

Aus dem Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie
(Direktor: Prof. Dr. Dr. Ingolf Cascorbi)
Im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**DIE EXPRESSION DES INTERLEUKIN-1 UND DES
INTERLEUKIN-1 REZEPTORANTAGONISTEN IM
ISCHÄMISCHEN HIRNGEWEBE DER RATTE NACH
VORBEHANDLUNG MIT PIOGLITAZON**



Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
TORBEN GLATZ
aus Itzehoe

Kiel, 2009

1. Berichterstatter: Herr Priv.-Doz. Dr. Culmann – Institut für
Experimentelle u. klinische Pharmakologie

2. Berichterstatter: Frau Prof. Dr. Fölster-Holst – Klinik für Dermatologie,
Venerologie und Allergologie

Tag der mündlichen Prüfung: 14.02.2011

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 22.10.2010

Gez: Herr Prof. Dr. Dr. I. Cascorbi

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen

1 Einleitung

1.1 Der ischämische Schlaganfall	01
1.2 Interleukin-1 im zentralen Nervensystem	04
1.3 Der Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptor	07
1.4 Fragestellung	11

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere	13
2.2 Chirurgische Techniken	13
2.3 Neurologische Untersuchung	16
2.4 Perfusion und Gewebeentnahme	17
2.5 Zellkulturen	18
2.6 Western-Blot-Analyse	20
2.7 Immunfluoreszenzuntersuchung	25
2.8 Immunhistochemische Untersuchung	28
2.9 Messung der Laktatdehydrogenase in Zellkulturen	30
2.10 Statistische Analyse	30

3 Ergebnisse

3.1 Zerebrale Blutflussmessung	31
3.2 Neurologische Evaluation	32
3.3 Gewebeanalysen	33
3.4 Neuronale Zellkulturen	42

4 Diskussion **48**

5 Zusammenfassung **58**

6 Literaturverzeichnis **60**

Liste der Veröffentlichungen **69**

Danksagung **70**

Lebenslauf **71**

Abkürzungen

15d-PGJ ₂	15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J ₂
A.	Arteria
ATP	Adenosintriphosphat
CBF	zerebraler Blutfluss
COX-2	Cyclooxygenase 2
DNA	Desoxyribonukleinsäure
GFAP	saures Gliafaserprotein (<i>glial fibrillary acidic protein</i>)
ICAM-1	interzelluläres Adhäsionsmolekül 1
ICV	intrazerebroventrikulär
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid Synthase
IL	Interleukin
ICE	Interleukin-1 Konversionsenzym
IL-1RI	Interleukin-1 Rezeptor I
IL-1RII	Interleukin-1 Rezeptor II
IL-1Ra	Interleukin-1 Rezeptorantagonist
LDH	Laktatdehydrogenase
MCAO	Verschluss der Arteria cerebri media
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NF κ B	nuklearer Faktor κ B
NO	Stickstoffmonoxid
NaCl	Natriumchlorid
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NeuN	<i>neuronal nuclei</i>
PPAR	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor
PPRE	<i>peroxisome proliferator response element</i>
rhIL-1Ra	rekombinanter humaner IL-1 Rezeptorantagonist
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α

1 Einleitung

1.1 Der ischämische Schlaganfall

1.1.1 Epidemiologie, Ätiologie und Therapiekonzepte

In den westlichen Industrienationen sind Schlaganfälle die dritthäufigste Todesursache sowie die häufigste Ursache andauernder Invalidität im Alter. Etwa 200.000 Menschen erleiden in Deutschland jährlich einen Schlaganfall und 700.000 Menschen leben zurzeit mit den Folgen. Diese fallen für den Einzelnen sehr unterschiedlich aus. 15-20% aller Patienten versterben innerhalb kürzester Zeit. Von den Überlebenden bleibt ein Drittel schwerbehindert zurück, ein weiteres Drittel ist deutlich beeinträchtigt und nur bei einem Drittel bilden sich die Symptome annähernd vollständig oder vollständig wieder zurück.

Etwa 85% aller Schlaganfälle werden durch eine akute fokale Ischämie des Hirngewebes ausgelöst. Prädisponierend sind die typischen kardiovaskulären Risikofaktoren. Dazu gehören im Wesentlichen Bluthochdruck, Fettstoffwechselstörungen, Gerinnungsstörungen, Diabetes mellitus, das Rauchen sowie kardiale Erkrankungen, hohes Alter, männliches Geschlecht und genetische Prädisposition (Poeck & Hacke, 2006).

Die oft verheerenden Auswirkungen des ischämischen Schlaganfalles können auf Grund eines Mangels an effektiven Therapien nur unzureichend behandelt werden. Die einzige in der Klinik etablierte kausale Therapie der Hirnischämie ist die Revaskularisation des unterversorgten Stromgebietes. Dazu wird nach Ausschluss einer intrazerebralen Blutung in einem Zeitfenster von drei Stunden nach Beginn der Ischämie ein rekombinanter gewebespezifischer Plasminogenaktivator intravenös verabreicht, um den gefäßverschließenden Thrombus zu lysieren. Eine lokale intraarterielle Thrombolyse oder eine mechanische Rekanalisierung ist auch über dieses Zeitfenster hinaus möglich. Zusätzlich werden Maßnahmen vorgenommen, die dem neuronalen Zellschaden entgegenwirken: Sauerstofftherapie, Einstellung des Blutglukosespiegels unter 150 mg/dl sowie Infektbehandlung und Fiebersenkung (Poeck & Hacke, 2006).

Diese Maßnahmen sind neuroprotektiv, schützen also die Neurone vor dem Zelltod. Tierexperimentell hat der Eingriff in die im nächsten Abschnitt beschriebenen exzitotoxischen, inflammatorischen und apoptotischen Mechanismen ebenfalls neuroprotektive Effekte gezeigt (Dirnagl et al., 1999; Lee et al., 2000; Thal et al., 2005).

1.1.2 Pathogenese

Das Gehirn erhält etwa 15% des Herzzeitvolumens in Ruhe. Das entspricht einer Durchblutung von 60 – 80 ml/100 g/min. Dabei verbrauchen 100 g Hirngewebe 3,35 ml Sauerstoff pro Minute. Das Gehirn ist für seinen Metabolismus streng auf die Versorgung durch einen ununterbrochenen Blutfluss angewiesen, da es über geringe Sauerstoff- und Glukosevorräte verfügt und die neuronalen Zellen Energie nur durch die oxidative Phosphorylierung von Glukose gewinnen können. Unterschreitet die Hirndurchblutung den Grenzwert von 20 ml/100 g/min, so kommt es zu neurologischen Funktionsstörungen. Sinkt der zerebrale Blutfluss unter 8 ml/100 g/min, so ist die Infarktschwelle erreicht und die Neurone im betroffenen Gebiet gehen zu Grunde (Poeck & Hacke, 2006).

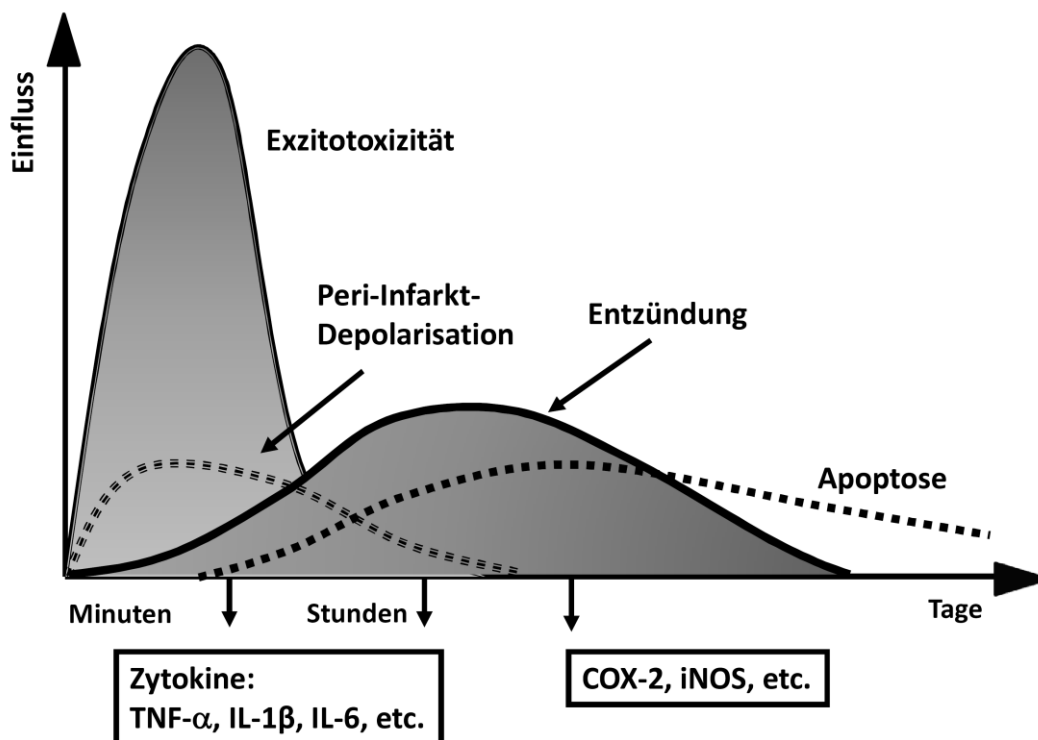


Abbildung 1.1: Gewebeschädigende Mechanismen nach der fokalen zerebralen Ischämie. Exzitotoxizität und Periinfarktdepolarisation setzen unmittelbar nach dem Infarktgeschehen ein und initiieren die verzögerten Prozesse der Entzündung und Apoptose. Die Abszisse illustriert den Zeitverlauf, die Ordinate den Einfluss der einzelnen Mechanismen auf den Zellschaden (Dirnagl et al., 1999).

Nach Okklusion einer versorgenden Arterie, lässt sich das Ischämiegebiet in zwei Bereiche unterteilen: Den Ischämiekern, in dem die Durchblutung jenseits der Infarktschwelle liegt und die Penumbra, die zusätzlich über Kollateralen aus anderen Hirngefäßen versorgt wird und Durchblutungswerte zwischen der Infarkt- und der Funktionsschwelle aufweist. Während der

Kern rasch nekrotisiert, bleiben die Zellen in der Penumbra vorerst vital. Hier führen nicht nur die Mangelversorgung sondern intrazelluläre Mechanismen und spezifische Zell-Zell Interaktionen zum neuronalen Zellsterben. Es handelt sich um einen akuten neurodegenerativen Prozess (Dirnagl et al., 1999). Die Mechanismen, die in der Penumbra zum Untergang der Neurone beitragen sind in Abbildung 1.1 dargestellt und wurden größtenteils in Tierversuchen untersucht. Ihre Rolle im menschlichen Gehirn ist noch nicht hinreichend geklärt.

Die Unterbrechung der Hirndurchblutung bewirkt einen intrazellulären ATP-Mangel, der zum Versagen der Ionenpumpen in der Zellmembran und damit zum Verlust des Ionengradienten über der Membran führt. Der Vorgang der Membrandepolarisation führt zur Öffnung spannungsabhängiger Kalziumkanäle, die den Einstrom von Kalziumionen in die Zelle ermöglichen. Kalzium als *second messenger* schädigt die Zellwand und initiiert eine übermäßige Ausschüttung erregender Neurotransmitter wie Glutamat. Die vom Glutamat beim Schlaganfall vermittelten Effekte werden im Folgenden beschrieben und unter dem Begriff der Exzitotoxizität zusammengefasst. Durch N-Methyl-D-Aspartat- (NMDA) und metabotrope Glutamatrezeptoren kommt es zum Einstrom von Kalzium-, Natrium- und Chloridionen und Wasser in die Zelle. Das resultierende Zellödem beeinträchtigt die Hirndurchblutung zusätzlich. Das Glutamat setzt zahlreiche Signalwege in Gang und erhöht den Stoffwechsel des Gewebes. Hält die Membrandepolarisation länger an, löst sich der Magnesium-Block der NMDA-Kanäle und eine Potenzierung der Exzitotoxizität resultiert (Lee et al., 2000).

In der Penumbra sind die Zellen in der Lage, ihre Membran auf Kosten eines weiteren Energieverbrauchs zu repolarisieren. Kommt es durch den anhaltenden Energiemangel zu einer erneuten Depolarisation, so spricht man von der Peri-Infarkt-Depolarisation, die kurz nach der Ischämie einsetzt, sich mehrmals in der Stunde wiederholen kann und durch zusätzliche Steigerung des Energiebedarfs des Hirngewebes zur Infarkterweiterung beiträgt. Mit längerer Latenz werden inflammatorische und apoptotische Prozesse in der Penumbra in Gang gesetzt. Kalzium, freie Radikale und der Sauerstoffmangel per se aktivieren proinflammatorisch wirksame Gene durch Induktion von Transkriptionsfaktoren wie dem nuklearen Faktor κ B (NF κ B), *hypoxia inducible factor 1*, *interferon regulatory factor 1* und *signal transducer and activator of transcription 3*. Die geschädigten Neurone produzieren proinflammatorische Zytokine, wie z.B. *platelet-activating factor*, Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Interleukin-1 β (IL-1 β) und Interleukin-6. Diese Botenstoffe bewirken unter anderem eine Überexpression von Adhäsionsmolekülen wie dem interzellulären Adhäsionsmolekül 1

(ICAM-1) und P- und E-Selektinen auf der Zelloberfläche des Endothels und ermöglichen so die Invasion von neutrophilen Granulozyten, Monozyten und Makrophagen aus dem Blut. Die Entzündungszellen initiieren gemeinsam mit Mikrogliazellen die inflammatorische Reaktion des Hirngewebes und halten diese aufrecht (Lee et al., 2000).

Die Entzündungsreaktion verstärkt den ischämischen Gewebeschaden und leistet einen entscheidenden Beitrag zum Neuronensterben (Lucas et al., 2006; Wang et al., 2007). Ein möglicher Mechanismus ist die Produktion schädlicher Mediatoren wie dem Stickstoffmonoxid (NO) in neutrophilen Granulozyten oder der Cyclooxygenase 2 (COX-2) in Neuronen, die zur Produktion von freien Radikalen, Superoxiden und toxischen Prostaglandinen beitragen.

Stark geschädigte Neurone in der Penumbra gehen durch Nekrose zugrunde, weniger geschädigte Zellen sterben den programmierten Zelltod (Apoptose). Effektormoleküle der Apoptose sind die Caspasen, die wichtige Moleküle des Zellstoffwechsels inaktivieren und Mediatoren des Zelluntergangs aktivieren. Die für die Caspasen codierenden Gene werden nach der fokalen Ischämie überexprimiert. Vor allem Caspase 1 und Caspase 3 scheinen eine entscheidende Rolle zu spielen. Über die Initiierung der apoptotischen Kaskade ist nur wenig bekannt. Das intrazelluläre Kalzium und freie Radikale setzen die Apoptose in Gang, indem sie die Ausschüttung von mitochondrialem Zytochrom C bedingen. Zytochrom C aktiviert den apoptotischen Komplex aus *apoptosis activating factor 1* und Procaspase 9, der Caspase 3 in Gang setzt (Dirnagl et al., 1999; Lee et al., 2000).

1.2 Interleukin-1 im zentralen Nervensystem

1.2.1 Regulation der Freisetzung und Signaltransduktion

Es existieren drei relevante Vertreter der Interleukin-1 Gruppe: IL-1 α , IL-1 β (gemeinsam im folgenden Text als IL-1 bezeichnet) und der endogene Interleukin-1 Rezeptorantagonist (IL-1Ra) (Rothwell, 1999). IL-1 β ist der im zentralen Nervensystem vorrangig exprimierte Agonist am Interleukin-1 Rezeptor (Touzani et al., 1999). In der Peripherie wird IL-1 vor allem von aktivierten Makrophagen gebildet, zentral sind auch Mikrogliazellen an der Produktion beteiligt.

Die genauen Mechanismen der Freisetzung von IL-1 sind wenig erforscht. Alle drei Zytokine werden als Vorläufermolekül gebildet. Pro-IL-1 α und Pro-IL-1Ra sind bereits biologisch aktiv, während Pro-IL-1 β durch das IL-1 Konversionsenzym (ICE) gespalten und damit

aktiviert werden muss. Das ICE ist das zuerst entdeckte Mitglied der Caspasen-Familie und wird daher auch als Caspase 1 bezeichnet. Kommt es zu einer Überexpression von IL-1 β , wird auch das ICE vermehrt gebildet (Rothwell, 1999; Rothwell & Luheshi, 2000).

IL-1 α , IL-1 β und IL-1Ra binden an den IL-1 Rezeptor Typ I (IL-1RI) und an den IL-1 Rezeptor Typ II (IL-1RII). Es existieren weitere Rezeptoren, an die IL-1 binden kann, allgemein gilt der IL-1RI aber als der wichtigste Vermittler der Wirkungen von IL-1. Er wird zentral vor allem von Neuronen, aber auch von Glia- und Endothelzellen exprimiert. Untersuchungen an Mäuse- und Rattenhirnen zeigen eine ubiquitäre Expression des Rezeptors (Touzani et al., 1999).

Der IL-1RI aktiviert intrazellulär eine komplexe Signalkaskade, an deren Ende die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B steht. Der Rezeptor assoziiert sich mit dem *accessory protein* und dem MyD88 Protein. Es kommt zur Aktivierung der *IL-1 receptor-associated-kinase 1* und 2, die über den *TNF receptor-associated-factor* und die *NF κ B inducing kinase* verschiedene andere Kinasen aktivieren, von denen einige den NF κ B-Inhibitor phosphorylieren und inaktivieren. Der NF κ B-Inhibitor löst sich daraufhin aus dem Komplex mit NF κ B, der nun im Zellkern als Transkriptionsfaktor aktiv werden kann. Weitere Proteinkinasen wie die mitogenaktivierte Proteinkinase oder die c-Jun N-terminale Kinase 1 ergänzen die Signaltransduktion durch IL-1 (Rothwell & Luheshi, 2000).

Der IL-1RII vermittelt keine Wirkung und aktiviert keine Signaltransduktionskaskade, da er nur über einen kleinen intrazellulären Anteil verfügt (Rothwell et al., 1999). Er agiert regulierend, indem er freies IL-1 inaktiviert und bindet den IL-1Ra mit nur geringer Affinität (Janeway et al., 2002).

1.2.3 Die Wirkung von Interleukin-1

Die Wirkung von IL-1 wurde vor allem an peripheren Entzündungsprozessen untersucht. IL-1 spielt eine entscheidende Rolle in der angeborenen Abwehr gegen pathogene Mikroorganismen und ist daher ein wichtiger Vermittler in der akuten und chronischen Entzündungsreaktion. Lokal kommt es zur Aktivierung von Leukozyten und Endothelzellen und zur Produktion von IL-6 und anderen Entzündungsmediatoren. Eine umschriebene Gewebsschädigung ermöglicht weiteren inflammatorischen Zellen den erleichterten Zugang. Systemisch wirkt IL-1 auf viele Bereiche des Körpers. Es mobilisiert Energiereserven aus dem Fettgewebe und der Muskulatur, aktiviert neutrophile Granulozyten im Knochenmark und induziert die Produktion von Akute-Phase-Proteinen in der Leber (Janeway et al., 2002).

Die Wirkung von IL-1 im zentralen Nervensystem ist weniger erforscht. Im gesunden Gehirn scheint IL-1 nur untergeordnete Aufgaben zu haben. Es ist an der Regulation des Tiefschlafs beteiligt und beeinflusst die neuronale und synaptische Plastizität des Gehirns.

Bei vielen pathologischen Zuständen des zentralen Nervensystems wird IL-1 vermehrt exprimiert (Rothwell, 1999). Seine Wirkungen sind: lokales Ödem, vaskuläre Schäden, Aktivierung von Glia, Induktion von Wachstumsfaktoren, Induktion der Phospholipase A₂, Induktion der COX-2, Induktion des β -Amyloid Vorläuferproteins, Induktion von Adhäsionsmolekülen und die Produktion von NO und freien Radikalen.

Zentraler Wirkort von IL-1 im Gehirn ist der Hypothalamus. Dort induziert es Fieber und die Ausschüttung von *corticotrophin releasing factor*. Damit beeinflusst IL-1 die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse und die Synthese von Glucocorticoiden. Die mit vielen Krankheiten assoziierten unspezifischen Symptome wie allgemeines Krankheitsgefühl, verminderter Appetit und reduzierte Nahrungsaufnahme scheinen ebenfalls durch IL-1 im Hypothalamus vermittelt zu werden (Hill et al., 1999; Legos et al., 2000; Rothwell & Luheshi, 2000; Rothwell, 2003).

Es gibt eindeutige Hinweise für die Beteiligung von IL-1 bei akuten neurodegenerativen Prozessen, wie sie z.B. im Rahmen eines Schlaganfalles oder Schädel-Hirn-Traumas auftreten. IL-1 allein wirkt nicht neurotoxisch, es verstärkt aber bereits entstandene Zellschäden (Touzani et al., 1999). Für eine Beteiligung von IL-1 bei der ischämisch bedingten Neurodegeneration im Tierversuch sprechen folgende Befunde: Fokale und globale Ischämien erhöhen den IL-1 Spiegel im geschädigten Gehirn von Versuchstieren; die Injektion von IL-1 in das zentrale Nervensystem verstärkt einen ischämischen Hirnschaden; die Hemmung der Freisetzung von IL-1 durch Deletion der für Caspase 1 kodierenden Genregionen verringert einen ischämischen Hirnschaden (Hara et al., 1997; Liu et al., 1999; Rothwell & Luheshi, 2000; Allan and Rothwell, 2001; Rothwell, 2003).

1.2.3 Der IL-1 Rezeptorantagonist

Der IL-1Ra bindet an den IL-1RI, ohne eine Signalkaskade zu aktivieren. Eine andere Funktion wird ihm nicht zugesprochen. Er wird physiologisch im Gehirn exprimiert (Touzani et al., 1999) und blockiert alle Wirkungen von IL-1 α und IL-1 β . Damit hat er als endogener Ligand eine hemmende Wirkung auf lokale Entzündungsprozesse und unterbindet die systemischen Inflammationsreaktionen, die IL-1 auslöst. Der rekombinant hergestellte IL-1Ra (rhIL-1Ra) stellt eine Option für die experimentelle Therapie zahlreicher pathologischer Zustände dar. In der Klinik wurde er zuerst unter dem Freinamen Anakinra zur Therapie der

rheumatoiden Arthritis eingesetzt. Dieser Ansatz hat sich aber als wenig effektiv gezeigt. Zurzeit wird er zur Therapie der Gicht verwendet (McGonagle et al., 2007).

Die Bedeutung von IL-1 bei der fokalen Ischämie macht den IL-1Ra zu einem möglicherweise effektiven Therapeutikum. Zentral wird er vor allem von Neuronen exprimiert. Eine erhöhte Expression im ischämischen Hirngewebe wurde nachgewiesen. Tierexperimente zeigen, dass die Blockade der IL-1 Wirkung mit dem IL-1Ra sich positiv auf das Schlaganfallvolumen und das neurologische Defizit auswirken. Auch exzitotoxisch herbeigeführte Zelldegeneration wird reduziert (Rothwell & Luheshi, 2000; Relton & Rothwell, 1992).

1.3 Der Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptor

1.3.1 Aufbau und Funktion

Der Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptor (PPAR) ist ein nuklearer Rezeptor, der in drei bekannten Formen vorliegt: PPAR α , PPAR γ und PPAR δ , auch als PPAR β bezeichnet. Alle Formen des Rezeptors fungieren als Transkriptionsfaktoren, das heißt sie aktivieren oder inhibieren die Transkription verschiedener Gene.

Um am Promotor des Zielgens, am sogenannten *peroxisome proliferator response element* (PPRE) aktiv werden zu können, muss der PPAR seinen Liganden binden und dann mit dem Retinoid X Rezeptor, dem Rezeptor der 9-cis Retinoidsäure, dimerisieren. Der Komplex aus PPAR, Ligand und Retinoid X Rezeptor kann dann an das PPRE binden, was die Transkription des Gens in Gang setzt oder bremst. Die Transkriptionsprodukte der durch PPAR kontrollierten Gene regulieren primär den Fettstoffwechsel der Zelle. PPAR α kommt vor allem im braunen Fettgewebe und in der Leber vor. Dort steigert er den Lipidmetabolismus. PPAR δ wird ubiquitär exprimiert und mit basalen Fettstoffwechselforgängen in Verbindung gebracht (Desvergne & Wahli, 1999; Kersten et al., 2000).

PPAR γ existiert in zwei Isoformen: PPAR γ 1 und PPAR γ 2. Die Expression von PPAR γ 1 ist vor allem auf braunes und weißes Fettgewebe, in geringem Maße auch auf Herz- und Skelettmuskel beschränkt. PPAR γ 2 kommt in verschiedenen Organen und Gewebetypen vor, z.B. dem zentralen Nervensystem, dem Darm und in spezifischen inflammatorischen und vaskulären Zellen (Staels & Fruchart, 2005; Michalik et al., 2006). Hauptsächlich bewirkt PPAR γ die Einlagerung von Triglyceriden in Adipozyten. Daher wird der Rezeptor im

Fettgewebe postprandial vermehrt exprimiert. Dort sorgt er für eine optimale Verwertung von Glukose und Fettsäuren. Zusätzlich begünstigt die Aktivierung von PPAR γ die Differenzierung der Adipozyten. Im Fastenzustand ist der PPAR γ erniedrigt. PPAR α stimuliert dann den Abbau von Fett in der Leber (Kersten et al., 2000).

1.3.2 Bedeutung der Agonisten am PPAR γ

Physiologische Agonisten am PPAR sind langkettige Fettsäuren und Eicosanoide (Derivate der Arachidonsäure), wie z.B. 15-Deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin J₂ (15d-PGJ₂), die an die verschiedenen Isotypen des Rezeptors mit unterschiedlicher Affinität binden. Therapeutisch werden die Thiazolidindione, auch als Glitazone bezeichnet, als selektive Agonisten am PPAR γ eingesetzt (Staels & Fruchart, 2005). Ebenfalls schwach agonistisch am PPAR γ wirken nichtsteroidale Antiphlogistika wie Ibuprofen (Desvergne & Wahli, 1999; Bordet et al., 2006).

