

Aus dem Bereich Anatomie und Zellbiologie  
Theoretische Medizin und Biowissenschaften der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

**Der Einfluss von Nicotinamid Nukleotid  
Transhydrogenase und Pannexin 1 auf die  
Ausprägung einer früh-postnatalen hypoxisch-  
ischämischen Gehirnläsion in der Maus**

*Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der  
Naturwissenschaften*

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2016

Vorgelegt von: Sandra Wolf (geb. Semar)  
geb. am: 02.01.1987 in Zweibrücken

Dekan: Prof. Dr. M.D. Menger

1. Berichterstatter: Prof. Dr. C. Meier

2. Berichterstatter: Prof. Dr. K. Faßbender

## **Erklärung**

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form in einem Verfahren zur Erlangung eines akademischen Grades vorgelegt.

Homburg, den

-----

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
1.1	Früh-postnatale hypoxisch-ischämische Gehirnläsion.....	1
1.2	Zellulärer Pathomechanismus.....	8
1.1.1	Die Rolle der Reaktiven Sauerstoffspezies nach einem hypoxisch-ischämischen Insult .....	8
1.2.1	Die Rolle der Mitochondrien nach einem hypoxisch-ischämischen Insult.....	9
<b>1.3</b>	<b>Die Rolle von ATP und Pannexin 1 nach einem hypoxisch-ischämischen Insult</b> .....	<b>12</b>
1.3.1	Connexin 43 bei Gehirnläsionen.....	15
<b>2</b>	<b>ZIELSETZUNGEN</b> .....	<b>16</b>
<b>3</b>	<b>MATERIALIEN</b> .....	<b>18</b>
3.1	Chemikalien.....	18
3.2	Antikörper.....	21
3.3	Kits.....	21
3.4	Geräte und Materialien .....	21
3.5	Verbrauchsmaterial.....	22
3.6	Software .....	23
3.7	Lösungen.....	23
<b>4</b>	<b>METHODEN</b> .....	<b>27</b>
4.1	Tiere.....	27
4.2	Das Modell der früh-postnatalen hypoxischen Ischämie.....	28
4.2.1	Etablierung der früh-postnatalen hypoxisch-ischämischen Gehirnläsion am Mausmodell .....	28
4.2.2	Experimentelles Protokoll.....	29
4.3	Histochemische Methoden.....	31
4.3.1	Anfertigung von Gefrierschnitten .....	31
4.3.2	Histologie.....	31
4.3.3	Score Einteilung.....	32
4.3.4	Flächenmessung.....	33
4.3.5	Relative Läsionsgröße.....	34
4.4	Immunhistologie .....	34
4.4.1	Gefrierschnitte .....	34
4.4.2	Quantitative Bildanalyse der Immunfluoreszenz.....	35
4.5	Zellkultur .....	36
4.5.1	Präparation und Kultivierung primärer Astrozytenkulturen .....	36
4.5.2	Oxygen-Glucose-Deprivation.....	37
4.6	Immunzytochemie .....	42
4.6.1	Calcium-Imaging .....	43
4.7	Molekularbiologische Methoden .....	46
4.7.1	Genotypisierung der transgenen Mäuse.....	46
4.7.2	RNA-Isolation.....	48
4.7.3	Konzentrationsbestimmung der RNA.....	48
4.7.4	Komplementäre DNA-Synthese .....	48
4.7.5	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) .....	49
4.7.6	Gelelektrophorese der PCR-Produkte.....	50

4.8	Statistik .....	50
<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>52</b>
5.1	Auswirkungen des fehlenden Nnt-Proteins auf die Ausprägung einer hypoxisch-ischämischen Gehirnläsion .....	52
5.2	Bestimmung der Läsionsgröße .....	52
5.3	Analyse des Effektes des Nnt-Proteins auf die Ausprägung einer früh-postnatalen hypoxisch-ischämischen Gehirnläsion <i>in vivo</i> .....	53
5.3.1	Analyse des Einflusses des Nnt-Proteins auf die zerebrale Gefäßstabilität.....	57
5.3.2	Analyse des Zellschadens nach einem hypoxisch-ischämischen Insult.....	60
5.3.3	Analyse von Reaktiver Sauerstoffspezies mittels 8-OHdG .....	66
5.4	Analyse des Effektes des Nnt-Proteins auf die Zellschädigung nach OGD <i>in vitro</i> .....	68
5.4.1	Die reaktive Sauerstoffspezies ist hauptsächlich in Astrozyten zu finden.....	68
5.4.2	Die Nnt-Deletion beeinflusst die Zellvitalität während der OGD .....	69
5.4.3	Die Nnt-Deletion erhöht den zellulären ATP-Gehalt in Astrozyten.....	70
5.4.4	Der Einfluss des Nnt-Proteins auf den intrazellulären ROS-Gehalt in Astrozyten .....	72
5.4.5	Der Einfluss der Nnt-Deletion auf Glutathion .....	74
5.5	Analyse des Effektes von Panx1 auf die Ausprägung einer früh-postnatalen hypoxisch-ischämischen Gehirnläsion <i>in vivo</i> .....	76
5.5.1	Die Panx1-Deletion beeinflusst die Proliferation .....	79
5.5.2	Der Einfluss der Panx1-Deletion auf Connexin 43.....	81
5.6	Analyse des Effektes von Panx1 auf die Zellschädigung nach OGD <i>in vitro</i> .....	82
5.6.1	Der Einfluss von Panx1 auf den zellulären ATP-Gehalt in Astrozyten.....	83
5.6.2	Der Einfluss der Panx1-Deletion auf die Zellvitalität während der OGD .....	84
5.6.3	Der Einfluss der Panx1-Deletion auf den intrazellulären Gehalt der ROS.....	84
5.6.4	Der Einfluss der Panx1-Deletion auf Glutathion .....	86
5.6.5	Der Einfluss von Panx1 auf die intrazelluläre Calcium-Konzentration.....	87
<b>6</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>91</b>
6.1	Läsionsmodell.....	92
6.2	Das Protein Nnt hat einen Einfluss auf die Ausprägung einer früh-postnatalen hypoxisch-ischämischen Gehirnläsion.....	96
6.2.1	Der Einfluss des Nnt-Proteins auf die Stabilität und Barrierefunktion der zerebralen Gefäße.....	101
6.3	Panx1 zeigt einen geringfügigen Einfluss auf die Ausprägung einer hypoxisch-ischämischen Gehirnläsion .....	102
<b>7</b>	<b>SCHLUSSFOLGERUNG .....</b>	<b>109</b>
7.1	Der Einfluss des Nnt-Proteins auf eine hypoxisch-ischämischen Gehirnläsion .....	109
7.2	Der Einfluss von Panx1 auf eine früh-postnatale hypoxisch-ischämische Gehirnläsion.....	110
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>111</b>

---

## Zusammenfassung

Die häufigste Ursache neuronaler Schädigung bei Neugeborenen ist der früh-postnatale hypoxisch-ischämische Insult des Gehirns. Als Folge eines Sauerstoffmangels im Gehirn werden zelluläre Mechanismen beschrieben, die initial eine gestörte Glutamat- und Calcium-Homöostase sowie die Bildung reaktiver Sauerstoffverbindungen (reactive oxygen species; ROS) beinhalten. Diese reaktiven Sauerstoffverbindungen, z.B. Superoxid-Anionen  $O_2^-$ , induzieren Lipid- und Proteinoxidationen sowie oxidative DNA-Schäden. Unter physiologischen Bedingungen wird ROS u.a. mit Hilfe von Nicotinamidadenin-dinukleotidphosphat (NADPH) eliminiert. Bei der Generierung von NADPH spielt wiederum das Enzym Nicotinamid Nukleotid Transhydrogenase (Nnt) eine wichtige Rolle. Ein zweiter Aspekt der zellulären Reaktion auf eine Hypoxie-Ischämie ist die Änderung des intrazellulären Adenosintriphosphates (ATP)- Gehaltes. Zu den Kanälen, die hauptsächlich für den Efflux von ATP verantwortlich sind, zählen die Pannexin 1 (Panx1)-Kanäle. Ob und in welcher Weise das Enzym Nnt und das Kanalprotein Panx1 in der Pathogenese der perinatalen hypoxisch-ischämischen Hirnläsion beteiligt sind, ist bislang nicht bekannt. In dieser Dissertation liegt der Fokus daher auf der Untersuchung der Bedeutung dieser beiden Proteine bei früh-postnataler hypoxisch-ischämischer Schädigung *in vivo* – am Modell des früh-postnatalen hypoxisch-ischämischen Insultes in der Maus – und *in vitro* – an kultivierten primären Astrozyten, die einer „oxygen glucose deprivation“ (OGD) ausgesetzt waren.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die Hypothese aufgestellt, dass es durch das Fehlen des Nnt-Proteins zu einem Anstieg der ROS und somit zu einer stärkeren Ausprägung der früh-postnatalen hypoxisch-ischämischen Gehirnläsion kommt. Die Analysen wurden in zwei Mausstämmen durchgeführt: einem Mausstamm mit und einem ohne funktionelles Nnt-Protein. Analysiert wurden die Parameter Apoptose, Aktivierung von Mikroglia sowie strukturelle Veränderungen aufgrund des hypoxisch-ischämischen Insultes. Wichtige Parameter der ROS-Bildung und des ROS-Abbaus wurden an Astrozyten *in vitro* nach OGD analysiert. Die Ergebnisse konnten erstmalig zeigen, dass es bei den Tieren mit Nnt in allen untersuchten Parametern zu einer stärkeren Ausprägung der früh-postnatalen hypoxisch-ischämischen Gehirnläsion kam als bei den Tieren ohne funktionelles Nnt. Hingegen war das Ausmaß der ROS-induzierten DNA-Schädigung in den Tieren ohne funktionelles Nnt größer. Die *in vitro* Analysen zeigten einen deutlichen Einfluss des Nnt-Proteins auf das Überleben und den ATP-Gehalt der hypoxierten Astrozyten. Zusammenfassend konnte in diesem Teil der Arbeit gezeigt werden, dass die Deletion des Nnt-Proteins, entgegen der eingangs

---

formulierten Hypothese, die Ausprägung einer früh-postnatalen hypoxisch-ischämischen Gehirnläsion positiv beeinflusst.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die Hypothese aufgestellt, dass es durch Deletion von Panx1 zu einer verminderten Ausprägung einer früh-postnatalen hypoxisch-ischämischen Gehirnläsion kommt. Auch hier wurde zunächst die Ausprägung der früh-postnatalen hypoxisch-ischämischen Gehirnläsion untersucht. Anhand von Parametern des ROS-Gehaltes und des ROS-Abbaus wurde analysiert, inwiefern Panx1 eine Rolle im ROS-Signalweg spielt. In dieser Arbeit wurde erstmalig der Einfluss der Panx1-Deletion auf eine hypoxisch-ischämische Gehirnläsion an früh-postnatalen Mäusen untersucht. Die Ergebnisse zeigten, dass die Deletion von Panx1 nur einen geringfügigen Einfluss auf die Ausprägung einer früh-postnatalen hypoxisch-ischämischen Gehirnläsion hat. Allerdings wurde eine Veränderung bei der Expression mehrerer Proteine, wie z.B. dem Gap Junction Protein Connexin 43 (Cx43) in den Gehirnen der Panx1-transgenen Tiere beobachtet. Mittels der Analysen an primären Astrozytenkulturen, die einer OGD unterzogen wurden, konnte ein Einfluss von Panx1 auf die Generierung von ROS sowie den intrazellulären ATP-Gehalt detektiert werden. Zusammenfassend konnte im zweiten Teil der Arbeit erstmals gezeigt werden, dass Panx1 im verwendeten Modell nur einen geringfügigen Einfluss auf die Ausprägung einer früh-postnatalen hypoxisch-ischämischen Gehirnläsion *in vivo* hat, jedoch einen deutlichen Effekt auf die beteiligten intrazellulären Funktionen zeigt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass das Enzym Nnt sowie das Kanalprotein Panx1 eine Rolle bei der Pathologie des perinatalen hypoxisch-ischämischen Hirnschadens spielen. Die Deletion von Nnt zeigt einen stärkeren Einfluss auf die Ausprägung der früh-postnatalen hypoxisch-ischämischen Gehirnläsion als die Deletion von Panx1. Des Weiteren konnte sowohl ein Einfluss von Nnt als auch von Panx1 auf den ROS- und ATP-Gehalt an hypoxierten Astrozyten detektiert werden.

---

## Summary

Neonate hypoxic-ischemic insult is one of the most common causes of neuronal damage in newborn. It is known that, as a consequence of this lack of oxygen, cellular mechanisms are activated which result in disturbed homeostasis of glutamate and calcium and in the formation of reactive oxygen species (ROS). These oxygen compounds, i.e. the superoxide anion  $O_2^-$ , induce oxidations in lipids and proteins as well as oxidative DNA-damage. Under physiological conditions, the elimination of ROS is achieved for instance by nicotinamide - adenine dinucleotide phosphate (NADPH). The enzyme nicotinamide nucleotide transhydrogenase (Nnt) plays an important role in the generation of NADPH. Another cellular effect that occurs during hypoxia-ischemia is the change of the intracellular content of adenosine triphosphate (ATP). One of the channels responsible for the efflux of ATP is the Pannexin 1 (Panx1) channel. So far it is not known whether and in which manner the enzyme Nnt and the channel protein Panx1 are involved in the pathogenesis of perinatal hypoxic-ischemic brain damage. The main focus of this dissertation is therefore analyzing the role of these two proteins in the early-postnatal hypoxic-ischemic damage *in vivo* – using the model of the early-postnatal hypoxic ischemic insult in mice – and *in vitro* – using cultured primary astrocytes, which were exposed to an “oxygen glucose deprivation” (OGD).

In the first part of this study, it was hypothesized that the absence of Nnt protein leads to an increase in ROS and thus to a more severe manifestation of perinatal hypoxic-ischemic brain damage. The analyses were performed in two mouse strains: one mouse strain with a functional Nnt protein and one without. The parameters apoptosis, activation of microglia as well as structural modifications due to a hypoxic-ischemic insult were analyzed. Important parameters for the formation and degradation of ROS were analyzed on astrocytes *in vitro* after OGD. The results have shown for the first time that the extent of perinatal hypoxic-ischemic brain damage is much greater in mice with a functional Nnt protein than in those without. However, the animals without a functional Nnt protein showed a greater extent of ROS-induced DNA-damage. *In vitro* analyses showed a noticeable impact of the Nnt protein on the survival rate and on the content of ATP in astrocytes with OGD. In summary, this part of the study shows for the first time that the deletion of Nnt protein, contrary to the hypothesis, has a positive effect on the manifestation of the early-postnatal hypoxic-ischemic brain damage.



---

In the second part of this study, it was hypothesized that the deletion of Panx1 leads to a diminished manifestation of perinatal hypoxic-ischemic brain damage. Here, too, the manifestation of early-postnatal hypoxic-ischemic brain damage was investigated. The importance of Panx1 in the ROS-pathway was analyzed with parameters for the formation and degradation of ROS. In this study, the influence of Panx1 deletion on hypoxic-ischemic brain damage in early postnatal mice was investigated for the first time. The results show that the deletion of Panx1 only leads to a marginal change in the manifestation of early-postnatal hypoxic-ischemic brain damage. However, changes of various proteins, i.e. the gap junction protein Connexin 43 (Cx43) have been detected in the brains of the Panx1-transgenic mice. By means of analysis on primary astrocytes that underwent OGD, an influence of Panx1 on the generation of ROS, as well as on the content of ATP was observed. In summary, this section of the study demonstrates for the first time that Panx1 merely has a marginal impact on the manifestation of perinatal hypoxic-ischemic brain damage *in vivo*, but a clear effect on the implicated intracellular functions.

The results of this study show that the enzyme Nnt as well as the channel protein Panx1 play a role in the pathology of the early-postnatal hypoxic-ischemic brain damage. The deletion of Nnt reveals a greater impact on the manifestation of the early-postnatal hypoxic ischemic brain lesion than the deletion of Panx1. Furthermore, an influence of Nnt as well as of Panx1 could be detected on the content of ROS and ATP in astrocytes after OGD.

---

## Abkürzungen

°C	Grad Celcius
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
8-OHdG	8-Hydroxydeoxyguanosine
Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumine (Rinderalbumin)
CA	Cornu ammonis
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
Calcein-AM	Calcein- Acetoxymethylester
CC3	Cleaved Caspase-3
CD68	Cluster of Differentiation 68
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
Cx43	Connexin 43
d.d. H <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
DAPI	Diamidinphenylindol
DEPC-H <sub>2</sub> O	Diethylcarbonat Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Ex/Em	Excitation/Emission
fwd	forward
GFAP	Glial fibrillary acidic protein
GPX	Glutathion Peroxidase
GSH	Glutathion (reduziert)
GSSG	Glutathion-Disulphid
h	Stunden
H <sup>+</sup>	Wasserstoff
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HE	Hämalaun-Eosin

---

IDP <sub>m</sub>	Isocitrat Dehydrogenase
IP3	Inositol Trisphosphat
K	Kontrolle
kb	Kilobasen
kDa	kilo Dalton
l	Liter
LFB	Luxol-Fast-Blue
MEP	Malat Decarboxylase
Min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
M-MULV RT	Moloney-Mausleukämievirus Reverse Transkriptase
Mn-SOD	Superoxid Dismutase
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
N <sub>2</sub>	Stickstoff
Na	Natrium
NAC	N-acetyl-L-cysteine
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NADH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Hydrid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (reduzierte Form)
NGS	Normal Goat Serum (normales Ziegenserum)
nm	Nanometer
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
Nnt	Nicotinamid-nucleotid Transhydrogenase
NP40	Nonyl Phenoxypropyloxyethanol
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superoxid-Radikal
OGD	Oxygen-Glucose-Deprivation
OGD	Oxygen glucose deprivation
Panx1	Pannexin 1
PBN	Probenecid
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction

---

PLL	Poly-L-Lysin
PRX	Peroxiredoxin
RDD Puffer	RNeasy DNA Digestion Puffer
rev	reverse
RLT-Puffer	RNeasy Lipid Tissue Puffer
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reactive oxygen species
rpm	Revolutions per minute
RT	Raumtemperatur
RW1 Puffer	RNeasy Wash 1 Puffer
SO	Superoxid
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-Elektrophoresepuffer
ÜN	Über Nacht
UV	Ultraviolett

---

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schema des Hippocampus und des Gyrus dentatus.....	2
Abb. 2: Pathophysiologischen Ereignisse nach einem hypoxisch-ischämischen Insult.....	6
Abb. 3: Mitochondriale Calcium-Übermittlung .....	11
Abb. 4: Membrantopographie von Pannexinen, Innexinen und Connexinen.....	13
Abb. 5: Schema des Versuchsablaufs zur früh-postnatalen hypoxisch-ischämischen Gehirnläsion.....	29
Abb. 6: Score-Einteilung bezüglich Schäden im Hippocampusbereich.....	33
Abb. 7: Originalbild und bearbeitetes Bild mittels ImageJ für die Auswertung .....	36
Abb. 8: Genotypisierung der transgenen Mäuse .....	47
Abb. 9: Score-Einteilung anhand der Läsionen im Hippocampusbereich.....	53
Abb. 10: Nnt-Detektion mittels RT-PCR .....	54
Abb. 11: Prozentualer Anteil der Tiere, die eine Läsion nach einem hypoxisch-ischämischen Insult zeigen .....	55
Abb. 12: Anzahl der Tiere je Score nach Auswertung der Histologie .....	55
Abb. 13: Fläche der Hemisphären.....	56
Abb. 14: Darstellung der Größe der Läsionsareale .....	57
Abb. 15: Repräsentative Darstellung der Microfil <sup>®</sup> -Perfusion.....	58
Abb. 16: Repräsentative Darstellung von Gehirnen von Tieren des C57BL/6N und des C57BL/6J Unterstammes .....	59
Abb. 17: Evans Blue Perfusion der Gehirne .....	59
Abb. 18: Apoptosemarker: Cleaved Caspase-3 (CC3) der CA3-Region <i>in vivo</i> .....	61
Abb. 19: Apoptosemarker: Cleaved Caspase-3 (CC3) der CA2-3-Region <i>in vivo</i> .....	62
Abb. 20: Zellproliferation.....	63
Abb. 21: Aktivierte Mikroglia/Makrophagen (CD68) der CA3-Region <i>in vivo</i> .....	65
Abb. 22: Aktivierte Mikroglia/Makrophagen (CD68) der CA2-3-Region <i>in vivo</i> .....	66
Abb. 23: Detektion von 8-OHdG <i>in vivo</i> .....	67
Abb. 24: Co-Lokalisation von GFAP (grün) und 8-OHdG (rot).....	69
Abb. 25: Bestimmung der Zellvitalität <i>in vitro</i> .....	70
Abb. 26: ATP-Detektion .....	71
Abb. 27: Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) .....	72
Abb. 28: Superoxid (SO) Detektion .....	73
Abb. 29: Verhältnis von GSH zu GSSG .....	74
Abb. 30: Darstellung der Größe der Läsionsareale .....	77
Abb. 31: Apoptosemarker: Cleaved Caspase-3 (CC3) <i>in vivo</i> .....	78
Abb. 32: Aktivierte Mikroglia/Makrophagen (CD68) <i>in vivo</i> .....	80

---

Abb. 33: Zellproliferation.....	81
Abb. 34: Gap Junction Protein Connexin 43.....	82
Abb. 35: ATP-Assay .....	83
Abb. 36: Bestimmung der Zellvitalität.....	84
Abb. 37: Detektion der Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS).....	85
Abb. 38: Bestimmung des GSH und GSSG Gehaltes .....	86
Abb. 39: Veränderung der Calciumkonzentration nach Gabe von 1 $\mu$ M Thapsigargin.....	88
Abb. 40: Veränderung der Calciumkonzentration nach Gabe von 10 $\mu$ M Ionomycin.....	89
Abb. 41: Veränderung der Calciumkonzentration nach Gabe von 100 $\mu$ M ATP mit anschließender Applikation von 1 $\mu$ M Thapsigargin.....	89
Abb. 42: Veränderung der Calciumkonzentration nach Gabe von 1 $\mu$ M TG mit anschließender Gabe von 100 $\mu$ M Ionomycin.....	90

---

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Kriterien zur Einteilung der Tiere in unterschiedliche Scores: .....	33
Tab. 2: Antikörper, die für die Immunfluoreszenz verwendet wurden: .....	35
Tab. 3: Gruppeneinteilung und Bedingungen der OGD.....	38
Tab. 4: Verdünnungsreihe der GSH- und des GSSG-Standard Lösung.....	41
Tab. 5: Antikörper, die für die Immunzytochemie benutzt wurden .....	43
Tab. 6: Temperaturprofile der PCR.....	47
Tab. 7: Basensequenzen der Genotypisierungsprimer .....	47
Tab. 8: Temperaturprofile der PCR.....	49
Tab. 9: Basensequenzen der Primer .....	50

# 1 Einleitung

In dieser Arbeit werden spezifische Pathomechanismen einer früh-postnatalen hypoxisch-ischämischen Gehirnläsion untersucht. Im Fokus steht die Analyse der Bedeutung a) reaktiver Sauerstoffspezies und b) der Pannexin-Kanäle auf die Ausprägung Hypoxie-induzierter Gehirnschädigungen. Die Analysen wurden in einem *in vivo*-Modell der früh-postnatalen hypoxisch-ischämischen Gehirnläsion in neugeborenen Mäusen sowie *in vitro* an primären Astrozytenkulturen durchgeführt.

## 1.1 Früh-postnatale hypoxisch-ischämische Gehirnläsion

Eine früh-postnatale Hypoxie-Ischämie des Gehirns ist die häufigste Ursache neuraler Schädigungen bei Neugeborenen (Volpe, 2001). Von 1.000 Neugeborenen sind ein bis zwei Kinder von einem hypoxisch-ischämischen Insult betroffen (Lai & Yang, 2011). Die Inzidenz ist bei Frühgeborenen höher; das Maximum liegt bei Kindern, die zwischen der 32. und 36. Schwangerschaftswoche geboren werden (Logitharajah *et al.*, 2009; Cabaj *et al.*, 2012). Gerade in diesem Reifestadium reagiert das Gehirn zudem besonders sensibel auf Hypoxie und Ischämie (Du Plessis, 2002; Cerio *et al.*, 2013). Als Gründe dafür werden eine größere Anzahl von Blutgefäßen, höherer Wassergehalt, weniger Myelin und ein nur schwach entwickelter Kortex im unreifen Gehirn diskutiert (Du Plessis, 2002; Cerio *et al.*, 2013).

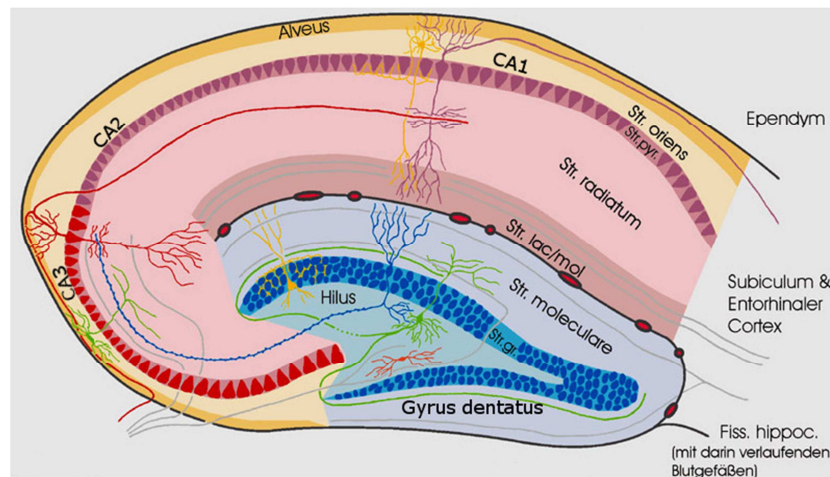
Die Ursachen eines früh-postnatalen hypoxisch-ischämischen Insultes können unterschiedlich sein, und schließen fetale Fehlbildungen, vorzeitige Plazentaablösung, mütterliche arterielle Hypotonie oder angeborene Herzfehler ein (Volpe, 2001). Die Auswirkungen eines früh-postnatalen hypoxisch-ischämischen Insults reichen von relativ milden (Haltungsschäden, Störungen der Koordination und Bewegung oder verminderte Intelligenz) bis zu sehr schweren Auswirkungen: Bei ca. 25% der betroffenen Neugeborenen führt ein früh-postnataler hypoxisch-ischämischer Insult zu schweren und irreversiblen kognitiven und senso-motorischen Beeinträchtigungen des Kindes; bei 15-20% führt er sogar zum Tod (Lai & Yang, 2011).

Die kognitiven und senso-motorischen Beeinträchtigungen entstehen, da sich ein früh-postnataler hypoxisch-ischämischer Insult primär im Hippocampus und im Kortex des Gehirns manifestiert. Der Grund dafür ist, dass besonders Zellen mit einem hohen Glukose- und Sauerstoffverbrauch, wie z.B. Neurone des Hippocampus oder Pyramidenzellen des Kortex, anfällig für einen hypoxisch-ischämischen Insult sind (Sokoloff *et al.*, 1977; Liu *et al.*, 2004a).



Ausschlaggebend für die Ausprägung eines früh-postnatalen hypoxisch-ischämischen Insultes ist – neben dem Entwicklungsstand des Gehirns (s.o.) – die Dauer des Sauerstoffmangels (Vannucci & Vannucci, 1997; Walton *et al.*, 1999; Ferriero, 2004; Cerio *et al.*, 2013). Bereits nach kurzzeitigem Sauerstoffmangel kommt es im Bereich des Hippocampus und des Neokortex zur Apoptose neuraler Zellen (Fatemi *et al.*, 2009).

Im Patienten zeigen sich neurale Ausfälle abhängig von der Lokalisation der kortikalen Schädigung. Ist ein Insult z.B. im motorischen Kortex lokalisiert, wird der Patient Defizite in seinen Bewegungsabläufen zeigen. Eine Schädigung des Hippocampus resultiert – entsprechend seiner physiologischen Funktion – häufig in Gedächtnisdefiziten. Anatomisch wird die Hippocampus-Formation in Gyrus dentatus, Cornu ammonis (Ammonshorn) und Subiculum unterteilt (Abb. 1). In vielen Studien konnte gezeigt werden, dass die Region des Cornu ammonis (CA) bereits bei milden hypoxisch-ischämischen Insulten geschädigt wird (Matsuoka *et al.*, 1997; Tajiri *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2013). Diese Schädigung manifestiert sich in neurale Apoptose, insbesondere im Bereich des Stratum pyramidale (Tajiri *et al.*, 2004; Zhu *et al.*, 2006b). Die Neurone der Cornu ammonis-Areale CA2- und CA3 (siehe Abb. 1) haben physiologisch einen hohen Glucose- und Sauerstoffverbrauch und reagieren entsprechend empfindlich auf einen hypoxisch-ischämischen Insult (Sokoloff *et al.*, 1977; Strasser & Fischer, 1995). Funktionell ist die Hippocampus-Formation die zentrale Struktur für die Gedächtnisbildung (Treves & Rolls, 1992).



**Abb. 1: Schema des Hippocampus und des Gyrus dentatus.** Str. pyr. = Stratum pyramidale, Str. lac/mol = Stratum lacunosum-moleculare, Fiss. Hippoc. = Fissura hippocampi, CA = Cornu ammonis (Ammonshorn) (mit freundlicher Genehmigung durch: J. Kacza, Veterinär-Anatomisches Institut, Universität Leipzig)

Hippocampusimpulse werden – vereinfacht dargestellt - vom Gyrus dentatus über das Cornu ammonis (von CA4 nach CA1) in das Subiculum und zum Fornix geleitet (Amaral *et al.*, 1984). Diese Impulsweiterleitung ist Teil des sogenannten Papez-Neuronenkreises, welcher für den Transport von Inhalten aus dem Kurzzeitgedächtnis ins Langzeitgedächtnis verantwortlich ist. Innerhalb dieses Papez-Neuronenkreises wird der Impuls vom Hippocampus über den Fornix zu den Corpora mammillare und dann über den Fasciculus mamillothalamicus zum Thalamus dorsalis weitergeleitet, wonach er über den Gyrus cinguli wieder zum Hippocampus gelangt (Bird & Burgess, 2008). Der Hippocampus spielt dabei eine essentielle Rolle, denn er hat Verbindungen zu fast allen sensorischen Kortizes (Bird & Burgess, 2008). Innerhalb des Hippocampus sind die Schaffer Kollateralen der CA3-Region für die Gedächtnisbildung von großer Bedeutung. Hierbei handelt es sich um Axon-Kollateralen, die von Pyramidenzellen der CA3-Region in die CA1-Region projizieren (Levy *et al.*, 1998). Anhand von Tierversuchen konnte gezeigt werden, dass diese Hippocampus-Region eine wichtige Funktion bei räumlichen Lern- und Gedächtnisprozessen spielt (Morris *et al.*, 1982; Aggleton *et al.*, 1986; Duva *et al.*, 1997).

Aufgrund ihrer zellulären Beschaffenheit spielt speziell die CA3-Region eine wichtige Rolle bei der Verarbeitung von Erinnerungen (Cherubini & Miles, 2015). Kommt es zu einem schweren Insult des Gehirns, wie dem hypoxisch-ischämischen Insult, oder zu einer Neurodegeneration, ist meist die CA3-Region sehr stark davon betroffen (Cherubini & Miles, 2015). Bei einer Unterversorgung des Gehirns mit Sauerstoff sind bereits nach ca. 20 Sekunden die Sauerstoffreserven der neuronalen Zellen aufgebraucht. Nach fünf Minuten sind in den Neuronen keine Reserven an Glukose und ATP mehr vorhanden (Volpe, 2001). Somit treten bereits nach wenigen Minuten ohne Sauerstoff irreversible Schäden in neuronalen Zellen auf (Dirnagl *et al.*, 1999; Perlman, 2006b; Lai & Yang, 2011).

### **Pathomechanismus der hypoxisch-ischämischen Gehirnläsion**

Auf zellulärer Ebene wirkt sich die Hypoxie-Ischämie sowohl auf neuronale Zellen (z.B. Interneurone, Pyramidenzellen) als auch auf Gliazellen (Astrozyten, Oligodendrozyten, Mikroglia) aus. Die Pathomechanismen werden hier am Beispiel der Neuronen – Astrozyten – Interaktion diskutiert: Astrozyten sind die am häufigsten auftretende Gliazellart im Gehirn. Strukturell sind sie an der Ausbildung der Blut-Hirn-Schranke beteiligt (Dehouck *et al.*, 1990), welche nur kleine Moleküle wie Sauerstoff, Glukose oder Hormone passieren lässt (Ballabh *et al.*, 2004; Abbott *et al.*, 2006; Sofroniew & Vinters, 2010). Physiologisch dienen Astrozyten als Glykogenspeicher (Brown & Ransom, 2007) und sind bedeutsam für die

Aufrechterhaltung der Homöostase des Gehirns (Simard & Nedergaard, 2004). Aufgrund ihrer Eigenschaft, aktiv Kalium-Ionen und Glutamat aufnehmen zu können, spielen sie eine wichtige Rolle in der Regulierung des chemischen Milieus im Extrazellulärraum. Bei Glutamat handelt es sich um einen wichtigen Neurotransmitter. Ist Glutamat allerdings in zu hohen Konzentrationen vorhanden, so wirkt es neurotoxisch (Choi, 1988; Chen & Swanson, 2003). Die Aufnahme von Glutamat in Astrozyten geschieht über Natrium-abhängige Transporter (Anderson & Swanson, 2000; Chen & Swanson, 2003). Dieser Prozess ist hochenergetisch und verbraucht viel ATP (Sibson *et al.*, 1998; Chen & Swanson, 2003).

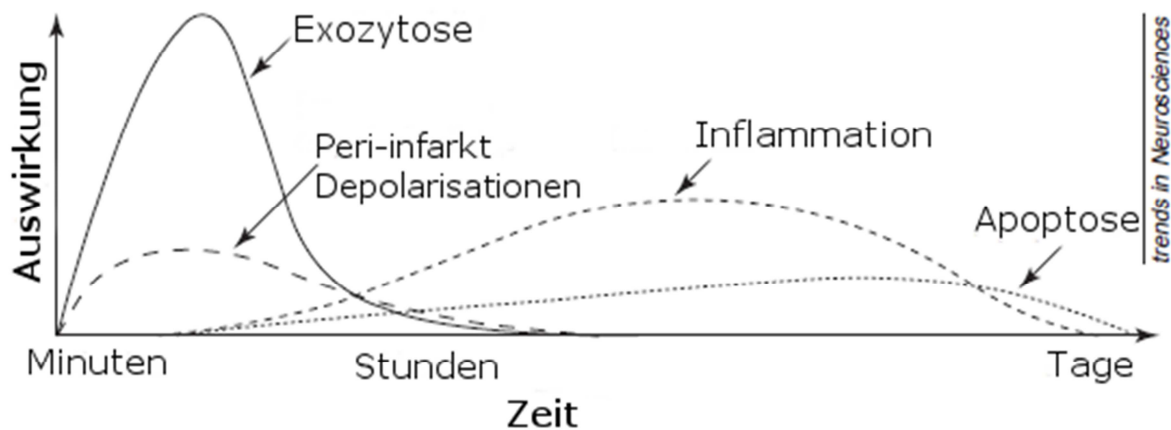
Während eines hypoxisch-ischämischen Insultes fällt die Aufnahme von Glutamat abrupt aus. Dadurch steigt die extrazelluläre Glutamatkonzentration und kann neurotoxisch wirken (Benveniste *et al.*, 1984; Choi, 1988; Swanson *et al.*, 1994; Chen & Swanson, 2003). Neben der fehlenden Aufnahme von Glutamat über Astrozyten wird vermutet, dass der Anstieg von extrazellulärem Glutamat auch durch das Ausströmen von Glutamat aus den Astrozyten bedingt ist. Mögliche Mechanismen sollen dabei reverse Glutamat-Transporter (Li *et al.*, 1999; Seki *et al.*, 1999; Chen & Swanson, 2003) und der P2X7-Rezeptor sein (Chen & Swanson, 2003; Duan *et al.*, 2003).

Eine weitere Aufgabe der Astrozyten ist der Abbau reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) mittels Glutathion. Glutathion ist eines der wichtigsten Antioxidantien im Gehirn (Dringen, 2000; Chen & Swanson, 2003). Zwar ist es auch in anderen Zellarten vorhanden, Astrozyten besitzen aber die höchsten Konzentrationen von Glutathion (Slivka *et al.*, 1987; Wilson, 1997; Chen & Swanson, 2003). Während eines hypoxisch-ischämischen Insultes kommt es zu einem starken Anstieg von ROS (Chan, 1996; Chen & Swanson, 2003). Um die ROS mittels Reduktion unschädlich zu machen, wird viel Glutathion generiert. Da die ROS-Konzentration während eines hypoxisch-ischämischen Insultes allerdings sehr hoch ist, sinkt der Gehalt des reduzierten Glutathions in den Astrozyten rapide ab. Durch den verringerten Glutathion-Gehalt sind die Astrozyten nicht mehr in der Lage ROS abzubauen und somit die Neurone vor einer ROS-bedingten Läsion zu schützen (Drukarch *et al.*, 1997; McNaught & Jenner, 1999; Chen *et al.*, 2001; Chen & Swanson, 2003).

Die Analyse der zeitlichen Abfolge der zellulären Ereignisse bei einer hypoxisch-ischämischen Gehirnläsion lässt folgende Ereignisse erkennen: Kurzfristig kommt es zunächst zu Depolarisation und Exozytose der Zellen im Zentrum der Hypoxie-Ischämie Zone. Diese initialen Ereignisse resultieren in einem primären energetischen Versagen der Zellen (primäre Phase). Die nachfolgenden Ereignisse der sekundären Phase sind längerfristig und beinhalten

Inflammation und Apoptose in der Hypoxie-Ischämie-Zone sowie in den umgebenden Bereichen des Gehirns. Die sekundäre Phase wird u.a. durch Vorgänge der Reperfusion und Reoxygenierung eingeleitet. Diese beiden Vorgänge führen dazu, dass wieder Sauerstoff sowie Glukose zu den Zellen gelangen kann. Zur Reperfusion kann es auf unterschiedliche Arten kommen, z.B. in dem die Verengung des Gefäßes wieder gelöst wird, wodurch wieder genügend Blut in die betroffenen Regionen gelangen kann, oder durch vorhandene Anastomosen der Gefäße, die die betroffenen Regionen über Umgehungswege versorgen können. Zwar wird die Reoxygenierung benötigt, um die Zellen nach einem hypoxisch-ischämischen Insult wieder zu versorgen, jedoch kann genau diese Reoxygenierung auch zum Zelltod führen. Durch die Reoxygenierung geht die mitochondriale Membranintegrität verloren, wodurch eine mitochondriale Dysfunktion entsteht. Dies wiederum ist der Grund dafür, dass nicht mehr ausreichend ATP gebildet werden kann, wodurch mehr ROS generiert wird (Ten & Starkov, 2012).

Somit spielen unter anderem die Aktivierung von ROS, Inflammation, die Membrandysfunktion, sowie aktivierte Mikroglia/Makrophagen und Apoptose eine wichtige Rolle während der sekundären Phase eines hypoxisch-ischämischen Insultes (Inder & Huppi, 2000; Cerio *et al.*, 2013). Die Aktivierung der Apoptose ist ein hochenergetischer Prozess. Für die Aktivierung der Caspasen, die bei der Apoptose eine essentielle Rolle spielen, wird eine große Menge an Adenosintriphosphat (ATP) benötigt (Northington *et al.*, 2001; Blomgren *et al.*, 2007; Cerio *et al.*, 2013). Somit spielen die Mitochondrien, in denen ATP gebildet wird, hierfür eine wichtige Rolle. Aus diesem Grund werden in den Analysen dieser Arbeit zwei Aspekte näher analysiert: a) der Einfluss von ROS und b) der Einfluss von ATP und Pannexin 1 (Panx1) Kanälen, auf die Ausprägung eines hypoxisch-ischämischen Insultes.



**Abb. 2: Pathophysiologischen Ereignisse nach einem hypoxisch-ischämischen Insult.** (Dirnagl *et al.*, 1999)

Während der Peri-Infarkt-Depolarisation kommt es durch den Mangel an Sauerstoff und Glukose zu einer verringerten Gewinnung von Energie in den Zellen (Martin *et al.*, 1994; Dirnagl *et al.*, 1999). Diese verringerte Energiegewinnung führt zu einem Verlust des Membranpotentials, welches zur Depolarisation der Neurone und Gliazellen führt (Katsura *et al.*, 1994; Dirnagl *et al.*, 1999). Aufgrund der Depolarisation der Zellen kommt es zu einem starken Einstrom von Calcium. Dieser verstärkte Einstrom von Calcium führt zu unterschiedlichen intrazellulären Kaskaden, die letztendlich zum Zelltod führen (Kalogeris *et al.*, 2012). So kommt es u.a. zu einem erhöhten Transport von Calcium in die Mitochondrien (Talukder *et al.*, 2009; Contreras *et al.*, 2010; Szydlowska & Tymianski, 2010), was wiederum zu einer gesteigerten Aktivität der mitochondrialen Permeabilitäts-Transitions-Poren (MPT) führt, die letztendlich den Tod der Zelle bedeutet (Yellon & Hausenloy, 2007; Kalogeris *et al.*, 2012). Ähnlich wie der verstärkte Einstrom von Calcium, führt auch eine erhöhte Bildung von ROS zu einer Zerstörung der inneren Mitochondrienmembran. Sobald es zu einer Zerstörung der Mitochondrien kommt, ist auch die Oxidation von Proteinen sowie die Bildung von ATP, welche beide einen aktiven Elektronentransport innerhalb der Zelle benötigen, verhindert. Des Weiteren wird der Apoptose-Aktivator Cytochrom C von den Mitochondrien freigesetzt (Fujimura *et al.*, 1998; Dirnagl *et al.*, 1999). Neben der Peri-Infarkt-Depolarisierung kommt es zur Exozytose, die eine um das Vielfache stärkere Auswirkung auf das Ausmaß der hypoxisch-ischämischen Schädigung hat. Während dieses Ereignisses werden Signalwege aktiviert, die zur Nekrose führen und sowohl die Apoptose als auch die post-ischämische Inflammation initiieren (Dirnagl *et al.*, 1999). Während der Inflammation werden mittels des erhöhten Calcium-Einstroms in die Zelle „second messenger“-Systeme aktiviert, die wiederum die ROS innerhalb der Zelle ansteigen lassen.

Sowohl der Anstieg der ROS als auch der hypoxisch-ischämische Insult selbst können die Genregulation der proinflammatorischen Faktoren, wie z.B. Nuclear Factor- $\kappa$ B, hypoxia inducible factor 1 und Interleukin-1 $\beta$  steigern (Rothwell & Hopkins, 1995; O'Neill & Kaltschmidt, 1997; Ruscher *et al.*, 1998; Dirnagl *et al.*, 1999). Aufgrund der gesteigerten Expression proinflammatorischer Faktoren sind einige Zellen in der Lage, zytotoxische Substanzen (z.B. ROS) freizusetzen, welche zu einer vermehrten Schädigung der Zellen sowie zu einer Zerstörung der Blut-Hirn-Schranke führen können (Emsley & Tyrrell, 2002; Danton & Dietrich, 2003; Wang *et al.*, 2007). Zusammengefasst kommt es wenige Minuten bis Stunden nach einem hypoxisch-ischämischen Insult zu einem primären energetischen Versagen der Zellen, während sich die sekundäre Phase über Stunden bis Tage nach einem hypoxisch-ischämischen Insult erstrecken kann (Abb. 2) (Dirnagl *et al.*, 1999).

In der primären Phase nach hypoxisch-ischämischer Läsion kann es bereits nach einigen Minuten zum Zelltod in den betroffenen Hirnarealen kommen. Dieser Bereich wird als zentrale Ischämie-Region bezeichnet. Um diese zentrale Ischämie-Region zeichnet sich die sogenannte Penumbra ab, die in der Regel primär nicht so schwer betroffen ist, wie die zentrale Ischämie-Region. In der Penumbra ist die Durchblutung ebenfalls vermindert, allerdings sind die Zellen in dieser Region noch nicht nekrotisch. Erst durch die anhaltende schlechte Durchblutung kommt es in den Zellen der Penumbra zu den Ereignissen der Inflammation und der Apoptose.

Parallel zu den genannten Prozessen wird die Zellproliferation im Gehirn gesteigert, um die beschädigten Zellen möglichst adäquat ersetzen zu können. Insbesondere bei einem milden hypoxisch-ischämischen Insult werden neuronale Stammzellen zur Proliferation angeregt (Santilli *et al.*, 2010).

Diese pathophysiologischen Faktoren eines hypoxisch-ischämischen Insultes konnten mittels verschiedener Tiermodelle identifiziert werden (Northington *et al.*, 2011). Ein etabliertes *in vivo* Modell zur Untersuchung adulter hypoxisch-ischämischer Gehirnläsionen am Nager ist das sogenannte Levine-Modell (Levine, 1960). Allerdings erfordert die Untersuchung einer früh-postnatalen hypoxisch-ischämischen Gehirnläsion auch ein früh-postnatales Modell. Aus diesem Grund wurde das Levine-Modell durch Rice (Rice, 1981) und Vannucci (Vannucci & Vannucci, 1997) modifiziert. Im Modell der Ratte wird im Alter von 7 Tagen (P7) eine einseitige Ligatur der Arteria carotis durchgeführt. Zu diesem Zeitpunkt ist die Gehirnentwicklung in Nagern vergleichbar mit der eines Menschen in der 34.-35. Schwangerschaftswoche (Hagberg *et al.*, 2002). Die induzierte Gehirnläsion bei diesem

Modell kann somit mit dem perinatalen hypoxisch-ischämischen Insult des Menschen verglichen werden (Dobbing, 1974). Die einseitige Carotisligatur führt zu einem Insult auf der ipsilateralen Seite. Vergleicht man das klinische Bild des früh-postnatalen Nagermodells mit dem eines früh-postnatalen hypoxisch-ischämischen Insultes beim Menschen, so sind diese sich sehr ähnlich. Unter anderem zeigen beide neurale Schäden im Kortex, Thalamus und Hippocampus auf.

Bei der Ratte findet das modifizierte Levine-Modell einen häufigen Einsatz, um physiologische (Vannucci *et al.*, 1996; Aley & Levine, 2002), morphologische (Van Reempts & Borgers, 1984; Dambaska & Gajkowska, 2002) und funktionelle (Jansen & Low, 1996; Pereira *et al.*, 2007) Auswirkungen einer hypoxisch-ischämischen Gehirnläsion zu untersuchen. Das Modell der Ratte wurde von Sheldon *et al.* (Sheldon *et al.*, 1998) auf die Maus übertragen. Jedoch zeigte sich, dass verschiedene Mausstämme anders auf die Durchführung des modifizierten Levine-Modells reagieren (Sheldon *et al.*, 1998). Somit muss für jeden Mausstamm individuell z.B. die Dauer der systemischen Hypoxie etabliert werden, damit sich eine früh-postnatale hypoxisch-ischämische Gehirnläsion ausbildet (Sheldon *et al.*, 1998).

## 1.2 Zellulärer Pathomechanismus

### 1.1.1 Die Rolle der Reaktiven Sauerstoffspezies nach einem hypoxisch-ischämischen Insult

Bei der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) handelt es sich um sogenannte Sauerstoffradikale. Dies sind Formen des Sauerstoffs, die aufgrund ihrer hohen Reaktivität schädlich für den Organismus sind. Unter den ROS gibt es viele verschiedene Radikale, wie z.B. das Superoxid-Anion ( $O_2^{\cdot-}$ ), das Hydroxyl-Radikal ( $OH^{\cdot}$ ) und Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ). Die ROS spielen bei pathophysiologischen Veränderungen eine wichtige Rolle. Beispiele hierzu finden sich bei neurodegenerativen Erkrankungen, wie der Alzheimer Erkrankung, hypoxisch-ischämischen Insulten, sowie dem Altern selbst [reviewed in: (Chandel *et al.*, 2000; Cui *et al.*, 2012; Huang *et al.*, 2016)].

Wird eine Zelle durch ROS beeinträchtigt, so kommt es zu einer nuklearen oder mitochondrialen Schädigung der DNA. Bei dieser Schädigung wird in den meisten Fällen Guanin oxidiert (Cooke *et al.*, 2002). Mittels Oxidation an der 8. Stelle des Guanin-Moleküls wird eine Hydroxyl-Gruppe angefügt, wodurch 8-Hydroxy-deoxy-guanosine (8-OHdG) entsteht. Mittels einer Analyse von 8-OHdG kann somit ein Rückschluss auf den oxidativen DNA-Schaden gezogen werden (Shigenaga *et al.*, 1989; Beckman & Ames, 1997).

### 1.2.1 Die Rolle der Mitochondrien nach einem hypoxisch-ischämischen Insult

Es wird vermutet, dass die Quelle für die postischämische Bildung von ROS in der mitochondrialen Atmungskette liegt (Boveris & Cadenas, 1975; Poderoso *et al.*, 1999; Almeida *et al.*, 2002; Ten & Starkov, 2012). Die Rolle der Mitochondrien, des Krebszyklus, des Nikotinamid-Adenin-Dinucleotid-Hydrat (NADH) und der Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) unter ischämischen Bedingungen wurden detailliert am Herzen untersucht (Giordano, 2005). Es wurde festgestellt, dass z.B. Arrhythmien und apoptotischer sowie nekrotischer Zelltod im Herzgewebe vor allem durch ROS negativ beeinflusst werden (Halestrap, 2005; Wagner *et al.*, 2013; Nickel *et al.*, 2015). Auch im Gehirn scheinen diese Mechanismen bei der Pathogenese der Ischämie, besonders in der Phase des sekundären Zelltods, eine Rolle zu spielen (Rousset *et al.*, 2012). Die unter hypoxischen Bedingungen zunehmenden metabolischen Entgleisungen resultieren aus der Freisetzung exzitatorischer Aminosäuren, der Aktivierung von Glutamat-Rezeptoren und Stickstoff-Monoxid-Synthase. Die Pathomechanismen konvergieren auf Ebene der Mitochondrien (Rousset *et al.*, 2012). Die Konzentration zytosolischen Calciums in der Zelle und im Mitochondrium steigt. Dies führt wiederum zur Bildung reaktiver Sauerstoff- und Stickstoff-Spezies, zur Peroxidation von Lipiden und mitochondrialer Dysfunktion, die zusammen im weiteren Verlauf zum Absterben von Neuronen führen (Dugan & Choi, 1994).

Dieser molekulare Mechanismus spielt insbesondere beim früh-postnatalen Sauerstoffmangel eine wichtige Rolle (Sanderson *et al.*, 2013). Reduzierte Mengen an Antioxidantien verursachen im früh-postnatalen Gehirn eine größere Schädigung als im adulten Gehirn (Rousset *et al.*, 2012).

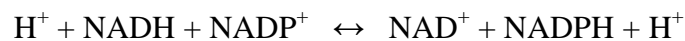
In den Mitochondrien werden während der ATP-Produktion in der Atmungskette Superoxid-Radikale ( $O_2^-$ ) gebildet (Balaban *et al.*, 2005). Mitochondrien verfügen über verschiedene Mechanismen, um ROS Moleküle unschädlich zu machen. Die Beseitigung des  $O_2^-$  erfolgt z.B. durch die Superoxid Dismutase (Mn-SOD) zu  $H_2O_2$ , welches wiederum über die Glutathion Peroxidase (GPX) und Peroxiredoxin (PRX) zu  $H_2O$  weiterreagiert. Generell benötigen beide Prozesse reduziertes NADPH, welches prinzipiell durch drei Enzyme aus  $NADP^+$  generiert werden kann: die Isocitrat Dehydrogenase ( $IDP_m$ ), die Malat Decarboxylase (MEP) sowie die Nicotinamid Nukleotid Transhydrogenase (Nnt). Metabolische Fluss-Analysen in *E. coli* ließen bereits frühzeitig vermuten, dass besonders dem Nnt-Protein eine wichtige Rolle zukommt (Sauer *et al.*, 2004). Inzwischen rückt das Nnt-Protein weiter in den Fokus der  $NAD^+$  Regeneration (Nickel *et al.*, 2013). *In vitro* konnte an H295R-Zellen gezeigt



werden, dass durch Deletion des *Nnt*-Gens das mitochondriale ROS-Niveau angestiegen ist und eine erhöhte Apoptose auftrat (Meimaridou *et al.*, 2012).

Als Folge einer ischämischen Schädigung kommt es im Nervensystem zu einer erhöhten ROS Produktion (Rousset *et al.*, 2012; Rousset *et al.*, 2013). Verglichen mit dem Pathomechanismus im adulten Nervensystem sind im früh postnatalen Gehirn nach einer ischämischen Läsion andere Mechanismen von Bedeutung. So ist das unreife Gehirn u.a. auch anfälliger für oxidativen Stress (Hagberg *et al.*, 2004; Vannucci & Hagberg, 2004; Rosenkranz & Meier, 2011). Interessanterweise ist in den Mitochondrien die Expression der ROS-abbauenden GPX und der Catalase in der frühen postnatalen Entwicklung sehr gering, was möglicherweise eine Ursache des reduzierten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Abbaus im früh-postnatalen Gehirn sein könnte (Rousset *et al.*, 2012; Rousset *et al.*, 2013). Auch die Exposition der ROS zu freiem Eisen, das im frühkindlichen Gehirn in höherer Konzentration vorkommt, könnte zu erhöhter Zytotoxizität führen (Ferriero, 2001).

