

Aus der Klinik für Anästhesiologie
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Untersuchung der zeitabhängigen Expressionsregulation von Glutamat-Transportern
nach Schädel-Hirn-Trauma in der männlichen Maus

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Silas Max Katzenbach
aus Hamburg

Mainz, 2025

Nutzungsrecht: Namensnennung, keine Bearbeitungen (CC-BY-ND-4.0)

Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr. med. Philipp Drees

Tag der Promotion: 12.12.2025

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	IV
Tabellenverzeichnis.....	V
1. Einleitung.....	1
2. Literaturdiskussion.....	2
2.1 Das Gehirn des Menschen	2
2.1.1 Funktionelle Anatomie.....	2
2.1.1.1 <i>Aufbau des Cortex cerebri</i>	2
2.1.1.2 <i>Aufbau des Hippocampus</i>	3
2.1.1.3 <i>Aufbau des Corpus geniculatum laterale</i>	4
2.1.2 Zellphysiologische Grundlagen	5
2.1.2.1 <i>Einfluss von Astrozyten auf die chemische Signalübertragung</i>	6
2.1.3 Glutamatmetabolismus.....	7
2.1.4 Glutamattransporter	10
2.1.4.1 <i>Exzitatorische Aminosäuretransporter</i>	11
2.1.4.2 <i>Vesikuläre Aminosäuretransporter</i>	13
2.2 Das Schädel-Hirn-Trauma.....	15
2.2.1 Definition des Schädel-Hirn-Traumas.....	15
2.2.2 Epidemiologie des Schädel-Hirn-Traumas	17
2.2.3 Pathophysiologie des Schädel-Hirn-Traumas.....	18
2.2.3.1 <i>Primärer Schaden</i>	19
2.2.3.2 <i>Sekundärer Schaden</i>	20
2.2.4 Therapie und Outcome.....	23
2.2.5 Tiermodelle des Schädel-Hirn-Traumas	24
2.3 Glutamatabhängige Neurotoxizität	25
2.3.1 Exzitotoxizität nach SHT	25
2.3.2 Expression von Glutamattransportern nach Schädel-Hirn-Trauma	28
2.3.2.1 <i>Zeitabhängige Expression von EAATs nach Schädel-Hirn-Trauma</i>	28
2.3.2.2 <i>Zeitabhängige Expression von VGLUTs nach Schädel-Hirn-Trauma</i>	29
2.3.3 Glutamattransporter als therapeutische Targets.....	30
3. Material	32
3.1 Geräte	32
3.2 Chemikalien	33
3.3 Puffer und Lösungen.....	34
3.4 Pharmaka.....	34
3.5 Verbrauchsmaterialien.....	35

3.6	Kits.....	36
3.7	Antikörper.....	36
3.8	Primer	36
3.9	Software.....	37
4.	Methoden	38
4.1	Tierexperiment	38
4.1.1	Genehmigung des Tierversuchs.....	38
4.1.2	Studiendesign	38
4.1.3	Versuchstiere, Haltung und Pflege	39
4.2	Operatives Vorgehen	40
4.2.1	Präoperative Maßnahmen	40
4.2.2	Induktion des Schädel-Hirn-Traumas	40
4.2.3	Scheinoperation	41
4.3	Verhaltensbiologische Untersuchungen	41
4.3.1	Neuroscore	41
4.3.2	RotaRod-Test.....	42
4.3.3	Open-Field-Test	43
4.4	Tötung und Hirnentnahme	43
4.5	Histologie	44
4.5.1	Kryosektion	44
4.5.2	Kresylviolett-Färbung	45
4.5.3	Schadensanalyse.....	46
4.5.3.1	<i>Bestimmung des Läsionsvolumens.....</i>	46
4.5.3.2	<i>Bestimmung der Dicke der GCL</i>	47
4.6	Immunhistochemie	47
4.6.1	Immunhistochemische Färbung.....	47
4.6.2	Wahl der Bildausschnitte und Quantifizierung	48
4.7	Molekularbiologische Untersuchungen	49
4.7.1	Extraktion der Ribonukleinsäure.....	49
4.7.2	Synthese der komplementären Desoxyribonukleinsäure	51
4.7.3	Quantitative Real-time Polymerasekettenreaktion	51
4.8	Statistische Auswertung	53
5.	Ergebnisse	54
5.1	Körpergewicht	54
5.2	Verhaltensbiologische Untersuchungen	55
5.2.1	Neuroscore	55
5.2.2	RotaRod-Test.....	56
5.2.3	Open-Field-Test	56

5.3	Volumetrie und Schichtdickenanalyse	57
5.3.1	Volumetrie.....	57
5.3.2	Dicke der GCL.....	58
5.4	Immunhistochemie	59
5.4.1	GFAP	60
5.4.2	CD68.....	61
5.4.3	EAAT1.....	62
5.4.4	VGLUT2.....	63
5.5	Quantitative Polymerasekettenreaktion	64
5.5.1	EAAT1.....	64
5.5.2	EAAT2.....	65
5.5.3	EAAT3.....	66
5.5.4	EAAT4.....	67
5.5.5	VGLUT1	67
5.5.6	VGLUT2.....	68
5.5.7	VGLUT3.....	69
5.6	Korrelationsanalyse.....	69
5.6.1	mRNA-Expression mit LV und Dicke der GCL.....	70
5.6.2	mRNA-Expression von EAATs mit VGLUTs.....	71
6.	Diskussion.....	72
6.1	Methodendiskussion.....	72
6.2	Entwicklung des Körpergewichts nach CCI	72
6.3	Verhaltensbiologische Untersuchungen nach CCI.....	73
6.3.1	Neuroscore	73
6.3.2	RotaRod-Test.....	74
6.3.3	Open-Field-Test	74
6.4	Volumetrie und Schichtdickenanalyse nach CCI.....	75
6.4.1	Läsionsvolumen	75
6.4.2	Dicke der GCL.....	75
6.5	Expression von Glutamattransportern nach SHT.....	77
6.5.1	Expression von EAATs nach SHT	77
6.5.2	Expression von VGLUTs nach SHT	79
6.6	Limitation und Ausblick.....	80
7.	Zusammenfassung	83
8.	Literatur	85
9.	Danksagung	103

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
μ-	Mikro-
A	Ampere
Abb.	Abbildung
AMPA	<i>Alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoaxazolepropionic acid</i> – Aminomethylphosphonsäure
ANOVA	<i>Analysis of variance</i> – Varianzanalyse
ATP	Adenosintriphosphat
Aqua dest.	<i>Aqua destilata</i> - destilliertes Wasser
c-	Zenti-
ca.	Circa
cDNA	<i>Complementary deoxyribonucleic acid</i> – komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CA	<i>Cornu ammonis</i> – Ammonshorn
Ca ²⁺	Zweifach positiv geladenes Calcium-Ion
CBF	<i>Cerebral blood flow</i> – zerebraler Blutfluss
CCI	<i>Controlled Cortical Impact</i>
CGL	<i>Corpus geniculatum laterale</i>
CP	<i>Crossing point</i>
d	Day – Tag
DAI	<i>Diffuse axonal injury</i> – Diffuser axonaler Schaden
DAMPs	<i>Damage-associated molecular patterns</i> – Schaden-assoziierte molekulare Mediatoren
DG	<i>Dentate gyrus</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> – Desoxyribonukleinsäure
EAAT	<i>Excitatory amino acid transporter</i> – Exzitatorischer Aminosäuretransporter
EDB	Epiduralblutung
E/I-balance	<i>Excitatory-inhibitory-balance</i> – exzitatorisch-inhibitorisches Gleichgewicht
engl.	Englisch
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
GABA	<i>γ-aminobutyric acid</i> – γ-Aminobuttersäure
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GCL	<i>Granular cell layer</i> – Granularzellschicht
GCS	<i>Glasgow Coma Scale</i>
gDNA	<i>Genomic deoxyribonucleic acid</i> – genomische Desoxyribonukleinsäure

GFAP	<i>Glial fibrillary acidic protein</i> – saures Gliafaserprotein
Gln	Glutamin
Glu ⁻	Glutamat
h	<i>Hour</i> – Stunde
H ⁺	Einfach positiv geladenes Wasserstoff-Ion
HGNC	<i>HUGO Gene Nomenclature Comittee</i>
HP	<i>Hairpin</i> – Schleifenhelix
Hz	Herz
ICP	<i>Intracranial pressure</i> – intrakranieller Druck
K ⁺	Einfach positiv geladenes Kalium-Ion
K _m	Michaelis-Konstante
l	Liter
lat.	Lateinisch
LDN	LDN/OSU 0212320
LFPI	<i>Lateral Fluid Percussion Injury</i>
LPR	<i>Lactate-pyruvate-ratio</i> – Laktat-Pyruvat-Quotient
m-	Milli-
m	Meter
M	Molar
min	Minuten
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mRNA	<i>Messenger ribonuclein acid</i> – messenger Ribonukleinsäure
mROS	Mitochondriale ROS
n-	Nano-
Na ⁺	Einfach positiv geladenes Natrium-Ion
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
Neuroscore	<i>Neurological Deficit Score</i>
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
OD	Optische Dichte
p	Signifikanzniveau
PAPs	<i>Peripheral astrocyte processes</i> – Endfüßchen protoplasmatischer Astrozyten
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> – Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PKC	Proteinkinase C
PPIA	Peptidylprolyl Isomerase A
qPCR	<i>Quantitative real-time polymerase chain reaction</i> – quantitative Polymerasekettenreaktion
RFID	<i>Radio frequency identification</i>
RNA	<i>Ribonuclein acid</i> – Ribonukleinsäure

RNS	Reaktive Stickstoffspezies
ROI	<i>Region of interest</i> - Bereich von Interesse
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RPE-Puffer	<i>RNA purification and elution buffer</i> – RNA-Reinigungs- und Elutions-Puffer
RT	Raumtemperatur
RWT- Puffer	<i>Reagent wash transfer buffer</i> – Puffer zum Waschen von Reagenzien
s	Sekunde
SAB	Subarachnoidalblutung
SDB	Subduralblutung
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamid gel electrophoresis</i> – Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SHAM	Scheinoperation
SHT	Schädel-Hirn-Trauma
SLC	<i>Solute carrier</i> – Transporter für gelöste Stoffe
SNAT	<i>Sodium-dependent neutral amino acid transporter</i> – Natrium-abhängiger Transporter für neutrale Aminosäure
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TierSchG	Tierschutzgesetz
TM	Transmembrane Domäne
U	Umdrehung
V	Läsionsvolumen
v/v	Volumen pro Volumen
VGCC	<i>Voltage gated calcium channel</i> – spannungsabhängige Calcium-Kanäle
vgl.	Vergleiche
VGLUT	Vesikuläre Glutamattransporter
Vol.	Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
WDI	<i>Weight Drop Injury</i>
WHO	<i>World Health Organisation</i> – Weltgesundheitsorganisation
YLDs	<i>Years of life lived with disability</i> – mit Behinderung gelebte Lebensjahre

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Mikroskopischer Koronarschnitt durch den Hippocampus	4
Abbildung 2 Glutamatmetabolismus	8
Abbildung 3 Glutamat-Glutamin-Zyklus	10
Abbildung 4 Stöchiometrie exzitatorischer und vesikulärer Glutamattransporter	13
Abbildung 5 Glutamatabhängige Neurotoxizität	27
Abbildung 6 Übersicht über den zeitlichen Ablauf des Versuches.....	39
Abbildung 7 Versuchsaufbau – Open-Field-Test	43
Abbildung 8 Auswahl der Untersuchungsregion zur molekularbiologischen Analyse	45
Abbildung 9 Areale der volumetrischen Analyse	46
Abbildung 10 Abschnitte zur Dickemessung der GCL.....	47
Abbildung 11 Auswahl der Untersuchungsregionen zur immunhistochemischen Analyse	49
Abbildung 12 Reduktion des Körpergewichts nach CCI	54
Abbildung 13 Anstieg des Neuroscores nach CCI	55
Abbildung 14 Reduzierte Laufzeit nach CCI	56
Abbildung 15 Kein Einfluss auf die absolute Laufstrecke durch CCI	57
Abbildung 16 Läsionsvolumen und Hemisphärenvolumina im Zeitverlauf nach CCI	58
Abbildung 17 Reduktion der Dicke der GCL im Zeitverlauf nach CCI	59
Abbildung 18 Darstellung des ipsilateralen Bildausschnittes iCA3 GCL im Zeitverlauf.....	60
Abbildung 19 Immunhistochemie – GFAP-Expression im Zeitverlauf nach CCI.....	61
Abbildung 20 Immunhistochemie – CD68-Expression im Zeitverlauf nach CCI	62
Abbildung 21 Immunhistochemie – EAAT1-Expression im Zeitverlauf nach CCI	63
Abbildung 22 Immunhistochemie – VGLUT2-Expression im Zeitverlauf nach CCI.....	64
Abbildung 23 qPCR – EAAT1-Expression im Zeitverlauf nach CCI	65
Abbildung 24 qPCR – EAAT2-Expression im Zeitverlauf nach CCI	66
Abbildung 25 qPCR – EAAT3-Expression im Zeitverlauf nach CCI	66
Abbildung 26 qPCR – EAAT4-Expression im Zeitverlauf nach CCI	67
Abbildung 27 qPCR – VGLUT1-Expression im Zeitverlauf nach CCI.....	68
Abbildung 28 qPCR – VGLUT2-Expression im Zeitverlauf nach CCI.....	68
Abbildung 29 qPCR – VGLUT3-Expression im Zeitverlauf nach CCI.....	69

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Übersicht gängiger Abkürzungen der untersuchten Transportproteine	11
Tabelle 2 Bewertungskriterien der GCS.....	17
Tabelle 3 Material – Geräte	33
Tabelle 4 Material – Chemikalien.....	34
Tabelle 5 Material – Puffer und Lösungen	34
Tabelle 6 Material – Pharmaka.....	35
Tabelle 7 Material – Verbrauchsmaterialien.....	36
Tabelle 8 Material – Kits	36
Tabelle 9 Material – Antikörper.....	36
Tabelle 10 Material – Primer.....	37
Tabelle 11 Material – Software	37
Tabelle 12 Neuroscore	42
Tabelle 13 Korrelation – mRNA-Expression mit LV und Dicke der GCL.....	70
Tabelle 14 Korrelation – mRNA-Expression von EAATs mit VGLUTs.....	71

1. Einleitung

Das Schädel-Hirn-Trauma (SHT) stellt einen hochkomplexen pathologischen Zustand dar. Es ist die häufigste Todesursache unter jungen Erwachsenen weltweit. In Deutschland allein verstarben im Jahr 2021 6.391 Menschen nach SHT (1). Die Kosten für die medizinische Versorgung von Patienten beträgt jährlich circa (ca.) 2,8 Milliarden Euro (2). Die komplexen Vorgänge insbesondere des sekundären Hirnschadens als Folge der initialen Krafteinwirkung bieten auf der einen Seite potenziell multiple Ansatzpunkte zur therapeutischen Intervention. Auf der anderen Seite zeigt sich in der klinischen Praxis jedoch ein bis heute limitiertes therapeutisches Angebot. Dies liegt nicht zuletzt auch an der noch nicht vollständig erfassten Pathophysiologie.

Die durch ein posttraumatisch erhöhtes Level an extrazellulär vorliegendem Glutamat ausgelöste Exzitotoxizität stellt einen relevanten Aspekt dieses sekundären Hirnschadens dar (3). Dabei ist ungeklärt, welchen Einfluss eine veränderte Expressionsrate von Glutamattransportern nach SHT auf die Entstehung und Aufrechterhaltung der Exzitotoxizität hat. Die Modulation der Expression von Glutamattransportern könnte einen Ansatzpunkt zur therapeutischen Intervention darstellen. Hierzu durchgeführte Studien zeigten bereits zum Teil vielversprechende Ergebnisse (4–7). Allerdings ist die pathophysiologische Expressionsregulation von Glutamattransportern nach SHT noch nicht vollständig erfasst. Bisher durchgeführte tierexperimentelle Studien kamen hier zu stark abweichenden Ergebnissen (6, 8, 9). Dabei wäre ein genaueres Verständnis der Pathophysiologie relevant, um weitere Therapiekonzepte entwickeln zu können. Auch zeigt sich, dass die einzelnen Subtypen der Glutamattransporter bisher in ungleichem Umfang beforscht wurden. Das Ziel dieser Forschungsarbeit ist es daher, eine grundlegende Übersicht über die Expressionsraten verschiedener Glutamattransporter nach SHT zu liefern.

Dafür werden die Gehirne eines murinen Modellorganismus nach Applikation eines SHT mittels *Controlled Cortical Impact* (CCI) mit Überlebenszeiten von einem, drei und sieben Tagen (d) untersucht. Die methodische Vorgehensweise umfasst hierbei neben verhaltensbiologischen Untersuchungen die Anfertigung von Übersichts- und immunhistochemischen Gewebefärbungen sowie die Durchführung einer quantitativen real-time PCR.

2. Literaturdiskussion

2.1 Das Gehirn des Menschen

2.1.1 Funktionelle Anatomie

Das Gehirn ist zentraler Bestandteil des menschlichen Nervensystems und erfüllt eine Vielzahl lebensnotwendiger Funktionen. Zu diesen Aufgaben zählen die Verarbeitung und Integration sensorischer Eingaben, die Steuerung motorischer Ausgaben sowie die Regulation komplexer Prozesse wie kognitive, emotionale und homöostatische Funktionen. Die Grundlage dieser Funktionen bildet die koordinierte Aktivität verschiedener spezialisierter Hirnareale, die in einem hierarchisch organisierten Netzwerk zusammenarbeiten. Diese Hierarchie reicht von elementaren Reflexzentren im Rückenmark über Zwischenstrukturen wie dem Thalamus, bis hin zu hoch spezialisierten Bereichen der Großhirnrinde, die höhere kognitive Prozesse ermöglichen (10).

Im Rahmen dieser Forschungsarbeit wird die veränderte Expression spezifischer Glutamatransporter sowohl überregional als auch in klar definierten Hirnarealen untersucht. Dabei bedarf es grundlegender Kenntnisse über die zu untersuchenden Regionen und deren glutamaterge Signaltransduktion.

2.1.1.1 Aufbau des Cortex cerebri

Als Cortex cerebri wird die graue Substanz der Endhirnrinde bezeichnet. Diese hat eine Dicke von 2-5 Millimetern (mm) und ist im wesentlichen beteiligt an den höheren zerebralen Funktionen, intellektuellen und physischen Leistungen. Phylogenetisch lässt sich der Cortex in drei Anteile aufteilen: Der Paleocortex, als Teil der olfaktorischen Rinde, der Archicortex, der die Hippocampusformation bildet (siehe unten) und dem jüngsten Anteil, den Neocortex, welcher flächenmäßig den größten Anteil der Endhirnrinde bildet (10).

Der Neocortex wird auch als Isocortex bezeichnet, weil dieser strukturell einem zumeist gleichen histologischen Aufbau folgt. Die im Neocortex enthaltenen Neurone lassen sich aufgrund ihrer Morphologie und Funktion in zwei Gruppen unterteilen: Die Gruppe der efferenten glutamatergen Pyramidenzellen, welche mit langen Axonen Verbindungen zu anderen Cortexarealen oder subcortikalen Strukturen ausbilden und die Gruppe der überwiegend GABAergen Interneurone (auch Nicht-Pyramidenzellen), die der intrakortikalen Verschaltung dienen und deren Axone die Region nicht verlassen (10).

Der Neocortex lässt sich in sechs horizontale Schichten (Laminea) gliedern, die sich in ihrer zellulären Zusammensetzung unterscheiden. Von oberflächlicher weicher Hirnhaut (Pia mater) zur weißen Substanz: I. *Lamina molecularis*, eine faserreiche, zellarme Schicht, II. *Lamina granularis externa*, mit vielen kleinen Pyramiden- und Nicht-Pyramidenzellen, III. *Lamina pyramidalis externa* mit locker angeordneten Pyramidenzellen, IV. *Lamina granularis interna*,

mit kleinen dicht angeordnete Pyramiden und Nicht-Pyramidenzellen, V. *Lamina pyramidalis interna*, mit locker gepackten Pyramidenzellen verschiedener Größe und VI. *Lamina multiformis*, mit modifizierten Pyramidenzellen und einem zum Teil unscharfen Übergang zur weißen Substanz (11).

Der Motorcortex, genauer die primär-motorische Rinde des Motorcortex, ist ein funktioneller Bereich des *Cortex cerebri* und ist im *Gyrus praecentralis* lokalisiert (Areal 4 nach Brodmann).

Die Lamina IV des motorischen Rindenareals geht in dessen Entwicklung verloren, daher wird dieser auch als agranulärer Cortex bezeichnet. Zudem finden sich in Lamina V des Motorcortex die Betz-Riesenpyramidenzellen mit Perikarya bis zu 120 Mikro (μ -) m, deren Axone gemeinsam mit weiteren Pyramidenzellen die Pyramidenbahnen bilden (12).

Der *Gyrus praecentralis* ist entscheidend an der Entstehung und Ausführung der Willkürmotorik beteiligt. Daher wird dieser Teil der Hirnrinde auch als primär somatomotorischer Cortex bezeichnet. Der *Gyrus praecentralis* enthält afferente Informationen sowohl von subkortikalen Strukturen, als auch von anderen Cortexarealen. Vom *Gyrus praecentralis* ziehen Projektionsfasern zu bi- und kontralateralen Hirnnervenkernen (*Tractus corticonuclearis*) und zu Motoneuronen auf Rückenmarksebene (*Tractus corticospinalis*). Die Fasern des *Tractus corticospinalis* werden auch als Pyramidenbahnen bezeichnet. Der Großteil, 70-90 Prozent (%), dieser Fasern kreuzen auf Höhe der Medulla oblongata und innervieren dann Motoneurone im kontralateralen Rückenmark. Der *Gyrus praecentralis* steuert folglich zum größten Teil die Willkürmotorik der jeweils kontralateralen Körperhälften (12).

Dabei gilt: Eine Schädigung der Pyramidenbahn kranial der Pyramidenkreuzung geht überwiegend mit dem klinischen Bild einer Parese auf der kontralateralen Körperhälfte einher. Eine Schädigung kaudal der Pyramidenkreuzung zeigt ein entsprechendes klinisches Korrelat der ipsilateralen Körperhälfte (10).

2.1.1.2 Aufbau des Hippocampus

Der Hippocampus ist eine evolutionär ältere Struktur des Gehirns. Im Unterschied zum Neocortex weist der Hippocampus einen dreischichtigen Aufbau auf. Dabei zeigen sich ausgeprägte Unterschiede in der strukturellen und funktionellen Komplexität zwischen verschiedenen Spezies. Funktionell ist der Hippocampus Teil des limbischen Systems. Ihm kommt eine zentrale Rolle bei der Konsolidierung von Gedächtnisleistungen, der Verarbeitung von Kontextinformationen sowie der stressbedingten emotionalen Regulation zu. Anatomisch lässt dieser sich in drei Hauptregionen unterteilen:

Der Gyrus dentatus (englisch (engl.) *Dentate gyrus*; DG) stellt räumlich die innerste Region des Hippocampus dar. In seinem strukturellen Aufbau folgt auf die äußerlich gelegene

Molekularschicht die Granularzellschicht (engl. *Granular cell layer*, GCL) und die den Hilus bildende polymorphe Schicht. Granularzellen ersetzen hier die Archicortex typischen Pyramidenzellen. Sie bilden den überwiegenden Anteil an Zellen des DG und sind exzitatorisch glutamaterge Neuronen, die sich mit ihren kleinen, eng aneinander liegenden Perikarya in der namensgebenden GCL befinden. Das Ammonshorn (lateinisch (lat.) *Cornu ammonis*; CA) liegt dem DG von außen an. Es folgt wiederum einem dem Archicortex-typischen Aufbau mit (von außen) *Stratum oriens*, *Stratum pyramidale* und *Stratum moleculare*. Räumlich lässt es sich in die Unterfelder CA1-CA4 unterteilen (vergleiche (vgl.) Abbildung (Abb.) 1). Als Zelltypen enthält das CA überwiegend Pyramidenzellen, welche exzitatorische, glutamaterge Neuronen darstellen. Dem Hippocampus aufgelegt stellt das Subiculum formal bereits einen Teil des sechsschichtigen entorhinalen Cortex des parahippocampalen Gyrus dar (12).

Der DG übernimmt funktionell die Aufgabe der Lamina IV des Neocortex und empfängt Afferenzen des entorhinalen Cortex. Dessen Granularzellen bilden mit ihren Axonen, auch Moosfasern genannt, Synapsen mit den apikalen Dendriten der CA3-Pyramidenzellen, die wiederum Kollaterale (Schaffer-Kollaterale) mit den Pyramidenzellen der CA1-Region ausbilden. Über das Subiculum wird der Schaltkreis dann mit Efferenzen zum entorhinalen Cortex geschlossen (12). Aufgrund der im Hippocampus beteiligten und miteinander kommunizierenden Neuronen wird diese anatomische Anordnung auch trisynaptischer Schaltkreis genannt.

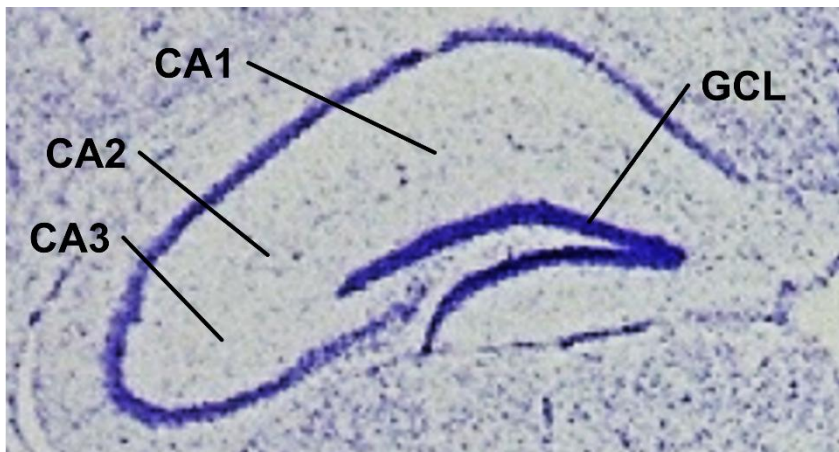


Abbildung 1 Mikroskopischer Koronarschnitt durch den Hippocampus

DG mit polymorpher Schicht (Hilus), prominent angefärbter GCL, und äußerer Molekularzellschicht. CA mit Stratum moleculare, Stratum pyramidale (hier prominent angefärbt) und Stratum oriens, eingezeichnet ist die Einteilung des CA in die Felder CA1-CA3, (CA4 nicht dargestellt), koronare Ebene, murines Gehirn; Kresylviolett-Färbung

2.1.1.3 Aufbau des *Corpus geniculatum laterale*

Das *Corpus geniculatum laterale* (CGL) stellt ein Kerngebiet des Thalamus dar. Der Thalamus ist eine Ansammlung von Kerngebieten der grauen Substanz des Diencephalons, dessen wesentliche Aufgabe in der Übertragung und Integration überwiegend sensibler und

sensorischer Informationen der Peripherie zu übergeordneten Cortexarealen besteht. Die Verschaltung zum Cortex ist dabei reziprok aufgebaut.

