

Aus dem Institut für Schlaganfall- und Demenzforschung
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Martin Dichgans



**Oxidativer Stress an der Blut-Hirn-Schranke:
Die Rolle der Glutathionperoxidase 4
beim ischämischen Schlaganfall**

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

vorgelegt von
Iga Maria Rynarzewska
aus Augsburg
2020

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Nikolaus Plesnila
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. med. Hans-Walter Pfister PD Dr. med. Manfred Uhr Prof. Dr. med. Thomas Pfefferkorn
Mitbetreuung durch die promovierte Mitarbeiterin:	Dr. med. vet. Manuela Schneider
Dekan:	Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel
Tag der mündlichen Prüfung:	30.01.2020

Ich widme diese Arbeit meiner Mutter – Renata Rynarzewska – die in mir die Begeisterung für die Medizin geweckt hat und mir anschließend das Vertrauen, den Rückhalt und die Mittel schenkte um diesen meinen Traum zu verwirklichen.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
1 Einleitung	4
1.1 Der ischämische Schlaganfall.....	4
1.1.1 Epidemiologie	4
1.1.2 Zerebrale Durchblutung	4
1.1.3 Therapieoptionen.....	5
1.2 Pathophysiologische Aspekte des ischämischen Schlaganfalls.....	6
1.2.1 Die biochemische Ischämiekaskade.....	6
1.2.2 Infarktkern, Penumbra und Peri-Infarktbereich.....	7
1.2.3 Hirnödem	7
1.3 Oxidativer Stress	7
1.4 Die Familie der Glutathionperoxidasen.....	9
1.5 Die Glutathionperoxidase 4 (Gpx4)	10
1.5.1 Entdeckung.....	10
1.5.2 Reaktionszyklus der Gpx4.....	10
1.5.3 Gen-Sequenz der Gpx4.....	12
1.5.4 Aufgaben der Gpx4.....	12
1.6 Die neurovaskuläre Einheit.....	15
1.6.1 Astrozyten in der neurovaskulären Einheit (NVU)	16
1.6.2 Die Gpx4 in der neurovaskulären Einheit	17
1.7 Zielsetzung dieser Arbeit	18
2 Material	19
2.1 Geräte.....	19
2.2 Operationsmaterialien.....	19
2.3 Medikamente	21
2.4 Allgemeine Chemikalien	21
2.5 Polymerase Chain Reaction (PCR)	22
2.6 Western Blot (WB).....	23
2.7 Histologie	23
2.8 Antikörper (AK)	24
2.9 Programme	25
3 Methoden	26
3.1 Allgemeine Maßnahmen.....	26
3.2 Versuchstiere und Tierhaltung.....	26
3.3 Genotypisierung der Mauslinien	28

3.3.1	Auswertung der Gel-Elektrophorese.....	30
3.4	Transiente fokale zerebrale Ischämie (fMCAO).....	31
3.4.1	Perioperatives Management.....	32
3.4.2	Chirurgische Präparation und Okklusion der Arteria cerebri media.....	35
3.4.3	Versorgung der Tiere während der Ischämie- und Reperusionszeit	38
3.4.4	Neurologische Untersuchung	39
3.4.5	Gefrierschnitte, Nissl-Färbung und Infarkt volumetrie	39
3.4.6	Doppelfärbungen: Immunfluoreszenz und TUNEL-Färbung	41
3.5	Proteinanalyse	43
3.5.1	Gewebe Gewinnung zur Bestimmung der Gpx4 Expression nach Ischämie	43
3.5.2	Aufbereitung der Proteine.....	45
3.5.3	Proteinquantifizierung	45
3.5.4	Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	45
3.5.5	Western Blot	45
3.6	Experimentelles Design und Versuchsgruppen.....	46
3.6.1	fMCAO Standardisierung.....	46
3.6.2	Western Blot Analyse: Gpx4 Expression nach zerebraler Ischämie.....	47
3.6.3	Infarkt volumetrie und Immunfluoreszenz: Gpx4 ^{AstWT} und Gpx4 ^{AstKO}	47
3.6.4	Vitamin-E Deprivation	48
3.6.5	Infarkt volumetrie Gpx4 ^{NeuWT} und Gpx4 ^{NeuKO} Tiere.....	48
3.7	Statistische Analyse.....	49
4	Ergebnisse	50
4.1	Standardisierung.....	50
4.1.1	Vorversuche.....	50
4.1.2	Finale Standardisierung.....	51
4.2	Gpx4-Expression nach Ischämie	53
4.3	Rolle der astrozytären Gpx4 nach zerebraler Ischämie.....	56
4.3.1	fMCAO bei Gpx4 ^{AstWT} und Gpx4 ^{AstKO}	56
4.3.2	Mikroskopische Analyse des Peri-Infarktbereichs	58
4.4	Einfluss der Vitamin-E Mangeldiät auf das Infarktvolumen	64
4.4.1	fMCAO unter Vitamin-E Mangel an C57BL/6-Tieren und astrozytären Gpx4 ^{WT} - und Gpx4 ^{KO} -Tieren	65
4.5	Bedeutung der neuronalen Gpx4 für das Infarktvolumen	67
4.5.1	fMCAO an Gpx4 ^{NeuWT} und Gpx4 ^{NeuKO}	68
5	Diskussion und Ausblick	70
5.1	Schlaganfall-Modell	70
5.2	Reaktive Sauerstoffradikale zwischen Homöostase und Zelltod in der NVU	72
5.2.1	Gpx4 in Abgrenzung zu anderen antioxidativen Schutzmechanismen.....	74
5.2.2	Astrozyten und astrozytärer Gpx4-Verlust.....	75
5.2.3	Neurone und neuronaler Gpx4-Verlust.....	77
5.3	Ausblick	79
6	Zusammenfassung	81

7	In a nutshell	82
	Abbildungsverzeichnis.....	83
	Tabellenverzeichnis.....	84
	Abkürzungsverzeichnis.....	85
	Literaturverzeichnis.....	87
	Danksagung	96
	Eidesstattliche Versicherung.....	98

1 Einleitung

1.1 Der ischämische Schlaganfall

1.1.1 Epidemiologie

Nach der ischämischen Herzkrankheit ist der Schlaganfall die häufigste Todesursache weltweit; 6,2 Mio. Menschen verstarben im Jahr 2015 in Folge eines Schlaganfalls (1). Täglich erleiden ca. 41 000 Menschen einen Schlaganfall, davon enden rund 25% tödlich (2, 3). Hinzu kommt, dass etwa die Hälfte aller, die einen Schlaganfall überleben, in ihrer Alltagskompetenz so beeinträchtigt sind, dass sie zeitweise oder dauerhaft auf Hilfe angewiesen sind (2, 4). Der Schlaganfall ist nach der Demenzerkrankung weltweit die Hauptursache für dauerhafte Behinderung im Alter (2, 3). Nicht nur Ältere sind vom Schlaganfall betroffen, er gehört auch zu den 10 häufigsten Todesursachen im Kindesalter (5). Am häufigsten betroffen sind Neugeborene, weitere Häufigkeitsgipfel sind das Vorschulalter und die Adoleszenz (5). Dies führt, neben dem persönlichen Schicksal der Betroffenen, zu erheblichen Kosten: Jährlich wird durch den Schlaganfall das europäische Gesundheitssystem mit rund 64 Milliarden Euro belastet (6). Dies verdeutlicht die sozioökonomische Relevanz dieser Erkrankung.

Gegliedert wird der Schlaganfall, je nach Ursache, in hämorrhagisch und ischämisch. Den größten Teil – etwa 87% der Fälle – macht der ischämische Schlaganfall aus (3). Die Hauptursachen sind Makroangiopathien, Mikroangiopathien und Thrombembolien (4).

1.1.2 Zerebrale Durchblutung

Verglichen mit allen anderen Organen des Körpers hat das Gehirn eine bemerkenswerte Blutversorgung: Da es eine geringe Ischämietoleranz hat, fließen dem Gehirn 15 – 20% des Herz-Minuten-Volumens zu (7). Nachdem es im Gehirn wenig Möglichkeiten gibt Sauerstoff, Elektrolyte und Nährstoffe für die Stoffwechselprozesse zu speichern, ist die Integrität des Gehirns – mehr als die aller anderen Organe – auf eine konstante Durchblutung angewiesen (8). Sauerstoffreiches Blut fließt über die Aa. carotis internae und die A. basilaris, die sich auf der Ebene der Hirnbasis im sog. Circulus arteriosus Willisi vereinen, zum Gehirn. Von dort aus zweigen die großen hirnversorgenden Arterien (A. cerebri anterior, media und posterior) ab. Sie verlaufen zunächst, von der Hirnbasis ausgehend, außen an der Hirnoberfläche entlang und tauchen von dort aus mit ihren Ästen in die Tiefe des Hirngewebes ein (9, 10). Das Gehirn setzt sich hiermit von der für andere Organe wie Leber oder Niere typischen „von innen nach außen“ Gefäßversorgung ab (9, 10). Diese besondere „von außen nach innen“ Versorgung des Hirns führt bei Gefäßverschluss zu den sog. Grenzzoneninfarkten bzw. Endstrominfarkten (4, 9, 11). Da die Endstromgebiete der Arterien in der Tiefe des Gehirns nicht ausreichend durch Kollateralen kompensiert

werden, sind einige Gebiete, beispielsweise das Caudatum und das Putamen, besonders anfällig für Durchblutungsstörungen (9, 12-14). Nach nur wenigen Minuten Minderversorgung treten irreversible Schäden auf (8). Das an Benjamin Franklins Zitat „Time is Money“ angelehnte Konzept „Time is Brain“ soll mit Hilfe von quantitativen Berechnungen kurz verdeutlicht werden: Basierend auf neurowissenschaftlichen Erkenntnissen zur durchschnittlichen Zellzahl und Volumen eines Gehirns sowie der durchschnittlichen Größe eines Infarktes und der dabei betroffenen neurologischen Strukturen gehen pro Minute Ischämiezeit 1,9 Mio. Neurone, 14 Mrd. Synapsen und 12 km Axonstrecke zugrunde (15). Verglichen mit der physiologischen Degeneration des Gehirns im Alter, altert das Gehirn durch einen Schlaganfall näherungsweise um etwa 36 Jahre (15). Das Zeitfenster, um nach arteriellem Verschluss zu handeln, ist daher eng. Es ist von essentieller Bedeutung, dass Diagnostik und Therapie zügig und zielführend ablaufen, um das funktionelle Outcome und die Überlebenschancen von Schlaganfallpatienten zu verbessern.

1.1.3 Therapieoptionen

Mehr als 95% der Schlaganfallpatienten erhalten keine kausale Therapie (4). Das beruht u. a. auf dem engen therapeutischen Zeitfenster, den beschränkten Therapieoptionen und den zahlreichen Kontraindikationen (16). Die kausale Therapie des ischämischen Schlaganfalls stützt sich, laut den aktuellen Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie (DGN), auf zwei Säulen: Die medikamentöse Thrombolyse mittels *recombinant tissue plasminogen activator* (rtPA) und die mechanische endovaskuläre Rekanalisationstherapie mittels Katheter (17, 18). Beide Verfahren werden von der DGN in einem engen Zeitfenster von 4,5 h bzw. 6 h nach Symptombeginn empfohlen. Die endovaskuläre Revascularisation mittels Katheter ist laut Leitlinien bei langstreckigen Verschlüssen im proximalen Gefäßverlauf oder bei absoluten Kontraindikationen zur systemischen Lyse sinnvoll (4, 17, 18). Für die größtmögliche Sicherheit, das geringste Blutungsrisiko und das beste Outcome ist eine Rekanalisation innerhalb von 3 h nach Symptombeginn optimal (19, 20). Diese Zeit ist schwer einzuhalten: Ist der genaue Zeitpunkt des Symptombeginns nicht bekannt, gilt der Zeitpunkt, an dem der Patient zuletzt symptomfrei war. Sind die Symptome beispielsweise morgens nach dem Erwachen vorhanden, zählt demnach die Zeit des zu Bettgehens als Beginn des Zeitfensters für die Therapie. Ferner noch kann die Symptomatik des Schlaganfalls selbst, wie Paresen oder Aphasien, die Patienten hindern den Notruf zu tätigen und somit das Zeitfenster für die kausale Therapie schließen. Auch die zahlreichen Nebenwirkungen und Kontraindikationen der Therapie sind zu beachten. So kann eine Thrombolyse mit rtPA bei einer oralen Antikoagulation oder bei zeitnah vorausgegangenen Operationen kontraindiziert sein. Deshalb erhalten die meisten Patienten nur eine symptomatische Therapie wie Antikoagulation, Optimierung der Vitalparameter, krankengymnastische bzw. logopädische Beübung und ggf. die Behandlung eines erhöhten intrakraniellen Drucks (ICP) (4). Der Schlaganfall ist ein medizinischer Notfall, der aufgrund des engen Zeitfensters und der schwerwiegenden Konsequenzen zügig diagnostiziert und therapiert werden muss. Daher ist bereits bei Verdacht auf Schlaganfall eine Einweisung in spezielle Zentren mit Stroke-Units notwendig. Und doch stehen den Spezialisten in der Akutsituation nur die oben genannten, limitierten Behandlungsmöglichkeiten

ten zur Verfügung. Das verdeutlicht die Notwendigkeit der Erforschung der Pathophysiologie des Schlaganfalls, um mehr Patienten eine effektive Therapie anbieten zu können.

1.2 Pathophysiologische Aspekte des ischämischen Schlaganfalls

Hossmann definiert die zerebrale Ischämie als „...eine Durchblutungs-minderung unter den Schwellenwert zur Aufrechterhaltung des Energiestoffwechsels und des Membranpotentials...“ (10, 21). Allgemein kommt es nach einem akuten Gefäßverschluss und der resultierenden Unterbrechung der zerebralen Durchblutung auf biochemischer, molekularer und genetischer Ebene zu pathophysiologischen Abläufen, die unterschiedlich stark ineinander greifen, sich gegenseitig bedingen oder verstärken. Man spricht daher von der biochemischen Ischämiekaskade (22, 23).

1.2.1 Die biochemische Ischämiekaskade

Durch die akute arterielle Minderperfusion im Gehirn kommt es zu einer Unterversorgung der Zellen mit Sauerstoff, Elektrolyten, Glukose und energiereichen Phosphatverbindungen wie dem Adenosintriphosphat (ATP) (10, 23, 24). Dies wirkt sich auf den Zellmetabolismus aus: Die Proteinbiosynthese wird eingestellt, der Sauerstoffmangel bedingt eine anaerobe Stoffwechsellage sowie erhöhte Laktatspiegel; es kommt zur Azidose und zu weiterem ATP Abbau (10, 23-25). Der ATP-Mangel führt zur Energiekrise der Zelle. Die in der Zellmembran lokalisierten aktiven (ATP-abhängigen) Ionenpumpen wie beispielsweise die Na^+/K^+ -ATPase oder die Ca^{2+} -ATPase können den Ionenkonzentrationsgradienten nicht länger aufrecht halten (10, 23-25). Es kommt zum unkontrollierten Natrium (Na^+) und Kalzium (Ca^{2+}) Einstrom in die Zelle und konsekutiver Membrandepolarisation (sog. anoxische Depolarisation) (23). Auf die Depolarisation folgt die unkontrollierte Freisetzung von exzitatorischen (erregenden) Neurotransmittern wie z. B. Glutamat. Glutamat aktiviert glutamatabhängige Rezeptoren, wie den α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol propion acid (AMPA)-Rezeptor und N-methyl-D-aspartat (NMDA)-Rezeptor (10, 23-25). Hierdurch gelangen weitere Kationen wie beispielsweise Ca^{2+} in die Zelle. Durch den erhöhten zytosolischen Kalziumspiegel kommt es u.a. zur Entstehung von freien Sauerstoffradikalen, die die Zellmembranen schädigen können (10, 24).

Unter freien Sauerstoffradikalen oder reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) versteht man sauerstoffhaltige Verbindungen mit unpaaren Elektronen z. B. das Hydroxylradikal ($\cdot\text{OH}^-$) oder das superoxid Anionradikal ($\text{O}_2\cdot^-$) (26, 27). Eine Ausnahme ist der Sauerstoff (O_2), der mit seiner geraden Elektronenanzahl ein Diradikal ist. Die meisten ROS sind instabil und daher sehr reaktiv, dadurch können sie über die Oxidation von Proteinseitenketten und Disulfidbrücken Proteine schädigen und DNA-Schäden hervorrufen (28). Ferner noch kommt es zur Aktivierung kalziumabhängiger kataboler Enzyme und zu mitochondrialen Funktionsstörungen (10, 24). Dabei wird die Permeabilität der Mitochondrienmembran erhöht; es kommt zu Störungen in der Atmungskette und zur Freisetzung von pro-

apoptotischen mitochondrialen Proteinen wie Cytochrom c und Caspase 9, diese führen zum programmierten Zelltod, der Apoptose (10, 24).

1.2.2 Infarktkern, Penumbra und Peri-Infarktbereich

Abhängig vom Schweregrad der Ischämie kommt es im Gehirn zu reversiblen oder irreversiblen Schädigungen. Der Infarktkern ist, auf Grund mangelnder Kollateralen, bereits intra-ischämisch irreversibel geschädigt. Im Infarktkern ist die Nekrose der vornehmliche Mechanismus des Zelluntergangs (25). Das umgebende Randgebiet des Infarktkerns ist zwar minderversorgt und dysfunktional, jedoch noch vital (21, 29). Die metabolische und dadurch strukturelle Integrität des Gewebes kann in diesem Bereich noch aufrecht gehalten werden (29, 30). Man nennt diesen Bereich die *Penumbra* (dt. Halbschatten), ein aus der Astronomie entlehener Begriff, der den teilweise hellen Rand einer totalen Sonnenfinsternis beschreibt (21). Die Penumbra ist eine Zeitlang therapeutisch zugänglich. Wird die Ischämie jedoch nicht behoben, breitet sich der Infarktkern weiter in das Gebiet der Penumbra aus (21, 24, 29, 22). Da die Penumbra anhand *metabolischer* Aspekte definiert wird, haben wir in dieser Arbeit den Randbereich der Infarkte als makroskopisch bzw. mikroskopisch ersichtlichen *Peri-Infarktbereich* definiert.

1.2.3 Hirnödem

Durch den beschriebenen Kationeneinstrom erhöht sich der intrazelluläre osmotische Druck und Wasser aus dem Extrazellularraum strömt in die Zelle. Es kommt zum sog. zytotoxischen Ödem v. a. in der grauen Substanz (10, 25, 31). Ist zudem noch die Blut-Hirn-Schranke gestört, dringen zusätzlich Ionen und Wasser aus dem Blut in die Zellen ein und es kommt zusätzlich zu einem vasogenen Ödem, das sich in die weiße Substanz des Gehirns ausbreiten kann (31). Die durch das Ödem hervorgerufene Volumenzunahme des Gehirns führt zu einem erhöhtem intrakraniellen Druck (ICP). Durch die Drucksteigerung kommt es zu einer Abnahme des zerebralen Perfusionsdrucks, was die Ausdehnung des ischämischen Zellschadens begünstigt (31).

1.3 Oxidativer Stress

Oxidativer Stress ist eine unvermeidliche Folge des Lebens in sauerstoffhaltiger Atmosphäre (32). Einfach gesprochen ist oxidativer Stress ein Übermaß an reaktiven Sauerstoffradikalen (ROS) (32, 33). Er lässt Eisen rosten, knusprige Chips verderben und macht Milch sauer (32). Doch auch in unserem Körper spielt oxidativer Stress eine Rolle: Proteindenaturierung, Enzyminaktivierung und DNA-Schäden sind einige der vielen Folgen von oxidativem Stress (34). Er ist auch der Schlüssel zu zahlreichen Pathomechanismen, die mit erhöhter Lipidperoxidation assoziiert sind, beispielsweise Makroangiopathien bei Arteriosklerose, einem Hauptrisikofaktor für Schlaganfall (35). Oxidativer Stress ist einer der schädlichsten Pathomechanismen bei Ischämie; so belegen zahlreiche Studien, dass die Menge an freigesetzten ROS den Grad des ischämischen Hirnschadens fundamental beeinflusst (34). Normalerweise werden die in der Atmungskette physiolo-

gisch anfallenden Sauerstoffradikale von zelleigenen Schutzmechanismen beseitigt (32, 36). Die bekanntesten Vertreter dieser Schutzsysteme sind die Superoxid-Dismutasen (SOD), Katalasen (CAT), Thioredoxinreduktasen (TrxR) und die Glutathionperoxidasen (Gpx). Zudem sind Vitamin-C, -E sowie Provitamin A/Betacarotin nicht-enzymatische Antioxidantien und neutralisieren die anfallenden Radikale direkt (32, 33). Vitamin-E ist ein wichtiger Kooperationspartner der Gpx4 und deswegen als zusätzlicher Stressor zum astrozytären Gpx4-Verlust in dieser Arbeit untersucht worden. Es handelt sich beim Vitamin-E um ein fettlösliches Vitamin mit antioxidativen Eigenschaften. Ferner noch unterstützt es die Integrität des Gefäßendothels und spielt eine wichtige Rolle beim Schutz der Zellmembranen vor reaktiven Sauerstoffspezies (37, 38).

Fallen mehr Radikale an als unsere Zellen abwehren können, gerät das antioxidative Schutzsystem aus dem Gleichgewicht. Die freien Radikale reagieren nun mit Proteinen, Lipiden und anderen Molekülen und setzen so die Zellen unter Stress und schädigen sie (33, 39). Die Bildung von ROS im ischämischen Hirngewebe und der resultierende oxidative Stress ist wesentlicher Bestandteil der biochemischen Ischämiekaskade und Scheitelpunkt zwischen Apoptose und Nekrose; daher ist die Erforschung der dabei beteiligten Pathomechanismen von großer therapeutischer Relevanz (32, 40).

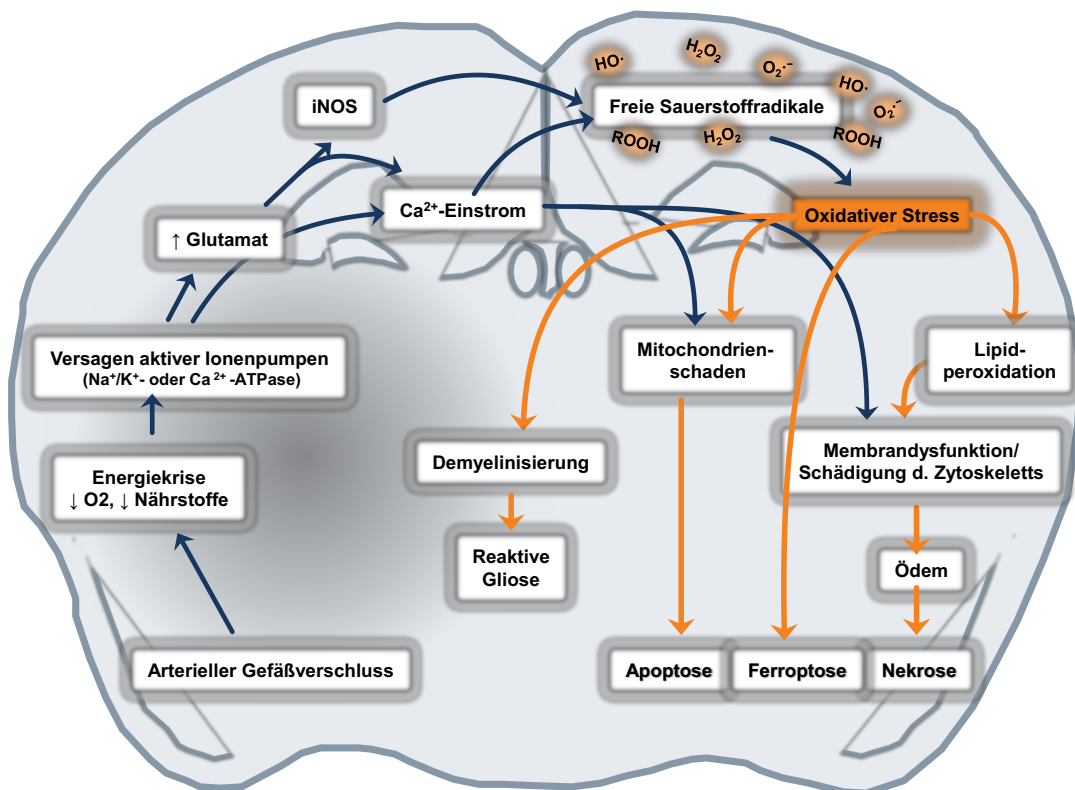


Abbildung 1: Ischämiekaskade. Das betroffene Hirnareal ist durch den Gefäßverschluss von der Blutversorgung ausgeschlossen. Es kommt zu einem Versorgungsengpass von Sauerstoff, Elektrolyten und Nährstoffen. Die konsekutive Energiekrise bringt den Elektrolythaushalt der Zellen aus dem Gleichgewicht: Glutamat und Calcium (Ca²⁺) werden freigesetzt, es entstehen freie Sauerstoffradikale. Der oxidative Stress setzt eine Kaskade von genetischen, metabolischen und zellulären Antworten in Gang. Diese können u. a. sowohl zu kontrolliertem Zelltod (Apoptose) als auch zur direkten Zelledestruktion (Nekrose) führen (9-11, 24, 28, 32, 39, 41, 42).

1.4 Die Familie der Glutathionperoxidasen

Zellen haben viele antioxidative Schutzsysteme, die es uns ermöglichen, in sauerstoffreicher Umgebung zu leben. Die wichtigsten wurden oben kurz genannt. Eines dieser Schutzsysteme ist die Familie der Glutathionperoxidasen (Gpx). Die bislang acht bekannten Familienmitglieder wurden in der Reihenfolge ihrer Entdeckung benannt (Gpx1 - Gpx8). Glutathionperoxidasen katalysieren die Redox-Reaktion zwischen Hydroperoxiden und Glutathion. Die einzelnen Familienmitglieder haben unterschiedliche Fähigkeiten und Aufgaben sowie ihren eigenen Wirkungsbereich. Zur Übersicht der einzelnen der Glutathionperoxidasen s. **Tabelle 1**.

Tabelle 1. Übersicht der Glutathionperoxidasen. ER = endoplasmatisches Retikulum, GI = gastrointestinal, Gpx = Glutathionperoxidase (modifiziert nach (43, 44))

Gpx	Lokalisation	Funktion	Literatur
Gpx1	<ul style="list-style-type: none"> • zytosolisch • ubiquitär • Mitochondrienmatrix 	<ul style="list-style-type: none"> • Antioxidans • Neutralisierung von H₂O₂ 	(45-47)
Gpx2	<ul style="list-style-type: none"> • zytosolisch • Epithel des GI-Trakts 	<ul style="list-style-type: none"> • wie oben • Antioxidans alimentärer Hydroperoxide 	(48)
Gpx3	<ul style="list-style-type: none"> • extrazellulär • Niere, Plasma 	<ul style="list-style-type: none"> • wie oben 	(49-51)
Gpx4	<ul style="list-style-type: none"> • zytosolisch • mitochondrial • nukleär, spermienkernspezifisch • ubiquitär • membranassoziiert 	<ul style="list-style-type: none"> • Antioxidans v.a. komplexer Lipide • Rolle in der Spermatogenese • essenziell für das Leben 	(52-58)
Gpx5	<ul style="list-style-type: none"> • sekretorisch (Nebenhodenlumen) • Nebenhodenepithel 	<ul style="list-style-type: none"> • h. w. Antioxidans im Sperma 	(43, 59)
Gpx6	<ul style="list-style-type: none"> • olfaktorisches Epithel • Bowman'sche Drüse 	<ul style="list-style-type: none"> • h. w. Antioxidans 	(60, 61)
Gpx7	<ul style="list-style-type: none"> • zytosolisch • ER (Lumen) 	<ul style="list-style-type: none"> • h. w. Redoxsensor • Aktivator antioxidativer Enzyme • Proteinfaltung 	(62, 63)
Gpx8	<ul style="list-style-type: none"> • ER (Membran) 	<ul style="list-style-type: none"> • h. w. Antioxidans • Proteinfaltung 	(63, 64)

1.5 Die Glutathionperoxidase 4 (Gpx4)

1.5.1 Entdeckung

Entdeckt wurde die Gpx4 von Fulvio Ursini et al. im Jahr 1982. Damals beschrieb die Forschungsgruppe ein aus Schweineleberzellen gewonnenes Protein mit einer Größe von etwa 20 kDa und der Fähigkeit, Phosphatidylcholin in Liposomen und Biomembranen in Anwesenheit von Glutathion vor oxidativem Stress und der konsekutiven Degeneration zu schützen (58). Diese ungewöhnliche Vorliebe der Gpx4 für Phospholipid-Hydroperoxide und vielen weiteren komplexen Fetten, macht dieses Enzym einzigartig und sorgte auch für den ursprünglichen Namen „Phospholipid-Hydroxyperoxid-Glutathion-Peroxidase (PHGPx)“. Die Gpx4 kommt jedoch nicht nur in Leberzellen vor, sondern ist ein ubiquitär exprimiertes Enzym und das prädominante Strukturprotein in Spermatozyten (52, 55, 65, 66). Unter den Glutathionperoxidasen hat die Gpx4 das breiteste Substratspektrum und als einzige die besondere Fähigkeit auch komplexe Lipide zu reduzieren (61, 67, 68). Beispielsweise werden folgende Substrate von der Gpx4 reduziert (57, 68):

- Cardiolipin
- Cholesterolesterhydroperoxide
- Cumolhydroperoxid
- Ethylhydroperoxid
- Linolsäurehydroperoxid
- Phosphatidylserin
- Phosphatidylcholin
- Wasserstoffperoxid

1.5.2 Reaktionszyklus der Gpx4

Für die Reduktion der oben genannten Substrate benutzt die Gpx4 – wie der Name es schon verrät – Glutathion (GSH). Das Besondere an der Gpx4 ist, dass sie unter GSH-Mangel auch Protein-Thiole als Reduktionsmittel heranziehen kann und somit genau genommen nicht nur eine Glutathionperoxidase, sondern auch eine Thiol-Peroxidase ist. Dies ist gerade in Geweben die kein oder nur wenig GSH enthalten, wie z. B. in reifen Spermatozyten, von besonderer Bedeutung (54, 69).

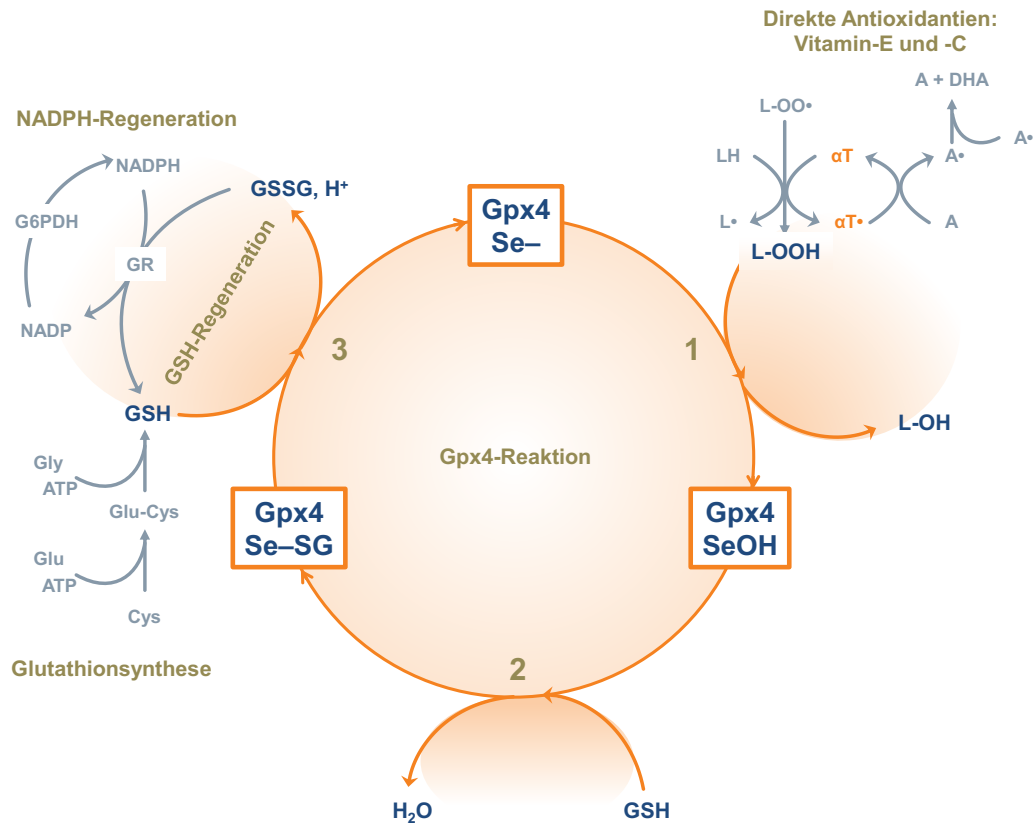


Abbildung 2: Reaktionszyklus der Gpx4 mit kooperativen Reaktionswegen von GSH, Vitamin E und C. Im ersten Schritt (1) findet die Oxidation des dissoziierten Selen im aktiven Enzymzentrum der Gpx4 (Gpx4-Se^-) durch das Hydroperoxidsubstrat (hier ein oxidiertes Lipid (L-OOH)) statt. Dieser Schritt liefert im Ergebnis das Selen säurederivat (Gpx4-SeOH). Im zweiten Schritt (2) reagiert das nun oxidierte Enzym mit der Thiolgruppe des Glutathions (GSH) als Reduktionsmittel unter Abspaltung von Wasser. Als Zwischenprodukt wird das GSH-Molekül mit seiner Schwefelgruppe kovalent an das Selen gebunden (Gpx4-Se-SG). Im letzten Schritt (3) lagert sich ein weiteres GSH-Molekül an, die vorübergehende Selen-Disulfid-Brücke wird aufgespalten und Gpx4 regeneriert (Ping-Pong-Mechanismus). Ein oxidiertes Glutathion-Disulfid-Molekül (GSSH) bleibt zurück (58, 70). Das GSSH-Molekül wird durch Glutathionreduktasen unter Verbrauch von NADPH/H^+ wieder zu GSH regeneriert. Die Glucose-6-Phosphatdehydrogenase regeneriert das NADPH . Neue GSH-Moleküle werden von der Glutathion-Synthetase aus Cystein, Glutamat und Glycin unter ATP -Verbrauch generiert. Die in der Zellmembran erzeugten freien Radikale ($\text{L-OO}\cdot$) können auch direkt von Vitamin-E (αT) neutralisiert werden. Das dabei entstehende Vitamin-E-Radikal kann dann wiederum durch Vitamin-C regeneriert werden, dabei entsteht Dehydroascorbinsäure (67). Aus diesem Reaktionszyklus wird der synergistische Effekt von Vitamin-E als direkter Kooperationspartner der Gpx4 ersichtlich. Versuche zur Lipidperoxidation belegen, dass die Gpx4 die zur Zellintegrität benötigte Menge an Vitamin-E einsparen kann und dass beide Antioxidantien wichtige Kooperationspartner sind. So konnte Vitamin-E den Gpx4-Verlust *in-vitro* und *in-vivo* teilweise kompensieren (37, 61, 67). **A** = Ascorbinsäure (Vitamin C), **DHA** = Dehydroascorbinsäure, **G6PDH** = Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, **Gpx4-Se⁻** = Gpx4 regeneriert, **Gpx4-SeOH** = Gpx4 oxidiert, **Gpx4-Se-SG** = Gpx4 mit transienter kovalenter Disulfidbindung mit GSH, **GR** = Glutathion-Reduktase, **GSH** = Glutathion, **GSSH** = oxidiertes Glutathion-Disulfid-Molekül, **H₂O** = Wasser, **LH** = mehrfach ungesättigtes Phospholipid, **L-OH** = korrespondierender Alkohol, **L-OO•** = Lipidperoxyl-Radikal, **L-OOH** = Hydroperoxidsubstrat, **NADPH** = Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat, **αT** = α -Tocopherol (Vitamin-E), **$\alpha\text{T}\cdot$** = α -Tocopherol-Radikal.

1.5.3 Gen-Sequenz der Gpx4

Das breite Substratspektrum und die funktionellen Eigenschaften dieses Enzyms könnten durch dessen Aufbau erklärt werden: Die *Gpx4* Sequenz ist auf dem kurzen Arm des Chromosoms 19 lokalisiert (71). Das Gen besteht aus sieben Exons, sowie einem alternativen Exon, die gemeinsam für die drei Isoformen (die längere mitochondriale, die kürzere zytosolische und die nukleäre Form) der *Gpx4* kodieren (53, 54, 72).

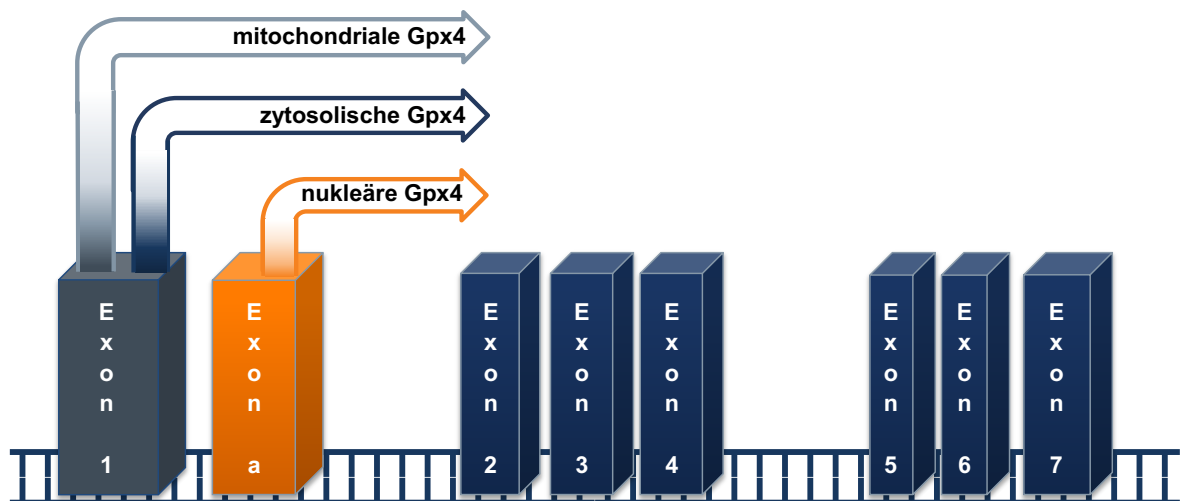


Abbildung 3: Schematische Darstellung der genomischen *Gpx4*-Sequenz. Die Sequenz besteht aus sieben Exons, sowie einem alternativen Exon. Die beiden Startcodons für die mitochondriale und zytosolische Form werden vom ersten Exon kodiert. Der alternative Transkriptionsstart für die mitochondriale Form, innerhalb des ersten Exons, bedingt die Längendifferenz. Das Startcodon für die nukleäre Form der *Gpx4* wird auf dem alternativen Exon (Exon a) kodiert (52, 54, 72).

Verglichen mit der *Gpx1* hat die *Gpx4* ganze 170 Aminosäuren weniger. Unter diesen fehlenden Aminosäuren sind auch vier Arginin-Residuen (R57, R103, R184 und R185), die speziell für die GSH-Bindung verantwortlich sind (43). Das Fehlen dieser Aminosäuren könnte also das besonders breite Substratspektrum der *Gpx4* erklären. Im Unterschied zu den anderen Glutathionperoxidasen erlaubt die kleine Größe und die lipophile Oberfläche der *Gpx4* direkt mit komplexen oder sogar membranständigen Lipidhydroperoxiden und Membranlipiden zu interagieren (67).

1.5.4 Aufgaben der *Gpx4*

Seit der Entdeckung der *Gpx4* Anfang der 80er Jahre ist bekannt geworden, dass dieses Enzym nicht nur eine Rolle in der Abwehr von oxidativem Stress einnimmt, sondern viele weitere Funktionen innehat (sog. Moonlighting Protein). Auf einige dieser Funktionen soll im Folgenden kurz eingegangen werden.

1.5.4.1 Fertilität

Als somatisches Enzym schützt die Gpx4 Zellen vor oxidativem Stress. Sie kann jedoch auch als enzymatisch inaktive Form verbaut werden: Die Gpx4 ist eine der Strukturkomponenten in Spermien und somit Bestandteil der strukturellen Spermienstabilität (73). Die vorherrschende Gpx4 Isoform in männlichen Keimzellen ist die mitochondriale Gpx4 (mGpx), so besteht über die Hälfte der Mitochondrienkapsel reifer Spermatozyten aus verbauter Gpx4. (53, 66). Es konnte gezeigt werden, dass für die männliche Fertilität die mGpx und nicht, wie vielleicht vermutet, die spermienkernspezifische Gpx4 (snGpx4) von essentieller Bedeutung ist (66).