Beim *Nnt*-Protein handelt es sich um eine Protonen-Pumpe, die über die Translokation von Protonen ins Mitochondrium und Einschleusung in den Krebs-Zyklus eine reversible Reduktion von NADP<sup>+</sup> zu NADPH fördert (Abb. 3). Die entsprechende Gleichung lautet:



Die Bedeutung des *Nnt*-Proteins in der Regeneration des NADPH im Gehirn ist weitgehend unklar. Obwohl das *Nnt*-Protein die stärkste Expression im Herzen aufweist, konnte das *Nnt*-Protein auch in anderen Organen der Maus und des Menschen nachgewiesen werden. Bei Mäusen wurde das *Nnt*-Protein in der Niere (64% der Expression im Herz (= 100%)), in der Leber (35%) und der Lunge (25%), sowie im Gehirn mit 14% detektiert (Arkblad *et al.*, 2002). Im humanen Gehirn wurde zudem eine Region-spezifische Expression nachgewiesen (Arkblad *et al.*, 2002). Insbesondere im Temporallappen, in dem die Hippocampus-Formation lokalisiert ist, wurde *Nnt*-mRNA detektiert. Diese Expressionsdaten lassen vermuten, dass die NADPH-Regeneration über *Nnt* auch im Nervensystem funktionell bedeutsam ist.

Um diesen Aspekt zu untersuchen, bieten sich zwei Unterstämme der C57BL/6 Maus an: Mäuse des C57BL/6N Unterstammes und Mäuse des C57BL/6J Unterstammes. In den Arbeiten von Mekada *et al.* (Mekada *et al.*, 2009) wurde gezeigt, dass den Mäusen des C57BL/6J Unterstammes Exon 7-11 des *Nnt*-Gens fehlen und somit kein funktionelles *Nnt*-Protein gebildet wird. Das *Nnt*-Gen kodiert im Menschen ein mitochondriales Enzym, die

Nicotinamid Nukleotid Transhydrogenase. Diese nutzt die Energie des mitochondrialen Protonengradienten, um hohe Konzentrationen an NADPH zu produzieren. NADPH spielt eine tragende Rolle bei der Biosynthese und Entgiftung von freien Radikalen (Balaban *et al.*, 2005; Gauthier *et al.*, 2013; Nickel *et al.*, 2014). Nur solange das *Nnt*-Gen aktiv ist, wird das Nnt-Protein generiert und kann genügend NADPH bilden, um die ROS zu entgiften und somit einen Zellschaden, durch ROS zu vermeiden. Da bei den Mäusen des C57BL/6J Unterstammes Exon 7-11 des *Nnt*-Gens fehlen, kann kein funktionierendes Nnt-Protein gebildet werden. Als Folge wird kein NADPH zur Entgiftung von ROS hergestellt. Somit wurde die Hypothese aufgestellt, dass es bei diesen Mäusen – aufgrund ihres Mangels an Nnt – zu einer stärkeren Ausprägung einer früh-postnatalen hypoxisch-ischämischen Läsion kommt. Bereits Meimaridou *et al.* konnten an H295R-Zellen beweisen, dass durch einen Knockdown des *Nnt*-Gens der mitochondriale ROS-Level angestiegen war, wodurch eine erhöhte Apoptose auftrat (Meimaridou *et al.*, 2012). Durch das Fehlen von von Exon 7-11 des *Nnt*-Gens stellt der C57BL/6J Unterstamm ein Modell zur Untersuchung der Folgen einer endogenen Deletion des Nnt-Proteins dar.

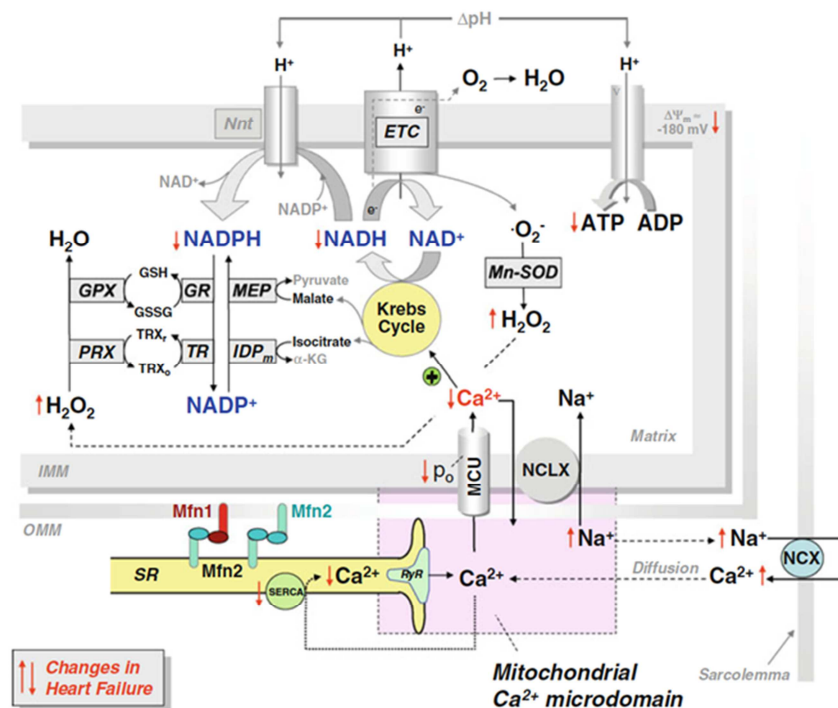


Abb. 3: Mitochondriale Calcium-Übermittlung und seine Bedeutung für den mitochondrialen Redox-Status in Herz-Myozyten. Der Krebs-Zyklus regeneriert NADH und NADPH; beteiligt sind drei Enzyme einschließlich Nnt. aus: (Nickel *et al.*, 2013).

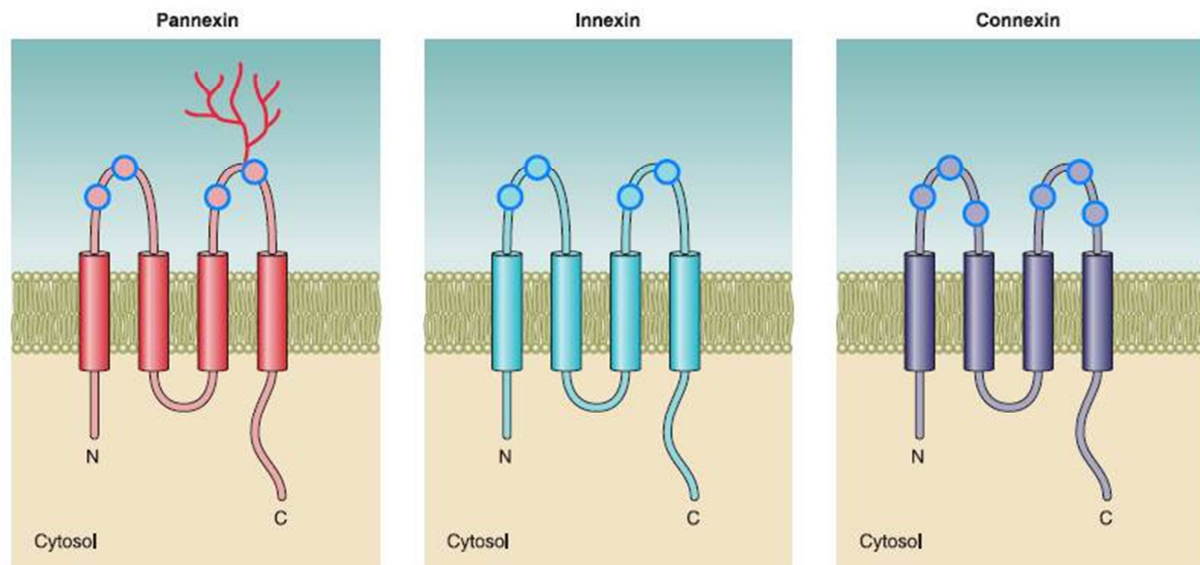
### 1.3 Die Rolle von ATP und Pannexin 1 nach einem hypoxisch-ischämischen Insult

Unter den pathophysiologischen Bedingungen eines hypoxisch-ischämischen Insultes des Gehirns spielt die Regulation von ATP eine wichtige Rolle. Bereits nach fünf Minuten ohne Sauerstoff sind in den neuronalen Zellen keine Reserven mehr an ATP vorhanden (Volpe, 2001). Dies liegt unter anderem daran, dass durch einen hypoxisch-ischämischen Insult eine mitochondriale Dysfunktion entsteht, wodurch nicht mehr ausreichend ATP gebildet werden kann (Ten & Starkov, 2012). Eine weitere Ursache liegt vermutlich in der Aktivierung apoptotischer Prozesse nach einem hypoxisch-ischämischen Insult. Bei diesem Prozess spielen vor allem Caspasen eine wichtige Rolle. Zur Aktivierung der Caspasen benötigt die Zelle viel ATP, welches über spezielle Transporter (Kanäle) zur Verfügung gestellt wird (Northington *et al.*, 2001; Blomgren *et al.*, 2007; Cerio *et al.*, 2013). Einer dieser Kanäle, der hauptsächlich ATP transportiert, ist der Panx1-Kanal (Bao *et al.*, 2004).

Ein Panx1-Kanal, auch als Pannexon bezeichnet, wird aus sechs Panx1-Proteinen gebildet (Boassa *et al.*, 2007). Panx1 gehört zu den Pannexinen, welche zu den integralen Membranproteinen zählen (Panchin *et al.*, 2000). Bei der Familie der Pannexine sind drei Isoformen bekannt: Panx1, Panx2, welche in den meisten Geweben auftreten, und Panx3, das bisher nur in wenigen Gewebetypen, wie z.B. in Knochen und in der Haut detektiert wurde (Panchin *et al.*, 2000; Goodenough & Paul, 2009). Panchin *et al.* konnten 2000 zeigen, dass Pannexine sowohl in Vertebraten als auch in Invertebraten zu finden sind (Panchin *et al.*, 2000). Des Weiteren konnten Panchin *et al.* nachweisen, dass sie Sequenzhomologien zu Innexinen, sowie Strukturhomologien zu Connexinen haben. Innexine und Connexine gehören zur Familie der Gap Junction-bildenden Proteine, wobei Innexine lediglich in Invertebraten und Connexine lediglich in Vertebraten zu finden sind (Panchin *et al.*, 2000; Baranova *et al.*, 2004; Panchin, 2005). Grundsätzlich besitzen die Pannexine, Connexine und Innexine einen ähnlichen Aufbau: 4 Transmembrandomänen, verbunden durch zwei Extrazellulärschleifen und eine Intrazellulärschleife, sowie einen intrazellulären N- und C-Terminus (Panchin *et al.*, 2000; Baranova *et al.*, 2004; Panchin, 2005).

Panx1 mRNA konnte in neuralem Gewebe im Bereich des Kortex, des Striatums, des Hippocampus, des Thalamus und des Zerebellums sowohl in Neuronen als auch in Astrozyten detektiert werden (Bruzzone *et al.*, 2003). Die Öffnung von neuralem Panx1 ist abhängig von der Aktivierung von N-Methyl-D-Aspartat- (NMDA) und P2X-Rezeptoren (Davidson *et al.*, 2015). Wird z.B. ein P2X-Rezeptor durch ATP aktiviert, so steigt das intrazelluläre Calcium an, was wiederum zum Öffnen von Panx1-Kanälen führt. Dieser Vorgang wird auch als eine

ATP-induzierte ATP Freisetzung bezeichnet (Yang *et al.*, 1994; Cotrina *et al.*, 1998a; Stout *et al.*, 2002; Iglesias *et al.*, 2008; Baroja-Mazo *et al.*, 2013). Der purinerge Rezeptor P2X7 interagiert mit Panx1 (Iacobas *et al.*, 2007; Mayo *et al.*, 2008; Pelegrin *et al.*, 2008; Scemes *et al.*, 2009). Mittels dieser Interaktion wird ein Signalkomplex gebildet, welcher zu einer verlängerten Aktivierung der Panx1-Kanäle führt (Locovei *et al.*, 2007).



**Abb. 4: Membrantopographie von Pannexinen, Innexinen und Connexinen.** Bei diesen Proteinen handelt es sich um integrale Membranproteine. Sie besitzen alle 4 Transmembrandomänen mit 2 extrazellulären und einer intrazellulären Schleife, sowie einen intrazellulären N- bzw. C-Terminus. Aus: (Bosco *et al.*, 2011).

Panx1 mRNA konnte in neuralem Gewebe im Bereich des Kortex, des Striatums, des Hippocampus, des Thalamus und des Zerebellums sowohl in Neuronen als auch in Astrozyten detektiert werden (Bruzzone *et al.*, 2003). Die Öffnung von neuralem Panx1 ist abhängig von der Aktivierung von N-Methyl-D-Aspartat- (NMDA) und P2X-Rezeptoren (Davidson *et al.*, 2015). Wird z.B. ein P2X-Rezeptor durch ATP aktiviert, so steigt das intrazelluläre Calcium an, was wiederum zum Öffnen von Panx1-Kanälen führt. Dieser Vorgang wird auch als eine ATP-induzierte ATP Freisetzung bezeichnet (Yang *et al.*, 1994; Cotrina *et al.*, 1998a; Stout *et al.*, 2002; Iglesias *et al.*, 2008; Baroja-Mazo *et al.*, 2013). Der purinerge Rezeptor P2X7 interagiert mit Panx1 (Iacobas *et al.*, 2007; Mayo *et al.*, 2008; Pelegrin *et al.*, 2008; Scemes *et al.*, 2009). Mittels dieser Interaktion wird ein Signalkomplex gebildet, welcher zu einer verlängerten Aktivierung der Panx1-Kanäle führt (Locovei *et al.*, 2007).

Durch seine Aktivität als ATP-Kanal (Locovei *et al.*, 2006a; Locovei *et al.*, 2006b; Locovei *et al.*, 2007) ist Panx1 an vielen interzellulären Prozessen beteiligt. Eine wichtige Rolle nimmt Panx1 im Immunsystem und bei der Apoptose ein. Im Immunsystem aktiviert Panx1 z.B. Leukozyten. Durch diese Aktivierung kommt es zu einer autokrinen Regulation der P2X7-

Signalkaskade und somit zu einer parakrinen Aktivierung anderer immunologisch aktiver Zellen (Bianco *et al.*, 2005). Des Weiteren wird durch die Interaktion von Panx1 und dem P2X7-Rezeptor der Signalweg des Inflammasoms aktiviert, wodurch Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) aus Makrophagen und T-Lymphozyten freigesetzt wird (Pelegriin & Surprenant, 2006; Locovei *et al.*, 2007; Schenk *et al.*, 2008; Pelegriin & Surprenant, 2009).

Elliott *et al.* konnten zeigen, dass Panx1 konservierte Caspase-3 und Caspase-7 Schnittstellen besitzt (Elliott *et al.*, 2009). Werden diese Caspase-Schnittstellen gespalten, so führt dies zu einer Öffnung des Panx1-Kanals, wodurch es zu einer Ausschüttung von ATP kommt. Dies dient dann als sogenanntes „Find-me“-Signal, durch das Phagozyten rekrutiert werden, um apoptotische Zellen und Zellfragmente aufzunehmen (Chekeni *et al.*, 2010).

Die Rolle von Panx1 während eines hypoxisch-ischämischen Insultes ist umstritten. So wurde an Neuronenkulturen gezeigt, dass die Panx1-Kanäle während einer Oxygen-Glukose Deprivation (OGD) für einen längeren Zeitraum geöffnet wurden. Somit wurde unter anderem mehr ATP aus der Zelle transportiert, wodurch es letztendlich zum Zelltod kam (Thompson *et al.*, 2006). Jian *et al.* konnten anhand von Astrozytenkulturen, die einer OGD ausgesetzt wurden zeigen, dass es durch die Blockierung von Panx1 mittels Probenecid (PBN) zu einem verringerten Zelltod kam (Jian *et al.*, 2016). In adulten Panx1-defizienten Mäusen konnte nach Verschluss der mittleren Zerebralarterie (middle cerebral artery occlusion = MCAO) eine Reduktion der Infarktgröße im Vergleich zum Wildtyp nachgewiesen werden (Cisneros-Mejorado *et al.*, 2015). Auf der anderen Seite konnten Madry *et al.* an Slice-Kulturen und Orellana *et al.* anhand von isolierten Astrozyten keine direkte Auswirkung von Panx1 auf die Bildung eines hypoxisch-ischämischen Zellschadens feststellen (Madry *et al.*, 2010; Orellana *et al.*, 2010).

Um die Wirkweise eines Proteins spezifizieren zu können, kann das Protein bzw. seine Funktion durch den Einsatz eines Inhibitors gehemmt oder verhindert werden. Dies kann z.B. mittels pharmakologischer Inhibition durch spezifische Blocker geschehen. Eine weitere Möglichkeit zur Überprüfung der Wirkweise eines Proteins bietet das Ausschalten bzw. die Überexpression des Proteins im Tiermodell.

In der vorliegenden Arbeit wurden zur Analyse des Einflusses von Panx1 auf eine frühpostnatale hypoxisch-ischämische Gehirnläsion Panx1-transgene Mäuse verwendet. Bei diesen Mäusen wird die Expression von Panx1 durch den Insertion eines *lacZ*-Gens sowie einer Phosphoglycerat Neomycin-Kassette verhindert (Anselmi *et al.*, 2008). Durch den

Vergleich dieser Tiere mit dem Wildtyp, in dem Panx1 weiterhin exprimiert wird, ist es somit möglich, den Einfluss von Panx1 auf eine früh-postnatale hypoxisch-ischämische Gehirnläsion zu untersuchen.

### 1.3.1 Connexin 43 bei Gehirnläsionen

Neben Panx1 spielen bei einem hypoxisch-ischämischen Insult die Connexine eine wichtige Rolle (Orellana *et al.*, 2010; Davidson *et al.*, 2012; Davidson *et al.*, 2013; Davidson *et al.*, 2014). Zur Familie der Connexine zählen 20 Connexine, die in murinem Gewebe, und 21 Connexine, die in humanem Gewebe bekannt sind (Sohl & Willecke, 2003; 2004). Untereinander zeigen sie ähnliche Membrantopologien auf und unterscheiden sich in ihrer molekularen Masse. So besitzt z.B. Connexin 43 (Cx43) eine molekulare Masse von ca. 43 kDa. Des Weiteren ist bekannt, dass aus sechs Connexin-Monomeren ein Hemikanal gebildet wird. Dieser Hemikanal wird als Connexon bezeichnet (Makowski *et al.*, 1977; Unwin & Zampighi, 1980). Verbinden sich nun zwei Connexone zweier Zellen miteinander, so entsteht ein Gap Junction Kanal. Diskutiert wird, dass einige Connexine auch als Non-Junction Kanäle agieren können. In diesem Fall agieren sie als Hemikanal und erlauben den Austausch von Ionen und Molekülen zwischen dem Zytoplasma und dem Extrazellulärraum. Ein prominentes Beispiel hierfür ist Cx43, welches u.a. zur Ausschüttung von ATP aus der Zelle in den Extrazellulärraum dient. Dies konnte durch Cotrina *et al.* gezeigt werden (Cotrina *et al.*, 1998b; Cotrina *et al.*, 2000; Spray *et al.*, 2006). Bei ihren Versuchen konnten sie bei Cx43-transfizierten Astrozyten und Gliomazellen mehr extrazelluläres ATP detektieren als in den nicht-transfizierten Zellen.

Cx43 ist ein Gap-Junction Protein, welches hauptsächlich in Astrozyten im Gehirn vorhanden ist (Dermietzel *et al.*, 1991; Meier & Rosenkranz, 2014). Es wird unter anderem benötigt, um die Homöostase der neuralen Umgebung aufrecht zu erhalten (Davidson *et al.*, 2015). Bei Verletzungen des zentralen Nervensystems scheint Cx43 einen wichtigen Einfluss zu haben. So konnten Wasielewski *et al.* an der Ratte nachweisen, dass es nach einer hypoxisch-ischämischen Läsion zu einer vermehrten Expression von Connexin 43 im Gehirn kommt (Wasielewski *et al.*, 2012). Des Weiteren konnte Davidson *et al.* durch das Blockieren von Cx43 mit einem mimetischen Peptid (z.B. Peptid 5) eine Neuroprotektion der hypoxisch-ischämischen Läsion im fetalen Schaf zeigen (Davidson *et al.*, 2014). Allerdings gibt es auch Arbeiten, die gezeigt haben, dass durch das Fehlen von Cx43 eine größere hypoxisch-ischämische Läsion detektiert wurde, als bei den Tieren mit funktionsfähigem Cx43 (Nakase *et al.*, 2004).

## 2 Zielsetzungen

### **Wirkt sich das Fehlen des Nnt-Proteins auf die Ausprägung einer früh-postnatalen hypoxisch-ischämischen Gehirnläsion aus?**

Ein Mangel an Sauerstoff und Glukose hat zur Folge, dass in neuronalen Zellen ein primäres Versagen im Energiehaushalt entsteht, welches biochemische Kaskaden aktiviert und somit zur Zelldysfunktion und zum Zelltod durch Nekrose führt (Perlman, 2006b; Lai & Yang, 2011). Einige Stunden bis Tage später kommt es dann zu einem sekundären Versagen im Energiehaushalt der Zelle, welches zum Zelltod durch Inflammation und Apoptose führt (Dirnagl *et al.*, 1999).

Bei der Pathogenese eines hypoxisch-ischämischen Insultes scheinen Mitochondrien, der Krebszyklus, NADH und die reaktive Sauerstoffspezies eine wichtige Rolle zu spielen (Rousset *et al.*, 2012). Vor allem durch den erhöhten Einstrom von Calcium und den verstärkten Ausstrom von ATP steigt die ROS-Konzentration innerhalb der Zelle an (Dirnagl *et al.*, 1999). Für den Abbau der ROS ist ein Mechanismus verantwortlich, der abhängig ist von NADPH. NADPH wiederum wird in den Mitochondrien u.a. mit Hilfe des Nnt-Proteins durch die Reduktion von  $\text{NADP}^+$  generiert.

Aus diesem Grund wird die Hypothese aufgestellt, dass das Fehlen des Nnt-Proteins in einem Anstieg der ROS und somit in einer stärkeren Ausprägung der früh-postnatalen hypoxisch-ischämischen Gehirnläsion resultiert.

Dazu wurde zunächst das Modell des früh-postnatalen hypoxisch-ischämischen Insultes in den verwendeten Mausstämmen etabliert. Die Ausprägung der früh-postnatalen hypoxisch-ischämischen Gehirnläsion konnte anhand von bekannten Markern für einen hypoxisch-ischämischen Insult (CC3 und CD68) sowie einer Score-Einteilung klassifiziert werden. Wichtige Parameter der ROS-Bildung und des ROS-Abbaus wurden nachfolgend analysiert, um den Einfluss des Nnt-Proteins während eines früh-postnatalen hypoxisch-ischämischen Insultes charakterisieren zu können.

---

## **Hat die Abwesenheit von Panx1 eine Auswirkung auf die Ausprägung einer früh-postnatalen hypoxisch-ischämischen Gehirnläsion?**

ATP ist der Energielieferant der Zelle. Es wird in den Mitochondrien gebildet. Während der Produktion von ATP entsteht in der Atmungskette ROS, welches jedoch unter normalen Bedingungen wieder unschädlich gemacht werden kann (Balaban *et al.*, 2005). Kommt es zu einem früh-postnatalen hypoxisch-ischämischen Insult, so spielt ATP in unterschiedlichen Prozessen eine wichtige Rolle. Durch einen früh-postnatalen hypoxisch-ischämischen Insult kommt es u.a. zur Apoptose. Die Aktivierung der Apoptose ist ein hochenergetischer Prozess, der z.B. für die Aktivierung der Caspasen eine große Menge an ATP benötigt (Northington *et al.*, 2001; Blomgren *et al.*, 2007; Cerio *et al.*, 2013). Des Weiteren wird mittels des Panx1-Kanals während eines hypoxisch-ischämischen Insultes vermehrt ATP aus der Zelle transportiert. Aufgrund dieses ATP-Transportes kommt es zu einer verlängerten Aktivierung des Panx1-Kanals, was wiederum zum Zelltod führen kann (Locovei *et al.*, 2007). Aus diesem Grund ging es bei der zweiten Fragestellung dieser Arbeit um den Einfluss von Panx1 während eines früh-postnatalen hypoxisch-ischämischen Insultes. Dabei wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Deletion von Panx1 zu einer verminderten Ausprägung eines hypoxisch-ischämischen Insultes führt.

Auch hier wurde zunächst die Ausprägung der früh-postnatalen hypoxisch-ischämischen Gehirnläsion anhand von bekannten Markern für einen hypoxisch-ischämischen Insult (CC3 und CD68) sowie einer Score-Einteilung klassifiziert. Neben Panx1 ist auch Cx43 in Astrozyten für den Transport von ATP verantwortlich. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob es bei Panx1-transgenen Mäusen zu einer erhöhten Cx43 Expression sowie einer verringerten intrazellulären ATP-Konzentration kommt. Anhand von Parametern des ROS-Gehaltes und des ROS-Abbaus wurde analysiert, inwiefern Panx1 eine Rolle im ROS-Signalweg spielt. Mittels Calcium-Imaging wurde überprüft, ob die Deletion von Panx1 zu einer Veränderung der intrazellulären Calcium-Konzentration von Astrozyten führt.



### 3 Materialien

#### 3.1 Chemikalien

Chemikalie	Firma
10x Reaction Buffer (für PCR)	New England BioLabs, Frankfurt, Deutschland
10x Thermo Pol.Buffer (für PCR)	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
8% Sauerstoff in Stickstoff	Praxair, Völklingen, Deutschland
Aceton	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
B27 supplement (50x), serum free	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
DAPI-Fluoromount-G Eindeckmedium	Southern Biotech, Eching, Deutschland
Deoxyribonuklease I (DNase I)	Serva, Heidelberg, Deutschland
Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTP)-Mix 10mM	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O)	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
DNase I Stock Lösung	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; wenig Glukose)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; ohne Glukose)	Gibco®BRL, Karlsruhe, Deutschland
Eisessig (Essigsäure)	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Eosin G	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol	Zentrales Chemikalienlager
Ethylen glykol-bis(2-aminoethylether)-tetra-Essigsäure (EGTA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Evans Blue	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco®BRL, Karlsruhe, Deutschland

GelRed				Biotium, Kalifornien, USA
GeneRuler 1kb Plus DNA Längenstandard			Ladder,	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
GeneRuler 50bp DNA Längenstandard			Ladder,	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
Glukose				Merck, Darmstadt, Deutschland
Hämatoxilin (nach Ehrlich)				Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Heparin-Natrium 5.000 i.E./ml				B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Isofluran				Baxter, Unterschleißheim, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)				Grüssing, Filsum, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)				Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Kaliumhydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )				Zentrales Chemikalienlager
Ketavet (100mg/ml)				Pfizer, Berlin, Deutschland
Kresylviolett				Merck, Darmstadt, Deutschland
Lithium-Carbonat				Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Luxol-Fast-Blue (LFB)				ARCOS Organics, Nidderau, Deutschland
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )				Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Methylenblau				AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Microfil <sup>®</sup>				Flow Tech Inc., Carver, MA, USA
Moloney-Mausleukämievirus Transkriptase (M-MULV-RT)		Reverse		New England BioLabs, Frankfurt, Deutschland
Narcoren				Merial, Hallbergmoos, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)				VWR International GmbH, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl, 0,9%)				B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Natrium-Zitrat				Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH)				Zentrales Chemikalienlager
Natriumpyruvat-Lösung 100mM				Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Nichtessentielle Aminosäuren (NEAA) (100x)				PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland
Nicotinamid Nukleotid Transhydrogenase (Nnt) Primer für PCR				Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Nonyl Phenoxypolyethoxylethanol (NP40)				Calbiochem, Darmstadt, Deutschland

## Alternative

---

Normales Ziegen Serum (NGS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Oligo dT (Desoxythymidine) Primer	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
Paraformaldehyd	Zentrales Chemikalienlager
Penicillin-Streptomycin (100x)	Gibco®BRL, Karlsruhe, Deutschland
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
RiboLock Ribonuklease (RNase) Inhibitor	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
Ribonuklease (RNase) Inhibitor	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
Rinderserumalbumin (BSA)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland
Rinderserumalbumin-Lösung (10% in DPBS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
RNeasy Lipid Tissue Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Rompun (2%)	Bayer, Leverkusen, Deutschland
Roti-Histokitt Eindeckmedium	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Rotihistol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Roti-Plast (Paraffin)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Taq (Thermus aquaticus) Polymerase	New England BioLabs, Frankfurt, Deutschland
Tissue-Tek® O.C.T™ Compound	Sakura Finetek Europe, Staufen, Deutschland
Tris Base	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Triton x 100	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Truglue Gewebekleber	Trusetal Verbandstoffwerk GmbH, Schloß Holte-Stukenbrock, Deutschland
Trypsin EDTA (Ethyldiamintetra-essigsäure)	GE Healthcare, München, Deutschland
Trypsin EDTA (Ethyldiamintetra-essigsäure) (10x)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland
Tween 20	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

---

### 3.2 Antikörper

Antikörper	Firma
Kaninchen-anti-Cleaved Caspase-3 (Asp175)	Cell signaling, Cambridge, UK
Kaninchen-anti-Connexin 43	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Kaninchen-anti-Ki67	Chemicon International, Darmstadt, Deutschland
Maus-anti-Glial fibrillary acidic protein	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Ratte-anti-CD68	Abcam, Cambridge, UK
Ziege-anti-8-Hydroxy-deoxy-guanosine	Abcam, Cambridge, UK
Alexa-Fluor® 488 Ziege-anti-Maus	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Alexa-Fluor® 564 Ziege-anti-Kaninchen	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Alexa-Fluor® 564 Ziege-anti-Ratte	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Esel-anti Ziege IgG -TRITC	Dianova, Hamburg, Deutschland

### 3.3 Kits

Name	Firma
„GSH/GSSG Ratio Detection Assay” Kit	Abcam, Cambridge, UK
„Live/Dead cell staining” Kit II	Promokine, Heidelberg, Deutschland
„Luminescent ATP Detection Assay” Kit	Abcam, Cambridge, UK
„ROS/SO Assay” (Total ROS/Superoxide detection kit)	Enzo Life Sciences, Lörrach, Deutschland

### 3.4 Geräte und Materialien

Geräte	Firma
Bench: Hera Safe KS	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
DAKO Pen	DAKO, Hamburg, Deutschland
Fluoreszenz Platten Lesegerät, Ultra384	Tecan, Männedorf, Schweiz
Fluoreszenzmikroskop Observer Z.1	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
FluoVac	Harvard Instruments, Massachusetts, USA
Fusion	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Halogenlampe (HXP 120C)	Carl Zeiss, Jena, Deutschland

Hypoxiekammer	COY Lab Products, Michigan, USA
iMark Microplate Absorbance Reader	BioRad, München, Deutschland
Inkubator: HERAcell 150i	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
Isofluran Verdampfer	Harvard Instruments, Massachusetts, USA
Kamera (ORCA-D2)	Visitron Systems, Puchheim
Kauter	EFF, Olfen, Deutschland
Kryostat Leica CM1950	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Life Touch Thermal Cycler	Biozym, Hessisch-Oldendorf, Deutschland
Lupe: Stemi DV4 Spot	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Mikroskop: PrimoVert	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
Nanodrop ND-1.000	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
Netzgerät: Power Supply PeqPower 250	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Netzgerät: Power Supply PeqPower 300	Peqlab, Erlangen, Deutschland
pH-Meter Seven Easy	Mettler Toledo, Zwingenberg, Deutschland
Semikonfokale Einheit (X-Light)	Visitron Systems, Puchheim, Deutschland
Thermocycler Life Touch	Biozym, Hessisch Oldenburg, Deutschland
ULTRA-TURRAX	IKA-Labortechnik, Staufen, Deutschland
Universal Microplate Analyzer, Fusion-Alpha, Modell A153601	Packard BioScience, Connecticut, USA
Wärmedecke	Harvard Instruments, Massachusetts, USA
Wasserbad	Lauda, Lauda-Königshofen, Deutschland
Wasserbad	Memmert, Schwabach, Deutschland
Xenon-Gasentladungslampe (DG-4)	Sutter Instruments, Novato, Kalifornien, USA
Zentrifuge Biofuge Primo R	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
Zentrifuge Fresco 17	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
Zentrifuge: himac CT15RE	Hitachi, Düsseldorf, Deutschland
Zentrifuge: Megafuge 16R	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland

### 3.5 Verbrauchsmaterial

Material	Firma
Cryomold	Polysciences, Inc., Eppelheim, Deutschland
Deckgläser Ø 12mm	Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland
FluoVac-Filter	Harvard Instruments, Massachusetts, USA

Mikrotomklinge	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Objektträger	R. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
Streckblättchen	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland

### 3.6 Software

Software	Firma
AxioVision SE64 Rel. 4.8	Carl Zeiss, Jena, Deutschland
FusionCapt Advance	Vilber Lourmat Deutschland GmbH, Eberhardzell, Deutschland
GIMP 2	
GraphPad Prism 6	GraphPad Software, Inc., Kalifornien, USA
ImageJ	National Institutes of Health (NIH), Bethesda, Maryland, USA
VisiView	Visitron Systems GmbH, Puchheim, Deutschland

### 3.7 Lösungen

#### 10x Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)

Chemikalie	Menge
NaCl	100 g
KCl	2,5 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> • 2 H <sub>2</sub> O	7,12 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,5 g

in 800 ml d.d.H<sub>2</sub>O lösen, pH auf 7,2 einstellen, auf 1 l auffüllen

#### 0,2% Kälberserum (BSA)

Chemikalie	Menge
Rinderserumalbumin (BSA), 35% Lösung (34.4 g/dL)	0,57 ml
1x PBS	100 ml

**Protease Inhibitor Cocktail**

<b>Chemikalie</b>	<b>Menge</b>
„Complete“ Tabletten	2 Tabletten
d.d.H <sub>2</sub> O	2 ml

**Luxol-Fast-Blue (LFB) (0,2%)**

<b>Chemikalie</b>	<b>Menge</b>
LFB-Pulver	0,8 g
Ethanol	400 ml
Eisessig	2 ml

**Lithium-Carbonat-Lsg. (1%)**

<b>Chemikalie</b>	<b>Menge</b>
Li-Carbonat	0,1 g
d.d.H <sub>2</sub> O	200 ml

**Kresylviolett (0,1%)**

<b>Chemikalie</b>	<b>Menge</b>
Kresylviolett	0,1 g
d.d.H <sub>2</sub> O	100 ml
Essigsäure	1 ml

**10x Tris-Acetat-Elektrophoresepuffer (TAE)**

<b>Chemikalie</b>	<b>Menge</b>
0,5 M EDTA (pH 8,0)	10 ml
Tris Base	24,2 g
Eisessig	5,7 ml
d.d.H <sub>2</sub> O	ad 500 ml

**Astrozytenmedium**

<b>Chemikalie</b>	<b>Menge</b>
DMEM (wenig Glukose)	500 ml
Penicillin-Streptomycin (100x)	5 ml
NEAA (Nicht-essentielle Aminosäuren)	5 ml
Fetales Kälberserum (FCS)	50 ml

**Calcium-haltige Ringerlösung (pH 7,4)**

<b>Chemikalie</b>	<b>Konzentration</b>
NaCl	140 mM
KCl	4 mM
MgCl <sub>2</sub>	1 mM
CaCl <sub>2</sub>	1 mM
HEPES	10 mM
Glukose	10 mM
in d.d.H <sub>2</sub> O	

**Nominal Calcium-freie Ringerlösung (pH 7,4)**

<b>Chemikalie</b>	<b>Konzentration</b>
NaCl	140 mM
KCl	4 mM
MgCl <sub>2</sub>	1 mM
HEPES	10 mM
Glukose	10 mM
in d.d.H <sub>2</sub> O	



**Calcium-freie Ringerlösung (pH 7,4)**

<b>Chemikalie</b>	<b>Konzentration</b>
NaCl	140 mM
KCl	4 mM
MgCl <sub>2</sub>	1 mM
EGTA	5 mM
HEPES	10 mM
Glukose	10 mM
in d.d.H <sub>2</sub> O	

## 4 Methoden

### 4.1 Tiere

Die Versuche wurden an Mäusen durchgeführt. Die Haltung und Zucht der Mäuse erfolgte in der Versuchstierhaltung des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie (IKEC) der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes. Haltung und Zucht der Tiere wurden durch das Landesamt für Verbraucherschutz des Saarlandes genehmigt.

Die Haltung erfolgte unter standardisierten Bedingungen in einem vollklimatisierten Raum bei einer Umgebungstemperatur von  $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50%. Durch ein Lichtprogramm wurde für einen zwölf-stündigen Tag-Nacht-Rhythmus gesorgt. Standardfutter und Leitungswasser stand den Mäusen *ad libitum* zur Verfügung.

In der Arbeit wurden zwei Unterstämme von C57BL/6 Mäusen sowie eine transgene Mauslinie (Panx1) verwendet.

- C57BL/6N Mäuse (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland)
- C57BL/6J Mäuse (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland) besitzen eine Deletion von Exon 7-11 des *Nnt*-Gens, wodurch kein funktionelles Nnt-Protein gebildet werden kann (Mekada *et al.*, 2009). Somit bot der C57BL/6J Unterstamm ein Modell zur Untersuchung der Folgen einer endogenen Nnt-Deletion.
- Panx1-transgene Mäuse wurden auf einem C57BL/6N Hintergrund generiert. Die transgenen Tiere wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Hannah Monyer (Abt. Klinische Neurobiologie des Universitätsklinikums DKFZ/ A230 in Heidelberg) zur Verfügung gestellt. Bei den Panx1-transgenen Mäusen wurden ein *lacZ*-Gen sowie eine Phosphoglycerat Kinase-Neomycin Kasette in Exon 1 des *Panx1*-Gens inseriert (Anselmi *et al.*, 2008). Entsprechend bilden homozygote Panx1-transgene Tiere kein Panx1-Protein. Die Genotypisierung erfolgte mittels PCR (Bargiotas *et al.*, 2011).

Die Operation und die experimentellen Durchführungen wurden ebenfalls durch das Landesamt für Verbraucherschutz des Saarlandes genehmigt (TVV 56/2010).

Bei der Durchführung aller Versuche wurde die Anzahl der Tiere auf ein für die Auswertung der experimentellen Daten notwendiges Minimum beschränkt. Alle Versuche wurden unter Einhaltung der Vorschriften des deutschen Tierschutzgesetzes in der Fassung vom 18.05.2006 durchgeführt.

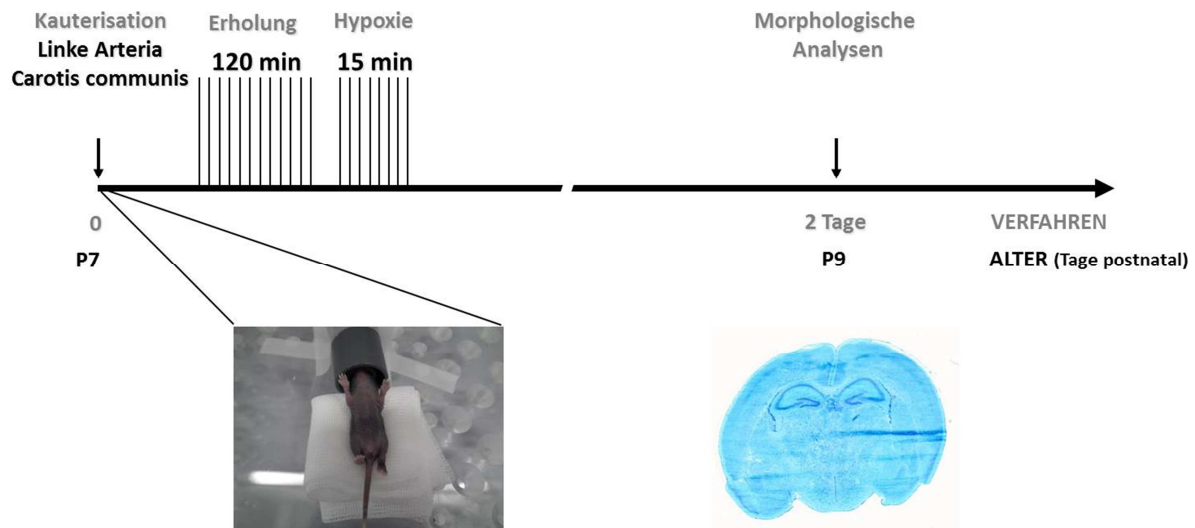
## 4.2 Das Modell der früh-postnatalen hypoxischen Ischämie

In Anlehnung an das Tiermodell der Ratte (Levine, 1960; Meier *et al.*, 2006) und Beschreibungen an der Maus (Sheldon *et al.*, 1998) wurde eine einseitige Durchtrennung der Arteria carotis communis an sieben Tage alten (P 7) Mäusen durchgeführt. Dazu wurden die Mäuse mit einer Isofluran-Sauerstoff-Inhalationsnarkose anästhesiert (5% Isofluran in Sauerstoff). Unter Schonung des Nervus vagus wurde die Arteria carotis communis sinistra freipräpariert und mittels eines elektrischen Kauters durchtrennt. Nach der Kontrolle auf Blutungen wurde der Hautschnitt mit Gewebekleber (Truglue; Trusetal Verbandstoffwerk GmbH, Schloß Holte-Stukenbrock, Deutschland) verschlossen. Die gesamte Operation, inklusive Einleitung der Narkose, dauerte pro Tier maximal zehn Minuten. Postoperativ wurde den Jungtieren eine zweistündige Erholungszeit beim Muttertier eingeräumt. Anschließend erfolgte eine systemische Hypoxie in einem befeuchteten hypoxischen Gasmisch (8% O<sub>2</sub>, 92% N<sub>2</sub>, Praxair, Düsseldorf) bei einem Durchfluss von 3 l/min. Die systemische Hypoxie erfolgte dann in einer Gasdurchflusskammer (Biospherix Animal Chamber NY, USA). Nach der Hypoxiephase wurden die Mäuse bis zur Organentnahme, im Alter von 9 Tagen (P9), wieder in die Haltungskäfige zu den Muttertieren gesetzt.

### 4.2.1 Etablierung der früh-postnatalen hypoxisch-ischämischen Gehirnläsion am Mausmodell

In dieser Arbeit wurde zunächst das Modell der früh-postnatalen hypoxisch-ischämischen Gehirnläsion in der Maus etabliert. Entscheidende Faktoren für das Überleben der Tiere sowie die Ausprägung der Läsion lagen insbesondere in den Parametern der systemischen Hypoxie und beinhalteten a) die Kammertemperatur während der Hypoxie b) den Sauerstoffgehalt und c) die Dauer der systemischen Hypoxie.

Die Körpertemperatur wurde konstant bei 36°C gehalten, da niedrigere Temperaturen zu einer Neuroprotektion (Truttmann, 2012) und höhere Temperaturen zu einer exzessiven Schädigung des neuralen Gewebes (Zhu *et al.*, 2006a) führen. Der Sauerstoffgehalt während der Hypoxie wurde – in Anlehnung an das Protokoll des Versuches in der Ratte (Vannucci *et al.*, 1988) – konstant bei 8% gehalten. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Hypoxie-Dauer von 15 min festgelegt.



**Abb. 5:** Schema des Versuchsablaufs zur früh-postnatalen hypoxisch-ischämischen Gehirnläsion.

#### 4.2.2 Experimentelles Protokoll

Vor der Durchführung der Operation wurden die Mäuse der C57BL/6 Unterstämme und des Panx1-transgenen Stammes beider Geschlechter im Alter von sieben Tagen in jeweils eine Sham- und in eine Läsions-Gruppe randomisiert eingeteilt.

- 1) Sham (C57BL/6N Unterstamm) (n = 11)
- 2) Läsion (C57BL/6N Unterstamm) (n = 45)
- 3) Sham (C57BL/6J Unterstamm) (n = 7)
- 4) Läsion (C57BL/6J Unterstamm) (n = 30)
- 5) Sham (Panx1<sup>tg/tg</sup>) (n = 3)
- 6) Läsion (Panx1<sup>tg/tg</sup>) (n = 13)

Bei den Tieren der Läsionsgruppen wurde eine Durchtrennung der Arteria carotis communis sinistra durchgeführt, wohingegen in den Sham-Gruppen eine Scheinoperation durchgeführt wurde, bei der die Arteria carotis communis sinistra ohne Durchtrennung aufgesucht wurde. Durch das Aufsuchen der Arteria carotis communis sinistra ohne Durchtrennung konnten mögliche Effekte, die durch die Operation selbst entstehen könnten, ausgeschlossen werden. Somit konnte der spezifische Effekt der Durchtrennung der Arteria carotis communis sinistra nachgewiesen werden. In beiden Gruppen wurde eine nachfolgende Hypoxie durchgeführt.

## **Gewebeentnahme**

Im Alter von neun Tagen, also an P9, folgte die Tötung der Tiere durch Dekapitation. Die Gehirne der Tiere wurden entnommen und für Untersuchungen mittels Immunfluoreszenz an Gefrierschnitten in OCT Tissue Tek Freezing Medium (Sakura Finetek Europe, Staufen, Deutschland), in der Gasphase von Flüssigstickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Für molekularbiologische Untersuchungen wurden die Hemisphären voneinander getrennt, in Flüssigstickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

## **Perfusion mit Microfil®**

Um zu untersuchen, ob das Nnt-Protein einen Einfluss auf die Stabilität der zerebralen Blutgefäße hat, wurden sieben Tiere des C57BL/6N und sechs Tiere des C57BL/6J Stammes im Alter von 9 Tagen (P9) mit Microfil® (Flow Tech Inc., Carver, MA, USA) perfundiert. Dabei handelt es sich um ein farbiges Silikongummi, mit dem die Tiere perfundiert wurden, um die Gefäßstruktur untersuchen zu können. Wenige Minuten nach der Injektion verhärtet die Microfil® – Lösung in den Gefäßen woraufhin das Gewebe entnommen und für die Analyse vorbereitet werden kann.

Für die Perfusion wurden die Tiere zunächst mit Ketavet-Rompun (Ketavet: 1:10; Rompun: 1:20 in NaCl 0,9%; 0,1 ml/10 g Körpergewicht (KG)) anästhesiert. Erst, wenn die Tiere in tiefer Narkose lagen, wurde der Brustkorb eröffnet, der linke Ventrikel mit einer Kanüle punktiert und mit einer NaCl (0,9%)-Heparin-Lösung (1:100) gespült, bis die Leber sich hell verfärbte. Danach folgte die Infusion mit Microfil®. Pro Maus wurden zunächst 1.000 µl Farbe, 1.000 µl Diluent und 200 µl Kleber gemischt. Nach 20 min wurden die Gehirne entnommen und in Ethanol fixiert (24h 50%, 24h 80%, 24h 90%, 24h 100%). Zur Analyse wurden Bilder der Gehirnbasis aufgenommen und die Blasen-ähnlichen Formationen pro Quadrant gezählt.

## **Perfusion mit Evans Blue**

Zur Analyse der Barrierefunktion der zerebralen Gefäße wurden Mäuse des C57BL/6N und des C57BL/6J Stammes mit Evans Blue perfundiert. Dazu wurden die Mäuse zunächst mit Ketavet-Rompun (Ketavet: 1:10; Rompun: 1:20 in NaCl 0,9%, 0,1 ml/10 g KG) anästhesiert. Nachdem die Tiere in tiefer Narkose lagen, wurde der Brustkorb eröffnet, und es wurden 20 µl Evans Blue (2% in 0,9% NaCl) in den linken Ventrikel injiziert. Fünf Minuten später wurden die Tiere dekapiert und die Gehirne für die weiteren Analysen entnommen. Die Gehirne wurden in OCT Tissue Tek Freezing Medium (Sakura Finetek Europe, Staufen, Deutschland), in der Gasphase von Flüssigstickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Von

diesen Gehirnen wurden Gefrierschnitte angefertigt, an welchen das injizierte Evans Blue mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert werden konnte.

### **4.3 Histochemische Methoden**

#### **4.3.1 Anfertigung von Gefrierschnitten**

Von den in OCT Tissue Tek Freezing Medium (Sakura Finetek Europe) eingebetteten Gehirnen wurden Gefrierschnitte am Kryostaten Leica CM1950 (Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland) bei  $-20^{\circ}\text{C}$  mit einer Dicke von  $10\ \mu\text{m}$  angefertigt. Bei 26 Tieren des C57BL/6N Unterstammes, 19 Tieren des C57BL/6J Unterstammes und 12 Tieren der Panx1-transgenen Tiere wurden die Schnitte der Region aufgenommen, die im adulten Tier der Bregmaregion von  $-1.22\ \text{mm}$  bis  $-2.30\ \text{mm}$  entspricht. Zur Orientierung diente hierbei der Gehirnatlas „The Mouse Brain“ von Keith B.J. Franklin und George Paxinos von 2008 (Franklin & Paxinos, 2008). Die angefertigten Schnitte wurden auf Superfrost Plus Objektträger aufgenommen und für 30 min auf einer Wärmeplatte bei  $45^{\circ}\text{C}$  und danach über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet, wonach eine Lagerung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  erfolgte. Für histologische Färbungen sowie Färbungen mittels Immunfluoreszenz, wurden die Schnitte sowohl nach der Trocknung bei Raumtemperatur als auch aus der Lagerung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  verwendet.

#### **4.3.2 Histologie**

##### ***Hämatoxilin-Eosin (HE)***

Die Hämatoxilin-Eosin-Färbung nach Ehrlich wurde zur allgemeinen histologischen Darstellung des Gewebes durchgeführt. Bei dieser Färbung werden die Zellkerne mittels des Farbstoffes Hämatoxilin blau angefärbt, wohingegen das Zytoplasma durch Eosin rot dargestellt wurde. Zur Durchführung der HE-Färbung nach Ehrlich wurden die Gefrierschnitte zunächst für 5 min in  $-20^{\circ}\text{C}$  kaltem Ethanol (100%) fixiert. Nach der Fixierung folgte ein zweiminütiger Waschschriff mit d.d.H<sub>2</sub>O, welchem eine Inkubation in Hämatoxilin (nach Ehrlich) für 5 min angeschlossen wurde. Um überschüssiges Hämatoxilin abzuspülen, folgte ein kurzer Waschschriff in d.d.H<sub>2</sub>O. Zur Bildung des Farbumschlages des Hämatoxilins wurden die Schnitte für zehn Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut. Bevor und nachdem das Zytoplasma mittels Eosin für zehn sec angefärbt wurde, folgte jeweils ein kurzer Waschschriff mit d.d.H<sub>2</sub>O. Um den Schnitten vor dem Eindecken mit dem wasserfreien Roti Histokit Eindeckmedium (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) das

Wasser zu entziehen, wurden sie für 3 min in 80% Ethanol, 6 min in 90% Ethanol, 2x 3 min in 100% Ethanol und für 3x 3 min in Rotihistol (Carl Roth) inkubiert.

### ***Luxol-Fast-Blue*** (LFB)

Zur Darstellung von Myelin wurde die Luxol-Fast-Blue Färbung angewandt. Aufgrund dieser Färbung erscheint das Myelin türkis und die Neurone in violett.

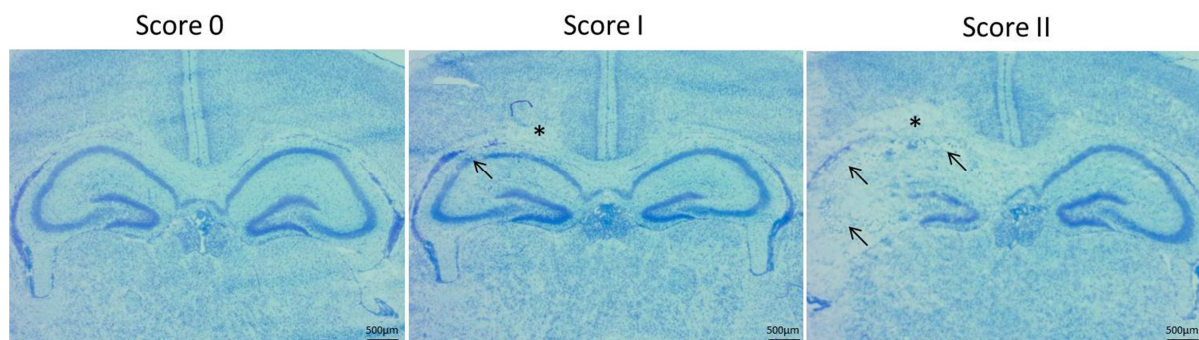
Zu Beginn der LFB-Färbung wurden die Gefrierschnitte für fünf Minuten in 100% Ethanol bei  $-20^{\circ}\text{C}$  fixiert. Danach wurden die Schnitte für 16 Stunden in einer 0,2% LFB-Lösung bei  $56^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Schnitte zunächst auf Raumtemperatur abgekühlt, wonach sie für zwei Minuten in 96% Ethanol und anschließend für zwei Minuten in 70% Ethanol inkubiert wurden. Einem Waschschrift für zwei Minuten in d.d.H<sub>2</sub>O, folgte die Differenzierung der Schnitte in einer 0,05% Litiumcarbonat-Lösung für 45 sec. Zum Abschluss wurden die Schnitte kurz in 70% Ethanol gespült, woraufhin die Zellkerne mit Kresylviolett (0,1%) für 15 min angefärbt wurden. Um die überschüssige Färbelösung abzuspielen, wurden die Schnitte für 1 min in d.d.H<sub>2</sub>O gewaschen. Der Dehydrierung der Schnitte (1 min in 96% Ethanol, 1 min in 96% Ethanol + Essigsäure, 1 min 96% Ethanol, 1 min 100% Ethanol und 3x 2 min Rotihistol (Carl Roth)) folgte das Eindecken mit wasserfreien Roti Histokit Eindeckmedium (Carl Roth).