Die Fähigkeit, Einfluss auf den Fettstoffwechsel des Organismus zu nehmen, macht den PPAR zum geeigneten Ziel in der Therapie vieler Zivilisationskrankheiten wie z.B. dem metabolischen Syndrom. Die Glitazone wie Rosiglitazon und Pioglitazon senken die Insulinresistenz in der Muskulatur, der Leber und dem Fettgewebe und eignen sich daher zur Therapie des Diabetes mellitus Typ II (Aktories et al., 2006). Eine Schlüsselrolle bei der Senkung der Insulinresistenz spielt die Skelettmuskulatur. Da ihr Besatz mit PPAR γ jedoch spärlich ist, wird ein indirekter Mechanismus diskutiert: Die Fettzellen werden allmählich gegen die anabole Wirkung von Insulin resistent, verwerten das Angebot an freien Fettsäuren also nicht. Zusätzlich produzieren sie Zytokine wie TNF- α oder IL-6. Die erhöhten Spiegel der freien Fettsäuren und der Entzündungsmediatoren im Blut bewirken die erhöhte Insulinresistenz von Skelettmuskulatur und Leber. Die Aktivierung der Adipozyten über PPAR γ wirkt diesem Mechanismus entgegen.

Klinische Studien konnten zeigen, dass sich die Therapie mit PPAR γ -Agonisten positiv auf die Folgeerkrankungen der Arteriosklerose auswirkt und zu einer Senkung der kardiovaskulären Mortalität führt (Staels & Fruchart, 2005). Für die Entstehung der Arteriosklerose sind neben veränderten Glukose- und Lipidspiegeln im Blut auch die Dysfunktion und die chronische Inflammation der Gefäßwand, vaskulärer Umbau und die Bildung von Schaumzellen von Bedeutung. Thiazolidindione hemmen die Proliferation von glatten Muskelzellen und steigern die NO-Expression des Endothels. NO bewirkt die Weitstellung der Gefäße und schützt in physiologischen Konzentrationen das Endothel vor toxischen Einflüssen. Die Expression von PPAR γ in den Schaumzellen der

arteriosklerotischen Plaques wird durch oxidiertes LDL induziert. Die Aktivierung des Rezeptors begünstigt in diesen Zellen den Cholesterolefflux, wirkt also dem Entstehungsprozess der Arteriosklerose entgegen.

Eine entscheidende Rolle im Pathomechanismus der Arteriosklerose spielt zusätzlich die inflammatorische Komponente. Aktivierter PPAR γ hemmt die Produktion inflammatorischer Zytokine wie TNF- α , IL-1 und IL-6 und steigert die Expression von Adiponektin, einem Protein, das entzündungshemmend und insulinsensitivierend wirkt. Bei einer Langzeitbehandlung von Patienten mit Rosiglitazon sinkt der Spiegel des Entzündungsmarkers C-reaktives Protein, der Matrix Metalloproteinase-9 und der COX-2 sowie verschiedener Marker der endothelialen Aktivierung (Staels & Fruchart, 2005).

1.3.3 PPAR γ im zentralen Nervensystem

PPAR γ kommt im zentralen Nervensystem in Neuronen, Astrozyten, Mikroglia und den versorgenden Blutgefäßen vor. Über die physiologischen Funktionen des Rezeptors ist nur wenig bekannt. Es wird angenommen, dass er den Fettstoffwechsel der Zellen reguliert und an der neuronalen Differenzierung und Plastizität beteiligt ist (Bordet et al., 2006).

Der PPAR γ spielt bei diversen pathologischen Zuständen des Gehirns eine Rolle, die mit akut neurodegenerativen und chronisch neurodegenerativen Prozessen verbunden sind. Zum Beispiel konnte die neuroprotektive Wirkung von Thiazolidindionen bei der fokalen zerebralen Ischämie im Tiermodell gezeigt werden. Bis zu vierzehn Tagen nach dem ischämischen Insult ist die Expression von PPAR γ im geschädigten Hirngewebe gesteigert. Maximalwerte werden vierundzwanzig Stunden nach dem Ereignis erreicht. Die Aktivierung des Rezeptors wirkt sich protektiv auf das Schlaganfallvolumen und das neurologische Defizit der behandelten Tiere aus (Zhao et al., 2005b; Zhao et al., 2006b; Lin et al., 2006; Ou et al., 2006; Patzer et al., 2008). Die Wirkungen der Thiazolidindione auf das Gefäßsystem addieren sich mit direkten zerebralen Mechanismen zu dem beschriebenen neuroprotektiven Effekt. Die intrazerebroventrikuläre (ICV) Applikation eines PPAR γ -Agonisten wirkt dabei vergleichbar effektiv wie die systemische Behandlung (Zhao et al., 2006a; Zhao et al., 2005b). Dies belegt die Bedeutung des zerebralen PPAR γ nach einem Schlaganfall.

Die Stimulation des Rezeptors führt zu einer Reduktion des oxidativen Stresses in dem ischämischen Kortexareal. Die Expression der COX-2 und der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) ist erniedrigt (Pereira et al., 2005; Sundararajan et al., 2005; Zhao et al., 2006b). Es werden erhöhte Spiegel antioxidierender Enzyme wie der

CuZn-Superoxiddismutase gefunden. Insgesamt resultiert daraus eine geringere Belastung des geschädigten Gewebes mit freien Sauerstoffradikalen (Shimazu et al., 2005).

Zu den antiinflammatorischen Effekten des aktivierten PPAR γ zählen die verminderte Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1, der Matrix-Metalloproteinase-9 und verschiedener inflammatorischer Zytokine, z.B. TNF- α , IL-6 und IL-1 β . Es kommt zu einer verminderten Akkumulation von Makrophagen und mikroglialen Zellen und zu einer Hemmung des Transkriptionsfaktors NF κ B und der p38-mitogenaktivierten Proteinkinase. PPAR γ -Agonisten vermindern den neuronalen Schaden durch Reduktion des oxidativen Stresses und Hemmung der beteiligten Entzündungsreaktionen. Ein Zusammenhang zwischen der Behandlung mit Thiazolidindionen und einer vermehrten Expression des IL-1Ra wurde an synovialen Fibroblasten der Ratte beobachtet (Moulin et al., 2005). Auch zentral konnte eine Verbindung zwischen PPAR γ und dem IL-1Ra nachgewiesen werden. Systemisch appliziert steigert der unselektive PPAR γ -Agonist Ibuprofen die postischämische Expression des Antagonisten in aktivierten mikroglialen Zellen und das Überleben von Neuronen im Hippocampus (Park et al., 2005). Detaillierte Studien zu der Bedeutung von Thiazolidindionen bei der Regulation des IL-1Ra nach dem ischämischen Schlaganfall wurden von dieser Arbeitsgruppe aber nicht durchgeführt.

Die Effektivität der Behandlung konnte bisher nur bei Applikation des PPAR γ -Agonisten vor oder während der Ischämie gezeigt werden (Culman et al., 2007). Ob eine Behandlung nach Beginn des Schlaganfalles erfolgreich sein kann, bleibt fraglich (Zhao et al., 2005a).

In-vitro-Versuche konnten weitere Mechanismen der durch PPAR γ vermittelten Neuroprotektion aufzeigen. PPAR γ -Agonisten wirken in Zellkulturen dem exzitotoxisch induzierten Zelltod entgegen. Sie wirken auch noch zu einem Applikationszeitpunkt, an dem NMDA-Antagonisten bereits wirkungslos sind. Sie verhindern die Sekretion neurotoxischer Moleküle durch Makrophagen und Mikroglia. Zudem haben PPAR γ -Liganden in verschiedenen Modellen eine Beteiligung an der Differenzierung von Neuronen gezeigt. Die strukturelle und funktionale Regeneration der Neurone nach der Ischämie kann zu dem beobachteten neuroprotektiven Effekt der Glitazone beitragen (Culman et al., 2007).

1.4 Fragestellung

Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass PPAR γ -Agonisten eine neuroprotektive Wirkung bei der experimentellen fokalen Ischämie beim Tier haben und die postischämische Inflammation hemmen (Bordet et al., 2006; Culman et al., 2007).

Einer der wichtigsten Mediatoren der postischämischen Inflammation ist das Zytokin IL-1 β . Es wird im ischämischen Hirngewebe vermehrt exprimiert und aktiviert über die Bindung an den IL-1RI die Transkription zahlreicher inflammatorischer Zytokine und neurotoxischer Stoffe, die für den fortschreitenden Gewebsschaden und neuronalen Zelltod verantwortlich sind. Der IL-1Ra bindet als endogener Ligand an den IL-1RI, ohne die Signaltransduktion zu aktivieren. Sämtliche Effekte von IL-1 β , einschließlich der postischämischen Inflammationsreaktionen, werden gehemmt. Eine veränderte Expression von IL-1 β und dem IL-1Ra durch Aktivierung des PPAR γ kann zu den neuroprotektiven Effekten von Pioglitazon beitragen. Ziel dieser Studie war es, die Bedeutung des PPAR γ -Agonisten Pioglitazon für die Expression von IL-1 β , IL-1RI und IL-1Ra im ischämischen neuronalen Gewebe nach einer fokalen zerebralen Ischämie zu untersuchen.

Um eine effektive Stimulation des zentralen PPAR γ zu erzielen, wurde normotensiven Wistar-Ratten mittels osmotischer Minipumpen fünf Tage lang der selektive PPAR γ -Agonist Pioglitazon intrazerebroventrikulär infundiert. Die Kontrollgruppe wurde mit Vehikel behandelt. Zur Induktion der temporären fokalen zerebralen Ischämie wurde die rechte A. cerebri media der Tiere verschlossen und nach 90 min wieder eröffnet. Der neurologische Status wurde anschließend einmal täglich kontrolliert und das Hirngewebe für die weitere Untersuchung 24 bzw. 48 h nach der Induktion der Ischämie entnommen.

Im frontoparietalen Kortex am Rand des Ischämiekerns wurde die Expression von IL-1 β , IL-1RI und IL-1Ra mittels der Western-Blot-Analyse quantifiziert und Anzahl und Typ der Zellen, die die Zytokine und den Rezeptor exprimieren, bestimmt. Primäre kortikale Zellkulturen wurden angelegt, um festzustellen, ob die beobachteten Effekte von Pioglitazon auf die Produktion von IL-1Ra in Neuronen über die Aktivierung von PPAR γ vermittelt werden. Zu diesem Zweck wurde neben Pioglitazon auch der selektive PPAR γ -Antagonist GW 9662 verwendet. Zusätzlich wurde der selektive PPAR δ -Agonist GW 501516 eingesetzt, um eine mögliche Beteiligung von PPAR δ an der Wirkung von Pioglitazon auf Expression des IL-1Ra zu klären. Zur Untersuchung der Bedeutung von Pioglitazon für die IL-1Ra Produktion unter pathologischen Bedingungen wurden die primären Neurone mit Pioglitazon

allein oder mit Pioglitazon in Kombination mit dem PPAR γ Antagonisten GW 9662 vorbehandelt. Beide Ansätze wurden mit NMDA stimuliert. Die Stimulation von NMDA Rezeptoren, als Model der postischämischen Exzitotoxizität, schädigt die Neurone und induziert deren Absterben. Die Expression des IL-1Ra wurde mittels der Western-Blot-Analyse erfasst. Die Untersuchung der neuroprotektiven Effekte der PPAR γ -Aktivierung erfolgte durch Messung der Laktatdehydrogenase, die als Indikator für den neuronalen Zelltod dient.

2 Material und Methoden

Die Herkunft der verwendeten Materialien ist in Klammern angegeben. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Chemikalien und Verbrauchsmaterialien von den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma (Steinheim) oder Roth (Karlsruhe) bezogen.

2.1 Versuchstiere

4% Chloralhydrat: 40 g Chloralhydrat (Merck, Darmstadt) wurden in 1 l destilliertem Wasser gelöst.

Für die Versuchsreihe wurden ausschließlich männliche Wistar-Ratten mit einem Gewicht zwischen 220 g und 250 g verwendet. Die Tiere stammten aus der Zucht des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein (Campus Kiel) und wurden unter kontrollierten Bedingungen aufgezogen und gehalten. Dabei wurden Raumtemperatur und Luftfeuchtigkeit überwacht und ein simulierter Tag- und Nachtzyklus von je 12 h aufrecht erhalten. Die Tiere hatten permanent freien Zugang zu Futter und Wasser.

Vor jedem operativen Eingriff wurden die Ratten in eine tiefe Narkose versetzt. Dazu wurde Chloralhydrat in einer Dosierung von 400 mg/kg Körpergewicht intraperitoneal injiziert.

Für die Gewinnung der neuronalen Zellkulturen wurden neugeborene Ratten bis zu 24 h nach der Geburt verwendet.

2.2 Chirurgische Techniken

2.2.1 Implantation der osmotischen Minipumpen

Pioglitazon (Cayman, Ann Arbor, Mi, USA): Eine Lösung der Konzentration 6 mM wurde mit Dimethylsulfoxid und Natriumchlorid (NaCl) im Verhältnis 1:1 angefertigt.

Zur ICV-Applikation von Pioglitazon wurden den Tieren fünf Tage vor Versuchsbeginn osmotische Minipumpen der Firma ALZET (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Model Nr. 2002) in eine Tasche am Rücken implantiert. Die Pumpen bestehen aus zwei Kompartimenten: Ein mit hyperosmolarer Lösung gefülltes Kompartiment zieht durch eine semipermeable Membran Wasser aus dem umliegenden Gewebe an. Durch den entstehenden

Druck werden pro Stunde 3 nmol Pioglitazon (0,5 µl) aus einem zweiten Kompartiment über eine Kanüle in den linken lateralen Ventrikel der Versuchstiere infundiert (Theeuwes & Yum, 1976). Für die mit Vehikel behandelte Gruppe wurde NaCl im Verhältnis 1:1 mit Dimethylsulfoxid appliziert. Vor der Verwendung wurde die Pumpe 20 – 24 h in isotoner Kochsalzlösung bei 37°C gelagert, um den Pumpvorgang zu starten und die Funktionsfähigkeit der Pumpen zu testen.

Zur Implantation der Pumpen wurde ein Polyethylen-Schlauch (PP-20) in den linken lateralen Ventrikel der Tiere eingebracht. Dazu wurde ein stereotaktisches Gerät (David Kopf Instruments, Tujunga, USA) verwendet. Der Kopf der Ratte wurde in die Vorrichtung eingespannt und der Schädel mit einer medialen Inzision freigelegt. Das Gewebe wurde mit einer feinen Schere und einem Wattestäbchen abgetragen. Zusätzlich wurde Wasserstoffperoxid verwendet, um die Blutung zu minimieren. Mittels eines feinen Bohrers wurde ein Loch für den Schlauch 0,6 mm kaudal und 1,3 mm lateral von Bregma (Kreuzungspunkt der Sutura sagittalis mit der Sutura coronaris) in den Schädel gebohrt. Die Pumpe wurde mittels eines Polyethylen-Schlauchs (PP-60) mit einer rechtwinkligen Metallkanüle (Größe: 21 Gauge) verbunden, die 5 mm tief (von der Schädeloberfläche gemessen) in den Ventrikel eingebracht und mit Zahnzement fixiert wurde. Die Pumpe wurde in eine Tasche auf dem Rücken der Ratten implantiert und die Wunde genäht (Dai et al., 1999).

2.2.2 Messung der Hirndurchblutung

Die häufigsten Komplikationen beim experimentellen Verschluss der A. cerebri media sind eine unzureichende Okklusion oder eine Ruptur der Arterie. Während des Eingriffs ist daher eine Überwachung der Durchblutung des Gebietes, das von der Arterie versorgt wird, unerlässlich. Mit dem Periflux System 5000 der Firma Perimed (Järfälla, Schweden) wurde der Blutfluss kontinuierlich gemessen (Schmid-Elsaesser et al., 1998). Das Prinzip der Flussmessung beruht auf dem Doppler-Effekt.

Die Halterung für die Lasersonde wurde gemeinsam mit der osmotischen Pumpe mit Hilfe des stereotaktischen Gerätes auf der Schädeloberfläche implantiert. Mit Zahnzement wurde eine Plastikhülse (innerer Durchmesser: 1 mm, äußerer Durchmesser: 2 mm) 1 mm kaudal und 6 mm rechts von Bregma am Schädel der Ratte befestigt. Der Knochen wurde an dieser Stelle mit einem Bohrer leicht eingekerbt, um die Messung zu erleichtern.

2.2.3 Herstellung des Okklusion-Monofilaments

Die Spitze eines Fadens (4/0, 1,5 Metrik Monofilament, ETHILON, Johnson & Johnson MEDICAL GmbH, Norderstedt) wurde mit einer Silikonschicht überzogen (Provil, Bayer AG, Leverkusen), um den Durchmesser auf den distalen 5 mm des Fadens auf etwa 0,25 mm zu erweitern. Vor Beginn der Operation ließ man die Silikonpaste antrocknen.

2.2.4 Verschluss der A. cerebri media mit Reperfusion

Es wurde ein intraluminaler Verschluss der Arterie mit nachfolgender Reperfusion durchgeführt (Koizumi et al., 1986; Dai et al., 1999). Durch einen 2 cm langen Schnitt medial am Hals der Ratte wurden die A. carotis communis und die begleitende Vena jugularis interna und Nervus vagus freigelegt. Die A. carotis communis wurde frei präpariert, die A. carotis externa an ihrem Abgang aufgesucht und mit einer 4-0 Naht ligiert. Anschließend wurde auch die A. carotis communis proximal ligiert. Dies führt zu einer Reduktion des zerebralen Blutflusses um bis zu 50% des Ausgangswertes, verursacht aber im Gehirn der Ratte, das über eine hervorragend kollateralisierte Blutversorgung verfügt, keine Ischämie (Nagasawa & Kogure, 1989).

Dann wurde ein Faden um das distale Ende der Arterie gespannt, um den Blutrückfluss zu unterbinden. Durch einen Schnitt zwischen der proximalen Ligatur und dem distalen Haltefaden wurde der vorbereitete Silikonfaden vorsichtig etwa 17 mm weit durch die A. carotis interna in die A. cerebri media vorgeschoben, bis der zerebrale Blutfluss im rechten frontoparietalen Kortex auf unter 25% des Ausgangswertes gefallen war. Das Monofilament wurde durch eine feste Ligatur an der A. carotis communis fixiert, verblieb 90 min in der Arterie und wurde dann entfernt, was zur Reperfusion des betroffenen Hirnareals führte. Abschließend wurde der Hautschnitt vernäht. Alle Arbeitsschritte erfolgten unter dem Wild M3Z Mikroskop (Leica Mikrosysteme, Wetzlar). Die Körpertemperatur der Tiere wurde mit einer Heizdecke konstant auf 37°C gehalten.

Eine Gruppe Tiere wurde *sham*-operiert. Es wurde also keine zerebrale Ischämie verursacht, sondern lediglich eine „Placebo-Operation“ durchgeführt. Die Ratten wurden narkotisiert. Der Schnitt am Hals wurde gemacht und die Arterie dargestellt. Nach 90 min wurde die Wunde verschlossen.

2.3 Neurologische Untersuchung

Die Versuchstiere wurden 24 und 48 h nach dem Schlaganfall neurologisch untersucht. Die Auswertung wurde von einem unvoreingenommenen Mitarbeiter ausgeführt. Die Bewertung des neurologischen Defizits erfolgte nach dem in Tabelle 2.1 beschriebenen Schema (Garcia et al., 1995).

Test	0	1	2	3
Spontanaktivität (5 min im Käfig)	Keine Bewegung	Kaum Bewegung	Bewegung zu < 3 Wänden	Bewegung zu allen 4 Wänden
Bewegungssymmetrie (alle Gliedmaßen)	Li.: Keine Bewegung	Li.: Wenig Bewegung	Li.: Langsame Bewegung	Symmetrische Bewegung
Bewegungssymmetrie der vorderen Extremität	Li.: Kein Strecken	Li.: Versuch des Streckens	Li: Strecken verringert	Symmetrisches Strecken
Klettern (Käfigwand)		Klettern nicht möglich	Li.: Schwächer als rechts	Normales Klettern
Sensibilität (Rumpf)		Li.: Keine Reaktion	Li.: Schwache Reaktion	Symmetrische Reaktion
Sensibilität (Tasthaare)		Li.: Keine Reaktion	Li.: Schwache Reaktion	Symmetrische Reaktion

Tabelle 2.1: Neurologische Auswertung der Ratten nach Verschluss der A. cerebri media Punktbewertung für die verschiedenen motorischen und sensorischen Leistungen der Ratte mit einer Gesamtpunktzahl von 3-18 Punkten (Garcia et al., 1995). Der Schlaganfall betraf die rechte Hemisphäre des zerebralen Kortex, die Ausfälle wurden daher an der linken (Li.) Körperhälfte beobachtet.

Die spontane Aktivität des Tieres wurde für 5 min im Käfig beobachtet. Zur Untersuchung der Bewegungssymmetrie der Gliedmaßen und des Ausstreckens der Vorderpfoten hielt man die Ratte an ihrem Schwanz in die Luft. Die Kletterfähigkeit der Ratte wurde an einem Käfiggitter quantifiziert. Die Sensibilitätsprüfung erfolgte durch beidseitiges Berühren von Rumpf und Tasthaaren mit einem Holzstäbchen.

Spontanaktivität und Bewegungssymmetrie wurden jeweils mit 0 bis 3 Punkten, Klettern und Sensibilität mit 1 bis 3 Punkten bewertet. Die Quantifizierung des neurologischen Defizits geschah durch Addition aller Punkte. Bewertet wurde somit auf einer Skala von 3 bis 18 Punkten, wobei 3 Punkte dem stärksten neurologischen Defizit und 18 Punkte dem Befund einer vollständig gesunden Ratte entsprachen.

2.4 Perfusion und Gewebeentnahme

10×PBS (Phosphat-gepufferte Salzlösung): 80 g NaCl, 11,5 g Na₂HPO₄, 2 g KH₂PO₄ und 2 g KCl wurden in 800 ml destilliertem Wasser gelöst. Nach Einstellen des pH-Wertes mit HCl oder NaOH auf 7,4 wurde die Lösung mit destilliertem Wasser auf 1000 ml aufgefüllt. Als Arbeitslösung wurde eine 1:10 Verdünnung dieser Lösung verwendet (1×PBS).

4% Paraformaldehyd: 40 g Paraformaldehyd wurden in 900 ml PBS bei 60°C gelöst; anschließend wurde die Lösung mit destilliertem Wasser auf 1000 ml aufgefüllt und im Kühlschrank aufbewahrt.

30% Saccharose: 30 g Saccharose wurden mit destilliertem Wasser auf 100 ml aufgefüllt.

Einen Tag (*Sham*: 8, Vehikel: 17, Pioglitazon: 15) bzw. zwei Tage (*Sham*: 8, Vehikel: 20, Pioglitazon: 18) nach dem Schlaganfall wurden die Ratten erneut narkotisiert. Für die

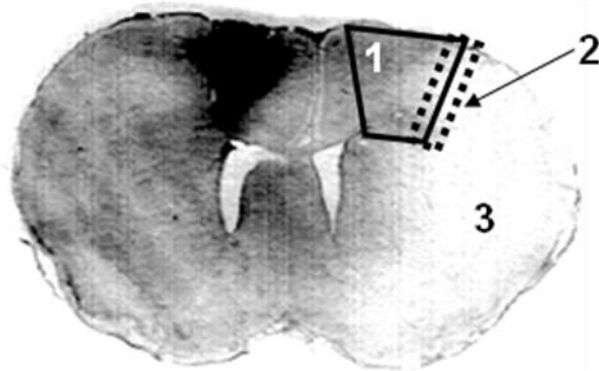


Abbildung 2.1: Gewebeentnahme an einem Rattengehirn

Gezeigt wird ein koronarer Schnitt (Bregma – 1 mm) in Ansicht von posterior. Der Ischämiekern (3) stellt sich blass dar. Die Schnitte für die Immunfluoreszenz- und die Immunhistochemische Untersuchung wurden aus der Area 2, die Proben für die Western-Blot-Analyse aus der Area 1 entnommen.

Immunfluoreszenzuntersuchung und die immunhistochemische Untersuchung wurden sie nacheinander erst mit 100 ml 1×PBS und anschließend sofort mit 100 ml 4% Paraformaldehyd transkardial perfundiert. Die Gehirne wurden entnommen, 24 h in 4%iger Paraformaldehydlösung nachfixiert, für drei Tage bei 4°C in 30%iger Saccharoselösung eingelegt, eingefroren und in dem CM3050 S Cryostat (Leica Mikrosysteme, Wetzlar) geschnitten.

Für die Immunfluoreszenzuntersuchung wurden serielle koronare Schnitte von 8 µm Dicke von Bregma ± 0 mm bis

Bregma – 2 mm angefertigt, die auf Objektträgern mit Gelatine beschichtet wurden. Für die immunhistochemische Untersuchung wurden 40 µm dicke Schnitte von Bregma ± 0 mm bis Bregma – 1,3 mm hergestellt, die in 24-well-Platten in 0,1%iger Paraformaldehydlösung bis zur Verwendung bei 4°C gelagert wurden. Die Gehirne für die Western-Blot-Analyse wurden ohne vorherige Perfusion entnommen. Unter dem Wild M3Z Mikroskop (Leica Mikrosysteme,

Wetzlar) wurden Gewebeproben aus dem ischämischen Bereich des rechten frontoparietalen Kortex (Abbildung 2.1) gewonnen und mit flüssigem Stickstoff eingefroren.

Bei der anatomischen Beurteilung richtete man sich nach dem Atlas von Paxinos & Watson (1986) mit Darstellungen von Rattengehirnen.

2.5 Zellkulturen

Kulturmedium: Zu dem neurobasalen Medium (Invitrogen, Karlsruhe) wurde 0,5 mM l-Glutamin, 2% B-27 Ergänzungsmittel (Invitrogen, Karlsruhe) und 50 IU/ml Penicillin/Streptomycin (Invitrogen, Karlsruhe) gegeben.