1.5.4.2 Leben und Überleben

Wird die Gpx4 im Mausmodell durch einen globalen Gen-Knockout (KO) ausgeschaltet, ist dieser bereits früh embryonal letal; die Gpx4-KO-Tiere versterben bereits am 7. Embryonaltag (56, 61). Die KO-Embryos sind kleiner als der Durchschnitt und zeigen erhebliche Entwicklungsdefekte direkt nach der Gastrulation (56). Doch nicht nur für das Leben ist die Gpx4 unverzichtbar, sondern auch für das „Über-Leben“: Wurde der Gpx4-Gen-KO in einem mit Tamoxifen induzierbaren globalen KO-Mausmodell im Alter von 6-9 Monaten ausgelöst, verstarben alle Gpx4-KO-Tiere innerhalb von zwei Wochen nach Induktion (57). Die genaue Todesursache konnte bisher nicht geklärt werden, jedoch verloren die Tiere massiv an Gewicht und waren neurologisch auffällig. In den Analysen zeigten sich eine vermehrte Astroglieose im Gehirn, Mitochondrienschäden sowie eine verringerte ATP-Produktion in der Leber (57). Diese Ergebnisse lieferten weitere Hinweise auf Funktion der Gpx4 im Gehirn. Durch weiterführende Versuche konnten Conrad et al. und Schneider et al. zeigen, welche der drei Isoenzyme der Gpx4 für das Leben essenziell ist: Erstaunlicherweise schadet der nukleäre Gpx4-Verlust weder der Embryogenese, noch der Fertilität von männlichen Mäusen (69). Ist die mitochondriale Gpx4 ausgeknockt, überleben die KO-Tiere und haben eine normale Entwicklung und Lebenserwartung, männliche Tiere sind jedoch auf Grund der fehlenden Strukturstabilität der Spermatozyten unfruchtbar (66). Somit ist der Verlust der zytosolischen Gpx4 essenziell; sowohl für das Leben als auch für das Überleben (55).

1.5.4.2.1 Ferroptose

Im Zusammenhang mit Zelluntergang sind Autophagie, Apoptose, Nekrose und Nekroptose seit längerem bekannt (74). Eine kürzlich entdeckte neue Form des kontrollierten Zelltods ist die Ferroptose. Es handelt sich dabei um eine regulierte Form des Zelltods, u. a. angetrieben durch einen Aktivitätsverlust der Gpx4 und die anschließende Akkumulation von reaktiven Sauerstoffspezies auf Lipidbasis, insbesondere von Lipidhydroperoxiden (42). Die genauen Reaktionsmechanismen sind noch nicht gänzlich geklärt, sicher ist jedoch, dass es, wie der Name schon sagt, eine Eisen- und ROS-abhängige Form des regulierten Zelltods ist (42, 74-76). Auch die virale Immunantwort und die Degeneration von Motoneuronen sind mit Ferroptose verknüpft (77-79). Die Gpx4 reguliert Ferroptose durch den Eingriff in die Lipidperoxidation durch die Reduktion oxidierter Lipide (s. Abb. 2). Fer-

ner konnten Versuche zeigen, dass die Zellen des diffusen B-Zell-Lymphoms sowie des Nierenzellkarzinoms anfällig für die Gpx4-regulierte Ferroptose sind (42). Somit kann dieser Signalweg als zukünftiges Target für potentielle Therapieoption von Interesse sein.

1.5.4.3 Nieren

Angeli et al. konnten zeigen, dass Ferroptose nicht nur eine Rolle in-vitro spielt (76); ein Gpx4-Verlust führt auch in-vivo zu einem Ferroptose assoziierten Zelltod im Nierenparenchym (76). Mit Tamoxifen induzierte globale Gpx4-KO-Tiere zeigten akutes Nierenversagen mit progredienter Albuminurie, unselektiver Proteinurie, erhöhten Nierenretentionsparametern sowie Proteinablagerungen in den distalen Tubuli und ausgedehnte Tubuluszellnekrosen. Die Mäuse verstarben innerhalb von 14 Tagen nach KO-Induktion an akutem Nierenversagen (76). Als Pathomechanismus für den massiven Zelluntergang in den Nieren konnte der durch Lipidperoxidation induzierte Ferroptose-Signalweg identifiziert werden. Diese Ergebnisse zeigten eine Schlüsselrolle der Gpx4 in der Ferroptose durch Schutz vor Akkumulation von Lipidperoxiden.

1.5.4.4 Leber

Der leberspezifische Gpx4-Gen-KO ist ebenfalls letal. Mäuse, mit gewebespezifischem Gpx4-KO in der Leber entwickeln sich embryonal normal, versterben allerdings innerhalb von 48 h nach der Geburt (77). Wurde den Muttertieren eine Vitamin-E reiche Diät verabreicht, überlebten die Gpx4-KO Mauswelpen bis zu 4 Wochen nach Geburt (77). Dies verdeutlicht den oben beschriebenen synergistischen Effekt von Vitamin-E und Gpx4 (s. Abb. 2). Die Versuche betonen auch die entscheidenden Aufgaben der Gpx4 in der Leberfunktion sowie ihre Rolle im Überleben von Hepatozyten. Die Analysen der leberspezifischen Gpx4-KO-Tiere zeigten histologisch eine Rarefizierung der Lebervenen und Sinusoide sowie eine großflächige Leberzelldegeneration und Nekrosen (77).

1.5.4.5 Gefäßendothel

Diesen synergistischen Effekt von Vitamin-E und Gpx4 konnten auch Wortmann und Schneider et al. in ihren Versuchen mit induzierbaren endothelspezifischen Gpx4-KO-Tieren nachweisen. Die induzierten KO-Tiere, bei denen die Gpx4 in den Endothelien ausgeschaltet ist, überlebten den gesamten Beobachtungszeitraum von sechs Monaten und zeigten keine Auffälligkeiten. Wurde den Tieren jedoch zusätzlich zum Gpx4-KO eine Vitamin-E Mangeldiät gefüttert verstarben 80% der KO-Mäuse innerhalb von 3 Wochen. In der Analyse zeigten sich multiple Thrombembolien. Die Gefäßendothelzellen starben ab und lösten sich von der Basalmembran. Im Lumen der Gefäße bildeten sich daraufhin Thromben. Je nach betroffenem Organsystem traten entsprechende Pathologien auf. Die Versuche lieferten wichtige Ergebnisse hinsichtlich der Synergie von Vitamin-E und Gpx4. Es konnte gezeigt werden, dass eine adäquate Vitamin-E-Versorgung den Gpx4-Funktionsverlust in Endothelzellen kompensieren kann (37).

1.5.4.6 Nervensystem

Mehrere voneinander unabhängige Forschungsgruppen konnten nachweisen, dass die Gpx4 eine entscheidende Rolle bei neurodegenerativen Prozessen spielt (57, 78, 80-85). Die Erstbeschreibung neuronaler Gpx4-KO Mäuse durch Seiler et al. zeigte, dass die neuronalen Gpx4-KO Tiere normal auf die Welt kamen, jedoch ab dem 8. Lebenstag (P8) im Vergleich zu ihren Wildtyp-Geschwistern weniger Gewicht zunahmten. Im Verlauf zeigten die KO-Tiere u. a. Ataxien, neurologische Defizite, epilepsieähnliche Anfälle und Desorientiertheit. Letztlich mussten die Tiere ab dem 13. Lebenstag euthanasiert werden. Die Auswertung der Gehirne zeigte neurodegenerative Veränderungen mit Astrogliose v. a. im Hippocampus (83). Versuche, die die neuronale Synthese von Gpx4 reduzierten, führten an Mäusen zu Ataxien, epilepsieähnlichen Anfällen und einer reduzierten Anzahl an Interneuronen (84). Ein weiteres Forschungsteam konnte zeigen, dass adulte induzierbare neuronale Gpx4-KO-Tiere (3-4 Monate alt) drei Tage nach KO-Induktion erste Zeichen einer beginnenden Paralyse (Versteifung der Hinterbeine), Gleichgewichtsverlust sowie Muskelatrophien zeigten (78). Innerhalb von acht Tagen mussten alle neuronalen Gpx4-KO-Tiere euthanasiert werden. Hier zeigten die Gewebeanalysen neurodegenerative Veränderungen der Motoneurone im Rückenmark. Eine Vitamin-E-Gabe konnte den Phänotyp verzögern (78).

Sowohl in einem Mausmodell für Morbus Alzheimer, als auch in humanen Hirnproben von Alzheimerpatienten konnte eine reduzierte Expression von Gpx4 sowie eine erhöhte Lipidperoxidation nachgewiesen werden (82, 85). Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass Parkinsonpatienten eine reduzierte Gpx4-Expression in den Bereichen der Substantia Nigra aufwiesen. Verglichen mit der verbliebenen Zellzahl in diesem Hirnareal waren die Gpx4-Level pro Zelle signifikant höher als bei Nichterkrankten (80). Dieser Expressionsanstieg der Gpx4 in den Neuronen der Substantia Nigra bei Parkinson spricht für einen neuroprotektiven Effekt dieses Enzyms.

Nachdem (wie unter 1.5.4.2 beschrieben) der globale Gpx4-KO sowohl embryonal als auch im Alter induziert letal endet und der zellspezifisch neuronale Gpx4-KO in der frühen Welpenphase durch die neurologischen Defizite tödlich ist, wurden für die Untersuchung der Rolle der Gpx4 im adulten Gehirn induzierbare gewebespezifische KO-Mausmodelle herangezogen (56, 57). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit liegt das Augenmerk auf neuronalen und astrozytären Gpx4 Knockout-Mausmodellen.

1.6 Die neurovaskuläre Einheit

Der Schlaganfall ist primär eine zerebrovaskuläre Erkrankung, in den 1990er Jahren rückten aber nach und nach auch die Mechanismen des neuronalen Zelltods in den Mittelpunkt des Forschungsinteresses, um mögliche neuroprotektive Ansätze und Substanzen für den Erhalt und Schutz von Neuronen zu finden. Die vermeintlich neuroprotektiven Substanzen lieferten jedoch in klinischen Studien kein besseres Outcome (86). Diese negativen Ergebnisse zeigten, dass der Schutz von Neuronen allein nicht ausreicht, um die Integrität neuronaler Funktionen nach Schlaganfall zu gewährleisten. Basierend auf die-

sen Erkenntnissen wurde ein Konzept entwickelt, das nach einem Schlaganfall von einer Schädigung sämtlicher im Gehirn vorhandener Zellen ausgeht, also auch von Endothelzellen, Perizyten, Astrozyten und Neuronen.

Der arterielle Gefäßverschluss beim Schlaganfall hat zwar seinen Ursprung innerhalb der Blutgefäße des Gehirns, wirkt sich jedoch auf alle Zellen des Gehirns aus: Die Endothelzellen werden durchlässig, es kommt zu Einblutungen und Ödemen, die Astrozyten reagieren mit reaktiver Astrozytose und die Neuronen sterben ab. Zahlreiche Signalkaskaden, Enzyme und Reaktionen auf metabolischer und genetischer Ebene werden in Gang gesetzt. Deswegen ist es zu kurz gegriffen, lediglich Neuronen als Mittelpunkt der Fragestellung zu betrachten, vielmehr sollten alle Zellen die eine funktionelle Einheit mit den Neuronen bilden – die sog. neurovaskulären Einheit (NVU) – in die Fragestellung einbezogen werden (8, 87, 88).

Bis heute noch ist der wissenschaftliche Diskurs darüber, welche Zellen der NVU angehören im Fluss (86). Die in dieser Arbeit untersuchten Neuronen und Astrozyten sind gemeinsam mit den Endothelzellen seit dem ersten Konzept der NVU Teil von ihr (86). Ebenfalls steht fest, dass der Defekt eines jeden Teils der NVU sich auf die anderen auswirkt. Bis heute ist jedoch noch nicht geklärt, wie genau die einzelnen Akteure der NVU miteinander kommunizieren, ihre Stressreaktionen aufeinander abstimmen oder wie stark sie sich nicht nur gegenseitig beeinflussen, sondern auch auf das umliegende Gewebe und auf die anliegenden NVU einwirken (89). Vor diesem Hintergrund ist die Beleuchtung von Neuronen und Astrozyten im Zusammenhang mit oxidativem Stress nach Schlaganfall besonders spannend.

1.6.1 Astrozyten in der neurovaskulären Einheit (NVU)

Astrozyten gehören zu den Gliazellen und sind die mit Abstand häufigste Zellart im Säugerhirn. Unter physiologischen Bedingungen übernehmen sie eine Vielzahl wichtiger Aufgaben, ohne die neuronale Prozesse im Gehirn nicht möglich wären (90, 91). Astrozyten gewährleisten die Nährstoffversorgung u. a. von Neuronen, da sie als einzige Zellen im Gehirn Glykogen (die größte Energiereserve des Gehirns) produzieren und speichern. Sie regulieren die extrazelluläre Neurotransmitter- und Ionenkonzentration, indem sie überschüssiges Glutamat und extrazelluläres Kalium abtransportieren (sog. *spatial buffering*). Ebenso sind sie an der Bildung und Aufrechterhaltung der Blut-Hirn-Schranke beteiligt und gewährleisten antioxidativen Schutz für das gesamte ZNS (87, 92-96). Zudem interagieren Astrozyten – als Teil der NVU – mit anderen Zellen (z. B. Mirkoglia, Oligodendrozyten, Perizyten, Endothelzellen), Kapillaren und Synapsen (95, 96). Um all die Aufgaben zu koordinieren, sind Astrozyten über Gap Junctions miteinander verbunden und bilden ein Netzwerk, durch das Astrozyten über weite Entfernungen miteinander kommunizieren können. Nicht nur unter physiologischen, sondern auch unter pathologischen Bedingungen, spielen Astrozyten eine essentielle Rolle. Sie können neuroprotektive Faktoren freisetzen oder durch die Aufnahme toxischer Metabolite das Hirngewebe schützen (90, 97).

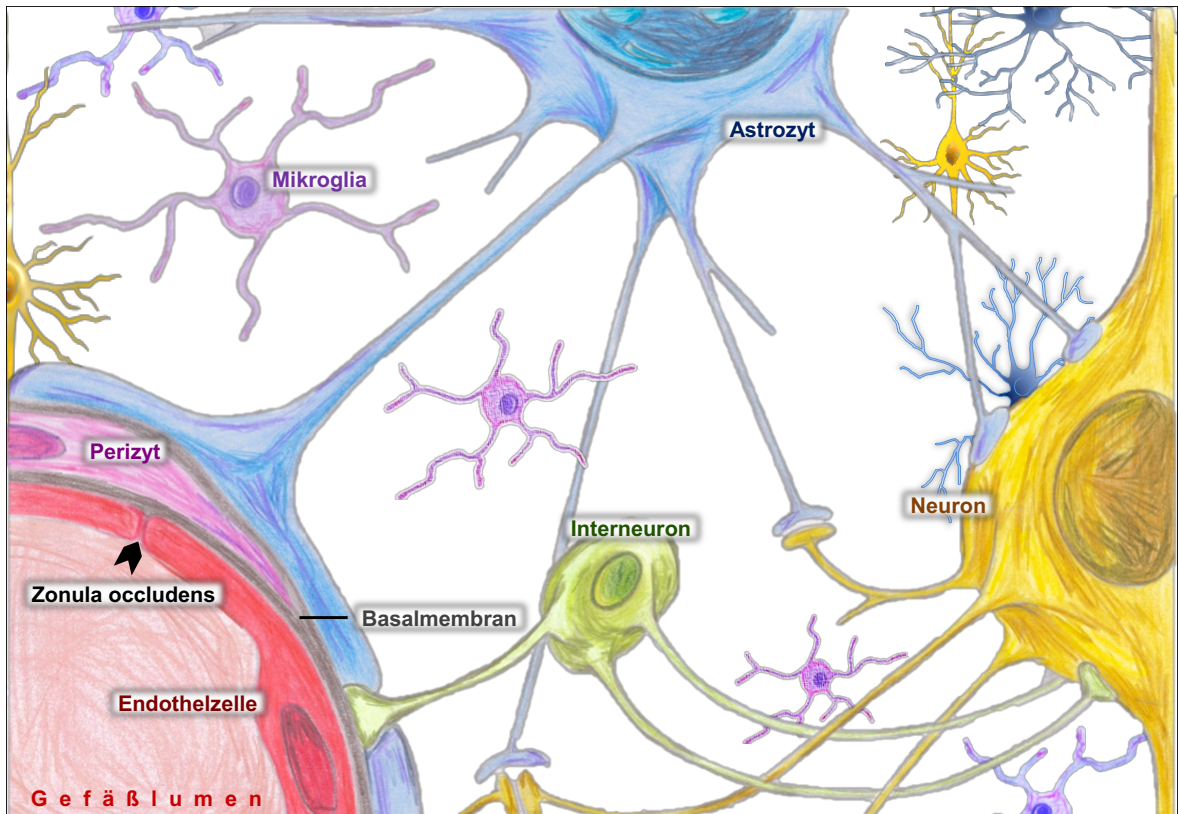


Abbildung 4: Schematische Darstellung der neurovaskulären Einheit (NVU). Die NVU ist ein Konzept, welches die funktionelle Einheit zwischen Gefäßen, Neuronen und Astrozyten beschreibt. Auch Perizyten und Mikrogliazellen können daran partizipieren. Die Zellen des Gefäßendothels im Gehirn sind einzigartig, sie sind durch die Zonula occludens (tightjunctions) dicht miteinander verbunden, nicht fenestriert und bilden die Blut-Hirn-Schranke. Astrozyten umgeben die Gefäße mit ihren Endfüßchen fast vollständig, tragen zur Barrierefunktion bei und sind maßgeblich an der Kommunikation zwischen Gefäßen und Neuronen beteiligt. Die Perizyten bzw. die glatten Muskelzellen der Gefäßwand nehmen die chemischen Signale der Endothelzellen und Neurone wahr und reagieren entsprechend mit Vasokonstriktion bzw. -dilatation. Diese funktionelle Einheit bildet ein wichtiges Netzwerk und ist die erste reaktive Verteidigungsfront gegen die Folgen der Ischämie bei Schlaganfall sowie anderen Formen der Hirnverletzung (8, 87, 88).

1.6.2 Die Gpx4 in der neurovaskulären Einheit

Das Gehirn ist das Gewebe mit der höchsten Dichte an mehrfach ungesättigten Fettsäuren im Körper (75, 82). Oxidativer Stress kann hier also in besonderem Maße zu Lipidperoxidation führen. Die Gpx4 ist das einzige bislang bekannte Enzym, das eben diese Lipidperoxide direkt neutralisiert, selbst wenn diese in komplexen Protein-Aggregaten verpackt sind wie in Zellmembranen, Lipoproteinen, Cholesterinen und sogar in dem die Apoptose regulierenden Cardiolipin in Mitochondrien (57, 67). Dieses Enzym verfügt über Einzigartigkeit in seiner Funktion und Struktur, es ist eines der wichtigsten antioxidativen Enzyme in Säugetieren und kann durch keine der anderen sieben Glutathionperoxidasen kompensiert werden (37, 61, 75, 83). Bislang ist auch keine andere Enzymgruppe bekannt, die die Funktion der Gpx4 kompensieren könnte. Vitamin-E scheint als nichtenzymatisches Antioxidans ein wichtiger Kooperationspartner zu sein (37, 61, 67). Der Zusammenhang von Lipidperoxidation und einer Vielzahl von Erkrankungen ist be-

kannt, darunter auch neurologische Erkrankungen wie die Schizophrenie, aber auch neurodegenerative Erkrankungen wie die Alzheimer-Demenz oder Morbus Parkinson (80-82, 85). Die Auswirkungen eines Gpx4-Mangels auf akute neurologische Stressoren, wie die akute Ischämie nach Schlaganfall, sind bislang ungeklärt. Um die Auswirkung von oxidativem Stress in den einzelnen Zellen der neurovaskulären Einheit (NVU) nach Schlaganfall zu untersuchen, wurden zellspezifische konditionale Gpx4-KO-Mausmodelle generiert und einem Schlaganfallmodell unterzogen. Dadurch soll die Auswirkung des Gpx4-Verlustes innerhalb von einzelnen Zellen (hier Neuronen und Astrozyten) nach akuter Ischämie untersucht werden und zu einem besseren Verständnis der Pathophysiologie von oxidativem Stress im Schlaganfall und dessen Rolle in der NVU führen.

1.7 Zielsetzung dieser Arbeit

Die wissenschaftlichen Zielsetzungen dieser Arbeit sind

- die Gpx4 Expression nach zerebraler Ischämie zu analysieren.
- die Auswirkungen eines neuronalen bzw. astrozytären Gpx4-Mangels auf den Infarkt und das neurologische Outcome nach akuter zerebraler Ischämie zu untersuchen.
- den Einfluss von Vitamin-E Mangel und von astrozytärem Gpx4 Verlust auf den Infarkt und das neurologische Outcome nach akuter zerebraler Ischämie näher zu beleuchten.

2 Material

2.1 Geräte

Adapter für Tissue Lyser LT, 12-Tube	Qiagen, Hilden, DE
Blockheater, Bibby Sterling, (# SHT100D)	Stuart Scientific, Stone Steffordshire, UK
Gefrierschrank, Hera Freeze Top, - 80°C	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Gefrierschränke, - 20°C	Liebherr, Bulle, CH
Geldokumentationssystem, Fusion FX7	Vilber Lourmat, Marne-la-Valée cedex, FR
Homogenisator, Tissue Lyser LT, iMark™, (# 17760)	Qiagen, Hilden, DE
Inkubator, Function line, 37°C	Heraeus Kulzer, Hanau, DE
Kryostat, CryoStar NX70	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Kühlschränke, 4°C	Liebherr, Bulle, CH
Mikroskop, Imager. M2	Zeiss, Jena, DE
Mikrowelle	Siemens, München, DE
pH-Meter, Lab 850	Schott AG, Mainz, DE
Pipetten (10, 20, 50, 100, 200, 1000) µl	Eppendorf, Hamburg, DE
Power Supply, Basic PowerPac	BIO-RAD, Hercules, CA, USA
Spektrophotometer, Micorplate reader,	BIO-RAD, Hercules, CA, USA
Thermocycler, peqStar 2X Gradient	PEQLAB, Erlangen, DE
Thermomixer „Thriller“	PEQLAB, Erlangen, DE
Thermomixer basic/pro (# 14T1100063)	Cell Media, Elsteraue, DE
Wippschüttler, ST5 CAT	neoLab, Heidelberg, DE
Zentrifuge (# 5417R)	Eppendorf, Hamburg, DE

2.2 Operationsmaterialien

Arterienklemme	FST, Heidelberg, DE
Beschleuniger für Cyanoacrylatkleber	BSI, Atascadero, USA
Cyanoacrylatkleber, Maxi-Cure™	BSI, Atascadero, USA
Desinfektionstücher, mikroqid® AF	Schülke, Norderstedt, DE
Dreieckstupfer, Sugi Saugstupfer	Kettenbach GmbH, Eschenburg, DE
Durchflussmesser für Gase, Digi Flow	Drägerwerk AG, Lübeck, DE

Fadenhalter, "Olsen-Hegar"	FST, Heidelberg, DE
Federschere, "Vannas" 2.5mm	FST, Heidelberg, DE
Fellschere, "Extra Fine Bonn"	FST, Heidelberg, DE
Filament MCAO (# 701912PK5Re)	Doccol Corporation, Sharon, MA, USA
Flüssiger Thermistor Einsatz	FHC, Bowdoinham, ME, USA
Glasfasersonde, (# MT B500-0 L240)	Perimed AB, Järfälla, SE
Heizmatte (5 x 12,5 cm)	FHC, Bowdoinham, ME, USA
Isofluranzerstäuber	Havard Apparatus, Holliston, USA
Klemme, "Halsted-Mosquito" 12.5cm	FST, Heidelberg, DE
Laser Doppler PeriFlux System 5000 LD	Perimed AB, Järfälla, SE
Laser Doppler Sonde 418	Perimed AB, Järfälla, SE
Laser Doppler Verbindungskabel	Perimed AB, Järfälla, SE
Lichtquelle des Mikroskops	Leica GmbH, Wetzlar, DE
Maus-Hirnmatrix	Zivic Instruments, Pittsburgh PA, USA
Operationsmikroskop, M80	Leica GmbH, Wetzlar, DE
Pinzette Dumont # 5 - 45 abgewinkelt	FST, Heidelberg, DE
Pinzette Dumont # 5 gerade	FST, Heidelberg, DE
Pinzette Dumoxel # 3	FST, Heidelberg, DE
Polyamidfaden, Ethilon 8-0	Johnson & Johnson, New Brunswick, USA
Polyesterfaden, Ethibond 5-0	Johnson & Johnson, New Brunswick, USA
Pulsoxymeter, MouseSTAT	Kent Scientific, Torrington, CT, USA
Rektale Temperatursonde	FHC, Bowdoinham, ME, USA
Seidenfaden 5/0	Pearsalls Ltd, Taunton, GB
Silikon-Abformmaterial, Xantopren® M mucosa	Heraeus Kulzer, Hanau, DE
Skalpelle Feather Gr. 11	über das Klinikum Großhadern
Temperaturregler	FHC, Bowdoinham, ME, USA
Universal Aktivator (Optosil/Xantopren)	Heraeus Kulzer, Hanau, DE
Waage	Ohaus Europe GmbH, Nänikon, CH
Wärmebox groß, "Babytherm"	Drägerwerk AG, Lübeck, DE
Wärmebox klein, Medi Heat™	Peco Services Ltd, Cumbria, GB

2.3 Medikamente

Augen- und Nasensalbe, Bepanthen®	Bayer AG, Leverkusen, DE
Carprofen	Pfizer GmbH, Berlin, DE
Ergänzungsfuttermittel, Immun Albrecht®	Albrecht GmbH, Aulendorf, DE
Ergänzungsfuttermittel, Nutri-Cal®	Albrecht GmbH, Aulendorf, DE
Isofluran	Virbac Animal Health, Biot, FR
Lachgas	Linde AG, München, DE
Metamizol (500 mg/ml)	MSD/Intervet, Unterschleißheim, DE
Sauerstoff	Linde AG, München, DE
Tamoxifen	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

2.4 Allgemeine Chemikalien

Agarose	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Ampuwa	Fresenius AG, Bad Homburg, DE
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Bromophenol Blau	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
DNA Ladepuffer, 6 X	PEQLAB, Erlangen, DE
Dodecylsulfatnatriumsalz (C ₁₂ H ₂₅ O ₄ S-Na)	Serva, Mannheim, DE
Ethanol (70, 96, 100)%	CLN Laborgroßhandel, Freising, DE
Ethanol pro analysi (p. a.)	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Glycerol ≥ 99,5%	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Isotone Kochsalzlösung (NaCl), 0,9%	B. Braun AG, Melsungen, DE
Magermilchpulver	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Methanol	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Neutralöl, MIGLYOL® 812	Caelo, Hilden, DE
Paraformaldehyd (PFA) 4% in PBS 7,4	Morphisto GmbH, Frankfurt a. M., DE
PBS Puffer 10 X, ph 7,4	Hausinterne Apotheke des Klinikums LMU
Proteaseinhibitor (EDTA freie Tabl.)	Roche, Basel, CH
β-Mercaptoethanol	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Tris (Tris (hydroxymethyl)-Aminomethan)	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Triton X-100	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Trizma Base	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA

Tween 20	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Xylol (Rotihistol)	Carl Roth, Karlsruhe, DE

Weitere in der Arbeit erwähnte, jedoch hier nicht gelistete Chemikalien wurden von Sigma-Aldrich bezogen.

2.5 Polymerase Chain Reaction (PCR)

Agarosegel-Kammer	PEQLAB, Erlangen, DE
DNA-Größenstandard, peqGOLD, 50 bp	PEQLAB, Erlangen, DE
Einweg Röhrchen (0,5; 1,5; 2,0) ml	Eppendorf, Hamburg, DE
Elektrophoresesystem, PerfectBlue™	PEQLAB, Erlangen, DE
Rekombinante Proteinase K	Roche, Basel, CH
RotiPhenol/Chloroform (pH 7,9)	Carl Roth, Karlsruhe, DE
SYBR® Safe DNA Farbe	Invitrogen, Carlsbad, USA
Taq PCR Core Kit	Qiagen, Hilden, DE

Lyse-Puffer: 10 mM Tris (pH 7,6), 10 mM EDTA, 0,5% SDS (pH 7,4), 10 mM NaCl

TAE-Puffer: 40 mM Tris, 20 mM Eisessig, 1 mM EDTA, pH 8,0

TE-Puffer: 10 mM Tris-HCL, 1 mM EDTA

Tabelle 2. Übersicht der verwendeten Primer zur Genotypisierung.

Oligoname	Sequenz
OligoPFfor1	5'-ACTCCCCGTGGAAGTGTGAGCTTTGTGC-3'
OligoPFrev1	5'-GGATCTAAGGATCACAGAGCTGAGGCTGC-3'
OligoPHGPxI5f1	5'-GTGTACCACGTAGGTACAGTGTCTGC-3'
GLAST F8	5'-GAGGCACTTGGCTAGGCTCTGAGGA-3'
GLAST R3	5'-GAGGAGATCCTGACCGATCAGTTGG-3'
CER1	5'-GGTGTACGGTCAGTAAATTGGACAT-3'
CreER1	5'-GGTTCTCCGTTTGCACCTCAGGA-3'
CreER2	5'-CTGCATGCACGGGACAGCTCT-3'
CreER3	5'-GCTTGCAGGTACAGGAGGTAGT-3'

Alle Oligonukleotide stammen von der Firma Metabion International AG, Martinsried, Deutschland.

2.6 Western Blot (WB)

Bicinchoninsäureassay (BCA), Pierce™	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Blotting-Kammer, Mini Trans-Blot® Cell	BIO-RAD, Hercules, CA, USA
CryoTube® Nunc, einweg, (1,8 ml)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Elektrophoresezelle, Mini-PROTEAN®	BIO-RAD, Hercules, CA, USA
Enhanced Chemilumiszenz (ECL), ImmobilonWestern®, HRP Substrat	Millipore, Billerica, MA, USA
Größenstandard PrecisionPlus (# 161-0373)	BIO-RAD, Hercules, CA, USA
Polyacrylamide Gel 8-16%, Mini-PROTEAN®	BIO-RAD, Hercules, CA, USA
Ponceau S Farbe	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Transfer-Polyvinylidenfluorid-Membran, (PVDF) Immobilion-P®, 0,45 µm	Millipore, Billerica, MA, USA
Tris/Glycine/SDS-Puffer (10 X) (# 1610732)	BIO-RAD, Hercules, CA, USA
Well Platte, einweg, 96 Loch	Greiner bio-one, Kremsmünster, AUT

<u>Blocking-Puffer:</u>	4% Magermilchpulver in TBST (1 X)
<u>Blotting-Puffer:</u>	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20% Methanol
<u>Coomassie-Farbe:</u>	5% Aluminiumsulfat-(14-18)-Hydrat, 10% Ethanol (96%), 0,02% CBB-G250, 2% Ortho-Phosphorsäure (100%)
<u>Lämmli-Puffer (5 X):</u>	375 mM Tris, 30% (v/v) Glycerin, 6% (w/v) SDS, 5% (v/v) β-Mercaptoethanol, 0,03% (w/v) Bromphenolblau, 50 ml dH ₂ O, pH 6,8
<u>LCW-Lyse-Puffer:</u>	20 mM TRIS (pH 7,6), 10 mM EDTA, 0,5% Sodium Deoxycholat, 30 mM Na-Pyrophosphat (pH 7,5), 150 mM NaCl, 0,5% Triton-X-100
<u>Running Puffer:</u>	25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0.1% SDS, pH 8.3 (
<u>Stripping-Puffer:</u>	0,4 M NaOH
<u>TBST-Puffer (10 X):</u>	100 mM Tris, 1,5 M NaCl, 0,05% Tween 20, 1 L dH ₂ O

2.7 Histologie

Deckgläser	Menzel-Gläser, Braunschweig, DE
Einbettkassetten	Carl Roth, Kralruhe, DE
Einbettmedium, Tissue-Tek®	Sakura Finetek Europe, Zoeterwoude, NL
Eindeckmedium, ProLong® Gold	Life Technology, Carlsbad, CA, USA
Eindeckmedium, Roti-Histokitt®	Carl Roth, Kralruhe, DE
Fettstift, DakoPen	Dako Diagnostika GmbH, Hamburg, DE
Fluorescein in Situ Apoptosis Detection Kit, ApopTag® TUNEL-Färbung	Millipore, Billerica, MA, USA
Kresylviolett für NISSL	Morphisto, Frankfurt a. M., DE

Objektträger, SuperFrost®

Menzel-Gläser, Braunschweig, DE

Blocking-Puffer: PBS, 5% BSA, 0,1% Tween

2.8 Antikörper (AK)

In den folgenden Tabellen sind alle AK aufgelistet, die im Rahmen dieser Doktorarbeit verwendet wurden.

Tabelle 3. Primäre Antikörper. WB: Western Blot, IF: Immunfluoreszenz

Antigen	Reaktivität	Verdünnung (Größe [kDa])	Herkunft
β-Actin	Kaninchen	WB: 1 : 1000 (42 kDa)	Sigma-Aldrich
DAPI	-----	IF: 1 : 10 000	Invitrogen
NeuN	Maus	WB: 1 : 1000, IF: 1 : 100	Millipore
Gpx4	Kaninchen	WB: 1 : 1000 (~ 20 kDa)	Abcam
GFAP	Maus	WB: 1 : 1000 (50 kDa)	Sigma-Aldrich
Iba1	Ziege	IF: 1 : 100	Wako Pure Chemical Industries
Gpx4 - Serum	aus Rattenserum	WB: Pur	Elisabeth Kremmer, Helmholtz Zentrum, München
MAP2	Maus	WB: 1 : 1000, IF: 1 : 100	Millipore
β-Tubulin	Maus	WB: 1 : 1000 (50 kDa)	Sigma-Aldrich

Tabelle 4. Sekundäre Antikörper. HRP: Horseradish peroxidase, Alexa: AlexaFluor, Cy: Cyanine

Antikörper	Typ	Verdünnung	Herkunft
Esel Anti-Ziege	AlexaFluor488 (AF) (grün)	IF: 1 : 100	Jackson ImmunoResearch
Ziege Anti-Maus	Cy3 (rot)	IF: 1 : 100	Jackson ImmunoResearch
Esel Anti-Maus	Cy3 (rot)	IF: 1 : 100	Jackson ImmunoResearch
Esel Anti-Kaninchen	Alexa488 (grün)	IF: 1 : 100	Invitrogen
Ziege Anti-Kaninchen	HRP gekoppelt	WB: 1 : 10 000	Dako
Ziege Anti-Maus	HRP gekoppelt	WB: 1 : 10 000	Dako
Hase Anti-Ratte	HRP gekoppelt	WB: 1 : 10 000	Dako

2.9 Programme

AxioVision Version: AxioVs40 4.8.2.0 SP3	Zeiss, Jena, DE
Biomedical-PowerPoint-Toolkit-Suite	Motifolio Inc., MD, USA
Fusion FX Software	Vilber Lourmat, MArne-la-Valée cedex, FR
ImageJ	Wayne Rasband (NIH)
Microsoft Office Word für Mac 2011 Version: 14.2.2 (120421)	Microsoft, Redmond, WA, USA
Microsoft Office PowerPoint für Mac 2011 Version: 14.2.2 (120421)	Microsoft, Redmond, WA, USA
Microsoft Office Excel für Mac 2011 Version: 14.2.2 (120421)	Microsoft, Redmond, WA, USA
SigmaPlot Version: 13.0	Systat Software GmbH, Wuppertal, DE
LabChart Reader 8 Version: v8.1.1 13.10.2015	ADInstruments GmbH, Sydney, AUS

3 Methoden

Die Versuche wurden im Zeitraum von 2013 bis 2017 am Institut für Schlaganfall- und Demenzforschung (ISD) der Ludwig-Maximilians-Universität München in der Arbeitsgruppe für experimentelle Schlaganfallforschung unter der Leitung von Prof. Dr. med. Nikolaus Plesnila und der Betreuung von Dr. med. vet. Manuela Schneider durchgeführt. Die Tierexperimente erfolgten mit der Genehmigung der Regierung von Oberbayern in Übereinstimmung den geltenden Tierschutzbestimmungen (Modell-Erlernung unter Gz. 55.2-1-54-2532.3-31-13 und Durchführung der Experimente unter Gz. 55.2-1-54-2532-154-12).

3.1 Allgemeine Maßnahmen

Die Versuchstiere wurden den Versuchsgruppen randomisiert zugeordnet. Alle Experimente sowie die neurologische Untersuchung der Tiere und die abschließende Auswertung aller erhobenen Versuchsdaten erfolgten verblindet.

3.2 Versuchstiere und Tierhaltung

Für die Standardisierungen wurden 7 Wochen alte männliche C57BL/6 Mäuse (Charles River, Sulzfeld, DE) operiert. Die in dieser Arbeit verwendeten astrozytenspezifischen und neuronenspezifischen Gpx4-Knockout-Mauslinien (Gpx4^{AstKO} bzw. Gpx4^{NeuKO}) wurden von Dr. rer. nat. Marcus Conrad etabliert (83).

Tabelle 5. Übersicht über die Bedingungen der Mäusehaltung.

Raumtemperatur	21 (\pm 3)°C
Luftfeuchtigkeit	55 (\pm 10)%
Tag-Nacht-Rhythmus (Licht)	12 h / 12 h
Nahrung	Standarddiät Ssniff GmbH, Soest, DE (ad libitum)
Tränke	Wasser teilentmineralisiert, filtriert (ad libitum)
Grundfläche pro Maus im Käfig	\leq 20 g Körpergewicht: Mindestens 60 cm ² > 20 g Körpergewicht: Mindestens 70 cm ²

Wie einleitend beschrieben, soll die *Gpx4* zellspezifisch in den Neuronen bzw. Astrozyten der Versuchstiere ausgeknockt werden. Zudem soll der Knock-out (KO) zu einem beliebigen Zeitpunkt auslösbar sein. Um einen solchen zellspezifischen und induzierbaren Gen-KO zu erhalten, wurde eine konditionale KO-Strategie unter Verwendung des sog. Cre/loxP-System gewählt. Hierbei wird das entsprechende Gen bzw. funktionell wichtige Genabschnitte (hier *Gpx4*) mit sog. loxP-Stellen (locus of crossingover of P1 phage) markiert. Diese loxP-Stellen flankieren das *Gpx4*-Gen im gesamten Genom der Maus. Man spricht hier auch von einem geflochten Gen (98). Diese Markierungen in der DNS dienen als Erkennungsstellen für das Enzym Cre-Rekombinase. Die Cre-Rekombinase schneidet nun den durch die loxP-Stellen definierten Genabschnitt der *Gpx4* aus dem Genom heraus und verursacht so den KO (98, 99). Zur Generierung von zellspezifischen KO-Mauslinien wird die Expression der Rekombinase durch Promotoren spezifisch für die jeweiligen Zielzellen kontrolliert. So wird die Cre-Rekombinase für den astrozytenspezifischen KO unter der Kontrolle der GLAST-Promotorregion (astrozytenspezifischer Glutamattransporter) exprimiert (100, 101). Analog dazu unterliegt die Expression der Cre-Rekombinase für den neuronalen KO der CaMKII-Promotorregion (Ca²⁺/Calmodulin-abhängige Protein-Kinase II) (102-104). Die genannten Promotorregionen sind nur zellspezifisch zur Transkription zugänglich, wodurch die Cre-Rekombinase nur in entsprechenden Zellarten (Neuronen bzw. Astrozyten) exprimiert wird und nur dort den KO auslöst. Um den KO zu einem definierten Zeitpunkt auszulösen, wurden u. a. mit Tamoxifen induzierbare Cre-Systeme entwickelt. Hierbei wird die synthetisierte Cre-Rekombinase zunächst im Zytoplasma an das Hitzeschockprotein 90 (HSP 90) und modifizierte Estrogen-Rezeptoren (ERT2) gebunden, wodurch deren Translokation in den Zellkern verhindert wird (84, 98-100, 105, 106). Erst durch die Gabe von Tamoxifen, einem Estrogenanalogon, wird die Cre-Rekombinase aus ihrer Bindung verdrängt, kann in den Zellkern translozieren und an definierter Stelle die *Gpx4* ausknocken (98-100, 106). In der vorliegenden Studie wurde das Tamoxifen zur KO-Induktion allen Tieren in der 4. Lebenswoche intraperitoneal (i. p.) verabreicht. Die Gesamtdosis pro Tier betrug bei den *Gpx4*^{Ast^{WT} und KO}-Tieren 2000 µg (100), bei den *Gpx4*^{Neu^{WT/KO}} 6000 µg (104). Diese wurde auf vier Injektionen zu je 500 µg bzw. 1500 µg Tamoxifen verteilt. Die Injektionen erfolgten jeweils im Abstand von 24 h (100, 104).