### **4.3.3 Score Einteilung**

An HE- bzw. LFB-gefärbten Schnitten der Gehirne sieben Tage alter Mäuse waren im Bereich der Bregmaregion von -1.22 mm bis -2.30 mm der Hippocampus und Gyrus dentatus, das Corpus callosum und der angrenzende Kortex zu erkennen. In hypoxisch-ischämischen Gehirnen waren im Bereich dieser Strukturen Läsionen in den linken Hemisphären erkennbar (Abb. 6). Da die Ausprägung der Läsion nach hypoxischer Ischämie starke Unterschiede aufwies, wurden die Tiere zur weiteren Analyse in sogenannte Score-Gruppen eingeteilt, in denen jeweils Tiere mit vergleichbar stark ausgebildeten Schäden eingruppiert wurden. Die Einteilung basierte auf den Ergebnissen der LFB-Färbung, die Kriterien der Einteilung wurden in Tab. 1 dargestellt.

Tab. 1: Kriterien zur Einteilung der Tiere in unterschiedliche Scores:

Score	Merkmal
0	- Keine Veränderung zur Kontrolle zu erkennen
I	- Deutliches Fehlen von Myelin im Hippocampusbereich - Hippocampus: kleine Areale, die keine neuronalen Zellen mehr enthalten
II	- Deutliches Fehlen von Myelin in der gesamten Hemisphäre - Hippocampus: stark ausgeprägte Areale in denen neuronale Zellen fehlen (Hippocampusformation kaum erkennbar)



**Abb. 6: Score-Einteilung bezüglich Schäden im Hippocampusbereich.** LFB-Färbung des Hippocampus-Bereichs der hypoxisch-ischämischen Tiere (rechte Seite: intakte Hemisphäre; linke Seite: läionierte Hemisphäre). \* Demyelinisierung, → fehlende Neurone in der Hippocampusformation.

#### 4.3.4 Flächenmessung

Anhand der angefertigten LFB-Färbung wurde neben der Score-Einteilung auch die Fläche der linken und der rechten Hemisphären ermittelt. Für diese Auswertung wurde zunächst eine Übersichtsaufnahme der Hemisphären aufgenommen. Mit dem Programm Image J (National Institutes of Health (NIH), Bethesda, Maryland, USA) wurden mittels des „Freehand“-Tools beide Hemisphären einzeln umrandet und die umfahrenden Flächen gemessen.



### 4.3.5 Relative Läsionsgröße

Zur Ermittlung der relativen Läsionsgröße wurde, wie bei der Flächenmessung beschrieben, zunächst die Fläche der linken Hemisphäre gemessen. Im nächsten Schritt wurde die geschädigte Fläche innerhalb der linken Hemisphäre gemessen. Als geschädigte Fläche wurde hierbei der Bereich definiert, welcher in der LFB-Färbung keine Myelinfärbung zeigt. Zur Ermittlung der relativen Größe der Läsionsareale in Prozent wurde folgende Formel angewandt:

$$\text{relative Schadensgröße (\%)} = \frac{100\%}{\text{Fläche (linke Hemisphäre)}} * \text{Fläche (Schaden)}$$

## 4.4 Immunhistologie

### 4.4.1 Gefrierschnitte

Die angefertigten Schnitte wurden für die indirekte Immunfluoreszenz zunächst für zehn Minuten in 100% Aceton bei -20°C fixiert. Danach folgte ein dreimaliger Waschschrift mit 1x PBS für jeweils zehn Minuten. Um eine unspezifische Bindung des Primärantikörpers zu verhindern, wurden die Schnitte für eine Stunde in 10% Normal Goat Serum (NGS) mit 0.1% Triton in 1x PBS inkubiert. Im Anschluss folgte die Inkubation mit Primärantikörpern (Tab. 2), die in der Blockierungslösung verdünnt wurden, für 16 Stunden und bei 4°C.

Nach 16 Stunden folgte, nach dreimaligem Waschen der Schnitte in 1x PBS für je zehn Minuten, ein 30-minütiger Blockierungsschritt mit 0.2% Rinderalbumin (BSA) in 1x PBS um ein unspezifisches Binden des Sekundärantikörpers an Proteine zu verhindern. Im nächsten Schritt wurden die Schnitte für 60 min im Dunkeln und bei Raumtemperatur mit dem jeweiligen Sekundärantikörper, welcher in der 0.2% BSA-Blockierungslösung verdünnt wurde (Tab. 2), inkubiert. Abschließend wurden die Schnitte zwei Mal für zehn Minuten in 1x PBS gewaschen und mit DAPI-Fluoromount-G (Southern Biotech, Eching, Deutschland) Eindeckmedium eingedeckt, wodurch eine Kernfärbung mittels des Farbstoffs DAPI stattfand und die Schnitte versiegelt wurden. Nachdem die Schnitte getrocknet waren, wurde mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskopes Observer Z.1 (Carl Zeiss, Jena, Deutschland), ausgestattet mit einer Digitalkamera AxioCam MRm (Carl Zeiss), und mit dem Programm AxioVision 4.8 (Carl Zeiss) Fotografien der Gewebeschnitte angefertigt. Das Fluoreszenzmikroskop war dabei mit einer Halogenlampe (HXP 120C, Carl Zeiss) sowie den Filtersets 43HE für rot, 38HE für grün und 49 für blau (Carls Zeiss) ausgestattet. Bei den verwendeten Objektiven

handelte es sich um das EC Plan-Neofluar 10x (Carl Zeiss), Plan-Apochromat 20x (Carl Zeiss) und das Plan-APO 40x/1,3 Oil (Carl Zeiss).

Tab. 2: Antikörper, die für die Immunfluoreszenz verwendet wurden:

<b>Primärantikörper</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Quelle</b>	<b>Verdünnung</b>
Cleaved Caspase-3 (CC3)	Cell Signaling	polyklonal Kaninchen- anti-Human	1:100
CD68	Abcam	monoklonal Ratte-anti- Maus	1:1.000
8-Hydroxyguanosine (8-OHdG)	Abcam	polyklonal Ziege	1:300
Ki67	Chemicon International	polyklonal Kaninchen- anti-Human	1:300
Connexin 43 (Cx43)	Invitrogen	polyklonal Kaninchen- anti-Ratte	1:800

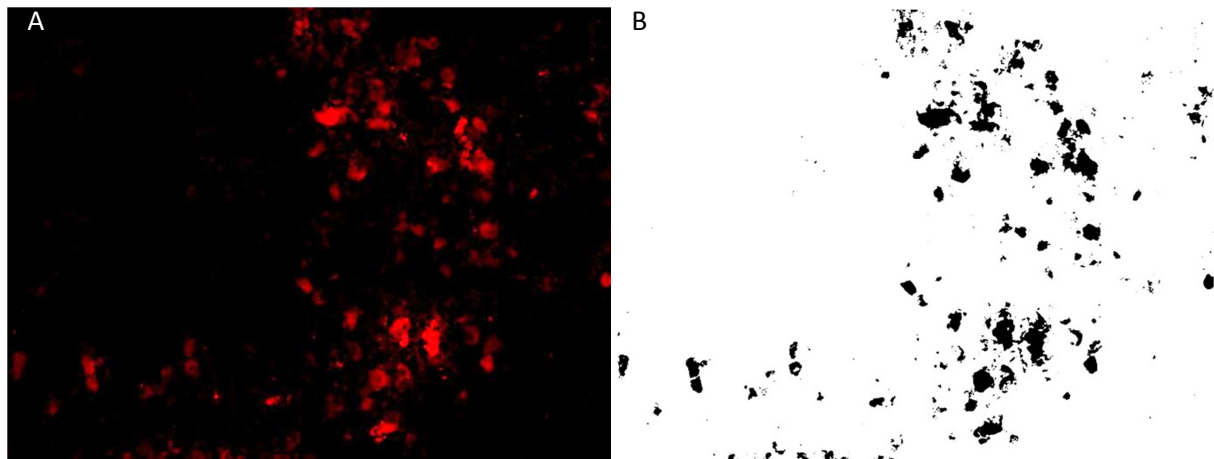
<b>Sekundärantikörper</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Quelle</b>	<b>Verdünnung</b>
Alexa-Fluor® 564	Invitrogen	Ziege-anti- Kaninchen	1:3.000
Alexa-Fluor® 564	Invitrogen	Ziege-anti- Ratte	1:3.000
IgG-TRITC	Dianova	Esel-anti- Ziege	1:30

#### 4.4.2 Quantitative Bildanalyse der Immunfluoreszenz

Das Areal der geschädigten Gehirnstrukturen wurde mit Hilfe der ImageJ Software quantifiziert. Dazu wurden mittels Fluoreszenzmikroskopie (Observer Z.1; Carl Zeiss) die CA2- und CA3-Region des Hippocampus der ipsi- und kontralateralen Hemisphäre der Tiere fotografiert. Für die Auswertung wurden diese zwei Bereiche gewählt, da sie die größte Schädigung zeigten.

Die Auswertung der immunhistologischen Färbung mit CD68 und Cx43 erfolgte mittels einer Flächenmessung über das Programm ImageJ (NIH). Dazu wurde das farbige Bild mittels ImageJ zunächst in ein 8bit-Bild umgewandelt. Im nächsten Schritt wurde an einem Bild mit definiertem Signal ein fester Schwellenwert festgelegt, der dann bei allen Bildern angewandt wurde. Durch diesen Schwellenwert wurden alle Fluoreszenz-markierten Stellen schwarz dargestellt, wohingegen sich die nicht-markierten Stellen des Bildes weiß darstellten (Abb. 7). Um eine Quantifizierung der Bilddaten zu erhalten, erfolgte eine Berechnung des prozentualen Anteils der markierten Areale (schwarz) in Bezug auf die gesamte Bildfläche.

Die Analyse der Cleaved Caspase-3 (CC3) sowie Ki67 Immunfärbung erfolgte durch das Auszählen der CC3-immunpositiven Zellen pro Foto. Jedes Bild besaß eine Gesamtfläche von  $147.050 \mu\text{m}^2$ .



**Abb. 7: Originalbild und bearbeitetes Bild mittels ImageJ für die Auswertung.** A) Am Mikroskop erstelltes Bild der CD68-Immunfärbung (Immunfluoreszenz in rot). In B) wurde das Bild in ImageJ zunächst in ein 8bit-Bild umgewandelt und dann ein Schwellenwert festgelegt.

## 4.5 Zellkultur

### 4.5.1 Präparation und Kultivierung primärer Astrozytenkulturen

Primäre Astrozytenkulturen wurden von neugeborenen Mäusen im Alter von 4 Tagen (P4) angelegt. Verwendet wurden C57BL/6 Mäuse des N- und J-Unterstammes sowie Panx1-transgene Mäusen.

Für die Präparation der primären Astrozyten wurden die Mäuse dekapitiert und die entnommenen Gehirne in eiskaltes PBS überführt. Nach der Entfernung der Hirnhäute wurden die Gehirne in eine Trypsin/PBS-Lösung (10 ml PBS + 450  $\mu\text{l}$  Trypsin (10x)) überführt und für 30 min im Wasserbad bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (Biofuge Primo R; Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland) von 500 x g für 7 min wurde der

Überstand vorsichtig abgenommen und 1 ml DNase I (0,5 mg/ml in 1x PBS) (Malgrange *et al.*, 1998) hinzugegeben, welche durch Resuspension des Pellets verteilt wurde. Nach einer Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur folgte ein zweimaliger Waschschrift, bei dem zunächst jeweils mit Astrozytenmedium auf 20 ml aufgefüllt wurde und eine Zentrifugation von 300 x g für 5 min folgte. Nach jedem Zentrifugationsschritt erfolgte die Entnahme des Überstandes unter Schonung des Zellpellets. Im letzten Schritt wurde das Pellet mit je 1 ml Astrozytenmedium pro Gehirn resuspendiert und diese Gewebe-Lösung durch ein Nylon-Netz (70 µm Porengröße) gefiltert. Die gefilterte Zellsuspension wurde mit einer Pipette in eine Zellkulturflasche überführt, mit Astrozytenmedium aufgefüllt und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert.

Nach 24 Stunden hatten sich die Astrozyten am Boden der Zellkulturflasche abgesetzt. Somit konnte das alte Medium komplett entfernt und nach zweimaligem Spülen der Kulturflasche mit Medium sowie starkem Abklopfen der Mikroglia die Kulturflasche wieder mit frischem Astrozytenmedium gefüllt werden. Danach folgte ein Wachstum der Zellen im Inkubator bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für zwei Wochen. Innerhalb dieses Zeitraumes wurden die Zellen drei bis vier Mal passagiert. Dazu wurde die Kulturflasche jeweils vor dem Entfernen des Mediums gut geklopft, um restliche Mikroglia zu entfernen. Nach der Entfernung des Mediums wurden die Astrozyten mittels 1,5 ml 1x Trypsin/EDTA (GE Healthcare) in 1x PBS von der Zellkulturflasche gelöst und in neue Zellkulturflaschen aufgeteilt. Durch dieses Vorgehen konnte eine Reinheit der Astrozytenkultur von 95% erreicht werden. Die Reinheit der Kultur wurde dabei durch eine immunzytochemische Färbung mittels saurem Gliafaserprotein (GFAP; Astrozyten) und CD68 (Mikroglia) überprüft.

#### **4.5.2 Oxygen-Glucose-Deprivation**

Nach zwei Wochen wurde das Medium entfernt und die Astrozyten wurden mit 1,5 ml 1x Trypsin/EDTA (GE Healthcare) in 1x PBS von der Zellkulturflasche gelöst. Die Wirkung von Trypsin konnte durch Zugabe von Astrozytenmedium, welches fetales Kälberserum (FCS) enthält, gestoppt werden. Danach wurden die Zellen gezählt und je 30.000 Zellen auf frisch beschichteten Poly-L-Lysin (PLL; Sigma, München, Deutschland) Deckgläsern ausgesät. Für die Beschichtung der Deckgläser wurde das PLL 1:10 in d.d.H<sub>2</sub>O verdünnt. Die Deckgläser wurden zunächst mit 100% Ethanol gewaschen. Nach Abnahme des Ethanols wurde die verdünnte PLL-Lösung auf die Deckgläser gegeben. Diese wurden dann für 5 min unter leichtem Schwenken und bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurde das PLL entfernt und

die Deckgläser konnten mit d.d.H<sub>2</sub>O gewaschen werden, um überschüssiges PLL zu entfernen. Danach wurden die Deckgläser zum Trocknen auf Filterpapier transferiert.

48 Stunden später erfolgte die Durchführung der OGD-Versuchsreihe. Die Oxygen-Glucose-Deprivation (OGD; Sauerstoff-Glukose-Entzug) stellt ein *in vitro* Modell der hypoxischen Ischämie dar. Bei diesem Modell wurde den Zellen für einen bestimmten Zeitraum sowohl Glukose als auch Sauerstoff entzogen.

Tab. 3: Gruppeneinteilung und Bedingungen der OGD

<b>Gruppe</b>	<b>Medium während Hypoxie</b>	<b>Dauer Hypoxie</b>
K+	DMEM mit Glukose (1.000 mg/ml)	0
K-	DMEM ohne Glukose	0
2h	DMEM ohne Glukose	2h
4h	DMEM ohne Glukose	4h
6h	DMEM ohne Glukose	6h
8h	DMEM ohne Glukose	8h
ÜN	DMEM ohne Glukose	16h

Die Auswahl der Zeitpunkte für die OGD erfolgte auf Basis der bisherigen Literatur. Huang *et al.* (Huang *et al.*, 2013) zeigten dabei, dass es bei den Astrozyten bereits nach 2h OGD zu ersten Zellschäden kommt. In anderen Arbeiten wurde dagegen beschrieben, dass Zellschäden bei einer OGD-Dauer von 4-8h auftreten (Chen *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2012; Neuhaus *et al.*, 2014). Des Weiteren wurde eine OGD über Nacht (ÜN) gewählt, da spätestens nach einer OGD über Nacht Zellschäden auftreten sollten.

### **OGD-Versuchsreihe**

Bei allen Gruppen wurde zu Beginn der OGD Versuchsreihe das Medium komplett entfernt. Danach folgte bei „K+“ ein zweimaliges Spülen mit Astrozytenmedium, wonach 500 µl frisches Astrozytenmedium dazu gegeben wurden. Bei „K-“, „2h“, „4h“, „6h“, „8h“ und „ÜN“ hingegen wurde je zweimal mit DMEM ohne Glukose gespült und 500 µl frisches DMEM ohne Glukose dazu gegeben.

Danach wurden die Gruppen „K+“ und „K-“ über Nacht bei 37°C; 5% CO<sub>2</sub>; 20% O<sub>2</sub> inkubiert. Die Inkubation der restlichen Gruppen erfolgte für die jeweils in Tab. 3 angegebene Dauer in einer Hypoxiekammer (COY Lab Products, Michigan, USA) bei 37°C; 5% CO<sub>2</sub> und 1% O<sub>2</sub>. Nach Ablauf der jeweiligen Inkubationszeit wurde das Medium verworfen, 500 µl frisches Astrozytenmedium auf die Zellen gegeben und die Zellen wurden für 2h unter „Normoxie“-Bedingungen (37°C; 5% CO<sub>2</sub>; 20% O<sub>2</sub>) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen weiter analysiert.

#### 4.5.2.1 Life/Dead-Assay

Zur Bestimmung der Überlebensrate nach OGD wurde ein Life/Dead Assay angewandt. Für die Durchführung des Assays wurde das Live/Dead Cell Staining Kit II von PromoKine (Heidelberg, Deutschland) verwendet und nach Angaben des Herstellers gearbeitet. Dazu wurde die Färbelösung zu Beginn des Assays immer frisch angesetzt. Die Lösung setzte sich zusammen aus 2 µM Calcein-AM (grün), welches die lebenden Zellen markiert, und 4 µM Ethidium-Homodimer III (rot) zur Markierung der toten Zellen, in 1x PBS. Bei der Durchführung des Assays wurde zunächst das Medium der Zellen entnommen, woraufhin ein Waschschritt mit 1x PBS erfolgte. Nun wurde die Assay-Lösung auf die Zellen gegeben und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte die Entnahme der Deckgläser aus der Lösung, welche zum Mikroskopieren auf Objektträger gelegt und direkt mit Klarlack versiegelt wurden.

Je Deckglas wurden sechs Bilder am Fluoreszenzmikroskop (Observer Z.1; Carl Zeiss) aufgenommen, welche danach mit Hilfe von Image J Software (NIH) ausgewertet wurden. Zunächst wurden die Calcein-AM positiven Zellen (grün) gezählt, welche die lebenden Zellen darstellten; dann die Ethidium-Homodimer III -positiven Zellen (rot) zur Quantifizierung der toten Zellen. Als Ergebnis wurde dann der prozentuale Anteil der lebenden Zellen angegeben.

$$\text{Lebende Zellen (\%)} = \frac{\text{Anzahl lebender Zellen}}{\text{Gesamtzellzahl}} \times 100$$

#### 4.5.2.2 ROS/SO Assay (Total ROS/Superoxide detection kit)

Der ROS/SO Assay (Enzo Life Sciences, Lörrach, Deutschland) wurde angewandt, um die Menge der in den Zellen enthaltenen Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) bzw. des

Superoxides (SO) zu detektieren. Für die Untersuchungen des ROS/SO Assays wurden die OGD-Zeitpunkte von 2h und ÜN weggelassen. Aufgrund des durchgeführten Life/Dead-Assays waren erste Veränderungen des ROS-Signalweges erst ab 4h OGD zu erwarten (siehe Ergebnisse). Bei der OGD ÜN hingegen war aufgrund des stark erhöhten Zelltods keine Regulierung in den Zellen mehr zu erwarten. Die im Kit enthaltenen Lösungen wurden laut Protokoll angesetzt. Vor jeder Benutzung wurde die ROS/SO-Lösung frisch angesetzt. Diese setzte sich aus 1  $\mu$ M ROS-Reagenz und 1  $\mu$ M Superoxid-Reagenz in Astrozytenmedium zusammen. Bei der Negativkontrolle wurde zunächst nach 1,5 h Normoxie 5 mM N-acetyl-L-cysteine (NAC) auf die Zellen gegeben, welches als Antioxidans wirkt und somit die Bildung von ROS verringert. Nach insgesamt 2 h Normoxie erfolgte ein Entfernen des Mediums und eine Zugabe der ROS/SO-Lösung, welche für 30 min bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert wurde. Danach wurde die ROS/SO-Lösung entfernt. Die Deckgläser wurden vor dem Übertragen auf die Objektträger einmal mit dem mitgelieferten Waschpuffer gespült. Vor dem Mikroskopieren erfolgte zunächst eine Versiegelung der Deckgläser mit Klarlack.

Je Deckglas wurden 6 Bilder am Fluoreszenzmikroskop (Observer Z.1; Carl Zeiss) aufgenommen, welche danach mit Hilfe von ImageJ Software (NIH) ausgewertet wurden. Nun wurde das jeweilige farbige Bild (roter Filter = SO; grüner Filter = ROS) in ein 8bit-Bild umgewandelt. Im nächsten Schritt erfolgte die Festlegung eines festen Schwellenwertes anhand der Negativkontrolle, welcher dann über alle Bilder gelegt wurde (siehe 4.4.2). Durch diesen Schwellenwert, wurden alle Fluoreszenz-markierten Stellen in schwarz dargestellt, wohingegen die nicht-markierten Stellen des Bildes sich weiß darstellten. Um eine Quantifizierung zu erhalten, erfolgte eine Berechnung des prozentualen Anteils der markierten Areale (schwarz) in Bezug auf die gesamte Bildfläche.

#### **4.5.2.3 GSH/GSSG-Assay**

Ein wichtiger Bestandteil beim Abbau der ROS spielt Glutathion. Es existiert dabei in einer reduzierten (GSH) und in einer oxidierten Form (GSSG). Beim Abbau von ROS bildet sich zwischen zwei GSH-Molekülen eine Disulfidbrücke, wodurch GSSG entsteht. Bei zunehmendem oxidativen Stress akkumuliert GSSG wodurch sich das GSH/GSSG-Verhältnis verringert. Um das Verhältnis von GSH zu GSSG in der Zelle zu ermitteln, wurde das GSH/GSSG Ratio Detection Assay Kit von Abcam (Cambridge, UK) verwendet. Alle Lösungen wurden nach Angaben des Herstellers vorbereitet und auch die Messungen wurden diesen Angaben durchgeführt.

Für diese Messung wurden die Astrozyten aus C57BL/6N Unterstamm, C57BL/6J Unterstamm und Panx1-transgenen Tieren in 96-well Platten (25.000 Zellen/well) ausgesät und über Nacht inkubiert (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 20% O<sub>2</sub>). Danach folgte die OGD für die Kontrolle K<sup>+</sup> und den Zeitpunkt OGD 6h (Tab. 3) mit anschließender Messung. Der GSH/GSSG-Assay wurde für diesen Zeitpunkt durchgeführt, da die vorhergehenden Assays bei 6h OGD ersichtliche Veränderungen auf zellulärer Basis zeigten. Für die Messung wurde zunächst eine Verdünnungsreihe des GSH Standards und des GSSG Standards hergestellt:

Tab. 4: Verdünnungsreihe der GSH- und des GSSG-Standard Lösung

<b>200µl 10µM GSH Standard Lösung</b>	<b>200µl 10µM GSSG Standard Lösung</b>
10 µM	5 µM
5 µM	2,5 µM
2,5 µM	1,25 µM
1,25 µM	0,625 µM
0,625 µM	0,3125 µM
0,3125 µM	0,1563 µM
0,1563 µM	0,0781 µM
0 µM	0 µM

Die Verdünnungsreihe der Standardlösungen für reduziertes Glutathion (GSH) und oxidiertes Glutathion (GSSG) wurde in Mikromolar (µM) angegeben.

Die Zellen wurden mit 100 µl 0,5% NP40 (in 1x PBS, pH 6.0; Calbiochem) für 15 min bei RT lysiert. Danach wurden je 50 µl des Zelllysates zur Messung von GSH und je 50 µl des Zelllysates zur Messung von GSSG verwendet. Zur Messung von GSH wurden 50 µl des GSH Assay-Ansatzes zur Standardreihe von GSH und zu den Proben für GSH dazu gegeben. Der GSH Assay-Ansatz setzte sich zusammen aus 10 ml Assay Puffer und 100 µl 100x Thiol Grüne Stock Lösung (beides im Kit enthalten). Um GSSG zu messen, wurde zunächst ein GSSG Assay-Ansatz gemischt. Dazu wurden 5 ml des GSH Assay-Ansatzes zur GSSG Messsonde gegeben (im Kit enthalten). Danach wurden 50 µl des GSSG Assay Ansatzes zur Standardreihe von GSSG und zu den Proben für GSSG gegeben, wonach die Zellen für 30 min bei RT, ohne Einfall von Licht inkubiert wurden. Die Messung erfolgte am Fluoreszenz Plattenlesegerät, Ultra384 (Tecan, Männedorf, Schweiz) mit einem Filter der Anregungs- und Emissionswerte Ex/Em = 490nm/520nm.



#### 4.5.2.4 ATP-Assay

ATP ist ein wichtiger Faktor bei der Generierung der ROS. Überschüssige Elektronen, die bei der Produktion von ATP entstehen können, führen vor allem zur Bildung von ROS (Turrens, 2003; Murphy, 2009). Zur Messung des ATP-Gehaltes der Zellen wurde das Luminescent ATP Detection Assay Kit von Abcam verwendet. Die Lösungen wurden nach Angaben des Herstellers vorbereitet und die Messung wurde nach diesen Angaben durchgeführt.

Für die Messung von ATP in den Zellen wurden die Astrozyten aus dem C57BL/6N Unterstamm, dem C57BL/6J Unterstamm und aus Panx1-transgenen Tieren in 96-well Platten (25.000 Zellen/well) ausgesät und über Nacht inkubiert (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 20% O<sub>2</sub>). Danach folgte die OGD für die Zeitpunkte K+, K-, 4h, 6h und 8h mit anschließender Messung von ATP. Dazu wurden je well 100 µl Medium und 50 µl Tensid hinzugefügt. Um die Zellen zu lysieren und das ATP zu stabilisieren wurden die Zellen nun 5 min bei 700 rpm geschüttelt. Nach diesem Schritt erfolgte eine Zugabe von 50 µl Substratlösung (im Kit enthalten), wonach die Zellen wieder für 5 min bei 700 rpm geschüttelt wurden. Nun wurden die Zellen für zehn Minuten unter Vermeidung von Lichteinstrahlung bei RT inkubiert. Danach fand die Detektion mittels des Detektionsgerätes Universal Microplate Analyzer, Fusion-Alpha (Packard BioScience, Connecticut, USA) statt.

#### 4.6 Immunzytochemie

Die Zellen auf den Deckgläsern wurden für die indirekte Immunfluoreszenz zunächst für 20 min in 100% Ethanol bei -20°C fixiert. Danach folgte ein dreimaliger Waschschrift mit 1x PBS. Um ein unspezifisches Binden des Primärantikörpers an Proteine zu verhindern, wurden die Zellen für eine Stunde mit 10% normalem Ziegen Serum (NGS) und 0.1% Triton in 1x PBS blockiert. Im nächsten Schritt erfolgte eine Inkubation der Deckgläser mit dem jeweiligen Primärantikörper (verdünnt in 10% NGS) für 2h bei Raumtemperatur (Tab. 5).

Nach dreimaligem Waschen der Zellen in 1x PBS folgte ein 30-minütiger Blockierungsschritt mit 0,2% bovinem Serumalbumin (BSA) in PBS, um ein unspezifisches Binden des Sekundärantikörpers an Proteine zu verhindern. Im nächsten Schritt wurden die Zellen für 60 min im Dunkeln und bei Raumtemperatur mit dem jeweiligen Sekundärantikörper inkubiert, welcher in der 0,2% BSA in PBS-Blockierungslösung verdünnt wurde (Tab. 5). Abschließend wurden die Zellen dreimal in 1x PBS gewaschen und mit DAPI-Fluoromount-G (Southern Biotech) Eindeckmedium eingedeckt. Ein Tropfen DAPI-Fluoromount-G wurde dazu auf einen Objektträger gegeben und das Deckglas mit der Seite, auf der die Zellen gewachsen waren, auf diesen Tropfen gelegt.

Nachdem die Deckgläser getrocknet waren, wurden sie zunächst mit Klarlack versiegelt. Daraufhin wurden mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops Observer Z.1 (Carl Zeiss) und mit dem Programm AxioVision 4.8 (Carl Zeiss) Bilder der Zellen angefertigt (Ausstattung siehe 4.4.1)

Tab. 5: Antikörper, die für die Immunzytochemie benutzt wurden

<b>Primärantikörper</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Quelle</b>	<b>Verdünnung</b>
GFAP	Millipore	Monoklonal Maus-anti-Schwein	1:100
CD68	Abcam	Monoklonal Ratte-anti-Maus	1:1.000
Cx43	Invitrogen	Polyklonal Kaninchen-anti-Ratte	1:800

<b>Sekundärantikörper</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Quelle</b>	<b>Verdünnung</b>
Alexa-Fluor® 488	Invitrogen	Ziege-anti-Maus	1:3.000
Alexa-Fluor® 564	Invitrogen	Ziege-anti-Ratte	1:3.000
Alexa-Fluor® 564	Invitrogen	Ziege-anti-Kaninchen	1:3.000

#### 4.6.1 Calcium-Imaging

Die astrozytäre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration wurde in Astrozytenkulturen des C57BL/6N-Unterstammes und der Panx1-transgenen Tiere mittels  $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging detektiert. Durch das  $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging-Verfahren war es möglich,  $\text{Ca}^{2+}$ -Fluktuationen und  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen bildlich darzustellen. Mit Hilfe dieses Systems konnten a) die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration des Endoplasmatischen Retikulums (ER), b) die Gesamtkonzentration an  $\text{Ca}^{2+}$  in der Zelle und c) der Einfluss von extrazellulärem ATP auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration bestimmt werden sowie d) die Verteilung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration zwischen ER oder anderen  $\text{Ca}^{2+}$ -Speichern, wie z.B. Mitochondrien.

a) Zur Bestimmung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalts im ER wurde 1  $\mu\text{M}$  Thapsigargin (TG) auf die Zellen gegeben. TG blockiert die Sarcoplasmische/endoplasmische Retikulum Calcium ATPase (SERCA)-Pumpen des ERs. Dadurch kann kein  $\text{Ca}^{2+}$  mehr in das ER transportiert werden, wodurch sich die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Zytoplasma erhöht. Um diesen Gradienten wieder zu beseitigen, werden nach kurzer Zeit andere  $\text{Ca}^{2+}$ -Pumpen, wie die Plasmamembran  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase (PMCA) und die Natrium-Calcium-Austauscher ( $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchanger = NCX) aktiviert, die das  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem Zytoplasma transportieren. b) Um die Gesamtmenge des  $\text{Ca}^{2+}$  in der Zelle zu bestimmen, wurde den Zellen 10  $\mu\text{M}$  Ionomycin hinzugegeben. Ionomycin ermöglicht durch seine Einlagerung in biologische Membranen den transmembranären Transport von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen (Abramov & Duchon, 2003). c) Damit der Einfluss von extrazellulärem ATP auf die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration bestimmt werden konnte, wurde den Zellen zunächst 100  $\mu\text{M}$  ATP zugefügt, wonach eine Gabe von 1  $\mu\text{M}$  TG folgte. d) Um zu bestimmen ob die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im ER oder in den restlichen  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher größer ist, wurde zunächst 1  $\mu\text{M}$  TG auf die Zellen gegeben. Nach Absinken der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration auf den Basalwert wurde den Zellen 10  $\mu\text{M}$  Ionomycin appliziert.

Zur Durchführung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging-Experimente wurden je 60.000 Astrozyten (14 Tage *in vitro*, Passage 3-4) (siehe Kapitel 4.5.1) des jeweiligen Stammes auf Poly-L-Lysin (Sigma, Deutschland) -beschichtete Deckgläser ausgesät. 24 Stunden später erfolgte die Durchführung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging-Experimente. Dazu wurde das Medium komplett entfernt und die Zellen zweimal mit  $\text{Ca}^{2+}$ -haltiger Ringerlösung gewaschen. Danach wurden die Zellen für 20 min mit Fura-2 Acetomethylester (AM) (4  $\mu\text{M}$ , Thermo Scientific, Dreieich, Deutschland) in  $\text{Ca}^{2+}$ -haltiger Ringerlösung bei Raumtemperatur beladen. Bei Fura-2 AM handelt es sich um eine chemische  $\text{Ca}^{2+}$ -Indikatorsubstanz. Mittels des AM ist das Fura-2 in der Lage, durch die Zellmembran transportiert zu werden. Ist das Fura-2 AM in die Zelle gelangt, so werden die AM mittels Esterasen gespalten, wodurch Fura-2 in der Zelle verbleibt.

Die Besonderheit von Fura-2 liegt in seiner Eigenschaft als ratiometrischer  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensor. Durch seine spektralen Eigenschaften erfährt sein Fluoreszenzanregungsmaximum, nach Bindung eines  $\text{Ca}^{2+}$ -Ions, eine Verschiebung von 367 nm ( $\text{Ca}^{2+}$ -ungebunden) zu 340 nm ( $\text{Ca}^{2+}$ -gebunden). Die Fluoreszenzemission hingegen erfolgt dabei weiterhin bei 510 nm. Somit steigt bei einer Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration die Intensität bei 510 nm nach Anregung mit 340 nm an, wohingegen sich die Fluoreszenzintensität bei Anregung durch 387 nm verringert. Nach Beladung der Zellen mit Fura-2 AM wurde das Deckglas in eine Messkammer übertragen, wo die Zellen zweimal mit nominal  $\text{Ca}^{2+}$ -freier Ringerlösung gespült wurden, um überschüssiges Fura-2 AM zu entfernen. Für die Messung wurde dann

300  $\mu\text{l}$  nominal  $\text{Ca}^{2+}$ -freie Ringerlösung auf die Zellen gegeben. Am Fluoreszenzmikroskop (Observer Z.1, Carl Zeiss) wurden mittels der Software VisiView (Visitron System GmbH, Puchheim, Deutschland) drei „Region of Interest“ (ROI) für den Hintergrund sowie ein ROI pro Zelle festgelegt. Zu Beginn wurde eine Messung von drei Minuten ohne Zugabe von Zusätzen durchgeführt, um den Basalwert der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in den Astrozyten ermitteln zu können. Nach diesen drei Minuten wurde den Zellen a) 300  $\mu\text{l}$  TG (1  $\mu\text{M}$ , in nominal  $\text{Ca}^{2+}$ -freier Ringerlösung, Life Technologies) oder c) zunächst 100  $\mu\text{M}$  ATP (in nominal  $\text{Ca}^{2+}$ -freier Ringerlösung, Sigma-Aldrich) und nach 9 min 1  $\mu\text{M}$  TG (in nominal  $\text{Ca}^{2+}$ -freier Ringerlösung, Life Technologies) gegeben. In einem weiteren Versuch wurden die Zellen, nach Übertragung des Deckglases in die Messkammer, zunächst mit einer  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Ringerlösung gespült. Zur Messung wurden dann 300  $\mu\text{l}$  dieser Lösung auf die Zellen gegeben. Auch in diesem Versuchsaufbau wurden zunächst die ROI definiert, wonach eine dreiminütige Messung zur Bestimmung des Basalwertes durchgeführt wurde. Danach wurde den Zellen b) 300  $\mu\text{l}$  Ionomycin (10  $\mu\text{M}$  in  $\text{Ca}^{2+}$ -freier Ringerlösung, Life Technologies) oder d) zunächst 1  $\mu\text{M}$  TG (in  $\text{Ca}^{2+}$ -freier Ringerlösung, Life Technologies) und nach 15 min 10  $\mu\text{M}$  Ionomycin (in  $\text{Ca}^{2+}$ -freier Ringerlösung, Life Technologies) gegeben.

Die Messung erfolgte in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Adolfo Cavalié (Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Universität des Saarlandes). Das verwendete  $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging-System bestand aus einem inversen Fluoreszenzmikroskop (Carl-Zeiss, Jena), einer Xenon-Gasentladungslampe (DG-4, Sutter Instruments, Novato, Kalifornien, USA), einer semikonfokalen Einheit (X-Light, Visitron Systems, Puchheim, Deutschland) und einer Kamera (ORCA-D2, Visitron Systems, Puchheim). Das gleichzeitige Messen der beiden  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen ist dadurch möglich, dass der DG-4 (Sutter Instruments, USA) in der Lage ist, innerhalb von nur 1,2 ms die Wellenlänge zu verändern. Mittels eines dichroitischen Spiegels im Mikroskop wird das aus dem DG-4 kommende Licht auf die Probe gelenkt. Das reflektierte Licht passiert den dichroitischen Spiegel und den Emissionsfilter im Mikroskop, wonach es ungehindert den X-Light durchläuft, da sich alle Komponenten außerhalb des Strahlengangs befinden. Danach trifft das reflektierte Licht im ORCA-D2 ein weiteres Mal auf einen dichroitischen Spiegel und einen Emissionsfilter, wonach es von der Kamera aufgenommen wird.

Im angegebenen Zeitraum wurde alle drei Sekunden jeweils eine Aufnahme einer Anregungswellenlänge (DG-4) von 340 nm und 387 nm gemacht. Mit Hilfe der Software VisiView (Visitron Systems GmbH, Puchheim, Deutschland) wurde die Intensität der

Fluoreszenz innerhalb der ROIs gemessen. Durch Subtraktion der zeitgleich gemessenen Hintergrundwerte bei jeweils 340 nm und 387 nm wurden die gemessenen Werte der Zellen korrigiert. Durch die Bildung des Quotienten der Emissionswerte der Anregung mit 340 nm und 387 nm war es möglich, eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration-abhängige Messgröße (Ratio F340/F387) darzustellen. Durch dieses Verfahren wurden Faktoren, die die Fluoreszenzintensität oder die Fluoreszenzemission beeinflussen, berücksichtigt. Die in den Ergebnissen dargestellten Kurven zeigten die Mittelwerte der Einzelmessungen mit Standardfehler. In den Diagrammen wurde die Veränderung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration nach Gabe der jeweiligen Substanz bezogen auf den Basalwert dargestellt.

## **4.7 Molekularbiologische Methoden**

### **4.7.1 Genotypisierung der transgenen Mäuse**

Die Genotypisierung der Panx1-transgenen Mäuse wurde anhand von Schwanzspitzenbiopsien durchgeführt. Dazu wurde die Schwanzspitze der Maus zunächst in Genotypisierungs-Lysepuffer nach Beifügung von Proteinase K verdaut (Roche). Dazu wurde die Probe für 24h bei 55°C und bei einer Umdrehungszahl von 60 rpm im Thermoshaker Inkubator (PEQLAB, Erlangen, Deutschland) inkubiert. Zur Inaktivierung der Proteinase K folgte eine 20-minütige Inkubation bei 95°C. Im nächsten Schritt wurden 2 µl des Gewebeextraktes zu dem PCR Reaktionsansatz gegeben. Der PCR Reaktionsansatz bestand aus 1x PCR Reaktionspuffer (New England Biolabs, Hitchin, UK), 0,2 µM Primer (Tab. 7) (Sigma-Aldrich), 0,2 mM dNTPs (New England Biolabs) sowie 0,3 U Taq DNA Polymerase (New England Biolabs). Der PCR Reaktionsansatz wurde mit Diethyldicarbonat Wasser (DEPC-H<sub>2</sub>O) auf 25 µl aufgefüllt.

Die Inkubation des Ansatzes erfolgte im Thermocycler Life Touch (Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland) mit beheiztem Deckel (110°C) und folgendem Temperaturprofil, welches 35-mal wiederholt wurde:

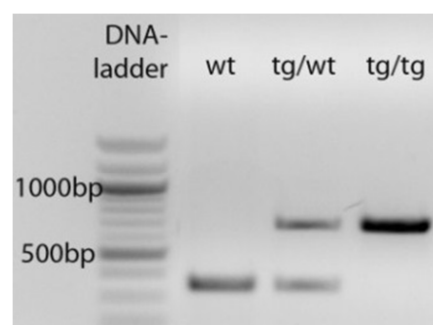
Tab. 6: Temperaturprofile der PCR

Initiale Denaturierung	5 min	95°C
Denaturierung	30 s	95°C
Hybridisierung	30 s	60°C
Polymerisation	40 s	72°C
Finale Polymerisation	5 min	72°C
	$\infty$	10°C

Die Auftrennung und Darstellung des generierten PCR-Produktes erfolgte durch eine Gelelektrophorese mit einem Agarosegel (siehe Punkt 4.7.6). Über die Größe des PCR-Produktes konnte der Genotyp der Maus bestimmt werden. Die Durchführung und Analyse der Genotypisierung wurde von Frau Andrea Rabung durchgeführt.

Tab. 7: Basensequenzen der Genotypisierungsprimer

Primer	Produktgröße	Sequenz	Genotyp
Panx1		5`GGAAAGTCAACAGAGGTACCC 3`	
	330 bp	rev 5`CTTGGCCACGGAGTATGTGTT 3`	Panx1 <sup>wt</sup>
	630 bp	rev 5`GTCCCTCTCACCCTTTTCTTACC 3` ( <i>lacZ</i> region)	Panx1 <sup>tg</sup>



**Abb. 8: Genotypisierung der transgenen Mäuse.** Zur Bestimmung des Genotyps der Panx1-transgenen Mäuse wurde eine spezifische Region der genomischen DNA mittels PCR amplifiziert und durch Gelelektrophorese analysiert. Über die Größe der PCR-Produkte konnte der Genotyp der Tiere bestimmt werden: Das transgene Allel resultierte in einer Größe des Amplifikationsproduktes von 630 bp, wohingegen das Amplifikationsprodukt des Wildtyp-Alles bei einer Größe von 330 bp zu detektieren war.

### 4.7.2 RNA-Isolation

Zur RNA-Isolation wurde das in flüssigem Stickstoff eingefrorene und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrte Gewebe auf Eis aufgetaut. Für die Isolation wurde das RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet und nach Angaben des Herstellers gearbeitet.

Die Homogenisierung des Gewebes erfolgte durch Zugabe von 2 ml des RLT (RNeasy Lipid Tissue) Puffers und der Bearbeitung mit Hilfe des ULTRA-TURRAX (IKA). Das Homogenat wurde nun für zehn Minuten bei  $5.000 \times g$  zentrifugiert und der Überstand in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen übertragen. Der Überstand wurde mit dem gleichen Volumen an 70% Ethanol versetzt. Es folgte eine gute Durchmischung der Substanzen, bevor sie auf die Säule gegeben und für zehn Minuten bei  $5.000 \times g$  zentrifugiert wurden. Der Durchfluss wurde verworfen und die membrangebundene RNA wurde zunächst zweimal mit dem mitgelieferten RW1 (RNeasy Wash 1) Puffer gewaschen, ehe ein DNase-Verdau mit einer Lösung aus 140  $\mu\text{l}$  des mitgelieferten RDD (RNeasy DNA Digestion) Puffers und 20  $\mu\text{l}$  DNase I Stock Lösung (Thermo) stattfand. Diese DNase I-Lösung wurde auf die membrangebundene RNA pipettiert und für 15 min bei RT inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschritten, mit dem mitgelieferten RPE Puffer, wurde die Säule mit 150  $\mu\text{l}$  RNase freiem Wasser eluiert.

### 4.7.3 Konzentrationsbestimmung der RNA

Die Konzentration der gewonnenen RNA wurde mittels Nanodrop ND-1.000 (Thermo) gemessen. Die Bestimmung der Konzentration erfolgte durch die Absorptionsmessung bei der Wellenlänge 260 nm. Dazu wurde zunächst ein Leerwert ermittelt, indem 1  $\mu\text{l}$  RNase-freies Wasser gemessen wurde, worauf die Messung von je 1  $\mu\text{l}$  der jeweiligen Probe erfolgte. Die Reinheit der Probe wurde durch den Absorptionsquotienten  $A_{260}/A_{280}$  festgestellt, welcher für eine RNA zwischen 1,9 und 2,1 liegen sollte.

### 4.7.4 Komplementäre DNA-Synthese

Zur Synthese der komplementären DNA (cDNA) wurde zunächst ein Ansatz aus 2  $\mu\text{l}$  Oligo (dT)<sub>18</sub> (New England Biolabs), 1  $\mu\text{l}$  dNTP-Mix (10 mM, Thermo) und 2  $\mu\text{g}$  RNA hergestellt, welcher bis auf 16  $\mu\text{l}$  mit DEPC-H<sub>2</sub>O aufgefüllt wurde. Der Ansatz wurde für 3-5 min auf  $65-80^{\circ}\text{C}$  erhitzt, danach kurz zentrifugiert und für 20 min auf Eis gelagert. Anschließend wurden 2  $\mu\text{l}$  10x Reaction Buffer (New England Biolabs), 1  $\mu\text{l}$  RNase Inhibitor (Thermo) und 1  $\mu\text{l}$  M-MULV RT (New England Biolabs) zugefügt. Entsprechende Kontrollen wurden angesetzt. Der erste Ansatz der Kontrolle beinhaltet dabei keine Matritze, somit sollte keine Transkription stattfinden. Im zweiten Kontrollansatz hingegeben wurde keine M-MULV RT

hinzugefügt. Bei der M-MULV RT handelt es sich um eine RNA-gerichtete DNA Polymerase. Fehlt diese, so kann keine Synthese des komplementären Stranges der DNA gebildet werden und eine Verunreinigung durch endogene DNA kann ausgeschlossen werden. Zur Bildung der komplementären DNA wurden die Proben für eine Stunde bei 42°C inkubiert. Darauf erfolgte eine Enzyminaktivierung bei 90°C für zehn Minuten.

#### 4.7.5 Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Eine RT-PCR mit spezifischen Primern für Nnt (Exon 8, Sigma Aldrich) wurde an Gehirnen der Tiere des C57BL/6N und des C57BL/6J Unterstammes durchgeführt. Des Weiteren wurden zur qualitativen und quantitativen Kontrolle der Proben eine 18S-PCR durchgeführt, da es sich bei 18S um ein Gen handelt, welches in den meisten Zelltypen stark exprimiert ist und nur selten bei experimentellen Behandlungen eine Regulation aufzeigt.

Ein Reaktionsansatz hatte ein Gesamtvolumen von 25 µl, bestehend aus 18,875 µl DEPC-H<sub>2</sub>O; 2,5 µl 10x ThermoPol Puffer (New England Biolabs); je 0,5 dNTP-Mix (10mM) (Fermentas); fwd Primer; rev Primer; 0,125 µl Taq (New England Biolabs) und 2 µl cDNA.

Die Inkubation der Ansätze erfolgte im Thermocycler Life Touch (Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland) mit folgendem Temperaturprofil (Tab. 8); die Schritte der Denaturierung, Hybridisierung und Polymerisation wurden für Nnt (Exon 8) 28-mal, und für 18S 20-mal wiederholt.

Tab. 8: Temperaturprofile der PCR

Schritt	Dauer	Nnt	18S
		Temperatur	Temperatur
Initiale Denaturierung	30 s	95°C	95°C
Denaturierung	30 s	95°C	95°C
Hybridisierung	30 s	60°C	56°C
Polymerisation	2 min	68°C	68°C
Finale Polymerisation	5 min	68°C	68°C
	∞	10°C	10°C



Tab. 9: Basensequenzen der Primer

Gen	Produktgröße		Primer Sequenzen
Nnt Exon 8	492 bp	fwd	5'-GAAACGACTAAGCCGGGAGA-3'
		rev	5'-TCCCCAAACAGTGTGGTAGC-3'
18S	155 bp	fwd	5'-AAACGGCTACCACATCCAAG-3'
		rev	5'-CCTCCAATGGATCCTCGTTA-3'

Die Produktgröße wurde in Basenpaaren (bp) angegeben. Für jedes Gen wurden jeweils die forward (fwd) und die reverse (rev) Sequenzen des Primers angegeben.

#### 4.7.6 Gelelektrophorese der PCR-Produkte

Zur Analyse der PCR-Produkte erfolgte eine Elektrophorese im 1,5%igen Agarose-Gel, welches den Interkalator GelRed (1:10.000; Biotum; Kalifornien, USA) enthielt. Dazu wurden zunächst 25 µl der Probe mit 5 µl Ladepuffer (6x) gemischt und auf das Gel aufgetragen. Beim Beladen des Gels mit dem Amplifikationsprodukt der Nnt Primer wurde eine Spur mit dem Längenstandard GeneRuler 50bp DNA Ladder (Thermo) und bei 18S mit dem Längenstandard GeneRuler 1kb DNA Ladder (Thermo) beladen. Die Durchführung der Elektrophorese erfolgte in 1x TAE-Puffer bei 120 V für 45 min. Die Ergebnisse wurden mittels UV-Licht (302 nm) am FUSION-FX7/SL Advance-System (PEQLAB) visualisiert und mit der Fusion-Software fotografiert.

#### 4.8 Statistik

Zur statistischen Auswertung der histologischen und immunhistologischen Daten wurden die Werte der einzelnen gemessenen Regionen miteinander verglichen. Bei den *in vitro* Analysen wurden die Werte der einzelnen Messungen in den Vergleich gestellt. Die Daten wurden als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler (SEM) dargestellt. Die statistische Analyse erfolgte mittels des Programms GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, La Jolla, USA). Dabei wurden die Proben mittels des d'Agostino-Pearson Omnibus-Tests zunächst auf eine Normalverteilung untersucht. Danach erfolgte die Durchführung einer geeigneten parametrischen (One-way ANOVA) oder nicht-parametrischen (Kruskal-Wallis) Analyse mit post-hoc Tests. Um Unterschiede zwischen zwei Gruppen beurteilen zu können wurde entweder der zweiseitige t-Test (bei normalverteilten Werten) oder der Mann-Whitney-U-Test (bei nicht-

normalverteilten Werten) bzw. Kolmogorov-Smirnov-Test (bei nicht-normalverteilten Werten) angewandt. Zur Analyse statistisch signifikanter Unterschiede in einer Probenverteilung wurde der Chi-Quadrat-Test verwendet. Für die Signifikanzwerte galt dabei: \*  $0,01 < p \leq 0,05$  signifikant; \*\*  $0,001 < p \leq 0,01$  hoch signifikant; \*\*\*  $0,0001 < p \leq 0,001$  sehr hoch signifikant.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Auswirkungen des fehlenden Nnt-Proteins auf die Ausprägung einer hypoxisch-ischämischen Gehirnläsion

Bei der Entstehung eines hypoxisch-ischämischen Insultes spielen reaktive Sauerstoffspezies (ROS), Inflammation und Apoptose eine wichtige Rolle (Dirnagl *et al.*, 1999; Inder & Huppi, 2000; Cerio *et al.*, 2013). Die Aktivierung der Apoptose ist ein hochenergetischer Prozess und benötigt viel ATP (Northington *et al.*, 2001; Blomgren *et al.*, 2007; Cerio *et al.*, 2013). Während der ATP-Produktion werden in der Atmungskette ROS gebildet, wie z.B. Superoxid-Radikale ( $O_2^-$ ) (Balaban *et al.*, 2005). Die Beseitigung des  $O_2^-$  hingegen benötigt reduziertes NADPH, welches u.a. durch das Enzym Nicotinamid Nukleotid Transhydrogenase (Nnt) aus  $NADP^+$  generiert werden kann. Somit ist Nnt ein Protein, das für den Abbau von ROS in Mitochondrien benötigt wird. Um den Einfluss des Nnt-Proteins auf die Ausprägung einer früh-postnatalen hypoxischen-ischämischen Gehirnläsion *in vivo* untersuchen zu können, wurden in dieser Arbeit zwei Unterstämme der C57BL/6 Maus verwendet: Mäuse des C57BL/6N (besitzen ein funktionelles Nnt-Protein) und des C57BL/6J Unterstammes (besitzen kein funktionelles Nnt-Protein).

In dieser Arbeit wurde die Hypothese untersucht, dass eine Nnt-Deletion zu einer stärkeren Ausprägung einer früh-postnatalen hypoxisch-ischämischen Gehirnläsion führt. Dazu musste zunächst das Modell der früh-postnatalen hypoxisch-ischämischen Gehirnläsion für den C57BL/6 Mausstamm etabliert werden.

