

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
(Direktorin: Prof. Dr. med. Heike Kielstein)

**Zeitliche Veränderungen der Glyoxalase 1 nach akuter Gehirnschädigung und die
Rolle von Ethylpyruvat auf die astrozytäre Narbenbildung**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Philipp Pieroh
geboren am 05.12.1988 in Leipzig

Betreuer: Prof. Dr. med. Faramarz Dehghani

Gutachter: Prof. Dr. med. Faramarz Dehghani
Prof. Dr. rer. nat. Andreas Simm
Prof. Dr. rer. nat. Abdelhaq Rami (Frankfurt am Main)

14.06.2016

22.02.2017

Referat

Methylglyoxal (MG) ist ein hauptsächlich in der Glykolyse entstehendes neurotoxisches α,β -Dicarbonyl, welches Proteine in ihrer Funktion und Struktur beeinträchtigen kann. Im zentralen Nervensystem reprimiert MG den Energiehaushalt, verstärkt den oxidativen Stress und führt zur Inflammation. Entgiftet wird MG durch das ubiquitär, zytosolisch exprimierte Glyoxalase (Glo) System. Das Glo System besteht aus den Enzymen Glo1 und 2, welche MG mit Glutathion als Kofaktor zu Laktat abbauen. Veränderungen des Glo Systems wurden bereits in degenerativen und strukturellen Erkrankungen des Gehirns gezeigt. Jedoch existieren nur wenige Daten zur Rolle der Glo1 nach einer akuten Gehirnschädigung. Auch Daten zur Veränderung der Glo1 durch seinen neuroprotektiven Inhibitor Ethylpyruvat (EP) fehlen.

In organotypischen, hippocampalen Schnittkulturen konnte nach exzitotoxischer Schädigung mittels Western Blot Analysen eine zeitlich abhängige Umverteilung des Glo1 Monomers hin zum Glo1 Dimer beobachtet werden. Zudem fand sich eine Zunahme der Glo1 Immunreaktivität nach exzitotoxischer Schädigung, die einer Translokation der Glo1 hin zur neuronalen Zellmembran folgte. Anschließend wurden diese Befunde *in vivo* im Modell des permanenten Verschlusses der Arteria cerebri media (pMCAO) immunhistochemisch überprüft. Hier fand sich auf der geschädigten Seite eine starke neuronale Expression der Glo1, welche nach 60 Tagen verschwand und durch eine astrozytäre Glo1 Immunreaktivität abgelöst wurde. Nachfolgend wurde in der mikroglären Zelllinie BV2 und der neuronalen Zelllinie HT22 überprüft, inwiefern die Glo1 Immunreaktivität zeitlich und nach Stimulation variiert und ob die Glo1 Immunreaktivität durch die Behandlung mit EP verändert werden kann. In diesen Experimenten konnten keine zeitlichen, stimulations- und EP abhängigen Unterschiede der Glo1 Immunreaktion beobachtet werden. Im *scratch wound assay* primärer Astrozyten konnte gezeigt werden, dass EP die astrozytäre Narbenbildung verlangsamt. Diese Ergebnisse identifizieren Glo1 als Ziel für mögliche Neurotherapeutika. Anhand der Zellkulturversuche könnten Astrozyten der zelluläre Angriffspunkt von EP sein.

Pieroh, Philipp: Zeitliche Veränderungen der Glyoxalase 1 nach akuter Gehirnschädigung und die Rolle von Ethylpyruvat auf die astrozytäre Narbenbildung.

Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 80 Seiten, 2016

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	IV
1 Einleitung	1
1.1 Epidemiologie und Folgen des Schlaganfalls	1
1.2 Der sekundäre neuronale Schaden	1
1.2.1 Exzitotoxizität	1
1.2.2 Oxidativer Stress	3
1.2.3 Die antioxidative Abwehr und deren metabolische Konsequenz	3
1.3 Die Rolle der Glia im sekundären Schaden	5
1.3.1 Die metabolische neuronale-astrozytäre Kopplung und deren Bedeutung in der Exzitotoxizität	5
1.3.2 Reaktive Astogliose	7
1.4 Die energetische Imbalance als Schlüssel der neuronalen Destruktion	9
1.5 Methylglyoxal und das Glyoxalase System	9
1.5.1 Methylglyoxal und seine zellulären Auswirkungen	9
1.5.2 Das Glyoxalase System	10
1.6 Methylglyoxal und das Glyoxalase System im ZNS	11
1.6.1 Bedeutung der Methylglyoxal Toxizität und des Glyoxalase Systems auf die Zellen des zentralen Nervensystems	11
1.6.2 Die Rolle des Glyoxalase Systems in akuten Hirnpathologien	12
2 Zielsetzung der Arbeit	13
3 Materialien und Methoden	13
3.1 Materialien, Chemikalien, Antikörper, Geräte und Programme	14
3.2 Organotypische, hippokampale Schnittkulturen (OHSC)	20
3.2.1 Präparation und Kultivierung	20
3.2.2 Exzitotoxische Schädigung	21
3.2.3 Vorbereitung der OHSC für Western Blot und immunhistochemische Analysen	22
3.3 Der permanente Verschluss der Arteria cerebri media mittels Thermokoagulation	23
3.4 Zellkulturexperimente an Zelllinien	24
3.4.1 Kultivierung und Vermehrung der Zelllinien BV2 und HT22	24
3.4.2 Vorbereitung der Gewebekulturplatten und Zelllinien für anschließende Experimente und die immunhistochemische Analyse	25
3.4.3 Herstellung der EP Lösungen	25
3.4.4 Behandlung der BV2 Zelllinie mit LPS und EP	26
3.4.5 Behandlung der HT22 Zelllinie mit EP	27

3.5	Zellkulturexperimente an primären Astrozyten	27
3.5.1	Präparation und Kultivierung primärer Astrozyten	27
3.5.2	Scratch wound assay	28
3.6	Western Blot Analysen	29
3.7	Histochemie und Immunhistochemie	30
3.7.1	Hämalaun-Eosin Färbung	30
3.7.2	Immunfluoreszenz Färbung	31
3.7.3	Die ExtrAvidin Färbemethode	31
3.8	Auswertung	32
3.8.1	Auswertung der Western Blot Membranen	32
3.8.2	Konfokale Laserscanning Mikroskopie	32
3.8.3	Voreinstellung für die Durchlichtmikroskopie	33
3.8.4	Analyse der pMCAO Experimente	33
3.8.5	Auswertung des scratch wound assays mittels Durchlichtmikroskopie	33
3.8.6	Morphometrische Analyse der Zelllinienexperimente mittels Durchlichtmikroskopie	33
3.8.7	Statistische Auswertung	34
4	Ergebnisse	34
4.1	Die Glo1 Proteinkonzentration und Immunreaktivität zeigen schädigungs- und zeitabhängige Veränderungen im Modell der exzitotoxisch geschädigten OHSC	34
4.1.1	Die exzitotoxische Schädigung führt zu einem zeitabhängigen Anstieg des Glo1 Dimers und zu einer Verschiebung von Glo1 Monomer zu Glo1 Dimer	34
4.1.2	Im Rahmen der exzitotoxischen Schädigung kommt es zu einer zeitabhängigen Veränderung der Glo1 Immunreaktivität im GD	38
4.2	Die Glo1 Immunreaktivität weist zeitabhängige Variationen nach pMCAO auf	40
4.3	Die Stimulation mit LPS und die Behandlung mit EP verändert die Glo1 Immunreaktivität in BV2 Zellen über die Zeit nicht	42
4.4	Die Glo1 Immunreaktivität in der HT22 Zelllinie ist auf eine Subpopulation beschränkt und wird durch die Zeit und EP nicht beeinflusst	46
4.5	EP verlangsamt die astrogläre Narbenbildung	48
5	Diskussion	49
5.1	Vorteile und Limitationen der genutzten Modelle	50
5.2	Veränderungen des Glo1 Proteins und der Glo1 Immunreaktivität	

	nach exzitotoxischer Schädigung im Modell der OHSC	52
5.2.1	Veränderungen des Glo1Dimer/Monomer Verhältnisses nach exzitotoxischem Insult	52
5.2.2	Die exzitotoxische Schädigung führt zu einer zeitabhängigen Veränderung der Glo1 Immunreaktivität im GD	53
5.3	Zeitliche und zelluläre Variationen der Glo1 Immunreaktivität nach pMCAO	55
5.4	Die Rolle der Glo1 bei der Stimulation von BV2 Zellen und die Wirkung von EP	56
5.5	Die Glo1 Immunreaktivität in der HT22 Zelllinie ist auf eine Subpopulation beschränkt und zeigt keine Veränderungen unter EP-Behandlung	58
5.6	Die EP-Behandlung verzögert die astrozytäre Narbenbildung	59
5.7	Ausblick	61
6	Zusammenfassung	62
7	Literatur	65
8	Thesen der Dissertation	79

Anhang

Tabellarischer Lebenslauf

Selbstständigkeitserklärung

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Danksagung

Abkürzungsverzeichnis

ADP	<u>A</u> denosindiphosphat
Akt	aktivierte Proteinkinase B
AMPA	<i><u>α</u>-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid</i> α-Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolepropionische Säure
ANLS	<u>A</u> strozytäres- <u>n</u> euronales <u>L</u> aktatshuttle
ANOVA	<i>analysis of variance</i> ; Varianzanalyse
ATP	<u>A</u> denosin <u>t</u> riphosphat
BCA	<i>bicinchoninic acid</i> ; Bicinchoninsäure
BSA	<u>b</u> ovines <u>S</u> erum <u>a</u> lbumin
Ca ²⁺	<u>C</u> aliumionen
CaMKII	Ca ²⁺ - <u>C</u> almodulin <u>K</u> inase <u>I</u> I
CD	<i>cluster of differentiation</i>
Cl ⁻	<u>C</u> hloridionen
CTR	<i>control group</i> ; Kontrollgruppe
d	<i>day</i> ; Tag
DAB	3,3'- <u>D</u> iaminobenzidin
DAPI	4',6- <u>D</u> iamidin-2-phenylindol
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i> ; Dulbecco's modifiziertes Medium
DNS	<u>D</u> esoxyribo <u>n</u> ukleinsäure
EP	<u>E</u> thylpyruvat
FKS	<u>F</u> ötale <u>K</u> älberserum
<i>g</i>	<u>G</u> ravitationskraft
GD	<u>G</u> yrus <u>d</u> entatus
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i> ; Saures Gliafaserprotein
Glo1	<u>G</u> lyoxalase <u>1</u>
Glo2	<u>G</u> lyoxalase <u>2</u>
GSH	reduziertes Glutathion

GSSG	oxidiertes Glutathion
h	<u>hours</u> , Stunden
H ⁺	<u>hydron</u> ; Wasserstoffione(n)
HBSS	<u>Hank's balanced salt solution</u> ; Hank's balancierte Salzlösung
HBSS/oCa ²⁺ Mg ²⁺	<u>HBSS</u> ohne Zusatz von <u>Calcium</u> -und <u>Magnesium</u> ionen
HBSS/mCa ²⁺ Mg ²⁺	<u>HBSS</u> versetzt mit <u>Calcium</u> -und <u>Magnesium</u> ionen
HE	<u>Hämalaun-Eosin</u>
HMGB1	<u>high mobility group box 1</u> <u>ionized calcium-binding adapter molecule 1</u> ; Ionisiertes Calcium bindendes Adaptermolekül 1
Iba1	
IgG	<u>Immunglobulin G</u>
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase
K ⁺	<u>Kalium</u> ionen
kDa	<u>Kilodalton</u>
LPS	<u>Lipopolysaccharide</u>
MAS	<u>Malat-Aspartat Shuttle</u>
MEM	<u>Minimal essential medium</u> ; Minimales essentielles Medium
Mg ²⁺	<u>Magnesium</u> ionen
min.	<u>Minuten</u>
MPO	<u>Myeloperoxidase</u>
MW	<u>Mittelwert</u>
n	<u>number</u> ; <u>Anzahl</u>
Na ⁺	<u>Natrium</u> ionen
NAD ⁺	oxidiertes <u>Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid</u>
NADH	reduziertes <u>Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid</u>
NADP	oxidiertes <u>Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat</u>
NADPH	reduziertes <u>Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat</u>
NeuN	<u>neuron-specific nuclear protein</u> , Neuronenspezifisches nukeläres Protein

NF-κB	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NGS	<i>normal goat serum</i> ; normales Ziegenserum
NHS	<i>normal horse serum</i> ; normales Pferdeserum
NMDA	<i>N-Methyl-D-Aspartat</i>
nNOS	<i>neuronal Stickstoffmonoxidsynthase</i>
NO	<i>nitric oxide</i> ; Stickstoffmonoxid
Nrf2	<i>nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2</i>
OHSC	<i>organotypic hippocampal slice cultures</i> ; organotypische, hippocampale Schnittkultur
p	<i>value of probability</i> ; Wahrscheinlichkeit
pBrBzGSCp ₂	<i>p-Bromobenzylglutathion-Cyclopentyl-Diester</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , Phosphat gepufferte Salzlösung
PFA	<i>Paraformaldehyd</i>
Pfkfb3	<i>6-Phosphofructo-2- Kinase/Fructose-2,6-Biphosphatase 3</i> ; Fructose-6-Phosphat-2-Kinase-Fructose-2,6-Bisphosphatase, Isoform 3
PLL	<i>Poly-L-Lysin</i>
pMCAO	<i>permanent middle cerebral artery occlusion</i> ; permanenter Verschluss der Arteria cerebri media
PPP	<i>pentose phosphate pathway</i> ; Pentosephosphatweg
PSD	<i>postsynaptic density protein</i>
ROS	<i>reactive oxygen species</i> ; reaktive Sauerstoffspezies
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> , Natriumdodecylsulfat
SEM	<i>standard error of mean</i> ; Standardfehler des Mittelwertes
TAT	<i>transactivator of transcription Protein</i>
TCA	<i>tricarboxylic acid cycle</i> ; Tricarbonsäurezyklus
TG	<i>Transglutaminase</i>
TNFα	<i>Tumornekrosefaktor α</i>
ZNS	<i>Zentrales Nervensystem</i>

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie und Folgen des Schlaganfalls

Der Schlaganfall wird durch die WHO als Durchblutungsstörung in Folge einer Gefäßruptur oder Verlegung der hirnersorgenden Gefäße definiert.

In den Vereinigten Staaten von Amerika erleiden pro Jahr ca. 795000 Menschen einen Schlaganfall, davon sind ca. 600000 Erstmanifestationen [1]. Der Schlaganfall belegt, hinter Herzerkrankungen, malignen Neubildungen und chronischen Erkrankungen der Atemwege, Platz vier der Todesursachenstatistik. Zudem erleiden zunehmend jüngere Menschen einen Schlaganfall. Neben der erhöhten Mortalität der Überlebenden sieht man sich immer mehr mit den Problemen der individuellen Belastung nach Schlaganfall und konsekutiven Beeinträchtigungen konfrontiert [2,3].

Von der Gesamtheit der Schlaganfälle wird der Großteil (87%) durch die ischämischen Schlaganfälle repräsentiert [1]. Der ischämische Schlaganfall ist durch eine plötzliche, vaskuläre Minderversorgung des Gehirns gekennzeichnet. Diese wird meist durch eine kardiale Embolie, großflächige arteriosklerotische Plaques und/oder Mikroangiopathien hervorgerufen [4,5]. Die Thrombolyse innerhalb der ersten 3-4,5 Stunden (h) nach Ischämie mit dem Ziel der Revaskularisierung stellt die einzig verfügbare, etablierte kausale Therapie dar [6]. Zusätzlich soll die Integrität und somit die Barrierefunktion der Blut-Hirn-Schranke gewährleistet werden [7]. Die Thrombolyse sowie die derzeit diskutierten endovaskulären Therapien zielen auf die Reperfusion und damit auf die Behebung des primären Schadens ab [8,9]. Jedoch führen auch die nachgeschaltete Ereignisse zu einem weiteren neuronalen Untergang einhergehend mit einer Ausdehnung des Infarktolumens innerhalb der ersten Tage bis Wochen [10].

1.2 Der sekundäre neuronale Schaden

Die entstandene Minderversorgung des Gehirns repräsentiert den primären Schaden und führt zur Aktivierung einer Kaskade von Ereignissen, die als sekundärer neuronaler Schaden zusammengefasst wird [11,12].

Zu den Mechanismen des Sekundärschadens zählen die Exzitotoxizität, die Produktion freier Radikale und die Neuroinflammation [13,14].

1.2.1 Exzitotoxizität

Exzitotoxizität leitet sich von der durch den exzitotoxischen Neurotransmitter Glutamat vermittelten Auslösung von Depolarisationen ab [15].

Während der Ischämie kommt es zur erhöhten Ausschüttung und damit zu einem Überangebot von Glutamat [16,17]. Die dadurch vermehrt stattfindenden

Depolarisationen beeinträchtigen den Energiehaushalt und die Funktion der umliegenden Neuronen und führen infolgedessen zum neuronalen Untergang [18–20]. Dieser Prozess wird als Exzitotoxizität bezeichnet.

Glutamat entfaltet seine Wirkung sowohl über die ionotropen, spannungsabhängigen N-Methyl-D-Aspartat- (NMDA), Kainat- und α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolepropionische Säure (*α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid*, AMPA) Rezeptoren als auch über metabotrope Rezeptoren, welche an intrazelluläre Signalkaskaden gekoppelt sind [21]. Im Prozess des exzitotoxischen neuronalen Schadens spielt der NMDA Rezeptor wohl die wichtigste Rolle [22,23]. Der NMDA Rezeptor besteht aus vier Untereinheiten und ist primär für Calciumionen (Ca^{2+}), aber auch für Natriumionen (Na^+) und Kaliumionen (K^+), durchlässig [24]. Die Aktivierung durch NMDA oder Glutamat führt dabei zu einem intrazellulären Fluss von Ca^{2+} , Na^+ und Chloridionen (Cl^-) mit konsekutivem Wassereinstrom [25]. Dieser Wassereinstrom führt vom Anschwellen bis zum Untergang der Neurone.

Bedingt durch die NMDA Rezeptoraktivierung trägt der Ca^{2+} -Überschuss zur Neurodegeneration bei [17,26,27]. Die Exzitotoxizität führt zum Ausfall des Ca^{2+} - Na^+ Austauschers an der Zellmembran und lässt die alternativen Puffersysteme, wie die Mitochondrien, notwendig werden [28,29]. Der intramitochondrialer Ca^{2+} Anstieg erniedrigt das mitochondriale Membranpotenzial und dadurch die Phosphorylierung von Adenosindiphosphat (ADP) zum Energieträger Adenosintriphosphat (ATP). Der ATP Gehalt wird durch das Ausschleusen von Ca^{2+} und durch die Glutamat vermittelte ATP Synthese Hemmung weiter herabgesetzt [30,31]. Neben der energetischen Imbalance entstehen durch den fehlenden Elektronentransfer innerhalb der Atmungskette reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS) [32,33]. Nach Erschöpfung der mitochondrialen Pufferkapazität folgt die Depolarisation der Mitochondrien wodurch die zytosolische Ca^{2+} Konzentration erhöht wird und weitere Depolarisationen vermittelt werden.

Parallel kommt es durch die Kopplung des NMDA Rezeptors über das *postsynaptic density protein* (PSD) 95 zur Induktion der neuronalen Stickstoffmonoxidsynthase (nNOS) mit nachfolgender Stickstoffmonoxid- (NO)-produktion [34].

Unter physiologischen Bedingungen würde die Ca^{2+} Erhöhung die Ca^{2+} - Calmodulin Kinase II (CaMKII) aktivieren, welche nNOS phosphoryliert und die NO Konzentration senkt [35,36]. Jedoch kommt es durch ein verringertes ATP/ADP Verhältnis und die ischämisch verursachte Azidose zu einer Zusammenlagerung mit Funktionsverlust der CaMKII [37,38]. Zusätzlich bedingen die hohen Glutamatkonzentrationen eine Aktivierung der Protein Phosphatase 1, welche nNOS dephosphoryliert und deren Aktivität steigert [39].

Damit wird durch den exzitotoxischen Prozess die Entstehung von ROS und NO übermäßig gesteigert, was im Zustand des oxidativen Stresses mündet.

1.2.2 Oxidativer Stress

Oxidativer Stress bezeichnet das Überangebot von Sauerstoffverbindungen oder Ionen, die durch ihre hohe Reaktivität Proteine, Membranlipide und Desoxyribonukleinsäuren (DNS) modifizieren und in Halbwertszeit, Funktionalität und Struktur beeinträchtigen, und damit die Zelle schädigen [40,41]. Die hohe Reaktivität ist begründet auf mindestens einem inkomplett besetztem Elektronenorbital des Sauerstoffs oder der entsprechenden Verbindung [41]. Auch physiologisch entstehen ROS, werden aber effektiv neutralisiert. Allerdings erhöht die NMDA Rezeptoraktivierung die ROS Produktion über die Kapazität der antioxidativen Abwehr hinaus und verursacht eine Imbalance, die als oxidativer Stress bezeichnet wird [42,43]. Eine Blockierung des NMDA Rezeptors reduziert die entstehenden ROS, welche initial vor allem in den Mitochondrien durch deren eingeschränkte Funktionalität entstehen [33,44]. Durch den Energiemangel und die fehlende Phosphorylierung von ADP zur ATP wird zusätzlich im Zytoplasma ADP durch die Xanthinoxidase zu Hypoxanthin und Xanthin unter Steigerung der ROS abgebaut [45,46]. Die Entstehung von ROS ist somit ein dynamischer, mehrstufiger Prozess, der nicht seinen alleinigen Ursprung in den Mitochondrien besitzt [46].

Die nNOS Aktivierung erhöht die Konzentrationen von Superoxid und NO, welche zum hoch reaktiven Peroxynitrit reagieren [47]. NO inhibiert zudem den Komplex IV der Atmungskette und unterhält damit den oxidativen Stress [48]. Stickstoffverbindungen sind außerdem in der Lage Proteine mit Cysteinresten oder Sulfhydrylgruppen im Sinne einer S- Nitrosylierung zu modifizieren und so deren Funktion einzuschränken [49–51]. Allerdings können Stickstoffverbindungen auch zelluläre Überlebensmechanismen aktivieren, wodurch Protektion und Destruktion durch die NO Dosis bestimmt wird [52,53]. Diese Dosis scheint in der Exzitotoxizität überschritten, sodass sich die destruktiven Effekte entfalten, die Mitochondrien depolarisieren und die Apoptose induziert wird [53–55]. Im ischämischen Kern dagegen wird die rapide intrazelluläre Steigerung der Na^+ , Ca^{2+} Konzentrationen von einem konsekutivem Wassereinstrom gefolgt, der den nekrotischen Untergang zur Folge hat [56].

1.2.3 Die antioxidative Abwehr und deren metabolische Konsequenz

Um den neuronalen Untergang zu vermeiden, bedienen sich Zellen antioxidativen Abwehrmechanismen in Form von Peroxiredoxinen, Superoxiddismutasen, Katalasen und reduziertem Glutathion (GSH) [41,57,58].

Glutathion ist ein Tripeptid bestehend aus den Aminosäuren Glutamat, Cystein und Glycin. Allerdings ist die extrazelluläre Konzentration der drei, für die Synthese notwendigen Aminosäuren, durch die Neurotransmitterfunktion von Glycin und Glutamat und das neurotoxische Potential von Cystein, gering [59,60]. Damit werden vermehrt Rückgewinnungsprozesse zur GSH Bereitstellung genutzt. Nach Ausschöpfung des GSH Pools als Reduktionsäquivalent (Elektronenakzeptor) entsteht die oxidierte Form des Glutathions (GSSG) [61]. Unter Verbrauch von reduziertem Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH) wird GSSG durch die Glutathion Reduktasen zu GSH reduziert [60,62]. Neben einer Vielzahl von NADPH regenerierenden Enzymen, wird der Großteil von NADPH im Pentosephosphatweg (pentose phosphate pathway, PPP) aus Glukose bereitgestellt [63–65].

Neben der metabolischen Konsequenz des verminderten Glukoseangebots wird die antioxidative Abwehr beeinträchtigt und es entsteht eine Konkurrenzsituation zwischen PPP und Glykolyse um die verbleibende Glukose [66–68].

Um diese Konkurrenz zu mindern und eine ausreichende Energiebereitstellung zu sichern, wird der neuronale oxidative Stoffwechsel induziert [68–71]. Der Großteil des ATPs wird nämlich vornehmlich durch die oxidative Phosphorylierung und die Degradation von Pyruvat im Tricarbonsäurezyklus (TCA) generiert [64,68]. Die Bedeutung dieser Einspeisung wird in Stresssituationen durch die Stimulation des TCA und der NADH Bereitstellung infolge des mitochondrialen Ca^{2+} Einstroms deutlich [72,73].

Neurone exprimieren Laktattransporter und können Laktat über den TCA direkt zur Energiegewinnung nutzen [74–76].

Die Herkunft des Laktats aus der neuronalen Glykolyse oder durch Bereitstellung anderer Zellen im zentralen Nervensystem (ZNS) ist dabei umstritten.

Die Schätzung der neuronalen Metabolisierung von Glukose (25%) und Laktat (75%) legt jedoch nahe, dass das Laktat nicht von den Neuronen, sondern anderen Zellen produziert wird [76,77]. Zusätzlich zeigen Transkriptomanalysen ein reduziertes Vorkommen glykolytischer Enzyme, wie beispielsweise der Pyruvatkinase [78–80]. Auch die Anpassungsfähigkeit entscheidender glykolytischer Enzyme, wie der Phosphofruktokinase 1, ist neuronal deutlich reduziert [81–83].

Zudem scheint die Glykolyse, durch die Konkurrenz von PPP und Glykolyse um die vorhandene Glukose, als entscheidende Energiequelle unwahrscheinlich [65].

Basierend auf diesen Befunden ergibt sich die Frage, wie die Bereitstellung notwendiger Energiesubstrate, Antioxidativa und der Abbau von Glutamat zur Minderung der Exzitotoxizität realisiert werden kann.

1.3 Die Rolle der Glia im sekundären Schaden

Astrozyten, Mikroglia, Oligodendrozyten und NG2- positive Zellen repräsentieren als Gliazellen die größte Zellpopulation innerhalb des ZNS [84]. In der Population der Gliazellen sind die meisten Zellen Astrozyten, von denen ein Einzelner mit mehreren Synapsen in Kontakt steht [84,85]. Astrozyten erfüllen elementare Aufgaben zur Sicherung des neuronalen Überlebens [86]. Führend hier sind der K^+ und H^+ Transport, welcher einerseits die Fortsetzung der Depolarisationen im Infarktgebiet limitieren kann und gleichzeitig die ischämische Azidose dämpft [87,88]. Für den aktiven Transport von K^+ über die Na^+-K^+ -ATPase wird ATP benötigt, welches in der Ischämie fehlt und einen Grund für die beobachteten Periinfarktdepolarisationen bietet [86,89,90]. Neben den passiven und aktiven Mechanismen zur Aufrechterhaltung der Ionengradienten stellen die gap junctions, als funktionelle Verbindung der Astrozyten, einen wichtigen Bestandteil zur Aufrechterhaltung der Ionengradienten dar [86,91].

Dieses funktionelle Synzytium wird durch die Ischämie und das hier entstehende NO entkoppelt und steigert die Anfälligkeit der Astrozyten gegenüber oxidativem Stress [92,93]. Daneben wird auch die astrozytäre Ca^{2+} Clearance beeinträchtigt, wodurch die Exzitotoxizität unterhalten wird [94]. Astrozyten stehen mit ihren Fortsätzen in engem Kontakt mit den Blutkapillaren, nehmen einen Großteil der Glukose aus dem Blutkreislauf auf und stellen diese Neuronen bereit [95–97].

1.3.1 Die metabolische neuronale-astrozytäre Kopplung und deren Bedeutung in der Exzitotoxizität

Astrozyten entgiften Glutamat, indem sie Glutamat, H^+ und Na^+ im Austausch für ein K^+ über spezifische Transporter aufnehmen [98]. Der dadurch steigende Na^+ Gradient wird über die Na^+-K^+ -ATPase reduziert [86]. Dieser Austausch repräsentiert einen der energieaufwendigsten Schritte innerhalb des ZNS und bedingt auch die geringere Glutamat Anfälligkeit von Astrozyten im Vergleich zu Neuronen [99,100]. Im Gegensatz zur Depletion des neuronalen Glutamatttransporters steigert das Ausschalten des gliösen Glutamatttransporters die exzitotoxische Anfälligkeit der Neuronen deutlich [101,102]. Allerdings funktionieren die Glutamat Transporter bidirektional. Unter ATP Depletion strömt Glutamat nach extrazellulär und unterhält die Exzitotoxizität [103,104]. Zusätzlich limitiert die ischämische Azidose den Prozess der Glutamataufnahme und verstärkt die Exzitotoxizität [105].

Nach der Aufnahme wird Glutamat ATP-abhängig durch die rein astrozytär vorkommende Glutaminsynthetase zu Glutamin metabolisiert, welches anschließend in Neuronen zur erneuten Glutamatregeneration genutzt werden kann [106,107]. Auch das aus dem Abbau von Glutamat entstehende α -Ketoglutarat und Alanin können dazu

bereitgestellt werden. Alternativ kann Glutamat auch in den astrozytären TCA eingespeist werden, der Bereitstellung von Substraten für den neuronalen TCA dient [108,109]. Es ist jedoch unklar welche Substrate des TCA an die Neurone abgegeben werden, da unterschiedliche Daten zur Expression der verschiedenen TCA Enzyme, wie z.B. der Pyruvatdecarboxylase, existieren [110]. Neben den energetisch wichtigen Substraten werden durch den TCA auch Reduktionsäquivalente, wie GSH, bereitgestellt und gegebenenfalls an Neurone abgegeben [111,112]. Neben der astrozytären Glykolyse kann auch das rein astrozytär vorkommende Glykogen zur ATP Bereitstellung genutzt werden [113,114]. Daneben kann das aufgenommene Glutamat zur astrozytären Energiegewinnung im TCA genutzt werden, wobei der intrazelluläre pH über eine glykolytische oder TCA bedingte ATP Generation entscheidet [115–117]. Dennoch scheint der Großteil des astrozytären ATPs durch die Glykolyse generiert zu werden. Diese Annahme wird gestützt durch die erhöhte Expression und die geminderte Degradation des glykolytischen Induktorenzyms Fructose-6-Phosphat-2-Kinase-Fructose-2,6-Bisphosphatase (*6-Phosphofructo-2-Kinase/Fructose-2,6-Bisphosphatase 3*; Pfkfb3) [78,118]. Zusätzlich stellen die Expression der vornehmlich Laktat generierende Laktatdehydrogenase, die Inaktivierung der Pyruvatdehydrogenase und die geringe Expression des Malat-Aspartat Shuttles (MAS) ein Hindernis zur Einschleusung von metabolisierter Glukose in den astrozytären TCA dar [119–121]. In Neuronen dominiert dagegen die Pyruvat generierende Laktatdehydrogenaseisoform, eine erhöhte Expression der aktiven Pyruvatdehydrogenase, eine hohe Expression des MAS und eine starke Degradation von Pfkfb3 [118–121].

Demnach wäre eine astrozytäre, glykolytischer Degradation von Glukose zu Laktat mit nachfolgender Bereitstellung über stressinduzierbare, neuronale Laktattransporter denkbar, wodurch gleichzeitig die gestörte Na⁺ Hämostase abgemildert werden könnte [122–124].

Zusätzlich fand sich eine exzitotoxisch bedingte Induktion des neuronalen oxidativen Stoffwechsels gefolgt von einer gesteigerten astrozytären Glykolyseaktivität, welche die Theorie des astrozytären- neuronalen Laktatshuttels (ANLS) begründete [70,125]. Die ANLS Theorie könnte einen energetischen Sicherungsmechanismus, z.B. bei Glukoseentzug darstellen, der ebenfalls das anfallende Laktat entgiftet [126,127].

Jedoch besitzen Astrozyten eine höhere Aufnahmefähigkeit für Laktat als Neurone und können zudem ihren oxidativen Stoffwechsel besser anpassen [128]. Darauf basierend hat sich neben der ANLS auch die *lactate release* Theorie etabliert, welche von einer Bereitstellung von astrozytärer Glukose für die Neurone ausgeht [129,130]. Hier wird das durch Astrozyten entstehende Laktat nicht als Substrat für Neurone verstanden,

sondern als Regulator des Blutflusses, welches eine ausreichende Glukosebereitstellung für die Neurone sichern soll [128,131]. Entgegen der für die ANLS sprechenden Befunde, fand sich eine NMDA-Ca²⁺-induzierte Steigerung der neuronalen Glykolyse in primären Neuronenkulturen [132]. Allerdings wurde auch Laktat zu großen Teilen metabolisiert, zeigte aber nach NMDA Exposition keine signifikante Steigerung. Auch scheint der Befund der gesteigerten Glykolyse in Abwesenheit von Astrozyten nicht verwunderlich, da alternative energiegewinnende Prozesse genutzt werden müssen. Demnach gilt dieser Befund nicht als klarer Gegenbeweis der ANLS Theorie und zeigt nur, dass im Rahmen der Exzitotoxizität ein ineffizienter Energiehaushalt gegeben ist, der mit Hilfe von Überlebensmechanismen überbrückt werden soll [133].

Die neuronale Glykolyseinduktion scheint vor allem notwendig, um einen Ca²⁺ Überschuss zu vermeiden [134]. Andernfalls würden die Mitochondrien als Puffersystem für das anfallende Ca²⁺ fungieren, wodurch sowohl die Atmungskette als auch das MAS beeinträchtigt würden [135]. Konsequenz dessen wäre der beeinträchtigte Transport von Laktat über Pyruvat in die Mitochondrien und ein energetischer Kollaps. Zudem scheint die exzitotoxisch bedingte Aktivierung der Glykolyse auf einer Hyperphosphorylierung des Pfkfb degradierenden Komplexes begründet, welche nachfolgend zur Apoptose führt [136]. Somit könnte die gesteigerte neuronale Glykolyse als einer der letzten neuronalen Überlebensmechanismen verstanden werden [136,137].

Neben der resultierenden Beeinträchtigung des neuronalen Stoffwechsels werden auch die Astrozyten durch das übermäßige Glutamatangebot und Metabolisierung sowie das limitierte Glukoseangebot in eine energetische Imbalance gebracht.

Unter anhaltendem Substratmangel ist ebenfalls ein ständiger Transport von Pyruvat und Laktat zwischen Neurone und Astrozyten denkbar um Reduktionsäquivalente zu generieren [138]. Eine abschließende Aussage über die Richtigkeit der aufgeführten Theorien ist aktuell jedoch nicht möglich.

1.3.2 Reaktive Astrogliose

Neben den metabolischen Folgen führt der neuronale Schaden auch zur reaktiven Astrogliose, welche durch eine Hypertrophie und Proliferation der Astrozyten gekennzeichnet ist [86,139]. Obwohl in diesem Prozess vermehrt NO gebildet wird, kommt es gleichzeitig zur Induktion der Enzyme der antioxidativen Abwehr [140,141].

Die Astrogliose steigert die Synthese von Interleukinen, Interferonen und Tumornekrosefaktoren, welche eine weitere inflammatorische Reaktion unterhalten

[142,143]. Je nach Funktionszustand und Expressionsmuster können diese Zytokine eine protektive oder destruktive Wirkung auf die Astrozyten haben [86,144].