Das CGL bildet gemeinsam mit dem *Corpus geniculatum mediale* den Metathalamus. Das CGL ist funktionell Teil der Sehbahn und bildet hier das primär optische Zentrum. Die über den Tractus opticus kommenden Afferenzen der Retina werden hier erstmalig verschaltet und dann über die *Radiatia optica* zum visuellen Cortex im Okzipitallappen weitergeleitet (Areal 17, V1 nach Brodmann) (12). Die Verschaltung erfolgt über glutamaterge Synapsen (13). Das CGL erhält zusätzlich Afferenzen aus verschiedenen weiteren Hirnarealen, etwa reziprok aus dem visuellen Cortex, Axone mehrerer Thalamuskern, sowie Interneurone aus dem CGL selbst. Diese können einen exzitatorischen, inhibitorischen oder modulatorischen Charakter aufweisen und überwiegen quantitativ die Faserverbindungen des Tractus opticus (14).

Histologisch folgt das CGL einem sechsschichtigen Aufbau. Dabei folgen auf zwei ventrale magnozellulären Schichten vier dorsale parvozelluläre Schichten. Die von der ipsi- und kontralateralen Retina kommenden Axone werden dabei nicht überschneidend in jeweils eigenen Schichten verschaltet (15).

2.1.2 Zellphysiologische Grundlagen

Im Rahmen dieser Forschungsarbeit werden Expressionsraten von Glutamattransportern untersucht, deren Regulation auf intra- und interzellulären Steuerungsmechanismen basieren. Dabei sind neben Neuronen auch Gliazellen, insbesondere Mikroglia und Astrozyten, an deren Regulation nach SHT beteiligt (5, 16).

Mikrogliazellen sind Zellen mesodermalen Ursprungs und immigrieren in das ZNS-Parenchym etwa in der 4. bis 6. Gestationswoche. Hier sind die langlebigen Zellen in der Lage, ihre Population konstant zu halten und sich unabhängig von Knochenmarkszellen selbst zu erneuern (17). Mikrogliazellen besitzen eine Vielzahl an Oberflächenrezeptoren, um mögliche Veränderungen in ihrem Umfeld zu detektieren (18). Die Zellkörper verharren dabei meist an einer Position, während sich die Zellfortsätze konstant durch das Hirnparenchym bewegen (19).

Erkennen Zellen der Mikroglia körperfremdes oder abgestorbenes Material, sind sie in der Lage dieses zu phagozytieren. Darüber hinaus schütten Mikrogliazellen lösliche Faktoren, wie beispielsweise Zytokine, aus und tragen damit zusätzlich zur Immunabwehr und Regeneration von verletztem Gewebe bei (20, 21).

Im Unterschied zu Neuronen, die hinsichtlich ihrer Neuroanatomie und Genexpression ausdifferenziert sind, verbleiben Zellen der Mikroglia in einem dynamischen Zustand und sind in der Lage, sich entsprechend ihrer Anforderungen zu adaptieren. Mikroglia stellt damit eine sehr heterogene und plastische Population an Zellen dar (22, 23). Der Zustand der Mikroglia

wird sowohl durch genetische Determinanten als auch ihr spezifisches Umfeld bestimmt, was mit einer dynamischen phänotypischen und funktionalen Veränderung der einzelnen Zelle einhergeht (24).

CD68 ist ein in Zellen der Mikroglia (überwiegend intrazellulär in Lysosomen und Endosomen) lokalisiertes Protein. Es wird häufig als Markerprotein für neuroinflammatorische Prozesse im ZNS verwendet. CD68-positive Zellen – neben Mikroglia auch beispielsweise Makrophagen – können nach SHT immunhistochemisch nachgewiesen werden (25).

2.1.2.1 Einfluss von Astrozyten auf die chemische Signalübertragung

Astrozyten übernehmen verschiedenen Funktionen im ZNS. Es gibt diverse Subtypen, die sich in ihrem Aufbau nach Hirnregion und Funktion unterscheiden (26). Astrozyten verfügen über eine Vielzahl an Ionenkanälen und Transportern, von denen ein Teil im Rahmen dieser Arbeit untersucht und mit den zugehörigen Funktionsprinzipien vorgestellt wird.

Bereits in der Embryonalphase der Gehirnentwicklung beeinflussen Astrozyten die Bildung und Migration von Nervenzellen. Im adulten Organismus sorgen Astrozyten für die Aufrechterhaltung der ZNS-Homöostase, haben eine mechanische Stützfunktion des Gewebes inne und sind beteiligt an der synaptischen Signalübertragung (26–28). Astrozyten tragen zudem zur Immunabwehr bei (29).

Astrozyten bilden eine heterogene Gruppe von Zellen, welche vereinfacht anhand zellmorphologischer Eigenschaften und ihrer Lokalisation im ZNS unterschieden werden können. Fibrilläre Astrozyten befinden sich überwiegend in der weißen Substanz, bilden längere Ausläufer und interagieren durch diese mit den Ranvierschen Schnürringen. Protoplasmatische Astrozyten hingegen finden sich überwiegend in der grauen Substanz, bilden kürzere, verzweigte Ausläufer und interagieren mit Synapsen und Blutgefäßen. An der Grenzschicht zwischen weißer und grauer Substanz finden sich als Mischform plasmato-fibrilläre Astrozyten (11).

Das saure Gliafaserprotein (engl. *Glial fibrillary acidic protein*; GFAP) ist ein Astrozyten-spezifisches Intermediärfilament. Als solches trägt es zur Stabilität und Mobilität der Zelle bei, ferner spielt es eine wichtige Rolle bei der Mitose. GFAP ist ebenfalls entscheidend an der membranösen Verankerung des zu untersuchenden Transmembranproteins Exzitatorischer Aminosäuretransporter (engl. *Excitatory amino acid transporter*; EAAT) 1 beteiligt (30). Aufgrund des Astrozyten-spezifischen Vorkommens wird GFAP auch als Zielstruktur für den Nachweis von Astrozyten in der Immunhistochemie verwendet (31).

Astrozyten bilden diverse sternenförmige Ausläufer, über diese sind sie sowohl untereinander als auch mit umliegenden Oligodendrozyten durch Transmembranproteine verbunden und bilden so ein funktionelles Synzytium (32). Dieses dichte Netz an Astrozytenfortsätzen füllt die

Lücken zwischen den verschiedenen Kompartimenten der Neurone suffizient aus, so dass der Extrazellulärraum zwischen den einzelnen Zellen besonders schmal gehalten wird und meist nur 40-60 Nanometer (nm) beträgt (11).

Die Endfüßchen protoplasmatischer Astrozyten (engl. *Peripheral astrocyte processes*; PAPs) befinden sich in direkter räumlicher Nähe zum synaptischen Spalt. Die Funktion der PAPs liegt in der Detektion und Modellierung synaptischer Aktivität, der Aufrechterhaltung der synaptischen Homöostase und Ausschüttung eigener Botenstoffe zur Kommunikation mit Neuronen (Gliotransmittern) (33, 34). Dabei kann ein Astrozyt über seine Ausläufer mit bis zu 2 Millionen Synapsen interagieren (35). Eine zentrale Aufgabe der Astrozyten ist die schnelle Aufnahme von Neurotransmittern aus dem synaptischen Spalt, um eine dortige Akkumulation und das „Überschwappen“ (engl.: *Spill Over*) von Neurotransmittern auf benachbarte Synapsen zu verhindern (36).

Wie in den folgenden Abschnitten im Detail näher ausgeführt, erfolgt die astrozytäre Aufnahme von Glutamat durch leistungsstarke Glutamatttransporter. Die erneute Bereitstellung des Neurotransmitters erfolgt anschließend durch die temporäre Umwandlung von Glutamat in Glutamin. Ein geringerer Anteil des aufgenommenen Transmitters wird dabei vom Astrozyten selbst metabolisch verstoffwechselt (37).

Um die Aktivität der Synapse zu detektieren, exprimieren Astrozyten Rezeptoren der jeweiligen Neurotransmitter (38, 39). Ein geringer Teil dieser Rezeptoren ist ionotrop und führt bei Aktivierung zu einem direkten Einstrom von zweifach positiven Calcium-Ionen (Ca^{2+}). In der Mehrzahl verfügen PAPs jedoch über metabotrope G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (40). Diese stimulieren bei Aktivierung die Phospholipase C, die über weitere Signalwege die Ausschüttung von Ca^{2+} aus intrazellulären Depots – überwiegend dem endoplasmatischen Retikulum – bewirkt (41, 42). Die Erregbarkeit von Astrozyten folgt demnach einer räumlichen und zeitlichen Veränderung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration (43). Diese astroglialen Ca^{2+} -Signale können sich auf quervernetzte Astrozyten erstrecken und hier wiederum diverse Signalkaskaden auslösen, was auch als Calcium-Signalgebung bezeichnet wird (32).

An Grenzbereichen zu nicht-neuronalem Gewebe, wie der Oberfläche des ZNS oder Endothelzellen von Blutgefäßen, bilden Astrozytenausläufer einen Randsaum, der sich lichtmikroskopisch als Pseudomembran darstellt und daher auch als *Membrana limitans glialis superficialis (perivascularis)* bezeichnet wird (11).

2.1.3 Glutamatmetabolismus

L-Glutamate sind die Salze der proteinogenen L-Glutaminsäure (44). Da im Säugetierstoffwechsel ausschließlich das L-Enantiomer vorkommt, wird im Folgenden auf die Verwendung des Präfixes verzichtet. Glutamat hat eine Molekülmasse von 147 Dalton (Da).

Der isoelektrische Punkt liegt bei einem pH-Wert von 3,22. Während eines physiologischen pH-Werts von 7,4 liegt Glutamat daher in seiner Zwitterionenstruktur einfach negativ geladen vor (44). Glutamat kann durch einfache, enzymvermittelte Reaktionen in die Zwischenprodukte diverser Stoffwechselprozesse überführt werden (vgl. Abb. 2). Beispielsweise kann Glutamat durch Aminotransferasen oder Glutamat-Dehydrogenase katalysierte Reaktionen in das Zwischenprodukt des Citratzyklus α -Ketoglutarat umgewandelt werden. Der Glutamatmetabolismus steht damit in unmittelbarem Zusammenhang mit dem zerebralen Energiehaushalt. Ferner entsteht durch eine Decarboxylierung von Glutamat der inhibitorisch wirksamen Neurotransmitter γ -Aminobuttersäure (engl. *γ -aminobutyric acid*; GABA) (45). Durch eine Aminierung wiederum entsteht die proteinogene Aminosäure Glutamin (46).

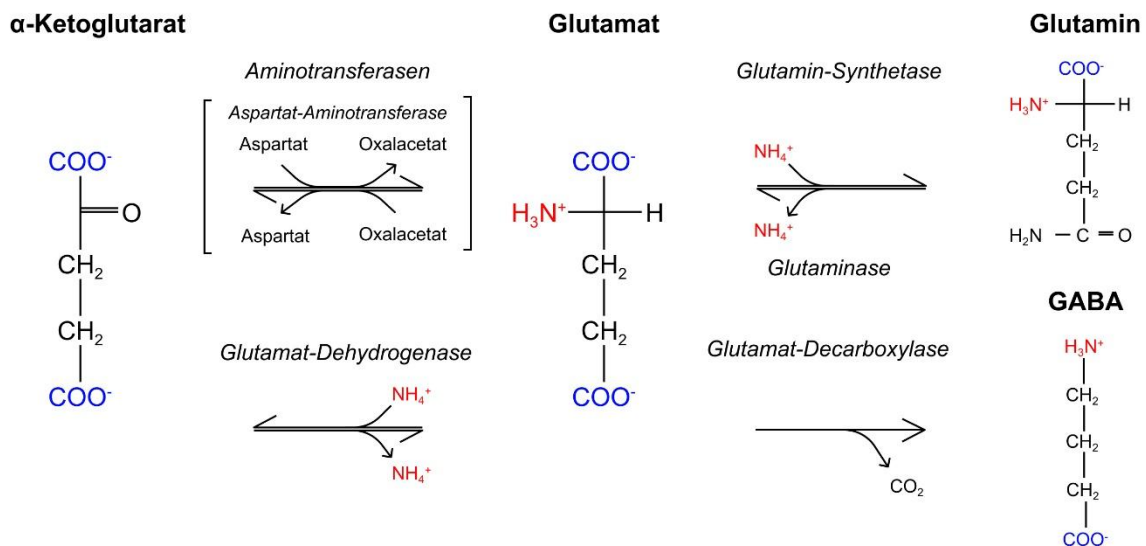


Abbildung 2 Glutamatmetabolismus

Glutamat kann sowohl durch die Glutamat-Dehydrogenase als auch verschiedene Aminotransferasen in α -Ketoglutarat überführt werden (hier beispielhaft gezeigt an der Aspartat-Aminotransferase). Mittels Glutamin-Synthetase kann Glutamat in die Aminosäure Glutamin überführt werden, die Rückreaktion katalysiert das Enzym Phosphat-aktivierte Glutaminase (hier nur Glutaminase). Zudem ist Glutamat die Vorstufe des inhibitorisch wirksamen Neurotransmitters γ -Aminobuttersäure (GABA), welcher im Organismus ausschließlich über das Enzym Glutamat-Dehydrogenase synthetisiert werden kann.

Im ZNS ist Glutamat der bedeutendste exzitatorische Neurotransmitter (45, 47–50). Glutamat fungiert als Botenstoff in etwa 90 % der Synapsen (51). Die glutamaterge Signaltransduktion ist allein für circa 80 % des zerebralen Energieverbrauchs verantwortlich (52, 53).

Im Zytosol des Neurons beträgt die Konzentration von Glutamat 5-10 Millimolar (mM) (48). Da die Zelle im Rahmen der Neurotransmission wiederholend Glutamat ausschüttet, zählt die suffiziente Bereitstellung des Transmitters zu deren elementaren Aufgaben. Glutamaterge Neurone sind in der Lage, Glutamat durch die oben beschriebenen Reaktionen zu synthetisieren (54). Für den hohen Bedarf an Neurotransmittern reicht dies allein jedoch nicht aus (37). Die Konstanthaltung der intrazellulären Glutamatkonzentration wird stattdessen

überwiegend durch dessen astrozytäre Wiederaufnahme nach Exozytose mit temporärer Umwandlung in Glutamin gewährleistet (vgl. Abb. 3). Dieser Prozess wird auch als Glutamat-Glutamin-Zyklus bezeichnet (37, 46, 55).

Die extrazelluläre Glutamatkonzentration wird über leistungsfähige EAATs reguliert (49). Sie muss dabei für eine funktionierende Signaltransduktion in Ruhe unter 20 μM gehalten werden, nach synaptischer Freisetzung kann diese dann auf bis zu 30 μM ansteigen (56). Die zelluläre Aufnahme durch EAATs erfolgt thermodynamisch gekoppelt an das Membranpotential verschiedener Kationen (57). Insbesondere die Transporter EAAT1 und EAAT2 werden in hoher Konzentration in den PAPs der Astrozyten synthetisiert (58). EAAT2 liegt in geringerer Konzentration auch in der Membran des präsynaptischen Neurons vor, der überwiegende Teil der Glutamataufnahme erfolgt jedoch astrozytär (48, 59).

Glutamat wird in den Astrozyten zu ungefähr 80 % in Glutamin umgewandelt (60). Diese Adenosintriphosphat- (ATP-) abhängige Aminierung wird durch die Astrozyten-spezifische Glutamin-Synthetase vermittelt (61).

Der extrazelluläre Transfer aus den Astrozyten mit anschließender neuronaler Aufnahme erfolgt durch verschiedene Isoformen von Natrium-abhängigen Transportern für neutrale Aminosäuren (engl. *sodium-dependent neutral amino acid transporter*, SNAT) (37). Im Neuron erfolgt dann die entsprechende Rückreaktion: Durch eine hydrolytische Desaminierung von Glutamin, enzymatisch katalysiert durch die Phosphat-aktivierte Glutaminase, entsteht durch Abspaltung von NH_4^+ erneut Glutamat (62). Es gilt, dass der Glutamat-Glutamin-Zyklus nicht stöchiometrisch geordnet abläuft, da Glutamat sowohl astrozytär als auch neuronal mit Enzymen des Citratzyklus interagiert (37, 63). Zudem verfügen die präsynaptischen Vesikel über Enzyme, um die Reaktion von α -Ketoglutarat und Aspartat zu Glutamat und Oxalacetat zu katalysieren (54). Neu synthetisiertes Glutamat wird durch vesikuläre Glutamattransporter (VGLUT) in den Vesikel transportiert (47). Durch die räumliche Trennung des Vesikels vom Intrazellulärraum fungiert das abgekapselte Glutamat von seiner metabolischen Funktion entkoppelt ausschließlich als Neurotransmitter (37). Intravesikal kann die Glutamatakonzentration auf bis zu 60 mM ansteigen (64). Bei einer Depolarisierung kommt es zur Verschmelzung des Vesikels mit der präsynaptischen Plasmamembran und der Glutamat-Glutamin-Zyklus beginnt von Neuem (37).

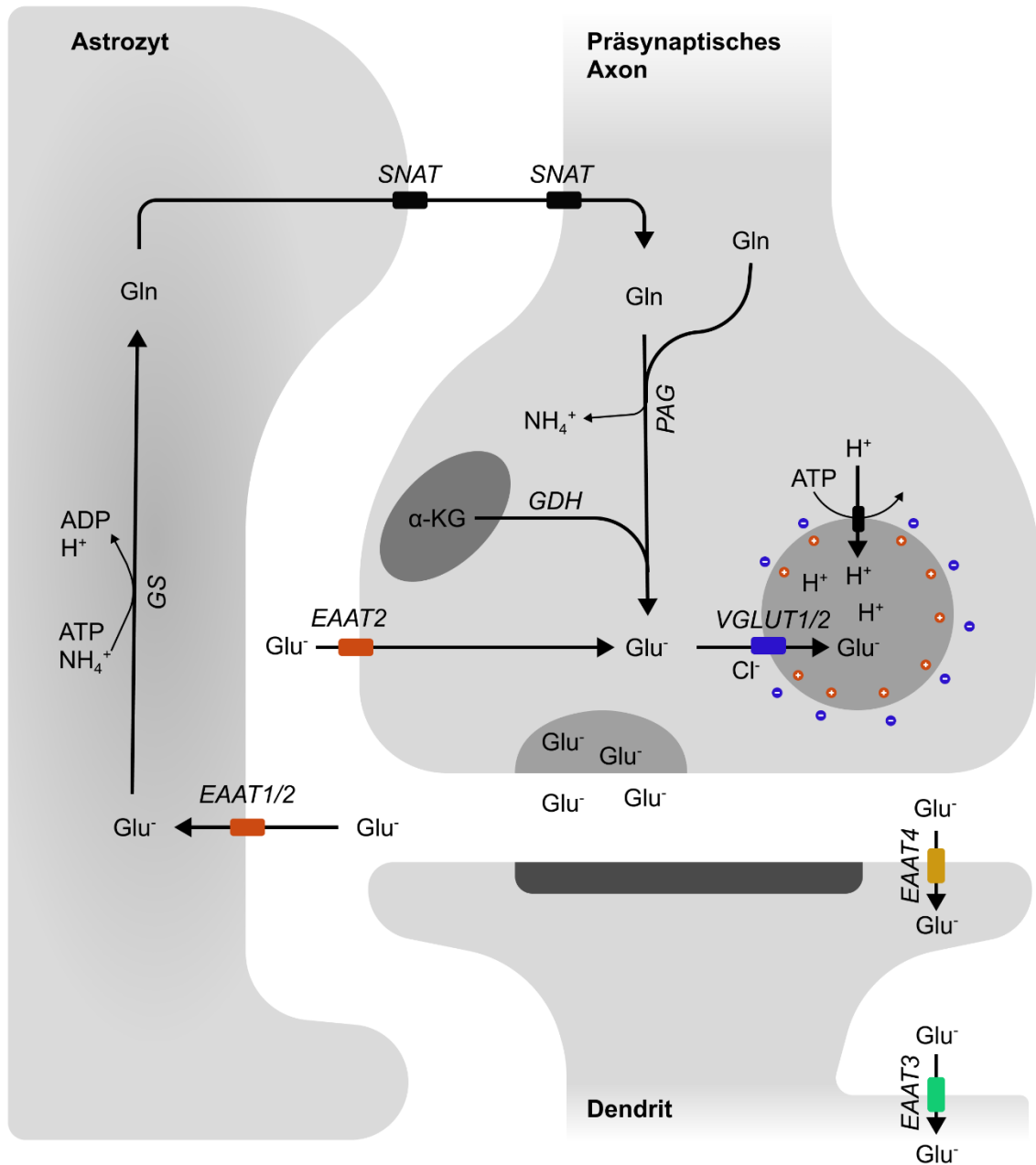


Abbildung 3 Glutamat-Glutamin-Zyklus

Dargestellt ist der Glutamat-Glutamin-Zyklus, im Rahmen dessen extrazelluläres Glutamat (Glu^-) durch die Transporter EAAT1 und EAAT2 in perisynaptische Zellen, überwiegend Astrozyten aufgenommen und mittels Glutamin-Synthetase (GS) unter ATP-Verbrauch in Glutamin (Gln) umgewandelt wird. Dieses gelangt über Glutamintransporter (SNAT) in die präsynaptische Zelle und kann hier mittels Glutaminase wieder in Glutamat umgewandelt werden. Zusätzlich kann Glutamat mittels Glutamatdehydrogenase (GDH) aus alpha-Ketoglutarat ($\alpha\text{-KG}$) synthetisiert werden. Durch die Transporter VGLUT1 und VGLUT2 vermittelt erfolgt der intravesikale Transport. Der Transmitter steht damit für die erneute Signaltransduktion bereit. Die Transporter EAAT3 und EAAT4 befinden sich in der Membran des postsynaptischen Dendriten.

2.1.4 Glutamattransporter

Glutamat muss als exzitatorischer Botenstoff die Zellmembran regelmäßig überwinden. Für diesen Transport stehen dem Neurotransmitter eine Vielzahl an Carrierproteinen – integrale Membranproteine, welche den Transport gelöster Substrate bewerkstelligen – zur Verfügung. Der genetische Ursprung dieser Transportproteine wird nach dem *HUGO Gene Nomenclature*

Comittee (HGNC) in verschiedene Superfamilien eingeteilt. Glutamattransporter gehören hier zur Familie der Transporter für gelöste Stoffe (engl. *Solute Carrier*, SLC) (65, 66). Neben der HGNC-Nomenklatur hat sich auch die Bezeichnung der Transporter nach ihrer Funktion – exzitatorische Aminosäuren Transporter (EAAT) bzw. vesikuläre Glutamattransporter (VGLUT) – etabliert. Im Rahmen der Forschungsarbeit wird das homologe Nagetierprotein untersucht. Zur besseren Übersicht wird dabei dennoch fortlaufend die Bezeichnung nach funktioneller Einteilung gewählt. Diese wird ebenfalls für die messenger-Ribonukleinsäure (engl. *Messenger ribonuclein acid*, mRNA) des zu kodierenden Proteins verwendet (vgl. Tabelle (Tab.) 1).

Funktionelle Einteilung	HGNC Nomenklatur (66)	Homologes Nagetier Protein	Weitere		
EAAT1	SLC1A3	GLAST	GLAST1	EA6	
EAAT2	SLC1A2	GLT1	HBGT	DEE41	EIEE41
EAAT3	SLC1A1	EAAC1	DCBXA	SCZD18	hEAAC1
EAAT4	SLC1A6	EAAT4			
<i>EAAT5</i>	<i>SLC1A7</i>	<i>EAAT5</i>	<i>AAAT</i>		
VGLUT1	SLC17A7	VGLUT1	BNPI		
VGLUT2	SLC17A6	VGLUT2	DNPI		
VGLUT3	SLC17A8	VGLUT3	DFNA25		

Tabelle 1 Übersicht gängiger Abkürzungen der untersuchten Transportproteine

Aufgelistet sind gängige Bezeichnungen der untersuchten Transportproteine. Die HGNC Nomenklatur bezieht sich dabei auf das für den Transporter kodierende Gen; EAAT5 ist der Vollständigkeit halber mit aufgelistet, wird im Rahmen der Forschungsarbeit jedoch nicht untersucht; *Database resources of the national center for biotechnology information* (67)

Neben EAATs und VGLUTs kommen im ZNS noch Glutamat-Cystein Austauscher als weitere Form von Glutamattransportern vor, diese sind jedoch für die Fragestellung der Forschungsarbeit nicht von Relevanz (68).

2.1.4.1 Exzitatorische Aminosäuretransporter

Astrogliale EAATs vermitteln den Großteil der Glutamataufnahme innerhalb des Gehirns (69–72). Sie beenden damit die glutamaterge Signalgebung, reduzieren die unkontrollierte Transmitterübertragung auf benachbarte Synapsen und verhindern die extrazelluläre, zytotoxische Akkumulation von Glutamat. Ferner üben sie eine metabolische Funktion aus, indem sie das Edukt der Glutaminsynthese bereitstellen und so ein Energiedefizit signalisieren können (47).

Der EAAT vermittelte Glutamattransport verläuft thermodynamisch gekoppelt an den Konzentrationsgradienten mehrerer Kationen. Im Symport von drei einfach positiv geladenen Natrium-Ionen (Na⁺) und einem einfach positiv geladenem Wasserstoff-Ion (H⁺), sowie im

Antiport von einem einfach positiv geladenem Kalium-Ionen (K^+) wird ein Glutamat Molekül in die Zelle transportiert (vgl. Abb. 4) (73, 74).

Darüber hinaus können EAATs einen - thermodynamisch entkoppelten - Glutamat-gesteuerten Cl^- -Transport bewerkstelligen (75). Insbesondere die Transporter EAAT4 und EAAT5 fungieren vornehmlich als Cl^- -Kanäle, wohingegen ein deutlich geringerer Teil der Transportaktivität von EAAT1-3 mit dem Cl^- -Transport assoziiert ist (76, 77). Zudem wurden EAATs als potenzielle Transporter für die neuronale Cysteinaufnahme beschrieben (78).