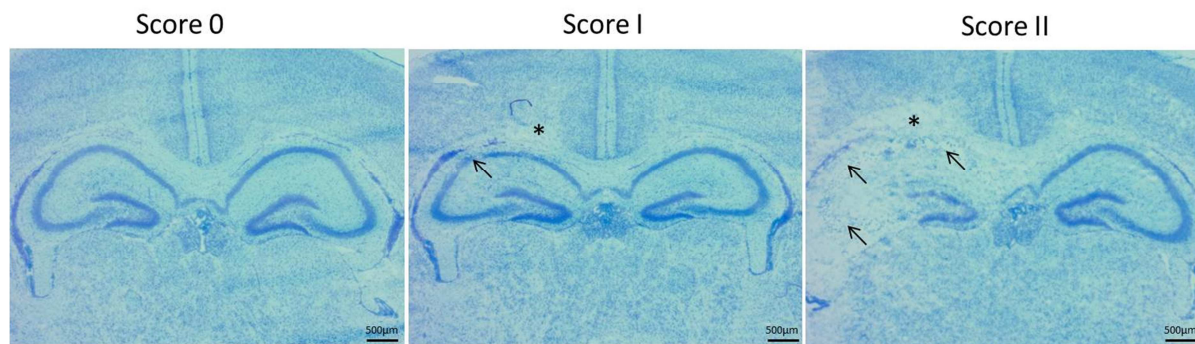
### 5.2 Bestimmung der Läsionsgröße

Zur Analyse der Gehirne wurden diese zunächst auf makroskopische Veränderungen untersucht. Dabei wurde inspiziert, ob es bei den Gehirnen der operierten Tiere zu einer Bildung von Zysten oder opaquen Stellen in den linken Hemisphären kam. Mittels dieser Analyse konnte kein Unterschied zwischen den Gehirnen der operierten Tiere und denen der Kontrollgruppe festgestellt werden.

### Score-Einteilung

Nachdem die Gehirne auf makroskopische Veränderungen untersucht wurden, erfolgte eine Untersuchung auf mikroskopischer Ebene. Dazu wurden Gefrierschnitte der in OCT eingebetteten Gehirne angefertigt und mittels LFB angefärbt. Anhand der Ergebnisse dieser LFB-Färbung wurde eine Score Einteilung vorgenommen. Bei einem nicht geschädigten

Gehirn waren Neurone (blau) und Myelin (türkis) in allen Arealen der Hippocampusformation und des angrenzenden Kortex gleichmäßig angefärbt (Abb. 9, Score 0). In einem geschädigten Gehirn hingegen konnte man ein deutliches Fehlen des Myelins erkennen. Zudem fanden sich kleine Areale im Hippocampus, die keine neuronalen Zellen mehr enthielten (Abb. 9, Score I). In Score II (Abb. 9) waren diese Areale sehr viel ausgeprägter; die Hippocampusformation war in der geschädigten linken Hemisphäre kaum noch zu erkennen. Die rechten Hemisphären waren in allen Scores, aufgrund der unilateralen Schädigung durch die Durchtrennung der A. carotis communis sinistra, unverändert. Aus diesem Grund wurden diese als Kontrolle zu den läsionierten Hemisphären in die Ergebnisse aufgenommen. Des Weiteren wurde das Gewebe von Tieren der Sham-Gruppen untersucht. Diese Gehirne zeigten keine Veränderungen.



**Abb. 9: Score-Einteilung anhand der Läsionen im Hippocampusbereich.** LFB-Färbung des Hippocampus-Bereichs der hypoxisch-ischämischen Tiere (rechte Seite im Bild: intakte Hemisphäre; linke Seite im Bild: läsionierte Hemisphäre). \* Demyelinisierung, → fehlende Neurone in der Hippocampusformation.

### 5.3 Analyse des Effektes des Nnt-Proteins auf die Ausprägung einer früh-postnatalen hypoxisch-ischämischen Gehirnläsion *in vivo*

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde untersucht, ob das mitochondriale Protein Nnt eine Bedeutung für die Ausprägung des früh-postnatalen hypoxisch-ischämischen Hirnschadens hat. Dazu wurde die unilaterale hypoxisch-ischämische Hirnläsion an sieben Tage alten Mäusen induziert. Analysiert wurden C57BL/6 Mäuse zweier Unterstämme: C57BL/6N Tiere enthalten ein intaktes *Nnt* Gen in ihrem Genom, während Tiere des C57BL/6J Unterstammes eine Deletion der Exone 7-11 des *Nnt* Gens aufweisen. Entsprechend bilden die C57BL/6J Tiere kein funktionales Nnt-Protein.

Um zu analysieren, ob im Großhirn der C57BL/6N Tiere Nnt-mRNA zu detektieren ist und im Großhirn der C57BL/6J Tiere nicht, wurde zunächst eine RT-PCR-Analyse mit in Exon 8 gelegenen Primern durchgeführt. Somit sollte in den C57BL/6J Tieren kein

Amplifikationsprodukt erscheinen, da Exon 8 durch die vorhandene Deletion bei diesen Tieren fehlt. Als Positivkontrolle wurde Nierengewebe der C57BL/6N Mäuse eingesetzt, da bekannt ist, dass dieses eine sehr hohe *Nnt*-Expression aufweist (Arkblad *et al.*, 2002). Im Großhirn der C57BL/6N Mäuse konnte die Expression von Exon 8 des *Nnt* Gens nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu wurde im Großhirn der C57BL/6J Mäuse keine *Nnt*-mRNA (Exon 8) detektiert (Abb. 10). Somit konnte gezeigt werden, dass a) das Großhirn *Nnt*-mRNA exprimiert, und b) dass die Tiere des C57BL/6J Unterstammes keine Expression der *Nnt*-mRNA (Exon 8) aufweisen.

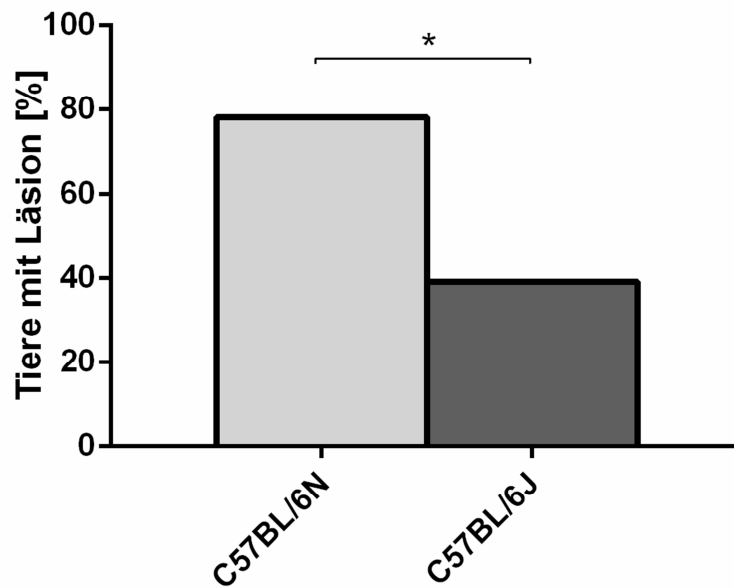


**Abb. 10: Nnt-Detektion mittels RT-PCR.** Mittels RT-PCR wurde die mRNA Expression von *Nnt* (Exon 8) im Großhirn (GH) der C57BL/6J (J) sowie der C57BL/6N Mäuse analysiert. Als Kontrolle diente die Niere der C57BL/6N Mäuse (N-Niere). Die erste Spur zeigt den DNA-Marker.

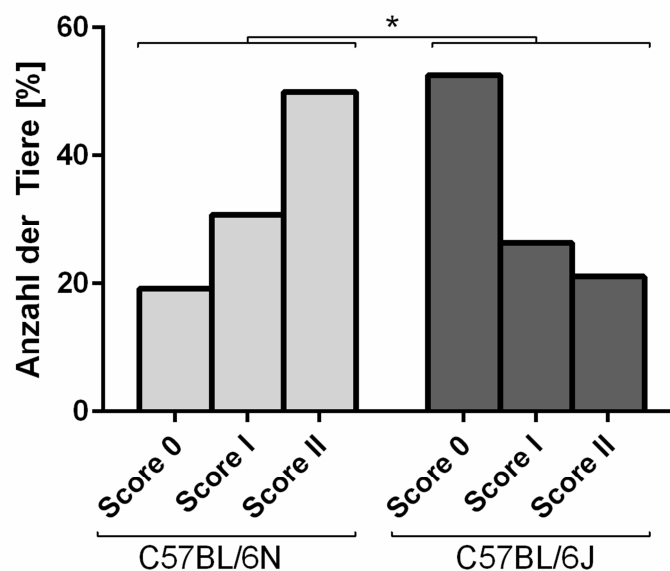
### Läsionsausprägung zwischen den Unterstämmen C57BL/6J und C57BL/6N

Bei der Analyse der Anzahl von Tieren eines Unterstammes, die eine Läsion nach einem hypoxisch-ischämischen Insult zeigten, konnte festgestellt werden, dass es im C57BL/6N Unterstamm signifikant mehr Tiere mit einer hypoxisch-ischämischen Läsion gab, als im C57BL/6J Unterstamm. Im C57BL/6N Unterstamm überlebten 26 von 45 Tieren die hypoxische Ischämie, bei den Tieren des C57BL/6J Unterstammes hingegen waren es 19 von 30 Tieren. Somit wurden für die Analysen 26 Tiere des C57BL/6N Unterstammes sowie 19 Tiere des C57BL/6J Unterstammes untersucht.

Durch die Einteilung der Tiere in die unterschiedlichen Scores konnten Unterschiede zwischen den C57BL/6N und den C57BL/6J Mäusen festgestellt werden (Abb. 11). Bei den Mäusen des C57BL/6N Unterstammes wurden 5 Tiere (19,23%) in Score 0; 8 Tiere (30,77%) in Score I und 13 Tiere (50%) in Score II eingeteilt. Die Einteilung der Mäuse des C57BL/6J Unterstammes zeigte hingegen ein gegensätzliches Bild. Hier wurden 10 Tiere (52,63%) in Score 0; 5 Tiere (26,32%) in Score I und 4 Tiere (21,05%) in Score II eingeteilt (Abb. 12).



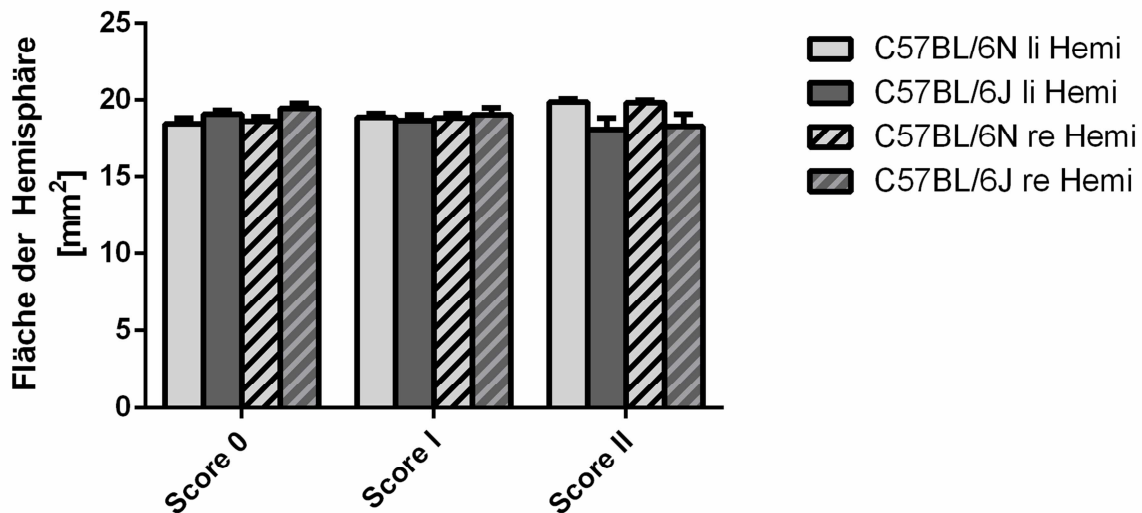
**Abb. 11: Prozentualer Anteil der Tiere, die eine Läsion nach einem hypoxisch-ischämischen Insult zeigen.** Der Vergleich des prozentualen Anteils der Tiere, die eine Läsion nach einem hypoxisch-ischämischen Insult zeigen (Score  $\geq$ I) zeigt einen signifikanten Unterschied in der Verteilung der Tiere mit Läsion zwischen dem C57BL/6N- und dem C57BL/6J Unterstamm auf (Chi-Quadrat-Test;  $p < 0,05$ ).



**Abb. 12: Anzahl der Tiere je Score nach Auswertung der Histologie.** Die Tiere wurden nach Größe der Läsionsfläche in Scores eingeteilt. Darstellung der Score-Verteilung für die C57BL/6N sowie den C57BL/6J Mäuse. Die Verteilung der Tiere, zu den drei Scores unterschied sich signifikant zwischen dem C57BL/6N und dem C57BL/6J Unterstamm (Chi-Quadrat-Test;  $p < 0,05$ ).

## Fläche der Hemisphären

Im Folgenden wurde untersucht, ob es aufgrund des hypoxisch-ischämischen Gewebeschadens zu einer Verringerung der Fläche in den läsierten linken Hemisphären, verglichen zu den rechten intakten Hemisphären, kam. Aus diesem Grund wurden an den LFB-gefärbten Schnitten die Flächen der linken und der rechten Hemisphäre vermessen. Die Fläche der Hemisphären war in beiden Stämmen und in allen Scoregruppen unverändert. Alle linken Hemisphären zeigten die gleiche Flächengröße wie die rechten Hemisphären (Abb. 13)



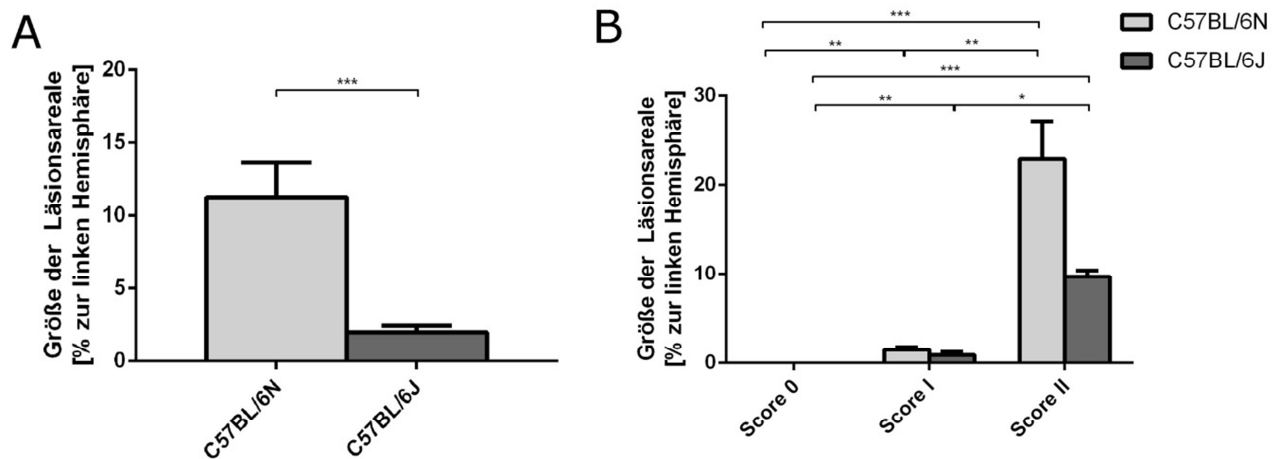
**Abb. 13: Fläche der Hemisphären.** Die Abbildung zeigt die Fläche der läsierten linken (= li Hemi) und der intakten rechten Hemisphäre (= re Hemi) der C57BL/6N und der C57BL/6J Mäuse.

## Größe der Läsionsareale

Obwohl die Gesamtflächen der Hemisphären keinen Unterschied zwischen den beiden Unterstämmen zeigten, wiesen die Läsionsareale einen Größenunterschied auf. Die Gehirne der C57BL/6N Mäuse zeigten eine signifikant größere Läsionsfläche als die Gehirne der C57BL/6J Mäuse (Abb. 14A).

Bei der Analyse der Score-Gruppen konnten signifikante Unterschiede zwischen den Scores innerhalb eines Unterstammes detektiert werden. Der Anstieg der Größe der Läsionsfläche von Score 0 zu Score I bzw. von Score I zu Score II war innerhalb eines Stammes jeweils signifikant. Die Differenz zwischen Score 0 und Score II zeigte innerhalb eines Stammes sogar eine sehr hohe Signifikanz (Abb. 14B). In Score 0 wurden per Definition die Tiere eingruppiert, die keine Läsion aufwiesen. Aus diesem Grund liegt die Größe der

Läsionsareale bei diesen Tieren bei 0%. Bei einem Score von II zeigte sich, dass die Gehirne der C57BL/6N Mäuse ein größeres Läsionsareal ausbildeten als die der C57BL/6J Mäuse (Abb. 14B). Die Tiere des C57BL/6N Unterstammes zeigten eine durchschnittliche Größe des Läsionsareals von  $22,9\% \pm 4,29\%$  und die C57BL/6J Mäuse von nur  $9,7\% \pm 0,69\%$ . Statistisch konnte bei diesem Ergebnis keine Signifikanz nachgewiesen werden. Die Größe des Läsionsareals in Score I lag bei den C57BL/6N Tieren durchschnittlich bei  $1,5\% \pm 0,23\%$  und bei den Mäusen des C57BL/6J Unterstammes bei  $0,9\% \pm 0,32\%$ .



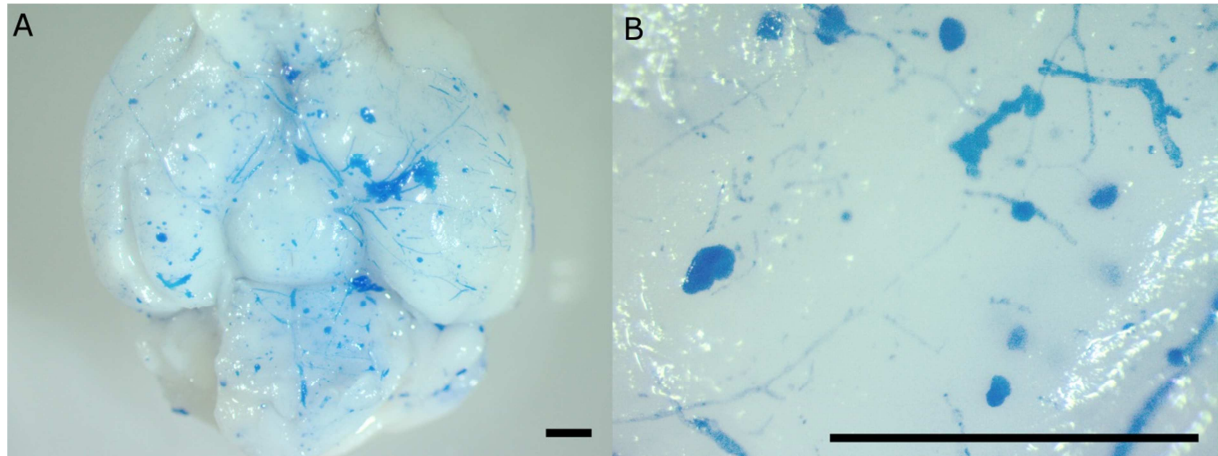
**Abb. 14: Darstellung der Größe der Läsionsareale.** Die Fläche der Läsion in der läsionierten linken Hemisphäre wurde in Bezug auf die Gesamtfläche der linken Hemisphäre (in %) genommen. A) Darstellung der Läsionsfläche zwischen den beiden Unterstämmen. In B) wurde die Größe der Läsionsareale innerhalb der Scores dargestellt. Dargestellt wurden die Mittelwerte  $\pm$  SEM (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

### 5.3.1 Analyse des Einflusses des Nnt-Proteins auf die zerebrale Gefäßstabilität

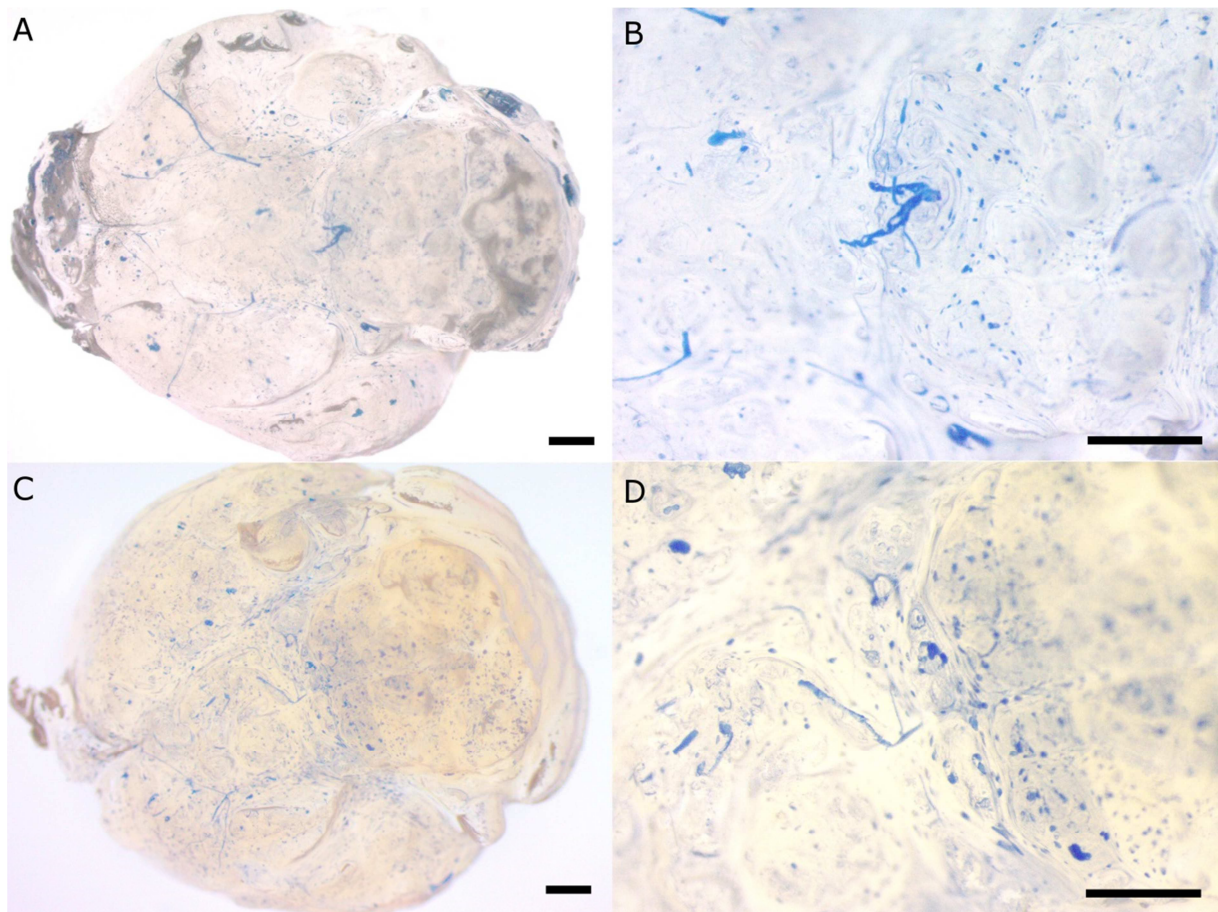
Im nächsten Schritt sollte analysiert werden, ob das Fehlen des Nnt-Proteins bereits einen Einfluss auf die Stabilität und die Barrierefunktion der zerebralen Gefäße bei unbehandelten Tieren hat. Aus diesem Grund wurden Mäuse des C57BL/6N und des C57BL/6J Unterstammes ohne hypoxisch-ischämischen Insult im Alter von P9 mit dem Silikongummi Microfil<sup>®</sup> oder mit Evans Blue perfundiert. Bei der Perfusion mit Microfil<sup>®</sup> zeigte sich, dass der Gefäßverlauf oft unterbrochen war und sich viele Blasen-ähnliche Formationen bildeten (Abb. 15). Die Anzahl dieser Blasen-ähnlichen Formationen, bezogen auf die gesamte basale Fläche, war allerdings in den Gehirnen der C57BL/6N Tiere (Mittelwert/SEM:  $32 \pm 7$  Blasen-ähnliche Formationen pro Quadrant, Abb. 16AB) geringer, als in den Gehirnen der C57BL/6J Tiere (Mittelwert/SEM:  $87 \pm 4$  Blasen-ähnliche Formationen pro Quadrant, Abb. 16CD).



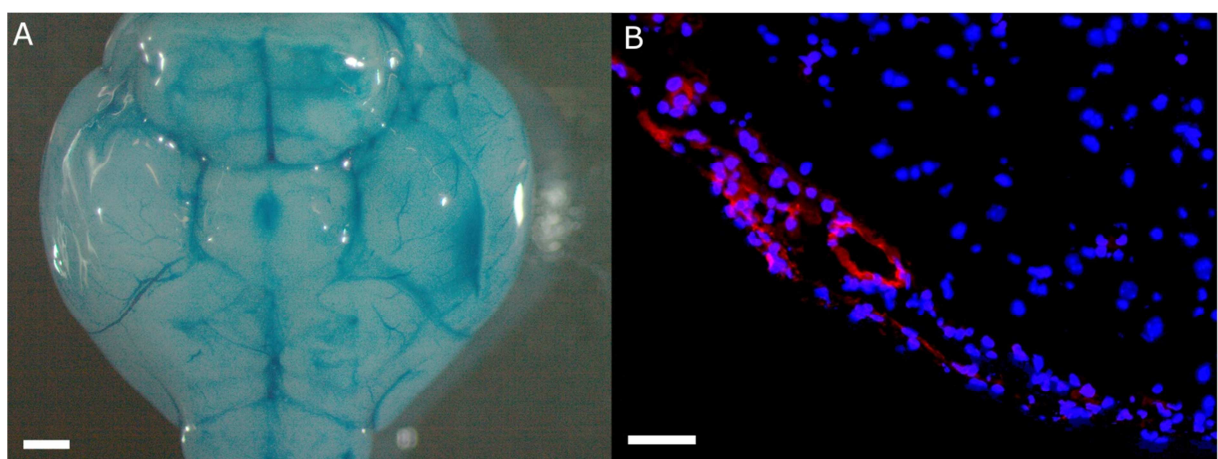
Mittels der Evans Blue - Perfusion sollte analysiert werden, ob es aufgrund des Fehlens von Nnt, und des somit hypothetisierten Anstieges von ROS, zu einer verringerten Barrierefunktion der zerebralen Gefäße kommt. Weder in den Gehirnen der C57BL/6N Tiere, noch in denen der C57BL/6J Tiere konnte eine Einfärbung von Evans Blue im Gewebe des Gehirns detektiert werden (Abb. 17A). Auch auf mikroskopischer Ebene konnte bei den angefertigten Gehirnschnitten kein Eindringen von Evans Blue in das umliegende Gehirngewebe gefunden werden (Abb. 17B).



**Abb. 15: Repräsentative Darstellung der Microfil<sup>®</sup>-Perfusion.** Repräsentative Darstellung der Basis eines mit Microfil<sup>®</sup> perfundierten Gehirns einer neun Tage alten Maus. Die Gefäße sind mit Microfil<sup>®</sup> gefüllt (blau) (A). Bei einer höheren Vergrößerung können Blasen-ähnliche Formationen detektiert werden (B). Die Maßstäbe stellen 100  $\mu\text{m}$  dar.



**Abb. 16: Repräsentative Darstellung von Gehirnen von Tieren des C57BL/6N und des C57BL/6J Unterstammes.** Die Gehirne wurden mit Microfil<sup>®</sup> perfundiert (blau) und transparent gemacht. A) und B) zeigen ein Gehirn des C57BL/6N Unterstammes. C) und D) hingegen zeigen ein Gehirn des C57BL/6J Unterstammes. Im C57BL/6J Unterstamm konnten mehr und größere Blasen-ähnliche Formationen detektiert werden als in Gehirnen des C57BL/6N Unterstammes. Die Maßstäbe zeigen 100 µm.



**Abb. 17: Evans Blue Perfusion der Gehirne.** A) zeigt die Basis des Gehirns einer sieben Tage alten Maus (C57BL/6J Unterstamm), die mit Evans Blue perfundiert wurde. Die Perfusion zeigt intakte und dichte Gefäße (Maßstab repräsentiert 100 µm). Dies kann ebenfalls anhand eines Kryoschnittes mit Hilfe von Fluoreszenz gesehen werden (B, rot = Evans Blue, blau = DAPI-Zellkernfärbung, Maßstab zeigt 20 µm).

### 5.3.2 Analyse des Zellschadens nach einem hypoxisch-ischämischen Insult

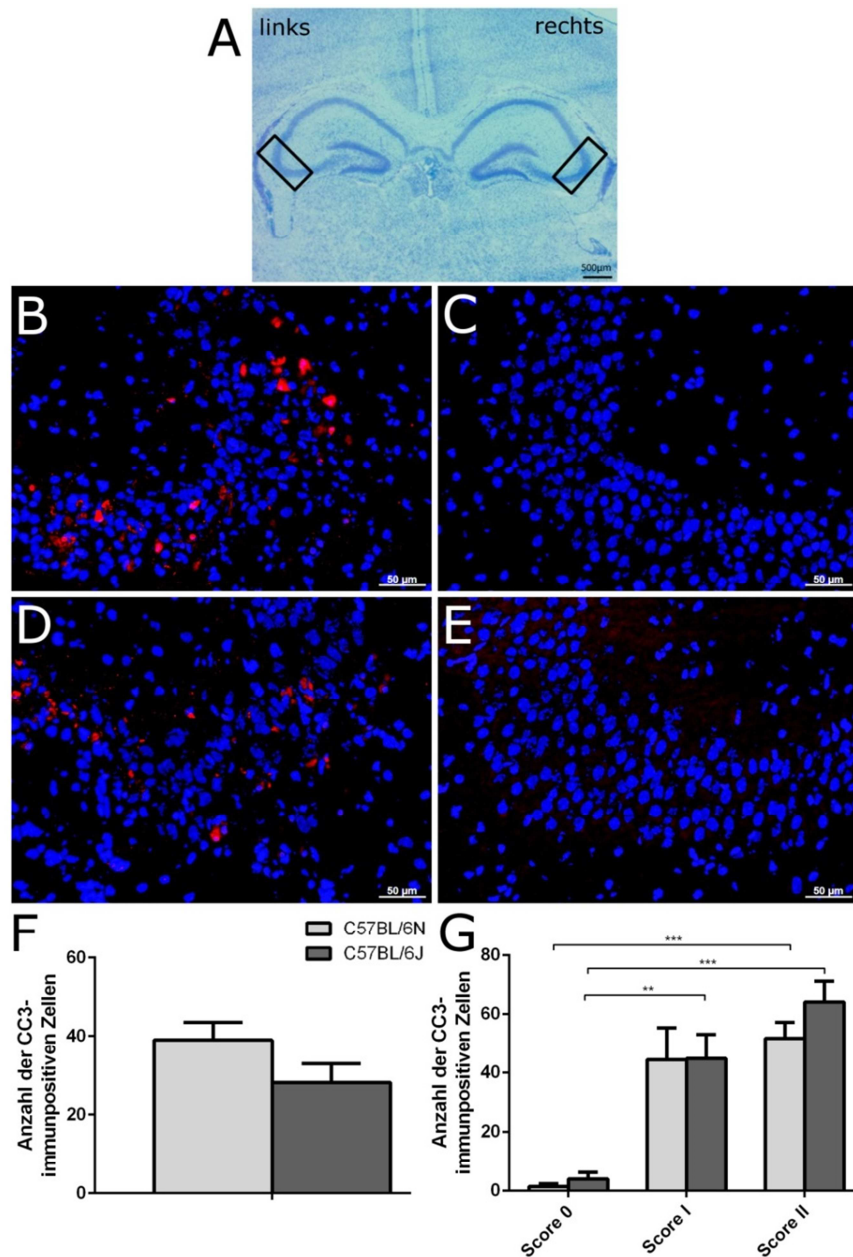
Durch das Eintreten eines früh-postnatalen hypoxisch-ischämischen Insultes sind auf zellulärer Ebene eine vermehrte Aktivierung der Mikroglia/Makrophagen und eine verstärkte Apoptose zu erwarten. Um diese Prozesse zu untersuchen, wurden immunhistologische Färbungen durchgeführt: Apoptose wurde über Cleaved Caspase-3 (CC3) detektiert. Aktivierte Mikroglia/Makrophagen wurden über CD68 identifiziert.

Bei der Analyse der immunhistologisch angefärbten Gehirnschnitte wurden die rechten und linken Hemisphären vergleichend ausgewertet. Da die Werte aller rechten Hemisphären bei der CC3-Immunfärbung bei 0 und bei der CD68-Immunfärbung unter 0,01% lagen, wurden im Folgenden nur die Werte der linken Hemisphären dargestellt.

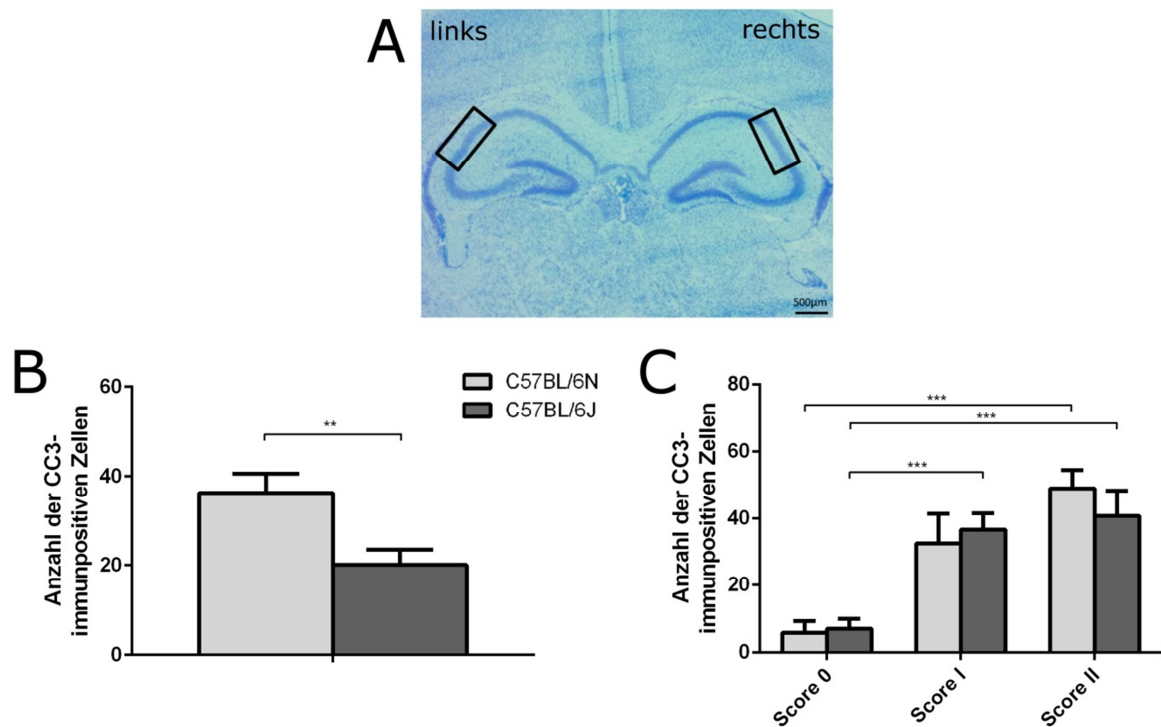
#### Apoptose-Detektion mittels Cleaved Caspase-3 (CC3) Immunfluoreszenz

Der Vergleich zwischen linken läsierten und den rechten intakten Hemisphären zeigte, dass in den rechten intakten Hemisphären keine CC3-immunpositiven Zellen zu detektieren waren. In den linken läsierten Hemisphären konnten allerdings CC3-immunpositive Zellen detektieren werden. Aus diesem Grund konnte die immunhistologische Färbung mittels CC3 als läsionsspezifischer Marker der hypoxisch-ischämischen Gehirnläsion verwendet werden. Fasst man alle Scores zusammen, so war im Bereich CA3 ein geringer Unterschied in der Anzahl der CC3-immunpositiven Zellen zwischen den C57BL/6N und den C57BL/6J Tieren zu erkennen (Abb. 18). Mittels CC3 wurde nachgewiesen, dass während eines früh-postnatalen hypoxisch-ischämischen Insultes Apoptose stattfindet. Die Tiere des C57BL/6N Unterstammes zeigten dabei mit durchschnittlich 39 Zellen pro Bildausschnitt mehr CC3-immunpositive Zellen als die Tiere des C57BL/6J Unterstammes, mit durchschnittlich 28 Zellen (nicht signifikant; Abb. 18F). Im Bereich der CA2/3-Region hingegen waren bei den C57BL/6N Tieren signifikant mehr CC3-immunpositive Zellen zu sehen (durchschnittlich 36 Zellen pro Bildausschnitt) als bei den C57BL/6J Tieren (durchschnittlich 20 Zellen) (Abb. 19B). Score 0-Tiere beider Stämme wiesen nur sehr wenige CC3-immunpositive Zellen auf (Abb. 18G). In Score I stieg die Anzahl der CC3-immunpositiven Zellen stark an, wobei kein Unterschied zwischen den Tieren des C57BL/6N und denen des C57BL/6J Unterstammes zu erkennen war. In Score II konnte festgestellt werden, dass es bei Tieren des C57BL/6N Unterstammes keinen weiteren Anstieg an CC3-immunpositiven Zellen gab. Dagegen stieg die Zahl der CC3-immunpositiven Zellen bei den C57BL/6J Mäusen an (durchschnittlich 13 Zellen mehr, nicht signifikant). Die CA2/3 Region und die CA3-Region für Score 0 und Score I waren vergleichbar. Hier waren jedoch in Score II mehr CC3-immunpositive Zellen bei den

C57BL/6N Tieren zu finden als im C57BL/6J Unterstamm (durchschnittlich 9 Zellen mehr, nicht signifikant) (Abb. 19C).



**Abb. 18: Apoptosemarker: Cleaved Caspase-3 (CC3) der CA3-Region *in vivo*.** Anzahl der CC3-immunopositiven Zellen in den läsierten linken Hemisphären. A) zeigt einen repräsentativen LFB-gefärbten Schnitt, der die untersuchten hippocampalen Areale der läsierten linken und intakten rechten Hemisphäre zeigt. Die umrandeten Areale zeigen, in welchem Bereich des Hippocampus die Analyse durchgeführt wurde (CA3-Region). B bis E) zeigen Fluoreszenzaufnahmen der CC3-Immunhistologischen Färbung (rot) in der läsierten linken (B, D) und der intakten rechten Hemisphäre (C, E) der C57BL/6N (B, C) und der C57BL/6J (D, E) Tiere. Zellkerne wurden mittels DAPI (blau) dargestellt. F) Quantifizierung der CC3-immunopositiven Zellen der linken Hemisphären des C57BL/6N- und des C57BL/6J Unterstammes. In G) wurde die Quantifizierung der CC3-immunopositiven Zellen der linken Hemisphären der beiden Unterstämme nach Scores dargestellt. Gezeigt wurden die Mittelwerte  $\pm$  SEM (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).



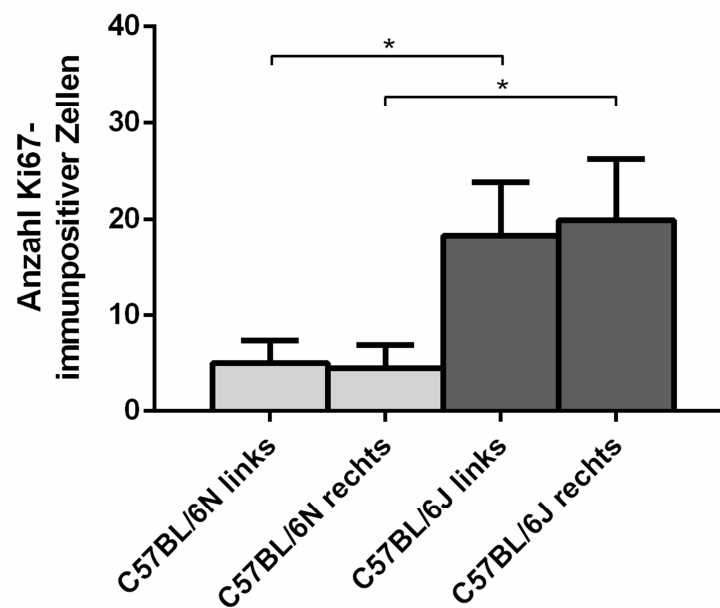
**Abb. 19: Apoptosemarker: Cleaved Caspase-3 (CC3) der CA2-3-Region *in vivo*.** Anzahl der CC3-immunopositiven Zellen in den läsierten linken Hemisphären. A) zeigt einen repräsentativen LFB-gefärbten Schnitt, mit den untersuchten hippocampalen Arealen der läsierten linken und der intakten rechten Hemisphäre. Die umrandeten Areale zeigen, in welchem Bereich des Hippocampus die Analyse durchgeführt wurde (CA2-3-Region). B) Quantifizierung der CC3-immunopositiven Zellen der linken Hemisphären der C57BL/6N- und der C57BL/6J Mäuse. In C) wurde die Quantifizierung der CC3-immunopositiven Zellen der linken Hemisphären der beiden Unterstämme nach Scores dargestellt. Gezeigt wurden die Mittelwerte  $\pm$  SEM (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

### Einfluss der Nnt-Deletion auf die Proliferation

Zur Überprüfung, ob es nach einer früh-postnatalen hypoxisch-ischämisch bedingten Zellschädigung im umliegenden Gewebe zu einer erhöhten Zellproliferation kommt, wurde an den Gefrierschnitten der Gehirne eine Ki67-Immunfärbung durchgeführt. Nach einer früh-postnatalen hypoxisch-ischämischen Gehirnläsion kam es zu keiner erhöhten Proliferation der Zellen (Abb. 20). Weder in Gehirnen der C57BL/6N Tiere noch in denen der C57BL/6J Tiere konnten Unterschiede bezüglich der Zellproliferation zwischen den läsierten linken und den intakten rechten Hemisphären festgestellt werden. Jedoch war zu erkennen, dass die Tiere des C57BL/6J Unterstammes eine signifikant höhere Anzahl Ki67-immunpositiver Zellen im Bereich der molekularen Schicht des Gyrus dentatus zeigten (links durchschnittlich  $18 \pm 5,6$

Zellen, rechts  $21,8 \pm 6,3$  Zellen) als die Tiere des C57BL/6N Unterstammes (links durchschnittlich  $4,9 \pm 1,2$  Zellen, rechts  $4,3 \pm 1,3$  Zellen).

Somit konnte gezeigt werden, dass die Proliferation nicht in Zusammenhang mit der früh-postnatalen hypoxisch-ischämischen Gehirnläsion steht. Allerdings zeigen die Ergebnisse auch, dass die erhöhte Proliferation in den beiden Hemisphären des C57BL/6J Unterstammes, im Vergleich zu den Hemisphären des C57BL/6N Unterstammes, möglicherweise direkt oder indirekt mit der Deletion von Nnt zusammenhängen könnten.

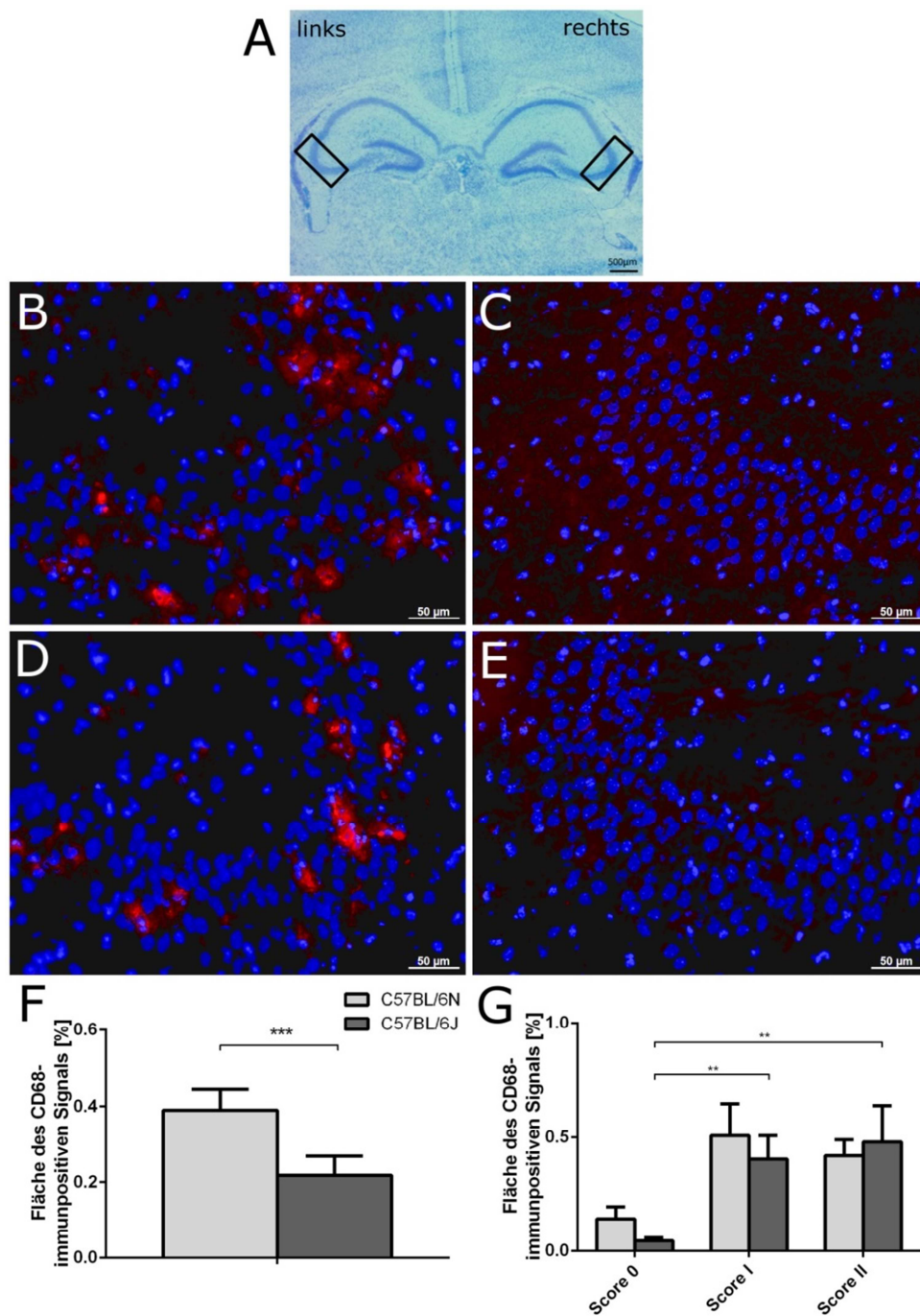


**Abb. 20: Zellproliferation.** Analyse der Zellproliferation mittels des Proliferationsmarkers Ki67 an Gehirnschnitten der Tiere vom C57BL/6N Unterstamm und vom C57BL/6J Unterstamm. Dargestellt wurden die Mittelwerte  $\pm$  SEM (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

### Aktivierte Mikroglia/Makrophagen: Detektion mittels CD68-Immunfluoreszenz

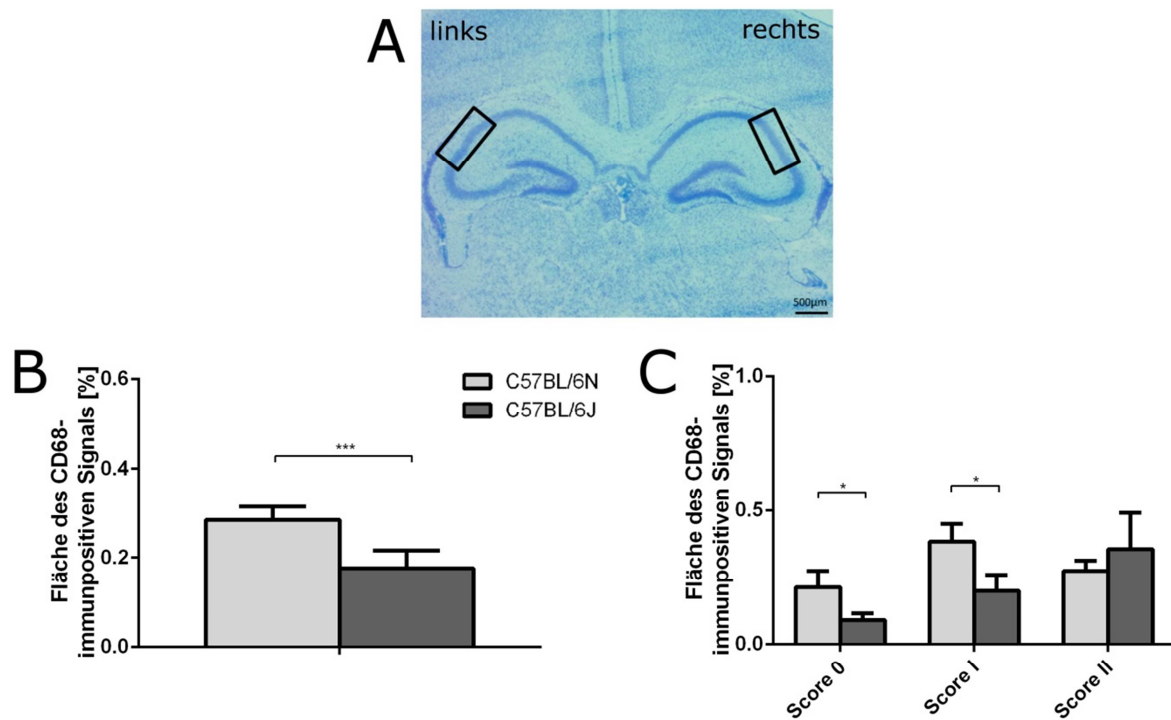
CD68 wurde als Marker für aktivierte Mikroglia und Makrophagen eingesetzt, welche während eines früh-postnatalen hypoxisch-ischämischen Insultes verstärkt auftreten. In den intakten rechten Hemisphären konnte durch diese immunhistologische Färbung kein Signal nachgewiesen werden. Die linken läsierten Hemisphären hingegen zeigten ein Signal. Somit stellte CD68 einen Marker für die hypoxisch-ischämische Gehirnläsion dar. In der Score-unabhängigen Betrachtung zeigte sich, dass sowohl in der CA3- als auch in der CA2/3-Region eine signifikant größere CD68-immunpositive Fläche in Tieren des C57BL/6N Unterstammes als in denen des C57BL/6J Unterstammes zu sehen war (Abb. 21F und Abb.

22B). Bei der Analyse der CD68-immunpositiven Fläche in den unterschiedlichen Scores war in den C57BL/6J Tieren in der CA3-Region ein Anstieg der CD68-immunpositiven Fläche zwischen Score 0 und Scores I / II zu erkennen (Abb. 21G und Abb. 22C). Dieser Anstieg war in der CA2/3 Region weniger ausgeprägt. Ein ähnliches Bild zeigte sich bei den Gehirnen der Tiere des C57BL/6N Stammes: In der CA2/3-Region war die CD68-immunpositive Fläche in allen Scores vergleichbar. In der CA3-Region konnte ein geringer, jedoch nicht signifikanter Anstieg der CD68-immunpositiven Fläche von Score 0 auf die Scores I und II detektiert werden (Abb. 21G). In der CA3-Region konnte kein Unterschied zwischen den beiden Unterstämmen innerhalb der Scores detektiert werden (Abb. 21G). Bei Betrachtung der CA2/3-Region war hingegen eine signifikant größere CD68-immunpositive Fläche in Score 0 und Score I der C57BL/6N Mäuse zu erkennen als bei den C57BL/6J Mäusen (Abb. 22C). In Score II konnte kein Unterschied zwischen den Stämmen detektiert werden.



