

Mia Kim

Dr. med.

## **Effekte der transgenen Expression des Caspaseninhibitors CrmA nach transienter fokaler zerebraler Ischämie**

Geboren am 17.02.1980 in Mönchengladbach

Staatsexamen am 31.05.2006 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Anaesthesiologie

Doktorvater: Prof. Dr. med. B. W. Böttiger

Im Jahr 2005 starben weltweit laut WHO über 5,7 Millionen Menschen an den Folgen eines Schlaganfalls. 2003 betrug die Krankheitslast in Deutschland, also die um Behinderungen bereinigten Lebensjahre, 4 pro 1000 Einwohner. Die hohe Morbidität und Mortalität ist auf die neuronale Schädigung nach fokaler zerebraler Ischämie zurückzuführen. Neben der akuten Schädigung und dem nachfolgenden nekrotischen neuronalen Zelluntergang kommt der neuronalen Apoptose im Rahmen der Neurodegeneration nach fokaler zerebraler Ischämie eine entscheidende Rolle zu. Aufgrund der Komplexität der apoptotischen Vorgänge erscheinen vor allem Neuroprotektiva therapeutisch aussichtsreich, die die Apoptose auf unterschiedlichen Ebenen inhibieren. Durch die Entwicklung transgener Tierstämme, die antiapoptotische Proteine in ihren Neuronen exprimieren, besteht die Möglichkeit, das therapeutische Potential spezifischer antiapoptotischer Interventionen zu analysieren.

Der virale Breitspektrum-Caspaseninhibitor CrmA aus dem Kuhpockenvirus zeigte seine antiapoptotische Wirkung in vitro und in vivo. In der vorliegenden Untersuchung wurde die neuroprotektive Potenz des neuronal exprimierten antiapoptotischen Proteins CrmA des Kuhpockenvirus anhand des neurologischen Defizitscore, des Infarktvolumens, der Hirnschwellung, der Anzahl überlebender, TUNEL-positiver und aktivierter Caspase 3-positiver Neurone nach experimenteller transienter Hirnischämie an der Maus evaluiert.

Nach Zustimmung der Tierschutzkommission erfolgte eine Genotypisierung und die Ermittlung des Expressionsniveau mittels PCR, FISH, ReFISH und Western Blot. An 24 C57/BL6 Mäusen wurde in Narkose (1% Halothan in 70% N<sub>2</sub>O / 30% O<sub>2</sub>) eine transiente Hirnischämie durch Fadenokklusion des Abgangs der rechten A. cerebri media induziert. Davon unterliefen 12 Versuchstiere eine Ischämie von 90 Minuten (jeweils 6 transgen und

nicht-transgen) und 12 Tiere eine Ischämie von 30 Minuten (5 transgen und 7 nicht-transgen). Die Perfusion über dem Versorgungsgebiet der MCA wurde durch eine Laser-Doppler-Sonde vor, während und 30 Minuten nach Ischämie kontrolliert. Nach 24 Stunden Reperfusionzeit wurden die Tiere in Narkose dekapitiert, die Gehirne entnommen und tiefgefroren. Im Kryomikrotom wurden 18 µm dicke Schnitte gewonnen und für die Kresylviolett-, TUNEL-Färbung und die immunzytochemische Analyse der aktivierten Caspase 3 genutzt. Anhand der Tiere nach 90 Minuten MCAO wurde der neurologische Score ermittelt und ihr Gewebe wurde zur Aufarbeitung des Infarkt volumens und des Ausmaßes der Hirnschwellung genutzt. Das Gewebe der Tiere nach 30 Minuten Ischämie wurde für die Bestimmung der Anzahl überlebender Neurone sowie für die TUNEL-Färbung und für die Caspase 3-Aktivitätsanalyse gewonnen. Für diese Analysen wurden sechs Regionen des Striatums (dorsolateral, dorsomedial, intermediolateral, intermediomedial, ventrolateral, ventromedial) in rechtwinkligen Flächen von 75.000 µm<sup>2</sup> Größe beurteilt. Der mittels einer Thy-1 Kasette entwickelte transgene Tierstamm CrmA wurde ebenso wie seine Wildtyp-Geschwistertiere streng randomisiert und geblendet untersucht. Die statistische Analyse erfolgte mit dem t-Test ( $p < 0,05$  = signifikant).

Durch PCR, FISH, ReFISH und Western Blot wurde der Einbau des Genkonstrukts und die neuronale Expression des Proteins CrmA nachgewiesen. Die signifikante Verminderung des LDF auf annäherungsweise 15% des Ausgangswertes in allen Versuchsgruppen beweist die Minderperfusion während der Fadenokklusion über dem Versorgungsgebiet des MCA. Der neurologische Score nach 24 Stunden Reperfusion (tg:  $1,92 \pm 0,66$ , wt:  $1,92 \pm 0,58$ ), das berechnete Infarktvolumen (tg:  $62,2 \pm 15,58$  mm<sup>3</sup>, wt:  $56,85 \pm 14,14$  mm<sup>3</sup>) und die Hirnschwellung (tg:  $18,17 \pm 5,32\%$ , wt:  $20,88 \pm 12,34\%$  der kontralateralen Seite) zeugen von einer stattgefundenen Infarzierung aller Versuchstiere. Es gibt jedoch keinen signifikanten Unterschied zwischen transgenen und Wildtyp-Tieren in Bezug auf den neurologischen Score, das Infarktvolumen und die Hirnschwellung nach 90 Minuten Ischämie und auf die überlebenden (tg:  $37 \pm 7,78\%$ , wt:  $32 \pm 18,7\%$ ), die TUNEL-positiven (tg:  $46 \pm 24,41/\text{Fläche}$ , wt:  $40 \pm 18,77/\text{Fläche}$ ) und die aktivierte Caspase 3-positiven Neurone (tg:  $9 \pm 9,17/\text{Fläche}$ , wt:  $11 \pm 9,14/\text{Fläche}$ ) nach 30 Minuten MCAO.

Die vorliegenden Daten zeigen erstmals den Einfluss einer transgenen antiapoptotischen neuronalen Expression von CrmA nach transienter fokaler zerebraler Ischämie. Eine Blockade der Caspasen mittels CrmA bei transienter fokaler zerebraler Ischämie allein scheint nicht ausreichend, um den detektierbaren Neuronenschaden zu verringern. Grund dafür kann die Umgehung der Caspasen durch die Aktivierung alternativer, caspasenunabhängiger

Signalwege sein. Diese Signalwege können durch verschiedene mitochondriale Proteine oder die Calpain-Cathepsin-Kaskade mediiert werden. Das Studium dieser Signalwege und deren Zusammenspiel mit dem apoptotischen Zelltod sind für zukünftige Untersuchungen von großem Interesse.