Neben der Zytokinproduktion entsteht im Rahmen der Astroglie, die durch das funktionelle Synzytium verbundene, astrogläre Narbe [139]. Obwohl die astrogläre Narbe die axonale Regeneration behindert ist sie auch an der Regeneration der Blut-Hirn Schranke beteiligt und fördert die Regeneration/Stabilisierung umliegender Neurone [139,145,146]. Daneben schirmt diese Narbe umliegende Neurone von im geschädigtem Gebiet frei werdenden Metaboliten ab und sorgt für eine progrediente Abheilung des Schadens [147,148]. Durch die astrogläre Narbe wird auch eine übermäßige Infiltration von Mikroglia und aus den Gefäßen migrierenden Zellen verhindert, wodurch die Ödembildung vermindert wird [149]. Neben dieser Abschirmung sind Astrozyten in der Lage durch beispielweise den Makrophagen-Koloniestimulierenden Faktor und andere Faktoren vor allem die mikrogläre(n) Funktion(szustand) und deren Proliferation zu beeinflussen [150–152]. Zu den beeinflussbaren Zellen gehört die zweite große Gruppe der Gliazellen, die Mikroglia [153]. Diese aus der myelomonozytären Zellreihe entstammenden Zellen repräsentieren die ortsständigen Immunzellen des ZNS und besitzen abhängig von ihrem Funktionszustand vielfältige Funktionen innerhalb des neuronalen Schadens [153,154]. Die Funktionsänderung der Mikroglia geht dabei mit der veränderten Expression von Zelloberflächenantigenen und ihrer Morphologie einher, die nicht zwingend homolog sein muss [155,156]. Im exzitotoxischen Schaden werden Mikroglia aktiviert und migrieren zum Ort der Schädigung [157]. Hier, im aktivsten Zustand ähneln Mikrogliazellen mit ihrer runden amöboiden Morphologie, den Makrophagen [158]. Sie produzieren pro-inflammatorische Zytokine, ROS und sind als Phagozyten aktiv [159,160]. Aktivierte Mikrogliazellen regulieren daher nicht nur das Ausmaß des Schadens, sondern auch die Aktivierung weiterer Mikroglia und Astrozyten [161,162]. Obwohl es im ersten Moment scheint, dass Mikroglia ausschließlich destruktive Effekte besitzen, entfalten die freigesetzten Substrate auch neuroprotektive Effekte deren Abwesenheit den neuronalen Schaden vergrößert [154].

Des Weiteren gilt zu erwähnen, dass auch Mikroglia ihren Stoffwechsel abhängig von ihrem Funktionszustand umstellen. Wenn Mikroglia sich im inflammatorischen Zustand befinden, wird die Glykolyse gesteigert und die Atmungskette sowie das Einschleusen von Pyruvat in den TCA gehemmt [163,164]. Dies geht jedoch mit einem verstärkten Anfallen von ROS und einer gesteigerten Inflammation einher. Daneben scheint diese Umstellung, wenn sie anhält, einen NO-medierten mikroglären Untergang zu bedingen, der damit die Zytokinfreisetzung und dadurch die Inflammation limitiert [165].

Eine Interpretation dieser Befunde in der Exzitotoxizität und hinsichtlich der astrozytären-neuronalen Kopplung ist bisher nicht ausreichend erfolgt.

1.4 Die energetische Imbalance als Schlüssel der neuronalen Destruktion

Wie beschrieben, führen alle Prozesse des neuronalen Schadens zu einer energetischen Imbalance, welche neben der vermehrten Produktion von ROS, durch die fehlende ATP- vermittelte Regeneration von Reduktionsäquivalenten, im oxidativen Stress mündet. Ebenfalls legen die oben angeführten Befunde nahe, dass vor allem die Metabolisierung von Glukose und Laktat eine entscheidende Rolle im Prozess der Neurodestruktion, Neuroinflammation und der neuronalen-gliösen Kopplung spielen. Eine Untersuchung der Haupt- und Seitenwege des Glukosestoffwechsels erscheint deshalb notwendig.

Die S-Nitrosylierung der Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase führt zum Ausscheiden dieser aus der Glykolyse und zur Induktion der Apoptose [166,167]. Dieses Enzym steht der induzierbaren Phosphofruktokinase nach und könnte vor allem die energiegewinnenden Schritte der Glykolyse limitieren. Neben der Glykolyse speist auch der PPP Triosen auf der Höhe dieses Enzyms ein. Ein Ausscheiden dieses Enzyms endet in einem Überschuss der Triosen Glycerinaldehyd-3-phosphat und Dihydroxyacetonphosphat die bei fehlender Metabolisierung zum toxischen Metaboliten Methylglyoxal (MG) zerfallen.

1.5 Methylglyoxal und das Glyoxalase System

1.5.1 Methylglyoxal und seine zellulären Auswirkungen

MG ist ein α,β - Dicarbonyl, welches während des Keton- und Threoninstoffwechsels entstehen kann [168]. Hauptsächlich fällt es jedoch nicht-enzymatisch bei dem spontanen Zerfall von Dihydroxyacetonphosphat in MG und Orthophosphat an [169–171]. Dihydroxyacetonphosphat ist eine Triose, welche aus der Spaltung von Fructose-1,6-bisphosphat während der Glykolyse entsteht. Da nur Glycerinaldehyd-3-phosphat den weiteren Weg durch die Glykolyse beschreiten kann, wird Dihydroxyacetonphosphat durch die Triosephosphatisomerase in Glycerinaldehyd-3-phosphat umgewandelt. Neben dem nicht-enzymatischen Zerfall von Dihydroxyacetonphosphat wird auch durch die Umwandlung zu Glycerinaldehyd-3-phosphat und den weiteren Abbau MG frei [172,173]. Unter aeroben Bedingungen werden 0,1-0,4% der Triosen über Methylglyoxal zu D-Laktat metabolisiert [174]. Damit spielt MG unter aeroben Verhältnissen eine untergeordnete Rolle. Jedoch kommt es unter Ausschluss der oxidativen Phosphorylierung und konsekutiver Glykolyseerhöhung zum Triosenanstau einhergehend mit einer Erhöhung von MG. Die

Bestimmung der Konzentration von MG wird durch seine schnelle und funktionseinschränkende Reaktivität mit Arginin- und/oder Arginin-Seitenketten von Makromolekülen erschwert [175,176]. Es wird davon ausgegangen, dass 90-99% des gesamten MG an Makromoleküle gebunden ist [176,177]. Dagegen liegt die Konzentration von freiem MG im mikromolaren Bereich [178,179]. Neben den Protein modifizierenden Eigenschaften, reagiert Methylglyoxal auch mit DNS und schädigt diese durch Strangbrüche oder Vernetzungen [180,181]. MG reagiert ebenfalls mit Transfer- und Boten-Ribonukleinsäuren (RNS), jedoch wurde die Bedeutung dieser Reaktion wenig beleuchtet [174,182,183].

1.5.2 Das Glyoxalase System

In eukaryonten Zellen ist das ubiquitär zytosolisch vorkommende Glyoxalase System, bestehend aus den Enzymen Glyoxalase 1 (Glo1; EC 4.4.1.5) und Glyoxalase 2 (Glo2; EC 3.1.2.6), hauptsächlich für den Abbau und die Entgiftung von MG verantwortlich [184,185]. MG reagiert nicht-enzymatisch mit GSH zu einem Hemithioacetal, welches anschließend durch Glo1 zu S-D-Lactoylglutathion isomerisiert wird [174,186]. Nachfolgend wird S-D-Lactoylglutathion durch Glo2 hydrolytisch gespalten, wodurch D-Laktat und GSH entstehen. In dieser Reaktion ist Glo1 das geschwindigkeitsbestimmende Enzym. Glo1 ist ein homodimeres Zink-Metalloenzym mit einer molekularen Masse von 46 Kilodalton (kDa), dessen Monomere nicht-kovalent gebunden sind [187–189]. Des Weiteren unterliegt Glo1 verschiedenen posttranslationalen Modifikationen [190–192]. Glo1 ist sensibel für NO, dessen Anlagerung zu einer Verringerung der Glo1 Aktivität führt. Eine anschließende, zusätzliche Phosphorylierung führt zum kompletten Ausscheiden der Glo1 bei der Entgiftung von MG [190,191]. Diese Modifikation führt jedoch zu einer verringerten Ableitung des *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NF- κ B) und zu einem erhöhten Zellüberleben [193]. Des Weiteren werden zwei Aktivitätsformen der Glo1 *in vivo* vermutet [192]. Die Modifikation, welche darüber bestimmt, ist die Glutathionylierung durch GSSG, welche die Aktivität von Glo1 herabsetzt. Auch pharmakologisch kann die Glo1 Aktivität herabgesetzt werden, z.B. durch p-Bromobenzylglutathion-Cyclopentyl-Diester (*p*BrBzGSCp₂), welches im aktiven Zentrum des Enzyms mit Zink interagiert und eine weitere MG Metabolisierung verhindert [194,195]. Ein weiterer Inhibitor ist Ethylpyruvat (EP), welches multiple antiinflammatorische Eigenschaften aufweist und auch im Modell der transienten Hirnischämie zu einer Abschwächung des neuronalen Schadens führte [196–198]. Der genaue Mechanismus der Glo1 Inhibierung durch EP ist allerdings bisher nicht bekannt [197].

1.6 Methylglyoxal und das Glyoxalase System im ZNS

1.6.1 Bedeutung der Methylglyoxal Toxizität und des Glyoxalase Systems auf die Zellen des zentralen Nervensystems

Die neurotoxischen Eigenschaften von Methylglyoxal wurden in verschiedenen Zelllinien untersucht [199,200]. Mögliche Folgen der MG Behandlung waren dabei eine gesteigerte Caspase Aktivierung, GSH und ATP Depletion, ein verringertes mitochondriales Membranpotenzial einhergehend mit einer Erhöhung der ROS und eine herabgesetzte Glo1 Aktivität. Eine Behandlung mit dem Glo1 Inhibitor $pBrBzGSCp_2$ führte zu einer gesteigerten Caspase Aktivierung mit nachfolgender Apoptose [201–203]. Allerdings ist die Übertragbarkeit der beschriebenen Ergebnisse fragwürdig, da sich die MG Empfindlichkeit in Abhängigkeit von der Zelldifferenzierung und der untersuchten Zelllinien deutlich unterschied [199,204]. Aus diesem Grund wurden die dosis- und zeitabhängigen Auswirkungen von MG auf primäre kortikale Neuronen, welche aus fetalen Rattenhirnen gewonnen wurden, untersucht [205]. Durch 100 μM MG wurde die Neuronenzahl nach 24 h auf 55 % und durch 200 μM auf 25 % der Kontrollgruppe herabgesetzt. Eine Verlängerung der Behandlung auf 48 h verstärkte die MG (100 μM) Effekte weiter, so dass nur 25 % überlebende Zellen verglichen mit der Kontrollgruppe gezählt wurden. Vergleichbare Überlebensraten fanden sich in der Untersuchung fetaler hippocampaler Neurone von Ratten [206,207]. Zusätzlich ließ sich in Folge der MG Behandlung ein Anstieg der ROS, der Glyoxalase Transkripte und der inflammatorischen Zytokine Interleukin 1 β und Tumorenekrosefaktor alpha (TNF- α), verzeichnen. Dagegen sank die Interleukin 6 Konzentration und die Aktivität beider Glyoxalasen.

Die aufgeführten Studien nutzten Gewebe aus fetalen Geweben, welche in Anbetracht des Anstiegens der neuronalen Glyoxalasen während der pränatalen Entwicklung die Aussagekraft und Übertragbarkeit limitieren könnte [208].

In Ko-Kultur Experimenten wiesen Astrozyten signifikant höhere Glyoxalase Proteinkonzentrationen und Aktivitäten gegenüber Neuronen auf [83]. Dies könnte eine Erklärung für die bessere Möglichkeit des MG Abbaus darstellen. Durch die Astrozyten in den Ko-Kulturen war eine vierfache höhere Konzentration MG notwendig, um den neuronalen Untergang herbeizuführen.

Um die Bedeutung der neuronalen Glyoxalasen hinsichtlich anderer toxischer Substanzen zu beleuchten, wurden Glo1 überexprimierende Neurone mit NO, Wasserstoffperoxid, Glutamat und MG behandelt. Mit Ausnahme einer erhöhten NO Anfälligkeit besaß die Glo1Überexpression keine Effekte auf die Empfindlichkeit der Neurone gegenüber Wasserstoffperoxid und Glutamat. Jedoch wurden extrem hohe (250-300 μM) MG Konzentrationen im Vergleich zu den vorher benutzen

Konzentrationen eingesetzt [83,205,206]. Gegen eine rein destruktive Wirkung von MG spricht dessen partielle Agonistenwirkung am γ -Aminobuttersäure A (γ -aminobutyric acid A; GABA_A) Rezeptor [209]. Dieser GABA Rezeptor-Subtyp ist ein ligandengesteuerter Chloridkanal, der bei Aktivierung zu einer Hyperpolarisation führt und somit den exzitatorischen Potenzialen, zum Beispiel vermittelt durch den NMDA Rezeptor, entgegenwirkt [210,211].

1.6.2 Die Rolle des Glyoxalase Systems in akuten Hirnpathologien

Bezogen auf die Glyoxalase Konzentration weist das Gehirn, verglichen mit allen anderen Organen, die vierhöchste Glyoxalase Menge auf [212]. Es ist daher nicht verwunderlich, dass Veränderungen des Glyoxalase Systems mit verschiedenen neurologischen Erkrankungen wie Angststörungen, Schizophrenie, Autismus, Restless-Leg Syndrom, Epilepsie dem Morbus Parkinson und Morbus Alzheimer in Zusammenhang gebracht wurden [209,213–215].

Bisher existieren wenige Studien zur Rolle des Glyoxalase Systems in akuten Hirnpathologien wie dem Schlaganfall oder der traumatischen Hirnschädigung, beziehungsweise deren nachfolgenden Prozesse, wie der metabolischen Imbalance, der Exzitotoxizität, der Neuroinflammation oder der Astrogliose [216–218]. Jedoch geben mehrere Studien Anhalt für eine Beteiligung des Glyoxalase Systems im akuten neuronalen Schaden. Im Modell der transienten Nierenischämie fanden sich vermehrt MG-modifizierte Proteine 24 Stunden (*hour(s)*, h) post Infarkt [219]. Dieser Anstieg sowie der mit der Ischämie einhergehende Zelltod konnte mittels Glo1 Überexpression signifikant herabgesetzt werden. Die vermehrte Ansammlung von MG-modifizierten Proteinen fand sich auch 24 h nach transienter Hirnischämie [216]. Hier zeigte sich nur das Endothel betroffen. Ein Nachweis dieser Proteine in anderen Zellen des ZNS wurde nicht berichtet. Dieser Proteine sind allerdings nicht zwingend Teil des Schadens, da MG-modifizierte Proteine wie Arg-Pyrimidin antioxidative Eigenschaften aufweisen und somit sogar protektiv wirken könnten [220].

Die Blut-Hirn-Schranke spielt beim ischämischen Schlaganfall eine bedeutende Rolle, da sie das Zeitfenster der Thrombolyse maßgeblich bestimmt [7]. In immortalisierten, mikrovaskulären Endothelzellen aus dem ZNS führte MG zu einer Barrieredysfunktion einhergehend mit einem vermehrten Proteineneinstrom [221]. Durch den Einsatz von Radikalfängern, wie Edavaron, konnte dies verhindert werden [222]. Einen der stärksten Hinweise auf eine Beteiligung des Glyoxalase Systems beim Prozess der neuronalen Schädigung geben die Befunde nach transienter Frontalhirnischämie [218]. Hier konnte mittels intraperitonealer Injektion von *transactivator of transcription protein* (Tat) - Glyoxalasen eine Reduktion des neuronalen Untergangs erzielt werden. Des

Weiteren gibt es starke Indizien für eine Wechselwirkung des Glyoxalase Systems mit dem Prozess der Exzitotoxizität. Die Behandlung von SH-SY 5Y mit MG führte zu einer Erhöhung von Glutamat, der durch den Einsatz von NMDA Rezeptor Antagonisten (AP-7, MK-801 und MET) aufgehoben wurde [217]. Zudem führen vermehrte Kopien des Glo1 Gens im Genom zu einer erhöhten Anzahl exzitatorischer Ereignisse, wodurch eine mögliche Rolle des Glyoxalase Systems bei der Vermittlung von exzitatorischen Potenzialen und dem exzitotoxischen Schaden aufgezeigt werden könnte [209].

2 Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der zeitlichen und schädigungsbedingten Veränderungen der Glo1 hinsichtlich des Proteingehalts und der Immunreaktion im Modell der organotypischen hippokampalen Schnittkulturen (*organotypic hippocampal slice culture*; OHSC) nach Schädigung mittels NMDA durch Western Blot Analysen und Immunhistochemie.

Anschließend sollten die erhobenen Befunde im *in vivo* Modell des experimentellen Schlaganfalls durch permanenten Verschluss der Arteria cerebri media (*permanent middle cerebral artery occlusion*; pMCAO) immunhistochemisch zu verschiedenen Zeitpunkten nach Ischämie überprüft werden.

Zusätzlich sollte betrachtet werden, ob die mikrogläre, immortalisierte Zelllinie BV2 eine zeitliche Dynamik der Glo1 Immunreaktion abhängig von einer Stimulation mit Lipopolysacchariden (LPS) aufweist. Außerdem sollte die Glo1 Immunreaktion der neuronalen, hippokampalen Zelllinie HT22 untersucht werden. In beiden Zelllinien sollte der Effekt des Glo1 Inhibitors EP auf die Glo1 Immunreaktion analysiert werden. Schließlich sollte der Effekt von EP auf die astrozytäre Narbenbildung im *scratch wound assay* betrachtet werden.

3 Materialien und Methoden

Alle Experimente mit Zelllinien wurden nach den für Schutzstufe 1 geltenden Richtlinien für Forschungslabore durchgeführt. Alle Tierexperimente wurden gemäß der Richtlinie 2010/63/EU zum Nutzen von Tieren in der neurowissenschaftlichen Forschung des europäischen Parlaments und des Rates zum Schutz von Tieren für wissenschaftliche Zwecke verwirklicht. Des Weiteren fanden die Experimente unter 3.3 entsprechend des durch das Regierungspräsidium Leipzig genehmigten Tierversuchsantrags 18/07 statt.

3.1 Materialien, Chemikalien, Antikörper, Geräte und Programme

Für die vorliegende Dissertation wurden die folgenden Chemikalien, Materialien, Geräte, Antikörper und Programme genutzt.

Tabelle 1: Chemikalien

Chemikalien	Hersteller	Herstellersitz
Ammoniumpersulfat	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Ascorbinsäure	Sigma- Aldrich	Deisenhofen, Deutschland
Atropin	Ratiopharm	Ulm, Deutschland
BCA Test	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Bromphenolblau	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
Chemilumineszenz	Thermo Fisher Scientific	Rockford, Illinois, USA
Clodronat	Bayer	Leverkusen, Deutschland
Cryoprotect	Sakura Finnetek USA Inc.	Torrance, USA
DAPI	Molecular Probes, Mobitec	Göttingen, Deutschland
Deckgläschen, rechteckig, 24x50mm	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Desoxyribonuklease 1	Gibco BRL Life Technologies	Eggenstein, Deutschland
Dinatriumhydrogen- phosphat	Merck	Darmstadt, Deutschland
DMEM	Gibco BRL Life Technologies	Eggenstein, Deutschland
Entellan	Merck	Darmstadt, Deutschland
Eosin	Roth	Karlsruhe, Deutschland
EP	Sigma-Aldrich	Saint Louis, Missouri, USA
FKS	Gibco BRL Life Technologies	Eggenstein, Deutschland
Fluoreszierendes	Dako	Hamburg,

Eindeckmedium		Deutschland
Glukose	Braun	Melsungen, Deutschland
Glycerol	Sigma- Aldrich	Deisenhofen, Deutschland
Glycin	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
Hämalaun	Dr. K. Hollborn und Söhne GmbH	Leipzig, Deutschland
HBSS mit oder ohne Calicum-, Magnesiumionen	Gibco BRL Life Technologies	Eggenstein, Deutschland
Histoacryl ® Gewebekleber	Braun	Tuttlingen, Deutschland
Insulin	Boehringer	Mannheim, Deutschland
Kaliumdihydrogen- phosphat	Merck	Darmstadt, Deutschland
Ketaminhydrochlorid	Merial	Hallbergmoos, Germany
L-Glutamin	Gibco BRL Life Technologies	Eggenstein, Deutschland
LPS	Sigma- Aldrich	Steinheim, Deutschland
Methanol	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
MEM	Gibco BRL Life Technologies	Eggenstein, Deutschland
Milchpulver	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Natirumorthovanadat	Sigma- Aldrich	Steinheim, Deutschland
Natriumbikarbonat	Invitrogen	Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid	AppliChem	Darmstadt, Deutschland
Natriumhypochlorid-	Roth	Karlsruhe,

lösung 12%		Deutschland
NGS	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
NHS	Gibco BRL Life Technologies	Eggenstein, Deutschland
NMDA	Sigma- Aldrich	Deisenhofen, Deutschland
PBS	Gibco BRL Life Technologies	Eggenstein, Deutschland
Penicillin	Sigma- Aldrich	Deisenhofen, Deutschland
PFA	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Phenylmethylsulfonyl- fluorid	Sigma- Aldrich	Steinheim, Deutschland
PLL	Sigma- Aldrich	Steinheim, Deutschland
Polyacrylamid- Methylenbisacrylamid Gemisch	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Saccharose	Roth	Karlsruhe, Deutschland
SDS	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Streptomycin	Sigma- Aldrich	Deisenhofen, Deutschland
Tetramethylethylene- diamin	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Tocopherol	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Tris	Roth	Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Trypsin	Biochrom GmbH, Merck Millipore	Berlin, Deutschland
Tween 20	Sigma- Aldrich	Steinheim,

		Deutschland
Wasserstoffperoxid	Carl Roth GmbH & Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Xylazin	Bayer	Leverkusen, Deutschland
Xylol	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
β -Mercaptoethanol	Sigma- Aldrich	Steinheim, Deutschland

BCA *bicinchoninic acid*, Bicinchoninsäure; DAPI 4',6-Diamidin-2-phenylindol; DMEM *Dulbecco's modified Eagle's medium*; EP Ethylpyruvat; FKS Fötales Kälberserum; HBSS *Hank's balanced salt solution*; LPS Lipopolysaccharide; MEM *Minimal essential medium*; NGS *normal goat serum*, normales Ziegen Serum; NHS *normal horse serum*, normales Pferdeserum; NMDA N-Methyl-D-Aspartat; PBS *phosphate buffered saline*, Phosphat gepufferte Salzlösung; PFA Paraformaldehyd; PLL Poly-L-Lysin; SDS *sodium dodecyl sulfate*, Natriumdodecylsulfat

Tabelle 2: Materialien

Materialien	Hersteller	Herstellersitz
24-Loch Gewebekulturschalen	Falcon, BD Biosciences Discovery Labware	Bedford, Massachusettes, USA
6-Loch Gewebekulturschalen	Falcon, BD Biosciences Discovery Labware	Bedford, Massachusettes, USA
96-Loch Gewebekulturschalen	Falcon, BD Biosciences Discovery Labware	Bedford, Massachusettes, USA
Agar	Sigma-Aldrich	Steinheim, Deutschland
Beschichtete Objektträger	Menzel	Braunschweig, Deutschland
binokulares Lichtmikroskop	Zeiss	Jena, Deutschland
Deckgläschen, rund, Durchmesser 12mm	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co. KG	Sondheim, Deutschland

Eppendorf Reaktionsgefäße, 1ml	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland
Hohlnadel	Sarstedt	Nümbrecht, Deutschland
Neubauer Zählglas	Marienfeld	Lauda-Königshofen
Präparierbesteck	Aesculap	Tuttlingen, Deutschland
Referenzobjektträger	Menzel	Braunschweig, Deutschland
Röntgenfilme	Kodak	Stuttgart, Deutschland
Sterile Skalpellklingen	Braun	Tuttlingen, Deutschland
Sterilfilter, 250 oder 500 ml	Greiner	Frickenhausen, Deutschland
Superfrost Objektträger	Thermo Fisher Scientific	Rockford, Illinois, USA
Zellkultur Inserts, Porengröße: 0,4 mm	Millipore	Schwalbach am Taunus, Deutschland
Zellkulturflaschen mit Filter, 250 ml	Greiner	Frickenhausen, Deutschland
Zellkulturröhrchen 15 oder 25 ml	Falcon, BD Biosciences Discovery Labware	Bedford, Massachusettes , USA
Zellschaber	TPP	Tradingen, Schweiz

Tabelle 3: Geräte

Gerät	Hersteller	Herstellersitz
Axiocam	Carl Zeiss AG	Jena, Deutschland
Axioplan	Carl Zeiss AG	Jena, Deutschland
Blotter	BioRad	München, Deutschland
Brutschrank	Haeraeus	Hanau, Deutschland
Konfokales Laserscanning Mikroskop	Carl Zeiss AG	Göttingen, Deutschland
Kryostat 3050S	Leica Microsystems AG	Wetzlar, Deutschland
MF ChemiBis 1,6	Biostep	Jahnsdorf, Deutschland
Probenkocher	Biometra	Göttingen, Deutschland
Sterilbank	Haeraeus	Hanau, Deutschland
Ultraschallgerät	Bandelin	Berlin, Deutschland

Vibratom VT 1200S	Leica Microsystems AG	Wetzlar, Deutschland
-------------------	--------------------------	----------------------

Tabelle 4: Antikörper

Antigen	Antigen- Antikörperwirt- spezies	Lösungs- verhältnis	Hersteller	Katalognummer
Alexa fluoreszierender Farbstoff 488	Maus-Ziege	1:200	Invitrogen	A-11029
Alexa fluoreszierender Farbstoff 568	Kaninchen- Ziege	1:200	Invitrogen	A-11036
ExtraAvidin Meerrettich Peroxidase	-	1:100	Sigma	E2886
GFAP	Kuh-Kaninchen	1:400	Dako	Z0034
Glo1	Maus-Maus	IHC 1:100, IF 1:50, WB 1:1000	BioMac	#02-15,Klon 2F7
Iba1	Maus- Kaninchen	1:500	Wako	019- 19741
IgG biotin- konjugiert	Maus-Ziege	1:100	Sigma	B-7264
IgG, Meerrettich Peroxidase gekoppelt	Maus-Pferd	1:10000	Vector Laboratories	PI-2000
Laminin	Ratte- Kaninchen	1:200	Dako	Z0097
N-Cadherin	Mensch- Kaninchen	1:100	Abcam	ab18203
NeuN	Maus- Kaninchen	1:500	Millipore	abn78
β-Aktin	Maus-Ziege	1:10000	Sigma	A1978

GFAP *glial fibrillary acidic protein*, Saures Gliafaserprotein; Glo1 Glyoxalase 1; Iba1 *ionized calcium-binding adapter molecule 1*, Ionisiertes Calcium bindendes Adaptermolekül 1; IHC Immunhistochemie; IF Immunfluoreszenz; IgG Immunglobulin G; NeuN *neuron-specific nuclear protein*, Neuronenspezifisches nukeläres Protein; WB Western Blot

Tabelle 5: Programme

Programme	Vertrieb	Vertriebssitz
Axiovision	Carl Zeiss AG	Oberkochen, Deutschland
Graph Pad Prism, Version 5	GraphPad Software	La Jolla, Kalifornien, USA
ImageJ	National Institutes of Health	USA
LSM Image Viewer	Carl Zeiss AG	Göttingen, Deutschland

3.2 Organotypische, hippokampale Schnittkulturen (OHSC)

3.2.1 Präparation und Kultivierung

Alle nachfolgend beschriebenen Experimente erfolgten unter aseptischen Bedingungen. Die Herstellung der OHSC erfolgte nach den veröffentlichten Protokollen [223–225]. Nach der Dekapitation von sieben bis neun Tage alten Spargue-Dawley Ratten wurden Weichteile, Kalotte, Frontallappen und Kleinhirn mit sterilem Präparierbesteck entfernt. Nun wurde das verbleibende Hirn in gekühltes Präparationsmedium (Zusammensetzung für 100 ml: 99 ml Minimal essential medium [MEM], 1 ml Glutamin; pH=7,35, steril filtriert) überführt. Die Gehirne wurden auf den Metallteller des Vibratoms durch HistoAcryl-Gewebekleber fixiert und mit Agarstreifen stabilisiert. Nach Kalibrierung des Vibratoms erfolgte die Anfertigung von 350 µm dicken, horizontalen Schnitten in Präparationsmedium bei 4 °C (Abbildung 1). Diese wurden gesammelt und unter binokularer Sicht wurde der Hippokampus mit entorhinalem Kortex vom restlichen Hirnschnitt getrennt. Es wurden nur die Schnitte genutzt bei denen eine komplette Darstellung des Gyrus dentatus (GD) gelang. Die so entstandenen OHSCs wurden auf Zellkultur Inserts transferiert und anschließend in die Vertiefungen von 6-Loch Gewebekulturplatten überführt.

Pro Vertiefung erfolgte der Zusatz von 1 ml Kulturmedium (Zusammensetzung für 100 ml: 50 ml MEM, 25 ml Ca²⁺ und Magnesiumionen [Mg²⁺] haltige Hank's balancierte Salzlösung [HBSS/mCa²⁺Mg²⁺], 12,5 ml Normal horse serum [NHS], 1 ml 20 % Glukose, 80 µl Ascorbinsäure, 1 ml Penicillin/Streptomycin, 100 µl Insulin, 580 µl Natriumbikarbonat, 2 ml Glutamin; pH=7,4, steril filtriert). Pro Tier entstanden so sechs

bis acht OHSCs. Anschließend erfolgte die Inkubation im Brutschrank bei 35 °C und 5 % CO₂ für sechs Tage. Der Mediumwechsel erfolgte alle zwei Tage.

3.2.2 Exzitotoxische Schädigung

Nach sechs Tagen *in vitro* wurden die OHSCs (n=270) in die Kontrollgruppe (*control group*; CTR) (n=135) oder NMDA geschädigte Gruppe (n=135) aufgeteilt. Anschließend wurden sie innerhalb ihrer Gruppe einem Zeitwert zugeordnet (n=21 pro Gruppe für 5 Minuten [min.]; n=18 pro Gruppe für 1 h; n=15 pro Gruppe für 6 h; n=18 pro Gruppe für 12 h; n=21 pro Gruppe für 24 h; n=24 pro Gruppe für 48 h; n=18 pro Gruppe für 72 h; Abbildung 1). Darauf folgend wurde das verbrauchte Kulturmedium entfernt. In der CTR wurde 1 ml Kulturmedium pro Insert hinzugegeben. Die exzitotoxische Schädigung wurde durch den Zusatz von 50 µmol/l NMDA zum Kulturmedium (NMDA-geschädigte Gruppe) herbeigeführt. Die Inserts der CTR wurden bis zum jeweiligen Fixierungszeitpunkt im Brutschrank inkubiert. Bei der NMDA geschädigten Gruppe wurde das NMDA beinhaltende Medium nach vier Stunden entfernt, die Vertiefungen einmalig mit HBSS/mCa²⁺Mg²⁺ gespült und anschließend 1 ml Kulturmedium hinzugegeben. Nachfolgend fand in beiden Gruppen kein weiterer Mediumwechsel statt. Der Zeitpunkt des NMDA-Zusatzes wurde für beide Gruppen als Zeitpunkt 0 h definiert (Abbildung 1).

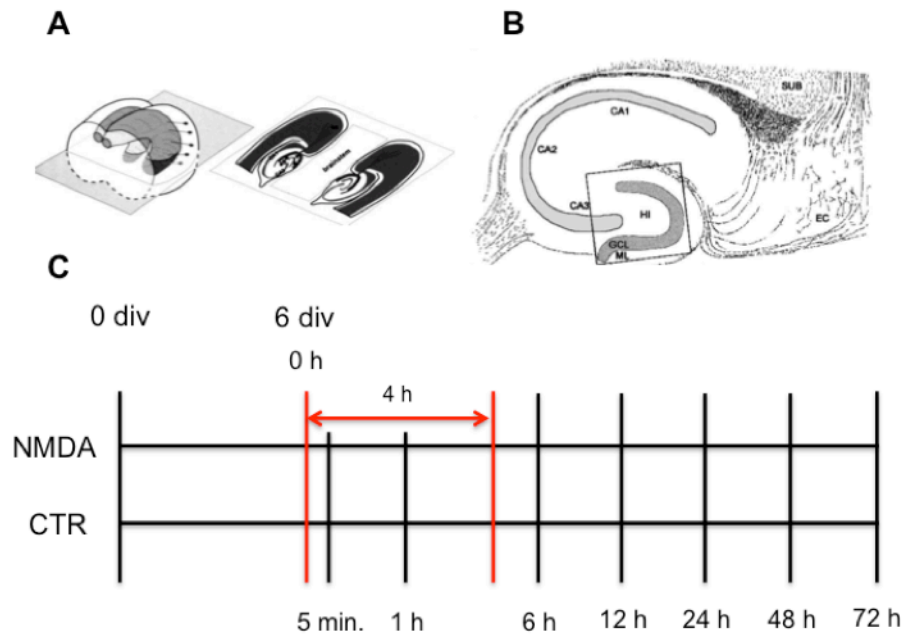


Abbildung 1: Übersicht zur Präparation der OHSC nach Entfernung des Frontallappens und Cerebellums (A). (B) zeigt einen OHSC mit den Strukturen des Ammonshorns und des GD. (C) Abbildung der Verteilung der OHSC mit Behandlungsschema. Modifiziert nach [226,227]

3.2.3 Vorbereitung der OHSC für Western Blot und immunhistochemische Analysen

Zum entsprechenden Zeitpunkt erfolgte der Transfer der OHSCs zur Aufbereitung für die Western Blot Analysen (n=228) oder für die Immunhistochemie (n=42).

Für die Western Blot Analysen wurde der entorhinale Kortex unter binokularer Sicht gelöst und pro Probe drei OHSCs derselben Gruppe und des Fixierungszeitpunktes in 50 µl Lysepuffer (Zusammensetzung für 100 ml: 2,95 g Tris, 6 g Natriumdodecylsulfat [SDS], 30 g Saccharose, 250 µl Natriumorthovanadat [SOV], 40 µl Phenylmethylsulfonylfluorid, 75 ml destilliertes Wasser; pH=7,4) in Eppendorf Reaktionsgefäße transferiert und bei -80 °C bis zur weiteren Analyse gelagert. Zur Vorbereitung der Immunhistochemie wurden die OHSCs mit 4 % Paraformaldehyd (PFA; Zusammensetzung für 100 ml: 4 g/l PFA, 100 ml destilliertes Wasser, 1,136 g Dinatriumhydrogenphosphat, 272 mg Kaliumdihydrogenphosphat) fixiert und im Anschluss in 10 %, in 20 % und zuletzt in 30 % Saccharose zur Kryoprotektion überführt. Für jeden Schritt wurde jeweils eine Mindestinkubationszeit von 24 h eingehalten. Nach der Einbettung der OHSC wurden 12 µm dicke Kryostatschnitte angefertigt, auf Superfrost Objektträger aufgezogen und bis zur weiteren Bearbeitung bei -20 °C gelagert.

3.3 Der permanente Verschluss der Arteria cerebri media mittels Thermokoagulation

Die hier beschriebenen Experimente wurden an spontan hypertensiven Ratten (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) durch Dr. med. Daniel-Christoph Wagner, Fraunhofer Institut für Zelltherapie und Immunologie, Leipzig, Deutschland durchgeführt [228]. Vor der Durchführung erfolgte die Einteilung der Tiere entsprechend des Tötungszeitpunktes (jeweils n=3; 75 min.; 1 Tag (d); 3 d; 7 d; 10 d; 60 d) nach Auftreten der Ischämie. Während der Operation erfolgte die nicht-invasive Messung der Körperkerntemperatur, des Blutdrucks und der Herzfrequenz. Die Tiere wurden mit einer intraperitonealen Injektion von 100 mg/kg Ketaminchlorid, Xylazin 10 mg/kg und Atropin 0,1 mg/kg in tiefe Narkose versetzt. Der pMCAO erfolgte entsprechend der Methode von Tamura et al. [229] (Abbildung 2). Hierzu wurde die Haut zwischen Orbita und äußerem Gehörgang eingeschnitten und die Glandula parotidea mikrochirurgisch nach posterior mobilisiert. Nachfolgend wurde der Musculus temporalis am oberen und hinteren Rand eingeschnitten und nach ventral aufgeklappt und zum großen Teil entfernt. Hieran schloss sich die partielle Resektion der Mandibula und des Os zygomaticum an. Dadurch gelang die Darstellung der Fossa infratemporalis, wo der Nervus mandibularis aufgesucht und bis zu seinem Austrittspunkt am knöchernen Schädel, dem Foramen ovale, zurückverfolgt wurde. Die Musculi pterygoidei wurden schonend zurückgehalten. Zwischen dem medialen Musculus pterygoideus, dem Dach der Fossa infratemporalis und der Articulatio temporomandibularis erfolgte die Kraniotomie, lateroventral des Foramen ovale. Durch eine feine Nadel wurde die Dura mater eröffnet. Nun konnte, unter Schonung der Vena cerebri media superficialis und der olfaktorischen Nervenfasern, die Arteria cerebri media mobilisiert werden. Nach vorsichtiger Ablösung der Arachnoidea mater wurde die Arteria cerebri media zwischen ihrem kortikalen Ast und dem rhinalen Kortex thermokoagulatorisch verschlossen. Nachfolgend erfolgte der schichtweise Verschluss des Operationsgebietes.