**Abb. 21: Aktivierte Mikroglia/Makrophagen (CD68) der CA3-Region *in vivo*.** Darstellung der prozentualen Fläche des CD68-immunopositiven Signals in den läsierten linken Hemisphären. A) zeigt einen repräsentativen LFB-gefärbten Schnitt mit den untersuchten hippocampalen Arealen der läsierten linken und der intakten rechten Hemisphäre. Die umrandeten Areale zeigen, in welchem Bereich des Hippocampus die Analyse durchgeführt wurde (CA3-Region). B bis E) zeigen Fluoreszenzaufnahmen der CD68-immunhistologischen Färbung (rot) in der läsierten linken (B, D) und der intakten rechten Hemisphäre (C, E) der C57BL/6N (B, C) und der C57BL/6J (D, E) Mäuse. Zellkerne wurden mittels DAPI (blau) dargestellt. F) Quantifizierung der CD68-immunopositiven Fläche der linken Hemisphären der C57BL/6N- und der C57BL/6J Mäuse. In G) wurde die Quantifizierung der CD68-immunopositiven Fläche der linken Hemisphären der beiden Unterstämme nach Scores dargestellt. Gezeigt wurden die Mittelwerte  $\pm$  SEM (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

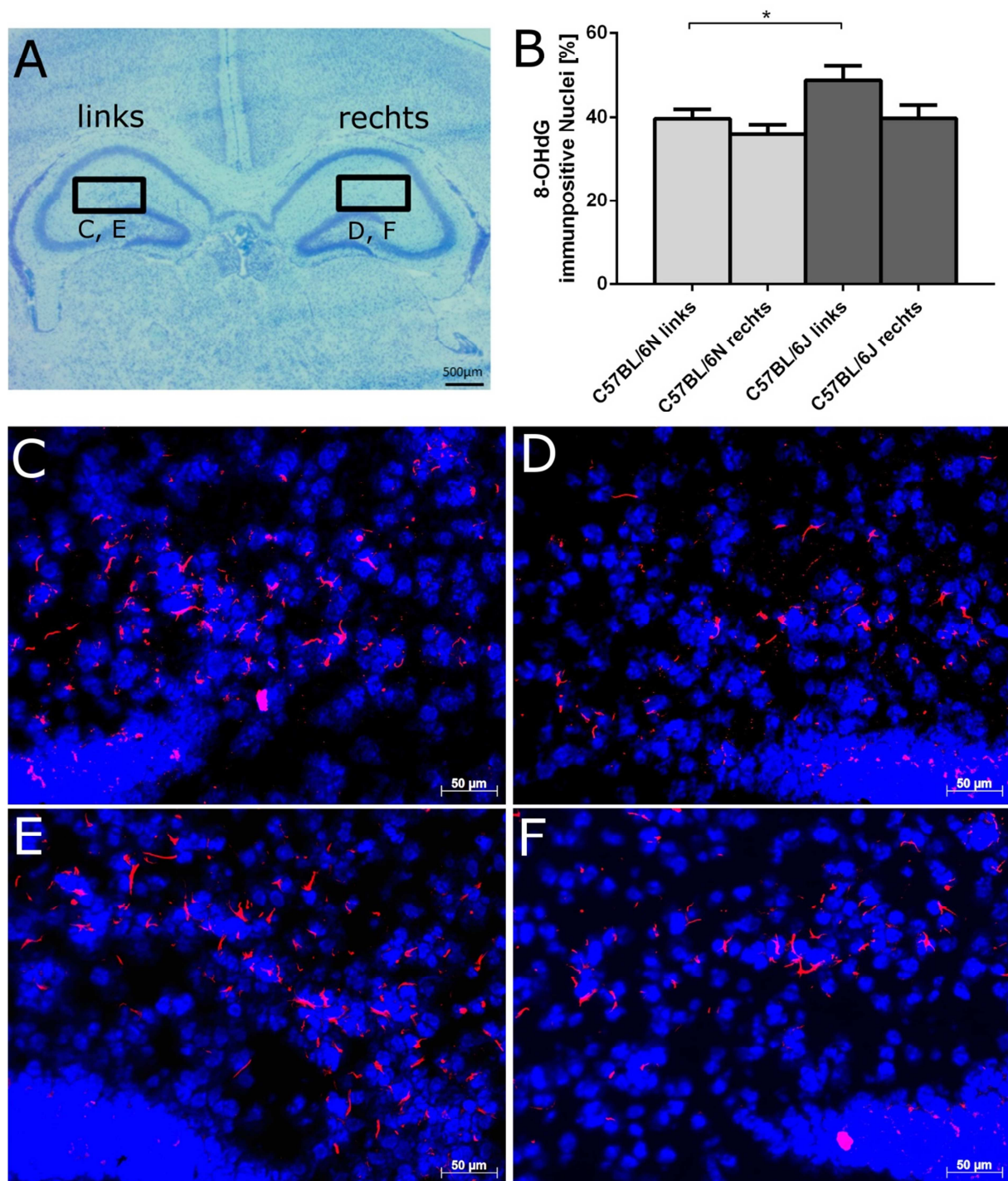




**Abb. 22: Aktivierte Mikroglia/Makrophagen (CD68) der CA2-3-Region *in vivo*.** Darstellung der prozentualen Fläche des CD68-immunpositiven Signals in den läsierten linken Hemisphären. A) zeigt einen repräsentativen LFB-gefärbten Schnitt mit den untersuchten hippocampalen Arealen der läsierten linken und der intakten rechten Hemisphäre. Die umrandeten Areale zeigen, in welchem Bereich des Hippocampus die Analyse durchgeführt wurde (CA2-3-Region). B) zeigt die Quantifizierung der CD68-immunpositiven Fläche der linken Hemisphären des C57BL/6N- und des C57BL/6J Unterstammes. C) Quantifizierung der CD68-immunpositiven Fläche der linken Hemisphären der beiden Unterstämme nach Scores. Gezeigt wurden die Mittelwerte  $\pm$  SEM (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

### 5.3.3 Analyse von Reaktiver Sauerstoffspezies mittels 8-OHdG

An den angefertigten Gefrierschnitten wurde ein immunhistologischer Nachweis von ROS-induzierter DNA/RNA-Schädigung mittels Antikörpern gegen 8-OHdG erbracht. 8-OHdG ist ein oxidatives Derivat von Guanosin und entsteht, wenn die DNA und RNA durch ROS geschädigt wird. In beiden Hemisphären wurden 8-OHdG-immunpositive Zellen detektiert (Abb. 23B-F). 40% der Zellen in den intakten rechten Hemisphären waren 8-OHdG-immunpositiv, so dass von einer prinzipiellen Oxidierung von Guanosin ausgegangen werden kann. Dabei zeigte sich kein Unterschied zwischen den Unterstämmen. In beiden Stämmen stieg die Anzahl der 8-OHdG-immunpositiven Zellen in den läsierten Hemisphären an. Allerdings zeigten die Gehirne der C57BL/6J Mäuse nach hypoxisch-ischämischer Läsion signifikant mehr 8-OHdG-immunpositive Zellen als die Gehirne der C57BL/6N Tiere (Abb. 23B).



**Abb. 23: Detektion von 8-OHdG *in vivo*.** Prozentualer Anteil der 8-OHdG-immunpositiven Zellen, bezogen auf die Gesamtzahl der Zellen (bestimmt über die Zahl der Zellkerne). A) zeigt einen repräsentativen LFB-gefärbten Schnitt, mit den untersuchten hippocampalen Arealen der läsierten linken und der intakten rechten Hemisphäre. Die umrandeten Areale zeigen, den Bereich der molekularen Schicht des Gyrus dentatus in dem die Analyse durchgeführt wurde. B) Quantifizierung der 8-OHdG-immunpositiven Zellen der linken Hemisphären der C57BL/6N- und der C57BL/6J Mäuse. Dargestellt wurden die Mittelwerte  $\pm$  SEM (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ). C bis F) 8-OHdG-Immunhistologische Färbung (rot) in der läsierten linken (C, E) und der intakten rechten Hemisphäre (D, F) der C57BL/6N (C, D) und der C57BL/6J (E, F) Tiere. Zellkerne wurden mittels DAPI (blau) dargestellt.

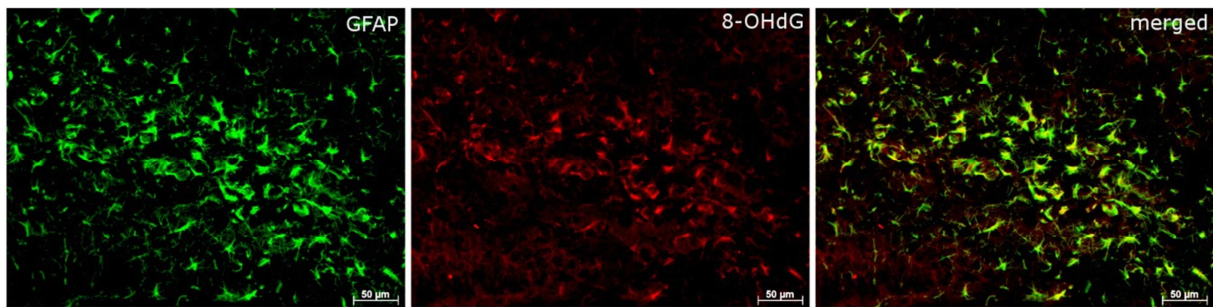
Anhand der *in vivo* Untersuchungen am Tiermodell des früh-postnatalen hypoxisch-ischämischen Insultes konnte gezeigt werden, dass das Fehlen des Nnt-Proteins einen Einfluss auf die Ausprägung einer früh-postnatalen hypoxisch-ischämischen Gehirnläsion hat. Jedoch zeigte sich entgegen der Ursprungshypothese, dass die Tiere des C57BL/6N Unterstammes, welche das Protein Nnt besitzen, eine stärkere hypoxisch-ischämische Gehirnläsion ausbildeten, als die Tiere des C57BL/6J Unterstammes. Bei allen Parametern, die zur Bestimmung des Läsionsausmaßes verwendet wurden, konnte dies beobachtet werden: In den Gehirnen von Tieren des C57BL/6N Unterstammes war das Läsionsareal größer, wurden vermehrt aktivierte Mikroglia/Makrophagen (CD68) nachgewiesen und eine höhere Zahl apoptotischer Zellen (CC3) detektiert als in Tieren des C57BL/6J Unterstammes. Die Betrachtung der ROS-induzierten DNA / RNA Schädigung mittels 8-OHdG zeigte allerdings, dass mehr 8-OHdG im Gehirn der C57BL/6J Tiere vorhanden war als bei den C57BL/6N Tieren.

#### **5.4 Analyse des Effektes des Nnt-Proteins auf die Zellschädigung nach OGD *in vitro***

In den bisherigen Versuchen konnte gezeigt werden, dass es in den Gehirnen des C57BL/6J Unterstammes – entgegen der Ursprungshypothese – zu einer geringeren Ausprägung einer früh-postnatalen hypoxisch-ischämischen Gehirnläsion kam als in den Gehirnen des C57BL/6N Unterstammes. Dagegen entsprach die Häufigkeit ROS-induzierter DNA-Schäden, dargestellt mittels 8-OHdG Immunfluoreszenz, den erwarteten Ergebnissen: C57BL/6J Tiere zeigten ein höheres Ausmaß an oxidiertem Guanodin als C57BL/6N Tiere. Das Protein Nnt ist an der Produktion von NADPH beteiligt, welches wiederum eine Rolle bei der Synthese und Entgiftung von freien Radikalen spielt (Balaban *et al.*, 2005; Gauthier *et al.*, 2013; Nickel *et al.*, 2014). Da ROS an der Zellschädigung im Rahmen eines hypoxisch-ischämischen Insultes beteiligt ist (Inder & Huppi, 2000; Cerio *et al.*, 2013), wurden wichtige Parameter der ROS-Bildung und des ROS-Abbaus analysiert. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Astrozyten der C57BL/6J Tiere, aufgrund ihrer Nnt-Deletion, nach Hypoxie mehr ROS produzieren.

##### **5.4.1 Die reaktive Sauerstoffspezies ist hauptsächlich in Astrozyten zu finden**

Mittels einer Doppelmarkierung von 8-OHdG und GFAP, einem astroglialen Intermediärfilament, das als Marker für Astrozyten verwendet wurde, konnte eine Co-Lokalisation der beiden Immunfluoreszenz-Signale nachgewiesen werden (Abb. 24). Dies deutete auf eine astrozytäre Lokalisation des 8-OHdG hin. Aus diesem Grund wurden für die folgenden *in vitro* Untersuchungen primäre Astrozyten verwendet.



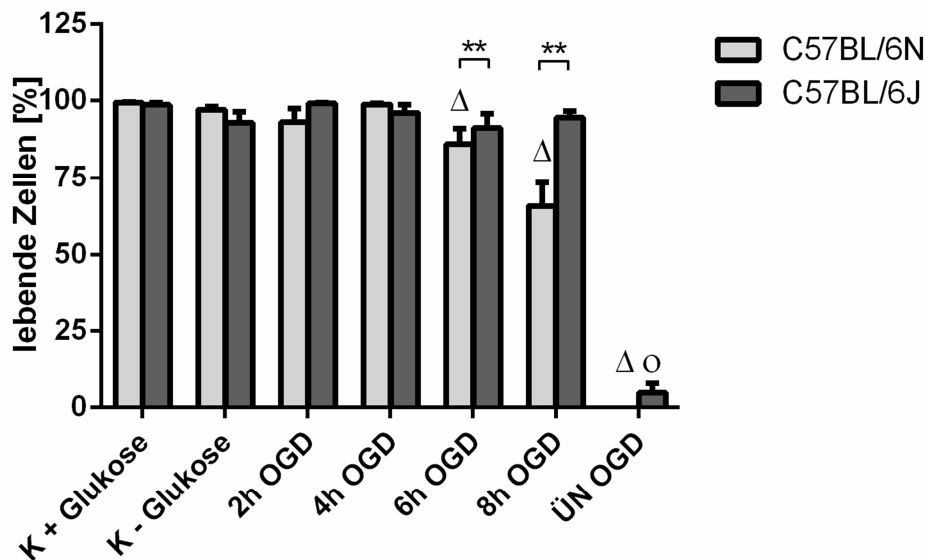
**Abb. 24: Co-Lokalisation von GFAP (grün) und 8-OHdG (rot).** Der optische Eindruck zeigt, dass der größte Teil der 8-OHdG-immunpositiven Zellen auch eine GFAP-Markierung besitzt (gelbes Signal im fusionierten rechten Bild (merged)).

Für diese Analysen wurde das Modell der „oxygen-glucose-deprivation“ (OGD) an primären Astrozyten der Tiere des C57BL/6N und des C57BL/6J Unterstammes etabliert. Dabei wurde den Zellen für eine definierte Zeit (2h, 4h, 6h, 8h, ÜN) Glukose entzogen und der Umgebungssauerstoff von 20% auf 1% reduziert. Im Anschluss an diese Phase der Sauerstoff-Glukose-Deprivation wurde den Zellen für einen Zeitraum von 2h wieder Glukose zugeführt und der Umgebungssauerstoff wieder auf 20% reguliert. Als physiologische Kontrolle dienten primäre Astrozyten des jeweiligen Unterstammes ohne OGD. Um auszuschließen, dass schon allein der Entzug der Glukose einen Effekt auf die Zellschädigung hat, wurden als weitere Kontrolle primäre Astrozyten des jeweiligen Unterstammes bei 20% Sauerstoff, jedoch ohne Glukose inkubiert. Analysiert wurden die Parameter Zellvitalität, ATP-Gehalt, ROS-Gehalt sowie verschiedene Komponenten der NADPH-Regeneration und somit des ROS Abbaus.

#### **5.4.2 Die Nnt-Deletion beeinflusst die Zellvitalität während der OGD**

Zur Bestimmung der Überlebensrate nach OGD wurde ein Life/Dead Assay angewandt. Die Ergebnisse des Life/Dead Assays der primären Astrozyten beider Stämme zeigten, dass bis zu einer OGD-Dauer von 4h keine Zellen durch die OGD starben. Ab einer OGD-Dauer von 6h nahm die Anzahl der lebenden Zellen im C57BL/6N Unterstamm ab, wobei nach einer OGD über Nacht keine Zellen lebenden Zellen mehr detektiert werden konnten (Abb. 25). Die C57BL/6J Zellen hingegen überlebten eine OGD von bis zu 8h; im Vergleich zur Kontrolle (K + Glukose) starben bis zu diesem Zeitpunkt keine Zellen. Wurde eine OGD jedoch über Nacht durchgeführt, gab es auch in C57BL/6J Astrozytenkulturen nur noch wenige lebende Zellen (Abb. 25). Bei dem Vergleich der unterschiedlichen Zeitpunkte der Überlebensraten der Astrozyten innerhalb eines Stammes, konnte detektiert werden, dass es bei den Astrozyten des C57BL/6N Unterstammes keinen Unterschied zwischen den Kontrollen (K+, K-) und den

Zeitpunkten 2h und 4h OGD gab. Die OGD-Dauer von 6h, 8h und ÜN hingegen zeigte eine signifikante Verringerung der Überlebensrate verglichen zur Kontrolle (K+) ( $p < 0,05$ ; im Diagramm Abb. 25Δ). Die Analyse der Astrozyten des C57BL/6J Unterstammes zeigte lediglich eine signifikante Verringerung der Überlebensrate der OGD über Nacht (ÜN) zur Kontrolle ohne Glukose (K-) ( $p < 0,05$ ; im Diagramm Abb. 25O).



**Abb. 25: Bestimmung der Zellvitalität *in vitro*.** Mittels eines Life/Dead-Assays wurde die Zellvitalität der Astrozyten zu unterschiedlichen Zeitpunkten der *oxygen-glucose-deprivation* (OGD) untersucht. Der prozentuale Anteil der lebenden Zellen wurde bezogen auf die Gesamtzahl der Astrozyten angegeben. Gezeigt wurden die Mittelwerte  $\pm$  SEM (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ). Signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe mit Glukose wurden mittels Δ markiert. Wurde ein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe ohne Glukose ermittelt, so wurde dies durch „O“ gekennzeichnet.

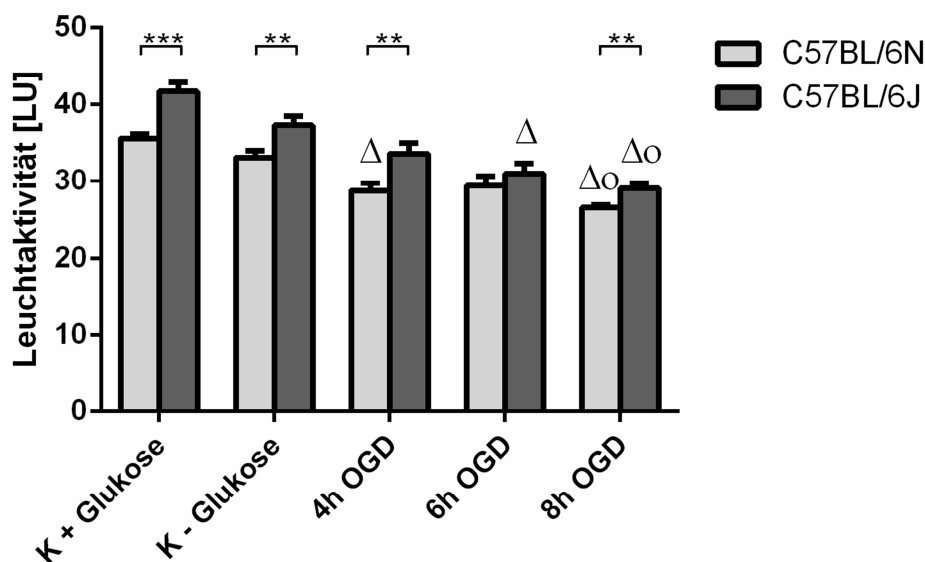
### 5.4.3 Die Nnt-Deletion erhöht den zellulären ATP-Gehalt in Astrozyten

ATP ist ein wichtiger Faktor bei der Generierung der ROS. Überschüssige Elektronen, die nicht für die Produktion von ATP benötigt werden, führen dabei zur Bildung von ROS (Turrens, 2003; Murphy, 2009). Unter pathologischen Bedingungen kommt es zu einer Verringerung der mitochondrialen ATP-Generierung und zu einer verstärkten Bildung von ROS (Murphy, 2009). Die Deletion des Nnt-Proteins führt ebenfalls zu einer verstärkten Bildung von ROS (Meimaridou *et al.*, 2012), wodurch die Hypothese aufgestellt wurde, dass es auch hier zu einer verringerten Synthese von ATP kommt.

Um zu überprüfen, a) ob sich der ATP-Gehalt in C57BL/6N und C57BL/6J Astrozyten unterscheidet, und b) ob eine OGD zu einer Veränderung des ATP-Gehalts in den Astrozyten führt, wurde ein ATP-Assay angewandt. Bei den Analysen wurde das ATP der gesamten

Zelle gemessen. Bereits unter physiologischen Kulturbedingungen (K + Glukose) wurde ein signifikanter Unterschied der zellulären ATP-Konzentration zwischen den C57BL/6N und C57BL/6J Astrozyten beobachtet ( $p < 0.001$ ).

Mit zunehmender OGD-Dauer nahm der ATP-Gehalt in beiden Stämmen signifikant ab (Abb. 26). Innerhalb des jeweiligen Unterstammes zeigten die Unterschiede von K+ und K- zu den jeweiligen OGD-Zeiten (4h, 6h, 8h) einen Signifikanzwert kleiner als 0,05 auf (Abb. 26). Ab einer OGD-Dauer von 4h blieb der ATP-Gehalt in den C57BL/6N Astrozyten gleich, wohingegen er in den C57BL/6J Astrozyten bis zum Zeitpunkt 8h OGD weiter absank, jedoch auch zu diesem Zeitpunkt noch signifikant über dem Wert der C57BL/6N Astrozyten lag.

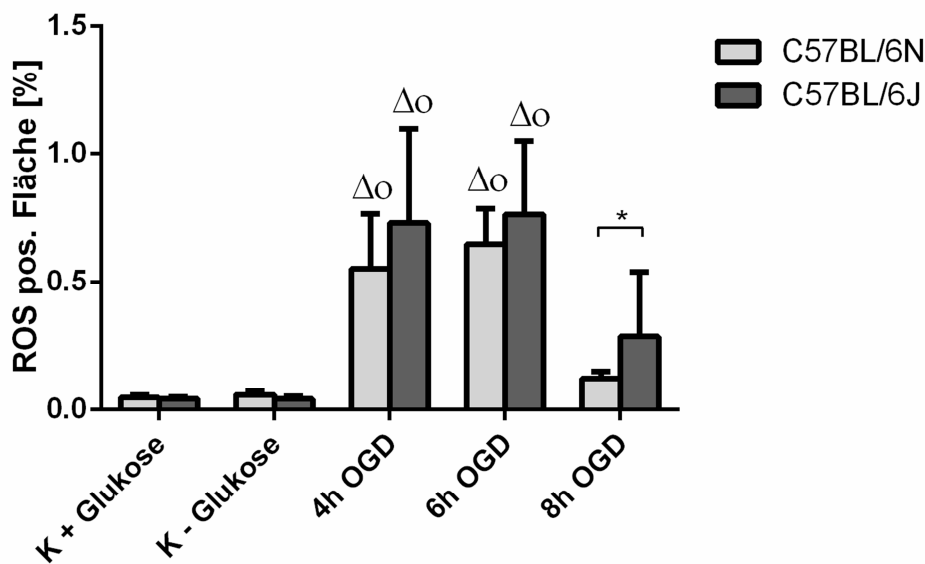


**Abb. 26: ATP-Detektion.** Darstellung des ATP-Gehaltes anhand der Leuchtaktivität (LU) der Luciferase in Astrozyten der C57BL/6N und C57BL/6J Tiere zu unterschiedlichen OGD-Zeitpunkten. Gezeigt wurden die Mittelwerte  $\pm$  SEM (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ). Signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe mit Glukose wurden mittels  $\Delta$  markiert. Wurde ein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe ohne Glukose ermittelt, so wurde dies durch „O“ gekennzeichnet.

#### 5.4.4 Der Einfluss des Nnt-Proteins auf den intrazellulären ROS-Gehalt in Astrozyten

##### Intrazelluläres ROS

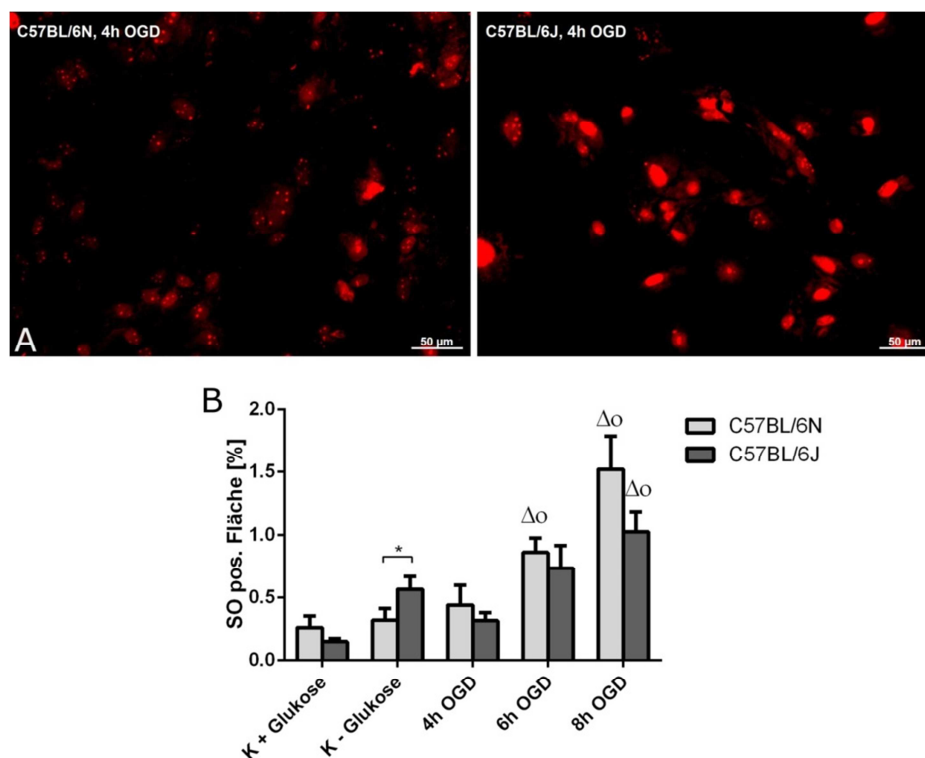
Zur Analyse des intrazellulären ROS-Gehaltes wurde ein ROS-Assay angewandt. Dieser Assay beruht auf der Fluoreszenz-Detektion des ROS in den Astrozyten. Das zu detektierende Fluoreszenzsignal entsteht dabei durch die Oxidation des im Kit enthaltenen, nicht fluoreszierenden, Substrates durch ROS. In beiden Unterstämmen war sowohl in der physiologischen Kontrolle (K+) als auch in der nicht-physiologischen Kontrolle (K-) nur eine sehr geringe ROS-positive Fläche vorhanden (Abb. 27). Der Sauerstoff-Glukose-Entzug resultierte in einem signifikanten Anstieg der ROS-positiven Fläche ( $p < 0.05$ ), wie über das ImageJ Programm ausgewertet wurde. Ab einer ODG-Dauer von 4h gab es in beiden Stämmen einen Anstieg der ROS-positiven Fläche, der bei einer OGD-Zeit von 8h jedoch kaum noch zu beobachten war. Diese zeitabhängigen Anstiege in der ROS-positiven Fläche waren innerhalb des jeweiligen Unterstammes signifikant ( $p < 0,05$ ). Zwischen den Astrozyten der C57BL/6N Tiere und der C57BL/6J Tiere konnte bei 8h OGD ein signifikanter Unterschied detektiert werden.



**Abb. 27: Reaktive Sauerstoffspezies (ROS).** Prozentuale Fläche des ROS-positiven Signals zu unterschiedlichen Zeitpunkten der OGD. Eine Zunahme der Fläche ist bei einer OGD von 4h festzustellen. Dargestellt wurden die Mittelwerte  $\pm$  SEM (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ). Signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe mit Glukose wurden mittels  $\Delta$  markiert. Wurde ein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe ohne Glukose ermittelt, so wurde dies durch „O“ gekennzeichnet.

### Intrazellulärer SO-Gehalt

Superoxid (SO) ist eine Form der ROS. Um den intrazellulären SO-Gehalt während der OGD zu bestimmen, wurde ein SO-Assay angewandt, der auf der Oxidation des nicht fluoreszierenden Substrates (im Kit enthalten) durch SO beruht, wodurch ein fluoreszierendes Signal entsteht. Die SO-positive Fläche war zu allen Konditionen und Zeitpunkten, mit Ausnahme der Astrozyten in Glukose-freiem (K- Glukose) Medium, in den Astrozyten des C57BL/6N Unterstammes vergleichbar der Fläche der Astrozyten des C57BL/6J Unterstammes. Ein Anstieg der SO-positiven Fläche war in beiden Stämmen erst ab einer OGD Dauer von 6h zu sehen, und setzte sich zum Zeitpunkt 8h OGD fort (Abb. 28). Wie bereits beim ROS-Assay beobachtet, konnte auch beim SO-Assay ein zeitabhängiger Anstieg der SO-positiven Fläche festgestellt werden. Die Unterschiede innerhalb des jeweiligen Unterstammes zeigten zwischen den Kontrollen (K+ und K-) und 6h OGD bzw. 8h OGD einen Signifikanzwert kleiner als 0,05.



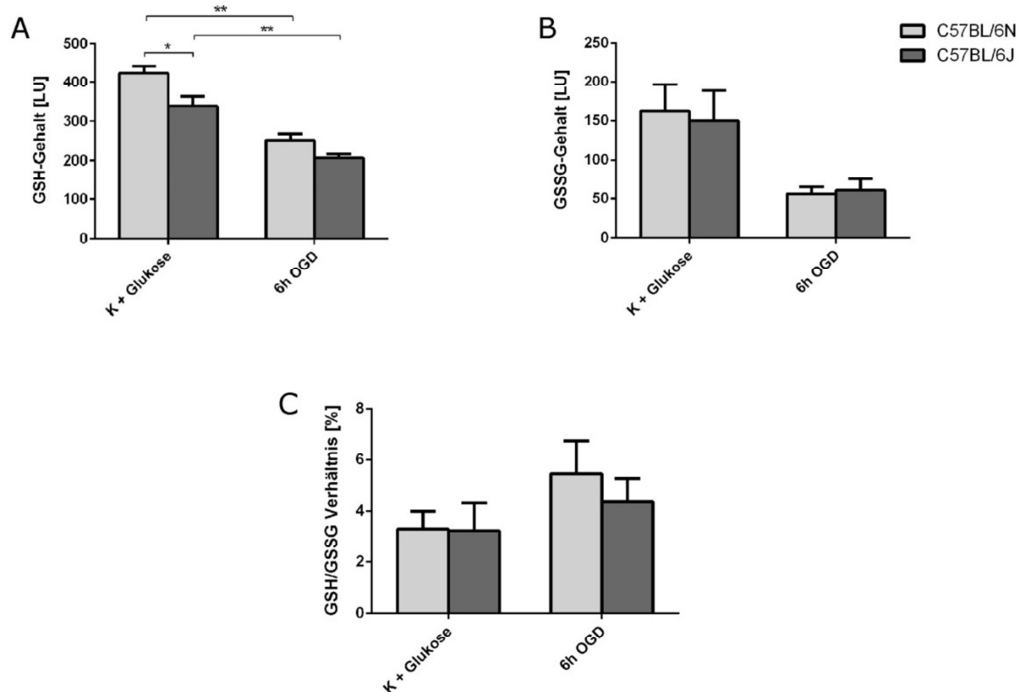
**Abb. 28: Superoxid (SO) Detektion.** A) Die SO-Fluoreszenz ist beispielhaft an Astrozyten der C57BL/6N (links) und C57BL/6J (rechts) Tiere nach 4h OGD dargestellt. B) Die quantitative Auswertung des SO-positiven Signals in Astrozyten wurde zu den verschiedenen OGD Zeitpunkten über die Berechnung der SO-positiven Fläche durchgeführt (ImageJ) und in Prozent angegeben. Gezeigt wurden die Mittelwerte  $\pm$  SEM (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ). Die Werte der Zeitpunkte 4h, 6h und 8h unterscheiden sich signifikant von der jeweiligen Kontrolle; signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe mit Glukose wurden mittels  $\Delta$  markiert. Wurde ein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe ohne Glukose ermittelt, so wurde dies durch „O“ gekennzeichnet.



### 5.4.5 Der Einfluss der Nnt-Deletion auf Glutathion

Ein wichtiger Bestandteil beim Abbau der ROS spielt Glutathion. Es existiert dabei in einer reduzierten (Glutathion; GSH) und in einer oxidierten Form, bei der zwei Peptide über eine Disulphidbrücke zu einem Dimer verbunden werden (Glutathion-Disulphid; GSSG). Da sich der Gehalt reaktiver Sauerstoffarten zwischen Astrozyten der C57BL/6N und der C57BL/6J Tiere unterschied, wurde in diesem Assay auf Proteine des Glutathion-Abbaus fokussiert, das GSH/GSSG System. Entscheidend ist in diesem Zusammenhang das Verhältnis des Monomers GSH zum Dimer GSSG, da GSSG bei zunehmendem oxidativem Stress akkumuliert und sich dadurch das GSH/GSSG-Verhältnis verringert.

In C57BL/6N Astrozyten wurde unter Kontrollbedingungen mehr GSH detektiert als in C57BL/6J Astrozyten (Abb. 29A). Nach 6h OGD sank der GSH-Gehalt in beiden Stämmen signifikant ab. Die GSSG-Werte waren hingegen zwischen C57BL/6N und C57BL/6J Astrozyten vergleichbar. Auch das GSH/GSSG-Verhältnis zeigte unter Kontrollbedingungen (K+ Glukose) keinen Unterschied zwischen den Unterstämmen. Ein Zeitraum von 6h OGD resultierte in einem geringfügigen, jedoch nicht signifikanten Anstieg des GSH/GSSG-Verhältnisses in beiden Unterstämmen (Abb. 29C).



**Abb. 29: Verhältnis von GSH zu GSSG.** Auswertung des GSH/GSSG-Verhältnisses bei Kontrollverhältnissen (K+ Glukose) und 6h OGD. Dabei zeigt A) den GSH Gehalt und B) den GSSG Gehalt der Zellen. In C) ist das GSH/GSSG Verhältnis dargestellt. Gezeigt wurden die Mittelwerte  $\pm$  SEM (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

Aufgrund des drastischen Unterschiedes zwischen den Astrozyten der C57BL/6N Mäuse und denen der C57BL/6J Tiere bezüglich der Zellvitalität nach einer OGD wurde erwartet, dass es ebenfalls Differenzen bezüglich der Produktion, dem Gehalt und dem Abbau von ROS gibt. Anhand der untersuchten Parameter zur Produktion, zum Gehalt und zum Abbau der ROS nach einer OGD konnten geringe Unterschiede zwischen den Astrozyten der C57BL/6N Tiere und den Astrozyten des C57BL/6J Unterstammes detektiert werden.

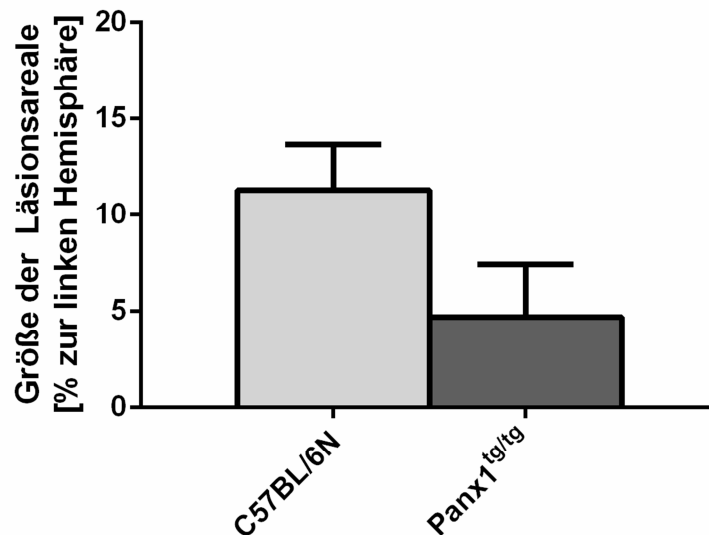
## **5.5 Analyse des Effektes von Panx1 auf die Ausprägung einer früh-postnatalen hypoxisch-ischämischen Gehirnläsion *in vivo***

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde untersucht, ob Panx1-Kanäle eine Bedeutung für die Ausprägung des früh-postnatalen hypoxisch-ischämischen Hirnschadens haben. Dazu wurde – wie auch im ersten Teil der Arbeit – die unilaterale hypoxisch-ischämische Hirnläsion an sieben Tage alten Mäusen induziert. Analysiert wurden folgende Mauslinien: Homozygote Panx1-transgene Mäuse exprimieren, bedingt durch die Insertion einer  $\beta$ -Gal-Kassette in Exon 1 des *Panx1*-Gens, kein Panx1-Protein (Panx1<sup>tg/tg</sup>). Im Vergleich dazu wurden C57BL/6N Mäuse verwendet, da die Panx1-transgenen Mäuse auf diesem Mausstamm beruhen (Anselmi *et al.*, 2008).

Die Panx1-Kanäle verbinden das Zytoplasma mit dem Extrazellulärraum (MacVicar & Thompson, 2010) und sind primär Kanäle für ATP. Im Rahmen eines hypoxisch-ischämischen Insultes wird durch ATP-Efflux u.a. der Zelltod induziert. Daher ist die Hypothese, dass eine Panx1-Defizienz zu einer verminderten Ausprägung einer früh-postnatalen hypoxisch-ischämischen Läsion führt.

### **Größe der Läsionsareale**

In den durchgeführten Analysen wurden 26 Tiere des C57BL/6N Unterstammes und 12 Tiere des Panx1-transgenen Stammes verwendet. Insgesamt wurden im C57BL/6N Unterstamm 45 Tiere und im Panx1-transgenen Stamm 13 Tiere einer hypoxischen Ischämie unterzogen. Zur Analyse des Effektes einer Panx1-Deletion auf die Ausprägung einer früh-postnatalen hypoxisch-ischämischen Gehirnläsion, wurde bei den hypoxierten Tieren des C57BL/6N Unterstammes und den Tieren des Panx1-transgenen Stammes die Größe der Läsionsareale bestimmt. Die Tiere des C57BL/6N Unterstammes zeigten eine nicht signifikant größere Läsionsfläche als die Tiere des Panx1-transgenen Stammes (Abb. 30).



**Abb. 30: Darstellung der Größe der Läsionsareale.** Die Fläche der Läsion in der läsionierten linken Hemisphäre der Tiere des C57BL/6N Unterstammes und der Panx1-transgenen Tiere (= Panx1<sup>tg/tg</sup>) wurde in Bezug auf die Gesamtfläche der linken Hemisphäre (in %) angegeben. Darstellung der Läsionsfläche beider Unterstämme. Dargestellt wurden die Mittelwerte  $\pm$  SEM.

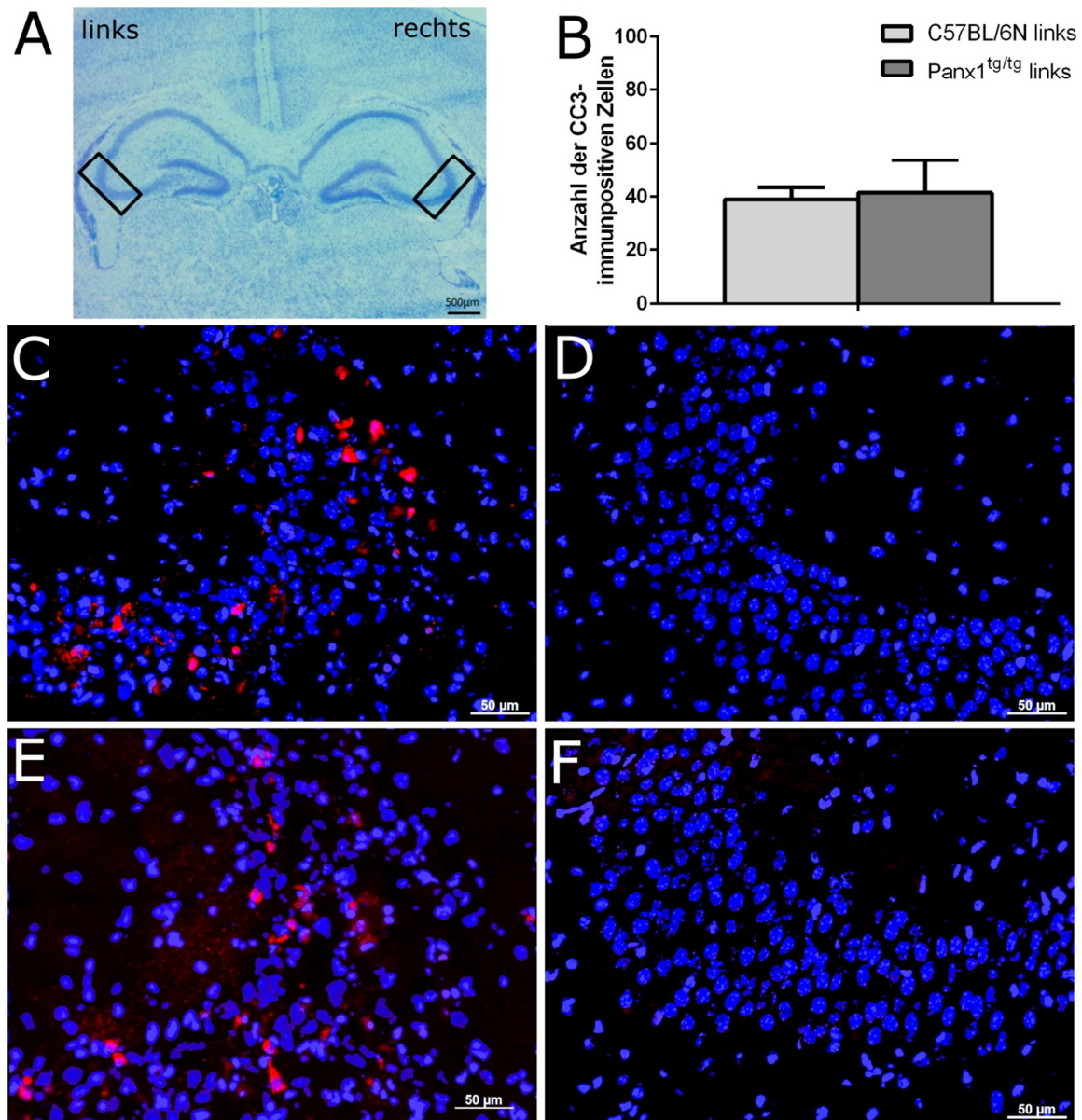
### Analyse des Zellschadens nach einem früh-postnatalen hypoxisch-ischämischen Insult

Um die Auswirkungen des früh-postnatalen hypoxisch-ischämischen Insult zu untersuchen, wurden mittels immunhistologischer Färbung zwei wichtige Prozesse analysiert: die Apoptose über den Nachweis der Cleaved Caspase-3 (CC3) und aktivierte Mikroglia/Makrophagen mittels CD68. Die Quantifizierung der Immunfluoreszenzen erfolgte über eine Auszählung der immunpositiven Zellen im Bereich der CA3-Region der Hippocampusformation (für CC3) bzw. über Auswertung der immunpositiven Fläche der CA3-Region mittels ImageJ (für CD68). Ausgewertet wurden sowohl die läsionierten linken Hemisphären als auch die intakten rechten Hemisphären. Da die Werte aller rechten Hemisphären bei der CC3-Immunfärbung bei 0 und bei der CD68-Immunfärbung unter 0,043% lagen, wurden im Folgenden nur die Werte der linken Hemisphären (Mittelwerte  $\pm$  SEM) dargestellt.

### Apoptose-Detektion mittels Cleaved Caspase-3 (CC3) Immunfluoreszenz

Bei der Analyse der CC3-immunpositiven Zellen konnte in den intakten rechten Hemisphären kein Signal detektiert werden, in den linken läsionierten Hemisphären hingegen schon. Aus diesem Grund wurde CC3 als Marker für eine hypoxisch-ischämische Gehirnläsion

verwendet. Zwischen der Anzahl apoptotischer Zellen in den läsierten Hemisphären der C57BL/6N Tiere und denen der Panx1-transgenen Mäuse konnte hingegen kein Unterschied detektiert werden (Abb. 31).



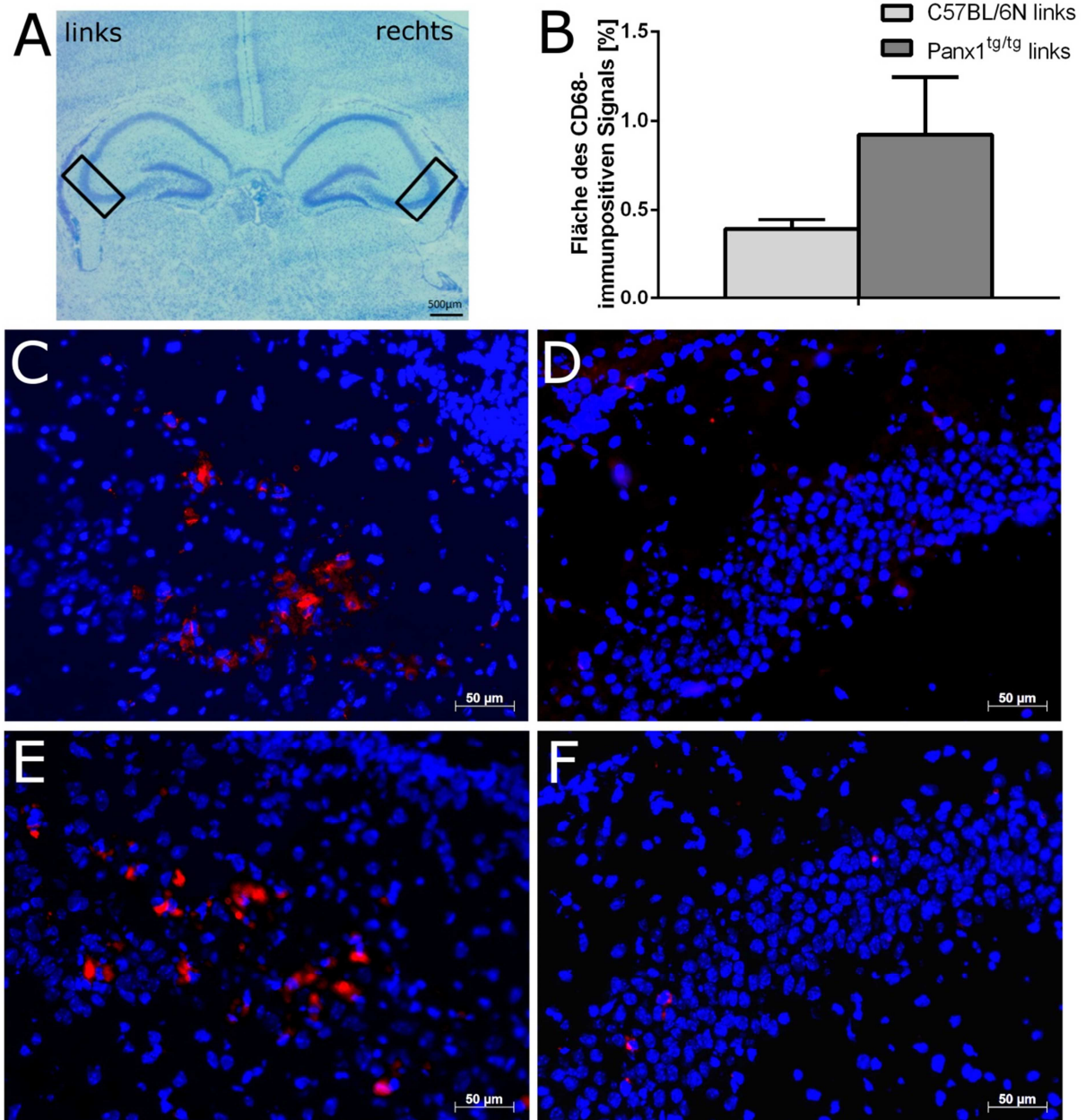
**Abb. 31: Apoptosemarker: Cleaved Caspase-3 (CC3) *in vivo*.** Anzahl der CC3-immunopositiven Zellen A) zeigt einen repräsentativen LFB-gefärbten Schnitt, mit den untersuchten hippocampalen Arealen der läsierten linken und der intakten rechten Hemisphäre. Die umrandeten Areale zeigen, in welchem Bereich des Hippocampus die Analyse durchgeführt wurde (CA3-Region). B) Quantifizierung der CC3-immunopositiven Zellen der linken Hemisphären der C57BL/6N- und der Panx1-transgenen (= Panx1<sup>tg/tg</sup>) Mäuse. C bis F) zeigen Fluoreszenzaufnahmen der CC3-Immunfluoreszenz Färbung (rot) in der läsierten linken (C, E) und der intakten rechten Hemisphäre (D, F) der C57BL/6N (C, D) und der Panx1-transgenen (E, F) Mäuse. Zellkerne wurden mittels DAPI (blau) dargestellt.

## **Aktivierte Mikroglia/Makrophagen: Detektion mittels CD68-Immunfluoreszenz**

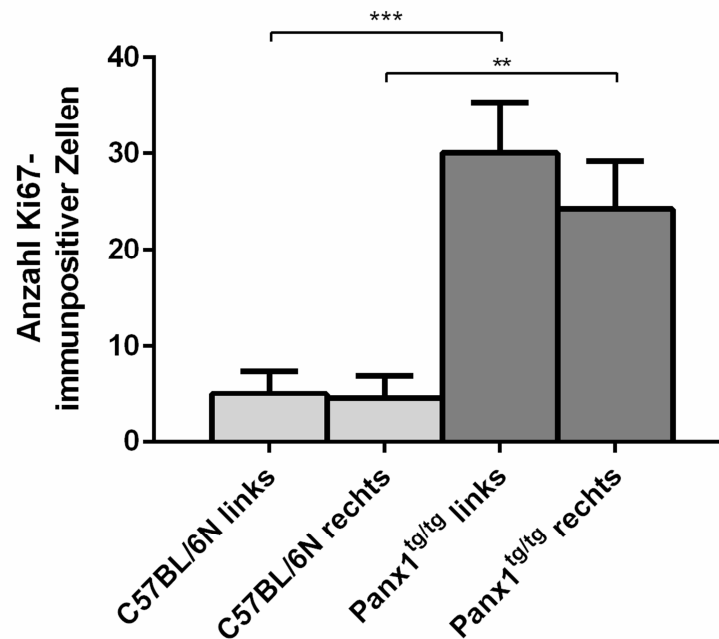
Die CD68-Immunfärbung zeigte in den rechten intakten Hemisphären kein Signal. Im Vergleich dazu konnte in den linken läsierten Hemisphären ein CD68-immunpositives Signal detektiert werden. Somit konnte auch die CD68-Markierung als Parameter für die hypoxisch-ischämische Gehirnläsion verwendet werden. In den läsierten Hemisphären der Panx1-transgenen Tiere wurde eine nicht signifikant größere Fläche des CD68-immunpositiven Signals detektiert als in den linken Hemisphären der C57BL/6N Mäuse (Abb. 32).

### **5.5.1 Die Panx1-Deletion beeinflusst die Proliferation**

Zur Überprüfung ob die Deletion von Panx1 zu einer veränderten Zellproliferation im Gehirn führt und ob sich die Zellproliferation nach einer früh-postnatalen hypoxisch-ischämisch-bedingten Zellschädigung im umliegenden Gewebe erhöht, wurde an den Gefrierschnitten der Gehirne eine Ki67-Immunfärbung durchgeführt. Mittels der Immunfärbung wurde detektiert, dass die Panx1-transgenen Tiere (links durchschnittlich  $30 \pm 5,3$  Zellen, rechts  $24,2 \pm 5$  Zellen) eine signifikant höhere Proliferation neuraler Zellen zeigten als die C57BL/6N Tiere (links durchschnittlich  $4,9 \pm 1,2$  Zellen, rechts  $4,3 \pm 1,3$  Zellen) (Abb. 33). Der hypoxisch-ischämische Insult hingegen hatte keinen Einfluss auf die Zellproliferation. Die Tiere des C57BL/6N Unterstammes zeigten keinen Unterschied in der Proliferation zwischen der läsierten linken und der intakten rechten Hemisphäre. Bei den Panx1-transgenen Mäusen war eine sehr geringe und nicht signifikante Erhöhung der Proliferation in den läsierten linken Hemisphären zu erkennen (Abb. 33).



**Abb. 32: Aktivierte Mikroglia/Makrophagen (CD68) *in vivo*.** Darstellung der prozentualen Fläche des CD68-immunpositiven Signals. A) zeigt einen repräsentativen LFB-gefärbten Schnitt, mit den untersuchten hippocampalen Arealen der läsierten linken und der intakten rechten Hemisphäre. Die umrandeten Areale zeigen, in welchem Bereich des Hippocampus die Analyse durchgeführt wurde (CA3-Region). B) Quantifizierung der CD68-immunpositiven Fläche der linken Hemisphären der C57BL/6N- und der Panx1-transgenen (= Panx1) Tiere. C bis F) zeigen Fluoreszenzaufnahmen der CD68-immunhistologischen Färbung (rot) in der läsierten linken (C, E) und der intakten rechten Hemisphäre (D, F) der C57BL/6N (C, D) sowie der Panx1-transgenen (E, F) Tiere. Zellkerne wurden mittels DAPI (blau) dargestellt.