Die Schalen zur Zellkultivierung wurden mit einer 0,1 mg/ml Lösung von Poly-L-Lysine (Molekulargewicht 70,000 bis 150,000) eine Stunde bei 37°C inkubiert, mit hochreinem Wasser gereinigt und trockneten anschließend für eine Stunde.

Die neuronalen Zellen wurden aus der Hirnrinde neugeborener Ratten (bis zu 24 h nach Geburt) isoliert. Die Gehirne wurden entnommen und auf steriles Filterpapier gelegt. Membranen und Gefäße wurden mit dem Papier abgewischt. Das Gewebe von zehn Gehirnen wurde in eine 60 mm Schale transferiert und in Stücke von weniger als 1 mm³ geteilt. Nach der 20-minütigen Inkubation mit 4 bis 8 ml einer 0,25% Trypsin-Lösung bei 5% CO₂ und 37°C wurde das Gewebe zehnmal mit einem Glasstab gemörsert, der zuvor in einer Flamme sterilisiert worden war. Die Zellen wurden nun dreimal für 4 min in einer Zentrifuge bei 1000 Umdrehungen pro Minute und 4°C in dem neurobasalen Medium gewaschen und in 3 ml des Mediums suspendiert. Nach 3 min Wartezeit hatte sich das ungelöste Material abgesetzt. Der Überstand wurde abpipettiert und in 15 ml Kulturmedium gegeben.

Für die Immunfluoreszenzuntersuchung wurden 500 µl mit der Konzentration 1,5x10⁵ Zellen pro *well* auf eine 4-*well* Platte transferiert und für die Western-Blot-Analyse 2 ml mit 1x10⁶ Zellen in einer Kulturschale (3,5 cm) angelegt. Die Zellen wurden für 3 h inkubiert. Anschließend folgten ein Austausch des Mediums und die Inkubation bei 5% CO₂ und 37°C. Nach 24 h wurde 1-γ-D-Arabinofuranosyl-Cytosin (5 µM) zugegeben, um das Wachstum nicht neuronaler Zellen zu hemmen. Alle drei bis vier Tage wurde nun die Hälfte des Mediums gewechselt. Nach neun Tagen erfolgte die Kontrolle des neuronalen Zellgehalts der Kulturen und anschließend die Stimulation der Zellen. Es wurden vier verschiedene Experimente durchgeführt:

1. Western-Blot-Untersuchung des PPAR γ unter basalen Bedingungen bei Behandlung mit Pioglitazon: Eine Kontrollkultur erhielt Vehikel, eine Kultur erhielt Pioglitazon (10 μ M).

2. Western-Blot-Untersuchung des IL-1Ra unter basalen Bedingungen bei Behandlung mit Pioglitazon und Antagonisierung des PPAR γ : Eine Kontrollkultur erhielt Vehikel, eine Kultur erhielt Pioglitazon (10 μ M) und eine dritte GW 9662 (1 μ M) (Cayman, Ann Arbor, Mi, USA) und 30 min später Pioglitazon.

3. Western-Blot-Untersuchung des IL-1Ra unter basalen Bedingungen bei Aktivierung des PPAR δ : Eine Kontrollkultur erhielt Vehikel, zwei Zellkulturen wurden mit verschiedenen Konzentrationen (0,1 μ M und 1 μ M) des selektiven PPAR δ -Agonisten GW 501516 (Cayman, Ann Arbor, Mi, USA) behandelt.

4. Messung der Laktatdehydrogenase, Immunfluoreszenzuntersuchung (PPAR γ und IL-1Ra) und Western-Blot-Analyse des IL-1Ra an NMDA-stimulierten Zellen bei Behandlung mit Pioglitazon und GW 9662: Eine Kontrollkultur erhielt Vehikel, eine Kultur wurde mit N-Methyl-D-Aspartat (NMDA, 100 μ M) versetzt, um exzitotoxische Effekte zu simulieren, eine dritte Kultur wurde erst mit Pioglitazon (10 μ M) vorbehandelt und 30 min später mit NMDA stimuliert, eine vierte erhielt den PPAR γ -Antagonisten GW 9662 (Cayman, Ann Arbor, Mi, USA) in der Konzentration von 1 μ M, nach 30 min Pioglitazon und nach weiteren 30 min NMDA.

Nach 24 Stunden wurden die Zellen aus der Kulturschale für die Western-Blot-Analyse entnommen, die Proteine wurden wie unten beschrieben isoliert und quantifiziert. Jedes Experiment wurde fünf bis sieben Mal durchgeführt.

Die *well*-Platten wurden nach 24 Stunden mit PBS bei Zimmertemperatur gewaschen und mit 4% Paraformaldehyd bei Raumtemperatur für eine Stunde fixiert. Die Immunfluoreszenzuntersuchung wurde wie unten beschrieben durchgeführt.

2.6 Western-Blot-Analyse

2.6.1 Proteinisolierung

1×Chaps Lysepuffer: Zu 0,5 ml 10×Chaps Lysepuffer (Cell Signal Technology, Danvers, Ma, USA) wurden 0,4 ml Complete Inhibitor (Roche, Mannheim), 60 µl Phosphatase Inhibitor Cocktail II (Sigma-Aldrich, München) und 25 µl DTT (1 M, 200×, Signal Technology, Danvers, Ma, USA) und 4,015 ml destilliertes Wasser gegeben.

Zur Proteinisolation wurden die Gewebe- bzw. Zellproben mit 200 µl 1×Chaps Lysepuffer unter ständigem Kühlen mit flüssigem Stickstoff vorsichtig gemörsert. Durch dreimaliges Einfrieren der Proben mit flüssigem Stickstoff, zwischenzeitliche Erwärmung auf 37°C und Behandlung mit Ultraschall (zweimal 5 s) wurden die Lysate homogenisiert. Nach anschließendem Zentrifugieren (15 min bei 13 000 Umdrehungen pro Minute und 4°C) wurde der Überstand abpipettiert und bei – 80°C bis zur weiteren Verwendung tiefgefroren.

2.6.2 Messung des Proteingehalts

BCA Protein Assay Kit (Pierce, Rockford, IL, USA): Der Albumin Standard mit einer Albumin-Konzentration von 2 mg/ml in NaCl wurde mit destilliertem Wasser verdünnt, so dass Standardlösungen der Konzentration 0, 25, 50, 125, 250, 500 und 1000 µg/ml entstanden. Die Reaktionslösung wurde aus Lösung A und Lösung B im Verhältnis 50:1 kurz vor Gebrauch hergestellt.

Die Standardlösungen und die zu messenden Proben (Verdünnung 1:50 mit destilliertem Wasser) wurden mit 1 ml des Proteinassay-Farbstoffkonzentrat 30 min bei 37°C im Wärmeblock inkubiert. Anschließend erfolgte die photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration bei einer Wellenlänge von 562 nm. Jede Proteinprobe wurde doppelt gemessen. Es wurde das Hitachi U-2000 Spektrophotometer verwendet. Mit Hilfe der Standardlösungen (bekannte Proteinkonzentration) ließ sich eine Gleichung der Form $C = a \times A + b$ (C: Proteinkonzentration; A: Absorption) etablieren mit der die Proteinkonzentrationen der Probenlösungen errechnet werden konnte. Mit $V = M/C$ (V: Volumen; M: Masse; C: Proteinkonzentration) konnte man nun das für die Gelelektrophorese zu verwendende Lösungsvolumen (mit einer Proteinmenge von 30 µg) bestimmen.

2.6.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

2.6.3.1 Prinzip

Die Gelelektrophorese mit Natriumdodecylsulfat (SDS) ist eine Methode, um Proteine nach deren Molekulargewicht aufzutrennen. Das Polyacrylamidgel dient als hochvernetzter Träger und wird direkt vor dem Gebrauch durch Polymerisation von Monomeren hergestellt. Es werden zwei miteinander verbundene Gelabschnitte eingesetzt. Im sogenannten Sammelgel werden die Proteine zu einer Bande komprimiert. Im zweiten Abschnitt, dem Trenngel, werden die Proteine nach ihrem Molekulargewicht getrennt. Das Verhältnis von Acrylamid zu Polyacrylamid bestimmt die Porengröße des Gels und kann variiert werden, um eine bestimmte Auftrennung der Proteine zu erreichen. Damit die Proteine nach ihrer Größe aufgetrennt werden können, müssen sie in eine wässrige Lösung mit SDS gegeben werden, um ihre Eigenladung zu überdecken. Pro 1 g Protein lagern sich 1,4 g SDS an die Proteinketten an und überlagern mit ihrer negativen Ladung so die Eigenladung der Proteine. Die stark negativ geladenen Proteine wandern in einem elektrischen Feld zur Anode. Die Beweglichkeit der Proteine in diesem elektrischen Feld stellt eine lineare Funktion ihrer Molekulargewichte dar. Große Proteine wandern langsamer durch das Gel als kleinere Proteine.

2.6.3.2 Durchführung

4×Trenngelpuffer: 150 ml 2 M Trihydroxymethylaminomethan (Tris) mit einem pH von 8,8 (36,34 g Tris in 150 ml destilliertem Wasser) und 8 ml einer 10%igen SDS-Lösung (10 g SDS in 100 ml destilliertem Wasser) wurden mit 42 ml destilliertem Wasser gemischt.

4×Sammelgelpuffer: 92 ml destilliertes Wasser wurden mit 100 ml 1 M Tris mit einem pH von 6,8 (12,1 g Tris in 100 ml destilliertem Wasser) und 8 ml einer 10%igen SDS-Lösung gemischt.

Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung: Es wurde die 40%ige Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (39:1) der Firma Bio Rad Laboratories (München) verwendet.

10×Elektrophoresepuffer: 30 g Tris, 144 g Glycin und 100 ml einer 10%igen SDS-Lösung wurden auf 1000 ml mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Als Arbeitslösung wurde eine 1:10 Verdünnung dieser Lösung verwendet.

5×Probenpuffer: 0,6 ml 1 M Tris mit einem pH von 6,8, 5 ml einer 50% Glycerollösung (50 ml Glycerol plus 50 ml destilliertes Wasser), 2 ml einer 10%igen SDS-Lösung, 0,5 ml β -Mercaptoethanol und 1 ml einer 1% Bromphenolblau-Lösung wurden gemischt.

Trenngel (12% für 1,5mm Plattenabstand): 3,0 ml der Acrylamidlösung, 4,5 ml destilliertes Wasser und 2,5 ml des 4×Trenngelpuffers wurden gemischt. Zur Einleitung der Polymerisation wurden 10 μ l Tetramethylethyldiamin (TEMED) und als Katalysator 100 μ l einer 10%igen Ammoniumperoxodisulfatlösung (APS) zugesetzt.

Sammelgel (12% für 1,5 mm Plattenabstand): 0,5 ml Acrylamid-Lösung, 2,47 ml destilliertes Wasser und 1 ml 4×Sammelgelpuffer wurden gemischt. Beim Sammelgel wurden 5 μ l TEMED und 30 μ l der APS-Lösung zugesetzt.

Markerlösung: Als Proteinmolekulargewichtsmarker wurde ein Breitband-Proteinmarker (2 – 212 kDa) der Firma New England Bio Labs (Frankfurt a. M.) verwendet.

Proteinleiter: Um das Proteingewicht auch auf dem Film zu markieren, wurde eine biotinierte Proteinleiter (Cell Signal, Frankfurt a. M.) verwendet.

Die SDS-PAGE wurde mit dem Mini-PROTEAN 3 System der Firma Bio-Rad Laboratories (München) durchgeführt. Die Gelgießkammer wurde mit Ethanol gereinigt und zusammengebaut. Das Trenngel wurde sofort nach Zugabe von TEMED und APS-Lösung mit einer Pasteurpipette möglichst luftblasenfrei zwischen die Glasplatten gegossen und zur Begradigung der Kante mit etwas Wasser bedeckt. In 10 bis 30 min polymerisierte das Gel und härtete aus. Das Wasser wurde abgegossen und das Trenngel mit dem Sammelgel überschichtet. Vor der Polymerisation wurde ein Kamm, der die Probenaschen formte, in das Sammelgel eingesetzt. Das fertige Gel wurde in die Elektrophoresekammer überführt, die mit 1×Elektrophoresepuffer gefüllt wurde. Die Kämmen wurden entfernt und die Geltaschen mit einer Kanüle gespült.

Von den Proteinproben wurden jeweils 30 μ g verwendet. Die Proben wurden mit Chaps-Lysepuffers auf 16 μ l aufgefüllt und mit 4 μ l 5×Probenpuffer versetzt. Nach fünf minütiger Inkubation bei 95°C und anschließendem Zentrifugieren (Eppendorf Zentrifuge 3200) wurden die Proben aufgetragen. Von Proteinmarker und Proteinleiter wurden jeweils 4 μ l pro Gel verwendet. Hinzu kamen 12 μ l Lysepuffer.

Nun wurde Spannung an das Gel angelegt (200 V für 5 min, dann 150 V für 1 h).

2.6.4 Western-Blot

2.6.4.1 Prinzip

Der Western-Blot wird zum Nachweis von Proteinen genutzt. Dabei werden die vorher durch eine SDS-Page aufgetrennten Proteine auf eine Trägermembran transferiert. Den Proteinen wird durch Anlegen eines elektrischen Feldes senkrecht zum Gel das Übertreten auf die Membran ermöglicht. Dabei werden die Proteine vom angelagerten SDS befreit und können wieder ihre Sekundär- und Tertiärstruktur annehmen. Die Proteinbanden auf der Trägermembran können jetzt mit Hilfe von spezifischen Immunreaktionen detektiert werden.

2.6.4.2 Durchführung

Primärantikörper: Folgende Primärantikörper wurden in entsprechender Verdünnung verwendet:

Antikörper (Quelle)	Hersteller	Verdünnung
Interleukin-1 Rezeptor Antagonist (Ziege)	R&D Systems, Minneapolis	1:1000 TTBS
Interleukin-1 Rezeptor (Ziege)	R&D Systems, Minneapolis	1:1000 TTBS
Interleukin-1 β (Kaninchen)	Serotec, Düsseldorf	1:1000 4 % BS
PPAR γ (Kaninchen)	Cell Signal Technology, Danvers, Ma, USA	1:1000 4 % BS
β -Aktin (Maus)	Sigma, Steinheim	1:10 000 4 % BS

Sekundärantikörper: Folgende Sekundärantikörper wurden in entsprechender Verdünnung verwendet (Alle Antikörper sind mit einer Meerrettichperoxidase gekoppelt, die mit ECL detektiert werden kann).

Antikörper	Hersteller	Verdünnung
Anti-Ziege (Esel)	Santa Cruz, Heidelberg	1:5000 – 1:6000 2% Esel-Serum
Anti-Maus (Ziege)	Amersham Biosciences, GE Healthcare, Littel Chalfont Buckinghamshire, UK	1:10 000 4% BS
Anti-Kaninchen (Ziege)	Amersham Biosciences, GE Healthcare, Littel Chalfont Buckinghamshire, UK	1:1000 – 1: 3000 4% BS

10×Transferpuffer: 5,82 g Tris, 2,93 g Glycin und 0,375 g SDS wurden bei einem pH von 9 bis 9,4 mit 250 ml Methanol und destilliertem Wasser auf 1000 ml aufgefüllt.

10×TBS (Tris-gepufferte Salzlösung): 60,57 g Tris und 43,83 g NaCl wurden in 500 ml Wasser gelöst. Der pH-Wert der Lösung soll bei 7,5 liegen.

1×TTBS (Tween TBS): Zu 100 ml 10×TBS wurden 1 ml Tween 20 (Calbiochem, Darmstadt) zugesetzt. Die Lösung wurde auf 1 l mit destilliertem Wasser aufgefüllt.

Blocklösung (BS): Als Blocklösung wurde abhängig vom verwendeten Antikörper eine 2 – 4%ige fettfreie Milchpulverlösung in 1×TTBS oder 2% Esel-Serum (Santa Cruz, Heidelberg) in 1×TTBS verwendet.

ECL-Substratlösung: ECL Plus Western Blotting Detection System (Amersham Biosciences, GE Healthcare, Little Chalfont Buckinghamshire, UK). Kurz vor Gebrauch wurden Lösung A und Lösung B im Verhältnis 25:1 gemischt.

Für den Western-Blot wurde der Elektrobloetter Transblot SD Cell (Bio Rad Laboratories, München) benutzt. Es wurden pro Blot zwei Filter (extra dickes Filterpapier; Bio-Rad Laboratories, München; 10×7 cm) und eine Membran (Immobilon P 1500, Porengröße: 0,45 µm; Millipore, Schwalbach; 10×7 cm) zugeschnitten. Die Membran wurde 3 min in konzentriertem Methanol aktiviert und dann in destilliertes Wasser gelegt, bis sie sich abgesenkt hatte. Die Membran und die Filter wurden anschließend in Transferpuffer getaucht. Auf den Elektrobloetter wurden ein Filter und die Membran geschichtet. Das Gel wurde vom Sammelgel getrennt, in Transferpuffer gewaschen, auf die Membran gelegt und mit einem weiteren Filter abgedeckt. Auftretende Luftblasen wurden ausgestrichen. Nach dem Schließen des Gerätes wurde für 90 min ein konstanter Strom von 0,16 mA angelegt. Anschließend wurden die Filter und das Gel von der Membran entfernt, die Membran nummeriert und die Banden markiert. Alle folgenden Inkubations- und Waschvorgänge wurden auf einer Schüttelmaschine (CAT RM5 oder ST5, M. Zipperer, Staufien) durchgeführt. In einer Schale wurde die Membran 20 min in 1×TTBS und anschließend für 30-60 min bei Raumtemperatur in der Blocklösung gewaschen und über Nacht bei 4°C mit dem Primärantikörper inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran einmal 15 min und anschließend zweimal 5 min in 1×TTBS gewaschen, mit dem Sekundärantikörper bei Raumtemperatur für 60 min inkubiert und abermals einmal 15 min und anschließend fünfmal 5 min mit 1×TTBS gewaschen.

Die Detektion der Banden erfolgte in der Dunkelkammer. Dazu wurde die Membran mit den aufgetragenen Proteinen nach oben auf eine feste Plastikfolie gelegt und mit der ECL-Lösung

bedeckt. Die überschüssige Lösung lief nach 3 min ab. Die Membran wurde mit einer zweiten Plastikfolie bedeckt und in einer Röntgenkassette mit einem Klebestreifen fixiert. Ein ECL-Film wurde auf den Blot gelegt, für unterschiedliche Zeiträume (1 s bis 5 min) exponiert und danach mit der AGFA Curix 60 Entwicklermaschine (Agfa HealthCare GmbH, Hamburg) entwickelt. Die Banden wurden gescannt und die Pixelintensität des Blots mit der Quantity One Software der Firma Bio Rad Laboratories (München) ausgewertet. Die Werte wurden in Relation zu den Intensitäten der Banden für β -Aktin, einem ubiquitären Zellmarker, gesetzt, um eventuelle Fehler in der Probenladung des Blots oder dem Proteintransfer auf die Membran auszugleichen.

2.6.5 Strippen von Western-Blot-Membranen

Stripping-solution: 7,57 g Tris wurden in 600 ml destilliertem Wasser gelöst, der pH wurde auf 6,7 eingestellt und 20 g SDS sowie 14,3 ml β -Mercaptoethanol wurden hinzugegeben. Die Lösung wurde mit destilliertem Wasser auf 1 l aufgefüllt.

Die Western-Blot-Membran wurde nach der ersten Färbung mit der *stripping-solution* für 30 min bei 50°C inkubiert, um die Komplexe aus Primär- und Sekundärantikörper zu entfernen und die Membran für einen anderen Primärantikörper zugänglich zu machen. Dann wurde die *stripping-solution* entfernt und die Membran zweimal für 10 min in TTBS (2.6.4.2) gewaschen. Anschließend wurde die Membran für 30 – 60 min in Blocklösung (2.6.4.2) inkubiert. Nun wurde die Membran wie unter 2.6.4.2 beschrieben mit dem nächsten Primärantikörper inkubiert.

2.7 Immunfluoreszenzuntersuchung

2.7.1 Prinzip

Bei Immunfluoreszenzfärbung bindet ein Antikörper, der sogenannte Primärantikörper, an ein Epitop des gesuchten Proteins. Gleichzeitig gibt man einen zweiten Primärantikörper, z.B. gegen spezifische Zellmarker hinzu, der eine Bestimmung der entsprechenden Zelltypen möglich macht. Wir verwendeten entweder *neuronal-nuclei* (NeuN) für Neuronen, saures Gliafaserprotein (GFAP) für Astrozyten oder CD68 für aktivierte mikrogliale Zellen und Makrophagen. Im zweiten Schritt werden Sekundärantikörper gegen die Primärantikörper

hinzugegeben. An den Sekundärantikörper ist ein Fluorochrom gebunden, das bei entsprechender Anregung fluoresziert.

Auch die Zugabe zweier Zellmarker ist bei speziellen Untersuchungen möglich.

2.7.2 Durchführung

Primärantikörper: Folgende Primärantikörper wurden in entsprechender Verdünnung verwendet:

Antikörper	Hersteller	Verdünnung
Interleukin-1 Rezeptor Antagonist (Ziege)	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA	1:300 0,5% BSA
Interleukin-1 Rezeptor (Ziege)	R&D Systems, Minneapolis, MN, USA	1:100 0,5% BSA
PPAR γ (Kaninchen)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA	1:50 0,5% BSA

Primärantikörper als Zellmarker: Folgende Primärantikörper wurden als Zellmarker in entsprechender Verdünnung in Blocklösung verwendet:

Antikörper	Hersteller	Verdünnung
Anti-NeuN (Maus)	Chemicon, Schwalbach	1:100 0,5% BSA
Anti-GFAP (Kaninchen)	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark	1:100 0,5% BSA
Anti-CD68 (Maus)	Serotec, Düsseldorf	1:300 0,5% BSA

Sekundärantikörper: Folgende Sekundärantikörper wurden in entsprechender Verdünnung verwendet (Alle Antikörper sind mit einem Fluorochrom gekoppelt):

Antikörper	Hersteller	Verdünnung
Alexa Fluor [®] 488 Anti-Maus IgG (Ziege) → Grün	Molecular Probes, Eugene, OR, USA	1:100 1% BSA
Alexa Fluor [®] 488 Anti Kaninchen IgG (Esel) → Grün	Molecular Probes, Eugene, OR, USA	1:100 1% BSA
Alexa Fluor [®] 546 Anti-Ziege IgG (Esel) → Rot	Molecular Probes, Eugene, OR, USA	1:100 1% BSA
Alexa Fluor [®] 546 Anti-Kaninchen IgG (Ziege) → Rot	Molecular Probes, Eugene, OR, USA	1:200 1% BSA

PBST: Zu 100 ml 10×PBS (siehe 2.4) werden 3 ml Triton X-100 gegeben und die Lösung wird auf 1 l mit destilliertem Wasser aufgefüllt.

3% Bovines Serum Albumin (BSA): 3 g BSA-Pulver werden in 100 ml PBST gelöst. Die Verdünnung der Lösung mit PBST ergibt die gewünschte Konzentration.

Die Gewebefärbungen wurden auf Permanox Objektträgern durchgeführt. Mit dem DakoPen (DakoCynomation, Glostrup, Dänemark) wurde eine Barriere um die Gehirnschnitte gebildet. Dann wurden drei Mal ca. 250 µl PBST für 5 min auf die Schnitte gegeben, um das Paraformaldehyd zu entfernen. Die primären neuronalen Zellen wurden in den zur Kultur verwendeten Platten mit vier *wells* gefärbt.

Damit die Primär- und die Sekundärantikörper keine unspezifischen Bindungen eingehen, wurde das Gewebe, bzw. die Zellen mit 3% BSA für 30 min bei Raumtemperatur geblockt. Anschließend wurde der Primärantikörper (100 µl pro Hirnschnitt, 200 µl pro *well*) hinzugegeben und für 24 h bei 4°C in einer mit feuchtem Papier ausgelegten Plastikkassette inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Schnitte dreimal je 5 min mit PBST gewaschen, um den überschüssigen Primärantikörper zu entfernen. Nun folgte die Inkubation mit dem Antikörper gegen den jeweiligen Zelltyp für 4 h bei 4°C in der Plastikkassette. Der zweite Primärantikörper muss von einem anderen Tier als der erste Primärantikörper stammen, um Kreuzreaktionen zu vermeiden. Die Schnitte wurden dreimal 5 min mit PBST gewaschen und abschließend mit dem korrespondierenden Sekundärantikörper für eine Stunde bei 37°C mit 1% BSA in der Plastikkassette inkubiert. Anschließend wurde erneut dreimal je 5 min mit PBST gewaschen und die Schnitte bei Raumtemperatur im Dunkeln getrocknet.

Die Gewebeschnitte bzw. Zellen wurden mit *Slow Fade Light Antifade Reagent* (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) bedeckt und mit einem Deckgläschen auf den Objektträgern versiegelt.

2.7.3 Mikroskopie

Die Aufnahmen der Immunfluoreszenzfärbungen wurden mit dem Leica DMR Fluoreszenz Mikroskop (Leica Mikrosysteme, Wetzlar) mittels konventioneller Weitfeld-Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt. Es wurde ein Objektiv mit 200-facher Vergrößerung und den Filtern 43HE, 38HE und 49 DAPI verwendet. Alle Bilder wurden mit der AxioCamMRmKamera und dem Adapter TV 1,0× (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena)

aufgenommen. Die Bearbeitung und Auswertung der Bilder erfolgte mit dem AxioVision 4.5 Programm (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena).

2.8 Immunhistochemische Untersuchung

2.8.1 Prinzip

Die immunhistochemische Untersuchung basiert auf dem Einsatz eines Primär- und eines korrespondierenden Sekundärantikörpers. Der Sekundärantikörper bindet an den Primärantikörper und ist an ein Enzym, hier einer Peroxidase, gekoppelt. In einer enzymkatalysierten Reaktion wird durch dieses Enzym aus einem farblosen Chromogen ein Farbstoff gebildet.