Entsprechend der vorher zugeteilten Gruppen erfolgte die Tötung der Tiere durch Kohlenstoffdioxidnarkose und Perfusion mit 4 % PFA. Dazu wurde die Haut über Abdomen und Thorax eröffnet. Nach Darstellung des knöchernen Thorax wurde dieser medial geteilt und die linke Hälfte Richtung Axilla aufgeklappt. Das Herz konnte nun mobilisiert werden. Nachfolgend erfolgte die Punktion und Injektion von 4 % PFA durch den linken Ventrikel. Um das Volumen nach Passage abzulassen, wurde der rechte Vorhof eingeschnitten. Danach wurde das Gehirn entnommen und in 4 % PFA bis zur immunhistochemischen Aufarbeitung bei -80 °C gelagert. Die Anfertigung der Schnitte für die Immunhistochemie wurde an 20 µm dicke Schnitte entsprechend 3.2.3 durchgeführt.

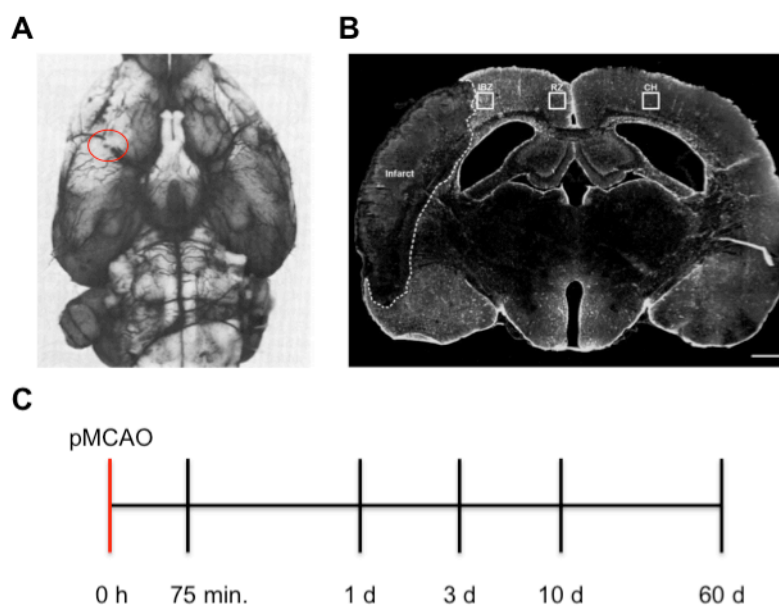


Abbildung 2: Durchführung der pMCAO mit markiertem Verschluss der A. cerebri media (A) und exemplarischem histologischem Schnitt mit Markierung des Infarktgebietes (B, Maßstab 1 mm). Unten aufgeführt die genutzten Fixierungszeitpunkte (C). Modifiziert nach [229,230]

3.4 Zellkulturexperimente an Zelllinien

Alle aufgeführten Experimente sowie die Kultivierung und Vermehrung der Zellen wurden unter aseptischen Bedingungen durchgeführt.

3.4.1 Kultivierung und Vermehrung der Zelllinien BV2 und HT22

Sowohl die BV2 als auch die HT22 Zelllinie wurden in Kulturflaschen im Brutschrank bei 37 °C und 5 %CO₂ in 10 ml Kulturmedium (Zusammensetzung für 100 ml: 88 ml Dulbecco's modified Eagle's medium [DMEM], 10 ml hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum [FKS], 1 ml Penicillin/Streptomycin, 1 ml Glutamin; pH=7,4, steril filtriert) kultiviert. Zur Vermehrung der Zelllinien wurde das verbrauchte Kulturmedium entfernt

und die Zellen, bei konfluentem und adhärentem Wachstum, mit einem sterilen Zellschaber gelöst, die Zellen in 1 ml Kulturmedium resuspendiert und in ein 15 ml Falcon Röhrchen überführt. Anschließend erfolgte die Zentrifugation bei 133-facher Gravitationskraft (g) für 10 Minuten. Danach wurde das Kulturmedium verworfen und durch 10 ml frisches Kulturmedium ersetzt. Zur Quantifizierung der vorhandenen Zellen wurden 10 μ l der Suspension in eine Neubaur Zählkammer gebracht. Anschließend wurden vier angrenzende Gruppenquadranten der Neubaur Zählkammer ausgezählt. Entsprechend der folgenden Formel wurde die benötigte Menge der Zellsuspension ermittelt:

$$X = \frac{(\text{gezählte Zellzahl}/4) \times 10\,000 \times 1\text{ml}}{\text{Gewünschte Zellzahl}}$$

Das berechnete Volumen wurde nun in die Kulturflaschen pipettiert und mit Kulturmedium bis zum Erreichen eines Volumens von 10 ml aufgefüllt.

Im Anschluss wurden die Kulturflaschen bis zum weiteren Gebrauch im Brutschrank inkubiert. Alle zwei Tage erfolgte ein Mediumwechsel.

3.4.2 Vorbereitung der Gewebekulturplatten und Zelllinien für anschließende Experimente und die immunhistochemische Analyse

Vor den jeweiligen Versuchen wurden 24-Loch Gewebekulturplatten mit Poly-L-Lysin (PLL) beschichteten, runden Deckgläschen (\varnothing 12 mm) vorbereitet. Hierzu wurden jeweils 0,5 ml 10 μ g/ml 0,1 % Poly-L-Lysin (PLL) Lösung direkt auf die Deckgläschen gegeben und für 1 h im Brutschrank inkubiert. Darauf folgend wurde die PLL Lösung abgesaugt, die Deckgläschen dreimalig mit Phosphat gepufferter Salzlösung (*phosphate buffered saline*, PBS) gespült und schließlich jegliche Flüssigkeit aus den Vertiefungen entfernt. Danach wurden die 24-Loch Gewebekulturplatten für mindestens sechs Stunden bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Anschließend konnten die Zellen der Zelllinien entsprechend des Protokolls zur Vermehrung bearbeitet werden. Für die Experimente wurden die Zellen mit einer Zielzellzahl von 30000 Zellen pro Deckgläschen in die Gewebekulturplatten eingebracht und 1 ml Kulturmedium hinzugegeben. Wenn die Kulturen ein adhärentes und konfluentes Wachstum aufwiesen, wurde mit den Experimenten begonnen.

3.4.3 Herstellung der EP Lösungen

Vor der Behandlung wurden die EP Lösungen vorbereitet. Aus der initial erworbenen EP-Lösung ($c=8,4$ mol/l) wurden 10 μ l in 9,99 ml Kulturmedium pipettiert und durchmischt (Stammlösung). Zur Herstellung der 8,4 μ mol/l EP-Lösung wurden 10 μ l

der Stammlösung entnommen und in 9,99 ml Kulturmedium überführt, für die Herstellung der 84 $\mu\text{mol/l}$ EP-Lösung wurden 100 μl der Stammlösung in 9,9 ml Kulturmedium pipettiert. Um die 0,84 $\mu\text{mol/l}$ EP-Lösung zu erzeugen wurden 100 μl der 84 $\mu\text{mol/l}$ EP-Lösung in 9,9 ml Kulturmedium überführt.

3.4.4 Behandlung der BV2 Zelllinie mit LPS und EP

Insgesamt wurden sechs 24-Loch Gewebekulturplatten (144 Vertiefungen) für die beschriebenen Versuche verwendet und wie nachfolgend beschrieben aufgeteilt (Abbildung 3). Nach Aufteilung in die entsprechende Behandlungsgruppe (kein EP $n=36$, 0,84 μM EP $n=36$, 8,4 μM EP $n=36$, 84 μM EP $n=36$) erfolgte die Aufteilung in CTR ($n=72$)- und LPS stimulierte Gruppe ($n=72$). Abschließend wurden die Deckgläschen der jeweiligen Behandlungs- und Stimulationsgruppen einem der untersuchten Zeitwerte zugeordnet (30 min. $n=24$, 2 h $n=24$, 6 h $n=24$, 12 h $n=24$, 24 h $n=24$, 48 h $n=24$). Am Ende der Aufteilung waren pro Behandlungs-, Stimulationsgruppe und Zeitwert jeweils 3 Deckgläschen zur Analyse vorbereitet.

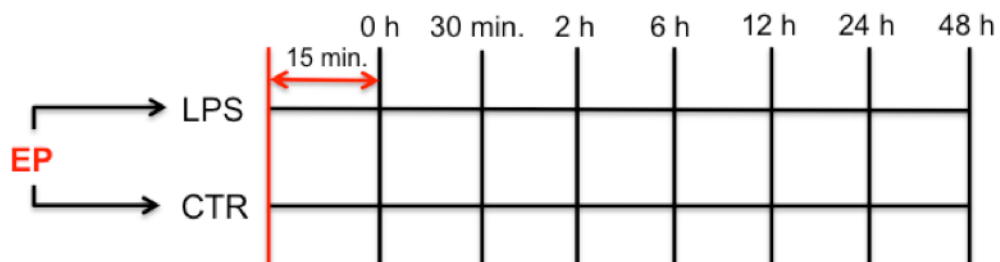


Abbildung 3: Aufteilung der 144 Vertiefungen auf die verschiedenen Behandlungs- und Stimulationsgruppen sowie die entsprechenden Zeitwerte. Präinkubation beider Stimulationsgruppen vor Zeitreihenbeginn für 15 Minuten.

Nach der Aufteilung der Vertiefungen wurde das verbrauchte Kulturmedium abgesaugt und entweder durch 1 ml Kulturmedium (keine EP-Behandlung) oder, entsprechend der zuvor bestimmten Behandlung, 1 ml der jeweiligen EP-Lösung hinzugegeben. Der LPS stimulierten Gruppe wurde nach 15 min. LPS in einer Konzentration von 10 ng/ml zugesetzt. Alle Platten wurden bis zur Fixierung im Brutschrank inkubiert. Die Zugabe von LPS definierte für alle Gruppen den 0 h Wert. Zum jeweiligen Fixierungszeitpunkt wurde das Medium abgesaugt und die Zellen mittels 4 % PFA fixiert.

3.4.5 Behandlung der HT22 Zelllinie mit EP

Für den folgenden Versuch wurden 60 Vertiefungen verwendet und wie folgt zugeordnet (Abbildung 4). Zu Beginn wurden die Vertiefungen den verschiedenen Behandlungen zugeordnet (kein EP n= 15, 0,84 μ M EP n= 15, 8,4 μ M EP n= 15, 84 μ M EP n= 15). Nachfolgend wurden die entsprechenden Zeitwerte festgelegt (2 h n= 12, 6 h n= 12, 12 h n= 12, 24 h n= 12, 72 h n= 12). Am Ende waren für jede Behandlungsgruppe und jeden Zeitwert drei Deckgläschen für die Analyse bereitgestellt. Nach der Aufteilung wurde das Kulturmedium abgesaugt und entsprechend der Behandlung durch 1 ml Kulturmedium (keine Behandlung) oder 1 ml der entsprechenden EP-Lösung ersetzt. Nach der Präinkubation aller Gruppen für 15 min. wurde das Zeitreihenexperiment begonnen und die jeweiligen Vertiefungen zum Fixierungszeitpunkt mit 4 % PFA fixiert.

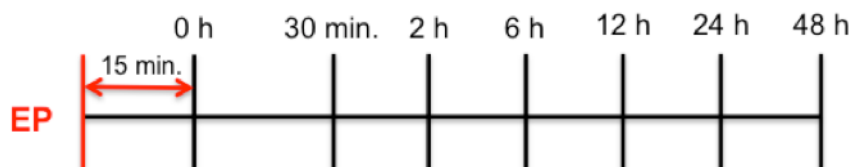


Abbildung 4: Aufteilung der 60 Vertiefungen auf die verschiedenen Behandlungsgruppen und entsprechenden Zeitwerte. Präinkubation aller Behandlungsgruppen vor Zeitreihenbeginn für 15 Minuten.

3.5 Zellkulturexperimente an primären Astrozyten

Alle aufgeführten Experimente wurden unter aseptischen Bedingungen unter einer Sterilbank durchgeführt.

3.5.1 Präparation und Kultivierung primärer Astrozyten

Für die Durchführung der nachfolgend beschriebenen *scratch wound assay* Versuche wurden zuvor primäre Astrozyten präpariert und kultiviert [231]. Hierfür wurden Spargue-Dawley Ratten am Tag der Geburt bzw. bis zum zweiten postnatalen Tag dekapitiert. Anschließend wurden die Hirne aus dem knöchernen Schädel entfernt und in Tocopherol und HBSS/ $mCa^{2+}Mg^{2+}$ überführt. Die Meningen wurden nun mit Hilfe einer Pinzette entfernt und das Gehirn wurde mit einer Pasteurpipette zerkleinert. Daraufhin wurden die Hirne mit HBSS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} (HBSS/ $oCa^{2+}Mg^{2+}$) gewaschen, in ein Falcon Zellkulturröhrchen überführt und mit Trypsin (4 mg/ml) und Desoxyribonuklease 1-haltigem (0,5 mg/ml) HBSS/ $mCa^{2+}Mg^{2+}$ behandelt. Das so entstandene Gemisch wurde bei 133 g 10 min. zentrifugiert. Die abgesetzten Zellen wurden nach Absaugen des überstehenden Kulturmediums mit 1 ml Kulturmedium (entsprechend der Zusammensetzung unter 3.4.1) resuspendiert und auf mehrere

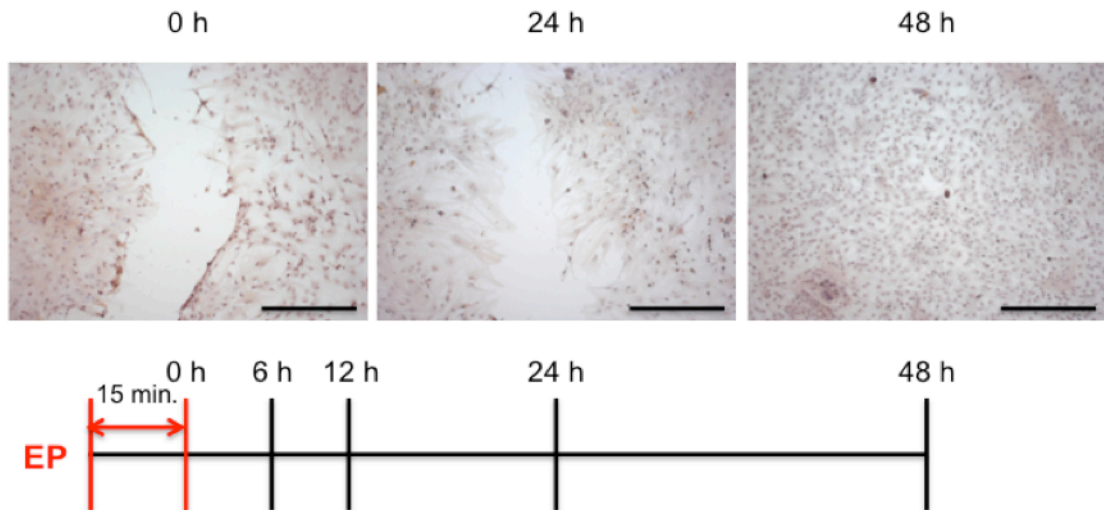


Abbildung 5: Astrozytärer Monolayer nach erfolgter Schädigung im zeitlichen Verlauf mit Aufteilung der Vertiefungen entsprechend der Zeitwerte. Nach 15 min. Präinkubation wurde der mechanische Schaden gesetzt. Maßstab: 300 µm

Kulturflaschen verteilt. Danach wurde die Differenz zum Volumen von 10 ml durch Kulturmedium ersetzt und zusätzlich 10 µg/ml Clodronat zur Abtötung der Mikroglia zugesetzt. Die Kulturflaschen wurden bis zum weiteren Gebrauch im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Aller zwei Tage erfolgte ein Wechsel des Kulturmediums. Die Vermehrung der Astrozyten erfolgte entsprechend dem Protokoll unter 3.4.1 unter Zusatz von 10 µg/ml Clodronat und vorheriger Behandlung der Kulturflaschen mit Trypsin für 2 Minuten. Die Vorbereitung der Gewebekulturplatten und EP-Lösungen wurde wie unter 3.4.2 und 3.4.3 beschrieben vollzogen.

3.5.2 Scratch wound assay

Bei konfluenten, adhärenenten Wachstum der Astrozyten wurden die insgesamt 60 Vertiefungen für drei unabhängige Experimente genutzt. Nach Aufteilung entsprechend der Behandlungsgruppe (kein EP n= 15, 0,84 µM EP n= 15, 8,4 µM EP n= 15, 84 µM EP n= 15) wurden die Vertiefungen einem Zeitwert zugeordnet (0 h n= 12, 6 h n= 12, 12 h n= 12, 24 h n= 12, 48h n= 12; Abbildung 5). Nach dieser Aufteilung standen pro Behandlungsgruppe und Zeitwert jeweils drei Deckgläschen zur Analyse bereit. Zu Beginn des Experiments wurde das verbrauchte Kulturmedium entfernt und nach Behandlungsschema durch 1 ml Kulturmedium (keine Behandlung) oder 1 ml der vorgesehenen EP Lösung ersetzt. Nach 15 min. Präinkubation wurde durch eine Hohlzahn, mittig und möglichst vertikal in der Vertiefung, ein mechanischer Riss (*scratch wound*) erzeugt. Bis zur Fixierung zum zugeordneten Zeitwert durch 4 % PFA wurden die Vertiefungen im Brutschrank inkubiert [225].

3.6 Western Blot Analysen

Zur Analyse wurden die Proben zunächst mit Ultraschall für dreimal drei Sekunden behandelt. Anschließend wurden sie bei 70 °C für 5 min. gekocht und im Anschluss bei 4 °C und 3000 g für 10 min. zentrifugiert. Daraufhin erfolgte die Proteinbestimmung mit dem Pierce Bicinchoninsäure (BCA) Protein Assay Kit. Zuerst wurde die bovine Serumalbumin (BSA) Standardreihe in Doppelbestimmung in die Vertiefungen einer 96-Loch Platte pipettiert: einfacher Probenpuffer (Zusammensetzung für 100 ml: 0,98 g Tris, 2 g SDS, 10 g Saccharose in 75 ml destilliertem Wasser gelöst), 1500 µg/ml, 1000 µg/ml, 750 µg/ml, 500 µg/ml, 250 µg/ml, 125 µg/ml, 100 µg/ml, 75 µg/ml, 50 µg/ml, 25 µg/ml, 10 µg/ml BSA. Nachfolgend wurden die Proben pro Eppendorf Reaktionsgefäß in einem Verhältnis von 1:5 mit einfachem Probenpuffer ver- und durchmischt. Nun wurden 25 µl pro Probe und Vertiefung in die Vertiefungen pipettiert. Nachfolgend wurde die Proteinreagenz aus den beigefügten Reagenzien A und B in einem Verhältnis von 1:50 hergestellt. Von dem Proteinreagenz wurden 200 µl in jede Vertiefung pipettiert. Nun erfolgte die photometrische Proteinbestimmung bei einer Wellenlänge von 492 nm. Die Proben wurden entsprechend der vorher bestimmten Proteinkonzentration mit vierfachem Laemmli-puffer (Zusammensetzung für 100 ml: 32 ml 0,5 mol/l Tris, 15 ml destilliertes Wasser, 40 ml Glycerol, 10 ml 10 % SDS, 2,8 ml β-Mercaptoethanol, 0,2 ml Bromophenolblau) versetzt, sodass eine Zielkonzentration von 10 µg/ml erreicht wurde. Darauffolgend wurden die Proben bei 95 °C für 5 min. gekocht. Nach Aufbau der Gelapparatur wurde diese mit einfachem Laufpuffer (Zusammensetzung für 100 ml: 3 g Tris, 14,4 g Glycin, 10 ml 10 % SDS in 100 ml destilliertem Wasser) befüllt. Daraufhin wurden die Proben und der biotinylierte Proteinmarker aufgetragen und mittels Elektrophorese bei initial 90 V, dann bei 200 V, im 15 % Trenngel (Zusammensetzung für ein Gel: 6,5375 ml destilliertes Wasser, 3,75 ml 30 % Polyacrylamid-Methylenbisacrylamid Gemisch, 22,5 µl 10 % Ammoniumpersulfat, 5 µl Tetramethylethylenediamin, 0,85 g Tris, 18,75 mg SDS) aufgetrennt. Nach erfolgter Auftrennung wurden die Proteine im Sammelgel (Zusammensetzung für ein Gel: 3,0875 ml destilliertes Wasser, 325 µl 30 % Polyacrylamid-Methylenbisacrylamid Gemisch, 25 µl 10 % SDS, 12,5 µl 10 % Ammoniumpersulfat, 2,5 µl Tetramethylethylenediamin, 94,56 mg Tris) gesammelt. Zum Blotten wurden die Nitrocellulosemembran und 14 Filterpapiere im Transferpuffer (Zusammensetzung für 100 ml: 290 mg Glycin, 580 mg Tris, 37 mg SDS, 20 ml Methanol, 80 ml destilliertes Wasser) eingeweicht. Im Anschluss wurde das Sammelgel auf sieben Filterpapiere gelegt, gefolgt von der Nitrocellulosemembran und weiteren sieben Filterpapieren. Der so entstandene Stapel wurde ausgerollt, so dass alle Luftblasen entweichen konnten. Nun erfolgte das Blotten bei 35 V für 30 Minuten.

Danach wurde die Membran mit Ponceau Rot zur Kontrolle angefärbt und mit destilliertem Wasser entfärbt. Daraufhin wurde die Membran mit 5 % Milch (Zusammensetzung für 100 ml: 5 g Milchpulver, 6,05 g Tris, 8,76 g Natriumchlorid, 100 ml destilliertes Wasser) für 30 min. blockiert. Anschließend folgte die Inkubation der Membran über Nacht bei 4 °C unter ständiger Rotation im Falcon Röhrchen zusammen mit dem Glo1 Antikörper (Tabelle 4, in 5 % Milch). Nach diesem Schritt wurde die Membran dreimal für 10 min. in Waschpuffer (Zusammensetzung für 100 ml: 6,05 g Tris, 8,76 g Natriumchlorid, 100 ml destilliertes Wasser) gewaschen. Nachfolgend wurde die Membran mit dem sekundären Antikörper der Meerrettich Peroxidase (Tabelle 4; in 5 % Milch) und dem Sekundärantikörper für den Proteinmarker (in 5 % Milch) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Hieran schlossen sich drei Waschschrte mit Waschpuffer für jeweils 10 Minuten. Nun erfolgte die Entwicklung mit verstärkter Chemiluminiszenz und Detektion im MF ChemiBis 1,6. Nach der erfolgreichen Detektion erfolgte das Strippen der Membran. Hierfür wurde die Membran dreimal 10 min. mit Waschpuffer gewaschen. Hinterher wurde die Membran 5 min. im Stripppuffer (Zusammensetzung für 100 ml: 1,5 g Glycin, 100 mg SDS, 1 ml Tween 20, 100 ml destilliertes Wasser) gewaschen. Darauf folgten erneut drei Waschschrte mit Waschpuffer für jeweils 10 Minuten. Im Anschluss wurde die Membran in 5 % Milch für 30 min. blockiert. Im Folgenden wurde die Membran über Nacht unter ständiger Rotation mit β -Aktin Antikörper (Tabelle 4, in 5%Milch) inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Ablauf wie nach der Inkubation mit dem Glo1 Antikörper bis zur Detektion wiederholt.

3.7 Histochemie und Immunhistochemie

3.7.1 Hämalaun-Eosin Färbung

Für die Auswertung der *scratch wound assay* Deckgläschen wurde eine Hämalaun-Eosin (HE) Färbung vorgenommen. Dazu wurden die Präparate 5 min. mit 0,02 mol/l PBS (Zusammensetzung für 100 ml: 0,9 g Natriumchlorid, 227 mg Dinatriumhydrogenphosphat, 54 mg Kaliumdihydrogenphosphat, 100 ml destilliertes Wasser) gespült und hinterher durch Zugabe von Hämalaun nach Mayer für 4 bis 8 min. gefärbt. Im Anschluss wurden die Präparate mit destilliertem Wasser für 2 min. gespült, gefolgt von einer Wässerungsphase unter schwach laufendem Leitungswasser für 30 Minuten. Nun erfolgte die Färbung mit Eosin für 3 bis 5 min., bevor die Präparate in der aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und mit Entellan auf Objektträgern eingedeckt wurden.

3.7.2 Immunfluoreszenz Färbung

Vor Beginn der Färbung wurden die Schnitte 30 min. bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Danach erfolgte die dreimalige Spülung mit PBS/Triton (Zusammensetzung für 100 ml: 0,9 g Natriumchlorid, 227 mg Dinatriumhydrogenphosphat, 54 mg Kaliumdihydrogenphosphat, 0,3 ml Triton X-100, 99,7 ml destilliertes Wasser) für jeweils 10 Minuten. Die Präparate wurden dann mit normalem Ziegenserum (*normal goat serum*, NGS) im Verhältnis von 1:20 in PBS/Triton für 30 min. vorinkubiert und je nach vorher bestimmtem Procedere mit folgenden Primärantikörper in mit 0,5 % BSA versetztem PBS/Triton über Nacht inkubiert: Glo1, Saures Gliafaserprotein (GFAP), neuronenspezifisches nukleäres Protein (NeuN), Laminin, Ionisiertes Calcium bindendes Adaptermolekül 1 (Iba1), neuronales Cadherin (N-Cadherin) (Tabelle 4). Hinterher erfolgten drei Waschschriffe mit PBS/Triton für jeweils 10 Minuten. Mit Hilfe der Alexa 488, 568 und/oder 633 gekoppelten Sekundärantikörper (Tabelle 4) wurden die Signale der Primärantikörper visualisiert. Danach folgte erneut ein Waschschriff mit PBS/Triton für 10 min. und das einmalige Waschen mit destilliertem Wasser für 5 Minuten. Gegebenenfalls wurde nun eine 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) Färbung angeschlossen, welche die Inkubation mit DAPI für 5 min. und das erneute Waschen mit PBS/Triton für 10 min. und mit destilliertem Wasser für 5 min. beinhaltete. Nach Abschluss der Färbung wurden die Schnitte mit fluoreszierendem Eindeckmedium eingedeckelt. Die Lagerung der Objektträger erfolgte bis zur Auswertung bei 4 °C.

3.7.3 Die ExtrAvidin Färbemethode

Für die ExtrAvidin Färbung wurden die Schnitte 30 min. bei Raumtemperatur getrocknet. Für die Zelllinienfärbungen wurde dieser Schritt ausgelassen. Für die Zelllinienfärbungen wurde statt PBS/Triton stets 0,02 mol/l PBS benutzt. Zum Blocken der endogenen Peroxidase wurden die Proben mit 4,5 % Wasserstoffperoxid versetztem Methanol für 10 min. behandelt. Anschließend wurden drei Waschschriffe mit PBS/Triton für jeweils 10 min. durchgeführt, gefolgt von der Inkubation mit NGS im Verhältnis von 1:20 in PBS/Triton für 30 Minuten. Hieran schloss sich die Inkubation mit dem Glo1 Antikörper in mit 0,5 % BSA versetztem PBS/Triton über Nacht bei 4 °C an. Danach folgten drei Waschschriffe mit PBS/Triton für jeweils 10 Minuten. Hinterher wurde das Material mit Biotin-konjugiertem monoklonalem Immunglobulin G (IgG) (Tabelle 4) Antikörper in PBS/Triton für eine Stunde inkubiert. Im Anschluss wurde das Material erneut dreimal für jeweils 10 min. mit PBS/Triton gewaschen und danach mit ExtrAvidin Peroxidase in PBS/Triton (Tabelle 4) für eine Stunde behandelt. Darauffolgend wurde das Material zweimal mit PBS/Triton und einmalig mit 0,05 mol/l

Trispuffer (Zusammensetzung für 1 l: 6,06 g Tris, 1 l destilliertes Wasser) für jeweils 10 min. gewaschen. Dann wurde das Material mit 0,05 g/l 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) und 0,15 % Wasserstoffperoxid versetztem 0,05 mol/l Trispuffer inkubiert. Parallel zu den Waschsritten, einmal mit Trispuffer für 10 min. und zweimalig für jeweils 5 min. mit destilliertem Wasser, wurde das DAB mit Natriumhypochloridlösung neutralisiert. Danach wurden die Proben durch Überführung in die aufsteigende Alkoholreihe entwässert und mit Entellan und 24x50 mm Deckgläschen eingedeckt.

3.8 Auswertung

3.8.1 Auswertung der Western Blot Membranen

Zur Analyse der belichteten Western Blot Membranen wurden diese digital als TIFF Dateien gespeichert und anschließend in ImageJ geöffnet. Hier wurden die Bilder invertiert und die Banden des gleichen Molekulargewichts möglichst horizontal ausgewählt. Anschließend wurde die Intensität berechnet. Die Intensitäten wurden auf die jeweilig für Gruppe, Zeitwert und Experiment bestimmte Intensität des β -Aktins normiert. Für die im Anschluss durchgeführte Normierung wurden die Intensitätswerte der NMDA geschädigten Gruppe auf den CTR Wert desselben Zeitpunkts und des jeweiligen Experiments normiert und der entsprechende CTR Wert wurde als 100% Wert angenommen. Die Bildung der Glo1 Ratio erfolgte durch Division der β -Aktin normierten Intensitätswerte des Glo1 Dimers durch diejenigen des Glo1 Monomers.

3.8.2 Konfokale Laserscanning Mikroskopie

Die Immunfluoreszenzfärbungen wurden mittels konfokaler Laserscanning Mikroskopie ausgewertet. Die für die jeweiligen Färbungen benutzte Wellenlänge (λ ; λ Exzitation) des monochromatischen Lichts, der genutzte dichroische Spiegel, der Emissions-Bandpassfilter (λ Emission) und die gewählte Farbe zur Darstellung sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6: Einstellungen für die konfokale Laserscanning Mikroskopie

Antigen	Marker	λ Exzitation	Dichroischer Spiegel		λ Emission	Farbe
Glo1	Alexa fluoreszierender Farbstoff 488	488nm	FT 488/ 543	FT UV/488/ 543/633	505- 530nm	Grün
NeuN	Alexa fluoreszierender Farbstoff 568	543nm			585- 615nm	Rot
Laminin						
GFAP						

N-Cadherin						
DAPI		405nm			420-480nm	Blau

Glo1 Glyoxalase 1; GFAP *glial fibrillary acidic protein*; Saures Gliafaserprotein; Iba1 *ionized calcium-binding adapter molecule 1*, NeuN *neuron-specific nuclear protein*, Neuronenspezifisches nukeläres Protein; λ Wellenlänge

Zur Untersuchung der intrazellulären bzw. zellmembrannahen Lage der Glo1 wurden Bildstapel in z-Richtung aufgenommen und für die weitere Analyse gespeichert.

3.8.3 Voreinstellung für die Durchlichtmikroskopie

Die Auswertung der HE Schnitte und der nach ExtrAvidin Methode gefärbten Präparate erfolgte an einem Axioplan Durchlichtmikroskop. Nach erfolgtem Einstellen der Beleuchtungsstärke, des Kontrastes und der Köhlerschen Beleuchtung wurden die Präparate mit den 2,5-, 10- und 40-fach vergrößernden Objektiven unter Nutzung eines 10-fach vergrößernden Okulars mit der installierten Axiocam Kamera im Programm AxioVision aufgenommen.

3.8.4 Analyse der pMCAO Experimente

Bei der Auswertung der pMCAO Schnitte bezüglich der Glo1 Immunreaktivität wurden die nicht-geschädigten (nachfolgend: contralateral) und geschädigten (nachfolgend: ipsilateral) Hemisphären in Übersicht und bei starker Vergrößerung aufgenommen und Unterschiede in der Expression der Glo1 dokumentiert.

3.8.5 Auswertung des scratch wound assays mittels Durchlichtmikroskopie

Die HE- gefärbten *scratch wound assay* Präparate wurden bei 100-facher Vergrößerung aufgenommen. Hier wurde der mechanisch erzeugte Spalt aufgesucht und als Bildmitte eingestellt. Das Bild wurde in AxioVision mit einem Referenzobjektträger skaliert und an vier Stellen vermessen. Dabei wurde das Präparat entlang des Spalts geviertelt, sodass jeweils der Randbereich und zwei zentrale Bereiche erfasst und vermessen wurden. Die Spaltbreite wurde in μm dokumentiert.

3.8.6 Morphometrische Analyse der Zelllinienexperimente mittels Durchlichtmikroskopie

Die Untersuchung der Glo1 Immunreaktivität hinsichtlich Veränderungen des Expressionsmusters durch LPS- und EP-Gabe wurde bei 100- und 400-facher

Vergrößerung untersucht. Die Präparate wurden in vier Quadranten eingeteilt und hinsichtlich Zellzahlschwankungen möglicher Unterschiede der Glo1-(Trans)Lokalisation, -Immunreaktivität und zellspezifischen Expression untersucht.

3.8.7 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der aus 3.8.1 und 3.8.5 erhobenen Daten wurde mit dem Programm GraphPad Prism vorgenommen. Der Datensatz von 3.8.1 bestand dabei aus fünf unabhängigen und von 3.8.5 aus drei unabhängigen Experimenten. Nach Analyse der Daten auf Normalverteilung wurden mittels ANOVA (analysis of variance; Varianzanalyse) Tests mögliche Signifikanzen untersucht. Dabei wurde das Signifikanzniveau auf 5 % definiert ($p < 0,05$). Beim Erreichen des Signifikanzniveaus wurde der Bonferroni Test angeschlossen um Untersuchungen zwischen den Gruppen durchzuführen. Zur Präsentation wurden Mittelwerte und Standardfehler des Mittelwertes angegeben.