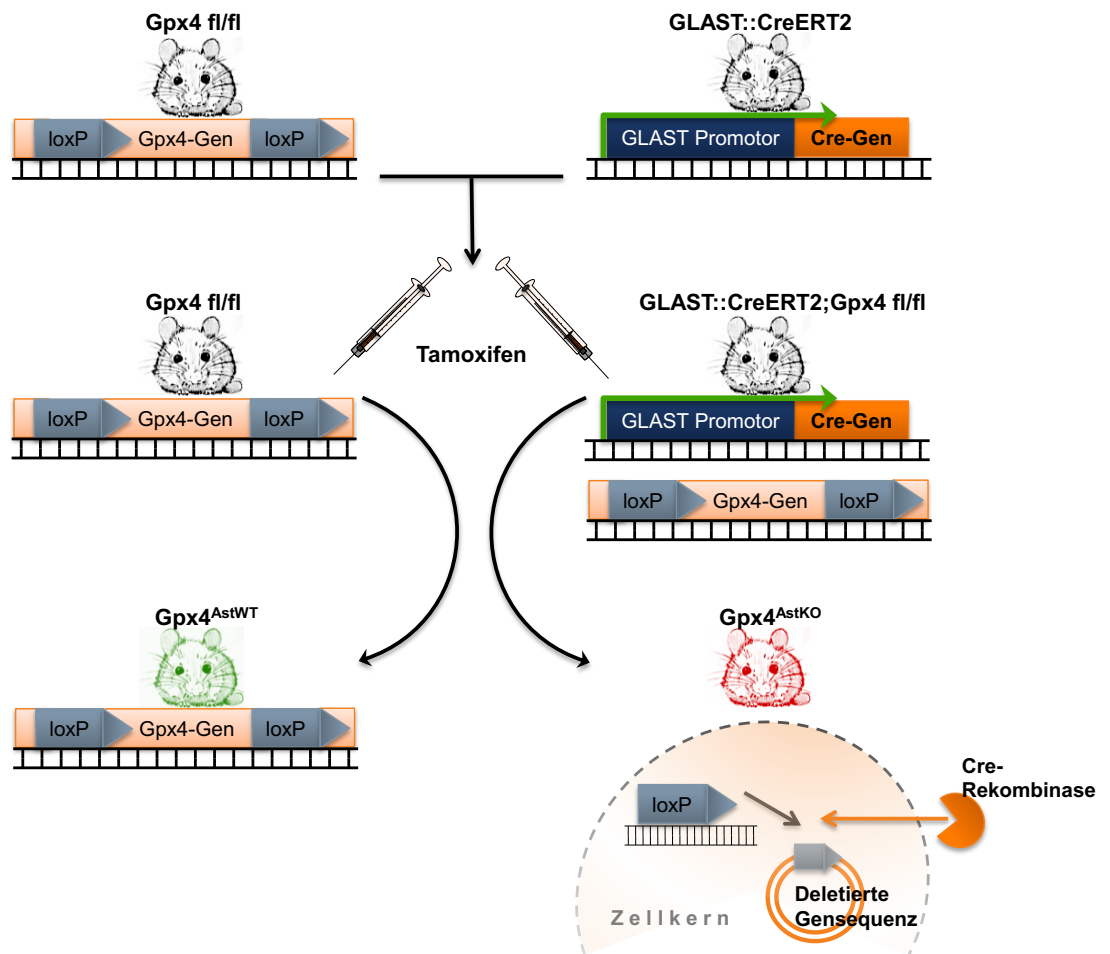


Abbildung 5: Das Cre/loxP-System - Generierung der zellspezifischen *Gpx4* KO Mauslinien am Beispiel der astrozytenspezifischen *Gpx4*-KO-Linie. Zur Generierung dieser Mauslinie wurden Cre-Rekombinase-transgene Tiere (Genotyp: *GLAST::CreERT2*) mit Mäusen verpaart, deren *Gpx4*-Gen gefloxt war (Genotyp: *Gpx4 fl/fl*) (107). Dadurch erhielt man Cre-Rekombinase-transgen positive Tiere mit geflochtenen *Gpx4*-Allelen (Genotyp: *GLAST::CreERT2; Gpx4 fl/fl*). Die Wildtyp-Kontrollgruppe (*WT*) bildeten die Cre-Rekombinase negative Wurfgeschwister (*Gpx4 fl/fl*). Diese wurden bei allen Versuchsreihen mit induziert. Nach der KO-Induktion mit Tamoxifen erhielt man die zellspezifischen KO (*Gpx4^{AstKO}*)- bzw. WT-Tiere (*Gpx4^{AstWT}*).

Die Generierung der neuronenspezifischen KO-Mauslinie (*Gpx4^{NeuKO}*) und der entsprechenden WT-Kontrollen (*Gpx4^{NeuWT}*) erfolgte analog unter Verwendung der neuronenspezifischen Cre-Rekombinase (Genotyp: *CamkII2α::CreERT2*).

3.3 Genotypisierung der Mauslinien

Die Genotypisierung erfolgte mittels Polymerase Chain Reaction (PCR). Bei allen Versuchstieren wurden die Zuchtnummern vor der Genotypisierung randomisiert und die zugehörigen Gewebeproben neu nummeriert. So wurde die Verblindung durch die Genotypisierung im Vorfeld nicht gefährdet. Um Verwechslungen auszuschließen, wurden alle Tiere nach Abschluss der Versuche erneut genotypisiert (re-genotypisiert). Die präoperative Genotypisierung (vor den Versuchen) erfolgte aus Schwanzgewebe. Für die postope-

rative Re-Genotypisierung nach Versuchsende wurde Kleinhirngewebe verwendet. Da es sich um einen zellspezifischen KO in den Astrozyten bzw. Neuronen handelt, zeigt lediglich Hirngewebe die entsprechenden KO-Banden nach der Induktion mit Tamoxifen (s. Abb. unten).

PCR-Protokoll

Zur Genotypisierung wurde je ein ca. 0,2 mm langes Schwanzspitzchen (präoperativ) bzw. ein etwa gleich großes Stück Kleinhirngewebe (postoperativ) mit 500 µl Lyse-Puffer und 7,5 µl Proteinase K im Thermomixer bei 55°C für mind. 12 h lysiert. Die lysierten Gewebeproben wurden anschließend mit je 500 µl Phenol-Chlorophorm-Lösung vermengt und sorgsam geschwenkt. Im nächsten Schritt wurden die Proben 10 min bei Raumtemperatur (RT) mit 14 000 g zentrifugiert. Im Anschluss daran wurden 200 µl der oberen wässrigen Phase abpipettiert und in die 2,5-fache Menge Ethanol-Salz-Mix (500 µl 100% EtOH + 15 µl 5 M NaCl) überführt. Die Proben wurden erneut gut gemischt und bei 4°C mit 15 000 g für 10 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen. Das DNS-Pellet wurde zweimal mit 70% EtOH p. a. gewaschen, luftgetrocknet und in je 50 µl TE-Puffer gelöst. Die Proben wurden bei 4°C gelagert oder weiterverarbeitet.

PCR-Bedingungen

Für die PCR wurde je 1 - 1,5 µl DNS mit 25,1 - 27,6 µl Standard-Reaktionsansatz vermengt. Der Standard-Reaktionsansatz wurde anhand der Herstellerangaben wie folgt zusammengesetzt:

- 14 µl ddH₂O
- 5 µl dNTP-Mix (1mM)
- 2,5 µl 10 X PCR-Puffer (ohne MgCl₂)
- 1,5 µl Primer 1 (5 µM)
- 1,5 µl Primer 2 (5 µM)
- 1,5 µl Primer 3 (5 µM)
- 1,5 µl MgCl₂ (50 mM)
- 0,1 µl Taq-Polymerase (5 U/µl)

Die Röhrcchen mit dem fertigen Reaktionsansatz wurden in einen Thermocycler gegeben, anschließend wurde ein Programm zur Amplifikation der DNS-Abschnitte gestartet. Die Gensequenzen von Interesse wurden vervielfältigt und anschließend mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und ausgewertet (s. unten).

Tabelle 6. DNS-Amplifikationsprogramm für den Thermocycler.

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Initiale Denaturierung	94°C	5 Minuten	1
Denaturierung	94°C	30 Sekunden	40
Primer-Annealing	55 – 65,5°C (je nach Primer)	30 Sekunden	
Elongation	72°C	50 Sekunden	
Finale Elongation	72°C	7 Minuten	1
Lagerung	4°C	Bis zur Entnahme	

Gel-Elektrophorese

Für die Gel-Elektrophorese wurden je 15 µl der amplifizierten DNS auf ein frisches 1,5%iges Agarose-Gel (150 ml TAE-Puffer, 2 g Agarose, 5 µl Cybersafe®) aufgetragen. Zusätzlich wurden zur Größenbestimmung der amplifizierten DNS-Abschnitte 3 µl eines 50 Basenpaar (bp) großen DNS-Größenstandards sowie eine Negativkontrolle (ddH₂O) und eine Positivkontrolle aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte lichtgeschützt bei einer Spannung von 100 V über einen Zeitraum von 90 Minuten. Anschließend wurden die Gele mit Hilfe des Detektionssystem Fusion FX7 digital aufgenommen, dokumentiert und ausgewertet.

3.3.1 Auswertung der Gel-Elektrophorese

Wie unter 3.2 beschrieben, müssen die astrozytären KO-Tiere für die Cre-Rekombinase transgen positiv und für Gpx4 gefloxed sein (Genotyp: GLAST::CreERT2;Gpx4 fl/fl), die Kontroll-Tiere müssen Cre-transgen negativ und Gpx4 gefloxed (Gpx4 fl/fl) sein. Zur Identifizierung von transgenen Cre-Mäusen wurden die Primer GLAST F8, GLAST R3 und CER1 verwendet (s. **Tabelle 2**). Liegt eine Cre-negative Maus vor, wird ein PCR-Produkt von 700 bp durch die Primer GLAST F8 und GLAST R3 amplifiziert. Ist die Maus Cre-transgen, erhält man eine Bande bei 400 bp (s. Abb. unten). Diese entsteht durch das DNS-Amplifikat der Primer GLAST F8 und CER 1. Analog dazu wurden für die neuronalen Versuchstiere die Primer CreER1, CreER2 und CreER3 verwendet (s. **Tabelle 2**).

Wie unter 3.3 beschrieben, wurde die Genotypisierung präoperativ aus Schwanzgewebe und postoperativ aus Hirngewebe durchgeführt. Zur präoperativen Identifizierung gefloxter Gpx4 Allele wurden die Primer OligoPFfor1 und OligoPFrev1 verwendet. Bei unverändertem Gpx4-Gen wird ein DNS-Amplifikat von 180 bp („Wildtypbande“, wt) generiert. Wurde das Gpx4-Gen erfolgreich auf beiden Allelen gefloxed, verlängert sich das Amplifikat u. a. durch die loxP-Stellen; in der Gel-Elektrophorese ist dann für die homozygoten geflochten (fl/fl) Tiere eine 240 bp große Bande zu sehen. Entsprechend zeigen heterozygote (fl/wt) Tiere zwei Banden, eine bei 180 bp (wt) und eine bei 240 bp (fl).

Für die postoperative Re-Genotypisierung aus Hirngewebe wird zusätzlich ein anderer Vorwärtsprimer verwendet (OligoPHGPxI5f1), um eine erfolgreiche Gpx4-Deletion nach KO-Induktion nachzuweisen.

Dieser Primer bindet am fünften Intron der Gpx4-Sequenz und bildet deswegen ein entsprechend längeres Amplifikat von 500 bp (KO-Bande).

Hirnproben von WT-Tieren zeigen Banden von ca. 1000 bp, da hier das gesamte Gpx4-Gen vorhanden ist und entsprechend amplifiziert wird. Bei KO-Tieren kann dagegen nach erfolgreicher Rekombination ein entsprechend kürzeres DNS-Amplifikat (500 bp) detektiert werden (s. Abb. unten).

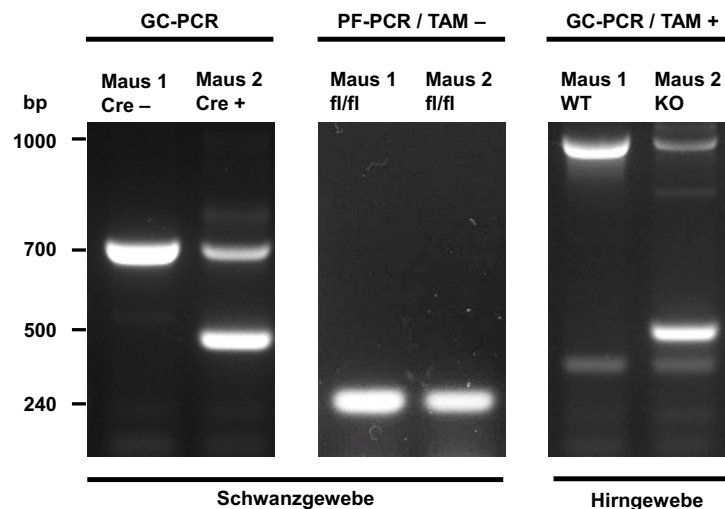


Abbildung 6: Exemplarische Gel-Elektrophorese anhand von astrozytären Versuchstieren. Mit „Maus 1“ ist eine Wildtypmaus bezeichnet, mit „Maus 2“ die spätere KO-Maus. Zunächst wird präoperativ aus Schwanzgewebe das Vorhandensein der Cre-Rekombinase überprüft. Maus 1 zeigt als WT eine Bande bei 700 bp und ist somit Cre negativ (Cre -). Maus 2 zeigt zusätzlich eine Bande bei 500 bp und ist somit Cre positiv (Cre +). Für die Versuche wurden ausschließlich in beiden Allelen gefloxt Tiere verwendet, andernfalls könnte über das nicht-gefloxt Allel noch Gpx4 synthetisiert werden. Entsprechend zeigen also Maus 1 und 2 eine Bande von 240 bp (fl/fl). Nachdem die Tiere mit Tamoxifen induziert und operiert worden sind, erfolgt die postoperative Re-Genotypisierung aus Hirngewebe. Maus 1 zeigt erwartungsgemäß eine WT-Bande bei ca. 1000 bp, während Maus 2 die KO-Bande bei 500 bp zeigt. Die schwächere Bande von ca. 1000 bp bei der KO-Maus stammt von den anderen Zellen des Hirns (z. B. Neuronen), die im Rahmen des zellspezifischen KO (hier nur astrozytärer Gpx4-KO) ihre vollständige Gpx4 haben.

3.4 Transiente fokale zerebrale Ischämie (fMCAO)

Zur Induktion eines ischämischen Schlaganfalls verwendeten wir das in unserer Arbeitsgruppe etablierte Filamentmodell: Dabei wird mittels eines intraluminalen Fadens die A. cerebri media okkludiert. Die Abkürzung fMCAO steht für filament middle cerebral artery occlusion.

3.4.1 Perioperatives Management

Das perioperative Management umfasst die Vorbereitung der Tiere unmittelbar vor dem Eingriff sowie die intraoperative Überwachung der Vitalparameter. Vor jeder Versuchsrunde erfolgte eine gründliche Flächendesinfektion des OP-Bereichs mit Desinfektionstüchern. Das Körpergewicht (KG) der Tiere wurde unmittelbar vor der OP sowie vor der Präparation bestimmt und dokumentiert. Das Operationsbesteck wurde vor jedem neuen Eingriff mit 70%igem Ethanol gereinigt. Alle während der OP ermittelten Parameter (Puls, regionale zerebrale Durchblutung (rCBF), OP-Dauer, neurologische Befunde etc.) wurden auf einem separaten Operationsprotokoll bzw. digital dokumentiert.

3.4.1.1 Analgesie und Anästhesie

Zur Analgesie wurden den Mäusen 30 min präoperativ 0,1 mg Carprofen subkutan (s.c.) und 50 mg Metamizol oral (p.o.) verabreicht. Zur Narkoseeinleitung wurden die Mäuse in einer Acryl-Box für 90 sec. mit einem Gasgemisch (4% Isofluran + 95% Raumluft) narkotisiert. Die Narkose wurde anschließend mit 2% Isofluran, 29% Sauerstoff und 69% Lachgas aufrechterhalten.

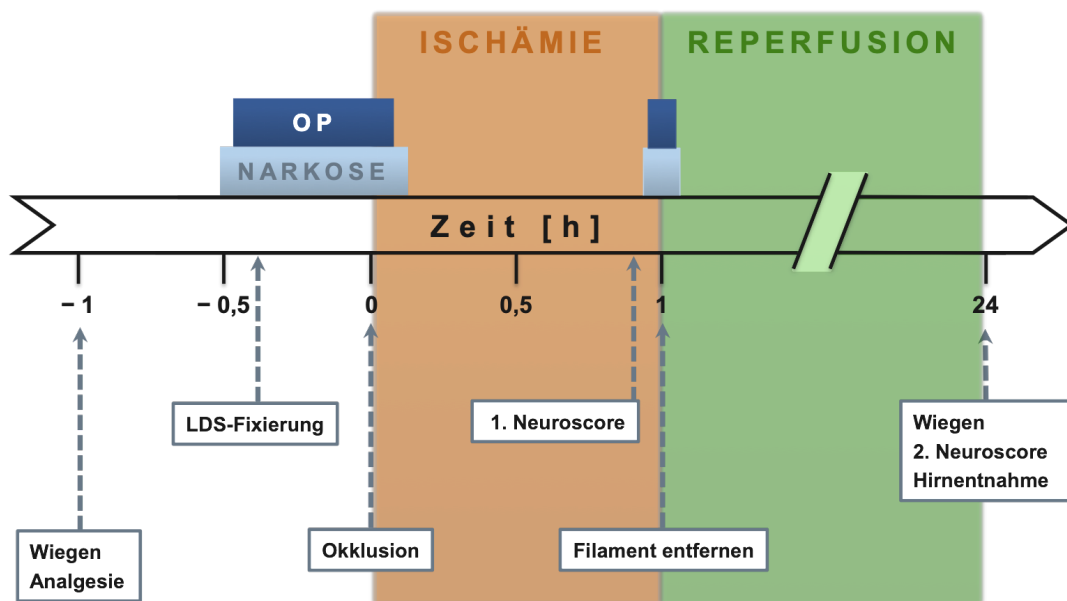


Abbildung 7: Zeitlicher Ablauf der fMCAO. Die Abbildung stellt den Ablauf der fMCAO samt der perioperativen Phase und dem Vorgehen nach dem Ende der Reperusionszeit dar. In der Zeit von $t = -1$ h bis $t = +1$ h ist der Ablauf der fMCAO für alle Versuchsgruppen dieser Arbeit gleich (weiße und orange Fläche). Die Dauer der Reperusionszeit (grüne Fläche) wurde für die Gruppen zur Bestimmung der Gpx4 Protein-Level („Western Blot (WB)-Gruppen“) zum Teil kürzer gewählt (s. 3.6.2). **LDS** = Laser-Doppler-Sonde.

3.4.1.2 Körpertemperatur

Mäuse kühlen unter Narkose rasch aus (108). Um dem vorzubeugen, wurden die Tiere während der OP auf einer Heizmatte gelagert. Diese war auf die Soll-Temperatur 37,5°C eingestellt und mit einer rektalen Temperatursonde rückgekoppelt: Wurde rektal eine Temperatur < 37,5°C gemessen, wärmte sich die Matte automatisch entsprechend auf. Nach der Operation ist die Temperaturregulation der Tiere weiterhin beeinträchtigt (108). Um dem Sorge zu tragen, wurden die Mäuse während der Ischämie- und Reperfusionszeit in beheizten Wärmeboxen gehalten (s. 3.4.3).

3.4.1.3 Puls und Sauerstoffsättigung

Während der OP wurden die Herzfrequenz (HF) und die Sauerstoffsättigung (SpO₂) der Tiere kontinuierlich gemessen. Die Sonde des Pulsoxymeters wurde hierfür an der Hinterpfote der Maus angebracht. Das Pulsoxymeter stand nicht für jede Versuchsreihe zur Verfügung, deswegen sind HF und SpO₂ nicht bei jeder Versuchsgruppe aufgezeichnet worden. Zur Auswertung wurden die HF-Werte an fünf definierten Zeitpunkten notiert und daraus die mittlere HF während der OP ermittelt. Die fünf Zeitpunkte waren wie folgt definiert:

- HF direkt nach Anlegen des Pulsoxymeters
- HF nach 5 min Narkosedauer
- HF nach Fixierung der LDS und Positionierung der Maus in Rückenlage
- HF nach Ligatur der A. carotis communis (ACC)
- HF nach Okklusion der A. cerebri media (ACM)

3.4.1.4 Zerebrale Durchblutung (rCBF)

Zur Bestätigung der korrekten Okklusion der ACM diente der schlagartige Abfall des rCBF über dem Versorgungsgebiet der ACM bei Filamentinsertion (109). Der rCBF wurde mittels einer Laser-Doppler-Fluxmetrieinheit temporal gemessen (110, 111). Hierzu wurde zu Beginn der OP über der Infarkthemisphäre (stets links) der M. temporalis dorsalseitig scharf von der Schädelkalotte abgetrennt und sorgfältig abpräpariert, bis die Bifurkation bzw. Äste der ACM unter dem Schädelknochen sichtbar wurden. Anschließend wurde an die entsprechende Stelle am Schädel eine Glasfasersonde mit Cyanoacrylatkleber angebracht und mit der LDS verbunden. Der dann angezeigte und stabile rCBF-Wert wurde als Baseline-Wert verwendet. Als intraoperative Kontrolle der korrekten Filament-Platzierung galt ein schlagartiger und dauerhafter rCBF Abfall um $\geq 80\%$ des rCBF-Baseline-Wertes (109, 112).

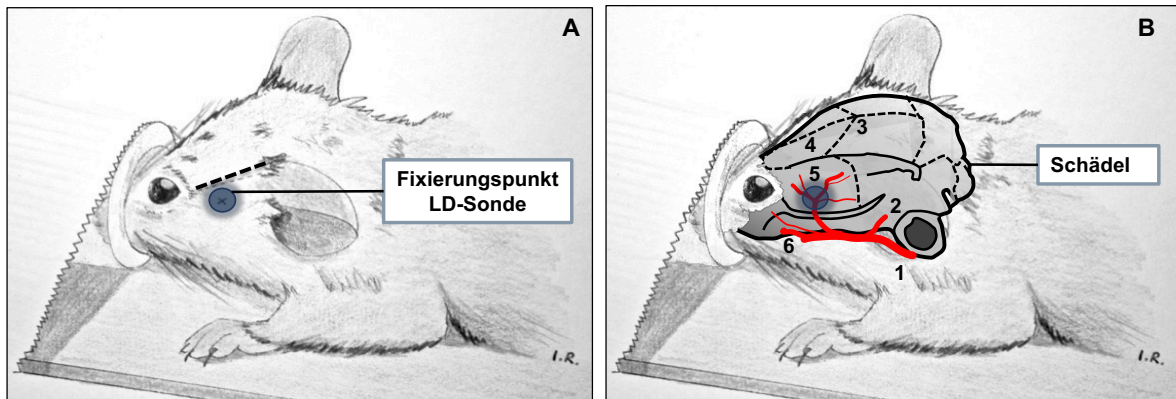


Abbildung 8: Befestigung der Laser-Doppler-Sonde (LDS). Zu sehen ist eine anästhesierte Maus (Schnauze in Beatmungsmaske liegend). A) zeigt den Verlauf des Hautschnitts zwischen lateralem Augenwinkel und vorderem Ohrmuschelansatz der Maus (gestrichelte Linie). Unter diesem Areal findet sich der dorsale Ansatzpunkt des *M. temporalis*. B) zeigt die Schädel- und Gefäßprojektion. Wichtige anatomische Leitstrukturen sind: 1 = *A. carotis interna*, 2 = *A. cerebri posterior*, 3 = Bregma, 4 = *Os frontale*, 5 = *A. cerebri media* (Bifurkation), 6 = *A. cerebri anterior*. Der blaue Punkt in beiden Abbildungen markiert die Projektion der Bifurkation der ACM, dem optimalen Fixierungspunkt der LDS.

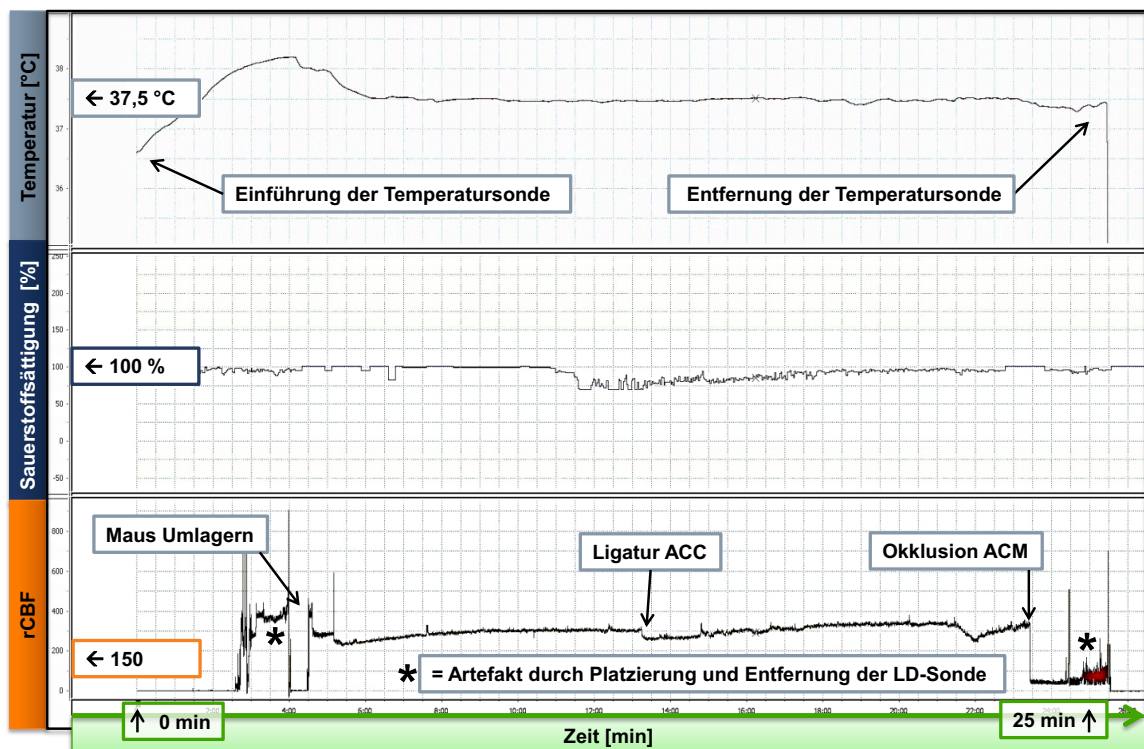


Abbildung 9: Intraoperatives Monitoring (Screenshot). Intraoperativ wurden die Vitalparameter der Tiere und die OP-Zeit konstant aufgezeichnet und dokumentiert. Der Screenshot zeigt das Monitoring eines kompletten OP-Verlaufs: Zum Zeitpunkt $t = 0$ min wird die anästhesierte und analgisierte Maus auf dem OP-Platz gelagert (s. grüne Linie unten). Zum Zeitpunkt $t = 24$ min wird die LDS entfernt und die Maus in eine Wärmebox gebracht (s. 3.4.3). Die Körpertemperatur sowie die SpO_2 bleiben konstant. Die typischen Veränderungen des rCBF-Werts während der OP, beispielsweise der signifikante Abfall des Wertes bei Gefäßokklusion, sind in der Abbildung entsprechend beschriftet.

3.4.2 Chirurgische Präparation und Okklusion der Arteria cerebri media

Nach der korrekten Befestigung der LDS wird die anästhesierte Maus in Rückenlage gebracht. Die anschließende Okklusion der ACM erfolgte intraluminal mittels eines Filaments (s. 3.4.2.1). Alle Eingriffe wurden an einem eigens für die fMCAO ausgestatteten OP-Platz durchgeführt (s. Abb. unten).

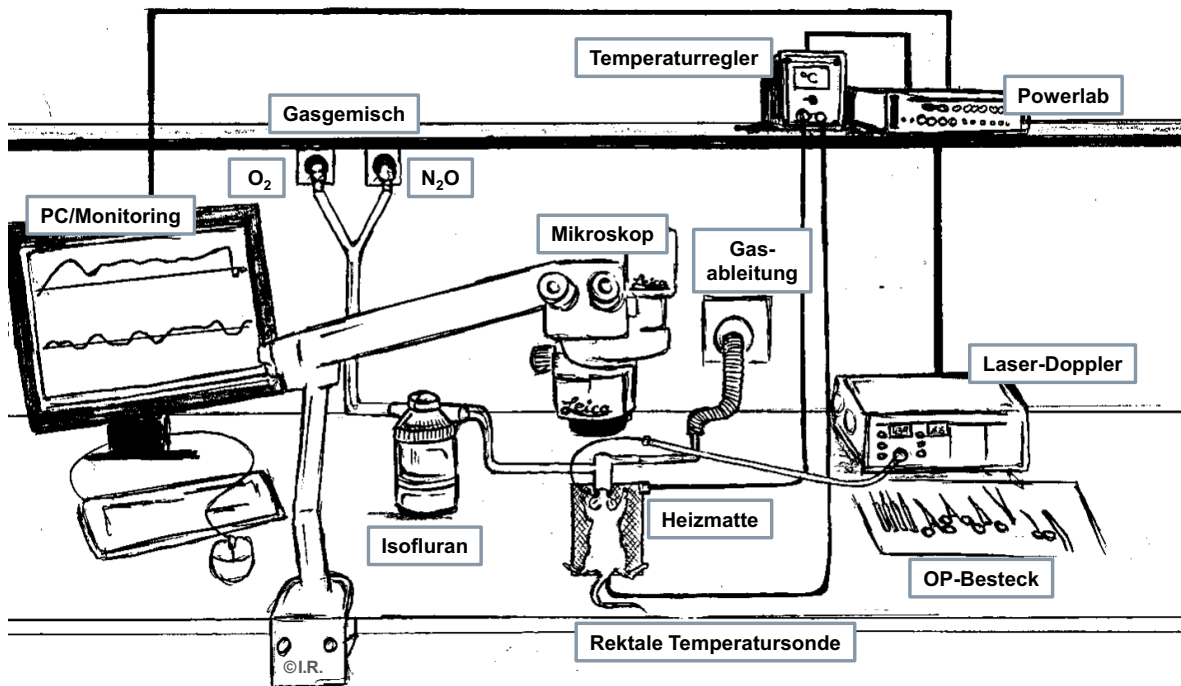


Abbildung 10: Versuchsaufbau fMCAO. Schematische Darstellung des für die fMCAO ausgestatteten OP-Platzes.

Die Mäuse wurden, wie unter 3.4.1.1 beschrieben, analgesiert und anästhesiert. Die Augen wurden mit Bepanthen® Augensalbe vor Austrocknung geschützt. Der Zugang erfolgte über einen vertikalen Hautschnitt vom Mandubrium sterni aus ca. 1 cm nach kranial. Nach stumpfer Trennung der anatomischen Schichten (Fett- und Drüsengewebe (Gll. submandibulares) wurde die oberflächliche und mittlere Halsfaszie durchtrennt. Mit Hilfe eines kleinen OP-Häkchens konnte störendes Fett- und Drüsengewebe lateralisiert werden. Nach sorgfältiger Präparation zeigte sich der Operationssitus: Das Trigonum colli mediale (s. Abb. unten).

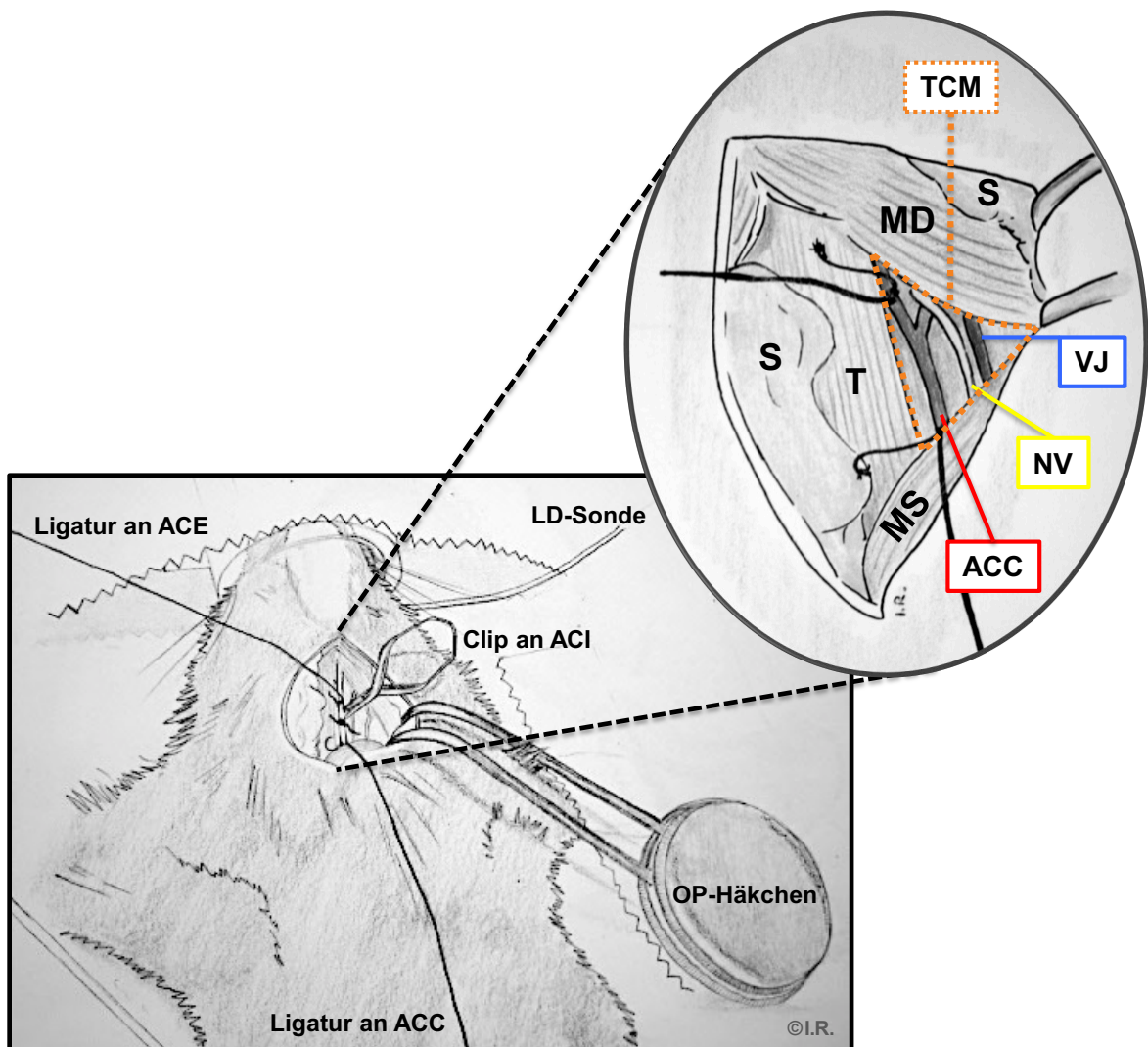


Abbildung 11: Operationssitus mit Trigonum colli mediale (TCM). Die Abbildung zeigt eine anästhesierte Maus in Rückenlage (Schnauze in Beatmungsмаске liegend). In der Vergrößerung ist der Operationssitus zu sehen. Das TCM ist durch die Trachea (T), den Vorderrand des M. sternocleidomastoideus (MS) und den M. digastricus (MD) begrenzt. Die schematisch dargestellten Muskelfasern über der Trachea, entsprechen dem M. sternohyoideus und M. omohyoideus. Die im Bereich des Trigonums liegenden Strukturen wie Speicheldrüsen (S), A. carotis communis (ACC), V. jugularis (VJ), N. vagus (NV) und N. phrenicus (nicht abgebildet) wurden zur Schonung vor dem nächsten OP-Schritt allesamt dargestellt und identifiziert.

Anschließend wurde die Bifurkation der ACC in der Tiefe dargestellt. Im nächsten Schritt wurden die ACC weitestgehend distal und die A. carotis externa (ACE) möglichst proximal ihrer jeweiligen Abgänge mit einem geflochtenen 5/0 Seidenfaden ligiert. Ein kurzes 5/0 Seidenfadenstück wurde um das distale Drittel der ACC geschlungen und ein Knoten zur späteren Fixierung des Filaments vorgelegt. Im Anschluss daran wurde die A. carotis interna (ACI) mit einem Gefäßclip abgeklemmt. Um Blutungen zu vermeiden, wurde der Gefäßclip stets proximal des Abgangs der A. pterygopalatina (AP) gesetzt (s Abb. unten). Jetzt konnte – unter Blutstille – die ACC mittels einer kleinen Inzision eröffnet werden und das Okklusions-Filament über die ACC bis in das Gefäßlumen der ACI zum Clip vorge-schoben werden. Der vorgelegte Knoten fixierte dabei proximal der Inzision das Filament. Dadurch konnte ein unnötiger Blutverlust beim Öffnen des Clips verhindert werden. Nach

dem Öffnen des Clips wurde das Okklusions-Filament bis in die ACM vorgeschoben und der an der ACC vorgelegte Knoten festgezogen, um das Okklusionsfilament während der Ischämiezeit an der richtigen Position zu halten. Der suffiziente Verschluss der ACM galt als bewiesen, wenn der rCBF Wert nach Einführen des Filaments abrupt um $\geq 80\%$ des rCBF-Baseline-Wertes abfiel (109, 112). Anschließend wurde die Haut mit einer Einzelknopfnahmt verschlossen und die Maus in eine Wärmebox gesetzt (s. 3.4.3). Nach Ablauf von 55 min wurden die Tiere neurologisch untersucht (s. 3.4.4) und erneut, wie oben beschrieben, anästhesiert. Nach 60 min wurde das Filament entfernt und die Ischämie beendet. Die offene Stelle der ACC wurde mit dem Fixierfaden distal verschlossen. Die Hautnaht erfolgte mit Einzelknopfnähten. Mäuse, die den WB-Analysen im Rahmen der Gpx4 Proteinkonzentrationsbestimmung zur Kontrollgruppe der scheinoperierten Tiere gehörten, wurden unter selbigen Bedingungen operiert, jedoch wurde das Filament nicht bis in die ACM vorgeschoben (s. 3.5).

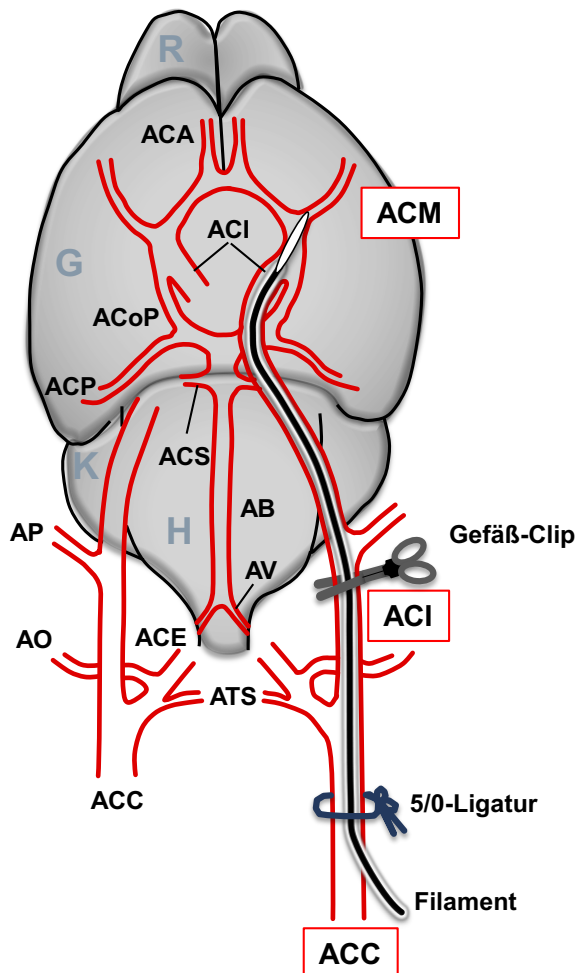


Abbildung 12: Schematische Darstellung der Hirngefäßanatomie. Ansicht von basal: Die grauen Lettern bezeichnen die Hirnteile: **R** = Riechhirn, **G** = Großhirn, **K** = Kleinhirn, **H** = Hirnstamm. Die schwarzen Lettern die Gefäße: **ACA** = A. cerebri anterior, **ACI** = A. carotis interna (re. im Bild mit Filament), **ACoP** = A. communicans posterior, **ACP** = A. cerebri posterior, **ACS** = A. cerebelli superior, **AB** = A. basilaris, **AV** = A. vertebralis, **AP** = A. pterygopalatina, **AO** = A. occipitalis, **ATS** = A. thyroidea superior, **ACE** = A. carotis externa, **ACC** = A. carotis communis.

3.4.2.1 Exkurs: Filamente zur Okklusion der A. cerebri media

Die Filamente, die für die Okklusion der ACM verwendet worden sind, wurden in unserem Institut von den Operateuren nach einem etablierten Verfahren selbst hergestellt (113). Hierzu teilte man einen monofilen 8/0 Faden in 12 mm lange Stücke. Die Fadenstücke wurden anschließend zu $\frac{2}{3}$ in Silikon-Abformmaterial getaucht und getrocknet. Während der Anfertigung der Doktorarbeit wurde unsere Arbeitsgruppe auf kommerziell erhältliche fMCAO Filamente der Firma Doccol aufmerksam. Diese hatten zur Erhöhung der Reproduzierbarkeit eine exakt 2 ($\pm 0,2$) mm lange Silikonspitze. Daraufhin entschlossen wir uns ebenfalls nur die ersten 2 mm unserer „selfmade“ Filamente mit Silikon zu umhüllen. Die Haltbarkeit und Handhabung und somit der Kosten-/Zeitnutzen der kommerziell erwerblichen Filamente waren besser als die der selbsthergestellten kurzbeschichteten Filamente. Deswegen wurden die Doccol Filamente für alle in dieser Arbeit durchgeführten Versuchsreihen – außer für die Standardisierung – verwendet. Zum Vergleich der Filamente s. Abbildung unten.



Abbildung 13: Mikroskopische Aufnahme der fMCAO-Filamente.
A) Zu $\frac{2}{3}$ umhülltes Filament aus eigener Herstellung. **B)** 2 mm umhülltes Filament aus eigener Herstellung. **C)** 2 mm Filament der Firma Doccol. Die Maßstableiste entspricht 1 mm.