EAATs setzen sich zusammen aus drei homologen Untereinheiten, die wiederum aus acht transmembranen (TM) Domänen und zwei Schleifenhelix Domänen (engl. *hairpin*; HP) aufgebaut sind. Untersuchungen im inaktiven Substrat- und Inhibitor-gebundenen Zustand lassen hier weitere Rückschlüsse auf die Substrat- und Natriumbindungsstellen zu (79, 80). Der Transportzyklus beinhaltet die wiederkehrende Konformationsänderung des Proteinkomplexes, welche sich durch die relative Bewegung der Bindungsdomäne (HP1 und 2, TM3, 6-8) gegen die Gerüstdomäne (TM1, 2, 4, 5) auszeichnet (70).

Glutamat bindet an EAATs mit einer ähnlichen Geschwindigkeit wie an *Alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoaxazolepropionic acid* (AMPA)- oder N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptoren (ca. $10^7 M^{-1} \text{ Sekunde } (s)^{-1}$), der anschließende Transportzyklus verläuft dabei deutlich langsamer (81). Dabei wird nicht jedes gebundene Molekül transferiert, das Verhältnis der wieder gelösten Moleküle zur Gesamtheit aller gebundenen Moleküle (engl. *Capture Efficiency*) ist mit 0,5 relativ gering (82, 83). Daraus folgt, dass die schnelle Beendigung der synaptischen Übertragung primär nicht durch die Translokation von Glutamat aus dem synaptischen Spalt, sondern durch dessen kompetitive, temporäre Bindung an den Transporter erfolgt (84).

Die Glutamat-spezifische Affinität der Transporter EAAT1, EAAT2 und EAAT3 zeigt im *Steady State* eine Michaelis-Konstante (K_m) von 10-20 μM . Dabei können EAATs die Entfernung extrazellulären Glutamats beschleunigen und so die Erregung benachbarter Synapsen kontrollieren (82, 85). Hinsichtlich der genauen Bindungsaffinitäten bzw. Enzymkinetik weisen die einzelnen Transporter deutliche Unterschiede auf.

EAAT1 wurde in seiner Funktion erstmalig 1992 von Storck et al. beschrieben (86). EAAT1 wird überwiegend von PAPs, zu einem geringeren Teil auch von Oligodendrozyten exprimiert (58). Hinsichtlich der zerebralen Verteilung findet sich EAAT1 hauptsächlich im Cortex, Cerebellum und Rückenmark. EAAT2 wurde erstmalig 1992 von Pines et al. beschrieben (87). Von der Gesamtmenge des zerebralen Proteingehalts stellt EAAT2 ca. 1 % dar und übernimmt 95 % des Glutamattransports im adulten Gehirn. Der Transporter wird ubiquitär im gesamten ZNS exprimiert (88). Aufgrund dessen Rolle als primärer Re-Uptake-Transporter in der

synaptischen Übertragung wird EAAT2 überwiegend in PAPs exprimiert (89). Gleichwohl wird der Transporter auch in Oligodendrozyten, Neuronen und an der Oberfläche von Gehirnkapillaren exprimiert (90). Dabei stellt der kontrollierte vaskuläre Efflux von überschüssigem Glutamat eine neuroprotektive Eigenschaft der Transporter dar (91). EAAT3 wurde erstmals 1992 von Kanai und Hediger beschrieben (92). Die Expression von EAAT3 ist auf Neurone begrenzt, hier wird EAAT3 in hoher Dichte in der postsynaptischen Membran exprimiert und kommt, im Gegensatz zu EAAT2, nicht im Bereich des terminalen Axons vor (93). Regionsspezifisch findet sich EAAT3 im Hippocampus, Striatum und Cerebellum (94). Aus der hohen Substrataffinität von EAAT3 lässt sich schlussfolgern, dass eine wichtige Rolle in der Pufferung des ausgeschütteten Glutamats besteht. EAAT3 reduziert damit das *Spill Over* von Glutamat auf benachbarte Synapsen. Zudem tragen postsynaptische neuronale Glutamattransporter zur Modellierung der Aktivität postsynaptischer metabotroper Glutamatrezeptoren bei (84, 95). Dabei zeigt sich für EAAT3 eine Na^+ abhängige Konformationsänderung (96). EAAT4 wurde erstmals 1995 von Fairman et al. beschrieben (97). Der Transporter wird überwiegend in zerebellaren Purkinje-Zellen exprimiert (77). EAAT5 wird ausschließlich in der Retina synthetisiert (76) und trägt dort nicht zur Wiederaufnahme von extrazellulärem Glutamat bei, sondern fungiert nach bisherigen Erkenntnissen als inhibitorischer wirkender Rezeptor (75).

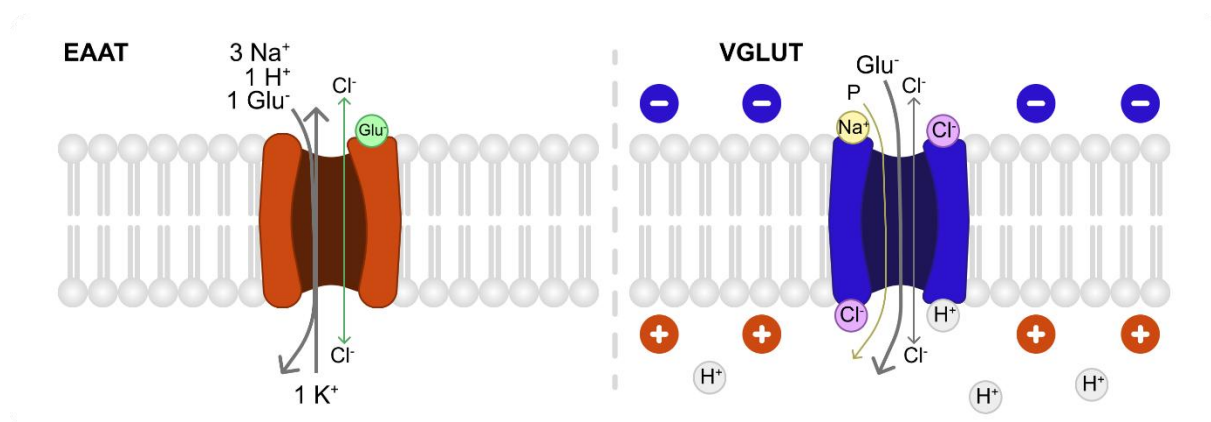


Abbildung 4 Stöchiometrie exzitatorischer und vesikulärer Glutamattransporter

Der EAAT-vermittelte Transport von Glu^- erfolgt physiologisch im Symport mit 3 Na^+ -Ionen und einem H^+ -Ion nach intrazellulär, bei gleichzeitigem Antiport eines K^+ -Ions. Zudem fungieren EAATs als glutamatabhängige Cl^- -Kanäle (links), VGLUTs transportieren Glu^- anhand des elektrochemischen H^+ -Gradienten, Cl^- kann die Membran über den Transporter überwinden und dient zugleich als allosterischer Aktivator. Zudem ermöglichen VGLUTs den Na^+ -abhängigen Transport von anorganischem Phosphat (rechts)

2.1.4.2 Vesikuläre Aminosäuretransporter

Es gibt eine Vielzahl an Carrier-Proteinen, welche den intravesikalen Transport von Neurotransmittern bewerkstelligen, etwa Transporter der Slc17-, Slc18-, oder Slc32-Familie nach HGNC-Nomenklatur (98). Glutamat wird dabei von vesikulären Transportern der Slc17-Familie, insbesondere den Transportern der Gene SLC17A6 (VGLUT2), SLC17A7 (VGLUT1)

und SLC17A8 (VGLUT3) in den Vesikel transportiert.

VGLUTs kommen ausschließlich in Neuronen vor, durch den intravesikalen Transport von Glutamat tragen sie entscheidend zur Exozytose bei (99). Sie sind hochspezifisch für L-Glutamat, strukturähnliche Substrate wie das Stereoisomer D-Glutamat, Aspartat oder Glutamin werden nicht transportiert (100, 101). Sie weisen im Vergleich zu EAATs eine deutlich geringere Enzym-Substrat-Affinität auf, der K_M für VGLUT1 und VGLUT2 liegt bei ungefähr 1-2 mM (101).

Neben den vesikulären Glutamattransportern befinden sich auch vakuoläre H^+ -ATPasen in der Membran des präsynaptischen Vesikels. Diese bewerkstelligen einen ATP-abhängigen aktiven Transport von Protonen in den Vesikel (102). Im Unterschied zum EAAT-vermittelten Glutamattransport, der durch die thermodynamische Kopplung an Kationen-Konzentrationen abläuft, fungiert hier der elektrochemische H^+ -Gradient als Antriebskraft für den intravesikalen Transport. Das Membranpotential ist somit als Antriebskraft des Transports entscheidend (98, 102, 103).

Dabei gilt: Würde die Aktivität von VGLUTs ausschließlich vom Membranpotential abhängen, müsste dies auch einen non-vesikulären Ausstrom von Glutamat aus der Zelle zur Folge haben. Es zeigt sich, dass hier luminales H^+ dem entgegenwirkt, indem es als allosterischer Aktivator des Transporters fungiert (104). Neben H^+ spielt auch Cl^- eine wichtige Rolle in der Regulierung der Transportaktivität. VGLUTs benötigen Cl^- im Zytosol als allosterischen Aktivator, mit einem Wirkmaximum des Transporters bei einer Cl^- -Konzentration von ca. 2-10 mM (100, 105, 106). Es zeigt sich dabei eine biphasische Abhängigkeit: Bei einer weiteren Erhöhung der Cl^- -Konzentration (> 20 mM) kommt es zu einem kontinuierlichen Abfall der Transportaktivität (106). Ketonkörper fungieren als kompetitiver Inhibitor am allosterischen Zentrum von Cl^- (107). VGLUTs zeigen eine Cl^- -assoziierte Membranleitfähigkeit, die – ebenso wie die Transportaktivität als solche – durch luminales Cl^- gesteuert wird (108). VGLUTs sind zusätzlich in der Lage einen Na^+ -abhängigen Transport von anorganischem Phosphat durchzuführen (109).

Im Rahmen systematischer Untersuchungen zu VGLUT1 wurde zunächst dessen Eigenschaft als Phosphattransporter entdeckt (102, 110). Später erst wurde dessen Bedeutung für den synaptovesikalen Glutamattransport erkannt (103). VGLUT1 wird in glutamatergen Neuronen des zerebralen und zerebellären Cortex sowie des Hippocampus exprimiert (111, 112). In Gen-Knockout Versuchen zeigte sich hinsichtlich eines Verlustes von VGLUT1 ein progredienter neurologischer Phänotyp, assoziiert mit Blindheit, Koordinationsdefiziten, sowie einer verstärkten Schreckreaktion dazu findet sich ein signifikant reduziertes Level an glutamaterger Neurotransmission im Hippocampus (113–115). Unmittelbar nach Erstbeschreibung von VGLUT1 im Jahr 1989 gelang es mehreren Arbeitsgruppen ab 1991

den strukturverwandten Carrier VGLUT2 zu isolieren und zu klonen (111, 116–120). Hinsichtlich der Lokalisation im Gehirn weist VGLUT2 dabei deutliche Unterschiede zu VGLUT1 auf. VGLUT2 wird komplementär in glutamatergen Neuronen des Thalamus, Hirnstamms und tiefen Kerngebieten exprimiert (111, 112, 117, 120). Für das CGL im Speziellen zeigt sich, dass VGLUT2 überwiegend in synaptischen Endungen der Projektionsfasern der Retina exprimiert wird, während VGLUT1 hier ubiquitär vorkommt (121). Ein Gen-Knockout geht mit perinataler Letalität, zusammen mit dominanter VGLUT2 Expression während embryonaler und früher postnataler Entwicklungsperiode, einher (122, 123). Verschiedene Studien deuten darauf hin, dass VGLUT1 und VGLUT2 aufgrund ihres spezifischen Expressionsmusters unterschiedliche Populationen von glutamatergen Projektionen darstellen (124).

VGLUT3 wurde 2002 erstmals beschrieben (125–127). Der Transporter wird in glutamatergen, serotonergen, cholinergen und GABAergen Neuronen im dorsalen und ventralen Striatum, sowie in serotonergen Neuronen der Nuclei raphes exprimiert (125–128). Im Vergleich zu VGLUT1 und VGLUT2 weist VGLUT3 mit einem K_M von ungefähr 0,5 mM eine geringere Enzymaffinität auf (125). Die genaue Funktion von VGLUT3 ist noch nicht vollständig erfasst. VGLUT3 spielt wohl eine wichtige Rolle in der Verarbeitung sensorischer Prozesse. Durch entsprechende Knock-out Experimente konnte eine Beteiligung von VGLUT3 an auditiven Funktionen nachgewiesen werden, zudem zeigte sich eine mechanische Hypersensitivität (129, 130).

2.2 Das Schädel-Hirn-Trauma

2.2.1 Definition des Schädel-Hirn-Traumas

In der aktuellen Leitlinie „Schädel-Hirn-Trauma im Erwachsenenalter“ (2015 zuletzt überarbeitet) der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie wird das SHT definiert als "Folge einer Gewalteinwirkung, die zu einer Funktionsstörung und/ oder Verletzung des Gehirns geführt hat und mit einer Prellung oder Verletzung der Kopfschwarte, des knöchernen Schädels, der Gefäße und/ oder der Dura verbunden sein kann." (2). Dabei kann das SHT von der Schädelprellung abgegrenzt werden, bei der keine Hirnfunktionsstörung oder Verletzung des Gehirns vorliegt (2). Die *International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems-10* (ICD-10) ist ein von der Weltgesundheitsorganisation (engl. *World Health Organisation*; WHO) entworfenes Klassifikationsmodell menschlicher Krankheiten. Intrakranielle Verletzungen werden hier nach ICD 10 mit S06.- verschlüsselt (131). Eine Gehirnerschütterung als leichteste Form des SHT (auch *Comotio cerebri*, Schädel-Hirn-Trauma 1. Grades) wird demnach mit S06.0 verschlüsselt (131).

Das SHT kann nach verschiedenen Gesichtspunkten klassifiziert werden. Eine Einteilung kann beispielsweise unter pathophysiologischen Gesichtspunkten erfolgen. Dabei unterscheidet man zwischen primärem und sekundärem Hirnschaden (132). Der primäre Schaden folgt der unmittelbaren physikalischen Krafteinwirkung und kann nur durch präventive Maßnahmen verhindert werden (132). Der sekundäre Hirnschaden resultiert aus verschiedenen molekularbiologischen Vorgängen, die durch den initialen Schaden ausgelöst werden und über Stunden und Tage ablaufen (132).

Weiter lässt sich zwischen einem offenen und gedeckten SHT unterscheiden. Bei einem offenen SHT liegt eine direkte Verbindung der Schädelhöhle mit der Außenwelt vor. Das offene SHT geht daher zwangsläufig mit einer Verletzung der Dura mater, des Knochen- und Weichgewebes einher (2).

Die gängigste Klassifikation des SHT erfolgt nach Schwere der Verletzung. Diese ist insbesondere für die grobe Orientierung in der Akutsituation, für die Einschätzung des Krankheitsverlaufs, sowie die Evaluation des Outcomes von besonderer Bedeutung. Die Einteilung erfolgt anhand der *Glascow Coma Scale* (GCS). Diese wurde 1974 erstmals von Teasdale und Jennett formuliert. Die 1976 noch einmal überarbeitete Version wird bis heute angewandt. Es werden drei Verhaltensmuster des Patienten untersucht: Die Augenöffnung, die beste verbale Reaktion, sowie die beste motorische Reaktion (vgl. Tab. 2). Diese Kategorien werden nacheinander und unabhängig voneinander untersucht (133). Bei einer GCS von 13-15 wird das SHT als leicht, bei einer GCS von 9-12 als mittelschwer und bei einer GCS unter 9 Punkten als schwer eingestuft (134). Bei bewusstlosen Patienten kann auch isoliert die beste motorische Reaktion betrachtet werden (135).

Teilscore	Mögliche Reaktion	
Öffnen der Augen	Spontan	4
	nach Aufforderung	3
	nach Schmerzreiz	2
	keine Reaktion	1
Beste verbale Reaktion	Konversation, orientiert	5
	Konversation, desorientiert	4
	Wörter ohne Zusammenhang	3
	Unverständliche Laute	2
	Keine Reaktion	1
Beste motorische Reaktion	Entsprechend Aufforderung	6
	Gerichtete Abwehrreaktion nach Schmerzreiz	5
	Ungerichtete Abwehrreaktion nach Schmerzreiz	4
	Beugesynergismen nach Schmerzreiz	3
	Strecksynergismen nach Schmerzreiz	2
	Keine Reaktion	1
Möglicher Gesamtscore		3-15

Tabelle 2 Bewertungskriterien der GCS

Auflistung der einzelnen Teilscores (Augenöffnung, Kommunikation und Motorik), die unabhängig voneinander erhoben werden und zu einem Gesamtscore zwischen 3 und 15 Punkten zusammenaddiert werden, mit drei Punkten als niedrigste zu erreichende Punktzahl.

Die Aussagekraft der GCS wird durch verschiedene Faktoren limitiert. Dazu zählen unter anderem: verabreichte Medikation, Lähmungen, endotracheale Intubation und Intoxikation des Patienten (135). Die GCS ist zudem abhängig vom Untersuchungszeitpunkt und weist mehrere methodische Schwächen auf. Sie hat daher nur eine eingeschränkte Reliabilität und Validität (2).

Dennoch ist sie aufgrund der Einfachheit und schnellen Durchführbarkeit sowie des guten prädiktiven Werts ein geeignetes Tool zur Abschätzung der Schwere des SHT und dafür bis heute ein wichtiges Instrument. Die Einteilung des SHT nach Schwere hat für die Therapieplanung eine untergeordnete Relevanz. Die Behandlung erfolgt primär in Abhängigkeit vom klinisch-neurologischen Zustand des Patienten und dessen Verlauf, der durch die GCS nur zum Teil erfassbar ist (2).

2.2.2 Epidemiologie des Schädel-Hirn-Traumas

In Deutschland beträgt die Inzidenz des SHT 332 pro 100.000 Einwohner. Es ist die führende Ursache von Todesfällen und Trauma-assoziiierter Behinderung junger Erwachsener. Die hohe Anzahl junger Patienten führt zu einer deutlichen Zunahme von "mit Behinderung gelebter Lebensjahre" (engl. *Years of life lived with disability*, YLDs) im Vergleich zu anderen

Erkrankungen. Das SHT geht demzufolge mit hohen Gesundheitskosten einher (136). Für Deutschland werden die Kosten für die Versorgung von Patienten mit SHT auf ca. 2,8 Milliarden Euro pro Jahr geschätzt (2).

In der Altersverteilung von Patienten mit SHT zeigt sich ein zweigipfliger Verlauf mit einem Maximum sowohl im Alter zwischen 15 und 24 Jahren und einem zweiten Anstieg bei Patienten über 65 Jahren. Es zeigt sich eine geschlechtsspezifische Divergenz bei Patienten im jungen Erwachsenenalter mit signifikant höherer Inzidenzrate bei Männern. In der Altersgruppe von 15-24 sind ca. 75 % der Patienten männlich. In höheren Altersgruppen zeigen sich keine geschlechtsspezifischen Unterschiede (137). Zu den häufigsten Ursachen des SHT im jungen Erwachsenenalter gehören Verkehrsunfälle, Gewalt und Sportverletzungen (138). Neben Alter und Geschlecht ist auch der Alkoholkonsum als Risikofaktor aufzuführen. Etwa 40-50 % der SHT stehen mit diesem im Zusammenhang (139).

Für Europa zeigt sich, dass sich die Inzidenz seit 2006 nicht signifikant verändert hat. Gleiches gilt für andere Industriestaaten wie die USA (138). Es lässt sich jedoch beobachten, dass ätiologisch sturzbedingte SHT in ihrer Anzahl die durch Verkehrsunfälle bedingten SHT als häufigste Ursache ablösen, was auf den demographischen Wandel der Gesellschaft zurückzuführen ist (138).

Global wird die jährliche Inzidenz des SHT auf 27,08 Millionen geschätzt, mit einer altersangepassten Inzidenzrate von 369 pro 100.000 Einwohnern. Die globale Prävalenz wird auf 55,5 Millionen geschätzt, mit einer altersangepassten Prävalenzrate von 759 pro 100.000 Einwohner. Das SHT war 2016 weltweit ursächlich für 8,1 Millionen YLDs, entsprechend altersangepasst 111 von 100.000 Jahren. Im Unterschied zu Industriestaaten lässt sich in der globalen Betrachtung ein Anstieg der Inzidenzrate beobachten. Stürze und Verkehrsunfälle, bedingt durch eine Zunahme an Ballungsräumen, verbunden mit einem steigenden Zugang zu motorisierten Fahrzeugen und einer global alternden Weltbevölkerung sind mögliche Ursachen für diese Entwicklung (137).

2.2.3 Pathophysiologie des Schädel-Hirn-Traumas

In der Pathophysiologie des SHT ist zwischen primärem und sekundärem Hirnschaden zu unterscheiden. So folgt der initialen Krafteinwirkung, dem primären Schaden, die lokale und systemische Reaktion des Organismus, der sekundäre Schaden. Die dabei ablaufenden Prozesse beeinflussen sich gegenseitig und führen zu einer Vergrößerung des Schadensareals. Dies erfolgt teils innerhalb von Sekunden, teils erst nach Tagen oder Wochen.

2.2.3.1 Primärer Schaden

Der primäre Schaden entsteht durch die direkte physikalische Krafteinwirkung auf den Schädel und die darin enthaltenen Strukturen. Es kommt zu einer mechanischen Gewebszerstörung, die mit der Verletzung der Kopfschwarte, dem Bruch des Schädelknochens, sowie der Ruptur von Blutgefäßen einhergehen kann und einen direkten Schaden am Nervengewebe zur Folge hat (2).

Dabei unterscheidet man im Mechanismus zwischen fokalem und diffusem Schaden (3). Bei einem fokalen Ereignis wird die Kollisionskraft unmittelbar auf ein Areal des Schädels übertragen. Bei besonders hoher Krafteinwirkung kann es hier zu einem Bruch der Schädelkalotte kommen und so zum Vorliegen eines offenen SHT (140). Beim geschlossenen SHT wird der Schädel durch die Krafteinwirkung an der Aufprallseite gegen das Gehirn gedrückt. Es entsteht ein unmittelbarer Schaden am beteiligten Hirngewebe. Wird das Gehirn jedoch durch höhere Krafteinwirkung mitbeschleunigt, kommt es, seiner Trägheit folgend, zum Aufprall an der gegenüberliegenden Seite (auch Coup-contre-coup-Mechanismus genannt). Das hier entstehende Schadensareal ist zumeist größer als das auf der initialen Aufprallseite (141).

Ein diffuser Schaden entsteht durch schnelles Beschleunigen und Abbremsen des Gehirns, etwa im Rahmen von Autounfällen (142). Durch Scher- und Zugkräfte innerhalb des heterogen aufgebauten Gewebes mit seinen unterschiedlich elastischen Kompartimenten kommt es zu einer diffus verteilten Schädigung (143).

Intrakranielle Blutungen gehen häufig mit einem SHT einher (144). Epi- und Subduralblutungen (EDB; SDB) sind häufig die Folge einer fokalen Krafteinwirkung. EDB und SDB können sowohl gleichzeitig als auch unabhängig voneinander auftreten (145). Die venöse SDB ist dabei in der Regel Folge von Hochrasanztraumata, hat eine höhere Mortalitätsrate und geht mit einem schlechteren Outcome einher (144). Sie ist assoziiert mit weiteren Läsionen des Gehirns und erhöht massenwirkungsbedingt den sekundären Schaden (142, 146). Die arterielle EDB zeigt im Vergleich zur SDB zwar eine deutlich schnellere Größenzunahme, persistiert jedoch auch schneller. Dadurch wird hier entweder eine sehr frühe Intervention notwendig, oder es lässt sich bei kleineren Blutungen abwartend agieren (144). Die Subarachnoidalblutung (SAB) kann als Folge von fokalen Schäden entstehen, tritt jedoch häufiger nach diffusen Schädigungen auf (143). SAB treten in etwa der Hälfte der Fälle eines SHT auf und sind ebenfalls mit einer Verschlechterung des Patientenoutcomes assoziiert (147, 148).

Eine weitere direkte Folge der mechanischen Krafteinwirkung auf das Gehirn ist der diffuse Untergang von Axonen in der weißen Substanz (engl. *Diffuse axonal injury*, DAI). Die

Neurofilamente des Cytoskeletts verleihen dem Axon eine viskoelastische Struktur, die eine physiologische Dehnung ermöglicht (149). Durch schnelle wiederholte Scherung und Stauchung des Gehirngewebes im Rahmen des SHT kommt es jedoch zu einer Überschreitung der Elastizitätsgrenze. Damit geht der Verlust der Membranintegrität einher, die Zellfortsätze degenerieren (150). Die Degenerierung der Axone wird zusätzlich durch eine metabolische Störung begünstigt, die durch den Schaden an einzelnen Zellorganellen entsteht (150, 151).

2.2.3.2 Sekundärer Schaden

Der sekundäre Schaden zeichnet sich durch den parallelen Ablauf mehrerer pathophysiologischer Prozesse aus, die sich zum Teil gegenseitig verstärken und somit zu einer Zunahme der zerebralen Schädigung führen.

Unmittelbar nach dem durch äußere Krafteinwirkung entstehenden Gewebeschaden, erfolgt die Deregulation des zerebralen Blutflusses (engl. *Cerebral blood flow*; CBF) (3). Durch den Gewebeschaden kommt es zu einer ödematösen Schwellung des Gehirns, die mit einer Erhöhung des intrakraniellen Drucks (engl. *Intracranial pressure*; ICP) einhergeht (152). Die daraus resultierende Reduktion des zerebralen Perfusionsdrucks (Hypoperfusion), führt zu einer Reduktion des CBF auf unter 15 ml/100g/min. Es kommt Ischämie-bedingt zu neuronalen Funktionseinschränkungen und dem Untergang von Nervenzellen (153). Der Organismus reagiert kompensatorisch mit einer Erhöhung des zerebrales Blutvolumens durch einen Anstieg des systemischen arteriellen Blutdrucks und einer Dilatation zerebraler Gefäße, was zum einen Blutungen begünstigt und zum anderen erneut den ICP ansteigen lässt (154, 155).