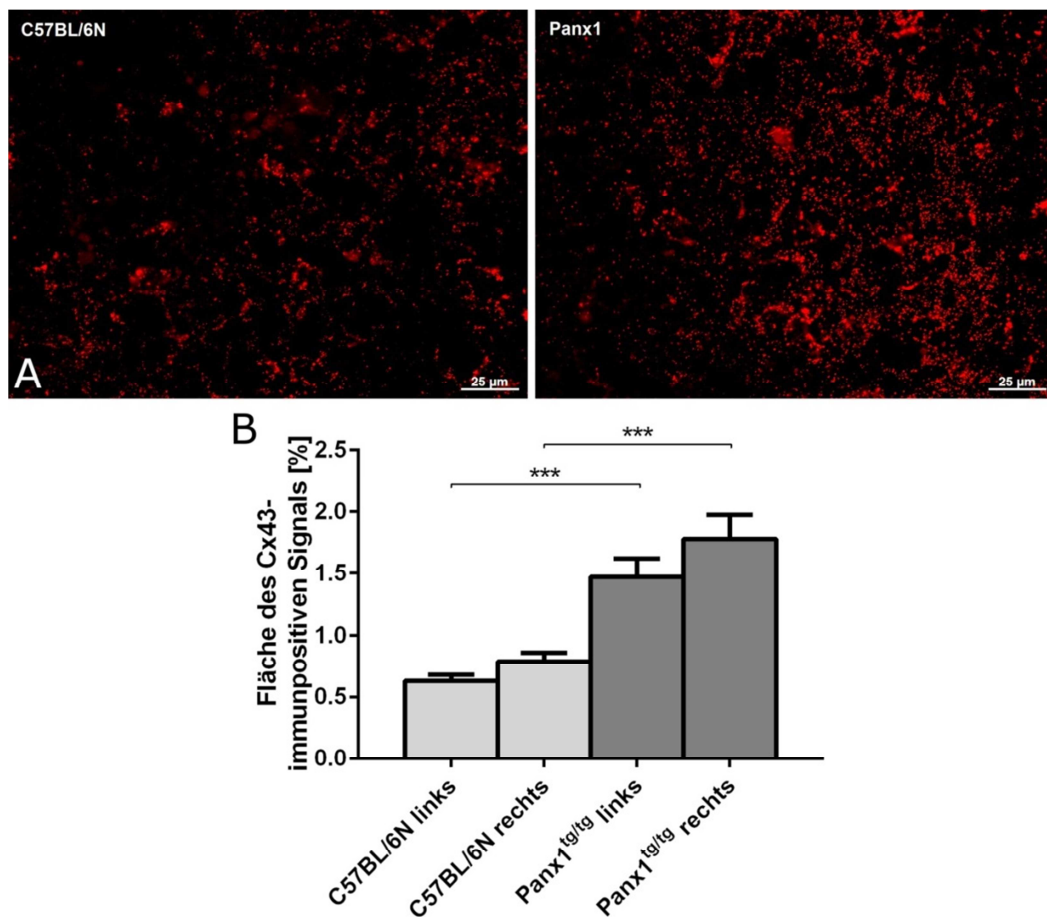


**Abb. 33: Zellproliferation.** Der Marker Ki67 zeigt die Zellproliferation an Gehirnschnitten der Tiere vom C57BL/6N Unterstamm und von Panx1-transgenen Tieren (= Panx1<sup>tg/tg</sup>). Dargestellt wurden die Mittelwerte ± SEM (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

### 5.5.2 Der Einfluss der Panx1-Deletion auf Connexin 43

Bei Cx43 handelt es sich um ein Gap Junction Protein, welches im Nervensystem vorzugsweise in Astrozyten zu finden ist (Dermietzel *et al.*, 1991). Änderungen der Cx43 Expression wurden in der Ratte nach perinatale Hypoxie/Ischämie bereits beschrieben (Wasielewski *et al.*, 2012). Ähnlich wie Panx1 ist auch Cx43 permeabel für ATP (Kang *et al.*, 2008). Aus diesem Grund wurde vermutet, dass es durch die Deletion von Panx1 zu einer kompensatorischen Cx43-Expression kommen könnte. Mit Hilfe der Cx43-Immunfluoreszenz wurde festgestellt, dass die Panx1-transgenen Tiere signifikant mehr Cx43-immunpositive Zellen im Gehirn zeigten als die C57BL/6N Mäuse (Abb. 34). Dieser Unterschied war sowohl in den läsierten linken als auch in den rechten Hemisphären signifikant. Eine signifikante hypoxisch-ischämisch-induzierte Veränderung der Cx43 Expression in den linken Hemisphären konnte jedoch weder in C57BL/6N Mäusen noch in Panx1-transgenen Tieren gezeigt werden.





**Abb. 34: Gap Junction Protein Connexin 43.** Darstellung der Cx43-Immunfluoreszenz der läsierten linken Hemisphären im Bereich des Gyrus dentatus der C57BL/6N Tiere und bei Panx1-transgenen Mäusen (= Panx1<sup>tg/tg</sup>) (A) sowie die Quantifizierung der prozentualen Fläche des Cx43-immunpositiven Signals in den läsierten linken und rechten Hemisphären (B). Gezeigt wurden die Mittelwerte  $\pm$  SEM (\*\*\*)  $p < 0,001$ ).

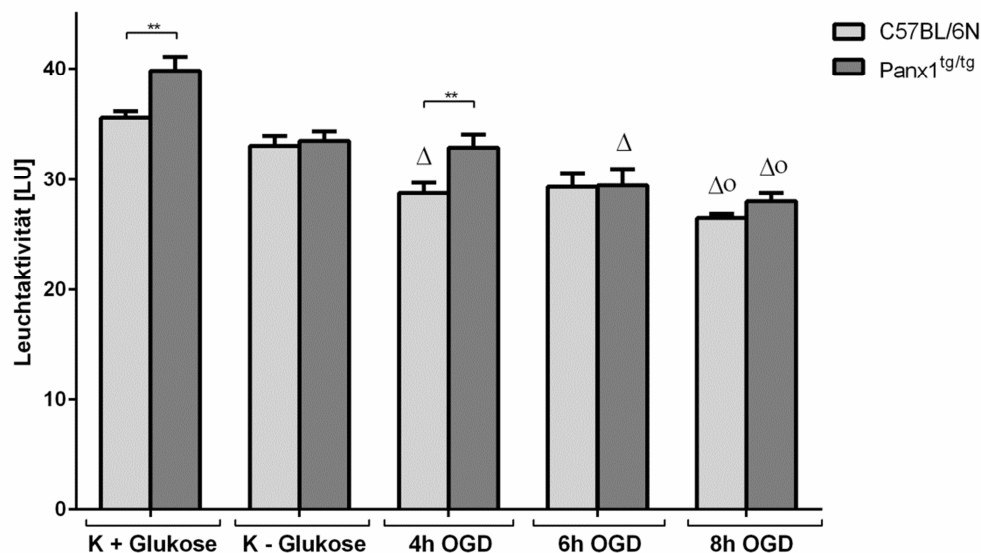
### 5.6 Analyse des Effektes von Panx1 auf die Zellschädigung nach OGD *in vitro*

Anhand der *in vivo* Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass die Deletion von Panx1 einen geringfügigen, jedoch nicht signifikanten Einfluss auf Läsionsgröße, Apoptose, Mikroglia-Aktivierung und Proliferation nach einer früh-postnatalen hypoxisch-ischämischen Gehirnläsion hat. Um Zelltyp-spezifische und detailliertere Analysen der ATP und ROS Signalwege durchzuführen, wurden Untersuchungen an Astrozytenkulturen der C57BL/6N und Panx1-transgenen Stämme durchgeführt. Analysiert wurden ATP-Gehalt, ROS-Gehalt und ROS-Abbau unter hypoxisch-ischämischen Bedingungen (OGD).

### 5.6.1 Der Einfluss von Panx1 auf den zellulären ATP-Gehalt in Astrozyten

Locovei et al. konnten zeigen, dass der Kanal Pannexin 1 als ATP-Kanal dient (Locovei *et al.*, 2006a; Locovei *et al.*, 2006b; Locovei *et al.*, 2007). Somit sind Änderungen des ATP-Gehaltes in Panx1-transgenen Tieren nach einem hypoxisch-ischämischen Insult zu erwarten.

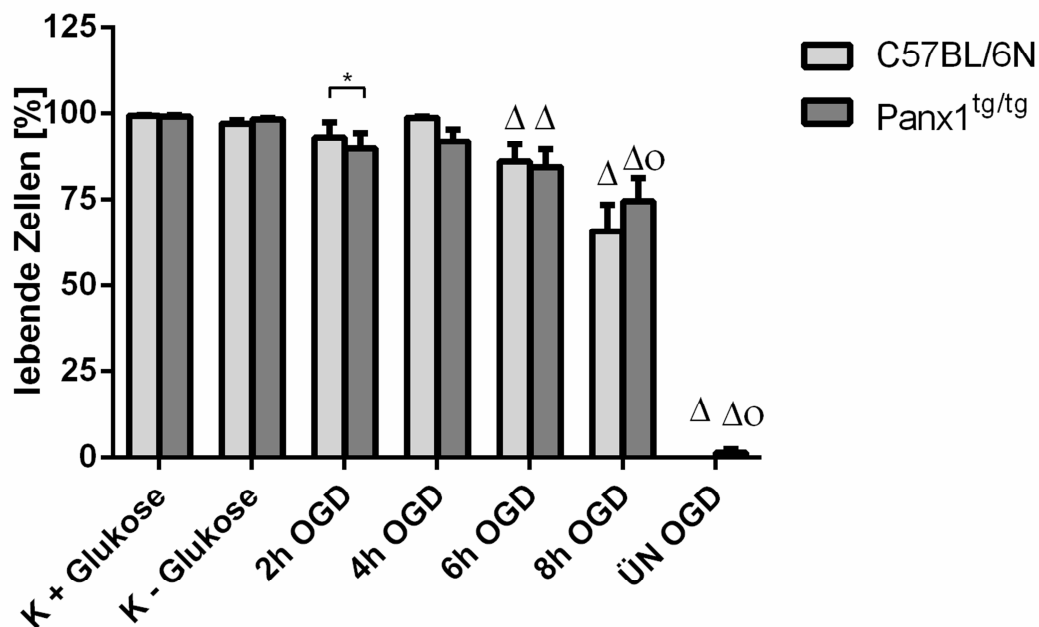
Zur Analyse des zellulären ATP-Gehaltes wurde ein ATP-Luciferase-Assay durchgeführt. Mittels dieses ATP-Assays konnte gezeigt werden, dass C57BL/6N Astrozyten unter Kontrollbedingungen (Abb. 35, K+) sowie nach 4 Stunden OGD einen signifikant geringeren ATP-Gehalt aufwiesen als die Panx1-transgenen Astrozyten. Insgesamt war ein geringfügiger Abfall des ATP mit zunehmender OGD-Dauer zu verzeichnen. Der Vergleich des ATP-Gehaltes innerhalb eines Stammes zeigte, dass die Astrozyten des C57BL/6N Unterstammes eine signifikante Verringerung bei 4h und 8h OGD verglichen zur Kontrolle (K+) aufwiesen. Bei 8h OGD konnte dazu noch eine signifikante Verringerung des ATP-Gehaltes zur Kontrolle ohne Glukose (K-) detektiert werden. Bei den Astrozyten des Panx1-transgenen Stammes wurde eine signifikante Verringerung des ATP-Gehaltes zwischen der Kontrolle (K+) und den Zeitpunkten 6h und 8h OGD detektiert. Auch zeigte sich eine signifikante Verringerung des ATP-Gehaltes zwischen der Kontrolle ohne Glukose (K-) und einer OGD von 8h (in Abb. 35).



**Abb. 35: ATP-Assay.** Darstellung des ATP-Gehaltes der Astrozyten des C57BL/6N Unterstammes und der Panx1-transgenen Tiere (= Panx1<sup>tg/tg</sup>) zu unterschiedlichen OGD-Zeitpunkten. Gezeigt wurden die Mittelwerte  $\pm$  SEM (\*\*  $p < 0,01$ ). Signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe mit Glukose wurden mittels  $\Delta$  markiert. Wurde ein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe ohne Glukose ermittelt, so wurde dies durch O gekennzeichnet.

### 5.6.2 Der Einfluss der Panx1-Deletion auf die Zellvitalität während der OGD

Zur Bestimmung der Überlebensrate nach OGD wurde ein Life/Dead Assay durchgeführt. Dieser zeigte, außer bei 2h OGD, keinen Unterschied in der Überlebensrate während der OGD zwischen den primären Astrozyten der C57BL/6N Tiere und der Panx1-transgenen Tiere (Abb. 36). Bis zu einer Dauer von 4h OGD waren nahezu 100% der Zellen vital. Ab einer Dauer von 6h OGD sank die Zahl der überlebenden Zellen. Kaum lebende Zellen konnten hingegen bei einer OGD über Nacht (ÜN) detektiert werden. Ab einer OGD von 6h waren innerhalb der jeweiligen Stämme die Verringerungen der lebenden Zellen zur Kontrolle mit Glukose signifikant.



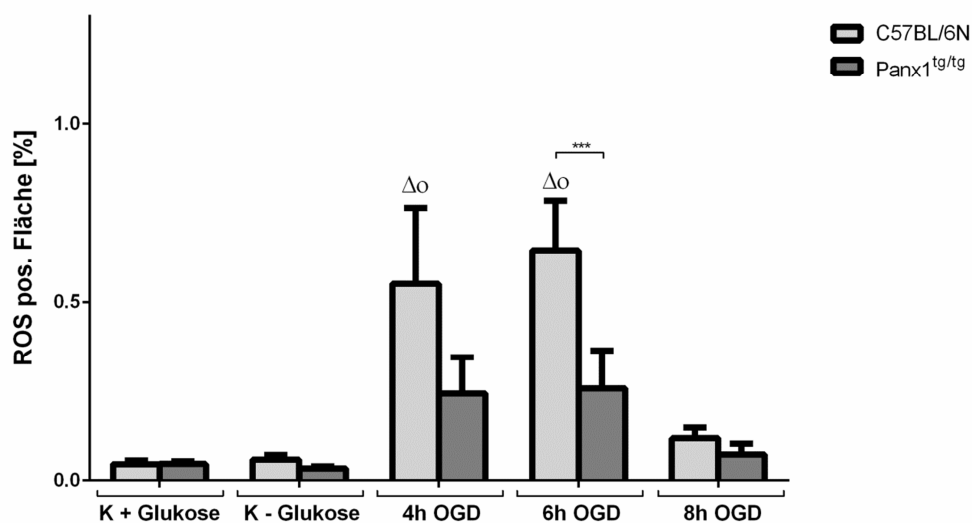
**Abb. 36: Bestimmung der Zellvitalität.** Mittels des Life/Dead-Assays wurde die Zellvitalität der Astrozyten des C57BL/6N Unterstammes und der Panx1-transgenen Tiere (= Panx1<sup>tg/tg</sup>) zu unterschiedlichen Zeitpunkten der oxygen-glucose-deprivation (OGD) untersucht. Der prozentuale Anteil der lebenden Zellen wurde angegeben. Gezeigt wurden die Mittelwerte  $\pm$  SEM (\*  $p < 0,05$ ). Signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe mit Glukose wurden mittels  $\Delta$  markiert. Wurde ein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe ohne Glukose ermittelt, so wurde dies durch „O“ gekennzeichnet.

### 5.6.3 Der Einfluss der Panx1-Deletion auf den intrazellulären Gehalt der ROS

Es wird vermutet, dass die Quelle für die postischämische Bildung von ROS in der mitochondrialen Atmungskette liegt (Boveris & Cadenas, 1975; Poderoso *et al.*, 1999;

Almeida *et al.*, 2002; Ten & Starkov, 2012). Während eines hypoxisch-ischämischen Insultes geht die mitochondriale Membranintegrität verloren, wodurch eine mitochondriale Dysfunktion entsteht. Durch diese mitochondriale Dysfunktion kommt es zu einem Anstieg in der ROS-Generierung (Ten & Starkov, 2012). Da es durch die Deletion von Panx1 in den Panx1-transgenen Tieren zu einer Veränderung im ATP-Haushalt kommt, sollte auch ein Unterschied im intrazellulären ROS-Gehalt vorliegen.

Die Ergebnisse des ROS-Assay zeigten, dass es in den Kontrollen (K<sup>+</sup> und K<sup>-</sup>) in beiden Stämmen eine geringe ROS-positive Fläche gab (Abb. 37), woraus sich ableiten lässt, dass die Astrozyten ohne Stresseinwirkung durch OGD nur sehr wenig ROS besitzen. Bei einer OGD von 4h und 6h stieg die ROS-positive Fläche in beiden Stämmen an. Der Anstieg war in den Astrozyten der C57BL/6N Mäuse doppelt so hoch (signifikant zur Kontrolle mit Glukose), wie in den Astrozyten der Panx1-transgenen Tieren (nicht signifikant zur Kontrolle mit Glukose) (Abb. 37). Verglichen zwischen den beiden Stämmen, war dieser Unterschied bei 6h OGD signifikant. Hingegen konnte nach 8 Stunden OGD ein starker Abfall der ROS-positiven Fläche detektiert werden.

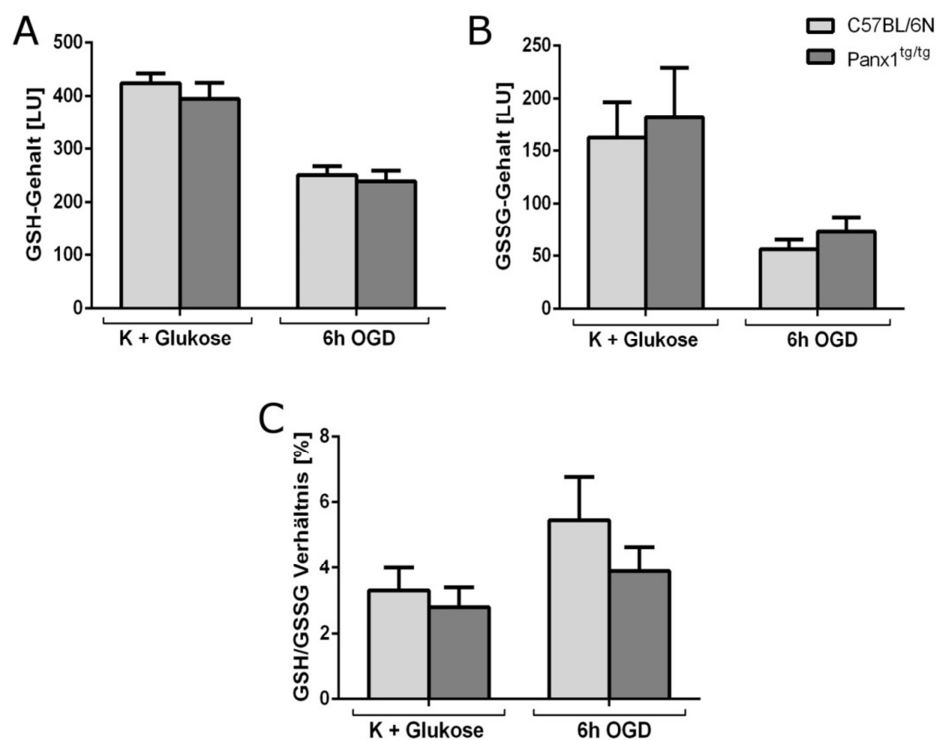


**Abb. 37: Detektion der Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS).** Stellt die prozentuale Fläche des ROS-positiven Signals der Astrozyten des C57BL/6N Unterstammes und der Panx1-transgenen Tiere (= Panx1<sup>tg/tg</sup>) zu unterschiedlichen OGD-Zeitpunkten dar. Gezeigt wurden die Mittelwerte  $\pm$  SEM (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ). Signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe mit Glukose wurden mittels  $\Delta$  markiert. Wurde ein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe ohne Glukose ermittelt, so wurde dies durch „O“ gekennzeichnet.

### 5.6.4 Der Einfluss der Panx1-Deletion auf Glutathion

Glutathion spielt eine wichtige Rolle beim Abbau von ROS. Es existiert in einer reduzierten (GSH) und in einer oxidierten Form (GSSG), bei der zwei Peptide über eine Disulphidbrücke zu einem Dimer verbunden werden (Glutathion-Disulphid; GSSG). In diesem Assay wurde der Fokus auf die Proteine des Glutathion-Abbaus gelegt, das GSH/GSSG System. In diesem Zusammenhang ist das Verhältnis des Monomers GSH zum Dimer GSSG entscheidend, da GSSG bei zunehmendem oxidativem Stress akkumuliert und sich dadurch das GSH/GSSG-Verhältnis verringert.

Da bei 6 Stunden OGD die höchsten ROS-Werte gemessen wurden, wurde die Detektion des GSH und GSSG zu diesem Zeitpunkt analysiert. Die OGD resultierte sowohl in C57BL/6N- als auch in Panx1-Astrozyten in einem leichten, jedoch nicht signifikanten, Abfall der GSH und GSSG Werte (Abb. 38). Die Ratio GSH/GSSG war unter Kontrollbedingungen (K + Glukose) und nach 6 Stunden OGD ebenfalls unverändert.



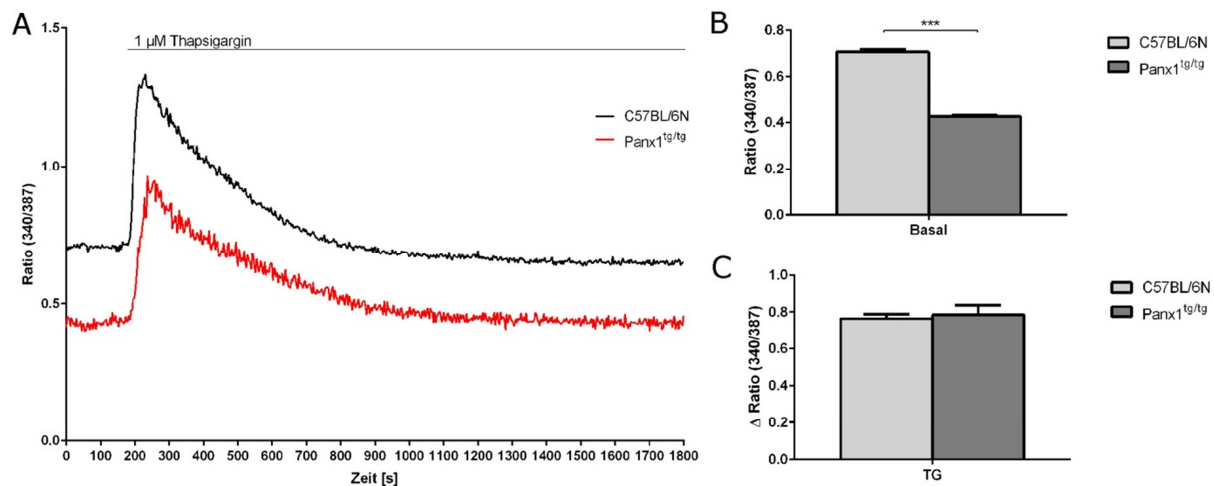
**Abb. 38: Bestimmung des GSH und GSSG Gehaltes.** Auswertung des GSH/GSSG-Verhältnisses der Astrozyten des C57BL/6N Unterstammes und der Panx1-transgenen Tiere (= Panx1<sup>tg/tg</sup>) unter Kontrollbedingungen (K+ Glukose) sowie 6h OGD. Dabei zeigt A) den GSH-Gehalt und B) den GSSG-Gehalt. In C) wurde das GSH/GSSG-Verhältnis dargestellt. Gezeigt wurden die Mittelwerte  $\pm$  SEM (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

### 5.6.5 Der Einfluss von Panx1 auf die intrazelluläre Calcium-Konzentration

Tritt ein hypoxisch-ischämischer Insult auf, so kommt es zu einer Depolarisation der Zellen, welche einen verstärkten Einstrom von Calcium zur Folge hat. Dieser verstärkte Einstrom von Calcium führt zu unterschiedlichen intrazellulären Kaskaden, die über eine Zerstörung der Mitochondrienmembranen und eine Verringerung der ATP-Bildung letztendlich im Zelltod resultieren (Kalogeris *et al.*, 2012). Somit spielt die intrazelluläre Calcium-Konzentration eine wichtige Rolle für das Überleben der Zelle. Anhand dieser Untersuchungen sollte analysiert werden, ob bereits die Deletion von Panx1 einen Einfluss auf die intrazelluläre Calcium-Konzentration hat.

Mit Hilfe des  $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging sollten zunächst zwei Aspekte bestimmt werden: a) der  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt des ERs und b) die Gesamtmenge des  $\text{Ca}^{2+}$  in der Zelle. Aufgrund der Vermutung, dass Panx1 nicht in der Membran des ERs vorkommt, wurde kein Unterschied bezüglich des  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehaltes des ERs zwischen den Stämmen erwartet. Bei der Gesamtmenge des  $\text{Ca}^{2+}$  innerhalb der Zelle wurde allerdings erwartet, dass der C57BL/6N Unterstamm eine größere  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration zeigt als die Panx1-transgenen Tiere. Der Grund für diese Hypothese ist, dass dem Panx1-transgenen Stamm das Panx1-Protein fehlt, welches unter anderem dem Transport von  $\text{Ca}^{2+}$  dient (Vanden Abeele *et al.*, 2006).

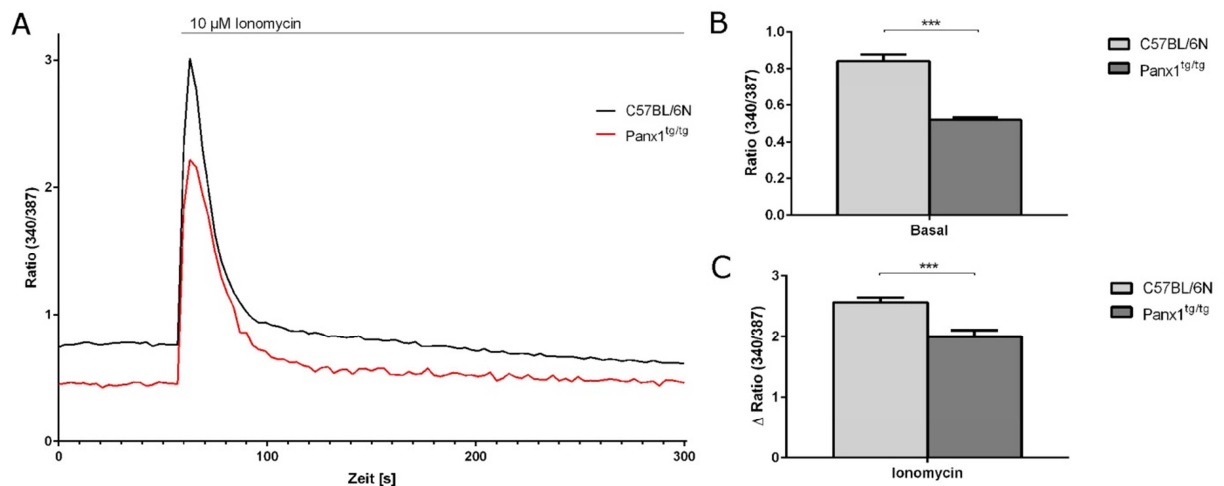
Zur Bestimmung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehaltes des ERs wurde nach drei Minuten 1  $\mu\text{M}$  TG auf die Zellen gegeben. TG blockiert die SERCA-Pumpen des ER, wodurch kein  $\text{Ca}^{2+}$  mehr in das ER gepumpt werden kann und sich somit die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Zytoplasma erhöht. Kompensatorisch werden nach kurzer Zeit alternative  $\text{Ca}^{2+}$ -Pumpen, wie die Plasmamembran  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase (PMCA) aktiviert, die das  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem Zytoplasma transportieren. Die durchgeführte Messung zeigte, dass es keinen Unterschied bezüglich des  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehaltes des ERs zwischen den C57BL/6N und den Panx1-transgenen Astrozyten gibt (Abb. 39C). Jedoch war zu sehen, dass die Zellen des C57BL/6N Unterstammes einen signifikant höheren Basalwert zeigten als die des Panx1-transgenen Stamms (Abb. 39B).



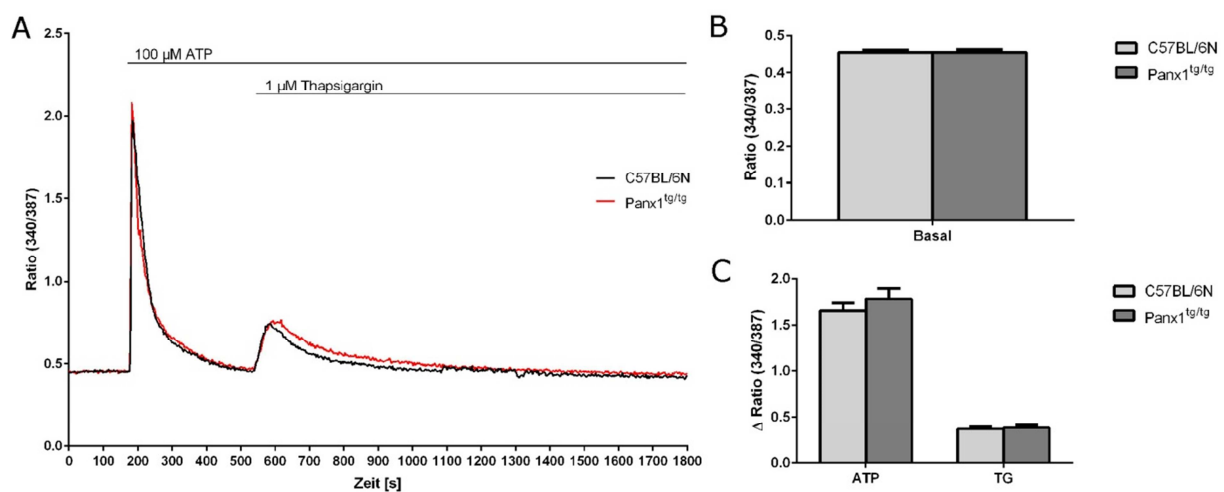
**Abb. 39: Veränderung der Calciumkonzentration nach Gabe von 1  $\mu\text{M}$  Thapsigargin.** Die Messung wurde in nominal  $\text{Ca}^{2+}$ -freier Ringerlösung mit Astrozyten des C57BL/6N Unterstammes und der Panx1-transgenen Tiere (= Panx1<sup>tg/tg</sup>) durchgeführt. In A) sind die Mittelwerte aller Messungen dargestellt. Die y-Achse zeigt das Verhältnis der gemessenen Fura-2-Intensität bei 340 nm und 387 nm (Ratio F340/387) und somit die indirekte Veränderung der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, welche gegen die entsprechenden Messzeitpunkte auf der x-Achse aufgetragen wurde. B) zeigt den Mittelwert der gemessenen Basalwerte mit Standardfehler (SEM) und in C) wurde die Änderung der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration nach Zugabe von TG dargestellt (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

Um die Gesamtmenge des  $\text{Ca}^{2+}$  in der Zelle zu bestimmen, wurde den Zellen 10  $\mu\text{M}$  Ionomycin gegeben. Ionomycin erlaubt den Transport von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen durch biologische Membranen. Hier zeigte die Messung erneut, dass Astrozyten des C57BL/6N Unterstammes einen signifikant höheren Basalwert hatten als Astrozyten der Panx1-transgenen Tiere (Abb. 40B). Selbst nach der Gabe von Ionomycin blieb dieser erhöhte intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt in den C57BL/6N Astrozyten, verglichen zu den Astrozyten des Panx1-transgenen Stammes, bestehen (Abb. 40C).

In einem weiteren Versuchsaufbau wurde den Astrozyten beider Stämme zunächst 100  $\mu\text{M}$  ATP gegeben, woraufhin nach Wiedererreichen des basalen Wertes 1  $\mu\text{M}$  TG appliziert wurde. Mit dieser Messung sollte bestimmt werden, ob der Panx1-transgene Stamm aufgrund seiner Panx1-Defizienz durch Gabe von extrazellulärem ATP weniger  $\text{Ca}^{2+}$  transportieren kann als der C57BL/6N Unterstamm. Bei dieser Messung zeigten beide Stämme einen gleich hohen Basalwert (Abb. 41B). Auch nach Gabe von ATP und TG konnte kein Unterschied bezüglich der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration zwischen beiden Stämmen festgestellt werden (Abb. 41C).

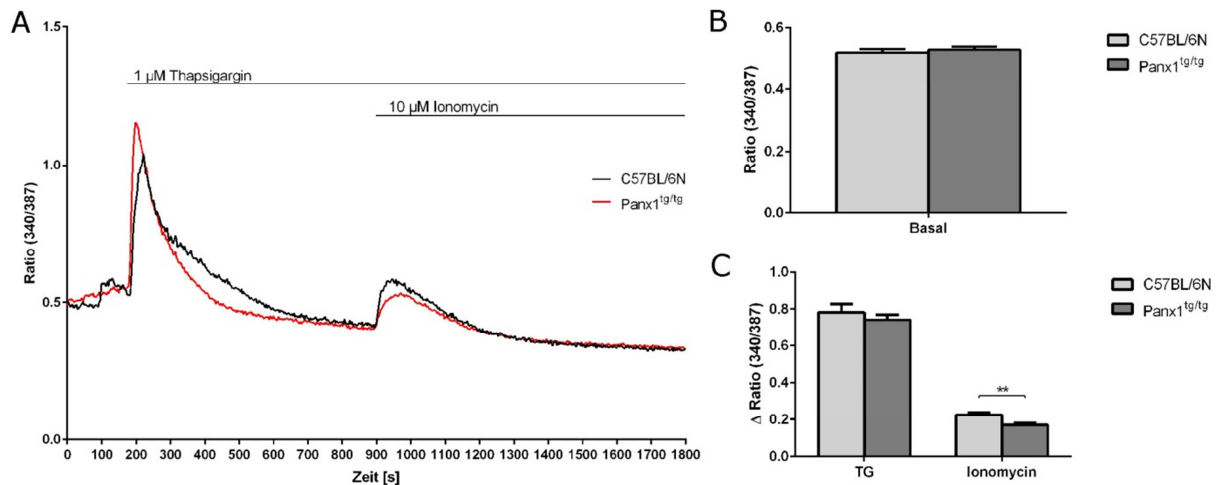


**Abb. 40: Veränderung der Calciumkonzentration nach Gabe von 10  $\mu\text{M}$  Ionomycin.** Die Messungen wurden in  $\text{Ca}^{2+}$ -freier Ringerlösung mit Astrozyten des C57BL/6N Unterstammes und der Panx1-transgenen Tiere (= Panx1<sup>tg/tg</sup>) durchgeführt. In A) sind die Mittelwerte aller Messungen dargestellt. Die y-Achse zeigt das Verhältnis der gemessenen Fura-2-Intensität bei 340 nm und 387 nm (Ratio F340/387) und somit die indirekte Veränderung der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, welche gegen die entsprechenden Messzeitpunkte auf der x-Achse aufgetragen wurde. B) zeigt den Mittelwert der gemessenen Basalwerte mit Standardfehler (SEM) und in C) wurde die Änderung der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration nach Zugabe von Ionomycin dargestellt (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).



**Abb. 41: Veränderung der Calciumkonzentration nach Gabe von 100  $\mu\text{M}$  ATP mit anschließender Applikation von 1  $\mu\text{M}$  Thapsigargin.** Die Messungen wurden in nominal  $\text{Ca}^{2+}$ -freier Ringerlösung mit Astrozyten des C57BL/6N Unterstammes und der Panx1-transgenen Tiere (= Panx1<sup>tg/tg</sup>) durchgeführt. In A) sind die Mittelwerte aller Messungen dargestellt. Die y-Achse zeigt das Verhältnis der gemessenen Fura-2-Intensität bei 340 nm und 387 nm (Ratio F340/387) und somit die indirekte Veränderung der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, welche gegen die entsprechenden Messzeitpunkte auf der x-Achse aufgetragen wurde. B) zeigt den Mittelwert der gemessenen Basalwerte mit Standardfehler (SEM) und in C) wurde die Änderung der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration nach Zugabe von ATP und TG dargestellt.





**Abb. 42: Veränderung der Calciumkonzentration nach Gabe von 1  $\mu\text{M}$  TG mit anschließender Gabe von 100  $\mu\text{M}$  Ionomycin.** Die Messung wurde in einer  $\text{Ca}^{2+}$ -freien Ringerlösung mit Astrozyten des C57BL/6N Unterstammes und der Panx1-transgenen Tiere (= Panx1<sup>tg/tg</sup>) durchgeführt. In A) sind die Mittelwerte aller Messungen dargestellt. Die y-Achse zeigt das Verhältnis der gemessenen Fura-2-Intensität bei 340 nm und 387 nm (Ratio F340/387) und somit die indirekte Veränderung der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration, welche gegen die entsprechenden Messzeitpunkte auf der x-Achse aufgetragen wurden. B) zeigt den Mittelwert der gemessenen Basalwerte mit Standardfehler (SEM) und in C) wurde die Änderung der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration nach Zugabe von TG und Ionomycin dargestellt (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ).

Bei der Bestimmung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehaltes des ERs konnte kein Unterschied zwischen den Stämmen detektiert werden (Abb. 39). Allerdings zeigten die Astrozyten des C57BL/6N Unterstammes einen höheren Gesamtgehalt an  $\text{Ca}^{2+}$  auf, als die Panx1-defizienten Astrozyten (Abb. 40). In einer weiteren Messung wurde wieder das ER mit TG entleert, jedoch wurde nach Erreichen des Basalwertes noch Ionomycin hinzugegeben, um den restlichen  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt der Astrozyten zu detektieren. Mit Hilfe dieser Messung konnte kein Unterschied zwischen den beiden Stämmen bezüglich der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration festgestellt werden (Abb. 42BC). Jedoch war die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration nach Gabe von TG höher als nach der Zugabe von Ionomycin, woraus zu schließen ist, dass sich bei Astrozyten das meiste  $\text{Ca}^{2+}$  im ER befindet (Abb. 42C).

Zusammenfassend konnten die Ergebnisse des zweiten Teils dieser Arbeit zeigen, dass die Panx1-transgenen Tiere eine leicht verringerte, jedoch nicht signifikante Ausprägung der frühpostnatalen hypoxisch-ischämischen Gehirnläsion zeigten als die C57BL/6N Mäuse. Allerdings konnten die *in vitro* Daten dabei weder einen Unterschied in der Überlebensrate der Astrozyten während der OGD, noch einen Unterschied bezüglich der Signalwegspezifischen Faktoren zur Bildung, der Konzentration und dem Abbau der ROS zeigen.

## 6 Diskussion

Der früh-postnatale hypoxisch-ischämische Insult ist eine der häufigsten Ursachen neuraler Schädigungen bei Neugeborenen. Bisherige Therapieansätze, wie z.B. die Behandlung mittels Hypothermie, mindern die Ausprägung der hypoxisch-ischämischen Gehirnläsion (Minamisawa *et al.*, 1990; Yager *et al.*, 1993; Laptook *et al.*, 1994; Towfighi *et al.*, 1994; Thoresen *et al.*, 1996; Colbourne *et al.*, 1997; Gunn *et al.*, 1997; Edwards *et al.*, 1998; Gunn *et al.*, 1998; Laptook & Corbett, 2002; Perlman, 2006a). Allerdings ist das Zeitfenster, in dem diese Behandlungsmöglichkeit eingesetzt werden kann, sehr klein und die geeignete Methode zur Einleitung der Hypothermie muss für jeden Patienten individuell bestimmt werden (Minamisawa *et al.*, 1990; Yager *et al.*, 1993; Laptook *et al.*, 1994; Towfighi *et al.*, 1994; Thoresen *et al.*, 1996; Colbourne *et al.*, 1997; Gunn *et al.*, 1997; Edwards *et al.*, 1998; Gunn *et al.*, 1998; Laptook & Corbett, 2002; Perlman, 2006a). Auf experimenteller Ebene wurden bisher schon unterschiedliche Therapieansätze analysiert. Unter anderem wurden die Applikation von ROS-Inhibitoren oder die Blockierung von Calcium-Kanälen in therapeutischen Ansätzen untersucht (Shimizu *et al.*, 2003; Perlman, 2006a). Diese zeigten im Tierversuch jedoch lediglich eine Wirkung, wenn sie vor der Entstehung eines hypoxisch-ischämischen Insultes gegeben wurden (Shimizu *et al.*, 2003; Perlman, 2006a).

Um bessere Behandlungsmöglichkeiten zu finden, ist es notwendig, den zellulären Pathomechanismus eines hypoxisch-ischämischen Insultes genau zu verstehen. Bisher ist bekannt, dass es unterschiedliche Phasen pathophysiologischer Ereignisse nach einem hypoxisch-ischämischen Insult gibt (Dirnagl *et al.*, 1999). Die primäre Phase ist charakterisiert durch Exozytose und Peri-Infarkt-Depolarisationen, welche einige Minuten bis Stunden nach einem hypoxisch-ischämischen Insult auftreten; die sekundäre Phase beinhaltet Inflammation und Apoptose, welche sich erst einige Stunden bis Tage nach dem Insult entwickeln (Dirnagl *et al.*, 1999).

Ein wichtiger Faktor, der bei einem hypoxisch-ischämischen Insult zum Zelltod führt, sind die reaktive Sauerstoffspezies (ROS). Diese wird in jeder der Phasen verstärkt gebildet, jedoch am meisten während der Reperfusion und Reoxygenierung (Ten & Starkov, 2012). Während der Reoxygenierung resultiert ein Verlust der mitochondrialen Membranintegrität in einer mitochondrialen Dysfunktion, welche wiederum zu einer Verringerung des ATP-Gehaltes und somit zu einer verstärkten ROS-Produktion führt (Ten & Starkov, 2012). Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit die Hypothese aufgestellt, dass eine gesteigerte ROS-Produktion zu einer stärkeren Ausprägung einer hypoxisch-ischämischen Gehirnläsion führt.

Locovei et al. beschrieben, dass es durch einen hypoxisch-ischämischen Insult zu einem erhöhten Efflux von ATP kommt, welcher wiederum die Aktivierungszeit des Panx1-Kanals verlängert und somit zum Zelltod führt (Locovei *et al.*, 2007). Des Weiteren spielt ATP eine wichtige Rolle bei der Aktivierung der Apoptose (Northington *et al.*, 2001; Blomgren *et al.*, 2007; Cerio *et al.*, 2013) sowie bei der Bildung der ROS (Dirnagl *et al.*, 1999). Da der Panx1-Kanal primär für den Efflux von ATP verantwortlich ist, wurde im zweiten Teil dieser Arbeit analysiert, ob die Deletion von Panx1, zu einer verminderten hypoxisch-ischämischen Gehirnläsion führt.

## 6.1 Läsionsmodell

Zur Untersuchung der früh-postnatalen hypoxisch-ischämischen Gehirnläsion wurde das bereits beschriebene Modell in früh-postnatalen Mäusen (Sheldon *et al.*, 1998) für die eigenen Versuchszwecke etabliert. Wie bereits von Sheldon et al. untersucht wurde, sprechen unterschiedliche Mausstämme unterschiedlich stark auf die Durchführung des früh-postnatalen hypoxisch-ischämischen Läsionsmodells an (Sheldon *et al.*, 1998). Ein kritischer Punkt ist hierbei die Hypoxiezeit, die balanciert werden muss zwischen einem zu geringen hypoxisch-ischämischen Hirnschaden und dem Tod der Tiere durch zu lange Hypoxie. In der Literatur sind unterschiedliche Protokolle bezüglich der Hypoxiedauer zu finden. Diese schwanken in der Regel zwischen 30 und 80 min und resultieren in unterschiedlichen Ausprägungen der früh-postnatalen hypoxisch-ischämischen Gehirnläsion (Ten *et al.*, 2003; Lafemina *et al.*, 2006; Albertsson *et al.*, 2014; Burnsed *et al.*, 2015).

Ein weiterer kritischer Punkt bei der Durchführung dieses Modells ist die Kammertemperatur während der Hypoxie. Um die Auskühlung der sieben-Tage alten Tiere zu verhindern, muss die Temperatur der Hypoxiekammer den Erhalt der Körpertemperatur konstant bei 36°C gewährleisten. Zudem führt eine zu niedrige Temperatur zu einer Neuroprotektion (Truttmann, 2012), eine zu hohe Temperatur hingegen zu einer exzessiven Schädigung des neuralen Gewebes (Zhu *et al.*, 2006a).

Bei der Durchführung des früh-postnatalen hypoxisch-ischämischen Läsionsmodells wurde nicht zwischen den Geschlechtern der Tiere unterschieden. Zum Zeitpunkt der Etablierung des Modells gab es keine eindeutigen Hinweise auf die stärkere Ausprägung einer früh-postnatalen hypoxisch-ischämischen Gehirnläsion bei einem der Geschlechter. Während Herson et al. den Einfluss des Geschlechts auf die Ausprägung einer hypoxisch-ischämischen Läsion ausschließen, legen aktuelle Befunde von Burnsed et al. einen Einfluss nahe (Herson *et al.*, 2013; Burnsed *et al.*, 2015). Allerdings wurden die Arbeiten von Burnsed et al. an

Tieren im Alter von P10 durchgeführt (Burnsed *et al.*, 2015). In der vorliegenden Arbeit hingegen wurden die Tiere im Alter von P7 einer hypoxisch-ischämischen Läsion unterzogen. Kang *et al.* konnten zeigen, dass geschlechtsspezifische Unterschiede in der Ausprägung einer früh-postnatalen hypoxisch-ischämischen Läsion altersabhängig sind (Kang *et al.*, 2015): Bis zu einem Alter von P7 zeigten die Geschlechter nur sehr geringfügige Unterschiede auf. Ab P12 hingegen treten deutliche Unterschiede auf. Als mögliche Ursachen wurde postuliert, dass es während der Reifung des Gehirns zu unterschiedlichen Expressionen von u.a. Chlorid-Transportern kommt, die für die Regulation der neuronalen Differenzierung und Migration verantwortlich sind (Dzhala *et al.*, 2008; Kahle *et al.*, 2008; Dzhala *et al.*, 2010; Kang *et al.*, 2015). Je nach Transporter zeigten diese Expressionen erst ab einem bestimmten Alter geschlechtsspezifische Unterschiede. Zusammenfassend ist der Einfluss des Geschlechts an P7, wie in dieser Arbeit analysiert, nahezu auszuschließen.

Zur Untersuchung der früh-postnatalen hypoxisch-ischämischen Gehirnläsion wurde ein hypoxisch-ischämischer Insult an sieben Tagen (P7) alten Mäusen herbeigeführt. Auf zellulärer Ebene zeigt das Gehirn einer P7 alten Maus einen ähnlichen Entwicklungsstand auf, wie das Gehirn eines humanen Neugeborenen (Biran *et al.*, 2012). Aus diesem Grund wurde das Alter von P7 für die Initiation des früh-postnatalen hypoxisch-ischämischen Insultes gewählt. Liu *et al.* konnten im Tierversuch einen entscheidenden Einfluss des Alters auf die Ausprägung einer Gehirnläsion zeigen (Liu *et al.*, 2004a). Je älter das Tier war, desto eher verschob sich die Art des Zelltodes von Apoptose zu Nekrose. Des Weiteren zeigten Untersuchungen am adulten Modell des Verschlusses der mittleren Zerebralarterie (MCAO), welches einen Schlaganfall simuliert, dass z.B. ältere Tiere kleinere Ödeme ausbildeten als jüngere Tiere (Liu *et al.*, 2009). Als Ursache wurden dabei z.B. eine unterschiedliche Expression des Natrium-Kalium-Chlorid Cotransporters (Liu *et al.*, 2010) sowie unterschiedliche Gefäßgrößen postuliert. Auch bei der Analyse der Gehirne kann im Modell der MCAO bereits nach 24h ein großer neuraler Schaden festgestellt werden (Ansari *et al.*, 2011; Chiang *et al.*, 2011). Allerdings ist dieser Schaden nur bei ca. 30% der Tiere auch im Hippocampus manifestiert (Rousselet *et al.*, 2012). Dies liegt darin begründet, dass der Hippocampus außerhalb des Versorgungsgebietes der mittleren Zerebralarterie liegt (Uchida *et al.*, 2010).

Neben dem Mausmodell der früh-postnatalen hypoxisch-ischämischen Gehirnläsion gibt es auch noch ein Modell in der Ratte (Levine, 1960; Rice, 1981; Vannucci & Vannucci, 1997).

In der Literatur wird beschrieben, dass dieses Modell eine relativ konstante Ausprägung der Gehirnläsion zeigt (Rong *et al.*, 2015). Bereits 48h nach einem hypoxisch-ischämischen Insult tritt eine ausgeprägte Läsion des Gehirns auf. Makroskopisch kann im Modell der Ratte eine Unterscheidung zwischen der läsierten Hemisphäre und der nicht-läsierten Hemisphäre erfolgen. Die läsierte Hemisphäre zeigt dabei Zysten oder gar eine komplette Verringerung des neuralen Gewebes auf (Rong *et al.*, 2015). Warum das Modell der Ratte einen solch konstanten Schaden aufzeigt ist noch nicht bekannt. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass die Ratte größere Gefäße besitzt als die früh-postnatale Maus (Liu *et al.*, 2010).

Des Weiteren könnte es möglich sein, dass Ratten und Mäusen unterschiedliche Anastomosen der Gehirnarterien ausbilden. So wäre es möglich, dass z.B. kleine anastomosierende Gefäße, welche der rechten Arteria carotis communis entspringen, Teilbereiche der durch die Operation verschlossenen linken Arteria carotis communis mit versorgen können. Van Bruggen *et al.* zeigten, dass der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) eine wichtige Rolle bei der Ausprägung einer hypoxisch-ischämischen Gehirnläsion spielt (van Bruggen *et al.*, 1999). Somit könnte es möglich sein, dass jede Maus unter hypoxisch-ischämischen Bedingungen unterschiedlich viel VEGF freisetzt, was möglicherweise zu einer unterschiedlichen Ausprägung einer hypoxisch-ischämischen Gehirnläsion führt.

Das Mausmodell der früh-postnatalen hypoxisch-ischämischen Gehirnläsion stellt eine gute Möglichkeit dar, um unterschiedliche Aspekte dieser Erkrankung zu untersuchen. Die Durchführung der Operation und der Hypoxie ist standardisiert und zeigt reproduzierbare Ergebnisse auf. Wie bereits in der Ratte beschrieben, ist auch bei der Maus das sekundäre energetische Versagen nach einer hypoxischen Ischämie vorhanden (Hagberg *et al.*, 1997). Viele Aspekte des Mausmodells sind der Pathologie des Menschen vergleichbar, z.B. ist eine hypoxisch-ischämische Gehirnläsion in den gleichen Arealen (z.B. Hippocampus-Region) zu detektieren. In vielen Punkten gibt es jedoch deutliche Differenzen zwischen dem Mausmodell und dem Menschen. Ein Beispiel hierfür ist, dass sich der Aufbau des murinen Gehirns deutlich von dem des humanen Gehirns unterscheidet; so besitzt das humane Gehirn im Vergleich zur Maus z.B. sehr stark ausgeprägte Gyri und Sulci.

Auf pathologischer Ebene besteht ein weiterer Unterschied zwischen dem Mausmodell und einem humanen Insult darin, dass bei einem hypoxisch-ischämischen Insult im Menschen nicht immer nur ein einseitiger Verschluss der Arterie bzw. eine einseitige Minderversorgung des Gehirns vorhanden ist (Rice, 1981; Hagberg *et al.*, 1997).

Im Tierversuch wurden strukturelle Veränderungen in den Hemisphären insbesondere auf zellulärer Ebene in histologischen Schnitten detektiert: Besonders im Bereich des Hippocampus wurde eine Zerstörung der Struktur sowie neuraler Zellen beobachtet. Eine Ausbreitung der Läsion bis in den Kortex konnte nur bei wenigen Tieren detektiert werden. Dies könnte begründen, warum auf makroskopischer Ebene kein Unterschied zwischen den Tieren mit und ohne früh-postnatalem hypoxisch-ischämischen Insult detektiert werden konnte. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Ergebnissen der bisherigen Literatur, worin beschrieben wird, dass es durch einen hypoxisch-ischämischen Insult vor allem zu Schäden im Bereich des Hippocampus kommt, da die Zellen dieser Region einen hohen Glukose- und Sauerstoffverbrauch haben (Sokoloff *et al.*, 1977; Strasser & Fischer, 1995; Matsuoka *et al.*, 1997; Tajiri *et al.*, 2004; Fatemi *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2013). Eine weitere mögliche Erklärung dafür, dass die zellulären Veränderungen hauptsächlich im Bereich des Hippocampus auftraten, könnte sein, dass die Zellen im Bereich des Hippocampus nur eine geringe Myelinisierung besitzen (Berger & Frotscher, 1994). Die Myelinschicht ermöglicht der Nervenzelle eine schnelle Weiterleitung des Nervenimpulses. Ist diese nicht gewährleistet, so kann dies auch eine negative Auswirkung auf die Nervenzelle selbst haben. Tritt ein Schaden an der Myelinschicht auf, so sind die Oligodendrozyten in der Lage, dies durch Remyelinisierung zu beheben. Liu *et al.* konnten bereits zeigen, dass ein früh-postnataler hypoxisch-ischämischer Insult in einer Verminderung des Myelins resultiert (Liu *et al.*, 2002). Sie konnten zeigen, dass es bei einer verstärkten Demyelinisierung zu einer verringerten Regeneration der Nervenzellen kam (Liu *et al.*, 2002). Des Weiteren scheint es von Bedeutung zu sein, welcher Zelltyp bei einem hypoxisch-ischämischen Insult betroffen ist. So konnten bisher mehrere Arbeitsgruppen mittels verschiedener Untersuchungstechniken nachweisen, dass die pyramidalen Zellen im Bereich des Hippocampus eine andere Reaktion auf einen hypoxisch-ischämischen Insult zeigen, als die pyramidalen Zellen des Kortex [reviewed in (Schmidt-Kastner, 2015)]. Für die hippocampale Region CA1 und CA3 wurden sogenannte Gen-Sets zusammengestellt, welche die Expression der Gene in diesen hippocampalen Regionen auflistet. Somit konnten sie feststellen, dass diese Regionen unterschiedliche Gene exprimieren, welche für die unterschiedlichen Reaktionen auf einen hypoxisch-ischämischen Insult verantwortlich sein könnten [reviewed in (Schmidt-Kastner, 2015)].