Um die Methode empfindlicher zu machen, wird die Avidin-Biotin-Methode verwendet. Diese Methode nutzt die starke Affinität von Avidin für Biotin zur Bindung von enzymmarkierten Avidin-Biotin-Komplexen an biotinierte Sekundärantikörper. Das Biotin ist kovalent an den Antikörper gebunden. Bei der Reaktion bindet das Avidin der Komplexe an den Sekundärantikörper. Die Reihenfolge der Applikation ist: Primärantikörper – biotinierter Sekundärantikörper – vorgeformte Avidin-Biotin-Enzymkomplexe – Substratlösung.

Als Enzym wird die Meerrettichperoxidase verwendet. Als Substrat der Peroxidase wird Wasserstoffperoxid hinzugegeben. Der frei werdende Wasserstoff reduziert das vorher farblose 3,3'- Diaminobenzidin (DAB) zu seinem braunen Endprodukt.

2.8.2 Durchführung

Primärantikörper: Folgender Primärantikörper wurde in entsprechender Verdünnung verwendet.

Antikörper	Hersteller	Verdünnung
Interleukin-1 Rezeptor Antagonist (Ziege)	R&D Systems, Minneapolis	1:300 1% Esel-Serum

Sekundärantikörper: Folgender Sekundärantikörper wurden in entsprechender Verdünnung verwendet.

Antikörper	Hersteller	Verdünnung
Vectastain [®] biotinierter Anti-Ziege Antikörper (Esel)	Vector Laboratories, Wiesbaden	Nach Protokoll

PBS: Siehe 2.4; PBST siehe 2.6.4.2

H₂O₂: 30%iges Wasserstoffperoxid wird in Methanol 1:100 gelöst.

ABC-Lösung: Es wurde das Vectastain[®] Elite ABC Reagenz der Firma Vector Laboratories (Wiesbaden) verwendet. Zwei Tropfen von Reagenz A wurden zu 5 ml PBST hinzugefügt. Danach wurden zwei Tropfen Reagenz B hinzugegeben. Nach dem Mischen wurde die Lösung 30 min bis zum Gebrauch stehen gelassen.

DAB-Lösung: Es wurde das Kit D 4418 der Firma Sigma (Steinheim) verwendet. Eine 3,3'-Diaminobenzidine-Tetrahydrochlorid-Tablette (10 mg DAB) und eine Tablette Wasserstoffperoxid wurden in 15 ml destilliertem Wasser gelöst. Die Lösung wurde kurz vor Gebrauch zubereitet und im Dunkeln aufbewahrt.

Die Färbungen wurden in 24-*well* -Platten mit je drei bis sechs Schnitten pro *well* nach folgendem Protokoll durchgeführt: Um das Paraformaldehyd abzuwaschen, wurden die Schnitte 5 min in PBST gewaschen. Anschließend wurden sie 10 min in Wasserstoffperoxid gewaschen, um die endogene Peroxidase abzusättigen. Es folgte zweimaliges Waschen mit PBST für 10 min.

Um interferierende Proteine zu blockieren, wurden die Schnitte danach 60 min bei Raumtemperatur in 2%igem Esel-Serum (2.6.4.2) inkubiert, dann kurz mit PBST gewaschen und schließlich mit dem Primärantikörper über Nacht bei 4°C inkubiert. Überschüssige Primärantikörper wurden durch Waschen mit PBST (dreimal: 5, 10 und 15 min) entfernt. Die Inkubation mit dem Sekundärantikörper erfolgte für 60 min bei Raumtemperatur. Die Schnitte wurden dann dreimal 5 min mit PBST, 30 min in der ABC-Lösung, zweimal 5 min in PBST und 5 min in PBS gewaschen und für 5 – 15 min mit der DAB-Lösung inkubiert. Die korrekte und ausreichende Färbung wurde unter dem Mikroskop (Leica DMR, Leica Mikrosysteme, Wetzlar) kontrolliert. Durch Verdünnung mit destilliertem Wasser wurde der Prozess gestoppt.

Nach dem Trocknen wurden die Schnitte auf Objektträger gelegt, kurz in Xylol getaucht und mit Pertex (Medite, Burgdorf) abgedeckt. Die Auswertung der positiv gefärbten Zellen erfolgte mit der Leica Image Analysing Software (Leica Qwin, Leica Mikrosysteme, Wetzlar) in drei zufällig ausgewählten, sich nicht überschneidenden Arealen.

2.9 Messung der Laktatdehydrogenase in Zellkulturen

Cytotoxicity detection kit (Roche, Mannheim): 25 μl der Detektionslösung 1 wurden mit 1128 μl der Detektionslösung 2 vermischt.

Freigesetzte Laktatdehydrogenase (LDH) im Kulturmedium reduziert Tetrazoliumchlorid zu Formazan. Formazan ist ein Farbstoff, der sich photometrisch quantifizieren lässt.

50 μl Zellüberstand von jeder Kultur wurden in einem 1,5 ml Röhrchen zentrifugiert (10 min bei 2000 Umdrehungen pro Minute und 20°C). Anschließend wurden je 10 $\mu\text{l/well}$ der Proben mit 90 $\mu\text{l/well}$ PBS (siehe 2.4) auf einer 96 *well*-Platte gegeben. Es folgte die Inkubation mit 100 μl der Reaktionslösung für 30 min bei 20°C im Dunkeln.

Die Lichtabsorbtion der Proben wurde bei 490 nm mit einem ELISA Auswerter der Firma Bio-Rad (München) bestimmt. Jede Probe wurde dreimal ausgewertet.

2.10 Statistische Analyse

Alle Werte sind als Mittelwert \pm SD (Standardabweichung) dargestellt. Die statistische Auswertung des Blutflusses erfolgte über eine mehrfaktorielle Varianzanalyse (MANOVA). Da es hier keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen der Vehikel-Gruppe und der Pioglitazon-Gruppe gab, wurden keine paarweisen Vergleiche durchgeführt. Der Effekt der Ischämie und der Behandlung der Ratten mit Vehikel oder Pioglitazon auf den neurologischen Status und die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen und Western-Blot-Analyse wurde über eine einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) analysiert. Die paarweisen Vergleiche zwischen der *sham*-operierten Gruppe und den Vehikel und Pioglitazon vorbehandelten Gruppen erfolgten dann über einen *post-hoc* Bonferroni-Test.

Die Ergebnisse der Western-Blot-Analyse und der LDH-Messung, die aus den Versuchen mit Zellkulturen gewonnen wurden, wurden ebenfalls mittels ANOVA und anschließendem *post-hoc* Bonferroni-Test untersucht.

3 Ergebnisse

3.1 Zerebrale Blutflussmessung

Vor, während und 30 min nach Verschluss der A. cerebri media (MCAO) wurde die Durchblutung des rechten frontoparietalen Kortex (zerebraler Blutfluss, CBF) des Versuchstieres registriert. Damit die Ratte in die Versuchsauswertung eingeschlossen werden konnte, musste der CBF auf unter 25% des Ausgangswertes sinken und durfte bis zur Wiedereröffnung des verschlossenen Gefäßes nicht über 30% des ursprünglich gemessenen Blutflusses ansteigen.

Gruppe (Anzahl)	MCAO + 10 min	MCAO + 60 min	Reperfusion + 30 min
V 1d (N = 17)	18,5 ± 6,9	19,8 ± 7,6	60,1 ± 18,4
P 1d (N = 15)	23,0 ± 5,8	23,9 ± 6,5	58,8 ± 15,3
V 2d (N = 20)	20,1 ± 4,8	22,2 ± 5,4	65,8 ± 17,1
P 2d (N = 18)	18,45 ± 6,5	21,1 ± 4,4	59,6 ± 19,1

Tabelle 3.1: Registrierung des zerebralen Blutflusses während und nach MCAO

Notiert ist der CBF (als prozentualer Anteil des Ausgangswertes vor OP-Beginn) 10 und 60 min nach MCAO und 30 min nach Wiedereröffnung des Gefäßes. Alle Werte entsprechen dem arithmetischen Mittel ± SD. V 1d und V 2d: Mit Vehikel behandelte Tiere, Hirnentnahmen am ersten (1d), bzw. zweiten Tag (2d) nach MCAO. P 1d und P 2d: Mit Pioglitazon behandelte Ratten, Hirnentnahmen am ersten (1d), bzw. zweiten Tag (2d) nach MCAO. Die statistische Auswertung erfolgte mittels MANOVA, es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.

Für die Versuche wurden insgesamt 130 Ratten operiert. 10 Tiere zeigten keine hinreichende Blutflusssenkung und weitere 12 Tiere starben während der OP. 22 Tiere verstarben nach OP-Ende vorzeitig, davon 13 mit Vehikel (V) und 9 mit Pioglitazon (P) behandelt. Insgesamt wurden 86 Tiere eingeschlossen und neurologisch evaluiert. Für die Western-Blot-Analyse wurde 34 Tiere (*sham1*: 4; *sham2*: 4; V1: 7; P1: 6; V2: 6; P2: 7), für die immunhistochemische Untersuchung 48 (*sham1*: 4; *sham2*: 4; V1: 10; P1: 9; V2: 10; P2: 11) und für die Immunfluoreszenzuntersuchung 4 Tiere (V2) verwendet.

Tabelle 3.1 stellt die durchschnittlichen CBF-Messungen der Gruppen dar. Die Werte der mit Pioglitazon behandelten Tiere nach Beginn und im Verlauf der Ischämie sowie nach Wiedereröffnung des Gefäßes zeigten keine signifikante Abweichung zu den Messwerten der mit Vehikel behandelten Tiere.

3.2 Neurologische Evaluation

Gruppe	Neurologie gesamt	Motorisches Defizit	Sensorisches Defizit
<i>sham</i> 1d (N = 8)	16,3 ± 1,7	8,6 ± 0,2	5,9 ± 0,2
V 1d (N = 17)	7,4 ± 2,9 (***)	4,0 ± 1,6 (***)	2,6 ± 1,0 (***)
P 1d (N = 15)	10,3 ± 1,4 (***; ††)	5,2 ± 0,7 (***; †)	3,2 ± 0,8 (***)
<i>sham</i> 2d (N = 8)	17,0 ± 1,3	8,7 ± 0,3	6 ± 0
V 2d (N = 20)	8,2 ± 2,5 (***)	4,3 ± 1,5 (***)	2,4 ± 0,4 (***)
P 2d (N = 18)	10,0 ± 2,5 (***; †)	5,3 ± 1,3 (***)	3,1 ± 0,9 (***; ††)

Table 3.2: Neurologische Evaluation der Versuchstiere nach MCAO

Dargestellt ist der Gesamtscore nach Garcia et al. (1995) als Quantifizierung des motorischen und sensorischen Defizits der Versuchstiere. Verglichen werden die mit Vehikel (V) behandelten, mit Pioglitazon (P) behandelten und sham-operierten Ratten einen Tag (1d) und zwei Tage (2d) nach MCAO. Alle Werte entsprechen dem arithmetisches Mittel ± SD. Die statistische Analyse erfolgte mit ANOVA, gefolgt von einem post-hoc Bonferroni-Test. Der statistische Vergleich wurde mit den sham-operierten Tieren (***) $p < 0.001$ und den mit Vehikel behandelten Tieren († $p < 0,05$; †† $p < 0,01$) durchgeführt.

Die Quantifizierung des neurologischen Defizits der Versuchstiere erfolgte 24 und 48 h nach MCAO. Tabelle 3.2 zeigt die Testergebnisse der Tiere.

Hier aufgeführt ist jeweils die Evaluation direkt vor der Hirnentnahme, also 24 oder 48 h nach MCAO. Der Vergleich mit den sham-operierten Tieren ergab hochsignifikante Unterschiede. Die mit Pioglitazon behandelten Tiere zeigten im Gesamtscore 24 und 48 h, in der Quantifizierung der motorischen Ausfällen 24 h und in der Untersuchung der sensorischen Ausfälle 48 h nach MCAO einen besseren neurologischen Status als die mit Vehikel behandelten Tiere.

Die ICV-Behandlung mit Pioglitazon verringerte den durch die Ischämie verursachten Schaden daher signifikant im Vergleich zu der mit Vehikel behandelten Gruppe.

3.3 Gewebeanalysen

3.3.1 PPAR γ

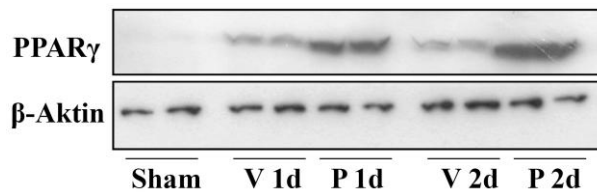


Abbildung 3.1: Exemplarische Darstellung der Expression von PPAR γ in der Penumbra Vergleich (Western-Blot-Analyse) der sham-operierten Tiere mit den mit Vehikel und Pioglitazon behandelten Tieren 24 (V 1d; P 1d) und 48 h (V 2d; P 2d) nach MCAO

Die Ergebnisse aus der Western-Blot-Analyse (Abbildung 3.1) beschreiben die Expression des PPAR γ in dem ischämischen Kortexareal.

Die Ischämie induzierte eine Überexpression des Rezeptors sowohl 24 als auch 48 h nach MCAO (Abbildung 3.2). Die Behandlung mit Pioglitazon verstärkte zusätzlich die in dem ischämischen Hirngewebe induzierte

Überexpression des Rezeptors. Der Unterschied zur mit Vehikel behandelten Gruppe zeigte sich nach 24 und 48 h signifikant.

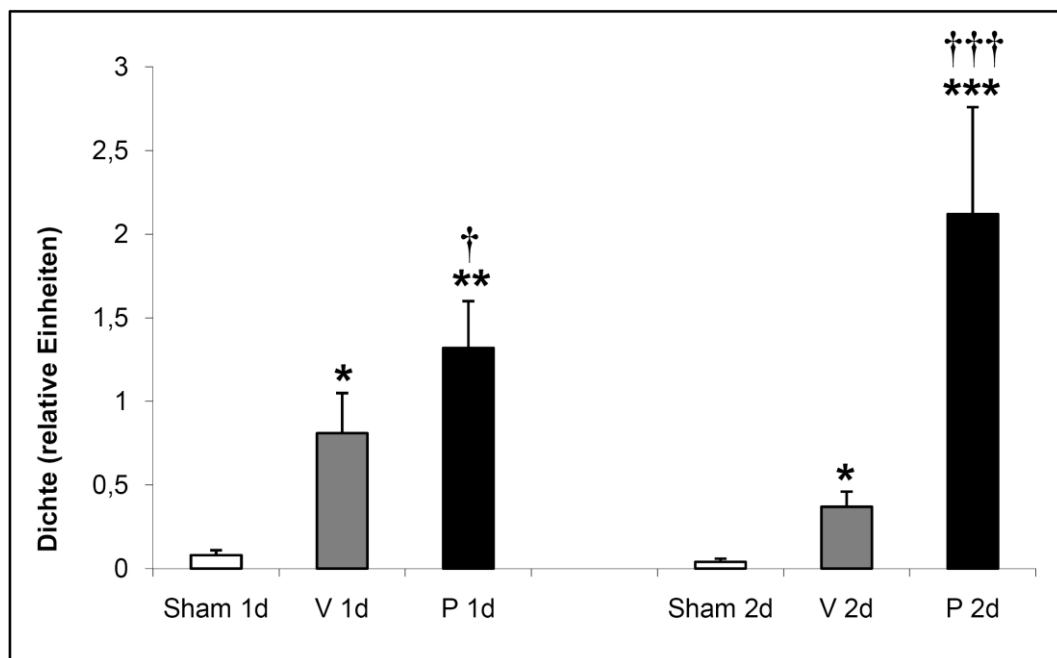


Abbildung 3.2: Western-Blot-Analyse von PPAR γ in der Penumbra

Das Diagramm zeigt die Intensität der Banden (im Verhältnis zu β -Aktin). Verglichen werden die mit Vehikel (V) behandelten, mit Pioglitazon (P) behandelten und sham-operierten Tiere einen Tag (1d) und zwei Tage (2d) nach MCAO. Alle Werte entsprechen dem arithmetischen Mittel \pm SD. Die statistische Analyse erfolgte mit ANOVA, gefolgt von einem post-hoc Bonferroni-Test. Der statistische Vergleich wurde mit den sham-operierten Tieren (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) und den mit Vehikel behandelten Tieren († $p < 0,05$; ††† $p < 0,001$) durchgeführt.

3.3.2 IL-1 β

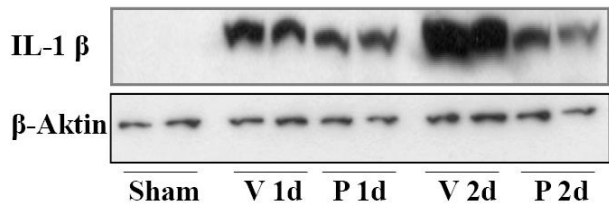


Abbildung 3.3: Exemplarische Darstellung der Expression von IL-1 β in der Penumbra Vergleich (Western-Blot-Analyse) der sham-operierten Tiere mit den mit Vehikel und Pioglitazon behandelten Tieren 24 (V 1d; P 1d) und 48 h (V 2d; P 2d) nach MCAO

Nach der fokalen Ischämie erhöhte sich der Spiegel des Zytokins IL-1 β im ischämischen Hirngewebe. Unsere Ergebnisse aus der Western-Blot-Analyse sind in Abbildung 3.3 und 3.4 dargestellt.

Die Induktion des Zytokins war sowohl 24 als auch 48 h nach MCAO zu beobachten. Durch Behandlung der Versuchstiere mit Pioglitazon wurde diese Überexpression zu beiden Zeitpunkten signifikant gehemmt. Nach 48 Stunden unterschied sich der IL-1 β Spiegel im ischämischen Kortexgewebe der mit Pioglitazon behandelten Tiere nicht mehr signifikant von dem Spiegel, der bei der sham-operierten Gruppe gemessen werden konnte.

beiden Zeitpunkten signifikant gehemmt. Nach 48 Stunden unterschied sich der IL-1 β Spiegel im ischämischen Kortexgewebe der mit Pioglitazon behandelten Tiere nicht mehr signifikant von dem Spiegel, der bei der sham-operierten Gruppe gemessen werden konnte.

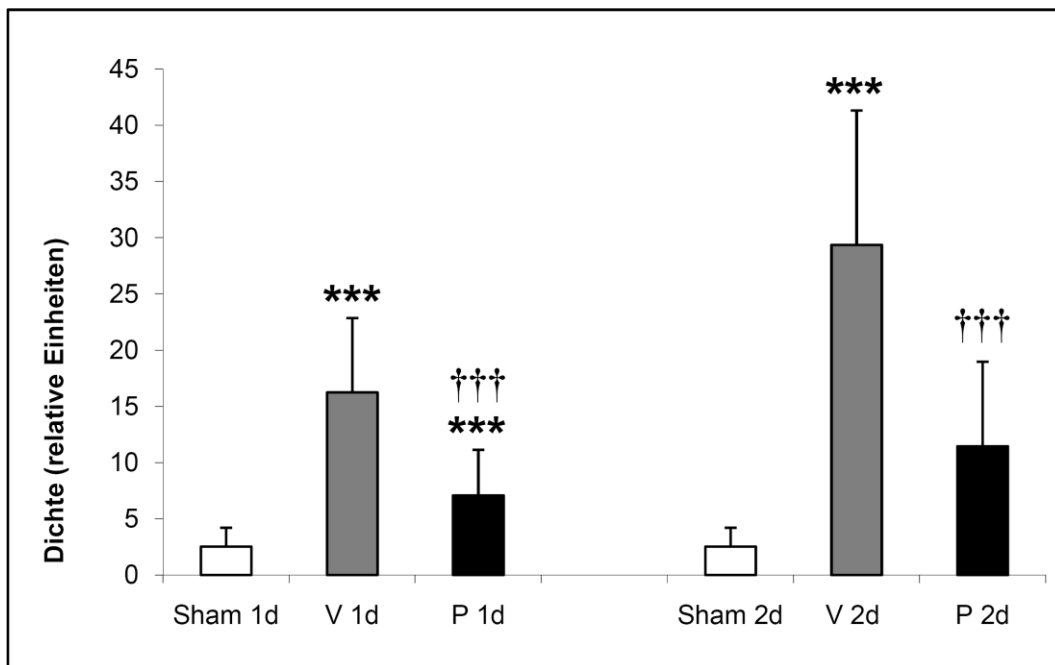


Abbildung 3.4: Western-Blot-Analyse von IL-1 β in der Penumbra

Das Diagramm zeigt die Intensität der Banden (im Verhältnis zu β -Aktin). Verglichen werden die mit Vehikel (V) behandelten, mit Pioglitazon (P) behandelten und sham-operierten Tiere einen Tag (1d) und zwei Tage (2d) nach MCAO. Alle Werte entsprechen dem arithmetischen Mittel \pm SD. Die statistische Analyse erfolgte mit ANOVA, gefolgt von einem post-hoc Bonferroni-Test. Der statistische Vergleich wurde mit den sham-operierten Tieren (***) und den mit Vehikel behandelten Tieren (††† $p < 0.001$) durchgeführt.

3.3.3 IL-1 RI

In dem ischämischen Hirnareal kam es zu einer deutlichen Induktion des IL-1RI sowohl 24 als auch 48 h nach MCAO. Abbildung 3.5 zeigt, dass die Behandlung mit Pioglitazon die Expression des Rezeptors nach dem Schlaganfall nicht verändert. Aufschluss über den Zelltyp der den Rezeptor exprimierenden Zellen gibt die Immunfluoreszenzuntersuchung (Abbildung 3.6). Die Kolokalisation des IL-1RI mit NeuN, einem neuronalen Marker, und CD-68, einem Marker für aktivierte Mikroglia und Makrophagen, zeigte, dass beide Zelltypen den Rezeptor in dem ischämischen Gewebe exprimieren. In der Vergrößerung der Zellabbildungen lässt sich der IL-1RI auch in der Membran von Neuronen und Entzündungszellen erkennen.

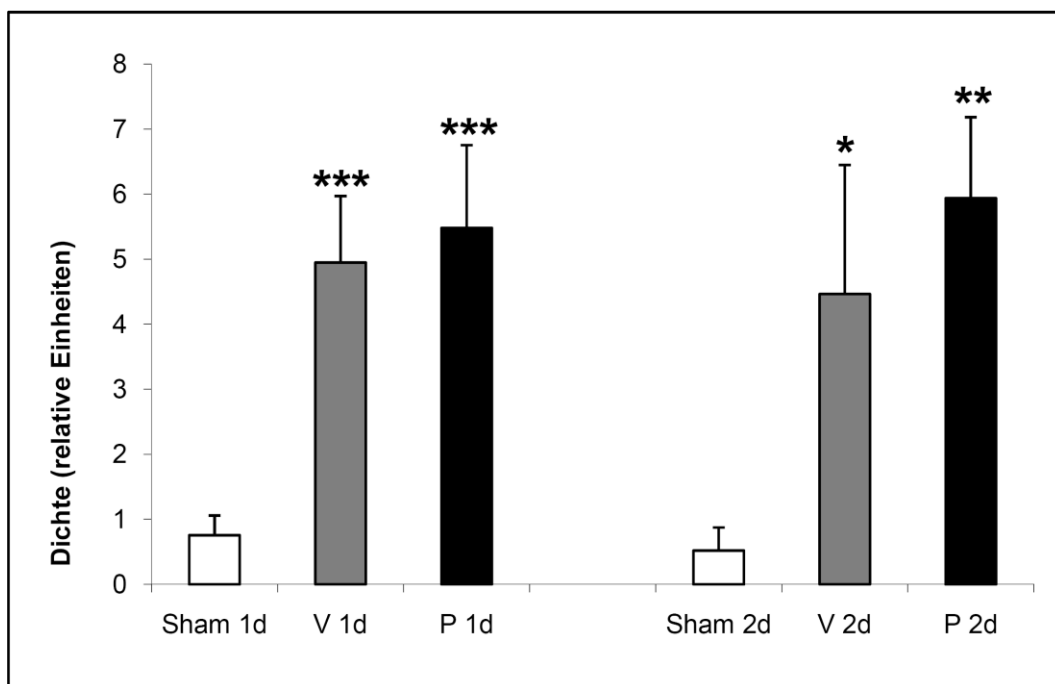


Abbildung 3.5: Western-Blot-Analyse des IL-1 Rezeptors I in der Penumbra

Das Diagramm zeigt die Intensität der Banden (im Verhältnis zu β -Aktin). Verglichen werden die mit Vehikel (V) behandelten, mit Pioglitazon (P) behandelten und sham-operierten Tiere einen Tag (1d) und zwei Tage (2d) nach MCAO. Alle Werte entsprechen dem arithmetischen Mittel \pm SD. Die statistische Analyse erfolgte mit ANOVA, gefolgt von einem post-hoc Bonferroni-Test. Der statistische Vergleich wurde mit den sham-operierten Tieren (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) und den mit Vehikel behandelten Tieren (keine signifikanten Ergebnisse) durchgeführt.