Dieser *Circulus vitiosus* führt dazu, dass dem Gehirn wichtige Substrate zur Energiegewinnung fehlen (156). Die dem Gehirn zur Verfügung stehende Energie kann vereinfacht als die vorhandene Menge an ATP und Kreatinphosphat betrachtet werden. Es kommt zu einer erhöhten anaeroben Energiegewinnung mit vermehrter Bildung von Laktat. Daher ist der Anstieg des Laktat/Pyruvat-Quotienten (engl. *Lactate-pyruvate-ratio*; LPR) als Maßstab für anaerobe Energiegewinnung sinnvoll, um Rückschlüsse auf den zerebralen Energiehaushalt zu gewinnen und fungiert als wichtiger Parameter für zerebrale Ischämie (157).

Der Anstieg der LPR, die Akkumulation von Laktat im Gewebe, führt wiederum dazu, dass die Membranpermeabilität der Zelle herabgesetzt wird. Es kommt zu einem weiteren Einstrom von Ionen in die Zelle. Diese ist aufgrund des vorherrschenden Energiemangels nicht in der Lage, die Ionenverschiebung auszugleichen, so dass es durch den Nachstrom von Wassermolekülen zu einem zytotoxischen Anschwellen der Zelle kommt (158). Von dieser intrazellulären Volumenzunahme abzugrenzen ist das vasogen bedingte Ödem. Durch eine partielle Unterbrechung der Blut-Hirn-Schranke nach SHT kommt es zu einem Einstrom von

Ionen und Kolloiden in den Extrazellularraum des Gewebes mit konsekutivem Nachstrom von Wassermolekülen, was zu einer Volumenzunahme des Interstitiums führt (158). Das zelltoxische Ödem hat dabei einen größeren Einfluss auf die Zunahme des Gehirnvolumens als das vasogen bedingte Ödem und trägt effektiv mehr zu der beschriebenen Erhöhung des ICP bei (152). Die Entwicklung der ödematösen Schwellung des Gehirns weist dabei eine zeitliche Dynamik auf. Das zytotoxische Ödem entwickelt sich innerhalb der ersten Minuten, während die vasogene Komponente über Stunden bis Tage ansteigt. Das Punktum maximum ist dabei in einem Zeitraum von einem bis drei Tagen nach SHT zu erwarten. Im weiteren Verlauf kommt es durch Resorptionsvorgänge zu einem Rückgang des Läsionsvolumens (159).

Die reduzierte Energiebereitstellung lässt sich nicht allein auf einen reduzierten CBF zurückführen (160). Es zeigt sich nach SHT auch eine deutliche mitochondriale Dysfunktion mit einer signifikanten Reduktion der Aktivität mitochondrialer Funktionseinheiten, wie etwa des Pyruvatdehydrogenase-Komplexes, sowie der Komplexe I und IV der Atmungskette (154, 160–163). Auch durch diese mitochondrialen Funktionseinschränkungen wird bei genügend verfügbarem Sauerstoff die extramitochondriale (anaerobe) Energiegewinnung hochreguliert, verbunden mit einem weiteren Anstieg des LPR (163).

Die mitochondriale Schädigung zeigt sich auch in der Zunahme des oxidativen Stresses nach SHT (164, 165). Oxidativer Stress entsteht als Folge der Imbalance zwischen pro-oxidativen Spezies und der zur Verfügung stehenden Radikalfänger und Antioxidantien. Er geht mit der erhöhten Bildung von freien Radikalen – nach SHT reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und Stickstoffspezies (RNS) – sowie mit der Inhibierung von Antioxidantien (wie etwa Glutathion) einher (166).

ROS entstehen überwiegend – bedingt durch den Elektronentransfer im Rahmen der Atmungskette – in Mitochondrien. Mitochondrien selbst verfügen physiologisch über verschiedene Mechanismen, den Abbau der ROS zu regulieren (167). Die SHT-assoziierte mitochondriale Dysfunktion resultiert jedoch in einer erhöhten Bildung von ROS, die durch kleinere Membranporen in das Zytosol der Zellen diffundieren können (164). ROS sind hier in der Lage, die Struktur von Makromolekülen zu zerstören. Sie führen so zu Brüchen der Desoxyribonukleinsäure (engl. *Deoxyribonucleic acid*, DNA), der Oxidation von Proteinen und der Zerstörung von Bestandteilen der mitochondrialen Atmungskette. Dies resultiert in einem weiteren mitochondrialen Schaden und letztlich dem Untergang der Zelle (164).

Durch die fehlende Bereitstellung von ATP ist die Zelle nicht mehr in der Lage durch Ionenpumpen das Membranpotential aufrecht zu erhalten (3). Es kommt zur vollständigen Depolarisation entlang des Axons mit einer unkontrollierten Ausschüttung von exzitatorischen Neurotransmittern, insbesondere von Glutamat (168, 169). Der durch diese stark erhöhte

extrazelluläre Glutamatkonzentration und den konsekutiven Einstrom von Ca^{2+} in die postsynaptische Zelle verursachte Schaden ist ein elementarer Bestandteil der Pathophysiologie des SHT.

Nach SHT kommt es zur Aktivierung komplexer immunologischer und neuroinflammatorischer Prozesse. Diese werden in dem für die Forschungsarbeit notwendigen Rahmen anhand deren systematischen Abläufe dargestellt. Die sterile Immunreaktion beginnt innerhalb von Minuten nach der initialen Verletzung. Die Freisetzung neurotoxischer Mediatoren wie Stickstoffmonoxid und Zytokinen führen zur erhöhten Expression proinflammatorischer Proteine. Es kommt zur Hochregulation von Schaden-assoziierten molekularen Mediatoren (engl. *Damage-associated molecular patterns*, DAMPs), weiterer proinflammatorischer Zytokine, Prostaglandine, freier Radikale, sowie der Aktivierung des Komplementsystems (170). Dabei können Zytokine und DAMPs die Ausbildung einer maladaptiven Immunreaktion fördern. Erhöhte Zytokin-Level korrelieren mit Mortalität, Multiorganversagen und erhöhtem intrakraniellen Druck (171).

Durch die Beeinträchtigung der Blut-Hirn-Schranke kommt es zum Eintritt peripherer Immunzellen, wie Makrophagen, Neutrophilen oder T-Zell-Lymphozyten in das Verletzungsgebiet. Darüber hinaus kommt es auch zur endothelvermittelten Diapedese von Immunzellen (140). Die akkumulierten peripheren und residenten Immunzellen setzen wiederum selbst Entzündungsmediatoren frei, die die Inflammation durch weitere Zellrekrutierung verstärken. Verschiedene Aspekte der Immunreaktion laufen somit parallel ab und zeigen synergistischen Charakter (158).

Aktivierte Mikroglia unterstützen die Beseitigung von Zelltrümmern und Gewebeumbau, setzen aber auch neurotoxische Substanzen wie reaktive Sauerstoffspezies und Glutamat frei. Mikrogliale Aktivierung amplifiziert die Entzündungsreaktion durch Freisetzung von Chemokinen, reaktiven Sauerstoffspezies und neurotoxischen Molekülen. Zellen der Mikroglia können durch diverse Moleküle aktiviert werden, entfernen Zelltrümmer und unterstützen Astrozyten in der Aufrechterhaltung der Integrität der Glia limitans (171).

Als reaktive Astroglie bezeichnet man die zelluläre Antwort von Astrozyten auf jegliche Form von Schaden am ZNS (172). Als Antwort auf externe Stimuli gehen Astrozyten in einen reaktiven Zustand über, der mit morphologischen, molekularen und funktionalen Veränderungen der Zelle einhergeht (173). Die Zelle hypertrophiert und es kommt zu einer vermehrten Bildung von GFAP. Je nach Ausprägung der Astroglie kommt es zu einer Veränderung der extra- und intrazellulären Signalwege (174, 175). Die komplexe Astroglie und die Immunzellaktivierung können sowohl die Gewebsregeneration durch neurotrophische Faktoren unterstützen als gewebescheidend durch verstärkte Entzündungsmechanismen wirken. In GFAP-Knockout Studien konnte gezeigt werden, dass die reaktive Astroglie den

gesamten sowie EAAT2-abhängigen Glutamattransport nach Ischämie positiv beeinflusst (176). Die Proliferation reaktiver Astrozyten und die Entwicklung einer Gliazarbe behindern beispielsweise die axonale Regeneration (171).

Gefäßwirksame Prozesse der sterilen Immunreaktion führen zu einer weiteren Reduktion der Gewebsperfusion, etwa durch die Ausschüttung von Vasokonstriktoren wie Prostaglandinen und Leukotrienen, der Obliteration der Mikrovaskularisation oder der Adhäsion von Immunzellen am Gefäßendothel (3).

Der neuronale Untergang manifestiert sich durch zwei divergente Formen des Zelltods: Nekrose und Apoptose. Nekrose stellt sich als Folge des mechanischen oder ischämischen Gewebeschadens dar und geht ungeordnet mit der Zerstörung der zellulären Integrität einher. Apoptose beschreibt demgegenüber den Prozess des geordneten Untergangs der Zelle. Dafür muss die Zelle initial über ausreichend ATP verfügen, um den Prozess aufrechtzuerhalten. Initiiert wird die Apoptose durch ein Ungleichgewicht der intrazellulären Homöostase zugunsten pro-apoptotischer Faktoren. Apoptose tritt mitunter erst Stunden bis Tage nach dem Primäreignis auf und bietet somit ein therapeutisches Zeitfenster (3, 177).

2.2.4 Therapie und Outcome

Die Therapie des SHT stellt eine komplexe medizinische Herausforderung dar (2, 178). Der primäre Hirnschaden, verursacht durch direkte mechanische Gewebeerstörung, ist irreversibel und kann ausschließlich durch präventive Maßnahme verhindert werden. Der therapeutische Fokus liegt daher auf der Reduktion der sekundären Hirnschädigung. Die Therapie kann hierbei in eine präklinische und eine klinische Phase unterteilt werden (2). Je nach Bewusstseinslage und weiterem klinischen Befund reicht sie von reiner Beobachtung des Patienten bis hin zur komplexen neurochirurgischen Versorgung. Hierbei kommen der gezielten neurointensiven Versorgung mit Kontrolle der Vitalparameter, des zerebralen Perfusionsdrucks, der Oxygenierung sowie dem Temperaturmanagement einer umfassenden Bedeutung zu (178). Zur Abschätzung des individuellen Outcomes zeigen sich die Bewusstlosigkeit, begleitende neurologische Störungen, die Dauer der Bewusstlosigkeit und das Alter des Patienten prognostisch bedeutsam (2). Bei einem schweren SHT ist die Prognose entsprechend ungünstig. In mehr als 40 % der Fälle kommt es zu schwerwiegenden Behinderungen oder zum Tod (179).

Es zeigt sich wie eingangs beschrieben, dass gezielte pharmakologisch-neuroprotektive Strategien bislang eine geringe klinische Relevanz haben. Dies resultiert aus dem unzureichenden Verständnis der beschriebenen molekularen Schädigungskaskade und der Komplexität der neuroinflammatorischen Prozesse (178, 180). Dies erschwert zielgerichtete

Interventionen und verdeutlicht die Notwendigkeit weiterer wissenschaftlicher Grundlagenforschung.

2.2.5 Tiermodelle des Schädel-Hirn-Traumas

Es gibt verschiedene in der Forschung etablierte Modelle, welche die komplexen biomechanischen Veränderungen während des SHT abbilden. Dabei gilt es zu beachten, dass die einzelnen Modelle, verschiedene Aspekte der Pathophysiologie jeweils unterschiedlich gut darstellen können (181). Darüber hinaus gibt es Unterschiede zwischen den zu untersuchenden Spezies, an denen die einzelnen Verfahren etabliert sind.

Es gibt verschiedene Modelle, um die fokale Kontusion nachzubilden (182–184). Das Trauma kann ausgelöst werden, indem ein Gewicht durch eine geführte Vorrichtung fallengelassen wird und auf das Kranium, eine am Kranium befestigte Metallplatte oder die freigelegte Dura aufschlägt (engl.: *Weight drop injury*; WDI) (182). Alternativ kann das Trauma durch eine Druckwelle herbeigefügt werden. Dabei erfolgt eine rasche Flüssigkeitsinjektion, in die entweder geschlossene oder eröffnete Schädelhöhle superfiziell der Dura mater (engl. *Lateral fluid percussion injury*; LFPI) (183). Im Rahmen dieser Arbeit wird das CCI-Modell genutzt (184).

Das CCI-Modell ist eines der am häufigsten genutzten und detailliertesten beschriebenen Modelle des SHT. Ursprünglich an Frettchen entwickelt, konnte es auf verschiedene Spezies adaptiert werden und findet mittlerweile am häufigsten bei Nagetieren Anwendung (185). Beim CCI wird ein starrer Bolzen durch einen pneumatisch (oder elektrisch) betriebenen Antrieb mit einer definierten Geschwindigkeit und Eindringtiefe auf das freigelegte Gehirn gedrückt, der Kopf des Tieres ist hierbei fixiert (185). Die resultierende funktionelle und kognitive Einschränkung korreliert gut mit der Geschwindigkeit und Eindringtiefe des Bolzens (186, 187). Ein Vorteil des CCI-Modells ist dementsprechend, dass je nach verwendeten Parametern verschiedene Trauma-Hergänge simuliert werden können (188). Gleichzeitig ist bei der Verwendung einheitlicher Parameter eine hohe Vergleichbarkeit innerhalb der Studienpopulation und eine hohe Reproduzierbarkeit der Ergebnisse möglich (189).

Nachteil dieser Methode ist, dass dynamische Prozesse weniger gut abgebildet werden. Eine lokale Schädigung von Axonen kann zwar auch im CCI-Modell gezeigt werden (184), die punktuelle Kräfteinwirkung im Rahmen des CCI-Modells führt jedoch nicht zu den Scher- und Stauchbewegungen des Gehirns, welche primär ursächlich für den DAI sind (181). Zur gezielten Beurteilung dynamischer Prozesse benötigt es folglich die Anwendung anderer Modelle (181, 190, 191).

Beim CCI wird die Schädelkalotte zumeist vor der Schadensapplikation eröffnet (185). Dafür wird ein definiertes knöchernes Areal mittels elektrischen Bohrers freigelegt und nach oben

hin weggeklappt. Diese Kraniektomie ist ein möglicher Confounder. Dazu kommt, dass ein CCI – unter der Einhaltung von ethischen und rechtlichen Regularien – nur unter adäquater Analgesie und Anästhesie durchgeführt wird, was zusätzliche potenzielle Störfaktoren darstellt. Um diese zu eliminieren, wird die Gruppe an CCI-Tieren mit einer zweiten Kohorte scheinoperierter (Sham) -Tiere verglichen (185).

Es lässt sich zusammenfassen, dass es derzeit kein Versuchsmodell gibt, welches in der Lage ist, die komplexe Pathophysiologie des SHT vollständig darzustellen. Die Auswahl des am besten geeigneten Verfahrens muss sich folglich immer nach der individuellen Fragestellung der Forschungsarbeit richten.

2.3 Glutamatabhängige Neurotoxizität

2.3.1 Exzitotoxizität nach SHT

Exzitotoxizität stellt einen Teilaspekt der bereits beschriebenen Pathophysiologie des SHT dar. Es beschreibt hierbei die glutamatabhängige Neurotoxizität, die durch eine erhöhte extrazelluläre Glutamatkonzentration ausgelöst wird. Dieser pathophysiologische Mechanismus steht in direktem Zusammenhang zur Funktionsweise der zu untersuchende Transporter.

Die zelltoxische Eigenschaft von extrazellulärem Glutamat konnte erstmals von Lucas und Newhouse 1957 dargestellt werden (192). 1974 postulierte Olney et al., dass die Gewebsschädigung ein negativer Nebeneffekt dessen Eigenschaft als exzitatorischer Neurotransmitter sei (193). Durch eine Reihe weiterer Forschungsarbeiten konnte der Ablauf der Zellschädigung detaillierter beschrieben werden. Exzitotoxizität ist dabei nicht ausschließlich mit dem SHT vergesellschaftet, sondern tritt auch bei anderen Pathologien, beispielsweise im Rahmen eines ischämischen Schlaganfalls auf (194).

Die Exzitotoxizität im Rahmen des SHT wird primär induziert, indem die mechanische Krafteinwirkung zu einer Aufhebung der Membranintegrität der einzelnen Zellen und somit zur Leckage von intrazellulärem Glutamat führt. Zusätzlich sorgt die postakzidentelle Energiedepletion dafür, dass der Glutamat-Glutamin-Zyklus nicht aufrechterhalten werden kann. Überschüssiges Glutamat kann nicht aus dem Extrazellulärraum entfernt werden. Durch den *Spill Over* erfolgt die konsekutive Erregung benachbarter Zellen mit kontrollierter Exozytose von Glutamat, welches ebenfalls durch die anhaltende Depolarisation ausgeschüttet wird (195). Dies mündet in einer erhöhten extrazellulären Konzentration des Neurotransmitters (vgl. Abb. 5). Zudem kommt es längerfristig zu einer kortikalen Verschiebung des exzitatorisch-inhibitorischen Gleichgewichts (engl. *Excitatory-Inhibitory-balance*; *E/I-balance*) hin zu einer gesteigerter Exzitation (196, 197), welche sich sowohl auf

eine Reduktion der Anzahl inhibitorischer Interneurone als auch eine Reduktion der inhibitorischen Neurotransmission an sich zurückführen lässt (198, 199).

Physiologisch führt extrazelluläres Glutamat zu einer Aktivierung ionotroper und metabotroper Rezeptoren. Die Bildung des exzitatorischen postsynaptischen Potenzials erfolgt durch den konsekutiven Einstrom positiv geladener Ionen. Der zelltoxische Effekt durch eine erhöhte Konzentration von extrazellulärem Glutamat erfolgt überwiegend Calcium-abhängig und wird über NMDA-Rezeptoren, insbesondere der Untereinheit NR2B, vermittelt (200, 201). Die Aktivierung von AMPA- und Kainat-Rezeptoren führt primär zu einem Einstrom von Na^+ , dieser geht mit einem potenziell reversiblen Anschwellen der Zelle einher. Bei einem isolierten Einstrom von Na^+ ohne gleichzeitigen Ca^{2+} -Einstrom kommt es nicht zu einer solchen Gewebsschädigung (202, 203). Die anhaltende Depolarisation der Zelle löst die Blockade der NMDA-Rezeptoren und führt zu einem Ca^{2+} -Einstrom. Zusätzlich kommt es zur Öffnung spannungsabhängiger Calcium-Kanäle (engl. *Voltage-gated calcium channel*; VGCC), die den Einstrom von Ca^{2+} weiter verstärken. Es zeigt sich, dass neben der absoluten Konzentration von intrazellulärem Calcium auch der Transporter, über den der Einstrom der Ionen erfolgt, relevant ist. Ein Einstrom von Ca^{2+} durch NMDA/NR2B-Kanäle ist mit einer deutlich toxischeren Wirkung verbunden als der Einstrom durch spannungsabhängige Calcium-Kanäle. Dabei ist umstritten, ob dies an der Lokalisation oder modulierenden Eigenschaften des Rezeptors liegt (204).

Der Anstieg der postsynaptischen Ca^{2+} -Konzentration zeigt einen zweiphasischen Verlauf. Ein initial erhöhtes Level an Calcium wird durch eine mitochondriale Ca^{2+} -Aufnahme kompensiert. Sobald die mitochondriale Pufferkapazität jedoch überschritten ist, folgt ein weiterer deutlicher Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration (205).

Dabei führt der Anstieg der mitochondrialen Ca^{2+} -Konzentration über eine Reihe von Mechanismen zur Schädigung des Zellorganells und Verlust der Ca^{2+} -Homöostase (206). Es kommt zur osmotisch bedingten Volumenzunahme des Mitochondriums, zur oxidativen Phosphorylierung und physikalischen Ruptur der äußeren mitochondrialen Membran. Dies wiederum führt zur umfangreichen Freisetzung von Cytochrom c, was eine Beeinträchtigung des Elektronentransports und die Bildung von ROS, Stickstoffmonoxid, Superoxide, oder Hydrogenperoxid bedingt. Dies führt zur Lipidperoxidation, was mit der Zerstörung der Zellmembran und dem damit verbundenen Verlust der zellulären Integrität einhergeht.

Zusätzlich greifen ROS die DNA an und sorgen hier für oxidative Schäden (207).

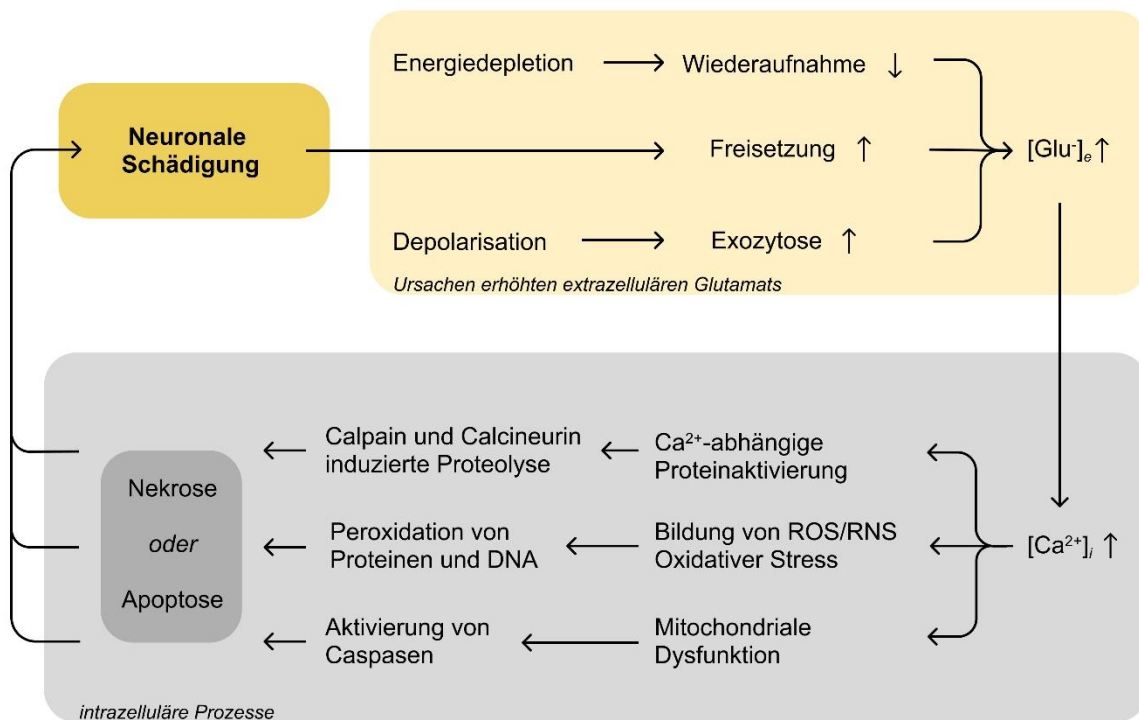


Abbildung 5 Glutamatabhängige Neurotoxizität

Dargestellt ist der glutamatabhängige negative Feedback-Loop als Folge der neuronalen Schädigung mit Ursachen der erhöhten extrazellulären Glutamatkonzentration $[Glu]_e$. In der unteren Bildhälfte sind die aus der erhöhten intrazellulären Calciumkonzentration $[Ca^{2+}]_i$ resultierenden intrazellulären Vorgänge dargestellt, die letztlich zu verschiedenen Formen des Zelltodes führen und so die neuronale Schädigung weiter begünstigen. Abbildung modifiziert nach Khatri, N et al., Oxidative Stress: Major Threat in Traumatic Brain Injury; 2018 (166) und Choi, DW; Glutamate neurotoxicity and diseases; 1988 (208)

Der vermehrte Einstrom von Calcium-Ionen in die Zellen bewirkt zusätzlich die Aktivierung der NO-Synthasen und Nicotinamadenindinukleotidphosphat (NADPH) Oxidase-2. Es erfolgt die weitere Bildung von ROS und RNS (168). Darüber hinaus werden katabole Enzyme, insbesondere Calpain, Calcineurin, Proteasen und Phospholipase 2, vermehrt aktiviert. Diese führen über verschiedene Signalwege zur Schädigung der Zelle und fördern die Bildung von ROS und RNS (166). Durch die Bindung von Ca^{2+} an Calmodulin kommt es zur Aktivierung der Calmodulin-abhängigen Proteinkinase, die die Bildung von mitochondrialen ROS (mROS) und die Öffnung des mitochondrialen Permeabilitäts-Übergangsporenkomplex bewirkt. Durch dessen Öffnung kommt es zur übermäßigen Freisetzung von mROS (166). Durch die mitochondriale Schädigung, die Aktivierung von Poly(ADP-Ribose)-Polymerasen als Folge der DNA-Schädigung, sowie die Aktivität membranständiger ATPasen wird das Energiedefizit der Zelle verstärkt (166).

Wie bereits dargestellt verläuft der EAAT-vermittelte Transport von Glutamat über die Zellmembran in Abhängigkeit des Na^+/K^+ -Gradienten. Sofern die membranständigen ATPasen nicht mehr in der Lage sind, diesen aufrechtzuerhalten, kann es zum umgekehrten Transport und somit der EAAT-vermittelten Freisetzung von Glutamat kommen (209). Dies steht im

Zusammenhang mit der Freisetzung proinflammatorischer Enzyme wie Cyclooxygenase-2 und Prostaglandin E2 (210). Zudem kommt es nach SHT zu einem Anstieg der Proteinkinase C (PKC). Diese vermittelt den Ubiquitin-abhängigen Abbau von EAAT1 und EAAT2, gleichzeitig vermittelt die PKC einen Anstieg von EAAT3 (211, 212). Die Aktivität der PKC erreicht ihren Höhepunkt 24 Stunden (engl. *Hour, h*) nach SHT (213). Zusätzlich kommt es zur Induktion und Aufrechterhaltung der Neuroinflammation durch erhöhte Ausschüttung weiterer proinflammatorischer Botenstoffe wie Tumor-Nekrose-Faktor alpha (214).

Es kommt, insbesondere durch oxidativen Stress, zur Aktivierung einer Vielzahl von proapoptotischen Faktoren, wie beispielsweise Caspasen. Die Zelle leitet in der Folge den kontrollierten Zelltod ein. Ist der Zustand der Ischämie mit Energiedefizit und strukturellen Schäden jedoch besonders gravierend ausgeprägt, dann erfolgt der nekrotische Zelluntergang, bevor der kontrollierte Zelltod vollständig ablaufen kann. Die Art des zellulären Untergangs wird dabei effektiv durch die absolute Menge an intrazellulär vorliegendem Ca^{2+} bestimmt (201).

