

Aus dem

Institut für Chirurgische Forschung  
am Walter-Brendel Zentrum für Experimentelle Medizin der  
Ludwig-Maximilians-Universität München  
Vorstand: Prof. Dr. med. U. Pohl

**Die Rolle der Wechselwirkung von p53 und NFκB für den sekundären  
Hirnschaden nach Schädel-Hirn Trauma - eine tierexperimentelle Studie  
an der Maus**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Louisa von Baumgarten  
aus Wiesbaden

Im Jahr  
2010

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München**

**1. Berichterstatter:** Prof. Dr. med. Nikolaus Plesnila

**2. Berichterstatter:** Prof. Dr. med. Armin Giese

**1. Mitberichterstatter:** Prof. Dr. med Matthias Siebeck

**2. Mitberichterstatter:** Priv. Doz. Dr. med Dieter Jenne

**Mitbetreuung durch:** Prof. Dr. Carsten Culmsee

**Dekan:** Prof. Dr. med. Dr.h.c. Maximilian Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 21.01.2010

**Für meine Familie**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1.EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Das Schädel-Hirn Trauma.....</b>	<b>1</b>
1.1.1. Definition und Einteilung .....	1
1.1.2. Epidemiologie .....	2
1.1.3. Pathophysiologie .....	3
<b>1.2. Neuronale Apoptose nach Schädel-Hirn Trauma .....</b>	<b>4</b>
1.2.1. Überblick .....	4
1.2.2. Effektormechanismen.....	5
1.2.2.1 Caspase- <u>abhängige</u> Signaltransduktion .....	5
1.2.2.2 Caspase- <u>unabhängige</u> Signaltransduktion .....	7
1.2.3. Regulatorproteine .....	8
<b>1.3. Bedeutung von p53 für die neuronale Apoptose .....</b>	<b>8</b>
<b>1.4. Ziel der Arbeit.....</b>	<b>9</b>
<b>2. MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>11</b>
<b>2.1. Versuchstiere .....</b>	<b>11</b>
<b>2.2. Versuchsdurchführung.....</b>	<b>12</b>
2.2.1. Narkose .....	12
2.2.2. Controlled Cortical Impact .....	12
2.2.3. Pifithrin-Applikation.....	14
2.2.4. Blutdruckmessung.....	15
<b>2.3. Versuchsgruppen.....</b>	<b>16</b>
2.3.1. P53-Expression nach Trauma .....	17
2.3.2. Physiologie nach Pifithrin-Applikation .....	19
2.3.3. Pifithrin-Applikation vor Trauma .....	19
2.3.4. Pifithrin-Applikation nach Trauma .....	20
2.3.5. NFκB-DNA-Bindungsaktivität nach Trauma .....	21
2.3.6. NFκB-Transkriptionsaktivität nach Trauma .....	22
<b>2.4. Histologie .....</b>	<b>23</b>
2.4.1. Material .....	23

2.4.2. Durchführung.....	23
2.4.3. Histomorphometrische Bestimmung des Kontusionsvolumens .....	24
<b>2.5. Immunhistochemie .....</b>	<b>25</b>
2.5.1. Material .....	25
2.5.2. Durchführung.....	25
<b>2.6. Western Blot Analyse .....</b>	<b>26</b>
2.6.1. Material .....	26
2.6.2. Durchführung.....	28
2.6.3. Semiquantitative Auswertung .....	28
<b>2.7. Luciferase Assay .....</b>	<b>30</b>
2.7.1. Material .....	30
2.7.2. Durchführung.....	31
<b>2.8. NFκB-ELISA.....</b>	<b>32</b>
2.8.1. Material .....	32
2.8.2. Durchführung.....	32
<b>2.9. Statistische Datenauswertung .....</b>	<b>33</b>
<b>3. ERGEBNISSE .....</b>	<b>34</b>
<b>3.1. P53-Expression nach Schädel-Hirn Trauma .....</b>	<b>34</b>
3.1.1. Western Blot Analyse .....	34
3.1.2. Immunhistochemie .....	36
<b>3.2. P53-Inhibition vor und nach Schädel-Hirn Trauma.....</b>	<b>37</b>
3.2.1. Physiologische Parameter nach Pifithrin-Applikation .....	37
3.2.2. Pifithrin-Applikation vor Trauma.....	38
3.2.3. Therapeutisches Fenster der Pfithrin-Applikation.....	40
<b>3.3. NFκB-Aktivität nach Trauma .....</b>	<b>43</b>
3.3.1. NFκB-DNA-Bindungsaktivität .....	43
3.3.2. NFκB-Transkriptionsaktivität .....	46
<b>3.4. P53-abhängige Inhibition der NFκB-Transkriptionsaktivität .....</b>	<b>49</b>

<b>4. DISKUSSION .....</b>	<b>53</b>
<b>4.1. Das Modell des Controlled Cortical Impact.....</b>	<b>53</b>
<b>4.2. P53-Expression nach Trauma .....</b>	<b>55</b>
4.2.1. Regulation von p53 im ZNS.....	55
4.2.2. Auslösemechanismen posttraumatisch gesteigerter p53 Expression.....	56
4.2.3. P53 Expression nach Schädel-Hirn Trauma <i>in vivo</i> .....	57
<b>4.3. Pharmakologische Inhibition von p53 nach Schädel-Hirn Trauma .....</b>	<b>59</b>
4.3.1. Pifithrin-alpha .....	59
4.3.2 Neuroprotektion durch p53-Inhibitor.....	60
<b>4.4. NFκB-Aktivität nach Trauma .....</b>	<b>61</b>
4.4.1. Funktion von NFκB im ZNS.....	62
4.4.2. Neuronale durch NFκB-regulierte Gene.....	63
4.4.3. NFκB-Aktivität nach akuter neuronaler Schädigung .....	64
4.4.4. P53-abhängige Inhibition der NFκB Transkriptionsaktivität.....	69
<b>4.5. Weiterführende Untersuchungen.....</b>	<b>71</b>
<b>4.6. Klinische Beurteilung der Ergebnisse.....</b>	<b>76</b>
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>77</b>
<b>6. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>80</b>
<b>7. BEREITS VERÖFFENTLICHTE ASPEKTE DER ARBEIT:.....</b>	<b>94</b>
<b>8. DANKSAGUNG.....</b>	<b>95</b>
<b>9. LEBENS LAUF.....</b>	<b>96</b>

# 1. Einleitung

## 1.1. Das Schädel-Hirn Trauma

### 1.1.1. Definition und Einteilung

Das Schädel-Hirn Trauma ist die Folge einer Gewalteinwirkung auf Kopf und Gehirn und der Oberbegriff für gedeckte und offene Schädelverletzungen mit Gehirnbeteiligung (Hildenbrandt, 1994). Es kann nach Verletzungsmuster (diffus oder fokal) oder Verletzungsart (offen: bei Eröffnung der Dura mater bzw. gedeckt bei deren Unversehrtheit) eingeteilt werden. Im klinischen Alltag hat sich zur Abschätzung der Verletzungsschwere des Schädel-Hirn Traumas eine Einteilung gemäß der Glasgow Coma Scale (Teasdale and Jennett, 1974) durchgesetzt. Auf Ansprache oder Reiz werden dabei die beste verbale Antwort, die beste motorische Reaktion und das Augenöffnen bewertet (Siehe Tabelle 1). Die maximal erreichbare Punktzahl ist 15 (wacher voll orientierter Patient), die minimal erreichbare Punktzahl ist 3 (tief komatöser Patient).

Augenöffnung		Beste motorische Reaktion		Beste verbale Reaktion	
Spontan	4	Befolgung von Anweisungen	6	Orientierte Antwort auf Fragen	5
Auf Ansprache	3	Gezielte Schmerzabwehr	5	Desorientierte Antwort auf Fragen	4
Auf Schmerzreiz	2	Ungezielte Schmerzabwehr	4	Unangemessene Antwort	3
Keine Augenöffnung	1	Stecksynergismen auf Schmerzreiz	3	Unverständliche Antwort	2
		Beugesynergismen auf Schmerzreiz	2	Keine Reaktion	1
		Keine Reaktion auf Schmerzreiz	1		

**Tabelle 1: Glasgow Coma Scale (GCS)**

Bei GCS-Werten von 13-15 spricht man von einem leichten, bei GCS-Werten von 9-12 von einem mittelschweren und bei GCS-Werten von 3-8 von einem schweren Schädel-Hirn Trauma.

Die Charakteristika des leichten Schädel-Hirn Traumas sind eine kurzzeitige Veränderung der Bewusstseinslage von weniger als 15 Minuten, Erinnerungslücken (retro- und anterograde Amnesie) von weniger als 24 Stunden und das Fehlen von neurologischen Fokalzeichen. Das kraniale Computertomogramm zeigt in der Regel keinen Herdbefund.

Die klinischen Charakteristika des leichten Schädel-Hirn Traumas mit dem, in der Regel transienten, in 10-20% chronischen, posttraumatischen Syndrom sind das Schmerzsyndrom (Kopfschmerz, Nackenschmerz und Nackensteife), das vegetative Syndrom (Übelkeit und Erbrechen, Schwindel, orthostatische Dysregulation, distale Hyperhidrose, vegetativer Tremor), das sensorische Syndrom (Licht- und Geräuschempfindlichkeit, Geruchs- und Geschmacksstörungen) und das neurasthenische Syndrom (depressive Verstimmungen, neuropsychologische Leistungseinbußen, Reizbarkeit, Schlafstörungen).

Beim mittelschweren Schädel-Hirn Trauma liegt eine Bewusstlosigkeit oder Bewusstseinstäubung von weniger als 24 Stunden vor, fokale neurologische Defizite und ein Herdbefund im CT sind möglich. Im Vergleich zum leichten Schädel-Hirn Trauma bilden sich neurologische Auffälligkeiten langsamer und unvollständig zurück und lassen sich meist noch nach einem Jahr nachweisen.

Das schwere Schädel-Hirn Trauma ist charakterisiert durch eine Bewusstlosigkeit oder eine Bewusstseinstäubung von mehr als 24 Stunden oder das Vorliegen einer Hirnstammdysfunktion (Keidel and Poremba, 2000; Middleboe et al., 1992; Ghajar, 2000; Clifton et al., 1993; Ruff et al., 1993).

### **1.1.2. Epidemiologie**

In Europa stellt das Schädel-Hirn Trauma die häufigste Ursache von Behinderung, Pflegebedürftigkeit und Tod in der Altersgruppe der 15-44 Jährigen dar (Tagliaferri et al., 2006). Das Schädel-Hirn Trauma ist ein Gesundheitsproblem von größter sozioökonomischer Relevanz: Es weist hohe Inzidenzraten auf, betrifft vor allem junge, vorher gesunde Menschen und führt in vielen Fällen zu persistierender Behinderung und psychosozialen Problemen. Aktuelle Studien belegen, dass es in der Europäischen Union zu 1 000 000 Krankenhausaufnahmen pro Jahr kommt, die auf Schädel-Hirntraumen zurückzuführen sind (Mauritz et al., 2008). In Deutschland lag die Inzidenz des Schädel-Hirn Traumas im Jahr 2000 bei 337 Fällen pro 100 000 Einwohner, die Inzidenz schwerer Verläufe lag bei 33,5 Fällen pro 100 000 Einwohner. Insgesamt wurden 276 758 Menschen stationär im Krankenhaus aufgenommen und an den Folgen eines Schädel-Hirn Traumas behandelt. 7567 (3,8%) der im Krankenhaus aufgenommenen Patienten verstarben an den Folgen ihrer Verletzungen. Die Mortalität des Schädel-Hirn Traumas machte im Jahr 2000 0,9% der Gesamtmortalität aller Deutschen aus (Steudel et al., 2005). Eine 2008 veröffentlichte Studie zur Inzidenz des Schädel-Hirn Traumas in Norddeutschland in den Jahren 2000 und 2001 zeigt, dass von 6789 im Krankenhaus behandelten Patienten 58% männlich waren. 28% der behandelten Patienten waren jünger als 15 Jahre und 18% älter als 65 Jahre, 30% der Schädel-Hirntraumen betrafen unter 30 Jährige. 90,9% der Patienten zeigten ein leichtes Schädel-Hirn Trauma (Glasgow Coma Scale:13-15), mittelschwere Verletzungen (Glasgow Coma Scale von 9-12) lagen in 3,9% der Fälle vor und schwere Schädel-Hirntraumen (Glasgow Coma Scale von <8) wurden in 5,2% der Fälle beobachtet.

Studien aus Süddeutschland aus dem Jahr 1999 belegen, dass insgesamt 4,5% der im Krankenhaus aufgenommen Kopfverletzungen schwer verliefen (Glasgow Coma Scale <8). Aus diesem Patientenkollektiv verstarben 60% der Patienten, 10% der Betroffenen überlebten mit einer substantiellen Behinderung und waren dauerhaft pflegebedürftig (Baethmann et al., 2002).

Zu den führenden Ursachen des Schädel-Hirn Traumas gehören Verkehrsunfälle (56%), gefolgt von Stürzen aus großer Höhe (31%) und Suizid (12%) (Firsching and Woischneck, 2001).



### 1.1.3. Pathophysiologie

Pathophysiologisch kann die, durch die mechanische Einwirkung auf den Kopf entstehende Verletzung des Hirngewebes in Primär- und Sekundärschaden unterteilt werden. Der Primärschaden umfasst diejenigen Verletzungen des Gehirns, die unmittelbar auf die mechanische Gewalteinwirkung zurückgehen und nicht reversibel sind. Hierzu gehören fokale Schäden durch Deformation und Fraktur des Schädels. Es kann zu traumatischen Blutungen und Kontusionen des Hirngewebes sowie zu diffusen Schäden, wie zum Beispiel durch Lazeration entstandene Axonschäden und Gefäßzerreißen, kommen.

Der Sekundärschaden umfasst diejenige Prozesse, die klinisch nach einer gewissen Zeit (Stunden bis Tage) einsetzen und zur Progression von Verletzung und neurologischer Dysfunktion führen. Dieser sekundäre Schaden ist zurückzuführen auf eine komplexe und bis heute zum Teil ungeklärte Kaskade von interagierenden funktionellen, strukturellen, zellulären und molekularen Veränderungen, die durch das Trauma angestoßen werden.

Dazu gehören Prozesse wie Ionenimbalance, Zusammenbruch der Blut-Hirnschranke, Ödementstehung, Anstieg des intrakraniellen Drucks, Herabsetzung des zerebralen Perfusionsdrucks, Beeinträchtigung des Energiemetabolismus, Aktivierung oder Freisetzung von autodestruktiven Mediatoren, Inflammation sowie deletäre oder protektive Veränderungen von intrazellulären Genen und Proteinen (Sahuquillo et al., 2001; Raghupathi et al., 2000).

Entscheidend ist, dass der entstehende Sekundärschaden im Gegensatz zum Primärschaden einer Therapie zugänglich ist.

Experimentelle Studien am Tiermodell zeigen, dass die sekundäre Schädigung bis zu 40% des totalen posttraumatischen Hirnschadens ausmacht (Plesnila et al., 2003; Stoffel et al., 2004; Zweckberger et al., 2006; von Baumgarten et al., 2008; Trabold et al., 2009; Plesnila et al., 2007). Obwohl es in den letzten 30 Jahren sowohl Fortschritte bei der Aufklärung der Pathophysiologie der, durch das mechanische Trauma angestoßenen, neurochemischen Kaskaden als auch auf dem Gebiet der technischen Möglichkeiten des Neuromonitorings gegeben hat, ist die Zahl der Patienten mit einem ungünstigen Outcome nach Schädel-Hirn Trauma auch in hochspezialisierten neurotraumatologischen Zentren, wie sie im European Brain Injury Consortium Network zusammengefasst sind, immer noch hoch (Murray et al., 1999; Tagliaferri et al., 2006; Narayan et al., 2002). Es gilt somit, die Pathophysiologie des sekundären Hirnschadens weiter aufzuschlüsseln, um neue therapeutische Angriffspunkte zu finden, die das Outcome von neurotraumatologischen Patienten weiter verbessern.

Neuronaler Zelltod im Rahmen des sekundären Hirnschadens nach Schädel-Hirn Trauma ist eine Ursache für die posttraumatische Mortalität und Morbidität (Zhang et al., 2005b). Im menschlichen Gehirn kommt es nach traumatischer Verletzung zum Verlust von Neuronen im Bereich des Kortex, des Hippocampus, des Kleinhirns und des Thalamus (Raghupathi et al., 2000). Veränderungen der Zellmorphologie, die auf eine ausgeprägte Neurodegeneration hinweisen,

lassen sich unmittelbar nach Trauma nachweisen und scheinen Wochen bis Monate anzuhalten (Bramlett and Dietrich, 2007). Elektronenmikroskopische Analysen neurodegenerativer Prozesse nach Schädel-Hirn Trauma haben ergeben, dass Neurone zum Teil morphologische Charakteristika des nekrotischen Zelluntergangs aufweisen. Hierzu gehören aufgetriebene Mitochondrien, vakuoliertes Zytoplasma und pyknotische Zellkerne. In vielen Neuronen lassen sich aber auch DNA-Fragmentation, geschrumpfte Zellorganellen und kondensiertes Chromatin nachweisen. Dies sind morphologische Kriterien, die für den apoptotischen Zelltod charakteristisch sind (Rink et al., 1995; Dietrich et al., 1994).

Die Intervention auf dem Gebiet apoptotischer Signalkaskaden bietet möglicherweise einen Ansatzpunkt für neue therapeutische Strategien. In den letzten Jahren haben eine Vielzahl von tierexperimentellen Studien belegt, dass es im Rahmen des Sekundärschadens zum apoptotischen Untergang von Neuronen nach experimentellem Schädel-Hirn Trauma kommt. Dies ist Thema vieler grosser Übersichtsarbeiten der letzten Jahre (Kovesdi et al., 2007; Zhang et al., 2005b; Wong et al., 2005; Raghupathi, 2004; Liou et al., 2003; Springer, 2002; Raghupathi et al., 2000). Auch im menschlichen Gehirn gibt es gut dokumentierte Evidenz dafür, dass apoptotischer Zelltod zum sekundären Schaden nach Schädel-Hirn Trauma beiträgt (Clark et al., 2000a; Smith et al., 2000; Williams et al., 2001; Nathoo et al., 2004; Zhang et al., 2003b; Hausmann et al., 2004; Uzan et al., 2006; Dressler et al., 2007).

Es gibt bisher keine Studie, die den direkten Beitrag des apoptotischen Zelluntergangs am sekundären Hirnschaden misst. Allerdings konnte der sekundäre Zelluntergang nach tierexperimentellem Schädel-Hirn Trauma unter pharmakologischer Inhibition oder genetischer Ausschaltung von apoptotischen Mechanismen, um bis zu 60% reduziert werden (Clark et al., 2000b; Raghupathi et al., 1998). Somit stellt die Aufklärung apoptotischer Kaskaden sowie deren pharmakologische Beeinflussung, einen viel versprechenden Angriffspunkt in der Therapie und Prognoseverbesserung von Schädel-Hirn Trauma Patienten dar.

## **1.2. Neuronale Apoptose nach Schädel-Hirn Trauma**

### **1.2.1. Überblick**

Apoptose ist eine aktive Form des Zelltods, die auf Basis von Informationen aus der Entwicklungsgeschichte der Zelle, aus der Zellumgebung oder aus dem Genom der Zelle initiiert wird. Abzugrenzen davon ist die Nekrose als eine passive Form des Zelltods, die auf eine lethale Beschädigung der Zelle zurückzuführen ist.

Die physiologische Funktion des programmierten Zelltodes im zentralen Nervensystem besteht in der Beseitigung von überflüssigen, überalterten oder beschädigten Zellen, zum Beispiel im Rahmen der Regulation der Neuronenzahl während der Embryonalentwicklung oder der Tumorsuppression (Cowan et al., 1984). Fehlgesteuerte Apoptose im ausgereiften Gehirn spielt

eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie neurodegenerativer Erkrankungen (Mattson, 2000a), wie zum Beispiel Parkinson (Tatton et al., 2003), Alzheimer (Kitamura et al., 1999) und amyotropher Lateralsklerose (Martin, 1999). Neben dem Schädel-Hirn Trauma führen auch andere akute Insulte wie zerebrale Ischämie (Mattson et al., 2000; Dirnagl et al., 1999) und Subarachnoidalblutung (Zhou et al., 2005) zur Aktivierung apoptotischer Signalkaskaden. Obwohl die Auslösemechanismen des programmierten Zelltods bei den einzelnen Krankheiten variieren, sind die ausführenden biochemischen und morphologischen Veränderungen, die bei apoptotischen Zellen zu beobachten sind sehr ähnlich, was Anlass für das Konzept des apoptotischen Zelltods als „central executioner“ gegeben hat (Ferri and Kroemer, 2001). Morphologisch ist Apoptose durch Chromatin-Kondensation, Zellschrumpfung und Fragmentation der Zelle in apoptotische Körperchen, die von Phagozyten beseitigt werden ohne eine inflammatorische Reaktion hervorzurufen, gekennzeichnet. Auf molekularer Ebene liegt der Endpunkt der Apoptose in der gesteuerten Fragmentation der zelleigenen DNA.

Apoptose kann durch multiple, zum Teil interagierende, Signalwege eingeleitet werden. Hierbei spielen bei der neuronalen Apoptose vor allem zwei große Signalkaskaden eine Rolle: Zum einen die Aktivierung der Enzymfamilie der Cystein-abhängigen, Aspartat-spezifischen Proteasen, genannt Caspasen, zum anderen kann Apoptose Caspasen-unabhängig durch die Freisetzung von apoptotischen Faktoren aus den Mitochondrien initiiert werden (Hengartner, 2000; Zhang et al., 2005b). Im Folgenden soll eine kurze Charakterisierung der komplexen apoptotischen Kaskaden erfolgen und deren Bezug zur Pathophysiologie des Schädel-Hirn Traumas hergestellt werden. Die molekularen Mechanismen, die in dieser Arbeit untersucht werden, können somit in einen größeren Kontext gestellt werden.

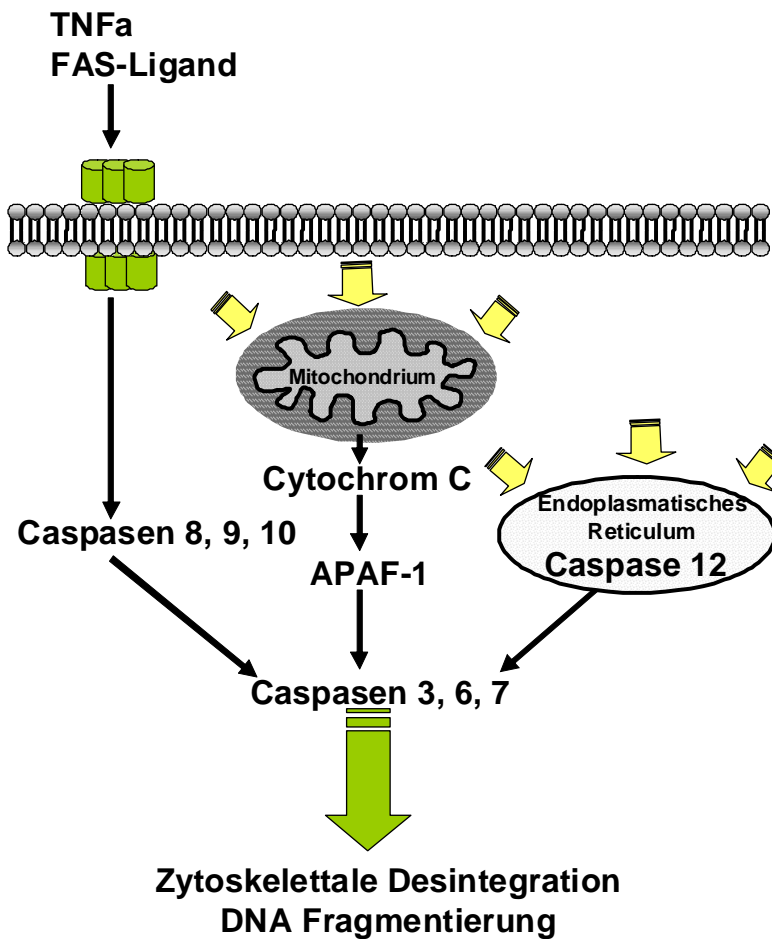
## **1.2.2. Effektormechanismen**

### ***1.2.2.1 Caspase-abhängige Signaltransduktion***

Die Familie der Caspasen umfasst derzeit 14 bekannte Mitglieder, die als Pro-Enzyme synthetisiert werden. Nach der proteolytischen Spaltung in große und kleine Untereinheiten können sie einen aktiven tetrameren Proteasenkomplex bilden (Salvesen and Dixit, 1997). Initiator-Caspasen, wie die Caspase 8, 9 und 10, werden durch Spaltung und Aggregation aktiviert. Caspasen 3, 6 und 7, denen die ausführende Funktion zukommt, werden durch die Initiatorcaspasen aktiviert. Zum Zeitpunkt der Aktivierung der Caspasen ist der Prozess der Apoptose irreversibel eingeleitet. Die proteolytische Spaltung ihrer Substrate führt zu den typischen morphologischen Kriterien der Apoptose wie zum Beispiel zur zytoskelettalen Desintegration und zur DNA-Fragmentation (Hengartner, 2000).

Der Caspasen-abhängige Zelluntergang im Rahmen des sekundären Hirnschadens ist nach experimentellem Schädel-Hirn Trauma untersucht und dokumentiert worden (Yakovlev et al., 1997;

Pike et al., 2000; Clark et al., 2000b; Lerner et al., 2005; Knoblach et al., 2002). Weiterhin konnten aktivierte Caspasen im Liquor und im Hirngewebe von Patienten nach Schädel-Hirn Trauma nachgewiesen werden (Harter et al., 2001; Clark et al., 1999; Nathoo et al., 2004; Uzan et al., 2006). Abbildung 1 zeigt eine schematische Darstellung der Caspasen-abhängigen Signaltransduktion im zentralen Nervensystem.



**Abbildung 1: Schematische Darstellung der Caspasen-abhängigen Signaltransduktion**

Der Zelltod durch Aktivierung von Caspasen kann durch extrinsische und intrinsische Signalwege initiiert werden. Dabei involviert der extrinsische Signalweg die Bindung von zelltodinitiiierenden Molekülen an neuronale Zelloberflächenrezeptoren (Cheema et al., 1999). Nach Schädel-Hirn Trauma konnten im humanen Kortex und Liquor die Apoptose-initiiierenden Liganden Tumor Necrosis Faktor (TNF) und FAS-Ligand nachgewiesen werden (Qiu et al., 2002; Ertel et al., 1997; Lenzlinger et al., 2002).

Der intrinsische Signalweg wird in erster Linie durch Stress auf zelluläre Organellen, wie zum Beispiel Mitochondrien und endoplasmatisches Retikulum (ER), ausgelöst. Nach Depolarisation oder Änderungen der Permeabilität der Mitochondrienmembran kommt es zur Cytochrom C

Freisetzung. Cytochrom C kann durch Interaktionen mit dem Protease Activating Factor (APAF-1), die Caspasen 9 und 3 aktivieren (Zou et al., 2003). Beim experimentellen Schädel-Hirn Trauma der Ratte konnte durch pharmakologische Verminderung der Cytochrom C Freisetzung der sekundäre Zelluntergang vermindert werden (Clark et al., 2007). Weiterhin konnte Cytochrom C im Liquor von Kindern nachgewiesen werden, die im Rahmen von Kindesmisshandlung ein Schädel-Hirntrauma erlitten (Satchell et al., 2005).

Auf der Ebene des endoplasmatischen Retikulums können Veränderungen der Kalzium-Hömoostase und exzessive Proteinakkumulation Apoptose auslösen. Dies geschieht durch Aktivierung der im endoplasmatischen Retikulum lokalisierten Caspase 12. Dieser Mechanismus scheint eine Rolle in der Pathophysiologie des sekundären Schadens beim experimentellen Schädel-Hirn Trauma der Ratte zu spielen (Larner et al., 2004). Weitere Enzymfamilien tragen ebenfalls zur Aktivierung von apoptotischen Mechanismen nach Neurotrauma bei. Die sogenannten Calpaine sind Kalzium-abhängige Proteasen mit einer Vielzahl von zellulären Substraten, wie zum Beispiel cytoskelettale Proteine. Calpain-Aktivierung wird nach Schädel-Hirn Trauma beobachtet und ist mit Caspase 3 Aktivierung kolokalisiert (Pike et al., 2000; Buki et al., 2000). Eine pharmakologische Hemmung der Calpainaktivierung nach Trauma erwies sich als neuroprotektiv (Knoblach et al., 2004).

### ***1.2.2.2 Caspase-unabhängige Signaltransduktion***

Verschiedene mitochondriale Proteine können Apoptose ohne die Aktivierung von Caspasen induzieren. Der Apoptosis Inducing Factor (AIF) ist ein mitochondriales Flavoprotein, welches nach mitochondrialer Membrandepolarisation freigesetzt wird (Susin et al., 1999). AIF transloziert in den Zellkern und induziert dort die DNA-Fragmentation. AIF-induzierte DNA-Fragmentation ist tierexperimentell nach zerebraler Ischämie (Plesnila et al., 2004) und Schädel-Hirn Trauma (Zhang et al., 2002; Slemmer et al., 2008) nachgewiesen worden. Andere mitochondriale Proteine, die bei apoptotischen Vorgängen eine Rolle spielen, sind Endonuclease G (Li et al., 2001), Htr2A/Omi (Suzuki et al., 2001) und Smac/Diablo (Chai et al., 2000), allerdings bleibt ihre Rolle nach Schädel-Hirn Trauma unklar.

Es hat sich gezeigt, dass Poly(ADP-Ribose)polymerase (PARP) Aktivierung zum Caspase-unabhängigen apoptotischen Zelltod beitragen kann (Yu et al., 2003). Bei Zuständen einer eingeschränkten NAD<sup>+</sup> Verfügbarkeit im Rahmen einer Kompromittierung der zellulären Energiebereitstellung, wie sie im perikontusionellen Gewebe bei Schädel-Hirntrauma vorliegt, kann die PARP-Aktivierung zur mitochondrialen Depolarisation, AIF-Freisetzung und zur p53-vermittelten Apoptose beitragen (Komjati et al., 2005; Culmsee and Mattson, 2005).

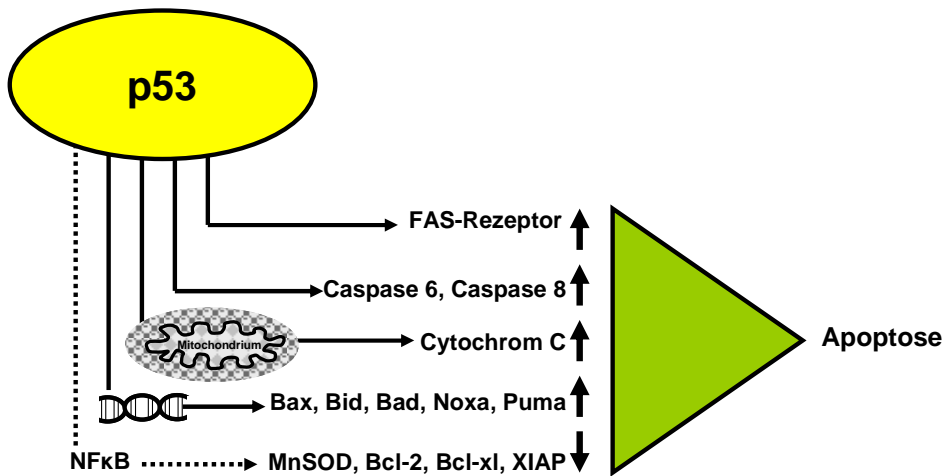
### **1.2.3. Regulatorproteine**

Caspase-abhängige und Caspase-unabhängige Apoptose wird durch die B-Zell-Lymphoma 2 (Bcl-2) Proteinfamilie reguliert, welche sowohl pro-apoptische als auch anti-apoptische Moleküle beinhaltet (Graham et al., 2000). Die über 20 bekannten Mitglieder der Bcl-2 Proteinfamilie regulieren die Permeabilität der äußeren mitochondrialen Membran (Harris and Thompson, 2000; Liou et al., 2003). Die Proteinfamilie zeichnet sich durch homologe Domänen aus (BH 1-4), die zur Komplexbildung befähigen. Komplexe, die aus BH-3-haltigen Proteinen bestehen, wie zum Beispiel Bax, Bid, Puma, Noxa und Bad, induzieren durch Porenbildung in der mitochondrialen Membran die mitochondriale Cytochrom C-Freisetzung (Graham et al., 2000; Ward et al., 2004). Anti-apoptische Mitglieder der Bcl-2 Familie umfassen die Moleküle Bcl-xl, Bcl-2 und Mcl-1l. Sie verhindern die Freisetzung von Proteinen aus den Mitochondrien, einschließlich Cytochrom C (Rosse et al., 1998), Endonuclease G (Li et al., 2001) und AIF (Susin et al., 1999).

### **1.3. Bedeutung von p53 für die neuronale Apoptose**

Zu den übergeordneten Initiatorproteinen der neuronalen Apoptose gehört das Tumorsuppressorprotein p53. Seine Aktivierung ist im zentralen Nervensystem mit dem Untergang von Neuronen assoziiert (Morrison et al., 2003; Hofseth et al., 2004). P53 kann als vorgeschaltetes Steuermolekül die apoptotische Kaskade in Gang bringen.

Dies geschieht zum einen auf Transkriptionsebene: P53 fungiert als Transkriptionsaktivator pro-apoptischer Zielgene, wie zum Beispiel Bax, Bid, Bad, Noxa und Puma (Cregan et al., 1999; Ward et al., 2004; Culmsee and Mattson, 2005; Liou et al., 2003). Zum anderen gibt es Evidenz dafür, dass p53 Transkriptions-unabhängig Apoptose initiieren kann. Hierbei spielen die Translokation von FAS-Rezeptoren auf die Zellmembran (Bennett et al., 1998), die Aktivierung von Caspase 6 und 8 (Ding et al., 2000) und die Freisetzung von Cytochrom C durch mitochondrial lokalisiertes p53 (Erster and Moll, 2005), eine Rolle. In den letzten Jahren wurde ein weiterer Mechanismus der p53-abhängigen Apoptose untersucht: die Inhibition des anti-apoptischen wirksamen nukleären Transkriptionsfaktors  $\kappa$ B, kurz NF $\kappa$ B (Webster and Perkins, 1999). In Neuronen kann NF $\kappa$ B Signalkaskaden, die das Überleben einer Zelle begünstigen, initiieren. NF $\kappa$ B kann als transaktivierender Transkriptionsfaktor die Expression von anti-apoptischen Proteinen, wie zum Beispiel Bcl-2 und Bcl-xl (Culmsee et al., 2002), Mangan-Superoxid-Dismutase (MnSOD) (Mattson et al., 1997; Bui et al., 2002) und die Proteinfamilie der Inhibitoren der Apoptose oder IAPs (Chu et al., 1997) induzieren. Die Hypothese, dass eine wechselseitige Beeinflussung von p53 und NF $\kappa$ B für den apoptotischen Zelluntergang im ZNS eine wichtige Rolle spielt, wird untermauert durch die Beobachtung, dass p53 nach zerebraler Ischämie die NF $\kappa$ B-Transkriptionsaktivität in Neuronen inhibiert (Culmsee et al., 2003). Einen Überblick über die Steuerungsfunktion von p53 im Rahmen der neuronalen Apoptose gibt Abbildung 2.



**Abbildung 2: Schematische Darstellung der übergeordneten Steuerfunktion von p53 im Rahmen der neuronalen Apoptose**

p53 besitzt eine Schlüsselrolle bei der Initiation neuronaler Apoptose. Es konnte gezeigt werden, dass der neuronale Zelluntergang durch Exposition von oxidativem Stress, von DNA-schädigenden Substanzen oder von Glutamat in *in vitro*-Studien ein p53-vermittelter Prozess ist (Hughes et al., 1997; Cregan et al., 1999; Xiang et al., 1998; Culmsee et al., 2001; Culmsee et al., 2003). *In vivo* konnte gezeigt werden, dass es nach zerebraler Ischämie (Crumrine et al., 1994; Li et al., 1994), nach intrazerebraler Blutung (Zhou et al., 2005; Cahill et al., 2007), im Rahmen der Alzheimer Erkrankung (de la Monte et al., 1997), bei Chorea Huntington (Bae et al., 2005), im Rahmen der multiplen Sklerose (Li et al., 2008) und beim Morbus Parkinson (Biswas et al., 2005) zur neuronalen p53-Akkumulation kommt. Studien an p53-knockout Mäusen belegen, dass p53 zum sekundären Absterben von Neuronen nach ischämischem und exitotoxischem Stress beiträgt (Crumrine et al., 1994; Morrison et al., 1996).

Auch nach Schädel-Hirn Trauma ist tierexperimentell eine gesteigerte p53 Expression belegt (Muir et al., 1999; Xue and Yang, 2004; Kaya et al., 1999; Lu et al., 2000; Napieralski et al., 1999). Eine gesteigerte p53-Expression lässt sich auch im humanen Kortex nach Schädel-Hirn Trauma nachweisen (Ng et al., 1999; Yang and Xue, 2004). Trotzdem ist bislang unklar, welchen Beitrag der p53-abhängige Zelltod zum sekundären Schadenswachstum nach Trauma leistet.