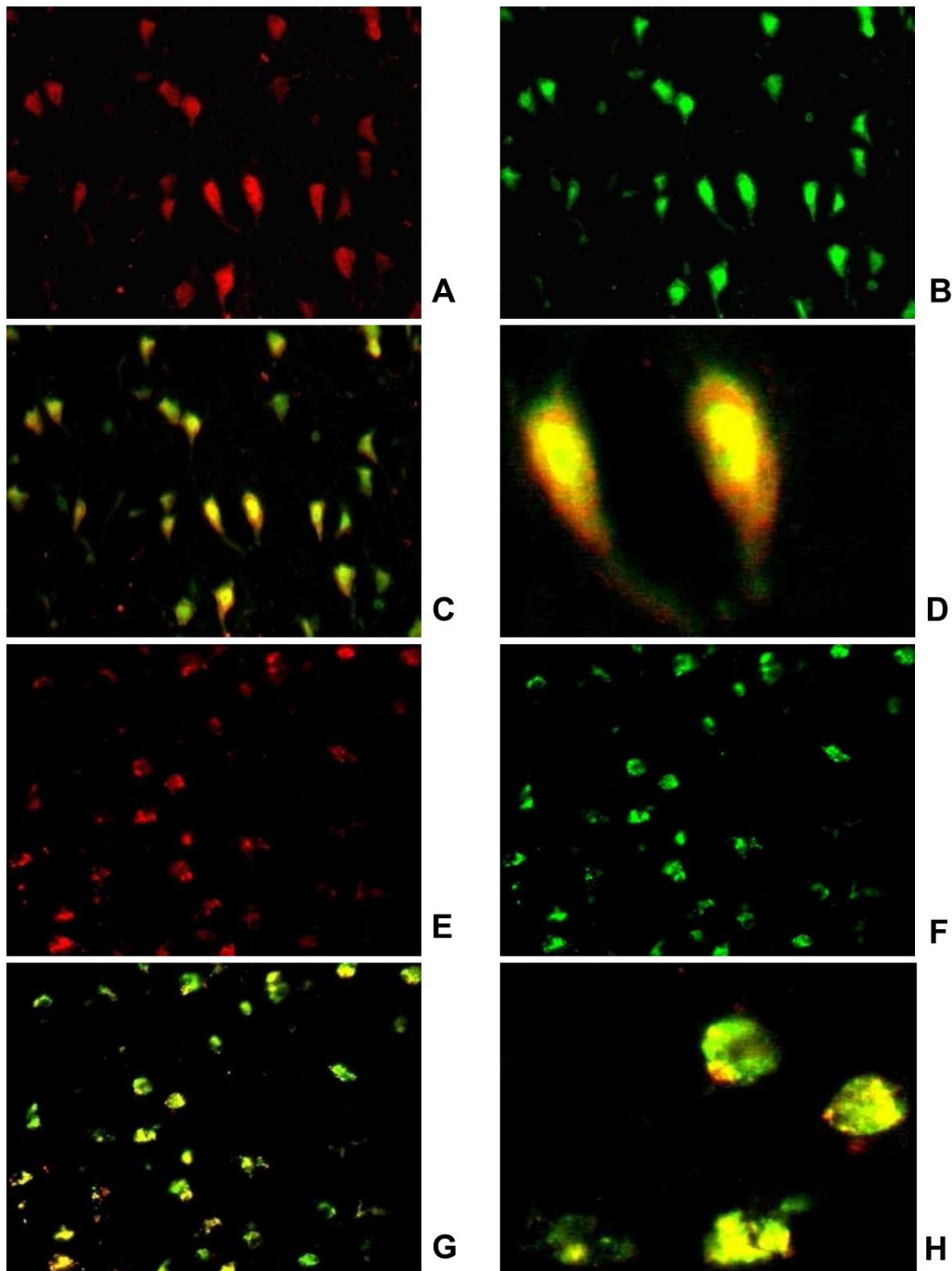


Abbildung 3.6: Detektion des IL-1 Rezeptors I in Neuronen (NeuN) und aktivierten mikroglialen Zellen und Makrophagen (CD-68)

Dargestellt sind die Ergebnisse der Immunfluoreszenzuntersuchung der Penumbra mit Vehikel behandelte Tiere am zweiten Tag nach MCAO.

A) Färbung des IL-1RI (rot)

C) Kolokalisation des IL-1RI mit NeuN (gelb)

E) Färbung des IL-1RI (rot)

G) Kolokalisation des IL-1RI mit CD-68 (gelb)

B) Färbung von NeuN (grün)

D) Vergrößerung aus C)

F) Färbung von CD-68 (grün)

H) Vergrößerung aus G)

3.3.4. IL-1Ra

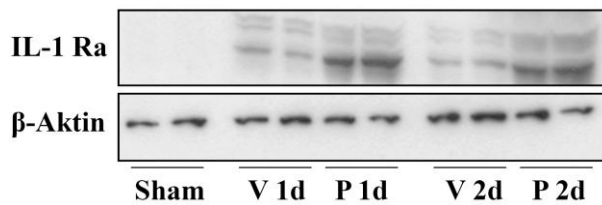


Abbildung 3.7: Exemplarische Darstellung der Expression des IL-1Ra in der Penumbra Vergleich (Western-Blot-Analyse) der sham-operierten Tiere mit den mit Vehikel und Pioglitazon behandelten Tieren 24 (V 1d; P 1d) und 48 h (V 2d; P 2d) nach MCAO

Das ischämische Hirngewebe zeigte in der Western-Blot-Analyse (Abbildung 3.7) eine Tendenz zur erhöhten Expression des IL-1Ra sowohl 24 als auch 48 h nach MCAO, aber keine signifikante Differenz zu den sham-operierten Tieren. Bei den mit Pioglitazon behandelten Tieren wurde in Gewebeprobe, die aus dem frontoparietalen Kortex am Rand des Ischämiekerns

entnommen wurden, eine hoch signifikante Überexpression des antientzündlichen IL-1Ra nach 48 Stunden im Vergleich zu den mit Vehikel behandelten Tieren festgestellt. Darüber hinaus war eine Tendenz zur Überexpression bereits nach 24 Stunden erkennbar (Abbildung 3.8).

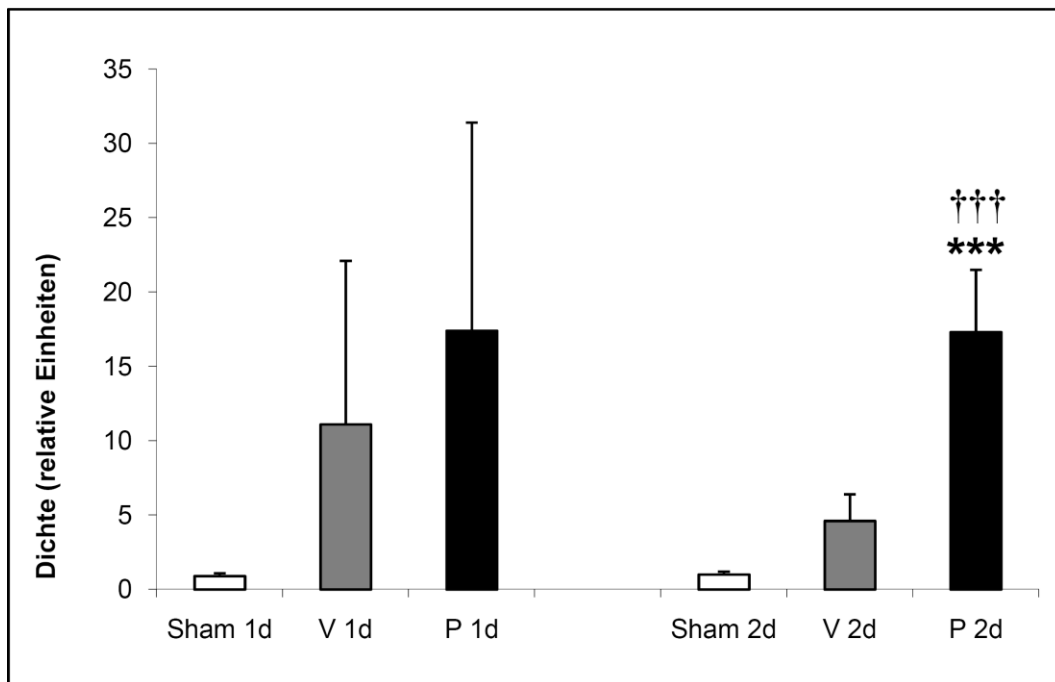


Abbildung 3.8: Western-Blot-Analyse des IL-1 Rezeptorantagonisten in der Penumbra Das Diagramm zeigt die Intensität der Banden (im Verhältnis zu β -Aktin). Verglichen werden die mit Vehikel (V) behandelten, mit Pioglitazon (P) behandelten und sham-operierten Tiere einen Tag (1d) und zwei Tage (2d) nach MCAO. Alle Werte entsprechen dem arithmetischen Mittel \pm SD. Die statistische Analyse erfolgte mit ANOVA, gefolgt von einem post-hoc Bonferroni-Test. Der statistische Vergleich wurde mit den sham-operierten Tieren (***) und den mit Vehikel behandelten Tieren (††† $p < 0.001$) durchgeführt.

Die immunhistochemische Untersuchung zeigte andere Ergebnisse (Abbildung 3.9). Die Zahlen IL-1Ra-positiver Zellen stimmten dabei in beiden untersuchten Schnittebenen überein. Die mit Vehikel behandelten Tiere zeigten in der immunhistochemischen Untersuchung nach 48 h einen signifikanten Anstieg der IL-1Ra-positiven Zellen im Vergleich zu den *sham*-operierten Tieren. Nach 24 h zeigte sich keine signifikante Induktion des Antagonisten durch die Ischämie, es war lediglich ein Trend hin zu erhöhten Werten erkennbar. Die Behandlung mit Pioglitazon führte bereits 24 h nach MCAO zu einer signifikanten Induktion des IL-1Ra. Auch nach 48 h war dieser Effekt erkennbar. Abbildung 3.10 zeigt exemplarische Färbungen des Rezeptorantagonisten im ischämischen Kortex. Die hohe Zahl IL-1Ra-positiver Zellen im Infarktareal der mit Pioglitazon behandelten Tiere im Vergleich mit den mit Vehikel behandelten Tieren wird deutlich.

Die Bestimmung des Typs der Zellen, die den IL-1Ra exprimieren, erfolgte mittels Immunfluoreszenzuntersuchung (Abbildung 3.11). Die Untersuchung zeigte, dass sowohl Neurone als auch Entzündungszellen den Antagonisten exprimieren.

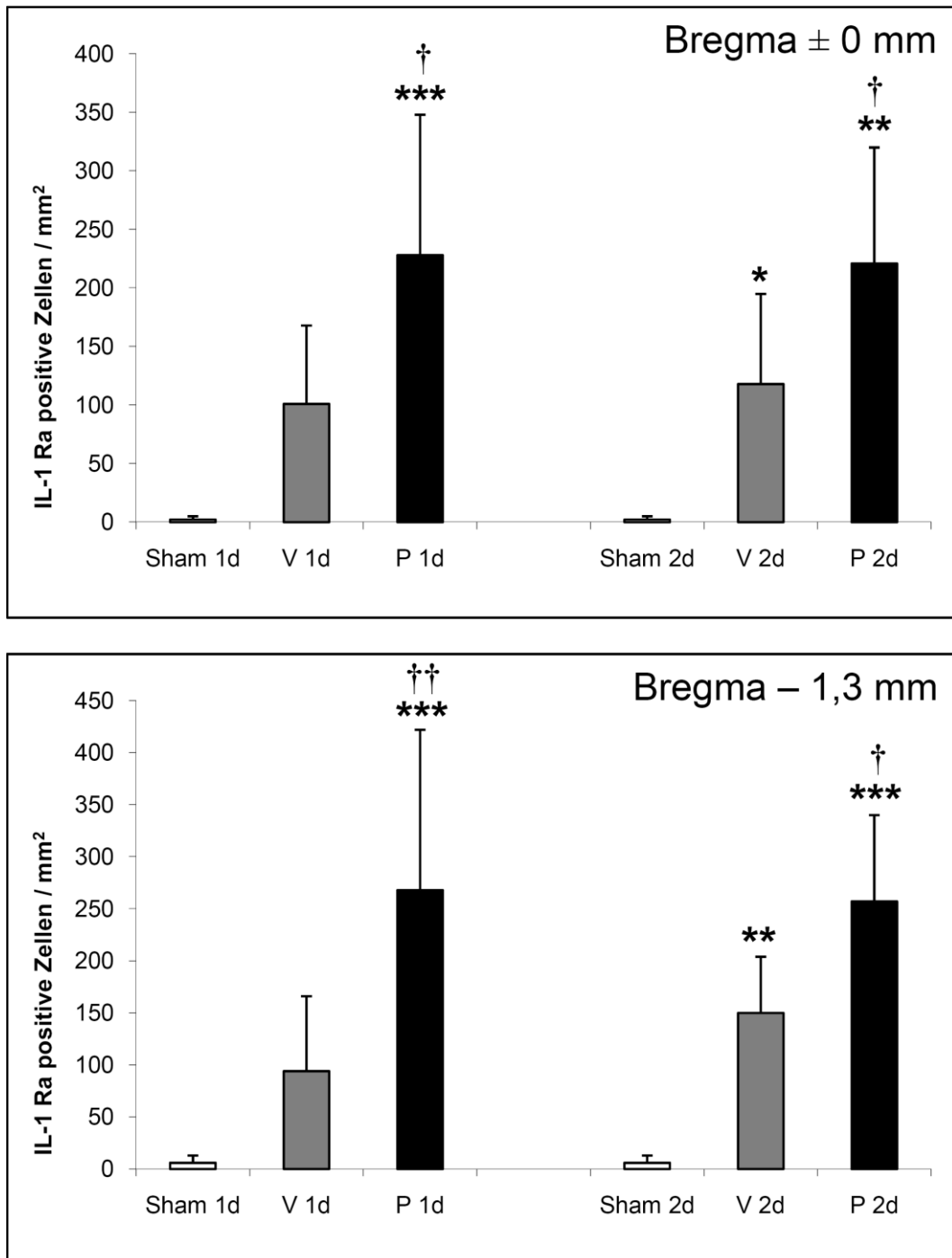


Abbildung 3.9: Zahl der für den IL-1 Rezeptorantagonisten positiv gefärbten Zellen pro mm² in der Penumbra

Das Diagramm zeigt die Ergebnisse aus der immunhistochemischen Untersuchung aus zwei verschiedenen Ebenen, oben Bregma ± 0 mm, unten Bregma - 1,3 mm. Verglichen werden die mit Vehikel (V) behandelten, mit Pioglitazon (P) behandelten und sham-operierten Tiere einen Tag (1d) und zwei Tage (2d) nach MCAO. Alle Werte entsprechen dem arithmetischen Mittel ± SD. Die statistische Analyse erfolgte mit ANOVA, gefolgt von einem post-hoc Bonferroni-Test. Der statistische Vergleich wurde mit den sham-operierten Tieren (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) und den mit Vehikel behandelten Tieren († $p < 0,05$; †† $p < 0,01$) durchgeführt.

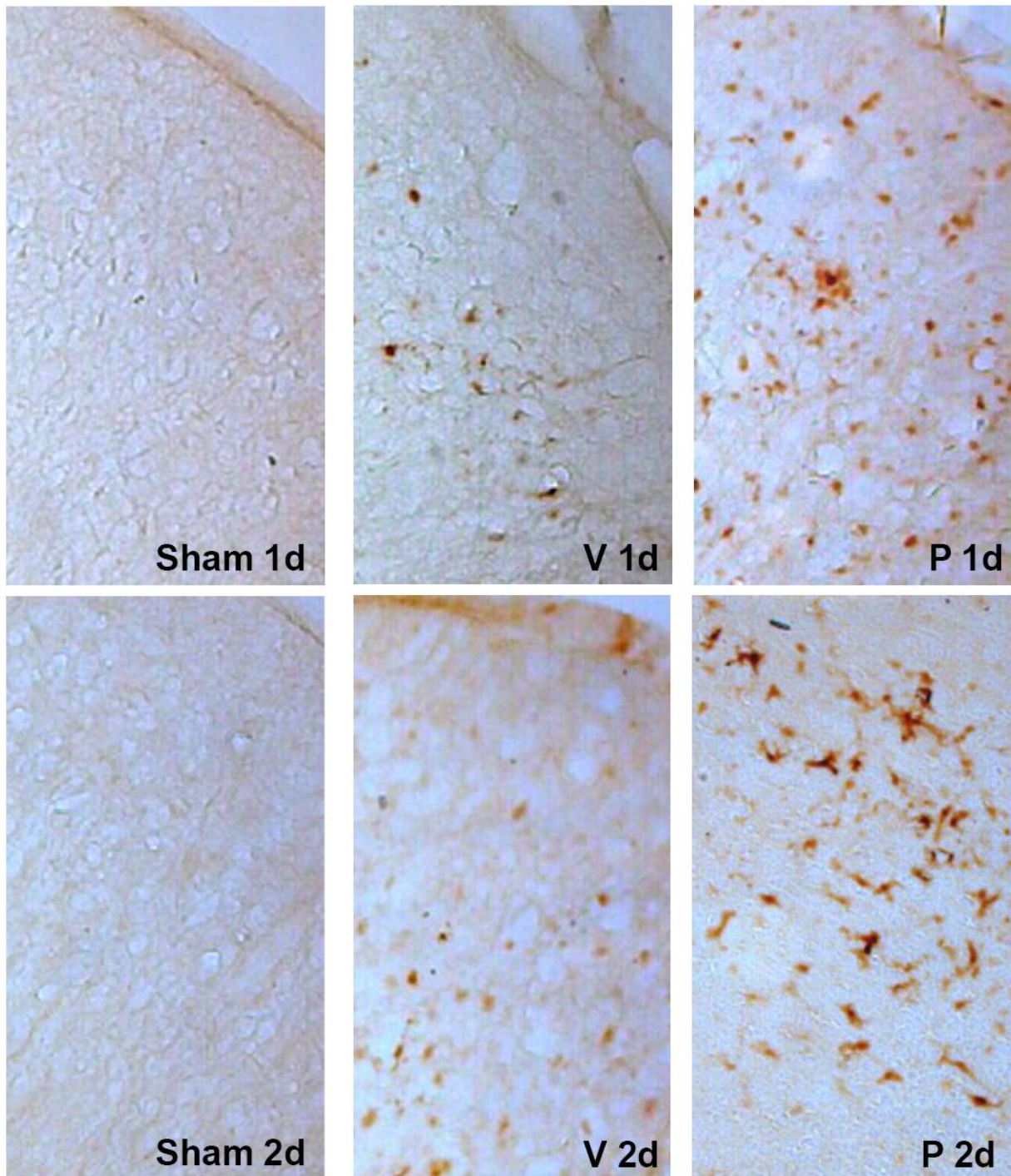


Abbildung 3.10: Immunhistochemische Färbung des IL-1 Rezeptorantagonisten

Die IL-1Ra-positiven Zellen färben sich braun. Dargestellt sind Beispielschnitte aus der Penumbra einen Tag (1d; oben) und zwei Tage (2d; unten) nach MCAO. Links die sham-operierten (Sham 1d und 2d), in der Mitte die mit Vehikel behandelten (V 1d und 2d) und rechts die mit Pioglitazon behandelten Tiere (P 1d und 2d).

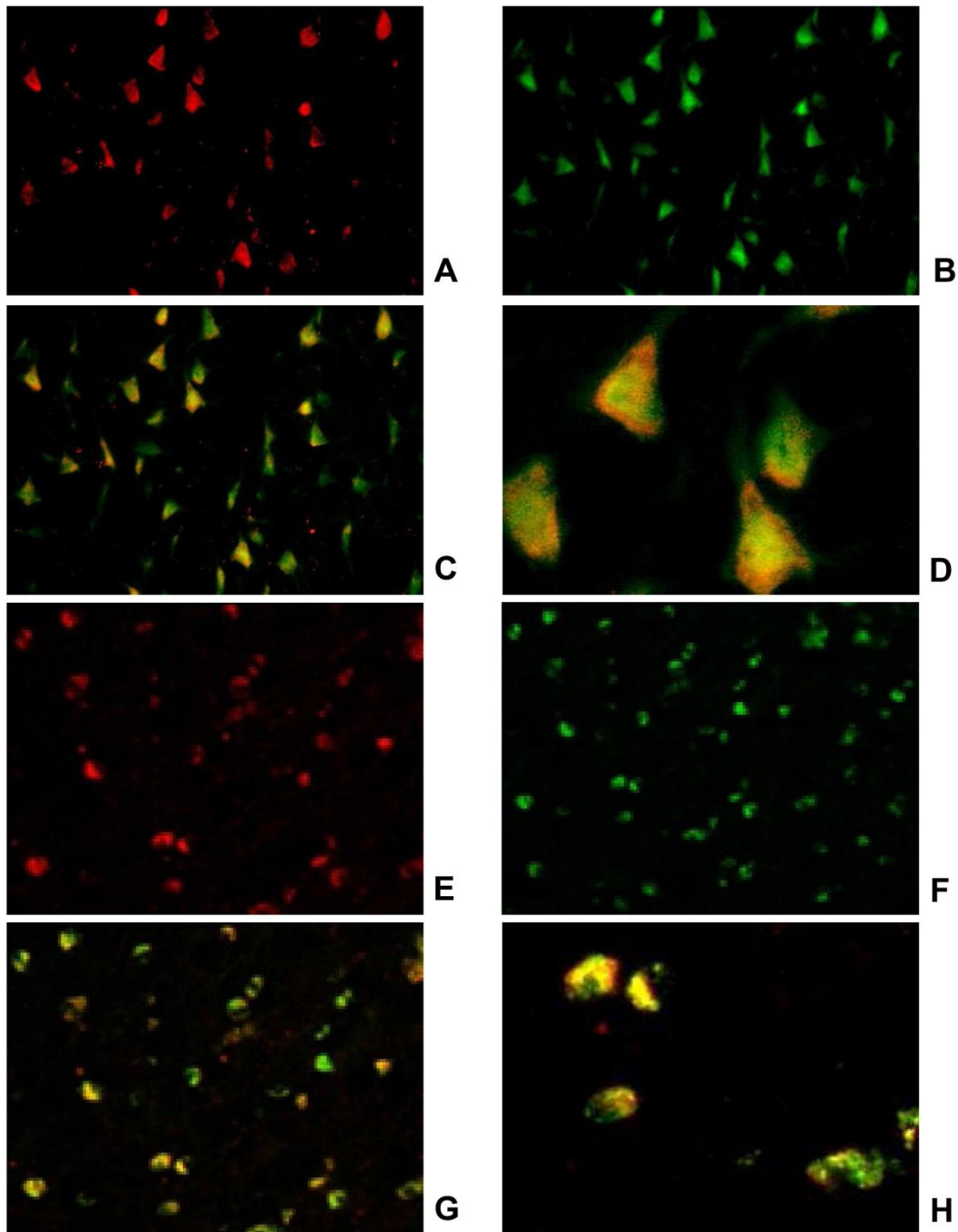


Abbildung 3.11: Detektion des IL-1 Rezeptorantagonisten in Neuronen (NeuN) und aktivierten mikroglialen Zellen und Makrophagen (CD-68)

Dargestellt sind die Ergebnisse der Immunfluoreszenzuntersuchung der Penumbra mit Vehikel behandelte Tiere am zweiten Tag nach MCAO.

A) Färbung des IL-1Ra (rot)

C) Kolokalisation des IL-1Ra mit NeuN (gelb)

E) Färbung des IL-1Ra (rot)

G) Kolokalisation des IL-1Ra mit CD-68 (gelb)

B) Färbung von NeuN (grün)

D) Vergrößerung aus C)

F) Färbung von CD-68 (grün)

H) Vergrößerung aus G)

3.4 Neuronale Zellkulturen

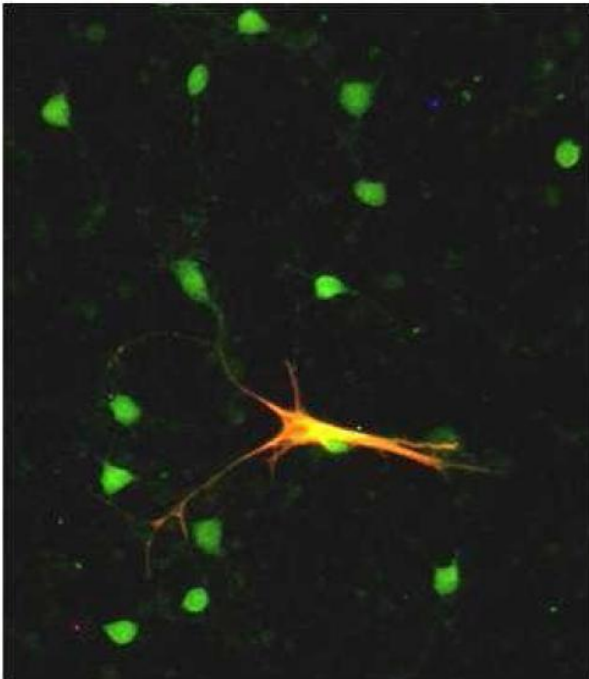


Abbildung 3.12: Kolokalisation von NeuN (grün) mit GFAP (rot)

Die Beteiligung des PPAR γ an der Überexpression des IL-1Ra durch die Behandlung mit Pioglitazon wurde an neuronalen Zellkulturen untersucht.

Der Anteil neuronaler Zellen in der verwendeten Kultur wurde mit der Immunfluoreszenzuntersuchung bestimmt. Die Kolokalisation der Zellmarker NeuN (Neurone) mit GFAP (Astrozyten) ist in Abbildung 3.12 dargestellt. Es zeigte sich ein Neuronen-Anteil von über 90% aller gefärbten Zellen.

Zur Kontrolle des Befundes wurde der Zellmarker CD-68 für aktivierte mikrogliale Zellen und Makrophagen angefärbt. Eine

vernachlässigbare Anzahl von Zellen zeigte sich CD-68 positiv. Daher kann von einem hohen Anteil neuronaler Zellen in der verwendeten Zellkultur ausgegangen werden.

2.4.1 Analyse des PPAR γ und des IL-1Ra unter basalen Bedingungen

Die PPAR γ -Expression einer mit Vehikel behandelten Kultur wurden mit der Expression einer mit Pioglitazon behandelten Kultur verglichen. Abbildung 3.13 zeigt die Ergebnisse der Western-Blot-Analyse. Pioglitazon steigerte die Expression des PPAR γ unter basalen Bedingungen.

Der IL-1Ra wurde ebenfalls unter basalen Bedingungen untersucht. Die Western-Blot-Analyse (Abbildung 3.13) vergleicht die IL-1Ra-Expression einer mit Vehikel behandelten Kultur, einer mit Pioglitazon und einer mit Pioglitazon und dem selektiven PPAR γ -Antagonisten GW 9662 behandelten Kultur. Pioglitazon steigerte die Expression des IL-1Ra und das auch in Anwesenheit von GW 9662. Dies deutet auf einen PPAR γ -unabhängigen Mechanismus hin.