2.3.2 Expression von Glutamattransportern nach Schädel-Hirn-Trauma

An der Regulation der extrazellulären Glutamatkonzentration sind Glutamattransporter entscheidend beteiligt (69, 71). Es wurden bereits mehrere Studien durchgeführt, die die veränderte Expression von Subtypen der Glutamattransporter nach SHT untersucht haben. Dabei sind die Ergebnisse inkonsistent und variieren in Abhängigkeit der verwendeten Methodik, der untersuchten zerebralen Region sowie des gewählten Zeitintervalls.

2.3.2.1 Zeitabhängige Expression von EAATs nach Schädel-Hirn-Trauma

Die Veränderung der Proteinexpression der Transporter EAAT1 und EAAT2 nach SHT wird bereits seit etwa 30 Jahren untersucht. Dabei zeigt der Großteil der Western-Blot Untersuchungen einen signifikanten Rückgang der Proteinmenge im Zeitverlauf, mit niedrigsten Werten zwischen 6 h und 72 h nach SHT (8, 215). Diese Ergebnisse konnten mit wenigen Ausnahmen umfangreich in jüngeren Forschungsarbeiten reproduziert werden (216–218). Beispielhaft für solche Ausnahmen konnte im Zeitraum bis 24 h nach SHT keine Reduktion der Proteinmenge im ipsilateralen Cortex und Hippocampus nachgewiesen werden, wobei sich eine Veränderung der EAAT-vermittelten Glutamataufnahme zeigte (9, 219).

Neuere Untersuchungen der mRNA-Expression beider Transporter mittels quantitativer Polymerasekettenreaktion (engl. *Quantitative Real-time polymerase chain reaction; qPCR*) sowie immunhistochemische Untersuchungen zeigen jedoch inhomogene Ergebnisse: Für EAAT1 wurde mittels qPCR ein Anstieg der mRNA-Expression im Bereich des Cortex 7 d nach SHT nachgewiesen (220). In anderen Studien zeigte sich jedoch die mRNA-Expression des Transporters 1 d nach SHT reduziert (221). Neuere immunhistochemische Untersuchungen

zeigten zudem keine signifikante Veränderung der EAAT1 Expression nach SHT im Zeitverlauf (222). Für EAAT2 deutet die Mehrheit Western-Blot Untersuchungen auf einen reduzierten Proteingehalt nach SHT hin (216, 217, 223). In der qPCR zeigte sich für EAAT2 jedoch ein Anstieg der mRNA-Expression im Bereich des Hippocampus 7 d nach SHT (220). Andere Studien zeigen eine Reduktion der mRNA-Expression von EAAT2 nach 7 d (224). Zudem weisen weitere Studien – wie bereits für EAAT1 gezeigt – eine Reduktion der mRNA-Expression im Bereich des Hippocampus 1 d nach SHT auf (221). Immunhistochemische Untersuchungen zeigten periläsional eine signifikant erhöhte neuronale, astrozytäre und mikrogliale Expression von EAAT2 nach CCI zum Zeitpunkt 3 d im Vergleich zu SHAM (6). Andere Studien zeigten für den selbigen Zeitraum eine Reduktion von EAAT2 im periläsionalen Cortex, dabei ohne signifikante Veränderung nach 7 d (222). Weitere Arbeiten wiesen wiederum immunhistochemisch genau 7 d nach SHT eine reduzierte Expression nach (224).

Im Vergleich zu EAAT1 und EAAT2 wurde die Expression der weiteren Glutamattransporter deutlich weniger intensiv untersucht. Für die durchgeführten Studien ist zu berücksichtigen, dass diese zum Teil ein älteres Publikationsdatum aufweisen.

Für EAAT3 zeigte sich dabei keine Veränderung der kortikalen Expression 6 h und 24 h nach LFPI (221, 225). Im Hippocampus zeigte sich zudem eine unveränderte EAAT3 Expression 7 d nach temporärer Ischämie (226). Für EAAT4 zeigte sich die mRNA Expression 24 h nach SHT unverändert (221). Jedoch konnte eine erhöhte astrozytäre Proteinkonzentrationen von EAAT4 immunhistochemisch und mittels Western Blot im Hippocampus nach 3 d und 7 d nach LFPI nachgewiesen werden (227). Dabei ist zu beachten, dass der Transporter physiologisch überwiegend neuronal exprimiert wird (16).

2.3.2.2 Zeitabhängige Expression von VGLUTs nach Schädel-Hirn-Trauma

Die zeitabhängige Expression von vesikulären Glutamattransportern nach SHT wurde ebenfalls im Vergleich zu EAAT1 und EAAT2 in deutlich geringerem Umfang untersucht, daher werden auch hier Studien älteren Publikationsdatums mitberücksichtigt. Vesikuläre Glutamattransporter werden dabei in der Immunhistochemie zum Nachweis von Neuronen verwendet. Zudem gibt es einige Studien, die den Einfluss von Exzitotoxizität auf die Expression von VGLUTs in vitro oder durch temporäre Ischämie im Rahmen eines Schlaganfalls in vivo untersucht haben. Diese weisen inhomogenen Ergebnissen auf. Zudem gibt es deutliche Abweichungen in der Pathophysiologie des ischämischen Schlaganfalls und des SHT, sodass die Übertragbarkeit der Ergebnisse limitiert ist.

Zellkulturen von Neuronen des Hippocampus zeigten nach 20-minütiger Behandlung mit 125 μ M Glutamat einen kontinuierlichen Rückgang der Proteinmenge von VGLUT1 und

VGLUT2 mittels Western Blot (228). Nach SHT konnte immunhistochemisch keine kortikale Veränderung von VGLUT1 unmittelbar und nach 7 d festgestellt werden (229).

Im Hippocampus konnte eine signifikant erhöhte VGLUT1 Expression 7 d nach Ischämie mit anschließender Reperfusion beschrieben werden (226). Mittels qPCR zeigte sich ein Ischämie-bedingter Anstieg der mRNA-Expression von VGLUT1 kortikal sowie im dorsalen Striatum 3 d nach Initiierung der Ischämie. Dabei zeigte sich die Expression von VGLUT2 im dorsalen Striatum und in der Großhirnrinde 1 d bzw. 3 d nach der Ischämie erhöht (230). Gleichzeitig berichten andere Studien von einer Herunterregulierung von VGLUT2 in ischämischen Cortexarealen bei gleichzeitig unveränderter Expression von VGLUT1 (231).

Es finden sich aktuell keine Forschungsarbeiten, die die veränderte Expression von VGLUT3 nach SHT untersucht haben. Die Rolle von VGLUT3 an der glutamatergen Signalübertragung ist aktuell noch unklar. Es zeigte sich eine herabgesetzte Expression des Transporters im von Ischämie betroffenen Cortex nach 1 d (231). Weitere Studien, die allgemein die Expressionsrate von VGLUT3 untersucht haben, zeigen eine reduzierte Expression VGLUT3-positiver Zellen im Bereich des dorsalen *Nucleus raphe* bei Mäusen, die chronischem Stress ausgesetzt wurden (232).

2.3.3 Glutamattransporter als therapeutische Targets

Die Darstellung der Expressionsregulation von Glutamattransportern nach SHT hat zudem aktuelle Relevanz, da es in der Forschung bereits mehrere therapeutische Ansätze zur Reduktion des durch Exzitotoxizität-bedingten Schadens gibt (194). Bei diesem spielen neben der Modifikation von Glutamatrezeptoren, EAATs eine wichtige Rolle, um Exzitotoxizität zu reduzieren (168). Systemische Ansätze versuchen beispielsweise durch eine Reduktion des Blutglukoselevels den erhöhten zerebralen Ausstrom von Glutamat zu forcieren und zeigten bereits vielversprechende Ergebnisse (233, 234). In diesem Kontext stellt auch der Einsatz mesenchymaler, mit EAAT2 kombinierter Stammzellen, einen möglichen Therapieansatz dar (235).

Die Modifikation der Expression astrozytärer Glutamattransporter, insbesondere von EAAT2 bietet einen weiteren Ansatzpunkt zur therapeutischen Intervention. Es gibt diverse Faktoren, die die Expression von EAAT2 auf transkriptioneller Ebene erhöhen können. Beta-Laktam Antibiotika, insbesondere Ceftriaxon, sind als bereits zugelassenes Medikament dazu über den NF- κ B Signalweg in der Lage (5). Allerdings konnten klinische Studien die erfolgsversprechenden präklinischen Ergebnisse nicht reproduzieren (236).

Das Molekül LDN/OSU 0212320 (LDN) ist ein translationaler Aktivator von EAAT2. In der Behandlung des ischämischen Schlaganfalls mit LDN im Tiermodell zeigt die Interventionsgruppe ein im Vergleich zur Kontrollgruppe reduziertes Infarktgebiet (4). Es

konnte hierbei gezeigt werden, dass die substanzinduzierte Steigerung der Translation von EAAT2 einen neuroprotektiven Effekt aufweist (237). Allerdings kann LDN trotz Anstieg von EAAT2 die Glutamataufnahme nicht in allen Hirnregionen gleichermaßen beeinflussen (237). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass astrozytäre metabotrope Glutamattransporter in der Lage sind, die Expression von EAAT1 und EAAT2 positiv zu modulieren (238).

Es zeigt sich, dass die Modulation der Expression der Glutamattransporter EAAT1 und EAAT2 bereits eine sich in Forschung befindende therapeutische Strategie ist. Dabei ist ein grundlegendes Verständnis sowohl über die lokale als auch überregionale Veränderung der Expression dieser und weiterer Glutamattransporter nach SHT wichtig, um vorhandene therapeutische Ansätze weiterentwickeln zu können. Gleichzeitig zeigt sich eine in der Literatur unzureichende Datenlage bezüglich der veränderten Expression der vesikulären Transporter VGLUT1, VGLUT2 und VGLUT3 sowie der Transporter EAAT3 und EAAT4 nach SHT. Zudem finden sich inhomogene Ergebnisse vorheriger Forschungsarbeiten bezüglich des Expressionsverhaltens von EAAT1 und EAAT2 nach SHT. Dies macht deutlich, dass es grundlegende Untersuchungen benötigt, um zum einen das Expressionsverhalten von Glutamattransportern eindeutig beschreiben zu können und zum anderen Gründe für die Abweichungen vorheriger Ergebnisse aufzeigen zu können.

Das Ziel dieser Forschungsarbeit ist es daher, anhand wissenschaftlich etablierter Methoden die Veränderung der Expression der beschriebenen Glutamattransporter nach kontrolliertem SHT mittels CCI zu untersuchen und vereinheitlicht darzustellen.

3. Material

3.1 Geräte

Gerät	Typ	Hersteller
Blotkammer	Mini Trans Blot System	BioRad, Hercules, US
Detektionssystem	GloMax®-Multi+ Detection System	Promega, Mannheim, DE
Elektrophoresekammer	Mini Protean Elektrophoresis	BioRad, Hercules, USA
Flächenkamera	acA1300-60gm - Basler ace	Basler AG, Ahrensburg, DE
Fluoreszenz-Detektionssystem	Odyssey®	Li-Cor Biosciences, Bad Homburg, DE
Gaszufuhr	Flowmeter Unit 760	Siemens AG, Erlangen, DE
Heizblock	Thermomixer confort	Eppendorf, Hamburg, DE
Homogenisator	Mastermill MM 300	Retsch Technology GmbH, Haan, DE
Impactor	Controlled Cortical Impactor	Kopacz, Mainz, DE
Inhalationsnarkosekammer		Sciencelab.cam Inc., Houston, USA
Inkubator	Inkubator IC 8000	Drägerwerk AG, Lübeck, DE
Käfige	Filtertopkäfig Typ-II lang	Bioscape GmbH, Castrop-Rauxel, DE
Kryostat	Microm Cryostar NX70	Thermo Fischer, Walldorf, DE
Lasermikroskop	LSM 5 Exciter	Zeiss, Jena, DE
Laserquelle	Lasos LGK 7812 ML-1/LGN 7812	Lasos Lasertechnik, Jena, DE
Luftstromschrank	UniProtect THF 3378-VO2	Bioscape, Castrop-Rauxel, DE
Magnetrührer	Ikamag Ret	Janke und Kunkel, Staufen, DE
	MR 3001	Heidolph, Schwabach, DE
Mikrobohrer	Uni-Drive N Kompletgerät	Praggen, Starnberg, DE
Mikropipetten	Reference®, Research® 10 Mikroliter (µl), 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg, DE
Mikroskopkamera	Axiocam 105 color	Zeiss, Jena, DE
Mikroskop	Stemi 305	Zeiss, Jena, DE
Operations-Mikroskop	Technoskop OPMI 11	Zeiss, Jena, DE
Photometer	NanoVue™	GE Healthcare, Chalfont St. Giles, DE
Plattformschüttler	Unimax 2010	Heidolph, Schwabach, DE
Quantitative RT-PCR Analysator	LightCycler® 480	Roche Diagnostics, Mannheim, DE
Rota-Rod	RS232/LE8200	Hugo Sachs, March Hugstetten, DE
Stereotaxierahmen		Kopf Instruments, Tujunga, USA
Temperatursteuerung	TCAT-2DF Controller	Harvard, New Jersey, USA
Tiefkühlschrank -20 Grad Celsius (°C)	UPUL 540	Liebherr, Ochsenhausen, DE

	Liebherr GG 5210 ProfiLine	Liebherr, Ochsenhausen, DE
Tiefkühlschrank -80 °C	MDF-U74V	Sanyo Electric Co., Osaka, J
Vapor	Vapor 19.3 Isofluram	Dräger, Lübeck, DE
Vortex	Reax control	Heidolph, Schwabach, DE
Waagen	CS 200	Ohaus, Pine Brook, US
	Sartorius 1702	Sartorius, Göttingen, DE
Zentrifugen	Centrifuge 5804 R	Eppendorf, Hamburg, DE
	Micro Star 17 R	VWR, Darmstadt, DE
	Haraeus Pico 17	Thermo Scientific, Walldorf, DE
	Megafuge 1.0	Thermo Scientific, Walldorf, DE

Tabelle 3 Material – Geräte

3.2 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Absolute Blue qPCR SybrgreenMix	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Ammoniumpersulfat (APS)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Aqua destillata	Braun Melsungen AG, Melsungen, DE
Bovines Serumalbumin A	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Chameleon™ Duo Prestained Protein Ladder	Li-Cor, Lincoln, USA
Chloroform	Merck, Darmstadt, DE
DC TM Protein Assay Reagent (A,B,S)	BioRad, Hercules, USA
DyNAmo™ ColorFlash Probe qPCR Kit	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
Ethanol absolut	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Ethylendiaminetetraacetat (EDTA)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Flüssigstickstoff	Air Liquide, Düsseldorf, DE
g (genomische) DNA Eliminator	Qiagen N.V., Venlo, NL
Glutaraldehyd	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Glycin	Applichem, Darmstadt, DE
Kresylviolett	Merck, Darmstadt, DE
LightCycler® 480 Probes Master	F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, CH
Magermilchpulver	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Magic Marker XP Western Standard	Invitrogen, Carlsbad, USA
Maxima Probe qPCR Master Mix	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
Methanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Natriumdodecylsulfat (SDS)	BioRad, Hercules, USA
Nonidet P-40 (NP-40)	Applichem, Darmstadt, DE
PagerRuler Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, DE
PonceauS	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Prestained Full-Range Rainbow Marker	GE Healthcare, Buckinghamshire, GB
Proteaseinhibitor	Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, DE

QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen N.V., Venlo, NL
Ribonuklease (RNase) freies Wasser	Fermentas, St. Leon Rot, DE
RNeasy Mini Kit	Qiagen N.V., Venlo, NL
Roti®-Histokitt	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Roti®-Histol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Rotiphorese® 10 x SDS-PAGE	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Rotiphorese® Gel	30 Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Salzsäure (HCl)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan (Tris)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, DE
Tween-20	GE Healthcare, Buckinghamshire, GB
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Tabelle 4 Material – Chemikalien

3.3 Puffer und Lösungen

Lösung	Zusammensetzung / Hersteller
0,1% Triton-X und 0,1% Natrium-Citrat-Lösung	0,1 Gramm (g) Gewicht pro Volumen (w/v) Natrium-Citrat + 0,1% Volumen pro Volumen (v/v) Triton-X in 100 ml Wasser
5% BSA-Lösung	5 g (w/v) in 100 ml Tris-buffered saline with Tween20 (TBST)
5% Magermilch-Lösung	5 g (w/v) in 100 ml TBST
Agaroselösung	4 g (w/v) in 100 ml Wasser
Blockierlösung: Immunhistochemie	0,5% BSA, 5% NGS in 0,1% PBST
Blotpuffer	25mM Tris, 192 mM Glycin, 0,1% (v/v) SDS, 20% (v/v) MeOH
Kresylviolett-Lösung	0,031 mM Kresylviolett, 20 % (v/v) Ethanol
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (engl. <i>Phosphate buffered saline</i> , PBS)	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 6,5 mM Na ₂ PO ₄ , 1,5 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,5
radioimmunoprecipitation assay (RIPA)-Puffer	50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1mM EDTA, 1% NP-40, 0,1% SDS
RNA-Reinigungs- und Elutions-Puffer (engl. <i>RNA purification elution buffer</i> , RPE-Puffer)	Qiagen N.V., Venlo, NL
Puffer zum Waschen von Reagenzien (engl. <i>Reagent wash transfer buffer</i> , RWT- Puffer)	Qiagen N.V., Venlo, NL
SDS-Ladepuffer	0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 10% (w/v), SDS, 20% (v/v) Glycerin, 5% (v/v) β-Mercaptoethanol, 01% (w/v) Bromphenolblau
Tris-gepufferte Salzlösung (TBS)	15 mM NaCl, 5 mM Tris, 0,2 mM HCl, pH 7,4 / + 0,05 % (v/v)
TBST	TBS + 0,05 % (v/v) Tween-20
Trenngelpuffer	150 mM Tris, 4 % (v/v) SDS, pH 8,8
Vehikel (-lösung)	PBS mit 0,01 % Tween 80

Tabelle 5 Material – Puffer und Lösungen

3.4 Pharmaka

Pharmakon	Handelsname	Hersteller
Dexapanthenol	Bepanthen-Augensalbe®	Bayer Vital, Leverkusen, DE

Carprofen	Rimadyl	Zoetis, Parsippany, NJ, USA
Lidocain	Lidocain B. Braun	B.Braun Melsungen GmbH, Melsungen, DE
Isofluran	Forene®	Baxter, Unterschleißheim, DE
Kochsalzlösung 0,9%	Isotone Kochsalz-Lösung 0,9% Braun	B.Braun Melsungen GmbH, Melsungen, DE
n-Butyl-2-Cyanoacrylat	Histoacryl®	B.Braun Surgical, Rubí, ES
Alkoholisches Hautantiseptikum	Octeniderm®	Schülke Mayr, Norderstedt, DE

Tabelle 6 Material – Pharmaka

3.5 Verbrauchsmaterialien

Material	Typ	Hersteller
96-Well Platte		Greiner Bio One GmbH, Frickenhausen, DE
Chirurgisches Nahtmaterial	Prolene 6-0	Ethicon, San Lorenzo, USA
Deckgläser	24 x 60 mm	Diagnoal GmbH, Münster, DE
Einbettmedium	NEG 50TM	Richard Allan Scientific, Thermo Scientific, Dreieich, DE
Einstreu	Lignocel® FS 14	J.Rettenmaier & Söhne GmbH&Co. KG, Rosenberg, DE
Einwegspritzen	BD Discardit™ II	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, DE
	Injekt®-F	B.Braun Melsungen AG, Melsungen, DE
Faltenfilter		Macherey-Nagel, Düren, DE
Kompressen	10 x 10 Zentimeter (cm)	MaiMed GmbH, Neuenkirchen, DE
Kryoboxen		Ratiolab GmbH, Dreieich, DE
LightCycler Kapillaren		Roche, Mannheim, DE
Mikropipettenspitzen	Safe Seal SurPhop 1000 µl, 300 µl, 10 µl	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, DE
	Tip One 1000 µl, 200 µl, 10µl	Starlab International GmbH, Hamburg, DE
	1000 µl, 200 µl, 10 µl	Sarstedt, Nürnberg, DE
Mikrotomklinge	Feather® Microtome Blade C35	Feather Safety Razor Co., Osaka, J
Mini-Spinsäule		Quiagen, Hilden, DE
Nitrozellulosemembran		Thermo Fisher Scientific, Walldorf, DE
Objektträger	Superfrost® plus	Thermo Scientific, Braunschweig, DE
PCR-Reaktionsgefäße	PCR SoftTubes, 0.5 ml	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, DE

Reaktionsgefäße	Falcon® 50 ml; 15 ml	Greiner Bio One GmbH, Frickenhausen, DE
	Safe-Lock (2,0 ml; 1,5 ml; 0,5 ml)	Eppendorf, Hamburg, DE
Saugtupfer	Sugi® Sponge Points	Kettenbach, Eschenburg, DE
Schnittstreckerplättchen	Glas, 39,5 mm	Microm, Thermo Fisher Scientific, Walldorf, DE
Skalpell	Cutfix® Fig 11	Aesculap, Tuttlingen, DE
Tierfutter	Maus Zucht Extrudat	ssniff Spezialdiät GmbH, Soest, DE

Tabelle 7 Material – Verbrauchsmaterialien

3.6 Kits

Kit	Hersteller
Absolute Blue qPCR SYBR Green Mix Plus Rox Vial, AB- 4166	Thermo Fisher, Walldorf, DE
DC™ Protein Assay	BioRad, München, DE
Light Cycler 480 Probes Master	Roche, Mannheim, DE
QIAzol Lysis Regent	Qiagen, Hilden, DE
QuantiTect Reverse Transkription Kit	Qiagen, Hilden, DE
RNase-free DNase Kit	Qiagen, Hilden, DE
RNeasy Plus Universal Mini Kit	Qiagen, Hilden, DE

Tabelle 8 Material – Kits

3.7 Antikörper

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller
Anti-GFAP	Kaninchen	1:500	Dako, Hamburg, DE
Anti-EAAT1	Maus	1:1000	Dako, Hamburg, DE
Anti-CD68	Schaf	1:500	Dako, Hamburg, DE
Anti-Kaninchen Alexa Fluor® 568	Ziege	1:500	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Anti-Maus Alexa Fluor® 488	Ziege	1:500	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Anti-Schaf Alexa Fluor® 633	Ziege	1:500	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
IRDye® 800CW Anti-IgG	Ziege	1:15000	LI-Cor, Bad Homburg, DE

Tabelle 9 Material – Antikörper

3.8 Primer

Target	Primer	Basenabfolge 5' -> 3'
VGLUT1 (SLC17A7)	VGLUT1 F	GCAAGTACATCGAGGACGCCAT
	VGLUT1 R	GCCACGATGATGGCATAGACTG
VGLUT2 (SLC17A6)	VGLUT1 F	GAGAGGAGTAGACTGGCAACCA
	VGLUT1 R	CTGAAGACCAGCCAGTGTACTG
VGLUT3 (SLC17A8)	VGLUT3 F	GTCTGTCCCCTCATTGTCCG
	VGLUT3 R	CACAATTCTGGGAGGTGGCT
EAAT1 (Slc1a3)	EAAT1 F	CAACGAAACACTTCTGGGCG
	EAAT1 R	CCAGAGGCGCATACACATT

EAAT2 (Slc1a2)	EAAT2 F	TGCCAACAGAGGACATCAGCCT
	EAAT2 R	CAGCTCAGACTTGGAGAGGTGA
EAAT3 (Slc1a1)	EAAT3 F	GATCTCGTCCAGTTCGGCAA
	EAAT3 R	TGACGATCTGCCCAATGCTT
EAAT4 (Slc1a6)	EAAT4 F	CCGCCAGATCAAGTACTTCTCCT
	EAAT4 R	GCAGAGCTGGAAGAGGTACCC

Tabelle 10 Material – Primer

3.9 Software

Software	Hersteller
Citavi, Version 6.14.4.0	Swiss Academic Software, Wädenswil, CH
ImageJ, Version 1,47v	National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA
Prism 9	GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA
Image Studio, Version 3.1	Li-Cor Biosciences, Bad Homburg, DE
Microsoft® Word für Microsoft 365 MSO, Version 2410	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
Microsoft® Excel für Microsoft 365 MSO, Version 2410	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
Zen 2 (blue edition)	Zeiss, Jena, DE
EthoVision 14	Noldus Information Technology BV, Wageningen; NL

Tabelle 11 Material – Software

4. Methoden

4.1 Tierexperiment

4.1.1 Genehmigung des Tierversuchs

Die durchgeführten Untersuchungen stellen nach Paragraph (§) 7 Absatz (Abs.) 2 des Tierschutzgesetzes (TierSchG) in der Fassung der Bekanntmachung vom 18. Mai 2006 einen Tierversuch dar. Die Haltung der Tiere und die Durchführung des Versuches entspricht den Vorgaben nach § 7 TierSchG sowie den institutionellen Richtlinien der Johannes Gutenberg-Universität Mainz.

Der Versuch ist durch das Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz gemäß § 8 des TierSchG auf Grundlage des Tierversuchsantrags mit dem Aktenzeichen 23 177-07 / G 16-1-022 genehmigt worden.

4.1.2 Studiendesign

Im Rahmen der Zeitreihe wird die Expressionsrate von Glutamattransportern zu den Zeitpunkten 1 d, 3 d und 7 d nach CCI untersucht. Hierfür werden die Versuchstiere in drei Vergleichsgruppen mit jeweils unterschiedlicher Überlebensrate randomisiert. Jede dieser Vergleichsgruppen beinhaltet 20 Tiere, wovon 12 Tieren ein SHT entsprechend des CCI-Modells zugefügt wird und 8 Tiere als Kontrollgruppe scheinoperiert (SHAM) werden (n = 60; davon CCI = 36 und SHAM = 24). Es werden zusätzlich sechs Reservetiere bereitgehalten.

Verhaltensbiologische Untersuchungen, wie die Erhebung des *Neurological Deficit Score* (Neuroscore), die Durchführung des RotaRod- sowie Open-Field-Tests, werden bei allen Versuchstieren am Tag vor der Operation, sowie am ersten postoperativen Tag durchgeführt. Je nach Überlebensdauer erfolgen weitere Untersuchungen in zweitägigen Abständen am dritten, fünften, und siebten postoperativen Tag. Zusätzlich wird in gleichen Abständen das Körpergewicht der Versuchstiere bestimmt (vgl. Abb. 6).