## 1.4. Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Expression von p53 nach experimentellem Schädel-Hirn Trauma der Maus zu untersuchen und zu evaluieren, ob diese eine kausale Rolle für die Entstehung des sekundären Hirnschadens nach Trauma spielt. Hierzu wird die Auswirkung einer pharmakologischen Inhibition von p53 auf die Entwicklung des Sekundärschadens nach traumatischem Insult bestimmt. Weiterhin wird untersucht, ob es nach Trauma zur p53-abhängigen

Änderung der posttraumatischen NFκB-Aktivität kommt und ob die Imbalance der beiden Transkriptionsfaktoren kausal zum sekundären Hirnschaden nach Schädel-Hirn Trauma beiträgt.

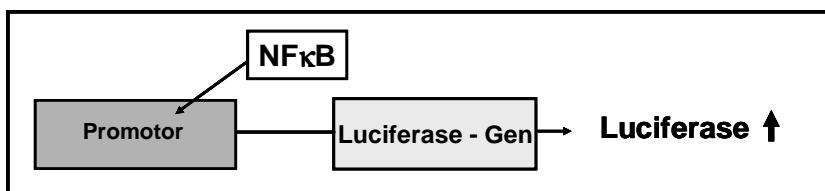


## 2. Material und Methoden

### 2.1. Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden männliche C57Bl6 Mäuse (Charles River, Deutschland) mit einem Gewicht zwischen 25 und 28 g verwendet. Weiterhin kamen transgene, männliche E14-NFκB-Luciferase Reporterermäuse mit einem Gewicht zwischen 25 und 28 g zum Einsatz. Diese Tiere wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Carsten Culmsee vom Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Ludwig-Maximilians-Universität München zur Verfügung gestellt. Es handelt sich um eine transgene C57Bl6-Mauslinie, die im Labor von Richard Flavell (Department of Molecular, Cellular and Developmental Biology, Yale University School of Medicine, New Haven, Connecticut, USA) hergestellt und charakterisiert wurde (Voll et al., 2000; Millet et al., 2000). Die transgene Founder-Linie wurde durch Mikroinjektion eines 2.0 kb HindIII-XhoI Fragments des NFκB-Reporter Gens pBlIx-luc in fertilisierte C57Bl6 F2 Eizellen erstellt. Das NFκB-Luciferase-Transgen enthält das Firefly-Luciferase Gen unter der Kontrolle von 2 DNA-NFκB Bindungsstellen, die die Homo- und Heterodimerkombinationen p65/p50, p50/cRel, p65/p65, p50/p50 und p65/c-Rel binden.

Luciferase ist ein Enzym, welches durch Oxidation seines Substrats Luciferin zur Biolumineszenz führt. Das Prinzip wird zur Darstellung und Quantifizierung der NFκB-Transkriptionsaktivität genutzt: Bindet NFκB an seinem Promotor, so wird in den transgenen Tieren das künstlich eingeführte Luciferase Gen abgelesen und das Genprodukt Luciferase exprimiert. Die Menge der hergestellten Luciferase dient als relatives Maß für die NFκB -Transkriptionsaktivität und kann mit einem Luminometer, wie unter Abschnitt 2.7.2 beschrieben ermittelt werden.



**Abbildung 3: Schematische Darstellung des NFκB-Luciferase Gens von E14-NFκB-Luciferase Reportertieren**

Alle Tiere wurden im Tierstall des Instituts für Chirurgische Forschung mit freiem Zugang zu Wasser und Futter (Sniff® R/M-H, Sniff Spezialdiäten, Soest, Deutschland) gezüchtet und gehalten. Der Tierstall war voll klimatisiert, bei einer Raumtemperatur von etwa 20°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 65%. Über eine Zeitschaltuhr wurde ein Zwölf-Stundenrhythmus künstlicher Beleuchtung eingehalten.

## **2.2. Versuchsdurchführung**

### **2.2.1. Narkose**

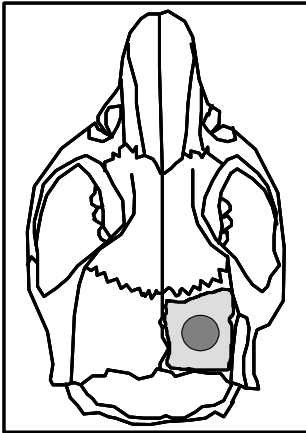
Für die Einleitung der Kurzzealnarkose zur Traumaapplikation wurde für 40 Sekunden 4% Halothan (Eurim-Pharma, Piding, Deutschland) über einen Narkosemittel-Verdunster (Dräger-Vapor 19.3, Dräger Medial, Lübeck, Deutschland) in eine Halothankammer geleitet. Während der Präparation wurde die Narkose mit einem Gemisch aus 1,1% Halothan, 30% Sauerstoff und 70% Lachgas (Linde, München, Deutschland), das über eine Maske den spontan atmenden Tieren zugeführt wurde, aufrechterhalten. Zur Ausleitung der Narkose wurde die Zufuhr von Halothan und Lachgas gestoppt und die Versuchstiere atmeten für eine Minute reinen Sauerstoff.

Bei Experimenten, für die eine längere Narkose notwendig war, erfolgte diese mittels einer intraperitonealen Injektion von Medetomidin, Midazolam und Fentanyl in der folgenden Dosierung: Medetomidin (Dr. E. Graub, Basel, Schweiz) 0,5 mg pro kg Körpergewicht, Midazolam (Ratiopharm, Ulm, Deutschland) 5 mg pro kg Körpergewicht und Fentanyl (Jansen – Cilag, Neuss, Deutschland) 0,05 mg pro kg Körpergewicht. Anschließend erfolgte unter Sicht mit einem OP-Mikroskop (OP-Mi 1, Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland) die Intubation in 45° Kopfhochlagerung. Als Tubus wurde eine Eigenkonstruktion, bestehend aus einem gekürzten Venenverweilkatheter (Becton-Dickinson Medical, Heidelberg, Deutschland), verwendet. Danach wurden die Versuchstiere mit einem druckgesteuerten Kleintierrespirator (Minivent 845, Hugo Sachs Elektronik, March – Hungstetten, Deutschland) mit 30% Sauerstoff mechanisch beatmet. Die kontinuierliche Bestimmung der expiratorischen endtidalen Kohlendioxidkonzentration (EtCO<sub>2</sub>) sowie die Messung der Atemfrequenz erfolgte mikrokapnographisch (CI240, Columbus Instruments, Ohio, USA). Atemfrequenz und Atemzugvolumen der mechanisch ventilierten Versuchstiere konnten so optimal angepasst werden, um physiologische Atmungsbedingungen zu schaffen. Diese liegen bei Mäusen etwa bei einer Atemfrequenzen von 120 bis 160 Atemzüge pro Minute und einem Atemzugvolumen von 200 µl. Zu Versuchsbeginn und nach Versuchsende wurden über den arteriellen Katheter Blutproben zur Blutgasanalyse entnommen. Diese wurde mit einem handelsüblichen Analysegerät (Nr. 860, Chiron Diagnostics Corporation, East Walpole, MA, USA) durchgeführt.

### **2.2.2. Controlled Cortical Impact**

Die Applikation des Schädel-Hirn Traumas erfolgte nach einem standardisierten Protokoll (Zweckberger et al., 2003; Zweckberger et al., 2006; von Baumgarten et al., 2008; Plesnila et al., 2007; Trabold et al., 2009). Das Versuchstier wurde in einem stereotaktischen Rahmen (Small Animal Stereotactic Frame, Model 900, David Kopf Instruments, Tujunga, Ca, USA) in Bauchlage positioniert. Es erfolgte eine 0,3 cm lange mediane Inzision der Kopfhaut zur Freilegung des Schädelknochens, von der vorderen (Bregma) bis zur hinteren (Lambda) Koronarnaht. Galea und

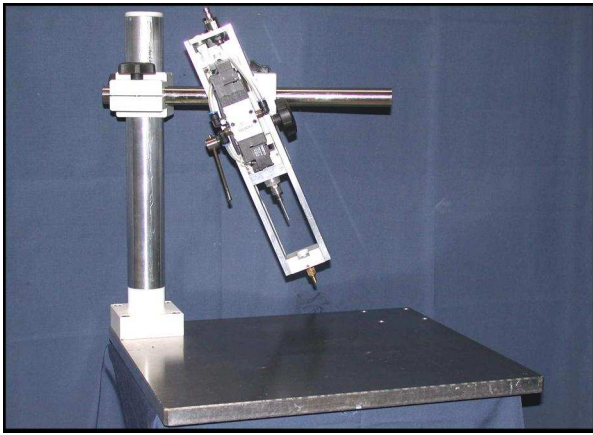
Periost wurden über der Kalotte stumpf abpräpariert. Nun erfolgte die Auffräsung der Kalotte über dem rechten parietalen Kortex zwischen Lambda-Koronarnaht und dem Ansatz des M. temporalis mit einem feinen Bohrer (Uni-Drive N, Paggen Werkzeugtechnik, Starnberg, Deutschland; Bohrerkopfaufsatz: Aesculap GD870R, 0,8 x 5,1 mm, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland). Abbildung 4 zeigt die schematische Darstellung der Kraniotomie und die Lokalisation der Trauma-Applikation.



**Abbildung 4: Schematische Darstellung des Mäuseschädels**

Kraniotomie über dem rechten parietalen Kortex (hellgrau unterlegt), Lokalisation der Trauma-Applikation (dunkelgrau unterlegt).

Das Aufbohren des Schädelknochens erfolgte, zur Schonung der Dura mater, unter kontinuierlicher Kühlung mit 0,9% NaCl (Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland). Anschließend wurde die Kalotte manuell über der sagittalen Koronarnaht aufgeklappt und blieb am Periost hängen. Die Dura mater wurde mikroskopisch auf ihre Unversehrtheit hin überprüft und während des Versuchsablaufs mit steriler, 0,9%iger NaCl-Lösung (Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) feucht gehalten. Die Applikation des standardisierten Traumas, nach dem Modell des Controlled Cortical Impact (Dixon et al., 1991), erfolgte mit einem speziell angefertigten Gerät (siehe Abbildung 5, L. Kopacz, Mainz). Ein hydraulisch getriebener Kolben, mit einem Durchmesser von 3 mm, drang im 90°-Winkel zur Gehirnoberfläche, mit einer Geschwindigkeit von 8 m/s, 0,75 mm tief ins Gehirnparenchym ein. Die Kontaktzeit mit der Gehirnoberfläche betrug 150 ms. Die Geschwindigkeit und die Kontaktzeit wurden durch eine im Gerät integrierte Lichtschranke kontrolliert zum Zeitpunkt der Traumaapplikation kontrolliert.



**Abbildung 5: Hydraulisch getriebener Kolben zur Traumaapplikation**

Das initial ausgefräste Knochenfragment wurde über dem Situs repositioniert und mit Gewebekleber (Histoacryl, Baun-Melsungen, Melsungen, Deutschland) fixiert. Anschließend wurde die mediane Inzision der Kopfhaut mit einem Vicrylfaden zugenäht (Ethibond Excel 5/0, Ethicon, Brüssel, Belgien). Sham-operierte Tiere durchliefen dieselbe Versuchsabfolge (Narkose, Kraniotomie, Verschluss der Kraniotomie) ohne Trauma-Applikation.

Die Körpertemperatur wurde bei allen Versuchstieren während der gesamten Versuchsdauer konstant bei  $36,5 \pm 0,1^\circ\text{C}$  gehalten. Zu diesem Zweck wurde bei Versuchsbeginn eine Sonde rektal eingeführt und mit einem Temperaturhomöostasegerät (FHC, Bowdingham, ME, USA), das eine Heizplatte im Boden des stereotaktischen Rahmens steuerte, verbunden. Zur Verhinderung eines Abfalls der Körperkerntemperatur während der Aufwachphase, wurden die Versuchstiere bis zur Rückkehr der spontanen motorischen Aktivität in einem Inkubator (Intensivpflegeinkubator Typ 7012, Drägerwerke Lübeck, Deutschland) bei  $36^\circ\text{C}$  ver wahrt.

### **2.2.3. Pifithrin-Applikation**

10 mg Pifithrinpulver (PFT- $\alpha$ , Calbiochem, Merck Bioscience GmbH, Schwalbach, Deutschland) wurde in 400  $\mu\text{l}$  Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland) gelöst, aliquotiert und bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert. Vor jedem Versuch wurden die einzelnen Proben bei Raumtemperatur langsam aufgetaut, um ein Ausfällen des Pifithrins zu vermeiden. Die jeweilige gewichtsspezifische Pifithrin-Dosierung wurde mit 0,9%iger, steriler Kochsalzlösung auf ein Gesamtvolumen von 300  $\mu\text{l}$  aufgefüllt und intraperitoneale verabreicht. Kontrolltiere erhielten die gewichtsspezifisch Menge an Trägersubstanz (DMSO) in 0,9% NaCl (0,16  $\mu\text{l}$ , 0,24 $\mu\text{l}$  bzw. 0, 32  $\mu\text{l}$  DMSO pro g Körpergewicht als Äquivalent einer Pifithrindosierung von 4, 6 oder 8 mg/kg Körpergewicht).

Die Pifithrindosen wurden auf der Basis von Konzentrationen gewählt, die sich im Mausmodell der zerebralen Ischämie als therapeutisch wirkungsvoll erwiesen haben (Culmsee et al., 2001; Culmsee et al., 2003).

#### **2.2.4. Blutdruckmessung**

Zur Erfassung des arteriellen Mitteldrucks bei Langzeitversuchen wurde ein Katheter mit angeschlossenen Drucksensor in die A. femoralis implantiert. Nach einer circa 1 cm langen Inzision im Bereich des rechten Ligamentum inguinale der Maus, erfolgte die Darstellung der Gefäß-Nervenscheide des Beins. Unter Schonung von Nervus und Vena femoralis wurde die Arteria femoralis frei präpariert. Unter temporärer Unterbrechung der Blutversorgung durch einen Mikro-Gefäßklipp (Zen Temporary Clip, No. 10-b, Ohwa Tsusho Co. Ltd., Tokyo, Japan) wurde die Arterie mit einer Mikroschere ca. 0,2 mm weit eingeschnitten. Anschließend wurde ein Katheter (Polythene Katheter, Außendurchmesser 0,6 mm, Innendurchmesser 0,28 mm, SIMS Portex, Kent, Großbritannien) etwa 7 mm weit in das Gefäß eingeführt und unter Zuhilfenahme von Gewebekleber (Histoacryl, Baun-Melsungen, Melsungen, Deutschland) und einer Fadenschlinge (Ethibond Excel 5/0, Brüssel, Belgien) fixiert. Der Blutdruck wurde mit einem Transducer von Becton Dickinson (DTX Plus DT-XX, Becton Dickinson Medical, Heidelberg, Deutschland) gemessen. Zur Verhinderung des Verschlusses der Arterie wurde das Kathetersystem mit einer 0,9%-igen NaCl Lösung mit der Flußrate von 0,2 ml/hr perfundiert (Infusionspumpe WPI SP100i Syringe Pump, World Precision Instruments, Sarasota, USA). Die Datenerfassung erfolgte mit einem PC unter Verwendung einer Analog-Digital-Wandlerkarte und der Datenerfassungssoftware DasyLab 5.0 (DasyLab 5.02.20, Datalog GmbH, Mönchengladbach, Deutschland).

Die während der Narkose der Tiere gewonnenen Blutdruckdaten wurden mit einer zeitlichen Auflösung von 10 Hz aufgezeichnet, zur Datenreduktion wurden 10 aufeinander folgende Werte zu einem Wert gemittelt. Für die weitere Verarbeitung wurden die Daten im DasyLab-Datenformat gespeichert.

Die Auswertung erfolgte mit dem Programm FlexPro 6.0 (FlexPro 6.0.25, Weisang GmbH & Co KG, Kassel, Deutschland).

## 2.3. Versuchsgruppen

Die Gruppenzuteilung der Versuchstiere erfolgte bei allen Versuchen randomisiert. Die Operateurin war während Versuchsdurchführung und -auswertung hinsichtlich der Therapie der Tiere verblindet. Die unten aufgeführte Tabelle zeigt alle Versuchsgruppen im Überblick.

Versuchstiere:	Anzahl:	Untersuchung:
C57Bl6	20	Zeitverlauf der p53 Expression nach Trauma (Western Blot)
C57Bl6	4	Lokalisation der p53 Expression im traumatisierten Gehirn (Immunhistochemie)
C57Bl6	10	Messung physiologischer Parameter vor und nach Pifithrin-Applikation (kontinuierliche Messung des arteriellen Blutdrucks, Blutgasanalyse)
C57Bl6	40	Auswirkung der Pifithrin- Vorbehandlung auf das posttraumatische Kontusionsvolumen (histomorphometrische Bestimmung des Kontusionsvolumens)
C57Bl6	42	Etablierung des therapeutischen Fensters der Pifithrin-Applikation nach Trauma (histomorphometrische Bestimmung des Kontusionsvolumens)
C57Bl6	24	Etablierung des therapeutischen Fensters der Pifithrin-Applikation nach Trauma (histomorphometrische Bestimmung des Kontusionsvolumens)
C57Bl6	18	Zeitverlauf der NFκB-DNA-Bindungsaktivität nach Trauma (ELISA)
NFκB-Luciferase Reporter-mäuse	18	Zeitverlauf der NFκB- Transkriptionsaktivität nach Trauma (Luciferase Assay)
NFκB-Luciferase Reporter-mäuse	16	Posttraumatischen NFκB-Transkriptionsaktivität unter p53-Inhibition mit Pifithrin (Luciferase Assay)

**Tabelle 2: Einteilung der Versuchsgruppen**

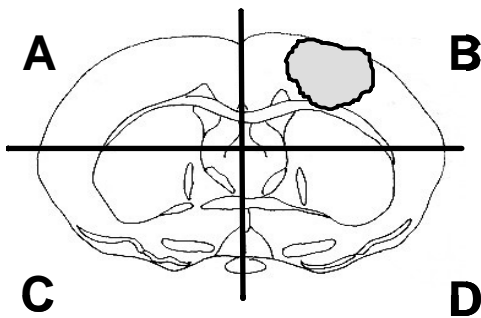
### 2.3.1. P53-Expression nach Trauma

Zur Untersuchung der p53-Expression nach Trauma wurden 18 C57Bl6-Mäuse randomisiert in sechs Versuchsgruppen eingeteilt. Die Traumaapplikation erfolgte in Halothannarkose.

Anzahl der Versuchstiere:	Prozedur:	Zeitpunkt der Hirnentnahme:	Untersuchung:
4	CCI	15 Minuten	p53-Western Blot
4		3 Stunden	
4		6 Stunden	
4		12 Stunden	
4		24 Stunden	
4	Sham-OP	15 Minuten	

**Tabelle 3 : Versuchsprotokoll zur Untersuchung der posttraumatischen p53-Expression im Western Blot**

In tiefer Halothannarkose erfolgte, nach Tod durch zervikale Dislokation, zu unterschiedlichen Zeitpunkten (15 Minuten, drei, sechs, zwölf und 24 Stunden nach Trauma) die Hirnentnahme. Hierzu wurde die Schädelkalotte medial, von okzipital nach frontal, gespalten und auseinandergedrängt. Nach dem Abtrennen der spinalen Fasern und der Durchtrennung der Hirnnerven konnte das Gehirn mit einem Dissektionsspatel mobilisiert und entnommen werden. Daraufhin wurde es mit einer Standardmatrix für Mausgehirn (FST GmbH, c/o Heidelberg, Deutschland) in 4 mm dicke Scheiben unterteilt. Der koronare Schnitt, der die Kontusion enthielt, wurde in vier Quadranten unterteilt (siehe Abbildung 6). Quadrant A und C enthielten Hirngewebe aus der Hemisphäre kontralateral zur Kontusion, Quadrant B enthielt die Kontusion sowie perikontusionelles Hirngewebe und Quadrant D unverletztes, ipsilateral zur Kontusion gelegenes Parenchym.



**Abbildung 6 : Schematische Darstellung der Gewinnung von Gewebelysaten nach Trauma**

Eine 4 mm dicke, koronare Hirnscheibe wurde in 4 Quadranten zerteilt. Quadrant B enthält die, in der Abbildung grau unterlegte Kontusion

Die Quadranten wurden auf Eis in einem Eppendorfgefäß unter Zugabe von je 250 µl eiskaltem Lysepuffer (Complete Lysis Buffer, Active Motif, Rixensart, Belgium) mit einem

Homogenisierungsstäbchen (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) homogenisiert. Um die unlöslichen Komponenten zu entfernen, wurden die Ansätze bei 4°C für 15 min bei 13 000 g zentrifugiert. Der klare Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -80°C bis zur Western Blot Analyse gelagert.

Für die immunhistochemische Detektion von p53 im Hirngewebe wurden vier C57Bl6 Mäuse dem standardisierten Trauma unter Halothannarkose unterzogen.

Anzahl der Versuchstiere:	Prozedur:	Zeitpunkt der Hirnentnahme:	Untersuchung:
4	CCI	6 Stunden nach Trauma	p53-Immunhistochemie an Parafinschnitten

**Tabelle 4: Versuchsprotokoll 2**

Sechs Stunden nach Controlled Cortical Impact wurden die Versuchstiere erneut mit Halothan narkotisiert, mit Kanülen auf einer Styroporplatte fixiert und thorakotomiert. Mit einer stumpfen Injektionskanüle der Stärke 24 G (Mikrolance, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland) wurde der linke Ventrikel punktiert, und das rechte Herzohr für den Austritt von Blut und Spülflüssigkeit durch Inzision eröffnet. Das Versuchstier wurde zunächst mit physiologischer Kochsalzlösung perfundiert, bis das gesamte Blutvolumen durch Spüllösung ausgetauscht war. Anschließend erfolgte die Perfusion mit 4%-iger, Phosphat-gepufferter Paraformaldehydlösung (PH 7,4) unter dem Druck von ca. 100 cm Wassersäule. Das Gehirn wurde, wie zuvor beschrieben, aus dem Kranium gelöst und in vierprozentiger, gepufferter Paraformaldehydlösung über Nacht bei 4 C° im Kühlschrank gelagert.

Die Einbettung der Gehirne in Paraffin erfolgte nach einem Standardprotokoll. Dazu wurde das Gehirn zunächst in eine Standardkassette überführt. Anschließend erfolgte die sequentielle Inkubation in 70%-igem Ethanol für zwölf Stunden, in 90%-igem Ethanol für zwölf Stunden, in 96%-igem Ethanol für 24 Stunden, in 100%-igem Ethanol für neun Stunden, in Aceton für 17 Stunden und in Paraffin bei einer Temperatur von 60-62 °C für 30 Stunden.

Das Gehirn wurde mit einem Mikrotom (Reichert-Jung Biocut, Heidelberg, Deutschland) in 4 µm dicke Scheiben geschnitten, die auf Objektträger aufgebracht wurden. Die angegebenen Verbrauchsmaterialien wurden von den Firmen Merck Eurolab (Darmstadt), Carl Roth (Karlsruhe), Serva Electrophoresis (Heidelberg) sowie Sigma- Aldrich (Deisenhofen) im Reinheitsgrad „zur Analyse“ bezogen.



### 2.3.2. Physiologie nach Pifithrin-Applikation

Insgesamt wurden zehn C57Bl6 Mäuse untersucht. Die Versuchstiere wurden randomisiert in zwei Versuchsgruppen eingeteilt. Der Versuch erfolgte in Langzeitnarkose unter endotrachealer Intubation und mechanischer Ventilation.

Anzahl der Versuchstiere:	Prozedur:	Therapie:	Prozedur
5	Messung des arteriellen Mitteldrucks, Blutgasanalyse	PFT (8 mg/kg KG)	Messung des arteriellen Mitteldrucks, Blutgasanalyse
5		Vehikel	

**Tabelle 5: Versuchsprotokoll 3**

Einteilung der Versuchsgruppen zur Untersuchung physiologischer Parameter nach Pifithrin Applikation

Die Messung des arteriellen Mitteldrucks erfolgte über 60 Minuten, beginnend 30 Minuten vor, endend 30 Minuten nach der intraperitonealen Injektion von Pifithrin bzw. Vehikel. Zu Beginn und am Ende der Messphase wurden circa 30 µl arterielles Blut aus dem, in der Arteria femoralis liegenden, Katheter in eine Heparin-beschichtete Kapillare (Chiron Diagnostics, Walpole, USA) überführt. Aus dieser Probe wurden mit einem Blutgasanalysegerät (Chiron Diagnostics 860, Chiron Diagnostics, Walpole, USA) der pH-Wert, der Sauerstoff- und Kohlendioxidpartialdruck ( $pO_2$ ,  $pCO_2$ ), die Sauerstoffsättigung ( $SO_2$ ), und der Wert für die Bicarbonat-,  $Na^{2+}$  - und  $K^+$  - Konzentration bestimmt.

### 2.3.3. Pifithrin-Applikation vor Trauma

40 C57Bl6-Mäuse wurden randomisiert in vier Versuchsgruppen eingeteilt. 60 Minuten vor Versuchsbeginn wurde die gewichtsadaptierte Dosis Pifithrin (2 bzw. 3 mg pro kg Körpergewicht) oder Vehikel appliziert, drei Stunden nach Trauma wurde nochmals die initiale Dosis verabreicht. Behandelte Tiere erhielten somit eine Gesamtdosis von 4 bzw. 6 mg Pifithrin pro kg Körpergewicht. Die Traumaapplikation erfolgte in Halothannarkose.

Anzahl der Versuchstiere	Therapie 60 Minuten vor CCI	Prozedur:	Therapie 3 Stunden nach CCI	Zeitpunkt der Hirnentnahme nach CCI:	Untersuchung:
Kontrollgruppe 1: n=10	Vehikel	CCI		15 Minuten	Histomorphometrische Bestimmung des Kontusionsvolumens
Kontrollgruppe 2: n=10	Vehikel		Vehikel	24 Stunden	
Therapiegruppe1: n=10	Pifithrin (2 mg/kg KG)		Pifithrin (2 mg/kg KG)	24 Stunden	
Therapiegruppe2: n=10	Pifithrin (3 mg/kg KG)		Pifithrin (3 mg/kg KG)	24 Stunden	

**Tabelle 6 : Versuchsprotokoll 4**

### 2.3.4. Pifithrin-Applikation nach Trauma

Zur Etablierung des therapeutischen Fensters der Pifithrin-Applikation nach Trauma wurden 42 Versuchstiere randomisiert in sechs Versuchsgruppen eingeteilt. Die Therapiegruppen erhielten Pifithrin in einer Dosierung von 8 mg pro kg Körpergewicht zu unterschiedlichen Zeitpunkten (15 Minuten, eine, drei und sechs Stunden) nach Trauma. Kontrollgruppen erhielten die gewichtsadaptierte Menge Vehikel (0,32 µl DMSO pro mg KG gelöst in 300 µl physiologischer Kochsalzlösung) eine Stunde nach Trauma. Die Traumaapplikation erfolgte in Halothannarkose.

Anzahl der Versuchstiere:	Prozedur:	Art der Therapie und Zeitpunkt der Applikation nach Trauma:	Zeitpunkt der Hirnentnahme nach CCI::	Untersuchung:
Kontrollgruppe 1 n=7	CCI	Vehikel, 60 Minuten	15 Minuten	Histomorphometrische Bestimmung des Kontusionsvolumens
Kontrollgruppe 2 n=7		Vehikel, 60 Minuten	24 Stunden	
Therapiegruppe 1 n=7		Pifithrin (8 mg/kg KG), 15 Minuten	24 Stunden	
Therapiegruppe 2 n=7		Pifithrin (8 mg/kg KG), 60 Minuten	24 Stunden	
Therapiegruppe 3 n=7		Pifithrin (8 mg/kg KG), 3 Stunden	24 Stunden	
Therapiegruppe 4 n=7		Pifithrin (8 mg/kg KG), 6 Stunden	24 Stunden	

**Tabelle 7: Versuchsprotokoll 5**

In einer zweiten Versuchsreihe wurden die Versuchstiere nach Controlled Cortical Impact randomisiert in vier Versuchsgruppen eingeteilt. Die Therapiegruppen erhielten Pifithrin in einer Dosierung von 8 mg pro kg Körpergewicht sechs bzw. zwölf Stunden nach Trauma, Kontrolltiere erhielten die gewichtsadaptierte Menge Vehikel (0,32 µl DMSO pro mg KG gelöst in 300 µl physiologischer Kochsalzlösung).

Anzahl der Versuchstiere:	Prozedur:	Art der Therapie und Zeitpunkt der Applikation nach Trauma:	Zeitpunkt der Hirnentnahme:	Untersuchung:
Kontrollgruppe 1 n=6	CCI	Vehikel, 60 Minuten	15 Minuten	Histomorphometrische Bestimmung des Kontusionsvolumens
Kontrollgruppe 2 n=6		Vehikel, 60 Minuten	24 Stunden	
Therapiegruppe 1 n=6		PFT (8 mg/kg KG), 6 Stunden	24 Stunden	
Therapiegruppe 2 n=6		PFT (8 mg/kg KG), 12 Stunden	24 Stunden	

**Tabelle 8: Versuchsprotokoll 6**

### 2.3.5. NFκB-DNA-Bindungsaktivität nach Trauma

Zur Untersuchung der NFκB-DNA-Bindungsaktivität nach Trauma wurden C57Bl6 Mäuse randomisiert in sechs Versuchsgruppen unterteilt.

Anzahl der Versuchstiere:	Prozedur:	Zeitpunkt der Hirnentnahme:	Untersuchung:
3	CCI	15 Minuten	NFκB-ELISA
3	CCI	3 Stunden	
3	CCI	6 Stunden	
3	CCI	12 Stunden	
3	CCI	24 Stunden	
3	Sham-OP	15 Minuten	

**Tabelle 9: Versuchsprotokoll 7**

### 2.3.6. NFκB-Transkriptionsaktivität nach Trauma

Zur Untersuchung der NFκB-Transkriptionsaktivität nach Trauma wurden transgene NFκB Luciferase-Reporterermäuse randomisiert in sechs Versuchsgruppen (je n=3) unterteilt.

Anzahl der Versuchstiere:	Porzedur:	Zeitpunkt der Hirnentnahme:	Untersuchung
3	Sham-OP	15 Minuten	Luciferase Assay
3	CCI	3 Stunden	
3		6 Stunden	
3		12 Stunden	
3		24 Stunden	

**Tabelle 10: Versuchsprotokoll 8**

Zur Untersuchung der posttraumatischen NFκB-Transkriptionsaktivität unter p53-Inhibition mit Pifithrin wurden transgene NFκB-Luciferase-Reporterermäuse randomisiert in sechs Versuchsgruppen unterteilt. Die Versuchstiere erhielten Pifithrin (8 mg pro kg Körpergewicht) bzw. Vehikel eine Stunde vor Trauma.

Anzahl der Versuchstiere:	Therapie 60 Minuten vor CCI:	Prozedur:	Zeitpunkt der Hirnentnahme:	Untersuchung:
4	Vehikel	Sham OP	6 Stunden	Luciferase- Assay
4	Pifithrin (8 mg/kg KG)			
4	Vehikel	CCI		
4	Pifithrin (8 mg/kg KG)			

**Tabelle 11: Versuchsprotokoll 9**

Die Probengewinnung erfolgte wie unter 2.3.1 beschrieben. Allerdings wurde für diese Versuchsreihe zur Lyse der Hirnquadranten je 300 µl Luciferase Reporter-Lysierungspuffer (Luciferase Cell Culture Lysis Reagent, Promega, Madison, WI, USA) verwendet.

## 2.4. Histologie

### 2.4.1. Material

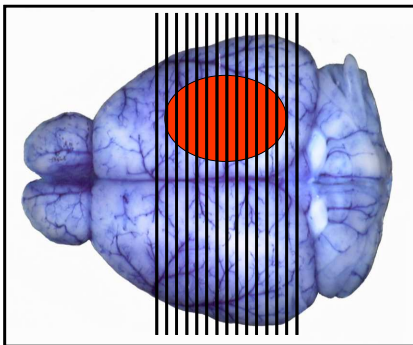
Einbettmedium	Tissue Tek, Sakura Finitek, Torrance, CA, USA
Ethanol	Merck Eurolab, Darmstadt, Deutschland
Isopropanol	Merck Eurolab, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure	Merck Eurolab, Darmstadt, Deutschland
Rotihistol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Mayers Hämalaun	Merck Eurolab, Darmstadt, Deutschland
Eosin-Färbelösung 3% Eosin B	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Eukitt	Riedel de Haen, Seelze, Deutschland

**Tabelle 12: Material zur Durchführung der Nissl-Färbung**

### 2.4.2. Durchführung

Nach Tod durch zervikale Dislokation wurde das Gehirn der Versuchstiere entnommen und auf Trockeneis schockgefroren. Die Aufbewahrung bis zur Weiterverarbeitung erfolgte in einem Gefrierschrank bei  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Das Gehirn wurde bei  $-20^{\circ}\text{C}$  mit Einbettmedium bedeckt, auf eine Halterung aufgesetzt und anschließend mit einem Gefriermikrotom (CryoStar HM 560, Microm, Walldorf, Deutschland) geschnitten. Beginnend 1000  $\mu\text{m}$  distal des Bulbus olfactorius wurden 14 koronare Schnitte von je 10  $\mu\text{m}$  Dicke in einem Abstand von je 500  $\mu\text{m}$  erzeugt. Das Schnittmuster ist in Abbildung 7 dargestellt.



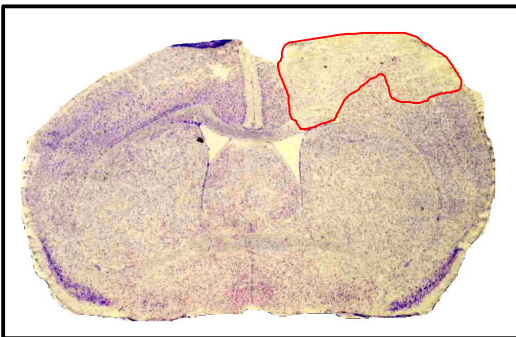
**Abbildung 7: Aufsicht auf das Mausgehirn mit schematischer Darstellung der Schnitfführung zur histomorphometrischen Auswertung**

Alle 500  $\mu\text{m}$  wurde ein 10  $\mu\text{m}$  dicker Schnitt (schwarz markiert) auf einen Objektträger aufgebracht. Die Kontusion ist schematisch rot dargestellt.

Die Färbung der Hirnschnitte erfolgte nach Nissl. Dazu wurden die Schnitte durch die sequentielle Inkubation in einer aufsteigenden Alkoholreihe (zwei Minuten in 70%-igem Ethanol, zwei Minuten in 96%-igem Ethanol, zwei Minuten in 100%-igem Ethanol) entwässert und dann für zehn Minuten in eine Standard Nissl-Farbmischung gelegt. Anschließend wurden die Schnitte kurz mit Aqua destillata gespült und durch die sequentielle Inkubation in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert (zehn Sekunden in 70%-igem Ethanol, 20 Sekunden in 96%-igem Ethanol, 20 Sekunden in 100%-igem Ethanol, zwei Minuten in Isopropanol). Abschliessend erfolgte eine acht-minütige Lagerung in Rotihistol. Zuletzt wurden die Schnitte mit Eukitt bedeckt und mit einem Deckglas versehen.

### 2.4.3. Histomorphometrische Bestimmung des Kontusionsvolumens

Die zu analysierenden, Nissl-gefärbten Hirnschnitte wurden unter ein Mikroskop (Olympus BX 41, Aalen, Deutschland) gelegt und mit einer, ans Mikroskop angeschlossenen, digitalen Kamera (Olympus, Camedia C5050, Aalen, Deutschland) in 12,5 fachen Vergrößerung abfotografiert. Die Bilddaten wurden auf einen PC übertragen. Mit einer Analysesoftware (Olympus PD Soft, Version 3.2, Aalen, Deutschland) konnte die Kontusionsfläche, die sich in der Nissl-Färbung nicht anfärbt, wie in Abbildung 8 dargestellt, markiert und berechnet werden.



**Abbildung 8: Beispiel für die histomorphometrische Bestimmung des Kontusionsvolumens.**

Der koronare Hirnschnitt zeigt ein kontusiertes Gehirn 24 Stunden nach der Applikation des Controlled Cortical Impacts. In der Nissl Färbung färbt sich das nekrotische Gewebe der Kontusion (hier rot umrandet) nicht an. Die Fläche kann computerestützt auf sequentiellen koronaren Schnitten bestimmt werden.