## 6.2 Das Protein Nnt hat einen Einfluss auf die Ausprägung einer früh-postnatalen hypoxisch-ischämischen Gehirnläsion

Zur Überprüfung der Hypothese, dass eine gesteigerte ROS-Produktion zu einer stärkeren Ausprägung einer früh-postnatalen hypoxisch-ischämischen Gehirnläsion führt, wurden in dieser Arbeit zwei Unterstämme der C57BL/6 Maus verwendet: der C57BL/6N Unterstamm und der C57BL/6J Unterstamm. Diese beiden Unterstämme unterscheiden sich darin, dass den Mäusen des C57BL/6J Unterstammes Exon 7-11 des *Nnt*-Gens fehlen und somit kein funktionelles Nnt Protein gebildet werden kann (Mekada *et al.*, 2009). Das Nnt Protein ist ein wichtiger Bestandteil zur mitochondrialen Bildung von NADPH. NADPH spielt eine tragende Rolle bei der Biosynthese und Entgiftung von freien Radikalen (Balaban *et al.*, 2005; Gauthier *et al.*, 2013; Nickel *et al.*, 2014). Durch das vorhandene Nnt Protein, kann genügend NADPH gebildet werden, um die reaktive Sauerstoffspezies (ROS) abzubauen und somit einen Zellschaden durch ROS zu vermeiden. Durch das Fehlen von Exon 7-11 des *Nnt*-Gens bei dem C57BL/6J Unterstamm kann nicht mehr genügend NADPH zur Entgiftung von ROS gebildet werden. Auf Grund dessen wurde die Hypothese aufgestellt, dass der C57BL/6J Unterstamm eine stärkere Ausprägung einer früh-postnatalen hypoxisch-ischämischen Gehirnläsion zeigen muss als der C57BL/6N Unterstamm. In bisherigen Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass es durch das Fehlen von Nnt zu Veränderungen im Stoffwechsel kam, so wiesen die Tiere des C57BL/6J Unterstammes z.B. eine verminderte Glukosetoleranz auf (Toye *et al.*, 2005; Fisher-Wellman *et al.*, 2015). Des Weiteren scheint das Fehlen des Nnt-Proteins eine Rolle bei der Entwicklung von Adipositas zu spielen (Nicholson *et al.*, 2010; Heiker *et al.*, 2013).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten, dass das Fehlen des Nnt-Proteins einen Einfluss auf die Ausprägung einer früh-postnatalen hypoxisch-ischämischen Gehirnläsion hat. Entgegen der ursprünglichen Hypothese ergaben die Auswertungen allerdings, dass der C57BL/6J Unterstamm eine geringere Ausprägung der hypoxisch-ischämischen Gehirnläsion zeigte als der C57BL/6N Unterstamm. Sowohl bei der Einteilung der Tiere in die unterschiedlichen Scores, als auch bei der Analyse der Apoptose und der aktivierten Mikroglia/Makrophagen zeigte der C57BL/6N Unterstamm ausgeprägtere pathologische Veränderungen auf als der C57BL/6J Unterstamm. Eine mögliche Ursache hierfür könnte sein, dass der C57BL/6J Unterstamm durch das Fehlen des Nnt-Proteins mehr intrazelluläres ROS besitzt und somit andere Kaskaden für den Abbau der ROS verantwortlich sind, als der Abbau über NADPH. Auch die im C57BL/6J Unterstamm bekannten metabolischen Veränderungen könnten einen Einfluss auf die Ausprägung einer früh-postnatalen hypoxisch-

ischämischen Gehirnläsion haben. Des Weiteren könnte es möglich sein, dass die Synthese von NADPH durch das Fehlen des Nnt-Proteins von anderen Proteinen übernommen wird.

Nickel et al. untersuchten in ihrer Arbeit den Einfluss des Nnt-Proteins auf die Bildung von ROS bei einer Herzinsuffizienz (Nickel *et al.*, 2015). Auch sie konnten feststellen, dass beim C57BL/6J Unterstamm weniger Tiere eine Herzinsuffizienz ausbildeten als die Tiere des C57BL/6N Unterstammes. Des Weiteren stellten sie fest, dass die Tiere des C57BL/6N Unterstammes nach einer Herzinsuffizienz mehr apoptotische Zellen aufzeigten, als die Tiere des C57BL/6J Unterstammes. Aus diesem Grund stellten sie die Hypothese auf, dass Nnt unter pathologischen Bedingungen seine Eigenschaft als Antioxidans verliert und durch eine reverse Funktion in einen „pro-oxidativen“ Modus versetzt wird. In diesem Modus wird NADPH oxidiert, um NADH für die ATP-Produktion zu synthetisieren. Aufgrund dieser Bedingungen wird die mitochondriale ROS-Emission gesteigert, wodurch es zu einer Verschlechterung der Herzinsuffizienz kommt, welche dann sogar zum Tod führen kann. Dieser Effekt konnte in Mäusen des C57BL/6J Unterstammes, denen das Nnt-Protein fehlt, nicht detektiert werden.

Prinzipiell ist ein vergleichbarer Modus auch im Rahmen der hypoxisch-ischämischen Hirnschädigung denkbar und könnte die beobachtete stärkere Schadensausprägung in Mäusen des C57BL/6J Unterstammes erklären. So deutet z.B. die erhöhte Anzahl 8-OHdG-immunpositiver Zellen auf eine erhöhte ROS-induzierte DNA-Schädigung in diesen Mäusen hin. Eine Analyse der mitochondrialen Enzyme der ROS-Synthese und des ROS-Abbaus würden an diesem Punkt weiterführende Ergebnisse erwarten lassen.

In der Literatur wurde beschrieben, dass es in Zelllinien durch einen Knockdown von Nnt zu einem Anstieg von ROS und der Apoptoserate kommt (Meimaridou *et al.*, 2012; Yin *et al.*, 2012). Aus diesem Grund wurde erwartet, dass es im C57BL/6J Unterstamm durch das Fehlen des Nnt-Proteins zu einer stärkeren Apoptose und somit zu einer größeren frühpostnatalen hypoxisch-ischämischen Gehirnläsion kommt. Allerdings konnte in der vorliegenden Arbeit genau das Gegenteil aufgezeigt werden: Der C57BL/6N Unterstamm zeigte mehr apoptotische Zellen auf als der C57BL/6J Unterstamm.

Der Einfluss des Nnt-Proteins wurde in anderen Studien auch in anderem Kontext, z.B. von Infektionen untersucht. So zeigten *in vitro* Analysen, dass der C57BL/6J Unterstamm eine größere Resistenz bei einer akuten Pulmonalinfektion mit *Streptococcus pneumoniae* zeigte als ein C57BL/6J Unterstamm, dem das *Nnt*-Gen inseriert wurde (Ripoll *et al.*, 2012). Jedoch



zeigte die Untersuchung an isolierten Makrophagen dieser beiden Stämme, dass der C57BL/6J Unterstamm bei einer Infektion mit Streptokokken mehr ROS bildet und eine stärkere inflammatorische Antwort zeigt (Ripoll *et al.*, 2012). Dieses Ergebnis deckt sich mit den anderen bisherigen Ergebnissen, die hauptsächlich an isolierten Mitochondrien durchgeführt wurden: Der Mangel an Nnt-Protein führte zu einem Anstieg des mitochondrialen ROS-Gehaltes (Yin *et al.*, 2012; Lopert & Patel, 2014). Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass das Protein Nnt einen Einfluss auf die Ausprägung einer Schädigung hat, die über einen ROS-Signalweg herbeigeführt wird. Entgegen der ursprünglichen Hypothese, dass das Fehlen des Nnt-Proteins zu einer stärkeren Ausprägung einer Läsion führt, konnte allerdings gezeigt werden, dass es durch das Fehlen des Nnt-Proteins zu einer antioxidativen Wirkung kommt. Dies bestätigt die Hypothese von Nickel *et al.*, dass es unter pathologischen Bedingungen zu einer reversen Funktion von Nnt kommt, welche es in einen „pro-oxidativen“ Modus versetzt, wodurch es zu einer gesteigerten ROS-Emission kommt (Nickel *et al.*, 2015).

Neben der veränderten Apoptose-Rate nach einem hypoxisch-ischämischen Insult, wurde in den Tieren des C57BL/6J Unterstammes auch eine gesteigerte Rate an aktivierten Mikroglia/Makrophagen erwartet. Allerdings wurde in der vorliegenden Arbeit anhand der Analyse der aktivierten Mikroglia/Makrophagen gezeigt, dass es bei den Tieren des C57BL/6N Unterstammes zu einer höheren Anzahl aktivierter Mikrogliazellen bzw. Makrophagen kam als bei den Tieren des C57BL/6J Unterstammes. Eine Aktivierung von Mikroglia/Makrophagen tritt u.a. nach Gehirnläsionen auf (Kingham *et al.*, 1999). Die Aktivierung von Mikroglia/Makrophagen kann eine negative, aber auch eine positive Wirkung zeigen. So werden durch ihre Aktivierung Gehirnzellen, wie z.B. Oligodendrozyten (Deng *et al.*, 2008) und Neurone (Jantzie *et al.*, 2005; Kaushal & Schlichter, 2008), zerstört. Allerdings kann ihre Aktivierung nach einem hypoxisch-ischämischen Insult auch eine protektive Rolle einnehmen (Kitamura *et al.*, 2004; Lalancette-Hebert *et al.*, 2007). Somit könnten die Ergebnisse aus dieser Arbeit auch bedeuten, dass der C57BL/6N Unterstamm eine größere Läsion ausbildet als der C57BL/6J Unterstamm, da in ihm eine Vielzahl von Mikrogliazellen aktiviert wird, welche wiederum in hoher Anzahl eher neurodegenerativ als neuroprotektiv wirken könnten.

Die Hypothese, welche eine stärkere Ausprägung der Läsion in den Tieren des C57BL/6J Unterstammes erwartete als in Tieren des C57BL/6N Unterstammes, lag darin begründet, dass in den Tieren des C57BL/6J Unterstammes, durch die Deletion von Nnt, eine gesteigerte

ROS-Produktion als in den Tieren des C57BL/6N Unterstammes erwartet wurde. Um diese Hypothese zu analysieren wurden sowohl *in vivo* als auch *in vitro* Untersuchungen bezüglich des ROS-Gehaltes sowie der Entstehung und des Abbaus von ROS durchgeführt. Zur Bestimmung der ROS-induzierten DNA-Schädigung *in vivo* wurde der Marker 8-OHdG an Gehirnschnitten bestimmt. Dieser zeigte ein stärkeres immunpositives Signal in den linken läsierten Hemisphären als in den intakten rechten Hemisphären. Des Weiteren konnte ein signifikant geringeres immunpositives Signal im C57BL/6N Unterstamm detektiert werden als im C57BL/6J Unterstamm. Entgegen der oben genannten Ergebnisse, bei denen eine größere Läsion im C57BL/6N Unterstamm gezeigt werden konnte, wurde die ursprüngliche Hypothese mittels indirekter Bestimmung der ROS durch den Marker 8-OHdG bestätigt. Ein verringertes Aufkommen von 8-OHdG-positiven Kardiomyozyten im C57BL/6N Unterstamm im Vergleich zum C57BL/6J Unterstamm konnte auch im Modell der Herzinsuffizienz durch Nickel *et al.* nachgewiesen werden (Nickel *et al.*, 2015). Allerdings war dieser Effekt nur in den Sham-operierten Tieren zu sehen. Bei den Tieren mit Herzinsuffizienz hingegen zeigte der C57BL/6N Unterstamm im Herzen mehr 8-OHdG-positive Kardiomyozyten, als der C57BL/6J Unterstamm (Nickel *et al.*, 2015). Somit stellt sich die Frage, ob Nnt-defiziente Kardiomyozyten eine andere Reaktion auf einen Insult zeigen, als Nnt-defiziente neurale Zellen. Eine weitere Erklärung dieser gegensätzlichen Ergebnisse könnte die Verwendung des 8-OHdG als ROS-Marker geben. In der Literatur wird 8-OHdG zum einen als zuverlässiger Marker für ROS beschrieben. Liu *et al.* zeigten, dass 8-OHdG ein geeigneter Marker für oxidativen Stress bei einem Zerebralinfarkt ist (Liu *et al.*, 2004b). Am Modell des MCAO konnte bei einer permanenten Okklusion, im Vergleich zu Kontrolle, ein verstärktes Signal detektiert werden. Bei den Tieren, bei denen nur für einen bestimmten Zeitraum die Arterie okkludiert wurde, war dieses Signal jedoch nicht so stark (Liu *et al.*, 2004b). Auf der anderen Seite wurde die Sensitivität von 8-OHdG als Marker für ROS bei anderen Erkrankungen wie z.B. dem Morbus Huntington kritisch diskutiert (Borowsky *et al.*, 2013). Diese Analysen wurden jedoch spektrometrisch sowie chromatographisch durchgeführt, so dass die Vergleichbarkeit zur immunhistochemischen Detektion nur bedingt gegeben ist.

Das 8-OHdG-Signal im hypoxierten Gehirn co-lokalisierte mit der Immunmarkierung des „glial fibrillary acidic protein“ (GFAP), einem Marker astroglialer Intermediärfilamente. Die detaillierte Analyse ROS-Signalweg-spezifischer Faktoren, die der Bildung bzw. dem Abbau von ROS dienen, wurde daher an Astrozytenkulturen durchgeführt. Astrozyten beider Unterstämme wurden einem Sauerstoff- und Glukosemangel (OGD) ausgesetzt. Vergleichbar den Ergebnissen des *in vivo* Modells, zeigten die Astrozyten des C57BL/6N Unterstammes

auch nach OGD *in vitro* eine geringere Überlebensfähigkeit als Zellen des C57BL/6J Unterstammes. Das Überleben zeigte sich jedoch unabhängig von den ROS-Konzentrationen bzw. vom GSH/GSSG-Verhältnis; Veränderungen aller Parameter konnten hauptsächlich in Abhängigkeit von der OGD-Dauer detektiert werden. Nickel *et al.* analysierten den Einfluss des Nnt-Proteins auf die Ausprägung einer Herzinsuffizienz am Mausmodell (Nickel *et al.*, 2015). Sie konnten bei der Bestimmung der ROS und des GSH/GSSG-Verhältnisses einen Unterschied zwischen den Herzen der Tiere mit und ohne einer Herzinsuffizienz zeigen, nicht aber zwischen den beiden Unterstämmen (Nickel *et al.*, 2015). In der vorliegenden Arbeit zeigten die Ergebnisse, dass es im Vergleich zur Kontrolle nach 6h OGD zu einem Anstieg des GSH/GSSG-Verhältnisses kommt. Dies würde bedeuten, dass nach 6h OGD weniger ROS vorhanden sein muss als bei der Kontrolle. Die Ursache hierfür könnte sein, dass durch die Verringerung von ATP bei 6h OGD und durch den geringen mitochondrialen Einstrom von Calcium weniger NADH gebildet werden kann (Maack *et al.*, 2006; Kohlhaas & Maack, 2013). Dadurch sind freie Elektronen in der Lage, die ROS-Einheit  $O_2^-$  zu bilden, welche nicht durch die Oxidation von GSH zu GSSG abgebaut werden kann. Aus diesen Erkenntnissen lässt sich schließen, dass durch einen früh-postnatalen hypoxisch-ischämischen Insult mehr  $O_2^-$  generiert werden könnte als  $H_2O_2$ , wodurch der Abbau über GSH/GSSG keine Rolle spielt. Eine weitere Vermutung aufgrund dieser Ergebnisse wäre, dass das Protein Nnt keinen direkten Einfluss auf die Bildung oder den Abbau von ROS hat.

Durch überschüssige Elektronen, die nicht für die Produktion von ATP benötigt werden, kommt es zur Bildung von ROS (Turrens, 2003; Murphy, 2009). Aus diesem Grund ist ATP ein wichtiger Faktor bei der Generierung der ROS. Mit Hilfe des ATP-Assays konnte gezeigt werden, dass mit zunehmender OGD-Dauer der ATP-Gehalt in beiden Unterstämmen absinkt. Die Reduktion des ATP-Gehaltes mit zunehmender OGD-Dauer bestätigt, dass es mit zunehmender OGD-Dauer zu einer gesteigerten Apoptose-Rate kommt. Die Einleitung der Apoptose ist ein hochenergetischer Prozess, der viel ATP benötigt, wodurch eine Verringerung des ATP-Gehaltes auf eine gesteigerte Apoptose-Rate schließen lässt (Northington *et al.*, 2001; Blomgren *et al.*, 2007; Cerio *et al.*, 2013). Mit den hier gezeigten Ergebnissen konnte festgestellt werden, dass es einen Unterschied in der ATP-Produktion zwischen dem C57BL/6N- und dem C57BL/6J Unterstamm gibt. Der C57BL/6J Unterstamm zeigte dabei initial einen höheren ATP-Gehalt als der C57BL/6N Unterstamm. Bei 6h OGD war kein Unterschied mehr zwischen dem C57BL/6N- und dem C57BL/6J Unterstamm zu detektieren, somit gab es im C57BL/6N Unterstamm einen geringeren Abfall im ATP-Gehalt, als im C57BL/6J Unterstamm. Folglich müsste im C57BL/6J Unterstamm verglichen mit dem

C57BL/6N Unterstamm während der OGD mehr ROS gebildet werden. Im Gegensatz zu den hier erzielten Ergebnissen wurde in der Arbeit von Yin et al. durch einen Knockdown von Nnt in PC12 Zellen eine Verringerung des ATP-Spiegels gezeigt (Yin *et al.*, 2012). Eine grundlegende Erklärung für dieses gegenteilige Ergebnis gibt es allerdings nicht. Eine mögliche Ursache hierfür könnte sein, dass die in dieser Arbeit verwendeten Astrozyten durch ihre natürliche Deletion des Nnt evolutionsbedingt einen physiologischen Vorteil gegenüber dem plötzlichen Knockdown des Nnt in den PC12 Zellen entwickelt haben könnten.

### **6.2.1 Der Einfluss des Nnt-Proteins auf die Stabilität und Barrierefunktion der zerebralen Gefäße**

Aufgrund der Tatsache, dass es einen Unterschied in der Ausprägung einer früh-postnatalen hypoxisch-ischämischen Gehirnläsion zwischen den Tieren des C57BL/6N- und den Tieren des C57BL/6J Unterstammes gab, wurde im nächsten Schritt analysiert, ob das Fehlen des Nnt-Proteins bereits zu einer Veränderung der Stabilität bzw. der Barrierefunktion der zerebralen Gefäße führt. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass es bei den Tieren des C57BL/6J Unterstammes aufgrund des Fehlens des Nnt-Proteins zu einer verringerten Gefäßstabilität und zu einer verringerten Barrierefunktion kommt. Durch die Perfusion mit dem farbigen Silikongummi Microfil<sup>®</sup> konnten die zerebralen Gefäße sichtbar gemacht werden. Jedoch waren bei einigen Gefäßen Unterbrechungen zu sehen, an denen sich Blasen-ähnliche Formationen von Microfil<sup>®</sup> gebildet hatten. Dies deutet darauf hin, dass die Gefäße an diesen Stellen rupturiert sind. Vor allen Dingen bei den Gehirnen der C57BL/6J Tiere war dies verstärkt aufgetreten. Mögliche Ursachen für dieses Phänomen könnten sein, dass der Druck während der Perfusion oder die Viskosität der Lösung zu hoch waren, wodurch die Gefäße an unterschiedlichen Stellen aufgerissen sind. Aufgrund dessen wurden weitere Tiere mit verringerten Viskositäten der Lösung perfundiert. Bei diesen Versuchen konnte allerdings bei der Analyse der Gehirne kein Microfil<sup>®</sup> in den Gefäßen detektiert werden, was vermuten lässt, dass eine verringerte Viskosität dazu führt, dass das Microfil<sup>®</sup> wieder aus den Gefäßen perfundiert, bevor es fest werden kann. Neben den möglichen methodischen Ursachen für die Bildung dieser Blasen-ähnlichen Formationen, könnten auch zelluläre Eigenschaften dafür verantwortlich sein. U.a. könnten ROS oder ROS-induzierte Vermittler, wie Bradikinin, inflammatorische Zytokine oder der Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) bei der Schwächung der Gefäßwand eine Rolle spielen. Bei TNF- $\alpha$  ist z.B. bereits bekannt, dass es durch die Aktivierung verschiedener Rho GTPasen und anderer Mechanismen die Barriere zwischen Endothelzellen beeinflussen kann (Marcos-Ramiro *et al.*, 2014). Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit zunächst Tiere mit Evans Blue perfundiert, und die angefertigten Gefrierschnitte

der Gehirne am Mikroskop untersucht. Die Analyse ergab, dass es weder in den Gehirnen der C57BL/6N Tiere, noch in denen der C57BL/6J Tiere zu einer Einfärbung mit Evans Blue im Gehirngewebe kam. Evans Blue konnte ausschließlich im Endothel detektiert werden. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die Gefäßbarriere noch intakt ist. Allerdings könnte dies auch darin begründet sein, dass die Perfusionszeit von fünf Minuten zu gering ist und eine längere Perfusionszeit ein anderes Ergebnis ergibt.

Anhand dieser Arbeit konnte erstmalig eine unterschiedliche Ausprägung einer früh-postnatalen hypoxisch-ischämischen Gehirnläsion zwischen dem C57BL/6N- und dem C57BL/6J Unterstamm detektiert werden. Sowohl in der Anzahl der Tiere, die eine Läsion ausbildeten, als auch in der Stärke der Ausprägung sowie den Markern für Apoptose und aktivierte Mikroglia und Makrophagen konnten Unterschiede zwischen den Unterstämmen gezeigt werden. Anhand des Proliferationsmarkers Ki67 sowie des ROS-Markers 8-OHdG wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass es zwischen den Unterstämmen einen generellen Unterschied gibt; so konnte in Tieren des C57BL/6J Unterstammes (Nnt-Deletion) eine erhöhte Anzahl Ki67-immunpositiver sowie 8-OHdG-immunpositiver Zellen detektiert werden als in Tieren des C57BL/6N Unterstammes. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass das Nnt-Protein eine wichtige Rolle bei der Zellschädigung während eines früh-postnatalen hypoxisch-ischämischen Insultes spielt.

### **6.3 Panx1 zeigt einen geringfügigen Einfluss auf die Ausprägung einer hypoxisch-ischämischen Gehirnläsion**

Der Einfluss des Panx1-Kanals auf die Ausprägung einer früh-postnatalen hypoxisch-ischämischen Hirnläsion wurde an Panx1-transgenen Mäusen untersucht (Prof. Dr. Hannah Monyer, Abteilung Klinische Neurobiologie des Universitätsklinikums, Heidelberg, Deutschland), die aufgrund einer Insertion eines *lacZ*-Gens sowie einer Phosphoglycerat Kinase-Neomycin Kasette in Exon 1 des *Panx1*-Gens kein Panx1-Protein exprimieren (Anselmi *et al.*, 2008). Panx1 wird zu den integralen Membranproteinen gezählt (Panchin *et al.*, 2000). Seine Aktivierung ist abhängig von der Aktivierung bestimmter Rezeptoren wie z.B. den P2X-Rezeptoren (Davidson *et al.*, 2015). Ein wichtiger Rezeptor, der mit Panx1 interagiert, ist der purinerge P2X7 Rezeptor (Iacobas *et al.*, 2007; Mayo *et al.*, 2008; Pelegrin *et al.*, 2008; Scemes *et al.*, 2009). Über die Interaktion zwischen Panx1 und dem P2X7 Rezeptor wird ein Signalkomplex gebildet, der zu einer verlängerten Aktivierung von Panx1 führt (Locovei *et al.*, 2007). Durch das Öffnen eines Panx1-Kanals ist es möglich, dass ATP in den Extrazellulärraum freigesetzt wird (Bao *et al.*, 2004; Shestopalov & Slepak, 2014). Das

extrazelluläre ATP wiederum führt u.a. zur Aktivierung des P2X7 Rezeptors. Dadurch wird der Signalweg des Inflammasoms aktiviert, wodurch Interleukin-1 $\beta$  aus Makrophagen und T-Lymphozyten ausgeschüttet wird (Pelegriin & Surprenant, 2006; Locovei *et al.*, 2007; Schenk *et al.*, 2008; Pelegriin & Surprenant, 2009). Thompson *et al.* konnten bereits an hippocampalen Neuronenkulturen zeigen, dass es unter hypoxisch-ischämischen Bedingungen gerade in hippocampalen Neuronen zu einer Öffnung der Panx1-Kanäle kommt (Thompson *et al.*, 2006; Penuela *et al.*, 2013). Durch das Öffnen dieser Kanäle kommt es zur Dysregulation des Ionengehaltes, welches wiederum zum neuronalen Tod führt (Thompson *et al.*, 2006; Locovei *et al.*, 2007; Penuela *et al.*, 2013). Des Weiteren wurde gezeigt, dass Panx1 eine wichtige Rolle bei der Apoptose zukommt. In diesem Fall soll ATP, welches über geöffnete Panx1-Kanäle freigesetzt wurde, als „Find-me“ Signal für Phagozyten dienen (Chekeni *et al.*, 2010; Penuela *et al.*, 2013). Da die Regulation von ATP während eines hypoxisch-ischämischen Insultes eine wichtige Rolle spielt (Northington *et al.*, 2001; Blomgren *et al.*, 2007; Locovei *et al.*, 2007; Cerio *et al.*, 2013) und Panx1 den ATP-Ausstrom ermöglicht, wurde postuliert, dass Panx1 eine wichtige Rolle bei der Ausprägung von Gehirnläsionen spielt (Yan *et al.*, 2010). In dieser Arbeit wurde die Hypothese aufgestellt, dass es durch die Deletion von Panx1 zu einer verminderten Ausschüttung von ATP kommt, welches in einer verringerten Ausprägung der hypoxisch-ischämischen Gehirnläsion resultiert. Somit wurde in dieser Arbeit postuliert, dass Tiere des Panx1-transgenen Stammes geringere Auswirkungen eines früh-postnatalen hypoxisch-ischämischen Insultes aufweisen als C57BL/6N Wildtyp-Tiere.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass in den Tieren des C57BL/6N Unterstammes eine geringfügig größere Läsionsfläche zu detektieren war als in den Tieren des Panx1-transgenen Stammes. Erstmals wurde sich in der vorliegenden Arbeit mit dem Einfluss einer Panx1 Deletion in einem früh-postnatalen Mausmodell der hypoxisch-ischämischen Gehirnläsion beschäftigt. In bisherigen Arbeiten, die unter anderem von Bargiottas *et al.* durchgeführt wurden, konnte gezeigt werden, dass es im adulten Modell für fokale ischämische Gehirnläsionen (MCAO) in Panx1-transgenen Mäusen, verglichen zur Kontrolle, zu einem verkleinerten Infarktvolumen kommt (Bargiottas *et al.*, 2011). Durch einen Doppelknockout von Panx1 und Panx2 konnten sie sogar eine noch stärkere Verringerung des Infarktvolumens erreichen. Auch Cisneros-Mejorado *et al.* konnten am Modell der MCAO zeigen, dass es durch eine Inhibition mittels Blockern oder durch eine Deletion von Panx1 zu einer verringerten fokalen ischämischen Läsion kommt (Cisneros-Mejorado *et al.*, 2015). Allerdings gibt es auch Untersuchungen, die keine direkte Auswirkung von Panx1 auf die Bildung eines hypoxisch-ischämischen Zellschadens feststellen konnten (Madry *et al.*, 2010;

Orellana *et al.*, 2010). Die unterschiedlichen Ergebnisse zwischen dem früh-postnatalen und dem adulten Modell können durch viele Aspekte beeinflusst sein. Aufgrund des sich entwickelnden Gehirns gibt es in den früh-postnatalen Tieren andere Expressionen bestimmter Faktoren und Hormone als in adulten Tieren (Kang *et al.*, 2015). Ein weiterer Aspekt für die unterschiedlichen Ergebnisse zwischen dem früh-postnatalen und dem adulten Modell könnte die unterschiedliche Expression von Panx1 im Gehirn zu unterschiedlichen Altersstadien sein (Ray *et al.*, 2005). Somit wäre es möglich, dass die Panx1-Regulation zum Zeitpunkt von P7 nur einen geringfügigen Einfluss auf die Ausprägung eines hypoxisch-ischämischen Insultes nimmt.

Neben der Ausprägung der früh-postnatalen hypoxisch-ischämischen Gehirnläsion wurden in dieser Arbeit die Apoptose und aktivierte Mikroglia/Makrophagen mittels immunhistologischer Färbungen untersucht. Zwischen den C57BL/6N- und dem Panx1-transgenen Stamm wurde keine Änderung der Anzahl CC3-immunpositiver Zellen detektiert. Auch *in vitro* Untersuchungen durch Qu *et al.* zeigten, dass es in kultivierte Knochenmarkzellen keinen Unterschied in der Anzahl apoptotischer Zellen zwischen den Zellen von Panx1-Knockout-Tieren und den Zellen des Wildtyps nach Stimulation mit u.a. ATP, Kieselsäure oder Flagellin gab (Qu *et al.*, 2011).

Zwischen den Tieren des C57BL/6N Unterstammes und den Panx1-transgenen Tieren zeigte die Analyse der Anzahl apoptotischer Zellen nach einem früh-postnatalen hypoxisch-ischämischen Insult keinen Unterschied zwischen den beiden Stämmen. Die Analyse der proliferierenden Zellen durch den Marker Ki67 wies allerdings auf eine erhöhte Proliferation in beiden Hemisphären der Panx1-transgenen Tiere hin, verglichen mit den Hemisphären der C57BL/6N Tiere. Dass Panx1 in neuronalen Stammzellen eine wichtige Rolle bei der Regulation der Proliferation spielt, konnten Wicki-Stordeur *et al.* bereits zeigen. Sie stellten fest, dass mittels Panx1 ATP freigesetzt wird, welches wiederum P2 Rezeptoren aktiviert und somit zu einer positiven Regulation der Proliferation führt (Wicki-Stordeur *et al.*, 2012). Sie konnten detektieren, dass die Zellproliferation mit steigender Panx1 Expression anstieg (Wicki-Stordeur *et al.*, 2012). Möglicherweise stehen diese gegenläufigen Beobachtungen mit dem Differenzierungsstatus der Zellen (Stammzellen *versus* postnatale Neurone) in Zusammenhang.

Zu unterschiedlichen Zeitpunkten der OGD wurde zur Bestimmung der Zellvitalität bei den primären Astrozytenkulturen der C57BL/6N Tiere und der Panx1-transgenen Tiere ein

Life/Dead-Assay durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten keinen Unterschied in der Überlebensrate zwischen dem C57BL/6N Unterstamm und dem Panx1-transgenen Stamm. Es war lediglich ein zeitabhängiger Abfall der Überlebensrate in beiden Stämmen zu detektieren, welcher ab 6h OGD eintrat. Dass die beiden Stämme die gleiche Überlebensrate aufwiesen, könnte daran liegen, dass der Signalweg eines OGD-vermittelten Zelltodes nicht Panx1-abhängig ist, sondern über andere Kanäle weitergeleitet wird. In einem Modell der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) wurde ein vergleichbarer Befund erhoben (Lutz *et al.*, 2013). In der genannten Arbeit wurde die EAE in Panx1 Knockout Mäusen und deren Kontrollen herbeigeführt. Das Ergebnis zeigte, dass es zwar keinen Unterschied in der Ausprägung der Erkrankung gab, es bei den Panx1-Knockout Mäusen allerdings zu einem verspäteten Beginn der Erkrankung kam (Lutz *et al.*, 2013). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Deletion von Panx1 nicht zu einer Verminderung einer neuralen Läsion führt, es aber den Einsatz der Läsion zeitlich verzögern kann.

Die Analyse der aktivierten Mikroglia/Makrophagen zeigte, dass weniger immunpositive Zellen und somit weniger aktivierte Mikroglia/Makrophagen im C57BL/6N Unterstamm zu detektieren waren als im Panx1-transgenen Stamm. Mikroglia sind Gliazellen, die in ihren Aufgaben den Makrophagen ähneln. Wie in Makrophagen, so ist auch in Mikroglia eine Expression von Panx1 vorhanden (Pelegriin & Surprenant, 2006; Silverman *et al.*, 2009; Rigato *et al.*, 2012). Durch eine Deletion von Panx1 wurde dementsprechend erwartet, dass es zu einer verringerten Aktivierung der Mikroglia/Makrophagen kommt. Eine mögliche Erklärung für dieses gegenteilige Ergebnis könnte sein, dass nicht Panx1 alleine für die Aktivierung von Mikroglia/Makrophagen verantwortlich ist. Durch Untersuchungen an embryonalem Gewebe konnte Rigato *et al.* feststellen, dass die Proliferation von Mikroglia hauptsächlich durch P2X7 Rezeptoren reguliert wird, und das Panx1 dabei keine Rolle spielt (Rigato *et al.*, 2012). Diese Theorie könnte auch die Ursache dafür sein, dass es in den Panx1-transgenen Tieren zu einer solch starken Aktivierung von Mikroglia/Makrophagen kommt.

Die ATP-Freisetzung in Astrozyten erfolgt einerseits über Panx1-Kanäle, andererseits auch über Cx43-Hemikanäle (Iglesias *et al.*, 2009). Die Deletion von Panx1 könnte daher in einer vermehrten Expression von Cx43 resultieren, um die ATP-Freisetzung auch in Panx1-defizienten Zellen zu gewährleisten. Die Auswertung der Cx43-Immunfluoreszenz zeigte eine vermehrte Expression von Cx43 in Panx1-defizienten Astrozyten, die in beiden Hemisphären zu beobachten war.



Auch bei den durchgeführten *in vitro*-Untersuchungen bezüglich des zellulären ATP-Gehaltes an primären Astrozytenkulturen von C57BL/6N und Panx1-transgenen Tieren konnte detektiert werden, dass die Astrozyten der Panx1-transgenen Tiere unter Kontrollbedingungen und 4h OGD signifikant mehr ATP aufwiesen als die Astrozyten der C57BL/6N Tiere. Generell kann davon ausgegangen werden, dass die Deletion von Panx1 zu einer Erhöhung der intrazellulären ATP-Konzentration führt. Zu allen anderen Zeitpunkten der OGD konnte allerdings kein Unterschied im ATP-Gehalt zwischen den beiden Stämmen festgestellt werden. Dieses Ergebnis weist daraufhin, dass die vermehrte Expression von Cx43, die in den Panx1-defizienten Astrozyten detektiert wurde, einen Einfluss auf den intrazellulären ATP-Gehalt hat. Eine mögliche Ursache hierfür könnte darin liegen, dass durch die Deletion der Panx1-Kanäle deren Funktion von Cx43-Kanälen ausgeglichen wird, wodurch u.a. der Transport von ATP kompensiert werden kann. Diese Hypothese beruht auf der Tatsache, dass in dieser Arbeit anhand von Gefrierschnitten eine geringere Cx43-immunpositive Fläche im C57BL/6N Unterstamm detektiert wurde als im Panx1-transgenen Stamm. Ein möglicher Grund für dieses Ergebnis könnte sein, dass bei der Analyse des ATP-Gehaltes die ganze Zelle lysiert wurde und nicht nur Teilbereiche wie z.B. die Mitochondrien untersucht wurden. Somit kann es möglich sein, dass zwar gleich viel ATP in beiden Stämmen vorhanden war, sich dieses ATP jedoch in unterschiedlichen Zellkompartimenten befand.

Neben dem ATP-Gehalt wurde an den primären Astrozytenkulturen beider Stämme der astrozytäre Calciumgehalt gemessen. Weder bei der Calcium-Clearance, noch bei Zugabe von extrazellulärem ATP konnte mittels des Calcium-Imaging ein Unterschied zwischen den beiden Stämmen detektiert werden. Interessant war jedoch, dass in Astrozyten des C57BL/6N Unterstammes generell eine höhere Calciumkonzentration gemessen werden konnte, als im Panx1-transgenen Stamm. Die geringere Calciumkonzentration in Zellen des Panx1-transgenen Stammes verglichen mit C57BL/6N Astrozyten lässt vermuten, dass die Weiterleitung interzellulärer Calciumwellen unter anderem ATP-abhängig ist. Es gibt zwei mögliche Wege, auf denen Calciumwellen von einer Zelle zur anderen übertragen werden können: a) über einen Calciumefflux durch Inositol Trisphosphat (IP3) oder bzw. und b) über den direkten Transport mittels Gap Junctions und Hemikanäle (Hassinger *et al.*, 1996; Cotrina *et al.*, 1998b). Neben der Weiterleitung von Calciumwellen über direkte Zellkontakte ist es auch möglich, dass ein zellulärer Calciumanstieg mittels parakriner Signale von einer Zelle zur anderen übertragen werden kann. Dies konnte insbesondere an Astrozytenkulturen detektiert werden (Hassinger *et al.*, 1996; Cotrina *et al.*, 1998b). Abeele *et al.* konnte zeigen, dass es durch eine Überexpression von Panx1 zu einer gesteigerten Durchlässigkeit von

Calcium kommt, welches somit zusätzlich zu den vorhandenen Connexinen für eine Weiterleitung des Calciums verantwortlich sind (Vanden Abeele *et al.*, 2006). Auch konnten sie zeigen, dass dies nicht nur für die Zellmembran der Fall ist, sondern dies auch im endoplasmatischen Retikulum (ER) zu sehen war.

Neben dem Einfluss von Panx1 auf die Ausprägung einer früh-postnatalen hypoxisch-ischämischen Gehirnläsion, sollte auch der Einfluss der Panx1-Deletion auf den ROS-Gehalt bzw. den Abbau von ROS analysiert werden. Die Bestimmung der ROS-Konzentration zeigte, dass der C57BL6/N Unterstamm eine größere ROS-positive Fläche besaß als der Panx1-transgene Stamm. In der Literatur ist zu finden, dass die Produktion von ROS durch Panx1 in Zusammenhang mit bestimmten Rezeptoren stehen muss. Hung *et al.* konnten an gingivalen Epithelzellen zeigen, dass Panx1 im Zusammenhang mit der Freisetzung von ATP und der daraus folgenden ROS-Produktion steht (Hung *et al.*, 2013). Um dieses Ergebnis zu erzielen, muss Panx1 allerdings mit P2X7 und P2X4 in Verbindung stehen (Hung *et al.*, 2013). Auch konnten sie feststellen, dass es durch die Inhibition von einem der Faktoren entweder zu einer veränderten ROS-Produktion oder zu einer verminderten Aktivierung des Inflammasoms kam (Hung *et al.*, 2013). Andere Arbeitsgruppen hingegen konnten zeigen, dass Panx1 direkt mit der ROS-Produktion in Verbindung steht. Ein detaillierter Mechanismus für dieses Ergebnis ist allerdings noch nicht bekannt. So wurde z.B. an hippocampalen pyramidalen Neuronen aus der Ratte festgestellt, dass es einen Zusammenhang zwischen einer verstärkten ROS-Produktion und einer gesteigerten Öffnung von Panx1-Hemikanälen gibt (Zhang *et al.*, 2008). Ob diese gesteigerte ROS-Produktion auf der verlängerten Öffnungszeit der Panx1-Hemikanäle beruht, wurde jedoch nicht analysiert. Eine weitere Arbeitsgruppe untersuchte den Einfluss von Panx1 in Keratinozyten, indem sie Panx1 unter pathologischen Bedingungen mittels eines Panx1-Antagonisten blockierten. Das Ergebnis der Arbeit zeigte, dass die Blockierung von Panx1 zu einer Verringerung des ATP-Gehaltes führte, der Zelltod durch diese Maßnahme allerdings nicht zu beeinflussen war (Onami *et al.*, 2014).

Des Weiteren wurde in der Literatur bereits vielfach eine positive Wirkung des Panx1-Blockers Probenecid auf den Verlauf und die Ausprägung bei anderen neuronalen Erkrankungen gezeigt. So konnten Hainz *et al.* durch die präventive Gabe von PBN ein verringertes Auftreten der Symptome der EAE in den Tieren nachweisen (Hainz *et al.*, 2015). Des Weiteren konnten Wei *et al.* sowie Cisneros-Mejorado *et al.* an Modellen der hypoxisch-ischämischen Gehirnläsion zeigen, dass es durch die Inhibition von Panx1 zu einer Verringerung der Gehirnläsionen kam (Cisneros-Mejorado *et al.*, 2015; Wei *et al.*, 2015). Die

Protektion durch eine Inhibition von Panx1 scheint in diesem Fall zellspezifisch zu sein. So stellte Wei et al. fest, dass es in einem Modell der hypoxisch-ischämischen Gehirnläsion durch die Gabe von PBN vor allem zu einer Neuroprotektion im CA1 Bereich des Hippocampus kommt (Wei *et al.*, 2015). Außerdem konnten sie detektieren, dass es nach einem hypoxisch-ischämischen Insult durch eine kontinuierliche Gabe von PBN für sieben Tage zu einer Verringerung der Aktivierung und der Proliferation von Mikroglia und Astrozyten kam.

Die Bestimmung des GSH/GSSG-Verhältnisses zeigte ab einer OGD-Zeit von 6h einen Anstieg dieses Ratio-Wertes. Dabei war nur ein geringer Unterschied des GSH/GSSG-Verhältnisses zwischen dem C57BL/6N Unterstamm und dem Panx1-transgenen Stamm zu sehen. Ein Anstieg der GSH/GSSG-Verhältnisses unter Stressbedingungen – in diesem Fall 6h OGD – würde allerdings bedeuten, dass der ROS-Spiegel im Vergleich zur Kontrolle gesunken war. Die Ursache hierfür könnte sein, dass durch die Verringerung von ATP bei 6h OGD und durch den geringen mitochondrialen Einstrom von Calcium weniger NADH gebildet werden konnte (Maack *et al.*, 2006; Kohlhaas & Maack, 2013). Dadurch sind freie Elektronen in der Lage, die ROS-Untereinheit  $O_2^-$  zu bilden, welche nicht durch die Oxidation von GSH zu GSSG abgebaut werden kann.

Die Untersuchungen des Einflusses einer Panx1-Deletion auf eine hypoxisch-ischämische Gehirnläsion wurden in dieser Arbeit erstmalig an früh-postnatalen Mäusen durchgeführt. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass die Deletion von Panx1 nur einen geringen Einfluss auf die Ausprägung einer früh-postnatalen hypoxisch-ischämischen Gehirnläsion hat. Allerdings konnte detektiert werden, dass es, verglichen zu den Tieren des C57BL/6N Unterstammes, in den Panx1-transgenen Tieren generell zu einer veränderten Expression des Gap Junction Proteins Cx43 und des Proliferationsmarkers Ki67 kam. Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass die Deletion von Panx1 die Ausprägung eines früh-postnatalen hypoxisch-ischämischen Insultes in dem untersuchten Modell nur in geringem Maße beeinflusst.

## 7 Schlussfolgerung

### 7.1 Der Einfluss des Nnt-Proteins auf eine hypoxisch-ischämischen Gehirnläsion

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das Protein Nnt einen Einfluss auf die Ausprägung einer früh-postnatalen hypoxisch-ischämischen Gehirnläsion hat. Aufgrund der in der Literatur bekannten Daten wurde davon ausgegangen, dass es durch das Fehlen des Nnt-Proteins zu einer stärkeren Ausprägung einer hypoxisch-ischämischen Gehirnläsion kommen muss. Diese Hypothese liegt darin begründet, dass das Protein Nnt an der Beseitigung von ROS beteiligt ist (Sauer *et al.*, 2004; Nickel *et al.*, 2013), welches als Folge einer hypoxisch-ischämischen Läsion im Nervensystem entsteht (Rousset *et al.*, 2012; Rousset *et al.*, 2013). Meimaridou *et al.* konnten an H295R-Zellen durch die Deletion des *Nnt*-Gens bereits einen Anstieg des mitochondrialen ROS-Niveaus sowie eine erhöhte Apoptose detektieren (Meimaridou *et al.*, 2012). Jedoch wurde diese Hypothese durch diese Arbeit nicht bestätigt, denn bei den Nnt-defizienten Mäusen (C57BL/6J) konnte eine geringere Ausprägung einer früh-postnatalen hypoxisch-ischämischen Läsion detektiert werden, als im Nnt-besitzenden C57BL/6N Unterstamm.

Um Analysen der Signalweg-spezifischen Faktoren zur Bildung, der Konzentration und dem Abbau von ROS durchführen zu können, wurde ein *in vitro* Modell angewandt: Primären Astrozytenkulturen beider Stämme wurden einem mehrstündigen Sauerstoff-Glukose-Entzug (OGD) ausgesetzt. Zwar zeigten die Astrozyten des C57BL/6J Unterstammes eine geringere Schädigung durch die OGD als die des C57BL/6N Unterstammes, jedoch konnten durch die Untersuchungen der Signalweg-spezifischen Faktoren nur leichte Differenzen zwischen den Unterstämmen detektiert werden. Die Hypothese zur Nutzung des Astrozyten-Modells entstand dadurch, dass eine Co-Lokalisation von 8-OHdG (ROS-Marker) und GFAP (Glia-Marker) gezeigt werden konnte, was vermuten ließ, dass die Astrozyten das entstandene ROS aufnehmen und dadurch möglicherweise geschädigt werden. Durch die gezeigten Ergebnisse stellt sich nun allerdings die Frage, ob ROS während eines hypoxisch-ischämischen Insultes nicht doch stärker in anderen neuronalen Zelltypen vorhanden ist. Eine weitere Hypothese die sich aus diesen Ergebnissen ergibt ist, dass das Protein Nnt vermutlich keinen direkten Einfluss auf den ROS-Signalweg hat. Nickel *et al.* konnten kürzlich am Modell einer Herzinsuffizienz zeigen, dass dem Nnt unter pathologischen Bedingungen eine reverse Funktion zukommt (Nickel *et al.*, 2015). Um den genauen Wirkmechanismus von Nnt nachvollziehen zu können müsste in weiteren Untersuchungen zunächst festgestellt werden, in welchem Zelltyp es zu Veränderungen der ROS-Spiegel kommt. Ein weiterer Ansatz wäre

die Analyse des detaillierten Wirkmechanismus bzw. des detaillierten Signalweges durch den das Nnt-Protein in der Zelle agiert.

## **7.2 Der Einfluss von Panx1 auf eine früh-postnatale hypoxisch-ischämische Gehirnläsion**

Im zweiten Teil dieser Arbeit konnte anhand der *in vivo* Daten gezeigt werden, dass Panx1 einen geringen Einfluss auf die Ausprägung einer früh-postnatalen hypoxisch-ischämischen Gehirnläsion hat. Anhand der *in vitro* Daten hingegen konnte kein Einfluss von Panx1 auf die untersuchten Parameter festgestellt werden. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass es durch die Deletion von Panx1 zu einer verringerten Ausprägung einer früh-postnatalen hypoxisch-ischämischen Gehirnläsion kommen muss. Die Grundlage für diese Hypothese bestand darin, dass es bei einer hypoxisch-ischämischen Gehirnläsion unter anderem zur Bildung von ROS und zur Aktivierung der Apoptose kommt. Diese Prozesse sind hochenergetisch und benötigen viel ATP (Northington *et al.*, 2001; Blomgren *et al.*, 2007; Cerio *et al.*, 2013). Des Weiteren kommt es durch einen exzessiven Abtransport von ATP aus der Zelle zu einer verlängerten Aktivierung des Panx1-Kanals, was wiederum zum Tod der Zellen führt (Locovei *et al.*, 2007). In den Ergebnissen dieser Arbeit zeigte sich zwar, dass der Panx1-transgene Stamm eine leicht verringerte Ausprägung der früh-postnatalen hypoxisch-ischämischen Gehirnläsion ausbildete als der C57BL/6N Unterstamm, jedoch konnte anhand der *in vitro* Daten weder ein Unterschied in der Überlebensrate der Astrozyten während der OGD, noch ein Unterschied bezüglich der Signalweg-spezifischen Faktoren zur Bildung, der Konzentration und dem Abbau von ROS gezeigt werden. Da es *in vivo* zu geringen Unterschieden in der Ausprägung der früh-postnatalen hypoxisch-ischämischen Gehirnläsion kam, wurde postuliert, dass Panx1 bei einem hypoxisch-ischämischen Insult eine Rolle spielt. Jedoch bleibt die Frage offen, ob Panx1 alleine oder durch die Bildung eines Komplexes mit anderen Proteinen oder Rezeptoren dabei von Bedeutung ist. Aus diesem Grund müsste in weiteren Untersuchungen analysiert werden, ob Panx1 bei einem früh-postnatalen hypoxisch-ischämischen Insult in Interaktion mit anderen Proteinen oder Rezeptoren tritt und ob diese auch in der Lage sind, ohne Panx1 in diesem Zusammenhang zu interagieren.

## 8 Literaturverzeichnis

- Abbott, N.J., Ronnback, L. & Hansson, E. (2006) Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nature reviews. Neuroscience*, **7**, 41-53.
- Abramov, A.Y. & Duchen, M.R. (2003) Actions of ionomycin, 4-BrA23187 and a novel electrogenic Ca<sup>2+</sup> ionophore on mitochondria in intact cells. *Cell calcium*, **33**, 101-112.
- Aggleton, J.P., Hunt, P.R. & Rawlins, J.N. (1986) The effects of hippocampal lesions upon spatial and non-spatial tests of working memory. *Behavioural brain research*, **19**, 133-146.
- Albertsson, A.M., Bi, D., Duan, L., Zhang, X., Leavenworth, J.W., Qiao, L., Zhu, C., Cardell, S., Cantor, H., Hagberg, H., Mallard, C. & Wang, X. (2014) The immune response after hypoxia-ischemia in a mouse model of preterm brain injury. *Journal of neuroinflammation*, **11**, 153.
- Aley, K.O. & Levine, J.D. (2002) Different peripheral mechanisms mediate enhanced nociception in metabolic/toxic and traumatic painful peripheral neuropathies in the rat. *Neuroscience*, **111**, 389-397.
- Almeida, A., Delgado-Esteban, M., Bolanos, J.P. & Medina, J.M. (2002) Oxygen and glucose deprivation induces mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurones but not in astrocytes in primary culture. *Journal of neurochemistry*, **81**, 207-217.
- Amaral, D.G., Insausti, R. & Cowan, W.M. (1984) The commissural connections of the monkey hippocampal formation. *The Journal of comparative neurology*, **224**, 307-336.
- Anderson, C.M. & Swanson, R.A. (2000) Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. *Glia*, **32**, 1-14.
- Ansari, S., Azari, H., McConnell, D.J., Afzal, A. & Mocco, J. (2011) Intraluminal middle cerebral artery occlusion (MCAO) model for ischemic stroke with laser doppler flowmetry guidance in mice. *Journal of visualized experiments : JoVE*.
- Anselmi, F., Hernandez, V.H., Crispino, G., Seydel, A., Ortolano, S., Roper, S.D., Kessar, N., Richardson, W., Rickheit, G., Filippov, M.A., Monyer, H. & Mammano, F. (2008) ATP release through connexin hemichannels and gap junction transfer of second messengers propagate Ca<sup>2+</sup> signals across the inner ear. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **105**, 18770-18775.
- Arklblad, E.L., Egorov, M., Shakhparonov, M., Romanova, L., Polzikov, M. & Rydstrom, J. (2002) Expression of proton-pumping nicotinamide nucleotide transhydrogenase in mouse, human brain and *C. elegans*. *Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology*, **133**, 13-21.
- Balaban, R.S., Nemoto, S. & Finkel, T. (2005) Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell*, **120**, 483-495.
- Ballabh, P., Braun, A. & Nedergaard, M. (2004) The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiology of disease*, **16**, 1-13.
- Bao, L., Locovei, S. & Dahl, G. (2004) Pannexin membrane channels are mechanosensitive conduits for ATP. *FEBS letters*, **572**, 65-68.
- Baranova, A., Ivanov, D., Petrash, N., Pestova, A., Skoblov, M., Kelmanson, I., Shagin, D., Nazarenko, S., Geraymovych, E., Litvin, O., Tiunova, A., Born, T.L., Usman, N., Staroverov, D., Lukyanov, S. & Panchin, Y. (2004) The mammalian pannexin family is homologous to the invertebrate innexin gap junction proteins. *Genomics*, **83**, 706-716.
- Bargiotas, P., Krenz, A., Hormuzdi, S.G., Ridder, D.A., Herb, A., Barakat, W., Penuela, S., von Engelhardt, J., Monyer, H. & Schwaninger, M. (2011) Pannexins in ischemia-induced neurodegeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **108**, 20772-20777.
- Baroja-Mazo, A., Barbera-Cremades, M. & Pelegrin, P. (2013) The participation of plasma membrane hemichannels to purinergic signaling. *Biochimica et biophysica acta*, **1828**, 79-93.
- Beckman, K.B. & Ames, B.N. (1997) Oxidative decay of DNA. *The Journal of biological chemistry*, **272**, 19633-19636.