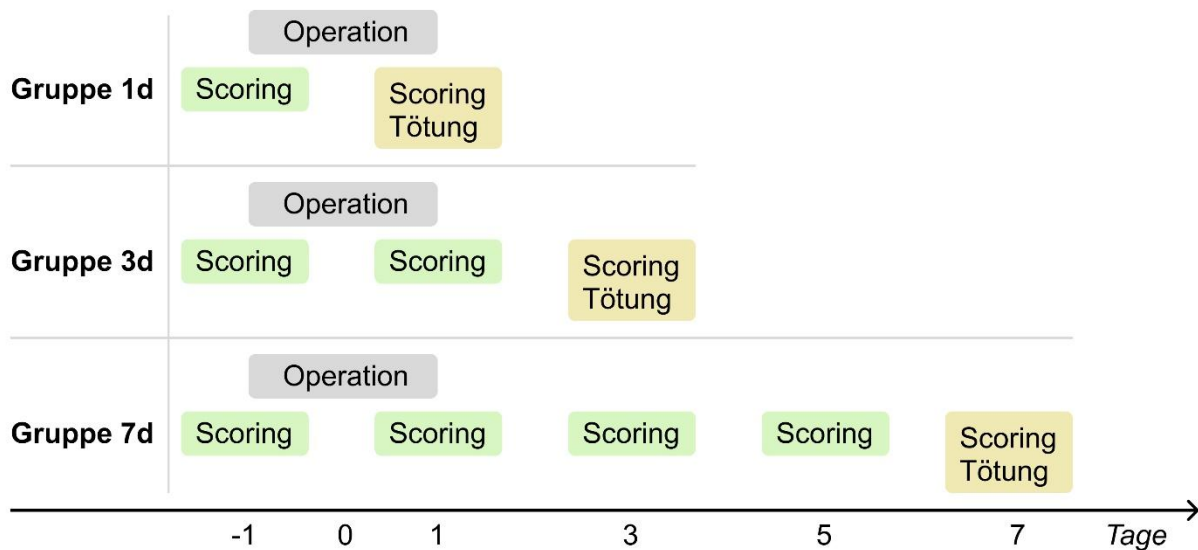


Abbildung 6 Übersicht über den zeitlichen Ablauf des Versuches

Dargestellt sind die Zeitpunkte der jeweiligen Datenerhebung während der vitalen Phase der einzelnen Gruppen mit unterschiedlicher Überlebenszeit. Unter Scoring wird zusammenfassend die Erhebung des Neuroscores, die Durchführung des RotaRod-Tests, sowie der Open-Field-Test bezeichnet. Zusätzlich wird bei jedem Scoring das Gewicht des Tieres bestimmt. Dieses wird ebenfalls unmittelbar präoperativ bestimmt.

4.1.3 Versuchstiere, Haltung und Pflege

In den Versuch werden insgesamt 66 männliche Mäuse (*Mus musculus*) mit einem genetischen Wildtyp C57BL/6JRj (Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, Frankreich), einem Alter von 84-86 Tagen und einem initialen Körpergewicht von 24,5 - 30,3 g eingeschlossen.

Die Tiere werden 24 h vor Beginn des Experiments in ihre Käfige umgesetzt. Dabei teilen sich zwei Versuchstiere einen Käfig, zur Unterscheidung wird eines der Tiere mit einer Ohrenstanze markiert. Die Käfige sind ausgestattet mit entkeimter Einstreu, trinkwassergefüllten Flaschen und Futterpellets, welches den Tieren *ad libidum* zur Verfügung steht. Als Nestbaumaterial und Rückzugsmöglichkeit dienen Kunststoffrollen und Papierhandtücher. Die Käfige befinden sich in einem Luftstromschrank, der eine konstante Temperatur von 22 °C und Luftfeuchtigkeit von 55 % gewährleistet. Durch die Beleuchtung innerhalb des Schrankes wird eine regelmäßige zirkadiane Tag-Nacht-Rhythmik von jeweils 12 h eingehalten. Es erfolgt eine tägliche Kontrolle des Wohlergehens der Mäuse mit Überprüfung und Aufrechterhaltung des Nahrungsmittelbestands sowie eine Messung des Körpergewichts in zweitägigem Abstand.

Gemäß den Vorgaben der Universitätsmedizin Mainz sind Abbruchkriterien zu definieren, bei denen belastete Tiere zu töten sind. Ein Gewichtsverlust von über 15 % in einer Kombination mit einer Schmerzsymptomatik, die sich etwa durch Zähneknirschen, aufgestelltes Rückenfell oder Krämpfe präsentiert, sowie eine Reduktion der Bewegung oder Vigilanzminderung, welche keinen direkten Zusammenhang zur Operation zeigt, bedarf einer unmittelbaren

veterinärmedizinischen Evaluation. Sofern ein Tier vor Beendigung des Versuches getötet werden muss, erfolgt dies durch zervikale Dislokation nach vorheriger Narkotisierung.

4.2 Operatives Vorgehen

4.2.1 Präoperative Maßnahmen

Vor der Operation wird jedes Tier auf seine körperliche Unversehrtheit hin überprüft und das präoperative Körpergewicht bestimmt. Analgetisch wird 30 Minuten (min.) vor Beginn der Narkose 4 mg/kgKG Carprofen injiziert. In einer Inhalationskammer erfolgt die Narkoseeinleitung mit 4 Volumen (Vol.) % Isofluran für 45 s. Anschließend wird am temporalen Schädel lokalanästhetisch 5 mg/kgKG 0,5 % Lidocain subkutan injiziert. Dann kann das Tier in einen stereotaktischen Rahmen transferiert und mit den Schneidezähnen eingespannt werden. Über eine abgedichtete Maske erfolgt die kontinuierliche Gabe von 1-2 Vol. % Isofluran mit einem Flow von 0,5 l/min Frischluft und 1,0 l/min Sauerstoff. Die Kontrolle der Narkosetiefe erfolgt durch Überprüfung des Zwischenzehenreflexes der hinteren Extremität. Eine ausbleibende Reflexantwort zeigt hierbei eine ausreichende Narkosetiefe. Die Körpertemperatur wird während der Operation konstant gehalten. Das Versuchstier liegt dafür auf einer Wärmeplatte mit einer Temperatur von 36,5 °C. Durch eine rektal eingeführte Temperatursonde wird die Körpertemperatur invasiv gemessen. Auf die geschlossenen Augen der Mäuse wird Bepanthen-Salbe aufgetragen, um diese vor Austrocknung zu schützen.

4.2.2 Induktion des Schädel-Hirn-Traumas

Die Induktion des SHT erfolgt nach CCI-Modell im Bereich des rechten Motorcortex. Hierfür wird zu Beginn mit einem geraden Hautschnitt einer Länge von etwa 1,5 cm über der Sutura coronaria bis zur Sutura lambdoidea das subkutane Fettgewebe freigelegt. Dieses wird vorsichtig zur Seite präpariert, sodass das Periost zum Vorschein kommt. Das Periost wird mittels eines Wattestäbchens nach rechts paramedian vom Knochen verlagert. Dadurch kommt die freigelegte Schädelkalotte zum Vorschein. Mit einer Knochenfräse erfolgt die Eröffnung der Schädelhöhle durch die Ausfräsung eines Knochendeckels. Dabei wird ein Quadrat mit einer Seitenlänge von ca. 5 mm von der Sutura sagittalis nach rechts lateral ausgehend freigelegt, die Sutura selbst wird dabei nicht durchtrennt, sodass der Knochendeckel mit Scharnierwirkung entlang der Sutura sagittalis nach medial hin aufgeklappt werden kann. Im Rahmen der Kraniotomie bleiben die Dura mater und die darunterliegenden Strukturen intakt. Der Impaktor wird im Bereich der dorsalen rechten Hemisphäre platziert, sodass dieser leicht dem Gehirn aufliegt, ohne dieses zu verletzen. Anschließend wird der Impaktor mit einer Stellschraube fixiert und die sichere Lagerung der Maus überprüft. Daraufhin wird das SHT induziert. Zur Gewährleistung gleicher Versuchsbedingungen wird bei jeder Operation ein pneumatischer Bolzen mit einem Durchmesser von 3 mm, einer

Eindringtiefe von 1,5 mm, einer Geschwindigkeit von 6 m/s und insgesamten Aufpralldauer von 200 ms verwendet. Nach erfolgtem Impakt wird der Knochendeckel wieder zurückgeklappt. Das Kraniotomiefenster wird mit Histoacryl-Gewebekleber sauber verschlossen, um eine Kompartiment-Verlagerung nach extrakranial zu verhindern. Der kutane Wundverschluss erfolgt durch Einzelknopfnähte.

Postoperativ wird die Atemmaske und die Temperatursonde entfernt, das Tier wird vorsichtig aus dem Stereotaxie-Rahmen gelöst und zum postoperativen Monitoring in einen Inkubator gelegt. Dort wird es bei einer konstanten Temperatur von 33 °C und 35 % Luftfeuchtigkeit für einen Zeitraum von 4,5 h überwacht.

4.2.3 Scheinoperation

Das operative Vorgehen ist bei den scheinoperativen Tieren bis zur Freilegung der Schädelkalotte identisch. Allerdings erfolgt weder eine Kraniotomie noch die Induktion des SHT. Stattdessen wird mit einem Wattestäbchen die Kalotte leicht angekratzt und im Anschluss die Haut wieder verschlossen. Die Narkosedauer wird bei beiden Gruppen mit etwa 15 min annähernd gleich gehalten. Die Tiere der SHAM-Gruppe erhalten die gleiche postoperative Versorgung wie die Tiere der CCI-Gruppe.

4.3 Verhaltensbiologische Untersuchungen

4.3.1 Neuroscore

Die Erhebung des Neuroscores dient der Quantifizierung neurologisch-motorischer Defizite der Maus. Dabei wird ein Score zwischen 0 (keine Defizite) und 15 (erhebliche Defizite) vergeben. Dieser setzt sich zusammen aus den folgenden Teilscores:

Zur Untersuchung der Schreckreaktion wird die Maus auf dem Untersuchungstisch platziert. Der Untersucher klatscht einmal laut in die Hände. Physiologisch läuft die Maus als Reaktion auf diesen externen Reiz los. Bei Ausbleiben des Schreckreflexes durch Nicht-Bewegung der Maus, wird der Score um einen Punkt angehoben (0-1). Im Rahmen der Untersuchung des generellen Verhaltens (*General behavior deficits*) wird kontrolliert, ob die Maus geradeaus läuft (0-1) und ein physiologisches Suchverhalten aufweist (0-1). Die Untersuchung der Koordination (*Coordination*) des Versuchstieres wird durch den *Beamwalk*-Test überprüft. Die Maus überquert eine Strecke von 50 cm auf Balken verschiedener Breite (3 cm; 1,5 cm; 1 cm). Dabei werden Fehlritte (1), sowie Stürze oder fehlendes Überqueren (2) für jede Breite gewertet (0-6). Zur Untersuchung der Balancefähigkeit (*Balance*) wird der Maus ein Stab angeboten, an dem sie sich festkrallt und 10 Sekunden an diesem hält. Stürzt die Maus vorher erhält sie einen Score. Die Untersuchung erfolgt zunächst mit einem eckigen und anschließend mit einem runden Stab (0-2). Bei der Untersuchung des Gangbildes (*Motor*

deficit) wird unterschieden, ob das Tier keine Auffälligkeit (0), eine Parese einer Extremität (1) oder eine Hemiparese (2) aufweist (0-2).

Teilscore	Mögliche Scores	
Allgemeines Verhaltensdefizit	Schreckreflex vorhanden	0
	Schreckreflex nicht auslösbar	1
	Versuchstier kann geradeaus laufen	0
	Versuchstier kann nicht geradeaus laufen	1
	Regelrechtes Suchverhalten	0
	Gestörtes Suchverhalten	1
Koordination	<i>Breite: 3 cm</i>	
	Kein Fehltritt	0
	Mindestens ein Fehltritt	1
	Sturz oder keine Überquerung	2
	<i>Breite: 1,5 cm</i>	
	Kein Fehltritt	0
	Mindestens ein Fehltritt	1
	Sturz oder keine Überquerung	2
	<i>Breite: 1 cm</i>	
	Kein Fehltritt	0
	Mindestens ein Fehltritt	1
	Sturz oder keine Überquerung	2
Balance	<i>Eckiger Stab</i>	
	Versuchstier hält sich für mindestens 10 Sekunden	0
	Versuchstier stürzt innerhalb der ersten 10 Sekunden	1
	<i>Runder Stab</i>	
	Versuchstier hält sich für mindestens 10 Sekunden	0
	Versuchstier stürzt innerhalb der ersten 10 Sekunden	1
Ausprägung der Lähmung	Keine Parese	0
	Parese einer Gliedmaße	1
	Hemiparese	2
Höchstmöglicher Gesamtscore		13

Tabelle 12 Neuroscore

Aufgelistet sind die untersuchten und vergebenen Teilscores mit jeweiliger Punktzahl sowie der höchstmöglichen Gesamtpunktzahl des Neuroscores

4.3.2 RotaRod-Test

Der RotaRod-Test dient der Überprüfung der Koordinations- und Ausdauerfähigkeit des Versuchstieres. Dabei wird untersucht, wie lange die Maus sich auf einen rotierenden Zylinder mit einem Durchmesser von 3 cm halten kann. Sobald der Zylinder zu rotieren beginnt, wird

die Messung gestartet. Anfänglich beträgt die Rotationsgeschwindigkeit 4 Umdrehungen (U) / min, sie wird konstant beschleunigt auf eine maximale Geschwindigkeit von 40 U/min nach 5 min. Kann die Maus sich nicht mehr auf dem Zylinder halten und stürzt, landet diese auf einem Kippschalter, der die Messzeit automatisch stoppt, Die Fallhöhe beträgt dabei 15 cm.

Um sich an die Untersuchung zu gewöhnen, erhält jedes Versuchstier vier Trainingsdurchläufe, deren Zeiten nicht gewertet werden. Für die Untersuchung werden zu den jeweiligen Zeitpunkten pro Versuchstier zwei Messungen durchgeführt und deren Mittelwert gebildet.

4.3.3 Open-Field-Test

Durch die digitale Erfassung der Bewegungen der Maus kann eine Anpassung des Bewegungsprofils nach Schädel-Hirn-Trauma untersucht werden. Das Tracking erfolgt mittels EthoVision XT®-Software.

Die Maus wird hierfür in das Zentrum einer quadratischen Box den Maßen von 42 cm x 42 cm x 42 cm gesetzt. Der Boden der Box wird vollständig von einer über dieser hängenden Kamera erfasst. Sobald die Maus einen virtuellen Kreis mit einem Durchmesser von 15 cm im Zentrum der Box verlässt, wird die Messung gestartet. Im Rahmen dieses Experimentes wird dabei ausschließlich die zurückgelegte Laufstrecke des Tieres in einem Zeitraum von 2 min untersucht. Zwischen den Versuchsdurchläufen wird die Box mit 70 % Ethanol gereinigt.

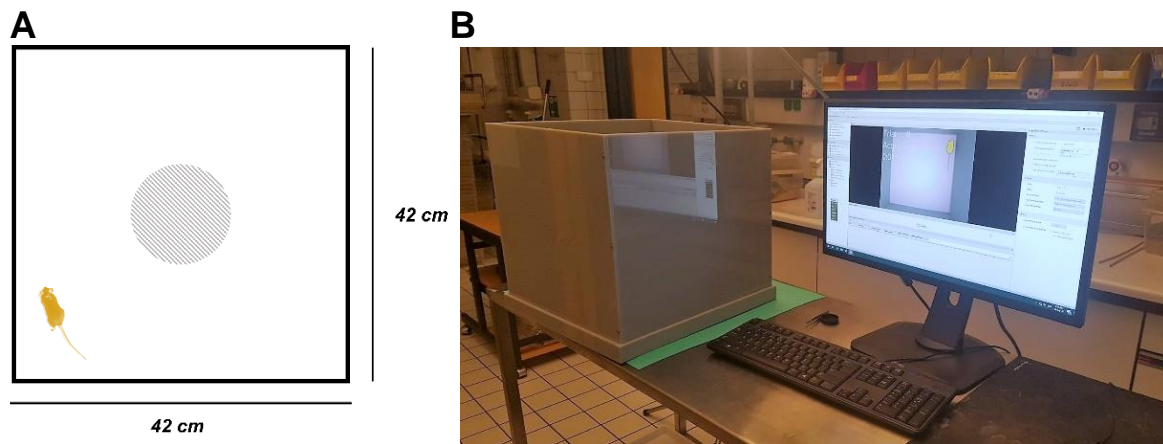


Abbildung 7 Versuchsaufbau – Open-Field-Test

A Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus mit Maßen der Box, mit virtuellem Kreis im Zentrum der Box (schraffiert) und Versuchstier (gelb), **B** Versuchsaufbau unter Laborbedingungen mit Untersuchungsbox (links) und Videotrackingsoftware (rechts)

4.4 Tötung und Hirnentnahme

Die Tötung der Versuchstiere erfolgt der Gruppeneinteilung entsprechend am ersten, dritten oder siebten Tag nach CCI bzw. Scheinoperation. Die Tiere werden in der Inhalationskammer

für 90 s mit 4 % Isofluran narkotisiert. Dies gewährt eine sichere Anästhesie und Analgesie, welche durch das Erlöschen des Zwischenzehenreflexes überprüft wird. Die Tötung erfolgt durch zervikale Dislokation und anschließendem Entbluten. Dafür werden die zervikalen Gefäße der Maus eröffnet. Das Blut wird in einem Eppendorf Gefäß aufgefangen, und anschließend zentrifugiert. Das gewonnene Blutplasma wird abpipettiert und für mögliche Folgeexperimente im Kühlschrank bei -80 °C gelagert.

Für die Entnahme des Gehirns erfolgt die Dekapitation. Die Kopfhaut und das subkutane Gewebe wird sagittal von okzipital nach rostral eingeschnitten und der knöcherne Schädel wird freigelegt. Von ventral ausgehend erfolgt die Öffnung des Schädels mit anschließender Durchtrennung der Hirnnerven. Das Gehirn wird entnommen und unmittelbar in zerkleinertem Trockeneis schockgefroren. Nach 15 min wird das Gehirn in ein beschriftetes Behältnis verpackt und zur Lagerung in einen Kühlschrank bei -22 °C überführt.

4.5 Histologie

4.5.1 Kryosektion

Die Anfertigung von sowohl dünneren Hirnschnitten mit einer Dicke von 12 µm, als auch von Trimmschnitten mit einer Dicke von 60 µm, ist die Voraussetzung für die folgenden histologischen und mikrobiologischen Untersuchungen. Die Schnitte werden mittels Kryostat angefertigt. Dabei wird das Gehirn senkrecht auf dem Probenhalter fixiert, sodass einzig das Cerebellum eine Kontaktfläche mit dem Teller aufweist. Die Schnitte sind demzufolge in koronarer Ebene ausgerichtet. Das Gehirn wird vollständig mit Gefrierschnittmedium eingedeckt und in den Objekthalter eingespannt.

Die Temperatur der Klinge beträgt -23 °C. Die Temperatur des Objektträgers beträgt -21 °C. Das rostral gelegene Rhinencephalon wird vollständig abgetragen und verworfen. Die erste Schnittebene zeigt ausschließlich den präfrontalen Cortex. Von dieser Ebene (Ebene 1; Bregma + 3,14 mm) ausgehend werden im Abstand von jeweils 500 µm 16 Schnittebenen definiert (bis Bregma - 4,36 mm). Die angefertigten Schnitte haben eine Dicke von 12 µm und werden auf Objektträgern fixiert. Dabei werden die ersten zehn Schnitte (Ebene 1-10) auf einen Objektträger überführt und die übrigen sechs Schnitte (Ebene 11-16) auf einen zweiten Objektträger. Um Material für verschiedene Färbungen zur Verfügung zu haben, werden aus jeder Ebene 6 Schnitte gewonnen.

Zusätzlich werden ab Ebene 6 (Bregma + 0,64 mm) bis einschließlich Ebene 13 (Bregma - 2,86 mm) aus dem Bereich zwischen den einzelnen Ebenen Trimmschnitte für die mikrobiologische Auswertung angefertigt (vgl. Abb. 8). Es erfolgen jeweils vier aufeinanderfolgende Schnitte mit einer Dicke von 60 µm. Diese werden übereinandergestapelt, das ventrale Drittel wird abgetrennt und verworfen. Die Hemisphären

werden anschließend geteilt und in separate Probenröhrchen überführt, sodass das ipsilaterale Schadensareal im Vergleich zum unversehrten kontralateralen Areal untersucht werden kann. Proben ab der Ebene 6, 8, 10 und 12 werden für die RNA-Extraktion verwendet, Proben ab der Ebenen 7, 9, 11 und 13 werden für eine mögliche die Proteinextraktion aufbewahrt.

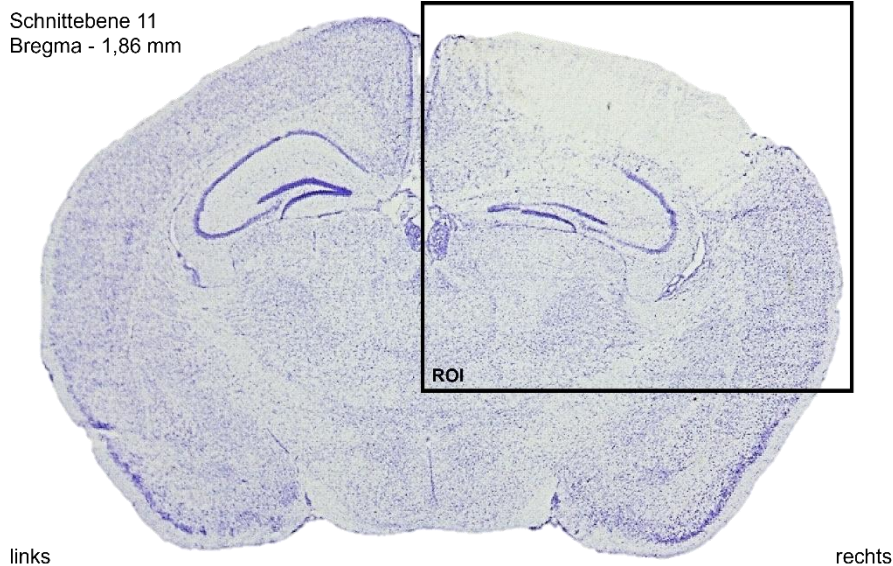


Abbildung 8 Auswahl der Untersuchungsregion zur molekularbiologischen Analyse

Beispielhafte Darstellung des ipsilateralen Bereichs, der zur molekularbiologischen Untersuchung aufbereitet wird (engl. *Region of interest*, ROI), koronare Ebene, murines Gehirn, Kresylviolett-Färbung

4.5.2 Kresylviolett-Färbung

Die Kresylviolett-Färbung ist eine sowohl in der Forschung, als auch in der klinischen Neuropathologie etablierte Färbung zur Darstellung von Nervengewebe (239–241). Der verwendete Farbstoff bindet hier an basophile Strukturen, wodurch die Perikarya der Neurone stärker angefärbt werden. Hirnareale mit einer höheren Dichte an Nervenzellkörpern stellen sich dementsprechend dunkler dar (239).

Zur Gewährleistung optimaler Färbebedingungen werden die Objektträger in die Lösungen eingetaucht und kurz geschwenkt. Zudem ist es erforderlich, dass die Objektträger nach den einzelnen Färbeschritten gut abtropfen, damit eine Verschleppung der Lösung zwischen den Tauchbädern vermieden wird.

Initial werden die Objektträger für 1 h an der Luft getrocknet, anschließend werden die Objektträger für 2 min in 70 % Ethanol eingetaucht, um das Einbettmedium vollständig zu entfernen. Daraufhin erfolgt der Transfer in die Kresylviolett-Arbeitslösung zur eigentlichen Färbung. In dieser verbleiben die Objektträger für insgesamt 10 min. Zur Entfernung von überschüssiger Farbe werden die Objektträger danach zweimal in destilliertes Wasser (lat. *Aqua destilata*; Aqua dest.) eingetaucht. Die darauffolgende Entwässerung erfolgt mittels aufsteigender Ethanol-Reihe. Die Schnitte werden zunächst zweimal kurz in 70 % Ethanol

eingetaucht und im Anschluss zweimal in 96 % Ethanol. Zur Fixierung wird das Intermediärmedium Roti®-Histol verwendet. Dafür werden die Objektträger erst für 5 min und danach für 2 min in das Medium eingetaucht. Abschließend werden die Schnitte mit dem kompatiblen Einschlussmedium Roti®-Histokritt und einem Deckgläschen versiegelt. Die Schnitte werden bei Raumtemperatur (RT) gelagert. Zusammenfassend lässt sich das Vorgehen als Abfolge von Reinigung, Färbung, Entwässerung und Fixierung beschreiben.

4.5.3 Schadensanalyse

4.5.3.1 Bestimmung des Läsionsvolumens

Die Hirnschnitte werden zur weiteren Analyse digitalisiert. Hierfür erfolgt die Aufnahme unter Vergrößerung der Schnitte mittels Lichtmikroskop. Zur Digitalisierung und Durchführung der einzelnen Messungen wird die Mikroskopie-Software ZEISS ZEN 2.0 (blue edition) verwendet.

In jedem Gehirn werden drei Areale vermessen: Die ipsilaterale Hemisphäre, die kontralaterale Hemisphäre, sowie die ipsilaterale Hemisphäre ohne das Läsionsareal. Als Läsionsareal wird der Bereich definiert, welcher sich in durch das Fehlen der violetten Färbung mit einer inhomogenen Struktur vom physiologischen Hirngewebe abgrenzt (vgl. Abb 9C).