Das Gesamtvolumen der Kontusion,  $V_{\text{ges}}$ , errechnet sich aus dem Abstand der sequentiellen koronaren Schnitte und den jeweils ausgemessenen Einzelflächen A, nach folgender Formel:

$$A_1 \times 0,5 + A_2 \times 0,5 \dots \dots \dots + A_{14} \times 0,5.$$

## 2.5. Immunhistochemie

### 2.5.1. Material

Paraformaldehyd	Merck Eurolab, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Merck Eurolab, Darmstadt, Deutschland
Rotihistol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Aceton	Merck Eurolab, Darmstadt, Deutschland
Histo SP mouse Kit: Peroxydase Quenching Solution BEAT™ Blocking Solution Enzyme Conjugate Substrate Chromogen Solution	Zymed, San Francisco, CA, USA
Triton X	Merck Eurolab, Darmstadt, Deutschland

**Tabelle 13: Material zur Durchführung der Immunhistochemie**

Anti-p53	Monoklonaler Antikörper aus der Maus gegen p53, 1C12 monoklonal, Cell Signaling Technologies, Beverly, MA, USA 1:50 in PBS mit 0,3 % (w/v) Triton X und 5% (w/w) BSA
Anti-Maus	Polyklonaler Antikörper aus der Ziege gegen Maus IgG, goat anti-mouse, Zymed Laboratories Inc., San Francisco, CA, USA 1: 1000 in 5 % (w/w) BSA

**Tabelle 14: Antikörper zur Durchführung der Immunhistochemie**

### 2.5.2. Durchführung

Die immunhistochemische Färbung erfolgte mit einem Histomouse-SP Kit (Zymed, San Francisco, CA, USA) nach den genauen Herstellerinformationen. Im Kit enthalten waren eine Lösung zum Absättigen endogener Peroxidasen (Peroxydase Quenching Solution), eine Lösung zur Absättigung endogener Nagetierimmungoglobuline (BEAT™ Blocking Solution), das Enzymkonjugat und eine Lösung zur Anfärbung des Substrats (Substrate Chromogen Solution). Die Paraffinschnitte wurden sequentiell zunächst für zehn Minuten in Peroxydase Quenching Solution und dann für 45 Minuten in der BEAT™ Blocking Solution inkubiert. Danach wurden die Präparate mit dem p53-spezifischen, primären Antikörper in einer Verdünnung von 1:50 in PBS mit 0.3% Triton X und 2% BSA, bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert. Nach dem Abwaschen von freiem primärem Antikörper mit PBS, wurde der biotinylierten sekundären anti-Maus Antikörper in einer Konzentration von 1:1000 in PBS mit 5% BSA hinzugefügt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend wurde zunächst das Enzymkonjugat und dann die Substrate Chromogen Solution hinzugefügt. Nun erfolgte die Inkubation bis eine Farbreaktion

auftrat. Die Spezifität der p53-Farbreaktion wurde durch geeignete Negativkontrollen (kein primärer Antikörper) überprüft. Die Eindeckelung der Schnitte erfolgte mit Eukitt.

## 2.6. Western Blot Analyse

### 2.6.1. Material

Lysepuffer	100 µl Complete Lysis Buffer bestehend aus: 10 mM DTT: 10 µl Lysis Buffer: 89 µl Protease Inhibitor Cocktail: 1 µl	Active Motif, Rixensart, Belgium
Bovines Serumalbumin (BSA)		Sigma-Aldrich, Deisendorf, Deutschland
Bradford Assay	Bio-Rad Protein Assay Farbstoffkonzentrat Coomassie brilliant blue G-250 dye	Bio Rad Laboratories, München, Deutschland
MOPS SDS Runnig Buffer (20x)	MOPS 1 M: 104,6g Tris Base 1 M: 60,6 g SDS 69,3 M: 10 g EDTA 20,5 mM: 3,0 g aufgefüllt auf 500 ml mit A. bidest	
Loading Buffer (2 x)	0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 : 2,5 ml SDS 20 % : 1 ml Glycerol : 2 ml A bidest: 3,5 ml B- Mercaptoethanol : 1 ml Bromophenol Blue 0,02 g	
Gel	Nu Page Bis-Tris Gel, 10%	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Molekulargewichtsmarker	SeeBlue plus 2, prestained	Bio Rad Laboratories, München, Deutschland
Molekulargewichtsmarker	See Blue, unstained	Bio Rad Laboratories, München, Deutschland
Transferpuffer (20x)	Bicine 500 mM: 10,2g Bis-Tris 500 mM: 13,08 g EDTA 20,5 mM: 0,75 g Chlorobutanol 1 mM: 22,18 mg aufgefüllt auf 125 ml mit A. bidest	
PVDF Membran	Hybond, RPN 303F	Amersham Bioscience, Freiburg, Deutschland
TBS Puffer (5x)	Tris 1 M pH 8,0 : 20 ml	



	NaCl 5 M: 60 ml aufgefüllt auf 2 l mit A. bidest	
TBST	TBS Puffer (5x): 100 ml A. bidest: 400 ml 250 µl Tween 20	
Färbung	Opti-4CN Kit	Bio Rad Laboratories, München, Deutschland
Magermilchpulver	0,7% Fett	Heider Cenovis, Radolfzell, Deutschland

**Tabelle 15: Reagentien zur Durchführung des Western Blots**

Soweit nicht anders angegeben, wurden sämtliche Chemikalien im Reinheitsgrad „zur Analyse“ von den Firmen Merck Eurolab (Darmstadt), Carl Roth (Karlsruhe), Serva Electrophoresis (Heidelberg) sowie Sigma-Aldrich (Deisenhofen) bezogen

Anti-p53	Monoklonaler Antikörper aus der Maus gegen p53, 1C12 monoklonal, Cell Signaling Technologies, Beverly, MA, USA 1:1000 in 5% (w/v) Magermilchpulver in TBST
Anti-Maus	Polyklonaler Antikörper aus der Ziege gegen Maus IgG, goat anti-mouse, Zymed Laboratories Inc., San Francisco, CA, USA 1: 5000 in 5 % (w/v) Magermilchpulver in PBST
Anti- Alpha Tubulin	Monoklonaler Antikörper aus der Maus gegen Alpha Tubulin B7-Sc-5286, Santa Cruz, CA, USA 1: 500 in 5% (w/v) Magermilchpulver in TBST

**Tabelle 16: Antikörper zur Durchführung des Western Blot**

Zentrifuge	Labofuge 400 R, Hereus instruments, Düsseldorf, Deutschland
Dynex Obsys MR Absorbance reader	Dynex, Chantilly, VI, USA
Dynex DSX Revelation Software	Dynex, Chantilly, VI, USA
Western Blot Modul	Hoefer Mini VE, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland

**Tabelle 17: Im Versuchsablauf verwendete Geräte**

## 2.6.2. Durchführung

Zunächst wurde die Proteinkonzentration der eingesetzten Proben mit einem kommerziellen Kit (Bio-Rad Laboratories, München; Deutschland) nach der Bradford-Methode bestimmt. Hierzu wurden jeweils 3 µl der 1:10 mit PBS verdünnten Hirnlysate und eine Standardreihe aus BSA mit den Konzentrationen 0,1 mg /ml, 0,2 mg/ml, 0,8 mg/ml und 1,2 mg/ml in eine 96-well Platte pipettiert. Nach Zugabe von 300 µl Farbstoff pro well und einer Inkubationszeit von 30 Minuten, wurde die Extinktion der Hirnlysate bzw. der Proteinstandards bei 576 nm photometrisch bestimmt. Durch lineare Regression der Extinktionswerte mit dem Proteingehalt der Standardreihe wurde eine Eichgerade ermittelt. Mit der Eichgerade konnten die Proteinkonzentrationen der Hirnlysate aus ihren Extinktionswerten berechnet werden. Für alle Messwerte wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt und der Mittelwert gebildet.

Die Auftrennung des Proteingemischs erfolgte mittels SDS-Gelelektrophorese für 95-100 Minuten bei 135 Volt. Die Taschen des Gels wurden mit je 10 µg Protein in 20 µl Loading Buffer beladen, als Größenstandards wurden Marker für Proteine zwischen 37 und 100 kDa eingesetzt. Der Transfer der Proteine vom Gel auf die PVDF-Membran erfolgte durch einen Elektroblot für 16,5–18 Stunden bei 35 mA. Nach Ablauf des Elektroblots wurde die Membran zunächst für eine Stunde in TBST mit 5% Magermilchpulver (w/v) inkubiert. Anschließend erfolgte die 12-stündige Inkubation mit dem primären Antikörper (anti-p53) in einer Verdünnung von 1:1000 in TBST mit 5% (w/v) Magermilchpulver bei 4°C. Nach Waschen in TBST wurde die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem sekundären, Peroxidase-konjugierten Antikörper (anti-Maus) in einer 1:5000 Verdünnung in TBST und 5% (w/v) Magermilchpulver inkubiert. Zur Detektion der Peroxidaseaktivität wurde die Membran nach Angaben des Herstellers mit dem Opti-4-CN Farbkits angefärbt. Nach 15-minütiger Trocknung bei Raumtemperatur wurden die Blots eingescannt und digital gespeichert. Anschließend wurden die Western Blots für 1,5 Stunden in TBST geschwenkt und mit dem primären Antikörper gegen alpha-Tubulin (Verdünnung 1: 5000 in 5 % (w/v) Magermilchpulver) für 12 Stunden bei 4°C inkubiert. Dann erfolgte die Inkubation mit dem sekundären, Peroxidase-konjugierten Antikörper (Anti-Maus) in einer 1: 5000 Verdünnung in 5 % (w/v) Magermilchpulver in PBST. Die Anfärbung mit Opti 4-CN erfolgte wie oben beschrieben. Nach 15 minütiger Trocknung wurden die Blots eingescannt.

## 2.6.3. Semiquantitative Auswertung

Die Auswertung der Blots erfolgte semiquantitativ mit einer bildverarbeitenden Software (Optimate Version 6.51, Media Cybernetics, Silver Spring, USA). Die Grauwerte der einzelnen Banden jeweils eines Blots wurden vermessen und mit der Bande der zugehörigen Ladungskontrollen (alpha-Tubulin) normiert. Jeder Western Blot enthielt Proteinextrakte von jeweils einem Sham-operierten Kontrolltier, und von je einem Versuchstier zum Zeitpunkt 15 Minuten, drei, sechs, zwölf

und 24 Stunden nach Trauma. Somit ist auf jedem einzelnen Blot die Veränderung der p53-Expression im Verhältnis zum Kontrolltier im Zeitverlauf quantifizierbar. Die Ergebnisse von vier Western Blotanalysen zur relativen Veränderung der p53-Expression wurden in der statistischen Analyse miteinander verglichen.

Grauwert der p53 Bande	Grauwert der Alpha –Tubulin Bande	Korrekturfaktor	Korrigierter Wert
Lane 1: $A_1$	Lane 1: $L_1$	$k_1 = 100\%$	$K_1 = k_1 \times A_1$
Lane 2: $A_2$	Lane 2: $L_2$	$k_2 = 100\% \times L_1 / L_2$	$K_2 = k_2 \times A_2$
.....	.....	.....	.....
Lane n: $A_n$	Lane n: $L_n$	$k_n = 100\% \times L_1 / L_n$	$K_n = k_n \times A_n$

**Tabelle 18: Formel zur Normierung der p53 Bande mit der zugehörigen Ladungskontrolle alpha-Tubulin**

## 2.7. Luciferase Assay

### 2.7.1. Material

Luciferase Cell Culture Lysis 5x reagent		Promega, Madison, WI, USA
Bio-Rad Protein Assay Farbstoffkonzentrat	Bio-Rad Protein Assay Farbstoffkonzentrat Coomassie brilliant blue G-250 dye	Bio Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Luciferase Assay Reagent (LAR)	2 ml 1 M Glycylglycin, 1ml 100 mM MgCl <sub>2</sub> , 20µl 500 mM EDTA 50,8 mg DTT 7,8 mg ATP 0,5 ml Coenzyme A aufgefüllt auf 100 ml mit A. bidest	Promega, Madison, WI, USA
Luciferin 10 mM Stock Solution	50mg Beetle Luciferin 0.47ml 1M Glycylglycine ph 8.0 15.3 ml A. bidest	Promega, Madison, WI, USA
Rekombinante Luciferase		Promega, Madison, WI, USA
Injection Solution	250 µl Stock Solution in 5 ml LAR, jeweils frisch angesetzt vor jeder Messreihe  engültige Konzentrationen: 0,25 mM Luciferin 20 mM Glycylglycin 1 mM MgCl <sub>2</sub> 0,1 mM EDTA 33 mM DTT 0,45 mM ATP 0,2 mg/ml Coenzym A pH 8	
Luminometer Lumat LB 9507		Berthold technologies, Bad Wildbad, Deutschland
Dynex Obsys MR Absorbance reader		Dynex, Chantilly, VI, USA

**Tabelle 191: Material zur Durchführung des Luciferase Assays**

Soweit nicht anders angegeben, wurden sämtliche Chemikalien im Reinheitsgrad „zur Analyse“ von den Firmen Merck Eurolab (Darmstadt), Carl Roth (Karlsruhe) sowie Sigma-Aldrich (Deisenhofen) bezogen.

## 2.7.2. Durchführung

Im Luciferase-Assay werden Luciferase-haltige Proben mit Luciferin und ATP im Überschuss versetzt, was unter Katalyse von Luciferase zu Oxyluciferin, AMP, CO<sub>2</sub> und Licht umgesetzt wird. Das emittierte Licht kann am Luminometer gemessen werden und ist ein relatives Maß für die, in der Probe enthaltene, Menge an Luciferase.

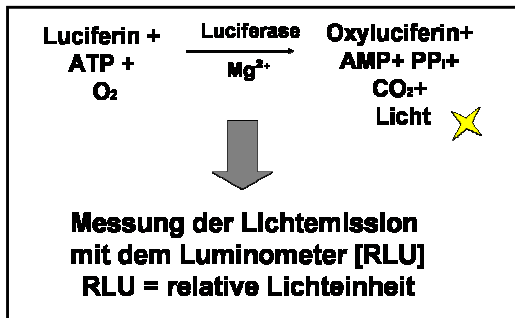


Abbildung 8: Chemische Grundlagen des Luciferase Assays

Der Proteingehalt der Hirnlysate wurde, wie unter 2.6.2 beschrieben, bestimmt. Anschließend wurde mit dem Luciferase Assay System (Promega, Madison, WI, USA), nach Empfehlung des Herstellers, die Lichtemission bestimmt. Dafür wurden 25 µl Hirnlysate mit 100 µl Injection Solution und 100 µl Luciferase Assay Reagent versetzt und bei Raumtemperatur am Luminometer gegen den Leerwert (Luciferase Reporter Buffer) vermessen. Es wurden zwei Proben pro Hirnlysate jeweils zwei Mal vermessen. Die Lumineszenz wurde in RLU, relative light units, als Mittelwert dieser vier Messergebnisse angegeben und mit der Proteinkonzentration der jeweiligen Probe normiert.

## 2.8. NFκB-ELISA

### 2.8.1. Material

Bio-Rad Protein Assay Farbstoffkonzentrat	Bio-Rad Protein Assay Farbstoffkonzentrat Coomassie brilliant blue G-250 dye	Bio Rad Laboratories, München, Deutschland
TransAM <sup>1M</sup> NFκB p65 Assay Kit	Complete Lysis Buffer Complete Binding Buffer Washing Buffer Antibody Binding Buffer Developing Solution Stop Solution NFκB p65 Antibody IgG Developing Solution Stop Solution Raji Nuclear Extract 96 well NFκB Assay Plate	Active Motif, Rixensart, Belgien
Mikrotiter Plattenreader		Tecan spectra fluor plus Salzburg, Österreich
Dynex Obsys MR Absorbance reader		Dynex, Chantilly, VI, USA

**Tabelle 20: Material NFκB - ELISA**

### 2.8.2. Durchführung

Das Prinzip des NFκB-ELISAs (Enzyme Linked Immunsorbent Assay) beruht auf einer Bindung von aktiviertem NFκB an dargebotene Oligonukleotide, die die NFκB-spezifische Bindungssequenz enthalten. Nach Zugabe eines primären Antikörpers gegen NFκB und Einsatz eines sekundären, konjugierten Antikörpers, kann an die DNA-gebundenes NFκB in einer Farbreaktion dargestellt werden. Die NFκB-DNA-Bindungsaktivität der Hirnlysaten wurde auf diese Art und Weise mit dem TransAM NFκB p65 Aktivierungsassay gemäß der Herstellerinformationen ermittelt. Hierzu wurde, wie bereits unter Absatz 2.6.2 beschrieben, die Proteinkonzentration der einzelnen Proben mit der Bradford Methode bestimmt. Anschließend wurden die 96 Wells der im Kit mitgelieferten Assay-Platte mit jeweils 10 µg Protein in 20 µl Complete Lysis Buffer und 30 µl Binding Buffer für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. In der Folge wurde drei Mal mit je 200 µl Washing Buffer gewaschen. Der NFκB-Antikörper (1:1000 Verdünnung in Antikörper- Bindungspuffer) wurde hinzu gegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach weiteren Waschschrritten wurde der sekundäre, HRP-konjugierte Antikörper (1:1000 Verdünnung) hinzugefügt und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Wells der Platte mit dem Farbreaktwerler (je 100 µl) für zehn Minuten inkubiert. Nach Zugabe von 100 µl Stop Lösung wurde innerhalb von fünf Minuten die Absorption bei 450 nm sowie Referenzwerte bei 655 nm bestimmt. Als Leer-Kontrolle diente Complete Lysis Puffer ohne Protein, als Positiv-Kontrolle dienten Zellextrakte von

Raji Zellen, die mit dem Assay geliefert wurden. Die NFκB DNA Bindung wurde pro Probe jeweils zweifach Proben bestimmt und hinsichtlich des Proteingehalts korrigiert.

## **2.9. Statistische Datenauswertung**

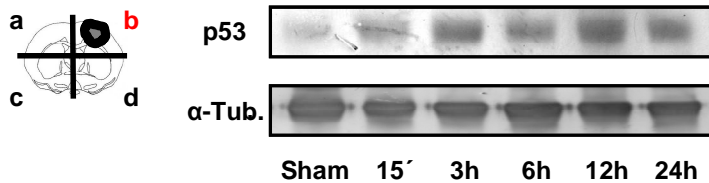
Zur Beurteilung der Daten wurden Varianzanalysen für unverbundene Stichproben durchgeführt. Die Nullhypothese, d.h. kein statistisch nachweisbarer Unterschied der untersuchten Daten, wurde mit einer Fehlerwahrscheinlichkeit von über 5% abgelehnt. Physiologische Parameter, histomorphometrischen Daten und die Ergebnisse der semiquantitativen Western Blotanalyse wurden mit ANOVA on ranks, und die Auswertung der Blutdruckkurve mit der Two-way ANOVA für wiederholte Messungen analysiert. Nachfolgende Paarvergleiche wurden mit dem Student-Newman-Keuls Test bzw. Dunnett's Test durchgeführt. Die Statistik wurde mit dem Programm SigmaStat 2.0 (Systat Software, Erkrath, Deutschland) durchgeführt. Wenn nicht anderes gekennzeichnet, sind alle Daten als Mittelwert  $\pm$  SEM angegeben.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. P53-Expression nach Schädel-Hirn Trauma

##### 3.1.1. Western Blot Analyse

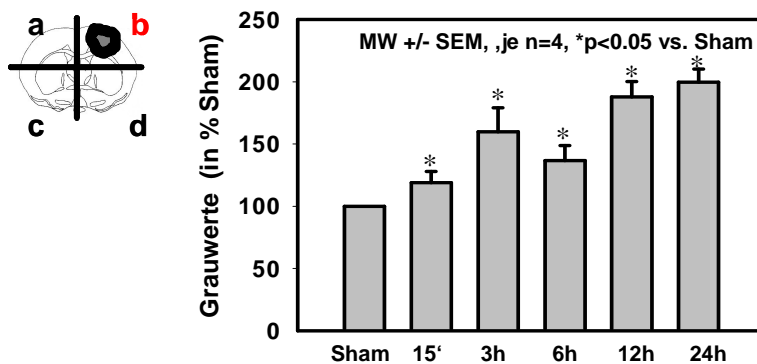
Die p53-Expression nach Trauma wurde in Proteinextrakten aus dem Bereich des Hirnquadranten, der die Kontusion enthält (Hirnquadrant b), untersucht.



##### Abbildung 9: Zeitliches Profil der p53-Expression im Bereich des kontusionierten Kortex

Die Abbildung zeigt eine Western Blotanalyse der p53-Expression (obere Bande) mit zugehöriger Ladungskontrolle  $\alpha$ -Tubulin (untere Bande). Die Gewebelysate wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Trauma (15 Minuten, 3, 6, 12 und 24 Stunden) aus Hirnquadrant b gewonnen.

Abbildung 9 zeigt eine repräsentative Western Blot Analyse. Die obere Bande zeigt die p53-Expression, die untere Bande zeigt, als zugehörige Ladungskontrolle, die  $\alpha$ -Tubulin-Expression derselben Probe. Es wurden Hirnlysate von einem Sham-operierten Kontrolltier und von je einem Versuchstier zu den Zeitpunkten 15 Minuten, drei, sechs, zwölf und 24 Stunden nach Trauma untersucht. Es ist ersichtlich, dass es bereits 15 Minuten nach Trauma zum Anstieg des p53-Signals kommt. Die p53-Expression nimmt kontinuierlich zu und ist über den gesamten Beobachtungszeitraum von 24 Stunden nachweisbar. Um die gewonnenen Daten quantifizieren zu können, wurden die Western Blots, wie unter Absatz 2.6.3 beschrieben, densitometrisch vermessen.



##### Abbildung 10: Zeitliches Profil der p53-Expression im Bereich des kontusionierten Kortex

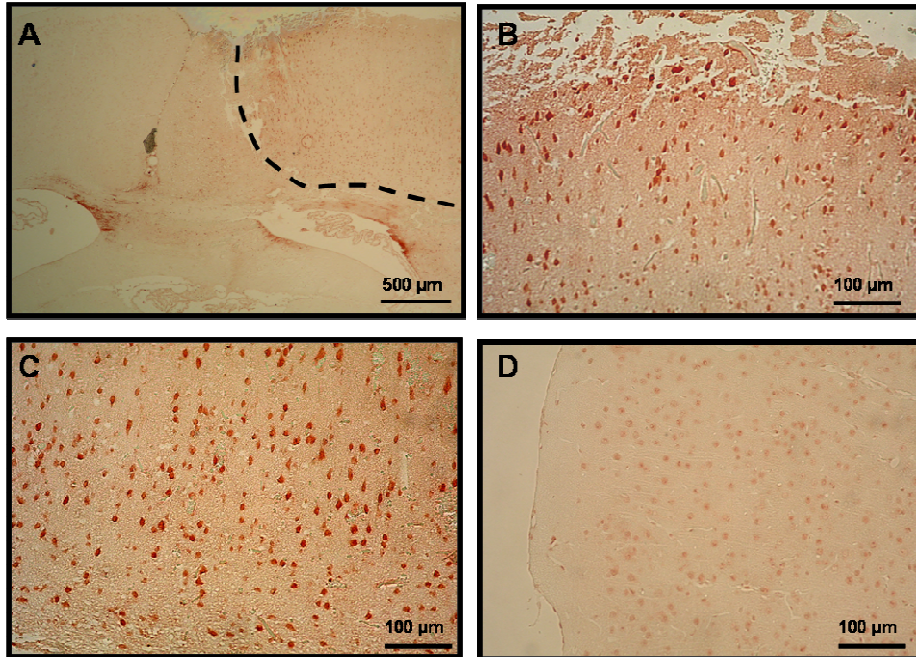
Die Abbildung zeigt die semiquantitative, densitometrische Auswertung von 4 Western Blots, die jeweils die p53-Expression in Hirnlysaten von einem Sham-operierten Kontrolltier und von je einem Versuchstier zu den Zeitpunkten 15 Minuten, 3, 6, 12, 24 Stunden nach Trauma untersuchen (n=4 Versuchstiere pro Zeitpunkt, Mittelwert +/- SEM, \* p < 0,05 vs. Sham, ANOVA on ranks, Student-Newman-Keuls).



In Abbildung 10 ist die prozentuale Zunahme der p53-Expression ausgehend von der Basis-Expression (Sham = 100%, Anstieg der p53 Expression in % Sham) von 4 Western Blotanalysen jeweils einer Zeitreihe dargestellt. Insgesamt wurden so pro Zeitpunkt je 4 Versuchstiere untersucht. Im Bereich des geschädigten Kortex nimmt die p53-Expression innerhalb von 24 Stunden zu. Dieser Anstieg ist mit 125+/- 9% bereits nach 15 Minuten signifikant, steigt nach drei Stunden auf 172 +/-21%, nach 6 Stunden auf 191 +/- 32%, nach 12 Stunden auf 192 +/- 8% und nach 24 auf 231 +/- 25% an (\* p < 0,05 vs. Sham, ANOVA on ranks, Student-Newman-Keuls).

### 3.1.2. Immunhistochemie

Abbildung 11 zeigt die immunhistochemische Analyse von Hirnschnitten sechs Stunden nach Trauma. P53 ist rot angefärbt.



#### Abbildung 11 A-D: p53 Immunhistochemie 6 Stunden nach Trauma

**A:** Abbildung A zeigt die P53-Expression (rot) 6 Stunden nach Trauma in vitalem und in kontusioniertem (markiert durch gestrichelte Linie) Hirngewebe. **B:** Eine stärkere Vergrößerung aus dem Bereich der Kontusion zeigt die hier deutlich gesteigerte p53-Expression. **C:** Auch im perikontusionellen Hirngewebe zeigt sich eine deutlich gesteigerte p53-Expression. **D:** Im Bereich des kontralateralen Kortex zeigt sich eine niedrige basale p53-Expression.

In Abbildung 11 **A** sind die Kontusion (markiert durch eine gestrichelte Linie), perikontusionelles Gewebe, Interhemisphärenspalt und die kontralaterale Hemisphäre sichtbar. Die p53-Expression im Bereich der Kontusion, bzw. im perikontusionellen Gewebe, ist wesentlich stärker ausgeprägt als in der kontralateralen Hemisphäre. Dies wird in einer stärkeren Vergrößerung noch deutlicher. Abbildung 11 **B** zeigt Zellen aus dem Bereich der Kontusion. P53 ist in diesem Bereich stark exprimiert und überwiegend im Zellkern lokalisiert. Im perikontusionellen Gewebe (**C**) sind vitale Zellen sichtbar, die ebenfalls eine deutlich gesteigerte p53-Expression aufweisen. Dies sind Zellen, die im Prozess der sekundären Ausweitung des Gewebeschadens in den ersten 24 Stunden nach Trauma möglicherweise untergehen. Die Tatsache, dass in Zellen in enger Nachbarschaft zur Kontusion eine Hochregulation von p53 zu finden ist, gibt Hinweis darauf, dass die beobachtete p53-Regulation im Prozess der sekundären Schadensausbreitung eine Rolle spielen könnte. P53-Immunreaktivität in Zellen der kontralateralen Hemisphäre (**D**) zeigt die nur schwach ausgeprägte Basisexpression von p53 im normalen Hirngewebe an.

## 3.2. P53-Inhibition vor und nach Schädel-Hirn Trauma

### 3.2.1. Physiologische Parameter nach Pifithrin-Applikation

Um die kausale Rolle von p53 für den verzögerten Zelltod nach Schädel-Hirn Trauma zu untersuchen, wurde der spezifische p53-Inhibitor Pifithrin eingesetzt. Im Vorfeld sollte eine mögliche Beeinflussung hämodynamischer oder systemischer Parameter der Versuchstiere durch das Therapeutikum ausgeschlossen werden.

	RR (in mmHg)	
	PFT (8 mg/kg)	Vehikel
15 min pre inj.	67,5 +/- 2,2	67,1 +/- 9,9
1 min post inj.	64,1 +/- 3,1	68,1 +/- 4,3
15 min post inj.	68,8 +/- 2,3	61,1 +/- 3,5
30 min post inj.	66,3 +/- 4,7	61,6 +/- 3,5

**Tabelle 21: Mittlerer arterieller Blutdruck vor und nach Injektion von 8 mg/kg Pifithrin-alpha**

Der mittlere arterielle Blutdruck wird durch die Injektion von Pifithrin nicht beeinflusst (RR in mmHg, MW +/- SEM, n=5 pro Gruppe).

Tabelle 21 zeigt den mittleren arteriellen Blutdruck vor und nach Injektion von Pifithrin-alpha in einer Dosierung von acht mg pro kg Körpergewicht. Zu keinem Zeitpunkt konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den, mit Pifithrin oder den, mit Vehikel behandelten Tieren festgestellt werden.

	Pifithrin (8 mg/kg)		Vehikel	
	pre	post	pre	post
pH	7,34 +/- 0,02	7,29 +/- 0,01	7,36 +/- 0,02	7,28 +/- 0,02
pCO <sub>2</sub> (mmHg)	40,3 +/- 1,9	41,48 +/- 3,4	39,7 +/- 2,6	40,02 +/- 4,2
pO <sub>2</sub> (mmHg)	96,1 +/- 4,5	97,3 +/- 3,3	105,2 +/- 15	102,4 +/- 8,2
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mMol /l)	21,5 +/- 0,9	20,6 +/- 2,3	21,92 +/- 1,1	19,7 +/- 1,9
O <sub>2</sub> -Sättigung (%)	96,5 +/- 0,2	95,9 +/- 0,3	96 +/- 1,2	96,6 +/- 1,2
Na <sup>2+</sup> (mMol /l)	137,2 +/- 0,9	139,5 +/- 2,0	135,4 +/- 3,1	135,2 +/- 0,9
K <sup>+</sup> (mMol /l)	4,9 +/- 0,4	5,2 +/- 0,3	4,4 +/- 0,2	5,1 +/- 0,3

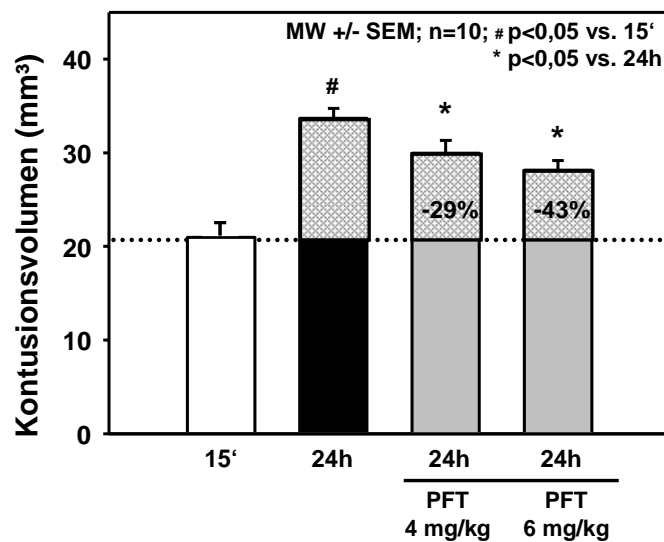
**Tabelle 22: Blutgasanalyse 20 Minuten vor und 40 Minuten nach Injektion von Pifithrin-alpha**

Die Applikation von Pifithrin veränderte die, in der Blutgasanalyse gemessenen Werte für pH, pCO<sub>2</sub>, pO<sub>2</sub>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, O<sub>2</sub>-Sättigung, Na<sup>2+</sup> und K<sup>+</sup> nicht signifikant (n=5, Mittelwert +/- SEM)

Tabelle 22 zeigt die Ergebnisse der Blutgasanalysen 20 Minuten vor und 40 Minuten nach der Applikation von Pifithrin oder Vehikel. Alle Werte liegen im physiologischen Bereich, es konnten keine signifikanten Unterschiede in den Therapiegruppen festgestellt werden.

### 3.2.2. Pifithrin-Applikation vor Trauma

In einer ersten Versuchsreihe wurde der Effekt des p53-Inhibitors Pifithrin auf das Kontusionsvolumen nach Trauma bestimmt. Um auf jeden Fall einen therapeutisch wirksamen Spiegel zu erreichen, wurde 50% der Dosis eine Stunde vor Trauma intraperitoneal appliziert, nach drei Stunden wurden weitere 50% nachgespritzt. Kontrolltiere erhielten die analoge Dosierung der Vehikelsubstanz (0,16 µl bzw. 0,24 µl DMSO pro mg Körpergewicht gelöst in 300 µl physiologischer Kochsalzlösung). In Abbildung 12 sind die Ergebnisse der Untersuchung dargestellt.



**Abbildung 12: Effekt der Pifithrin-Behandlung auf das Kontusionsvolumen 24 Stunden nach Trauma**  
 Das Kontusionsvolumen von Pifithrin-behandelten Tieren ist grau unterlegt dargestellt (4 und 6 mg pro kg Körpergewicht, Hirnentnahme 24 Stunden nach Trauma, je n=10) und das Kontusionsvolumen von Kontrolltieren ist weiss (Hirnentnahme 15 Minuten nach Trauma) bzw. schwarz unterlegt (Hirnentnahme 24 Stunden nach Trauma, je n=10) dargestellt. Bei den Kontrolltieren ist das Kontusionsvolumen 24 Stunden nach Trauma signifikant größer als 15 Minuten nach Trauma (# p < 0,05 24h vs. 15', ANOVA on ranks, Student-Newman-Keuls). Die Differenz dieser Kontusionsvolumen ist als gemusterte Fläche dargestellt und repräsentiert den Hirnschaden, der durch sekundäres Schadenswachstum innerhalb von 24 Stunden nach Trauma entsteht. In den Therapiegruppen konnte dieser, im Vergleich zu den 24h-Kontrolltieren, signifikant reduziert werden (n=10 p < 0,05 vs. 24h Kontrolle, ANOVA on ranks, Student-Newman-Keuls). Die sekundäre Schadensausweitung konnte um 29% bzw. 43% gesenkt werden (n=10, p < 0,05 vs. 24 Kontrolle, ANOVA on ranks, Student-Newman-Keuls).

Abbildung 12 zeigt die Kontusionsvolumen von Versuchstieren nach Schädel-Hirn Trauma. 15 Minuten nach Trauma zeigen Kontrolltiere ein Kontusionsvolumen von 20,96 +/- 1,3 mm<sup>3</sup> (weisser Balken). Nach 24 Stunden beträgt das Kontusionsvolumen 33,69 +/- 1,04 mm<sup>3</sup> (schwarzer

Balken). Das mittlere Kontusionsvolumen nimmt somit innerhalb von 24 Stunden um 62% zu. Dieser Anstieg ist signifikant ( $^{\#}p < 0,05$ ,  $n=10$ , 15' vs. 24h).

Zur besseren Anschaulichkeit ist der sekundäre Anstieg des Kontusionsvolumens gemustert unterlegt. Die Versuchstiere, die mit Pifithrin behandelt wurden (graue Balken), wiesen 24 Stunden nach Trauma ein signifikant geringeres Kontusionsvolumen auf als entsprechende Kontrolltiere. Nach der Behandlung mit Pifithrin in einer Dosierung von 4 mg pro kg Körpergewicht, lag das mittlere Kontusionsvolumen 24 Stunden nach Trauma bei  $29,98 \pm 1,36 \text{ mm}^3$ , nach der Applikation von Pifithrin in einer Dosierung von 6 mg pro kg Körpergewicht, bei  $28,15 \pm 1,03 \text{ mm}^3$ .

Es liegt somit eine dosisabhängige Reduktion des sekundären Hirnschadens um 29 % bzw. 43% vor. Das mittlere Kontusionsvolumen ist 24 Stunden nach Trauma in beiden Therapiegruppen signifikant kleiner als bei den Kontrolltieren ( $*p < 0,05$  versus 24h,  $n=10$ ).

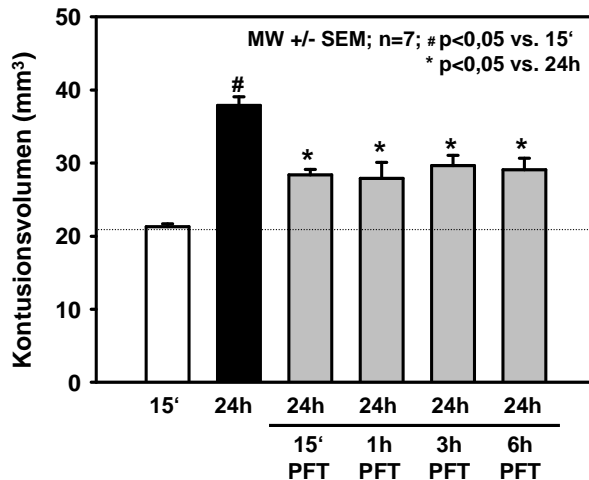
Die Versuchsreihe zeigt im Sinne eines „proof of principle“, dass die p53-Inhibition mit Pifithrin zur ausgeprägten Reduktion des sekundären posttraumatischen Hirnschadens führt, wenn das Therapeutikum eine Stunde vor Trauma appliziert wird. Um zu überprüfen, ob die durch Pifithrin erreichte Neuroprotektion klinisches Potential besitzt, wurde in weiteren Versuchsreihen evaluiert, ob die Verabreichung des p53-Inhibitors nach Trauma ebenfalls therapeutische Wirksamkeit besitzt.

### 3.2.3. Therapeutisches Fenster der Pfithrin-Applikation

In Abbildung 13 ist das Kontusionsvolumen von Kontrolltieren 15 Minuten (weißer Balken) und 24 Stunden nach Trauma (schwarzer Balken, je n=7) aufgetragen. Das Kontusionsvolumen von behandelten Tieren (graue Balken) ist 24 Stunden nach Trauma bestimmt worden. Die behandelten Versuchstiere erhielten Pifithrin (8 mg pro kg Körpergewicht, je n=7) 15 Minuten, bzw. eine, drei und sechs Stunden nach Trauma.

Das mittlere Kontusionsvolumen der Kontrolltiere steigt von 21,27 +/- 0,8 mm<sup>3</sup> innerhalb von 24 Stunden auf 37,86 +/- 1,2 mm<sup>3</sup> signifikant an (# p< 0,05, 15' vs. 24h).

24 Stunden nach Trauma zeigen alle behandelten Tiere ein signifikant geringeres Kontusionsvolumen als entsprechende Kontrolltiere (je n=7, \* p< 0,05 Pifithrin 15 min, 1h, 3h, 6h versus 24 h).