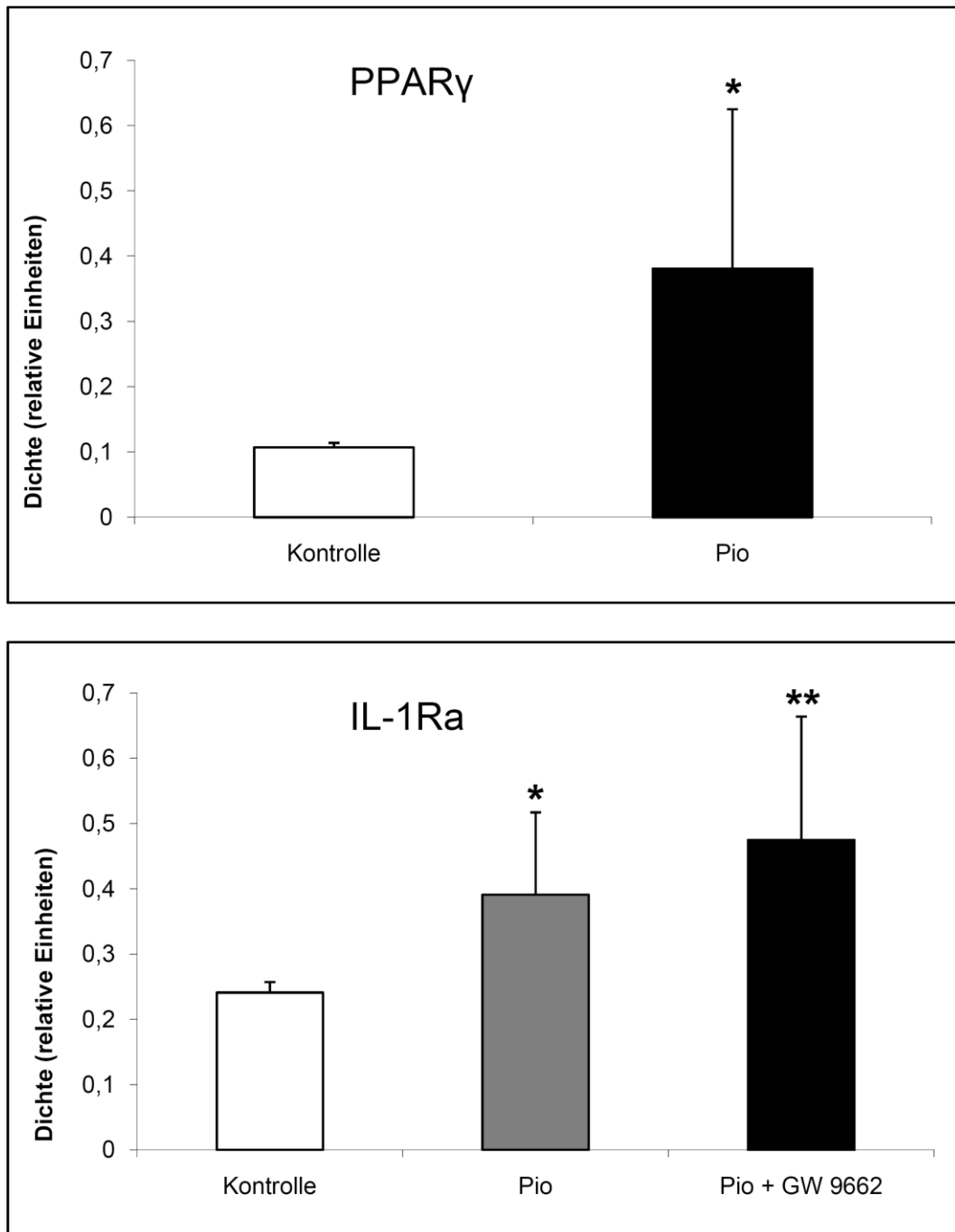


Abbildung 3.13: Western-Blot-Analyse der Expression des PPAR γ (oben) und des IL-1Ra (unten) in Zellkulturen

Das Diagramm zeigt die Intensität der Banden (im Verhältnis zu β -Aktin). Eine mit Vehikel behandelte Kultur (Kontrolle) wird mit einer mit Pioglitazon (Pio) behandelten Kultur verglichen. Die Expression des IL-1Ra wurde zusätzlich an einer mit Pioglitazon und einem selektiven PPAR γ -Antagonisten (GW 9662) behandelten Kultur untersucht. Alle Werte entsprechen dem arithmetischen Mittel \pm SD. Die statistische Analyse erfolgte mit ANOVA, gefolgt von einem post-hoc Bonferroni-Test. Der statistische Vergleich wurde mit der mit Vehikel behandelten (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$) und der mit Pioglitazon behandelten Kultur (kein signifikanter Unterschied) durchgeführt.

2.4.2 Bedeutung des PPAR δ für die Expression des IL-1Ra unter basalen Bedingungen

Die Behandlung primärer kortikaler Neurone mit dem selektiven PPAR δ -Agonisten GW 501516 bewirkte bereits in geringer Konzentration einen Trend zur erhöhten Expression des IL-1Ra (Abbildung 3.14). Deutlich zeigte sich der Effekt bei höherer Konzentration des Agonisten.

GW 501516 induziert den IL-1Ra *in vitro* unter basalen Bedingungen also dosisabhängig.

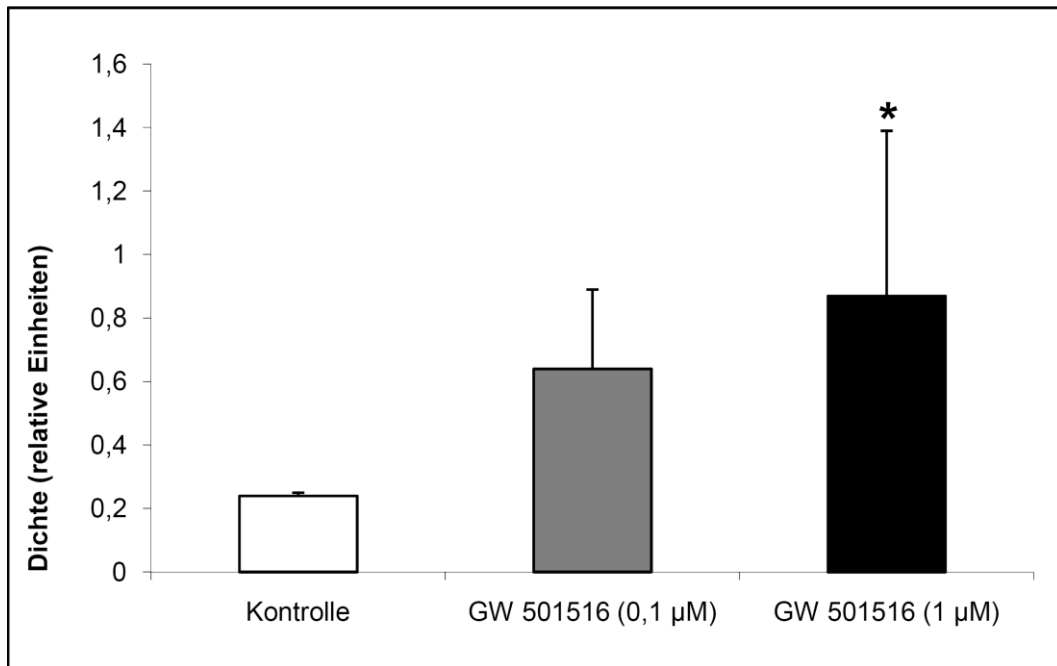


Abbildung 3.14: Western-Blot-Analyse der Expression des IL-1Ra in Zellkulturen

Das Diagramm zeigt die Intensität der Banden (im Verhältnis zu β -Aktin). Eine mit Vehikel behandelte Kultur (Kontrolle) wird mit zwei Kulturen verglichen, die mit einem selektiven PPAR δ -Antagonisten (GW 501516) in unterschiedlicher Konzentration behandelt wurden (0,1 μ M und 1 μ M). Alle Werte entsprechen dem arithmetischen Mittel \pm SD. Die statistische Analyse erfolgte mit ANOVA, gefolgt von einem post-hoc Bonferroni-Test. Der statistische Vergleich wurde mit der mit Vehikel behandelten Kultur (* $p < 0,05$) durchgeführt.

2.4.3 Analyse des PPAR γ , des IL-1Ra und der LDH bei Stimulation mit NMDA

Die Wirkung von Pioglitazon auf exzitotoxisch geschädigte neuronale Zellen wurde durch Stimulation der Zellen mit NMDA untersucht. Verglichen wurden:

- eine mit Vehikel behandelte Kultur
- eine mit NMDA stimulierte Kultur
- eine zusätzlich mit NMDA stimulierte und mit Pioglitazon vorbehandelte Kultur
- eine mit NMDA stimulierte und mit Pioglitazon und dem selektiven PPAR γ -Antagonisten GW 9662 vorbehandelte Zellkultur

Abbildung 3.15 zeigt eine exemplarische Darstellung der Western-Blot-Analyse und Abbildung 3.16 illustriert die zusammengefassten Ergebnisse. Der durch NMDA herbeigeführte exzitotoxische Zellschaden hatte keinen signifikanten Effekt auf die Expression des IL-1Ra. Erst die Behandlung mit Pioglitazon führte zu einer Überexpression des IL-1Ra, die durch GW 9662 nicht aufgehoben und daher PPAR γ -unabhängig vermittelt wurde. Zusätzlich ist die Messung der LDH als Marker des Zellsterbens in Abbildung 3.16 dargestellt. So konnte der Zelltod in den verschiedenen Gruppen quantifiziert werden. Die mit NMDA behandelte Gruppe zeigte ein signifikant erhöhtes Zellsterben im Vergleich zu der Kontrollgruppe. Die Stimulation mit Pioglitazon verringerte diesen Effekt deutlich, die LDH war im Vergleich zur Kontrollgruppe aber weiterhin signifikant erhöht. Durch Zugabe des PPAR γ -Antagonisten GW 9662 wurde die protektive Wirkung von Pioglitazon aufgehoben. Dieser Effekt wird daher über PPAR γ vermittelt.

Mit der Immunfluoreszenzuntersuchung (Abbildung 3.17) konnten die Ergebnisse der Western-Blot-Analyse bestätigt werden. Es wurden der IL-1Ra und der PPAR γ dargestellt.

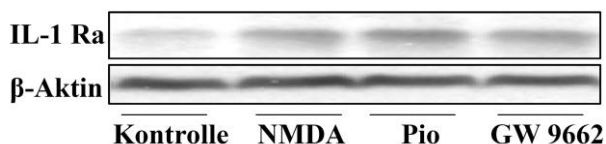


Abbildung 3.15: Exemplarische Darstellung der Expression des IL-1Ra in Zellkulturen Western-Blot-Analyse einer mit Vehikel behandelten Kultur (Kontrolle), einer mit NMDA stimulierten Kultur, einer mit NMDA stimulierten und Pioglitazon vorgehandelten Kultur (Pio) und einer zusätzlich mit einem selektiven PPAR γ -Antagonisten (GW 9662) behandelten Kultur

Die Zellen aller vier Gruppen zeigten eine konstant hohe Expression des PPAR γ . Die mit NMDA stimulierte Gruppe zeigte ein vermehrtes Zellsterben und zahlreiche Zellfragmente. Der an den mit Pioglitazon und Pioglitazon plus GW 9662 behandelten Zellen entstandene Schaden fiel deutlich geringer aus. Diese Zellen exprimierten den IL-1Ra vermehrt.

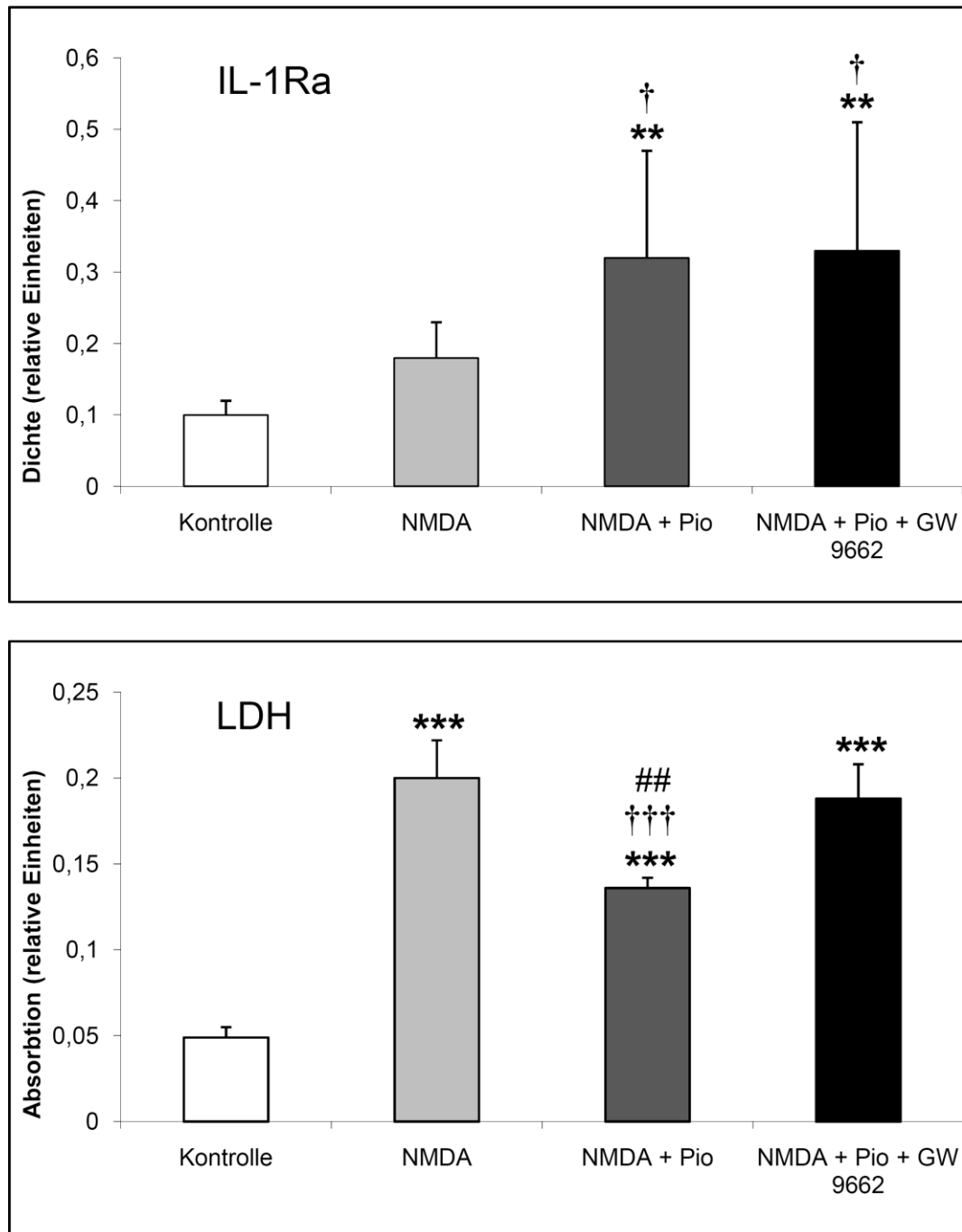


Abbildung 3.16: Untersuchung exzitotoxisch stimulierter Zellkulturen

– **Western-Blot-Analyse des IL-1Ra (oben) und Messung der LDH (unten)**

Aufgetragen sind die Intensität der Banden (im Verhältnis zu β -Aktin) oben und die photometrische Absorption bei 490 nm unten. Verglichen werden eine mit Vehikel behandelte Kultur (Kontrolle), eine mit NMDA stimulierte Kultur (NMDA), eine Kultur, die mit NMDA stimuliert und mit Pioglitazon vorbehandelt wurde (Pio) und eine vierte Kultur, der zusätzlich ein selektiver PPAR γ -Antagonisten zugefügt wurde (GW 9662). Alle Werte entsprechen dem arithmetischen Mittel \pm SD. Die statistische Analyse erfolgte mit ANOVA, gefolgt von einem post-hoc Bonferroni-Test. Der statistische Vergleich wurde mit der mit Vehikel behandelten Kultur (** $p < 0,01$; *** $p < 0.001$), der mit NMDA stimulierten Kultur († $p < 0.05$; ††† $p < 0.001$) und der mit Pioglitazon behandelten Kultur (## $p < 0,01$) durchgeführt.

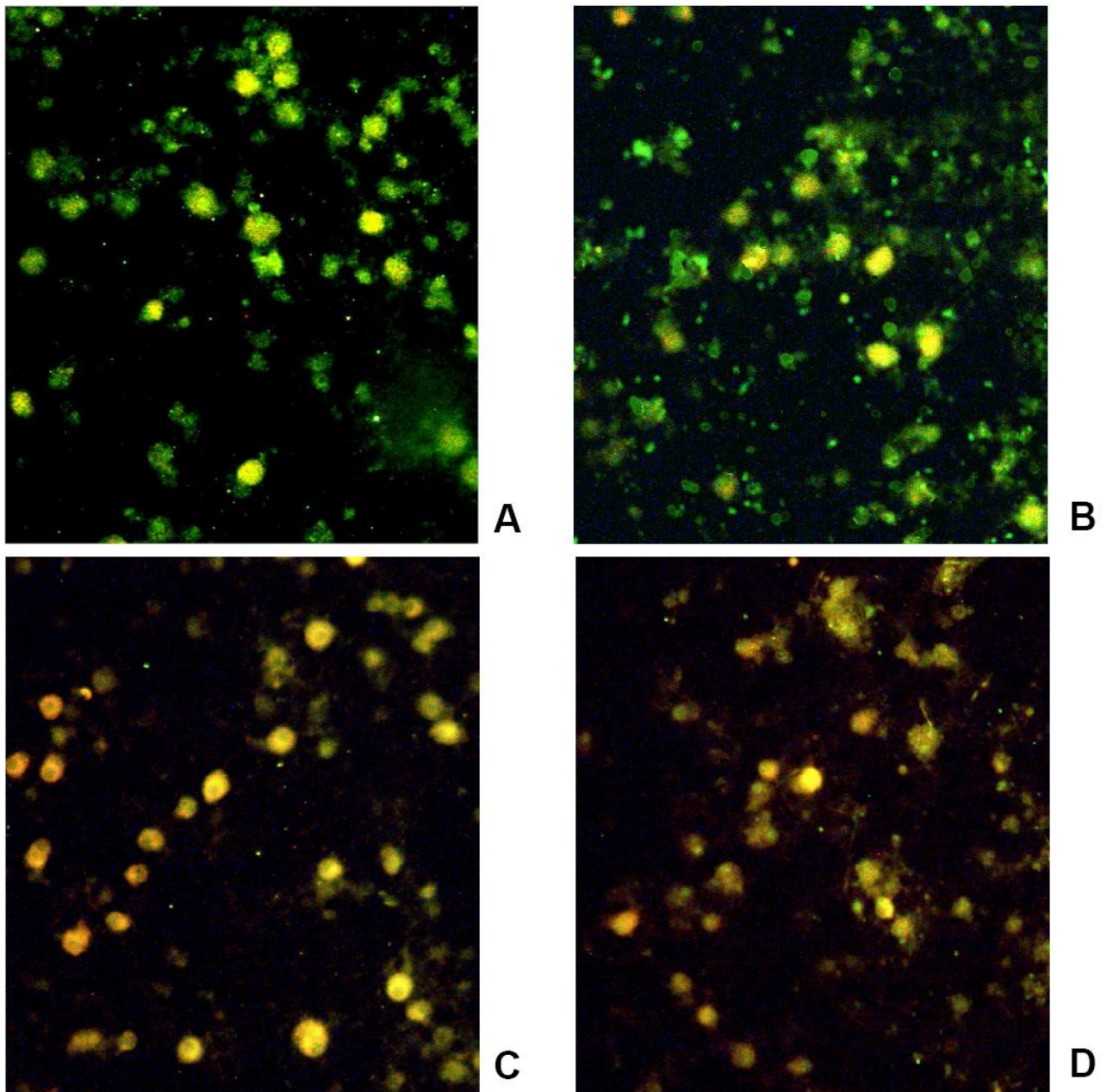


Abbildung 3.17: Kolokalisation (orange) des IL-1Ra (rot) mit PPAR γ (grün) in Zellkulturen

- (A) Eine mit Vehikel behandelte Zellkultur
- (B) Eine mit NMDA stimulierte Kultur
- (C) Eine Kultur, die mit NMDA stimuliert und mit Pioglitazon vorbehandelt wurde
- (D) Eine Kultur, der zusätzlich der selektive PPAR γ -Antagonist GW 9662 zugefügt wurde

4 Diskussion

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die ICV-Infusion von Pioglitazon die Expression des neuroprotektiven PPAR γ im Randbereich des ischämischen zerebralen Kortex erhöht, die Induktion des proinflammatorischen Zytokins IL-1 β unterdrückt und die Expression des IL-1Ra steigert. Diese Mechanismen reduzieren den postischämischen Entzündungsprozess, der den Gewebeschaden nach einem ischämischen Schlaganfall verstärkt und zum Absterben von Neuronen maßgeblich beiträgt.

Frühere Untersuchungen zeigten, dass eine fokale oder globale Ischämie die zerebrale Expression von PPAR γ in Neuronen und Mikroglia in dem betroffenen Kortexareal induziert. In der ischämischen Penumbra wurden erhöhte Spiegel der PPAR γ -mRNA und eine vermehrte Akkumulation PPAR γ -positiver Zellen nachgewiesen (Ou et al., 2006; Zhao et al., 2006a). Gleichzeitig ist die Bindung von PPAR γ an das PPRE des Zielgens erniedrigt, die biologische Aktivität des Rezeptors also eingeschränkt. Die Behandlung mit einem Agonisten am PPAR γ normalisiert die DNA-Bindungskapazität des PPAR γ vollständig (Luo et al., 2006; Ou et al., 2006). Bei Versuchstieren, die mit einem selektiven PPAR γ -Antagonisten behandelt wurden, der die Wirkung endogener PPAR γ -Liganden verhindert, richtete der Schlaganfall größeren Schaden an, das Schlaganfallvolumen war ausgedehnter. Die physiologische Aktivierung des PPAR γ durch endogene Liganden allein schützt daher die Neurone vor dem Zelltod (Victor et al., 2006). Dieser Befund belegt die Relevanz der postischämischen Überexpression des PPAR γ trotz reduzierter Bindung an das PPRE. Mechanismen, durch die aktivierter PPAR γ ohne Bindung an die DNA entzündungshemmend und neuroprotektiv wirken kann, werden im Folgenden noch diskutiert.

Luo et al. (2006) berichten von einer Induktion von PPAR- γ nach einer ICV-Gabe des endogenen Agonisten 15d-PGJ $_2$. Es wird deutlich, dass PPAR γ -Agonisten einerseits die Expression des PPAR γ im ischämischen Gewebe induzieren, andererseits auch dessen Bindungsaktivität erhöhen. Es ist deshalb wichtig, die Bedeutung des zentralen PPAR γ nach dem ischämischen Schlaganfall weiter zu untersuchen. In unseren Versuchen wurde Pioglitazon ICV infundiert, um eine selektive Aktivierung des PPAR γ im Gehirngewebe zu erreichen, ohne den peripheren PPAR γ zu beeinflussen. In früheren Experimenten konnte gezeigt werden, dass die in dieser Arbeit verwendete Dosis von Pioglitazon das ischämische kortikale Gewebe ausreichend mit dem Agonisten saturiert (Patzner et al. 2008).

Unsere Ergebnisse zeigen, dass die ICV-Behandlung mit Pioglitazon die Ischämie-induzierte Überexpression von PPAR γ im betroffenen Kortex steigert. Das bedeutet, dass der PPAR γ -Agonist seinen eigenen Rezeptor induziert. Aus anderen Rezeptorsystemen, etwa den Adrenozeptoren, ist das Gegenteil bekannt: Vermehrte Stimulation durch einen Agonisten führt zu einer reduzierten Expression der entsprechenden Rezeptoren (Aktories et al., 2006). Pioglitazon verstärkt allerdings die Bindung des PPAR γ an das PPRE. Die Transkription verschiedener Gene, die für die erhöhte Expression des PPAR γ verantwortlich sind, wird so induziert (Ou et al, 2006; Victor et al., 2006). Die Aktivierung des PPAR γ hat sowohl protektive Effekte für das umliegende Hirngewebe als auch für die PPAR γ -überexprimierende Zelle selbst (Culman et al., 2007). Wir gehen davon aus, dass Zellen, die den Rezeptor exprimieren, in Anwesenheit eines PPAR γ -Agonisten vor den schädlichen Einflüssen der Ischämie geschützt werden.

Die neuroprotektive Wirkung des aktivierten PPAR γ bei der experimentellen fokalen Ischämie wurde mehrfach beschrieben (Bordet et al., 2006; Culman et al., 2007; Yi et al., 2007). Auch in dieser Arbeit konnte der günstige Effekt von Pioglitazon auf den Hirnschaden durch die neurologische Untersuchung der Versuchstiere deutlich gemacht werden. Die mit Pioglitazon behandelten Tiere zeigten geringere neurologische Ausfälle als die mit Vehikel behandelten Tiere. Pioglitazon bewirkte diesen Effekt nicht über eine verbesserte Durchblutung der Rattengehirne, da sich die während der MCAO-Operation gemessenen CBF-Werte in der mit Vehikel und Pioglitazon behandelten Gruppe nicht unterschieden. Der beobachtete neuroprotektive Effekt des Glitazons muss also über zentrale Mechanismen vermittelt werden.

Neben der neuroprotektiven Eigenschaft haben PPAR γ -Agonisten eine nachgewiesene entzündungshemmende Wirkung. Glitazone, wie z.B. Pioglitazon, modulieren postischämisch die Expression von Entzündungsmediatoren und vermindern dadurch die postischämische Inflammation (Ricote et al., 1999).