Schnittebene 11
Bregma - 1,86

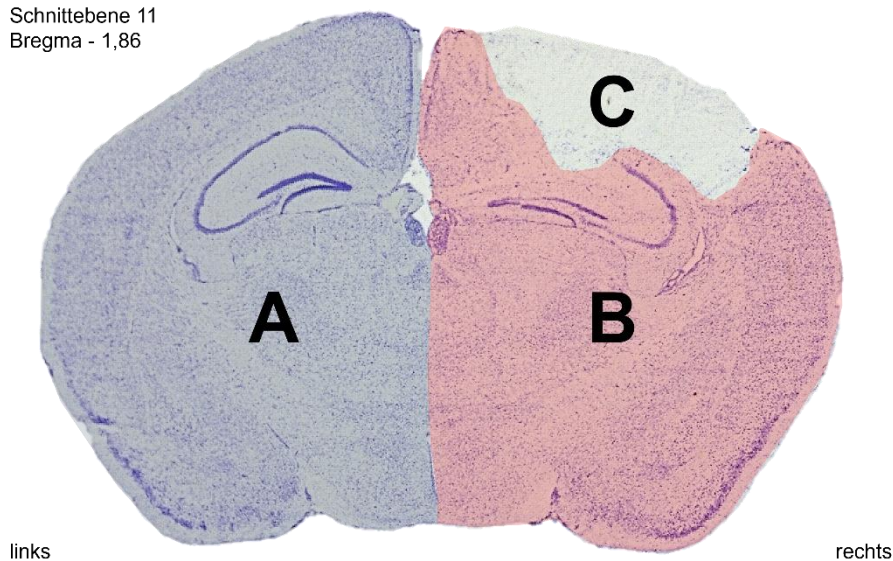


Abbildung 9 Areale der volumetrischen Analyse

Beispielhafter Bildausschnitt mit kontralateralem schadensfreiem Areal (A, blau), ipsilateralem schadensfreiem Areal (B, rot) und farblich nicht hervorgehoben ist das Läsionsareal (rechte Hemisphäre, dorsal, C). koronare Ebene, murines Gehirn, Kresylviolett-Färbung

Die Fläche des Läsionsareals wird durch Subtraktion der Fläche der ipsilateralen Hemisphäre unter Ausparung des Schadensareals von der Fläche der vollständigen ipsilateralen Hemisphäre für alle Schnitte (C_{1-16}) berechnet. Das Läsionsvolumen (V) wird näherungsweise unter der Einbeziehung des Abstands zwischen den einzelnen Schnitten von 500 μm bestimmt und ergibt sich aus:

$$V = \sum_{x=1}^{16} C_x \times 500 \mu m$$

Wie in 4.5.1. Kryosektion beschrieben, erfolgt die die Anfertigung der Hirnschnitte unter anteriorer Aussparung des olfaktorischen Riechhirns (Bregma + 3,14 mm) und posteriorer Hirnregionen (Bregma - 4,36 mm). Die Volumina dieser Bereiche werden folglich für die Berechnung des gesamten Hirnvolumens nicht miterfasst. Die Bestimmung des Läsionsvolumens bleibt davon unberührt, da dieses vollständig von den angefertigten Hirnschnitten erfasst wird.

4.5.3.2 Bestimmung der Dicke der GCL

Die Dickemessung der GCL erfolgt analog den volumetrischen Messungen mit der Mikroskopie-Software ZEISS ZEN 2.0 (blue edition). Dabei erfolgt bei jedem Gehirn die Messung der GCL in den zwei Kryoschnitten, in denen die GCL am prominentesten aufgebaut ist (Bregma - 1,8 bis - 2,3 mm). Dabei werden jeweils drei Abstände im Bereich des medialen, intermediären und lateralen dorsalen Abschnittes der GCL ausgemessen (vgl. Abb. 10). Das arithmetische Mittel der insgesamt sechs Messungen wird für die weitere Auswertung verwendet. Die Dicke der ipsi- und kontralateralen Hemisphäre wird dabei jeweils unabhängig voneinander gemessen.

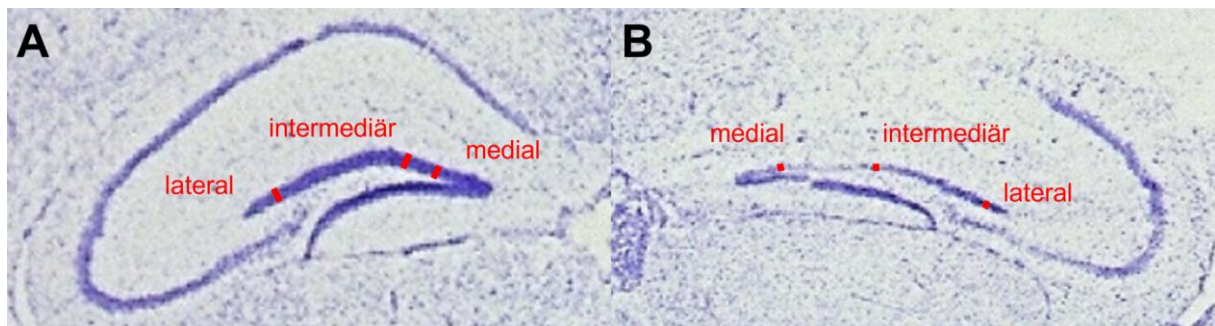


Abbildung 10 Abschnitte zur Dickemessung der GCL

Beispielhafte Darstellung des kontralateralen (A) und ipsilateralen (B) Thalamus zum Zeitpunkt 3d nach CCI, eingezeichnet sind die drei Messpunkte (lateral, intermediär und medial) zur Bestimmung der Dicke der GCL, koronare Ebene, murines Gehirn, Kresylviolett-Färbung

4.6 Immunhistochemie

4.6.1 Immunhistochemische Färbung

Immunhistochemisch werden die immunosensitiven Marker CD68, zur Darstellung proliferierter Mikroglia, und GFAP, zur Darstellung reaktiver Astrozyten, untersucht. Zudem erfolgt die Anfärbung der Glutamattransporter EAAT1 und VGLUT2. Dies geschieht durch spezifisches Anfärben mittels gekoppelter fluoreszierender Antikörper. Es werden ausschließlich die Schnitte der CCI-Gruppe gefärbt. Die immunhistochemische Anfärbung von

CD68, GFAP und EAAT1 erfolgt parallel an den gleichen Hirnschnitten. Für die Anfärbung von VGLUT2 werden eigene Hirnschnitte verwendet.

Die Objektträger werden zu Beginn für 30 min bei RT getrocknet, im Anschluss werden die ausgewählten Schnitte mit einem Markierstift umfahren. Im Rahmen dieses Versuches werden Schnitte mit einer Tiefe von 5,5 mm nach Abtragung des Riechhirns ausgewählt (Ebene 11). Danach erfolgt die Fixierung mit 4 % PFA-Lösung für 10 min mit anschließender Waschung in PBS für zweimal 5 min. Danach werden die Objektträger für 1 h in der Feuchtkammer mit Blockierlösung inkubiert, um die Ausbildung von unspezifischen Bindungen zu reduzieren. Es folgt das Pipettieren der primären Antikörper, die jeweils gegen entsprechende Zielstrukturen gerichtet sind. Diese inkubieren über Nacht bei 4 °C im Kühlschrank. Am Folgetag werden diese dreimal für jeweils 15 min mit PBS gewaschen. Die weiteren Schritte finden in einem abgedunkelten Raum und zusätzlich unter Aluminiumfolie statt, um die Schnitte vor ultravioletter Strahlung zu schützen. Es erfolgt die Aufbringung des sekundären Antikörpers mit anschließender Inkubationszeit von 1 h. Danach werden die Objektträger erneut dreimal für jeweils 15 min mit PBS gewaschen und bei RT getrocknet. Abschließend erfolgt eine Fixierung mit dem nicht-permanenten Eindeckmedium Immu-Mount™ und die Aufbringung eines mechanischen Schutzes in Form eines Deckgläschens. Die Schnitte werden im Kühlschrank bei 4 °C gelagert.

4.6.2 Wahl der Bildausschnitte und Quantifizierung

Die ROI umfasst repräsentative Bildausschnitte im kortikalen Bereich medial und lateral der Läsion, sowie im Bereich des Übergangs zwischen CA3-Region des Hippocampus und CGL des Thalamus. Repräsentative Bildausschnitte werden bei 20-facher Vergrößerung mit dem Konfokalmikroskop aufgesucht und Bildaufnahmen angefertigt (vgl. Abb. 11). Bezogen auf die kontralaterale Hemisphäre gilt hier, dass die Aufnahmen der am Hemisphärenspalt achsensymmetrisch gespiegelten ipsilateralen ROI entsprechen. Die Bildaufnahmen von VGLUT2 erfolgen ausschließlich im Bereich des CGL des Thalamus. Entsprechend der verwendeten sekundären Antikörper werden die Bilder für CD68 bei einer Wellenlänge von 488 nm angefertigt, für GFAP bei einer Wellenlänge von 633 nm und für EAAT1 und VGLUT2 bei einer Wellenlänge von 568 nm. Für die Auswertung wird die Bildanalyse-Software ImageJ verwendet.

Schnittebene 11
5.500 µm

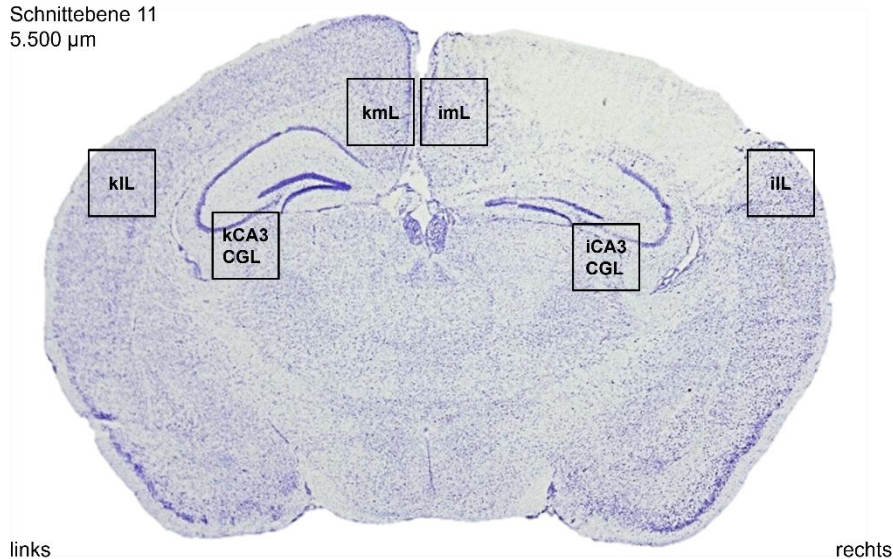


Abbildung 11 Auswahl der Untersuchungsregionen zur immunhistochemischen Analyse

Dargestellt sind die jeweiligen ROI der immunhistochemischen Untersuchung mit **iIL** ipsilaterale Hemisphäre, lateraler periläsionaler Anschnitt; **imL** ipsilaterale Hemisphäre, medialer periläsionaler Anschnitt; **iCA3 CGL** ipsilaterale Hemisphäre, Anschnitt der CA3-Region des Hippocampus und des CGL des Thalamus; **kIL** kontralaterale Hemisphäre, lateraler Anschnitt; **kmL** kontralaterale Hemisphäre, medialer Anschnitt; **kCA3 CGL** kontralaterale Hemisphäre, Anschnitt der CA3-Region des Hippocampus und des CGL des Thalamus, koronare Ebene, murines Gehirn, Kresylviolett-Färbung

4.7 Molekularbiologische Untersuchungen

Molekularbiologisch erfolgt die quantitative Mengenbestimmung der einzelnen mRNAs, welche für die zu untersuchende Transporter codiert. Die Menge an mRNA korreliert mit der Menge an Protein. Dementsprechend kann durch die quantitative Bestimmung der Menge vorhandener mRNA die Expressionsrate der entsprechenden Glutamat Transporter nach CCI untersucht werden.

In einem ersten Schritt wird RNA aus dem Gewebe extrahiert. Anschließend wird aus der gewonnenen RNA komplementäre DNA (engl. *Complementary deoxyribonucleic acid*, cDNA) synthetisiert. Die Mengenbestimmung erfolgt indirekt mittels qPCR.

4.7.1 Extraktion der Ribonukleinsäure

Zur Extraktion der RNA werden die bereits angerfertigten Trimmschnitte mit der Markierung „a“ verwendet (vgl. 4.5.1. Kryosektion). Das Probenmaterial der ipsilateralen Hemisphäre wird separat von der kontralateralen Hemisphäre aufgearbeitet. Genutzt wird das RNeasy Plus Universal Kit von Qiagen. Dabei wird in drei Schritten vorgegangen: Die RNA wird zunächst aufgetrennt, anschließend aufgereinigt und zuletzt wird die Konzentration und der Reinheitsgrad bestimmt.

Die Extraktion erfolgt unter sterilen Bedingungen und wird unter einem Abzug durchgeführt. Das Material wird in ein Röhrchen überführt. 900 µl Qiazol sowie eine kleine Metallkugel werden hinzugegeben. Das Röhrchen wird verschlossen und in den Mastermill bei einer

Frequenz von 20 Hz für 2 min gegeben. Die homogene Lösung wird im Anschluss bei RT für 5 min inkubiert. Um genomische Desoxyribonukleinsäure (engl. *Genomic deoxyribonucleic acid*; gDNA) zu zerstören, werden 100 µl gDNA-Eliminator dem Lysat hinzugegeben und durch einen Vortex für 15 s gemischt. 180 µl Chloroform werden hinzugegeben. Es wird erneut mittels Vortex für 15 s gemischt. Die Lösung wird im Anschluss bei RT für 3 min inkubiert. Es erfolgt die Zentrifugation bei 12000 × Erdbeschleunigung (*g*) und 4 °C für 15 min. Dadurch erfolgt die Phasentrennung. Die untere rötlich-violette Phase besteht aus organischem Material, überwiegend Protein, die mittlere, weißliche Phase enthält DNA und die obere, klare Phase die RNA. Die obere Phase wird vorsichtig abpipettiert und die übrigen Phasen werden verworfen.

600 µl RNA wird in ein Eppendorf Gefäß überführt und mit 600 µl 70 % Ethanol vermischt. Die entstandene Lösung wird auf eine Zentrifugationssäule gegeben. Diese Säule (eine *mini spin column*) verfügt über eine RNA-selektive Silikatmembran. Durch Zentrifugation wird die Lösung durch die Membran geschleust, dabei bleibt die zu gewinnende RNA an der Membran haften. Das hinzugegebene Ethanol begünstigt diesen Effekt. Die Zentrifugation erfolgt bei 8000 × *g* und RT für 15 s. Der sich im Auffangröhrchen befindliche Durchlauf wird verworfen. Anschließend werden 700 µl RWT-Puffer auf die Zentrifugationssäule gegeben und analog verfahren. Es erfolgt die Zentrifugation bei 8000 × *g* und RT für 15 s. Zur Waschung werden noch zweimal 500 µl RPE-Puffer auf die Säule gegeben. Es erfolgt die erneute Zentrifugation bei jeweils 8000 × *g* und RT für 15 s. Zur Nachtrocknung wird die Zentrifugationssäule ohne hinzugegebene Lösung bei maximaler Geschwindigkeit für 1 min zentrifugiert. Dann wird die Säule in ein neues Auffangröhrchen gestellt. 40 µl RNase-freies Wasser werden auf die Säule gegeben. Es erfolgt eine finale Zentrifugation bei 8000 × *g* und RT für 1 min. Das RNase-freie Wasser löst die RNA von der Membran. Das Eluat wird im Auffangröhrchen gesammelt und in ein für jede Probe individuell beschriftetes Reaktionsgefäß überführt.

Anschließend erfolgt die photometrische Bestimmung der Konzentration und des Reinheitsgrads der gewonnenen RNA. Dem Lambert-Beerschen Gesetz folgend ist die Extinktion einer Lösung, die Optische Dichte (OD), proportional zur Konzentration des Stoffes bei seinem Absorptionsmaximum. Das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren liegt bei einer Wellenlänge von 260 nm (242). Zur Bestimmung der Konzentrationen der einzelnen Proben werden 2 µl des gewonnenen Eluats auf das Photometer gegeben. Die Konzentration errechnet sich nach der folgenden Formel:

$$c(RNA) = OD_{260nm} \times Verdünnungsfaktor \times 40 \left[\frac{mg}{dl} \right]$$

Neben der OD bei einer Wellenlänge von 260 nm, wird auch die OD bei 280 nm bestimmt. Hier liegt das Absorptionsmaximum von Proteinen. Durch Bildung des Quotienten kann das

mengenmäßige Verhältnis von RNA und Protein in der Probe bestimmt werden und somit die Reinheit der Probe ermittelt werden. Der Reinheitsgrad wird als ausreichend angesehen, wenn der Quotient zwischen 1,8 und 2,1 liegt.

$$\text{Reinheitsgrad} = \frac{OD_{260nm}}{OD_{280nm}}$$

Die Proben werden gut verschlossen und bis zur weiteren Verwendung im Kühlschrank bei -80 °C eingelagert.

4.7.2 Synthese der komplementären Desoxyribonukleinsäure

Als Ausgangssequenz für die PCR wird ein DNA-Strang benötigt. Darum wird die extrahierte RNA mittels reverser Transkription in eine cDNA überführt. Diese fungiert als Amplicon in der sich anschließenden qPCR. Der eigentlichen reversen Transkription geht eine wiederholte Eliminierung von gDNA voraus. Verwendet wird das QuantiTect Reverse Transcription Kit von Qiagen. Aufgrund der Instabilität des Probenmaterials wird auf Eis gearbeitet.

Zur Eliminierung von gDNA werden 0,5 µg RNA mit 2 µl gDNA Wipeout Puffer in ein Reaktionsgefäß gegeben. Es wird RNase freies Wasser hinzugegeben bis zu einem Gesamtvolumen von 14 µl. Anschließend wird das Gemisch bei 42 °C für 8 min inkubiert.

Für die reverse Transkription werden verschiedene Enzyme, Basen und Pufferlösungen benötigt. Für jede zu untersuchende Probe wird daher ein Mastermix nach dem folgenden Schema angesetzt: 1 µl Quantiscript Reverse Transkriptase, 1 µl Reverse Transkriptase Primer Mix, 4 µl Quantiscript Reverse Transkriptase Puffer. Der Mastermix wird zur RNA-Lösung gegeben und das Reaktionsgemisch bei 42 °C für 30 min inkubiert. Anschließend werden die Proben auf 95 °C erhitzt. Dadurch denaturiert die Reverse Transkriptase und die cDNA-Synthese wird gestoppt. In einem letzten Schritt wird die gewonnene cDNA mit 20 µl RNase freiem Wasser verdünnt, sodass in jeder Probe cDNA in 40 µl Lösung vorliegt. Die Proben werden gut verschlossen und bis zur weiteren Verwendung im Kühlschrank bei -80 °C eingelagert.

4.7.3 Quantitative Real-time Polymerasekettenreaktion

Die PCR ist ein *In-Vitro*-Verfahren zur Amplifikation definierter DNA-Sequenzen. Wie auch bei der natürlichen, in Zellen vorkommenden Amplifikation von DNA (DNA-Replikation), wird die DNA-Doppelhelix aufgespalten und mittels des Enzyms DNA-Polymerase und komplementärer Basen vervielfältigt. Bei der PCR wird die DNA durch im Regelfall etwa 50 Zyklen exponentiell vervielfacht. Es gilt: Die Menge der DNA (d) nach variabler Anzahl an Zyklen (n) mit einer bestimmten Menge an zu Beginn vorhandener DNA (d') beträgt:

$$d = d' \times 2^n$$

Die drei dafür notwendigen Teilschritte laufen im Unterschied zur *in vivo* Amplifikation temperaturabhängig in einem Thermocycler (hier *LightCycler*© 480, von *Roche Diagnostics*) ab. Die Denaturierung erfolgt bei 95 °C. Es werden Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den komplementären Basen der Doppelhelix aufgebrochen, sodass die zwei Einzelstränge separat vorliegen. Bei der folgende Primer Hybridisierung wird das Reaktionsgemisch abgekühlt auf die Temperatur, bei der die verwendeten Primer ihr Bindungsoptimum haben, im vorliegenden Versuch bei 65 °C. Durch die Auswahl geeigneter Primer (*forward* und *reverse*) können selektiv Abschnitte der DNA repliziert werden, je nach Basenabfolge der Primer und daraus resultierender Bindungsstelle an der DNA. Im vorliegenden Versuch werden dementsprechend Zielstrukturen (engl. *Targets*) spezifischer Primer ausgewählt. Die Elongation als dritter Teilschritt erfolgt bei 68 °C - 72 °C. Die Temperatur wird angehoben auf das Arbeitsoptimum der DNA-Polymerase. Die DNA-Polymerase baut aus frei vorliegenden Nukleotiden den in 5'-3' komplementär verlaufenden Strang auf, sodass ein neuer Doppelstrang entsteht. Die verwendete Polymerase ist thermostabil, sie denaturiert trotz der hohen Temperaturen nicht, was den entscheidenden Vorteil mit sich bringt, dass die drei Schritte kontinuierlich ablaufen können. Nach erfolgter Bildung des Doppelstrangs beginnt der Zyklus erneut mit der Denaturierung der Doppelhelix.

Die Besonderheit der qPCR liegt darin, dass in Echtzeit (engl. *Real time*) die Menge an amplifizierter DNA gemessen werden kann (quantitativ). Dies geschieht durch die Beimischung von Fluoreszenzfarbstoffen (hier *SYBR Green*) zum Reaktionsgemisch. Diese können durch Einlagerung in die DNA-Doppelhelix Licht einer bestimmten Wellenlänge absorbieren und Licht einer höheren Wellenlänge emittieren. Die Anzahl an PCR-Zyklen wird in das Verhältnis zum gemessenen Fluoreszenzsignal gesetzt. Das Fluoreszenzsignal korreliert entsprechend mit der Vermehrung der DNA und zeigt einen charakteristischen sigmoidalen Verlauf. In der Anfangsphase sind die Edukte (DNA, Polymerase, Primer, und Nukleotide) ungleich verteilt und es benötigt mehrere Zyklen bis sich effektiv ein exponentielles Wachstum einstellen kann, die log-Phase. Abschließend wird die Amplifikation durch entstandene Produkte selbst gehemmt. Es zeigt sich graphisch ein Plateau, daher Plateau-Phase. Die Software des *LightCycler*-Systems bestimmt in der log-Phase den Schwellenwert, bei dem sich erstmals das Fluoreszenzsignal vom Hintergrundrauschen abhebt (engl. *Crossing point*, CP). Der CP-Wert wird gegen eine mit definierten DNA-Konzentrationen erstellte Standardkurve aufgetragen, um so die ursprüngliche Konzentration zu bestimmen. Abschließend erfolgt die Normalisierung gegen ein Haushaltsgen (engl. *Housekeeping gene*), welches nachweislich nicht reguliert, das heißt unabhängig von äußeren Einflüssen, exprimiert wird. Im Versuch dient als *housekeeping gene* Peptidylprolyl Isomerase A (PPIA), welches nach CCI keine veränderte Expression zeigt.

Verwendet wird der Absolute Blue qPCR Sybrgreen-Assay. Dafür werden pro untersuchter Probe 5 µl SYBR Green, 0,25 µl Forward-Primer, 0,25 µl Reverse-Primer, 3,5 µl RNase-freies Wasser in ein Reaktionsgefäß gegeben, auf dem Vortex gemischt und für 5 s zentrifugiert. Auf eine 96-Well-PCR-Platte wird in jede Reaktionskammer das Gemisch sowie 1 µl der zu untersuchenden cDNA gegeben. Jede Probe wird zur besseren Vergleichbarkeit in zwei Kammern gegeben. Darüber hinaus werden 4 Kammern mit RNase-freiem Wasser als Negativkontrollen befüllt. Sobald alle Proben pipettiert sind, wird die Platte mit einer Folie luftdicht verschlossen und bei 1500 × g für 2 min zentrifugiert. Anschließend werden die Proben im Thermocycler untersucht.

Für den Versuch werden die folgenden Targets untersucht: EAAT1, EAAT2, EAAT3, EAAT4, VGLUT1, VGLUT2, VGLUT3 und PPIA.

4.8 Statistische Auswertung

Für die Sammlung und Speicherung der erhobenen Daten wird die Software Microsoft Excel für Windows 10 verwendet. Für die statistische Auswertung sowie zur Anfertigung der graphischen Darstellungen wurde die Software GraphPad Prism Version 9.0 für Windows 10 verwendet.

Das Signifikanzniveau wird a priori auf $\alpha = 0,05$ festgelegt. Als Outlier-Testung wird der Datensatz mit Rout-T-Test ($Q = 1\%$) untersucht, mögliche Ausreißer werden entsprechend exkludiert. Zum Vergleich von Subgruppen zu einem Zeitpunkt wird bei bestätigter Normalverteilung eine einfaktorielle (engl. *One-way*) Varianzanalyse (engl. *Analysis of variance*; ANOVA) durchgeführt. Es erfolgt die Korrektur des Signifikanzniveaus nach Holm-Sidak. Sofern mehrere Untersuchungszeitpunkte berücksichtigt werden, wird eine zweifaktorielle (engl. *Two-way*) ANOVA durchgeführt., auch hier erfolgt die Korrektur des Signifikanzniveaus nach Holm-Sidak. Die Ergebnisse werden graphisch entweder in Form eines Linien- oder eines Balkendiagramms dargestellt, dabei wird der Mittelwert mit jeweiligem Standardfehler eingezeichnet. Sofern aus Gründen der besseren Lesbarkeit auf die graphische Darstellung des Mittelwerts und der Standardabweichung verzichtet wird, werden diese in der Abbildungsbeschriftung aufgeführt. Das erreichte Signifikanzniveau (p) zwischen zwei Subgruppen wird durch Linien mit entsprechender Markierung graphisch eingezeichnet, dabei gelten die folgenden Abstufungen: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$. Sofern ein Balkendiagramm ein Verhältnis relativ zu einer anderen Subgruppe zeigt, wird das Signifikanzniveau graphisch oberhalb des Balkens eingezeichnet. Die Korrelationsanalyse erfolgt bei vorhergehender Testung auf Normalverteilung nach Pearson. Die Ergebnisse davon werden tabellarisch dargestellt.

5. Ergebnisse

5.1 Körpergewicht

Das Körpergewicht der Vergleichsgruppe mit jeweils unterschiedlichen Überlebenszeiten wurde unabhängig voneinander bestimmt. Abb. 12 zeigt hier das mittlere Körpergewicht der Tiere mit einer Überlebenszeit von 1 d (Abb. 12A), 3 d (Abb. 12B) und 7 d (Abb. 12C). Es werden sowohl Unterschiede innerhalb der Versuchsgruppe (CCI, bzw. SHAM), als auch zwischen den Versuchsgruppen untersucht. Das mittlere Körpergewicht sinkt nach CCI in den Gruppen mit einer Überlebenszeit von 3 d und 7 d mit einem Signifikanzniveau von $p < 0,001$ am ersten postoperativen Tag im Vergleich zum präoperativen Tag (Abb. 12B, C). Nach CCI zeigt sich im Verlauf ein signifikanter Anstieg des Körpergewichtes mit $p < 0,05$ in den Gruppen mit einer Überlebenszeit von 3 d und 7 d (Abb. 12B, C). In der SHAM-Gruppe zeigt sich durch das operationsäquivalente Vorgehen keine signifikante Reduktion des Körpergewichtes. Es kommt in der Gruppe mit einer Überlebenszeit von 3 d zu einem signifikanten Anstieg des Körpergewichtes mit $p < 0,05$ (Abb. 12B). Es zeigt sich in keiner Vergleichsgruppe zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied zwischen dem Körpergewicht der CCI- und SHAM-Tiere.