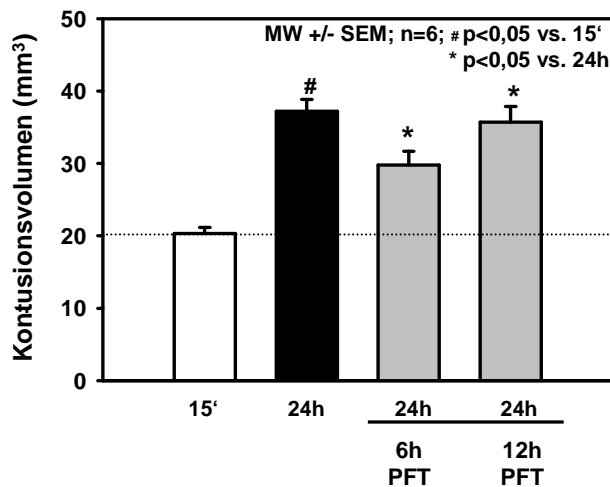
**Abbildung 13: Effekt der Pifithrin-Behandlung auf das Kontusionsvolumen 24 Stunden nach Trauma**  
Das Kontusionsvolumen von Pifithrin-behandelten Tieren ist in grau (8 mg/kg Pifithrin, Hirnentnahme 24 Stunden nach Trauma), das Kontusionsvolumen von Kontrolltieren ist in weiss (Hirnentnahme 15 Minuten nach Trauma) bzw. in schwarz (Hirnentnahme 24 Stunden nach Trauma) dargestellt. In den Therapiegruppen wurde Pifithrin (PFT) 15 Minuten, 1, 3 und 6 Stunden nach Trauma intraperitoneal appliziert. Bei den Kontrolltieren ist das Kontusionsvolumen 24 Stunden nach Trauma signifikant größer als 15 Minuten nach Trauma (# p<0,05 vs. 15', ANOVA on ranks, Student-Newman-Keuls). In den Therapiegruppen konnte der sekundäre Hirnschaden im Vergleich zu den 24h-Kontrolltieren signifikant reduziert werden (n=7, p<0,05 vs. 24h, ANOVA on ranks, Student-Newman-Keuls).

Im Einzelnen beträgt das Kontusionsvolumen 24 Stunden nach Trauma: bei Applikation von Pifithrin 15 Minuten nach Trauma 28,38 +/- 0,8 mm<sup>3</sup>, bei Applikation eine Stunde nach Trauma 27,91 +/- 2,2 mm<sup>3</sup>, bei Applikation 3 Stunden nach Trauma 29,65 +/- 2,4 mm<sup>3</sup>, und bei Applikation sechs Stunden nach Trauma 29,06 +/- 1,6 mm<sup>3</sup>.

Der sekundäre Anstieg des Kontusionsvolumens konnte somit in den Therapiegruppen um 57% (Behandlungszeitpunkt 15 Minuten nach Trauma), 60% (Behandlungszeitpunkt eine Stunde nach

Trauma), 49% (Behandlungszeitpunkt drei Stunden nach Trauma) und 53% (Behandlungszeitpunkt sechs Stunden nach Trauma) gesenkt werden.

Zur Vervollständigung des Zeitfensters wurde eine weitere Therapiestudie durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 14 dargestellt. Analog zu Abbildung 13 ist das mittlere Kontusionsvolumen von Kontrolltieren (weißer Balken: Kontusionsvolumen 15 Minuten nach Trauma, schwarzer Balken: Kontusionsvolumen 24 Stunden nach Trauma, je n=6), sowie das mittlere Kontusionsvolumen von mit Pifithrin behandelten Tieren (8 mg/kg Körpergewicht, Applikation sechs und zwölf Stunden nach Trauma, Hirnentnahme 24 Stunden nach Trauma, je n=6) dargestellt.



**Abbildung 14: Effekt der Behandlung mit Pifithrin auf das Kontusionsvolumen 24 Stunden nach Trauma**

Das Kontusionsvolumen von Pifithrin-behandelten Tieren ist grau unterlegt dargestellt (8 mg/kg Pifithrin, Hirnentnahme 24 Stunden nach Trauma), das Kontusionsvolumen von Kontrolltieren ist weiss (Hirnentnahme 15 Minuten nach Trauma) bzw. schwarz unterlegt (Hirnentnahme 24 Stunden nach Trauma) dargestellt. In den Therapiegruppen wurde Pifithrin 6 und 12 Stunden nach Trauma intraperitoneal appliziert. Bei den Kontrolltieren ist das Kontusionsvolumen 24 Stunden nach Trauma signifikant größer als 15 Minuten nach Trauma (# p < 0,05 vs. 15', ANOVA on ranks, Student-Newman-Keuls). Die Applikation von Pifithrin 6 Stunden nach Trauma konnte den sekundären Hirnschaden im Vergleich zu den 24h-Kontrolltieren signifikant reduzieren (n=6, p < 0,05 vs. 24h Kontrolle, ANOVA on ranks, Student-Newman-Keuls). Die Applikation von Pifithrin 12 Stunden nach Trauma zeigte keinen signifikanten Effekt auf das Kontusionsvolumen.

Innerhalb von 24 Stunden kommt es zum signifikanten Anstieg des mittleren Kontusionsvolumens der Kontrolltiere von 20,31 +/- 0,8 mm<sup>3</sup> (15 Minuten) auf 37,21 +/- 1,6 mm<sup>3</sup> (24 Stunden, # p < 0,05, 15' vs. 24h). Die Applikation von Pifithrin sechs Stunden nach Trauma reduzierte den Hirnschaden nach Trauma signifikant (mittleres Kontusionsvolumen 29,76 +/- 1,9 mm<sup>3</sup>, p < 0,05 PFT 6h versus 24h). Die Verabreichung zwölf Stunden nach Trauma zeigt keine signifikante Auswirkung auf das mittlere Kontusionsvolumen (35,7 +/- 2,1 mm<sup>3</sup>).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Applikation von Pifithin vor Trauma zur dosisabhängigen, signifikanten Reduktion der sekundären Hirnschädigung geführt hat.

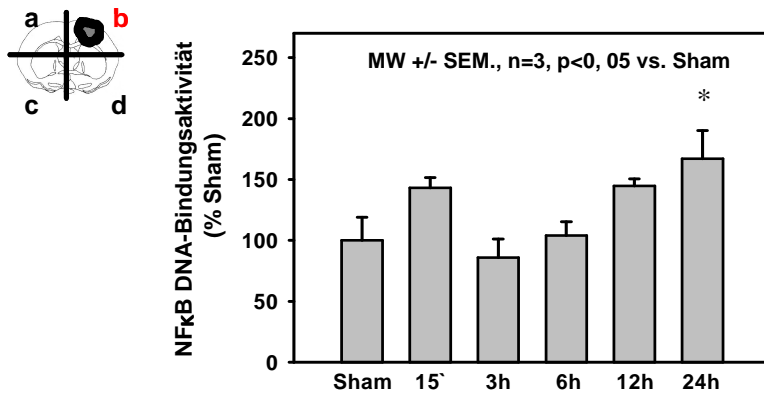
Untersuchungen des therapeutischen Fensters der Pifithrinapplikation nach Trauma zeigen, dass eine einzelne intraperitoneale Applikation von Pifithrin in einer Dosierung von 8 mg/kg Körpergewicht in einem Zeitfenster bis zu sechs Stunden nach Trauma ausgeprägte neuroprotektive Wirksamkeit besitzt



### 3.3. NFκB-Aktivität nach Trauma

#### 3.3.1. NFκB-DNA-Bindungsaktivität

Die NFκB-DNA-Bindungsaktivität wurde, wie unter Abschnitt 2.8.2 beschrieben, mittels ELISA bestimmt. In Abbildung 15 ist die NFκB-DNA-Bindungsaktivität aus Proben im Bereich des Hirnquadranten, der Kontusion und perikontusionelles Hirngewebes enthält (Hirnquadrant b), zu unterschiedlichen Zeitpunkten (15 Minuten, drei, sechs, zwölf und 24 Stunden) nach Trauma dargestellt.

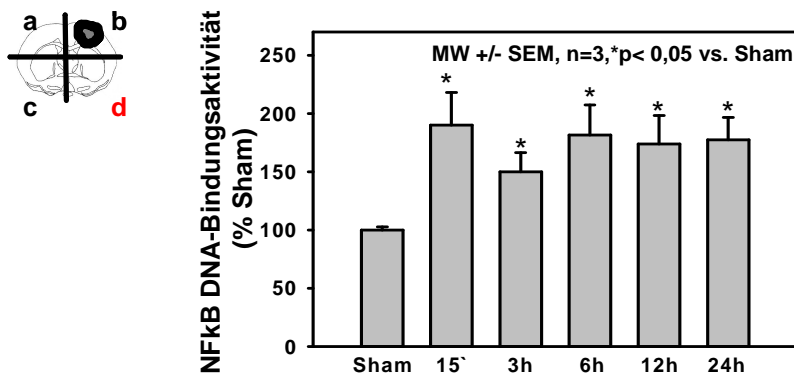


#### Abbildung 15: Zeitliches Profil der NFκB-DNA-Bindungsaktivität

Die Gewebelysate wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten (15 Minuten, 3, 6, 12 und 24 Stunden nach Trauma, n=3 pro Zeitpunkt) aus dem, die Kontusion enthaltenden Quadranten b gewonnen und mittels NFκB-ELISA untersucht. Die NFκB-DNA-Bindungsaktivität (angegeben in % Sham) nimmt innerhalb von 24 Stunden zu. Der Aktivitätsanstieg ist nach 24 Stunden gegenüber dem Ausgangsniveau der Sham-operierten Tiere signifikant (\* p < 0,05 vs. Sham, ANOVA on ranks, Student Newman Keuls).

Es ist ersichtlich, dass es zum graduellen Anstieg der NFκB-DNA-Bindungsaktivität kommt. Dieser Anstieg ist nach 24 Stunden, gegenüber der Gruppe der Sham-operierten Tiere, signifikant (p < 0,05, n=3). Die NFκB-DNA-Bindungsaktivität liegt in Sham-operierten Tieren bei einem Ausgangsniveau von 100 +/- 5%, 15 Minuten nach Trauma liegt sie bei 143 +/- 8%, drei Stunden nach Trauma bei 92 +/- 8%, sechs Stunden nach Trauma bei 106 +/- 9,5% nach zwölf Stunden bei 145 +/- 6 % und nach 24 Stunden bei 172 +/- 20%.

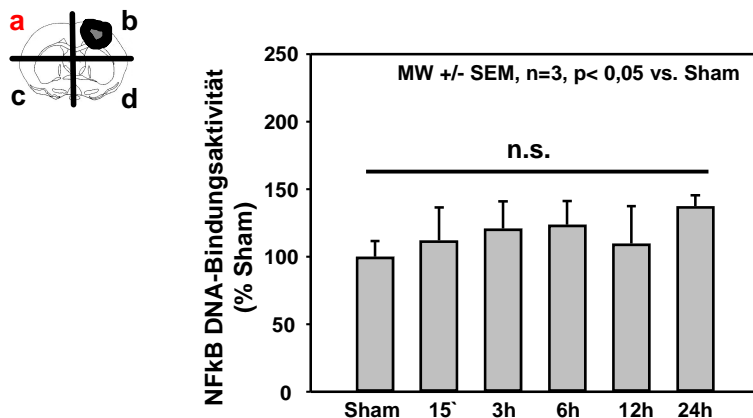
In Abbildung 16 ist die DNA-Bindungsaktivität im Bereich des Hirnquadranten unterhalb der Kontusion dargestellt (Hirnquadrant d). Die NFκB-DNA-Bindungsaktivität ist zu den Zeitpunkten 15 Minuten, drei, sechs, zwölf und 24 Stunden nach Trauma signifikant erhöht ( $p < 0,05$  vs. Sham,  $n=3$ ). Ausgehend von  $100 \pm 4\%$  steigt sie nach 15 Minuten auf  $190 \pm 25\%$  an, beträgt nach drei Stunden  $152 \pm 7\%$ , nach sechs Stunden  $186 \pm 23\%$ , nach zwölf Stunden  $183 \pm 15\%$  und nach 24 Stunden  $182 \pm 16\%$ .



**Abbildung 16: Zeitliches Profil der NFκB-DNA-Bindungsaktivität nach Trauma**

Die Gewebelysate wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten (15 Minuten, 3, 6, 12 und 24 Stunden nach Trauma,  $n=3$  pro Zeitpunkt) aus dem unterhalb der Kontusion gelegenen Quadranten d gewonnen und mittels NFκB-ELISA untersucht. Die in % der Shamkontrollen angegebene NFκB-DNA-Bindungsaktivität ist während des gesamten Beobachtungszeitraums signifikant gesteigert (\*  $p < 0,05$  vs. Sham, ANOVA on ranks, Student-Newman-Keuls).

Dieser Anstieg der NFκB-DNA-Bindungsaktivität lässt sich nur in der, zur Kontusion ipsilateral gelegenen, Hemisphäre nachweisen. In der kontralateralen Hemisphäre (zur Kontusion kontralateral gelegener Hirnquadrant a, dargestellt in Abbildung 17) liegt keine signifikante Änderung der NFκB-DNA-Bindungsaktivität vor.



**Abbildung 17: Zeitliches Profil der NFκB-DNA-Bindungsaktivität nach Trauma im Bereich des zur Kontusion kontralateral gelegenen oberen Hirnquadranten – ELISA Untersuchung**

NFκB Transkriptionsaktivität zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Trauma (15 Minuten, 3, 6, 12 und 24 Stunden nach Trauma,  $n=3$  pro Zeitpunkt) im kontralateral zur Kontusion liegenden Quadranten a im NFκB-ELISA. Die in % der Shamkontrollen angegebene NFκB-DNA-Bindungsaktivität ändert sich nach Trauma nicht. (n.s.  $p = 0,79$  vs. Sham, ANOVA on ranks, one way Anova).

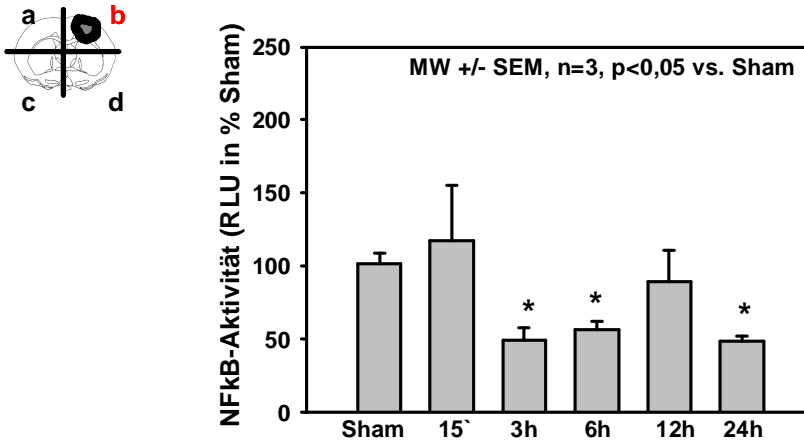
Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die NFκB-DNA-Bindungsaktivität nach Trauma im Bereich des verletzten Kortex graduell zunimmt, der Anstieg ist nach 24 Stunden signifikant. Im, zur Kontusion ipsilateral gelegenen Hirnquadranten steigt die NFκB-DNA-Bindungsaktivität sehr rasch an. Die Zunahme ist bereits nach 15 Minuten signifikant und lässt sich über den gesamten Untersuchungszeitraum von 24 Stunden nachweisen. Im zur Kontusion kontralateral gelegenen Hirnquadranten liegt keine Änderung der DNA-Bindungsaktivität vor.

Die Untersuchung der DNA-Bindungsaktivität im ELISA besitzt hinsichtlich der tatsächlichen transkriptionellen Aktivität von NFκB nur eingeschränkte Aussagekraft. Sie belegt eine Dissoziation von NFκB und IκB, welches die Aktivität von NFκB durch Blockierung der DNA-Bindungsstelle inhibiert. Um seiner Funktion als Transkriptionsfaktor nachzukommen muss NFκB in den Nukleus translozieren und dort an die DNA binden. Weiterhin wird die Transkriptionsaktivität durch Kofaktoren moduliert.

Aus dieser Überlegung heraus, wurde in einer weiteren Untersuchungsreihe die NFκB-Transkriptionsaktivität anhand von NFκB-Reportertieren im Luciferase-Assay untersucht.

### 3.3.2. NFκB-Transkriptionsaktivität

Die NFκB-Transkriptionsaktivität wurde, wie unter Abschnitt 2.8.2 beschrieben, bestimmt. In Abbildung 18 ist die NFκB-Transkriptionsaktivität aus Proben im Bereich der Kontusion und des perikontusionellen Hirngewebes (Hirnquadrant b) dargestellt.

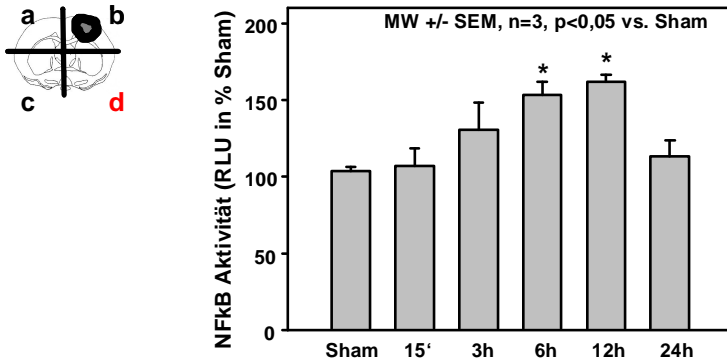


**Abbildung 18: Zeitliches Profil der NFκB Transkriptionsaktivität nach Trauma im Bereich des kontusionierten Kortex im Luciferase Reporter Assay**

Gewebelysate wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten (15 Minuten, 3, 6, 12 und 24 Stunden nach Trauma, n=3 pro Zeitpunkt) aus dem, die Kontusion enthaltenden, Hirnquadranten b gewonnen und mit dem NFκB Luciferase Reporter-Assay untersucht. Die NFκB-Transkriptionsaktivität ist in RLU (relative light units) in % der Shamkontrollen angegeben. Die NFκB-Transkriptionsaktivität ist 3, 6 und 24 Stunden nach Trauma signifikant erniedrigt (\* p < 0,05 vs. Sham, ANOVA on ranks, Student-Newman-Keuls).

Es zeigt sich, dass die NFκB-Transkriptionsaktivität nach Trauma deutlich abnimmt. Dieser Abfall ist nach drei, sechs und 24 Stunden signifikant gegenüber den Sham-operierten Kontrolltieren (p < 0,05 vs. Sham, je n=3). Dabei beträgt die NFκB-Aktivität bei Sham-operierten Tieren 100 +/- 7%, 15 Minuten nach Trauma 117 +/- 37%, 3 Stunden nach Trauma 48 +/- 8%, 6 Stunden nach Trauma 56 +/- 9%, 12 Stunden nach Trauma 89 +/- 20% und 24 Stunden nach Trauma 48 +/- 3%. Die Untersuchung zeigt, dass es im Bereich des verletzten Kortex zwar zur Steigerung der, im ELISA-gemessenen NFκB-DNA-Bindungsaktivität kommt (vergleiche Abbildung 15), die NFκB-Transkriptionsaktivität hingegen fällt in diesem Bereich im Verlauf von 24 Stunden um mehr als 50% der Ausgangswerte ab.

Auch im Hirnquadranten, der unterhalb der Kontusion liegt wurde die NFκB-Transkriptionsaktivität bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 19 dargestellt.

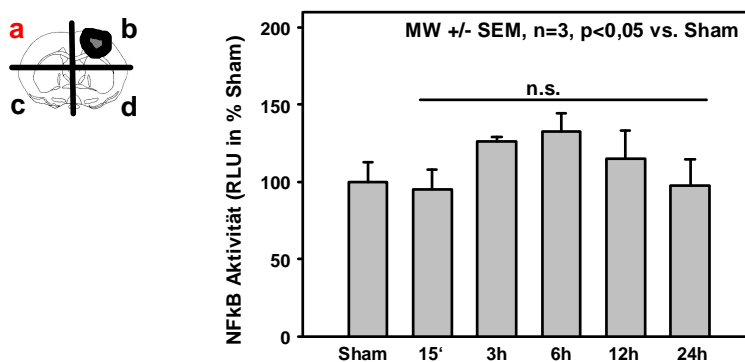


**Abbildung 19: Zeitliches Profil der NFκB-Transkriptionsaktivität nach Trauma im Bereich des Hirnquadranten unterhalb des kontusionierten Kortex im Luciferase Reporter Assay**

Gewebelysate wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten (15 Minuten, 3, 6, 12 und 24 Stunden nach Trauma, n=3 pro Zeitpunkt) aus dem unterhalb zur Kontusion gelegenen Hirnquadranten d gewonnen und mit dem NFκB Luciferase Reporter Assays untersucht. Die NFκB Transkriptionsaktivität ist in RLU (relative light units) in % der Shamkontrollen angegeben. Es liegt eine Erhöhung der Transkriptionsaktivität 3, 6 und 12 Stunden nach Trauma vor, diese ist bei 6 und 12 Stunden signifikant (\* p < 0,05 vs. Sham, ANOVA on ranks, Student-Newman-Keuls).

Wie aus Abbildung 19 hervorgeht steigt die NFκB-Transkriptionaktivität graduell an und erreicht 12 Stunden nach Trauma ein Maximum. Der Anstieg ist zu den Zeitpunkten 6 und 12 Stunden nach Trauma signifikant (\*p<0,05 vs. Sham, Anova on ranks, Student-Newman-Keuls). Dabei liegt beträgt die NFκB-Transkriptionsaktivität bei Sham operierten Tieren 100 +/- 3%, nach 15 Minuten 107 +/- 11%, nach 3 Stunden 130 +/- 17%, nach 6 Stunden 153 +/- 8%, nach 12 Stunden 162 +/- 4 % und nach 24 Stunden 113 +/- 10%.

In Abbildung 20 ist die NFκB-Transkriptionsaktivität im Hirnquadranten kontralateral zu Kontusion dargestellt. Drei und sechs Stunden nach Trauma liegt eine geringfügig erhöhte Transkriptionsaktivität vor, die Werte erreichen kein Signifikanzniveau (p =0,292).



**Abbildung 20: Zeitliches Profil der NFκB Transkriptionsaktivität nach Trauma im Bereich des Hirnquadranten unterhalb des kontusionierten Kortex im Luciferase Reporter Assay**

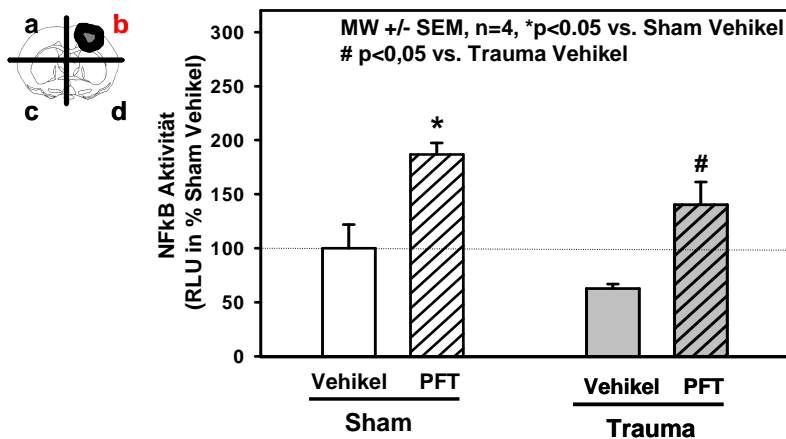
Gewebelysate wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten (15 Minuten, 3, 6, 12 und 24 Stunden nach Trauma, n=3 pro Zeitpunkt) aus dem kontralateral zur Kontusion gelegenen Hirnquadranten a gewonnen und mit dem NFκB Luciferase Reporter Assay untersucht. Die NFκB-Transkriptionsaktivität ist in RLU (relative light units) in % der Shamkontrollen angegeben. Bei 3 und 6 Stunden liegt eine geringgradige Erhöhung der Transkriptionsaktivität vor, diese ist aber nicht signifikant (n.s. p > 0,05 vs. Sham, ANOVA on ranks, one way Anova).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es nach Trauma im Bereich des Hirnquadranten, der die Kontusion enthält, zur Aktivierung von NFκB, also zur Erhöhung der NFκB-DNA-Bindungsaktivität kommt. Trotzdem liegt in diesem Bereich keine gesteigerte, sondern eine auf bis zu 50% reduzierte NFκB-Transkriptionsaktivität vor. Parallel dazu konnte eine, im Western Blot und in der immunhistochemischen Analyse belegte, Steigerung der p53-Expression beobachtet werden. In weiteren Versuchen wurde deswegen evaluiert, ob die beobachtete Repression der NFκB-Transkriptionsaktivität möglicherweise p53 vermittelt ist.

Im Bereich des Hirnquadranten, der unterhalb der Kontusion liegt, zeigte sich sowohl ein Anstieg der NFκB-DNA-Bindungsaktivität als auch der NFκB-Transkriptionsaktivität. In der kontralateral zur Kontusion gelegenen Hemisphäre konnte weder eine signifikante Veränderung der NFκB-DNA-Bindungsaktivität noch der NFκB-Transkriptionsaktivität beobachtet werden.

### 3.4. P53-abhängige Inhibition der NFκB-Transkriptionsaktivität

Um die Frage beantworten zu können, ob der beobachtete Abfall der NFκB-Transkriptionsaktivität im Bereich der Kontusionin möglicherweise p53-vermittelt ist, wurde die posttraumatische NFκB-Transkriptionsaktivität unter p53-Inhibition untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 22 dargestellt.



**Abbildung 21: Effekte der Behandlung mit Pifithrin auf die posttraumatische NFκB Transkriptionsaktivität**

Gewebelysate wurden 6 Stunden nach Trauma (n=4 pro Zeitpunkt) aus dem, die Kontusion enthaltenden Hirnquadranten (Quadrant b, rot gekennzeichnet) gewonnen. Die NFκB-Transkriptionsaktivität ist in % der Shamkontrollen (Sham/Vehikel) angegeben.

Die Transkriptionsaktivität der Shamkontrollen ist weiß, die der Traumatiere grau dargestellt. In beiden Gruppen sind die PFT-behandelten Tiere (8 mg/kg KG, Applikation eine Stunde vor Trauma) gemustert unterlegt. Die Behandlung mit Pifithrin führt sowohl in der Sham/PFT- als auch in der Trauma/PFT-Gruppe zur signifikanten Erhöhung der NFκB-Transkriptionsaktivität im Vergleich zu den entsprechenden Kontrolltieren (\* p < 0,05 Trauma/Vehikel vs. Trauma/PFT und # p < 0,05 Sham/Vehikel vs. Sham/PFT, ANOVA on ranks, Student-Newman-Keuls). Weiterhin ist die NFκB-Transkriptionsaktivität in der Versuchsgruppe Trauma/Vehikel im Vergleich zu Sham/Vehikel um 37% reduziert.

Die NFκB-Transkriptionsaktivität von Sham-operierte Tieren (weiß unterlegt) und von Tieren nach Traumaapplikation (grau unterlegt) ist in Abbildung 22 mit und ohne Pifithrin-Applikation (jeweils gemusterte unterlegt) zu sehen. Es zeigt sich, dass die Applikation von Pifithrin in einer Dosierung von 8 mg/kg Körpergewicht bei Sham-operierten Tieren zur signifikanten Steigerung der NFκB-Transkriptionsaktivität von 100 +/- 22% auf 186 +/- 9% führt (Sham/Vehikel vs. Sham/PFT, p < 0,05, Anova on ranks, Student-Newman-Keuls).

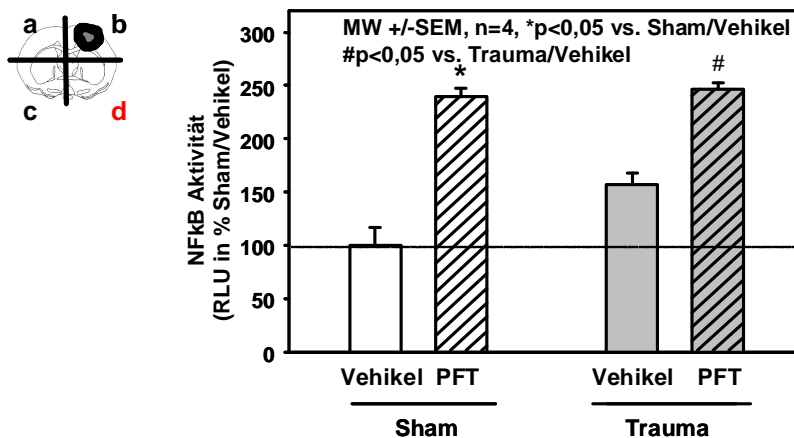
Vergleich man nun Sham-operierte (Sham/Vehikel, weiß unterlegt) und traumatisierte Tiere (Trauma/Vehikel, grau unterlegt), die Vehikel erhalten haben, so ist ersichtlich, dass es nach Trauma zum Abfall der NFκB-Transkriptionsaktivität von 100 +/- 22% auf 63 +/- 3% kommt.

Weiterhin zeigt sich, dass die Applikation von Pifithrin nach Trauma (grau, gemustert unterlegt) die NFκB-Transkriptionsaktivität von 63 +/- 3% auf 140 +/- 21% signifikant steigert (Trauma/Vehikel vs. Trauma/PFT, p < 0,05, Anova on ranks, Student-Newman-Keuls). Allerdings liegt das

Transkriptionsniveau nach Trauma und Pifithrin-Applikation (140 +/- 21%) niedriger als nach Sham-OP und Pifithrin-Applikation (186 +/- 9%).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass auch in dieser Versuchsreihe ein Abfall der NFκB-Transkriptionsaktivität nach Trauma gezeigt werden kann (Sham/Vehikel vs. Trauma/Vehikel). Dieser Abfall kann durch p53-Inhibition mit Pifithrin verhindert werden (Trauma/Vehikel vs. Trauma/Pifithrin). Pifithrin steigert nicht nur die posttraumatische, sondern auch die basale NFκB-Transkriptionsaktivität in Sham-operierten Tieren (Sham/Vehikel vs. Sham/Pifithrin).

In Abbildung 23 ist die NFκB-Transkriptionsaktivität im Bereich des Quadranten unterhalb der Kontusion zu sehen.



**Abbildung 22: Effekte der Behandlung mit Pifithrin auf die posttraumatische NFκB-Transkriptionsaktivität**

Gewebelysate wurden 6 Stunden nach Trauma (n=4 pro Zeitpunkt) aus dem ipsilateral zur Kontusion gelegenen Hirnquadranten (Quadrant d, rot gekennzeichnet) gewonnen. Die NFκB-Transkriptionsaktivität ist in % der Shamkontrollen (Sham/Vehikel) angegeben.

Die Transkriptionsaktivität der Shamkontrollen ist weiß, die nach Trauma grau dargestellt. In beiden Gruppen sind mit Pifithrin (8 mg/kg KG, Applikation eine Stunde vor Trauma) behandelte Tiere gemustert unterlegt. Die Pifithrin-Behandlung führt sowohl in der Sham/PFT als auch in der Trauma/PFT Gruppe zur signifikanten Erhöhung der NFκB-Transkriptionsaktivität im Vergleich zu Kontrolltieren (\* p < 0,05 Trauma/Vehikel vs. Trauma/PFT und # p < 0,05 Sham/Vehikel vs. Sham/PFT, ANOVA on ranks, Student-Newman-Keuls). Weiterhin ist die NFκB-Transkriptionsaktivität in der Versuchsgruppe Trauma/Vehikel um über 150 % im Vergleich zu Sham/Vehikel erhöht.

Analog zur Abbildung 21 ist die NFκB-Transkriptionsaktivität von Sham-operierten Tieren (weiß unterlegt) und von Tieren nach Traumaapplikation (grau unterlegt) mit oder ohne Pifithrin-Gabe (jeweils gemusterte unterlegt) zu sehen.

Es zeigt sich, dass die Applikation von Pifithrin bei Sham-operierten Tieren zur signifikanten Steigerung der NFκB-Transkriptionsaktivität von 100 +/- 16% auf 240 +/- 16 % führt (Sham/Vehikel vs. Sham/PFT, p < 0,05, Anova on ranks, Student-Newman-Keuls).

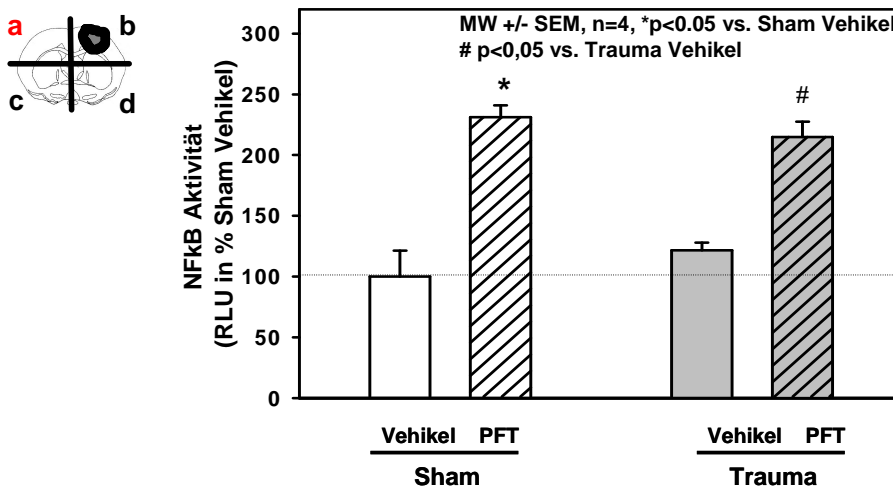
Vergleicht man nun mit Vehikel behandelte Sham-operierte Tiere (Sham/Vehikel, weiß unterlegt) und mit Vehikel behandelte Tiere nach Trauma (Trauma/Vehikel, grau unterlegt), so ist ersichtlich, dass es zum Anstieg der NFκB-Transkriptionsaktivität von 100 +/- 16 % (Sham/Vehikel) auf 157 +/- 8% (Trauma/Vehikel) nach Trauma kommt. Weiterhin zeigt sich, dass die Applikation von Pifithrin



nach Trauma (grau, gemustert unterlegt) die NFκB-Transkriptionsaktivität von 157 +/- 8% auf 246 +/- 6 % signifikant steigert (Trauma/Vehikel vs. Trauma/PFT,  $p < 0,05$ , Anova on ranks, Student-Newman-Keuls).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass im Hirngewebe, das ipsilateral zu Kontusion liegt, von dieser jedoch nicht direkt betroffen ist, eine Steigerung der NFκB-Transkriptionsaktivität nach Trauma vorliegt (Sham/Vehikel vs. Trauma/Vehikel). Die Applikation von Pifithrin nach Trauma kann die NFκB-Transkriptionsaktivität weiter steigern (Trauma/Vehikel vs. Trauma/Pifithrin). Pifithrin steigert nicht nur die posttraumatische, sondern auch die basale NFκB-Transkriptionsaktivität in Sham-operierten Tieren (Sham/Vehikel vs. Sham/Pifithrin).

In Abbildung 23 ist die NFκB-Transkriptionsaktivität im Bereich des, zur Kontusion kontralateral gelegenen, Hirnquadranten a dargestellt.



**Abbildung 23: Effekte der Behandlung mit Pifithrin auf die posttraumatische NFκB-Transkriptionsaktivität**

Gewebelysate wurden 6 Stunden nach Trauma (n=4 pro Zeitpunkt) aus dem kontralateral zur Kontusion gelegenen Hirnquadranten (Quadrant a, rot gekennzeichnet) gewonnen.

Die Transkriptionsaktivität der Shamkontrollen ist weiß, die der Traumatiere grau dargestellt. In beiden Gruppen sind mit Pifithrin (8 mg/kg KG, Applikation eine Stunde vor Trauma) behandelte Tiere gemustert unterlegt. Die Pifithrin Behandlung führt sowohl in der Sham/PFT als auch in der Trauma/PFT Gruppe zur signifikanten Erhöhung der NFκB-Transkriptionsaktivität im Vergleich zu den respektiven Kontrolltieren (\*  $p < 0,05$  Trauma/Vehikel vs. Trauma/PFT und #  $p < 0,05$  Sham/Vehikel vs. Sham/PFT, ANOVA on ranks, Student-Newman-Keuls). Weiterhin ist die NFκB-Transkriptionsaktivität in der Versuchsgruppe Trauma/Vehikel um über 150 % im Vergleich zu Sham/Vehikel erhöht.

Vergleicht man die Versuchstiere der Versuchsgruppe Sham/Vehikel mit denen der Versuchsgruppe Trauma/Vehikel so ist ersichtlich, dass sich die basale NFκB Transkriptionsaktivität nicht signifikant verändert (100 +/- 20 % vs. 114 +/- 11 %). Die Applikation von Pifithrin führt sowohl bei Sham-operierten Tieren, als auch bei Versuchstieren nach Trauma zum signifikanten Anstieg der NFκB-Transkriptionsaktivität (\*  $p < 0,05$  für Sham/Vehikel: 100 +/- 20% vs. Sham/PFT: 225 +/- 5%; und #  $p < 0,05$  für Trauma/Vehikel 114 +/- 11% vs. Trauma PFT 220 +/- 8% Anova on ranks, Student-Newman-Keuls).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich die NFκB-Transkriptionsaktivität nach Trauma kontralateral zur Kontusion nicht signifikant verändert (Sham/Vehikel vs. Trauma/Vehikel). Die Hemmung von p53 durch Pifithrin-Applikation führt sowohl nach Sham-OP, als auch nach Trauma zur signifikanten Steigerung der NFκB-Transkriptionsaktivität (Sham/Vehikel vs. Sham/PFT und Trauma/Vehikel vs. Trauma/PFT).