- Benveniste, H., Drejer, J., Schousboe, A. & Diemer, N.H. (1984) Elevation of the extracellular concentrations of glutamate and aspartate in rat hippocampus during transient cerebral ischemia monitored by intracerebral microdialysis. *Journal of neurochemistry*, **43**, 1369-1374.
- Berger, T. & Frotscher, M. (1994) Distribution and morphological characteristics of oligodendrocytes in the rat hippocampus in situ and in vitro: an immunocytochemical study with the monoclonal Rip antibody. *Journal of neurocytology*, **23**, 61-74.
- Bianco, F., Pravettoni, E., Colombo, A., Schenk, U., Moller, T., Matteoli, M. & Verderio, C. (2005) Astrocyte-derived ATP induces vesicle shedding and IL-1 beta release from microglia. *Journal of immunology*, **174**, 7268-7277.
- Biran, V., Verney, C. & Ferriero, D.M. (2012) Perinatal cerebellar injury in human and animal models. *Neurology research international*, **2012**, 858929.
- Bird, C.M. & Burgess, N. (2008) The hippocampus and memory: insights from spatial processing. *Nature reviews. Neuroscience*, **9**, 182-194.
- Blomgren, K., Leist, M. & Groc, L. (2007) Pathological apoptosis in the developing brain. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*, **12**, 993-1010.
- Boassa, D., Ambrosi, C., Qiu, F., Dahl, G., Gaietta, G. & Sosinsky, G. (2007) Pannexin1 channels contain a glycosylation site that targets the hexamer to the plasma membrane. *The Journal of biological chemistry*, **282**, 31733-31743.
- Borowsky, B., Warner, J., Leavitt, B.R., Tabrizi, S.J., Roos, R.A., Durr, A., Becker, C., Sampaio, C., Tobin, A.J. & Schulman, H. (2013) 8OHdG is not a biomarker for Huntington disease state or progression. *Neurology*, **80**, 1934-1941.
- Bosco, D., Haefliger, J.A. & Meda, P. (2011) Connexins: key mediators of endocrine function. *Physiol Rev*, **91**, 1393-1445.
- Boveris, A. & Cadenas, E. (1975) Mitochondrial production of superoxide anions and its relationship to the antimycin insensitive respiration. *FEBS letters*, **54**, 311-314.
- Brown, A.M. & Ransom, B.R. (2007) Astrocyte glycogen and brain energy metabolism. *Glia*, **55**, 1263-1271.
- Bruzzone, R., Hormuzdi, S.G., Barbe, M.T., Herb, A. & Monyer, H. (2003) Pannexins, a family of gap junction proteins expressed in brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100**, 13644-13649.
- Burnsed, J.C., Chavez-Valdez, R., Hossain, M.S., Kesavan, K., Martin, L.J., Zhang, J. & Northington, F.J. (2015) Hypoxia-ischemia and therapeutic hypothermia in the neonatal mouse brain--a longitudinal study. *PloS one*, **10**, e0118889.
- Cabaj, A., Bekiesinska-Figatowska, M. & Madzik, J. (2012) MRI patterns of hypoxic-ischemic brain injury in preterm and full term infants - classical and less common MR findings. *Polish journal of radiology / Polish Medical Society of Radiology*, **77**, 71-76.
- Cerio, F.G., Lara-Celador, I., Alvarez, A. & Hilario, E. (2013) Neuroprotective therapies after perinatal hypoxic-ischemic brain injury. *Brain sciences*, **3**, 191-214.
- Chan, P.H. (1996) Role of oxidants in ischemic brain damage. *Stroke; a journal of cerebral circulation*, **27**, 1124-1129.
- Chandel, N.S., McClintock, D.S., Feliciano, C.E., Wood, T.M., Melendez, J.A., Rodriguez, A.M. & Schumacker, P.T. (2000) Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III stabilize hypoxia-inducible factor-1alpha during hypoxia: a mechanism of O2 sensing. *The Journal of biological chemistry*, **275**, 25130-25138.
- Chekeni, F.B., Elliott, M.R., Sandilos, J.K., Walk, S.F., Kinchen, J.M., Lazarowski, E.R., Armstrong, A.J., Penuela, S., Laird, D.W., Salvesen, G.S., Isakson, B.E., Bayliss, D.A. & Ravichandran, K.S. (2010) Pannexin 1 channels mediate 'find-me' signal release and membrane permeability during apoptosis. *Nature*, **467**, 863-867.
- Chen, X., Guan, T., Li, C., Shang, H., Cui, L., Li, X.M. & Kong, J. (2012) SOD1 aggregation in astrocytes following ischemia/reperfusion injury: a role of NO-mediated S-nitrosylation of protein disulfide isomerase (PDI). *Journal of neuroinflammation*, **9**, 237.

- Chen, Y. & Swanson, R.A. (2003) Astrocytes and brain injury. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, **23**, 137-149.
- Chen, Y., Vartiainen, N.E., Ying, W., Chan, P.H., Koistinaho, J. & Swanson, R.A. (2001) Astrocytes protect neurons from nitric oxide toxicity by a glutathione-dependent mechanism. *Journal of neurochemistry*, **77**, 1601-1610.
- Cherubini, E. & Miles, R. (2015) The CA3 region of the hippocampus: how is it? What is it for? How does it do it? *Frontiers in cellular neuroscience*, **9**, 19.
- Chiang, T., Messing, R.O. & Chou, W.H. (2011) Mouse model of middle cerebral artery occlusion. *Journal of visualized experiments : JoVE*.
- Choi, D.W. (1988) Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron*, **1**, 623-634.
- Cisneros-Mejorado, A., Gottlieb, M., Cavaliere, F., Magnus, T., Koch-Nolte, F., Scemes, E., Perez-Samartin, A. & Matute, C. (2015) Blockade of P2X7 receptors or pannexin-1 channels similarly attenuates postischemic damage. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, **35**, 843-850.
- Colbourne, F., Sutherland, G. & Corbett, D. (1997) Postischemic hypothermia. A critical appraisal with implications for clinical treatment. *Molecular neurobiology*, **14**, 171-201.
- Contreras, L., Drago, I., Zampese, E. & Pozzan, T. (2010) Mitochondria: the calcium connection. *Biochimica et biophysica acta*, **1797**, 607-618.
- Cooke, M.S., Lunec, J. & Evans, M.D. (2002) Progress in the analysis of urinary oxidative DNA damage. *Free radical biology & medicine*, **33**, 1601-1614.
- Cotrina, M.L., Lin, J.H., Alves-Rodrigues, A., Liu, S., Li, J., Azmi-Ghadimi, H., Kang, J., Naus, C.C. & Nedergaard, M. (1998a) Connexins regulate calcium signaling by controlling ATP release. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**, 15735-15740.
- Cotrina, M.L., Lin, J.H., Lopez-Garcia, J.C., Naus, C.C. & Nedergaard, M. (2000) ATP-mediated glia signaling. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **20**, 2835-2844.
- Cotrina, M.L., Lin, J.H. & Nedergaard, M. (1998b) Cytoskeletal assembly and ATP release regulate astrocytic calcium signaling. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **18**, 8794-8804.
- Cui, H., Kong, Y. & Zhang, H. (2012) Oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. *Journal of signal transduction*, **2012**, 646354.
- Dambaska, M. & Gajkowska, B. (2002) Hypoxic damage of the cerebellum in 7-day-old rats. Ultrastructural and histochemical study. *Acta neurobiologiae experimentalis*, **62**, 45-49.
- Danton, G.H. & Dietrich, W.D. (2003) Inflammatory mechanisms after ischemia and stroke. *J Neuropathol Exp Neurol*, **62**, 127-136.
- Davidson, J.O., Drury, P.P., Green, C.R., Nicholson, L.F., Bennet, L. & Gunn, A.J. (2014) Connexin hemichannel blockade is neuroprotective after asphyxia in preterm fetal sheep. *PloS one*, **9**, e96558.
- Davidson, J.O., Green, C.R., Bennet, L. & Gunn, A.J. (2015) Battle of the hemichannels - Connexins and Pannexins in ischemic brain injury. *International journal of developmental neuroscience : the official journal of the International Society for Developmental Neuroscience*, **45**, 66-74.
- Davidson, J.O., Green, C.R., Bennet, L., Nicholson, L.F., Danesh-Meyer, H., O'Carroll, S.J. & Gunn, A.J. (2013) A key role for connexin hemichannels in spreading ischemic brain injury. *Current drug targets*, **14**, 36-46.
- Davidson, J.O., Green, C.R., Nicholson, L.F., O'Carroll, S.J., Fraser, M., Bennet, L. & Gunn, A.J. (2012) Connexin hemichannel blockade improves outcomes in a model of fetal ischemia. *Annals of neurology*, **71**, 121-132.
- Dehouck, M.P., Meresse, S., Delorme, P., Fruchart, J.C. & Cecchelli, R. (1990) An easier, reproducible, and mass-production method to study the blood-brain barrier in vitro. *Journal of neurochemistry*, **54**, 1798-1801.



- Deng, Y., Lu, J., Sivakumar, V., Ling, E.A. & Kaur, C. (2008) Amoeboid microglia in the periventricular white matter induce oligodendrocyte damage through expression of proinflammatory cytokines via MAP kinase signaling pathway in hypoxic neonatal rats. *Brain pathology*, **18**, 387-400.
- Dermietzel, R., Hertberg, E.L., Kessler, J.A. & Spray, D.C. (1991) Gap junctions between cultured astrocytes: immunocytochemical, molecular, and electrophysiological analysis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **11**, 1421-1432.
- Dirnagl, U., Iadecola, C. & Moskowitz, M.A. (1999) Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends in neurosciences*, **22**, 391-397.
- Dobbing, J. (1974) The later growth of the brain and its vulnerability. *Pediatrics*, **53**, 2-6.
- Dringen, R. (2000) Metabolism and functions of glutathione in brain. *Progress in neurobiology*, **62**, 649-671.
- Drukarch, B., Schepens, E., Jongenelen, C.A., Stoof, J.C. & Langeveld, C.H. (1997) Astrocyte-mediated enhancement of neuronal survival is abolished by glutathione deficiency. *Brain research*, **770**, 123-130.
- Du Plessis, A.J.V., J.J. (2002) Perinatal brain injury in the preterm and term newborn. *Curr Opin Neurol*, **15**, 151-157.
- Duan, S., Anderson, C.M., Keung, E.C., Chen, Y., Chen, Y. & Swanson, R.A. (2003) P2X7 receptor-mediated release of excitatory amino acids from astrocytes. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **23**, 1320-1328.
- Dugan, L.L. & Choi, D.W. (1994) Excitotoxicity, free radicals, and cell membrane changes. *Annals of neurology*, **35 Suppl**, S17-21.
- Duva, C.A., Floresco, S.B., Wunderlich, G.R., Lao, T.L., Pinel, J.P. & Phillips, A.G. (1997) Disruption of spatial but not object-recognition memory by neurotoxic lesions of the dorsal hippocampus in rats. *Behavioral neuroscience*, **111**, 1184-1196.
- Dzhala, V.I., Brumback, A.C. & Staley, K.J. (2008) Bumetanide enhances phenobarbital efficacy in a neonatal seizure model. *Annals of neurology*, **63**, 222-235.
- Dzhala, V.I., Kuchibhotla, K.V., Glykys, J.C., Kahle, K.T., Swiercz, W.B., Feng, G., Kuner, T., Augustine, G.J., Bacsikai, B.J. & Staley, K.J. (2010) Progressive NKCC1-dependent neuronal chloride accumulation during neonatal seizures. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **30**, 11745-11761.
- Edwards, A.D., Wyatt, J.S. & Thoresen, M. (1998) Treatment of hypoxic-ischaemic brain damage by moderate hypothermia. *Archives of disease in childhood. Fetal and neonatal edition*, **78**, F85-88.
- Elliott, M.R., Chekeni, F.B., Trampont, P.C., Lazarowski, E.R., Kadl, A., Walk, S.F., Park, D., Woodson, R.I., Ostankovich, M., Sharma, P., Lysiak, J.J., Harden, T.K., Leitinger, N. & Ravichandran, K.S. (2009) Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. *Nature*, **461**, 282-286.
- Emsley, H.C. & Tyrrell, P.J. (2002) Inflammation and infection in clinical stroke. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, **22**, 1399-1419.
- Fatemi, A., Wilson, M.A. & Johnston, M.V. (2009) Hypoxic-ischemic encephalopathy in the term infant. *Clinics in perinatology*, **36**, 835-858, vii.
- Ferriero, D.M. (2001) Oxidant Mechanisms in Neonatal Hypoxia-Ischemia. *Developmental neuroscience*, **23**, 198-202.
- Ferriero, D.M. (2004) Neonatal brain injury. *The New England journal of medicine*, **351**, 1985-1995.
- Fisher-Wellman, K.H., Lin, C.T., Ryan, T.E., Reese, L.R., Gilliam, L.A., Cathey, B.L., Lark, D.S., Smith, C.D., Muoio, D.M. & Neuffer, P.D. (2015) Pyruvate dehydrogenase complex and nicotinamide nucleotide transhydrogenase constitute an energy-consuming redox circuit. *The Biochemical journal*, **467**, 271-280.
- Franklin, K.B.J. & Paxinos, G. (2008) *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates, Compact, 3rd Edition*. Elsevier.

- Fujimura, M., Morita-Fujimura, Y., Murakami, K., Kawase, M. & Chan, P.H. (1998) Cytosolic redistribution of cytochrome c after transient focal cerebral ischemia in rats. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, **18**, 1239-1247.
- Gauthier, L.D., Greenstein, J.L., Cortassa, S., O'Rourke, B. & Winslow, R.L. (2013) A computational model of reactive oxygen species and redox balance in cardiac mitochondria. *Biophysical journal*, **105**, 1045-1056.
- Giordano, F.J. (2005) Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure. *Journal of Clinical Investigation*, **115**, 500-508.
- Goodenough, D.A. & Paul, D.L. (2009) Gap junctions. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, **1**, a002576.
- Gunn, A.J., Gunn, T.R., de Haan, H.H., Williams, C.E. & Gluckman, P.D. (1997) Dramatic neuronal rescue with prolonged selective head cooling after ischemia in fetal lambs. *The Journal of clinical investigation*, **99**, 248-256.
- Gunn, A.J., Gunn, T.R., Gunning, M.I., Williams, C.E. & Gluckman, P.D. (1998) Neuroprotection with prolonged head cooling started before postischemic seizures in fetal sheep. *Pediatrics*, **102**, 1098-1106.
- Hagberg, H., Bona, E., Gilland, E. & Puka-Sundvall, M. (1997) Hypoxia-ischaemia model in the 7-day-old rat: possibilities and shortcomings. *Acta paediatrica*, **422**, 85-88.
- Hagberg, H., Peebles, D. & Mallard, C. (2002) Models of white matter injury: comparison of infectious, hypoxic-ischemic, and excitotoxic insults. *Mental retardation and developmental disabilities research reviews*, **8**, 30-38.
- Hagberg, H., Wilson, M.A., Matsushita, H., Zhu, C., Lange, M., Gustavsson, M., Poitras, M.F., Dawson, T.M., Dawson, V.L., Northington, F. & Johnston, M.V. (2004) PARP-1 gene disruption in mice preferentially protects males from perinatal brain injury. *Journal of neurochemistry*, **90**, 1068-1075.
- Hainz, N., Wolf, S., Tschernig, T. & Meier, C. (2015) Probenecid Application Prevents Clinical Symptoms and Inflammation in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Inflammation*.
- Halestrap, A. (2005) Biochemistry: a pore way to die. *Nature*, **434**, 578-579.
- Hassinger, T.D., Guthrie, P.B., Atkinson, P.B., Bennett, M.V. & Kater, S.B. (1996) An extracellular signaling component in propagation of astrocytic calcium waves. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **93**, 13268-13273.
- Heiker, J.T., Kern, M., Kosacka, J., Flehmig, G., Stumvoll, M., Shang, E., Lohmann, T., Dressler, M., Kovacs, P., Bluher, M. & Kloting, N. (2013) Nicotinamide nucleotide transhydrogenase mRNA expression is related to human obesity. *Obesity*, **21**, 529-534.
- Herson, P.S., Bombardier, C.G., Parker, S.M., Shimizu, T., Klawitter, J., Klawitter, J., Quillinan, N., Exo, J.L., Goldenberg, N.A. & Traystman, R.J. (2013) Experimental pediatric arterial ischemic stroke model reveals sex-specific estrogen signaling. *Stroke; a journal of cerebral circulation*, **44**, 759-763.
- Huang, Q., Zhang, R., Zou, L., Cao, X. & Chu, X. (2013) Cell death pathways in astrocytes with a modified model of oxygen-glucose deprivation. *PloS one*, **8**, e61345.
- Huang, W.J., Zhang, X. & Chen, W.W. (2016) Role of oxidative stress in Alzheimer's disease. *Biomedical reports*, **4**, 519-522.
- Hung, S.C., Choi, C.H., Said-Sadier, N., Johnson, L., Atanasova, K.R., Sellami, H., Yilmaz, O. & Ojcius, D.M. (2013) P2X4 assembles with P2X7 and pannexin-1 in gingival epithelial cells and modulates ATP-induced reactive oxygen species production and inflammasome activation. *PloS one*, **8**, e70210.
- Iacobas, D.A., Suadicani, S.O., Iacobas, S., Chrisman, C., Cohen, M.A., Spray, D.C. & Scemes, E. (2007) Gap junction and purinergic P2 receptor proteins as a functional unit: insights from transcriptomics. *The Journal of membrane biology*, **217**, 83-91.
- Iglesias, R., Dahl, G., Qiu, F., Spray, D.C. & Scemes, E. (2009) Pannexin 1: the molecular substrate of astrocyte "hemichannels". *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **29**, 7092-7097.

- Iglesias, R., Locovei, S., Roque, A., Alberto, A.P., Dahl, G., Spray, D.C. & Scemes, E. (2008) P2X7 receptor-Pannexin1 complex: pharmacology and signaling. *American journal of physiology. Cell physiology*, **295**, C752-760.
- Inder, T.E. & Huppi, P.S. (2000) In vivo studies of brain development by magnetic resonance techniques. *Mental retardation and developmental disabilities research reviews*, **6**, 59-67.
- Jansen, E.M. & Low, W.C. (1996) Long-term effects of neonatal ischemic-hypoxic brain injury on sensorimotor and locomotor tasks in rats. *Behavioural brain research*, **78**, 189-194.
- Jantzie, L.L., Cheung, P.Y. & Todd, K.G. (2005) Doxycycline reduces cleaved caspase-3 and microglial activation in an animal model of neonatal hypoxia-ischemia. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, **25**, 314-324.
- Jian, Z., Ding, S., Deng, H., Wang, J., Yi, W., Wang, L., Zhu, S., Gu, L. & Xiong, X. (2016) Probenecid protects against oxygen-glucose deprivation injury in primary astrocytes by regulating inflammasome activity. *Brain research*.
- Kahle, K.T., Staley, K.J., Nahed, B.V., Gamba, G., Hebert, S.C., Lifton, R.P. & Mount, D.B. (2008) Roles of the cation-chloride cotransporters in neurological disease. *Nature clinical practice. Neurology*, **4**, 490-503.
- Kalogeris, T., Baines, C.P., Krenz, M. & Korthuis, R.J. (2012) Cell biology of ischemia/reperfusion injury. *International review of cell and molecular biology*, **298**, 229-317.
- Kang, J., Kang, N., Lovatt, D., Torres, A., Zhao, Z., Lin, J. & Nedergaard, M. (2008) Connexin 43 hemichannels are permeable to ATP. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **28**, 4702-4711.
- Kang, S.K., Markowitz, G.J., Kim, S.T., Johnston, M.V. & Kadam, S.D. (2015) Age- and sex-dependent susceptibility to phenobarbital-resistant neonatal seizures: role of chloride co-transporters. *Frontiers in cellular neuroscience*, **9**, 173.
- Katsura, K., Kristian, T. & Siesjo, B.K. (1994) Energy metabolism, ion homeostasis, and cell damage in the brain. *Biochemical Society transactions*, **22**, 991-996.
- Kaushal, V. & Schlichter, L.C. (2008) Mechanisms of microglia-mediated neurotoxicity in a new model of the stroke penumbra. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **28**, 2221-2230.
- Kingham, P.J., Cuzner, M.L. & Pocock, J.M. (1999) Apoptotic pathways mobilized in microglia and neurones as a consequence of chromogranin A-induced microglial activation. *Journal of neurochemistry*, **73**, 538-547.
- Kitamura, Y., Takata, K., Inden, M., Tsuchiya, D., Yanagisawa, D., Nakata, J. & Taniguchi, T. (2004) Intracerebroventricular injection of microglia protects against focal brain ischemia. *J Pharmacol Sci*, **94**, 203-206.
- Kohlhaas, M. & Maack, C. (2013) Calcium release microdomains and mitochondria. *Cardiovascular research*, **98**, 259-268.
- Lafemina, M.J., Sheldon, R.A. & Ferriero, D.M. (2006) Acute hypoxia-ischemia results in hydrogen peroxide accumulation in neonatal but not adult mouse brain. *Pediatric research*, **59**, 680-683.
- Lai, M.C. & Yang, S.N. (2011) Perinatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *Journal of biomedicine & biotechnology*, **2011**, 609813.
- Lalancette-Hebert, M., Gowing, G., Simard, A., Weng, Y.C. & Kriz, J. (2007) Selective ablation of proliferating microglial cells exacerbates ischemic injury in the brain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **27**, 2596-2605.
- Laptook, A.R. & Corbett, R.J. (2002) The effects of temperature on hypoxic-ischemic brain injury. *Clinics in perinatology*, **29**, 623-649, vi.
- Laptook, A.R., Corbett, R.J., Sterett, R., Burns, D.K., Tollefsbol, G. & Garcia, D. (1994) Modest hypothermia provides partial neuroprotection for ischemic neonatal brain. *Pediatric research*, **35**, 436-442.
- Levine, S. (1960) Anoxic ischemic encephalopathy in rats. *The American Journal of Pathology*, **36**, 1-17.

- Levy, W.B., Desmond, N.L. & Zhang, D.X. (1998) Perforant path activation modulates the induction of long-term potentiation of the schaffer collateral-hippocampal CA1 response: theoretical and experimental analyses. *Learning & memory*, **4**, 510-518.
- Li, S., Mealing, G.A., Morley, P. & Stys, P.K. (1999) Novel injury mechanism in anoxia and trauma of spinal cord white matter: glutamate release via reverse Na<sup>+</sup>-dependent glutamate transport. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **19**, RC16.
- Liu, C.L., Siesjo, B.K. & Hu, B.R. (2004a) Pathogenesis of hippocampal neuronal death after hypoxia-ischemia changes during brain development. *Neuroscience*, **127**, 113-123.
- Liu, F., Akella, P., Benashski, S.E., Xu, Y. & McCullough, L.D. (2010) Expression of Na-K-Cl cotransporter and edema formation are age dependent after ischemic stroke. *Experimental neurology*, **224**, 356-361.
- Liu, F., Yuan, R., Benashski, S.E. & McCullough, L.D. (2009) Changes in experimental stroke outcome across the life span. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, **29**, 792-802.
- Liu, H., Uno, M., Kitazato, K.T., Suzue, A., Manabe, S., Yamasaki, H., Shono, M. & Nagahiro, S. (2004b) Peripheral oxidative biomarkers constitute a valuable indicator of the severity of oxidative brain damage in acute cerebral infarction. *Brain research*, **1025**, 43-50.
- Liu, Y., Silverstein, F.S., Skoff, R. & Barks, J.D. (2002) Hypoxic-ischemic oligodendroglial injury in neonatal rat brain. *Pediatric research*, **51**, 25-33.
- Locovei, S., Bao, L. & Dahl, G. (2006a) Pannexin 1 in erythrocytes: function without a gap. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**, 7655-7659.
- Locovei, S., Scemes, E., Qiu, F., Spray, D.C. & Dahl, G. (2007) Pannexin1 is part of the pore forming unit of the P2X(7) receptor death complex. *FEBS letters*, **581**, 483-488.
- Locovei, S., Wang, J. & Dahl, G. (2006b) Activation of pannexin 1 channels by ATP through P2Y receptors and by cytoplasmic calcium. *FEBS letters*, **580**, 239-244.
- Logitharajah, P., Rutherford, M.A. & Cowan, F.M. (2009) Hypoxic-ischemic encephalopathy in preterm infants: antecedent factors, brain imaging, and outcome. *Pediatric research*, **66**, 222-229.
- Lopert, P. & Patel, M. (2014) Nicotinamide Nucleotide Transhydrogenase (Nnt) Links the Substrate Requirement in Brain Mitochondria for Hydrogen Peroxide Removal to the Thioredoxin/Peroxiredoxin (Trx/Prx) System. *The Journal of biological chemistry*, **289**, 15611-15620.
- Lutz, S.E., Gonzalez-Fernandez, E., Ventura, J.C., Perez-Samartin, A., Tarassishin, L., Negro, H., Patel, N.K., Sudicani, S.O., Lee, S.C., Matute, C. & Scemes, E. (2013) Contribution of pannexin1 to experimental autoimmune encephalomyelitis. *PLoS one*, **8**, e66657.
- Maack, C., Cortassa, S., Aon, M.A., Ganesan, A.N., Liu, T. & O'Rourke, B. (2006) Elevated cytosolic Na<sup>+</sup> decreases mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uptake during excitation-contraction coupling and impairs energetic adaptation in cardiac myocytes. *Circulation research*, **99**, 172-182.
- MacVicar, B.A. & Thompson, R.J. (2010) Non-junction functions of pannexin-1 channels. *Trends in neurosciences*, **33**, 93-102.
- Madry, C., Haglerod, C. & Attwell, D. (2010) The role of pannexin hemichannels in the anoxic depolarization of hippocampal pyramidal cells. *Brain : a journal of neurology*, **133**, 3755-3763.
- Makowski, L., Caspar, D.L., Phillips, W.C. & Goodenough, D.A. (1977) Gap junction structures. II. Analysis of the x-ray diffraction data. *The Journal of cell biology*, **74**, 629-645.
- Malgrange, B., Rogister, B., Lefebvre, P.P., Mazy-Servais, C., Welcher, A.A., Bonnet, C., Hsu, R.Y., Rigo, J.M., Van De Water, T.R. & Moonen, G. (1998) Expression of growth factors and their receptors in the postnatal rat cochlea. *Neurochemical research*, **23**, 1133-1138.
- Marcos-Ramiro, B., Garcia-Weber, D. & Millan, J. (2014) TNF-induced endothelial barrier disruption: beyond actin and Rho. *Thrombosis and haemostasis*, **112**, 1088-1102.
- Martin, R.L., Lloyd, H.G. & Cowan, A.I. (1994) The early events of oxygen and glucose deprivation: setting the scene for neuronal death? *Trends in neurosciences*, **17**, 251-257.

- Matsuoka, Y., Kitamura, Y., Tooyama, I., Kimura, H. & Taniguchi, T. (1997) In vivo hypoxia-induced neuronal damage with an enhancement of neuronal nitric oxide synthase immunoreactivity in hippocampus. *Experimental neurology*, **146**, 57-66.
- Mayo, C., Ren, R., Rich, C., Stepp, M.A. & Trinkaus-Randall, V. (2008) Regulation by P2X7: epithelial migration and stromal organization in the cornea. *Investigative ophthalmology & visual science*, **49**, 4384-4391.
- McNaught, K.S. & Jenner, P. (1999) Altered glial function causes neuronal death and increases neuronal susceptibility to 1-methyl-4-phenylpyridinium- and 6-hydroxydopamine-induced toxicity in astrocytic/ventral mesencephalic co-cultures. *Journal of neurochemistry*, **73**, 2469-2476.
- Meier, C., Middelanis, J., Wasielewski, B., Neuhoff, S., Roth-Haerer, A., Gantert, M., Dinse, H.R., Dermietzel, R. & Jensen, A. (2006) Spastic paresis after perinatal brain damage in rats is reduced by human cord blood mononuclear cells. *Pediatric research*, **59**, 244-249.
- Meier, C. & Rosenkranz, K. (2014) Cx43 expression and function in the nervous system-implications for stem cell mediated regeneration. *Frontiers in physiology*, **5**, 106.
- Meimaridou, E., Kowalczyk, J., Guasti, L., Hughes, C.R., Wagner, F., Frommolt, P., Nurnberg, P., Mann, N.P., Banerjee, R., Saka, H.N., Chapple, J.P., King, P.J., Clark, A.J. & Metherell, L.A. (2012) Mutations in NNT encoding nicotinamide nucleotide transhydrogenase cause familial glucocorticoid deficiency. *Nature genetics*, **44**, 740-742.
- Mekada, K., Abe, K., Murakami, A., Nakamura, S., Nakata, H., Moriwaki, K., Obata, Y. & Yoshiki, A. (2009) Genetic differences among C57BL/6 substrains. *Exp Anim*, **58**, 141-149.
- Minamisawa, H., Smith, M.L. & Siesjo, B.K. (1990) The effect of mild hyperthermia and hypothermia on brain damage following 5, 10, and 15 minutes of forebrain ischemia. *Annals of neurology*, **28**, 26-33.
- Morris, R.G., Garrud, P., Rawlins, J.N. & O'Keefe, J. (1982) Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. *Nature*, **297**, 681-683.
- Murphy, M.P. (2009) How mitochondria produce reactive oxygen species. *The Biochemical journal*, **417**, 1-13.
- Nakase, T., Sohl, G., Theis, M., Willecke, K. & Naus, C.C. (2004) Increased apoptosis and inflammation after focal brain ischemia in mice lacking connexin43 in astrocytes. *Am J Pathol*, **164**, 2067-2075.
- Neuhaus, W., Gaiser, F., Mahringer, A., Franz, J., Riethmuller, C. & Forster, C. (2014) The pivotal role of astrocytes in an in vitro stroke model of the blood-brain barrier. *Frontiers in cellular neuroscience*, **8**, 352.
- Nicholson, A., Reifsnnyder, P.C., Malcolm, R.D., Lucas, C.A., MacGregor, G.R., Zhang, W. & Leiter, E.H. (2010) Diet-induced obesity in two C57BL/6 substrains with intact or mutant nicotinamide nucleotide transhydrogenase (Nnt) gene. *Obesity*, **18**, 1902-1905.
- Nickel, A., Kohlhaas, M. & Maack, C. (2014) Mitochondrial reactive oxygen species production and elimination. *Journal of molecular and cellular cardiology*, **73**, 26-33.
- Nickel, A., Loffler, J. & Maack, C. (2013) Myocardial energetics in heart failure. *Basic research in cardiology*, **108**, 358.
- Nickel, A.G., von Hardenberg, A., Hohl, M., Loffler, J.R., Kohlhaas, M., Becker, J., Reil, J.C., Kazakov, A., Bonnekoh, J., Stadelmaier, M., Puhl, S.L., Wagner, M., Bogeski, I., Cortassa, S., Kappl, R., Pasiaka, B., Lafontaine, M., Lancaster, C.R., Blacker, T.S., Hall, A.R., Duchon, M.R., Kastner, L., Lipp, P., Zeller, T., Muller, C., Knopp, A., Laufs, U., Bohm, M., Hoth, M. & Maack, C. (2015) Reversal of Mitochondrial Transhydrogenase Causes Oxidative Stress in Heart Failure. *Cell metabolism*, **22**, 472-484.
- Northington, F.J., Chavez-Valdez, R. & Martin, L.J. (2011) Neuronal cell death in neonatal hypoxia-ischemia. *Annals of neurology*, **69**, 743-758.
- Northington, F.J., Ferriero, D.M., Graham, E.M., Traystman, R.J. & Martin, L.J. (2001) Early Neurodegeneration after Hypoxia-Ischemia in Neonatal Rat Is Necrosis while Delayed Neuronal Death Is Apoptosis. *Neurobiology of disease*, **8**, 207-219.

- O'Neill, L.A. & Kaltschmidt, C. (1997) NF-kappa B: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function. *Trends in neurosciences*, **20**, 252-258.
- Onami, K., Kimura, Y., Ito, Y., Yamauchi, T., Yamasaki, K. & Aiba, S. (2014) Nonmetal haptens induce ATP release from keratinocytes through opening of pannexin hemichannels by reactive oxygen species. *The Journal of investigative dermatology*, **134**, 1951-1960.
- Orellana, J.A., Hernandez, D.E., Ezan, P., Velarde, V., Bennett, M.V., Giaume, C. & Saez, J.C. (2010) Hypoxia in high glucose followed by reoxygenation in normal glucose reduces the viability of cortical astrocytes through increased permeability of connexin 43 hemichannels. *Glia*, **58**, 329-343.
- Panchin, Y., Kelmanson, I., Matz, M., Lukyanov, K., Usman, N. & Lukyanov, S. (2000) A ubiquitous family of putative gap junction molecules. *Current biology : CB*, **10**, R473-474.
- Panchin, Y.V. (2005) Evolution of gap junction proteins--the pannexin alternative. *The Journal of experimental biology*, **208**, 1415-1419.
- Pelegri, P., Barroso-Gutierrez, C. & Surprenant, A. (2008) P2X7 receptor differentially couples to distinct release pathways for IL-1beta in mouse macrophage. *Journal of immunology*, **180**, 7147-7157.
- Pelegri, P. & Surprenant, A. (2006) Pannexin-1 mediates large pore formation and interleukin-1beta release by the ATP-gated P2X7 receptor. *The EMBO journal*, **25**, 5071-5082.
- Pelegri, P. & Surprenant, A. (2009) The P2X(7) receptor-pannexin connection to dye uptake and IL-1beta release. *Purinergic signalling*, **5**, 129-137.
- Penuela, S., Gehi, R. & Laird, D.W. (2013) The biochemistry and function of pannexin channels. *Biochimica et biophysica acta*, **1828**, 15-22.
- Pereira, L.O., Arteni, N.S., Petersen, R.C., da Rocha, A.P., Achaval, M. & Netto, C.A. (2007) Effects of daily environmental enrichment on memory deficits and brain injury following neonatal hypoxia-ischemia in the rat. *Neurobiology of learning and memory*, **87**, 101-108.
- Perlman, J.M. (2006a) Intervention strategies for neonatal hypoxic-ischemic cerebral injury. *Clinical therapeutics*, **28**, 1353-1365.
- Perlman, J.M. (2006b) Summary proceedings from the neurology group on hypoxic-ischemic encephalopathy. *Pediatrics*, **117**, S28-33.
- Poderoso, J.J., Lisdero, C., Schopfer, F., Riobo, N., Carreras, M.C., Cadenas, E. & Boveris, A. (1999) The regulation of mitochondrial oxygen uptake by redox reactions involving nitric oxide and ubiquinol. *The Journal of biological chemistry*, **274**, 37709-37716.
- Qu, Y., Misaghi, S., Newton, K., Gilmour, L.L., Louie, S., Cupp, J.E., Dubyak, G.R., Hackos, D. & Dixit, V.M. (2011) Pannexin-1 is required for ATP release during apoptosis but not for inflammasome activation. *Journal of immunology*, **186**, 6553-6561.
- Ray, A., Zoidl, G., Weickert, S., Wahle, P. & Dermietzel, R. (2005) Site-specific and developmental expression of pannexin1 in the mouse nervous system. *The European journal of neuroscience*, **21**, 3277-3290.
- Rice, J.E. (1981) The Influence of Immaturity on Hypoxic-Ischemic Brain Damage in the Rat. *Annals of neurology*, **9**, 131-141.
- Rigato, C., Swinnen, N., Buckinx, R., Couillin, I., Mangin, J.M., Rigo, J.M., Legendre, P. & Le Corronc, H. (2012) Microglia proliferation is controlled by P2X7 receptors in a Pannexin-1-independent manner during early embryonic spinal cord invasion. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **32**, 11559-11573.
- Ripoll, V.M., Meadows, N.A., Bangert, M., Lee, A.W., Kadioglu, A. & Cox, R.D. (2012) Nicotinamide nucleotide transhydrogenase (NNT) acts as a novel modulator of macrophage inflammatory responses. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, **26**, 3550-3562.
- Rong, Z., Pan, R., Chang, L. & Lee, W. (2015) Combination treatment with ethyl pyruvate and IGF-I exerts neuroprotective effects against brain injury in a rat model of neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy. *International journal of molecular medicine*, **36**, 195-203.
- Rosenkranz, K. & Meier, C. (2011) Umbilical cord blood cell transplantation after brain ischemia--from recovery of function to cellular mechanisms. *Annals of anatomy*, **193**, 371-379.

- Rothwell, N.J. & Hopkins, S.J. (1995) Cytokines and the nervous system II: Actions and mechanisms of action. *Trends in neurosciences*, **18**, 130-136.
- Rousselet, E., Kriz, J. & Seidah, N.G. (2012) Mouse model of intraluminal MCAO: cerebral infarct evaluation by cresyl violet staining. *Journal of visualized experiments : JoVE*.
- Rousset, C.I., Baburamani, A.A., Thornton, C. & Hagberg, H. (2012) Mitochondria and perinatal brain injury. *The journal of maternal-fetal & neonatal medicine*, **25 Suppl 1**, 35-38.
- Rousset, C.I., Kassem, J., Aubert, A., Planchenault, D., Gressens, P., Chalon, S., Belzung, C. & Saliba, E. (2013) Maternal exposure to lipopolysaccharide leads to transient motor dysfunction in neonatal rats. *Developmental neuroscience*, **35**, 172-181.
- Ruscher, K., Isaev, N., Trendelenburg, G., Weih, M., Iurato, L., Meisel, A. & Dirnagl, U. (1998) Induction of hypoxia inducible factor 1 by oxygen glucose deprivation is attenuated by hypoxic preconditioning in rat cultured neurons. *Neurosci Lett*, **254**, 117-120.
- Sanderson, T.H., Reynolds, C.A., Kumar, R., Przyklenk, K. & Huttemann, M. (2013) Molecular mechanisms of ischemia-reperfusion injury in brain: pivotal role of the mitochondrial membrane potential in reactive oxygen species generation. *Molecular neurobiology*, **47**, 9-23.
- Santilli, G., Lamorte, G., Carlessi, L., Ferrari, D., Rota Nodari, L., Binda, E., Delia, D., Vescovi, A.L. & De Filippis, L. (2010) Mild hypoxia enhances proliferation and multipotency of human neural stem cells. *PLoS one*, **5**, e8575.
- Sauer, U., Canonaco, F., Heri, S., Perrenoud, A. & Fischer, E. (2004) The soluble and membrane-bound transhydrogenases UdhA and PntAB have divergent functions in NADPH metabolism of *Escherichia coli*. *The Journal of biological chemistry*, **279**, 6613-6619.
- Scemes, E., Spray, D.C. & Meda, P. (2009) Connexins, pannexins, innexins: novel roles of "hemichannels". *Pflügers Archiv : European journal of physiology*, **457**, 1207-1226.
- Schenk, U., Westendorf, A.M., Radaelli, E., Casati, A., Ferro, M., Fumagalli, M., Verderio, C., Buer, J., Scanziani, E. & Grassi, F. (2008) Purinergic control of T cell activation by ATP released through pannexin-1 hemichannels. *Science signaling*, **1**, ra6.
- Schmidt-Kastner, R. (2015) Genomic approach to selective vulnerability of the hippocampus in brain ischemia-hypoxia. *Neuroscience*, **309**, 259-279.
- Seki, Y., Feustel, P.J., Keller, R.W., Jr., Tranmer, B.I. & Kimelberg, H.K. (1999) Inhibition of ischemia-induced glutamate release in rat striatum by dihydrokinate and an anion channel blocker. *Stroke; a journal of cerebral circulation*, **30**, 433-440.
- Sheldon, R.A., Sedik, C. & Ferriero, D.M. (1998) Strain-related brain injury in neonatal mice subjected to hypoxia-ischemia. *Brain research*, **810**, 114-122.
- Shestopalov, V.I. & Slepak, V.Z. (2014) Molecular pathways of pannexin1-mediated neurotoxicity. *Frontiers in physiology*, **5**, 23.
- Shigenaga, M.K., Gimeno, C.J. & Ames, B.N. (1989) Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine as a biological marker of in vivo oxidative DNA damage. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **86**, 9697-9701.
- Shimizu, K., Rajapakse, N., Horiguchi, T., Payne, R.M. & Busija, D.W. (2003) Neuroprotection against hypoxia-ischemia in neonatal rat brain by novel superoxide dismutase mimetics. *Neurosci Lett*, **346**, 41-44.
- Sibson, N.R., Dhankhar, A., Mason, G.F., Rothman, D.L., Behar, K.L. & Shulman, R.G. (1998) Stoichiometric coupling of brain glucose metabolism and glutamatergic neuronal activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**, 316-321.
- Silverman, W.R., de Rivero Vaccari, J.P., Locovei, S., Qiu, F., Carlsson, S.K., Scemes, E., Keane, R.W. & Dahl, G. (2009) The pannexin 1 channel activates the inflammasome in neurons and astrocytes. *The Journal of biological chemistry*, **284**, 18143-18151.
- Simard, M. & Nedergaard, M. (2004) The neurobiology of glia in the context of water and ion homeostasis. *Neuroscience*, **129**, 877-896.
- Slivka, A., Mytilineou, C. & Cohen, G. (1987) Histochemical evaluation of glutathione in brain. *Brain research*, **409**, 275-284.

- Sofroniew, M.V. & Vinters, H.V. (2010) Astrocytes: biology and pathology. *Acta neuropathologica*, **119**, 7-35.
- Sohl, G. & Willecke, K. (2003) An update on connexin genes and their nomenclature in mouse and man. *Cell communication & adhesion*, **10**, 173-180.
- Sohl, G. & Willecke, K. (2004) Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovascular research*, **62**, 228-232.
- Sokoloff, L., Reivich, M., Kennedy, C., Des Rosiers, M.H., Patlak, C.S., Pettigrew, K.D., Sakurada, O. & Shinohara, M. (1977) The [<sup>14</sup>C]deoxyglucose method for the measurement of local cerebral glucose utilization: theory, procedure, and normal values in the conscious and anesthetized albino rat. *Journal of neurochemistry*, **28**, 897-916.
- Spray, D.C., Ye, Z.C. & Ransom, B.R. (2006) Functional connexin "hemichannels": a critical appraisal. *Glia*, **54**, 758-773.
- Stout, C.E., Costantin, J.L., Naus, C.C. & Charles, A.C. (2002) Intercellular calcium signaling in astrocytes via ATP release through connexin hemichannels. *The Journal of biological chemistry*, **277**, 10482-10488.
- Strasser, U. & Fischer, G. (1995) Quantitative measurement of neuronal degeneration in organotypic hippocampal cultures after combined oxygen/glucose deprivation. *Journal of neuroscience methods*, **57**, 177-186.
- Swanson, R.A., Chen, J. & Graham, S.H. (1994) Glucose can fuel glutamate uptake in ischemic brain. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, **14**, 1-6.
- Szydłowska, K. & Tymianski, M. (2010) Calcium, ischemia and excitotoxicity. *Cell calcium*, **47**, 122-129.
- Tajiri, S., Oyadomari, S., Yano, S., Morioka, M., Gotoh, T., Hamada, J.I., Ushio, Y. & Mori, M. (2004) Ischemia-induced neuronal cell death is mediated by the endoplasmic reticulum stress pathway involving CHOP. *Cell Death Differ*, **11**, 403-415.
- Talukder, M.A., Zweier, J.L. & Periasamy, M. (2009) Targeting calcium transport in ischaemic heart disease. *Cardiovascular research*, **84**, 345-352.
- Ten, V.S., Bradley-Moore, M., Gingrich, J.A., Stark, R.I. & Pinsky, D.J. (2003) Brain injury and neurofunctional deficit in neonatal mice with hypoxic-ischemic encephalopathy. *Behavioural brain research*, **145**, 209-219.
- Ten, V.S. & Starkov, A. (2012) Hypoxic-ischemic injury in the developing brain: the role of reactive oxygen species originating in mitochondria. *Neurology research international*, **2012**, 542976.
- Thompson, R.J., Zhou, N. & MacVicar, B.A. (2006) Ischemia opens neuronal gap junction hemichannels. *Science*, **312**, 924-927.
- Thoresen, M., Bagenholm, R., Loberg, E.M., Apricena, F. & Kjellmer, I. (1996) Posthypoxic cooling of neonatal rats provides protection against brain injury. *Archives of disease in childhood. Fetal and neonatal edition*, **74**, F3-9.
- Towfighi, J., Housman, C., Heitjan, D.F., Vannucci, R.C. & Yager, J.Y. (1994) The effect of focal cerebral cooling on perinatal hypoxic-ischemic brain damage. *Acta neuropathologica*, **87**, 598-604.
- Toye, A.A., Lippiat, J.D., Proks, P., Shimomura, K., Bentley, L., Hugill, A., Mijat, V., Goldsworthy, M., Moir, L., Haynes, A., Quarterman, J., Freeman, H.C., Ashcroft, F.M. & Cox, R.D. (2005) A genetic and physiological study of impaired glucose homeostasis control in C57BL/6J mice. *Diabetologia*, **48**, 675-686.
- Treves, A. & Rolls, E.T. (1992) Computational constraints suggest the need for two distinct input systems to the hippocampal CA3 network. *Hippocampus*, **2**, 189-199.
- Truttmann, A. (2012) Betreuung der hypoxisch-ischämischen Enzephalopathie des Termingeborenen. *Paediatrica*, **23**, 25-28.
- Turrens, J.F. (2003) Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of physiology*, **552**, 335-344.
- Uchida, H., Fujita, Y., Matsueda, M., Umeda, M., Matsuda, S., Kato, H., Kasahara, J. & Araki, T. (2010) Damage to neurons and oligodendrocytes in the hippocampal CA1 sector after transient focal ischemia in rats. *Cellular and molecular neurobiology*, **30**, 1125-1134.



- Unwin, P.N. & Zampighi, G. (1980) Structure of the junction between communicating cells. *Nature*, **283**, 545-549.
- van Bruggen N, H.T., James T. Palmer, Wyne P. Lee,, Ling Fu, B.C., Daniel Tumas, Robert Gerlai, Simon-Peter Williams, & Menno van Lookeren Campagne, N.F. (1999) VEGF antagonism reduces edema formation and tissue damage after ischemia/reperfusion injury in the mouse brain. *Journal of Clinical Investigation*, **104**, 1613-1620.
- Van Reempts, J. & Borgers, M. (1984) Histologic changes in the hypoxic brain. *Acta anaesthesiologica Belgica*, **35 Suppl**, 209-218.
- Vanden Abeele, F., Bidaux, G., Gordienko, D., Beck, B., Panchin, Y.V., Baranova, A.V., Ivanov, D.V., Skryma, R. & Prevarskaya, N. (2006) Functional implications of calcium permeability of the channel formed by pannexin 1. *The Journal of cell biology*, **174**, 535-546.
- Vannucci, R.C., Lyons, D.T. & Vasta, F. (1988) Regional cerebral blood flow during hypoxia-ischemia in immature rats. *Stroke; a journal of cerebral circulation*, **19**, 245-250.
- Vannucci, R.C. & Vannucci, S.J. (1997) A model of perinatal hypoxic-ischemic brain damage. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **835**, 234-249.
- Vannucci, S.J. & Hagberg, H. (2004) Hypoxia-ischemia in the immature brain. *The Journal of experimental biology*, **207**, 3149-3154.
- Vannucci, S.J., Seaman, L.B. & Vannucci, R.C. (1996) Effects of hypoxia-ischemia on GLUT1 and GLUT3 glucose transporters in immature rat brain. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, **16**, 77-81.
- Volpe, J.J. (2001) Perinatal brain injury: from pathogenesis to neuroprotection. *Mental retardation and developmental disabilities research reviews*, **7**, 56-64.
- Wagner, S., Rokita, A.G., Anderson, M.E. & Maier, L.S. (2013) Redox regulation of sodium and calcium handling. *Antioxidants & redox signaling*, **18**, 1063-1077.
- Walton, M., Connor, B., Lawlor, P., Young, D., Sirimanne, E., Gluckman, P., Cole, G. & Dragunow, M. (1999) Neuronal death and survival in two models of hypoxic-ischemic brain damage. *Brain research. Brain research reviews*, **29**, 137-168.
- Wang, Q., Tang, X.N. & Yenari, M.A. (2007) The inflammatory response in stroke. *Journal of neuroimmunology*, **184**, 53-68.
- Wang, R., Zhang, X., Zhang, J., Fan, Y., Shen, Y., Hu, W. & Chen, Z. (2012) Oxygen-glucose deprivation induced glial scar-like change in astrocytes. *PloS one*, **7**, e37574.
- Wasielowski, B., Jensen, A., Roth-Harer, A., Dermietzel, R. & Meier, C. (2012) Neuroglial activation and Cx43 expression are reduced upon transplantation of human umbilical cord blood cells after perinatal hypoxic-ischemic injury. *Brain research*, **1487**, 39-53.
- Wei, R., Wang, J., Xu, Y., Yin, B., He, F., Du, Y., Peng, G. & Luo, B. (2015) Probenecid protects against cerebral ischemia/reperfusion injury by inhibiting lysosomal and inflammatory damage in rats. *Neuroscience*, **301**, 168-177.
- Wicki-Stordeur, L.E., Dzugalo, A.D., Swansburg, R.M., Suits, J.M. & Swayne, L.A. (2012) Pannexin 1 regulates postnatal neural stem and progenitor cell proliferation. *Neural development*, **7**, 11.
- Wilson, J.X. (1997) Antioxidant defense of the brain: a role for astrocytes. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, **75**, 1149-1163.
- Yager, J., Towfighi, J. & Vannucci, R.C. (1993) Influence of mild hypothermia on hypoxic-ischemic brain damage in the immature rat. *Pediatric research*, **34**, 525-529.
- Yan, Z., Khadra, A., Li, S., Tomic, M., Sherman, A. & Stojilkovic, S.S. (2010) Experimental characterization and mathematical modeling of P2X7 receptor channel gating. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **30**, 14213-14224.
- Yang, S., Cheek, D.J., Westfall, D.P. & Buxton, I.L. (1994) Purinergic axis in cardiac blood vessels. Agonist-mediated release of ATP from cardiac endothelial cells. *Circulation research*, **74**, 401-407.
- Yellon, D.M. & Hausenloy, D.J. (2007) Myocardial reperfusion injury. *The New England journal of medicine*, **357**, 1121-1135.

- Yin, F., Sancheti, H. & Cadenas, E. (2012) Silencing of nicotinamide nucleotide transhydrogenase impairs cellular redox homeostasis and energy metabolism in PC12 cells. *Biochimica et biophysica acta*, **1817**, 401-409.
- Zhang, L., Deng, T., Sun, Y., Liu, K., Yang, Y. & Zheng, X. (2008) Role for nitric oxide in permeability of hippocampal neuronal hemichannels during oxygen glucose deprivation. *Journal of neuroscience research*, **86**, 2281-2291.
- Zhao, Y.D., Ou, S., Cheng, S.Y., Xiao, Z., He, W.J., Zhang, J.H. & Ruan, H.Z. (2013) Dendritic development of hippocampal CA1 pyramidal cells in a neonatal hypoxia-ischemia injury model. *Journal of neuroscience research*, **91**, 1165-1173.
- Zhu, C., Wang, X., Xu, F., Qiu, L., Cheng, X., Simbruner, G. & Blomgren, K. (2006a) Intraischemic mild hypothermia prevents neuronal cell death and tissue loss after neonatal cerebral hypoxia-ischemia. *The European journal of neuroscience*, **23**, 387-393.
- Zhu, C., Xu, F., Wang, X., Shibata, M., Uchiyama, Y., Blomgren, K. & Hagberg, H. (2006b) Different apoptotic mechanisms are activated in male and female brains after neonatal hypoxia-ischaemia. *Journal of neurochemistry*, **96**, 1016-1027.

## **9 Poster**

Sandra Semar, Thomas Tschernig, Carola Meier

Influence of the nicotinamid-nucleotid-transhydrogenase on the manifestation of perinatal hypoxic-ischemic brain lesions in the mouse

11<sup>th</sup> Göttingen Meeting of the German Neuroscience Society 2015

## 10 Danksagung

Zu guter Letzt möchte ich mich noch gerne bei den Menschen bedanken, ohne deren Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

An erster Stelle bedanke ich mich recht herzlich bei Frau Prof. Dr. Carola Meier für ihre sehr gute fachliche Betreuung, ihre starke Hilfsbereitschaft sowie ihre Unterstützung während meiner Dissertation.

Herrn Prof. Dr. Klaus Faßbender danke ich für die Erstellung des Zweitgutachtens.

Herrn Prof. Dr. Christoph Maack, Dr. Alexander Nickel und Herrn Dr. Andrey Kazakov (Homburg) möchte ich gerne für die fachliche Unterstützung zum Thema ROS sowie der Durchführung der 8-OHdG Immunfluoreszenz danken.

Herrn Prof. Dr. Adolfo Cavalié und Herrn Tillman Pick (Homburg) danke ich herzlichst für die Einarbeitung und die Hilfe bei der Durchführung des Calcium-Imaging. Auch möchte ich mich für die fachliche Unterstützung bedanken.

Bei Frau Prof. Dr. Hannah Monyer (Heidelberg) bedanke ich mich für die Überlassung der transgenen Mäuse.

Der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Dr. Robert Bals (Homburg) danke ich für die Nutzung der Hypoxie-Kammer sowie die freundliche Unterstützung.

Der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Matthias Hannig (Homburg) möchte ich gerne für die Nutzung des Nanodrop danken.

Der Universität des Saarlandes danke ich für die finanzielle Unterstützung mittels des Promotionsstipendiums der Universität des Saarlandes (GradUS).

Herrn Prof. Dr. Thomas Tschernig danke ich für die freundliche Unterstützung und die nette Zusammenarbeit während meiner Dissertation.

Einen herzlichen Dank möchte ich auch gerne an Frau Dr. Anja Beckmann und Frau Dr. Nadine Hainz aussprechen: Danke für die nette Zusammenarbeit sowie die hilfreichen Kommentare, konstruktiven Diskussionen und unzähligen Korrekturlesungen meiner Dissertation. Auch an Frau Ann-Mary Soether geht ein herzliches Dankeschön für die Korrekturlesungen meiner Dissertation.

Bei Frau Andrea Rabung möchte ich mich für die Durchführung der Genotypisierungs PCRs sowie für die Zucht der Panx1-transgenen Tiere bedanken.

Frau Belinda König, Frau Alina Mattheis, Frau Ingrid Lang und Herrn Alexander Grißmer danke ich für die tatkräftige Unterstützung im Labor bei meinen Versuchen.

Natürlich danke ich auch allen ehemaligen und gegenwärtigen Mitgliedern der Arbeitsgruppen Prof. Dr. Meier und Prof. Dr. Tschernig sowie der Prosektur für die wirklich nette Atmosphäre während meiner gesamten Arbeitszeit.

Auch meinem gesamten Freundeskreis möchte ich gerne für den Ausgleich zur Arbeit danken.

Meiner ganzen Familie danke ich recht herzlich dafür, dass sie mir in jeder Situation immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben. Ohne eure Unterstützung wäre ich jetzt nicht da, wo ich jetzt bin! Vor allem meinem Mann Markus Wolf möchte ich einen großen Dank aussprechen. Er musste mich aus einigen „Dissertationslöchern“ herausholen. Danke für dein Verständnis und deine Geduld mit mir!