4 Ergebnisse

4.1 Die Glo1 Proteinkonzentration und Immunreaktivität zeigen schädigungs- und zeitabhängige Veränderungen im Modell der exzitotoxisch geschädigten OHSC

4.1.1 Die exzitotoxische Schädigung führt zu einem zeitabhängigen Anstieg des Glo1 Dimers und zu einer Verschiebung von Glo1 Monomer zu Glo1 Dimer

Um mögliche zeitliche und schädigungsabhängige Veränderungen der Glo1 Proteinkonzentration zu analysieren, wurden Western Blot Untersuchungen unter reduzierenden Bedingungen der OHSC zu verschiedenen Zeitpunkten ohne und mit NMDA Schädigung durchgeführt. Anschließend erfolgte die semiquantitative Auswertung durch Bestimmung der Intensitäten und darauffolgender Normierung auf β -Aktin, welches als Referenzprotein genutzt wurde. Abbildung 6 zeigt exemplarisch einen solchen Western Blot. Hier erkannte der β -Aktin Antikörper entsprechend des Molekulargewichts eine 42 kDa schwere Bande. Der Glo1 Antikörper erkannte bei 23 kDa das Glo1 Monomer und bei 46 kDa das Glo1 Dimer. Die bestimmten Intensitäten sind in den Tabellen 7-9 aufgeführt. Eine signifikante zeitliche Veränderung konnte weder für das Glo1 Monomer noch für das Glo1 Dimer in der CTR bestimmt werden ($p > 0,05$, Abbildung 7). Im Vergleich von Glo1 Monomer und Dimer fand sich zu allen betrachteten Zeitpunkten eine signifikant höhere Konzentration des Glo1 Monomers ($p < 0,0001$; Tabelle 7, Abbildung 7). Nach erfolgter β -Aktin Normierung wurden die gewonnenen Intensitäten der NMDA geschädigten Gruppe auf die entsprechenden Zeitwerte der CTR normiert (Tabelle 8, Abbildung 8). Bei der

Betrachtung der zeitlichen Dynamik wurde eine signifikante Abnahme des Glo1 Monomers zwischen 5 min. und 48 h ($p < 0,05$) beobachtet. Weitere zeitliche, signifikante Variationen konnten für das Glo1 Monomer nicht bestimmt werden ($p > 0,05$). Dagegen konnte ein signifikanter Anstieg des Glo1 Dimer zwischen 12 und 24 h beobachtet werden ($p < 0,05$). Weitere signifikante Unterschiede existierten für das Glo1 Dimer nicht ($p > 0,05$). Zwischen Glo1 Monomer und Dimer fand sich bei 24 und 48 h ein signifikanter Unterschied, welcher jedoch nur für das Glo1 Dimer signifikant zur Kontrollgruppe unterschiedlich war ($p < 0,0001$). An den übrigen Zeitpunkten zeigten sich keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$). Um eine mögliche Umverteilung zwischen Glo1 Monomer und Glo1 Dimer zu untersuchen, wurde das Verhältnis von Glo1 Dimer zu Glo1 Monomer für die entsprechenden Zeitpunkte berechnet und ausgewertet (Tabelle 9, Abbildung 9). Innerhalb der CTR wurde kein signifikanter zeitlicher Unterschied beobachtet. In der NMDA geschädigten Gruppe fand sich ein signifikanter Anstieg der Glo1 Ratio zwischen 1 und 24 h ($p < 0,05$). Im Vergleich beider Gruppen zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen 24 und 48 h nach Schädigung ($p < 0,0001$).

Tabelle 7: Bestimmte Intensitäten der Western Blot Analysen nach β -Aktin Normierung für die CTR

Zeitwert	Monomer		Dimer	
	MW	SEM	MW	SEM
5 min.	0,78	0,1	0,04	0,01
1 h	0,71	0,13	0,05	0,02
6 h	0,74	0,06	0,06	0,02
12 h	0,61	0,06	0,05	0,01
24 h	0,66	0,1	0,04	0,01
48 h	0,74	0,07	0,06	0,01
72 h	0,82	0,12	0,06	0,01

CTR Kontrollgruppe, MW Mittelwert, SEM Standardfehler, min. Minuten, h Stunde(n)

Tabelle 8: Intensitäten der NMDA geschädigte Gruppe normiert auf die zeitentsprechenden CTR Werte

Zeitwert	Monomer (% von CTR)		Dimer (% von CTR)	
	MW	SEM	MW	SEM
5 min.	110,3	16,01	123,1	19,14
1 h	116	17,87	121,6	13,63
6 h	99,01	9,96	116,5	22,94

12 h	97,06	12,34	96,55	7,61
24 h	75,18	16,49	202,6	37,53
48 h	68,09	7,83	157,5	16,58
72 h	71,69	8,27	122,7	20,38

CTR Kontrollgruppe, MW Mittelwert, SEM Standardfehler, min. Minuten, h Stunde(n), % von CTR Prozentualer Anteil des zeitlich korrespondierenden Wertes der CTR

Tabelle 9: Glo1 Ratio (Dimer/Monomer) generiert aus den β -Aktin normierten Glo1 Monomer und Dimer Intensitäten der CTR und NMDA geschädigten Gruppe.

Zeitwert	CTR		NMDA geschädigte Gruppe	
	MW	SEM	MW	SEM
5 min.	0,06	0,01	0,06	0,01
1 h	0,07	0,01	0,07	0,01
6 h	0,08	0,03	0,1	0,01
12 h	0,1	0,01	0,1	0,01
24 h	0,06	0,01	0,17	0,03
48 h	0,08	0,01	0,18	0,02
72 h	0,07	0,01	0,13	0,03

CTR Kontrollgruppe, MW Mittelwert, NMDA N-Methyl-D-Aspartat, SEM Standardfehler, min. Minuten, h Stunde(n)

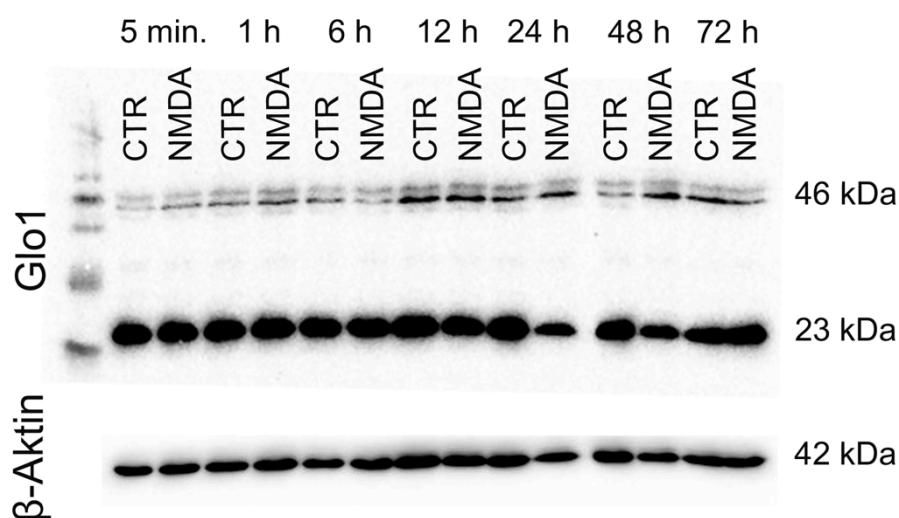


Abbildung 6: Exemplarischer Western Blot mit Detektion des Glo1 Monomers bei 23 kDa, des Glo1 Dimers bei 46 kDa und des entsprechenden β -Aktins bei 42 kDa über alle untersuchten Zeitpunkte und für beide Gruppen

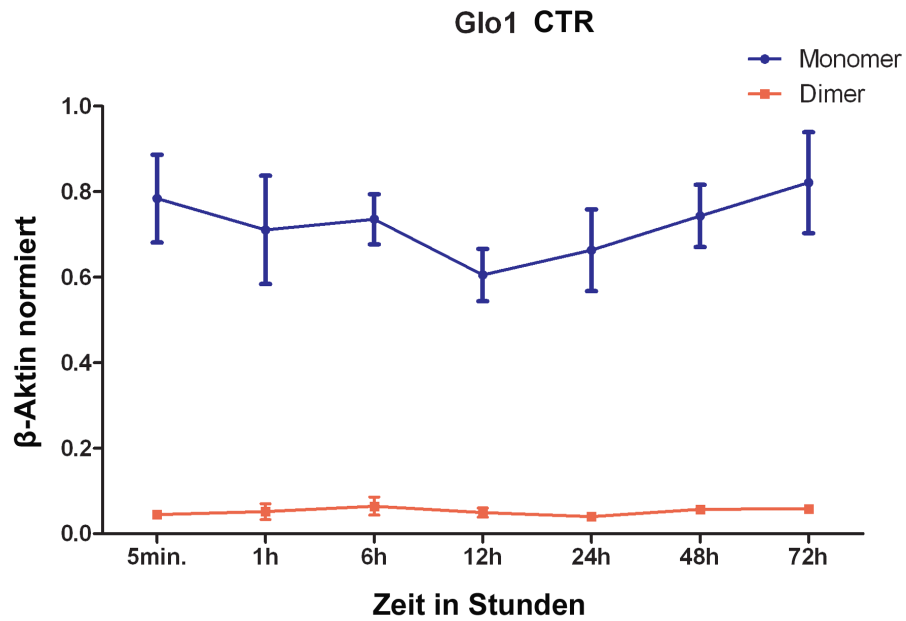


Abbildung 7: Semiquantitative Auswertung der β -Aktin normierten Intensitäten für das Glo1 Monomer und Dimer der CTR über die Zeit

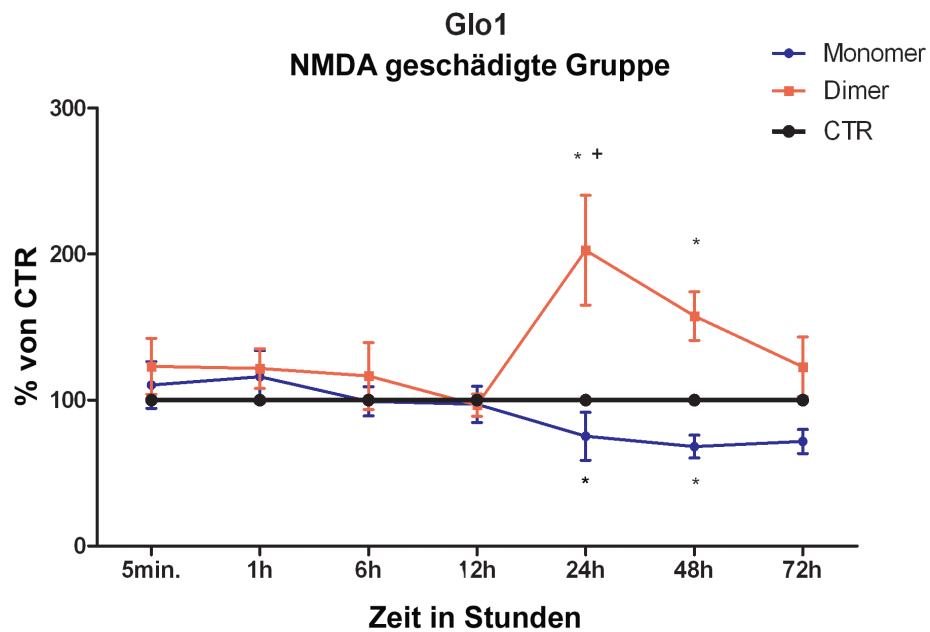


Abbildung 8: CTR normierte semiquantitative Bestimmung der Intensitäten für das Glo1 Monomer und Dimer über die Zeit. * signifikanter Unterschied zur CTR und für das Monomer verglichen zum Dimer, + signifikanter Unterschied zum vorhergehenden Zeitpunkt.

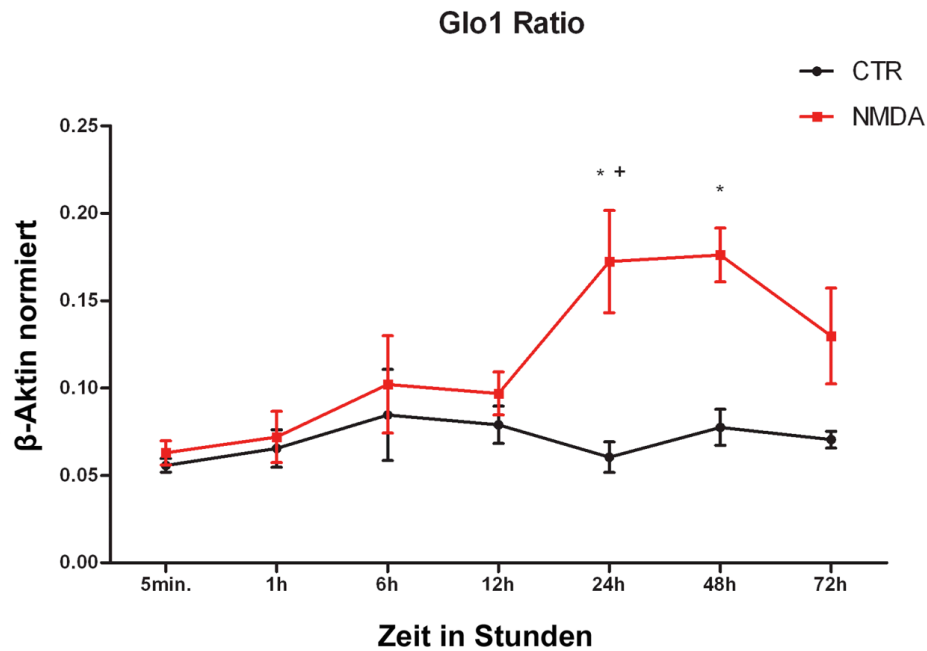


Abbildung 9: Semiquantitative Auswertung der β -Aktin normierten Glo1 Ratio (Dimer/Monomer) über die Zeit, * signifikanter Unterschied zur CTR, + signifikanter Unterschied zu 1 h nach Schädigung

4.1.2 Im Rahmen der exzitotoxischen Schädigung kommt es zu einer zeitabhängigen Veränderung der Glo1 Immunreaktivität im GD

Für die Untersuchung der schädigungs- und zeitabhängigen Variationen der Glo1 Immunreaktivität wurden Kryostatschnitte der OHSCs angefertigt und mittels Immunfluoreszenzmethode doppelt markiert. Darauffolgend wurde die Hippokampusformation, mit speziellem Augenmerk auf den GD, mittels konfokaler Laserscanning Mikroskopie betrachtet (Abbildung 10). Dabei zeigte sich in der Doppelfärbung von Glo1 und NeuN in der CTR keine Kolokalisierung im GD. Nur astrozytäre Fortsätze besaßen eine Glo1 Immunreaktivität (Abbildung 10). Eine zeitliche Veränderung konnte in der CTR nicht beobachtet werden. In der NMDA geschädigten Gruppe zeigte sich eine Änderung der Glo1 Immunreaktivität an den Zeitpunkten 12, 24 und 48 h nach Schädigung. In den Übersichtsaufnahmen der NMDA geschädigten Gruppe kam es nach 24 und 48 h zu einem Auftauchen von wenigen kleinen, rundlichen Glo1 positiven Zellen (Abbildung 10, 12).

Unter Nutzung einer höheren Vergrößerung konnte 12 h Stunden nach NMDA Zugabe eine Translokation der Glo1 Immunreaktivität zur neuronalen Zellmembran beobachtet werden (Abbildung 11). Außerdem konnte nach 24 und 48 h in den auftauchenden Glo1 positiven Zellen eine Kernfragmentierung mit zeitlicher Zunahme und Kondensation der Zellen gesichert werden (Abbildung 12). Nach 72 h waren diese Zellen nicht mehr zu finden. Der Zelltyp dieser Zellen konnte mittels Doppelmarkierung

nicht determiniert werden. Mittels der Doppelfärbungen von Glo1 und GFAP bzw. Iba1 konnte gezeigt werden, dass Astrozyten und Mikroglia eine Glo1 Immunreaktivität besitzen. Allerdings zeigte diese keine zeit- und schädigungsabhängigen Veränderungen.

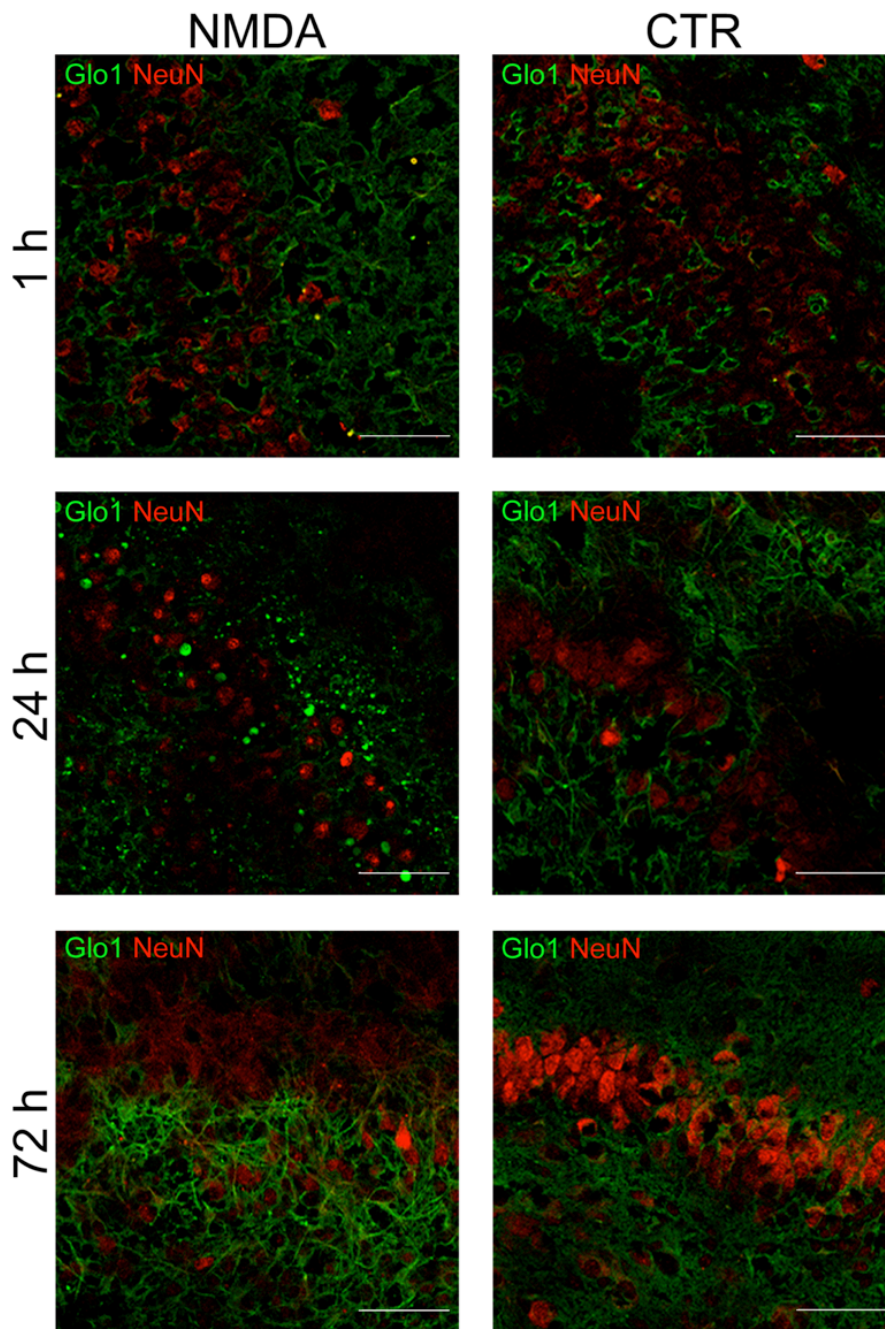


Abbildung 10: Immunfluoreszenzfärbungen des GD für Glo1 (grün) und NeuN (rot) über die Zeit und für beide Gruppen. Maßstab: 50 μ m

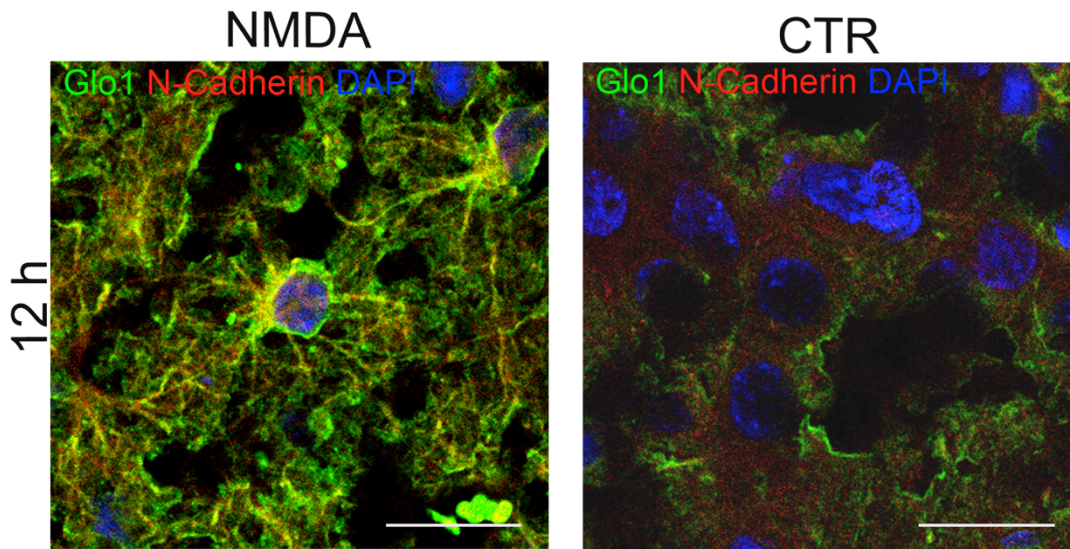


Abbildung 11: Translokation der Glo1 (grün) 12 h nach exzitotoxischer Schädigung zur neuronalen Zellmembran, markiert mittels N-Cadherin (rot) und ohne Nachweis der Glo1 in Zellkernnähe, markiert mittels DAPI. Maßstab: 20 μm

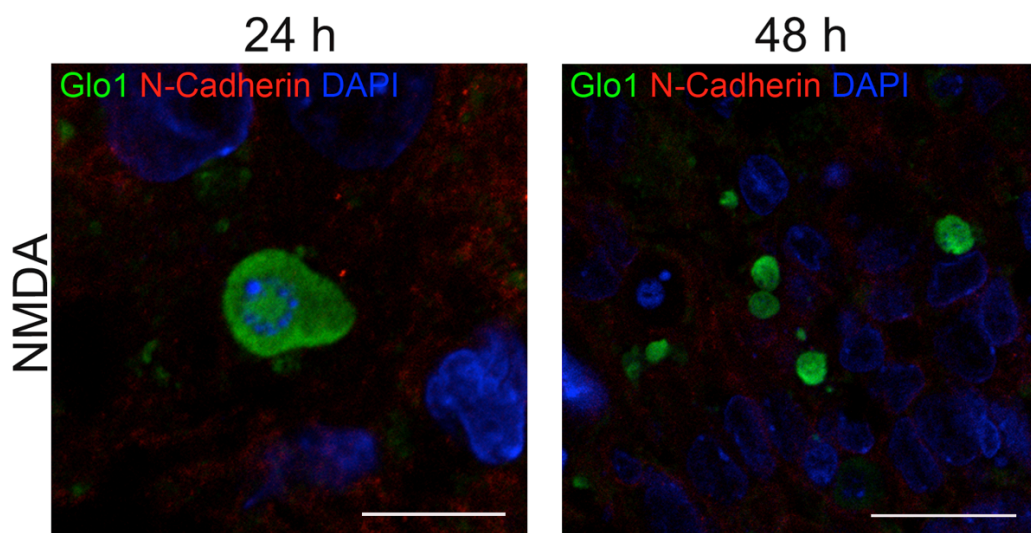


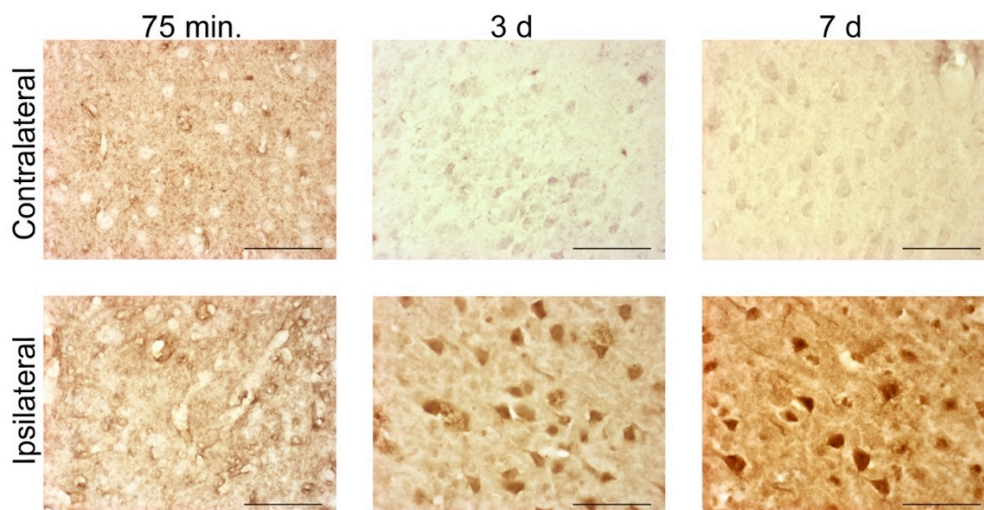
Abbildung 12: Nachweis der Glo1 (grün) positiven Zellen mit fragmentiertem Kern (markiert durch DAPI) nach exzitotoxischer Schädigung. Maßstab: 24 h 10 μm , 48 h 20 μm

4.2 Die Glo1 Immunreaktivität weist zeitabhängige Variationen nach pMCAO auf

Um eine mögliche Rolle der Glo1 nach ischämischem Schlaganfall zu überprüfen wurde das Modell der pMCAO eingesetzt. Aus den Hirnen der operierten Tiere wurden Kryostatschnitte angefertigt und mittels ExtrAvidin und Immunfluoreszenz Methode gefärbt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Lichtmikroskopie bzw. konfokalen Laserscanningmikroskopie (Abbildung 13,14). Die Hemisphäre mit unverschlossener

Arteria cerebri media (contralateral) wurde als Kontrolle zum Vergleich mit der geschädigten Hemisphäre (ipsilateral) genutzt.

Über den betrachteten Zeitraum zeigte sich auf beiden Hemisphären eine Glo1 Immunreaktivität im Gefäßendothel, jedoch ohne zeitliche Dynamik (Abbildung 13). Auf der contralateralen Hemisphäre konnte keine zusätzliche Glo1 Immunreaktivität über die weiteren Zeitpunkte beobachtet werden. Auf der ipsilateralen Seite war die Zeichnung des Gefäßendothels mit Glo1 Immunreaktivität ebenfalls zu sehen, zeigte aber eine scheinbar höhere Intensität nach 75 Minuten. Nach 1-10 d präsentierten die Neurone innerhalb des Infarktgebietes die stärkste Glo1 Immunreaktivität (Abbildung 13). Zum spätesten betrachteten Zeitpunkt (60 d) nach Ischämie verschwand das neuronale Muster und stattdessen wiesen die Astrozyten der Astroglianarbe die stärkste Glo1 Immunreaktivität auf. Zur Validierung dieses morphologischen Eindrucks wurden Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt um einerseits die Lokalisation im Gefäßendothel (mittels Laminin Färbung), in Neuronen (mittels NeuN Färbung) und in Astrozyten (mittels GFAP Färbung) darzustellen (Abbildung 14).



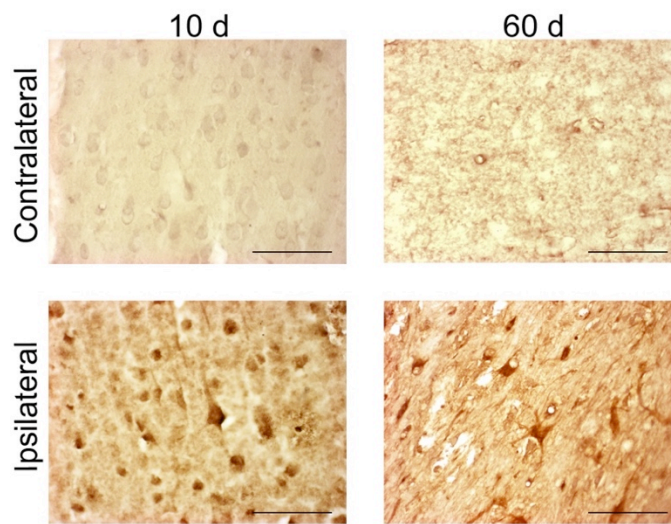


Abbildung 13: Zeitliche Variationen der Glo1 Immunreaktivität nach pMCAO mit nach 1 d ausgeprägtem neuronalem Muster, welches nach 60 d nicht auffindbar war. Nach 60 d besaßen die Astrozyten der Astroglialnarbe die stärkste Glo1 Immunreaktivität. contralateral: ungeschädigte Hemisphäre, ipsilateral: Hemisphäre nach pMCAO; Maßstab: 300 μm

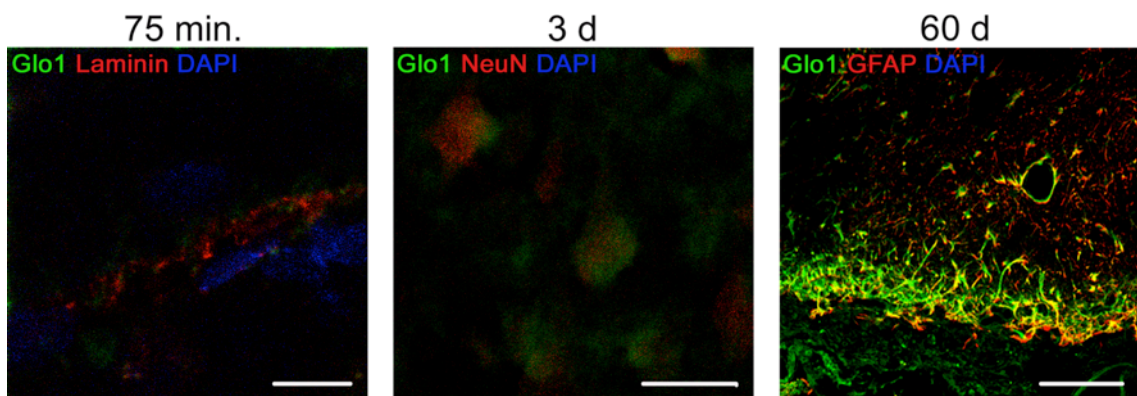


Abbildung 14: Zeitliche Variation der Zellen mit der stärksten Glo1 (grün) Immunreaktivität auf der geschädigten Hemisphäre. Während nach 75 min. nur das Gefäßendothel, markiert durch Laminin (rot), eine Glo1 Immunreaktivität zeigt, präsentieren von 1 d bis 10 d die Neurone, markiert mittels NeuN (rot) die stärkste Glo1 Immunreaktivität. Dieses Muster verschwand nach 60 d und die Astrozyten der Astroglialnarbe präsentierten die stärkste Glo1 Immunreaktivität, Maßstab: 10 μm (75 min), 20 μm (3 d), 100 μm (60 d).

4.3 Die Stimulation mit LPS und die Behandlung mit EP verändert die Glo1 Immunreaktivität in BV2 Zellen über die Zeit nicht

Die Untersuchung der Glo1 Immunreaktivität von BV2 Zellen erfolgte mittels Immunhistochemie und lichtmikroskopischer Auswertung.

In allen Gruppen und zu allen untersuchten Zeitpunkten fand sich eine starke Glo1 Immunreaktivität in allen BV2 Zellen. Dabei schien diese am stärksten in jenen BV2 Zellen mit amöboider Zellmorphologie (Abbildung 15,16). Die Glo1 Immunreaktivität beschränkte sich auf das Zytoplasma und die perinukleäre Zisterne der BV2 Zellen. Innerhalb der CTR variierte die Glo1 Immunreaktivität über die Zeit nicht (Abbildung 15). Auch durch eine Behandlung mit EP wurde die Glo1 Immunreaktivität nicht beeinflusst. Zwischen den EP behandelten Gruppen konnte keine Alternation der Glo1 Immunreaktivität beobachtet werden.

Nach Stimulation der BV2 Zellen mit LPS kam es zur Reduktion der Zellzahl, zudem entwickelte der Großteil der Zellen eine amöboide Zellmorphologie.

Die Glo1 Immunreaktivität blieb dabei unter subjektiven Gesichtspunkten unbeeinflusst (Abbildung 16).

Die Glo1 Immunreaktivität veränderte sich durch eine zusätzliche EP-Behandlung nicht (Abbildung 16). Jedoch schienen auf den mit EP behandelten Deckgläschen mehr Zellen vorhanden zu sein, verglichen mit denen ohne EP-Behandlung (Abbildung 17). Zwischen den mit EP behandelten Gruppen war kein konzentrationsabhängiger Unterschied zu erkennen. Zu allen untersuchten Zeitpunkten blieb die Glo1 Immunreaktivität unbeeinflusst von der Zeit, der Stimulation mit LPS und der Behandlung mit EP.