3.4.3 Versorgung der Tiere während der Ischämie- und Reperfusionzeit

Während der Ischämiezeit, als auch während der Reperfusionzeit ist die Regulation der Körpertemperatur beeinträchtigt (108). Deswegen verbrachten die Tiere die Ischämiezeit in einer Wärmebox bei 35°C. Für die Reperfusionzeit wurden die Tiere wieder in ihre gewohnten Käfige zu ihren gewohnten Käfiggenossen gesetzt. Der Käfig wurde dann für die gesamte Reperfusionzeit in einen Wärme-Haltungsschrank bei 28°C gestellt. Um den Tieren den Zugang zu Futter und Wasser zu erleichtern, wurden Futter-Pellets auf dem Käfigboden verteilt. Zusätzlich wurden kleine Schalen mit Wasser und aufgeweichten Futter-Pellets auf dem Boden platziert. Bei einer Reperfusionzeit von 24 h erhielten die Tiere am nächsten Morgen weitere 0,1 mg Carprofen s.c. zur Analgesie. Nach dem Ende der Reperfusionzeit wurden die Tiere neurologisch untersucht (s. unten) und in tiefer Isofluran-Anästhesie durch zervikale Dislokation schmerzfrei getötet. Anschließend wurde das Gehirn entnommen und auf Trockeneis schockgefroren.

3.4.4 Neurologische Untersuchung

Die neurologischen Befunde der Tiere wurden zu zwei Zeitpunkten erfasst: Die erste Untersuchung erfolgte noch während der Ischämie kurz vor der Filament-Entfernung. Eine weitere neurologische Untersuchung erfolgte am Ende der Beobachtungszeit nach 24 Stunden. Zur Evaluation der neurologischen Befunde verwendeten wir einen modifizierten Neuroscore nach Bederson (114). Während der Durchführung der neurologischen Untersuchung wurde auf eine ruhige Umgebung geachtet.

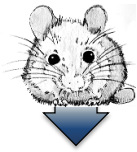
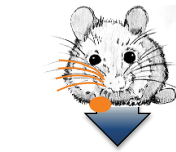
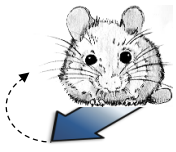
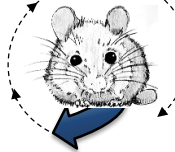

				
0 Punkte	1 Punkt	2 Punkte	3 Punkte	4 Punkte
<ul style="list-style-type: none"> • Unauffälliges Verhalten 	<ul style="list-style-type: none"> • Paretische kontralaterale Vorderpfote 	<ul style="list-style-type: none"> • Kreiseln 	<ul style="list-style-type: none"> • Starkes Kreiseln/ Rollen auf den Rücken • Verlust des Standreflexes 	<ul style="list-style-type: none"> • Keine/kaum Spontanbewegung

Abbildung 14: Modifizierter Neuroscore nach Bederson. Die neurologischen Befunde wurden in fünf Schweregrade unterteilt (0 – 4 Punkte). Dabei stehen 0 Punkte für ein neurologisch unauffälliges Verhalten. 1 Punkt entspricht dem Bild einer paretischen kontralateralen Vorderpfote und/oder einer beeinträchtigten Schnurrhaarsensibilität (keine Kopfdrehung bei Berührung der Schnurrhaare). Ein Neuroscore von 2 Punkten wird durch das Kreiseln der Maus definiert. Bei 3 Punkten hat die Maus ihren Standreflex verloren, kreiselt sehr stark bzw. rollt sich auf den Rücken. 4 Punkte wurden bei deutlich reduziertem Zustand, beispielsweise bei keiner Spontanbewegung, vergeben. Die Vergabe von halben Punkten war möglich.

3.4.5 Gefrierschnitte, Nissl-Färbung und Infarktvolumetrie

Nach der Hirnentnahme wurden die Gehirne auf Trockeneis schockgefroren und anschließend bei – 20°C bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt. Sowohl für die Infarktgrößenbestimmung als auch für die Immunfluoreszenz (IF) wurden Gefrierschnitte genutzt. Hierfür wurden die Gehirne in TissueTek® eingebettet und im Kryostaten geschnitten. Insgesamt wurden pro Gehirn 12 Schnitte à 10 µm im Abstand von 750 µm auf einen Objektträger aufgenommen. Die Anzahl der Schnitte pro Gehirn wurde bei der Berechnung des Infarktvolumens berücksichtigt (s. Formel unten).

Zur Kresylviolett-Färbung nach Nissl wurden die Objektträger kurz in 70% Ethanol gegeben, anschließend in die Färbelösung getaucht, kurz gewaschen und in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und fixiert (genaues Färbeprotokoll s. Tab. unten). Die gefärbten Schnitte wurden in Roti-Histokitt® Eindeckmedium eingedeckelt und über Nacht getrocknet.

Tabelle 7. Protokoll der Kresylviolett-Färbung nach Nissl.

Schritt	Lösung	Dauer
1	70% Ethanol	2 min
2	Kresylviolett (fertige Lösung)	15 min
3	ddH ₂ O	Kurz eintauchen / spülen
4	ddH ₂ O	Kurz eintauchen / spülen
5	70% Ethanol	Kurz eintauchen / spülen
6	96% Ethanol	Kurz eintauchen / spülen
7	99% Ethanol	Kurz eintauchen / spülen
8	100% Isopropanolol	2 min
9	Xylol	5 min
10	Xylol	5 min

Nach abgeschlossener Kresylviolett-Färbung, Versiegelung und Aushärtung erfolgte die Infarktflächen-Messung pro Schnitt. Die Schnitte wurden unter dem Mikroskop fotografiert und mit Hilfe der Axiovision Software vermessen (Infarktfläche, Hemisphärenfläche ipsilateral und kontralateral). Die Infarktgröße konnte dann näherungsweise mit folgender Formel berechnet werden:

$$V_I [mm^3] = (A_1 + A_2 + A_3 + \dots + A_n) \times 0,75$$

V_I = Infarktvolumen, A = Infarktfläche auf einem Schnitt, n = Anzahl der Schnitte

Für die Immunfluoreszenz (s. 3.4.6) wurden nach dem 4., 6. und 8. Schnitt je drei 10 μ m dünne Serienschnitte auf gesonderte Objektträger aufgenommen. Die Objektträger für die IF befanden sich während des Schneidens stets innerhalb des Kryostaten bei -20°C bzw. wurden im Gefrierschrank bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

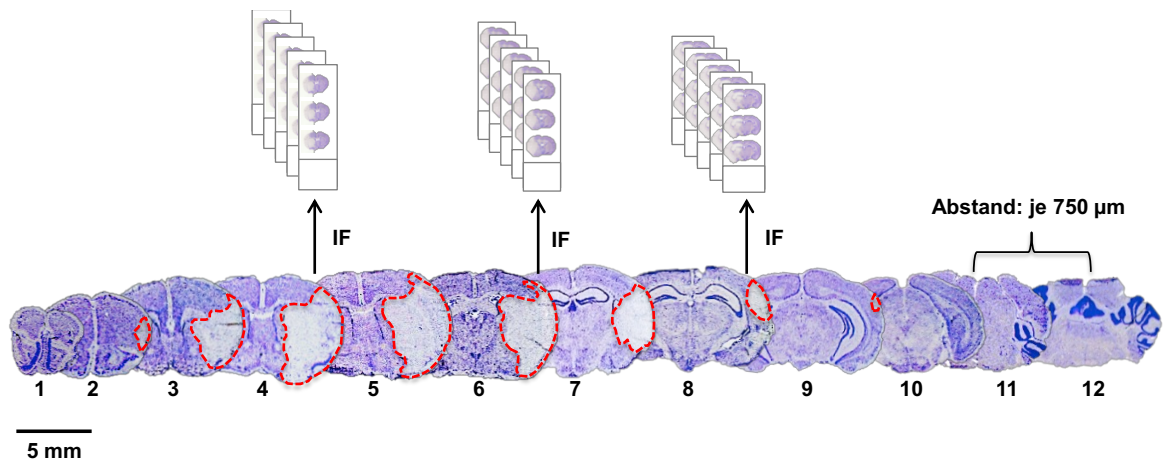


Abbildung 15: Gefrierschnitte für Infarktmetrie und IF. Exemplarische Schnitte eines Gehirns nach fMCAO. Der Infarkt ist durch die Erbleichung auf den einzelnen Schnitten erkennbar und hier zur Verdeutlichung rot umrandet. Die 12 Ebenen (1-12) werden für die Infarktmetrie verwendet. Für die IF werden nach den Ebenen 4, 6 und 8 zusätzliche Objektträger mit Serienschnitten angefertigt (s. Pfeile in Abb.). Die Maßstabsleiste entspricht 5 mm.

3.4.6 Doppelfärbungen: Immunfluoreszenz und TUNEL-Färbung

Zum Nachweis einer für Apoptose typischen DNA Fragmentierung wurde an zusätzlich angefertigten Gefrierschnitten eine TUNEL-Färbung durchgeführt (115).

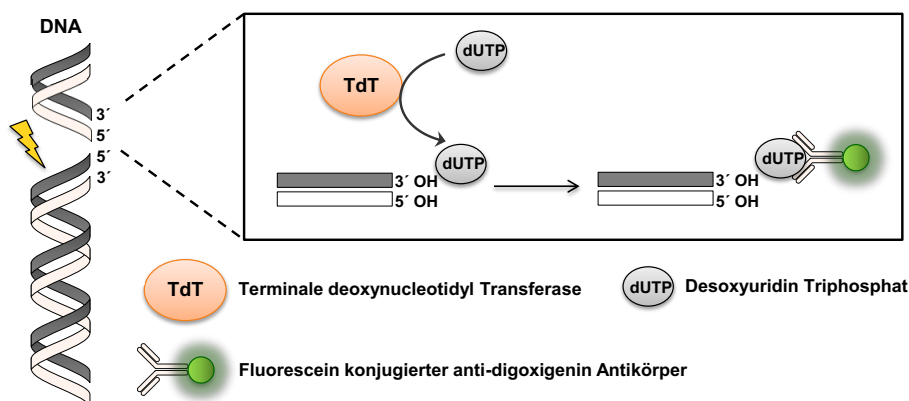


Abbildung 16: Schematische Darstellung der TUNEL-Färbung. Die DNS-Fragmentierung wird nachgewiesen, indem die Terminale-deoxynucleotidyl-Transferase (TdT) an die fragmentierten und deshalb frei liegenden 3-OH-Enden der DNS-Fragmente Desoxyuridin-Triphosphat (dUTP) anlagert (115). Hieran bindet der Fluorescein konjugierte Anti-Digoxigenin Antikörper, welcher zur Detektion grün fluoresziert.

Zur Identifikation der TUNEL-positiven Zellen wurden Doppelfärbungen durchgeführt. Zur Färbung der Zellkörper von Neuronen wurde das Neuron Specific Nuclear Protein (NeuN) genutzt. Analog dazu wurde für die Astrozyten Glial Fibrillary Acid Protein (GFAP) verwendet. Mikroglia wurde mit Ionized Calcium Binding Adaptor Molecule 1 (Iba1) gefärbt. Bei der Mikrogliafärbung wurde nicht mit TUNEL, sondern mit Microtubule Associated Protein 2 (Map2) gegengefärbt. Map2 ist eine Neuronenfärbung und wurde hier zur In-

farktmarkierung anstelle der TUNEL-Färbung verwendet, um eine Kreuz-Reaktion der AK zu vermeiden. Für genauere Angaben zu den verwendeten primären AK s. **Tabelle 3**.

Da die TUNEL-Färbung grün fluoreszierte, wurde ein Cy3-gekoppelter sekundärer AK (rot) für die Doppelfärbungen verwendet. In der Bildfusion der Doppelfärbungen (grüne TUNEL-Färbung und rote NeuN-/GFAP-Färbung) erschienen doppeltpositive Zellen gelb. Für genauere Angaben zu den verwendeten sekundärer AK s. **Tabelle 4**.

3.4.6.1 Durchführung der Doppelfärbungen

Protokoll der Grundfärbung für Neuronen, Astrozyten bzw. Mikroglia

Auf jedem Objektträger befanden sich 3 Schnitte: Zwei vollständig gefärbte Schnitte zur Analyse sowie eine Negativkontrolle (nur sekundärer AK), um Artefakte durch unspezifische Bindungen der sekundären AK ausschließen zu können. Die Objektträger wurden bei Raumtemperatur (RT) aufgetaut, in PBS rehydriert und anschließend in 4% PFA für 15 min postfixiert. Nach der Fixierung wurden die Objektträger in PBS gewaschen (3 x 2 min) und 10 min bei RT im Blocking-Puffer (PBS, 5% BSA, 0,1% Tween20) geblockt. Nach einem weiteren Waschgang wurde jeder einzelne Schnitt mit einem DakoPen® Fettstift umrandet und anschließend über Nacht bei 4°C mit dem jeweiligen primärem AK inkubiert. Die Kontrollschnitte wurden nur mit Blocking-Puffer versehen. Im nächsten Schritt wurden die Objektträger in PBS gewaschen (3 x 2 min) und für 1 h bei RT mit dem Cy3-gekoppelten sekundärem AK inkubiert. Ab hier wurden die Objektträger stets vor Licht geschützt.

Protokoll der TUNEL-Färbung

Nach abgeschlossener Zellfärbung konnte mit der TUNEL-Färbung begonnen werden. Dazu verwendeten wir das ApopTag® Detection Kit von Millipore (s. 2.7) gemäß den Herstellerangaben. Für die TUNEL-Färbung wurde der sekundäre AK mittels PBS von den Schnitten gewaschen (3 x 2 min). Anschließend wurden die Schnitte kurz (mind. 10 sec.) mit Equilibration Buffer und gleich danach mit dem TdT Enzyme-Mix (30% TdT-Enzym, 70% Reaction Buffer) für 1 h bei 37°C inkubiert. Auf die Negativkontrollen wurde lediglich Reaction Buffer pipettiert. Danach wurden die Objektträger mit Stop/Wasch Buffer bei RT für 10 min inkubiert und kurz in PBS gewaschen. Der Anti-Digoxigenin-Fluorescein Antibody-Mix (Fluorescein-konjugierter Anti-Digoxigenin-AK: 47% AK, 63% „Blocking Solution“) wurde für 30 min bei RT auf die Schnitte gegeben. Danach wurden die Objektträger in PBS gewaschen (4 x 2 min). Im letzten Schritt wurden die Objektträger für 5 min mit DAPI gegengefärbt. Die DAPI Färbung färbt alle Zellkerne an und diente beim Mikroskopieren der Übersichtlichkeit und zur besseren Orientierung. Zuletzt wurden die Schnitte erneut kurz in PBS gewaschen und in ProLong® Eindeckelmedium eingedeckelt und über Nacht bei RT ausgehärtet. Zur Auswertung der IF wurde folgendes Schema etabliert:

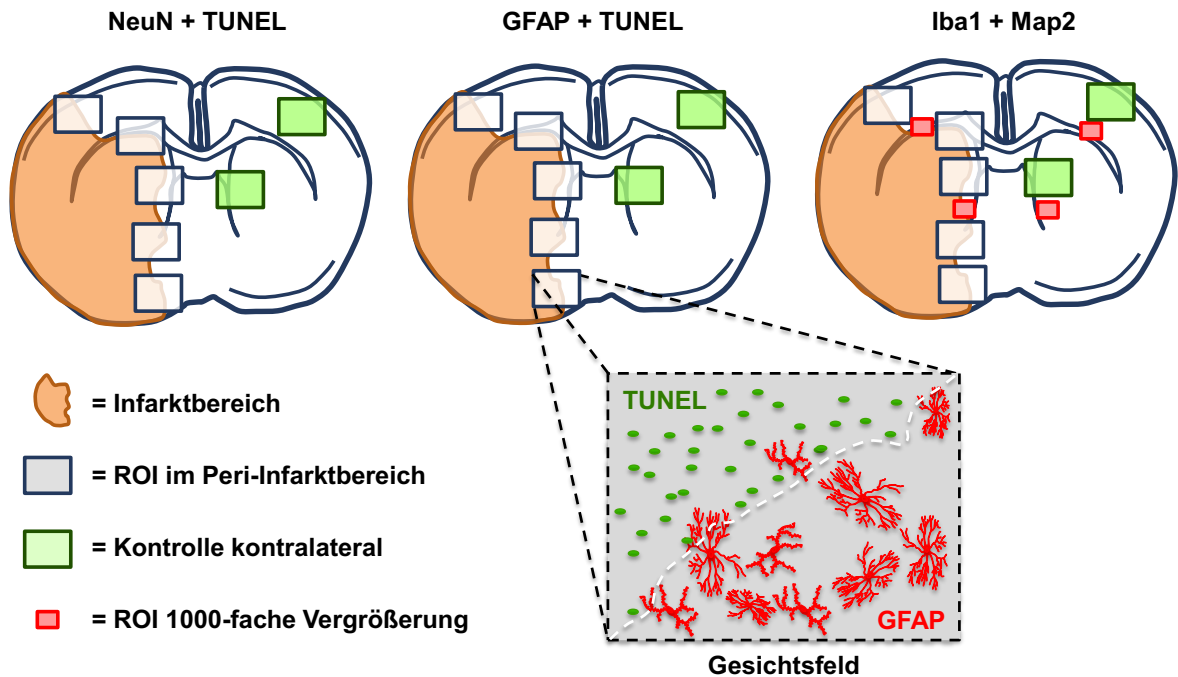


Abbildung 17: Schematische Darstellung der Immunfluoreszenz-Auswertung. Es sind drei Hirnschnitte für die drei Doppelfärbungen (NeuN/Cy3 + TUNEL, GFAP/Cy3 + TUNEL und Iba1/Alexa488 + Map2/Cy3) abgebildet. Der Infarkt ist orange dargestellt. Für alle Doppelfärbungen gilt: Fünf Auswertebereiche (regions of interest = ROI) entlang des Peri-Infarktgebietes wurden ausgewählt (blaue Kästchen). Die ROIs wurden gleichmäßig über die gesamte Länge des Peri-Infarktgebietes verteilt. Zur Kontrolle wurden auf der kontralateralen Hemisphäre zwei Regionen untersucht (grüne Kästchen). Diese wurden so gewählt, dass je ein Bereich aus dem kortikalen und einer aus dem striatalen Auswertebereich der ipsilateralen Seite auf die kontralaterale Seite gespiegelt worden war. Der zu analysierende Bildbereich wurde so eingestellt, dass die Infarktgrenze das Gesichtsfeld halbierte (s. weiße Linie i. d. Gesichtsfeldarstellung). Bei der Doppelfärbung für Iba1 + Map2 wurden zusätzlich je Hemisphäre zwei Auswertebereiche in 1000-facher Vergrößerung angefertigt (rote Kästchen). Diese dienten der genaueren Begutachtung der Morphologie der Mikroglia.

Am Ende der Analyse aller Objektträger einer Doppelfärbung wurde der erste Objektträger ein zweites Mal analysiert, um eventuelle anfängliche Abweichungen auszuschließen. Die jeweiligen Belichtungszeiten für die kontralateralen Kontrollen und die ipsilateralen Auswertungsbereiche wurden gleich gehalten.

3.5 Proteinanalyse

3.5.1 Gewebegewinnung zur Bestimmung der Gpx4 Expression nach Ischämie

Zur Untersuchung der Gpx4 Expression nach unterschiedlichen Reperfusionzeiten analysierten wir definierte Bereiche ischämischer Gehirne mittels Western Blot (WB). Für die Expressionsstudie wurden C57BL/6 Mäuse wie unter 3.4 beschrieben operiert und präpariert. Die Gehirne wurden entnommen und für die WB-Analyse mit Hilfe einer Maus-

Hirnmatrix noch vor dem Einfrieren in standardisierte Stücke aufgeteilt (s. Abb. unten). Hierfür wurde unmittelbar vor der Hirnentnahme mit einer spitzen Sonde die Höhe des Bregmas im darunterliegenden Hirngewebe markiert. Das entnommene Gehirn wurde anschließend auf einer Hirnmatrix platziert. So konnte eine genau definierte Hirnscheibe von 2 mm dorsal des Bregmas entnommen werden. Der Schnitt wurde mit einem Skalpell in drei Teile geteilt. Die kontralaterale Hemisphäre wurde als Kontrolle verwendet. Ipsilateral wurde das Gehirn in „Infarkt-Kern“ und „Penumbra“ unterteilt. Für den „Infarkt-Kern“ wurde Gewebe im Bereich des Striatums, v. a. Caudatum, Putamen und piriformer Kortex, entnommen; Bereiche die bereits während der Ischämie absterben (12, 14, 109, 116). Der Bereich der „Penumbra“ bestand aus Gewebe des Neokortex. Es wurde dabei stets darauf geachtet, dass die Versorgungsgebiete der A. cerebri anterior et posterior entfernt worden sind und so nicht in die Analysen einfließen. Ebenso wurde auf die absolute Gleichbehandlung aller Gehirne geachtet (s. Abb. unten). Das Gewebe für die WB-Analysen wurde schockgefroren und bei -80°C bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt. Jedes Gel wurde mit Gewebelysaten aus Maushoden (Positivkontrolle), Größenmarkern, Gehirnen von unbehandelten Mäusen, Gehirnen von scheinoperierten Mäusen und Gehirnen von Mäusen, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach einer fokalen zerebralen Ischämie getötet wurden (3, 6 und 24 h), beladen.

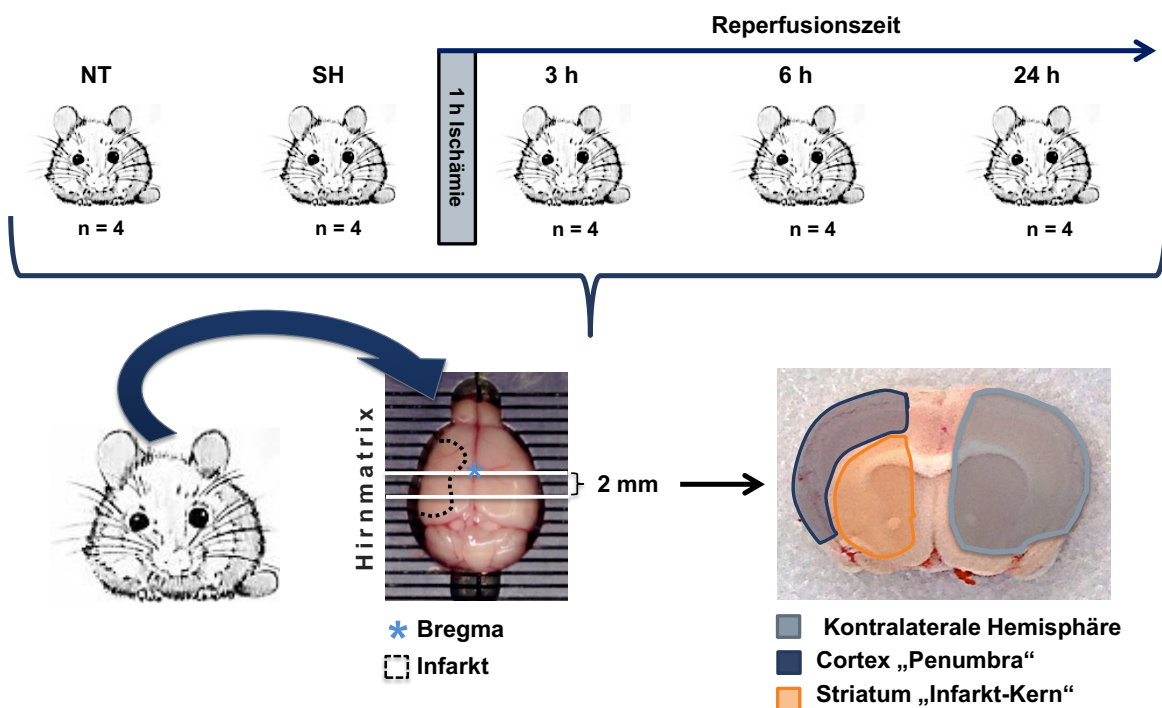


Abbildung 18: Schematische Darstellung der WB-Versuchsgruppen und Gewebegewinnung zur Proteinanalyse. Jede Versuchsgruppe bestand aus je vier C57BL/6 Mäusen. Eine Gruppe nicht operierter Tiere (Non-Treated = NT), eine Gruppe Scheinoperierter (SH) sowie operierte Tiere, die sich in ihrer Reperfusionszeit (3h, 6h bzw. 24h) unterschieden. Die Gehirne wurden entnommen und mittels Hirnmatrix ist eine definierte Ebene (2 mm post Bregma) in die zu analysierenden Bereiche unterteilt worden.

3.5.2 Aufbereitung der Proteine

Alle im Folgenden beschriebenen Schritte erfolgten bei 4°C. In 500 µl LCW-Lyse-Puffer (s. 2.6) wurden 50 mg Gewebe gelöst. Es wurde jeweils 50 mg Gewebe in 500 µl LCW-Lyse-Puffer aufgenommen mit Hilfe einer 5 mm großen Metallkugel in einem 2 ml Eppendorf-Röhrchen für drei Minuten bei 50 Hz in einem gekühlten Tissue-Lyser® (Quiagen) homogenisiert. Die so homogenisierten Proben ruhten fünf Minuten auf Eis. Anschließend wurden die Proben in 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen überführt und bei 4°C mit 13 000 g für 30 min zentrifugiert. Zuletzt wurde der Proteinüberstand in neue Röhrchen pipettiert und bei – 80°C aufbewahrt oder direkt weiterverarbeitet.

3.5.3 Proteinquantifizierung

Die Proteinquantifizierung erfolgte mittels kommerziellem BCA-Assay (Thermo Scientific) gemäß den Herstellerangaben. Hierfür wurde zunächst eine Protein-Standardkurve mittels einer BSA-Verdünnungsreihe (0 mg/ml – 2000 mg/ml) erstellt. Die BSA- und Proteinproben wurden in entsprechender Verdünnung für 30 min bei 37°C mit den BCA-Reagenzien (Thermo Scientific) inkubiert. Anschließend wurde die optische Dichte der Proben in einem Spektrophotometer (s. 2.1) bei 560 nm gemessen. Die Proteinkonzentration wurde mittels linearer Regression berechnet.

Fiel bei der Quantifizierung das Gütemaß der linearen Regression $R^2 < 0,96$ aus, wurde der BCA-Assay neu angesetzt und wiederholt, sodass stets die exakte Menge Protein pro Probe berechnet wurde. Für jede Proteinquantifizierung wurde eine neue Standardkurve erstellt.

3.5.4 Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Proteine wurden ihrer Größe nach in einem elektrischen Feld mittels SDS-PAGE in einem kontinuierlich gradierten kommerziell erhältlichen Polyacrylamid-Gel (8-16%) aufgetrennt. In jede Geltasche wurde ein definiertes Volumen (25 µl) mit gleicher Proteinmenge (25 µg) pipettiert. Hierfür musste die entsprechend berechnete (s. oben) Menge Lämmli-Puffer (reduzierend, 5 X) zur entsprechenden Menge Protein gegeben werden. Anschließend wurden die Proben bei 95°C für 5 min hitzedenaturiert. Zur Größenbestimmung der Banden wurden stets 5 µl eines Protein-Größenstandards aufgetragen. Als Positivkontrolle für die Gpx4-Bande diente eine Gewebeprobe aus Hoden, einem besonders Gpx4-reichen Gewebe (55, 65, 72). Die Elektrophorese-Kammer wurde mit Running-Puffer (1 X) gefüllt und eine konstante Spannung (100 V) angeschlossen.

3.5.5 Western Blot

Nach der SDS-PAGE mussten die Proteine aus dem Gel auf eine PVDF-Membran übertragen werden. Hierfür wurde die Technik des Nasstransfers verwendet. Die angelegte Spannung betrug 100 V. Das Blotten dauerte 1 h und wurde bei 4°C durchgeführt.

Nach dem Blotten haben wir die PVDF-Membran mittels PonceauS-Lösung für 5 min angefärbt, um die Qualität des Proteintransfers zu überprüfen. Das Gel wurde zeitgleich für 2 h mit Coomassie-Blau gefärbt. Beide Färbegergebnisse (Membran und Gel) wurden gescannt und dokumentiert. Um unspezifische AK-Bindungsstellen zu minimieren, wurde die Membran anschließend für 1 h im Blocking-Puffer bei RT auf dem Wippschüttler inkubiert. Im nächsten Schritt wurde die Membran unter konstanter Bewegung mit dem primären AK (verdünnt in Blocking-Puffer, 1:1000) 1 h bei RT inkubiert. Um überschüssigen AK zu entfernen, folgten drei Waschschrte, je 10 min in 1X TBST. Nachfolgend wurde die Membran im sekundären AK für 1 h bei RT inkubiert und abschließend, wie oben beschrieben, gewaschen. Die Auswertung der Membran erfolgte mittels Chemilumineszenz-Signal, dafür wurde die Membran mit einer Detektionslösung (Millipore) gemäß den Herstellerangaben behandelt. Das Chemiluminiszenzsignal wurde digital sichtbar gemacht und dokumentiert. Wurde dieselbe Membran für einen weiteren WB verwendet, wurde sie 10 min in Stripping-Puffer inkubiert, gewaschen und erneut im Blocking-Puffer geblockt.

3.6 Experimentelles Design und Versuchsgruppen

Für einen kurzen Überblick werden im Folgenden alle Versuchsgruppen mit Zielsetzung knapp zusammengefasst und tabellarisch dargestellt.

3.6.1 fMCAO Standardisierung

Zur Erlernung der fMCAO wurden mehrere Standardisierungen durchgeführt. Dies diente sowohl der stabil reproduzierbaren Erlernung des Modells, der Erlernung der sicheren Handhabung der Proben samt Aufbereitung (Hirnentnahme, Anfertigung von Gefrierschnitten und Färbungen) sowie der Überprüfung des Lernerfolges selbst. Die fMCAO galt als stabil reproduzierbar, wenn die Standardabweichung (SD = standard deviation) der Infarktgröße $\leq 20\%$ des Mittelwertes betrug. Zur genauen Beschreibung der Durchführung s. 3.4.

Tabelle 8. Experimentelles Design der fMCAO Standardisierungen. STD = Standardisierung

	1. Vor-STD	2. Vor-STD	3. Vor-STD	Finale STD
Mauslinie	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6
n	8	13	11	9
Versuche	fMCAO	fMCAO	fMCAO	fMCAO
Ziel	Methode der fMCAO stabil und reproduzierbar erlernen (SD $\leq 20\%$).			

3.6.2 Western Blot Analyse: Gpx4 Expression nach zerebraler Ischämie

Nach der Erlernung der fMCAO sollte die Gpx4 Expression nach Ischämie analysiert werden. Dies diente u. a. der Bestimmung der optimalen Reperfusionzeit in Bezug auf die mögliche Veränderung der Gpx4 Expression im Gehirn nach Ischämie.

Tabelle 9. Experimentelles Design der Gpx4 Expression nach Schlaganfall. NT = Non treated, SH = Scheinoperiert, Re(t) = Reperfusionzeit

	NT	SH	3 h Re(t)	6 h Re(t)	24 h Re(t)
Mauslinie	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6
n	4	4	4	4	4
Versuche	fMCAO und WB	fMCAO und WB	fMCAO und WB	fMCAO und WB	fMCAO und WB
Ziel	Gpx4 Expressionsanalyse nach zerebraler Ischämie.				

3.6.3 Infarktmetrie und Immunfluoreszenz: Gpx4^{AstWT} und Gpx4^{AstKO}

Um die Folgen des astrozytenspezifischen KO nach ischämischem Schlaganfall zu untersuchen, wurde den Tieren nach dem Absetzen in der 4. Lebenswoche, wie unter 3.2 beschrieben, Tamoxifen verabreicht. Zeitgleich wurden die Tiere genotypisiert und in KO und WT eingeteilt. Nach der letzten Tamoxifen-Gabe wurde drei Wochen abgewartet, um eine möglichst hohe Rekombinationsrate zu erreichen und das verabreichte Tamoxifen aus dem System zu bringen, um so mögliche Tamoxifen-Effekte auf die Versuche zu verhindern (117). Anschließend wurden die Tiere, wie oben beschrieben, randomisiert und verblindet, operiert und das Hirngewebe analysiert (s. Tab. unten). Um den Infarktbereich bei Gpx4^{AstWT} bzw. KO nicht nur makroskopisch zu untersuchen, sondern auch mikroskopisch einen Blick auf den Zelltod im Peri-Infarktbereich zu werfen und die Morphologie der Mikroglia und Astrozyten näher zu untersuchen, wurden bei sechs der oben genannten Tiere (n = 3 für Gpx4^{AstWT}, n = 3 für Gpx4^{AstKO}) zusätzlich Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen (TUNEL + NeuN/Cy3, TUNEL + GFAP/Cy3 bzw. Iba1/Alexa488 + Map2/Cy3) angefertigt und analysiert. Für eine detailliertere Beschreibung s. 3.4.5 und 3.4.6.

Tabelle 10. Experimentelles Design der Gpx4^{AstWT} bzw. KO Mäuse.

	Gpx4 ^{AstWT}	Gpx4 ^{AstKO}
n	14 bzw. 3	10 bzw. 3
Versuche	fMCAO und IF/TUNEL	fMCAO und IF/TUNEL
Ziel	Auswirkungen des astrozytären Gpx4-Verlustes auf Infarktgröße, Neuroscore und Zelltod im Peri-Infarktbereich.	

3.6.4 Vitamin-E Deprivation

In einer weiteren Versuchsreihe sollte zusätzlich zum astrozytären Gpx4-Verlust den Mäusen vier Wochen lang, zur Verstärkung des oxidativen Stresses, eine Vitamin-E Mangel diät vorgesetzt werden. Das Standardfutter enthielt einen Vitamin-E Gehalt von 50 mg/kg, das Vitamin-E Mangelfutter lediglich 7 mg/kg. Die Diät erhielten die Tiere direkt nach dem Absetzen. Näheres zur Interaktion von Gpx4 und Vitamin-E s. 1.5.2. Zusätzlich zu Gpx4^{AstWT} und Gpx4^{AstKO} Tieren wurden als Kontrollgruppe auch Vitamin-E-gemangelte C57BL/6 Tiere operiert. Anschließend wurden die Infarktgrößen sowie die neurologischen Befunde ausgewertet. Den synergistischen Effekt von Vitamin-E und Gpx4 konnten viele Forschungsgruppen nachweisen, zuletzt auch im Kontext endothelspezifischer Gpx4-KO Tiere (37). Angelehnt an das Protokoll dieser Publikation wurden Gpx4^{AstWT} und Gpx4^{AstKO}-Tiere nach dem Absetzen simultan mit der Tamoxifen-Gabe für vier Wochen auf eine Vitamin-E Mangel diät gesetzt und anschließend operiert. Zur Kontrolle sowie zur Untersuchung der Auswirkungen einer reinen Vitamin-E Mangel diät auf das Infarktvolumen wurden C57BL/6 Mäuse gleichen Alters für denselben Zeitraum Vitamin-E gemangelt und einer fMCAO unterzogen und mit einer entsprechenden Kontrollgruppe unter Standard diät verglichen.

Tabelle 11. Experimentelles Design Vitamin-E-Mangelfutter.

	C57BL/6	C57BL/6	Gpx4 ^{AstWT}	Gpx4 ^{AstKO}
n	12	8	11	13
Futter	Standardfutter	Vitamin-E-Mangelfutter		
Versuche	fMCAO	fMCAO	fMCAO	fMCAO
Ziel	Auswirkungen von Vitamin-E-Mangel als zusätzlicher Stressor zum astrozytären Gpx4-Verlust.			

3.6.5 Infarktvolumetrie Gpx4^{NeuWT} und Gpx4^{NeuKO} Tiere

Zur Untersuchung der Auswirkung eines neuronalen Gpx4-Verlustes wurden Gpx4^{NeuWT} und Gpx4^{NeuKO} Mäuse einer fMCAO unterzogen und die korrespondierenden Daten analysiert.

Tabelle 12. Experimentelles Design der Gpx4^{NeuWT/KO} Mäuse.

	Gpx4 ^{NeuWT}	Gpx4 ^{NeuKO}
n	21	19
Versuche	fMCAO TUNEL	fMCAO TUNEL
Ziel	Auswirkungen des neuronalen Gpx4-Verlustes auf Infarktgröße und Neuroscore.	

3.7 Statistische Analyse

Die statistische Analyse der Ergebnisse erfolgte mittels des Statistikprogramms SigmaPlot. Um zwei unverbundene Gruppen zu vergleichen, wurde der Wilcoxon-Rangsummen-Test (Mann-Whitney Rank Sum Test) bzw. Shapiro-Wilk Test genutzt. Beim Vergleich von verbundenen Daten wurde die statistische Analyse mittels des Wilcoxon-Vorzeichen-Rangsummen-Tests (Signed Rank Test) durchgeführt. Falls es nicht anders vermerkt ist, sind alle Ergebnisse in den Abbildungen als Mittelwert (MW) \pm Standardfehler vom Mittelwert (SEM) angegeben. Als statistisch signifikant galt ein p-Wert von $< 0,05$.

Tiere mit einer nicht regelhaften fMCAO wurden von der statistischen Analyse ausgeschlossen. Ausschlusskriterien waren wie folgt:

- Tiere, die vor Versuchsende verstarben.
- Tiere, bei denen der rCBF nicht um $\leq 80\%$ fiel und die zusätzlich in der Kresylviolet-Färbung nach Nissl keine kortikalen Infarkte zeigten.

4 Ergebnisse

4.1 Standardisierung

Die fMCAO ist ein aufwändiges mikrochirurgisches Schlaganfallmodell. Um die Rolle der Gpx4 in diesem Schlaganfallmodell valide untersuchen zu können, muss das Modell stabil reproduzierbar sein. Das gründliche Erlernen und Üben dieses Modells erfordert Zeit und ist unabdingbar, um in den folgenden Versuchen die Hauptfragestellung nicht durch Varianzen in der Modellausführung zu gefährden. Zu diesem Zweck wurden C57BL/6 Mäuse einer fMCAO unterzogen. Der Lernprozess wurde mittels Standardisierungen (Stand.) objektiviert. Die insgesamt vier Standardisierungen wurden, wie oben beschrieben, an 7 Wochen alten Mäusen durchgeführt.

4.1.1 Vorversuche

Die Vorversuche dienen dem Erlernen der OP-Technik. Wir haben uns entschlossen bereits von Anfang an die Daten der ersten operierten Tiere auszuwerten, um den gesamten Lernprozess zu dokumentieren. Die ersten drei Standardisierungen zeigen den Prozess des Erlernens der fMCAO, deswegen hier als „Vorversuche“ bezeichnet. Die Lernkurve ist anhand der kürzeren OP-Zeit pro Tier, des kleiner werdenden Infarktolumens sowie der sinkenden SD-Werte zu erkennen.

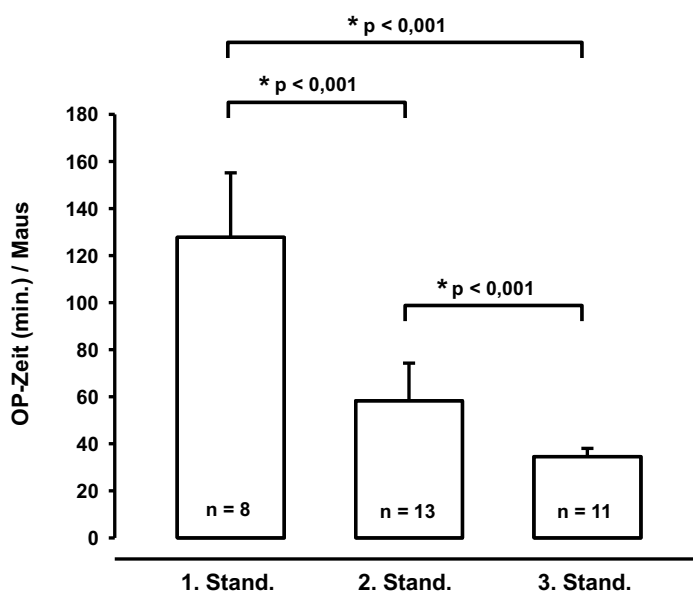


Abbildung 19: OP-Dauer der Vorversuche. In der 1. Standardisierung (1. Stand.) betrug die OP-Dauer im Durchschnitt 128 ± 27 min pro Tier. Die OP-Zeit der 2. Stand. lag bei $58 \text{ min} \pm 16 \text{ min}$ und die der 3. Stand. bereits nur noch bei $35 \pm 3 \text{ min}$. Die Verbesserung der OP-Zeiten sind jeweils signifikant ($p < 0,001$).

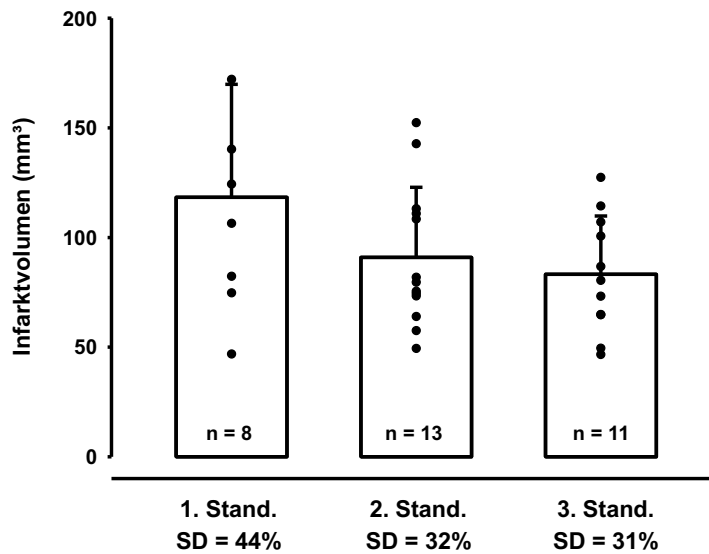


Abbildung 20: Infarkt volumina der Vorversuche. Das Infarkt volumen der 1. Stand. betrug $118 \pm 51 \text{ mm}^3$, das entspricht einem SD-Wert von 44%. In der 3. Stand. war die Infarktgröße bereits bei $83 \pm 27 \text{ mm}^3$, was einem SD-Wert von 31% entspricht.