## 4. Diskussion

### 4.1. Das Modell des Controlled Cortical Impact

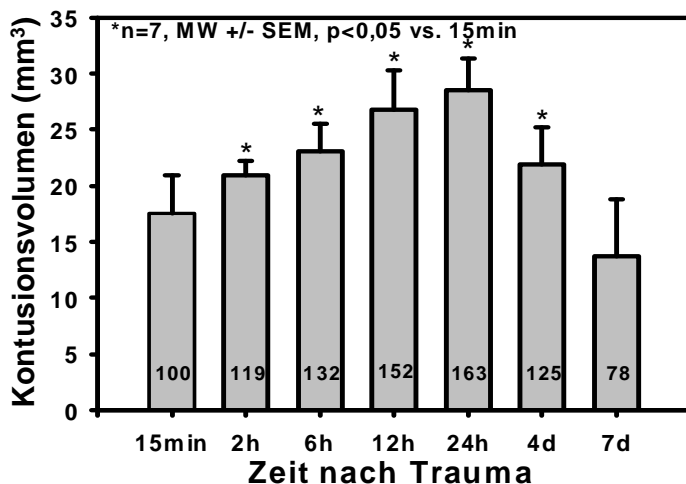
Das Modell des Controlled Cortical Impacts bietet eine einzigartige Möglichkeit, die Pathophysiologie des Schädel-Hirn Traumas aufzuklären, weil es reproduzierbar und sehr kliniknah viele pathophysiologische Manifestationen des Schädel-Hirn Traumas simuliert. 1988 veröffentlichte das Department für Biomedizinische Forschung im General Motors Research Laboratory in Michigan erstmals eine systematische Untersuchung zur Anwendung des dort entwickelten Modells des Controlled Cortical Impact am Frettchen (Lighthall, 1988). Analysen des durch einen pneumatisch getriebenen Kolben entstandenen Verletzungsmusters ergaben, dass viele Aspekte des realen Schädel-Hirn Traumas wie die fokale Rindenkontusion, epidurale Blutungen, Parenchymblutungen, das Abreißen von Brückenvenen, die Entstehung von subkortikal lokalisiertem, diffusem Axonschaden, Hirnödemen und Parenchymuntergang durch die erzeugte Verletzung repräsentiert sind.

Durch die freie Wahl der Intensitätsparameter wie der Auftreffgeschwindigkeit und Eindringtiefe des Bolzens, sowie dessen Kontaktzeit mit der Dura mater, ermöglicht das Modell des Controlled Cortical Impacts die präzise und reproduzierbare Erzeugung eines Traumas von definiertem anatomischem und funktionellem Schweregrad. Die Weiterentwicklung des Geräts zur Anwendung an der Maus ermöglichte die Untersuchung molekularer Teilaspekte des Traumas anhand transgener Tiere, sowie die Evaluierung verschiedener Therapiestrategien zur Neuroprotektion nach Trauma. Dabei ließ die durch Controlled Cortical Impact erzeugte Verletzung des Hirngewebes eine intra- und interindividuelle Quantifizierung zu, was unterschiedliche Studien aus dem Labor für Chirurgische Forschung belegen (Plesnila et al., 2007; von Baumgarten et al., 2008; Zweckberger et al., 2006; Zweckberger et al., 2003; Engel et al., 2008; Trabold et al., 2009).

Voruntersuchungen zu den optimalen Einstellungen der frei justierbaren Intensitätsparameter des hier verwendeten Geräts haben ergeben, dass eine Traumaapplikation mit einer Auftreffgeschwindigkeit von 8 m/s, einer Eindringtiefe von 1 mm, einer Kontaktzeit von 150 ms, eines Bolzendurchmessers von 3 mm und einem Eindringwinkel von 90° zur Gehirnoberfläche zur Erzeugung eines moderaten Schädel-Hirn Traumas geeignet ist (Zweckberger et al., 2003). Pathophysiologisch wichtige Aspekte, wie die Entstehung und Beeinflussung des Hirnödems oder der regionalen zerebralen Durchblutung, die Kinetik der Schadensentstehung sowie der posttraumatische Anstieg des intrakraniellen Drucks konnten so untersucht werden. So zeigten Studien zur regionalen Durchblutung des Hirnparenchyms mittels Laser Doppler Fluxmetrie und <sup>14</sup>C-Iodoantipyrin Autoradiographie, dass die Durchblutung ipsilateral zur Kontusion in den ersten drei Stunden nach Trauma deutlich vermindert ist. Es kommt zum Abfall der regionalen Durchblutung auf 50-60% des Ausgangswerts. Kontralateral zur Kontusion steigt die Durchblutung

auf ca. 120% des Ausgangswerts an (Zweckberger et al., 2003; von Baumgarten et al., 2008). Angestoßen durch das mechanische Trauma, kommt es bereits in den ersten Stunden nach Trauma zum Zusammenbruch der Blut-Hirnschranke und zur Entstehung eines Hirnödems (Zweckberger et al., 2006). Der intrakranielle Druck steigt innerhalb von 180 Minuten nach Trauma signifikant an (Zweckberger et al., 2003; Zweckberger et al., 2006; von Baumgarten et al., 2008).

Des Weiteren wurde in Studien im Institut für Chirurgische Forschung die Kinetik des sekundären Schadenswachstums bestimmt: Abbildung 24 zeigt die histologische Quantifizierung der Kontusionsvolumina zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Trauma. Es ist ersichtlich, dass sich der Hirnschaden in den ersten 24 Stunden nach Trauma kontinuierlich ausweitet. 24 Stunden nach Trauma hat das Kontusionsvolumen um 63% zugenommen. Zu späteren Zeitpunkten stellt sich das Nekrosevolumen wieder kleiner dar, da Abbauprozesse und narbige Gewebeschrumpfung den Substanzdefekt zusammenziehen (Zweckberger et al., 2006). Die gute Reproduzierbarkeit des Modells zeigt sich darin, dass die in dieser Arbeit erhobenen Werte für den sekundären Hirnschaden nach Trauma fast identische sind mit denen aus Abbildung 24.



**Abbildung 24: Zunahme der Kontusionsvolumen nach Controlled Cortical Impact, modifiziert nach Zweckberger et al, 2006**

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das Modell des Controlled Cortical Impacts sehr gut geeignet ist, die Pathophysiologie des Schädel-Hirn Traumas weiter aufzuklären und die Auswirkung therapeutischer Interventionen auf das sekundäre Nekrosewachstum zu untersuchen. Folgende Gründe tragen dazu bei:

1. Controlled Cortical Impact erzeugt eine Vielzahl klinisch relevanter pathophysiologischer Manifestationen des Schädel-Hirn Traumas.
2. Diese konnten in der Vergangenheit in unserem Labor vielfach charakterisiert werden.
3. Die unterschiedlichen Studien zeichneten sich durch eine hohe intra- und interindividuelle Reproduzierbarkeit aus.

4. In vorausgegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass eine therapeutische Beeinflussung des sekundären Schadenswachstums sicher quantifiziert werden kann.

## **4.2. P53-Expression nach Trauma**

Die vorliegende Studie belegt durch Western Blotanalysen von Hirnlysaten, dass es zur gesteigerten p53 Expression nach experimentellem Schädel-Hirn Trauma der Maus kommt. P53 akkumuliert graduell in einem Zeitraum von 24 Stunden nach Trauma im Bereich des von der Kontusion betroffenen Hirnquadranten. Der Anstieg der p53 Expression ist bereits 15 Minuten nach Trauma nachweisbar und hält für 24 Stunden an.

Immunhistochemische Schnitte zeigen, dass eine gesteigerte p53 Expression dabei selektiv im Bereich der Kontusion sowie im perikontusionellen Hirngewebe vorliegt und hier in erster Linie im Zellkern nachzuweisen ist. Diese Tatsachen müssen im Licht der aktuellen Forschung differenziert betrachtet werden. Insgesamt erscheinen drei Punkte in diesem Zusammenhang relevant.

1. Was ist über die Regulation der p53 Proteinlevel in Neuronen bekannt?
2. Sind Auslösemechanismen bekannt, die nach Schädel-Hirn Trauma zur Expressionssteigerung von p53 führen könnten?
3. Wie sind die beobachteten Ergebnisse in die aktuelle Forschung zum Schädel-Hirn Trauma einzuordnen?

### **4.2.1. Regulation von p53 im ZNS**

P53 ist ein tetrameres Phosphoprotein, das als Tumorsuppressor und nukleärer Transkriptionsfaktor wichtige Funktionen wie Gentranskription, DNA-Synthese, DNA-Reparatur und Zelltod steuert. Da p53 den Zelltod sehr effizient initiieren kann, muss die p53 Proteinkonzentration engmaschig kontrolliert werden, um eine normale Zellfunktion zu gewährleisten. P53 wird in Neuronen konstitutiv exprimiert und liegt im Zytosol in sehr niedriger Konzentration vor. Es wird unter physiologischen Bedingungen rasch abgebaut, die Halbwertszeit beträgt nur 10–30 Minuten (Soussi, 2000).

Die schnelle und kontinuierliche Degradation erfolgt Ubiquitin-abhängig in den Proteasomen des Zytosols. Für den Abbau entscheidend, ist die Interaktion mit dem MDM-2 (murine double minute-2) Molekül. Hierbei handelt es sich um ein Protein, das p53 am N-Terminus binden kann. Die Bindung führt zur Inaktivierung von p53 und zum Transport von p53 aus dem Zellkern ins Zytosol. Hier katalysiert MDM-2, unter Funktion einer Ubiquitin-Ligase, die Ubiquitinierung. Das Ubiquitin-markierte p53 wird in der Folge von Proteasomen erkannt und abgebaut (Kubbutat and Vousden, 1998). Zur Akkumulation von p53 in Neuronen kommt es dann, wenn die Interaktion mit MDM-2 gestört ist. Auf ein aktivierendes Signal hin kommt es zur posttranslationalen Modifizierung von

p53 oder MDM-2, was die wechselseitige Interaktion verhindern und zur Akkumulation von p53 führen kann. Zu den Modifikationen des p53 Proteins gehören unter anderem die Phosphorylierung von N-terminalen Resten, die Acetylierung von C-terminal Resten und die Poly(ADP)-Ribosylierung. Diese Modifizierungen stabilisieren das Protein oder tragen direkt zur Erhöhung der DNA-Bindungsaffinität bei (Brooks and Gu, 2006).

Die Regulation der p53-Expression durch posttranslationale Modifikation lässt die beobachtete rasche Akkumulation 15 Minuten nach Trauma möglich erscheinen, da hierfür weniger eine Steigerung der *de novo* Synthese (Dauer 3-6 Stunden), als vielmehr eine Hemmung der Proteindegradation zu Grunde liegt.

#### **4.2.2. Auslösemechanismen posttraumatisch gesteigerter p53**

##### **Expression**

Zerebrale Kontusionen sind mit einer Reduktion der regionalen zerebralen Blutversorgung assoziiert (Dietrich et al., 1998; Coles et al., 2004; Tawil et al., 2008). Die Versorgung kortikaler Neurone mit Sauerstoff und Glucose ist eingeschränkt, zelluläre ATP-Level sind erniedrigt. Dies kompromittiert die Fähigkeit zur Aufrechterhaltung des Ionengradienten über der Zellmembran durch ATP abhängige Ionentransporter für Natrium und Kalzium. Es kommt zur Membrandepolarisation, welche die Aktivierung von synaptischen Glutamat-Rezeptoren bewirkt. Glutamat akkumuliert extrazellulär, was die Glutamat-Rezeptoren weiter aktiviert und zum massiven Einstrom von Kalzium in die Zelle führt (Yi and Hazell, 2006).

*In vitro* konnte eine enge Korrelation von p53-Expression und dem Zelltod durch Glutamat und N-methyl-d-Aspartat (NMDA)-Applikation in Neuronen belegt werden (Culmsee and Mattson, 2005; Culmsee et al., 2001; Xiang et al., 1998). Durch Glutamat verursachte Störungen des Ionenhaushalts stellen somit einen möglichen Stimulus für die gesteigerte p53-Expression und den damit verbundenen Zelluntergang nach Trauma dar.

Als Resultat der Störung des oxidativen Metabolismus und der Kalziumhomöostase kommt es nach Trauma zur mitochondrialen Dysfunktion und zur Entstehung von freien Radikalen, die zelleigene Proteine, Membranlipide und zelleigene DNA beschädigen (Lewen et al., 2000; Lewen et al., 2001). *In vitro* und *in vivo* Daten belegen, dass oxidative DNA-Schäden zur gesteigerten p53 Expression in Neuronen führen (Culmsee et al., 2002; Culmsee et al., 2001; Mattson, 2000b; Martin et al., 2003).

*In vitro* Studien belegen, dass es durch oxidativen Stress zur Aktivierung von Jun-Kinase und p38 Map-Kinase kommt. Diese Kinasen können p53 phosphorylieren, was den neuronalen Zelltod induziert (Fuchs et al., 1998). Die Aktivierung dieser Kinasen konnte auch nach Trauma

nachgewiesen werden (Serbest et al., 2005; Lu et al., 2005; Raghupathi et al., 2003a). Somit stellt auch dieser Mechanismus eine denkbare Möglichkeit für die Aktivierung von p53 nach Trauma dar.

Des Weiteren führen Membranschädigungen und Axotomie im Tiermodell zu einem signifikanten Anstieg der p53 Expression in betroffenen Neuronen (Martin et al., 2003). Diffuse axonale Schädigung ist nach Schädel-Hirn Trauma nachzuweisen (Sahuquillo et al., 2001).

### **4.2.3. P53 Expression nach Schädel-Hirn Trauma *in vivo***

In der Literatur wurde bereits an unterschiedlichen Modellen des experimentellen Schädel-Hirn Traumas beschrieben, dass es zur posttraumatischen Expressionssteigerung von p53 kommt. Eine Studie von Lu und Mitarbeitern, die sich mit Änderungen von Apoptose-assoziierten Proteinen im Zeitverlauf nach Schädel-Hirn Trauma in der Ratte beschäftigt, konnte zeigen, dass es vier Stunden nach Schädel-Hirn Trauma im Kortex zur gesteigerten Expression von p53 kommt. Interessanterweise war die gesteigerte p53-Expression in Neuronen mit einer stark erhöhten Expression des proapoptotischen Moleküls Bax und einer stark verminderten Expression des antiapoptotischen Bcl-2 Proteins kolokalisiert (Lu et al., 2000). Die Interaktion von Bax und Bcl-2 ist entscheidend für das Schicksal von Neuronen: Überwiegt das pro-apoptotisch wirksame Bax, kommt es zum Zelluntergang, überwiegt Bcl-2, ist das Zellüberleben begünstigt (Oltvai et al., 1993). Dieser Mechanismus scheint auch nach experimentellem Schädel-Hirn Trauma und nach experimenteller Verletzung des Rückenmarks bei Mäusen, eine Rolle zu spielen (Clark et al., 1997; Raghupathi et al., 2003b; Saito et al., 2000). Es ist bekannt, dass beide Gene auf Transkriptionsebene durch p53 reguliert werden. Dabei fördert p53 die Transkription von Bax und die hemmt Transkription von Bcl-2 (Miyashita et al., 1994; Miyashita and Reed, 1995).

Napieralski und Mitarbeiter haben 1999 die Expression von p53-mRNA nach Schädel-Hirn Trauma der Ratte untersucht. In der ipsilateral zur Kontusion gelegenen Hemisphäre stieg p53-mRNA in den Neuronen des Kortex, des Hippocampus und des Thalamus deutlich an. Dieser Anstieg erreichte sechs Stunden nach Trauma ein Maximum, ging dann zurück und war drei Tage nach Trauma nicht mehr nachweisbar (Napieralski et al., 1999).

Kaya und Mitarbeiter konnten im Jahr 1999 zeigen, dass apoptotischer Zelltod nach experimentellem Schädel-Hirn Trauma (Controlled Cortical Impact) der Ratte bereits innerhalb von zwei Stunden auftritt. Hierzu wurde die im Rahmen der Apoptose auftretende Fragmentation der zelleigenen DNA mit der TUNEL-Methode (Terminal Deoxynucleotide Transferase mediated dUTP-biotin Nick-End Labeling) nachgewiesen. Das so detektierte Auftreten von apoptotischen Zellen war innerhalb von zwei Stunden nach Trauma nachweisbar, erreichte 24 bis 48 Stunden einen Höhepunkt und war in einzelnen apoptotischen Zellen bis zu zwei Wochen nach Trauma zu detektieren. Apoptotische Zellen fanden sich in erster Linie kortikal an die Kontusion angrenzend. Mehr als 95% der apoptotischen Zellen waren Neurone, die restlichen 5% entfielen auf Astrozyten

und Endothelzellen. Im perikontusionellen Hirngewebe zeigte sich eine zytoplasmatische und nukleäre Expressionssteigerung von p53. Nukleär lokalisiertes p53 war vor allem in TUNEL-positiven Zellen nachweisbar, wurde aber auch in Neuronen detektiert, die noch keine morphologischen Charakteristika der Apoptose aufwiesen (Kaya et al., 1999).

Ng und Mitarbeiter untersuchten im Jahr 2000 humanes Hirngewebe, das im Rahmen von Entlastungskraniektomien nach zerebralen Kontusionen innerhalb von zwei bis 196 Stunden nach Trauma gewonnen wurde. Insgesamt konnten 31 Proben verschiedener Patienten gewonnen werden. Nur elf Proben enthielten vitales, nicht nekrotisches, perikontusionelles Hirngewebe und konnten hinsichtlich des Auftretens von Apoptose untersucht werden. In 73% der Proben konnten so TUNEL-positive apoptotische Neurone detektiert werden. Weiterhin fand sich eine erhöhte Expression des proapoptotischen Proteins Bax in allen untersuchten Proben. 55% der Proben zeigten eine erhöhte Expression des Proteins Bcl-2, was statistisch signifikant mit einem besseren klinischen Outcome korreliert war. Nur in einer der elf Proben konnte eine gesteigerte p53-Expression nachgewiesen werden. Die Autoren führen dies auf die geringe Halbwertszeit von p53 (10-30 Minuten) im Vergleich zu Bax (8-42 Stunden) zurück. Insgesamt belegt die Studie erstmalig eindeutig, dass apoptotische Mechanismen nach Trauma im menschlichen Gehirn auftreten. Eine therapeutische Intervention könnte somit eine viel versprechende Therapieoption in der Behandlung des Schädel-Hirn Traumas darstellen (Ng et al., 2000).

Nathoo und Mitarbeiter veröffentlichten 2004 eine Studie zur Expression von p53, Bax, Bcl-2 und Caspase 3 in Gewebeproben von 29 Patienten, die bei supratentoriellen Kontusionen entlastungskraniektomiert wurden. Die Ergebnisse wurden anschließend mit demographischen, klinischen, chirurgischen und bildgebenden Daten sowie mit dem Outcome korreliert. Es zeigte sich eine statistisch signifikante, stark gesteigerte Expression von Bax und Caspase 3. Bcl-2 war in 48% der Proben stark erhöht. Regressionsanalysen ergaben, dass erhöhte Caspase 3 und fehlende Bcl-2 Expression unabhängige Prädiktoren für ein schlechtes Outcome darstellen. Keine der untersuchten Proben zeigte eine gesteigerte p53 Expression (Nathoo et al., 2004).

Zusammenfassend zeigen die angeführten Studien, dass es nach Schädel-Hirn Trauma zur gesteigerten Expression von p53 bzw. von durch p53 positiv (Bax) und negativ (BCL2) regulierten Genprodukten kommt. Diese Phänomene stehen in engem zeitlichem und örtlichem Zusammenhang mit apoptotischem Zelluntergang von Neuronen des perikontusionellen Hirngewebes. Ein kausaler Zusammenhang von p53-Expression nach Trauma, wird vermutet, konnte bisher jedoch nicht eindeutig belegt werden.



## 4.3. Pharmakologische Inhibition von p53 nach Schädel-Hirn

### Trauma

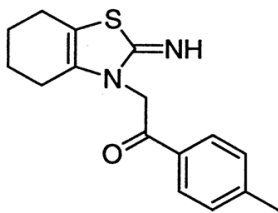
Die vorliegende Arbeit zeigt, dass p53 eine kausale Rolle in der Pathophysiologie des Schädel-Hirn Traumas spielt. Die pharmakologische Inhibition von p53 mit Pifithrin-alpha führte zur dosisabhängigen, signifikanten Reduktion des sekundären Hirnschaden um bis zu 60%.

Therapiestudien zur Etablierung des therapeutischen Fensters zeigen, dass die Applikation von Pifithrin in einem Zeitraum von bis zu sechs Stunden nach Trauma signifikante neuroprotektive Effekte besitzt.

In der Folge soll der eingesetzte p53 Inhibitor Pifithrin-alpha charakterisiert sowie dessen Wirkung in anderen Modellen akuter neuronaler Schädigung dargelegt werden.

#### 4.3.1. Pifithrin-alpha

Zu den unerwünschten Nebenwirkungen von Chemo- und Strahlentherapie auf normales Gewebe gehören zum Beispiel die p53-abhängige Apoptose von Zellen des hämatopoetischen Systems (Wang et al., 1996), der Haarfollikel (Song and Lambert, 1999) und der Epithelien des Magen-Darmtrakts (Merritt et al., 1997). Um diese Nebenwirkungen zu reduzieren, untersuchten Komarov und Mitarbeiter 10 000 synthetische Chemikalien auf Inhibitoren der p53-vermittelten Apoptose. Ein kleines, stabiles, lipophiles Molekül mit den geforderten Eigenschaften und der in Abbildung 27 dargestellten chemischen Struktur konnte identifiziert werden. Als Abkürzung für *p-fifty-three inhibitor*, wurde es Pifithrin-alpha genannt. Pifithrin-alpha bewahrte die Zellen des hämatopoetischen Systems, der Haarfollikel und des Magen-Darmtrakts, sowohl *in vitro* als auch *in vivo* vor dem apoptotischen Zelluntergang nach Applikation von Chemotherapie oder Bestrahlung. Dieser Effekt ließ sich nur in Zellen von Wildtyp-, nicht aber in homozygot defizienten p53-Knockoutmäusen nachweisen. Die Therapie mit Pifithrin konnte die Nebenwirkungen der Krebsbehandlung durch Chemotherapie oder Strahlentherapie in der Maus signifikant reduzieren, ohne dass dabei der Entstehung neuer Tumore Vorschub geleistet wurde (Komarov et al., 1999).



**Abbildung 25: Strukturformel von Pifithrin-alpha (PFT-α)**

Molekülstruktur des eingesetzten p53 Inhibitors Pifithrin-alpha [1-(4-methylphenyl)-2-(4,5,6,7-tetrahydro-2-imino-3(2H)-benzothiazolyl)-ethanon hydrobromid]

Pifithrin ist ein kleines, stabiles, lipophiles Molekül, das einen Oktanol-Wasser Trennungskoeffizienten log P von 1,75 besitzt. Diese physikalische Eigenschaft legt eine gute Fähigkeit zur Penetration der Blut-Hirnschranke nahe. Tatsächlich ist Pifithrin-alpha 30 Minuten nach intraperitonealer Applikation im Liquor von Mäusen nachweisbar (Culmsee et al., 2001). Der genaue Wirkmechanismus der anti-p53 Aktivität von Pifithrin ist nicht abschließend geklärt.

Pifithrin inhibiert die p53-abhängige Transkription in Neuronen. Die Transaktivierung der p53-responsiven Gene für Bax, p21 und Cyclin G sind nach Applikation von Pifithrin supprimiert (Komarov et al., 1999; Duan et al., 2002; Tamagno et al., 2003; Nakaso et al., 2004). Weiterhin involvieren die anti-apoptotischen Effekte von Pifithrin-alpha die Hemmung der p53-abhängige Aktivierung von Caspasen (Alves et al., 2002; Zhang et al., 2003a; Paitel et al., 2003; Jiang et al., 2004; Cahill et al., 2007).

Die Applikation von Pifithrin-alpha führt zur Reduktion der nukleären Konzentration von p53, die zytosolische p53-Konzentration bleibt unverändert. Möglicherweise hemmt der Pifithrin den Transport von p53 in und aus dem Kern oder setzt die Stabilität von nukleärem p53 herab (Culmsee et al., 2001; Gudkov and Komarova, 2005; Leker et al., 2004; Komarov et al., 1999).

Weiterhin gibt es Hinweise darauf, das Pifithrin-alpha in Thymozyten und Tumorzelllinien p53-unabhängig Heat-Shock und Glucocorticoid Signalwege unterdrückt (Komarova et al., 2003).

### **4.3.2 Neuroprotektion durch p53-Inhibitor**

*In vitro* Studien belegen, dass Pifithrin in verschiedenen Modellen akuter neuronaler Schädigung neuroprotektive Eigenschaften besitzt. Nach Applikation von DNA-schädigenden Substanzen (Camptotecin, Etoposid) sowie nach Schädigungsmechanismen, die für die Pathogenese des Schlaganfalls (Glutamatapplikation, Sauerstoff- und Glukosedepriivation), der Alzheimer Erkrankung (Amyloid-beta Akkumulation) und der Parkinsonerkrankung (Dopaminakkumulation) relevant sind, kann Pifithrin den Untergang von Neuronen signifikant reduzieren (Culmsee et al., 2001; Culmsee et al., 2003; Biswas et al., 2005).

*In vitro* Daten zeigen weiterhin, dass Pifithrin in sehr hoher Konzentration durch seine Funktion als Antioxidans und Radikalfänger neuroprotektive Wirksamkeit besitzen kann. Diese hohe Konzentration wird bei der *in vivo* verabreichten Dosis von 10 mg pro kg Körpergewicht im Mausmodell nicht erreicht (Culmsee et al., 2001).

Auch *in vivo* wirkt Pifithrin-alpha neuroprotektiv. Anhand von verschiedenen tierexperimentellen Modellen der zerebralen Ischämie konnte gezeigt werden, dass p53-abhängige Apoptose zum sekundären Hirnschaden nach zerebraler Ischämie beiträgt. So konnte in mehreren unabhängigen Studien eindeutig belegt werden, dass die Hemmung von p53 mit Pifithrin nach zerebraler Ischämie zu signifikant kleineren Infarktvolu-men und zur verbesserten neurologischen Erholung

führt (Leker et al., 2004; Zhu et al., 2002; Culmsee et al., 2001; Culmsee et al., 2003; Gupta et al., 2007).

72 Stunden nach transienter, fokaler, zerebraler Ischämie der Ratte, verursacht durch einen temporären Verschluss der Arteria cerebri media, weisen mit Pifithrin behandelte Tiere ein um bis zu 66% kleineres Infarktvolume und signifikant weniger neurologische Defizite auf als respektive Kontrolltiere. Die Reduktion des Zelluntergangs betrifft vor allem den Bereich des Kortex, der in diesem Modell die Penumbra repräsentiert. Der Infarktkern im Bereich des Striatums wurde durch die Behandlung nicht beeinflusst (Leker et al., 2004).

Weiterhin zeigte sich, dass die Applikation von Pifithrin, in einem Zeitfenster von bis zu drei Stunden nach Auslösung des Infarkts, neuroprotektive Wirkung besitzt. Die eingesetzten Dosierungen liegen zwischen 0,2 und 4 mg/kg Körpergewicht (Culmsee et al., 2001; Leker et al., 2004; Gupta et al., 2007).

Auch im Tiermodell der Subarachnoidalblutung konnte belegt werden, dass die Pifithrin-Applikation in einem Zeitfenster von bis zu drei Stunden nach Auslösung der Blutung, zur signifikanten Reduktion des Zelluntergangs in Kortex und Hippocampus führt. Mit Pifithrin behandelte Tiere zeigen insgesamt ein deutlich besseres neurologisches Outcome. Auf molekularer Ebene konnte gezeigt werden, dass durch p53-Inhibition drei unterschiedliche Signalkaskaden beeinflusst wurden. In Kortex und Hippocampus kommt es zur signifikant erniedrigten Expression von Caspase 3 und 8, einer erniedrigten Expression von AIF sowie einer deutlich gesenkten mitochondrialen Cytochrom C Freisetzung (Cahill et al., 2006; Cahill et al., 2007).

#### **4.4. NFκB-Aktivität nach Trauma**

Die vorliegende Studie belegt eine, innerhalb von 24 Stunden nach Trauma auftretende, NFκB-Aktivierung mit gesteigerter DNA-Bindungsaktivität im Bereich der kontusionierten Hemisphäre. Die NFκB-Transkriptionsaktivität steigt in der ipsilateral zur Kontusion gelegenen Hemisphäre an. Eine Ausnahme stellt der Bereich der Hemisphäre dar, welcher Kontusion und perikontusionelles Gewebe enthält. Hier kommt es, trotz gesteigerter NFκB DNA-Bindungsaktivität, zur Reduktion der NFκB-Transkriptionsaktivität um bis zu 50%. Kontralateral zur Kontusion ist keine signifikante Änderung der NFκB DNA-Bindungsaktivität und der NFκB-Transkriptionsaktivität zu beobachten.

Zur Interpretation der erhobenen Befunde ist es relevant, die Funktion und Regulation von NFκB im Gehirn detailliert aufzuschlüsseln.

#### 4.4.1. Funktion von NFκB im ZNS

NFκB wurde vor 23 Jahren als Transkriptionsfaktor von B-Lymphozyten entdeckt (Sen and Baltimore, 1986) und wenige Jahre später auch im Gehirn nachgewiesen (Korner et al., 1989). NFκB wird im ZNS konstitutiv in Neuronen, Astrozyten, Mikroglia und Oligodendrozyten exprimiert (O'Neill and Kaltschmidt, 1997). Es reguliert physiologische Prozesse wie Zellwachstum und Zelldifferenzierung sowie adaptive Prozesse auf zellulären Stress und Inflammation in einer zell- und stimulusabhängigen Art und Weise.

NFκB liegt im Zytoplasma als inaktive Form vor, die aus dem Transkriptionsfaktor-Dimer und der inhibitorischen Untereinheit IκB besteht. In Neuronen setzen sich NFκB Homo- bzw. Heterodimere aus Kombinationen der Untereinheiten p65 (RelA), RelB, p50 und cRel zusammen. Auf aktivierende Signale hin kommt es zur Phosphorylierung von IκB, welches im phosphorylierten Zustand ubiquitiniert und durch Proteasomen abgebaut wird. Dabei kommt es zur Freisetzung von NFκB. Nur freies NFκB kann in den Nukleus translozieren, wo es an die κB DNA-Konsensussequenz bindet und die Expression von NFκB regulierten Gene initiiert (Mattson and Meffert, 2006).

In Neuronen besitzt NFκB wichtige Funktionen bei der Entwicklung des zentralen Nervensystems: NFκB Komplexe vermitteln neuronales Überleben und die Ausbildung neuronaler Fortsätze (Gutierrez et al., 2005; Bhakar et al., 2002). Wenn die konstitutive DNA-Bindungsaktivität von NFκB in Neuronen komplett unterbunden wird, kommt es zum apoptotischen Zelluntergang. Diesem geht eine starke Reduktion von NFκB regulierten Genprodukten, wie zum Beispiel Bcl-2 und Bcl-xl, voraus (Bhakar et al., 2002; Middleton et al., 2000).

Das Vorhandensein von NFκB im Bereich der neuronalen Synapse war der erste Hinweis darauf, dass der Transkriptionsfaktor eine Rolle bei der Vermittlung von synaptischer Aktivität in nukleäre Transkriptionsaktivität spielt (Kaltschmidt et al., 1993). Eine Vielzahl von Studien belegten in der Folge, dass NFκB eine kausale Rolle für neuronale Mechanismen der Gedächtnisfunktion, der synaptischen Plastizität und des Verhaltens spielt (O'Neill and Kaltschmidt, 1997; Mattson and Meffert, 2006; Boersma and Meffert, 2008; Memet, 2006).

Es gibt unterschiedliche Signalwege, die die konstitutive NFκB-Aktivierung im zentralen Nervensystem aufrechterhalten. Hierbei spielen zum einen die Neurotransmitter Glutamat, Dopamin und Noradrenalin eine Rolle. Zum anderen können Membrandepolarisierungen, neurotrophe Faktoren wie zum Beispiel NGF (Nerve Growth Factor) und BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor), oxidativer Stress, Opioide und Amyloid-beta Vorläuferprotein die NFκB-Aktivierung steigern (Denk et al., 2000).

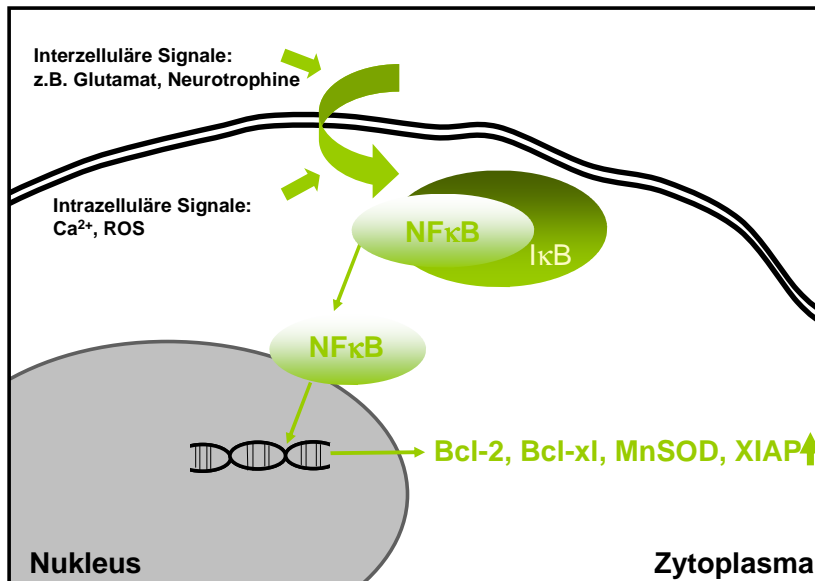
Neben den wichtigen Funktionen, die NFκB für neuronales Überleben, Wachstumsprozesse während der Entwicklung des Gehirns und Langzeitveränderungen der neuronalen Funktion als

Antwort auf synaptische Transduktion besitzt, gibt es auch Hinweise dafür, dass pathologische NFκB-Aktivierung eine zentrale Rolle in der Pathogenese von Gedächtnisstörungen, Neurodegeneration, Inflammation und neuronalem Zelluntergang spielt (Clemens et al., 1997; O'Neill and Kaltschmidt, 1997; Qin et al., 1998; Schneider et al., 1999).

#### 4.4.2. Neuronale durch NFκB-regulierte Gene

Es gibt eine Vielzahl von Hinweisen dafür, dass NFκB, vor allem durch die Suppression apoptotischer Mechanismen, eine entscheidende Rolle bei der Regulation von neuronalen Zelltodmechanismen spielt (Barkett and Gilmore, 1999; Pizzi et al., 2005; Kaltschmidt et al., 2005; Mattson, 2005; Mattson and Meffert, 2006).

Anhand von *in vitro* Studien konnte gezeigt werden, dass NFκB-Aktivierung in neuronalen Zellen die neuroprotektive Wirkung des Tumor Nekrose Faktors (TNF) im Rahmen der Zellreaktion auf oxidativen Stress vermittelt (Tamatani et al., 1999; Mattson et al., 1997). Die neuroprotektive Wirkung scheint vor allem durch das NFκB-regulierte, anti-oxidativ wirksame Enzym Mangan-Superoxid-Dismutase (MnSOD), vermittelt zu sein (Mattson et al., 1997).



**Abbildung 26: Schematische Darstellung der, durch NFκB vermittelten, neuronalen Signaltransduktion als Antwort auf neuronalen Stress**

Die Abbildung zeigt die schematische Darstellung eines Neurons mit einem Ausschnitt des Zytoplasmas und des Zellkerns. Interzelluläre Signaltransduktion durch Glutamat oder Neurotrophine und intrazelluläre Signale, wie zum Beispiel Kalzium-Akkumulation oder die Bildung von reaktiven Sauerstoffabkömmlingen (ROS, reactive oxygen species), können die Dissoziation von NFκB und IκB bewirken. Freies NFκB kann in den Zellkern translozieren und hier die Transkription von anti-apoptotischen Molekülen wie zum Beispiel Bcl-2, Bcl-xl, MnSOD und XIAP induzieren.

Die Aktivierung von NFκB kann hierbei die apoptotische Kaskade zu einem relativ frühen Zeitpunkt unterbrechen, nämlich bevor es zur mitochondrialen Dysfunktion und zur Bildung von freien Radikalen kommt (Mattson and Furukawa, 1997). Weitere NFκB-regulierte Zielgene, die anti-apoptotische Wirksamkeit im zentralen Nervensystem besitzen, sind die Proteinfamilie der Inhibitoren der Apoptose oder IAPs (Chu et al., 1997), das Kalzium-bindende Protein Calbindin D28K (Mattson et al., 1995), Bcl-2 (Tamatani et al., 1999), Bcl-xl (Bhakar et al., 2002) und der Transforming Growth Factor Beta, kurz TNFgenannt (Zhu et al., 2004).

Allerdings gibt es auch Evidenz dafür, dass NFκB in unterschiedlichen *in vitro* Modellen neuronaler Schädigung die Expression apoptotischer Gene induziert und somit Zelltod initiieren kann. So konnte gezeigt werden, dass NFκB in Neuronen möglicherweise die Expression des proapoptotischen c-Myc reguliert (Nakai et al., 2000).