Die postischämische Inflammation spielt in der Pathogenese der zerebralen Ischämie eine entscheidende Rolle. Die Entzündungsreaktion wird durch zahlreiche Zytokine initiiert und aufrechterhalten. Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass die Behandlung mit PPAR γ -Agonisten eine verringerte Akkumulation von Entzündungszellen und eine verminderte Expression von proinflammatorischen Mediatoren nach dem Schlaganfall bewirkt. Dazu gehören Zytokine wie TNF α und IL-6, Chemokine, Adhäsionsmoleküle, die COX-2 und die iNOS (Sundarajajan et al., 2005; Collino et al., 2006; Luo et al., 2006; Zhao et al., 2006b; Tureyen et al., 2007; Patzer et al., 2008). Der Schwerpunkt unserer Arbeit lag

auf der Untersuchung der postischämischen Expression von IL-1 β und dem IL-1Ra. Wir konnten zeigen, dass die zentrale Behandlung von Versuchstieren mit dem PPAR γ -Agonisten Pioglitazon die Expression von IL-1 β hemmt.

IL-1 β ist einer der wichtigsten Entzündungsmediatoren mit vielseitiger Wirkung auf das geschädigte Hirngewebe (Allan & Rothwell, 2003). IL-1 β initiiert und beschleunigt den inflammatorischen Prozess im postischämischen Geschehen und fördert die neurodegenerativen Vorgänge. Im Tierexperiment vergrößert die Applikation von IL-1 β in ein ischämisches Hirnareal den Gewebeschaden und damit das neurologische Defizit der Tiere. IL-1 β gehört zu den potentesten Induktoren von Adhäsionsmolekülen auf der Oberfläche aktivierter Endothelzellen und ist in der Lage, die Invasion von Entzündungszellen in das ischämische Gebiet zu verstärken (Huang et al., 2006). Diese Entzündungszellen halten den inflammatorischen Prozess in Gange und verstärken den entstehenden Gewebeschaden. Diskutiert wird ebenfalls ein Zusammenhang zwischen IL-1 β und apoptotischen Prozessen. Die Aktivierung der Signalkaskade am IL-1RI durch IL-1 β könnte den programmierten Zelltod induzieren (Rothwell et al., 1999).

Wir konnten eine Überexpression von IL-1 β sowohl am ersten als auch am zweiten Tag nach dem Schlaganfall beobachten. Andere Arbeitsgruppen haben zuvor die gewebeschädigende Wirkung von IL-1 β im postischämischen Inflammationsprozess beschrieben und einen deutlichen Anstieg der IL-1 β mRNA im ischämischen Gewebe bereits nach einer Stunde detektiert (Touzani et al., 1999; Rothwell & Luheshi, 2000). In unseren Versuchen wurde deutlich, dass der IL-1 Spiegel am zweiten postischämischen Tag noch stärker erhöht ist, als 24 h nach der Ischämie. Das geschädigte Hirngewebe ist dem Einfluss von IL-1 β auch noch Stunden und Tage nach Ablauf der Ischämie ausgesetzt, die zytotoxischen Effekte summieren sich und wirken verstärkt neurodegenerativ.

Wir haben eine deutliche Verminderung der Ischämie-induzierten Expression von IL-1 β im ischämischen Gewebe durch die Behandlung mit Pioglitazon festgestellt. Sundararajan et al. zeigten 2005 erstmals einen hemmenden Effekt von Troglitazon auf die postischämischen Spiegel von IL-1 β mRNA bei der Ratte. Die postischämisch produzierte mRNA, wird aber nicht in jedem Falle vollständig translatiert, geht also nur begrenzt mit der tatsächlich vorhanden Menge IL-1 β einher (Roux-Lompard, 1998). Die von uns durchgeführte direkte Bestimmung des Proteins liefert den definitiven Beweis für den hemmenden Effekt von Pioglitazon auf die Expression von IL-1 β im ischämischen Gewebe.

Unterschiedliche Mechanismen können die Reduktion des IL-1 β Spiegels nach fokaler Ischämie durch Pioglitazon erklären. Die wichtigste Quelle von IL-1 β im zentralen

Nervensystem sind Makrophagen und mikrogliale Zellen (Davies et al., 1999). Die ICV-Behandlung mit Pioglitazon verringert die Anhäufung inflammatorischer Zellen im ischämischen Kortexareal. Dieser Effekt zeigt sich aber erst 48 h nach Beginn der Ischämie deutlich (Zhao et al., 2005b). In unseren Experimenten verringerte die Gabe von Pioglitazon den IL-1 β Spiegel bereits 24 h nach MCAO. Ein geringeres Aufkommen von Entzündungszellen kann die verringerte Expression von IL-1 β also nicht vollständig erklären. Im Gegenteil vermuten wir, dass die reduzierte Ansammlung von Entzündungszellen im ischämischen Kortex auch mit der verminderten Induktion von IL-1 β nach Behandlung mit Pioglitazon zusammenhängt. Da Pioglitazon zentral appliziert wird und nicht direkt auf die Gefäße und die Expression vaskulärer Adhäsionsmoleküle wirken kann, muss es die vaskulären Strukturen durch Initiation indirekter Signalwege beeinflussen. Die Reduktion von IL-1 β stellt einen möglichen Mechanismus dar, durch den Pioglitazon der Akkumulation von Entzündungszellen entgegenwirken kann.

Die PPAR γ -Aktivierung kann die Expression von IL-1 β im ischämischen Gewebe auf zellulärer Ebene hemmen. Der PPAR γ ist in der Lage unabhängig von seiner Bindung an die DNA die Transkription proinflammatorischer Gene zu beeinflussen. Das für IL-1 β kodierende Gen wird durch zahlreiche Transkriptionsfaktoren kontrolliert, wie z.B. NF κ B oder AP-1 bindende Proteine (Allan et al., 2005). Einerseits konkurriert aktiviertes PPAR γ mit diesen Transkriptionsfaktoren um Ko-Aktivatoren, die zur Bindung an die DNA benötigt werden, andererseits blockiert PPAR γ die Phosphorylierung von Kinasen wie der mitogenaktivierten Proteinkinase oder der c-Jun N-terminalen Kinase 1, die Transkriptionsfaktoren phosphorylieren und aktivieren (Abdelrahman et al., 2005). Eine wichtige Rolle spielt auch der Mechanismus der Transrepression, einer Interaktion zwischen PPAR γ und anderen Transkriptionsfaktoren, wie z.B. NF κ B. Die Transkription proinflammatorischer Gene wird durch gebundene Ko-Repressions-Komplexe unterdrückt (Ricote & Glass, 2007). Aktivierter PPAR γ ist in der Lage diese Ko-Repressions-Komplexe zu binden und ihren Austausch gegen Ko-Aktivatoren zu verhindern. Die Transrepression wurde für NF κ B in Makrophagen beschrieben (Pascual et al., 2005). Dass sie auch in mikroglialen Zellen stattfindet, liegt aufgrund der gemeinsamen Vorläuferzellen nahe. Ob dieser Mechanismus aber auch in Neuronen eine Rolle spielt, bleibt fraglich.

Als weitere Möglichkeit reduziert die Behandlung mit Pioglitazon die Produktion von TNF- α im ischämischen Kortexareal (Zhao et al., 2006b). Dieses Zytokin induziert über eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B die Produktion von IL-1 β . Die verringerten

Spiegel von IL-1 β können also auch durch die verminderte Induktion von TNF- α und folglich verminderte Aktivierung von NF κ B vermittelt sein.

IL-1 β entfaltet seine Wirkung über die Bindung am IL-1RI. Ein zweiter Rezeptor, der IL-1RII, bindet ebenfalls das Zytokin, ohne aber eine Signalkaskade auszulösen. Seine einzige Funktion scheint daher die Inaktivierung von freigesetztem IL-1 zu sein. Beide Rezeptoren werden nach globaler oder fokaler Ischämie im betroffenen Kortex überexprimiert. Der Anstieg des IL-1RI erfolgt erst nach mehreren Stunden bis Tagen, der des IL-1RII bereits nach wenigen Stunden (Touzani et al., 1999; Fogal & Hewett, 2008). Eine signifikante Induktion des IL-1RI nach fokaler Ischämie wurde auch in dieser Arbeit beobachtet. Sairanen et al. (1997) konnte die Überexpression des Rezeptors nach globaler Ischämie hauptsächlich in Neuronen nachweisen. Wir haben mittels der Immunfluoreszenzfärbung gezeigt, dass auch mikrogliale Zellen und Makrophagen zur postischämischen Expression des Rezeptors beitragen. IL-1 entfaltet seine Wirkung daher nicht nur in neuronalen Zellen, sondern hat auch eine Funktion bei der Stimulation der Abwehrzellen. Welche Faktoren die Überexpression des Rezeptors vermehrt in Neuronen oder inflammatorischen Zellen begünstigen, bleibt fraglich. Das Ausmaß der Ischämie und der Reperfusion könnten determinierend sein (Sairanen et al., 1997).

Ein Effekt von Pioglitazon auf die erhöhte Expression des IL-1RI nach dem Schlaganfall konnte in dieser Versuchsreihe nicht beobachtet werden. Die Überexpression des Rezeptors geht aber nur begrenzt mit der Signaltransduktion von IL-1 β einher, da auch andere Rezeptoren die Wirkung von IL-1 β vermitteln können (Touzani et al., 1999). Die postischämische Überexpression des IL-1RI bleibt aber ein wichtiger Faktor für die verstärkte IL-1 Signaltransduktion im geschädigten Hirnareal.

Die Existenz eines endogenen Antagonisten am IL-1 Rezeptor bietet dem Organismus die Möglichkeit, die Wirkung von IL-1 β zu modulieren. Der IL-1Ra konkurriert mit IL-1 β um die Bindung am Rezeptor. Er verhindert alle Effekte von IL-1 β auf die Zelle. Genau wie IL-1 β wird er im ischämischen Hirngewebe vermehrt exprimiert. Fokale oder globale Ischämien stimulieren die Produktion des IL-1Ra. Der Spiegel des antiinflammatorischen Zytokins steigt erst einige Stunden nach Ischämiebeginn und somit später als der von IL-1 β an (Wang et al., 1997). Der postischämische Anstieg des IL-1Ra konnte in dieser Arbeit in Einklang mit der Literatur bestätigt werden. Wir haben ebenfalls beobachten können, dass der Rezeptorantagonist in Neuronen aber auch in Mikroglia und Makrophagen exprimiert wird. Park et al. (2005) konnten ähnliche Ergebnisse präsentieren: Die Arbeitsgruppe zeigte die Induktion des IL-1Ra in mikroglialen Zellen des Hippocampus nach transientscher Ischämie.

Die postischämisch produzierte Menge des IL-1Ra ist aber nicht ausreichend, um die Wirkung von IL-1 zu blockieren. Das Gleichgewicht zwischen den Zytokinen ist zugunsten des proinflammatorischen verschoben. Die in unseren Versuchen beobachtete Induktion des IL-1Ra und die Unterdrückung von IL-1 β stellen einen möglichen Wirkmechanismus dar, durch den Pioglitazon inflammatorische Prozesse hemmt und die Progression des ischämischen Schadens vermindert.

Der IL-1Ra zeigte in diversen Tiermodellen, z.B. bei der experimentellen fokalen Ischämie, neuroprotektive Eigenschaften (Rothwell & Luheshi, 2000). Die Deletion des für den Antagonisten kodierenden Gens verschlimmert den Gewebeschaden genauso wie die Applikation eines spezifisch gegen den IL-1Ra gerichteten Antikörpers (Loddick et al., 1997; Allan et al., 2005; Pinteaux et al., 2006). Im Gegenzug reduzieren die transgene Überexpression und die externe Applikation des IL-1Ra den ischämischen Hirnschaden und den Neuronentod (Relton & Rothwell, 1992; Yang et al., 1997; Betz et al., 1995; Yang et al., 1999; Rothwell & Luheshi, 2000).

Die Behandlung mit Pioglitazon verstärkte die durch die Ischämie hervorgerufene Induktion des IL-1Ra. Interessanterweise lieferten die verschiedenen Untersuchungsmethoden von einander abweichende Ergebnisse. Die immunhistochemische Färbung zeigte deutlich erhöhte Zahlen IL-1Ra-positiver Zellen in den am Ischämierand lokalisierten Arealen sowohl 24 als auch 48 h nach MCAO. Die Behandlung mit Pioglitazon erhöhte die Zahl der IL-1Ra-positiven Zellen zu beiden Zeitpunkten. Mit der Western-Blot-Analyse konnten wir dagegen keine signifikante Induktion des IL-1Ra durch die Ischämie feststellen. Die Behandlung mit Pioglitazon induzierte erst 48 h nach MCAO einen erhöhten IL-1Ra-Spiegel im ischämischen Kortex der Ratten.

Diese Diskrepanz kann durch die Lokalisation der für die immunhistochemische Färbung gewählten Gebiete im frontoparietalen Kortex erklärt werden: Die untersuchten Areale lagen sehr nah am Kern der Ischämie. Für die Western-Blot-Analyse wurde ein Teil des frontoparietalen Kortex verwendet, der neben dem stark beschädigten Gewebe am Rand des ischämischen Kerns auch Gewebe beinhaltete, das von der Ischämie leichter betroffen war. Wir vermuten also, dass die postischämische Expression des IL-1Ra durch das Ausmaß der Ischämie beeinflusst werden kann. Wir gehen davon aus, dass eine ausgeprägte Ischämie eine stärkere Induktion des IL-1Ra bewirkt als eine unvollständige Ischämie. Die Behandlung mit Pioglitazon scheint bei starker Ischämie ebenfalls eine größere Wirkung zu entfalten. Auch der Zeitverlauf der Induktion kann durch das Ausmaß der Ischämie beeinflusst werden. Die

Behandlung mit Pioglitazon scheint den Anstieg der IL-1 Expression umso schneller zu induzieren, desto stärker sich die Ischämie manifestiert.

Pioglitazon reguliert inflammatorische Prozesse über PPAR γ abhängige und unabhängige Mechanismen (Chawla et al., 2001; Kielian & Drew, 2003; Sundararajan & Landreth, 2004). Um die Bedeutung des Rezeptors für die Überexpression des IL-1Ra zu untersuchen, führten wir weitere Versuche an primären neuronalen Zellkulturen durch. Pioglitazon induzierte auch bei primären kortikalen Neuronen die Überexpression des PPAR γ .

Die Stimulation der Zellkulturen erfolgte in unserer Versuchsreihe mit NMDA. Massiver Kalzium-Einstrom nach NMDA-Rezeptor-Aktivierung bewirkt das Sterben der Neurone (Dirnagl et al., 1999), das durch die Freisetzung von LDH in das Kulturmedium quantifiziert wurde. Pioglitazon verringerte den LDH-Spiegel im Kulturmedium. Dieser Effekt wird über PPAR γ vermittelt, da er durch die Applikation des selektiven PPAR γ -Antagonisten GW 9662 aufgehoben werden konnte. Luna-Medina et al. (2005) beobachteten ebenfalls, dass der von Thiazolidindionen bewirkte Schutz primärer kortikaler Zellkulturen vor exzitotoxisch wirkender Substanzen durch PPAR γ vermittelt wird.

NMDA ist direkt neurotoxisch und aktiviert die Transkription inflammatorischer Gene (Jander et al., 2000). In unseren Versuchen bewirkte NMDA einen Trend zu erhöhten Werten des IL-1Ra, aber erst die Behandlung mit Pioglitazon induzierte eine deutliche Überexpression des Antagonisten. Da die Gabe von GW 9662 die Überexpression des Rezeptorantagonisten nicht beeinflussen konnte, wurde dieser Effekt nicht über PPAR γ vermittelt. Die Induktion des IL-1Ra durch Pioglitazon ließ sich auch an intakten neuronalen Zellen, die nicht mit NMDA stimuliert wurden, beobachten und ebenfalls nicht durch GW 9662 aufheben. Auch unter basalen Bedingungen vermittelt Pioglitazon seine Wirkung also nicht über PPAR γ .

Die von Moulin et al. (2005) beobachtete Induktion des IL-1Ra durch Rosiglitazon in mit IL-1 β stimulierten Fibroblasten der Ratte konnte ebenfalls weder durch Überexpression noch durch Inhibition des PPAR γ beeinflusst werden. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen konnten Meier et al. (2002) zeigen, dass die durch PPAR γ -Liganden induzierte Produktion des Rezeptorantagonisten in stimulierten Monozyten tatsächlich über eine Aktivierung von PPAR γ vermittelt wird. Die Antwort der Zellen auf Pioglitazon scheint daher von dem entsprechenden Zelltyp und den verwendeten Stimuli abzuhängen.

Wir haben gezeigt, dass Pioglitazon den durch NMDA verursachten Schaden an neuronalen Zellkulturen durch einen PPAR γ abhängigen Mechanismus verringert. Entsprechend wurde für die PPAR γ -Liganden 15d-PGJ2 und Ciglitazon (einem Vorläufer der modernen

Thiazolidindione) gezeigt, dass sie die durch NMDA und Glutamat hervorgerufene Toxizität in kortikalen Zellkulturen mindern (Zhao et al., 2006a). Die Peri-Infarkt-Depolarisation und die Aktivierung der NMDA-Rezeptoren führen im postischämischen Geschehen zu einer Induktion der COX-2 (Hewett et al., 2000; Koistinaho & Chan, 2000; Strauss & Marini, 2002). Die Reduktion der COX-2 nach Vorbehandlung mit Pioglitazon und konsekutiver Stimulation mit Wasserstoffperoxid wurde in primären kortikalen Neuronen von Zhao et al. (2006b) gezeigt. Diese Daten implizieren einen Zusammenhang zwischen den neuroprotektiven Eigenschaften von Pioglitazon und der Reduktion des neuronalen oxidativen Stresses. Glutamat-Toxizität, oxidativer Stress und IL-1 β stehen somit in enger Verbindung zueinander. Die Aktivierung des neuronalen PPAR γ leistet hierbei einen entscheidenden Beitrag zur neuroprotektiven Wirkung von Pioglitazon (Fogal & Hewett, 2008).

Unabhängig von der PPAR γ vermittelten neuroprotektiven Wirkung von Pioglitazon auf primäre kortikale Neurone, induziert das Glitazon die Expression des IL-1Ra in den Neuronen sowohl unter basalen Bedingungen als auch bei Stimulation mit NMDA durch einen PPAR γ -unabhängigen Mechanismus. Die Induktion des Antagonisten ist *in vitro* bei Hemmung der PPAR γ -abhängigen Effekte nicht neuroprotektiv wirksam. Der IL-1Ra entfaltet seine Wirkung *in vivo* über die Hemmung der proinflammatorischen Effekte von IL-1 β (Pinteaux et al., 2006). In den von uns verwendeten rein neuronalen Zellkulturen spielt IL-1 β für die Entstehung des neuronalen Schadens durch NMDA offensichtlich keine große Rolle. Der IL-1Ra kann unter diesen Bedingungen daher nicht neuroprotektiv wirken.

Mögliche Vermittler der PPAR γ -unabhängigen Modulation der Expression des IL-1Ra sind die anderen Isoformen des PPAR. Es konnte gezeigt werden, dass Glitazone einen Teil ihrer Effekte über PPAR α und PPAR δ vermitteln. So induziert Pioglitazon z.B. Apolipoprotein A-I in humanen Leberzellen über PPAR α (Qin et al., 2007) und die bereits beschriebene Induktion des IL-1Ra durch Rosiglitazon in mit IL-1 β stimulierten Fibroblasten der Ratte wird durch aktivierten PPAR δ bewirkt (Moulin et al., 2005). Wir konnten zeigen, dass die Behandlung primärer Neurone mit dem selektiven PPAR δ -Agonisten GW 501516 dosisabhängig eine Überexpression des IL-1Ra hervorruft. Die Tatsache, dass Pioglitazon den IL-1Ra PPAR γ -unabhängig induziert und dass die Aktivierung von PPAR δ zu Überexpression des IL-1Ra führt, impliziert einen PPAR δ -vermittelten Mechanismus der Induktion des IL-1Ra durch Pioglitazon in Neuronen *in vivo* und *in vitro*. Detaillierte Analysen der Interaktion von Pioglitazon und PPAR δ , z.B. in mit NMDA stimulierten primären Neuronen, sind notwendig um unsere Vermutung definitiv zu belegen.

In dieser Arbeit konnten wir zeigen, dass Pioglitazon das postischämische Geschehen durch zwei unabhängige Mechanismen moduliert: PPAR γ -abhängig hauptsächlich durch Reduktion des oxidativen Stresses und durch Hemmung des exzitotoxischen Zellschadens und PPAR γ -unabhängig durch Steigerung der postischämischen Expression des IL-1Ra und der daraus resultierenden Hemmung der durch IL-1 β induzierten inflammatorischen Prozesse.

Wir gehen davon aus, dass die Reduktion von IL-1 β und die Induktion des IL-1Ra durch Pioglitazon beim Schlaganfall signifikant zum neuroprotektiven Effekt des PPAR γ -Agonisten beitragen.

Dies eröffnet neue Perspektiven für den klinischen Einsatzes der PPAR γ -aktivierenden Thiazolidindione. Zur Antagonisierung der Effekte von IL-1 β nach einem Schlaganfall sind große Mengen des IL-1Ra notwendig. Die Überexpression des Antagonisten im minderperfundierten Hirngewebe reicht nicht aus, um die Wirkung von IL-1 β ausreichend zu blockieren (Fogal & Hewett, 2008). Ein deutlich höherer Spiegel des IL-1Ra durch ICV-Applikation oder transgene Überexpression wirken im Tierversuch neuroprotektiv (Relton & Rothwell, 1992; Yang et al., 1997). Diese Methoden sind zwar experimentell wegweisend, klinisch aber nicht relevant.

Ein effektives therapeutisches Prinzip stellt die systemische Behandlung mit rhIL-1Ra dar. Die Therapie zeigte im Tierversuch eine signifikante Reduktion des Schlaganfallvolumens und des neurologischen Defizits (Garcia et al., 1995; Gibson et al., 2004; Relton et al., 1996). Eine wiederholte Injektion des Antagonisten in hoher Dosis war jedoch erforderlich, um eine zufriedenstellende Wirkung zu erreichen. Da es sich bei dem Antagonisten mit 17 kDa um ein großes Protein handelt, ist seine Wirksamkeit im zentralen Nervensystem eingeschränkt. Bei der Ratte konnte nachgewiesen werden, dass der IL-1Ra nach einem Schlaganfall die Blut-Hirn-Schranke überwinden kann, beim Menschen ist diese Frage nicht geklärt (Allan & Rothwell, 2003). Ein aktives Transportersystem in Kombination mit der durch die Ischämie geschädigten zentralen Barriere, könnte aber das Eindringen des rhIL-1Ra in das zentrale Nervensystem ermöglichen (Rothwell, 2003). Erste klinische Studien bestätigen, dass der rhIL-1Ra postischämisch zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke in der Lage ist. Der rhIL-1Ra wurde erfolgreich bei Schlaganfallpatienten getestet (Emsley et al., 2005). Aufgrund der kurzen Halbwertszeit des Proteins waren jedoch mehrfache Injektionen über 72 Stunden notwendig um eine Besserung des klinischen Krankheitsbildes zu erreichen (Emsley et al., 2008).

Im Gegensatz zur systemischen Therapie mit systemischen Wirkungen und Nebenwirkung stimuliert Pioglitazon die Produktion des IL-1Ra direkt am Ort des pathologischen

Geschehens: im ischämischen Hirngewebe. In dieser Arbeit wurde eine neue Möglichkeit aufgezeigt, die Expression des IL-1Ra im ischämisch geschädigten frontoparietalen Kortex zu steigern. Die Schlüsselrolle des IL-1 bei vielen pathologischen Zuständen des zentralen Nervensystems wie der multiplen Sklerose, der amyotrophen Lateralsklerose, Morbus Parkinson und Morbus Alzheimer (Rothwell & Luheshi, 2000) machen PPAR γ -Agonisten zu potentiell effektiven Substanzen bei diesen Erkrankungen. Bei der Therapie des Schlaganfalls könnten sie in Zukunft eine wichtige Rolle spielen, allerdings muss eine systematische klinische Testung abgewartet werden.

5 Zusammenfassung

Das gestörte Gleichgewicht zwischen Interleukin-1 β und dem Interleukin-1 Rezeptorantagonisten im ischämisch geschädigten frontoparietalen Kortex resultiert in einer verstärkten inflammatorischen Reaktion und einem gesteigerten neuronalen Zellsterben. Durch intrazerebroventrikuläre Behandlung mit Pioglitazon werden die Entzündungsreaktion und der neuronale Zelltod bei der Ratte gehemmt.

In dieser Studie untersuchten wir die Wirkung von Pioglitazon bei der experimentellen fokalen Ischämie auf die Expression des Interleukin-1 β , des Interleukin-1 Rezeptorantagonisten und des Interleukin-1 Rezeptors I im ischämischen Kortex der Ratte mittels der Western-Blot-Analyse, der Immunhistochemischen Untersuchung und der Immunfluoreszenzfärbung. Die zerebrale Ischämie führte zu einer deutlichen Überexpression des Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptors γ , des Interleukin-1 β , des Interleukin-1 Rezeptorantagonisten und des Interleukin-1 Rezeptor I und steigerte die Anzahl der Zellen, die sich positiv für den Interleukin-1 Rezeptorantagonisten färbten.

Die intrazerebroventrikuläre Vorbehandlung mit Pioglitazon verbesserte den neurologischen Status der Versuchstiere und stimulierte zusätzlich die erhöhte Expression des Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptors γ im ischämischen Gewebe. Die Ischämie-induzierte Produktion von Interleukin-1 β wurde gehemmt und die des Interleukin-1 Rezeptorantagonisten zusätzlich gesteigert. Die Behandlung erhöhte die Anzahl Interleukin-1 Rezeptorantagonist positiver Neurone und Abwehrzellen. Die Expression des Interleukin-1 Rezeptors I, der in den Membranen von Neuronen und Entzündungszellen detektiert wurde, wurde durch die Behandlung mit Pioglitazon nicht beeinflusst.