4.1.2 Finale Standardisierung

Die 4. und finale Standardisierung wurde nach gründlicher Übung vorgenommen. Die Methode war nun stabil reproduzierbar, was an dem SD-Wert des Infarkt volumens von 17% zu erkennen ist. Deswegen werden im Folgenden die Daten der 4. Standardisierung nunciierter betrachtet. Die $n = 9$ Tiere hatten ein Startgewicht von 20,3 – 23,7 g. Der Gewichtsverlust nach 24 h Reperfusionzeit betrug im Schnitt 14% des Startgewichts. Nach korrekter Filamentplatzierung entsteht eine signifikante Hypoperfusion des Hirngewebes über dem Versorgungsgebiet der ACM. Diese Ischämie wird durch den rasch abfallenden rCBF-Wert um $\geq 80\%$ des Baselinewertes deutlich (111, 112).

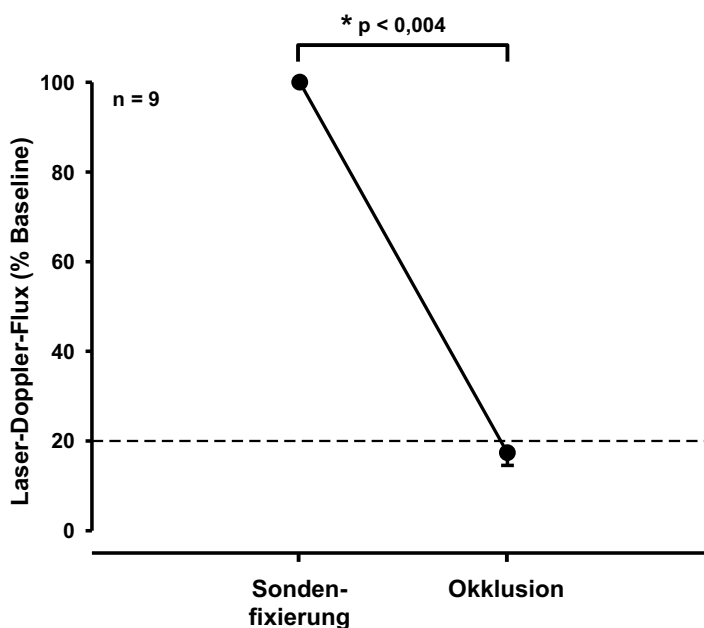


Abbildung 21: Laser-Doppler-Fluxmetrie.

Die rCBF-Werte der 4. Stand. fielen nach Gefäßokklusion auf $17\% \pm 2\%$ des Baseline-Wertes ab. Dies indizierte die korrekte Gefäßokklusion.

Wie in der Einleitung unter 1.2.3 beschrieben kann nach dem Einsetzen der Ischämie der Ionenkonzentrationsgradient nicht aufrecht erhalten werden. Es kommt zum Einstrom von Natrium und Kalzium in die Zelle und zum zytotoxischen Hirnödem. Diese Ödembildung ist auch makroskopisch anhand der ausgemessenen Hemisphärenvolumina nachzuvollziehen. Die ischämische Hemisphäre hatte im Vergleich zur kontralateralen Hemisphäre ein um 24% größeres Volumen (s. Abb. unten).

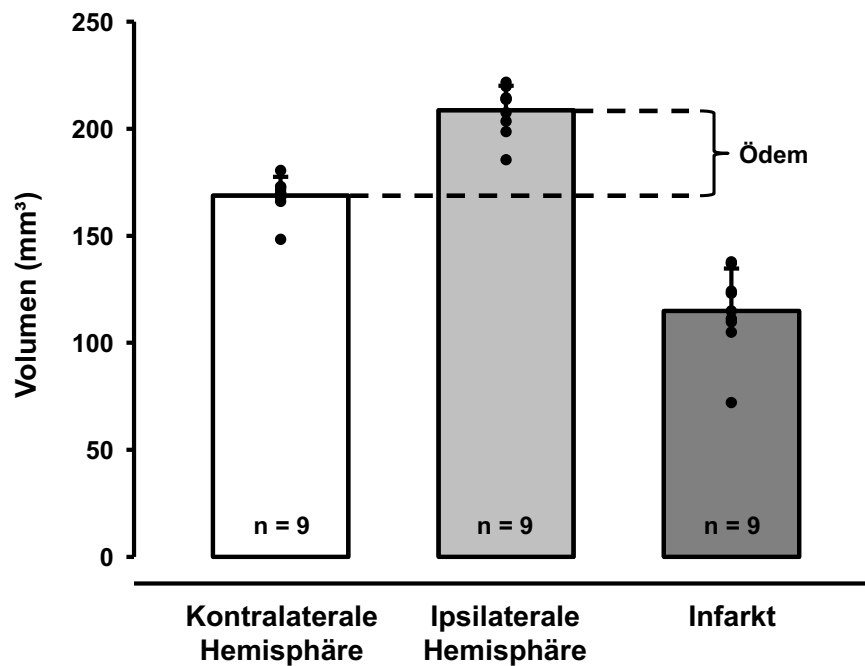


Abbildung 22: Hemisphärenvolumina Standardisierung. Die kontralaterale Hemisphäre hatte ein Volumen von $169 \text{ mm}^3 \pm 9 \text{ mm}^3$, die infarzierte Hemisphäre ein Volumen von $209 \text{ mm}^3 \pm 11 \text{ mm}^3$. Das Infarktvolumen betrug $115 \text{ mm}^3 \pm 20 \text{ mm}^3$ (SD-Wert = 17%). Daraus lässt sich ein infarktbedingtes Hirnödem von $24\% \pm 1\%$ berechnen. Es fanden sich keine intrazerebralen Blutungen.

An dieser Stelle wird anhand der Daten der 4. Standardisierung das korrigierte Infarktvolumen erläutert: Das Infarktvolumen wird, wie unter 3.4.5 beschrieben, berechnet. Daraus ergibt sich eine Absolutgröße in mm^3 . Störende Einflüsse wie z. B. unterschiedlich stark ausgeprägte Hirnschwellungen nach fMCAO oder in der Größe variierende Gehirne werden hierbei nicht berücksichtigt. Um diese Störgrößen auszuschließen, wird das Infarktvolumen als prozentualer Anteil der kontralateralen Hemisphäre angegeben. Das Ödemkorrigierte Infarktvolumen wird mit folgender Formel berechnet:

$$V_{\text{Infarkt korrigiert}} = \frac{V_{\text{Hemisphäre kontralateral}} - (V_{\text{Hemisphäre ipsilateral}} - V_{\text{Infarkt absolut}})}{V_{\text{Hemisphäre kontralateral}}} \times 100$$

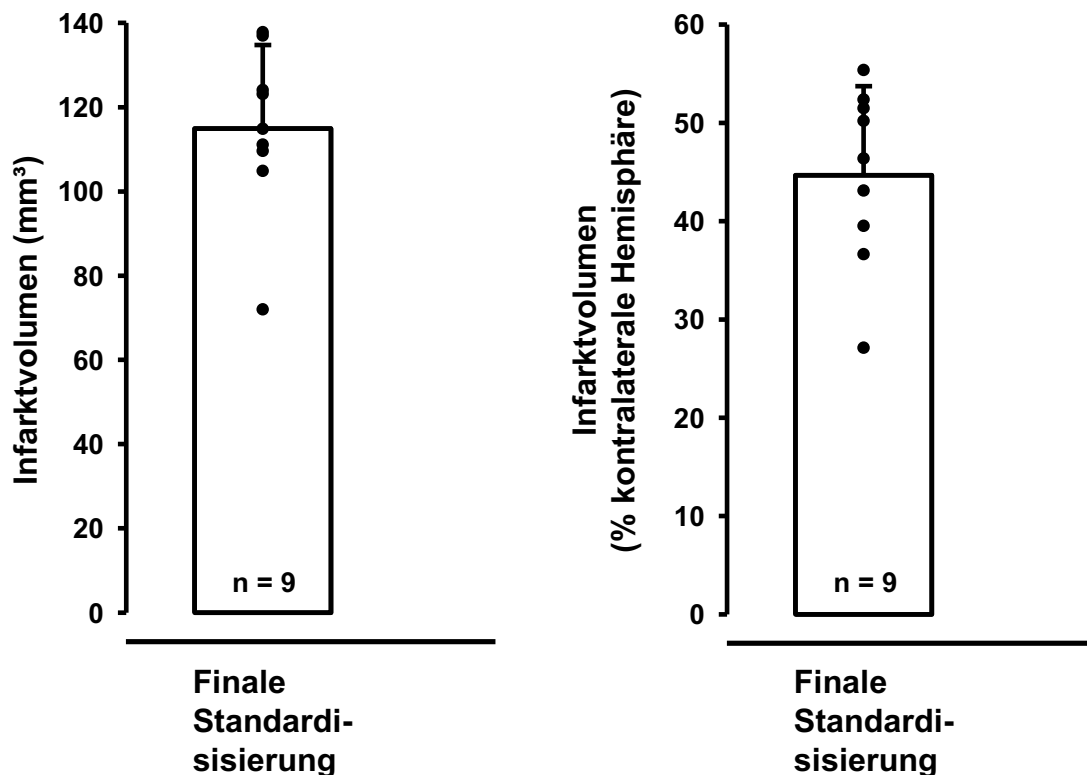


Abbildung 23: Veranschaulichung des korrigierten Infarktvolumens. Der Absolutwert für das Infarktvolumen der 4. Standardisierung betrug $115 \text{ mm}^3 \pm 20 \text{ mm}^3$. Das Ödem-korrigierte Infarktvolumen beträgt demnach $45\% \pm 9\%$.

4.2 Gpx4-Expression nach Ischämie

Zunächst sollte beantwortet werden, ob sich die Gpx4-Expression in der Folge nach zerebraler Ischämie verändert. Deswegen wurde nach erfolgreicher Standardisierung der fMCAO die Gpx4-Expression zu verschiedenen Zeitpunkten nach Ischämie untersucht und mit nativen bzw. scheinoperierten Hirnen verglichen. Für diese Analysen wurden definierte Hirnregionen nach verschiedenen Reperfusionzeiten nach fMCAO bzw. den Kontrollen entnommen und die Protein-Expression der Gpx4 mittels Western Blot untersucht.

Gpx4 Antikörper Charakterisierung:

Für die WB-Analysen zur Gpx4 standen dem Labor zwei verschiedene AK zur Verfügung: Ein etablierter und bis dato genutzter Gpx4-AK aus Rattenserum, hergestellt von Frau Dr. Elisabeth Kremmer (Helmholz Zentrum, München) und ein kürzlich auf dem Markt erschienener, kommerziell erhältlicher Gpx4-AK der Firma Abcam (s. **Tabelle 3**). Zur Etablierung wurde eine Reihe von WB durchgeführt (siehe Abb. unten).

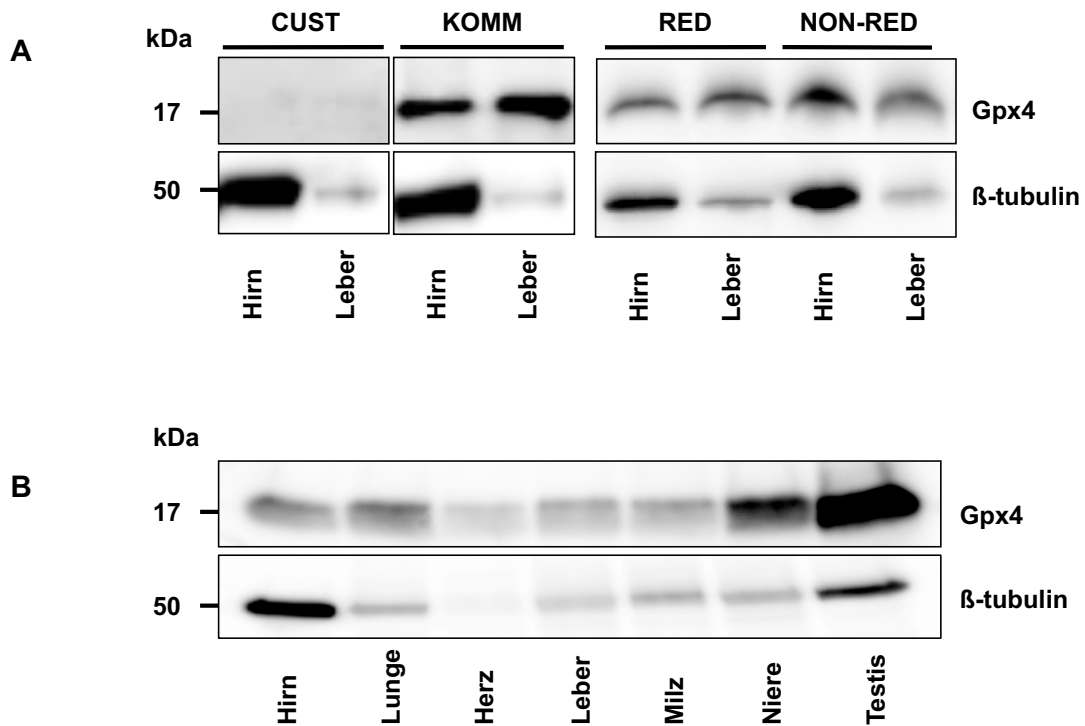


Abbildung 24: **Gpx4 Antikörper Charakterisierung.** **A)** WB aus Hirn- und Lebergewebe. Der custom-made AK (CUST) von Dr. Elisabeth Kremmer zeigte im Vgl. zum kommerziell erhältlichen AK (KOMM) der Firma Abcam schwächere Banden. Für den Abcam-AK ergab sich kein Unterschied zwischen reduzierenden (RED) und nicht-reduzierenden (NON-RED) Bedingungen. **B)** In der Analyse der WB-Ergebnisse verschiedener Gewebe bestätigte sich Hodengewebe (Testis) als geeignete Positivkontrolle.

Gpx4 Expression nach zerebraler Ischämie:

Nach der Etablierung eines geeigneten WB-Protokolls für den kommerziell erhältlichen Gpx4-AK wurden C57BL/6 Tiere einer fMCAO unterzogen und definiertes Hirngewebe wurde zu verschiedenen Zeitpunkten nach Reperfusion bzw. von nativen oder scheinoperierten Tieren für die WB-Analysen entnommen (s. 3.5.1). Für definierte Hirnbereiche wurden WB durchgeführt. Die Abbildungen unten zeigen drei repräsentative WB. Die Banden der Hirnproben aus dem Striatum zeigen nach 24 h Reperusionszeit einen signifikanten Anstieg der Gpx4-Expression. Diese Resultate bestärken bereits publizierte Daten einer erhöhten Gpx4-Expression nach traumatischem Hirnschaden (118).

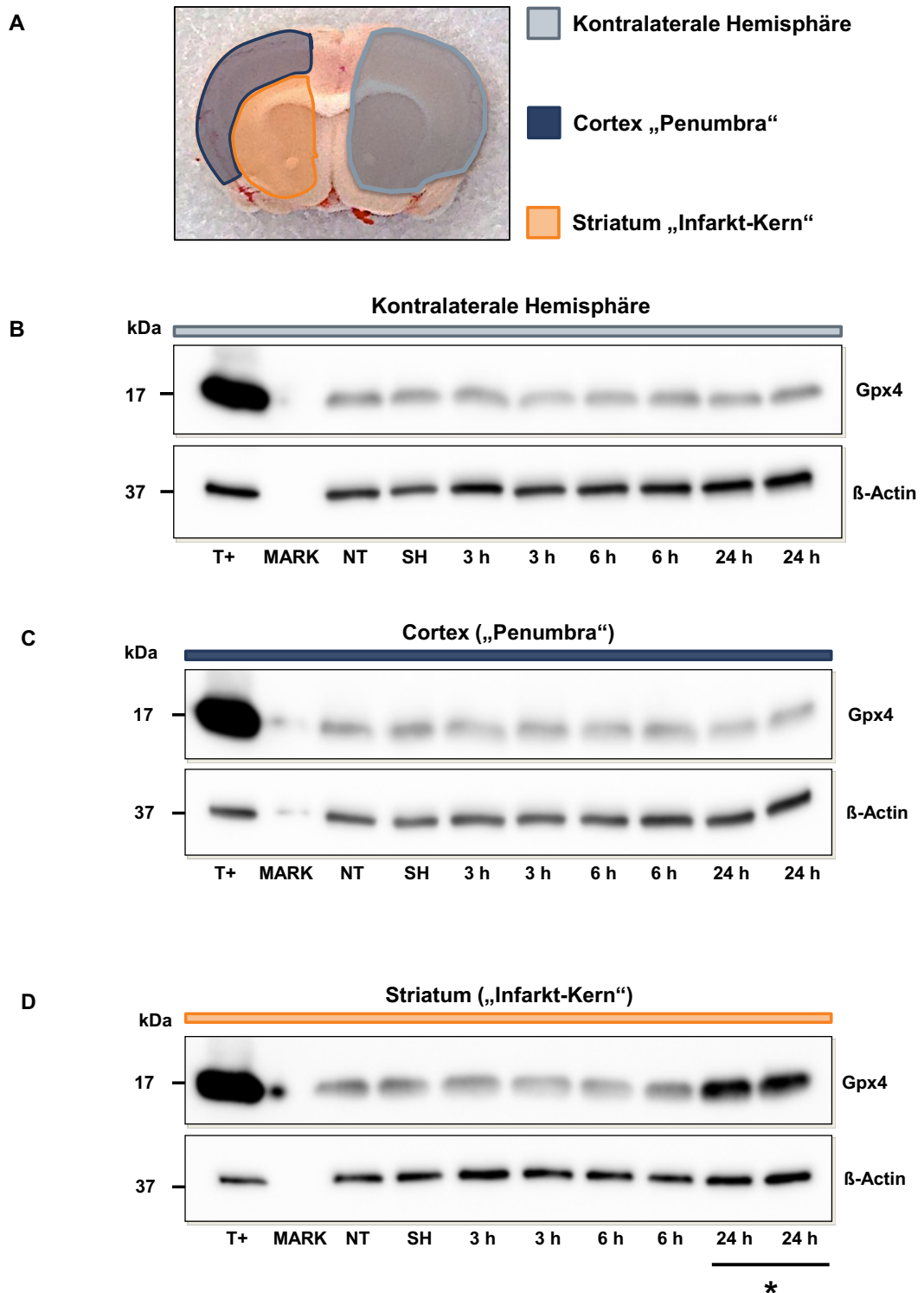


Abbildung 25: Gpx4 Expression nach fMCAO. A) zeigt die definierte Hirnscheibe 2 mm post Bregma (s. 3.6.2) mit den entsprechenden Hirnarealen für die Analyse: Ipsilaterales Striatum als „Infarkt-Kern“ (orange Fläche), Cortex als „Penumbra“ (dunkelblaue Fläche) und kontralaterale Hemisphäre als Kontrolle (graublau Fläche). B) Repräsentativer WB der Kontrolle, erwartungsgemäß mit gleichmäßiger Gpx4-Expression in allen Versuchsgruppen. C) Repräsentativer WB der „Penumbra“: Auch hier ist die Gpx4-Expression unverändert. D) Repräsentativer WB des „Infarkt-Kerns“. Hier ist nach 24 h Reperfusionzeit im Vergleich zu den anderen Gruppen ein Anstieg der Gpx4-Expression zu sehen. **T+** = Positivkontrolle Testis, **MARK** = Marker/Größenstandard, **NT** = Non-Treated, **SH** = Schein-OP.

4.3 Rolle der astrozytären Gpx4 nach zerebraler Ischämie

Wir konnten somit zeigen, dass die Gpx4-Expression im Gehirn 24 h nach Ischämie deutlich ansteigt. Demnach lässt sich schlussfolgern, dass die Gpx4 in der Akutphase nach Ischämie möglicherweise eine wichtige Rolle spielt. Um die Frage nach der zellspezifischen Funktion der Gpx4 nach Schlaganfall näher zu beleuchten, wurden astrozytäre Gpx4 Mausmutanten verwendet.

4.3.1 fMCAO bei Gpx4^{AstWT} und Gpx4^{AstKO}

4.3.1.1 Laser-Doppler, Herzfrequenz, Gewichtsverlust und Hirnschwellung

Die korrekte Okklusion der ACM für alle Versuchstiere zeigten die rCBF-Werte, die nach Filamentplatzierung auf $\leq 20\%$ des Baseline-Wertes abfielen.

Das Ausgangsgewicht der Tiere lag zwischen 20,4 – 23,4 g. Der postoperative Gewichtsverlust, die Hirnschwellung sowie die Herzfrequenz sind in der Tabelle unten zusammengefasst.

Tabelle 13. Perioperative Parameter der Gpx4^{AstWT} bzw. KO -Tiere.

Parameter	Gpx4 ^{AstWT}	Gpx4 ^{AstKO}
Abfall des Laser-Doppler-Fluxes (% Baseline)	14 ± 5	14 ± 5
Mittlere Herzfrequenz pro Minute während der OP	568 ± 32	598 ± 16
Gewichtsverlust nach 24 h (% Startgewicht)	15 ± 3	15 ± 3
Hemisphärenschwellung (% kontralaterale Hemisphäre)	16 ± 6	17 ± 5

Da alle erhobenen Parameter vergleichbare Werte zeigten, können diese Größen als mögliche Confounder ausgeschlossen werden und es kann von gleichen Voraussetzungen für beide Versuchsgruppen ausgegangen werden.

4.3.1.2 Neuroscore und Infarktmetrie

In der neurologischen Untersuchung zeigten die KO-Tiere während der Ischämie zunächst einen schlechteren Neuroscore als die WT-Tiere. Nach 24 h Reperfusionzeit zeigten beide Versuchsgruppen vergleichbare neurologische Ergebnisse. Die Erholung (fallender Neuroscore) nach 24 h ist physiologisch durch die Reperfusion der Penumbra zu erklären.

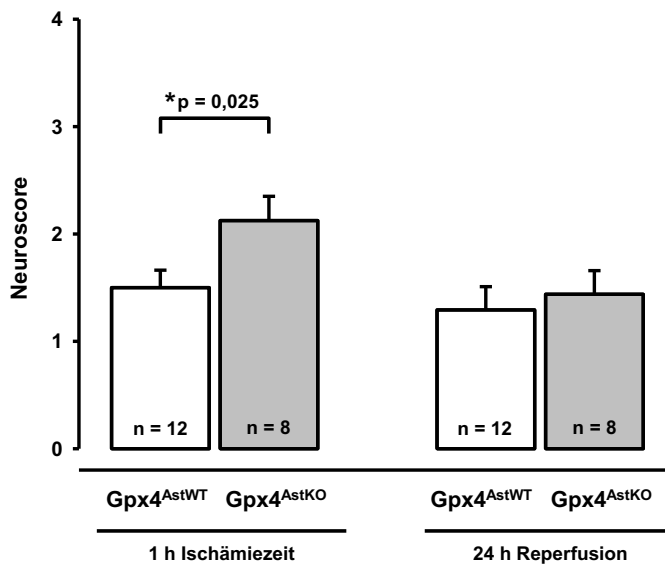


Abbildung 26: Neuroscore der astrozytären Mausmutanten. Im modifizierten Neuroscore nach Bederson (s. 3.4.4) erreichen nach 1 h Ischämie die Gpx4^{AstWT}-Tiere 1,5 ± 0,5 Punkte. Die Gpx4^{AstKO}-Tiere erreichten 2,1 ± 0,6 Punkte. Der Unterschied ist signifikant ($p = 0,025$). Der Neuroscore nach 24 h Reperfusionzeit betrug 1,3 ± 0,8 für die WT-Tiere und 1,4 ± 0,6 für die KO-Tiere.

Der kortikale Infarkt entsteht durch den arteriellen Verschluss der ACM. Das Volumen des Infarktes wurde anhand von Gefrierschnitten bestimmt (s. 3.4.5). Die WT-Tiere zeigten ein geringfügig größeres Infarktvolumen als die KO-Tiere. Die Differenz war nicht signifikant.

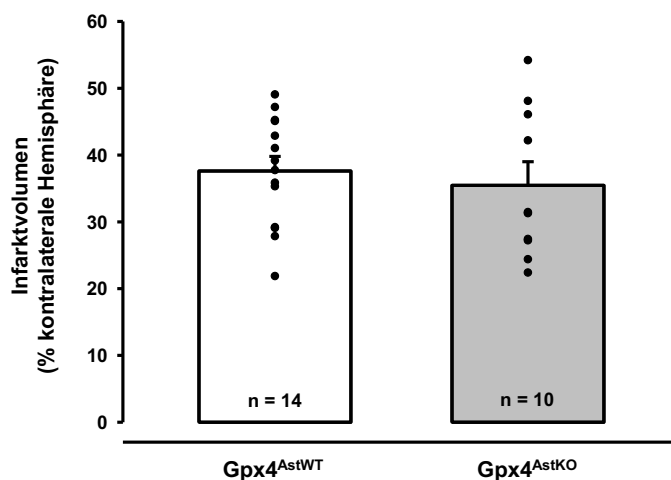


Abbildung 27: Infarktmetrie der astrozytären Mausmutanten. Die korrigierte Infarktgröße der Gpx4^{AstWT}-Tiere betrug 38% ± 8% und die der Gpx4^{AstKO}-Tiere 36% ± 11%.

4.3.2 Mikroskopische Analyse des Peri-Infarktbereichs

Es konnte kein makroskopischer Unterschied in den Infarktvolumina von Gpx4^{AstWT} im Vergleich zu Gpx4^{AstKO} Mäusen nach Ischämie und 24 h Reperfusionzeit detektiert werden. Ein weiteres Augenmerk sollte daher auf dem neuronalen und astrozytären Zelltod liegen, welcher sich aufgrund des astrozytären KO mikroskopisch ggf. unterscheiden könnte. Ferner noch sollte die Morphologie der Astrozyten und Mikroglia untersucht werden. Hierfür wurde eine Neuronen-spezifische immunhistochemische Färbung (NeuN) in Kombination mit einer TUNEL-Färbung als Zelltod-Marker durchgeführt (s. **Tabelle 3** und **Tabelle 4**). Untersucht wurden die Zellen im Peri-Infarktbereich, da dieser Bereich die Grenze zwischen irreversibel geschädigtem Infarktkern und noch vitalem Gewebe markiert (s. 3.4.6). Insgesamt wurden von n = 6 Mäusen (n = 3 Gpx4^{AstWT} bzw. Gpx4^{AstKO}) 18 Objektträger (\cong 9 Hirschnitte pro Maus) analysiert. Die folgenden Abbildungen zeigen repräsentative Auswertebereiche jeweils einer Maus.

4.3.2.1 Analyse des neuronalen Zelltodes

Die Abbildung unten zeigt repräsentative Fluoreszenz-Doppelfärbungen aus dem Peri-Infarktbereich von Neuronen mittels NeuN/Cy3 (rot) und TUNEL (grün). Zur Veranschaulichung der Antikörperspezifität zeigt die erste Bildreihe Schnitte, die nur mit sekundärem AK inkubiert worden sind. In der zweiten Reihe sieht man die kontralaterale Hemisphäre (Kontrolle) ohne TUNEL-positive Neurone. Die unterste Reihe zeigt ROIs aus dem Peri-Infarktbereich. Nahezu alle TUNEL-positiven Zellen sind Neurone (s. unten).

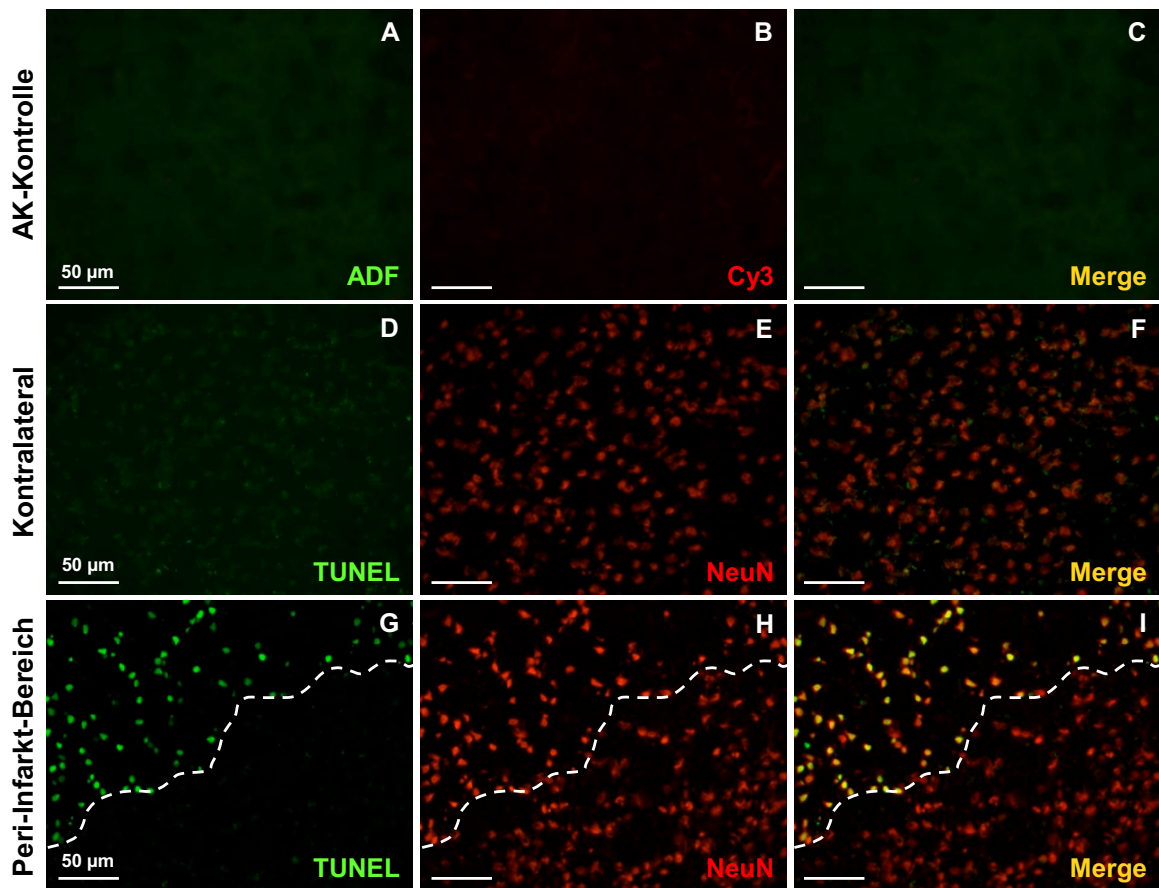


Abbildung 28: Neuronaler Zelltod im Peri-Infarktbereich (Mikroskopie) A), B) und C) zeigen ROI aus dem AK-Kontrollschnitt (nur sekundärer AK). D), E) und F) zeigen die kontralaterale Kontrolle. Kontralateral zeigten sich erwartungsgemäß keine TUNEL-positiven Zellen (D, F) bei regelrechter NeuN-Färbung (E, F). G), H) und I) zeigen eine ROI im Peri-Infarktbereich: G) Die TUNEL-Färbung, H) die NeuN-Färbung und I) die Bildfusion. TUNEL-positive Neurone erscheinen in I) gelb. Wie zu sehen, handelte es sich bei nahezu 100% aller TUNEL-positiven Zellen (G) um Neurone. (I). Die Bilder wurden in 400-facher Vergrößerung aufgenommen, die Maßstabsleiste entspricht 50 µm. Die weiße Linie indiziert die Infarktgrenze.

Die TUNEL-positiven Neuronen im Peri-Infarktbereich wurden für jede einzelne ROI gezählt und ausgewertet. Anschließend wurden zunächst die einzelnen ROI für sich analysiert und anschließend alle ROIs zusammengefasst und der gesamte ausgewertete Peri-Infarktbereich statistisch analysiert (s. unten).

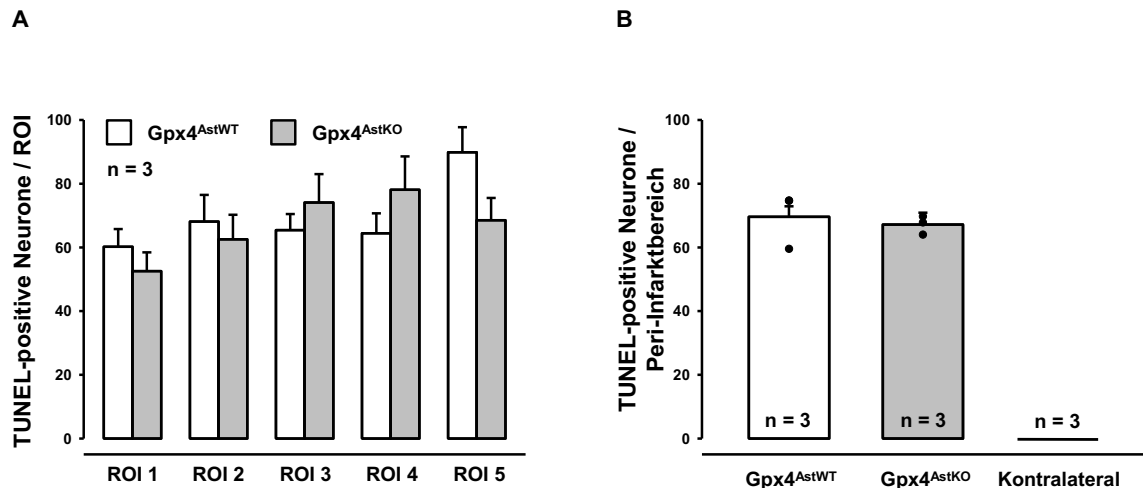


Abbildung 29: Neuronaler Zelltod im Peri-Infarktbereich (statistische Auswertung): A) zeigt die einzelnen ROIs (1-5) im Vergleich. In ROI 1, am Übergang zwischen dem Versorgungsgebiet der ACM und ACA, zeigt sich bis zu ROI 5 ein Anstieg der TUNEL-positiven Neuronen. In ROI 1 sind es bei den Gpx4^{AstroWT}-Tieren 60 ± 17 TUNEL-positive Zellen, bei den Gpx4^{AstroKO}-Tieren 53 ± 18 . Diese Werte stiegen auf Werte in ROI 5 auf 90 ± 23 TUNEL-positive Zellen bei den WT-Tieren und auf 69 ± 21 bei den KO-Tieren an. B) zeigt die Gesamtheit aller TUNEL-positiver Neurone im Peri-Infarktbereich. Die Gpx4^{AstroWT}-Tiere hatten im Schnitt 70 ± 22 TUNEL-positive Neurone pro ROI. Bei den Gpx4^{AstroKO}-Tieren waren es 67 ± 25 . In der kontralateralen Kontrolle fanden sich erwartungsgemäß keine TUNEL-positiven Neurone.

Die ansteigende Zahl TUNEL-positiver Neurone von ROI 1 bis ROI 5 zeigt die gute Wahl der Auswertebereiche, da der vermehrte Zelltod in ROI 4/5 die auf Ischämie empfindlicheren Hirnregionen repräsentiert (s. 1.1.2).

Insgesamt ist festzuhalten, dass die mittlere Anzahl der untergehenden Neurone in Gpx4^{AstroWT} und Gpx4^{AstroKO} vergleichbar waren und kein wesentlicher Unterschied detektiert werden konnte.

4.3.2.2 Analyse der Astrozyten

Nachdem keine Unterschiede für den neuronalen Zelltod nachgewiesen werden konnten, stellte sich die Frage, ob eine erhöhte Astrozyten-Aktivierung und/oder ein erhöhter Untergang von Astrozyten zu beobachten ist. Zu diesem Zweck wurde eine astrozyten-spezifische immunhistochemische Färbung (GFAP) in Kombination mit einer TUNEL-Färbung als Zelltod-Marker verwendet. Die Färbungen wurden analog zur Neuronen-Evaluation durchgeführt und analysiert.

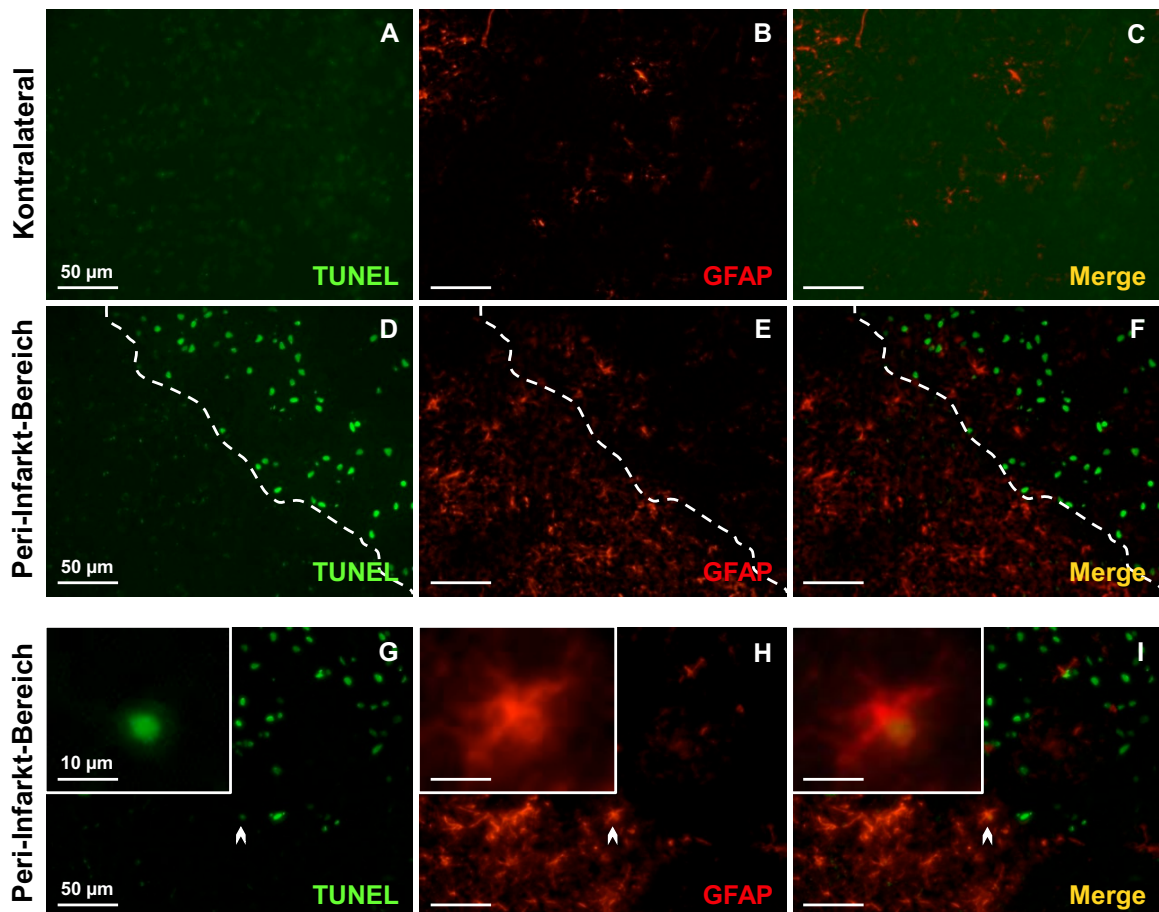


Abbildung 30: Analyse der Astrozyten im Peri-Infarktbereich (Mikroskopie). Fluoreszenz-Doppelfärbungen von Astrozyten mittels GFAP/Cy3 (rot) und TUNEL (grün). A), B) und C) zeigen die kontralaterale Kontrolle. Wie erwartet, fanden sich kontralateral keine TUNEL-positiven Zellen (A,C). Die GFAP-Färbung zeigte kontralateral regelrechte Astrozyten (B, C). D), E) und F) zeigen den Peri-Infarkt-Bereich: D) Die TUNEL-Färbung, E) die GFAP-Färbung und F) die Bildfusion. Es zeigte sich eine höhere GFAP-positive Fläche im der Peri-Infarktbereich (E, F) verglichen mit der kontralateralen Kontrolle (B, C). Die unterste Bildreihe (G, H und I) zeigen den einzigen TUNEL-positiven Astrozyten (weißer Pfeil). Die Bilder wurden in 400-facher Vergrößerung aufgenommen, die Maßstabsleiste entspricht 50 µm (A-I) bzw. 10 µm (G-I (vergrößerter Ausschnitt)). Die weiße Linie indiziert die Infarktgrenze.

Aus der Analyse der TUNEL/NeuN-Doppelfärbungen (s. oben) wurde bereits ersichtlich, dass nahezu alle TUNEL-positiven Zellen Neurone waren. In der gesamten Auswertung der GFAP/TUNEL-Färbung (insgesamt 90 ROIs im Peri-Infarktbereich) fand sich nur ein einziger TUNEL-positiver Astrozyt (s. Abb. oben). Analog zur NeuN/TUNEL-Doppelfärbung erfolgte zunächst die Analyse der einzelnen ROIs und anschließend des gesamten Peri-Infarktbereichs. Zur Untersuchung der Reaktivität von Astrozyten (s. 5.2.2) wurde die GFAP-positive Fläche pro ROI mittels ImageJ gemessen und ausgewertet.