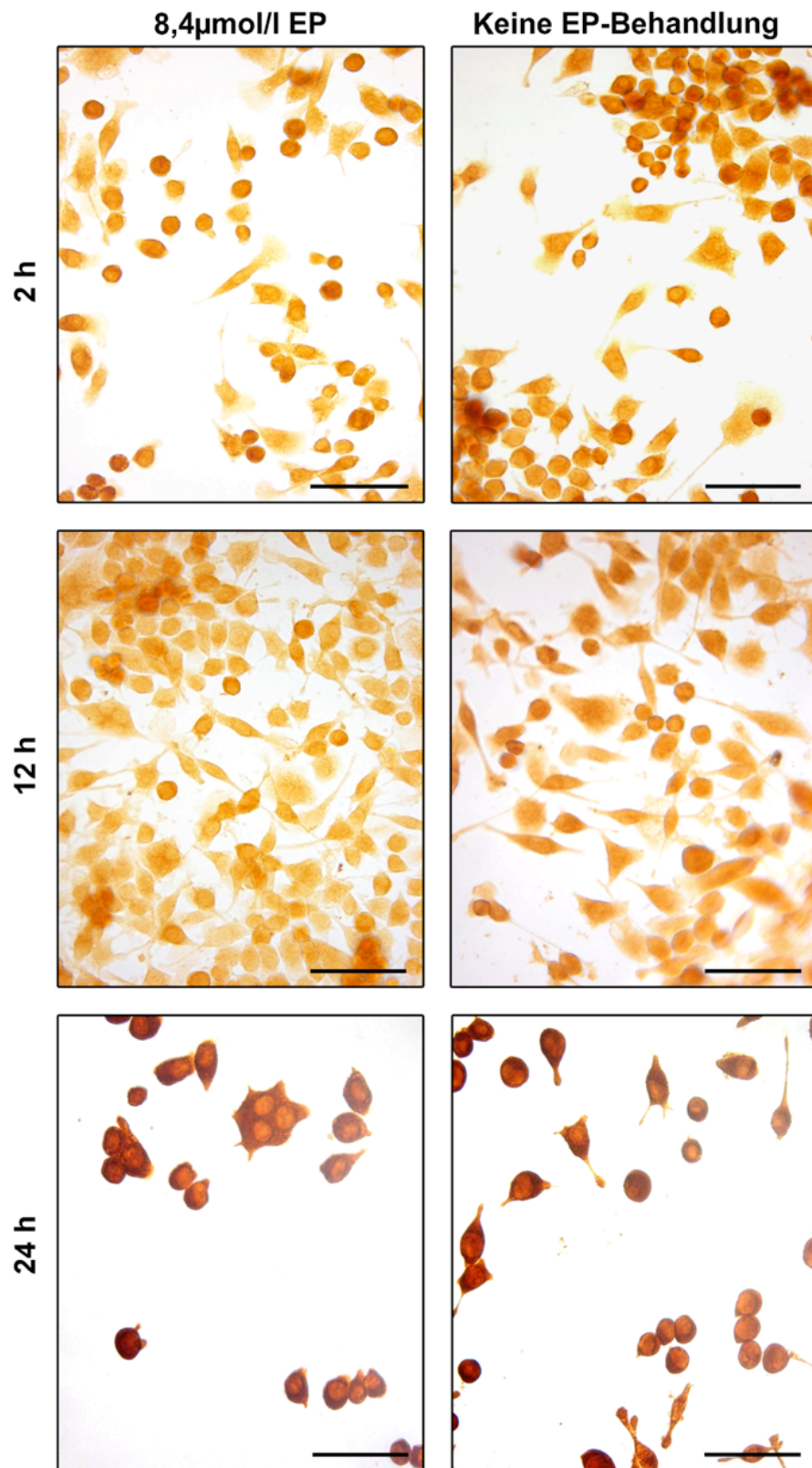


Abbildung 15: Immunhistochemischer Nachweis der Glo1 in nicht LPS stimulierten BV2 Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit und ohne EP-Behandlung. Repräsentierend für die EP Gruppe wurde die mit 8,4 µmol/l EP behandelte Gruppe gewählt. Maßstab: 100 µm

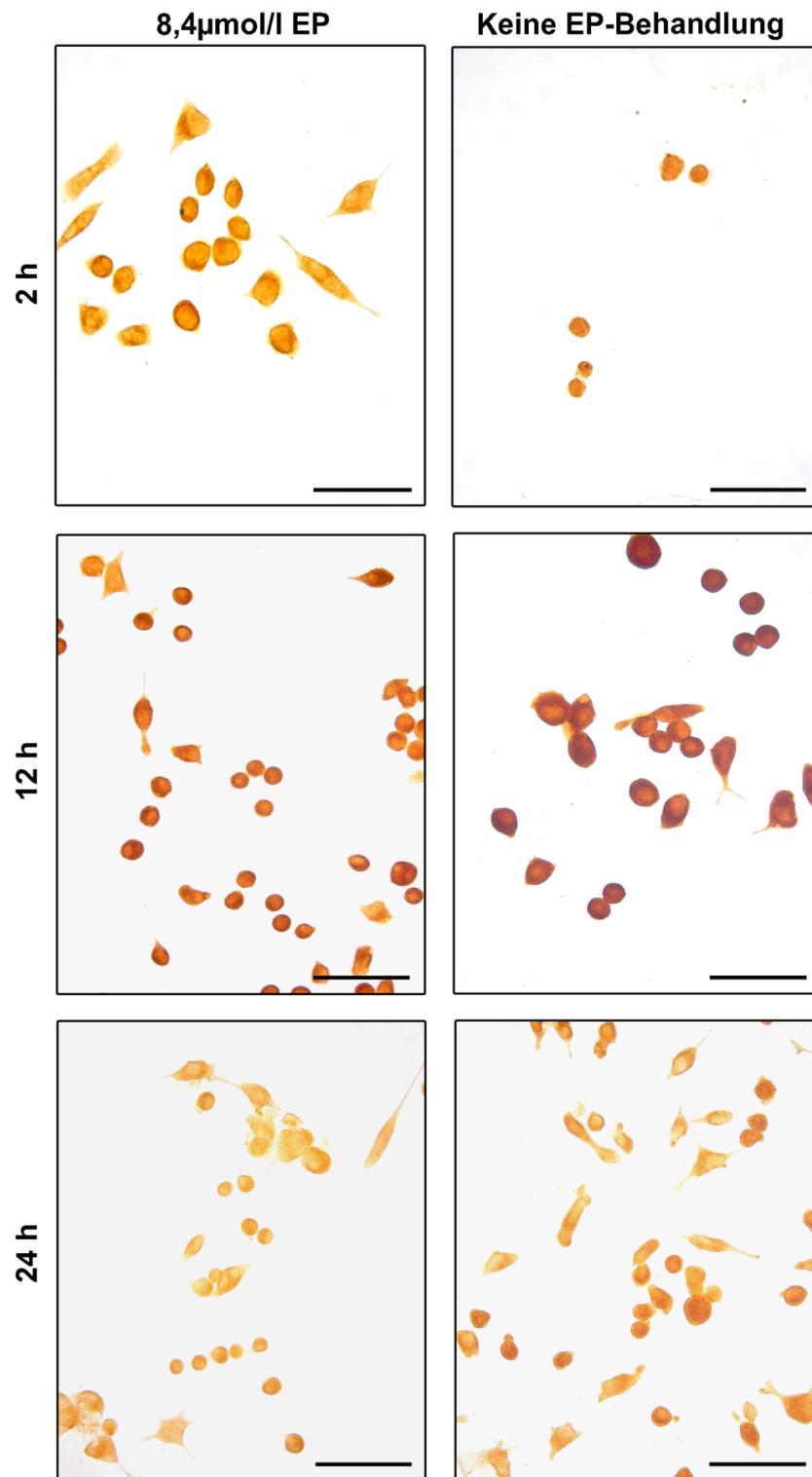


Abbildung 16: Immunhistochemischer Nachweis der Glo1 in mit LPS (10 ng/ml) stimulierten BV2 Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten, mit und ohne EP-Behandlung. Repräsentierend für die EP Gruppe wurde die mit 8,4 µmol/l EP behandelte Gruppe gewählt. Maßstab: 100 µm

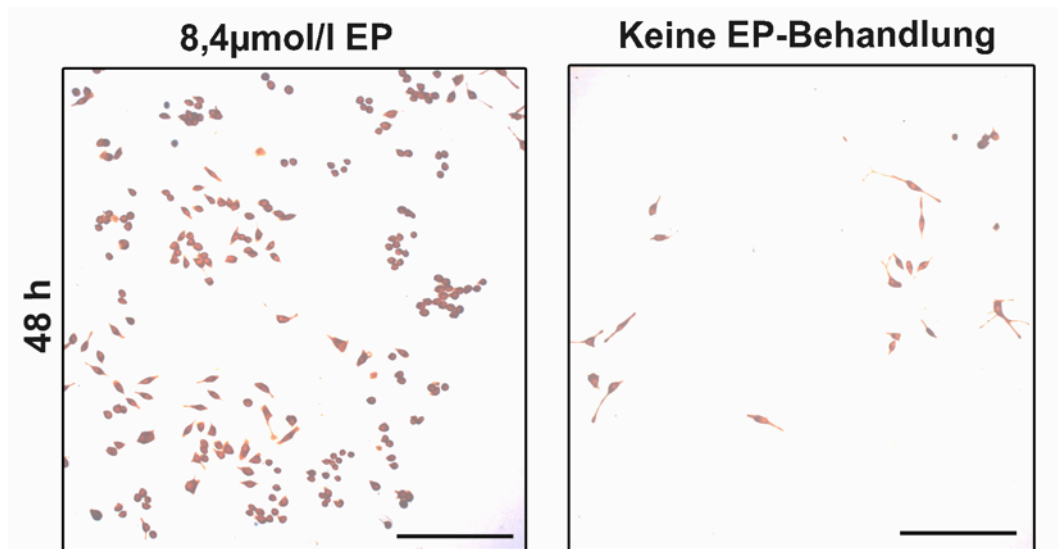


Abbildung 17: Übersichtsaufnahme der BV2 Zellen mit immunhistochemischem Glo1 Nachweis zum Vergleich der Zellzahl zwischen EP behandelter und der CTR. Repräsentierend für die EP Gruppe wurde die mit 8,4 $\mu\text{mol/l}$ EP behandelte Gruppe gewählt. Maßstab: 200 μm .

4.4 Die Glo1 Immunreaktivität in der HT22 Zelllinie ist auf eine Subpopulation beschränkt und wird durch die Zeit und EP nicht beeinflusst

Die Glo1 Immunreaktivität von HT22 Zellen wurde hinsichtlich zeitlicher und EP bedingter Variationen immunhistochemisch untersucht (Abbildung 18). Über die Zeit konnte eine zeitlich beständige Glo1 Immunreaktivität in einer Subpopulation der HT22 Zellen beobachtet werden. Im Vergleich zum Großteil der HT22 Zellen besaßen diese Zellen eine kleine, runde Zellmorphologie. Intrazellulär war die Glo1 Immunreaktivität auf das Zytoplasma und die perinukleäre Zisterne beschränkt. Die Behandlung mit EP hatte keinen Einfluss auf die beobachtete Glo1 Immunreaktivität und führte auch zu keinen Veränderungen in den restlichen HT22 Zellen.

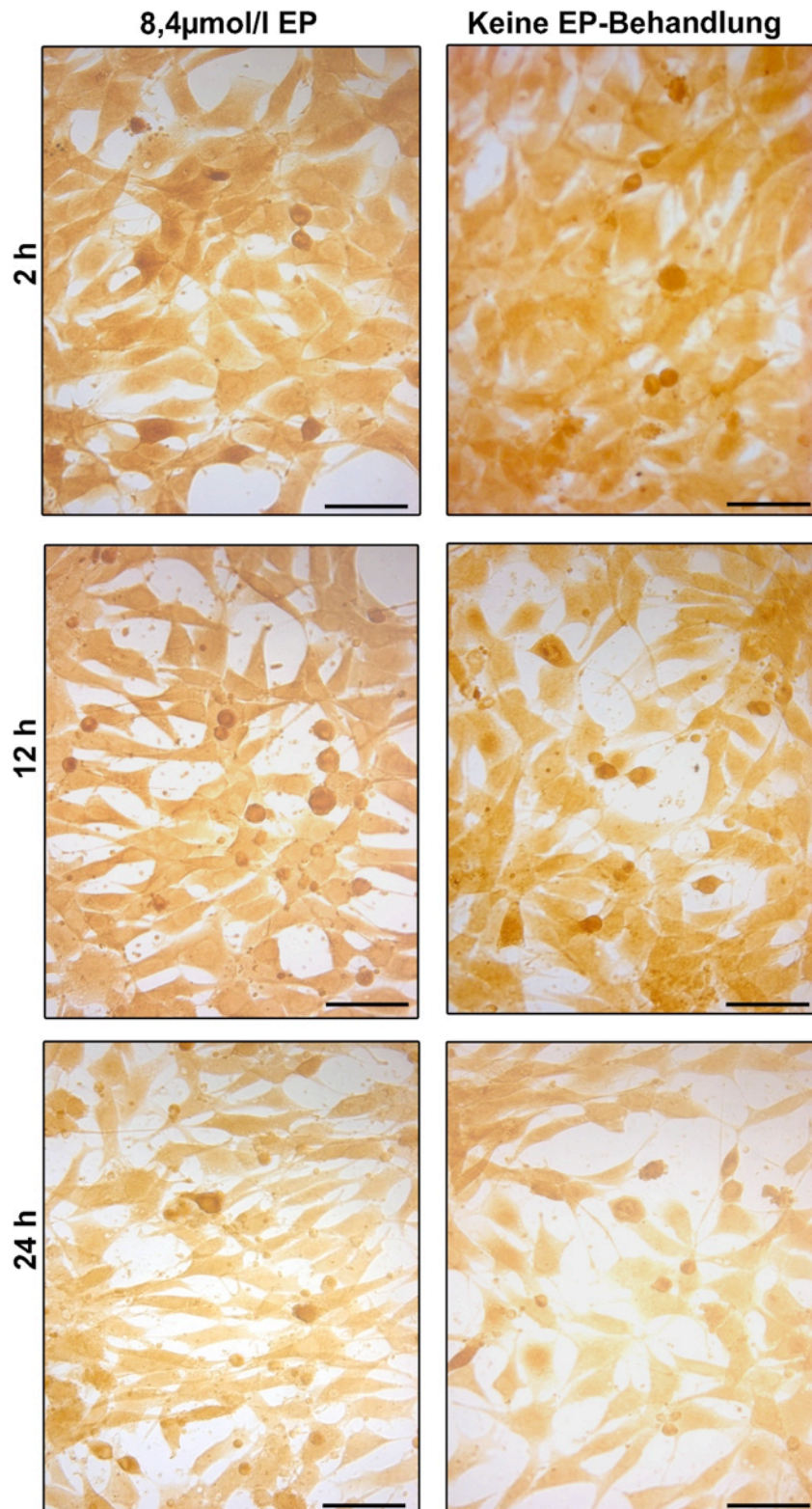


Abbildung 18: Glo1 Immunhistochemie in HT22 Zellen über die Zeit in der mit EP behandelten Gruppe und CTR. Repräsentierend für die EP Gruppe wurde die mit 8,4 µmol/l EP behandelte Gruppe gewählt. Maßstab: 100 µm

4.5 EP verlangsamt die astrogläre Narbenbildung

Die Wirkung von EP auf die astrozytäre Narbenbildung wurde mit Hilfe des *scratch wound assays* untersucht. Dabei wurde der Astrozyten Monolayer nach 15 minütiger Inkubation mit der entsprechenden Behandlung mechanisch separiert und zum vorher bestimmten Zeitpunkt fixiert, HE gefärbt und an vier Stellen vermessen (Tabelle 10, Abbildung 19). Die Statistische Auswertung mittels zweifacher ANOVA ergab dabei in der CTR eine signifikante Reduktion des erzeugten Abstandes zwischen 12 und 24 h und 12 und 48 h ($p < 0,05$). Dies konnte in allen mit EP behandelten Gruppen nicht beobachtet werden ($p > 0,05$). Im Vergleich der 48 h Zeitwerte der EP behandelten Gruppen zur CTR fand sich eine signifikante Verzögerung des Risschlusses für die mit 8,4 und 84 $\mu\text{mol/l}$ EP behandelten Gruppen ($p < 0,05$), allerdings nicht für die mit 0,84 $\mu\text{mol/l}$ EP behandelte Gruppe ($p > 0,05$). Zwischen den mit EP behandelten Gruppen konnte kein signifikanter Unterschied aufgezeigt werden ($p > 0,05$).

Tabelle 10: Mittelwerte und dazugehöriger Standardfehler der Vermessung des erzeugten Risses

Zeitwert	CTR		0,84 $\mu\text{mol/l}$ EP		8,4 $\mu\text{mol/l}$ EP		84 $\mu\text{mol/l}$ EP	
	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM
0h	222	19,12	183,5	22,8	157,8	13,43	153,5	18,29
6h	271	17,83	229	27,97	194	25,34	193	26,13
12h	248	39,45	136	17,53	157	24,68	155	14,18
24h	91	39,36	90	23,36	196	21,56	112	17,44
48h	0	0	77	17,48	192	30,45	153	14,18

CTR Kontrollgruppe, EP Ethylpyruvat, h Stunde(n), MW Mittelwert, SEM Standardfehler

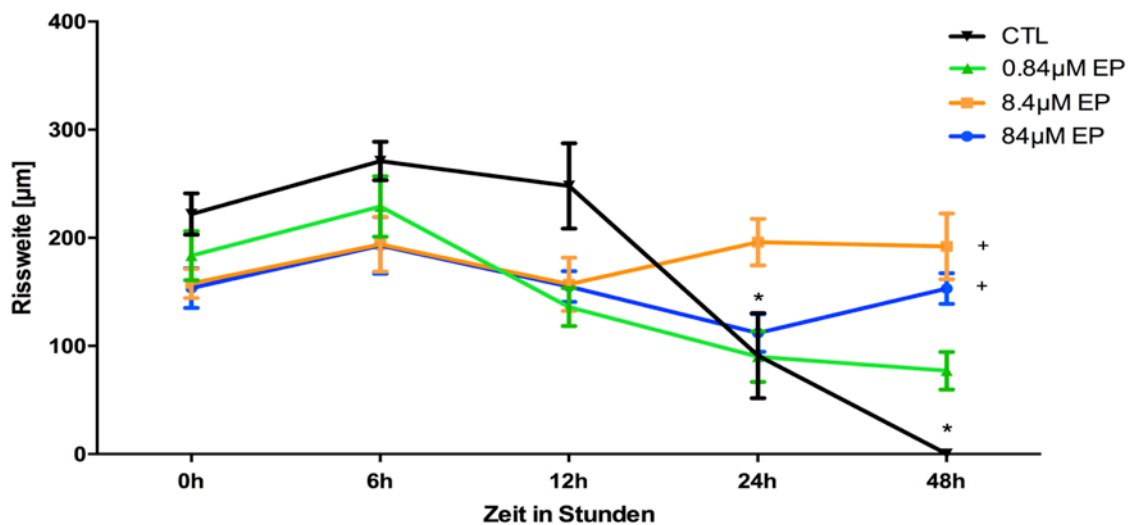


Abbildung 19: Zeitlicher Verlauf des Risschlusses der verschiedenen Gruppen;
 * signifikanter Unterschied innerhalb der CTR ($p < 0,05$), + signifikanter Unterschied der mit EP behandelten Gruppen verglichen mit dem Kontrollgruppenwert 48h nach Läsion

5 Diskussion

Obwohl in den letzten Jahren eine Vielzahl neuer möglicher Angriffsziele zur Abmilderung der Schlaganfallfolgen identifiziert wurden, fehlten in klinischen Studien die erwarteten Erfolge [232–234]. Dies macht die Notwendigkeit eines verbesserten Verständnisses der Mechanismen des Schlaganfalls klar, um mögliche neue Therapiestrategien zu entwickeln. Die dem sekundären Schaden folgenden Prozesse bzw. die zur Vermeidung notwendigen Kompensationsmechanismen könnten interessante Angriffsziele darstellen [10,133]. Die metabolische Stabilisierung in Form der ausreichenden Bereitstellung von ATP könnte die Kompensationsmechanismen stabilisieren und so eine Ausdehnung des Schadens begrenzen [137].

Durch die enge neuro-gliäre Kopplung könnte sich der Glukosestoffwechsel als Ziel für Neurotherapeutika eignen. Zwar verbessert eine erhöhte Glukosebereitstellung das neurologische Outcome, steigert aber gleichzeitig das Infektionsrisiko und die Mortalität [235,236]. Dabei könnte das Problem nicht in der Stabilisierung der Substratzufuhr, sondern in den Substrat abbauenden Wegen liegen. Im Zuge der Schädigung steigern die Neurone ihre Glykolyse, wobei die Frage offen ist, ob diese Glykolysesteigerung den neuronalen Untergang verstärkt [133,137]. Da im Zuge der Schädigung z.B. die Triosen weiterverarbeitenden Enzyme durch NO modifiziert werden und nicht mehr an der ATP Generation in der Glykolyse teilnehmen und dadurch die Energiezufuhr über die Glykolyse ausgesetzt wird [166,167]. Zudem

würde MG vermehrt anfallen und seine neurotoxischen Eigenschaften entfalten. Hier könnte das Glo System protektiv eingreifen bzw. dessen Veränderung das Ausmaß des Schadens markieren.

Alternativ könnten auch andere Stoffwechselwege, wie der TCA, mit großen Behandlungszeitfenstern genutzt werden [110]. Damit könnten TCA Substrate, wie Laktat, Pyruvat und deren Derivate, wie EP, zur Stabilisierung des Stoffwechsels dienen [237,238].

EP besitzt antiinflammatorische Eigenschaften und konnte das Ausmaß neuronaler Läsionen mindern und das neurologische Outcome verbessern [196,239,240]. Zudem durchlief EP bereits eine klinische Phase II Studie und gilt als unbedenklich für die klinische Anwendung am Menschen [241]. Der genaue Mechanismus der EP-vermittelten Effekte ist allerdings bisher nicht eindeutig geklärt. Die Inhibierung der Glo1 durch EP könnte eine mögliche Erklärung bieten [197,198,242].

5.1 Vorteile und Limitationen der genutzten Modelle

Um neue Einblicke in die Bedeutung der Glo1 in akuten zerebralen Läsionen zu erlangen und diese möglicherweise durch EP zu beeinflussen, wurden in der vorliegenden Arbeit zuerst die möglichen zeitlichen Veränderungen des Proteingehalts und der Immunreaktion der Glo1 im Modell der exzitotoxischen Schädigung der OHSC analysiert.

Das Modell der OHSC ist für solche Analysen besonders gut geeignet, da neben dem sehr guten Erhalt der organotypischen Struktur auch elektrophysiologische Aktivitäten und Expressionsmuster vergleichbar mit *in vivo* Bedingungen sind [223,243–247]. Dabei kann die parenchymatöse Reaktion im Zellverband unter gut kontrollierbaren Bedingungen untersucht werden [247]. Ein Ausschluss der systemischen Reaktion im Sinne einer Infiltration von Zellen aus der Blutbahn kann dabei sowohl als Vor- und Nachteil des Modells gewertet werden. Zusätzlich bietet dieses Modell den Vorteil der Reduktion der notwendigen Tiertötung, da aus einer Ratte 6-8 OHSC gewonnen werden können und die selektive Gruppenwahl für *in vivo* Modelle mit deutlich geringerer Gruppenzahl ermöglicht werden kann. Durch die hohe NMDA Rezeptordichte, vor allem in der Region des Cornu ammonis 1 und dem GD, verfügt das Modell über gute Bedingungen zur Untersuchung der NMDA vermittelten Exzitotoxizität [225,245]. Dabei sollte die Region des GD bevorzugt werden, da die Region des Cornu ammonis 1 durch die Präparation geschädigt wird und somit eine Differenzierung zwischen Präparations- und NMDA vermitteltem Schaden erschwert wird [248].

Nach Erhebung der Befunde im Modell der OHSC wurde in einem *in vivo* Modell des experimentellen Schlaganfalls überprüft, inwiefern sich die immunhistochemischen Befunde bestätigen lassen. Hierfür wurde das Modell des pMCAO an spontan hypertensiven Tieren verwendet. Neben der hohen Reproduzierbarkeit des Schlaganfallvolumens bei spontan hypertensiven Tiere durch die fehlende Kollateralisierung, entspricht das Modell der pMCAO am ehesten den klinisch beobachteten Verhältnissen [7,249]. Verglichen mit dem Modell der transienten MCAO fehlt bei der pMCAO der beobachtete Reperfusionsschaden, welcher bei rein pharmakologischer Therapie unter klinischen Bedingungen weitestgehend ausbleibt [7].

Um darauffolgend die Rolle der Glo1 und deren Modulierung für die verschiedenen Zelltypen des ZNS zu beleuchten, wurde die Glo1 Immunreaktion in der mikroglären, immortalisierten Zelllinie BV2 und der neuronalen, immortalisierten Zelllinie HT22 in Abhängigkeit von der Zeit und Stimulation untersucht. Zudem wurden immunhistochemische Veränderungen der Glo1 nach EP-Behandlung betrachtet.

BV2 Zellen sind murine, immortalisierte Mikroglia, welche durch die Transfektion des v-raf/v-myc tragenden Retrovirus (J2) generiert wurden [250]. In ihrer Morphologie und Immunologie waren BV2 Zellen mit primären Mikroglia vergleichbar und konnten durch LPS in einen inflammatorischen Zustand versetzt werden [163,164,250,251].

Die HT4 Zelllinie wurde durch die Transfektion mit einem temperatursensitiven retroviralen Vektor generiert und anschließend subkloniert, sodass die immortalisierte, hippokampale, murine Neuronenzelllinie HT22 entstand [252,253]. Die so entstandene HT22 Zelllinie wurde daraufhin als Modell zur Untersuchung neuroprotektiver Effekte eingesetzt [254–258].

Des Weiteren wurden mögliche Veränderungen der astrozytären Narbenbildung durch EP im *scratch wound assay* primärer Astrozyten untersucht. Dieses Modell wurde zur *in vitro* Untersuchung der astrozytären Reaktion auf einen mechanischen Schaden etabliert [225,259,260]. Hier ist gleichzeitig zu erwähnen, dass die hervorgerufene Reaktion nicht ausschließlich mit einer Veränderung der Zellmobilität einhergehen muss, so dass mehrere Aspekte der Astroglie beurteilt werden können [261].

Aufgrund der erleichterten Handhabung und der schnelleren Verfügbarkeit, stellen Zelllinien eine alternative zu Tierversuche und für den Beginn ein geeignetes Modell dar, um Signalkaskaden und Modulationsmöglichkeiten zu testen. Jedoch handelt es sich bei Zelllinien immer um durch Transfektion(en) immortalisierte Zellen, bei denen das Ausmaß der Transfektion auf verschiedene regulatorische, immunologische Prozesse oftmals nicht komplett untersucht wurde. Außerdem ermöglichen Zelllinienexperimente zwar eine zellspezifische Zuordnung des beobachteten Effekts,

jedoch fehlt die Interaktion mit anderen Zellen des ZNS, welche das Ausmaß der Reaktion maßgeblich beeinflussen können. Selbiges gilt auch für Experimente mit primären Zellen. Des Weiteren entstammt das für die vorgelegte Arbeit genutzte Material Nagern, wodurch eine komplette Übertragbarkeit der Ergebnisse auf das humane System eingeschränkt wird.

5.2 Veränderungen des Glo1 Proteins und der Glo1 Immunreaktivität nach exzitotoxischer Schädigung im Modell der OHSC

5.2.1 Veränderungen des Glo1Dimer/Monomer Verhältnisses nach exzitotoxischem Insult

In der vorgelegten Arbeit konnte das Glo1 Protein mittels Western Blot Analysen unter reduzierten Bedingungen als Dimer bei 46 kDa und das dissoziierte Monomer bei 23 kDa in OHSC nachgewiesen werden [187–189,262]. Nach β -Aktin Normierung fand sich in der CTR keine zeitliche Dynamik des Glo1 Monomers und Dimers, jedoch ein signifikant höherer Gehalt des Glo1 Monomers zu allen untersuchten Zeitpunkten. Um einen möglichen Einfluss der circadianen Rhythmik auszuschließen, erfolgte die Normierung der NMDA behandelten Gruppe auf die zeitlich korrespondierenden Werte der CTR. Nach dieser Normierung zeigte sich eine signifikante Abnahme des Glo1 Monomers zwischen 24 und 48 h nach Schädigung. Dagegen konnte ein Anstieg des Glo1 Dimers von 24 auf 48 h verzeichnet werden. Aufgrund der gegensätzlichen Dynamik wurde eine Umverteilung von Glo1 Monomer und Dimer vermutet. Um dies zu prüfen, wurde ein Quotient aus Glo1 Dimer und Monomer (Ratio) gebildet, der einen Anstieg zwischen 1 und 24 h in der NMDA geschädigten Gruppe aufzeigte. Zudem fand sich ein signifikanter Unterschied zur CTR zu den Zeitpunkten 24 und 48 h nach Schädigung, so dass von einer Umverteilung ausgegangen werden kann.

Bisherige Untersuchungen erbrachten keinen direkten Zusammenhang zwischen der Glo1 und der Exzitotoxizität, einzig indirekte Hinweise existieren. Die pharmakologische Blockade des NMDA Rezeptors durch AP-7, MK-801 und MET erniedrigte die MG-assoziierte Glutamatfreisetzung in einer Neuroblastomzelllinie [217]. Dagegen führte die Glo1 Blockade in primären kortikalen Neuronen zu keiner erhöhten Anfälligkeit gegenüber Glutamat, wobei die gewählte Glutamatkonzentration zu niedrig erscheint [83,263]. Auch die protektiven Effekte der Tat- Glo Injektion im ischämischen Schlaganfall könnten mit der Milderung des exzitotoxischen Schadens assoziiert sein [218]. Damit stellen die hier präsentierten Befunde eine direkte Assoziation der Glo1 zur Exzitotoxizität dar. Zudem konnten bisherige Studien ein Glo1 Dimer nicht zeigen bzw. nachweisen [83,207,213]. Dafür könnte die ausschliessliche Analyse der Glo1 Expression auf der Boten-RNS Ebene ursächlich sein [83,207,214].

Die hier präsentierten Daten stellen damit den ersten Nachweis des Glo1 Dimers als Folge des akuten neuronalen Schadens dar.

Die Entstehung des Glo1 Dimers könnte auf einer posttranslationalen Modifikation beruhen [190,191,193]. Durch die Nitrosylierung in Kooperation mit GSH und nachfolgender Phosphorylierung ist die Glo1 nicht länger an der Entgiftung von MG beteiligt. Jedoch steht diese Modifikation in Zusammenhang mit der beobachteten Reduktion der NF- κ B Reportergenaktivität und einem gesteigertem Zellüberleben [190,191,193]. Glo1 kann außerdem durch GSSG modifiziert und in der Aktivität gemindert werden [192]. Obwohl dabei keine Glo1 Dimerisierung beschrieben wurde, ist die Dissoziation bzw. Assoziation mehrere Monomere durch GSSG bekannt und konnte ebenfalls für die DJ-1 Familie, eine neu entdeckte GSH unabhängige Glyoxalase, aufgezeigt werden [264–268]. Dennoch fehlen bislang Daten, welche diese Auswirkung von GSSG auf die Struktur der Glo1 beschreiben. Allerdings hätten mögliche Disulfidbrücken, Nitrosylierungen oder GSSG Modifikation durch die hier vorgenommene Zugabe von SDS und Mercaptoethanol gelöst werden müssen [269]. Jedoch könnte die NMDA- Ca^{2+} abhängige Aktivierung der Transglutaminasen (TG) und deren Protein vernetzenden Eigenschaften für die Dimerisierung verantwortlich sein und die hier vorgelegten Befunde erklären [270–272].

Unterstützt wird dies durch die Identifikation von Glo1 als Ziel der TG2 mit konsekutiver Aktivitätssteigerung [273]. Die gesteigerte Glo1 Dimersierung fand sich ebenfalls nach Fruktosediät [274]. Dabei war das Monomer nicht verändert und auch die Aktivität der Glo1 unbeeinträchtigt, was von den Autoren auf die mangelnde Bereitstellung von GSH zurückgeführt wurde. Bei gleichzeitiger Behandlung mit Pyridoxamin blieb die Translokation der Glo1 sowie der Anstieg des Glo1 Dimers aus und es zeigte sich eine Erhöhung der Glo1 Aktivität. Hier sei angemerkt, dass Pyridoxamin ebenfalls die MG Veränderungen nach kardialer Ischämie milderte und damit eine mögliche Assoziation zwischen Pyridoxamin und dem Glo System besteht [275].

Um die Art der hervorgerufenen Dimerbindung abschließend zu klären, sind jedoch massenspektrometrische Messungen notwendig.

5.2.2 Die exzitotoxische Schädigung führt zu einer zeitabhängigen Veränderung der Glo1 Immunreaktivität im GD

In beiden Gruppen fand sich zu allen untersuchten Zeitpunkten eine positive Glo1 Immunreaktivität in Astrozyten und Mikroglia ohne zeitliche und schädigungsabhängige Dynamik. In der mit NMDA geschädigten Gruppe konnte jedoch 12 h nach exzitotoxischem Insult eine positive Glo1 Immunreaktivität an der neuronalen Zellmembran beobachtet werden. Des Weiteren fand sich in einigen wenigen Zellen

ein Anstieg der Glo1 Immunreaktivität zwischen 1 und 24 h, welcher nach 72 h nicht mehr nachweisbar war. Dieser kleine Teil der Glo1-immunreaktiven Zellen besaß fragmentierte Zellkerne. Trotz Mehrfachfärbungen mit neuronalen, glösen und mit Markern spezifisch für Immunzellen konnte die genaue Natur dieser Zellen nicht bestimmt werden.

Es konnte aufgezeigt werden, dass diese Zellen nicht GFAP, Iba1 und NeuN positiv sind. Einzig sei die Aussage über eine mögliche Degeneration aufgrund der Kernfragmentierung und der zunehmenden Kondensation erlaubt. Es liegt jedoch die Vermutung nahe, dass es sich hierbei um Neurone handeln könnte. Speziell bei der zeitlich vorangegangenen Markierung der Glo1 in der neuronalen Zellmembran und die Degradation des NeuN während der Schädigung könnten diese Zellen Neurone darstellen [276,277]. Auch GFAP negative Astrozyten oder Oligodendrozyten kämen in Betracht [84].

Aus der Untersuchung humaner Gehirne ist bekannt, dass Neurone des Kortex sowie gefäßnahe Astrozyten eine Glo1 Immunreaktivität aufweisen [278]. Dabei wurde eine mikrogläre Glo1 Immunreaktivität ausgeschlossen. Die Glo1 Immunreaktivität konnte in HT22 Zellen nach Tat-Glo Transduktion und in der Untersuchung von Neuronen und Astrozyten des Kortex aufgezeigt werden [83,218]. Eine Analyse der Immunreaktion in Abhängigkeit der eingesetzten Stressfaktoren wurde nicht durchgeführt.

Die Phänomene, wie die Translokation der Glo1 zur neuronalen Zellmembran, als mögliches Schädigungssignal, könnten unbemerkt geblieben sein. Obwohl diese Translokation schädigungsabhängig ist, kann keine Wertung einer protektiven oder destruktiven Natur erfolgen. Bisher wurde eine solche Translokation nur nach Fruktosediät im Hippokampus beobachtet, worin eine neuronale Glo1 Translokation von den Fortsätzen zum Soma hin beobachtet wurde [274].

In dieser Arbeit wurde, basierend auf rein morphologischen Charakteristika, eine ausschließliche neuronale Immunreaktivität beschrieben. Eine astrozytäre Glo1 Immunreaktivität wurde aufgrund der fehlenden Kollokalisierung mit GFAP nicht gefunden.

Eine mögliche Ursache für die verstärkte Glo1 Immunreaktivität könnte die gesteigerte Glykolyse im Zuge der Exzitotoxizität darstellen um ATP zur Balancierung des Ionengleichgewichts zu generieren sowie den Zelluntergang zu verhindern [65,118,134]. Gleichzeitig muss betont werden, dass die exzitotoxisch bedingte Steigerung der Glykolyse als präapoptotisch gilt und somit einen nahenden Untergang kennzeichnen könnte [133]. Unklar bleibt, ob der Glo1 Anstieg einen Überlebensmechanismus oder den drohenden Untergang markiert. Dennoch ist fraglich, warum es nicht bereits vorher zu einer Steigerung der Glo1 kommt, um die

Toxizität zu verhindern. Dabei könnte die Rolle von MG als partieller GABA_A Agonist eine Rolle spielen [209]. Hypothetisch könnte der initiale Anstieg der Glykolyse ohne Steigerung der Glo1 zu einem MG Anstieg führen, welcher anschließend über GABA_A Rezeptoren eine Hyperpolarisierung verursacht, um so das Ausmaß des exzitotoxischen Schadens abzumildern [211,279]. Dem steht gegenüber, dass MG auch zu einer Steigerung der Glutamatfreisetzung führt und damit das Fortbestehen der Exzitotoxizität unterhält [217].

Obwohl sich keine Veränderungen der Glo1 Immunreaktivität in Mikroglia und Astrozyten fanden, erlaubt dies noch keine abschließende Aussage zur Veränderung der Glo1 Aktivität und der Veränderung des Glo1 Proteingehalts. Hierfür müssen Experimente an Einzelzellen durchgeführt werden. Zudem bestärken Untersuchungen in ähnlichen organotypischen Modellen, mit dem Nachweis einer hohen Anfälligkeit des Hippokampus gegenüber MG, die Notwendigkeit einer Modulation des Glo System im Zuge der Schädigung [280].

5.3 Zeitliche und zelluläre Variationen der Glo1 Immunreaktivität nach pMCAO

Zu allen untersuchten Zeitpunkten konnte sowohl auf der geschädigten als auch auf der nicht geschädigten Hemisphäre eine Glo1 Immunreaktivität im Endothel der Gefäße nachgewiesen werden. Zusätzlich schien die Glo1 Immunreaktivität auf der geschädigten Seite im Endothel nach 75 min. verstärkt. An den nachfolgenden Zeitpunkten (1-10 d) wurde die stärkste Glo1 Immunreaktivität in Neuronen des geschädigten Gebiets beobachtet. Am spätesten untersuchten Zeitpunkt (60 d) fand sich die stärkste Glo1 Immunreaktivität in den Astrozyten, welche sich in der Nähe des ehemaligen Schadensgebiets befanden.

MG führt zu einer Zerstörung der Gefäßbarriere im Endothel [221,281]. Ebenfalls stieg nach Schlaganfall der Gehalt von MG-modifizierten Proteinen innerhalb des Gefäßbettes der Infarktzone, allerdings ohne Nachweis dieser Proteine in Neuronen oder Gliazellen [216]. In Modellen der renalen Ischämie wurde zudem gezeigt, dass eine Überexpression der Glo1 den ischämischen Schaden mildert, wohingegen ein Knockout diesen verstärkt [219]. Ähnliche Befunde lassen sich aus der Protektivität der Injektion von Tat-Glyoxalase in der zerebralen Ischämie ableiten [218]. Jedoch wurde hier keine Differenzierung des transfizierten Zelltyps vorgenommen, wodurch unklar ist, welche Zellen die Protektivität vermitteln. Bezüglich der neuronalen Vulnerabilität und der Bedeutung der Astrozyten gegenüber dem durch MG hervorgerufenen Stress sei auf die Arbeit von Bélanger et al. verwiesen [83]. Entgegen der Befunde aus der Exzitotoxizität fand sich nach pMCAO eine deutliche neuronale Glo1 Immunreaktivität

im Soma, die nachfolgend in einer primären astrozytären Glo1 Immunreaktivität mündete. Das veränderte Muster der Glo1 Immunreaktivität könnte dabei ein Resultat einer veränderten Reaktion auf den jeweiligen zeitlichen Zustand der Schädigung darstellen [10]. Während die Exzitotoxizität bereits am Anfang der Schädigung steht, folgen weitere Prozesse die den Schaden verstärken und damit auch die Glo1 Reaktion beeinflussen könnten. Es scheint möglich, dass die veränderte Glo1 Immunreaktivität in der pMCAO nicht allein als Reaktion auf die Exzitotoxizität, sondern auf nachgeschaltete Prozesse zurückzuführen ist. Die astrozytäre Glo1 Immunreaktivität zum spätesten betrachteten Zeitpunkt innerhalb der astroglären Narbe, könnte der protektiven Rolle der Narbe zum Schutz der umliegenden Neurone zugeschrieben werden, welche sich auch gegenüber einem MG induzierten Schaden präsentierte [83,139,282].