#### **4.4.3. NFκB-Aktivität nach akuter neuronaler Schädigung**

NFκB-Aktivierung scheint wichtige, zum Teil gegensätzliche, Funktionen in der Pathologie unterschiedlicher akuter und chronischer, neurodegenerativer Erkrankungen zu spielen, was NFκB zum „Janus-gesichtigen“ Transkriptionsfaktor macht (Lipton, 1997). Eine Vielzahl unterschiedlicher Studien zur neuronaler Schädigung postulieren sowohl neuroprotektive als auch neurodegenerative Funktionen von NFκB. Dies führt, seit der Identifikation des Transkriptionsfaktors im ZNS, immer wieder zu Kontroversen und ungelösten Fragen, die in grossen Übersichtsarbeiten thematisiert werden (Pizzi and Spano, 2006; Memet, 2006; Mattson and Meffert, 2006; Denk et al., 2000; O'Neill and Kaltschmidt, 1997; Lipton, 1997; Grilli and Memo, 1999). In der Folge sollen alle wichtigen Arbeiten vorgestellt werden, die NFκB-Aktivierung in, für die Pathologie des Schädel-Hirn Traumas relevanten, murinen Modellen des akuten ZNS-Insults untersuchen.

Yang und Mitarbeiter konnten 1995 zeigen, dass es nach experimentellem Schädel-Hirn Trauma der Ratte im perikontusionellen Hirngewebe zur Erhöhung der NFκB-DNA-Bindungsaktivität kommt. Diese ist im Zeitraum von 24 Stunden bis zu sieben Tage nach Trauma nachweisbar (Yang et al., 1995). Nonaka et al untersuchten 1999 die Lokalisation von aktiviertem NFκB im Gehirn von Ratten nach Controlled Cortical Impact im Zeitverlauf. Es zeigte sich, dass aktiviertes NFκB nach Schädel-Hirn Trauma sehr früh (eine Stunde nach Trauma) in Axonen des perikontusionellen Hirngewebes nachweisbar ist. Nach 24 Stunden konnte gesteigerte NFκB-Aktivität vor allem im Kern von Neuronen detektiert werden und war hier bis zu einer Woche nach Trauma nachweisbar. Aktiviertes NFκB konnte 24 Stunden nach Trauma zudem im Nukleus von Mikroglia und Makrophagen nachgewiesen werden. Die Aktivierung von NFκB ließ sich bis zu einem Jahr nach Verletzung des Hirngewebes in Astrozyten der periventriculären Hirnregionen nachweisen. Diese zeigten im Rahmen einer steten Vergrößerung der Ventrikel Zeichen einer

ausgeprägten Hirnatrophie. Dies wurde als prolongierter, möglicherweise NFκB-vermittelter, entzündlicher Prozess gedeutet (Nonaka et al., 1999).

Bethea et al zeigten 1998, dass es im Zeitraum von 30 Minuten bis 72 Stunden nach traumatischer Kontusion des Rückenmarks der Ratte zum Anstieg von aktiviertem NFκB in Neuronen, Makrophagen und Endothelzellen, nicht aber in Astrozyten kommt. Im Zeitraum der ersten 90 Minuten nach Trauma war die gesteigerte NFκB-Aktivierung vor allem direkt im Läsionsepizentrum, bzw. rostral und kaudal davon, nachweisbar. Zu späteren Zeitpunkten ließ sich die Aktivierung vor allem in infiltrierenden Makrophagen detektieren. In einigen Neuronen und Makrophagen konnte eine Kolokalisation von aktiviertem NFκB und dem Entzündungsmediator iNOS nachgewiesen werden, weshalb NFκB mit inflammatorischen Prozessen in Verbindung gebracht wurde (Bethea et al., 1998).

Sullivan et al konnten 1999 zeigen, dass transgene Mäuse ohne TNF-Rezeptoren, nach Schädel-Hirn Trauma einen weitaus stärkeren Untergang kortikaler Neurone und eine stärker ausgeprägte Störung der Blut-Hirnschranke aufwiesen als Kontrolltiere. Dies ging einher mit einer ausgeprägten Reduktion von aktiviertem NFκB. Diese Befunde legen nahe, dass NFκB adaptive neuroprotektive Funktion besitzt (Sullivan et al., 1999).

Sanz et al untersuchten 2002 das Gehirn von neun Tage alten Ratten nach Schädel-Hirn Trauma auf NFκB-Aktivierung. Sie beobachteten eine, innerhalb von 90 Minuten auftretende, Expressionssteigerung von aktiviertem NFκB, die nach 24 Stunden einen Höhepunkt erreichte. NFκB-Aktivierung fand sich dabei vornehmlich in Neuronen des degenerierenden Kortex und, in geringerem Ausmaß, auch in Astrozyten des benachbarten Corpus Callosum (Sanz et al., 2002). Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es bisher nur wenige Arbeiten gibt, die die NFκB-Aktivierung nach Trauma untersuchten. In Übereinstimmung mit den, in dieser Arbeit erhobenen Befunden, konnte in diesen Arbeiten eine relativ früh einsetzende NFκB-Aktivierung nach Trauma nachgewiesen werden. Über die Rolle von NFκB in der Pathophysiologie des Schädel-Hirn Traumas konnten nur indirekte Aussagen getroffen werden. So bleibt die Frage ungeklärt, welche Funktion die beobachtete NFκB-Aktivierung besitzt. Trägt sie ursächlich zum Absterben von Neuronen bei oder handelt es sich hierbei um eine Reaktion auf zellulären Stress, die im Sinne einer endogenen Neuroprotektion, zum Überleben von sublethal geschädigten Neurone beiträgt? Im Rahmen der zerebralen Ischämie gibt es zahlreiche Untersuchungen zur NFκB-Aktivierung und möglichen, NFκB-vermittelten, Effekten auf neuronalen Zelluntergang bzw. neuronales Zellüberleben.

Erste Hinweise auf eine wichtige Rolle von NFκB in der Pathologie des neuronalen Untergangs nach akuter ischämischer Schädigung des Gehirns ergaben sich aus Beobachtungen, die zeigten, dass aktiviertes NFκB in murinen Neuronen im Bereich der ischämischen Schädigung in einem *in vivo* Modell der transienten fokalen Ischämie, in kortikalen, hippocampalen und striatalen

Neuronen stark erhöht ist (Salminen et al., 1995). Clemens et al beobachteten, dass aktiviertes NFκB nach transienter globaler Ischämie der Ratte in degenerierenden Neuronen stark erhöht ist. In nicht-degenerierenden Neuronen ist hingegen kein Anstieg der NFκB-Aktivität nachweisbar (Clemens et al., 1997).

Erste Hinweise auf eine mögliche deletäre Rolle von NFκB im Rahmen des neuronalen Untergangs wurden durch Schneider et al 1999 in einem Mausmodell der temporären fokalen Ischämie durch transienten Verschluss der A. cerebri media erhoben. Im Bereich der ischämischen Hemisphäre konnten eine erhöhte nukleäre Translokation von NFκB, eine erhöhte NFκB-DNA-Bindungsaktivität sowie ein starker Anstieg der NFκB-Transkriptionsaktivität in NFκB-p50 Reportertieren nachgewiesen werden. Dies sind transgene Mäuse die die Transkriptionsaktivität von NFκB-Homo- und Heterodimeren anzeigen, die die Untereinheit p50 enthalten. Transgene Mäuse, die homozygot defizient für die p50-Untereinheit von NFκB sind, zeigten signifikant kleinere Infarkt volumina als p50 +/+ Kontrolltiere (Schneider et al., 1999).

Nurmi et al kamen 2004 zu ähnlichen Ergebnissen: P50 -/- Knockout Mäuse wiesen im Modell der permanenten fokalen Ischämie durch Verschluss der A. cerebri media signifikant kleinere Infarkt volumina auf als p50 +/+ Kontrolltiere (Nurmi et al., 2004).

Demgegenüber stehen Ergebnisse aus Studien von Yu et al aus dem Jahr 1999. Hier konnte gezeigt werden, dass p50 -/- defiziente Mäuse nach exzitotoxischem Stress signifikant mehr hippocampalen Neuronenuntergang aufweisen als p50 +/+ Mäuse (Yu et al., 1999).

Duckworth et al konnte 2006 in einem Modell der transienten fokalen Ischämie der Maus zeigen, dass p50 -/- Knockout-Mäuse wesentlich stärker ausgeprägte Zeichen der Neurodegeneration in Hippocampus und Striatum, sowie eine signifikant höhere postoperative Mortalität aufweisen als respektive Kontrolltiere. Weiterhin zeigte sich, dass es vor allem in den Gebieten zu neuronalem Untergang kam, die kaum NFκB-Aktivität zeigten, wohingegen Neurone ohne Zeichen von Neurodegeneration ausgeprägte NFκB-Aktivität aufwiesen (Duckworth et al., 2006).

Insgesamt ist die Interpretation von Studien unter Einsatz von p50-defizienten Mäusen sehr komplex, da sich gezeigt hat, dass p50 in Abhängigkeit vom Dimerisationspartner (p65, b-Rel, oder c-Rel), und vom Promotor sowohl als Transkriptionsrepressor als auch als Transkriptionsaktivator fungieren kann (Kurland et al., 2001). Des Weiteren führt das Fehlen von p50 in allen Körperzellen zu Defekten in der Immunantwort (Sha et al., 1995) und könnte auch andere systemische Effekte aufweisen, wie zum Beispiel veränderte proinflammatorische Zytokinlevel nach zerebraler Ischämie.

Culmsee et al konnten 2003 anhand von NFκB-Luciferase Reporter-mäusen zeigen, dass die NFκB-Transkriptionsaktivität nach permanenter fokaler Ischämie durch Koagulation der A. cerebri media im Bereich der ischämischen Hemisphäre zur ausgeprägten Reduktion der NFκB-Transkriptionsaktivität führt. In der kontralateralen Hemisphäre hingegen, konnte eine prolongierte Transkriptionssteigerung beobachtet werden (Culmsee et al., 2003).



Zhang et al gelang es, NFκB spezifisch in Astrozyten bzw. in Neuronen zu inhibieren. Die Arbeitsgruppe generierte durch genetische Modifikation transgene Mäuse, bei denen ein NFκB-Super-Repressor (IκBα) unter Kontrolle von Neuronen-spezifischen (NSE, Neuronenspezifische Enolase) oder Glia-spezifischen (GFAP, Glial Fibrillary Acidic Protein) Promotoren eingeführt wurde. Es zeigte sich, dass der Verlust von NFκB in Neuronen, nicht aber in Astrozyten, zu kleineren Infarkten nach permanenter fokaler Ischämie durch Koagulation der A. cerebri media führte (Zhang et al., 2005a).

Die Einführung desselben Superrepressors in prosencephale Neurone führte hingegen zur gesteigerten exzitotoxischem Zelluntergang in organotypischen Sliceulturen (Fridmacher et al., 2003).

Inta et al konnten 2006 zeigen, dass transgene Mäuse mit einem konditionellen p65-Knockout signifikant kleinere Infarkt volumina nach permanenter fokaler Ischämie durch Ligatur der A. cerebri media aufwiesen als Kontrolltiere. Hierbei zeigte sich, dass p65 möglicherweise die Transkription der Apoptose-induzierenden Proteine Bim und Noxa stimuliert (Inta et al., 2006).

Der Einsatz von Substanzen, die eine unspezifische Inhibierung der NFκB-Aktivierung nach Schädigungen des Gehirns bewirken, konnte die Rolle von NFκB, im Rahmen des Zelluntergangs nach akuten Insulten des ZNS, nicht eindeutig klären. Die Applikation der Anti-Oxidantien PDTC (Nurmi et al., 2004), LY341122 (Stephenson et al., 2000) oder Dexacannabinol (Juttler et al., 2004) führte zu signifikant kleineren Infarkt volumina nach permanenter bzw. nach transienter fokaler Ischämie im Mausmodell. Eine gleichzeitig auftretende Reduktion von neuronalem, aktiviertem NFκB wurde mit den neuroprotektiven Effekten in Verbindung gebracht. Allerdings ist der genaue Wirkmechanismus der eingesetzten Substanzen nicht abschließend geklärt. Eine kausale Rolle von NFκB für die beobachtete Neuroprotektion konnte nicht bewiesen werden.

Aktivierung von NFκB besitzt eine Schlüsselbedeutung bei der sogenannten ischämischen Präkonditionierung. Dieser Ausdruck bezeichnet die wiederholte Exposition von Neuronen mit kurzen, ischämischen, sublethalen Schäden, die zur Ausbildung einer erhöhten Toleranz gegenüber nachfolgenden schweren, ischämischen Schädigungen führt. Ischämische Präkonditionierung induziert eine rapide Induktion von NFκB, die bei nachfolgender schwerer Ischämie neuroprotektiv wirkt (Blondeau et al., 2001; Marini et al., 2007).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Untersuchung der NFκB-Aktivität nach zerebraler Ischämie widersprüchliche Ergebnisse liefert. NFκB-vermittelte Prozesse scheinen in unterschiedlichen Tiermodellen und sowohl zum Zellüberleben als auch zum Zelluntergang beitragen.

Eingedenk der komplexen Befunde, die die Untersuchung von NFκB nach akuten Insulten des Gehirns ergeben, lassen sich doch einige wichtige Gemeinsamkeiten erheben. Es scheint nach akuten Insulten des zentralen Nervensystems wie Ischämie oder Trauma, zur raschen Aktivierung von NFκB zu kommen. Auch in der vorliegenden Arbeit steigt die NFκB-DNA-Bindungsaktivität

innerhalb von 24 Stunden an. Es konnte gezeigt werden, dass es von essentieller Bedeutung ist, nicht nur die NFκB-DNA-Bindungsaktivität zu untersuchen, sondern auch die reelle Transkriptionsaktivität zu bestimmen. Wie gezeigt, korrelieren diese nicht notwendigerweise. In der vorliegenden Arbeit steigt die DNA-Bindungsaktivität im Bereich des kontusionierten Hirngewebes innerhalb von 24 Stunden an, die Transkriptionsaktivität hingegen fällt im selben Zeitraum stark ab. Offensichtlich kann es also zur Aktivierung von NFκB kommen, ohne dass dabei eine Steigerung der Transkriptionsaktivität vorliegt. Diese Befunde stehen in Einklang mit *in vitro* und *in vivo* Studien von Culmsee und Mitarbeitern. Diese Studien konnten zeigen, dass im Rahmen der neuronalen Antwort auf unterschiedliche Stressoren trotz deutlicher NFκB-Aktivierung, eine Repression der NFκB-Transkriptionsaktivität vorliegt. Hierzu wurden Neurone *in vitro* apoptotischen Stimuli ausgesetzt. Apoptose wurde dabei durch Glutamat-Applikation, durch DNA-Schädigung mit Camptothecin, durch Beta-Amyloid-Applikation und durch Sauerstoff- und Glukose-Entzug induziert. *In vivo* konnte nach permanenter fokaler Ischämie eine gesteigerte NFκB-DNA-Bindungsaktivität bei stark verminderter NFκB-Transkriptionsaktivität beobachtet werden (Culmsee et al., 2001; Culmsee et al., 2003). Diese Arbeiten werden unter Absatz 4.4.4 nochmal detailliert aufgeschlüsselt.

Die funktionelle Einordnung der NFκB-Aktivität nach akuten Insulten des Gehirns wird möglicherweise dadurch erschwert, dass einzelne NFκB-Hetero- und Homodimeren individuelle Funktionen besitzen. Es gibt Hinweise darauf, dass bestimmte NFκB-Dimerkombinationen die Transkription unterschiedlicher Zielgene verursachen, was in unterschiedlichen biologischen Funktionen resultieren kann. Diese differentiellen Effekte sind bis dato nicht eindeutig untersucht, und müssen in weiteren Studien charakterisiert werden (Hoffmann et al., 2003; Gerondakis et al., 1999; Memet, 2006; Pizzi and Spano, 2006; Kaltschmidt et al., 2005).

Durch den in dieser Arbeit verwandten ELISA werden mit einem, gegen p65 gerichteten Antikörper, p65-haltige NFκB Homo- und Heterodimere erkannt. Das für die Bestimmung der Transkriptionsaktivität verwandte NFκB-Luc Transgen enthält das Firefly-Luciferase Gen unter der Kontrolle von 2 DNA-NFκB Bindungsstellen, die die Homo- und Heterodimerkombinationen p65/p50, p50/cRel, p65/p65, p50/p50 und p65/c-Rel binden (Voll et al., 2000; Millet et al., 2000). Somit kann durch die in dieser Arbeit verwandte Methodik keine Aussage zur möglichen Partialfunktion einzelner NFκB-Dimerkombination getroffen werden.

Kontroverse Untersuchungsergebnisse zur Funktion von NFκB in der Pathologie unterschiedlicher Schädigungsmodelle im ZNS, resultieren sicherlich aus der Tatsache, dass das zelluläre Milieu des ZNS sehr komplex ist. Es ist bekannt, dass NFκB in Astrozyten und Mikroglia die Produktion von proinflammatorischen Mediatoren und Zytokinen induziert. Dazu gehören zum Beispiel neurotoxisch wirkende Zytokine wie Interleukin-1β, FAS-Ligand, induzierbare Nitrit-Oxidase und Matrix-Metalloproteinase 9 (Mattson, 2005). Die vorliegende Arbeit kann nicht zwischen

astrozytärem und neuronalem NFκB diskriminieren, dafür aber den „Netto-Effekt“ der NFκB Aktivität in der Pathophysiologie nach Schädel-Hirn Trauma evaluieren.

Weiterhin belegen Studien, dass der Apoptose-auslösende Stimulus entscheidend ist, ob NFκB pro- bzw. anti-apoptotische Funktion ausübt (Kaltschmidt et al., 2002). In der Pathophysiologie des Schädel-Hirn Traumas liegen eine Vielzahl nicht separierbarer, potentiell Apoptose-auslösender Stimuli vor, die die Aktivierung von NFκB bewirken können. Der Effekt der NFκB-Aktivierung kann somit unmöglich durch *in vitro* Daten erwogen oder vorhergesagt werden. Um klinisch relevante Aussagen treffen zu können, ist es unabdingbar, die Rolle von NFκB anhand eines möglichst kliniknahen *in vivo* Modell wie Controlled Cortical Impact zu untersuchen.

#### **4.4.4. P53–abhängige Inhibition der NFκB Transkriptionsaktivität**

In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, dass es nach Schädel-Hirn Trauma zur Akkumulation von p53 sowie zur ausgeprägten Minderung der NFκB-Transkriptionsaktivität im Bereich der Kontusion kommt. Die Applikation des spezifischen p53-Inhibitors Pifithrin kann die posttraumatische Minderung der NFκB-Transkriptionsaktivität aufheben. Dies führt zu signifikant kleineren Kontusionsvolumina nach Schädel-Hirn Trauma.

Culmsee und Mitarbeiter konnten im Mausmodell der permanenten fokalen Ischämie durch einseitige Ligatur der A. cerebri media ähnliche Befunde erheben. Innerhalb von sechs Stunden nach Ischämie kommt es in der ipsilateral zum Infarkt gelegenen Hemisphäre zum Abfall der NFκB-Transkriptionsaktivität auf bis zu 20% der Ausgangswerte. Die Applikation von Pifithrin kann die NFκB-Transkriptionsaktivität in diesem Bereich signifikant steigern. Gleichzeitig liegt eine Reduktion des Infarktvolumens um bis zu 50% vor (Culmsee et al., 2003).

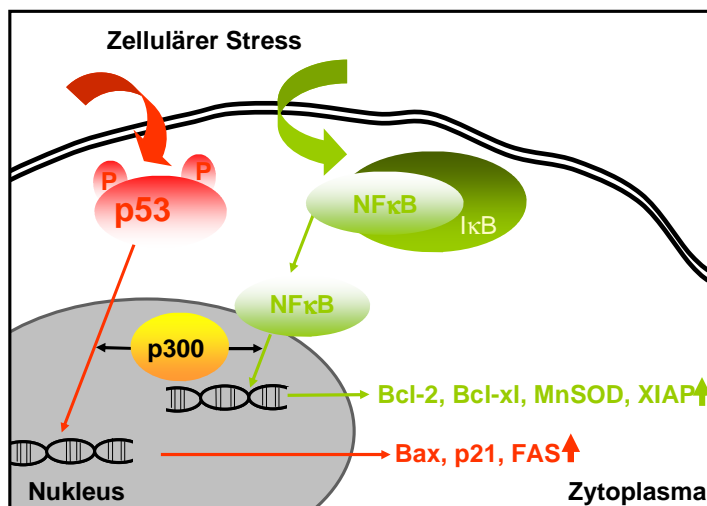
*In vitro* Studien dieser Arbeitsgruppe belegen weiterhin, dass die NFκB-Transkriptionsaktivität auch in anderen Modellen neuronaler Schädigung (Glutamatapplikation, Applikation DNA-schädigender Substanzen, Sauerstoff- und Glukoseentzug) deutlich vermindert ist. Die Applikation von Pifithrin kann die NFκB-Aktivität wiederherstellen und den apoptotischen Zelluntergang deutlich vermindern. NFκB spielt hierbei für das Zellüberleben eine kausale Rolle. Die Applikation von spezifischen NFκB-Inhibitoren wie NFκB-decoy Nukleotiden oder unspezifischem NFκB-Inhibitoren wie PDTC, schwächen die neuroprotektive Wirkung von Pifithrin signifikant ab (Culmsee et al., 2001; Culmsee et al., 2003).

Inhibitorische Effekte von p53 auf NFκB sind bekannt. Anhand von Untersuchungen an unterschiedlichen Tumorzelllinien konnte belegt werden, dass die transkriptionellen Kofaktoren p300 und CBP (cAMP-responsive-element Binding Protein) als Integratoren der Transkriptionsaktivität von p53 und p65-haltigen NFκB-Dimeren fungieren. Nach apoptotischen

Stimuli konkurrieren p53 und NFκB um die Bindung an p300 bzw. CBP. Die Bindung an diese Kofaktoren ist essentiell für die Fähigkeit zur Transkriptionssteigerung der Zielgene (Wadgaonkar et al., 1999; Ikeda et al., 2000; Wadgaonkar et al., 1999; Webster and Perkins, 1999).

Culmsee und Mitarbeiter konnten erstmals zeigen, dass der Mechanismus der reziproken Inhibition von p53 und NFκB wichtige Bedeutung für den Zelluntergang nach akuter neuronaler Schädigung besitzt.

Nach der Applikation der DNA-schädigenden Substanz Camptothecin zeigen hippocampale Neurone eine gesteigerte Bindung von p53 an den transkriptionellen Kofaktor p300. Gleichzeitig liegt eine starke Reduktion der Bindung von p300 an NFκB vor, was mit einer deutlich erniedrigten NFκB-Transkriptionsaktivität und ausgeprägtem neuronalem Zelluntergang einhergeht. Die Applikation von Pifithrin führte in diesem Schädigungsmodell zur verminderten Bindung von p53 an p300. Die Bindung von NFκB an p300 hingegen erhöhte sich signifikant. Dies führte zur deutlichen Steigerung der NFκB Transkriptionsaktivität sowie zur signifikanten Neuroprotektion (Culmsee et al., 2001).



**Abbildung 27: Schematische Darstellung der reziproken Inhibition von p53 und NFκB durch kompetitive Bindung an den transkriptionellen Kofaktor p300 in Neuronen**

Die Abbildung zeigt die schematische Darstellung eines Neurons mit einem Ausschnitt des Zytoplasmas und des Zellkerns. Unter Exposition von zellulärem Stress, kann es in Neuronen sowohl zur Aktivierung von p53 als auch von NFκB kommen. Nach Bindung an den transkriptionellen Kofaktor p300 kann p53 die Transkription von proapoptischen Molekülen wie zum Beispiel Bax, p21 oder FAS initiieren. NFκB kann nach Bindung an p300 die Transkription anti-apoptischer Moleküle wie zum Beispiel Bcl-2, Bcl-xl, MnSOD und XIAP auslösen. Die kompetitive Bindung an den gemeinsamen Kofaktor bietet ein Erklärungsmodell für die reziproke Inhibition von p53 und NFκB.

Die Konkurrenz um den gemeinsamen Transkriptionskofaktor p300 würde auch die p53-abhängige Inhibition der NFκB-Transkriptionsaktivität nach Controlled Cortical Impact erklären und müsste in weiterführenden Experimenten belegt werden.

## 4.5. Weiterführende Untersuchungen

In weiteren Versuchen, die auf den Ergebnissen der vorgestellten Arbeit aufbauen, konnte die Rolle von p53 und NFκB in der Pathophysiologie des Schädel-Hirn Traumas weiter aufgeschlüsselt werden. Im Wesentlichen wurden in Folgeexperimenten zum Schädel-Hirn Trauma die folgenden Fragen beantwortet:

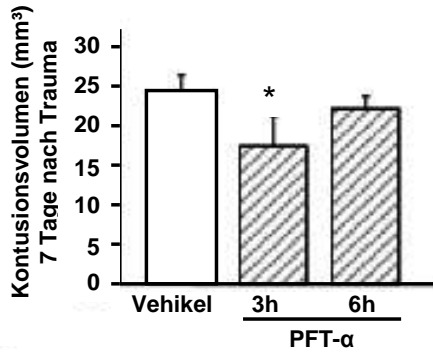
-Besitzt die Inhibition von p53 langfristige Effekte auf das posttraumatische Kontusionsvolumen und auf das neurologische Outcome nach Controlled Cortical Impact?

-Welche Zielgene werden durch p53 und NFκB nach Controlled Cortical Impact reguliert?

Die Versuche wurden in den Laboren von Prof. Dr. Nikolaus Plesnila und PD. Dr. Carsten Culmsee unter der Mitarbeit von Doortje Engel, Frank Hoffmann und Stefan Landshammer durchgeführt. Sie wurden zusammen mit den, in dieser Arbeit vorgestellten Befunden, im April 2007 unter dem Titel: „Delayed neuronal death after brain trauma involves p53-dependent inhibition of NF-kappaB transcriptional activity“ in der Fachzeitschrift „Cell Death and Differentiation“ veröffentlicht.

Die Messung der Kontusionsvolumina 24 Stunden nach Trauma kann nicht ausschließen, dass die Pifithrin-Applikation apoptotische Vorgänge nur verlangsamt. Deswegen wurde in weiteren Versuchen evaluiert, ob die initial beobachtete Protektion des Hirngewebes auch längerfristig nachweisbar ist, und ob diese zur Verbesserung motorischer und kognitiver Funktionen der Versuchstiere führt.

Die Auswirkung der Pifithrin-Behandlung (Applikation von 8 mg pro kg Körpergewicht drei und sechs Stunden nach Trauma) auf das Kontusionsvolumen wurde deshalb an Tag 7 nach Controlled Cortical Impact untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 28 dargestellt.

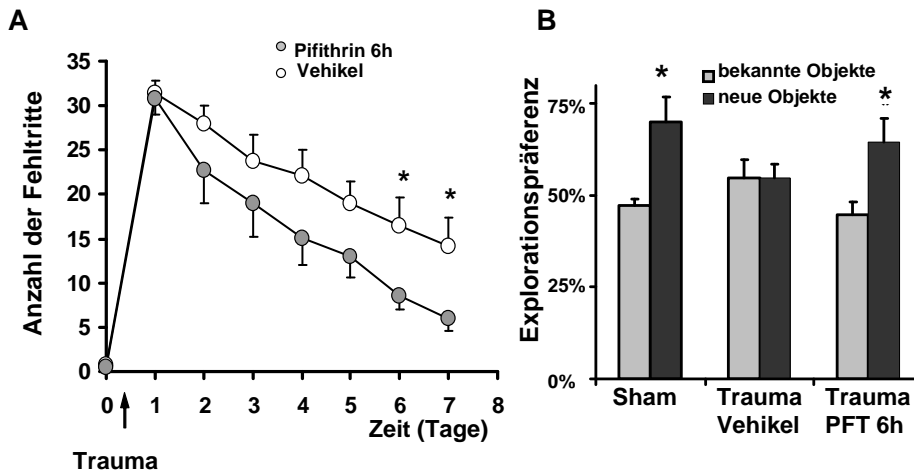


**Abbildung 28: Kontusionsvolumina nach Applikation von Pifithrin an Tag 7 nach Controlled Cortical Impact (modifiziert nach Plesnila et al, 2007)**

Die intraperitoneale Applikation von Pifithrin (8 mg/kg Körpergewicht) 3 Stunden nach Trauma führte zur signifikanten Reduktion des Kontusionsvolumens an Tag 7 nach Controlled Cortical Impact (n=7, MW +/- Stabw., \* p < 0,05 vs. Vehikel, Anova on ranks, Student-Newman Keuls).

Es ist ersichtlich, dass die Applikation von Pifithrin drei Stunden nach Trauma zu signifikant kleineren Kontusionsvolumina führt. Die Applikation von Pifithrin sechs Stunden nach Trauma besitzt keine signifikanten Auswirkungen auf das Kontusionsvolumen mehr.

Der Effekt der Behandlung mit Pifithrin (Applikation 6 Stunden nach Trauma) auf das neurologische Outcome wurde in zwei Testbatterien untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 29 dargestellt.



**Abbildung 29: Auswirkung der Pifithrin-Applikation (8 mg/kg Körpergewicht, Applikation 6 Stunden nach Schädel-Hirn Trauma) auf A) motorische Leistungen und B) kognitive Leistungen nach Schädel-Hirn Trauma (modifiziert nach Plesnila et al., 2007)**

**A:** Die Pifithrin-Behandlung 6 Stunden nach Trauma führte zur Verbesserung der motorischen Leistung (weniger Fehltritte) im Beam Walk Test. Die Verbesserung ist an Tag 6 und 7 nach Trauma signifikant im Vergleich zu Vehikel-behandelten Kontrolltieren (n=10, Mittelwert +/- Standardabweichung, p < 0,05, Anova on ranks, Student Newman Keuls).

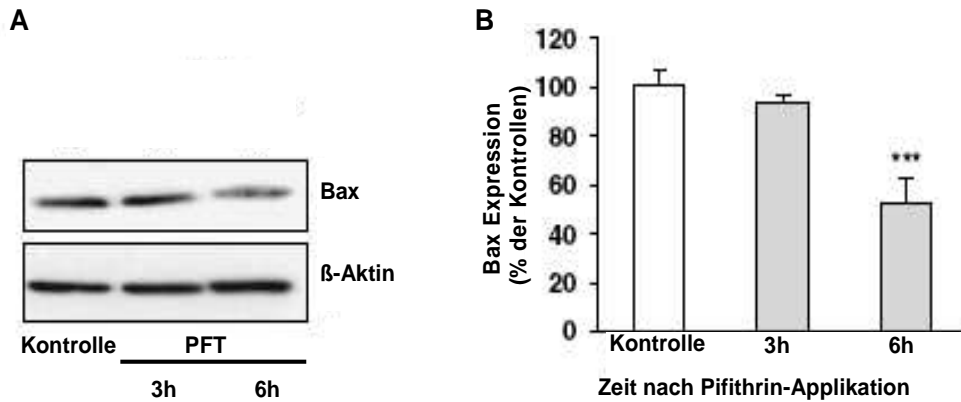
**B:** In der Testbatterie zur Objektwiederkennung führte die Pifithrin-Applikation 6 Stunden nach Trauma zur verbesserten Explorations-Präferenz bei der Präsentation unbekannter Objekte (n=7-10, MW +/- SEM, p < 0,05 vs. Vehikel-behandelte Tiere, 7 Tage nach Trauma).

Die Versuchstiere wurden hinsichtlich ihrer motorischen Leistung im Beam Walk Test beurteilt. In diesem Test wird die Motorik der Hinterpfoten untersucht. Die Mäuse müssen dazu einen 8 mm starken, 1 Meter langen Holzstab überqueren, der zwischen einer Startplattform und ihrem Käfig befestigt ist. Beim Überschreiten des Balkens wurden die Fehlritte gezählt. Abbildung 29 A zeigt, dass Versuchstiere, die Pifithrin in einer Dosierung von 8 mg/kg Körpergewicht sechs Stunden nach Trauma erhielten, sechs und sieben Tage nach Trauma signifikant weniger Fehlritte begehen als Vehikel-behandelte Kontrolltiere.

Ausserdem wurden, in der standartisierten Testbatterie zur Objekt-Wiedererkennung, die kognitiven Fähigkeiten von Versuchstieren nach Trauma überprüft. Dieser Test evaluiert das Kurzzeitgedächtnis, welches bei Patienten nach Schädel-Hirn Trauma häufig eingeschränkt ist. Wie aus Abbildung 29 B hervorgeht, zeigen Versuchstiere, die eine einzelne Pifithrin-Applikation sechs Stunden nach Trauma erhalten hatten, an Tag sieben nach Trauma eine signifikant bessere Leistung als Vehikel-behandelte Kontrollen. Diese Daten untermauern die Tatsache, dass selbst eine einzelne Pifithrin-Applikation zu persistierenden zerebroprotektiven Effekten und funktioneller Erholung nach experimentellem Schädel-Hirn Trauma führt.

In weiteren Versuchen wurde untersucht, welche Zielgene nach Schädel-Hirn Trauma durch p53 und NFκB reguliert werden und ob sich deren Expression unter Pifithrin-Applikation verändert.

Nach Schädel-Hirn Trauma konnte sowohl im murinen als auch im humanen perikontusionellen Hirngewebe die Akkumulation des proapoptotischen Proteins Bax beobachtet werden (Lu et al., 2000; Ng et al., 2000; Nathoo et al., 2004). Um zu überprüfen, ob nach Trauma eine p53-abhängige Expressionssteigerung von Bax vorliegt, wurde zunächst die Bax-Expression nach Controlled Cortical Impact anhand von Western Blotanalysen untersucht. Diese zeigten eine deutliche Expressionssteigerung von Bax innerhalb von 24 Stunden nach Trauma (Daten nicht gezeigt). In weiteren Experimenten wurde dann evaluiert, ob die beobachtete Expressionssteigerung durch p53-Inhibition modifiziert werden kann. Diese Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abbildung 30 dargestellt. Abbildung 30 A zeigt einen repräsentativen Western Blot der Bax-Expression von, mit Vehikel bzw. mit Pifithrin behandelten Versuchstieren. Die Hirnlysate stammen aus dem Hirnquadranten, welcher Kontusion und perikontusionelles Gewebe enthält. Pifithrin wurde in einer Dosierung von 8 mg pro kg Körpergewicht 15 Minuten nach Trauma appliziert. Es ist ersichtlich, dass es innerhalb von sechs Stunden nach Pifithrin-Applikation zur deutlichen Reduktion der Bax-Expression kommt. Die densitometrische Quantifizierung der Western Blotanalysen ist in Abbildung 30 B dargestellt. Es zeigt sich, dass die Bax-Expression sechs Stunden nach Pifithrin-Applikation signifikant niedriger ist als bei Kontrolltieren.



**Abbildung 30: Reduziert Bax-Expression unter p53-Inhibitor nach Schädel-Hirn Trauma (modifiziert nach Plesnila et al., 2007)**

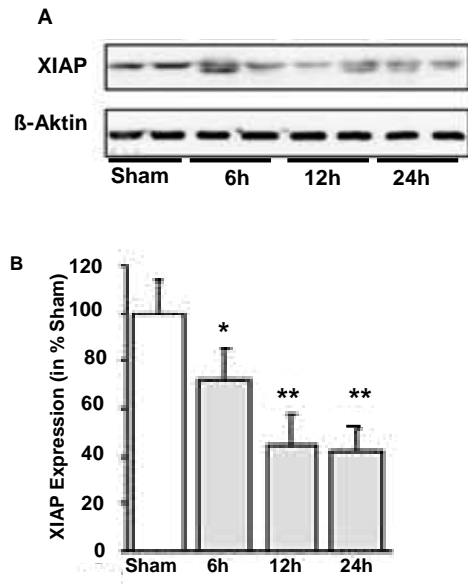
**A)** Repräsentative Western Blot-Analyse von Hirngewebe aus dem Bereich der Kontusion und des perikontusionellen Hirngewebes mit zugehöriger Ladungskontrolle ( $\beta$ -aktin). Mit Pifithrin behandelte Tiere zeigen innerhalb von 6 Stunden nach Pifithrin-Applikation (8 mg/kg Körpergewicht) eine deutliche Reduktion der Bax Expression.

**B)** Die Densitometrische Analyse der Western Blot Untersuchungen zeigt, dass der Abfall der Bax-Konzentration 6 Stunden nach Pifithrin-Applikation gegenüber Vehikelbehandelten Kontrolltieren signifikant ist (MW  $\pm$  Stabw., je n=4, Anova, Duncan's).

Wie unter 4.3.3 beschrieben, kann NF $\kappa$ B neuroprotektive Effekte durch die Transkription anti-apoptotischer Zielgene wie zum Beispiel Bcl-2 und Bcl-xl, Calbindin, MnSOD oder durch die Proteinfamilie der IAPs vermitteln. Unter diesen potentiellen Zielgenen ist XIAP (X-Chromosome linked Inhibitor of Apoptosis Protein) von besonderem Interesse, weil mehrere Studien zeigen, dass XIAP eine wichtige Rolle für das neuronale Überleben nach zerebraler Ischämie (Guegan et al., 2006; Siegelin et al., 2005) und neonataler Hypoxie (Wang et al., 2004) spielt.