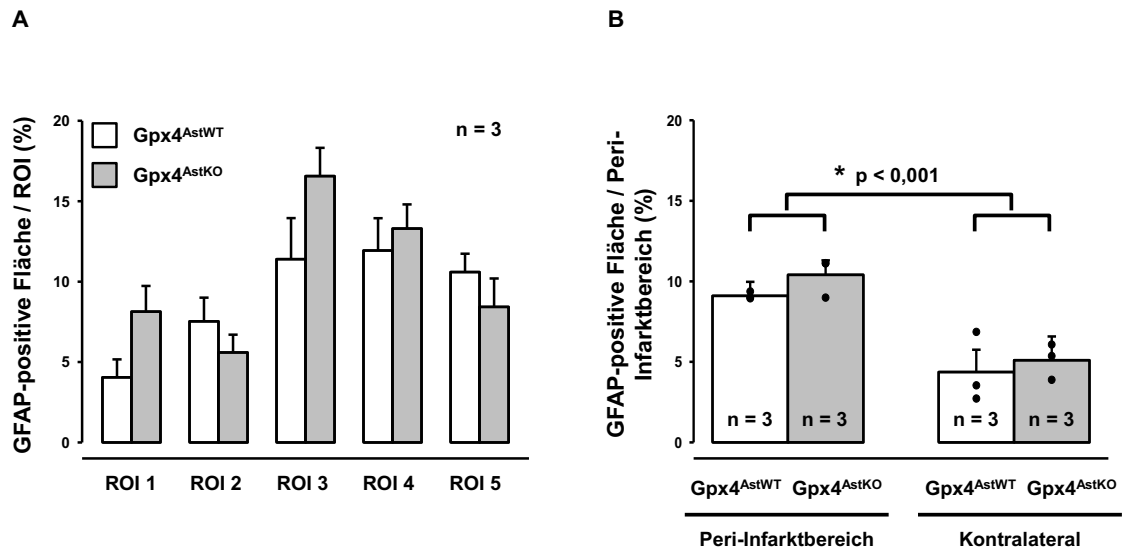


Abbildung 31: Gpx4^{WT/KO}-Astrozyten im Peri-Infarktbereich (statistische Auswertung). A) zeigt die einzelnen ROI (1 – 5) im Vergleich. Kongruent mit dem vermehrten neuronalen Zelltod von ROI 1 – ROI 5 (s. Abb oben) ist hier als Reaktion der Astrozyten eine steigende GFAP-positive Fläche von ROI 1 – ROI 5 zu erkennen. B) zeigt die Gesamtheit der GFAP-positiven Fläche im Peri-Infarktbereich verglichen mit der kontralateralen Kontrolle: Bei den Gpx4^{AstWT}-Tieren waren 9 ± 6% der Fläche GFAP-positiv, bei den Gpx4^{AstKO}-Tieren waren es 10 ± 6%. Auf der kontralateralen Kontrolle waren es nur halb so viel: 4 ± 6% für die Gpx4^{AstWT}-Tiere und 5 ± 6% für die Gpx4^{AstKO}-Tiere. Es konnte zwar kein Unterschied zwischen WT- und KO-Tieren gezeigt werden, jedoch fand sich ipsilateral (n = 6 für WT + KO) signifikant mehr GFAP-positive Fläche als kontralateral (p < 0,001). Ein morphologischer Unterschied zwischen WT und KO Astrozyten war nicht ersichtlich.

Insgesamt lässt sich sagen, dass kein wesentlicher Unterschied in der Astrozyten-Morphologie, Reaktivität oder Untergang in Gpx4^{AstWT} verglichen mit Gpx4^{AstKO} zu beobachten war. Die GFAP-positive Fläche im Peri-Infarktbereich war jedoch deutlich größer als in der kontralateralen Kontrolle. Dies deutet auf eine Astrozytenaktivierung trotz Gpx4-KO hin.

4.3.2.3 Analyse der Mikroglia Reaktivität

Zur Demaskierung der Infarktgrenze wurde bei der Analyse der Mikroglia anstelle der TUNEL-Färbung die Neuronen mit Map2 gefärbt, um eine mögliche AK-Kreuzreaktion zu vermeiden. Des Weiteren war aus den vorangegangenen Analysen der NeuN/TUNEL- sowie GFAP/TUNEL-Färbungen ersichtlich, dass keine TUNEL-positive Mikroglia-Zellen zu erwarten waren. Um eventuelle Unterschiede in der Morphologie der Mikroglia zu beobachten, wurden weitere Bilder in 1000-facher Vergrößerung eines ROI im Peri-Infarktbereich und den entsprechenden kontralateralen Bereich analysiert. Die Iba1-Färbung zeigt keinen Unterschied zwischen dem Peri-Infarktbereich und der Kontrolle. Auch in der 100-fachen Vergrößerung zeigen sich in der Morphologie der Mikroglia keine wesentlichen Unterschiede zwischen Peri-Infarktbereich und Kontrolle.

Zusammenfassend konnten im Fall der Mikroglia keine Unterschiede in der Anzahl und Morphologie zwischen Gpx4^{AstKO}- und Gpx4^{AstWT}-Tieren detektiert werden.

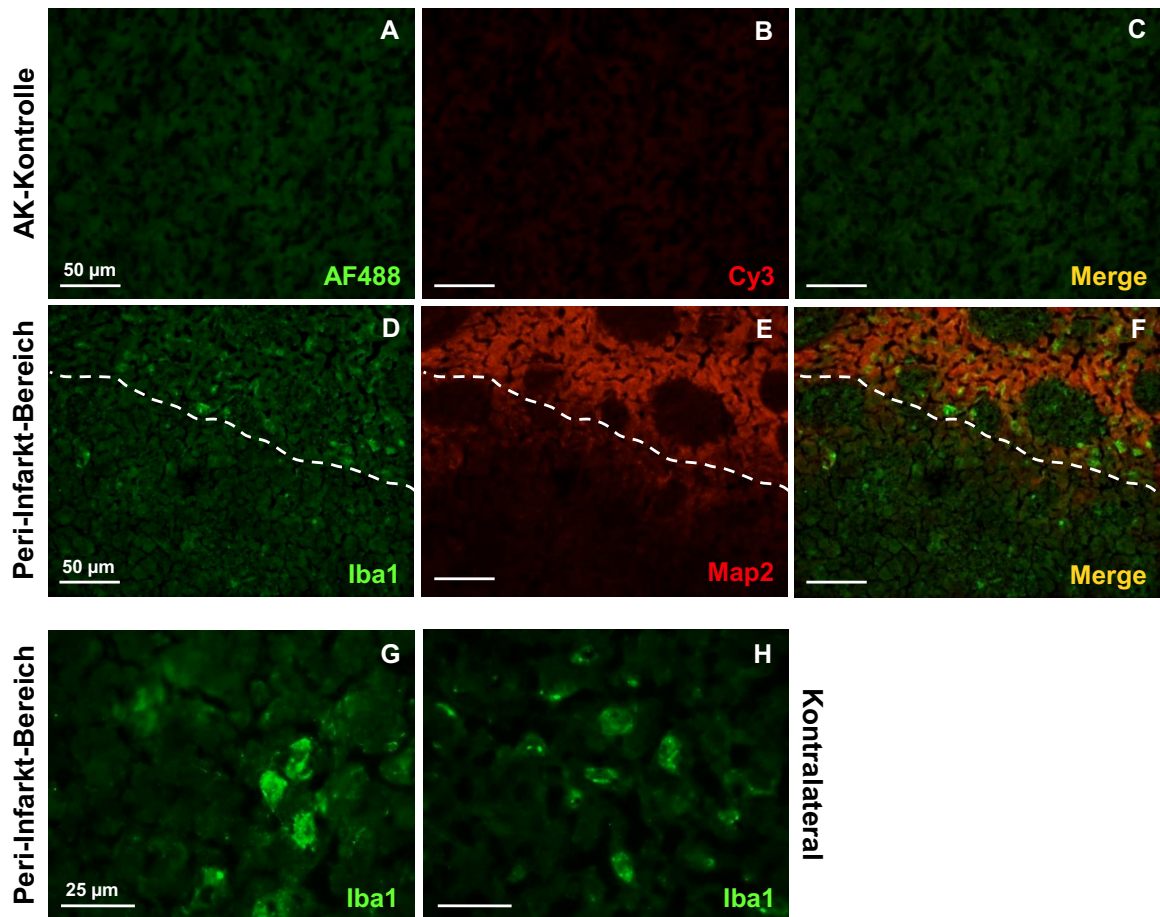


Abbildung 32: Mikroglia im Peri-Infarktbereich (Mikroskopie). Fluoreszenz-Doppelfärbungen von Mikroglia mittels Iba1/AF488 (grün) und Map2/Cy3 (rot). A), B) und C) zeigen ROIs aus dem AK-Kontrollschnitt (nur sekundärer AK) zur Veranschaulichung der AK-Spezifität: A) AF488, B) Cy3 und C) die Bildfusion. D), E) und F) zeigen Ausschnitte aus dem Peri-Infarktbereich: D) Iba1-Färbung, E) Map2-Färbung und F) die Bildfusion. Es waren keine Unterschiede in der Morphologie der Mikroglia im Peri-Infarktbereich (G) verglichen mit der kontralateralen Kontrolle (H) ersichtlich. Die Bilder wurden in 400- bzw. 1000-facher Vergrößerung aufgenommen, die Maßstabsleiste entspricht 50 µm (A-F) bzw. 25 µm (G, H). Die weiße Linie indiziert die Infarktgrenze.

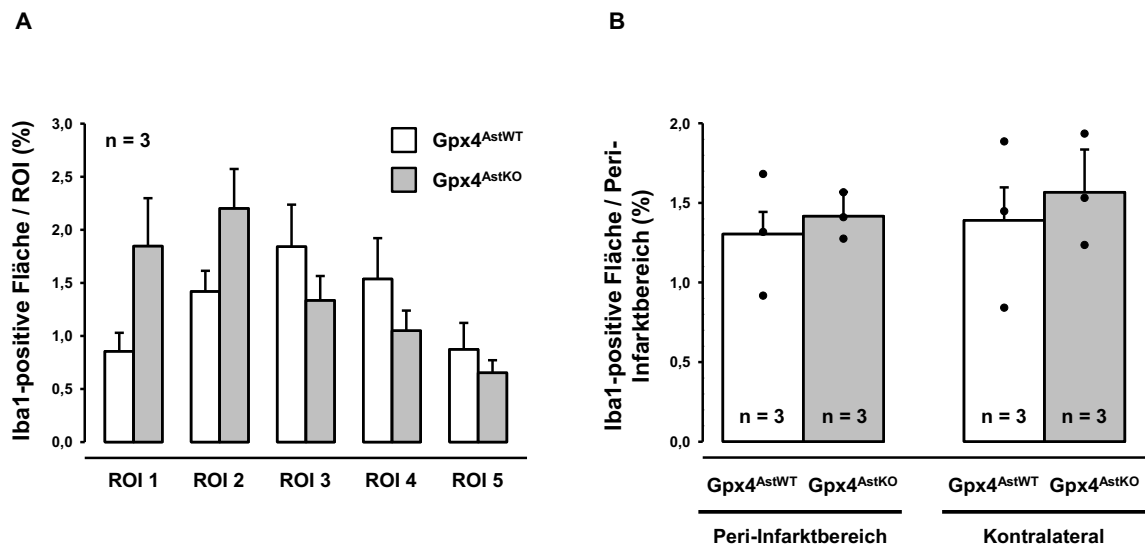


Abbildung 33: Mikrogliabildung im Peri-Infarktgebiet (statistische Auswertung). Die einzelnen ROIs zeigten über den gesamten Peri-Infarktgebiet eine entgegengesetzte Verteilung zur NeuN- und GFAP-Färbung, hier waren die größten Iba1-positiven Flächen in ROI 1 und 2 zu sehen, die kleinsten in ROI 4 und 5. Die Iba1-positive Fläche im gesamten Peri-Infarktgebiet betrug für die Gpx4^{AstWT}-Tiere im Schnitt $1,3 \pm 0,9\%$ und für die Gpx4^{AstKO}-Tiere $1,4 \pm 1,0\%$. Die kontralaterale Kontrolle zeigte eine Iba1-positive Fläche von $1,4 \pm 0,9\%$ für die Gpx4^{AstWT}-Tiere und $1,6 \pm 1,1\%$ für die Gpx4^{AstKO}-Tiere. Im Gegensatz zur GFAP-Färbung zeigte sich hier kein Unterschied zwischen ipsilateraler und kontralateraler Hemisphäre.

4.4 Einfluss der Vitamin-E Mangeldiät auf das Infarktvolumen

Die oben beschriebenen Ergebnisse zeigten keinen signifikanten Unterschied zwischen astrozytären Gpx4^{AstWT} und Gpx4^{AstKO}-Tieren nach fMCAO, weder in der makroskopischen Infarktmorphologie noch in der mikroskopischen Analyse des Peri-Infarktgebietes. Ferner zeigten die IF-Doppelfärbungen eine signifikant höhere GFAP-positive Fläche im Peri-Infarktgebiet verglichen mit der kontralateralen Seite. Demnach scheint der Gpx4-Verlust die Funktion der Astrozyten, im Sinne einer reaktiven Astroglie (s. 5.2.2) nicht zu beeinträchtigen. Um den Phänotyp zu verstärken, entschieden wir uns, die gleichen astrozytären Mausmutanten einer fMCAO zu unterziehen, jedoch diesmal vor der OP den Tieren für vier Wochen eine Vitamin-E Mangeldiät zu verabreichen. Dem Vitamin-E wird als direktes Antioxidans eine wichtige Rolle in der Defensive von oxidativem Stress zugeschrieben, es zählt außerdem zu den wichtigsten Kooperationspartnern der Gpx4 (s. 1.5.2).

4.4.1 fMCAO unter Vitamin-E Mangel an C57BL/6-Tieren und astrozytären Gpx4^{WT}- und Gpx4^{KO}-Tieren

4.4.1.1 Laser-Doppler, Herzfrequenz, Gewichtsverlust und Hirnschwellung

Die LD-Werte fielen in allen Versuchsgruppen signifikant ab, sodass von einer suffizienten und gleichartigen Ischämie in allen Versuchsgruppen ausgegangen werden kann. Alle Werte, die mögliche Störgrößen darstellen könnten, waren für alle Gruppen vergleichbar. Das Ausgangsgewicht der C57BL/6-Mäuse lag bei 19,5 - 27,5 g. Die Gpx4^{AstWT}-Tiere hatten ein Ausgangsgewicht von 15,5 - 20,8 g, die Gpx4^{AstKO}-Tiere 16,5 - 23,6 g.

Tabelle 14. Perioperative Parameter der Vitamin-E-Mangel-Tiere.

Parameter	C57BL/6	C57BL/6	Gpx4 ^{AstWT}	Gpx4 ^{AstKO}
Ernährung	Kontrolle	Vitamin-E-Mangelfutter		
Abfall des Laser-Doppler-Fluxes (% Baseline)	11 ± 3	14 ± 6	15 ± 5	17 ± 5
Mittlere Herzfrequenz pro Minute während der OP	572 ± 51	575 ± 17	570 ± 45	589 ± 33
Gewichtsverlust nach 24 h (% Startgewicht)	11 ± 3	12 ± 2	15 ± 3	15 ± 6
Hemisphärenschwellung (% kontralaterale Hemisphäre)	22 ± 7	18 ± 6	17 ± 6	16 ± 6

4.4.1.2 Neuroscore und Infarkt volumetrie

Die neurologische Untersuchung der Tiere nach 1 h Ischämie und nach 24 h Reperfusionzeit zeigte keine signifikanten Unterschiede in den jeweiligen Gruppen. Der Neuroscore nach 1 h Ischämie beträgt bei allen Versuchsgruppen etwa 2 Punkte. Nach Reperfusion liegt der Neuroscore für alle Versuchstiere unter 2 Punkten. Dies spricht dafür, dass nicht das gesamte initial ischämische Gewebe infarziert.

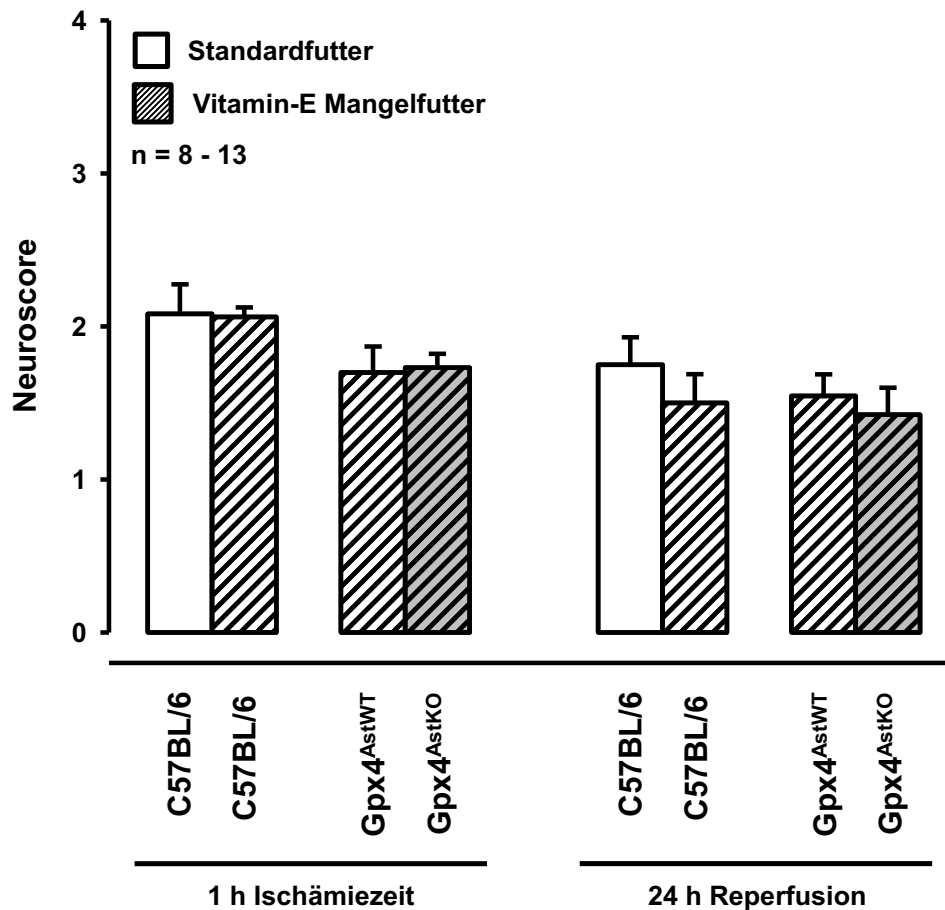


Abbildung 34: Neuroscore der C57BL/6 Tiere und der astrozytären Mausmutanten unter Vitamin-E Mangeldiät. Der Neuroscore der C57BL/6 Mäuse nach 1 h Ischämie bei Standarddiät betrug $2,1 \pm 0,7$ Punkte, die Vitamin-E-Mangel-Gruppe hatte Werte von $2,1 \pm 0,2$. Die Gpx4^{AstWT}-Tiere erzielten Neuroscore Werte von $1,7 \pm 0,5$, die Gpx4^{AstKO}-Tiere $1,7 \pm 0,3$ Punkte. Nach 24 h Reperfusionzeit hatten die C57BL/6 Mäuse mit Standarddiät einen Neuroscore von $1,8 \pm 0,6$ Punkten und die Gruppe unter Vitamin-E-Mangel $1,5 \pm 0,5$. Der Neuroscore der Gpx4^{AstWT}-Tiere lag bei $1,5 \pm 0,5$ die Gpx4^{AstKO}-Tiere erzielten $1,4 \pm 0,6$ Punkte.

Die Gruppen mit Vitamin-E Mangelfutter bzw. Vitamin-E Mangelfutter und Gpx4KO zeigten tendenziell kleinere Infarkte als ihre Kontrollen. Dieser Unterschied war allerdings statistisch nicht signifikant.

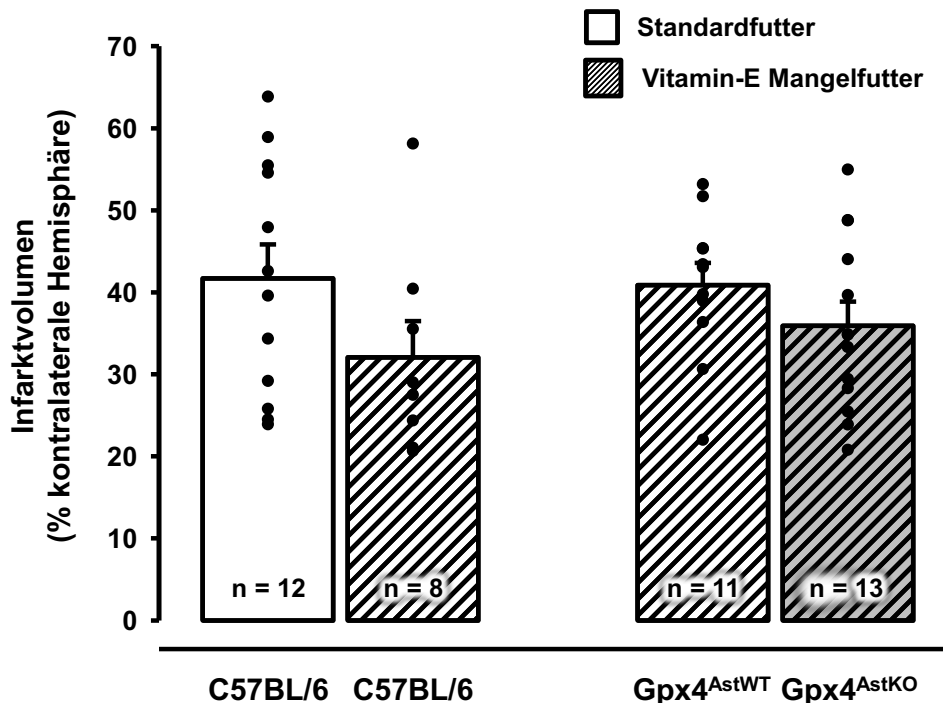


Abbildung 35: Infarkt volumen der C57BL/6 Tiere und der astrozytären Mausmutanten unter Vitamin-E Mangeldiät. Die Infarktgrößen der C57BL/6 Mäuse betragen $42\% \pm 14\%$ bei Standarddiät und $32\% \pm 13\%$ bei Vitamin-E-Mangel. Die Gpx4^{AstWT}-Tiere hatten Infarktgrößen von $41\% \pm 9\%$ die Gpx4^{AstKO}-Tiere $36\% \pm 11\%$.

Die Versuche an astrozytären Gpx4-KO Tieren konnten zeigen, dass Astrozyten auch ohne Gpx4 sowie unter zusätzlicher Vitamin-E Mangeldiät zumindest ihre Funktion im Sinne der reaktiven Astroglieose aufrechterhalten können. Des Weiteren wirkt sich der Gpx4-Verlust in Astrozyten in der akuten Phase (24 h) nach Ischämie nicht auf das Überleben der Astrozyten oder anderer Zellen der NVU aus.

Es ist bekannt, dass Neuronen deutlich empfindlicher auf Stress reagieren als Astrozyten. In einer weiteren Versuchsreihe wurden deshalb die Neuronen, als eine der Hauptakteure der NVU, im Zusammenhang mit Gpx4-Verlust nach Ischämie untersucht.

4.5 Bedeutung der neuronalen Gpx4 für das Infarkt volumen

Um die Auswirkungen des neuronalen Gpx4-Verlustes unter dem zusätzlichen Stress eines Schlaganfalles zu untersuchen, operierten wir konform zu den Versuchen der astrozytären Gpx4-Mausmutanten neuronale Gpx4-WT bzw. KO-Tiere. Die Mäuse wurden wie unter 3.2 beschrieben mit Tamoxifen induziert. Vier der Würfe für diese Versuchsreihe nahmen nicht oder nur spärlich an Gewicht zu. Um den schwächer geratenen Tieren die

Rahmenbedingungen zu erleichtern, erhielten sie zusätzlich Futterpellets sowie Petrischalen mit Wasser auf dem Boden des Käfigs. Des Weiteren wurde reichhaltiges Nahrungsergänzungsmittel (Immun Albrecht ®) ins Wasser gegeben und eine Nahrungsergänzungspaste (Nutri-Cal®) auf einzelne Futterpellets im Käfig verteilt. Trotz der aufwändigen Pflege der Tiere verstarben 17 Tiere noch vor der fMCAO. Die untenstehende PCR zeigt, dass von den 17 verstorbenen Tieren 16 Tiere $Gpx4^{NeuKO}$ waren und ein Tier $Gpx4^{NeuWT}$. Die restlichen Tiere entwickelten sich gut. Diese Beobachtung ist vollständigkeithalber zu erwähnen, jedoch führen wir dieses Ergebnis nicht auf einen Zusammenhang mit der Mauslinie selbst zurück. In einer weiteren Versuchsreihe im Mai 2017 verstarb von der gleichen Mauslinie kein einziges Tier vorzeitig.

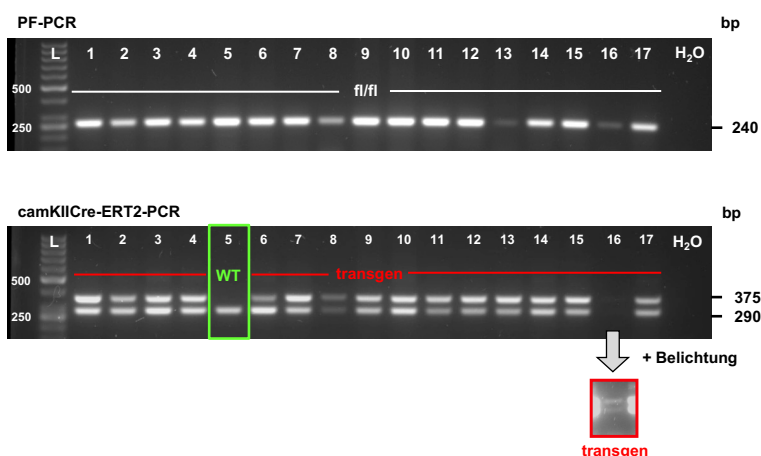


Abbildung 36: Genotypisierung der präoperativ verstorbenen $Gpx4^{NeuWT}$ bzw. $Gpx4^{AstKO}$ -Tiere.

Die Abbildung zeigt oben die $Gpx4$ -PCR, welche das homozygot gefloxt $Gpx4$ Gen bestätigt. Unten ist die $CamKIIaCre-ERT2$ -PCR zu sehen, welche das Vorhandensein der Cre- Rekombinase testet (Cre-transgen bei Bande von 375 bp).

4.5.1 fMCAO an $Gpx4^{NeuWT}$ und $Gpx4^{NeuKO}$

Aufgrund der 17 präoperativ (in der ersten Versuchsreihe 2014) verstorbenen neuronalen $Gpx4$ Mausmutanten, wurden die fMCAO Versuche in einer zweiten Versuchsreihe 2017 wiederholt. Da beide Versuchsreihen in allen erhobenen Parametern vergleichbare Werte erzielten (Daten nicht einzeln dargestellt), werden die Daten der beiden Versuchsreihen zusammengefasst präsentiert.

4.5.1.1 Laser-Doppler, Gewichtsverlust und Hirnschwellung

Das Startgewicht der $Gpx4^{NeuWT}$ -Tiere lag zwischen 15,8 - 28,2 g, das der $Gpx4^{NeuKO}$ -Tiere bei 9,8 - 24,1 g.

Tabelle 15. Perioperative Parameter der $Gpx4^{NeuWT/KO}$ -Tiere.

Parameter	$Gpx4^{NeuWT}$	$Gpx4^{NeuKO}$
Abfall des Laser-Doppler-Fluxes (% Baseline)	12 ± 5	13 ± 6
Gewichtsverlust nach 24 h (% Startgewicht)	13 ± 4	12 ± 4
Hemisphärenschwellung (% kontralaterale Hemisphäre)	20 ± 9	21 ± 11

4.5.1.2 Neuroscore und Infarktmetrie

Die neurologische Untersuchung der Tiere nach 1 h Ischämie und 24 h Reperfusion zeigte für die Gpx4^{NeuWT}-Tiere einen signifikanten Unterschied. Der Neuroscore nach 1 h Ischämie betrug für Gpx4^{NeuWT}- und Gpx4^{NeuKO}-Tiere in etwa 2 Punkte. Nach der Reperfusion hatten die Gpx4^{NeuWT}-Tiere einen deutlich niedrigeren Neuroscore als nach 1 h Ischämie. Das lässt auf eine Erholung während der Reperusionszeit schließen. Die Gpx4^{NeuKO}-Tiere hingegen bleiben bei einem Neuroscore von etwa 2 Punkten. Hier scheint die Erholung der neurologischen Symptome nicht möglich zu sein (s. unten).

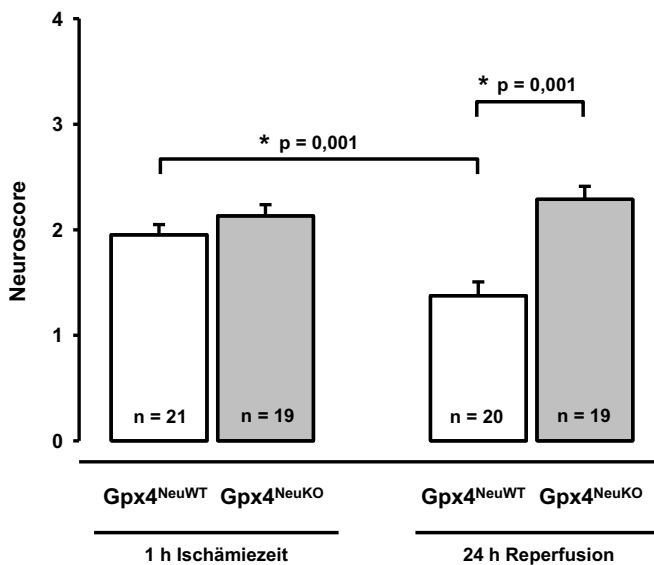


Abbildung 37: Neuroscore der neuronalen Gpx4-Mausmutanten. In der neurologischen Untersuchung nach 1 h Ischämie schnitten die Gpx4^{NeuWT}-Tiere mit $2,0 \pm 0,5$ Punkten ab, die Gpx4^{NeuKO}-Tiere mit $2,1 \pm 0,5$ Punkten. Nach 24 h Reperusionszeit hatten die WT-Tiere Werte von $1,4 \pm 0,6$ Punkte, bei den Gpx4^{NeuKO}-Tieren blieben die Werte erhöht bei $2,3 \pm 0,5$ Punkten. Der Unterschied im Neuroscore ist zwischen WT und KO nach 24 h signifikant. Die Erholung der WT Tiere nach 24 h Reperfusion ist ebenso signifikant. Der p-Wert beträgt je 0,001.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen der neurologischen Untersuchung zeigen die Tiere keine signifikanten Unterschiede in ihren Infarktvolumina.

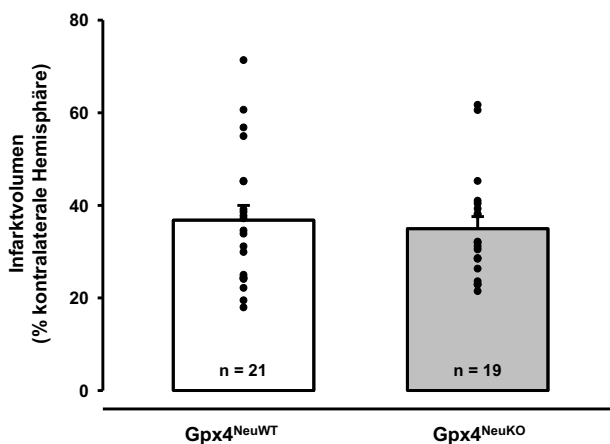


Abbildung 38: Infarktvolumen der neuronalen Gpx4 Mausmutanten. Die Infarktgröße der Gpx4^{NeuWT}-Tiere lag bei $39\% \pm 15\%$, die der Gpx4^{NeuKO}-Tiere bei $35\% \pm 12\%$.

5 Diskussion und Ausblick

Die vorliegende Arbeit hat die Rolle der astrozytären und neuronalen Gpx4 akut nach experimenteller transienter fokaler zerebraler Ischämie untersucht. In diesem Kontext hatte der Verlust der astrozytären Gpx4 weder die Funktionalität noch die Mortalität der Astrozyten beeinflusst, während der Verlust der neuronalen Gpx4 bei vergleichbaren Infarktvolu-
mina zu einem hochsignifikant höheren neurologischen Defizit nach Ischämie und 24 h Reperfusion geführt hat.

Die erstaunliche Diskrepanz zwischen der vergleichbaren Infarktmorphologie und dem signifikant unterschiedlichen neurologischen Outcome der neuronalen Gpx4-WT und -KO Mäuse wirft eine Reihe wichtiger Fragen auf. Auch aus der Zusammenschau der Daten der neuronalen Gpx4-Mausmutanten mit den Daten der astrozytären KO-Tiere ergibt sich eine spannende Diskussion um die Rolle der Gpx4 in der neurovaskulären Einheit nach Schlaganfall. Im Folgenden werden die Ergebnisse in den Kontext der aktuellen Wissenschaft gebracht und mögliche Erklärungsansätze diskutiert.

5.1 Schlaganfall-Modell

Inwieweit sind die Erkenntnisse aus Mausmodellen wie der fMCAO für die Behandlung des ischämischen Schlaganfalls beim Menschen nützlich? Die zahlreichen experimentellen Schlaganfallmodelle in Tieren haben in den letzten Jahrzehnten einen großen Beitrag zum Verständnis der Pathophysiologie des Schlaganfalls geleistet (119). Insbesondere hervorzuheben sind die Vorteile von experimentellen Schlaganfallmodellen in kleinen Nagetieren wie der Maus (120):

- Mausversuche sind ethisch akzeptierter als Versuche an Primaten, Hunden oder Katzen.
- Zahlreiche Variablen wie Komorbiditäten oder Altersunterschiede entfallen, sodass gezielt die Auswirkung eines Faktors im Kontext des Schlaganfalls untersucht werden kann.
- Physiologische Parameter wie die Körpertemperatur, Herzfrequenz oder Sauerstoffsättigung können kontinuierlich dokumentiert und kontrolliert werden, um evtl. Einflüsse auf die Infarktgröße zu vermeiden.
- Ischämiebezogene Parameter wie die Dauer der Ischämie, die Reperfusionszeit oder die Art des Infarktes (hämorrhagisch vs. Ischämisch), sind etabliert und können je nach wissenschaftlicher Fragestellung frei gewählt werden.
- Mäuse sind relativ kostengünstig in der Anschaffung, Haltung und Zucht.
- Mäuse sind die Tierart mit den am besten etablierten Möglichkeiten der genetischen Manipulation.

Zum Zweck der standardisierten und reproduzierbaren Auslösung eines Schlaganfalls im Kleintier wurden in den letzten Jahrzehnten verschiedenste Modelle generiert. Manche Modelle haben geringe Schwankungen der Infarktgröße, bilden jedoch kaum eine Penumbra aus, andere Modelle sind nah an der Pathophysiologie des Schlaganfalls beim Menschen, variieren in der Infarktgröße jedoch so sehr, dass die Auswirkungen einzelner Faktoren auf die Infarktgröße nicht sinnvoll untersucht werden können (121). Deswegen ist es von großer Bedeutung, die jeweiligen Stärken und Schwächen der Modelle zu kennen und das für die eigene Fragestellung geeignetste Modell zu wählen. Einige bekannte Schlaganfallmodelle sind beispielsweise der Verschluss der proximalen MCA über eine offene Kraniotomie unter dem M. temporalis (122, 123). Nachteile dieses Modells erklären sich durch die große Invasivität der Kraniotomie und die Eröffnung des Subarachnoidalraums. Dies birgt die Gefahr einer Subarachnoidalblutung, möglicher Gewebe- und Gefäßverletzungen, Veränderungen des intrakraniellen Drucks, der lokalen Hirntemperatur und der Hämodynamik. Ferner entspricht dies nicht der Pathophysiologie des ischämischen Schlaganfalls beim Menschen (122-124).

Am nächsten an der Realität sind vermutlich die Thrombembolie-Modelle. Die Thrombembolie kann beispielsweise mittels der Injektion von Blutthromben (125), Mikrosphären (= kleine Kugeln ähnlich derer zur Embolisation von Tumorgefäßen im Bereich der interventionellen Radiologie (Embosphere®)) (124) oder durch Photothrombose (120, 126) induziert werden. Zur Untersuchung der Effekte von thrombolytischen Substanzen ist die Injektion von geronnenen Blutthromben sicherlich die beste Wahl, jedoch unterliegen die Thrombembolie-Modelle naturgemäß einer größeren Varianz bezüglich der Infarktgröße und waren für die Fragestellung dieser Arbeit daher ungeeignet.

In dieser Arbeit wurde das Modell der fMCAO verwendet. Dies ist das mit Abstand am häufigsten verwendete experimentelle Schlaganfallmodell (121, 124, 127, 128). Es wurde von Koizumi et al. etabliert und mehrfach von anderen Arbeitsgruppen modifiziert (124, 127, 128). Es handelt sich hierbei um ein etabliertes Modell mit hoher Reproduzierbarkeit der Infarktmorphologie (121). Die Standardabweichungen sind deutlich geringer als in den Thrombembolie-Modellen (120, 124, 125). Zusätzlich bietet dieses Modell durch den Rückzug des Filaments die Möglichkeit einer Reperfusion zu einem definierten Zeitpunkt. Die Möglichkeit der Reperfusion ist ein ganz wesentlicher Vorteil, da klinische Studien zeigen konnten, dass in über 70% der Fälle beim Menschen eine spontane Reperfusion durch Thrombolyse stattfindet (129). Somit imitiert der Rückzug des Filaments die spontane Reperfusionssituation im Menschen und gibt dem Modell eine größere klinische Dimension. In diesem Zusammenhang ist auch die therapeutische Reperfusion zu erwähnen: Lange wurde der potentielle Endothelschaden, der durch das Verschieben und wieder Entfernen des Filaments im Gefäß entsteht, als Nachteil dieses Modells angesehen (120). Damals war die einzige zugelassene kausale Therapie des Schlaganfalls die medikamentöse Thrombolyse mittels rt-PA. Seit Neuestem ist jedoch die interventionelle intraarterielle Thrombektomie mittels Stentretreiver (MR CLEAN (= Multicenter Randomized Clinical trial of Endovascular treatment for Acute ischemic stroke in the Netherlands)) für die Therapie des ischämischen Schlaganfalls zugelassen (17, 18). Der Endothelschaden,

den das Filament in der fMCAO ggf. verursacht, ist somit für die vorliegende Arbeit nicht als Konfounder zu betrachten, sondern als weitere klinische Dimension in Bezug auf die Reperfusionstherapie (121). Weitere mögliche Fehlerquellen des Modells, wie eine Fehlposition oder Dislokation des Filaments während der Ischämiezeit oder eine durch den Schlaganfall ausgelöste Hyperthermie durch Hypothalamusbeteiligung (124, 130), konnte vorgebeugt werden, indem intraoperativ der rCBF gemessen wurde, im Vorfeld klare Ischämiekriterien der ACM definiert worden sind und die Ischämiezeit mit 60 min deutlich unter den Hyperthermie Grenze von mehr als 90 min lag (s. 3.4).

Deshalb war für die Fragestellung nach der Bedeutung der Gpx4 beim ischämischen Schlaganfall innerhalb der NVU und dem damit verbundenen oxidativen Stress durch ROS die fMCAO das geeignetste Modell. Dieses Modell weist die geringste Invasivität auf, lässt die Blut-Hirn-Schranke intakt und hat im Vergleich zu allen anderen Modellen die höchste Reproduzierbarkeit (121). Da unsere Ergebnisse zeigen konnten, dass der Gpx4-Verlust und der damit verbundene erhöhte oxidative Stress erstaunlicherweise nicht zu größeren Läsionen nach Ischämie führt, sollte die Bedeutung von ROS und oxidativem Stress im Gewebe näher betrachtet werden.

5.2 Reaktive Sauerstoffradikale zwischen Homöostase und Zelltod in der NVU

Wie einleitend beschrieben, führt Ischämie im Gewebe zu oxidativem Stress (39, 40). Es ist auch bekannt, dass die dauerhafte Belastung durch oxidativen Stress zu Zellschäden bis hin zum Zelltod führen kann. Ferner sind zahlreiche chronische Erkrankungen mit oxidativem Stress assoziiert, wie bspw. neurodegenerative Erkrankungen wie Morbus Parkinson (80), Morbus Alzheimer (82, 85), oder systemische Erkrankungen wie Arteriosklerose (35). Erstaunlicherweise konnten die Ergebnisse dieser Forschungsarbeit, nicht wie erwartet, den Zusammenhang zwischen erhöhtem oxidativen Stress nach Schlaganfall und vermehrtem Zelltod, schlechterem neurologischen Outcome oder größerem Infarktvolumen bestätigen. Die Ergebnisse dieser Arbeit bestärken die Erkenntnisse der letzten Jahre, dass Sauerstoffradikale nicht nur toxische Nebenprodukte der Atmungskette sind (27). ROS sind hochreaktive und somit potentiell schädliche Moleküle, jedoch entstehen sie nicht nur unter pathologischen Bedingungen, wie z. B. nach Strahlenexposition oder anderen Noxen, sondern auch physiologisch während des natürlichen Zellstoffwechsels (26, 131). Diese naturgemäß anfallenden, basalen ROS-Level, sind für die Signaltransduktion und Proliferation der Zelle in der Protein- und Transkriptionsregulation essentiell (27, 131, 132). Die genauen pathophysiologischen Mechanismen, durch welche ROS den Spagat zwischen gesunder Zellhomöostase und Zelltod bewältigen und regulativ in die Pathophysiologie von Erkrankungen eingreifen, sind noch ungeklärt (131). Auch über das physiologische Maß hinausgehende ROS-Level stellen einen wichtigen Teil des Zellmetabolismus dar (131). Unter anderem greifen die anfallenden ROS positiv in Autophagie, Zelldifferenzierung und das Immunsystem ein (133). Der Zellstoffwechsel passt sich dem erhöhten Stress an, indem Reparatursysteme und Schutzmechanismen hochgefahren

werden (131, 134). Dazu zählt bspw. die erhöhte Transkription von HIF-1 (Hypoxie-Induzierender-Faktor 1), welcher direkt mit erhöhtem oxidativem Stress verlinkt ist (134). HIF-1 ist ein Transkriptionsfaktor, der direkt die Synthese von Stoffen fördert, die im hypoxischen Zustand eine bessere Versorgung der Zelle mit Sauerstoff gewährleisten. Dazu zählen Erythropoetin (EPO), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und Enzyme der Glykolyse (134). Sogar das Tumorsuppressorgen p53, welches maßgeblich an der Einleitung des programmierten Zelltods und dem Zellarrest beteiligt ist, wird durch die Anwesenheit von ROS bei oxidativem Stress durch Ischämie stabilisiert (135). So wird auch die Gpx4-Expression zum Schutz unter oxidativem Stress hochreguliert; sowohl bei chronischen Erkrankungen (80), aber auch im Akutfall wie nach Schädel-Hirn-Trauma (118). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass bereits 24 h nach akutem Schlaganfall die Gpx4-Expression signifikant hochreguliert wurde. Diese Vielzahl an regulatorischen Mechanismen zeigt, dass ROS nicht nur als Schadstoffe - die zu Stress, Zellschäden und Zelltod führen - gesehen werden dürfen, sondern vielmehr als eine Art wichtige Second Messenger und Modulatoren der zellulären Homöostase. Sie sind Initiatoren wichtiger Adaptations- und Reparaturmechanismen der Zelle bei Stress (27). Diese regulatorischen Mechanismen werden unter dem sog. Redox-Signaling zusammengefasst: Das ist die spezifische Aktivierung oder auch Inaktivierung von Molekülen durch ROS bei intaktem antioxidativen Schutzsystem und entsprechender Reparaturkapazität der Zelle (136).