5.4 Die Rolle der Glo1 bei der Stimulation von BV2 Zellen und die Wirkung von EP

In der vorgelegten Arbeit wurde eine starke Glo1 Immunreaktion in BV2 Zellen beobachtet. Diese unterlag keiner zeitlichen Dynamik und konnte auch nicht durch die Stimulation mit LPS verändert werden. Auch die Behandlung mit EP führte zu keinen Veränderungen.

In humanen Hirnen erfolgte kein mikroglärer Glo1 Nachweis [278]. Obwohl dies auf den Speziesunterschied zurückgeführt werden könnte, muss auch die postmortale Liegezeit der humanen Gehirne als Fehlerquelle In Betracht gezogen werden.

Jedoch spricht die Bedeutung der Substrate und Intermediate der Glo1 für eine Rolle dieses Systems bei der Immunreaktion von Makrophagen und Mikroglia. Während S-D-Lactoylglutathion bzw. Veränderungen der Glo1 in Leukozyten zu veränderten Sekretionsmustern von Histamin führten, steigerte MG die phagozytotische Aktivität [283,284]. Außerdem induzierte MG weitere in die Immunsystemaktivierung involvierte Proteine und Antigene, wie die induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase (iNOS), den Makrophagen-Koloniestimulierenden Faktors und des *cluster of differentiation* (CD)4 und CD8 [164,285]. Dagegen führte MG in Blutproben zu einer verringerten inflammatorischen Zytokinfreisetzung [197].

In Mikroglia der Retina führte MG zu einer Induktion des CD74 Rezeptors, der die Proliferation inflammatorischer Zellen und die Prostaglandinsynthese fördert [286,287]. Obwohl Makrophagen nicht mit Mikroglia gleichgesetzt werden können, sind sie sich in vielen Prozessen ähnlich [288,289]. Allerdings wurde die Rolle von Methylglyoxal und Glo1 in Mikroglia bisher nicht weiter beleuchtet.

Auch EP besitzt Eigenschaften, welche die inflammatorische Zytokinproduktion beeinflussen und hemmt gleichzeitig Glo1 einhergehend mit einer reduzierten Zytokinfreisetzung in Blutproben [197,198].

Hier hatte EP keinen Einfluss auf die Glo1 Immunreaktivität. Dennoch schien es die BV2 Zellen unter LPS Stimulation zu schützen. Dabei könnte EP die Mikrogliaaktivierung hemmen, wie es im Schlaganfallmodell vermutet wurde [196]. In Monozyten reduzierte EP die Produktion vieler inflammatorischer Proteine und Zytokine, wie z.B. des Tumornekrosefaktors alpha (TNF α) und des inflammatorischen Proteins der Makrophagen [290]. Auch in Mikroglia verringerte die Behandlung mit EP, im millimolaren Bereich, die Produktion inflammatorischer Zytokine und erhöhte das Überleben der Mikroglia nach Stimulation [239,291–294]. Auch Alarmine, wie das inflammationsunterhaltende, nicht chromosomale, nukleäre Protein *high mobility group box 1* (HMGB1) werden durch EP beeinflusst [295]. In verschiedenen Modellen der akuten Verletzung des ZNS stieg HMGB1, während EP diesen Anstieg verhindern konnte [296–298]. Dabei kann HMGB1 von Neuronen, Astrozyten und Mikroglia abgegeben werden und Astrozyten und weitere Mikroglia aktivieren [299–301]. Diese Abgabe konnte EP abmildern und dadurch einer Überaktivierung vorbeugen [298,302]. Neben den antiinflammatorischen Eigenschaften induziert EP die antioxidative Abwehr, beispielweise über den *nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2* (Nrf2), der die Glo1 Expression steigert [303,304]. Die Nrf2 Induktion beruht am ehesten auf einer GSH Depletion mit konsekutiver Nrf2 Aktivierung [304–307].

Diese GSH Depletion bringt Mikroglia in einen oxidierten Zustand, der den exzitotoxischen Schaden erhöht [307,308]. Dies scheint mit einer veränderten Expression des Glutamat/Cystin Antiporters in Zusammenhang zu stehen, dessen Expression durch Nrf2 gesteigert wird und den mikroglialen Funktionszustand reguliert [294,308]. Die Expressionserhöhung dieses Transporters führt zu einer erhöhten Ausschleusung von Glutamat aus Mikroglia, wodurch der oxidative Stress der Mikroglia den exzitotoxischen Schaden im ZNS unterhalten kann oder Glutamat als Substrat für Astrozyten bereitgestellt werden könnte [307–310].

Die fehlenden Effekte von EP auf Glo1 können, neben dem tatsächlichen Fehlen, mehrere Ursachen besitzen. Im Gegensatz zu bisherigen Studien wurden in unserer Studie EP Konzentrationen im mikromolaren Bereich genutzt, wohingegen andere Studien in der Zellkultur millimolare Dosen nutzten [291,304]. Auch die eingesetzte LPS Konzentration ist mit 10 ng/ml verglichen mit der sonst benutzten Dosis von 100 ng/ml niedrig.

Die erwähnten Punkte sollten bei der Planung von Folgeexperimenten berücksichtigt werden. Außerdem sollte der morphologische Aktivierungszustand, die

Zytokinsekretion, die GSH Konzentration, der Proteingehalt und die Aktivität der Glo1 sowie die Quantifikation des mikroglären Untergangs bestimmt werden. Auch die Rolle der Mikroglia- Neuronen Interaktion bedarf weiterer Aufklärung, da in einem Parkinson Modell EP nur in Anwesenheit von Mikroglia seine neuroprotektiven Effekte entfalten konnte [311].

5.5 Die Glo1 Immunreaktivität in der HT22 Zelllinie ist auf eine Subpopulation beschränkt und zeigt keine Veränderungen unter EP-Behandlung

Zu allen untersuchten Zeitpunkten präsentierte nur eine amöboide Subpopulation der HT22 Zellen eine Glo1 Immunreaktivität, welche sich weder über die Zeit noch durch eine zusätzliche EP-Behandlung änderte. Der Großteil der HT22 Zellen zeigte keine spezifische Glo1 Immunreaktivität. Bisher wurde die MG Toxizität in mit TAT-Glyoxalase HT22 Zellen untersucht, jedoch ohne eine Bestimmung der zelleigenen Glo1 [218].

In der Neuroblastozelllinie SH-SY5Y steigerte der Glo1 Inhibitor $pBrBzGSCp_2$ den MG Gehalt nach 12 h signifikant einhergehend mit einer erhöhten Caspase 3 Abspaltung und einem vorangegangenen Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} [203]. Das Überleben der Zellen wurde durch $pBrBzGSCp_2$ nicht signifikant beeinträchtigt. Eine genaue Untersuchung der Glo1, immunhistochemisch oder hinsichtlich des Proteingehalts und der Aktivität wurden nicht vorgenommen. Weitere Befunde aus neuronalen Zelllinien bezüglich Veränderungen der Glo1 existieren nicht.

Dagegen wurde die MG Toxizität in verschiedenen Zelllinien untersucht [200,204,217]. MG reduzierte das intrazelluläre ATP, das mitochondriale Membranpotenzial und verdoppelte die Glutamatfreisetzung [217]. Durch den Einsatz von NMDA Rezeptorantagonisten (AP-7, MK-801 und MET) konnte der Anstieg der Glutamatfreisetzung abgewendet werden [217]. Zudem fand sich eine von der Zelldifferenzierung abhängige Anfälligkeit gegenüber MG [204]. Eine mögliche Erklärung könnte der ebenfalls differenzierungsabhängige, unterschiedliche Bestand von GSH und GSSG darstellen [204]. GSSG inhibiert durch eine posttranslationale Modifikation Glo1, wodurch das Entgiftungssystem für MG inhibiert wäre und sich die MG Toxizität entfalten könnte [192]. Diese Möglichkeit fordert allerdings eine Untersuchung des Glo1 Systems, welche in den bisherigen Studien nicht durchgeführt wurde. Andererseits könnte die erhöhte Anfälligkeit der naiven Zellen mit der Rolle von MG in der Zelldifferenzierung zusammenhängen und sollte damit nicht zwingend als pathologisch betrachtet werden [208]. Die differenzierungsabhängige Anfälligkeit von Zelllinien findet sich ebenfalls in HT22 gegenüber Glutamat [312]. Zusätzlich besaßen die verschiedenen Zelllinien eine geringere MG Vulnerabilität verglichen mit primären

Neuronenkulturen [200,205,204,217]. Nur 20 % der primären Neuronen überlebten die Behandlung mit 300 μM MG, welches als Standarddosis in den Zelllinienexperimenten eingesetzt wurde [205]. Die Hälfte der Neuronenkultur ging schon bei 150 μM MG unter. Zusätzlich verstärkte eine längere Behandlung den toxischen Effekt von MG. Die Auswirkungen der MG Behandlung mit der Induktion der ROS Produktion, Inflammation und DNA Fragmentierung waren jedoch vergleichbar mit den Befunden aus den Zelllinien [206,207]. In der Untersuchung der Glyoxalasen zeigte sich ein entgegengesetzter Trend von Aktivität und Expression [207]. Obwohl die Glo Boten-RNS nicht signifikant durch MG Behandlung induziert wurden, wurde eine Tendenz dahingehend beschrieben. Dagegen wurde die Aktivität der Glo1 und Glo2 durch MG signifikant herabgesetzt [207]. Die Glo1 Aktivitätsreduktion könnte auf der durch MG bedingten GSH Depletion mit konsekutiver Inaktivierung der Glo1 durch GSSG begründet sein [192,207]. Die Inhibierung der Glo1 führte allerdings zu keiner erhöhten Anfälligkeit der Neurone gegenüber Glutamat, wobei die gewählte Glutamatkonzentration als zu gering gewertet werden kann [83,263]. Der Vergleich zwischen primären Neuronen und Astrozyten zeigte, dass Astrozyten eine deutlich stärkere Glo1 Immunreaktivität und Aktivität besitzen, woraufhin Astrozyten die Entgiftung von MG zugeschrieben wurde [83].

Die Rolle von EP auf Glo1 wurde bisher nicht untersucht. In der vorgelegten Arbeit konnte keine Veränderung der Glo1 Immunreaktivität durch die Behandlung mit EP beobachtet werden. Jedoch reduzierte EP in Neuronenkulturen den neuronalen Untergang nach NMDA Behandlung [313]. Außerdem führte die Behandlung mit EP bei Neuronen nach Sauerstoff- und Glukoseentzug zu einer Phosphorylierung von Akt (aktivierte Proteinkinase B), welche wiederum in der Lage ist das proapoptotische Enzym Glykogen Synthase Kinase 3b zu inhibieren und dadurch einen Zelluntergang zu vermeiden [314,315]. Dabei könnte die Stabilisierung der ATP Generation und des TCA eine elementare Rolle spielen [316,317]. Ebenfalls zeigte EP die Eigenschaft Ca^{2+} und Zn^{2+} zu binden und deren toxisches Potenzial zu mindern [318,319]. Demnach muss die protektive Wirkung von EP auf Neuronen nicht zwingend durch eine Veränderung der Glo1 Expression und Aktivität begründet sein.

5.6 Die EP-Behandlung verzögert die astrozytäre Narbenbildung

In der Untersuchung der CTR wurde der Großteil des Schadens zwischen 12 und 48 h nach mechanischer Schädigung geschlossen ($p < 0,05$). Nach 48 h war der hervorgerufene Schaden kaum noch auffindbar. In den EP behandelten Gruppen wurde über die untersuchte Zeit keine signifikante Reduktion der Rissweite beobachtet ($p > 0,05$). Im Vergleich zur Kontrollgruppe war der Riss in der EP behandelten Gruppe

nach 48 h nicht verschlossen. Die verbleibende Rissweite war für die mit 8,4 und 84 μM EP signifikant größer als die der CTR ($p < 0,05$ für 8,4 und 84 μM EP, $p > 0,05$ für 0,84 μM EP).

Obwohl in der vorgelegten Arbeit keine Assoziation zwischen der EP Wirkung und Glo1 untersucht wurde, ist aus vorangegangenen Arbeiten bekannt, dass vor allem die astrozytäre Glo1 Neurone vor der MG Toxizität schützt [83]. Außerdem sind Astrozyten in der Lage ihre Glo1 Aktivität besser anzupassen, wodurch der höhere Einsatz von MG zur Provokation des Zelluntergangs in astrozytären Zelllinien bedingt sein könnte [83,199,320,321].

Andere Angriffspunkte wären, neben der astrozytären Glo1, für die durch EP vermittelte verlangsamte Astroglieose denkbar. Die Aktivierung der Astrozyten hin zur reaktiven Astroglieose könnte eine Ursache darstellen [322]. Ein in diese Aktivierung involviertes Enzym wird durch die Myeloperoxidase (MPO) repräsentiert, welches zur Expressionssteigerung inflammatorischer Zytokine führt und Mikroglia und Neutrophile aktiviert [323,324]. In einem Modell zur Untersuchung des Morbus Parkinson reduzierte EP die Anzahl der GFAP⁺/MPO⁺ Astrozyten einhergehend mit einer verminderten Mikrogliaaktivierung [311]. Zudem steigerte MPO den oxidativen Stress. EP könnte MPO sekundär betreffen und vornehmlich über die Aktivierung der antioxidativen Abwehr, z.B. über Nrf2 entfalten [325–327]. Auch eine verminderte Aktivierung der Astrozyten durch eine Stabilisierung des mitochondrialen Stoffwechsels über eine gesteigerte Akt Aktivierung wäre denkbar [316,326].

Allerdings war den Effekt von EP auf die MPO in anderen Modellen nicht reproduzierbar, wodurch weitere Studien zur Klärung der Assoziation von EP und MPO notwendig werden [328].

Hinsichtlich des Narbenschlusses sollten allerdings auch Veränderungen von Proteinen diskutiert werden, welche die extrazelluläre Matrix durch Vernetzung stabilisieren, wie z.B. der TG2 [270,271,329–332]. Im ZNS führt TG zu einer Vernetzung von Proteinen, welche zum Beispiel als Marker in neurodegenerativen Erkrankungen genutzt werden [333]. In *in vivo* Modellen findet sich eine Hochregulation der TG2 nach Verschluss der Arteria cerebri media [334]. Ein Ausschalten der astrozytären TG2 scheint, das neuronale Überleben signifikant zu erhöhen [335]. Außerdem konnte in einem Modell der Multiplen Sklerose gezeigt werden, dass TG die astrozytäre Narbenbildung induziert [336]. Die Stimulation von Astrozyten mit 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS beeinträchtigte nicht das astrozytäre Überleben, aber induzierte die Expression der TG2 [337]. Diese Induktion konnte durch 10 mM EP aufgehoben werden und ging mit einer verminderten NO Produktion einher [337].

Die Mechanismen der verzögerten Astrogliose durch EP könnten auf einer verminderten reaktiven Astrogliose und damit verbundenen verringerten Veränderungen der extrazellulären Matrix beruhen.

5.7 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte im Modell der exzitotoxisch geschädigten OHSC gezeigt werden, dass es zu Veränderungen des Glo1 Proteins und der Immunreaktivität kommt. Die Beobachtung der Umverteilung zwischen Monomer und Dimer konnte bisher nur nach Fruktosediät aufgezeigt werden. Um die Bindung des Glo1 Dimers zu klären, müssen massenspektrometrische Messungen angestrebt werden. Die Bedeutung des Glo1 Dimers für die jeweiligen Zellen bedarf weiterer Untersuchungen. Es wird notwendig sein, jene Zellen zu identifizieren, welche diese Umverteilung zeigen. Dabei wird die Bestimmung der Glo1 Aktivität zur Aufklärung der funktionelle Bedeutung des Glo1 Dimers helfen. In der vorliegenden Arbeit wurden immunhistochemisch die Veränderungen der Glo1 nach exzitotoxischem Insult aufgezeigt. Die dabei auffällige Translokation zur neuronalen Zellmembran und die 12 h später auftauchenden, nicht doppel-markierbaren Zellen bedürfen weiterer Abklärung. Speziell wäre der Zeitraum zwischen 12 und 24 h von besonderem Interesse, um herauszufinden, ob es sich bei diesen Zellen nicht um jene Neuronen handelt, die zuvor die membrannaher Translokation zeigten. Da MG ein partieller GABA_A Agonist ist, wäre ebenfalls zu klären wie eine Behandlung mit MG den exzitotoxischen Schaden verändert und ob ein zeitlicher Unterschied zwischen Protektivität im Sinne einer GABA_A Aktivierung oder eine Exazerbation des Schadens durch weitere Glutamatfreisetzung vorliegt. Im Unterschied zu den im exzitotoxischen Schaden beobachteten Veränderungen konnte in der pMCAO ein deutliches neuronales Muster von einem bis zehn Tagen nach Insult beobachtet werden. Die Veränderungen bzw. das stabile Monitoring des Schadens könnte dabei später eine diagnostische Relevanz erlangen. Es bleibt jedoch unklar, welches Ereignis innerhalb der pMCAO das beobachtete Muster hervorruft und welche Rolle eine Modulation spielt. Denn aus allen hier durchgeführten Experimenten kann weder eine protektive oder destruktive Rolle der Glo1 Immunreaktivitätserhöhung abgeleitet werden. Zusätzlich ist von Interesse, ob die beobachteten Veränderungen einzig in der ischämischen, akuten neuronalen Schädigung vorliegen, oder ob ähnliche Veränderungen in einem Modell der traumatischen Hirnschädigung zu finden sind. Im Hinblick auf die neuroprotektiven Eigenschaften von EP würden Versuche unter Nutzung des Modells der OHSC Aufschluss geben, inwiefern eine intrinsische ZNS Reaktion für die Neuroprotektivität verantwortlich ist. Die Depletion der Mikroglia mit

Bisphosphonaten würde klären, welche Rolle diese Zellen bei der EP vermittelten Neuroprotektion spielen.

Hinsichtlich der neuronalen Glo1 zeigte nur eine Subpopulation der HT22 Zellen eine Glo1 Immunreaktivität. Eine systematische Analyse des Gehirns wäre notwendig und würde die Frage beantworten, ob die neuronale Glo1 regionspezifisch exprimiert wird und ob sich daraus ein Einfluss auf die neuronale Schädigung ableiten lässt.

In der vorliegenden Arbeit verlangsamte EP den astrozytären Narbenschluss. Neben der Veränderung der Transglutinasen sollte auch die Einflussnahme von inflammatorischen Mediatoren wie z.B. MPO und der Einfluss des oxidativen Stresses auf die Astrozyten weiterführend untersucht werden. Zusätzlich könnte in einem Stimulationsversuch mit LPS und ggf. Interferon- γ oder Glutamat mit zusätzlicher EP-Behandlung der Einfluss dieser Faktoren untersucht werden und zusätzlich auch die Rolle der Glo1 im Zuge der Aktivierung aufgedeckt werden.

6 Zusammenfassung

Der ischämische Schlaganfall stellt eine der häufigsten akuten Schädigungen des zentralen Nervensystems (ZNS) dar und zählt zu den häufigsten Todesursachen weltweit. Neben dem primären Schaden, verkörpert durch den Gefäßverschluss, fördern vor allem konsekutiv ausgelöste Prozesse die Ausdehnung des Schadens. Zu diesen Prozessen gehören unter anderen die Exzitotoxizität, der oxidative Stress und die Neuroinflammation. Dabei werden nicht nur mehrere Signalkaskaden aktiviert, sondern auch Überlebensmechanismen, welche diesen Prozessen entgegen wirken, angeregt. Allerdings sind diese Abwehrmechanismen energieabhängig, weshalb der notwendigen Energiebereitstellung eine besondere Rolle gebührt. Zellen des ZNS können ihren Stoffwechsel entsprechend der Aktivierung und vorangegangener Prozesse anpassen. Diese Anpassungen können aber auch in einer Mehrproduktion von toxischen Metaboliten münden. Einen dieser Metabolite repräsentiert das neurotoxische, hoch reaktive Methylglyoxal (MG), welches hauptsächlich über die Glykolyse generiert wird. MG entfaltet seine toxische Wirkung durch die Depletion von ATP, GSH und die Verstärkung des oxidativen Stresses und der Inflammation. MG wird durch das aus den Enzymen Glyoxalase (Glo) 1 und 2 bestehende ubiquitär exprimierte Glo System entgiftet. Glo1 ist dabei das geschwindigkeitsbestimmende und primär entgiftende Enzym. Veränderungen der Glo1 wurden mit neurodegenerativen Erkrankungen wie dem Morbus Parkinson, Morbus Alzheimer oder strukturellen Erkrankungen, wie der Epilepsie, assoziiert. Dagegen fehlen Daten zur Rolle der Glo1 und dessen neuroprotektiven Inhibitor EP nach akuter neuronaler Schädigung.

Im Modell der OHSC konnte sowohl ein Glo1 Monomer (23 kDa) als auch ein Glo1 Dimer (46 kDa) unter reduzierenden Bedingungen nachgewiesen werden. Zu allen betrachteten Zeitpunkten ist der semiquantitativ bestimmte Gehalt des Glo1 Monomers in der Kontrollgruppe (CTR) signifikant höher als der des Glo1 Dimers. Nach β -Aktin und zeitlich korrespondierender CTR Normierung, fand sich eine signifikante Reduktion des Glo1 Monomers 24 und 48 h nach Schädigung parallel zu einem Anstieg des Glo1 Dimers. Aus dieser Beobachtung wurde eine mögliche Umverteilung geschlussfolgert, welche anschließend durch die Ratio Dimer/Monomer untersucht wurde. Dabei fand sich ein signifikanter Unterschied der Ratio zu den Zeitpunkten 24 und 48 h zwischen der NMDA geschädigten Gruppe und der CTR. In der NMDA geschädigten Gruppe zeigte sich zudem ein signifikanter Anstieg der Ratio von 1 h auf 24 h. Hinsichtlich der Glo1 Immunreaktivität waren in allen Gruppen über die Zeit die astrozytären Fortsätze Glo1 positiv. Nach der Schädigung kam es nach 12 h zu einer Translokation der neuronalen Glo1 zur Zellmembran hin. Nach 24 und 48 h konnte eine Veränderung der Glo1 Immunreaktivität in Form des Auftauchens kleiner, runder Glo1 positiver Zellen mit fragmentiertem Zellkern nachgewiesen werden. Doppelmarkierungen mit GFAP, Iba1 und NeuN konnten nicht zur Bestimmung des vorliegenden Zelltyps führen. Nach pMCAO fand sich zu allen betrachteten Zeitpunkten sowohl contra- als auch ipsilateral ein positiver Glo1 Nachweis im Endothel der Gefäße. Contralateral kam es zu keinen zeitlichen Veränderungen der Glo1 Immunreaktivität. Ipsilateral konnte von einem bis zu zehn Tagen nach Schädigung die stärkste Glo1 Immunreaktion in Neuronen des geschädigten Gebiets beobachtet werden. Nach 60 d verlor sich das neuronale Muster und die Astrozyten der Astoglianarbe wiesen die stärkste Glo1 Immunreaktivität auf. Die Mikrogliazelllinie BV2 präsentierte eine starke, zeitlich und stimulationsunabhängige Glo1 Immunreaktivität. Diese wurde auch durch eine EP-Behandlung nicht beeinflusst. In der HT22 Zelllinie zeigte nur eine Subpopulation der Zellen eine Glo1 Immunreaktivität, welche sich zeitlich und unter EP-Behandlung nicht änderte. Nach mechanischer Schädigung der Astrozyten, im *scratch wound assay*, verlangsamte EP den Narbenschluss.

Die vorliegende Arbeit identifiziert Glo1 als modifiziertes Protein während der akuten neuronalen Schädigung und gibt Hinweise auf ein mögliches neues Behandlungsziel oder einen neuen Schädigungs- und Verlaufsmarker. Jedoch müssen deren zelluläre Bedeutung und die möglichen Modifikationen näher beleuchtet werden.

Zusätzlich gilt zu klären, welchen Einfluss MG innerhalb der Exzitotoxizität besitzt. Bezüglich EP ergeben sich aus der Literatur starke Hinweise für eine primär gliäre Wirkung, welche in den vorlegten Ergebnissen nur bezüglich der Astrozyten nachgewiesen werden konnte. Dabei muss deren molekulares Wirkungsziel noch

aufgedeckt werden. Außerdem könnten Experimente zur Wirkung von EP innerhalb der Exzitotoxizität dazu beitragen, genaue Mechanismen zu identifizieren, die dessen Neuroprotektion vermitteln. Ebenfalls sollten weitere Untersuchungen angestellt werden, um die Assoziation von Glol und EP weiter zu beleuchten.

7 Literatur

- 1 Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS et al (2015) Heart disease and stroke statistics--2015 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* 131:e29-322.
- 2 Hardie K, Hankey GJ, Jamrozik K, Broadhurst RJ, Anderson C (2003) Ten-year survival after first-ever stroke in the perth community stroke study. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 34:1842-1846.
- 3 Jaracz K, Grabowska-Fudala B, Górna K, Kozubski W (2014) Consequences of stroke in the light of objective and subjective indices: a review of recent literature. *Neurologia i neurochirurgia polska* 48:280-286.
- 4 Grau AJ, Weimar C, Buggle F, Heinrich A, Goertler M, Neumaier S, Glahn J, Brandt T, Hacke W, Diener HC (2001) Risk factors, outcome, and treatment in subtypes of ischemic stroke: the German stroke data bank. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 32:2559-2566.
- 5 Eschenfelder CC, Zeller JA, Stingele R (2006) Schlaganfall: Ursachen und Klassifikation. *Hämostaseologie* 26:298-308.
- 6 Hacke W, Kaste M, Bluhmki E, Brozman M, Dávalos A, Guidetti D, Larrue V, Lees KR, Medeghri Z, Machnig T, Schneider D, Kummer R von, Wahlgren N, Toni D (2008) Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. *The New England journal of medicine* 359:1317-1329.
- 7 Hossmann K (2012) The two pathophysiologies of focal brain ischemia: implications for translational stroke research. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 32:1310-1316.
- 8 Hacke W (2015) Interventional thrombectomy for major stroke--a step in the right direction. *The New England journal of medicine* 372:76-77.
- 9 Hacke W (2015) The results of the recent thrombectomy trials may influence stroke care delivery: are you ready? *International journal of stroke : official journal of the International Stroke Society* 10:646-650.
- 10 Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA (1999) Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends in neurosciences* 22:391-397.
- 11 Dusart I, Schwab ME (1994) Secondary cell death and the inflammatory reaction after dorsal hemisection of the rat spinal cord. *The European journal of neuroscience* 6:712-724.
- 12 Tator CH (1995) Update on the pathophysiology and pathology of acute spinal cord injury. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)* 5:407-413.
- 13 Mehta SL, Manhas N, Raghubir R (2007) Molecular targets in cerebral ischemia for developing novel therapeutics. *Brain research reviews* 54:34-66.
- 14 Doll DN, Barr TL, Simpkins JW (2014) Cytokines: their role in stroke and potential use as biomarkers and therapeutic targets. *Aging and disease* 5:294-306.
- 15 Curtis DR, Phillis JW, Watkins JC (1959) Chemical excitation of spinal neurones. *Nature* 183:611-612.
- 16 Wahl F, Obrenovitch TP, Hardy AM, Plotkine M, Boulu R, Symon L (1994) Extracellular glutamate during focal cerebral ischaemia in rats: time course and calcium dependency. *Journal of neurochemistry* 63:1003-1011.
- 17 Lai TW, Zhang S, Wang YT (2014) Excitotoxicity and stroke: identifying novel targets for neuroprotection. *Progress in neurobiology* 115:157-188.
- 18 Rothman S (1984) Synaptic release of excitatory amino acid neurotransmitter mediates anoxic neuronal death. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 4:1884-1891.
- 19 Olney JW (1986) Inciting excitotoxic cytocide among central neurons. *Advances in experimental medicine and biology* 203:631-645.
- 20 Ohta K, Graf R, Rosner G, Heiss WD (2001) Calcium ion transients in peri-infarct depolarizations may deteriorate ion homeostasis and expand infarction in focal cerebral ischemia in cats. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 32:535-543.
- 21 Lau A, Tymianski M (2010) Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. *Pflügers Archiv : European journal of physiology* 460:525-542.
- 22 Abele AE, Scholz KP, Scholz WK, Miller RJ (1990) Excitotoxicity induced by enhanced excitatory neurotransmission in cultured hippocampal pyramidal neurons. *Neuron* 4:413-419.
- 23 Tymianski M, Wallace MC, Spigelman I, Uno M, Carlen PL, Tator CH, Charlton MP (1993) Cell-permeant Ca²⁺ chelators reduce early excitotoxic and ischemic neuronal injury in vitro and in vivo. *Neuron* 11:221-235.
- 24 Traynelis SF, Wollmuth LP, McBain CJ, Menniti FS, Vance KM, Ogden KK, Hansen KB, Yuan H, Myers SJ, Dingledine R (2010) Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacological reviews* 62:405-496.
- 25 Choi DW (1987) Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 7:369-379.
- 26 Budd SL (1998) Mechanisms of neuronal damage in brain hypoxia/ischemia: focus on the role of mitochondrial calcium accumulation. *Pharmacology & therapeutics* 80:203-229.
- 27 Arundine M, Tymianski M (2003) Molecular mechanisms of calcium-dependent neurodegeneration in excitotoxicity. *Cell calcium* 34:325-337.

- 28 White RJ, Reynolds IJ (1995) Mitochondria and Na⁺/Ca²⁺ exchange buffer glutamate-induced calcium loads in cultured cortical neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 15:1318–1328.
- 29 Bano D, Young KW, Guerin CJ, Lefevre R, Rothwell NJ, Naldini L, Rizzuto R, Carafoli E, Nicotera P (2005) Cleavage of the plasma membrane Na⁺/Ca²⁺ exchanger in excitotoxicity. *Cell* 120:275–285.
- 30 Atlante A, Gagliardi S, Minervini GM, Marra E, Passarella S, Calissano P (1996) Rapid uncoupling of oxidative phosphorylation accompanies glutamate toxicity in rat cerebellar granule cells. *Neuroreport* 7:2519–2523.
- 31 Castilho RF, Hansson O, Ward MW, Budd SL, Nicholls DG (1998) Mitochondrial control of acute glutamate excitotoxicity in cultured cerebellar granule cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 18:10277–10286.
- 32 Dykens JA (1994) Isolated cerebral and cerebellar mitochondria produce free radicals when exposed to elevated CA²⁺ and Na⁺: implications for neurodegeneration. *Journal of neurochemistry* 63:584–591.
- 33 Dugan LL, Sensi SL, Canzoniero LM, Handran SD, Rothman SM, Lin TS, Goldberg MP, Choi DW (1995) Mitochondrial production of reactive oxygen species in cortical neurons following exposure to N-methyl-D-aspartate. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 15:6377–6388.
- 34 Sattler R, Xiong Z, Lu WY, Hafner M, MacDonald JF, Tymianski M (1999) Specific coupling of NMDA receptor activation to nitric oxide neurotoxicity by PSD-95 protein. *Science (New York, N.Y.)* 284:1845–1848.
- 35 Osuka K, Watanabe Y, Usuda N, Nakazawa A, Fukunaga K, Miyamoto E, Takayasu M, Tokuda M, Yoshida J (2002) Phosphorylation of neuronal nitric oxide synthase at Ser847 by CaM-KII in the hippocampus of rat brain after transient forebrain ischemia. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 22:1098–1106.
- 36 Watanabe Y, Song T, Sugimoto K, Horii M, Araki N, Tokumitsu H, Tezuka T, Yamamoto T, Tokuda M (2003) Post-synaptic density-95 promotes calcium/calmodulin-dependent protein kinase II-mediated Ser847 phosphorylation of neuronal nitric oxide synthase. *The Biochemical journal* 372:465–471.
- 37 Vest RS, O'Leary H, Bayer KU (2009) Differential regulation by ATP versus ADP further links CaMKII aggregation to ischemic conditions. *FEBS letters* 583:3577–3581.
- 38 Coultrap SJ, Vest RS, Ashpole NM, Hudmon A, Bayer KU (2011) CaMKII in cerebral ischemia. *Acta pharmacologica Sinica* 32:861–872.
- 39 Rameau GA, Chiu L, Ziff EB (2004) Bidirectional regulation of neuronal nitric-oxide synthase phosphorylation at serine 847 by the N-methyl-D-aspartate receptor. *The Journal of biological chemistry* 279:14307–14314.
- 40 Evans MD, Dizdaroglu M, Cooke MS (2004) Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutation research* 567:1–61.
- 41 Halliwell B (2006) Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *Journal of neurochemistry* 97:1634–1658.
- 42 Lafon-Cazal M, Pietri S, Culcasi M, Bockaert J (1993) NMDA-dependent superoxide production and neurotoxicity. *Nature* 364:535–537.
- 43 Reynolds IJ, Hastings TG (1995) Glutamate induces the production of reactive oxygen species in cultured forebrain neurons following NMDA receptor activation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 15:3318–3327.
- 44 Di Loreto S, Balestrino M, Pellegrini P, Berghella AM, Del Beato T, Di Marco F, Adorno D (1997) Blockade of N-methyl-D-aspartate receptor prevents hypoxic neuronal death and cytokine release. *Neuroimmunomodulation* 4:195–199.
- 45 Harrison R (2004) Physiological roles of xanthine oxidoreductase. *Drug metabolism reviews* 36:363–375.
- 46 Abramov AY, Scorziello A, Duchon MR (2007) Three distinct mechanisms generate oxygen free radicals in neurons and contribute to cell death during anoxia and reoxygenation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27:1129–1138.
- 47 Xia Y, Dawson VL, Dawson TM, Snyder SH, Zweier JL (1996) Nitric oxide synthase generates superoxide and nitric oxide in arginine-depleted cells leading to peroxynitrite-mediated cellular injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93:6770–6774.
- 48 Almeida A, Ciudad P, Delgado-Esteban M, Fernández E, García-Nogales P, Bolaños JP (2005) Inhibition of mitochondrial respiration by nitric oxide: its role in glucose metabolism and neuroprotection. *Journal of neuroscience research* 79:166–171.
- 49 Stamler JS (1994) Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell* 78:931–936.
- 50 Hess DT, Matsumoto A, Nudelman R, Stamler JS (2001) S-nitrosylation: spectrum and specificity. *Nature cell biology* 3:E46-9.
- 51 Nakamura T, Lipton SA (2009) According to GOSPEL: filling in the GAP(DH) of NO-mediated neurotoxicity. *Neuron* 63:3–6.
- 52 Bolanos JP, García-Nogales P, Almeida A (2004) Provoking neuroprotection by peroxynitrite. *Current pharmaceutical design* 10:867–877.

