup, Denmark)
- 2. Antikörper (biotinyliert, Vectastain Kit)
- ABC-Komplex (Vectastain, ABC Kit)
- DAB – 3,3'-Diaminobenzidine, Fa. Sigma
- Tris – Trizma Pre-Set Crystals, Fa. Sigma
- Verstärker Nickel / Cobalt:

1. Cobalt chloride (hexahydrate), Fa. Sigma
2. Ni-sulfate-6-hydrate, Fa. Riedel-de-Haen

(Ansatz Verstärker: 50 µl 20% $CoCl_2$ + 100 µl 10% $NiSo_4$ + 850 µl A. dest. = 1000 µl 1%ige Lsg.; dann: 40 µl + 1960 µl Aqua dest. = 2000 µl fertige Gebrauchslösung; pro ml DAB / Tris-Lsg. 25 µl Verstärker)

- Filter (Porenweite 0,2 bzw. 0,4 µm)
- Objektträger (Menzel GmbH + Co. KG, ca. 76 x 26mm, Braunschweig)
- Eindeckmedium - Microscopy Aquatex® - wässriges Eindeckmittel für die Mikroskopie, Merck UGaA
- CoolSNAP CCD Kamera (Roper Scientific, Ottobrunn, Deutschland)
- MCID Imaging Research Software (Imaging Research Inc., St. Catharines, ON, Canada)
- Analyse-it für Microsoft Excel (Analyse-it Software Ltd., Leed, UK)

Danksagung

Dank, wem Dank gebührt:

meinem Doktorvater und Spiritus rector dieser Arbeit, Herrn Prof. Dr. Clemens Sommer, für die Möglichkeit, über dieses interessante Thema eine Forschungsarbeit anzufertigen, seine sorgfältigen Korrekturen und die Betreuung, die er auch nach dem Wechsel an die Uni Mainz problemlos fortsetzte.

meinem Betreuer, Herrn Dr. Harald Müller, für die große Hilfe beim praktischen Teil der Arbeit und die ständige Bereitschaft, mir bei verfahrenstechnischen Unklarheiten oder fachlichen Fragen beizustehen.

der Abteilung für Pathologie der Universität Ulm für die freundliche Bereitstellung der Arbeitsmöglichkeiten zur Durchführung der immunhistochemischen Färbungen und deren Auswertung.

Herrn Prof. Dr. Wolf-Rüdiger Schäbitz für die Überlassung der Vibratomschnitte für den experimentellen Teil der Arbeit sowie Herrn Frank Malischewski für die Hilfe bei der Herstellung der Schnitte.

Frau Katrin Mihr vom Promotionssekretariat für ihr beherztes Engagement.

dem Zweitgutachter dieser Arbeit, Herrn Chefarzt Prof. Dr. Albert Ludolph, für die durchaus spontane Bereitschaft, dieser Arbeit eine Zweitbegutachtung zukommen zu lassen.

meinen Wahlprüfern, Herrn Prof. Dr. Dietmar Thal und Herrn Prof. Dr. Bernd Schmitz, für ihre Bemühungen im Rahmen dieser Arbeit.

meiner Familie, vor allem meiner Oma Maria Dietz und meinen Eltern Josef und Margit Neder, für ihre Liebe und Unterstützung – Ihr habt den Weg zu dieser Arbeit überhaupt ermöglicht!

meinem Bruder Jörg, der in den vergangenen Jahren seine eigene Promotion „durchstand“, und dem ich immer wieder mal mein Herz ausschütten konnte, wenn der steinige Weg zuweilen nicht direkt zu den Sternen zu führen schien…

meinem lieben Maximilian – DANKE für uns, unsere kleine Familie mit Elisabeth und das wundervolle Leben mit Dir.

und last but not least meiner Ma Nothum, Frau Dr. Ulrike Nothum, die mir von Jugend an als Ärztin immer auch Vorbild war.

Publikation:

Müller Harald D, Neder Angelika, Sommer Clemens, Schäbitz Wolf-Rüdiger (2009) Different postischemic protein expression of the GABA(A) receptor alpha2 subunit and the plasticity-associated protein MAP1B after treatment with BDNF versus G-CSF in the rat brain**.** *Restorative Neurology and Neuroscience*; 27(1):27-39.