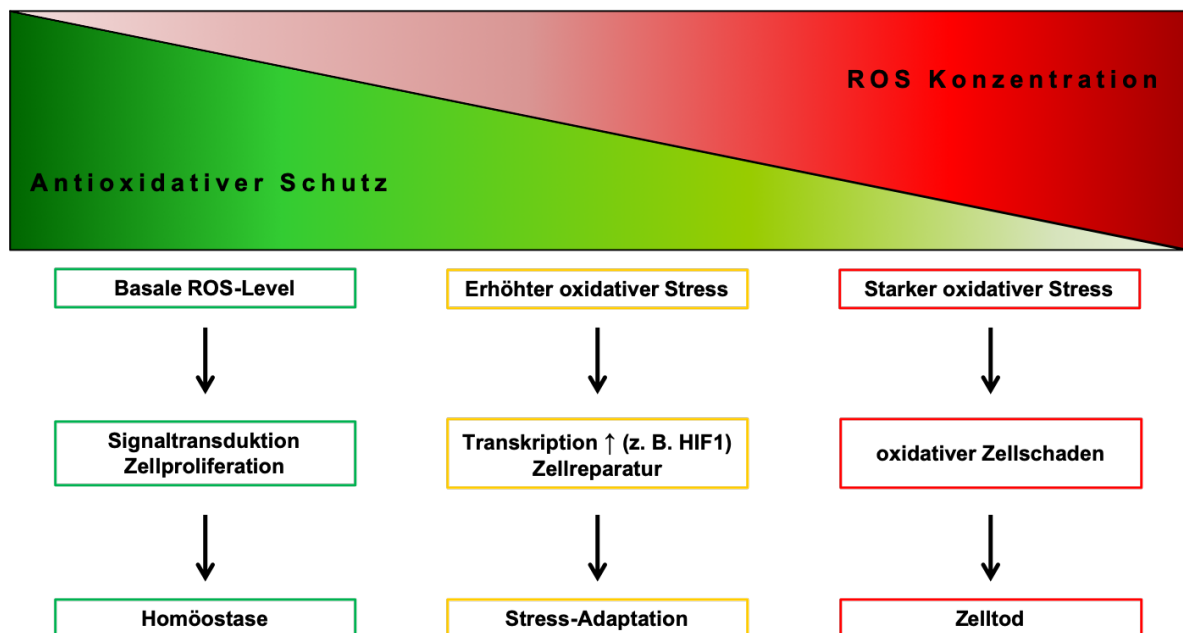


Abbildung 39: Oxidativer Stress: Zwischen Homöostase und Zelltod.

Basale Mengen an ROS spielen eine wichtige Rolle in der Erhaltung der Zellhomöostase der Zelle. Mit steigender Menge an ROS steigt der oxidative Stress auf das Gewebe. Bei mildem oxidativem Stress kann die Zelle in die Stress-Adaptation übergehen, die durch die Radikale verursachten Molekülmodifikationen durch das Hochregulieren von Reparaturmechanismen rückgängig machen und Überlebenssignale in Gang setzen. Übersteigt die Menge an ROS die Puffer- und Reparaturkapazitäten der Zelle, führt der daraus resultierende schwere oxidative Stress zu Zellschäden und Zelltod. Da Fette, Proteine und DNS jeweils unterschiedlich schwer zu oxidieren sind, kann man selbst bei irreversiblen Modifikationen an den jeweiligen Molekülen von einer Art „Hackordnung“ oder selektiver Signaltransduktion sprechen. Die Übergänge zwischen Homöostase, Stress-Adaptation und Zelltod sind fließend und vom Zelltyp abhängig (26, 131, 133).

5.2.1 Gpx4 in Abgrenzung zu anderen antioxidativen Schutzmechanismen

In der Einleitung wurden die wichtigsten antioxidativen Schutzmechanismen genannt und die besonderen Eigenschaften der Gpx4 im Körper und in der neurovaskulären Einheit betont. Wir konnten zeigen, dass der zellspezifische Gpx4-Verlust im akuten Schlaganfallmodell überraschenderweise bei der Infarktgröße eine untergeordnete Rolle zu spielen scheint. Es stellt sich daher die Frage, welche Mechanismen das Gehirn vor oxidativem Stress nach Ischämie schützen. Hierfür ist eine detailliertere Betrachtung der ROS-Neutralisierung in Zellen erforderlich. Da selbst der zum Leben nötige Sauerstoff (O_2) in der Atmosphäre genau genommen ein freies Radikal ist, unsere Zellen zusätzlich physiologisch kontinuierlich Sauerstoffradikale produzieren und der Übergang von nötiger ROS-Menge zu schädlicher ROS-Menge fließend ist, ist das antioxidative Schutzsystem, welches diese Balance hält hochkomplex (26, 133). Unser Körper ist fortwährend damit beschäftigt, so viel ROS wie nötig zu produzieren und so rasch als möglich zu eliminieren, um oxidativen Zellschaden zu vermeiden. Um dieses Gleichgewicht – bei zusätzlichem Stress wie Hypoxie, Ischämie, Glukosemangel, radioaktiver Strahlung usw. – aufrecht zu halten, ist ein speziell eingespieltes Radikale-neutralisierendes System von Nöten. Die einzelnen Akteure dieses Systems müssen ihre Aufgaben erfüllen und zeitgleich unterschiedlich schnell in bestimmten Zellkompartimenten agieren. Durch dieses Zusammenspiel von unterschiedlichen Reaktionsgeschwindigkeiten und Zellkompartimenten können die antioxidativen Systeme insgesamt einen ganzheitlichen und effektiven Schutz gewährleisten und die, für die Zelle nötigen, ROS-Level aufrecht erhalten. Das am häufigsten natürlich vorkommende Sauerstoffradikal der Zelle ist das Superoxidradikal ($O_2^{\cdot-}$) (137). Nicht nur physiologisch, sondern auch unter Hypo-/ Hyperoxie und unter Ischämie ist das $O_2^{\cdot-}$ neben Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und Stickstoffmonoxid (NO) das prädominante Sauerstoffradikal (138). Die Superoxiddismutase (SOD) reduziert das anfallende $O_2^{\cdot-}$ zum weniger reaktiven H_2O_2 , welches wiederum durch Katalasen (CAT), Peroxiredoxine (PRX) und die Glutathionperoxidasen weiter zu Wasser (H_2O) reduziert wird (26, 137).

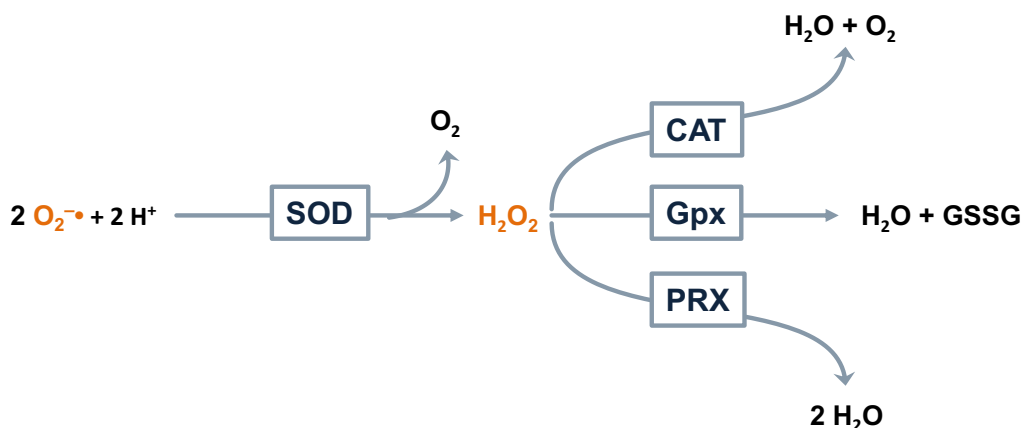


Abbildung 40: Enzymatische ROS-Neutralisierung. Zunächst wird das am häufigsten anfallende $O_2^{\cdot-}$ Radikal durch die SOD unter Abspaltung von O_2 zu H_2O_2 verarbeitet. Das H_2O_2 wiederum kann nun von CAT, Gpx oder PRX zu H_2O neutralisiert werden (26, 137, 138).

Obwohl die SOD an der Front der $O_2^{\cdot-}$ -Abwehr steht und erst dann CAT, PRX und Gpx das daraus resultierende H_2O_2 neutralisieren, bedeutet dies nicht, dass alle Enzyme gleich stark und schnell auf ROS reagieren. Die SODs zählen zu der wichtigsten zellulären Abwehr gegen $O_2^{\cdot-}$ (131). Gemeinsam mit den CATs zeigen die SODs die höchste enzymatische Aktivität, sodass SODs und CATs eine in etwa 100-fach höhere enzymatische Aktivität aufweisen als Glutathionperoxidasen (139-142). Besonders diskutiert wird die Wichtigkeit der Gpx im Vergleich zur PRX bei der Neutralisierung von H_2O_2 . Auf der einen Seite garantiert das Selenocystein im aktiven Zentrum der Gpx4 eine schnelle Reaktion mit H_2O_2 und zugleich eine schnelle Regeneration über GSH (43). Hinzu kommen die zusätzlichen spezifischen Eigenschaften der Glutathionperoxidasen (s. Einleitung), sodass die Glutathionperoxidasen seit langem zu den wichtigsten Enzymen der H_2O_2 -Neutralisierung zählen (26, 43). Auf der anderen Seite liegen die Peroxireduktasen trotz ihrer langsameren Reaktionsgeschwindigkeit in etwa 10-fach höherer Konzentration intrazellulär vor und haben eine relativ niedrige Michaelis-Menten-Konstante (K_m) für H_2O_2 , womit sie die langsamere Reaktionsgeschwindigkeit kompensieren könnten (26, 133, 138). Einfach gesprochen, könnte man einerseits argumentieren, dass die relativ geringere intrazelluläre Konzentration der Gpx4 dazu führt, dass im Vergleich zu PRX, ein großer Anteil des Gpx-Systems relativ schnell oxidiert und das Schutzsystem schnell ausgelastet ist (138). Andererseits ist es denkbar, dass die beiden Enzymklassen aufgrund ihrer unterschiedlichen Eigenschaften jeweils andere Schwerpunkte innerhalb der ROS-Neutralisierung haben: Während die PRX mit ihrer hohen Affinität, hohen intrazellulären Konzentration, sowie dem ubiquitärem Vorkommen in Zellen, steigende ROS-Level großflächig eindämmen kann, um die Zelle im Bereich der „ROS-Homöostase“ zu halten (s. Abb. 39), könnte die zwar in geringerer Konzentration vorhandene, aber schneller reagierende Gpx erst bei weiter steigender ROS-Konzentration eingreifen (133). Hier wäre es denkbar, dass die Gpx als eine Art „Feintuning-Enzym“ im Rahmen der ROS-Neutralisierung steigende (PRX-Kapazität übersteigende) ROS-Level schnell dezimiert, um die Zelle gerade noch in der Stress-Adaptation zu halten (s. Abb. 39) und dadurch Schutz- und Reparaturmechanismen zu initiieren, bevor oxidative Schäden bzw. Zelltod auftreten.

5.2.2 Astrozyten und astrozytärer Gpx4-Verlust

Während eines Schlaganfalls wird der Ablauf an wichtigen Aufgaben, die die Astrozyten innehaben (s. Einleitung), abrupt gestört. Trotzdem sind Astrozyten die Spielermacher bei metabolischen, genetischen und reaktiven Antworten des Gehirns auf den Schaden durch Ischämie (96). Im Vergleich zu Neuronen sind Astrozyten, sowohl in-vitro als auch in-vivo, in Punkto Ischämie deutlich robuster: Während die Mehrzahl der Neuronen nach 60-90 min Glukose- und Sauerstoffdeprivation in Zellkultur sterben, sind Astrozyten erst nach 4-6 h irreversibel geschädigt (97, 143). Astrozyten in direkter Nachbarschaft zum Infarkt zeigen erhebliche Veränderungen in ihrer Morphologie, Genexpression, Proliferation und Funktion; so fahren Astrozyten u. a. die GFAP-Expression hoch, ein Vorgang der als reaktive Astrogliose bekannt ist (94, 96). Wie wir in dieser Arbeit zeigen konnten, scheinen die Astrozyten trotz ausgeknockter Gpx4 die beiden letzteren Aufgaben (Überleben und Reaktivität) bewältigen zu können. In der Immunfluoreszenz ist im Peri-Infarktgebiet ein

signifikanter Anstieg der GFAP-positiven Fläche im Vergleich zur kontralateralen Hemisphäre zu sehen. Die reaktive Astroglieose im akuten Zeitfenster nach Ischämie ist demnach trotz Gpx4-Verlust möglich. Tendenziell war bei den KO-Tieren die GFAP-positive Fläche und somit die Reaktivität der Astrozyten größer als bei den WT-Tieren. Dies könnte eine Reaktion auf den Gpx4-Verlust darstellen. Es wäre denkbar, dass durch den Verlust der Gpx4 der damit verbundene, erhöhte oxidative Stress die Reaktion der Astrozyten entsprechend stärker ausfallen lässt als bei WT-Tieren. Gleichzeitig konnte kein vermehrter Zelltod bei Astrozyten beobachtet werden, da in der gesamten Auswertung lediglich ein Astrozyt TUNEL-positiv war und dieser befand sich auf dem Hirnschnitt einer WT-Maus. Zudem zeigten wir, dass beinahe alle TUNEL-positiven Zellen Neurone waren. Somit scheint die allgemein bekannte stärkere Resistenz von Astrozyten gegenüber Sauerstoff- und Glukosemangel im Vergleich zu Neuronen trotz Gpx4-Verlust erhalten geblieben zu sein.

Die Funktionen der Astrozyten unter physiologischen Bedingungen wurden in der Einleitung beschrieben. Übersteigen durch Stress (wie bei einer akuten Ischämie) die Anforderungen an die Astrozyten ihre physiologische „Funktionskapazität“ werden sie reaktiv. Diese reaktive Astroglieose und die damit verbundene Infarktnarbenbildung ist ein zweischneidiges Schwert.

Während Astrozyten unter physiologischen Bedingungen das Gehirn vor oxidativem Stress und anderen Gefahren schützen und in ihrer Funktion unterstützen, können reaktive und gestresste Astrozyten sowohl Schaden anrichten als auch Schaden eindämmen (93, 144). Auf der einen Seite reagieren Astrozyten protektiv auf akute Ischämie mit der Freisetzung zahlreicher neurotropher Faktoren, wie dem Nerve Growth Factor (NGF), Erythropoetin (EPO), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) und Glia-Derived Neurotrophic Factor (GDNF) (97). Tierversuche in denen Fluorocitrate, ein Hemmstoff der Astrozyten Aktivierung, vor MCAO verabreicht wurde resultieren in größeren Infarkten, was auf die Schutzfunktion und Erhöhung der Ischämietoleranz durch Astrozytenaktivierung hindeutet (145). In der Penumbra helfen reaktive Astrozyten durch Phagozytose Zelltrümmer zu eliminieren (145). Die Gap Junctions der Astrozyten bleiben während der Reaktivität erhalten, so können Astrozyten durch die Umverteilung toxischer Stoffe das Hirngewebe auch unter Stress weiter schützen (97). Zudem bilden die Astrozyten eine Glianarbe um den Infarktbereich aus, die das tote Hirngewebe von dem noch vitalen Hirngewebe abgrenzt. Durch die Barrierefunktion dieser Narbe wird eine übermäßige, unkontrollierte und schädliche Ausbreitung von Entzündungsreaktionen und möglicherweise die Infarktgröße selbst eingedämmt (97). Um die Glianarbe zwischen vitalem Gewebe und Nekrosekern entstehen lassen zu können, gehen von den reaktiven Astrozyten zahlreiche inhibierende Moleküle aus. Diese Moleküle verhindern axonale Extension und Regeneration im ZNS (97). Unsere Versuche konnten zeigen, dass der Verlust der astrozytären Gpx4 in der akuten Phase nach Ischämie die Funktion der Astrozyten nicht zu beeinträchtigen scheint. Die reaktive Astrozytose, im Sinne der vermehrten GFAP-Expression im Peri-Infarktbereich, sowie das Überleben der Astrozyten scheinen unbeeinträchtigt. Auch die Infarktgröße selbst ist durch den Verlust

der astrozytären Gpx4 nicht beeinflusst. Die Infarkte der KO-Tiere sind in der Tendenz kleiner als die der WT-Tiere. Ähnlich verhält es sich mit den Daten der Vitamin-E-Mangel-Gruppen. Daraus könnte man schlussfolgern, dass der Verlust der astrozytären Gpx4, ebenso wie eine Vitamin-E Mangel diät, durch den möglicherweise erhöhten oxidativen Stress eine Art Präkonditionierung für die Astrozyten und die Hirnzellen darstellt. Es wäre denkbar, dass hierdurch die Aktivierung der Astrozyten und die anfangs noch protektiven Funktionen der Astrozyten schneller in Gang gesetzt werden und somit die etwas höhere GFAP-Expression und die tendenziell kleinere Infarktgröße zu erklären sind.

Der astrozytäre Gpx4-Verlust scheint sich nicht auf andere Zellen der NVU auszuwirken. In den IF-Doppelfärbungen zeigten die Mikrogliazellen im Peri-Infarktgebiet ihre aktivierte amöbioide Zellform. Diese kugelige Zellform ist typisch für aktivierte Mikroglia (146). Somit scheint die Reaktion der Mikroglia durch den Gpx4-KO in den Astrozyten nicht beeinträchtigt zu sein, kontralateral wie ipsilateral ist eine vergleichbare Iba1-Expression, ein Marker für aktivierte Mikroglia, zu erkennen. Des Weiteren zeigt sich im Peri-Infarktgebiet kein Unterschied im neuronalen Zelltod zwischen WT- und KO-Tieren.

Kontralateral finden sich beim astrozytären Gpx4-KO keine TUNEL-positiven Neurone, anders beim neuronalen Gpx4-KO (s. unten).

5.2.3 Neurone und neuronaler Gpx4-Verlust

Neurone sind Zellen, deren Funktionsfähigkeit stark von einer intakten Umgebung abhängt. Während des ischämischen Schlaganfalls werden freie Sauerstoffradikale gebildet, die das Hirngewebe schädigen und Neurone in Zellkultur töten können (87). Nicht nur in Zellkultur Versuchen, sondern auch in-vivo ist bekannt, dass ROS Neurone schädigen und Einfluss auf die Infarktgröße nehmen. SOD-Knockout Mäuse haben größere Infarkte nach Ischämie als Wildtyp-Tiere, ebenso kann eine Überexpression an SOD den Hirnschaden verringern (87). Unsere Versuche haben gezeigt, dass der neuronale Gpx4-KO keinen Einfluss auf die Infarktgröße hat; jedoch erstaunlicherweise das neurologische Outcome nach Schlaganfall beeinflusst. Der modifizierte Neuroscore nach Bederson liegt für die WT- und KO-Tiere nach 1 h Ischämie bei etwa 2 Punkten. Das bedeutet, dass während das Filament die ACM noch okkludiert, WT- und KO-Tiere beim Gehen zur kontralateralen Seite hin kreiseln. Normalerweise zeigt sich der Neuroscore nach 24 h Reperfusionzeit aufgrund der Erholung nach der OP und der Reperfusion der Penumbra deutlich verbessert. Dies war in den aktuellen Versuchen für die WT-Tiere der Fall. Die neuronalen Gpx4-KO-Tiere erholen sich jedoch nicht. Im Schnitt kreiseln sie noch nach 24 h Reperfusionzeit. Um eine Erklärung für die Diskrepanz zwischen den gleich großen Infarkt volumina bei deutlichen schlechteren neurologischen Befunden in den neuronalen Gpx4-KO-Tieren zu finden, werden weitere Versuche nötig sein. Wie einleitend beschrieben, zeigten induzierbare globale Gpx4-KO-Tiere neurodegenerative Erscheinungen, es könnte sich auch hier um einen stattfindenden neurologischen Schaden handeln, der von der Kresylviolett-Färbung nach Nissl nicht erfasst würde (57). Hierzu haben wir TUNEL-Färbungen angefertigt, um einen erhöhten neuronalen Zelltod zu detektieren. Im Gegensatz zu den astrozytären Gpx4-KO-Tieren zeigten sich bei den neuronalen Gpx4-KO-

Tieren kontralateral über dem Kortex verteilt TUNEL-positive Zellen (Daten im Ergebnisteil nicht gezeigt). Dies bedeutet, dass ohne zusätzliche Stressoren, wie die fMCAO, Zellschäden wie DNA-Fragmentierung durch den neuronalen Gpx4-Verlust stattfinden. Während andere Forschungsgruppen zeigen konnten, dass die KO-Induktion bei globalen Gpx4-KO-Tieren innerhalb weniger Tage zu massiven neurodegenerativen Veränderungen im Gehirn und zum Tod führt, konnten wir bestätigen, dass ein zellspezifischer neuronaler Gpx4-KO über einen Zeitraum von 3-4 Wochen nach Induktion keine offensichtlichen klinischen Auffälligkeiten zur Folge hat, aber ein vermehrter neuronaler Zellschaden histologisch nachweisbar war (57). Aber warum hat eine einstündige Ischämie im vorgeschädigten Hirngewebe keinen Einfluss auf die Infarktgröße? Eine Erklärung könnte die oben beschriebene Funktion von ROS als Signaling-Molekül sein. Durch die steigende ROS-Mengen werden u. a. die Stress-Adaptationsmechanismen der Zelle initiiert und somit protektive Moleküle und Zellschutz gefördert (26, 131, 133). In den neuronalen Gpx4-KO-Tieren könnte es zu einer vor der fMCAO stattgefundenen erhöhten Stress-Adaptation der Zellen gekommen sein, sodass die Zellen der NVU auf weiteren Stress bereits in einer Art Prækonditionierung sind. Unter ischämischer Prækonditionierung versteht man eine erhöhte Ischämietoleranz durch zuvor stattgefundene kurze Ischämieepisodes (145). Zum ersten Mal wurde dieses Phänomen vor über 30 Jahren beim Myokardinfarkt beobachtet (147). Später konnten zeitgleich zwei unabhängige Arbeitsgruppen das Prinzip der Prækonditionierung auch im Gehirn nachweisen (148, 149). Prækonditionierung im Gehirn ist sowohl in Tierexperimenten, als auch in der Klinik bei Schlaganfallpatienten zu beobachten (148-150). Prækonditionierung kann nicht nur durch Ischämie sondern auch durch Hypoxie, Hyper- oder Hypothermie, Medikamentös oder durch andere Stressreize ausgelöst werden (145). Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass der erhöhte oxidative Stress bei neuronalem Gpx4 Verlust, nicht nur vereinzelt zu neuronalem Zelltod, sondern auch zu einer Prækonditionierung bei Schlaganfall führen kann.

Ein weiterer Faktor könnten die intakten Astrozyten sein, die einen wichtigen Schutz vor oxidativem Stress und Glukosedepriavation im Gehirn bieten. Astrozyten speichern nicht nur die größten Mengen Glykogen, sondern sind auch die glutathionreichsten Zellen im Gehirn und sezernieren bei Bedarf nicht nur Ascorbinsäure, sondern weitere wichtige antioxidative Moleküle (97). Während Neurone auf Ischämie empfindlich reagieren, sind Astrozyten deutlich resistenter und bieten während der Ischämie Schutz für das neuronale Gewebe. Es wäre denkbar, dass für die Infarktgröße die neuronale Gpx4 nicht so ausschlaggebend ist wie eine intakte Astrozyten-Funktion. Wie lässt sich dadurch das hochsignifikante neurologische Defizit der KO-Tiere erklären? Aus klinischer Perspektive ist das neurologische Outcome wichtiger als das Infarktvolumen selbst. Während die Infarktvolumetrie mit der Kresylviolett- oder der TUNEL-Färbung die reine Morphologie des Infarktes darstellen, sind die Funktionsverluste des Hirns, wie beispielsweise defekte synaptische Übertragung, reduzierte Kompensationsmechanismen und verzögerte oder fehlende Regeneration, erst durch die Erhebung eines funktionellen Neuroscore evaluierbar (151). Normalerweise korreliert der modifizierte Neuroscore nach Bederson mit der Infarktgröße, da dies bei den neuronalen Gpx4-KO-Tieren nicht der Fall ist, könnte dies auf eine verminderte Fähigkeit zur Erholung der Penumbra hindeuten.

5.2.3.1 Infarktkern und Penumbra

In unseren Versuchen zeigen sowohl die neuronalen Gpx4-WT- als auch die KO-Tiere intra-ischämisch einen Neuroscore um die 2 Punkte. Zu diesem Zeitpunkt befindet sich das okkludierende Filament noch im Gefäß und sowohl der Infarktkern als auch die Penumbra sind ischämisch. Nach der Entfernung des Filaments und der somit einsetzenden Reperfusion kann die Penumbra mit noch überlebensfähigen Zellen beginnen, sich zu regenerieren. Diese Regeneration scheint bei den KO-Tieren nicht, oder verzögert stattzufinden, obwohl in der Kresylviolett-Färbung kein vergrößerter Infarkt festzustellen ist. Demnach ließe sich vorsichtig schlussfolgern, dass die Neurone bei Gpx4-Verlust zwar ihre strukturelle Integrität noch aufrechterhalten können und so mit der Kresylviolett-Färbung noch anfärbbar sind, ihre funktionelle Integrität durch die Reperfusion nicht wiederherstellbar zu sein scheint und keine oder eine geringere Erholung stattfindet.

5.3 Ausblick

Die Aufklärung der pathophysiologischen Auswirkungen von oxidativem Stress bei Schlaganfall, sowie der darauffolgenden Reaktionen der NVU als funktionelle Einheit ist von großer klinischer Bedeutung. Die Auswirkungen von reaktiven Sauerstoffradikalen und oxidativem Stress auf Zellhomöostase, Stress-Adaptationsmechanismen und Zellschaden/-tod stehen im Zentrum wissenschaftlicher Bemühungen. ROS sind nicht nur neurotoxisch, sondern in Maßen auch protektiv und daher im Zusammenhang mit dem ischämischen Schlaganfall viel diskutiert. Diese Arbeit soll zum Verständnis beitragen, welche Rolle die Glutathionperoxidase 4 innerhalb der neurovaskulären Einheit nach akuter Ischämie in-vivo innehat. Da sich der Blick dieser Arbeit auf das akute Fenster (24 h) nach ischämischen Schlaganfall beschränkt, ist zum einen die Untersuchung der Gpx4 Funktion in einem chronischen Schlaganfallmodell der nächste wichtige Schritt. Zum anderen müssen die übrigen Akteure neben Astrozyten und Neuronen in der NVU in Bezug auf den ischämischen Schlaganfall untersucht werden. Die Analyse des neuronalen bzw. astrozytären Gpx4-Verlustes im chronischen Schlaganfallmodell ist insofern interessant, als dass die Astrozyten ihre Funktionen in der subchronischen und chronischen Phase nach Ischämie verändern: Die von ihnen gebildete Glianarbe entsteht in den ersten Tagen nach einem Schlaganfall und ist erst ab dem 8. – 10. Tag voll ausgereift (94). Womöglich spielt der Verlust der astrozytären Gpx4 später, im Rahmen der Narbenbildung, eine Rolle. Ebenso ist die Langzeitentwicklung des neuronalen Gpx4-Verlustes interessant, hierbei mit genauem Blick auf neurologische Untersuchungen der Tiere, auf Grund des in dieser Arbeit hochsignifikanten Unterschieds in den neurologischen Defiziten der Mäuse. Die Langzeitversuche nach Schlaganfall waren zum Zeitpunkt der Anfertigung dieser Dissertation noch nicht möglich, da kein suffizientes chronisches Schlaganfallmodell etabliert war. Wegen der beobachteten Hochregulation der Gpx4-Expression nach 24 h Reperfusion, haben wir uns entschieden ein akutes Zeitfenster zu wählen. 2017 konnten wir in unserer AG, mit Hilfe einer optimierten postoperativen Behandlung, ein Modell für Langzeitversuche nach Schlaganfall etablieren, in dem Mäuse ein mehr als 90%iges Überleben aufweisen (152). Neben den Langzeitversuchen sollen noch die anderen Zellen der NVU,

wie beispielsweise Endothelzellen, auf den Verlust der Gpx4 nach akuter zerebraler Ischämie untersucht werden. Erst dann kann eine ganzheitliche Aussage zur Rolle der Gpx4 in der neurovaskulären Einheit nach Schlaganfall gemacht werden.

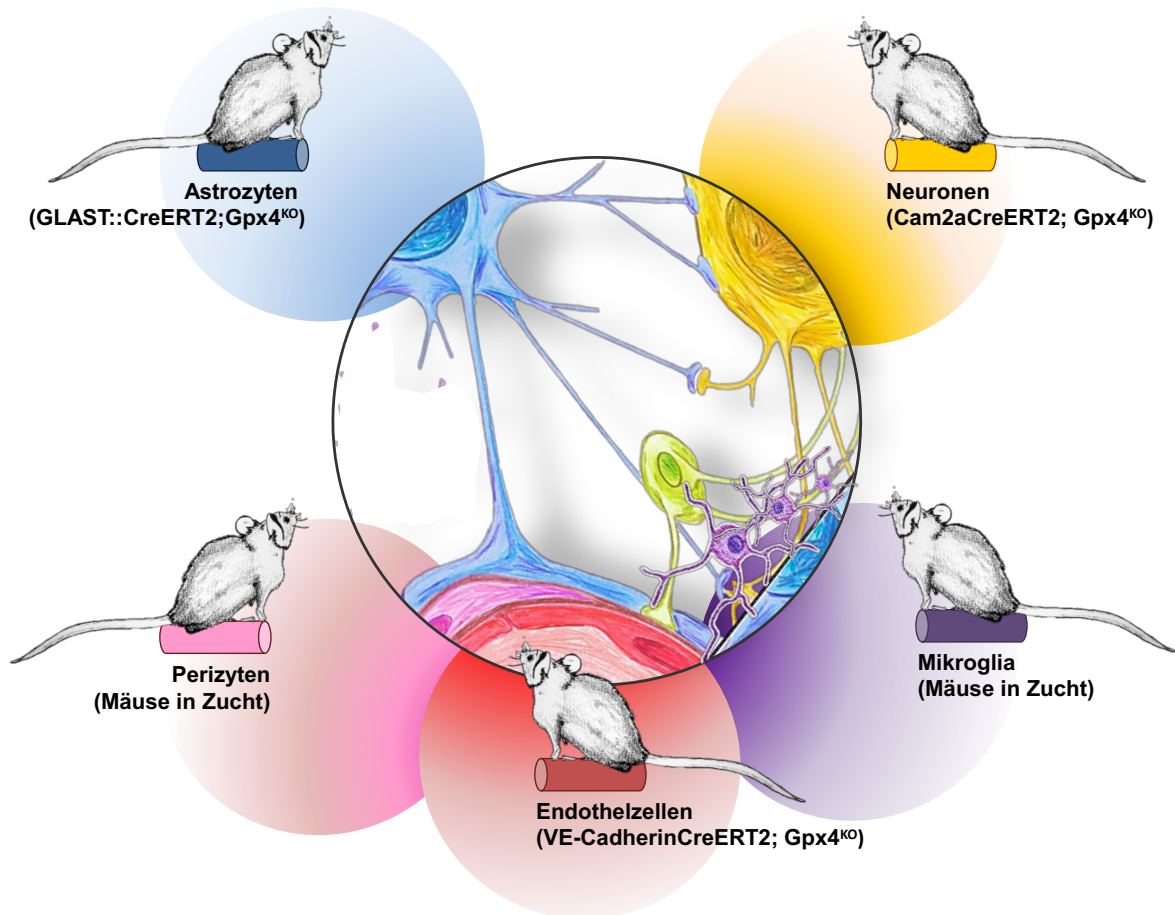


Abbildung 41: Schematische Darstellung des Zuchtplans für weitere konditionale Gpx4 knock-out Mäuse der NVU. Die Abbildung zeigt weitere zellspezifische Gpx4-KO-Mauslinien, die sich gerade für weiterführende Versuche zur Funktion von Gpx4 in der NVU bei Schlaganfall in Zucht befinden.

6 Zusammenfassung

Effektive Therapieoptionen des Schlaganfalls setzen genaue pathophysiologische Kenntnisse voraus; diese liegen bis dato nur unzureichend vor. Diese Arbeit befasst sich mit den pathophysiologischen Auswirkungen von oxidativem Stress auf die Infarktgröße und das neurologische Outcome nach Schlaganfall. Hierzu wurden neuronale und astrozytäre Gpx4-KO Tiere einer fMCAO unterzogen. Die Gpx4 ist das einzig bekannte Enzym das die Fähigkeit hat auch komplexe Lipide zu reduzieren (61, 67, 68). Vorversuche haben gezeigt, dass der globale Gpx4-KO sowohl embryonal als auch konditional-induzierbar letal ist (56, 57, 61). Wir konnten zeigen, dass die Expression der Gpx4 nach 24 h Reperfusion signifikant im Infarktgebiet ansteigt. Weiter konnten unsere Versuche belegen, dass der Verlust der astrozytären Gpx4 keinen Einfluss auf die Infarktgröße, die Hirnschwellung oder den Zelltod hat. Auch nicht unter Vitamin-E-Mangelfutter. Wir konnten zeigen, dass die essentiellen Funktionen der Astrozyten bei akutem Stress, trotz Gpx4-Verlust erhalten bleiben. Die Aktivierung der Astrozyten im Peri-Infarktbereich war mittels signifikant erhöhter GFAP-Expression im Vergleich zur kontralateralen Kontrolle evident. Des Weiteren waren die Astrozyten weiterhin robuster als die Neuronen gegenüber Ischämie (Keine TUNEL-positiven Astrozyten bei KO-Tieren). Fast alle TUNEL-positiven Zellen waren Neurone, sodass auch die Resistenz der Astrozyten im Vergleich zu Neuronen trotz Gpx4-KO erhalten bleibt. Mikrogliazellen schienen vom astrozytären Gpx4-KO nicht beeinflusst zu sein. Der neuronale Gpx4-KO hingegen beeinflusst zwar nicht das Infarktvolumen jedoch das neurologische Outcome. Neuronale Gpx4-KO Tiere haben ein hochsignifikant schlechteres neurologisches Outcome als ihre WT-Wurfgeschwister. Dies deutet auf eine noch erhaltene strukturelle Integrität der Neuronen hin, bei bereits geschädigter funktioneller Integrität. Die Ergebnisse dieser Dissertation deuten darauf hin, dass ROS in-vivo nicht rein schädliche Wirkungen haben, sondern in der Akutphase des Schlaganfalls zum einem durch die in Gang gesetzten Stress-Adaptationsmechanismen oder auch durch die ggf. stattfindende Präkonditionierung durch den Gpx4-KO auch protektive Effekte haben könnten. Insbesondere die Rolle der Gpx4 als Feintuning-Enzym im Vergleich zu anderen antioxidativen Systemen der Zelle muss innerhalb der einzelnen Akteure der NVU untersucht werden sowohl im akuten als auch im chronischen Schlaganfallmodell. Der nächste wichtige Schritt wird deswegen die Auswirkung des Gpx4 Verlustes innerhalb der NVU in einem chronischen Schlaganfallmodell sein, welches kürzlich an unserem Institut etabliert wurde (152).

7 In a nutshell

Effective therapy of ischemic stroke requires accurate pathophysiological knowledge. For stroke this is not fully available yet. This thesis focuses on the pathophysiological effects of oxidative stress on infarct size and the neurological outcome after stroke. For this purpose, neuronal and astrocytic Gpx4-KO animals were subjected to fMCAO. Gpx4 is the only known enzyme that has the ability to reduce complex lipids (61, 67, 68). Previous experiments have shown, that the global Gpx4-KO is both embryonic and conditionally inducible lethal (56, 57, 61). We were able to show, that the expression of Gpx4 increases significantly in the infarct area after 24 h reperfusion time. Furthermore, our experiments indicate that the loss of astrocytic Gpx4 has no influence on infarct size, brain swelling or cell death, not even after a vitamin E deficient diet. We were able to prove that the essential functions of the astrocytes are maintained under acute stress despite Gpx4 loss. The reactive astrocytosis in the peri-infarct area was measured by significantly higher GFAP positive area stained compared to the contralateral side. Furthermore, astrocytes continued to be more robust than neurons to ischemia (no TUNEL-positive astrocytes in KO animals). Almost all TUNEL-positive cells were neurons, so that the resistance of astrocytes in comparison to neurons is maintained despite Gpx4-KO. Microglia cells did not seem to be affected by the astrocytic Gpx4-KO. The neuronal Gpx4-KO, on the other hand, does not affect the infarct volume in the acute phase, but neurological outcome. Neuronal Gpx4-KO animals have a significantly worse neurological outcome than their WT littermates. This indicates that although structural integrity of the neurons is still maintained in the acute phase, functional integrity of neurons is damaged and therefore a lack of regeneration and recovery in the penumbra can be suggested. The results of this thesis suggest that ROS do not have purely harmful effects *in vivo*, but also protective ones in the acute phase of stroke due to the initiated stress-adaptation mechanisms or by the possible preconditioning due to the Gpx4-KO. In particular, the role of Gpx4 as a fine-tuning enzyme in comparison to other antioxidant systems of the cell, must be investigated within the individual actors of the NVU, both in the acute and in the chronic stroke model. Therefore the next important step will be the examination of the Gpx4 loss within the NVU in a chronic stroke model, recently established at our institute (152).