- 53 Lipton SA, Choi YB, Pan ZH, Lei SZ, Chen HS, Sucher NJ, Loscalzo J, Singel DJ, Stamler JS (1993) A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature* 364:626–632.
- 54 Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer* 26:239–257.
- 55 Rami A (2003) Ischemic neuronal death in the rat hippocampus: the calpain-calpastatin-caspase hypothesis. *Neurobiology of disease* 13:75–88.
- 56 Ankarcrona M, Dypbukt JM, Bonfoco E, Zhivotovsky B, Orrenius S, Lipton SA, Nicotera P (1995) Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron* 15:961–973.
- 57 Dringen R (2000) Metabolism and functions of glutathione in brain. *Progress in neurobiology* 62:649–671.
- 58 Rhee SG, Chae HZ, Kim K (2005) Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signaling. *Free radical biology & medicine* 38:1543–1552.
- 59 Janáky R, Varga V, Hermann A, Saransaari P, Oja SS (2000) Mechanisms of L-cysteine neurotoxicity. *Neurochemical research* 25:1397–1405.
- 60 Dringen R, Hirrlinger J (2003) Glutathione pathways in the brain. *Biological chemistry* 384:505–516.
- 61 Savaskan NE, Ufer C, Kühn H, Borchert A (2007) Molecular biology of glutathione peroxidase 4: from genomic structure to developmental expression and neural function. *Biological chemistry* 388:1007–1017.
- 62 Dringen R, Gutterer JM (2002) Glutathione reductase from bovine brain. *Methods in enzymology* 348:281–288.
- 63 Ben-Yoseph O, Boxer PA, Ross BD (1996) Assessment of the role of the glutathione and pentose phosphate pathways in the protection of primary cerebrocortical cultures from oxidative stress. *Journal of neurochemistry* 66:2329–2337.
- 64 Wamelink, M M C, Struys EA, Jakobs C (2008) The biochemistry, metabolism and inherited defects of the pentose phosphate pathway: a review. *Journal of inherited metabolic disease* 31:703–717.
- 65 Rodriguez-Rodriguez P, Almeida A, Bolaños JP (2013) Brain energy metabolism in glutamate-receptor activation and excitotoxicity: role for APC/C-Cdh1 in the balance glycolysis/pentose phosphate pathway. *Neurochemistry international* 62:750–756.
- 66 Mink JW, Blumenshine RJ, Adams DB (1981) Ratio of central nervous system to body metabolism in vertebrates: its constancy and functional basis. *The American journal of physiology* 241:R203-12.
- 67 Lennie P (2003) The cost of cortical computation. *Current biology* : CB 13:493–497.
- 68 Harris JJ, Jolivet R, Attwell D (2012) Synaptic energy use and supply. *Neuron* 75:762–777.
- 69 Thompson JK, Peterson MR, Freeman RD (2003) Single-neuron activity and tissue oxygenation in the cerebral cortex. *Science (New York, N.Y.)* 299:1070–1072.
- 70 Kasischke KA, Vishwasrao HD, Fisher PJ, Zipfel WR, Webb WW (2004) Neural activity triggers neuronal oxidative metabolism followed by astrocytic glycolysis. *Science (New York, N.Y.)* 305:99–103.
- 71 Hall CN, Klein-Flügge MC, Howarth C, Attwell D (2012) Oxidative phosphorylation, not glycolysis, powers presynaptic and postsynaptic mechanisms underlying brain information processing. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32:8940–8951.
- 72 Duchen MR (1992) Ca²⁺-dependent changes in the mitochondrial energetics in single dissociated mouse sensory neurons. *The Biochemical journal* 283 (Pt 1):41–50.
- 73 Gellerich FN, Gizatullina Z, Arandarcikaite O, Jerzembek D, Vielhaber S, Seppet E, Striggow F (2009) Extramitochondrial Ca²⁺ in the nanomolar range regulates glutamate-dependent oxidative phosphorylation on demand. *PLoS one* 4:e8181.
- 74 Schurr A, West CA, Rigor BM (1988) Lactate-supported synaptic function in the rat hippocampal slice preparation. *Science (New York, N.Y.)* 240:1326–1328.
- 75 Wyss MT, Jolivet R, Buck A, Magistretti PJ, Weber B (2011) In vivo evidence for lactate as a neuronal energy source. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31:7477–7485.
- 76 Bélanger M, Allaman I, Magistretti PJ (2011) Brain energy metabolism: focus on astrocyte-neuron metabolic cooperation. *Cell metabolism* 14:724–738.
- 77 Bouzier-Sore A, Voisin P, Bouchaud V, Bezancon E, Franconi J, Pellerin L (2006) Competition between glucose and lactate as oxidative energy substrates in both neurons and astrocytes: a comparative NMR study. *The European journal of neuroscience* 24:1687–1694.
- 78 Lovatt D, Sonnewald U, Waagepetersen HS, Schousboe A, He W, Lin JH, Han X, Takano T, Wang S, Sim FJ, Goldman SA, Nedergaard M (2007) The transcriptome and metabolic gene signature of protoplasmic astrocytes in the adult murine cortex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 27:12255–12266.
- 79 Cahoy JD, Emery B, Kaushal A, Foo LC, Zamanian JL, Christopherson KS, Xing Y, Lubischer JL, Krieg PA, Krupenko SA, Thompson WJ, Barres BA (2008) A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28:264–278.

- 80 Zhang Y, Chen K, Sloan SA, Bennett ML, Scholze AR, O'Keefe S, Phatnani HP, Guarnieri P, Caneda C, Ruderisch N, Deng S, Liddelow SA, Zhang C, Daneman R, Maniatis T, Barres BA, Wu JQ (2014) An RNA-sequencing transcriptome and splicing database of glia, neurons, and vascular cells of the cerebral cortex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 34:11929–11947.
- 81 Uyeda K (1979) Phosphofructokinase. *Advances in enzymology and related areas of molecular biology* 48:193–244.
- 82 Almeida A, Moncada S, Bolaños JP (2004) Nitric oxide switches on glycolysis through the AMP protein kinase and 6-phosphofructo-2-kinase pathway. *Nature cell biology* 6:45–51.
- 83 Bélanger M, Yang J, Petit J, Laroche T, Magistretti PJ, Allaman I (2011) Role of the glyoxalase system in astrocyte-mediated neuroprotection. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31:18338–18352.
- 84 Freeman MR (2010) Specification and morphogenesis of astrocytes. *Science (New York, N.Y.)* 330:774–778.
- 85 Tower DB, Young OM (1973) The activities of butyrylcholinesterase and carbonic anhydrase, the rate of anaerobic glycolysis, and the question of a constant density of glial cells in cerebral cortices of various mammalian species from mouse to whale. *Journal of neurochemistry* 20:269–278.
- 86 Chen Y, Swanson RA (2003) Astrocytes and brain injury. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 23:137–149.
- 87 Walz W, Hertz L (1983) Functional interactions between neurons and astrocytes. II. Potassium homeostasis at the cellular level. *Progress in neurobiology* 20:133–183.
- 88 Deitmer JW, Rose CR (1996) pH regulation and proton signalling by glial cells. *Progress in neurobiology* 48:73–103.
- 89 Walz W, Hertz L (1982) Ouabain-sensitive and ouabain-resistant net uptake of potassium into astrocytes and neurons in primary cultures. *Journal of neurochemistry* 39:70–77.
- 90 Nedergaard M, Hansen AJ (1993) Characterization of cortical depolarizations evoked in focal cerebral ischemia. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 13:568–574.
- 91 Dermietzel R, Hertberg EL, Kessler JA, Spray DC (1991) Gap junctions between cultured astrocytes: immunocytochemical, molecular, and electrophysiological analysis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 11:1421–1432.
- 92 Bolaños JP, Medina JM (1996) Induction of nitric oxide synthase inhibits gap junction permeability in cultured rat astrocytes. *Journal of neurochemistry* 66:2091–2099.
- 93 Martínez AD, Sáez JC (2000) Regulation of astrocyte gap junctions by hypoxia-reoxygenation. *Brain research. Brain research reviews* 32:250–258.
- 94 Blanc EM, Bruce-Keller AJ, Mattson MP (1998) Astrocytic gap junctional communication decreases neuronal vulnerability to oxidative stress-induced disruption of Ca²⁺ homeostasis and cell death. *Journal of neurochemistry* 70:958–970.
- 95 Abbott NJ, Revest PA, Romero IA (1992) Astrocyte-endothelial interaction: physiology and pathology. *Neuropathology and applied neurobiology* 18:424–433.
- 96 Rischke R, Rami A, Bachmann U, Rabié A, Kriegstein J (1992) Activated astrocytes, but not pyramidal cells, increase glucose utilization in rat hippocampal CA1 subfield after ischemia. *Pharmacology* 45:142–153.
- 97 Nehlig A, Wittendorp-Rechenmann E, Lam CD (2004) Selective uptake of [14C]2-deoxyglucose by neurons and astrocytes: high-resolution microautoradiographic imaging by cellular 14C-trajectory combined with immunohistochemistry. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 24:1004–1014.
- 98 Anderson CM, Swanson RA (2000) Astrocyte glutamate transport: review of properties, regulation, and physiological functions. *Glia* 32:1–14.
- 99 Rosenberg PA, Aizenman E (1989) Hundred-fold increase in neuronal vulnerability to glutamate toxicity in astrocyte-poor cultures of rat cerebral cortex. *Neuroscience letters* 103:162–168.
- 100 Sibson NR, Dhankhar A, Mason GF, Rothman DL, Behar KL, Shulman RG (1998) Stoichiometric coupling of brain glucose metabolism and glutamatergic neuronal activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:316–321.
- 101 Rothstein JD, Dykes-Hoberg M, Pardo CA, Bristol LA, Jin L, Kuncl RW, Kanai Y, Hediger MA, Wang Y, Schielke JP, Welty DF (1996) Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron* 16:675–686.
- 102 Rao VL, Dogan A, Todd KG, Bowen KK, Kim BT, Rothstein JD, Dempsey RJ (2001) Antisense knockdown of the glial glutamate transporter GLT-1, but not the neuronal glutamate transporter EAAC1, exacerbates transient focal cerebral ischemia-induced neuronal damage in rat brain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 21:1876–1883.
- 103 Longuemare MC, Swanson RA (1995) Excitatory amino acid release from astrocytes during energy failure by reversal of sodium-dependent uptake. *Journal of neuroscience research* 40:379–386.

- 104 Li S, Mealing GA, Morley P, Stys PK (1999) Novel injury mechanism in anoxia and trauma of spinal cord white matter: glutamate release via reverse Na⁺-dependent glutamate transport. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 19:RC16.
- 105 Swanson RA, Farrell K, Simon RP (1995) Acidosis causes failure of astrocyte glutamate uptake during hypoxia. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 15:417–424.
- 106 Martinez-Hernandez A, Bell KP, Norenberg MD (1977) Glutamine synthetase: glial localization in brain. *Science (New York, N.Y.)* 195:1356–1358.
- 107 Peng L, Hertz L, Huang R, Sonnewald U, Petersen SB, Westergaard N, Larsson O, Schousboe A (1993) Utilization of glutamine and of TCA cycle constituents as precursors for transmitter glutamate and GABA. *Developmental neuroscience* 15:367–377.
- 108 Hertz L, Dringen R, Schousboe A, Robinson SR (1999) Astrocytes: glutamate producers for neurons. *Journal of neuroscience research* 57:417–428.
- 109 Hertz L, Yu AC, Kala G, Schousboe A (2000) Neuronal-astrocytic and cytosolic-mitochondrial metabolite trafficking during brain activation, hyperammonemia and energy deprivation. *Neurochemistry international* 37:83–102.
- 110 Martin E, Rosenthal RE, Fiskum G (2005) Pyruvate dehydrogenase complex: metabolic link to ischemic brain injury and target of oxidative stress. *Journal of neuroscience research* 79:240–247.
- 111 Sagara JI, Miura K, Bannai S (1993) Maintenance of neuronal glutathione by glial cells. *Journal of neurochemistry* 61:1672–1676.
- 112 Dringen R, Pfeiffer B, Hamprecht B (1999) Synthesis of the antioxidant glutathione in neurons: supply by astrocytes of CysGly as precursor for neuronal glutathione. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 19:562–569.
- 113 Swanson RA, Choi DW (1993) Glial glycogen stores affect neuronal survival during glucose deprivation in vitro. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 13:162–169.
- 114 Wender R, Brown AM, Fern R, Swanson RA, Farrell K, Ransom BR (2000) Astrocytic glycogen influences axon function and survival during glucose deprivation in central white matter. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 20:6804–6810.
- 115 Halperin ML, Connors HP, Relman AS, Karnovsky ML (1969) Factors that control the effect of pH on glycolysis in leukocytes. *The Journal of biological chemistry* 244:384–390.
- 116 Brookes N, Turner RJ (1993) Extracellular potassium regulates the glutamine content of astrocytes: mediation by intracellular pH. *Neuroscience letters* 160:73–76.
- 117 Peng L, Swanson RA, Hertz L (2001) Effects of L-glutamate, D-aspartate, and monensin on glycolytic and oxidative glucose metabolism in mouse astrocyte cultures: further evidence that glutamate uptake is metabolically driven by oxidative metabolism. *Neurochemistry international* 38:437–443.
- 118 Herrero-Mendez A, Almeida A, Fernández E, Maestre C, Moncada S, Bolaños JP (2009) The bioenergetic and antioxidant status of neurons is controlled by continuous degradation of a key glycolytic enzyme by APC/C-Cdh1. *Nature cell biology* 11:747–752.
- 119 Laughton JD, Bittar P, Charnay Y, Pellerin L, Kovari E, Magistretti PJ, Bouras C (2007) Metabolic compartmentalization in the human cortex and hippocampus: evidence for a cell- and region-specific localization of lactate dehydrogenase 5 and pyruvate dehydrogenase. *BMC neuroscience* 8:35.
- 120 Berkich DA, Ola MS, Cole J, Sweatt AJ, Hutson SM, LaNoue KF (2007) Mitochondrial transport proteins of the brain. *Journal of neuroscience research* 85:3367–3377.
- 121 Halim ND, Mcfate T, Mohyeldin A, Okagaki P, Korotchkina LG, Patel MS, Jeoung NH, Harris RA, Schell MJ, Verma A (2010) Phosphorylation status of pyruvate dehydrogenase distinguishes metabolic phenotypes of cultured rat brain astrocytes and neurons. *Glia* 58:1168–1176.
- 122 Itoh Y, Esaki T, Shimoji K, Cook M, Law MJ, Kaufman E, Sokoloff L (2003) Dichloroacetate effects on glucose and lactate oxidation by neurons and astroglia in vitro and on glucose utilization by brain in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100:4879–4884.
- 123 Karus C, Ziemens D, Rose CR (2015) Lactate rescues neuronal sodium homeostasis during impaired energy metabolism. *Channels (Austin, Tex.)* 9:200–208.
- 124 Rosafio K, Castillo X, Hirt L, Pellerin L (2016) Cell-specific modulation of monocarboxylate transporter expression contributes to the metabolic reprogramming taking place following cerebral ischemia. *Neuroscience* 317:108–120.
- 125 Pellerin L, Magistretti PJ (1994) Glutamate uptake into astrocytes stimulates aerobic glycolysis: a mechanism coupling neuronal activity to glucose utilization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91:10625–10629.
- 126 Occhipinti R, Somersalo E, Calvetti D (2009) Astrocytes as the glucose shunt for glutamatergic neurons at high activity: an in silico study. *Journal of neurophysiology* 101:2528–2538.
- 127 Figley CR (2011) Lactate transport and metabolism in the human brain: implications for the astrocyte-neuron lactate shuttle hypothesis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31:4768–4770.

- 128 Diemel GA (2013) Astrocytic energetics during excitatory neurotransmission: What are contributions of glutamate oxidation and glycolysis? *Neurochemistry international* 63:244–258.
- 129 Gandhi GK, Cruz NF, Ball KK, Diemel GA (2009) Astrocytes are poised for lactate trafficking and release from activated brain and for supply of glucose to neurons. *Journal of neurochemistry* 111:522–536.
- 130 Patel AB, Lai, James C K, Chowdhury, Golam M I, Hyder F, Rothman DL, Shulman RG, Behar KL (2014) Direct evidence for activity-dependent glucose phosphorylation in neurons with implications for the astrocyte-to-neuron lactate shuttle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111:5385–5390.
- 131 Ball KK, Cruz NF, Mrak RE, Diemel GA (2010) Trafficking of glucose, lactate, and amyloid-beta from the inferior colliculus through perivascular routes. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 30:162–176.
- 132 Bak LK, Walls AB, Schousboe A, Ring A, Sonnewald U, Waagepetersen HS (2009) Neuronal glucose but not lactate utilization is positively correlated with NMDA-induced neurotransmission and fluctuations in cytosolic Ca²⁺ levels. *Journal of neurochemistry* 109 Suppl 1:87–93.
- 133 Rodriguez-Rodriguez P, Fernandez E, Almeida A, Bolaños JP (2012) Excitotoxic stimulus stabilizes PFKFB3 causing pentose-phosphate pathway to glycolysis switch and neurodegeneration. *Cell death and differentiation* 19:1582–1589.
- 134 Ivannikov MV, Sugimori M, Llinás RR (2010) Calcium clearance and its energy requirements in cerebellar neurons. *Cell calcium* 47:507–513.
- 135 Satrústegui J, Bak LK (2015) Fluctuations in Cytosolic Calcium Regulate the Neuronal Malate-Aspartate NADH Shuttle: Implications for Neuronal Energy Metabolism. *Neurochemical research* 40:2425–2430.
- 136 Maestre C, Delgado-Esteban M, Gomez-Sanchez JC, Bolaños JP, Almeida A (2008) Cdk5 phosphorylates Cdh1 and modulates cyclin B1 stability in excitotoxicity. *The EMBO journal* 27:2736–2745.
- 137 Bolaños JP, Almeida A, Moncada S (2010) Glycolysis: a bioenergetic or a survival pathway? *Trends in biochemical sciences* 35:145–149.
- 138 Cerdán S, Rodrigues TB, Sierra A, Benito M, Fonseca LL, Fonseca CP, García-Martín ML (2006) The redox switch/redox coupling hypothesis. *Neurochemistry international* 48:523–530.
- 139 Ridet JL, Malhotra SK, Privat A, Gage FH (1997) Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. *Trends in neurosciences* 20:570–577.
- 140 Endoh M, Maiese K, Pulsinelli WA, Wagner JA (1993) Reactive astrocytes express NADPH diaphorase in vivo after transient ischemia. *Neuroscience letters* 154:125–128.
- 141 van Lookeren Campagne, M, Thibodeaux H, van Bruggen N, Cairns B, Lowe DG (2000) Increased binding activity at an antioxidant-responsive element in the metallothionein-1 promoter and rapid induction of metallothionein-1 and -2 in response to cerebral ischemia and reperfusion. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 20:5200–5207.
- 142 Feuerstein GZ, Wang X, Barone FC (1998) The role of cytokines in the neuropathology of stroke and neurotrauma. *Neuroimmunomodulation* 5:143–159.
- 143 Dong Y, Benveniste EN (2001) Immune function of astrocytes. *Glia* 36:180–190.
- 144 Choudhury GR, Ding S (2016) Reactive astrocytes and therapeutic potential in focal ischemic stroke. *Neurobiology of disease* 85:234–244.
- 145 Kakinuma Y, Hama H, Sugiyama F, Yagami K, Goto K, Murakami K, Fukamizu A (1998) Impaired blood-brain barrier function in angiotensinogen-deficient mice. *Nature medicine* 4:1078–1080.
- 146 Sivron T, Schwartz M (1995) Glial cell types, lineages, and response to injury in rat and fish: implications for regeneration. *Glia* 13:157–165.
- 147 Faulkner JR, Herrmann JE, Woo MJ, Tansey KE, Doan NB, Sofroniew MV (2004) Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24:2143–2155.
- 148 Pekny M, Nilsson M (2005) Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia* 50:427–434.
- 149 Bush TG, Puvanachandra N, Horner CH, Polito A, Ostensfeld T, Svendsen CN, Mucke L, Johnson MH, Sofroniew MV (1999) Leukocyte infiltration, neuronal degeneration, and neurite outgrowth after ablation of scar-forming, reactive astrocytes in adult transgenic mice. *Neuron* 23:297–308.
- 150 Malipiero UV, Frei K, Fontana A (1990) Production of hemopoietic colony-stimulating factors by astrocytes. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 144:3816–3821.
- 151 Raivich G, Haas S, Werner A, Klein MA, Kloss C, Kreutzberg GW (1998) Regulation of MCSF receptors on microglia in the normal and injured mouse central nervous system: a quantitative immunofluorescence study using confocal laser microscopy. *The Journal of comparative neurology* 395:342–358.
- 152 Hailer NP, Wirjatijasa F, Roser N, Hischebeth GT, Korf HW, Dehghani F (2001) Astrocytic factors protect neuronal integrity and reduce microglial activation in an in vitro model of N-methyl-D-aspartate-induced excitotoxic injury in organotypic hippocampal slice cultures. *The European journal of neuroscience* 14:315–326.
- 153 Graeber MB, Streit WJ (2010) Microglia: biology and pathology. *Acta neuropathologica* 119:89–105.

- 154 Benakis C, Garcia-Bonilla L, Iadecola C, Anrather J (2014) The role of microglia and myeloid immune cells in acute cerebral ischemia. *Frontiers in cellular neuroscience* 8:461.
- 155 Lawson LJ, Perry VH, Dri P, Gordon S (1990) Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience* 39:151–170.
- 156 Lawson LJ, Perry VH, Gordon S (1992) Turnover of resident microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience* 48:405–415.
- 157 Heppner FL, Skutella T, Hailer NP, Haas D, Nitsch R (1998) Activated microglial cells migrate towards sites of excitotoxic neuronal injury inside organotypic hippocampal slice cultures. *The European journal of neuroscience* 10:3284–3290.
- 158 Streit WJ (2002) Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS. *Glia* 40:133–139.
- 159 Lee YB, Nagai A, Kim SU (2002) Cytokines, chemokines, and cytokine receptors in human microglia. *Journal of neuroscience research* 69:94–103.
- 160 Tambuyzer BR, Ponsaerts P, Nouwen EJ (2009) Microglia: gatekeepers of central nervous system immunology. *Journal of leukocyte biology* 85:352–370.
- 161 Giulian D, Vaca K, Johnson B (1988) Secreted peptides as regulators of neuron-glia and glia-glia interactions in the developing nervous system. *Journal of neuroscience research* 21:487–500.
- 162 Wirjatijasa F, Dehghani F, Blaheta RA, Korf H, Hailer NP (2002) Interleukin-4, interleukin-10, and interleukin-1-receptor antagonist but not transforming growth factor-beta induce ramification and reduce adhesion molecule expression of rat microglial cells. *Journal of neuroscience research* 68:579–587.
- 163 Gimeno-Bayón J, López-López A, Rodríguez MJ, Mahy N (2014) Glucose pathways adaptation supports acquisition of activated microglia phenotype. *Journal of neuroscience research* 92:723–731.
- 164 Orihuela R, McPherson CA, Harry GJ (2016) Microglial M1/M2 polarization and metabolic states. *British journal of pharmacology* 173:649–665.
- 165 Wang B, Liu T, Lai C, Rao Y, Choi M, Chi J, Dai J, Rathmell JC, Yao T (2014) Glycolysis-dependent histone deacetylase 4 degradation regulates inflammatory cytokine production. *Molecular biology of the cell* 25:3300–3307.
- 166 Hara MR, Agrawal N, Kim SF, Cascio MB, Fujimuro M, Ozeki Y, Takahashi M, Cheah JH, Tankou SK, Hester LD, Ferris CD, Hayward SD, Snyder SH, Sawa A (2005) S-nitrosylated GAPDH initiates apoptotic cell death by nuclear translocation following Siah1 binding. *Nature cell biology* 7:665–674.
- 167 Li C, Feng J, Wu Y, Zhang G (2012) Cerebral ischemia-reperfusion induces GAPDH S-nitrosylation and nuclear translocation. *Biochemistry. Biokhimiia* 77:671–678.
- 168 Thornalley PJ (2003) Glyoxalase I—structure, function and a critical role in the enzymatic defence against glycation. *Biochemical Society transactions* 31:1343–1348.
- 169 Ray S, Ray M (1981) Isolation of methylglyoxal synthase from goat liver. *The Journal of biological chemistry* 256:6230–6233.
- 170 Phillips SA, Thornalley PJ (1993) The formation of methylglyoxal from triose phosphates. Investigation using a specific assay for methylglyoxal. *European journal of biochemistry / FEBS* 212:101–105.
- 171 Ahmed N, Battah S, Karachalias N, Babaei-Jadidi R, Horányi M, Baróti K, Hollan S, Thornalley PJ (2003) Increased formation of methylglyoxal and protein glycation, oxidation and nitrosation in triosephosphate isomerase deficiency. *Biochimica et biophysica acta* 1639:121–132.
- 172 Richard JP (1993) Mechanism for the formation of methylglyoxal from triosephosphates. *Biochemical Society transactions* 21:549–553.
- 173 Thornalley PJ, Langborg A, Minhas HS (1999) Formation of glyoxal, methylglyoxal and 3-deoxyglucosone in the glycation of proteins by glucose. *The Biochemical journal* 344 Pt 1:109–116.
- 174 Thornalley PJ (1993) The glyoxalase system in health and disease. *Molecular aspects of medicine* 14:287–371.
- 175 Selwood T, Thornalley PJ (1993) Binding of methylglyoxal to albumin and formation of fluorescent adducts. Inhibition by arginine, N-alpha-acetylarginine and aminoguanidine. *Biochemical Society transactions* 21:170S.
- 176 Thornalley PJ (1996) Pharmacology of methylglyoxal: formation, modification of proteins and nucleic acids, and enzymatic detoxification—a role in pathogenesis and antiproliferative chemotherapy. *General pharmacology* 27:565–573.
- 177 Chaplen FW, Fahl WE, Cameron DC (1998) Evidence of high levels of methylglyoxal in cultured Chinese hamster ovary cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:5533–5538.
- 178 Rabbani N, Thornalley PJ (2012) Methylglyoxal, glyoxalase 1 and the dicarbonyl proteome. *Amino acids* 42:1133–1142.
- 179 Allaman I, Bélanger M, Magistretti PJ (2015) Methylglyoxal, the dark side of glycolysis. *Frontiers in neuroscience* 9:23.
- 180 Marinari UM, Ferro M, Sciaba L, Finollo R, Bassi AM, Brambilla G (1984) DNA-damaging activity of biotic and xenobiotic aldehydes in Chinese hamster ovary cells. *Cell biochemistry and function* 2:243–248.
- 181 Kang JH (2003) Oxidative damage of DNA induced by methylglyoxal in vitro. *Toxicology letters* 145:181–187.

- 182 Kozarich JW, Deegan JL (1979) 7-Methylguanosine-dependent inhibition of globin mRNA translation by methylglyoxal. *The Journal of biological chemistry* 254:9345–9348.
- 183 Lozano AM, Mezl VA (1984) Methylglyoxal inhibits the translation of natural and chemically decapped mRNAs. *Bioscience reports* 4:783–788.
- 184 Racker E (1951) The mechanism of action of glyoxalase. *The Journal of biological chemistry* 190:685–696.
- 185 Thornalley PJ (1990) The glyoxalase system: new developments towards functional characterization of a metabolic pathway fundamental to biological life. *The Biochemical journal* 269:1–11.
- 186 Sellin S, Mannervik B (1983) Reversal of the reaction catalyzed by glyoxalase I. Calculation of the equilibrium constant for the enzymatic reaction. *The Journal of biological chemistry* 258:8872–8875.
- 187 Oray B, Norton SJ (1977) A two-step purification of mouse liver glyoxalase I and evidence of its dimeric constitution. *Biochimica et biophysica acta* 483:203–209.
- 188 Marmstål E, Aronsson AC, Mannervik B (1979) Comparison of glyoxalase I purified from yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) with the enzyme from mammalian sources. *The Biochemical journal* 183:23–30.
- 189 Allen RE, Lo TW, Thornalley PJ (1993) A simplified method for the purification of human red blood cell glyoxalase. I. Characteristics, immunoblotting, and inhibitor studies. *Journal of protein chemistry* 12:111–119.
- 190 Mitsumoto A, Kim KR, Oshima G, Kunimoto M, Okawa K, Iwamatsu A, Nakagawa Y (1999) Glyoxalase I is a novel nitric-oxide-responsive protein. *The Biochemical journal* 344 Pt 3:837–844.
- 191 Mitsumoto A, Kim KR, Oshima G, Kunimoto M, Okawa K, Iwamatsu A, Nakagawa Y (2000) Nitric oxide inactivates glyoxalase I in cooperation with glutathione. *Journal of biochemistry* 128:647–654.
- 192 Birkenmeier G, Stegemann C, Hoffmann R, Günther R, Huse K, Birkemeyer C (2010) Posttranslational modification of human glyoxalase 1 indicates redox-dependent regulation. *PLoS one* 5:e10399.
- 193 Hemptinne V de, Rondas D, Toepoel M, Vancompennolle K (2009) Phosphorylation on Thr-106 and NO-modification of glyoxalase I suppress the TNF-induced transcriptional activity of NF- κ B. *Molecular and cellular biochemistry* 325:169–178.
- 194 Vince R, Wolf M, Sanford C (1973) Glutaryl-S-(p-bromobenzyl)-L-cysteinylglycine. A metabolically stable inhibitor of glyoxalase I. *Journal of medicinal chemistry* 16:951–953.
- 195 Aronsson AC, Sellin S, Tibbelin G, Mannervik B (1981) Probing the active site of glyoxalase I from human erythrocytes by use of the strong reversible inhibitor S-p-bromobenzylglutathione and metal substitutions. *The Biochemical journal* 197:67–75.
- 196 Yu Y, Kim J, Lee K, Kim SY, Han P, Lee J (2005) Inhibition of the cerebral ischemic injury by ethyl pyruvate with a wide therapeutic window. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 36:2238–2243.
- 197 Hollenbach M, Hintersdorf A, Huse K, Sack U, Bigl M, Groth M, Santel T, Buchold M, Lindner I, Otto A, Sicker D, Schellenberger W, Almendinger J, Pustowoit B, Birkemeyer C, Platzer M, Oerlecke I, Hemdan N, Birkenmeier G (2008) Ethyl pyruvate and ethyl lactate down-regulate the production of pro-inflammatory cytokines and modulate expression of immune receptors. *Biochemical pharmacology* 76:631–644.
- 198 Kao KK, Fink MP (2010) The biochemical basis for the anti-inflammatory and cytoprotective actions of ethyl pyruvate and related compounds. *Biochemical pharmacology* 80:151–159.
- 199 Amicarelli F, Colafarina S, Cattani F, Cimini A, Di Ilio C, Ceru MP, Miranda M (2003) Scavenging system efficiency is crucial for cell resistance to ROS-mediated methylglyoxal injury. *Free radical biology & medicine* 35:856–871.
- 200 de Arriba, Susana Garcia, Stuchbury G, Yarin J, Burnell J, Loske C, Münch G (2007) Methylglyoxal impairs glucose metabolism and leads to energy depletion in neuronal cells—protection by carbonyl scavengers. *Neurobiology of aging* 28:1044–1050.
- 201 Thornalley PJ, Edwards LG, Kang Y, Wyatt C, Davies N, Ladan MJ, Double J (1996) Antitumour activity of S-p-bromobenzylglutathione cyclopentyl diester in vitro and in vivo. Inhibition of glyoxalase I and induction of apoptosis. *Biochemical pharmacology* 51:1365–1372.
- 202 Sakamoto H, Mashima T, Sato S, Hashimoto Y, Yamori T, Tsuruo T (2001) Selective activation of apoptosis program by S-p-bromobenzylglutathione cyclopentyl diester in glyoxalase I-overexpressing human lung cancer cells. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 7:2513–2518.
- 203 Kuhla B, Lüth H, Haferburg D, Weick M, Reichenbach A, Arendt T, Münch G (2006) Pathological effects of glyoxalase I inhibition in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Journal of neuroscience research* 83:1591–1600.
- 204 Okouchi M, Okayama N, Aw TY (2005) Differential susceptibility of naive and differentiated PC-12 cells to methylglyoxal-induced apoptosis: influence of cellular redox. *Current neurovascular research* 2:13–22.
- 205 Kikuchi S, Shinpo K, Moriwaka F, Makita Z, Miyata T, Tashiro K (1999) Neurotoxicity of methylglyoxal and 3-deoxyglucosone on cultured cortical neurons: synergism between glycation and oxidative stress, possibly involved in neurodegenerative diseases. *Journal of neuroscience research* 57:280–289.
- 206 Di Loreto S, Caracciolo V, Colafarina S, Sebastiani P, Gasbarri A, Amicarelli F (2004) Methylglyoxal induces oxidative stress-dependent cell injury and up-regulation of interleukin-1 β and nerve growth factor in cultured hippocampal neuronal cells. *Brain research* 1006:157–167.

- 207 Di Loreto S, Zimmiti V, Sebastiani P, Cervelli C, Falone S, Amicarelli F (2008) Methylglyoxal causes strong weakening of detoxifying capacity and apoptotic cell death in rat hippocampal neurons. *The international journal of biochemistry & cell biology* 40:245–257.
- 208 Nakadate Y, Uchida K, Shikata K, Yoshimura S, Azuma M, Hirata T, Konishi H, Kiyama H, Tachibana T (2009) The formation of argpyrimidine, a methylglyoxal-arginine adduct, in the nucleus of neural cells. *Biochemical and biophysical research communications* 378:209–212.
- 209 Distler MG, Plant LD, Sokoloff G, Hawk AJ, Aneas I, Wuenschell GE, Termini J, Meredith SC, Nobrega MA, Palmer AA (2012) Glyoxalase 1 increases anxiety by reducing GABAA receptor agonist methylglyoxal. *The Journal of clinical investigation* 122:2306–2315.
- 210 Kaila K (1994) Ionic basis of GABAA receptor channel function in the nervous system. *Progress in neurobiology* 42:489–537.
- 211 Muir JK, Lobner D, Monyer H, Choi DW (1996) GABAA receptor activation attenuates excitotoxicity but exacerbates oxygen-glucose deprivation-induced neuronal injury in vitro. *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 16:1211–1218.
- 212 Hayes JD, Milner SW, Walker SW (1989) Expression of glyoxalase, glutathione peroxidase and glutathione S-transferase isoenzymes in different bovine tissues. *Biochimica et biophysica acta* 994:21–29.
- 213 Kuhla B, Boeck K, Schmidt A, Ogunlade V, Arendt T, Münch G, Lüth H (2007) Age- and stage-dependent glyoxalase I expression and its activity in normal and Alzheimer's disease brains. *Neurobiology of aging* 28:29–41.
- 214 Kurz A, Rabbani N, Walter M, Bonin M, Thornalley P, Auburger G, Gispert S (2011) Alpha-synuclein deficiency leads to increased glyoxalase I expression and glycation stress. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 68:721–733.
- 215 Tajes M, Guivernau B, Ramos-Fernández E, Bosch-Morató M, Palomer E, Guix FX, Muñoz FJ (2013) The pathophysiology of triose phosphate isomerase dysfunction in Alzheimer's disease. *Histology and histopathology* 28:43–51.
- 216 Oya T, Hattori N, Mizuno Y, Miyata S, Maeda S, Osawa T, Uchida K (1999) Methylglyoxal modification of protein. Chemical and immunochemical characterization of methylglyoxal-arginine adducts. *The Journal of biological chemistry* 274:18492–18502.
- 217 de Arriba, Susana Garcia, Krügel U, Regenthal R, Vissiennon Z, Verdaguer E, Lewerenz A, García-Jordá E, Pallas M, Camins A, Münch G, Nieber K, Allgaier C (2006) Carbonyl stress and NMDA receptor activation contribute to methylglyoxal neurotoxicity. *Free radical biology & medicine* 40:779–790.
- 218 Shin MJ, Kim DW, Lee YP, Ahn EH, Jo HS, Kim D, Kwon O, Kang T, Cho Y, Park J, Eum WS, Choi SY (2014) Tat-glyoxalase protein inhibits against ischemic neuronal cell damage and ameliorates ischemic injury. *Free radical biology & medicine* 67:195–210.
- 219 Kumagai T, Nangaku M, Kojima I, Nagai R, Ingelfinger JR, Miyata T, Fujita T, Inagi R (2009) Glyoxalase I overexpression ameliorates renal ischemia-reperfusion injury in rats. *American journal of physiology. Renal physiology* 296:F912-21.
- 220 Sreejayan N, Yang X, Palanichamy K, Dolence K, Ren J (2008) Antioxidant properties of argpyrimidine. *European journal of pharmacology* 593:30–35.
- 221 Li W, Maloney RE, Circu ML, Alexander JS, Aw TY (2013) Acute carbonyl stress induces occludin glycation and brain microvascular endothelial barrier dysfunction: role for glutathione-dependent metabolism of methylglyoxal. *Free radical biology & medicine* 54:51–61.
- 222 Li W, Xu H, Hu Y, He P, Ni Z, Xu H, Zhang Z, Dai H (2013) Edaravone protected human brain microvascular endothelial cells from methylglyoxal-induced injury by inhibiting AGEs/RAGE/oxidative stress. *PLoS one* 8:e76025.
- 223 Stoppini L, Buchs PA, Muller D (1991) A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. *Journal of neuroscience methods* 37:173–182.
- 224 Dehghani F, Hischebeth, Gunnar T R, Wirjatijasa F, Kohl A, Korf H, Hailer NP (2003) The immunosuppressant mycophenolate mofetil attenuates neuronal damage after excitotoxic injury in hippocampal slice cultures. *The European journal of neuroscience* 18:1061–1072.
- 225 Ebrahimi F, Koch M, Pieroh P, Ghadban C, Hobusch C, Bechmann I, Dehghani F (2012) Time dependent neuroprotection of mycophenolate mofetil: effects on temporal dynamics in glial proliferation, apoptosis, and scar formation. *Journal of neuroinflammation* 9:89.
- 226 Kohl A, Dehghani F, Korf H, Hailer NP (2003) The bisphosphonate clodronate depletes microglial cells in excitotoxically injured organotypic hippocampal slice cultures. *Experimental neurology* 181:1–11.
- 227 Oest TM, Dehghani F, Korf H, Hailer NP (2006) The immunosuppressant mycophenolate mofetil improves preservation of the perforant path in organotypic hippocampal slice cultures: a retrograde tracing study. *Hippocampus* 16:437–442.
- 228 Wagner D, Deten A, Härtig W, Boltze J, Kranz A (2012) Changes in T2 relaxation time after stroke reflect clearing processes. *NeuroImage* 61:780–785.
- 229 Tamura A, Graham DI, McCulloch J, Teasdale GM (1981) 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* 1:53–60.