Um zu ermitteln, ob sich die XIAP-Expression nach Controlled Cortical Impact verändert, wurden Western Blotanalysen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 31 dargestellt. Abbildung 31 A zeigt einen repräsentativen Western Blot der XIAP-Expression nach Schädel-Hirn Trauma. Die untersuchten Hirnlysate stammen aus dem Hirnquadranten, welcher Kontusion und perikontusionelles Gewebe enthält. Die obere Bande zeigt die XIAP-Expression, die untere Bande zeigt als Ladungskontrolle die Expression von  $\beta$ -Actin. Es zeigt sich, dass es sechs, zwölf und 24 Stunden nach Trauma zum Abfall der XIAP-Expression kommt. Die densitometrische Quantifizierung der Western Blots ist in Abbildung 31 B dargestellt. Es ist ersichtlich dass der Abfall der XIAP-Expression sechs, zwölf und 24 Stunden nach Trauma signifikant gegenüber den Sham-Kontrollen ist. Die Tatsache, dass die XIAP-Expression zeitgleich mit der NF $\kappa$ B-Transkriptionsaktivität abnimmt, legt nahe, dass die Transkription von XIAP möglicherweise durch NF $\kappa$ B reguliert wird.



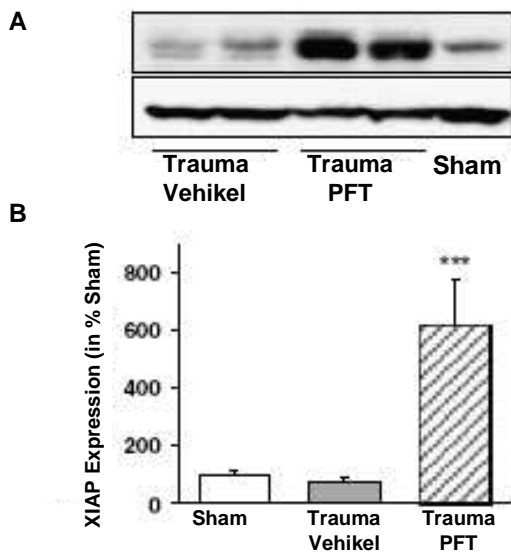


**Abbildung 31: Western Blotanalyse der XIAP Expression nach Controlled Cortical Impact (modifiziert nach Plesnila et al., 2007)**

Western Blot zur XIAP Expression nach Trauma mit zugehöriger Ladungskontrolle β-actin von je 2 Versuchstieren pro Zeitpunkt.

Abbildung 31B zeigt die densitometrische Quantifizierung der Western Blotanalysen (je=4 Versuchstiere pro Zeitpunkt). 6, 12 und 24 Stunden nach Trauma kommt es, im Vergleich zu Sham-operierten Kontrolltieren, zur signifikanten Reduktion der XIAP Expression (MW +/- Stabw. Anova, Duncan's, \*p < 0,05, \*\*p < 0,01)

In weiteren Versuchen wurde evaluiert, ob sich durch eine Steigerung der posttraumatischen NFκB-Transkriptionsaktivität, wie sie unter p53-Inhibition zu beobachten ist, auch die posttraumatischen XIAP-Level verändern. Die Ergebnisse sind in Abbildung 32 dargestellt. Abbildung 32 A zeigt einen repräsentativen Western Blot der XIAP-Expression sechs Stunden nach Schädel-Hirn Trauma mit und ohne p53-Inhibition sowie von Sham-operierten Kontrolltieren (je n=2 Versuchstiere pro Gruppe). Die untersuchten Hirnlysate stammen aus dem Hirnquadranten, welcher Kontusion und perikontusionelles Gewebe enthält. Die obere Bande zeigt die XIAP-Expression, die untere Bande zeigt als Ladungskontrolle die Expression von β-Actin. Es zeigt sich, dass die Applikation von Pifithrin (8 mg pro kg Körpergewicht, Applikation 15 Minuten nach Trauma) zur gesteigerten XIAP-Expression nach Trauma führt. Abbildung 32 B zeigt die densitometrische Quantifizierung der Western Blots. Es ist ersichtlich, dass der Anstieg der XIAP-Expression nach Pifithrin-Applikation signifikant gegenüber Vehikel-behandelten Kontrolltieren ist.



**Abbildung 32: XIAP Expression nach Trauma und Pifithrin-Applikation (modifiziert nach Plesnila et al., 2007)**

Abbildung 33 A zeigt einen repräsentativen Western Blot der XIAP-Expression 6 Stunden nach Trauma. Die Expression wurde zum einen nach Trauma und Pifithrin-Applikation (8 mg/kg Körpergewicht, Applikation 15 Minuten nach Trauma, n=2), nach Trauma und Vehikel-Applikation (n=2) sowie bei Sham-operierten Kontrolltieren (n=2). Die Proben stammen aus dem Bereich des Hirnquadranten, welcher Kontusion und perikontusionelles Hirngewebe enthält. Die untere Bande stellt die zugehörige Ladungskontrolle  $\beta$ -Actin dar. Pifithrin-behandelte Tiere zeigen eine deutlich gesteigerte XIAP-Expression nach Trauma und Pifithrin-Applikation.

Abbildung 33 B zeigt die densitometrische Analyse der Western Blots. Es ist ersichtlich, dass es unter Pifithrin-Applikation nach Trauma zur signifikanten Steigerung der XIAP-Expression im Vergleich zu Vehikel-behandelten Kontrolltieren kommt (MW  $\pm$  Stabw., n=4,  $p < 0,01$  vs. Trauma/Vehikel, Anova, Duncan's).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Hemmung von p53 nach Controlled Cortical Impact das posttraumatische Kontusionsvolumen dauerhaft reduziert und die motorische und kognitive Leistungsfähigkeit der Versuchstiere langfristig verbessert. Pifithrin bewirkt dabei die Blockierung der p53-Transkriptionsaktivität und die Steigerung der NF $\kappa$ B-Transkriptionsaktivität, die zu reduzierten Expressionsleveln des proapoptotischen p53-Zielgens Bax und zur verstärkten Expression des anti-apoptotischen NF $\kappa$ B-Zielgens XIAP führen.

## 4.6. Klinische Beurteilung der Ergebnisse

Die Applikation von Pifithrin kann den sekundären Hirnschaden nach Trauma signifikant reduzieren. Besonders hervorzuheben ist die Tatsache, dass die therapeutische Applikation des p53-Inhibitors in einem klinisch relevanten Zeitfenster, nämlich bis zu sechs Stunden nach Trauma, wirksam ist. Neuroprotektive Effekte konnten nicht nur in der vorliegenden Studie, sondern auch in anderen klinisch relevanten Modellen akuter neuronaler Schädigung belegt

werden (Leker et al., 2004; Cahill et al., 2007; Cahill et al., 2006; Zhu et al., 2002; Gupta et al., 2007).

Weder in der vorliegenden Studie, noch in anderen Untersuchungen zeigte sich hierbei ein Einfluss auf Blutdruck, Herzschlag, Hirn- und Körpertemperatur, Blutgase oder die zerebrale Durchblutung, welche als mögliche Ursache für die beobachtet Neuroprotektion oder als mögliche Nebenwirkung des Therapeutikums zu werten wäre (Culmsee et al., 2003; Leker et al., 2004).

Trotzdem müssen mögliche Nebenwirkungen einer p53-Inhibition in Betracht gezogen werden. In 60% der humanen Tumore liegt ein Verlust oder eine Mutation des p53-Gens vor. Dabei ist die Inaktivierung von p53 die häufigste in Tumoren gefundene Alteration (Levine et al., 1994). Homozygot p53-defiziente Mäuse haben eine sehr hohe Inzidenz spontaner Tumore (Donehower et al., 1992). Die Aktivierung der p53-abhängigen Apoptose als Antwort auf genetische Schädigungen von Körperzellen, führt zur Elimination von potentiellen Tumorzellvorläufern, weswegen p53 als Tumorsuppressorprotein bezeichnet wird. Untersuchungen zur temporären p53-Inhibition mit Pifithrin zeigen, dass bisher auch in Langzeituntersuchungen keine erhöhte Inzidenz von Tumoren in behandelten Mäusen beobachtet wurde (Komarov et al., 1999).

Weiterhin konnte in einem Modell der pharmakologisch regulierten p53-Defizienz gezeigt werden, dass sporadische, kurzfristige Aktivierung von p53 in p53-defizienten Mäusen ausreicht, um effektive Tumor-Suppression zu erreichen (Christophorou et al., 2006).

Zusammenfassend ist Pifithin ein attraktiver Kandidat in der Therapie des Schädel-Hirn Traumas. Gründe hierfür sind:

1. die vielfach belegte neuroprotektive Wirksamkeit mit persistierenden zerebroprotektiven Effekten und Verbesserung der funktioneller Erholung
2. das klinisch relevante therapeutische Fenster
3. die Fähigkeit zur Penetration der Blut-Hirnschranke und
4. die gute Verträglichkeit im Tierversuch.

## **5. Zusammenfassung**

In der Pathophysiologie des Schädel-Hirn Traumas unterscheidet man Primär- und Sekundärschaden. Der Primärschaden kommt durch die initiale Gewalteinwirkung zustande und kann therapeutisch nicht beeinflusst werden. Der Sekundärschaden setzt nach einer gewissen Zeit (Stunden bis Tage) ein, und führt zur Progression von Verletzung und neurologischer Dysfunktion. Apoptotischer Zelluntergang von Neuronen kann im Kortex von Patienten nach Schädel-Hirn Trauma nachgewiesen werden und stellt möglicherweise eine Ursache für diese sekundäre klinische Verschlechterung dar. In der Regulation der neuronalen Apoptose besitzt p53 eine Schlüsselfunktion und kann als übergeordnetes Steuermolekül den Zelluntergang initiieren.

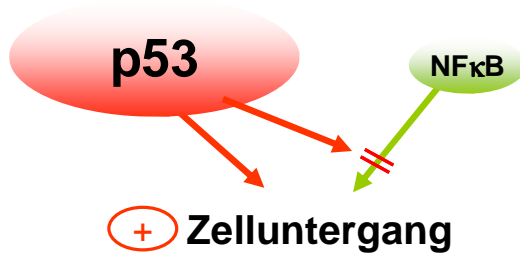
Bislang ist unklar, welchen Beitrag p53-abhängiger Zelltod zum sekundären Hirnschaden nach Schädel-Hirn Trauma leistet. Ziel der vorliegenden Arbeit ist somit, die Expression von p53 nach experimentellem Schädel-Hirn Trauma der Maus zu untersuchen und zu evaluieren, ob p53-abhängiger Zelluntergang eine kausale Rolle für die Entstehung des Hirnschadens nach Trauma spielt. Hierzu wird die Auswirkung einer pharmakologischen Inhibition von p53 auf die Entwicklung des Sekundärschadens nach traumatischem Insult bestimmt. Weiterhin wird untersucht, ob p53 NFκB-vermittelte Mechanismen der endogenen Neuroprotektion beeinflusst.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass sich das Kontusionsvolumen nach initialer Verletzung des Mausekortex durch einen pneumatisch getriebenen Kolben nach dem Modell des Controlled Cortical Impact, innerhalb von 24 Stunden sekundär um bis zu 60% vergrößert. Dies geht einher mit einer gesteigerten kortikalen p53-Expression: Western Blot-Analysen von Hirnlysaten zeigen, dass es im Bereich der Kontusion und des eng benachbarten unverletzten Kortex bereits 15 Minuten nach Trauma zum signifikanten Anstieg der p53-Expression kommt. Dieser Anstieg ist über 24 Stunden nachweisbar. Immunhistochemische Analysen von Hirngewebe nach Trauma zeigen weiterhin, dass p53 selektiv im Bereich der Kontusion sowie im perikontusionellen Hirngewebe akkumuliert.

Die Hemmung von p53 durch Pifithrin kann den sekundären Hirnschaden signifikant um bis zu 60% reduzieren. Bemerkenswert ist hierbei die Tatsache, dass eine einzelne Applikation bis zu sechs Stunden nach Trauma neuroprotektive Wirksamkeit besitzt.

Die vorliegende Arbeit zeigt weiterhin, dass es nach Trauma zum signifikanten Abfall der NFκB-Transkriptionsaktivität kommt. Inhibitorische, p53-abhängige Effekte auf die Transkriptionsaktivität von NFκB sind bekannt. Hierbei spielt die kompetitive Bindung beider Transkriptionsfaktoren an den aktivierenden Kofaktor p300 eine Rolle. Um zu überprüfen ob der Abfall der NFκB-Transkriptionsaktivität nach Trauma tatsächlich p53-vermittelt ist, wurde die NFκB-Transkriptionsaktivität unter p53-Inhibition untersucht. Es zeigt sich dass die Applikation von Pifithrin zum signifikanten Anstieg der, ohne Therapie, supprimierten NFκB-Transkriptionsaktivität nach Trauma führt.

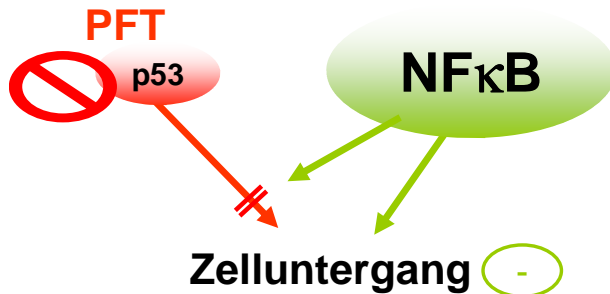
Zusammenfassend kann diese Studie belegen, dass p53 eine kausale Rolle für den sekundären Hirnschaden nach experimentellem Schädel-Hirn Trauma besitzt. Dies ist schematisch in Abbildungen 33 und 34 dargestellt.



**Abbildung 33: Schematische Darstellung der Rolle von p53 und NFκB nach Trauma**

P53-abhängige Effekte auf den Sekundärschaden nach Trauma involvieren neben der p53-abhängigen Expressionssteigerung pro-apoptotischer Zielgene die Inhibition NFκB-vermittelter, endogener, neuroprotektiver Mechanismen.

Die ausgeprägten zerebroprotektiven Effekte der p53-Inhibition mit Pifithrin sind somit zum einen auf die Hemmung pro-apoptotischer, p53-abhängiger Signalwege zurückzuführen. Zum anderen führt die Aufhebung der p53-abhängigen Inhibition von NFκB zum Überwiegen endogener neuroprotektion Mechanismen.



**Abbildung 34: Schematische Darstellung der reziproken Inhibition von p53 und NFκB sowie deren Auswirkung auf den sekundären Zelluntergang nach Trauma**

Die Inhibition von p53 durch Pifithrin stellt somit einen viel versprechenden Ansatzpunkt in der Therapie nach Schädel-Hirn Trauma dar, die bei guter Verträglichkeit, einem klinisch relevanten therapeutische Fenster und vielfach belegter zerebroprotektiver Wirksamkeit viel Potential besitzt.

## 6. Literaturverzeichnis

Alves,d.C., Paitel,E., Mattson,M.P., Amson,R., Telerman,A., Ancolio,K., and Checler,F. (2002). Wild-type and mutated presenilins 2 trigger p53-dependent apoptosis and down-regulate presenilin 1 expression in HEK293 human cells and in murine neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99, 4043-4048.

Bae,B.I., Xu,H., Igarashi,S., Fujimuro,M., Agrawal,N., Taya,Y., Hayward,S.D., Moran,T.H., Montell,C., Ross,C.A., Snyder,S.H., and Sawa,A. (2005). p53 mediates cellular dysfunction and behavioral abnormalities in Huntington's disease. *Neuron* 47, 29-41.

Baethmann,A., Wirth,A., and Schlesinger-Raab,A. (2002). Prospective system analysis of the pre- and early hospital care in severe head injury in Bavaria at a population-based level. *Eur. Surg. Res.* 34, 42-46.

Barkett,M. and Gilmore,T.D. (1999). Control of apoptosis by Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 18, 6910-6924.

Bennett,M., Macdonald,K., Chan,S.W., Luzio,J.P., Simari,R., and Weissberg,P. (1998). Cell surface trafficking of Fas: a rapid mechanism of p53-mediated apoptosis. *Science* 282, 290-293.

Bethea,J.R., Castro,M., Keane,R.W., Lee,T.T., Dietrich,W.D., and Yeziarski,R.P. (1998). Traumatic spinal cord injury induces nuclear factor-kappaB activation. *J. Neurosci.* 18, 3251-3260.

Bhakar,A.L., Tannis,L.L., Zeindler,C., Russo,M.P., Jobin,C., Park,D.S., MacPherson,S., and Barker,P.A. (2002). Constitutive nuclear factor-kappa B activity is required for central neuron survival. *J. Neurosci.* 22, 8466-8475.

Biswas,S.C., Ryu,E., Park,C., Malagelada,C., and Greene,L.A. (2005). Puma and p53 play required roles in death evoked in a cellular model of Parkinson disease. *Neurochem. Res.* 30, 839-845.

Blondeau,N., Widmann,C., Lazdunski,M., and Heurteaux,C. (2001). Activation of the nuclear factor-kappaB is a key event in brain tolerance. *J. Neurosci.* 21, 4668-4677.

Boersma,M.C. and Meffert,M.K. (2008). Novel roles for the NF-kappaB signaling pathway in regulating neuronal function. *Sci. Signal.* 1, e7.

Bramlett,H.M. and Dietrich,W.D. (2007). Progressive damage after brain and spinal cord injury: pathomechanisms and treatment strategies. *Prog. Brain Res.* 161, 125-141.

Brooks,C.L. and Gu,W. (2006). p53 ubiquitination: Mdm2 and beyond. *Mol. Cell* 21, 307-315.

Bui,N.T., Konig,H.G., Culmsee,C., Bauerbach,E., Poppe,M., Krieglstein,J., and Prehn,J.H. (2002). p75 neurotrophin receptor is required for constitutive and NGF-induced survival signalling in PC12 cells and rat hippocampal neurones. *J. Neurochem.* 81, 594-605.

Buki,A., Okonkwo,D.O., Wang,K.K., and Povlishock,J.T. (2000). Cytochrome c release and caspase activation in traumatic axonal injury. *J. Neurosci.* 20, 2825-2834.

- Cahill, J., Calvert, J.W., Marcantonio, S., and Zhang, J.H. (2007). p53 may play an orchestrating role in apoptotic cell death after experimental subarachnoid hemorrhage. *Neurosurgery* 60, 531-545.
- Cahill, J., Calvert, J.W., Solaroglu, I., and Zhang, J.H. (2006). Vasospasm and p53-induced apoptosis in an experimental model of subarachnoid hemorrhage. *Stroke* 37, 1868-1874.
- Chai, J., Du, C., Wu, J.W., Kyin, S., Wang, X., and Shi, Y. (2000). Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature* 406, 855-862.
- Cheema, Z.F., Wade, S.B., Sata, M., Walsh, K., Sohrabji, F., and Miranda, R.C. (1999). Fas/Apo [apoptosis]-1 and associated proteins in the differentiating cerebral cortex: induction of caspase-dependent cell death and activation of NF-kappaB. *J. Neurosci.* 19, 1754-1770.
- Christophorou, M.A., Ringshausen, I., Finch, A.J., Swigart, L.B., and Evan, G.I. (2006). The pathological response to DNA damage does not contribute to p53-mediated tumour suppression. *Nature* 443, 214-217.
- Chu, Z.L., McKinsey, T.A., Liu, L., Gentry, J.J., Malim, M.H., and Ballard, D.W. (1997). Suppression of tumor necrosis factor-induced cell death by inhibitor of apoptosis c-IAP2 is under NF-kappaB control. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 10057-10062.
- Clark, R.S., Chen, J., Watkins, S.C., Kochanek, P.M., Chen, M., Stetler, R.A., Loeffert, J.E., and Graham, S.H. (1997). Apoptosis-suppressor gene bcl-2 expression after traumatic brain injury in rats. *J. Neurosci.* 17, 9172-9182.
- Clark, R.S., Kochanek, P.M., Adelson, P.D., Bell, M.J., Carcillo, J.A., Chen, M., Wisniewski, S.R., Janesko, K., Whalen, M.J., and Graham, S.H. (2000a). Increases in bcl-2 protein in cerebrospinal fluid and evidence for programmed cell death in infants and children after severe traumatic brain injury. *J. Pediatr.* 137, 197-204.
- Clark, R.S., Kochanek, P.M., Chen, M., Watkins, S.C., Marion, D.W., Chen, J., Hamilton, R.L., Loeffert, J.E., and Graham, S.H. (1999). Increases in Bcl-2 and cleavage of caspase-1 and caspase-3 in human brain after head injury. *FASEB J.* 13, 813-821.
- Clark, R.S., Kochanek, P.M., Watkins, S.C., Chen, M., Dixon, C.E., Seidberg, N.A., Melick, J., Loeffert, J.E., Nathaniel, P.D., Jin, K.L., and Graham, S.H. (2000b). Caspase-3 mediated neuronal death after traumatic brain injury in rats. *J. Neurochem.* 74, 740-753.
- Clark, R.S., Nathaniel, P.D., Zhang, X., Dixon, C.E., Alber, S.M., Watkins, S.C., Melick, J.A., Kochanek, P.M., and Graham, S.H. (2007). boc-Aspartyl(OMe)-fluoromethylketone attenuates mitochondrial release of cytochrome c and delays brain tissue loss after traumatic brain injury in rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab* 27, 316-326.
- Clemens, J.A., Stephenson, D.T., Smalstig, E.B., Dixon, E.P., and Little, S.P. (1997). Global ischemia activates nuclear factor-kappa B in forebrain neurons of rats. *Stroke* 28, 1073-1080.
- Clifton, G.L., Kreutzer, J.S., Choi, S.C., Devany, C.W., Eisenberg, H.M., Foulkes, M.A., Jane, J.A., Marmarou, A., and Marshall, L.F. (1993). Relationship between Glasgow Outcome Scale and neuropsychological measures after brain injury. *Neurosurgery* 33, 34-38.
- Coles, J.P., Fryer, T.D., Smielewski, P., Chatfield, D.A., Steiner, L.A., Johnston, A.J., Downey, S.P., Williams, G.B., Aigbirio, F., Hutchinson, P.J., Rice, K., Carpenter, T.A., Clark, J.C., Pickard, J.D., and Menon, D.K. (2004). Incidence and mechanisms of cerebral ischemia in early clinical head injury. *J. Cereb. Blood Flow Metab* 24, 202-211.

Cowan,W.M., Fawcett,J.W., O'Leary,D.D., and Stanfield,B.B. (1984). Regressive events in neurogenesis. *Science* 225, 1258-1265.

Cregan,S.P., MacLaurin,J.G., Craig,C.G., Robertson,G.S., Nicholson,D.W., Park,D.S., and Slack,R.S. (1999). Bax-dependent caspase-3 activation is a key determinant in p53-induced apoptosis in neurons. *J. Neurosci.* 19, 7860-7869.

Crumrine,R.C., Thomas,A.L., and Morgan,P.F. (1994). Attenuation of p53 expression protects against focal ischemic damage in transgenic mice. *J. Cereb. Blood Flow Metab* 14, 887-891.

Culmsee,C., Gerling,N., Lehmann,M., Nikolova-Karakashian,M., Prehn,J.H., Mattson,M.P., and Krieglstein,J. (2002). Nerve growth factor survival signaling in cultured hippocampal neurons is mediated through TrkA and requires the common neurotrophin receptor P75. *Neuroscience* 115, 1089-1108.

Culmsee,C. and Mattson,M.P. (2005). p53 in neuronal apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 331, 761-777.

Culmsee,C., Siewe,J., Junker,V., Retiounskaia,M., Schwarz,S., Camandola,S., El-Metainy,S., Behnke,H., Mattson,M.P., and Krieglstein,J. (2003). Reciprocal inhibition of p53 and nuclear factor-kappaB transcriptional activities determines cell survival or death in neurons. *J. Neurosci.* 23, 8586-8595.

Culmsee,C., Zhu,X., Yu,Q.S., Chan,S.L., Camandola,S., Guo,Z., Greig,N.H., and Mattson,M.P. (2001). A synthetic inhibitor of p53 protects neurons against death induced by ischemic and excitotoxic insults, and amyloid beta-peptide. *J. Neurochem.* 77, 220-228.

de la Monte,S.M., Sohn,Y.K., and Wands,J.R. (1997). Correlates of p53- and Fas (CD95)-mediated apoptosis in Alzheimer's disease. *J. Neurol. Sci.* 152, 73-83.

Denk,A., Wirth,T., and Baumann,B. (2000). NF-kappaB transcription factors: critical regulators of hematopoiesis and neuronal survival. *Cytokine Growth Factor Rev.* 11, 303-320.

Dietrich,W.D., Alonso,O., Busto,R., Prado,R., Zhao,W., Dewanjee,M.K., and Ginsberg,M.D. (1998). Posttraumatic cerebral ischemia after fluid percussion brain injury: an autoradiographic and histopathological study in rats. *Neurosurgery* 43, 585-593.

Dietrich,W.D., Alonso,O., and Halley,M. (1994). Early microvascular and neuronal consequences of traumatic brain injury: a light and electron microscopic study in rats. *J. Neurotrauma* 11, 289-301.

Ding,H.F., Lin,Y.L., McGill,G., Juo,P., Zhu,H., Blenis,J., Yuan,J., and Fisher,D.E. (2000). Essential role for caspase-8 in transcription-independent apoptosis triggered by p53. *J. Biol. Chem.* 275, 38905-38911.

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

Dixon,C.E., Clifton,G.L., Lighthall,J.W., Yaghmai,A.A., and Hayes,R.L. (1991). A controlled cortical impact model of traumatic brain injury in the rat. *J. Neurosci. Methods* 39, 253-262.

Donehower,L.A., Harvey,M., Slagle,B.L., McArthur,M.J., Montgomery,C.A., Jr., Butel,J.S., and Bradley,A. (1992). Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* 356, 215-221.

Dressler,J., Hanisch,U., Kuhlisch,E., and Geiger,K.D. (2007). Neuronal and glial apoptosis in human traumatic brain injury. *Int. J. Legal Med.* 121, 365-375.



- Duan,W., Zhu,X., Ladenheim,B., Yu,Q.S., Guo,Z., Oyler,J., Cutler,R.G., Cadet,J.L., Greig,N.H., and Mattson,M.P. (2002). p53 inhibitors preserve dopamine neurons and motor function in experimental parkinsonism. *Ann. Neurol.* 52, 597-606.
- Duckworth,E.A., Butler,T., Collier,L., Collier,S., and Pennypacker,K.R. (2006). NF-kappaB protects neurons from ischemic injury after middle cerebral artery occlusion in mice. *Brain Res.* 1088, 167-175.
- Engel,D.C., Mies,G., Terpolilli,N.A., Trabold,R., Loch,A., De Zeeuw,C.I., Weber,J.T., Maas,A.I., and Plesnila,N. (2008). Changes of Cerebral Blood Flow during the Secondary Expansion of a Cortical Contusion Assessed by (14)C-Iodoantipyrine Autoradiography in Mice Using a Non-Invasive Protocol. *J. Neurotrauma* 25, 739-753.
- Erster,S. and Moll,U.M. (2005). Stress-induced p53 runs a transcription-independent death program. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 331, 843-850.
- Ertel,W., Keel,M., Stocker,R., Imhof,H.G., Leist,M., Steckholzer,U., Tanaka,M., Trentz,O., and Nagata,S. (1997). Detectable concentrations of Fas ligand in cerebrospinal fluid after severe head injury. *J. Neuroimmunol.* 80, 93-96.
- Ferri,K.F. and Kroemer,G. (2001). Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nat. Cell Biol.* 3, E255-E263.
- Firsching,R. and Woischneck,D. (2001). Present status of neurosurgical trauma in Germany. *World J. Surg.* 25, 1221-1223.
- Fridmacher,V., Kaltschmidt,B., Goudeau,B., Ndiaye,D., Rossi,F.M., Pfeiffer,J., Kaltschmidt,C., Israel,A., and Memet,S. (2003). Forebrain-specific neuronal inhibition of nuclear factor-kappaB activity leads to loss of neuroprotection. *J. Neurosci.* 23, 9403-9408.
- Fuchs,S.Y., Adler,V., Buschmann,T., Yin,Z., Wu,X., Jones,S.N., and Ronai,Z. (1998). JNK targets p53 ubiquitination and degradation in nonstressed cells. *Genes Dev.* 12, 2658-2663.
- Gerondakis,S., Grossmann,M., Nakamura,Y., Pohl,T., and Grumont,R. (1999). Genetic approaches in mice to understand Rel/NF-kappaB and IkappaB function: transgenics and knockouts. *Oncogene* 18, 6888-6895.
- Ghajar,J. (2000). Traumatic brain injury. *Lancet* 356, 923-929.
- Graham,S.H., Chen,J., and Clark,R.S. (2000). Bcl-2 family gene products in cerebral ischemia and traumatic brain injury. *J. Neurotrauma* 17, 831-841.
- Grilli,M. and Memo,M. (1999). Nuclear factor-kappaB/Rel proteins: a point of convergence of signalling pathways relevant in neuronal function and dysfunction. *Biochem. Pharmacol.* 57, 1-7.
- Gudkov,A.V. and Komarova,E.A. (2005). Prospective therapeutic applications of p53 inhibitors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 331, 726-736.
- Guegan,C., Braudeau,J., Couriaud,C., Dietz,G.P., Lacombe,P., Bahr,M., Nosten-Bertrand,M., and Onteniente,B. (2006). PTD-XIAP protects against cerebral ischemia by anti-apoptotic and transcriptional regulatory mechanisms. *Neurobiol. Dis.* 22, 177-186.
- Gupta,S., Gupta,Y.K., and Sharma,S.S. (2007). Protective effect of pifithrin-alpha on brain ischemic reperfusion injury induced by bilateral common carotid arteries occlusion in gerbils. *Indian J. Physiol Pharmacol.* 51, 62-68.

- Gutierrez,H., Hale,V.A., Dolcet,X., and Davies,A. (2005). NF-kappaB signalling regulates the growth of neural processes in the developing PNS and CNS. *Development* 132, 1713-1726.
- Harris,M.H. and Thompson,C.B. (2000). The role of the Bcl-2 family in the regulation of outer mitochondrial membrane permeability. *Cell Death. Differ.* 7, 1182-1191.
- Harter,L., Keel,M., Hentze,H., Leist,M., and Ertel,W. (2001). Caspase-3 activity is present in cerebrospinal fluid from patients with traumatic brain injury. *J. Neuroimmunol.* 121, 76-78.
- Hausmann,R., Biermann,T., Wiest,I., Tubel,J., and Betz,P. (2004). Neuronal apoptosis following human brain injury. *Int. J. Legal Med.* 118, 32-36.
- Hengartner,M.O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407, 770-776.
- Hildenbrandt,H. (1994). *Pschyrembel klinisches Wörterbuch.* (Berlin: Walter de Gruyter GmbH).
- Hoffmann,A., Leung,T.H., and Baltimore,D. (2003). Genetic analysis of NF-kappaB/Rel transcription factors defines functional specificities. *EMBO J.* 22, 5530-5539.
- Hofseth,L.J., Hussain,S.P., and Harris,C.C. (2004). p53: 25 years after its discovery. *Trends Pharmacol. Sci.* 25, 177-181.
- Hughes,P.E., Alexi,T., and Schreiber,S.S. (1997). A role for the tumour suppressor gene p53 in regulating neuronal apoptosis. *Neuroreport* 8, v-xii.
- Ikeda,A., Sun,X., Li,Y., Zhang,Y., Eckner,R., Doi,T.S., Takahashi,T., Obata,Y., Yoshioka,K., and Yamamoto,K. (2000). p300/CBP-dependent and -independent transcriptional interference between NF-kappaB RelA and p53. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 272, 375-379.
- Inta,I., Paxian,S., Maegele,I., Zhang,W., Pizzi,M., Spano,P., Sarnico,I., Muhammad,S., Herrmann,O., Inta,D., Baumann,B., Liou,H.C., Schmid,R.M., and Schwaninger,M. (2006). Bim and Noxa are candidates to mediate the deleterious effect of the NF-kappa B subunit RelA in cerebral ischemia. *J. Neurosci.* 26, 12896-12903.
- Jiang,M., Yi,X., Hsu,S., Wang,C.Y., and Dong,Z. (2004). Role of p53 in cisplatin-induced tubular cell apoptosis: dependence on p53 transcriptional activity. *Am. J. Physiol Renal Physiol* 287, F1140-F1147.
- Juttler,E., Potrovita,I., Tarabin,V., Prinz,S., Dong-Si,T., Fink,G., and Schwaninger,M. (2004). The cannabinoid dexamabinol is an inhibitor of the nuclear factor-kappa B (NF-kappa B). *Neuropharmacology* 47, 580-592.
- Kaltschmidt,B., Heinrich,M., and Kaltschmidt,C. (2002). Stimulus-dependent activation of NF-kappaB specifies apoptosis or neuroprotection in cerebellar granule cells. *Neuromolecular. Med.* 2, 299-309.
- Kaltschmidt,B., Widera,D., and Kaltschmidt,C. (2005). Signaling via NF-kappaB in the nervous system. *Biochim. Biophys. Acta* 1745, 287-299.
- Kaltschmidt,C., Kaltschmidt,B., and Baeuerle,P.A. (1993). Brain synapses contain inducible forms of the transcription factor NF-kappa B. *Mech. Dev.* 43, 135-147.
- Kaya,S.S., Mahmood,A., Li,Y., Yavuz,E., Goksel,M., and Chopp,M. (1999). Apoptosis and expression of p53 response proteins and cyclin D1 after cortical impact in rat brain. *Brain Res.* 818, 23-33.

- Keidel,M. and Poremba,M. (2000). Schädel-Hirntrauma. In Therapie und Verlauf neurologischer Erkrankungen, D.J.Brandt.T and H.Diener, eds. (Stuttgart: Kohlhammer), pp. 569-593.
- Kitamura,Y., Taniguchi,T., and Shimohama,S. (1999). Apoptotic cell death in neurons and glial cells: implications for Alzheimer's disease. *Jpn. J. Pharmacol.* **79**, 1-5.
- Knoblach,S.M., Alroy,D.A., Nikolaeva,M., Cernak,I., Stoica,B.A., and Faden,A.I. (2004). Caspase inhibitor z-DEVD-fmk attenuates calpain and necrotic cell death in vitro and after traumatic brain injury. *J. Cereb. Blood Flow Metab* **24**, 1119-1132.
- Knoblach,S.M., Nikolaeva,M., Huang,X., Fan,L., Krajewski,S., Reed,J.C., and Faden,A.I. (2002). Multiple caspases are activated after traumatic brain injury: evidence for involvement in functional outcome. *J. Neurotrauma* **19**, 1155-1170.
- Komarov,P.G., Komarova,E.A., Kondratov,R.V., Christov-Tselkov,K., Coon,J.S., Chernov,M.V., and Gudkov,A.V. (1999). A chemical inhibitor of p53 that protects mice from the side effects of cancer therapy. *Science* **285**, 1733-1737.
- Komarova,E.A., Neznanov,N., Komarov,P.G., Chernov,M.V., Wang,K., and Gudkov,A.V. (2003). p53 inhibitor pifithrin alpha can suppress heat shock and glucocorticoid signaling pathways. *J. Biol. Chem.* **278**, 15465-15468.
- Komjati,K., Besson,V.C., and Szabo,C. (2005). Poly (adp-ribose) polymerase inhibitors as potential therapeutic agents in stroke and neurotrauma. *Curr. Drug Targets. CNS. Neurol. Disord.* **4**, 179-194.
- Korner,M., Rattner,A., Mauxion,F., Sen,R., and Citri,Y. (1989). A brain-specific transcription activator. *Neuron* **3**, 563-572.
- Kovesdi,E., Czeiter,E., Tamas,A., Reglodi,D., Szellar,D., Pal,J., Bukovics,P., Doczi,T., and Buki,A. (2007). Rescuing neurons and glia: is inhibition of apoptosis useful? *Prog. Brain Res.* **161**, 81-95.
- Kubbutat,M.H. and Vousden,K.H. (1998). Keeping an old friend under control: regulation of p53 stability. *Mol. Med. Today* **4**, 250-256.
- Kurland,J.F., Kodym,R., Story,M.D., Spurgers,K.B., McDonnell,T.J., and Meyn,R.E. (2001). NF-kappaB1 (p50) homodimers contribute to transcription of the bcl-2 oncogene. *J. Biol. Chem.* **276**, 45380-45386.
- Larner,S.F., Hayes,R.L., McKinsey,D.M., Pike,B.R., and Wang,K.K. (2004). Increased expression and processing of caspase-12 after traumatic brain injury in rats. *J. Neurochem.* **88**, 78-90.
- Larner,S.F., McKinsey,D.M., Hayes,R.L., and KK,W.W. (2005). Caspase 7: increased expression and activation after traumatic brain injury in rats. *J. Neurochem.* **94**, 97-108.
- Leker,R.R., Aharonowiz,M., Greig,N.H., and Ovadia,H. (2004). The role of p53-induced apoptosis in cerebral ischemia: effects of the p53 inhibitor pifithrin alpha. *Exp. Neurol.* **187**, 478-486.
- Lenzlinger,P.M., Marx,A., Trentz,O., Kossmann,T., and Morganti-Kossmann,M.C. (2002). Prolonged intrathecal release of soluble Fas following severe traumatic brain injury in humans. *J. Neuroimmunol.* **122**, 167-174.
- Levine,A.J., Perry,M.E., Chang,A., Silver,A., Dittmer,D., Wu,M., and Welsh,D. (1994). The 1993 Walter Hubert Lecture: the role of the p53 tumour-suppressor gene in tumorigenesis. *Br. J. Cancer* **69**, 409-416.