An primären neuronalen Zellkulturen wurde die Bedeutung des Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptors γ bei der Regulation des Interleukin-1 Rezeptorantagonisten untersucht. Pioglitazon führte zu einer Überexpression des Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptors γ und induzierte die Produktion des Interleukin-1 Rezeptorantagonisten in primären Neuronen sowohl unter basalen Bedingungen als auch bei Stimulation mit exzitotoxisch wirksamen N-Methyl-D-Aspartat. Dieser Effekt konnte durch den selektiven Antagonisten am Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptor γ GW 9662 nicht aufgehoben werden und wird daher nicht über diesen Rezeptor vermittelt. Als alternativer Mechanismus kommt eine Aktivierung der anderen Isoformen des Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptors (α oder δ) durch Pioglitazon in Frage. Die Behandlung primärer Neurone mit dem selektiven

Agonisten am Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptor δ GW 501516 induzierte dosisabhängig eine Überexpression des Interleukin-1 Rezeptorantagonisten. Dies impliziert, dass auch Pioglitazon die Induktion des Interleukin-1 Rezeptorantagonisten unter basalen Bedingungen über den Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor δ vermittelt.

Die Stimulation der primären kortikalen Neuronen mit N-Methyl-D-Aspartat führte zu einer deutlich erhöhten Laktatdehydrogenase, einem Marker des Zellsterbens, im Kulturmedium. Die Behandlung mit Pioglitazon senkte den Spiegel der Laktatdehydrogenase, wirkte also neuroprotektiv. Dieser Effekt konnte mit GW 9662 vollständig aufgehoben werden und ist daher abhängig von der Aktivierung des Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptors γ .

Die Normalisierung des Gleichgewichtes zwischen Interleukin-1 β und dem Interleukin-1 Rezeptorantagonisten durch Pioglitazon im postischämischen Gewebe begrenzt die Auswirkungen von Interleukin-1 β als Mediator im Entzündungsprozess. Unsere Daten implizieren, dass die Überexpression des antiinflammatorischen Interleukin-1 Rezeptorantagonisten einen zentralen Mechanismus bei der neuroprotektiven Wirkung von Pioglitazon darstellt. Pioglitazon wirkt über den Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptor γ *in vivo* und *in vitro* neuroprotektiv und induziert von diesem Rezeptor unabhängig, höchstwahrscheinlich über den Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptor δ vermittelt, den Interleukin-1 Rezeptorantagonisten in ischämischen Neuronen. Pioglitazon aktiviert somit zwei unabhängige Rezeptoren, deren Aktivierung sich protektiv auf das ischämische Gewebe und die geschädigten Neurone nach einem Schlaganfall auswirken kann.

6 Literaturverzeichnis

- Abdelrahman M, Sivarajah A, Thiernemann C. *Beneficial effects of PPAR- γ ligands in ischemia-reperfusion injury, inflammation and shock*. Cardiovasc Res. 2005; 65: 772-81
- Aktories K, Förstermann U, Hofmann F, Starke K. *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. Urban & Fischer bei Elsevier, München. 2006
- Allan SM & Rothwell N. *Cytokines and acute neurodegeneration*. Nature Reviews 2001; 2: 734-44
- Allan SM & Rothwell N. *Inflammation in central nervous system injury*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2003; 358: 1669-77
- Allan SM, Tyrrell PJ, Rothwell NJ. *Interleukin-1 and neuronal injury*. Nat Rev Immunol. 2005; 5: 629-40
- Betz AL, Yang GY, Davidson BL. *Attenuation of stroke size in rats using an adenoviral vector to induce overexpression of interleukin-1 receptor antagonist in brain*. J Cereb Blood Flow Metab. 1995; 15: 447-51
- Bordet R, Ouk T, Petrault O, Gelé P, Gautier S, Laprais M, Deplanque D, Duriez P, Staels B, Fruchart JC, Bastide M. *PPAR: a new pharmacological target for neuroprotection in stroke and neurodegenerative Disease*. Biochemi Soc Trans. 2006; 34: 1341-46
- Chawla A, Barak Y, Nagy L, Liao D, Tontonoz P, Evans RM. *PPAR- γ dependent and independent effects on macrophage-gene expression in lipid metabolism and inflammation*. Nat Med. 2001; 7: 48-52
- Collino M, Aragno M, Mastrocola R, Gallicchio M, Rosa AC, Dianzani C, Danni O, Thiernemann C, Fantozzi R. *Modulation of the oxidative stress and inflammatory*

- response by PPAR- γ agonists in the hippocampus of rats exposed to cerebral ischemia/reperfusion.* Eur J Pharmacol. 2006; 530: 70-80
- Culman J, Zhao Y, Gohlke P, Herdegen T. *PPAR- γ : therapeutic target for ischemic stroke.* Trends Pharmacol Sci. 2007; 28: 244-9
- Dai WJ, Funk A, Herdegen T, Unger T, Culman J. *Blockade of central angiotensin AT(1) receptors improves neurological outcome and reduces expression of AP-1 transcription factors after focal brain ischemia in rats.* Stroke, 1999; 30: 2391-98
- Davies CA, Loddick SA, Toulmond S, Stroemer RP, Hunt J, Rothwell NJ. *The progression and topographic distribution of interleukin-1beta expression after permanent middle cerebral artery occlusion in the rat.* J Cereb Blood Flow Metab. 1999 Jan; 19: 87-98
- Desvergne B & Wahli W. *Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism.* Endocr Rev. 1999; 20: 649-88
- Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. *Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view.* Trends Neurosci. 1999; 22: 391-7
- Emsley HC, Smith CJ, Georgiou RF, Vail A, Hopkins SJ, Rothwell NJ, Tyrrell PJ. *Acute Stroke Investigators. A randomised phase II study of interleukin-1 receptor antagonist in acute stroke patients.* J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2005; 76: 1366-72
- Emsley HC, Smith CJ, Tyrrell PJ, Hopkins SJ. *Inflammation in acute ischemic stroke and its relevance to stroke critical care.* Neurocrit Care. 2008; 9: 125-38
- Fogal B & Hewett SJ. *Interleukin-1beta: a bridge between inflammation and excitotoxicity?* J Neurochem. 2008; 106: 1-23
- Garcia JH, Liu KF, Relton JK. *Interleukin-1 receptor antagonist decreases the number of necrotic neurons in rats with middle cerebral artery occlusion.* Am J Pathol. 1995; 147: 1477-86

- Gibson RM, Rothwell NJ, Le Feuvre RA. *CNS injury: the role of the cytokine IL-1*. Vet J. 2004; 168: 230-7
- Hara H, Friedlander RM, Gagliardini V, Ayata C, Fink K, Huang Z, Shimizu-Sasamata M, Yuan J, Moskowitz MA. *Inhibition of interleukin-1beta converting enzyme family proteases reduces ischemic and excitotoxic neuronal damage*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997; 94: 2007-12
- Hewett SJ, Uliasz TF, Vidwans AS, Hewett JA. *Cyclooxygenase-2 contributes to N-methyl-D-aspartate-mediated neuronal cell death in primary cortical cell culture*. J Pharmacol Exp Ther. 2000; 293: 417-25
- Hill JK, Gunion-Rinker L, Kulhanek D, Lessov N, Kim S, Clark WM, Dixon MP, Nishi R, Stenzel-Poore MP, Eckenstein FP. *Temporal modulation of cytokine expression following focal cerebral ischemia in mice*. Brain Res. 1999; 820: 45-54
- Huang J, Upadhyay UM, Tamargo RJ. *Inflammation in stroke and focal cerebral ischemia*. Surg Neurol. 2006 Sep; 66: 232-45
- Jander S, Schroeter M, Stoll G. *Role of NMDA receptor signaling in the regulation of inflammatory gene expression after focal brain ischemia*. J Neuroimmunol. 2000; 109: 181-7
- Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M. *Immunologie, 5. Auflage*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg/Berlin, 2002
- Kersten S, Desvergne B, Wahli W. *Roles of PPARs in Health and Disease*. Nature. 2000; 405: 421-4
- Kielian T & Drew PD. *Effects of peroxisome proliferator-activated receptor- γ agonists on central nervous system inflammation*. J Neurosci Res. 2003; 71: 315-25
- Koistinaho J, Chan PH. *Spreading depression-induced cyclooxygenase-2 expression in the cortex*. Neurochem Res. 2000; 25: 645-51

- Koizumi J, Yoshida Y, Nakazawa T, Ooneda G. *Experimental studies of ischemic brain oedema, I: a new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area.* Jpn J stroke 1986; 8: 1-8
- Lee JM, Grabb MC, Zipfel GJ, Choi DW. *Brain tissue response to ischemia.* The Journal of clinical investigation 2000; 106, 723-31
- Legos JJ, Whitmore RG, Erhardt JA, Parsons AA, Tuma RF, Barone FC. *Quantitative changes in interleukin proteins following focal stroke in the rat.* Neurosci Lett. 2000; 282: 189-92
- Lin TN, Cheung WM, Wu JS, Chen JJ, Lin H, Chen JJ, Liou JY, Shyue SK, Wu KK. *15d-prostaglandin J2 protects brain from ischemia-reperfusion injury.* Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2006; 26: 481-7
- Liu XH, Kwon D, Schielke GP, Yang GY, Silverstein FS, Barks JD. *Mice deficient in interleukin-1 converting enzyme are resistant to neonatal hypoxic-ischemic brain damage.* J Cereb Blood Flow Metab. 1999; 10: 1099-108
- Loddick SA, Wong ML, Bongiorno PB, Gold PW, Licinio J, Rothwell N. *Endogenous interleukin-1 receptor antagonist is neuroprotective.* Biochem Biophys Res Commun. 1997 May 8; 234: 211-5
- Lucas SM, Rothwell NJ, Gibson RM. *The role of inflammation in CNS injury and disease.* Br J Pharmacol. 2006; 147: S232-40
- Luna-Medina R, Cortes-Canteli M, Alonso M, Santos A, Martínez A, Perez-Castillo A. *Regulation of inflammatory response in neural cells in vitro by thiadiazolidinones derivatives through peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation.* J Biol Chem. 2005; 280: 21453-62

- Luo Y, Yin W, Signore AP, Zhang F, Hong Z, Wang S, Graham SH, Chen J. *Neuroprotection against focal ischemic brain injury by the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist rosiglitazone*. J Neurochem. 2006; 97: 435-48
- McGonagle D, Tan AL, Shankaranarayana S, Madden J, Emery P, McDermot MF. *Management of treatment resistant inflammation of acute or chronic tophaceous gout with anakinra*. Ann Rheum Dis. 2007; 66: 1683-4
- Meier CA, Chicheportiche R, Juge-Aubry CE, Dreyer MG, Dayer JM. *Regulation of the interleukin-1 receptor antagonist in THP-1 cells by ligands of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma*. Cytokine. 2002; 18: 320-8
- Michalik L, Auwerx J, Berger JP, Chatterjee VK, Glass CK, Gonzalez FJ, Grimaldi PA, Kadowaki T, Lazar MA, O'Rahilly S, Colin NA. *International Union of Pharmacology. LXI. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors*. Pharmacol Rev 2006; 58: 726-41
- Moulin D, Bianchi A, Boyault S, Sebillaud S, Koufany M, Francois M, Netter P, Jouzeau JY, Terlain B. *Rosiglitazone induces interleukin-1 receptor antagonist in interleukin-1 beta-stimulated rat synovial fibroblasts via a peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta-dependent mechanism*. Arthritis Rheum. 2005; 52: 759-69
- Nagasawa H & Kogure K. *Correlation between cerebral blood flow and histological changes in a new rat model of middle cerebral artery occlusion*. Stroke 1989; 20: 1037-43
- Ou Z, Zhao X, Labiche LA, Strong R, Grotta JC, Herrmann O, Aronowski J. *Neuronal expression of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPARgamma) and 15d-prostaglandin J2 mediated protection of brain after experimental cerebral ischemia in rat*. Brain Res. 2006; 1096: 196-203
- Park EM, Cho BP, Volpe BT, Cruz MO, Joh TH, Cho S. *Ibuprofen protects ischemia-induced neuronal injury via up-regulating interleukin-1 receptor antagonist expression*. Neuroscience. 2005; 132: 625-31

- Pascual G, Fong AL, Ogawa S, Gamliel A, Li AC, Perissi V, Rose DW, Willson T, Rosenfeld MG, Glass CK. *A SUMOylation-dependent pathway mediates transrepression of inflammatory response genes by PPAR- γ* . *Nature* 2005; 437: 759-63
- Patzer A, Zhao Y, Stöck I, Gohlke P, Herdegen T, Culman J. *Peroxisome proliferator-activated receptors gamma (PPARgamma) differently modulate the interleukin-6 expression in the peri-infarct cortical tissue in the acute and delayed phases of cerebral ischaemia*. *Eur J Neurosci*. 2008; 28: 1786-94
- Paxinos G & Watson C. *The rat brain in stereotaxis coordinates*. Academic Press, New York. 1982
- Pereira MP, Hurtado O, Cárdenas A, Alonso-Escolano D, Boscá L, Vivancos J, Nombela F, Leza JC, Lorenzo P, Lizasoain I, Moro MA. *The nonthiazolidinedione PPARgamma agonist L-796,449 is neuroprotective in experimental stroke*. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2005 Sep; 64:797-805
- Pinteaux E, Rothwell NJ, Boutin H. *Neuroprotective actions of endogenous interleukin-1 receptor antagonist (IL-1ra) are mediated by glia*. *Glia*. 2006 Apr 1; 53: 551-6
- Poeck K & Hacke W. *Neurologie, 12. Auflage*. Springer Medizin Verlag, Heidelberg. 2006
- Qin S, Liu T, Kamanna VS, Kashyap ML. *Pioglitazone stimulates apolipoprotein A-I production without affecting HDL removal in HepG2 cells: involvement of PPAR-alpha*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007; 27: 2428-34
- Relton JK, Martin D, Thompson RC, Russell DA. *Peripheral administration of Interleukin-1 Receptor antagonist inhibits brain damage after focal cerebral ischemia in the rat*. *Exp Neurol*. 1996; 138: 206-13
- Relton JK & Rothwell NJ. *Interleukin-1 receptor antagonist inhibits ischaemic and excitotoxic neuronal damage in the rat*. *Brain Res Bull*. 1992; 29: 243-6

- Ricote M & Glass CK. *PPARs and molecular mechanisms of transrepression*. Biochim Biophys Acta. 2007; 1771: 926-35
- Ricote M, Huang JT, Welch JS, Glass CK. *The peroxisome proliferator-activated receptor (PPARgamma) as a regulator of monocyte/macrophage function*. J Leukoc Biol. 1999 Nov; 66: 733-9
- Rothwell N. *Cytokines – killers in the brain?* J.Phys. 1999; 514: 3-17
- Rothwell N. *Interleukin-1 and neuronal Injury: mechanisms, modification, and therapeutic potential*. Brain Behav Immun 2003; 17: 152-7
- Rothwell N & Luheshi GN. *Interleukin I in the brain: biology, pathology and therapeutic target*. Trends Neurosci. 2000; 23: 618-25
- Roux-Lombard P. *The interleukin-1 family*. Eur. Cytokine Netw. 1998; 9: 565-76
- Sairanen TR, Lindsberg PJ, Brenner M, Sirén AL. *Global forebrain ischemia results in differential cellular expression of interleukin-1beta (IL-1beta) and its receptor at mRNA and protein level*. J Cereb Blood Flow Metab. 1997; 17: 1107-20
- Schmid-Elsaesser, R., Zausinger, S., Hungerhuber, E., Baethmann, A. & Reulen, H.J. *A critical review of the intraluminal thread model of focal cerebral ischemia: evidence of inadvertent premature reperfusion and subarachnoid hemorrhage in rats by laser-doppler-flowmetry*. Stroke. 1998; 29: 2162-70
- Shimazu T, Inoue I, Araki N, Asano Y, Sawada M, Furuya D, Nagoya H, Greenberg JH. *A peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist reduces infarct size in transient but not in permanent ischemia*. Stroke. 2005; 36: 353-9.
- Staels B, & Fruchart JC. *Therapeutic Roles of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor agonist*. Diabetes. 2005; 54: 2460-70

- Strauss KI, Marini AM. *Cyclooxygenase-2 inhibition protects cultured cerebellar granule neurons from glutamate-mediated cell death*. J Neurotrauma. 2002; 19: 627-38
- Sundararajan S, Gamboa JL, Victor NA, Wanderi EW, Lust WD, Landreth GE. *Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands reduce inflammation and infarction size in transient focal ischemia*. Neuroscience. 2005; 130: 685-96
- Sundararajan S & Landreth GE. *Antiinflammatory properties of PPARgamma agonists following ischemia*. Drug News Perspect. 2004; 17: 229-36
- Thal SC, Engelhard K, Werner C. *New cerebral Protection strategies* Current Opinion in Anaesthesiology 2005; 18: 490-5
- Theeuwes F & Yum SI. *Principles of the design and operation of generic osmotic pumps for the delivery of semisolid or liquid drug formulations*. Annals of Biomedical Engineering 1976; 4: 343-53
- Touzani O, Boutin H, Chuquet J, Rothwell N. *Potential mechanisms of interleukin-1 involvement in cerebral ischaemia*. J Neuroimmunol. 1999; 100: 203-15
- Tureyen K, Kapadia R, Bowen KK, Satriotomo I, Liang J, Feinstein DL, Vemuganti R. *Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists induce neuroprotection following transient focal ischemia in normotensive, normoglycemic as well as hypertensive and type-2 diabetic rodents*. J Neurochem. 2007; 101: 41-56
- Victor NA, Wanderi EW, Gamboa J, Zhao X, Aronowski J, Deininger K, Lust WD, Landreth GE, Sundararajan S. *Altered PPARgamma expression and activation after transient focal ischemia in rats*. Eur J Neurosci. 2006; 24: 1653-63
- Wang Q, Tang XN, Yenari MA. *The inflammatory response in stroke*. J Neuroimmunol. 2007; 184: 53-68
- Wang X, Barone FC, Aiyar NV, Feuerstein GZ. *Interleukin-1 receptor and receptor antagonist gene expression after focal stroke in rats*. Stroke. 1997; 28: 155-62

- Yang GY, Mao Y, Zhou LF, Ye W, Liu XH, Gong C, Lorrin Betz A. *Attenuation of temporary focal cerebral ischemic injury in the mouse following transfection with interleukin-1 receptor antagonist*. Brain Res Mol Brain Res. 1999; 72: 129-37
- Yang GY, Zhao YJ, Davidson BL, Betz AL. *Overexpression of interleukin-1 receptor antagonist in the mouse brain reduces ischemic brain injury*. Brain Res. 1997; 751: 181-8
- Yi JH, Park SW, Kapadia R, Vemuganti R. *Role of transcription factors in mediating post-ischemic cerebral inflammation and brain damage*. Neurochem Int. 2007; 50: 1014-27
- Zhao X, Ou Z, Grotta JC, Waxham N, Aronowski J. *Peroxisome-proliferator-activated receptor-gamma (PPARgamma) activation protects neurons from NMDA excitotoxicity*. Brain Res. 2006a; 1073-1074: 460-9
- Zhao Y, Foryst-Ludwig A, Bruemmer D, Culman J, Bader M, Unger T, Kintscher U. *Angiotensin II induces peroxisome proliferator-activated receptor gamma in PC12W cells via angiotensin type 2 receptor activation*. J Neurochem. 2005a; 94: 1395-401.
- Zhao Y, Patzer A, Gohlke P, Herdegen T, Culman J. *The intracerebral application of the PPARgamma-ligand pioglitazone confers neuroprotection against focal ischaemia in the rat brain*. Eur J Neurosci. 2005b; 22: 278-82
- Zhao Y, Patzer A, Herdegen T, Gohlke P, Culman J. *Activation of cerebral peroxisome proliferator-activated receptors gamma promotes neuroprotection by attenuation of neuronal cyclooxygenase-2 overexpression after focal cerebral ischemia in rats*. FASEB J. 2006b; 20: 1162-75

Liste der Veröffentlichungen

Zitierbare Veröffentlichungen

Zhao Y, **Glatz T**, Stöck I, Gohlke P (2008) *Activation of cerebral peroxisome proliferator-activated receptors gamma (PPAR γ) inhibits inflammation and apoptosis after focal cerebral ischemia in the rat.* J Hypertens 26 (Suppl 1): 402

Zhao Y, Stöck I, **Glatz T**, Gohlke P, Culman J (2009) *Effects of pioglitazone on interleukin-1 β and interleukin-1 receptor antagonist expression in the frontoparietal cortex after focal cerebral ischemia in rats.* Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacology 379 (Suppl 1): 47

Glatz T, Stöck I, Nguyen-Ngoc M, Gohlke P, Herdegen T, Culman J, Zhao Y
Peroxisome-proliferator-activated receptors gamma and peroxisome-proliferator-activated receptors beta/delta and the regulation of interleukin 1 receptor antagonist expression by pioglitazone in ischaemic brain.
J Hypertens. 2010 Jul;28(7):1488-97.

Nicht zitierbare wissenschaftliche Vorträge

Glatz T, Zhao Y, Gohlke P, Culman J (2008) *Die IL-1 Familie und der ischämische Schlaganfall: Effekte von Pioglitazon.* Wissenschaftliche Tagung des Deutschen Instituts für Bluthochdruckforschung (Vortrag)

Culman J, **Glatz T**, Stöck I, Gohlke P, Herdegen T, Zhao Y (2009) *Cerebral peroxisome proliferator-activated receptors gamma (PPAR γ) and the regulation of interleukin-1 β and interleukin-1 receptor antagonist expression after focal cerebral ischemia in rats.* Eight Göttingen Meeting of the German Neuroscience Society

Danksagung

Widmen möchte ich diese Arbeit meinem Vater, der leider den Entstehungsprozess nicht mehr erleben konnte.

Ich möchte an dieser Stelle alle jenen danken, die mich während meiner Promotionsarbeit unterstützt haben:

- Herrn Prof. Dr. Dr. Ingolf Cascorbi dafür, dass ich am pharmakologischen Institut eine Dissertation anfertigen durfte.
- Meinem Doktorvater, PD. Dr. Juraj Culman, für die unzähligen Stunden geduldigen Zuhörens und die vielen Wochenenden gemeinsamer Arbeit im Tierstall, für das Korrigieren der Arbeit und vor allem die freundschaftliche Unterstützung in jeder Lebenslage.
- Dr. Yi Zhao für die hervorragende Anleitung im Labor, das geduldige Klären aller Unklarheiten, viele interessante Gespräche und das leckere chinesische Essen in den Mittagspausen.
- Dem technischen Personal des Institutes, insbesondere Britta Schwarten, für ihre wertvolle Mitarbeit im Tierstall und die sporadischen Wochenendeinsätze, den Tierpflegern, Jan Brdon, Angela Schulz und Peter Manikowski.
- Prof. Dr. Peter Gohlke und Prof. Dr. Herdegen, die nie um einen guten Ratschlag verlegen waren.

Der größte Dank gilt meiner Mutter, ohne deren ständige Unterstützung in schweren Zeiten ich weder diese Arbeit noch mein Medizinstudium begonnen und vollendet hätte.

Für moralischen Rückhalt möchte ich mich auch bei Erika Glamann und Henning Müller bedanken, die stets wie eine Familie zu mir gehalten haben.

Abschließend danken möchte ich der Friedrich-Ebert-Stiftung, deren Förderung es mir erlaubt hat, mich neben meinem Studium voll auf diese Arbeit zu konzentrieren. Mein besonderer Dank gilt meinem Mentor, Dr. Hartmut Kollikowski, der stets wertvolle Hilfestellungen für mich bereithielt.

Lebenslauf – Torben Glatz, geboren in Itzehoe am 14/03/1983, ledig, keine Kinder

Schule

- 08/1989 – 12/1994 Besuch der Freien Waldorfschule Itzehoe
01/1995 – 07/2004 Besuch des Sophie-Scholl-Gymnasiums Itzehoe, Abitur (Note: 1,3)
08/2001 – 05/2002 Auslandsjahr mit Besuch der New Haven Highschool, New Haven, Indiana, USA, Erwerb des amerikanischen Highschool-Abschlusses

Studium

- Seit 10/2004 Studium der Medizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
08/2006 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: 1,0)
05/2007 – 06/2009 Promotionsarbeit am Pharmakologischen Institut der CAU zu Kiel über neuroprotektive Therapieansätze bei der fokalen zerebralen Ischämie
12/2010 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Note: 1,33)

Praktika

- 08/2002 – 06/2004 Freier Mitarbeiter bei der Itzehoer Lokalredaktion des sh:z
03,08,09/2005 Pflegepraktikum am KH Itzehoe
03/2007 Famulatur in der Klinik für Herz- und Gefäßchirurgie, UK-SH Kiel
08/2007 Famulatur auf der Aufnahmestation des Städtischen KH Kiel
09/2007 Famulatur in der Klinik für Viszeralchirurgie, Uniklinikum Kaunas, LT
02/2008 Famulatur in der Klinik für Neurologie im KH Itzehoe
03/2008 Famulatur in einer pädiatrischen Praxis in Kiel
08/2008 *visitor program des hospital for special surgery* in New York, USA
03/2009 Famulatur in der Klinik für Anästhesie im KH Itzehoe
07/2009 *summer school tropical medicine* in Yogyakarta, ID
08/2009 – 08/2010 Praktisches Jahr; Chirurgisches Auslandstertial in Mumbai, IN

Gesellschaftliches Engagement

- 08/2002 – 05/2004 Mitglied der Schülerversretung des SSG, Schülersprecher
10/2004 – 12/2006 Mitarbeit in der Heimselbstverwaltung des Christian-Albrecht-Hauses; Austauschprogramm mit verschiedenen Ostseeanrainerstaaten
04/2007 – 12/2010 Förderung durch die Friedrich-Ebert-Stiftung, aktive Mitarbeit in der Hochschulgruppe, Präsentation der FES an Schulen und der Universität
09/2007 – 06/2009 Mitarbeit bei der Fachschaft Medizin, der Bundesvertretung der Medizinstudenten und dem Teddybär-Krankenhaus
07/2008 – 06/2009 Mitglied im Konvent der Medizinischen Fakultät

Sprachen: Englisch (fließend), Französisch, Hindi (Grundkenntnisse), Latein

Freizeitinteressen: Reisen, Laufen, Musik, Saxophon spielen