- 230 Wagner D, Scheibe J, Glocke I, Weise G, Deten A, Boltze J, Kranz A (2013) Object-based analysis of astroglial reaction and astrocyte subtype morphology after ischemic brain injury. *Acta neurobiologiae experimentalis* 73:79–87.
- 231 Dehghani F, Conrad A, Kohl A, Korf H, Hailer NP (2004) Clodronate inhibits the secretion of proinflammatory cytokines and NO by isolated microglial cells and reduces the number of proliferating glial cells in excitotoxically injured organotypic hippocampal slice cultures. *Experimental neurology* 189:241–251.
- 232 O'Collins VE, Macleod MR, Donnan GA, Horky LL, van der Worp, Bart H, Howells DW (2006) 1,026 experimental treatments in acute stroke. *Annals of neurology* 59:467–477.
- 233 Hardingham GE (2009) Coupling of the NMDA receptor to neuroprotective and neurodestructive events. *Biochemical Society transactions* 37:1147–1160.
- 234 Kostandy BB (2012) The role of glutamate in neuronal ischemic injury: the role of spark in fire. *Neurological sciences : official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology* 33:223–237.
- 235 Griesdale, Donald E G, Tremblay M, McEwen J, Chittock DR (2009) Glucose control and mortality in patients with severe traumatic brain injury. *Neurocritical care* 11:311–316.
- 236 Moro N, Ghavim S, Harris NG, Hovda DA, Sutton RL (2013) Glucose administration after traumatic brain injury improves cerebral metabolism and reduces secondary neuronal injury. *Brain research* 1535:124–136.
- 237 Moro N, Sutton RL (2010) Beneficial effects of sodium or ethyl pyruvate after traumatic brain injury in the rat. *Experimental neurology* 225:391–401.
- 238 Alessandri B, Schwandt E, Kamada Y, Nagata M, Heimann A, Kempinski O (2012) The neuroprotective effect of lactate is not due to improved glutamate uptake after controlled cortical impact in rats. *Journal of neurotrauma* 29:2181–2191.
- 239 Kim J, Yu Y, Kim S, Lee J (2005) Anti-inflammatory mechanism is involved in ethyl pyruvate-mediated efficacious neuroprotection in the postischemic brain. *Brain research* 1060:188–192.
- 240 Shi H, Wang H, Pu H, Shi Y, Zhang J, Zhang W, Wang G, Hu X, Leak RK, Chen J, Gao Y (2015) Ethyl pyruvate protects against blood-brain barrier damage and improves long-term neurological outcomes in a rat model of traumatic brain injury. *CNS neuroscience & therapeutics* 21:374–384.
- 241 Bennett-Guerrero E, Swaminathan M, Grigore AM, Roach GW, Aberle LG, Johnston JM, Fink MP (2009) A phase II multicenter double-blind placebo-controlled study of ethyl pyruvate in high-risk patients undergoing cardiac surgery with cardiopulmonary bypass. *Journal of cardiothoracic and vascular anesthesia* 23:324–329.
- 242 Zeng J, Liu J, Yang G, Kelly, Mark J S, James TL, Litt L (2007) Exogenous ethyl pyruvate versus pyruvate during metabolic recovery after oxidative stress in neonatal rat cerebrocortical slices. *Anesthesiology* 107:630–640.
- 243 del Rio, J A, Heimrich B, Soriano E, Schwegler H, Frotscher M (1991) Proliferation and differentiation of glial fibrillary acidic protein-immunoreactive glial cells in organotypic slice cultures of rat hippocampus. *Neuroscience* 43:335–347.
- 244 Frotscher M, Zafirov S, Heimrich B (1995) Development of identified neuronal types and of specific synaptic connections in slice cultures of rat hippocampus. *Progress in neurobiology* 45:vii–xxviii.
- 245 Hailer NP, Jarhult JD, Nitsch R (1996) Resting microglial cells in vitro: analysis of morphology and adhesion molecule expression in organotypic hippocampal slice cultures. *Glia* 18:319–331.
- 246 Gähwiler BH, Capogna M, Debanne D, McKinney RA, Thompson SM (1997) Organotypic slice cultures: a technique has come of age. *Trends in neurosciences* 20:471–477.
- 247 Holopainen IE (2005) Organotypic hippocampal slice cultures: a model system to study basic cellular and molecular mechanisms of neuronal cell death, neuroprotection, and synaptic plasticity. *Neurochemical research* 30:1521–1528.
- 248 Boscia F, Annunziato L, Tagliatela M (2006) Retigabine and flupirtine exert neuroprotective actions in organotypic hippocampal cultures. *Neuropharmacology* 51:283–294.
- 249 Riegelsberger U, Deten A, Pösel C, Zille M, Kranz A, Boltze J, Wagner D (2011) Intravenous human umbilical cord blood transplantation for stroke: impact on infarct volume and caspase-3-dependent cell death in spontaneously hypertensive rats. *Experimental neurology* 227:218–223.
- 250 Blasi E, Barluzzi R, Bocchini V, Mazzolla R, Bistoni F (1990) Immortalization of murine microglial cells by a v-raf/v-myc carrying retrovirus. *Journal of neuroimmunology* 27:229–237.
- 251 Laurenzi MA, Arcuri C, Rossi R, Marconi P, Bocchini V (2001) Effects of microenvironment on morphology and function of the microglial cell line BV-2. *Neurochemical research* 26:1209–1216.
- 252 Frederiksen K, Jat PS, Valtz N, Levy D, McKay R (1988) Immortalization of precursor cells from the mammalian CNS. *Neuron* 1:439–448.
- 253 Davis JB, Maher P (1994) Protein kinase C activation inhibits glutamate-induced cytotoxicity in a neuronal cell line. *Brain research* 652:169–173.
- 254 Hashimoto M, Sagara Y, Langford D, Everall IP, Mallory M, Everson A, Digicaylioglu M, Masliah E (2002) Fibroblast growth factor 1 regulates signaling via the glycogen synthase kinase-3beta pathway. Implications for neuroprotection. *The Journal of biological chemistry* 277:32985–32991.

- 255 van Leyen K, Siddiq A, Ratan RR, Lo EH (2005) Proteasome inhibition protects HT22 neuronal cells from oxidative glutamate toxicity. *Journal of neurochemistry* 92:824–830.
- 256 Lewerenz J, Albrecht P, Tien MT, Henke N, Karumbayaram S, Kornblum HI, Wiedau-Pazos M, Schubert D, Maher P, Methner A (2009) Induction of Nrf2 and xCT are involved in the action of the neuroprotective antibiotic ceftriaxone in vitro. *Journal of neurochemistry* 111:332–343.
- 257 Benz AH, Shajari M, Peruzki N, Dehghani F, Maronde E (2010) Early growth response-1 induction by fibroblast growth factor-1 via increase of mitogen-activated protein kinase and inhibition of protein kinase B in hippocampal neurons. *British journal of pharmacology* 160:1621–1630.
- 258 Ouyang Y, Chen Z, Tan M, Liu A, Chen M, Liu J, Pi R, Fang J (2013) Carvedilol, a third-generation β -blocker prevents oxidative stress-induced neuronal death and activates Nrf2/ARE pathway in HT22 cells. *Biochemical and biophysical research communications* 441:917–922.
- 259 Yu AC, Lee YL, Eng LF (1993) Astroglialosis in culture: I. The model and the effect of antisense oligonucleotides on glial fibrillary acidic protein synthesis. *Journal of neuroscience research* 34:295–303.
- 260 Mukhin AG, Ivanova SA, Allen JW, Faden AI (1998) Mechanical injury to neuronal/glia cultures in microplates: role of NMDA receptors and pH in secondary neuronal cell death. *Journal of neuroscience research* 51:748–758.
- 261 Környei Z, Czirók A, Vicssek T, Madarász E (2000) Proliferative and migratory responses of astrocytes to in vitro injury. *Journal of neuroscience research* 61:421–429.
- 262 Aronsson AC, Marmstål E, Mannervik B (1978) Glyoxalase I, a zinc metalloenzyme of mammals and yeast. *Biochemical and biophysical research communications* 81:1235–1240.
- 263 Dehghani F, Sayan M, Conrad A, Evers J, Ghadban C, Blaheta R, Korf H, Hailer NP (2010) Inhibition of microglial and astrocytic inflammatory responses by the immunosuppressant mycophenolate mofetil. *Neuropathology and applied neurobiology* 36:598–611.
- 264 Hess DT, Matsumoto A, Kim S, Marshall HE, Stamler JS (2005) Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nature reviews. Molecular cell biology* 6:150–166.
- 265 Ito G, Ariga H, Nakagawa Y, Iwatsubo T (2006) Roles of distinct cysteine residues in S-nitrosylation and dimerization of DJ-1. *Biochemical and biophysical research communications* 339:667–672.
- 266 Park JW, Piszczek G, Rhee SG, Chock PB (2011) Glutathionylation of peroxiredoxin I induces decamer to dimers dissociation with concomitant loss of chaperone activity. *Biochemistry* 50:3204–3210.
- 267 Toyoda Y, Erkt C, Pan-Montojo F, Boland S, Stewart MP, Müller DJ, Wurst W, Hyman AA, Kurzchalia TV (2014) Products of the Parkinson's disease-related glyoxalase DJ-1, D-lactate and glycolate, support mitochondrial membrane potential and neuronal survival. *Biology open* 3:777–784.
- 268 Mihoub M, Abdallah J, Gontero B, Dairou J, Richarme G (2015) The DJ-1 superfamily member Hsp31 repairs proteins from glycation by methylglyoxal and glyoxal. *Biochemical and biophysical research communications* 463:1305–1310.
- 269 Paige JS, Xu G, Stancevic B, Jaffrey SR (2008) Nitrosothiol reactivity profiling identifies S-nitrosylated proteins with unexpected stability. *Chemistry & biology* 15:1307–1316.
- 270 Selkoe DJ, Abraham C, Ihara Y (1982) Brain transglutaminase: in vitro crosslinking of human neurofilament proteins into insoluble polymers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 79:6070–6074.
- 271 Greenberg CS, Birckbichler PJ, Rice RH (1991) Transglutaminases: multifunctional cross-linking enzymes that stabilize tissues. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 5:3071–3077.
- 272 Ientile R, Caccamo D, Macaione V, Torre V, Macaione S (2002) NMDA-evoked excitotoxicity increases tissue transglutaminase in cerebellar granule cells. *Neuroscience* 115:723–729.
- 273 Lee D, Chang G (2014) Methylglyoxal in cells elicits a negative feedback loop entailing transglutaminase 2 and glyoxalase 1. *Redox biology* 2:196–205.
- 274 Mastrocola R, Nigro D, Cento AS, Chiazza F, Collino M, Aragno M (2016) High-fructose intake as risk factor for neurodegeneration: Key role for carboxy methyllysine accumulation in mice hippocampal neurons. *Neurobiology of disease* 89:65–75.
- 275 Almeida F, Santos-Silva D, Rodrigues T, Matafome P, Crisóstomo J, Sena C, Gonçalves L, Seica R (2013) Pyridoxamine reverts methylglyoxal-induced impairment of survival pathways during heart ischemia. *Cardiovascular therapeutics* 31:e79–85.
- 276 Unal-Cevik I, Kiling M, Gürsoy-Ozdemir Y, Gurer G, Dalkara T (2004) Loss of NeuN immunoreactivity after cerebral ischemia does not indicate neuronal cell loss: a cautionary note. *Brain research* 1015:169–174.
- 277 McPhail LT, McBride CB, McGraw J, Steeves JD, Tetzlaff W (2004) Axotomy abolishes NeuN expression in facial but not rubrospinal neurons. *Experimental neurology* 185:182–190.
- 278 Kuhla B, Boeck K, Lüth H, Schmidt A, Weigle B, Schmitz M, Ogunlade V, Münch G, Arendt T (2006) Age-dependent changes of glyoxalase I expression in human brain. *Neurobiology of aging* 27:815–822.
- 279 Zhang F, Li C, Wang R, Han D, Zhang Q, Zhou C, Yu H, Zhang G (2007) Activation of GABA receptors attenuates neuronal apoptosis through inhibiting the tyrosine phosphorylation of NR2A by Src after cerebral ischemia and reperfusion. *Neuroscience* 150:938–949.

- 280 Heimfarth L, Loureiro SO, Pierozan P, de Lima, Bárbara Ortiz, Reis KP, Torres EB, Pessoa-Pureur R (2013) Methylglyoxal-induced cytotoxicity in neonatal rat brain: a role for oxidative stress and MAP kinases. *Metabolic brain disease* 28:429–438.
- 281 Tóth AE, Walter FR, Bocsik A, Sántha P, Veszelka S, Nagy L, Puskás LG, Couraud P, Takata F, Dohgu S, Kataoka Y, Deli MA (2014) Edaravone protects against methylglyoxal-induced barrier damage in human brain endothelial cells. *PLoS one* 9:e100152.
- 282 Pekny M, Pekna M (2014) Astrocyte reactivity and reactive astrogliosis: costs and benefits. *Physiological reviews* 94:1077–1098.
- 283 Gillespie E (1979) Effects of S-lactoylglutathione and inhibitors of glyoxalase I on histamine release from human leukocytes. *Nature* 277:135–137.
- 284 Bhattacharyya N, Pal A, Patra S, Haldar AK, Roy S, Ray M (2008) Activation of macrophages and lymphocytes by methylglyoxal against tumor cells in the host. *International immunopharmacology* 8:1503–1512.
- 285 Pal A, Bhattacharya I, Bhattacharya K, Mandal C, Ray M (2009) Methylglyoxal induced activation of murine peritoneal macrophages and surface markers of T lymphocytes in sarcoma-180 bearing mice: involvement of MAP kinase, NF-kappa beta signal transduction pathway. *Molecular immunology* 46:2039–2044.
- 286 Calandra T, Roger T (2003) Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. *Nature reviews. Immunology* 3:791–800.
- 287 Wang J, Lin J, Schlotterer A, Wu L, Fleming T, Busch S, Dietrich N, Hammes H (2014) CD74 indicates microglial activation in experimental diabetic retinopathy and exogenous methylglyoxal mimics the response in normoglycemic retina. *Acta diabetologica* 51:813–821.
- 288 Flaris NA, Densmore TL, Molleston MC, Hickey WF (1993) Characterization of microglia and macrophages in the central nervous system of rats: definition of the differential expression of molecules using standard and novel monoclonal antibodies in normal CNS and in four models of parenchymal reaction. *Glia* 7:34–40.
- 289 Stoll G, Jander S (1999) The role of microglia and macrophages in the pathophysiology of the CNS. *Progress in neurobiology* 58:233–247.
- 290 van Zoelen, Marieke A D, Bakhtiari K, Dessing MC, van't Veer C, Spek CA, Tanck M, Meijers JC, van der Poll, Tom (2006) Ethyl pyruvate exerts combined anti-inflammatory and anticoagulant effects on human monocytic cells. *Thrombosis and haemostasis* 96:789–793.
- 291 Kim HS, Cho IH, Kim JE, Shin YJ, Jeon J, Kim Y, Yang YM, Lee K, Lee JW, Lee W, Ye S, Chung M (2008) Ethyl pyruvate has an anti-inflammatory effect by inhibiting ROS-dependent STAT signaling in activated microglia. *Free radical biology & medicine* 45:950–963.
- 292 Woo M, Park J, Choi I, Kim W, Kim H (2008) Inhibition of MMP-3 or -9 suppresses lipopolysaccharide-induced expression of proinflammatory cytokines and iNOS in microglia. *Journal of neurochemistry* 106:770–780.
- 293 Lee E, Kim H (2011) Inhibitory mechanism of MMP-9 gene expression by ethyl pyruvate in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglial cells. *Neuroscience letters* 493:38–43.
- 294 Stanisavljević S, Jevtić B, Djedović N, Miljković D (2015) Short term exposure to ethyl pyruvate has long term anti-inflammatory effects on microglial cells. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomédecine & pharmacothérapie* 72:11–16.
- 295 Fang P, Schachner M, Shen Y (2012) HMGB1 in development and diseases of the central nervous system. *Molecular neurobiology* 45:499–506.
- 296 Faraco G, Fossati S, Bianchi ME, Patrone M, Pedrazzi M, Sparatore B, Moroni F, Chiarugi A (2007) High mobility group box 1 protein is released by neural cells upon different stresses and worsens ischemic neurodegeneration in vitro and in vivo. *Journal of neurochemistry* 103:590–603.
- 297 Wang Q, Ding Q, Zhou Y, Gou X, Hou L, Chen S, Zhu Z, Xiong L (2009) Ethyl pyruvate attenuates spinal cord ischemic injury with a wide therapeutic window through inhibiting high-mobility group box 1 release in rabbits. *Anesthesiology* 110:1279–1286.
- 298 Shin J, Lee H, Lee H, Jin Y, Lee J (2014) Ethyl pyruvate inhibits HMGB1 phosphorylation and secretion in activated microglia and in the posts ischemic brain. *Neuroscience letters* 558:159–163.
- 299 Pedrazzi M, Patrone M, Passalacqua M, Ranzato E, Colamassaro D, Sparatore B, Pontremoli S, Melloni E (2007) Selective proinflammatory activation of astrocytes by high-mobility group box 1 protein signaling. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 179:8525–8532.
- 300 Qiu J, Nishimura M, Wang Y, Sims JR, Qiu S, Savitz SI, Salomone S, Moskowitz MA (2008) Early release of HMGB-1 from neurons after the onset of brain ischemia. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 28:927–938.
- 301 Gao H, Zhou H, Zhang F, Wilson BC, Kam W, Hong J (2011) HMGB1 acts on microglia Mac1 to mediate chronic neuroinflammation that drives progressive neurodegeneration. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31:1081–1092.
- 302 Li M, Sun L, Luo Y, Xie C, Pang Y, Li Y (2014) High-mobility group box 1 released from astrocytes promotes the proliferation of cultured neural stem/progenitor cells. *International journal of molecular medicine* 34:705–714.
- 303 Xue M, Rabbani N, Momiji H, Imbasi P, Anwar MM, Kitteringham N, Park BK, Souma T, Moriguchi T, Yamamoto M, Thornalley PJ (2012) Transcriptional control of glyoxalase 1 by Nrf2 provides a stress-responsive defence against dicarbonyl glycation. *The Biochemical journal* 443:213–222.

- 304 Kim S, Lee H, Shin J, Lee J (2013) Up-down regulation of HO-1 and iNOS gene expressions by ethyl pyruvate via recruiting p300 to Nrf2 and depriving it from p65. *Free radical biology & medicine* 65:468–476.
- 305 Shih AY, Johnson DA, Wong G, Kraft AD, Jiang L, Erb H, Johnson JA, Murphy TH (2003) Coordinate regulation of glutathione biosynthesis and release by Nrf2-expressing glia potently protects neurons from oxidative stress. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23:3394–3406.
- 306 Song M, Kellum JA, Kaldas H, Fink MP (2004) Evidence that glutathione depletion is a mechanism responsible for the anti-inflammatory effects of ethyl pyruvate in cultured lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 308:307–316.
- 307 Vilhardt F, Haslund-Vinding J, Jaquet V, McBean G (2016) Microglia antioxidant systems and redox signaling. *British journal of pharmacology*.
- 308 Kigerl KA, Ankeny DP, Garg SK, Wei P, Guan Z, Lai W, McTigue DM, Banerjee R, Popovich PG (2012) System x(c)⁻ regulates microglia and macrophage glutamate excitotoxicity in vivo. *Experimental neurology* 233:333–341.
- 309 Barger SW, Goodwin ME, Porter MM, Beggs ML (2007) Glutamate release from activated microglia requires the oxidative burst and lipid peroxidation. *Journal of neurochemistry* 101:1205–1213.
- 310 Mesci P, Zaïdi S, Lobsiger CS, Millecamps S, Escartin C, Seilhean D, Sato H, Mallat M, Boillée S (2015) System xC⁻ is a mediator of microglial function and its deletion slows symptoms in amyotrophic lateral sclerosis mice. *Brain : a journal of neurology* 138:53–68.
- 311 Huh SH, Chung YC, Piao Y, Jin MY, Son HJ, Yoon NS, Hong JY, Pak YK, Kim YS, Hong JK, Hwang O, Jin BK (2011) Ethyl pyruvate rescues nigrostriatal dopaminergic neurons by regulating glial activation in a mouse model of Parkinson's disease. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 187:960–969.
- 312 He M, Liu J, Cheng S, Xing Y, Suo WZ (2013) Differentiation renders susceptibility to excitotoxicity in HT22 neurons. *Neural regeneration research* 8:1297–1306.
- 313 Kim S, Jeong J, Kim HJ, Seo J, Han P, Yoon S, Lee J (2010) Combination treatment with ethyl pyruvate and aspirin enhances neuroprotection in the postischemic brain. *Neurotoxicity research* 17:39–49.
- 314 Dudek H, Datta SR, Franke TF, Birnbaum MJ, Yao R, Cooper GM, Segal RA, Kaplan DR, Greenberg ME (1997) Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. *Science (New York, N.Y.)* 275:661–665.
- 315 Hetman M, Cavanaugh JE, Kimelman D, Xia Z (2000) Role of glycogen synthase kinase-3β in neuronal apoptosis induced by trophic withdrawal. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 20:2567–2574.
- 316 Hoshi M, Takashima A, Noguchi K, Murayama M, Sato M, Kondo S, Saitoh Y, Ishiguro K, Hoshino T, Imahori K (1996) Regulation of mitochondrial pyruvate dehydrogenase activity by tau protein kinase I/glycogen synthase kinase 3β in brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93:2719–2723.
- 317 Shen H, Hu X, Liu C, Wang S, Zhang W, Gao H, Stetler RA, Gao Y, Chen J (2010) Ethyl pyruvate protects against hypoxic-ischemic brain injury via anti-cell death and anti-inflammatory mechanisms. *Neurobiology of disease* 37:711–722.
- 318 Shin J, Kim I, Kim S, Lee H, Jin Y, Park J, Kim T, Suh C, Kwak J, Lee K, Han P, Lee J (2014) Ethyl pyruvate inhibits HMGB1 phosphorylation and release by chelating calcium. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)* 20:649–657.
- 319 Kim S, Lee H, Kim H, Yoon S, Lee J (2016) Neuroprotective effect of ethyl pyruvate against Zn²⁺ toxicity via NAD replenishment and direct Zn²⁺ chelation. *Neuropharmacology* 105:411–419.
- 320 Endale M, Kim SD, Lee WM, Kim S, Suk K, Cho JY, Park HJ, Wagley Y, Kim S, Oh J, Rhee MH (2010) Ischemia induces regulator of G protein signaling 2 (RGS2) protein upregulation and enhances apoptosis in astrocytes. *American journal of physiology. Cell physiology* 298:C611-23.
- 321 Hansen F, de Souza, Daniela Fraga, Silveira, Simone da Luz, Hoefel AL, Fontoura JB, Tramontina AC, Bobermin LD, Leite MC, Perry, Marcos Luiz Santos, Gonçalves CA (2012) Methylglyoxal alters glucose metabolism and increases AGEs content in C6 glioma cells. *Metabolic brain disease* 27:531–539.
- 322 Yuan Y, Su Z, Pu Y, Liu X, Chen J, Zhu F, Zhu Y, Zhang H, He C (2012) Ethyl pyruvate promotes spinal cord repair by ameliorating the glial microenvironment. *British journal of pharmacology* 166:749–763.
- 323 Xie L, Poteet EC, Li W, Scott AE, Liu R, Wen Y, Ghorpade A, Simpkins JW, Yang S (2010) Modulation of polymorphonuclear neutrophil functions by astrocytes. *Journal of neuroinflammation* 7:53.
- 324 Chang CY, Song MJ, Jeon S, Yoon HJ, Lee DK, Kim I, Suk K, Choi D, Park EJ (2011) Dual functionality of myeloperoxidase in rotenone-exposed brain-resident immune cells. *The American journal of pathology* 179:964–979.
- 325 Davies MJ (2011) Myeloperoxidase-derived oxidation: mechanisms of biological damage and its prevention. *Journal of clinical biochemistry and nutrition* 48:8–19.
- 326 Shin J, Kim S, Jin Y, Kim I, Lee J (2012) Ethyl pyruvate-mediated Nrf2 activation and hemoxygenase 1 induction in astrocytes confer protective effects via autocrine and paracrine mechanisms. *Neurochemistry international* 61:89–99.
- 327 Forghani R, Kim HJ, Wojtkiewicz GR, Bure L, Wu Y, Hayase M, Wei Y, Zheng Y, Moskowitz MA, Chen JW (2015) Myeloperoxidase propagates damage and is a potential therapeutic target for subacute stroke. *Journal of*

cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism 35:485–493.

328 Chang CY, Choi D, Lee DK, Hong YJ, Park EJ (2013) Resveratrol confers protection against rotenone-induced neurotoxicity by modulating myeloperoxidase levels in glial cells. *PLoS one* 8:e60654.

329 Aeschlimann D, Thomazy V (2000) Protein crosslinking in assembly and remodelling of extracellular matrices: the role of transglutaminases. *Connective tissue research* 41:1–27.

330 Fesus L, Piacentini M (2002) Transglutaminase 2: an enigmatic enzyme with diverse functions. *Trends in biochemical sciences* 27:534–539.

331 Verderio, E A M, Johnson T, Griffin M (2004) Tissue transglutaminase in normal and abnormal wound healing: review article. *Amino acids* 26:387–404.

332 Telci D, Griffin M (2006) Tissue transglutaminase (TG2)--a wound response enzyme. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 11:867–882.

333 Ientile R, Currò M, Caccamo D (2015) Transglutaminase 2 and neuroinflammation. *Amino acids* 47:19–26.

334 Filiano AJ, Tucholski J, Dolan PJ, Colak G, Johnson, G V W (2010) Transglutaminase 2 protects against ischemic stroke. *Neurobiology of disease* 39:334–343.

335 Colak G, Johnson, Gail V W (2012) Complete transglutaminase 2 ablation results in reduced stroke volumes and astrocytes that exhibit increased survival in response to ischemia. *Neurobiology of disease* 45:1042–1050.

336 van Strien, Miriam E, Drukarch B, Bol JG, van der Valk, Paul, van Horssen J, Gerritsen WH, Breve JJ, van Dam A (2011) Appearance of tissue transglutaminase in astrocytes in multiple sclerosis lesions: a role in cell adhesion and migration? *Brain pathology (Zurich, Switzerland)* 21:44–54.

337 Takano K, Shiraiwa K, Moriyama M, Nakamura Y (2010) Transglutaminase 2 expression induced by lipopolysaccharide stimulation together with NO synthase induction in cultured astrocytes. *Neurochemistry international* 57:812–818.

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

(Direktorin: Prof. Dr. med. Heike Kielstein)

Thesen der Dissertation

**Zeitliche Veränderungen der Glyoxalase 1 nach akuter Gehirnschädigung und
die Rolle von Ethylpyruvat auf die astrozytäre Narbenbildung**

Dissertation

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Philipp Pieroh

geboren am 05.12.1988 in Leipzig

Thesen

1. Nach exzitotoxischer Schädigung kommt es zu einer Umverteilung zwischen Glyoxalase (Glo) 1 Monomer und Dimer, zu Gunsten des Glo1 Dimers.
2. In Folge der Exzitotoxizität kann eine Translokation der neuronalen Glo1 zur Zellmembran hin beobachtet werden
3. Die exzitotoxische Schädigung führt zu einer zeitlichen Erhöhung der Glo1 Immunreaktivität.
4. Im Modell des ischämischen Schlaganfalls kommt es zu zeitlichen Veränderungen der Glo1 Immunreaktivität
5. Nach ischämischen Schlaganfall zeigen verschiedene Zelltypen die stärkste Glo1 Immunreaktivität: Gefäßendothel (75 Minuten), Neurone (1-10 Tage) und Astrozyten (60 Tage)
6. Die Glo1 Immunreaktivität ist in der Mikrogliazelllinie BV2 vorhanden und wird weder durch die Zeit noch durch die Stimulation mit Lipopolysacchariden beeinflusst
7. Die BV2 Glo1 Immunreaktivität ist nicht durch die Behandlung mit Ethylpyruvat (EP) beeinflussbar.
8. Nur eine Subpopulation der HT22 Zellen besitzt eine Glo1 Immunreaktivität, welche durch die Zeit nicht beeinflusst wird
9. Die Glo1 Immunreaktivität wird durch die Behandlung mit EP in HT22 Zellen nicht verändert
10. EP verlangsamt die astrogläre Narbenbildung

Lebenslauf

Philipp Pieroh

Geburtsdatum: 05.12.1988

Geburtsort: Leipzig

▪ **Schulische und akademische Ausbildung:**

08.12.2014	Approbation als Arzt
2008 - 2014	Studium der Humanmedizin, Universität Leipzig
30.06.2007	Erhalt der Allgemeinen Hochschulreife
1999 - 2007	Besuch des Werner Heisenberg Gymnasiums in Leipzig
1995 - 1999	Besuch der Adam Friedrich Oeser Grundschule in Leipzig

▪ **Famulaturen und Praktisches Jahr:**

Praktisches Jahr

02.06.2014 - 25.07.2014	Klinik für Orthopädie, Unfallchirurgie und Plastische Chirurgie Universitätsklinikum Leipzig AöR; Direktor: Prof. Dr. med. Christoph Josten
06.04.2014 - 31.05.2014	Department of Orthopedics, Trauma Surgery Hadassah Medical Center, Ein Karem, Jerusalem, Israel; Chairman: Prof. Meir Liebergall Head of Trauma Surgery: Prof. Rami Mosheiff
10.02.2014 - 06.04.2014	Klinik für Innere Medizin/Kardiologie, Herzzentrum Leipzig - Universitätsklinik; Direktor: Prof. Dr. med. Gerhard Schuler
15.12.2013 - 07.02.2014	Klinik und Poliklinik für Gastroenterologie, Universitätsklinikum Leipzig AöR; Direktor: Prof. Dr. med. Joachim Mössner
26.08.2013 - 15.12.2014	Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie,

Universitätsklinikum Leipzig AöR;
Direktor: Prof. Dr. med. Udo X. Kaisers

Famulaturen

- 31.08.2012 - 01.10.2012 Abteilung für Orthopädie und Unfallchirurgie,
Evangelische Elisabeth Klinik in Berlin
Chefarzt: PD Dr. med. Stefan Klima
- 18.08.2011 - 18.09.2011 Klinik und Poliklinik für Unfall, Wiederherstellungs- und
Plastische Chirurgie
Universitätsklinikum Leipzig AöR;
Direktor: Prof. Dr. med. Christoph Josten
- 18.07.2011 - 17.08.2011 Zentrale Notaufnahme
Universitätsklinikum Leipzig AöR;
Direktor: Prof. Dr. med. Christoph Josten und Prof. Dr. med.
Joachim Mössner
- 14.03.2011 - 02.04.2011 Klinik und Poliklinik für Unfall, Wiederherstellungs- und
Plastische Chirurgie
Universitätsklinikum Leipzig AöR;
Direktor: Prof. Dr. med. Christoph Josten
- 21.02.2011 - 11.03.2011 Abteilung Innere Medizin II Gastroenterologie, Onkologie,
Palliativmedizin
St. Elisabeth-Krankenhaus Leipzig;
Chefarzt: Dr. med. Andreas von Aretin

▪ Studentische Nebentätigkeiten:

- 12/2011 - 12/2014 Studentische Hilfskraft der Klinik und Poliklinik für Unfall,
Wiederherstellungs- und Plastische Chirurgie,,
Universitätsklinikum Leipzig AöR
- Sommersemester 2011 Tutor im Kurs Makroskopische Anatomie, Institut für Anatomie,
Universität Leipzig

Sommersemester 2010 Tutor im Kurs Makroskopische Anatomie, Institut für Anatomie,
Universität Leipzig

04/2010 – 12/2011 Studentische Hilfskraft im Makroskopischen Forschungslabor
des Instituts für Anatomie, Universität Leipzig unter der Leitung
von PD Dr.rer.medic. Hanno Steinke

(Ort, Datum)

(Unterschrift)

Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Ich versichere, dass ich für die inhaltliche Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten (Promotionsberater oder anderer Personen) in Anspruch genommen habe. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die in Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Unterschrift

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zum Promotionsverfahren eingereicht. Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

Unterschrift

Danksagung

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Faramarz Dehghani danke ich herzlich für die Möglichkeit der Durchführung dieser Arbeit und die exzellente Betreuung während der kompletten Zeit meiner Doktorarbeit. Er hatte für jede noch so kleine Frage ein offenes Ohr und war zu jedem Zeitpunkt ansprechbar. Des Weiteren möchte ich ihm für seine Ratschläge beim Fortsetzen meiner wissenschaftlichen und beruflichen Laufbahn und die Möglichkeit der Vertiefung meiner wissenschaftlichen Tätigkeit sowie die unterhaltsamen nicht-wissenschaftlichen Diskussionen danken.

Besonderer Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. med. Gerd Birkenmeier, der die Promotion zu jeder Zeit mit wissenschaftlichen und nicht-wissenschaftlichen Diskussionen und methodischen Ratschlägen unterstützte und förderte.

Des Weiteren möchte ich mich bei Herrn Dr. med. Daniel- Christoph Wagner und Herrn Prof. Dr. med. Johannes Boltze bedanken, die durch die Durchführung der pMCAO Experimente und die Beratung bei deren Interpretation besonders zum Gelingen dieser Promotion beitrugen.

Ein besonderer Dank gebührt auch der ganzen Arbeitsgruppe für die jederzeitige Hilfestellung und exzellente Atmosphäre im Labor. Besonderer Dank gebührt hier Angela Ehrlich, Constanze Hobusch und Chalid Ghadban die sich die Zeit genommen haben mir jeden methodischen Kniff beizubringen und mir nach jedem misslungenen Experiment einen guten Tipp geben konnten. Auch Herrn PD. Dr. phil. nat. Marco Koch und Frau Dr. phil. nat. Urszula Grabiec möchte ich für zahlreiche Diskussionen und Hilfestellungen danken.

Danken möchte ich auch meinen Freunden und Kollegen die mich auf dem Weg zur Promotion mit vielen Ratschlägen, ihrer Unterstützung und den notwendigen Ablenkungen begleitet haben. Hier möchte ich PD Dr. rer. medic. Hanno Steinke besonders erwähnen, der mir die Grundzüge des wissenschaftlichen Arbeitens vermittelte und mein wissenschaftliches Arbeiten förderte.

Besonders möchte ich Frau Dr. med. Odette Soisson für ihr Verständnis und ihre langjährige Unterstützung danken. Sie hat mich stets motiviert, mir Rückhalt gegeben, und war die kritische Leserin, wodurch sich die Arbeit verbesserte.

Zuletzt möchte ich meiner Familie danken, im speziellen meiner Mutter Martina Pieroh, die immer ein offenes Ohr und Interesse für meine Arbeit hatte und ihr Vorankommen förderte.