- Lewen,A., Fujimura,M., Sugawara,T., Matz,P., Copin,J.C., and Chan,P.H. (2001). Oxidative stress-dependent release of mitochondrial cytochrome c after traumatic brain injury. *J. Cereb. Blood Flow Metab* 21, 914-920.
- Lewen,A., Matz,P., and Chan,P.H. (2000). Free radical pathways in CNS injury. *J. Neurotrauma* 17, 871-890.
- Li,J., Ghiani,C.A., Kim,J.Y., Liu,A., Sandoval,J., DeVellis,J., and Casaccia-Bonnel,P. (2008). Inhibition of p53 transcriptional activity: a potential target for future development of therapeutic strategies for primary demyelination. *J. Neurosci.* 28, 6118-6127.
- Li,L.Y., Luo,X., and Wang,X. (2001). Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* 412, 95-99.
- Li,Y., Chopp,M., Zhang,Z.G., Zaloga,C., Niewenhuis,L., and Gautam,S. (1994). p53-immunoreactive protein and p53 mRNA expression after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke* 25, 849-855.
- Lighthall,J.W. (1988). Controlled cortical impact: a new experimental brain injury model. *J. Neurotrauma* 5, 1-15.
- Liou,A.K., Clark,R.S., Henshall,D.C., Yin,X.M., and Chen,J. (2003). To die or not to die for neurons in ischemia, traumatic brain injury and epilepsy: a review on the stress-activated signaling pathways and apoptotic pathways. *Prog. Neurobiol.* 69, 103-142.
- Lipton,S.A. (1997). Janus faces of NF-kappa B: neurodestruction versus neuroprotection. *Nat. Med.* 3, 20-22.
- Lu,J., Mochhala,S., Kaur,C., and Ling,E. (2000). Changes in apoptosis-related protein (p53, Bax, Bcl-2 and Fos) expression with DNA fragmentation in the central nervous system in rats after closed head injury. *Neurosci. Lett.* 290, 89-92.
- Lu,K.T., Wang,Y.W., Wo,Y.Y., and Yang,Y.L. (2005). Extracellular signal-regulated kinase-mediated IL-1-induced cortical neuron damage during traumatic brain injury. *Neurosci. Lett.* 386, 40-45.
- Marini,A.M., Jiang,X., Wu,X., Pan,H., Guo,Z., Mattson,M.P., Blondeau,N., Novelli,A., and Lipsky,R.H. (2007). Preconditioning and neurotrophins: a model for brain adaptation to seizures, ischemia and other stressful stimuli. *Amino. Acids* 32, 299-304.
- Martin,L.J. (1999). Neuronal death in amyotrophic lateral sclerosis is apoptosis: possible contribution of a programmed cell death mechanism. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 58, 459-471.
- Martin,L.J., Price,A.C., McClendon,K.B., Al Abdulla,N.A., Subramaniam,J.R., Wong,P.C., and Liu,Z. (2003). Early events of target deprivation/axotomy-induced neuronal apoptosis in vivo: oxidative stress, DNA damage, p53 phosphorylation and subcellular redistribution of death proteins. *J. Neurochem.* 85, 234-247.
- Mattson,M.P. (2000a). Apoptosis in neurodegenerative disorders. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1, 120-129.
- Mattson,M.P. (2000b). Apoptotic and anti-apoptotic synaptic signaling mechanisms. *Brain Pathol.* 10, 300-312.
- Mattson,M.P. (2005). NF-kappaB in the survival and plasticity of neurons. *Neurochem. Res.* 30, 883-893.

- Mattson, M.P., Barger, S.W., Begley, J.G., and Mark, R.J. (1995). Calcium, free radicals, and excitotoxic neuronal death in primary cell culture. *Methods Cell Biol.* 46, 187-216.
- Mattson, M.P., Culmsee, C., and Yu, Z.F. (2000). Apoptotic and antiapoptotic mechanisms in stroke. *Cell Tissue Res.* 301, 173-187.
- Mattson, M.P. and Furukawa, K. (1997). Anti-apoptotic actions of cycloheximide: blockade of programmed cell death or induction of programmed cell life? *Apoptosis.* 2, 257-264.
- Mattson, M.P., Goodman, Y., Luo, H., Fu, W., and Furukawa, K. (1997). Activation of NF-kappaB protects hippocampal neurons against oxidative stress-induced apoptosis: evidence for induction of manganese superoxide dismutase and suppression of peroxynitrite production and protein tyrosine nitration. *J. Neurosci. Res.* 49, 681-697.
- Mattson, M.P. and Meffert, M.K. (2006). Roles for NF-kappaB in nerve cell survival, plasticity, and disease. *Cell Death. Differ.* 13, 852-860.
- Mauritz, W., Wilbacher, I., Majdan, M., Leitgeb, J., Janciak, I., Brazinova, A., and Rusnak, M. (2008). Epidemiology, treatment and outcome of patients after severe traumatic brain injury in European regions with different economic status. *Eur. J. Public Health* 18, 575-580.
- Memet, S. (2006). NF-kappaB functions in the nervous system: from development to disease. *Biochem. Pharmacol.* 72, 1180-1195.
- Merritt, A.J., Allen, T.D., Potten, C.S., and Hickman, J.A. (1997). Apoptosis in small intestinal epithelial from p53-null mice: evidence for a delayed, p53-independent G2/M-associated cell death after gamma-irradiation. *Oncogene* 14, 2759-2766.
- Middleboe, T., Andersen, H.S., Birket-Smith, M., and Friis, M.L. (1992). Minor head injury: impact on general health after 1 year. A prospective follow-up study. *Acta Neurol. Scand.* 85, 5-9.
- Middleton, G., Hamanoue, M., Enokido, Y., Wyatt, S., Pennica, D., Jaffray, E., Hay, R.T., and Davies, A.M. (2000). Cytokine-induced nuclear factor kappa B activation promotes the survival of developing neurons. *J. Cell Biol.* 148, 325-332.
- Millet, I., Phillips, R.J., Sherwin, R.S., Ghosh, S., Voll, R.E., Flavell, R.A., Vignery, A., and Rincon, M. (2000). Inhibition of NF-kappaB activity and enhancement of apoptosis by the neuropeptide calcitonin gene-related peptide. *J. Biol. Chem.* 275, 15114-15121.
- Miyashita, T., Krajewski, S., Krajewska, M., Wang, H.G., Lin, H.K., Liebermann, D.A., Hoffman, B., and Reed, J.C. (1994). Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene* 9, 1799-1805.
- Miyashita, T. and Reed, J.C. (1995). Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 80, 293-299.
- Morrison, R.S., Kinoshita, Y., Johnson, M.D., Guo, W., and Garden, G.A. (2003). p53-dependent cell death signaling in neurons. *Neurochem. Res.* 28, 15-27.
- Morrison, R.S., Wenzel, H.J., Kinoshita, Y., Robbins, C.A., Donehower, L.A., and Schwartzkroin, P.A. (1996). Loss of the p53 tumor suppressor gene protects neurons from kainate-induced cell death. *J. Neurosci.* 16, 1337-1345.

- Muir, J.K., Raghupathi, R., Emery, D.L., Bareyre, F.M., and McIntosh, T.K. (1999). Postinjury magnesium treatment attenuates traumatic brain injury-induced cortical induction of p53 mRNA in rats. *Exp. Neurol.* *159*, 584-593.
- Murray, G.D., Teasdale, G.M., Braakman, R., Cohadon, F., Dearden, M., Iannotti, F., Karimi, A., Lapierre, F., Maas, A., Ohman, J., Persson, L., Servadei, F., Stocchetti, N., Trojanowski, T., and Unterberg, A. (1999). The European Brain Injury Consortium survey of head injuries. *Acta Neurochir. (Wien.)* *141*, 223-236.
- Nakai, M., Qin, Z.H., Chen, J.F., Wang, Y., and Chase, T.N. (2000). Kainic acid-induced apoptosis in rat striatum is associated with nuclear factor-kappaB activation. *J. Neurochem.* *74*, 647-658.
- Nakaso, K., Yoshimoto, Y., Yano, H., Takeshima, T., and Nakashima, K. (2004). p53-mediated mitochondrial dysfunction by proteasome inhibition in dopaminergic SH-SY5Y cells. *Neurosci. Lett.* *354*, 213-216.
- Napieralski, J.A., Raghupathi, R., and McIntosh, T.K. (1999). The tumor-suppressor gene, p53, is induced in injured brain regions following experimental traumatic brain injury. *Brain Res. Mol. Brain Res.* *71*, 78-86.
- Narayan, R.K., Michel, M.E., Ansell, B., Baethmann, A., Biegon, A., Bracken, M.B., Bullock, M.R., Choi, S.C., Clifton, G.L., Contant, C.F., Coplin, W.M., Dietrich, W.D., Ghajar, J., Grady, S.M., Grossman, R.G., Hall, E.D., Heetderks, W., Hovda, D.A., Jallo, J., Katz, R.L., Knoller, N., Kochanek, P.M., Maas, A.I., Majde, J., Marion, D.W., Marmarou, A., Marshall, L.F., McIntosh, T.K., Miller, E., Mohberg, N., Muizelaar, J.P., Pitts, L.H., Quinn, P., Riesenfeld, G., Robertson, C.S., Strauss, K.I., Teasdale, G., Temkin, N., Tuma, R., Wade, C., Walker, M.D., Weinrich, M., Whyte, J., Wilberger, J., Young, A.B., and Yurkewicz, L. (2002). Clinical trials in head injury. *J. Neurotrauma* *19*, 503-557.
- Nathoo, N., Narotam, P.K., Agrawal, D.K., Connolly, C.A., van, D., Jr., Barnett, G.H., and Chetty, R. (2004). Influence of apoptosis on neurological outcome following traumatic cerebral contusion. *J. Neurosurg.* *101*, 233-240.
- Ng, I., Yeo, T.T., Soong, R., Tang, W.T., Ong, P.L., Lew, T., Goh, H.S., and Smith, D. (1999). Young Investigator's Award: induction of apoptosis following traumatic head injury in humans. *Ann. Acad. Med. Singapore* *28*, 363-365.
- Ng, I., Yeo, T.T., Tang, W.Y., Soong, R., Ng, P.Y., and Smith, D.R. (2000). Apoptosis occurs after cerebral contusions in humans. *Neurosurgery* *46*, 949-956.
- Nonaka, M., Chen, X.H., Pierce, J.E., Leoni, M.J., McIntosh, T.K., Wolf, J.A., and Smith, D.H. (1999). Prolonged activation of NF-kappaB following traumatic brain injury in rats. *J. Neurotrauma* *16*, 1023-1034.
- Nurmi, A., Lindsberg, P.J., Koistinaho, M., Zhang, W., Juettler, E., Karjalainen-Lindsberg, M.L., Weih, F., Frank, N., Schwaninger, M., and Koistinaho, J. (2004). Nuclear factor-kappaB contributes to infarction after permanent focal ischemia. *Stroke* *35*, 987-991.
- O'Neill, L.A. and Kaltschmidt, C. (1997). NF-kappa B: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function. *Trends Neurosci.* *20*, 252-258.
- Oltvai, Z.N., Millman, C.L., and Korsmeyer, S.J. (1993). Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* *74*, 609-619.
- Paitel, E., Fahraeus, R., and Checler, F. (2003). Cellular prion protein sensitizes neurons to apoptotic stimuli through Mdm2-regulated and p53-dependent caspase 3-like activation. *J. Biol. Chem.* *278*, 10061-10066.

- Pike,B.R., Zhao,X., Newcomb,J.K., Glenn,C.C., Anderson,D.K., and Hayes,R.L. (2000). Stretch injury causes calpain and caspase-3 activation and necrotic and apoptotic cell death in septo-hippocampal cell cultures. *J. Neurotrauma* 17, 283-298.
- Pizzi,M., Sarnico,I., Boroni,F., Benarese,M., Steimberg,N., Mazzoleni,G., Dietz,G.P., Bahr,M., Liou,H.C., and Spano,P.F. (2005). NF-kappaB factor c-Rel mediates neuroprotection elicited by mGlu5 receptor agonists against amyloid beta-peptide toxicity. *Cell Death. Differ.* 12, 761-772.
- Pizzi,M. and Spano,P. (2006). Distinct roles of diverse nuclear factor-kappaB complexes in neuropathological mechanisms. *Eur. J. Pharmacol.* 545, 22-28.
- Plesnila,N., Friedrich,D., Eriskat,J., Baethmann,A., and Stoffel,M. (2003). Relative cerebral blood flow during the secondary expansion of a cortical lesion in rats. *Neurosci. Lett.* 345, 85-88.
- Plesnila,N., von Baumgarten,L., Retiounskaia,M., Engel,D., Ardeshiri,A., Zimmermann,R., Hoffmann,F., Landshamer,S., Wagner,E., and Culmsee,C. (2007). Delayed neuronal death after brain trauma involves p53-dependent inhibition of NF-kappaB transcriptional activity. *Cell Death. Differ.* 14, 1529-1541.
- Plesnila,N., Zhu,C., Culmsee,C., Groger,M., Moskowitz,M.A., and Blomgren,K. (2004). Nuclear translocation of apoptosis-inducing factor after focal cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab* 24, 458-466.
- Qin,Z.H., Wang,Y., Nakai,M., and Chase,T.N. (1998). Nuclear factor-kappa B contributes to excitotoxin-induced apoptosis in rat striatum. *Mol. Pharmacol.* 53, 33-42.
- Qiu,J., Whalen,M.J., Lowenstein,P., Fiskum,G., Fahy,B., Darwish,R., Aarabi,B., Yuan,J., and Moskowitz,M.A. (2002). Upregulation of the Fas receptor death-inducing signaling complex after traumatic brain injury in mice and humans. *J. Neurosci.* 22, 3504-3511.
- Raghupathi,R. (2004). Cell death mechanisms following traumatic brain injury. *Brain Pathol.* 14, 215-222.
- Raghupathi,R., Fernandez,S.C., Murai,H., Trusko,S.P., Scott,R.W., Nishioka,W.K., and McIntosh,T.K. (1998). BCL-2 overexpression attenuates cortical cell loss after traumatic brain injury in transgenic mice. *J. Cereb. Blood Flow Metab* 18, 1259-1269.
- Raghupathi,R., Graham,D.I., and McIntosh,T.K. (2000). Apoptosis after traumatic brain injury. *J. Neurotrauma* 17, 927-938.
- Raghupathi,R., Muir,J.K., Fulp,C.T., Pittman,R.N., and McIntosh,T.K. (2003a). Acute activation of mitogen-activated protein kinases following traumatic brain injury in the rat: implications for posttraumatic cell death. *Exp. Neurol.* 183, 438-448.
- Raghupathi,R., Strauss,K.I., Zhang,C., Krajewski,S., Reed,J.C., and McIntosh,T.K. (2003b). Temporal alterations in cellular Bax:Bcl-2 ratio following traumatic brain injury in the rat. *J. Neurotrauma* 20, 421-435.
- Rink,A., Fung,K.M., Trojanowski,J.Q., Lee,V.M., Neugebauer,E., and McIntosh,T.K. (1995). Evidence of apoptotic cell death after experimental traumatic brain injury in the rat. *Am. J. Pathol.* 147, 1575-1583.
- Rosse,T., Olivier,R., Monney,L., Rager,M., Conus,S., Fellay,I., Jansen,B., and Borner,C. (1998). Bcl-2 prolongs cell survival after Bax-induced release of cytochrome c. *Nature* 391, 496-499.
- Ruff,R.M., Marshall,L.F., Crouch,J., Klauber,M.R., Levin,H.S., Barth,J., Kreutzer,J., Blunt,B.A., Foulkes,M.A., Eisenberg,H.M., and . (1993). Predictors of outcome following severe head trauma: follow-up data from the Traumatic Coma Data Bank. *Brain Inj.* 7, 101-111.

- Sahuquillo,J., Poca,M.A., and Amoros,S. (2001). Current aspects of pathophysiology and cell dysfunction after severe head injury. *Curr. Pharm. Des* 7, 1475-1503.
- Saito,N., Yamamoto,T., Watanabe,T., Abe,Y., and Kumagai,T. (2000). Implications of p53 protein expression in experimental spinal cord injury. *J. Neurotrauma* 17, 173-182.
- Salminen,A., Liu,P.K., and Hsu,C.Y. (1995). Alteration of transcription factor binding activities in the ischemic rat brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 212, 939-944.
- Salvesen,G.S. and Dixit,V.M. (1997). Caspases: intracellular signaling by proteolysis. *Cell* 91, 443-446.
- Sanz,O., Acarin,L., Gonzalez,B., and Castellano,B. (2002). NF-kappaB and IkappaBalpha expression following traumatic brain injury to the immature rat brain. *J. Neurosci. Res.* 67, 772-780.
- Satchell,M.A., Lai,Y., Kochanek,P.M., Wisniewski,S.R., Fink,E.L., Siedberg,N.A., Berger,R.P., DeKosky,S.T., Adelson,P.D., and Clark,R.S. (2005). Cytochrome c, a biomarker of apoptosis, is increased in cerebrospinal fluid from infants with inflicted brain injury from child abuse. *J. Cereb. Blood Flow Metab* 25, 919-927.
- Schneider,A., Martin-Villalba,A., Weih,F., Vogel,J., Wirth,T., and Schwaninger,M. (1999). NF-kappaB is activated and promotes cell death in focal cerebral ischemia. *Nat. Med.* 5, 554-559.
- Sen,R. and Baltimore,D. (1986). Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* 46, 705-716.
- Serbest,G., Horwitz,J., and Barbee,K. (2005). The effect of poloxamer-188 on neuronal cell recovery from mechanical injury. *J. Neurotrauma* 22, 119-132.
- Sha,W.C., Liou,H.C., Tuomanen,E.I., and Baltimore,D. (1995). Targeted disruption of the p50 subunit of NF-kappa B leads to multifocal defects in immune responses. *Cell* 80, 321-330.
- Siegelin,M., Touzani,O., Toutain,J., Liston,P., and Rami,A. (2005). Induction and redistribution of XAF1, a new antagonist of XIAP in the rat brain after transient focal ischemia. *Neurobiol. Dis.* 20, 509-518.
- Slemmer,J.E., Zhu,C., Landshamer,S., Trabold,R., Grohm,J., Ardeshiri,A., Wagner,E., Sweeney,M.I., Blomgren,K., Culmsee,C., Weber,J.T., and Plesnila,N. (2008). Causal role of apoptosis-inducing factor for neuronal cell death following traumatic brain injury. *Am. J. Pathol.* 173, 1795-1805.
- Smith,F.M., Raghupathi,R., MacKinnon,M.A., McIntosh,T.K., Saatman,K.E., Meaney,D.F., and Graham,D.I. (2000). TUNEL-positive staining of surface contusions after fatal head injury in man. *Acta Neuropathol. (Berl)* 100, 537-545.
- Song,S. and Lambert,P.F. (1999). Different responses of epidermal and hair follicular cells to radiation correlate with distinct patterns of p53 and p21 induction. *Am. J. Pathol.* 155, 1121-1127.
- Soussi,T. (2000). The p53 tumor suppressor gene: from molecular biology to clinical investigation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 910, 121-137.
- Springer,J.E. (2002). Apoptotic cell death following traumatic injury to the central nervous system. *J. Biochem. Mol. Biol.* 35, 94-105.



- Stephenson,D., Yin,T., Smalstig,E.B., Hsu,M.A., Panetta,J., Little,S., and Clemens,J. (2000). Transcription factor nuclear factor-kappa B is activated in neurons after focal cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab* 20, 592-603.
- Steudel,W.I., Cortbus,F., and Schwerdtfeger,K. (2005). Epidemiology and prevention of fatal head injuries in Germany--trends and the impact of the reunification. *Acta Neurochir. (Wien. )* 147, 231-242.
- Stoffel,M., Blau,C., Reinl,H., Breidt,J., Gersonde,K., Baethmann,A., and Plesnila,N. (2004). Identification of brain tissue necrosis by MRI: validation by histomorphometry. *J. Neurotrauma* 21, 733-740.
- Sullivan,P.G., Bruce-Keller,A.J., Rabchevsky,A.G., Christakos,S., Clair,D.K., Mattson,M.P., and Scheff,S.W. (1999). Exacerbation of damage and altered NF-kappaB activation in mice lacking tumor necrosis factor receptors after traumatic brain injury. *J. Neurosci.* 19, 6248-6256.
- Susin,S.A., Lorenzo,H.K., Zamzami,N., Marzo,I., Snow,B.E., Brothers,G.M., Mangion,J., Jacotot,E., Costantini,P., Loeffler,M., Larochette,N., Goodlett,D.R., Aebersold,R., Siderovski,D.P., Penninger,J.M., and Kroemer,G. (1999). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397, 441-446.
- Suzuki,Y., Imai,Y., Nakayama,H., Takahashi,K., Takio,K., and Takahashi,R. (2001). A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol. Cell* 8, 613-621.
- Tagliaferri,F., Compagnone,C., Korsic,M., Servadei,F., and Kraus,J. (2006). A systematic review of brain injury epidemiology in Europe. *Acta Neurochir. (Wien. )* 148, 255-268.
- Tamagno,E., Parola,M., Guglielmotto,M., Santoro,G., Bardini,P., Marra,L., Tabaton,M., and Danni,O. (2003). Multiple signaling events in amyloid beta-induced, oxidative stress-dependent neuronal apoptosis. *Free Radic. Biol. Med.* 35, 45-58.
- Tamatani,M., Che,Y.H., Matsuzaki,H., Ogawa,S., Okado,H., Miyake,S., Mizuno,T., and Tohyama,M. (1999). Tumor necrosis factor induces Bcl-2 and Bcl-x expression through NFkappaB activation in primary hippocampal neurons. *J. Biol. Chem.* 274, 8531-8538.
- Tatton,W.G., Chalmers-Redman,R., Brown,D., and Tatton,N. (2003). Apoptosis in Parkinson's disease: signals for neuronal degradation. *Ann. Neurol.* 53 *Suppl* 3, S61-S70.
- Tawil,I., Stein,D.M., Mirvis,S.E., and Scalea,T.M. (2008). Posttraumatic cerebral infarction: incidence, outcome, and risk factors. *J. Trauma* 64, 849-853.
- Teasdale,G. and Jennett,B. (1974). Assessment of coma and impaired consciousness. A practical scale. *Lancet* 2, 81-84.
- Trabold,R., Krieg,S., Scholler,K., and Plesnila,N. (2009). Role of Vasopressin V(1a) and V(2) Receptors for the Development of Secondary Brain Damage after Traumatic Brain Injury in Mice. *J. Neurotrauma* 25, 1459-1465.
- Uzan,M., Erman,H., Tanriverdi,T., Sanus,G.Z., Kafadar,A., and Uzun,H. (2006). Evaluation of apoptosis in cerebrospinal fluid of patients with severe head injury. *Acta Neurochir. (Wien. )* 148, 1157-1164.
- Voll,R.E., Jimi,E., Phillips,R.J., Barber,D.F., Rincon,M., Hayday,A.C., Flavell,R.A., and Ghosh,S. (2000). NF-kappa B activation by the pre-T cell receptor serves as a selective survival signal in T lymphocyte development. *Immunity.* 13, 677-689.

- von Baumgarten,L., Trabold,R., Thal,S., Back,T., and Plesnila,N. (2008). Role of cortical spreading depressions for secondary brain damage after traumatic brain injury in mice. *J. Cereb. Blood Flow Metab* 28, 1353-1360.
- Wadgaonkar,R., Phelps,K.M., Haque,Z., Williams,A.J., Silverman,E.S., and Collins,T. (1999). CREB-binding protein is a nuclear integrator of nuclear factor-kappaB and p53 signaling. *J. Biol. Chem.* 274, 1879-1882.
- Wang,L., Cui,Y., Lord,B.I., Roberts,S.A., Potten,C.S., Hendry,J.H., and Scott,D. (1996). Gamma-ray-induced cell killing and chromosome abnormalities in the bone marrow of p53-deficient mice. *Radiat. Res.* 146, 259-266.
- Wang,X., Zhu,C., Wang,X., Hagberg,H., Korhonen,L., Sandberg,M., Lindholm,D., and Blomgren,K. (2004). X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) protein protects against caspase activation and tissue loss after neonatal hypoxia-ischemia. *Neurobiol. Dis.* 16, 179-189.
- Ward,M.W., Kogel,D., and Prehn,J.H. (2004). Neuronal apoptosis: BH3-only proteins the real killers? *J. Bioenerg. Biomembr.* 36, 295-298.
- Webster,G.A. and Perkins,N.D. (1999). Transcriptional cross talk between NF-kappaB and p53. *Mol. Cell Biol.* 19, 3485-3495.
- Williams,S., Raghupathi,R., MacKinnon,M.A., McIntosh,T.K., Saatman,K.E., and Graham,D.I. (2001). In situ DNA fragmentation occurs in white matter up to 12 months after head injury in man. *Acta Neuropathol. (Berl)* 102, 581-590.
- Wong,J., Hoe,N.W., Zhiwei,F., and Ng,I. (2005). Apoptosis and traumatic brain injury. *Neurocrit. Care* 3, 177-182.
- Xiang,H., Kinoshita,Y., Knudson,C.M., Korsmeyer,S.J., Schwartzkroin,P.A., and Morrison,R.S. (1998). Bax involvement in p53-mediated neuronal cell death. *J. Neurosci.* 18, 1363-1373.
- Xue,L. and Yang,S.Y. (2004). [The protective effect of p53 antisense oligonucleotide against neuron apoptosis secondary to traumatic brain injury]. *Zhonghua Wai Ke. Za Zhi.* 42, 236-239.
- Yakovlev,A.G., Knoblach,S.M., Fan,L., Fox,G.B., Goodnight,R., and Faden,A.I. (1997). Activation of CPP32-like caspases contributes to neuronal apoptosis and neurological dysfunction after traumatic brain injury. *J. Neurosci.* 17, 7415-7424.
- Yang,K., Mu,X.S., and Hayes,R.L. (1995). Increased cortical nuclear factor-kappa B (NF-kappa B) DNA binding activity after traumatic brain injury in rats. *Neurosci. Lett.* 197, 101-104.
- Yang,S.Y. and Xue,L. (2004). Human neuronal apoptosis secondary to traumatic brain injury and the regulative role of apoptosis-related genes. *Chin J. Traumatol.* 7, 159-164.
- Yi,J.H. and Hazell,A.S. (2006). Excitotoxic mechanisms and the role of astrocytic glutamate transporters in traumatic brain injury. *Neurochem. Int.* 48, 394-403.
- Yu,S.W., Wang,H., Dawson,T.M., and Dawson,V.L. (2003). Poly(ADP-ribose) polymerase-1 and apoptosis inducing factor in neurotoxicity. *Neurobiol. Dis.* 14, 303-317.
- Yu,Z., Zhou,D., Bruce-Keller,A.J., Kindy,M.S., and Mattson,M.P. (1999). Lack of the p50 subunit of nuclear factor-kappaB increases the vulnerability of hippocampal neurons to excitotoxic injury. *J. Neurosci.* 19, 8856-8865.

Zhang,M., Liu,W., Ding,D., and Salvi,R. (2003a). Pifithrin-alpha suppresses p53 and protects cochlear and vestibular hair cells from cisplatin-induced apoptosis. *Neuroscience* 120, 191-205.

Zhang,W., Potrovita,I., Tarabin,V., Herrmann,O., Beer,V., Weih,F., Schneider,A., and Schwaninger,M. (2005a). Neuronal activation of NF-kappaB contributes to cell death in cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab* 25, 30-40.

Zhang,X., Chen,J., Graham,S.H., Du,L., Kochanek,P.M., Draviam,R., Guo,F., Nathaniel,P.D., Szabo,C., Watkins,S.C., and Clark,R.S. (2002). Intranuclear localization of apoptosis-inducing factor (AIF) and large scale DNA fragmentation after traumatic brain injury in rats and in neuronal cultures exposed to peroxynitrite. *J. Neurochem.* 82, 181-191.

Zhang,X., Chen,Y., Jenkins,L.W., Kochanek,P.M., and Clark,R.S. (2005b). Bench-to-bedside review: Apoptosis/programmed cell death triggered by traumatic brain injury. *Crit Care* 9, 66-75.

Zhang,X., Graham,S.H., Kochanek,P.M., Marion,D.W., Nathaniel,P.D., Watkins,S.C., and Clark,R.S. (2003b). Caspase-8 expression and proteolysis in human brain after severe head injury. *FASEB J.* 17, 1367-1369.

Zhou,C., Yamaguchi,M., Colohan,A.R., and Zhang,J.H. (2005). Role of p53 and apoptosis in cerebral vasospasm after experimental subarachnoid hemorrhage. *J. Cereb. Blood Flow Metab* 25, 572-582.

Zhu,X., Yu,Q.S., Cutler,R.G., Culmsee,C.W., Holloway,H.W., Lahiri,D.K., Mattson,M.P., and Greig,N.H. (2002). Novel p53 inactivators with neuroprotective action: syntheses and pharmacological evaluation of 2-imino-2,3,4,5,6,7-hexahydrobenzothiazole and 2-imino-2,3,4,5,6,7-hexahydrobenzoxazole derivatives. *J. Med. Chem.* 45, 5090-5097.

Zhu,Y., Culmsee,C., Klumpp,S., and Kriegstein,J. (2004). Neuroprotection by transforming growth factor-beta1 involves activation of nuclear factor-kappaB through phosphatidylinositol-3-OH kinase/Akt and mitogen-activated protein kinase-extracellular-signal regulated kinase1,2 signaling pathways. *Neuroscience* 123, 897-906.

Zou,H., Yang,R., Hao,J., Wang,J., Sun,C., Fesik,S.W., Wu,J.C., Tomaselli,K.J., and Armstrong,R.C. (2003). Regulation of the Apaf-1/caspase-9 apoptosome by caspase-3 and XIAP. *J. Biol. Chem.* 278, 8091-8098.

Zweckberger,K., Eros,C., Zimmermann,R., Kim,S.W., Engel,D., and Plesnila,N. (2006). Effect of early and delayed decompressive craniectomy on secondary brain damage after controlled cortical impact in mice. *J. Neurotrauma* 23, 1083-1093.

Zweckberger,K., Stoffel,M., Baethmann,A., and Plesnila,N. (2003). Effect of decompression craniotomy on increase of contusion volume and functional outcome after controlled cortical impact in mice. *J. Neurotrauma* 20, 1307-1314.

## 7. Bereits veröffentlichte Aspekte der Arbeit:

### Publikation:

Delayed neuronal death after brain trauma involves p53-dependent inhibition of NF-kappaB transcriptional activity

Plesnila N\*, von Baumgarten L\*, Retiounskaia M, Engel D, Ardeshiri A, Zimmermann R, Hoffmann F, Landshamer S, Wagner E, Culmsee C.

\* both authors contributed equally

Cell Death and Differentiation, 2007 Aug; 14(8):1529-41. Epub 2007 Apr 27.

### Buchbeiträge:

Culmsee C, Junker V, Kremers W, Thal S, von Baumgarten L, Plesnila N, Krieglstein J (2004): Combination therapy in ischemic stroke.

(In: Krieglstein J, Klumpp S (eds) *Pharmacology of Cerebral Ischemia 2004*, medpharm scientific Publishers Stuttgart, pp 467-479)

### Vorträge:

Von Baumgarten L, Culmsee C, Plesnila N

Aktivierung des Transkriptionsfaktors p53 beim sekundären Hirnschaden nach Schädel-Hirntrauma (29. Jahrestagung der Sektion "Intrakranieller Druck, Hirnödem und Hirndurchblutung" der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie, Berlin 10-11. Oktober 2003)

Von Baumgarten L, Culmsee C, Plesnila N

Die Rolle der Wechselwirkung von p53 und NFκB beim sekundären Nekrosewachstum nach Schädel-Hirntrauma der Maus

(Kolloquium über wissenschaftliche Arbeiten aus der Chirurgischen Forschung, Vorlesungsverzeichnis Nr. 07199, München, 05. Februar 2003)

Von Baumgarten L, Culmsee C, Plesnila N

Role of p53 and NFκB in traumatic brain lesion expansion from focal injury

(8th international Symposium: Mechanisms of secondary brain damage from trauma and ischemia, Mauls/Sterzing, Italien, 15-17. Februar 2004)

Von Baumgarten L, Culmsee C, Plesnila N

Activation and interaction of p53 and NFκB during cell death - role for secondary brain damage after controlled cortical impact in mice

(7<sup>th</sup> international Neurotrauma Symposium, International Neurotrauma Society, Adelaide, Australien, 12.-16.September 2004)

**Poster:**

Plesnila N, von Baumgarten L, Culmsee C (2004)

Activation and interaction of p53 and NFκB during cell death after traumatic brain injury

(Society for Neuroscience, 34rd annual Meeting, San Diego, USA, 23-27.10.2004)

## 8. Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Alexander Baethmann, ehemaligem komm. Direktor des Instituts für Chirurgische Forschung, der mich an seinem Institut aufgenommen hat. Im Rahmen meiner wissenschaftlichen Tätigkeit wurde ich dank seiner Unterstützung in beispielgebender Weise ausgebildet und gefördert.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Prof. Nikolaus Plesnila für die Überlassung des Themas und die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe bedanken. Meine wissenschaftliche Arbeit wurde durch ihn exzellent betreut. Es ist ihm gelungen ein Arbeitsumfeld zu schaffen, das es mir in einzigartiger Weise ermöglichte produktiv, kreativ und vor allem mit Spaß an der Sache wissenschaftlich zu arbeiten. Weiterhin gilt mein Dank Prof. Carsten Culmsee für die Mitbetreuung meiner Arbeit.

Meine Mitdoktoranden, vor allem Nicole Terpolilli, Seong Woong Kim, Serge Thal und Klaus Zweckberger, standen mir durch kreative Diskussionen, technische und vor allem menschliche Unterstützung tatkräftig zur Seite.

Mein Dank geht ausserdem an die technischen Assistentinnen Frau Uta Mamrak, Frau Mai Ping Wu und Frau Veronika Bischoff.

Für das gewissenhafte Korrekturlesen dieser Arbeit, für die Verbesserung meiner Kenntnisse der neuen deutschen Rechtschreib- und Kommaregeln und vor allem für die einzigartige menschliche Unterstützung und den guten Zuspruch in allen Lebenslagen geht mein herzlicher Dank an meine liebe Freundin Ann-Kristin Deckert.

## 9. Lebenslauf

Louisa von Baumgarten  
Belgradstrasse 20  
80796 München  
Louisa.vonBaumgarten@med.uni-muenchen.de

### **Persönliche Daten:**

Geburtsdatum: 19. November 1980 in Wiesbaden  
Nationalität: Deutsch

### **Schulbildung:**

1990 – 1999 Röntgen-Gymnasium, Würzburg  
1999 Allgemeine Hochschulreife (Note 1,2)

### **Hochschulbildung:**

ab WS 1999/2000 Studium der Humanmedizin an der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg  
ab WS 2001/2002 Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians Universität  
08/2001 Physikum (Note: 2,0)  
09/2002 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note 2,0)  
04/2005 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note 1,6)  
06/2006 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note 1,0),  
Gesamtnote der ärztlichen Prüfung 1,49

### **Famulaturen:**

03/2002 Famulatur in der Radiologie (Radiologisches Zentrum München Pasing)  
03-04/2003 Famulatur in der Inneren Medizin (Eerste River Hospital, Kapstadt, Südafrika),  
09/2003 Famulatur in der Neurochirurgie (Klinikum Großhadern, München)

### **Praktisches Jahr:**

04-08/05: 1.. Terial Neurologie: Neurologische Klinik und Poliklinik, Klinikum Großhadern, München  
08-11/05 -2. Terial Innere Medizin Medizinische Klinik I und II, Klinikum Großhadern, München  
11/05-03/06 3. Terial Allgemeinchirurgie, Chirurgische Klinik und Poliklinik Innenstadt, München

und Neurochirurgie, Department of Neurosurgery, Kyoto University Hospital,  
Kyoto, Japan

**Stipendien und Auszeichnungen:**

- 10/03-12/04: Stipendiatin des DFG-Graduiertenkollegs Nr. 688 „Neurotraumatologie und neuropsychologische Rehabilitation, Leitung: Prof. A. Baethman
- 10/2004 Young Investigator Travel Award  
7th international Neurotrauma Symposium, Adelaide, Australien

**Publikationen:**

Delayed neuronal death after brain trauma involves p53-dependent inhibition of NF-kappaB transcriptional activity

Plesnila N\*, von Baumgarten L\*, Retiounskaia M, Engel D, Ardeshiri A, Zimmermann R, Hoffmann F, Landshamer S, Wagner E, Culmsee C.

Cell Death and Differentiation, 2007 Aug; 14(8):1529-41. Epub 2007 Apr 27.

Role of cortical spreading depressions for secondary brain damage after traumatic brain injury in mice

von Baumgarten L, Trabold R, Thal S, Back T, Plesnila N.

Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism, 2008 Jul; 28(7):1353-60. Epub 2008 Apr 16.

Imaging glioma cell invasion in vivo reveals mechanisms of dissemination and peritumoral angiogenesis

Winkler F, Kienast Y, Fuhrmann M, Von Baumgarten L, Burgold S, Mitteregger G, Kretschmar H, Herms J

Glia. 2009 Sep;57(12):1306-15

Real-time imaging reveals the single steps of brain metastasis formation.

Kienast Y, von Baumgarten L, Fuhrmann M, Klinkert WE, Goldbrunner R, Herms J, Winkler F.

Nat Med. 2010 Jan 16 (1): 116-22

**Fremdsprachen:**

Englisch

Französisch

Latein

**Beruf :**

seit 01.08.2006:

Assistenzärztin an der Neurologischen Klinik und Poliklinik, Klinikum Großhadern, München,

Direktorin: Prof. Dr. med. M. Dieterich