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Ischämiekaskade	8
Abbildung 2: Reaktionszyklus der Gpx4	11
Abbildung 3: Schematische Darstellung der genomischen Gpx4-Sequenz.....	12
Abbildung 4: Schematische Darstellung der neurovaskulären Einheit (NVU).	17
Abbildung 5: Das Cre/loxP-System.....	28
Abbildung 6: Exemplarische Gel-Elektrophorese	31
Abbildung 7: Zeitlicher Ablauf der fMCAO.	32
Abbildung 8: Befestigung der Laser-Doppler-Sonde (LDS).	34
Abbildung 9: Intraoperatives Monitoring (Screenshot).	34
Abbildung 10: Versuchsaufbau fMCAO.	35
Abbildung 11: Operationssitus mit Trigonum colli mediale (TCM).	36
Abbildung 12: Schematische Darstellung der Hirngefäßanatomie.	37
Abbildung 13: Mikroskopische Aufnahme der fMCAO-Filamente.....	38
Abbildung 14: Modifizierter Neuroscore nach Bederson.....	39
Abbildung 15: Gefrierschnitte für Infarktmetrie und IF.....	41
Abbildung 16: Schematische Darstellung der TUNEL-Färbung.....	41
Abbildung 17: Schematische Darstellung der Immunfluoreszenz-Auswertung.	43
Abbildung 18: Schematische Darstellung der WB-Versuchsgruppen und Gewebegewinnung ..	44
Abbildung 19: OP-Dauer der Vorversuche.	50
Abbildung 20: Infarktvolumina der Vorversuche.	51
Abbildung 21: Laser-Doppler-Fluxmetrie.	51
Abbildung 22: Hemisphärenvolumina Standardisierung.	52
Abbildung 23: Veranschaulichung des korrigierten Infarktvolumens.	53
Abbildung 24: Gpx4 Antikörper Charakterisierung.....	54
Abbildung 25: Gpx4 Expression nach fMCAO.	55
Abbildung 26: Neuroscore der astrozytären Mausmutanten.....	57
Abbildung 27: Infarktmetrie der astrozytären Mausmutanten.....	57
Abbildung 28: Neuronaler Zelltod im Peri-Infarktbereich (Mikroskopie).....	59
Abbildung 29: Neuronaler Zelltod im Peri-Infarktbereich (statistische Auswertung):	60
Abbildung 30: Analyse der Astrozyten im Peri-Infarktbereich (Mikroskopie).	61
Abbildung 31: Gpx4 ^{WT/KO} -Astrozyten im Peri-Infarktbereich (statistische Auswertung).	62
Abbildung 32: Mikroglia im Peri-Infarktbereich (Mikroskopie).	63
Abbildung 33: Mikroglia im Peri-Infarktbereich (statistische Auswertung).	64
Abbildung 34: Neuroscore der C57BL/6 Tiere und der astrozytären Mausmutanten unter Vitamin-E Mangel diät.	66
Abbildung 35: Infarktvolumen der C57BL/6 Tiere und der astrozytären Mausmutanten unter Vitamin-E Mangel diät.	67
Abbildung 36: Genotypisierung der präoperativ verstorbenen Gpx4 ^{NeuWT} bzw. Gpx4 ^{AstKO} -Tiere.	68
Abbildung 37: Neuroscore der neuronalen Gpx4-Mausmutanten.....	69
Abbildung 38: Infarktvolumen der neuronalen Gpx4 Mausmutanten.	69
Abbildung 39: Oxidativer Stress: Zwischen Homöostase und Zelltod.	73
Abbildung 40: Enzymatische ROS-Neutralisierung.	74
Abbildung 41: Schematische Darstellung des Zuchtplans für weitere konditionale Gpx4 knock- out Mäuse der NVU.	80

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Übersicht der Glutathionperoxidasen.....	9
Tabelle 2. Übersicht der verwendeten Primer zur Genotypisierung.....	22
Tabelle 3. Primäre Antikörper.....	24
Tabelle 4. Sekundäre Antikörper.....	24
Tabelle 5. Übersicht über die Bedingungen der Mäusehaltung.....	26
Tabelle 6. DNS-Amplifikationsprogramm für den Thermocycler.....	30
Tabelle 7. Protokoll der Kresylviolett-Färbung nach Nissl.....	40
Tabelle 8. Experimentelles Design der fMCAO Standardisierungen.....	46
Tabelle 9. Experimentelles Design der Gpx4 Expression nach Schlaganfall.....	47
Tabelle 10. Experimentelles Design der Gpx4 ^{AstWT bzw. KO} Mäuse.....	47
Tabelle 11. Experimentelles Design Vitamin-E-Mangelfutter.....	48
Tabelle 12. Experimentelles Design der Gpx4 ^{NeuWT/KO} Mäuse.....	48
Tabelle 13. Perioperative Parameter der Gpx4 ^{AstWT bzw. KO} -Tiere.....	56
Tabelle 14. Perioperative Parameter der Vitamin-E-Mangel-Tiere.....	65
Tabelle 15. Perioperative Parameter der Gpx4 ^{NeuWT/KO} -Tiere.....	68

Abkürzungsverzeichnis

a	Jahr	GFAP	glial fibrillary acid protein
A.	Arteria/Arterie	GLAST	astrozytenspezifischer Glutamatrezeptor
Abb.	Abbildung(en)	Gpx4	Glutathionperoxidase 4 (Protein)
ACC	Arteria carotis communis	<i>Gpx4</i>	<i>Glutathionperoxidase 4 (Gen)</i>
ACE	Arteria carotis externa	Gpx4 ^{AstKO}	Astrozytäre Glutathionperoxidase 4 Knock-out Tiere
ACI	Arteria carotis interna	Gpx4 ^{AstWT}	Astrozytäre Glutathionperoxidase 4 Wildtyp Tiere
ACM	Arteria carotis media	Gpx4 ^{NeuKO}	Neuronale Glutathionperoxidase 4 Knock-out Tiere
AF	Atemfrequenz	Gpx4 ^{NeuWT}	Neuronale Glutathionperoxidase 4 Wildtyp Tiere
AF	AlexaFluor 488	h	Stunde(n)
AK	Antikörper	HCl	Salzsäure
ast.	astrozytär	HRP	Horse reddish peroxidase
BHS	Blut-Hirn-Schranke	HSP90	Hitzeschockprotein 90
bp	Basenpaar(e)	Hz	Hertz (1/sec)
bpm	Herz-Frequenz	ICP	Intrakranieller Druck
BSA	Bovines Serum Albumin	i. p.	intraperitoneal
°C	Grad Celsius	Iba1	Ionized calcium binding adaptor molecule 1
Ca ²⁺	Kalzium	IF	Immunfluoreszenz
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat	ISD	Institute für Schlaganfall und Demenzforschung
CAT/CATs	Katalase/(-n)	k	kilo
CON	Kontrolle	K	knock-out
Cre	Causes recombination	KCl	Kaliumchlorid
d	Tag	KG	Körpergewicht
Da	Dalton	l	Liter
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol	LBD	Liganden-Bindungs-Domäne
ddH ₂ O	zweifach destilliertes Wasser	LD/LD-Sonde	Laser-Doppler-Fluxmetrie
DNS	2'-Desoxyribonukleinsäure	loxP Stelle	locus of crossingover P1 phage
dNTP	3'-Desoxyribonukleosid-5'-Triphosphat	μ	mikro (10 ⁻⁶)
dUTP	Desoxyuridin-Triphosphat	m	milli (10 ⁻³)
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetra-Azetat	M	molar (Mol pro Liter)
fl	flankiert von loxP-Stelle		
fMCAO	Filament Okklusion der MCA		
g	Gramm		
g	Erdbeschleunigung (G-Zahl)		

M.	Musculus/Muskel	RT	Raumtemperatur
Map2	Microtubule associated protein	s. c.	subcutan
MCA	middle cerebral artery (=ACM)	SDS-PAGE	Sodium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
MER	Modifizierter-Estrogen-Rezeptor	sec	Sekunde(n)
MgCl ₂	Magnesiumchlorid	sek.	Sekundär
min	Minute(n)	SEM	Standardfehler des Mittelwerts
N.	Nervus/Nerv	SOD/SODs	Superoxiddismutase/(-n)
NaCl	Natriumchlorid, Kochsalz	Tab.	Tabelle
neu.	Neuron/neuronal	TAE	Tris-Acetat-EDTA
NeuN	Neuron specific nuclear protein	Taq-Polymerase	Polymerase aus Thermophilus aquaticus (hitzebeständig)
NVU	Neurovaskuläre Einheit	TE	Tris-EDTA-Puffer
OP	Operation	Tris	α, α, α-Tris-(hydroxymethyl)methylamin
p. a.	per analysi	TrxR	Thioredoxinreduktase
p. o.	per os (Verabreichung oral)	U	Unit(s), Einheit enzymatischer Aktivität
PBS	Phosphate Buffered Saline	UTP	Uridin-5'-Triphosphat
PCR	Polymerase Chain Reaction	V	Volt
PFA	Paraformaldehyd	V.	Vena/Vene
pH	potentia hydrogenii	v/v	Volumenprozent
prim.	Primär	w/v	Gewichtsprozent
R ²	Bestimmtheitsmaß (Gütemaß der linearen Regression)	WB	Western Blot
rCBF	regionale zerebrale Durchblutung	WT	Wildtyp
Re(t)	Reperusionszeit		
ROI	Region of Interest / Auswertebereich		

Literaturverzeichnis

1. Organization WH. Global health estimates 2015: deaths by cause, age, sex, by country and by region, 2000–2015. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2016. 2017.
2. Kalra L, Langhorne P. Facilitating recovery: evidence for organized stroke care. *Journal of rehabilitation medicine*. 2007;39(2):97-102.
3. Rosamond W, Flegal K, Furie K, Go A, Greenlund K, Haase N, et al. Heart disease and stroke statistics--2008 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation*. 2008;117(4):e25-146.
4. Hans-Christoph Diener WH, Michael Forsting. Schlaganfall. Stuttgart [u.a.]: Thieme; 2004: 51-59.
5. Meyer S, Poryo M, Flotats-Bastardas M, Ebrahimi-Fakhari D, Yilmaz U. Schlaganfall bei Kindern und Jugendlichen Stroke in children and adolescents. *Der Radiologe*. 2017;57(7):569-76.
6. Olesen J, Gustavsson A, Svensson M, Wittchen HU, Jonsson B. The economic cost of brain disorders in Europe. *European journal of neurology*. 2012;19(1):155-62.
7. Sokoloff L. The metabolism of the central nervous system in vivo. *Handbook of Physiology, Section I, Neurophysiology*. 1960;3:1843-64.
8. Iadecola C. Neurovascular regulation in the normal brain and in Alzheimer's disease. *Nature reviews Neuroscience*. 2004;5(5):347-60.
9. Iadecola C. The pathobiology of vascular dementia. *Neuron*. 2013;80(4):844-66.
10. Hartmann A, Heiss W-D. Der Schlaganfall: Pathogenese, Klinik, Diagnostik und Therapie akuter zerebrovaskulärer Erkrankungen: Springer-Verlag; 2013: 89-122.
11. Manfred Dietel NS, Martin Zeitz†. *Harrisons innere Medizin Bd. 3*. Bd. 3. London: McGraw-Hill; 2012.
12. Brown WR, Thore CR. Review: cerebral microvascular pathology in ageing and neurodegeneration. *Neuropathology and applied neurobiology*. 2011;37(1):56-74.
13. De Reuck J. The human periventricular arterial blood supply and the anatomy of cerebral infarctions. *European neurology*. 1971;5(6):321-34.
14. Memezawa H, Smith ML, Siesjo BK. Penumbra tissues salvaged by reperfusion following middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke*. 1992;23(4):552-9.
15. Saver JL. Time is brain--quantified. *Stroke*. 2006;37(1):263-6.
16. Barber PA, Zhang J, Demchuk AM, Hill MD, Buchan AM. Why are stroke patients excluded from TPA therapy? An analysis of patient eligibility. *Neurology*. 2001;56(8):1015-20.
17. Berkhemer OA, Fransen PS, Beumer D, van den Berg LA, Lingsma HF, Yoo AJ, et al. A randomized trial of intraarterial treatment for acute ischemic stroke. *The New England journal of medicine*. 2015;372(1):11-20.
18. Broderick JP, Berkhemer OA, Palesch YY, Dippel DW, Foster LD, Roos YB, et al. Endovascular Therapy Is Effective and Safe for Patients With Severe Ischemic Stroke: Pooled Analysis of Interventional Management of Stroke III and Multicenter Randomized Clinical Trial of Endovascular Therapy for Acute Ischemic Stroke in the Netherlands Data. *Stroke*. 2015;46(12):3416-22.

19. Hacke W, Donnan G, Fieschi C, Kaste M, von Kummer R, Broderick JP, et al. Association of outcome with early stroke treatment: pooled analysis of ATLANTIS, ECASS, and NINDS rt-PA stroke trials. *Lancet* (London, England). 2004;363(9411):768-74.
20. Hacke W, Kaste M, Fieschi C, Toni D, Lesaffre E, von Kummer R, et al. Intravenous thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator for acute hemispheric stroke. The European Cooperative Acute Stroke Study (ECASS). *Jama*. 1995;274(13):1017-25.
21. Hossmann KA. Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia. *Annals of neurology*. 1994;36(4):557-65.
22. Heiss WD, Graf R. The ischemic penumbra. *Curr Opin Neurol*. 1994;7(1):11-9.
23. Pulsinelli W. Pathophysiology of acute ischaemic stroke. *Lancet* (London, England). 1992;339(8792):533-6.
24. Ringelstein EB, Nabavi DG. Der ischämische Schlaganfall: eine praxisorientierte Darstellung von Pathophysiologie, Diagnostik und Therapie: W. Kohlhammer Verlag; 2007: 39-46.
25. Hu HJ, Song M. Disrupted Ionic Homeostasis in Ischemic Stroke and New Therapeutic Targets. *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2017;26(12):2706-19.
26. Halliwell B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. *Plant Physiol*. 2006;141(2):312-22.
27. Rhee SG. Redox signaling: hydrogen peroxide as intracellular messenger. *Exp Mol Med*. 1999;31(2):53-9.
28. Mohr J, Wolf PA, Moskowitz MA, Mayberg MR, Von Kummer R. Stroke E-Book: Pathophysiology, Diagnosis, and Management: Elsevier Health Sciences; 2011: 97-99.
29. Astrup J, Siesjo BK, Symon L. Thresholds in cerebral ischemia - the ischemic penumbra. *Stroke*. 1981;12(6):723-5.
30. Astrup J, Symon L, Branston NM, Lassen NA. Cortical evoked potential and extracellular K⁺ and H⁺ at critical levels of brain ischemia. *Stroke*. 1977;8(1):51-7.
31. Reulen HJ. Vasogenic brain oedema. New aspects in its formation, resolution and therapy. *Br J Anaesth*. 1976;48(8):741-52.
32. Davies KJ. Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *IUBMB life*. 2000;50(4-5):279-89.
33. Siesjo BK. Cell damage in the brain: a speculative synthesis. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 1981;1(2):155-85.
34. Kontos HA. Oxygen radicals in cerebral ischemia: the 2001 Willis lecture. *Stroke*. 2001;32(11):2712-6.
35. Glavind J, Hartmann S, Clemmesen J, Jessen KE, Dam H. Studies on the role of lipoperoxides in human pathology. II. The presence of peroxidized lipids in the atherosclerotic aorta. *Acta pathologica et microbiologica Scandinavica*. 1952;30(1):1-6.
36. Ganjifrockwala FA, Joseph JT, George G. Decreased total antioxidant levels and increased oxidative stress in South African type 2 diabetes mellitus patients. *Journal of Endocrinology, Metabolism and Diabetes of South Africa*. 2017:1-5.
37. Wortmann M, Schneider M, Pircher J, Hellfritsch J, Aichler M, Vegi N, et al. Combined deficiency in glutathione peroxidase 4 and vitamin E causes multiorgan thrombus formation and early death in mice. *Circulation research*. 2013;113(4):408-17.

38. Bakir T, Sonmezoglu I, Imer F, Apak R. Antioxidant/prooxidant effects of alpha-tocopherol, quercetin and isorhamnetin on linoleic acid peroxidation induced by Cu(II) and H₂O₂. *International journal of food sciences and nutrition*. 2014;65(2):226-34.
39. Siesjo BK, Zhao Q, Pahlmark K, Siesjo P, Katsura K, Folbergrova J. Glutamate, calcium, and free radicals as mediators of ischemic brain damage. *The Annals of thoracic surgery*. 1995;59(5):1316-20.
40. Khoshnam SE, Winlow W, Farzaneh M, Farbood Y, Moghaddam HF. Pathogenic mechanisms following ischemic stroke. *Neurological Sciences*. 2017:1-20.
41. Siegenthaler W, Amann-Vesti BR. *Klinische Pathophysiologie*. Stuttgart; New York: Thieme; 2006.
42. Yang WS, SriRamaratnam R, Welsch ME, Shimada K, Skouta R, Viswanathan VS, et al. Regulation of ferroptotic cancer cell death by GPX4. *Cell*. 2014;156(1-2):317-31.
43. Brigelius-Flohe R, Maiorino M. Glutathione peroxidases. *Biochimica et biophysica acta*. 2013;1830(5):3289-303.
44. Schweizer U, Brauer AU, Kohrle J, Nitsch R, Savaskan NE. Selenium and brain function: a poorly recognized liaison. *Brain research Brain research reviews*. 2004;45(3):164-78.
45. Flohe L, Gunzler WA, Schock HH. Glutathione peroxidase: a selenoenzyme. *FEBS letters*. 1973;32(1):132-4.
46. Lindenau J, Noack H, Asayama K, Wolf G. Enhanced cellular glutathione peroxidase immunoreactivity in activated astrocytes and in microglia during excitotoxin induced neurodegeneration. *Glia*. 1998;24(2):252-6.
47. Rotruck JT, Pope AL, Ganther HE, Swanson AB, Hafeman DG, Hoekstra WG. Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science (New York, NY)*. 1973;179(4073):588-90.
48. Chu FF, Doroshow JH, Esworthy RS. Expression, characterization, and tissue distribution of a new cellular selenium-dependent glutathione peroxidase, GSHPx-GI. *The Journal of biological chemistry*. 1993;268(4):2571-6.
49. Takahashi K, Avissar N, Whitin J, Cohen H. Purification and characterization of human plasma glutathione peroxidase: a selenoglycoprotein distinct from the known cellular enzyme. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1987;256(2):677-86.
50. Whitin JC, Bhamre S, Tham DM, Cohen HJ. Extracellular glutathione peroxidase is secreted basolaterally by human renal proximal tubule cells. *American journal of physiology Renal physiology*. 2002;283(1):F20-8.
51. Burk RF, Olson GE, Winfrey VP, Hill KE, Yin D. Glutathione peroxidase-3 produced by the kidney binds to a population of basement membranes in the gastrointestinal tract and in other tissues. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2011;301(1):G32-8.
52. Borchert A, Savaskan NE, Kuhn H. Regulation of expression of the phospholipid hydroperoxide/sperm nucleus glutathione peroxidase gene. Tissue-specific expression pattern and identification of functional cis- and trans-regulatory elements. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(4):2571-80.
53. Moreno SG, Laux G, Brielmeier M, Bornkamm GW, Conrad M. Testis-specific expression of the nuclear form of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx). *Biological chemistry*. 2003;384(4):635-43.
54. Pfeifer H, Conrad M, Roethlein D, Kyriakopoulos A, Brielmeier M, Bornkamm GW, et al. Identification of a specific sperm nuclei selenoenzyme necessary for protamine thiol

- cross-linking during sperm maturation. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2001;15(7):1236-8.
55. Schneider M, Vogt Weisenhorn DM, Seiler A, Bornkamm GW, Brielmeier M, Conrad M. Embryonic expression profile of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Gene expression patterns : GEP*. 2006;6(5):489-94.
56. Yant LJ, Ran Q, Rao L, Van Remmen H, Shibatani T, Belter JG, et al. The selenoprotein GPX4 is essential for mouse development and protects from radiation and oxidative damage insults. *Free radical biology & medicine*. 2003;34(4):496-502.
57. Yoo SE, Chen L, Na R, Liu Y, Rios C, Van Remmen H, et al. Gpx4 ablation in adult mice results in a lethal phenotype accompanied by neuronal loss in brain. *Free radical biology & medicine*. 2012;52(9):1820-7.
58. Ursini F, Maiorino M, Valente M, Ferri L, Gregolin C. Purification from pig liver of a protein which protects liposomes and biomembranes from peroxidative degradation and exhibits glutathione peroxidase activity on phosphatidylcholine hydroperoxides. *Biochimica et biophysica acta*. 1982;710(2):197-211.
59. Ghyselinck NB, Dufaure JP. A mouse cDNA sequence for epididymal androgen-regulated proteins related to glutathione peroxidase. *Nucleic acids research*. 1990;18(23):7144.
60. Kryukov GV, Castellano S, Novoselov SV, Lobanov AV, Zehtab O, Guigo R, et al. Characterization of mammalian selenoproteomes. *Science (New York, NY)*. 2003;300(5624):1439-43.
61. Conrad M. Transgenic mouse models for the vital selenoenzymes cytosolic thioredoxin reductase, mitochondrial thioredoxin reductase and glutathione peroxidase 4. *Biochimica et biophysica acta*. 2009;1790(11):1575-85.
62. Chen YI, Wei PC, Hsu JL, Su FY, Lee WH. NPGPx (GPx7): a novel oxidative stress sensor/transmitter with multiple roles in redox homeostasis. *American journal of translational research*. 2016;8(4):1626-40.
63. Nguyen VD, Saaranen MJ, Karala AR, Lappi AK, Wang L, Raykhel IB, et al. Two endoplasmic reticulum PDI peroxidases increase the efficiency of the use of peroxide during disulfide bond formation. *Journal of molecular biology*. 2011;406(3):503-15.
64. Morikawa K, Gouttenoire J, Hernandez C, Dao Thi VL, Tran HT, Lange CM, et al. Quantitative proteomics identifies the membrane-associated peroxidase GPx8 as a cellular substrate of the hepatitis C virus NS3-4A protease. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2014;59(2):423-33.
65. Roveri A, Casasco A, Maiorino M, Dalan P, Calligaro A, Ursini F. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase of rat testis. Gonadotropin dependence and immunocytochemical identification. *The Journal of biological chemistry*. 1992;267(9):6142-6.
66. Schneider M, Forster H, Boersma A, Seiler A, Wehnes H, Sinowatz F, et al. Mitochondrial glutathione peroxidase 4 disruption causes male infertility. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2009;23(9):3233-42.
67. Ursini F, Bindoli A. The role of selenium peroxidases in the protection against oxidative damage of membranes. *Chemistry and physics of lipids*. 1987;44(2-4):255-76.
68. Ursini F, Maiorino M, Gregolin C. The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Biochimica et biophysica acta*. 1985;839(1):62-70.
69. Conrad M, Moreno SG, Sinowatz F, Ursini F, Kolle S, Roveri A, et al. The nuclear form of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase is a protein thiol peroxidase

contributing to sperm chromatin stability. *Molecular and cellular biology*. 2005;25(17):7637-44.

70. Savaskan NE, Ufer C, Kuhn H, Borchert A. Molecular biology of glutathione peroxidase 4: from genomic structure to developmental expression and neural function. *Biological chemistry*. 2007;388(10):1007-17.

71. Kelner MJ, Montoya MA. Structural organization of the human selenium-dependent phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase gene (GPX4): chromosomal localization to 19p13.3. *Biochemical and biophysical research communications*. 1998;249(1):53-5.

72. Pushpa-Rekha TR, Burdsall AL, Oleksa LM, Chisolm GM, Driscoll DM. Rat phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase. cDNA cloning and identification of multiple transcription and translation start sites. *The Journal of biological chemistry*. 1995;270(45):26993-9.

73. Ursini F, Heim S, Kiess M, Maiorino M, Roveri A, Wissing J, et al. Dual function of the selenoprotein PHGPx during sperm maturation. *Science (New York, NY)*. 1999;285(5432):1393-6.

74. Xie Y, Hou W, Song X, Yu Y, Huang J, Sun X, et al. Ferroptosis: process and function. *Cell Death Differ*. 2016;23(3):369-79.

75. Angeli JPF, Shah R, Pratt DA, Conrad M. Ferroptosis Inhibition: Mechanisms and Opportunities. *Trends in pharmacological sciences*. 2017;38(5):489-98.

76. Friedmann Angeli JP, Schneider M, Proneth B, Tyurina YY, Tyurin VA, Hammond VJ, et al. Inactivation of the ferroptosis regulator Gpx4 triggers acute renal failure in mice. *Nature cell biology*. 2014;16(12):1180-91.

77. Carlson BA, Tobe R, Yefremova E, Tsuji PA, Hoffmann VJ, Schweizer U, et al. Glutathione peroxidase 4 and vitamin E cooperatively prevent hepatocellular degeneration. *Redox biology*. 2016;9:22-31.

78. Chen L, Hambright WS, Na R, Ran Q. Ablation of the Ferroptosis Inhibitor Glutathione Peroxidase 4 in Neurons Results in Rapid Motor Neuron Degeneration and Paralysis. *The Journal of biological chemistry*. 2015;290(47):28097-106.

79. Matsushita M, Freigang S, Schneider C, Conrad M, Bornkamm GW, Kopf M. T cell lipid peroxidation induces ferroptosis and prevents immunity to infection. *The Journal of experimental medicine*. 2015;212(4):555-68.

80. Bellinger FP, Bellinger MT, Seale LA, Takemoto AS, Raman AV, Miki T, et al. Glutathione Peroxidase 4 is associated with Neuromelanin in Substantia Nigra and Dystrophic Axons in Putamen of Parkinson's brain. *Mol Neurodegener*. 2011;6(1):8.

81. Cardoso BR, Hare DJ, Bush AI, Roberts BR. Glutathione peroxidase 4: a new player in neurodegeneration? *Molecular psychiatry*. 2017;22(3):328-35.

82. Hambright WS, Fonseca RS, Chen L, Na R, Ran Q. Ablation of ferroptosis regulator glutathione peroxidase 4 in forebrain neurons promotes cognitive impairment and neurodegeneration. *Redox biology*. 2017;12:8-17.

83. Seiler A, Schneider M, Forster H, Roth S, Wirth EK, Culmsee C, et al. Glutathione peroxidase 4 senses and translates oxidative stress into 12/15-lipoxygenase dependent- and AIF-mediated cell death. *Cell metabolism*. 2008;8(3):237-48.

84. Wirth EK, Conrad M, Winterer J, Wozny C, Carlson BA, Roth S, et al. Neuronal selenoprotein expression is required for interneuron development and prevents seizures and neurodegeneration. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2010;24(3):844-52.

85. Yoo MH, Gu X, Xu XM, Kim JY, Carlson BA, Patterson AD, et al. Delineating the role of glutathione peroxidase 4 in protecting cells against lipid hydroperoxide damage and in Alzheimer's disease. *Antioxid Redox Signal*. 2010;12(7):819-27.
86. Zhang JH, Badaut J, Tang J, Obenaus A, Hartman R, Pearce WJ. The vascular neural network--a new paradigm in stroke pathophysiology. *Nat Rev Neurol*. 2012;8(12):711-6.
87. del Zoppo GJ. Stroke and neurovascular protection. *The New England journal of medicine*. 2006;354(6):553-5.
88. Lo EH, Dalkara T, Moskowitz MA. Mechanisms, challenges and opportunities in stroke. *Nature reviews Neuroscience*. 2003;4(5):399-415.
89. del Zoppo GJ. The neurovascular unit in the setting of stroke. *J Intern Med*. 2010;267(2):156-71.
90. Nedergaard M, Ransom B, Goldman SA. New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. *Trends Neurosci*. 2003;26(10):523-30.
91. Markiewicz I, Lukomska B. The role of astrocytes in the physiology and pathology of the central nervous system. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 2006;66(4):343-58.
92. Barreto G, White RE, Ouyang Y, Xu L, Giffard RG. Astrocytes: targets for neuroprotection in stroke. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem*. 2011;11(2):164-73.
93. Becerra-Calixto A, Cardona-Gomez GP. The Role of Astrocytes in Neuroprotection after Brain Stroke: Potential in Cell Therapy. *Front Mol Neurosci*. 2017;10:88.
94. Choudhury GR, Ding S. Reactive astrocytes and therapeutic potential in focal ischemic stroke. *Neurobiol Dis*. 2016;85:234-44.
95. Pekny M, Pekna M, Messing A, Steinhauser C, Lee JM, Parpura V, et al. Astrocytes: a central element in neurological diseases. *Acta Neuropathol*. 2016;131(3):323-45.
96. Sims NR, Yew WP. Reactive astrogliosis in stroke: Contributions of astrocytes to recovery of neurological function. *Neurochem Int*. 2017;107:88-103.
97. Liu Z, Chopp M. Astrocytes, therapeutic targets for neuroprotection and neurorestoration in ischemic stroke. *Prog Neurobiol*. 2016;144:103-20.
98. Feil R, Brocard J, Mascrez B, LeMeur M, Metzger D, Chambon P. Ligand-activated site-specific recombination in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1996;93(20):10887-90.
99. Metzger D, Clifford J, Chiba H, Chambon P. Conditional site-specific recombination in mammalian cells using a ligand-dependent chimeric Cre recombinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995;92(15):6991-5.
100. Mori T, Tanaka K, Buffo A, Wurst W, Kuhn R, Götz M. Inducible gene deletion in astroglia and radial glia--a valuable tool for functional and lineage analysis. *Glia*. 2006;54(1):21-34.
101. Shibata T, Yamada K, Watanabe M, Ikenaka K, Wada K, Tanaka K, et al. Glutamate transporter GLAST is expressed in the radial glia-astrocyte lineage of developing mouse spinal cord. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1997;17(23):9212-9.
102. Kelly PT. Calmodulin-dependent protein kinase II. Multifunctional roles in neuronal differentiation and synaptic plasticity. *Molecular neurobiology*. 1991;5(2-4):153-77.
103. Ochiishi T, Terashima T, Yamauchi T. Specific distribution of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II alpha and beta isoforms in some structures of the rat forebrain. *Brain research*. 1994;659(1-2):179-93.
104. Erdmann G, Schutz G, Berger S. Inducible gene inactivation in neurons of the adult mouse forebrain. *BMC neuroscience*. 2007;8:63.

105. Indra AK, Warot X, Brocard J, Bornert JM, Xiao JH, Chambon P, et al. Temporally-controlled site-specific mutagenesis in the basal layer of the epidermis: comparison of the recombinase activity of the tamoxifen-inducible Cre-ER(T) and Cre-ER(T2) recombinases. *Nucleic acids research*. 1999;27(22):4324-7.
106. Feil R, Wagner J, Metzger D, Chambon P. Regulation of Cre recombinase activity by mutated estrogen receptor ligand-binding domains. *Biochemical and biophysical research communications*. 1997;237(3):752-7.
107. Gu H, Marth JD, Orban PC, Mossmann H, Rajewsky K. Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting. *Science (New York, NY)*. 1994;265(5168):103-6.
108. Thal SC, Plesnila N. Non-invasive intraoperative monitoring of blood pressure and arterial pCO₂ during surgical anesthesia in mice. *Journal of neuroscience methods*. 2007;159(2):261-7.
109. Engel O, Kolodziej S, Dirnagl U, Prinz V. Modeling stroke in mice - middle cerebral artery occlusion with the filament model. *Journal of visualized experiments : JoVE*. 2011(47).
110. Heimann A, Kroppenstedt S, Ulrich P, Kempfski OS. Cerebral blood flow autoregulation during hypobaric hypotension assessed by laser Doppler scanning. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 1994;14(6):1100-5.
111. Plesnila N, Friedrich D, Eriskat J, Baethmann A, Stoffel M. Relative cerebral blood flow during the secondary expansion of a cortical lesion in rats. *Neuroscience letters*. 2003;345(2):85-8.
112. Kataoka H, Kim SW, Plesnila N. Leukocyte-endothelium interactions during permanent focal cerebral ischemia in mice. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2004;24(6):668-76.
113. Hara H, Huang PL, Panahian N, Fishman MC, Moskowitz MA. Reduced brain edema and infarction volume in mice lacking the neuronal isoform of nitric oxide synthase after transient MCA occlusion. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 1996;16(4):605-11.
114. Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, Nishimura MC, Davis RL, Bartkowski H. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke*. 1986;17(3):472-6.
115. Mohan C, Long K, Mutneja M, Ma J. Detection of end-stage apoptosis by ApopTag(R) TUNEL technique. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)*. 2015;1219:43-56.
116. Katchanov J, Waeber C, Gertz K, Gietz A, Winter B, Bruck W, et al. Selective neuronal vulnerability following mild focal brain ischemia in the mouse. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*. 2003;13(4):452-64.
117. Zhang Y, Jin Y, Behr MJ, Feustel PJ, Morrison JP, Kimelberg HK. Behavioral and histological neuroprotection by tamoxifen after reversible focal cerebral ischemia. *Exp Neurol*. 2005;196(1):41-6.
118. Savaskan NE, Borchert A, Brauer AU, Kuhn H. Role for glutathione peroxidase-4 in brain development and neuronal apoptosis: specific induction of enzyme expression in reactive astrocytes following brain injury. *Free radical biology & medicine*. 2007;43(2):191-201.

119. Zivin JA, Grotta JC. Animal stroke models. They are relevant to human disease. *Stroke*. 1990;21(7):981-3.
120. Mhairi Macrae I. New models of focal cerebral ischaemia. *Br J Clin Pharmacol*. 1992;34(4):302-8.
121. Sommer CJ. Ischemic stroke: experimental models and reality. *Acta Neuropathol*. 2017;133(2):245-61.
122. Tamura A, Graham DI, McCulloch J, Teasdale GM. Focal cerebral ischaemia in the rat: 1. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 1981;1(1):53-60.
123. Tamura A, Graham DI, McCulloch J, Teasdale GM. Focal cerebral ischaemia in the rat: 2. Regional cerebral blood flow determined by [¹⁴C]iodoantipyrine autoradiography following middle cerebral artery occlusion. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 1981;1(1):61-9.
124. Gerriets T, Li F, Silva MD, Meng X, Brevard M, Sotak CH, et al. The macrosphere model: evaluation of a new stroke model for permanent middle cerebral artery occlusion in rats. *Journal of neuroscience methods*. 2003;122(2):201-11.
125. Busch E, Kruger K, Hossmann KA. Improved model of thromboembolic stroke and rt-PA induced reperfusion in the rat. *Brain research*. 1997;778(1):16-24.
126. Ginsberg MD, Busto R. Rodent models of cerebral ischemia. *Stroke*. 1989;20(12):1627-42.
127. Koizumi J, Nakazawa T, Yoshida Y, editors. Reperfusible brain infarction model in the rat. *Proceedings of the 10th Meeting of the Japanese Stroke Society; 1985: Japanese Stroke Society Kyoto, Japan*.
128. Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*. 1989;20(1):84-91.
129. Molina CA, Montaner J, Abilleira S, Ibarra B, Romero F, Arenillas JF, et al. Timing of spontaneous recanalization and risk of hemorrhagic transformation in acute cardioembolic stroke. *Stroke*. 2001;32(5):1079-84.
130. Li F, Omae T, Fisher M. Spontaneous hyperthermia and its mechanism in the intraluminal suture middle cerebral artery occlusion model of rats. *Stroke*. 1999;30(11):2464-70; discussion 70-1.
131. Navarro-Yepes J, Burns M, Anandhan A, Khalimonchuk O, del Razo LM, Quintanilla-Vega B, et al. Oxidative stress, redox signaling, and autophagy: cell death versus survival. *Antioxid Redox Signal*. 2014;21(1):66-85.
132. D'Autreaux B, Toledano MB. ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2007;8(10):813-24.
133. Sena LA, Chandel NS. Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. *Mol Cell*. 2012;48(2):158-67.
134. Chandel NS, Maltepe E, Goldwasser E, Mathieu CE, Simon MC, Schumacker PT. Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1998;95(20):11715-20.
135. Chandel NS, Vander Heiden MG, Thompson CB, Schumacker PT. Redox regulation of p53 during hypoxia. *Oncogene*. 2000;19(34):3840-8.

136. Putker M, Madl T, Vos HR, de Ruiter H, Visscher M, van den Berg MC, et al. Redox-dependent control of FOXO/DAF-16 by transportin-1. *Mol Cell*. 2013;49(4):730-42.
137. Krishnamurthy P, Wadhvani A. Antioxidant enzymes and human health. In: El-Missiry MA, editor. *Antioxidant enzyme: InTechOpen*; 2012.
138. Winterbourn CC, Hampton MB. Thiol chemistry and specificity in redox signaling. *Free radical biology & medicine*. 2008;45(5):549-61.
139. Patockova J, Marhol P, Tumova E, Krsiak M, Rokyta R, Stipek S, et al. Oxidative stress in the brain tissue of laboratory mice with acute post insulin hypoglycemia. *Physiol Res*. 2003;52(1):131-5.
140. Rhoads DE, Contreras C, Fathalla S. Brain Levels of Catalase Remain Constant through Strain, Developmental, and Chronic Alcohol Challenges. *Enzyme Research*. 2012;2012:572939.
141. Tsay HJ, Wang P, Wang SL, Ku HH. Age-associated changes of superoxide dismutase and catalase activities in the rat brain. *J Biomed Sci*. 2000;7(6):466-74.
142. Popov B, Gadjeva V, Valkanov P, Popova S, Tolekova A. Lipid peroxidation, superoxide dismutase and catalase activities in brain tumor tissues. *Arch Physiol Biochem*. 2003;111(5):455-9.
143. Gurer G, Gursoy-Ozdemir Y, Erdemli E, Can A, Dalkara T. Astrocytes are more resistant to focal cerebral ischemia than neurons and die by a delayed necrosis. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*. 2009;19(4):630-41.
144. Hayakawa K, Esposito E, Wang X, Terasaki Y, Liu Y, Xing C, et al. Transfer of mitochondria from astrocytes to neurons after stroke. *Nature*. 2016;535(7613):551-5.
145. Koizumi S, Hirayama Y, Morizawa YM. New roles of reactive astrocytes in the brain; an organizer of cerebral ischemia. *Neurochem Int*. 2018;119:107-14.
146. Ma Y, Wang J, Wang Y, Yang GY. The biphasic function of microglia in ischemic stroke. *Prog Neurobiol*. 2017;157:247-72.
147. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*. 1986;74(5):1124-36.
148. Kirino T, Tsujita Y, Tamura A. Induced tolerance to ischemia in gerbil hippocampal neurons. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 1991;11(2):299-307.
149. Kitagawa K, Matsumoto M, Tagaya M, Hata R, Ueda H, Niinobe M, et al. 'Ischemic tolerance' phenomenon found in the brain. *Brain research*. 1990;528(1):21-4.
150. Weih M, Kallenberg K, Bergk A, Dirnagl U, Harms L, Wernecke KD, et al. Attenuated stroke severity after prodromal TIA: a role for ischemic tolerance in the brain? *Stroke*. 1999;30(9):1851-4.
151. Corbett D, Nurse S. The problem of assessing effective neuroprotection in experimental cerebral ischemia. *Prog Neurobiol*. 1998;54(5):531-48.
152. Lourbopoulos A, Mamrak U, Roth S, Balbi M, Shrouder J, Liesz A, et al. Inadequate food and water intake determine mortality following stroke in mice. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2017;37(6):2084-97.

Danksagung

Vorweg gilt mein Dank meinem Doktorvater – Prof. Dr. med. Nikolaus Plesnila, der mir dieses Thema überlassen hat. Danke, Nick, dass du mich erst in die Welt der Wissenschaft eingeführt hast und mich anschließend mit Ideen, Feedback und Hilfestellungen auf meinem Weg begleitet hast. Ich durfte durch diese Zusammenarbeit nicht nur wissenschaftlich, sondern auch menschlich viele Erfahrungen sammeln und persönlich reifen.

Im selben Maße gilt mein Dank Frau Dr. med. vet. Manuela Schneider, die durch ihre Betreuung diese Arbeit erst möglich machte. Danke, Manu, für deine anhaltende und unermüdliche Unterstützung und Hilfestellung in dieser Arbeit, für deine Freundschaft, für die zahlreichen zielführenden Diskussionen, deine Erfahrung, die du offen mit mir geteilt hast, das Korrekturlesen, deine Empathie in den schwierigen Phasen meines „wissenschaftlichen Lebens“ sowie für dein großes Engagement, das mich stets motivierte, mein Bestes zu geben.

Für die vielen stets offenen Ohren bei technischen und organisatorischen Fragen rund um die Versuche bedanke ich mich von Herzen bei Uta Mamrak, Peggy Kunath, Barbara Lindner und Melanie Schneider. Ganz besonderer Dank gilt an dieser Stelle Uta Mamrak. Danke, liebe Uta! Nicht nur für das Beibringen der fMCAO, sondern dafür, dass du meine „OP-Mentorin“ warst, deinen reichen Erfahrungsschatz großzügig und geduldig mit mir geteilt hast und mit deinem geschulten Auge stets einen Blick über meine Schulter geworfen hast, wenn ich gerade Infarkte verursachte oder auswertete.

Special thanks go to Ph.D. Farida Hellal. You accompanied me through long days and late evenings in the lab. I'm grateful for each moment we spent together, listening to music while discussing science, papers and eating sweets. Thank you for sharing your time and mind with me.

Ein großer Dank geht auch an die Postdoktorandinnen und Postdoktoranden sowie Promovierenden im Labor. Danke, für die vielen Kleinigkeiten zwischendurch, die Motivation und die Freundschaften, die entstanden sind.

Ferner noch möchte ich mich herzlich bei Dr. rer. nat. Marcus Conrad bedanken. Danke, Marcus, für das große Interesse an dieser Arbeit, die regelmäßige konstruktive Kritik, die zahlreichen wissenschaftlichen Ratschläge und die vielen Anregungen und Tipps.

Da diese Doktorarbeit durch das „Förderprogramm für Forschung und Lehre“ der Ludwig-Maximilians-Universität München gefördert wurde, möchte ich ebenfalls Prof. Dr. Dr. J. Heesemann für die Organisation und Leitung des Programms danken.

Für die gute Zusammenarbeit und den großen Einsatz bedanke ich mich bei dem Tierpflegeteam.

Zuletzt gilt ganz besonderer Dank meiner Familie, die mich während der Anfertigung dieser Arbeit weit über ein selbstverständliches Maß hinaus unterstützt hat. Ich möchte mich bei meinen Eltern – Peter Habertzettl, Renata Rynarzewska und Robert Rynarzewski – bedanken, dass ich dank euch diesen Weg gehen durfte. Danke, Ida, Larissa, Janina und Marlena, ich hatte in den Jahren oft nur wenig Zeit, ihr standet trotzdem immer an meiner Seite. Danke, Opa Georg, für die große und liebevolle Unterstützung meines gesamten Werdegangs, ohne die mir im Leben vieles verborgen geblieben wäre. Danke, Ewa, für die vielen Kleinigkeiten und Worte, die mich über die gesamte Zeit daran erinnerten, auf mich selbst zu achten.

Na koniec dziękuję całej mojej rodzinie z Polski za to, że pomimo odległości zawsze byliście przy mnie. Szczególnie chciałabym podziękować mojej cioci Ewie Skarzyńskiej i mojemu dziadkowi Czesławowi Napieralskiemu. To dzięki nim po raz pierwszy zwróciłam uwagę na udar mózgu. Pamięć o nich zachęcała mnie, zwłaszcza w trudnych czasach tej pracy naukowej, by nie stracić z oczu celu.

Eidesstattliche Versicherung

Ich, Iga Maria Rynarzewska, erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel:

„Oxidativer Stress an der Blut-Hirn-Schranke:

Die Rolle der Glutathionperoxidase 4 beim ischämischen Schlaganfall“

selbstständig angefertigt, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ferner versichere ich, dass ich alle in den Abbildungen verwendeten Fotografien und Zeichnungen selbst erstellt und digitalisiert habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 02.02.2020

Iga Maria Rynarzewska