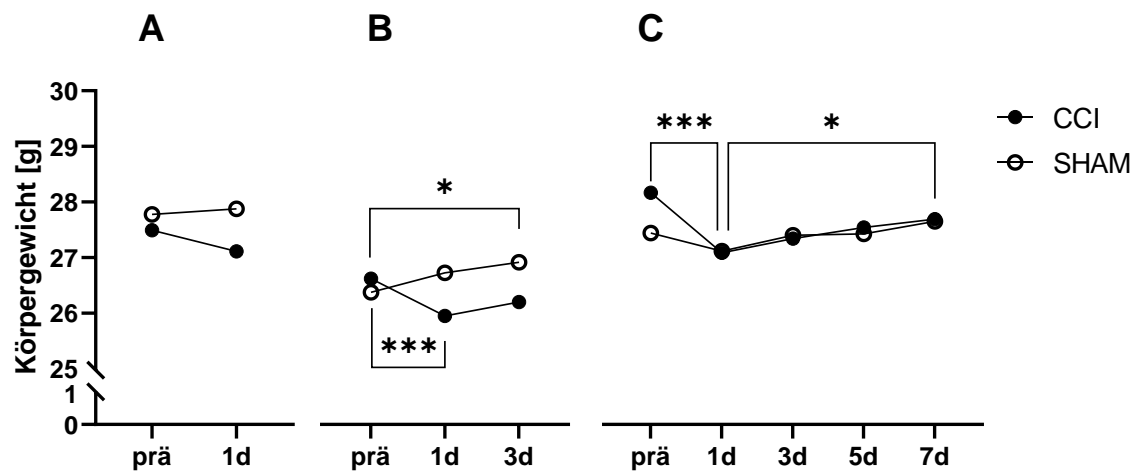


Abbildung 12 Reduktion des Körpergewichts nach CCI

Das Liniendiagramm zeigt das mittlere Körpergewicht der Vergleichsgruppen zu den Untersuchungszeitpunkten einen Tag vor der Operation (prä), am ersten postoperativen Tag (1 d), dritten postoperativen Tag (3d), fünften postoperativen Tag (5d) und siebten postoperativen Tag (7d) entsprechend der jeweiligen Überlebenszeiten der einzelnen Vergleichsgruppe. Zur besseren Darstellung wurde auf die Angabe der Standardabweichung verzichtet. Mittelwert, Standardabweichung und Anzahl der Versuchstiere in der Übersicht: **A** CCI prä $27,49 \pm 1,22$; $n = 12$; 1d $27,11 \pm 1,62$; $n = 12$; SHAM prä $27,78 \pm 1,07$; $n = 8$; 1d $27,88 \pm 0,84$; $n = 8$; **B** CCI prä $26,62 \pm 1,29$; $n = 12$; 1d $25,95 \pm 1,52$; $n = 12$; 3d $26,2 \pm 1,49$; $n = 12$; SHAM prä $26,38 \pm 1,2$; $n = 8$; 1d $26,73 \pm 0,82$; $n = 8$; 3d $26,91 \pm 0,89$; $n = 8$; **C** CCI prä $28,17 \pm 1,45$; $n = 12$; 1d $27,08 \pm 1,32$; $n = 12$; 3d $27,34 \pm 1,4$; $n = 12$; 5d $27,54 \pm 1,6$; $n = 12$; 7d $27,7 \pm 1,58$; $n = 12$; SHAM prä $27,44 \pm 2,06$; $n = 8$; 1d $27,11 \pm 1,93$; $n = 8$; 3d $27,4 \pm 2,02$; $n = 8$; 5d $27,43 \pm 1,99$; $n = 8$; 7d $27,65 \pm 2,05$; $n = 8$; CCI: n (total) = 36, SHAM: n (total) = 24; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; Two-way ANOVA

5.2 Verhaltensbiologische Untersuchungen

Im Rahmen der verhaltensbiologischen Untersuchungen erfolgt die Erhebung des Neuroscores, sowie die Durchführung des RotaRod- und Open-field-Tests. Die Untersuchung der einzelnen Gruppen mit jeweils unterschiedlichen Überlebenszeiten wurde unabhängig voneinander durchgeführt. In den folgenden Abbildungen werden die Ergebnisse der Vergleichsgruppen entsprechend dargestellt.

5.2.1 Neuroscore

In der CCI-Gruppe zeigt sich unabhängig der totalen Überlebenszeit postoperativ ein signifikanter Anstieg des Neuroscores mit $p < 0,001$ im Vergleich zu SHAM (Abb. 13A, B, C). Im weiteren Zeitverlauf kommt es zu einem zu allen Zeitpunkten signifikanten Rückgang des Neuroscores mit $p < 0,001$ (Abb. 13B, C). Es besteht bis zum Ende des jeweiligen Untersuchungszeitraums ein signifikanter Unterschied zwischen CCI- und SHAM-Gruppe mit $p < 0,001$ (Abb. 13A, B, C). In der SHAM-Gruppe zeigt sich zu keinem Zeitpunkt eine signifikante Veränderung des Neuroscores.

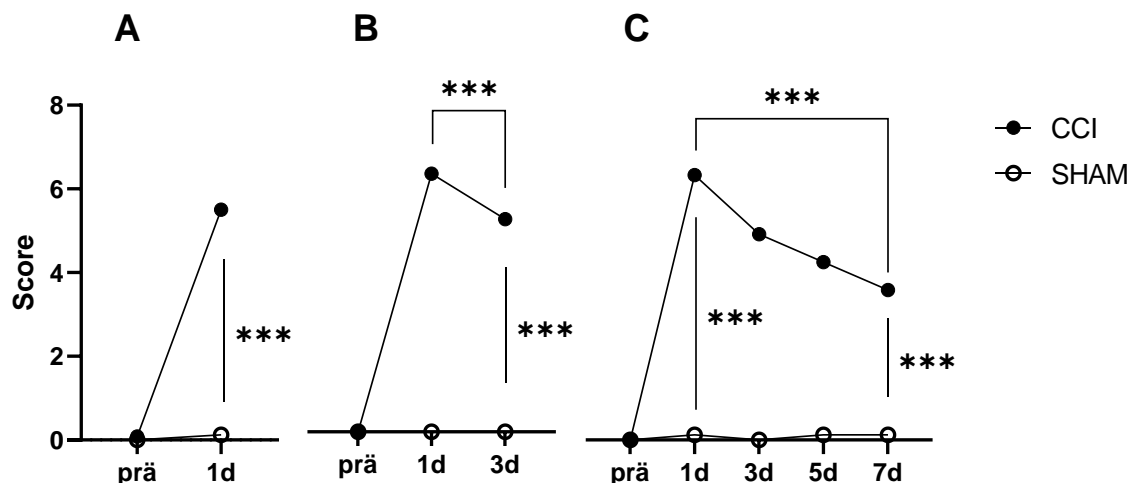


Abbildung 13 Anstieg des Neuroscores nach CCI

Das Liniendiagramm zeigt den Mittelwert des erhobenen Neuroscores der Vergleichsgruppen zu den Untersuchungszeitpunkten einen Tag vor der Operation (prä), am ersten postoperativen Tag (1d), dritten postoperativen Tag (3d), fünften postoperativen Tag (5d) und siebten postoperativen Tag (7d) entsprechend der jeweiligen Überlebenszeiten der einzelnen Vergleichsgruppe. Zur besseren Darstellung wurde auf die Angabe der Standardabweichung verzichtet. Mittelwert und Standardabweichung in der Übersicht: **A** CCI prä 0,08 ± 0,29; n = 12; 1d 5,5 ± 1,17; n = 12; SHAM prä 0,0 ± 0,0; n = 8; 1d 0,13 ± 0,35; n = 8; **B** CCI prä 0,0 ± 0,0; n = 12; 1d 6,17 ± 1,27; n = 12; 3d 5,08 ± 1,0; n = 12; SHAM prä 0,0 ± 0,0; n = 8; 1d 0,0 ± 0,0; n = 8; 3d 0,0 ± 0,0; n = 8; **C** CCI prä 0,0 ± 0,0; n = 12; 1d 6,33 ± 1,5; n = 12; 3d 4,91 ± 0,67; n = 12; 5d 4,25 ± 0,63; n = 12; 7d 3,58 ± 0,79; n = 12; SHAM prä 0,0 ± 0,0; n = 8; 1d 0,13 ± 0,35; n = 8; 3d 0,0 ± 0,0; n = 8; 5d 0,13 ± 0,35; n = 8; 7d 0,13 ± 0,35; n = 8; CCI: n (total) = 36, SHAM: n (total) = 24; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; Two-way ANOVA

5.2.2 RotaRod-Test

Der RotaRod-Test dient als weitere Messgröße der Untersuchung motorischer Fähigkeiten der Maus. In der CCI-Gruppe kommt es zu einer signifikanten Reduktion der Laufzeit zwischen präoperativem und erstem postoperativem Tag bei den Überlebenszeiten 1 d und 3 d mit $p < 0,05$ (Abb. 14A, B). Es zeigt sich ein signifikanter Unterschied der Laufzeit zwischen CCI und SHAM mit $p < 0,01$ bei den Überlebenszeiten 1 d und 7 d (Abb. 14A, C) und $p < 0,001$ bei einer Überlebenszeit von 3 d (Abb. 14B). In der SHAM-Gruppe kommt es zu einem signifikanten Anstieg der Laufzeit mit $p < 0,05$ zwischen präoperativem und erstem postoperativem Tag bei einer Überlebenszeit von 1 d und 3 d (Abb. 14A, B) sowie mit $p < 0,01$ zwischen erstem und drittem postoperativem Tag bei einer Überlebenszeit von 7 d (Abb. 14C).

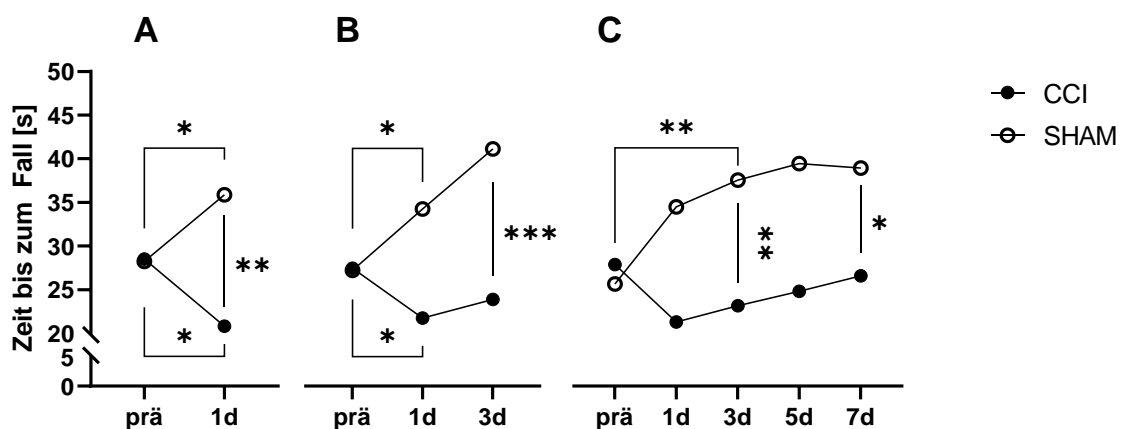


Abbildung 14 Reduzierte Laufzeit nach CCI

Das Liniendiagramm zeigt die Ergebnisse des RotaRod-Tests der Vergleichsgruppen zu den Untersuchungszeitpunkten: präoperativer Tag (prä), erster postoperativer Tag (1d), dritter postoperativer Tag (3d), fünfter postoperativer Tag (5d) und siebter postoperativer Tag (7d) entsprechend der jeweiligen Überlebenszeiten der einzelnen Vergleichsgruppe. Zur besseren Darstellung wurde auf die Angabe der Standardabweichung verzichtet. Mittelwert und Standardabweichung [s] in der Übersicht: **A** CCI prä $28,53 \pm 6,51$; $n = 12$; 1d $20,83 \pm 6,2$; $n = 12$; SHAM prä $28,23 \pm 11,75$; $n = 8$; 1d $35,88 \pm 14,3$; $n = 8$; **B** CCI prä $27,47 \pm 5,64$; $n = 12$; 1d $21,75 \pm 6,76$; $n = 12$; 3d $23,86 \pm 6,86$; $n = 12$; SHAM prä $27,23 \pm 4,07$; $n = 8$; 1d $34,25 \pm 8,18$; $n = 8$; 3d $41,13 \pm 16,46$; $n = 8$; **C** CCI prä $27,86 \pm 10,34$; $n = 12$; 1d $21,29 \pm 7,14$; $n = 12$; 3d $23,17 \pm 5,55$; $n = 12$; 5d $24,83 \pm 6,58$; $n = 12$; 7d $26,58 \pm 5,7$; $n = 12$; SHAM prä $25,65 \pm 5,28$; $n = 8$; 1d $34,5 \pm 9,23$; $n = 8$; 3d $37,56 \pm 8,36$; $n = 8$; 5d $29,44 \pm 16,65$; $n = 8$; 7d $39,94 \pm 12,15$; $n = 8$; CCI: n (total) = 36, SHAM: n (total) = 24; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; Two-way ANOVA

5.2.3 Open-Field-Test

Mittels *Video-Tracking* wurde die in 2 min zurückgelegte Laufstrecke der Versuchstiere untersucht. Nach CCI zeigt sich bei einer Überlebenszeit von 1 d und 7 d ein signifikanter Rückgang der Laufstrecke am ersten postoperativen Tag mit $p < 0,01$, bzw. $p < 0,001$ (Abb. 15A, C). Zudem zeigt sich ein signifikanter Rückgang der Laufstrecke zwischen präoperativem und drittem postoperativem Tag bei einer Überlebenszeit von 3 d (Abb. 15B). In der SHAM-Gruppe zeigt sich ein signifikanter Rückgang der Laufstrecke mit $p < 0,001$ am ersten postoperativen Tag im Vergleich zur präoperativem Laufstrecke bei einer

Überlebenszeit von 3 d und 7 d (Abb. 15B, C). In keiner Vergleichsgruppe zeigt sich ein signifikanter Unterschied der absoluten Laufstrecke zwischen CCI und SHAM.

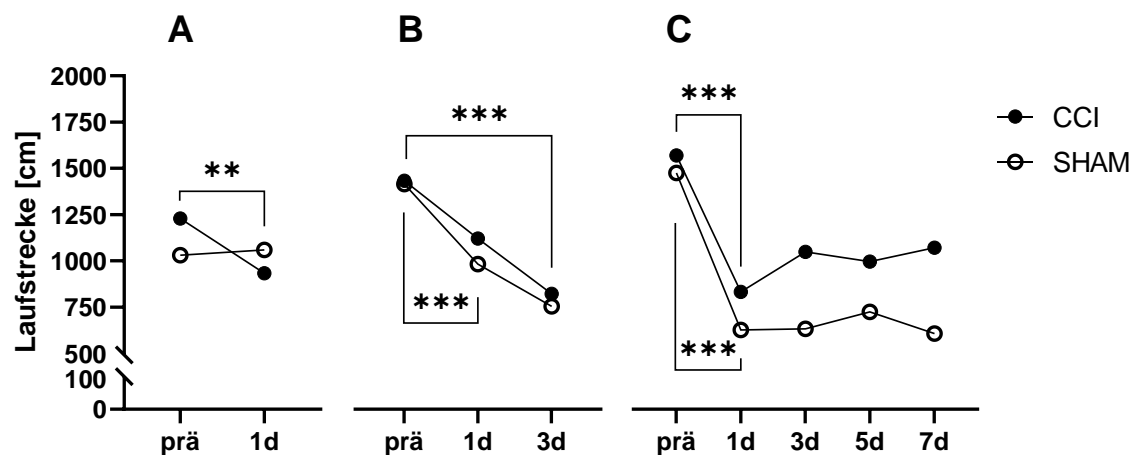


Abbildung 15 Kein Einfluss auf die absolute Laufstrecke durch CCI

Das Liniendiagramm zeigt die zurückgelegte Laufstrecke der Vergleichsgruppen zu den Untersuchungszeitpunkten: präoperativer Tag (prä), erster postoperativer Tag (1d), dritter postoperativer Tag (3d), fünfter postoperativer Tag (5d) und siebter postoperativer Tag (7d) entsprechend der jeweiligen Überlebenszeiten der einzelnen Vergleichsgruppe. Zur besseren Darstellung wurde auf die Angabe der Standardabweichung verzichtet. Mittelwert und Standardabweichung [cm] in der Übersicht: **A** CCI prä $1228,84 \pm 365,24$; $n = 12$; 1d $933,14 \pm 370,13$; $n = 12$; SHAM prä $1031,13 \pm 262,17$; $n = 8$; 1d $1058,6 \pm 393,43$; $n = 8$; **B** CCI prä $1433,67 \pm 204,69$; $n = 12$; 1d $1120,71 \pm 335,05$; $n = 12$; 3d $822,61 \pm 297,67$; $n = 12$; SHAM prä $1414,8 \pm 105,48$; $n = 8$; 1d $983,07 \pm 153,24$; $n = 8$; 3d $754,09 \pm 60,49$; $n = 8$; **C** CCI prä $1570,15 \pm 315,77$; $n = 12$; 1d $832,11 \pm 404,638$; $n = 12$; 3d $1048,68 \pm 605,26$; $n = 12$; 5d $996,17 \pm 495,3$; $n = 12$; 7d $1071,4 \pm 442,1$; $n = 12$; SHAM prä $1474,7 \pm 282,13$; $n = 8$; 1d $626,27 \pm 196,19$; $n = 8$; 3d $632,79 \pm 270,44$; $n = 8$; 5d $724,06 \pm 359,84$; $n = 8$; 7d $607,81 \pm 245,32$; $n = 8$; CCI: n (total) = 36, SHAM: n (total) = 24; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$; Two-way ANOVA

5.3 Volumetrie und Schichtdickenanalyse

5.3.1 Volumetrie

Durch die Messung des Schadenareals der einzelnen Hirnschnitte im Abstand vom 500 μm erfolgt die näherungsweise Bestimmung des absoluten Läsionsvolumens. Es zeigt sich ein signifikanter Rückgang des Schadenvolumens im Zeitverlauf zwischen 1 d und 7 d, und 3 d und 7 d mit jeweils $p < 0,001$ sowie zwischen 1 d und 3 d mit $p < 0,01$ (Abb. 16A).

Analog hierzu erfolgt die näherungsweise Bestimmung der Volumina der ipsi- und kontralateralen Hemisphäre der CCI- und SHAM-Gruppe nach Abtragung des olfaktorischen Riechhirns (Bregma + 3,14 mm) unter Aussparung posterior gelegener Anteile des Gehirns (Bregma - 4,36 mm). Es zeigt sich ein signifikant erhöhtes ipsilaterales Volumen der CCI-Gruppe nach 1 d und 3 d jeweils mit $p < 0,01$ im Vergleich zu SHAM. Zudem zeigt sich im Zeitverlauf eine signifikante Größenminderung der ipsilateralen Hemisphäre zwischen 1 d und 7 d sowie 3 d und 7 d mit $p < 0,001$. Kontralateral zeigt sich keine signifikante Veränderung des Hemisphärenvolumens (Abb. 16B).

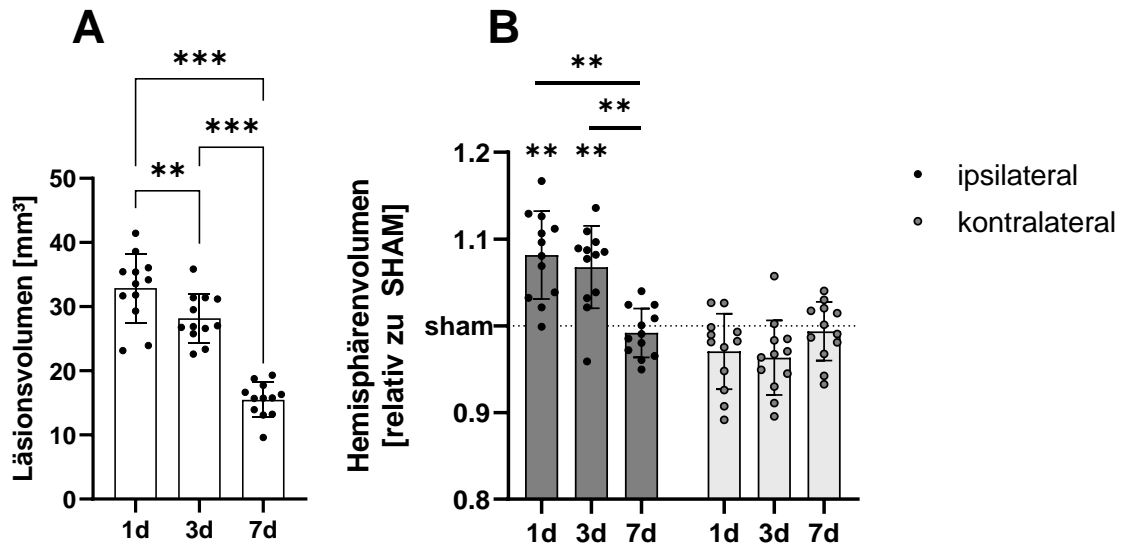


Abbildung 16 Läsionsvolumen und Hemisphärenvolumina im Zeitverlauf nach CCI

A Das Balkendiagramm zeigt das absolute Läsionsvolumen zu den Untersuchungszeitpunkten erster postoperativer Tag (1d), dritter postoperativer Tag (3d) und siebter postoperativer Tag (7d) entsprechend der jeweiligen Überlebenszeiten der CCI-Gruppe; ipsilateral: n = 12, kontralateral: n = 12; * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001; One-way ANOVA; **B** Das Balkendiagramm zeigt das relative Hemisphärenvolumen der CCI-Gruppe zu SHAM zu den Untersuchungszeitpunkten erster postoperativer Tag (1d), dritter postoperativer Tag (3d) und siebter postoperativer Tag (7d) entsprechend der jeweiligen Überlebenszeiten der CCI-Gruppe; ipsilateral: n (pro Überlebenszeit) = 12, kontralateral: n (pro Überlebenszeit) = 12; * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001; Two-way ANOVA

5.3.2 Dicke der GCL

Die Messung der Dicke der GCL des Hippocampus erfolgt mittels Höhenbestimmung in definierter Tiefe (Bregma - 1,8 bis - 2,3 mm) sowie als Mittelwert dreier definierter Abschnitte im Vergleich zum Mittelwert der kontralateralen GCL (Abb. 17A, B).

Nach CCI zeigt sich eine signifikante Höhenminderung an allen Tagen im Vergleich zu SHAM mit p < 0,05 nach 1 d und p < 0,001 nach 3 d und 7 d. Zudem zeigt sich ein signifikanter Rückgang der ipsilateralen Dicke der GCL zwischen 1 d und 3 d mit p < 0,01 sowie zwischen 1 d und 7 d mit p < 0,001. Kontralateral zeigt sich keine signifikante Veränderung der Dicke der GCL (Abb. 17C).

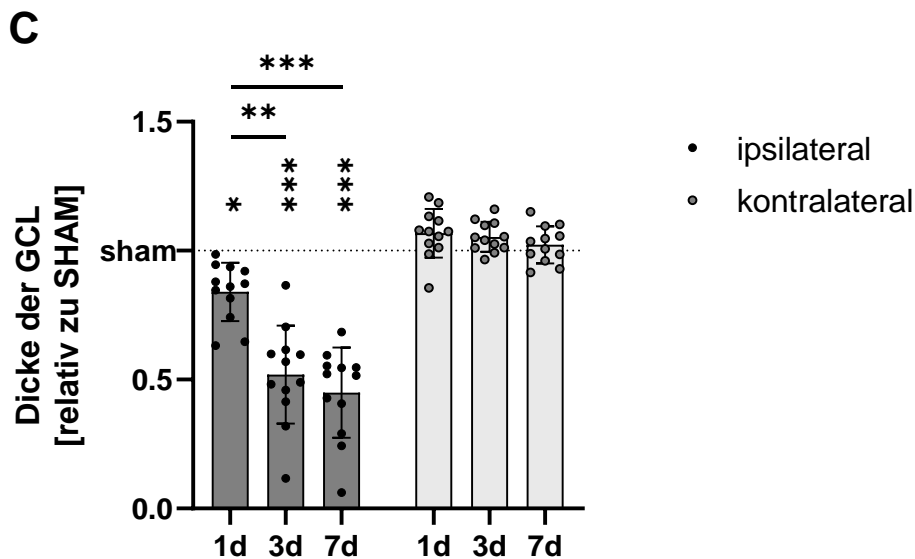
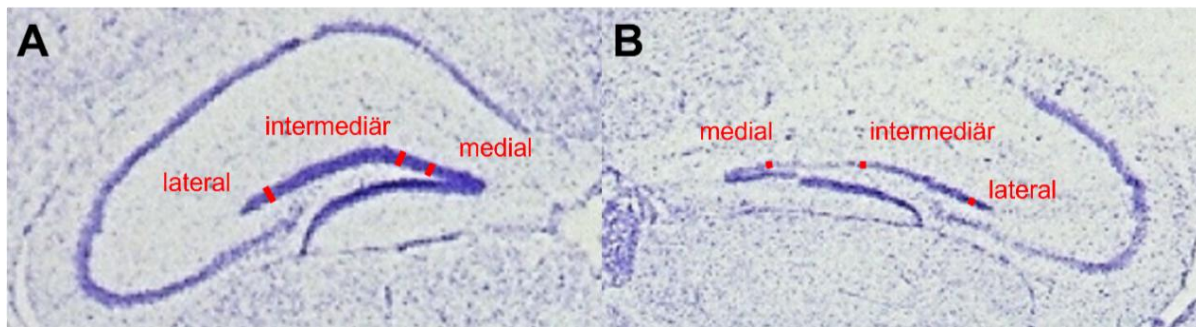


Abbildung 17 Reduktion der Dicke der GCL im Zeitverlauf nach CCI

A, B Beispielhafte Darstellung der Messung der entsprechenden Höhe der GCL in den drei definierten Abschnitten: medial, intermediär und lateral in der kontralateralen (A) und ipsilateralen (B) Hemisphäre; koronare Ebene, murines Gehirn, Kresylviolett-Färbung **C** Das Balkendiagramm zeigt die Dicke der GCL der CCI-Gruppe relativ SHAM zu den Untersuchungszeitpunkten erster postoperativer Tag (1d), dritter postoperativer Tag (3d) und siebter postoperativer Tag (7d) entsprechend der jeweiligen Überlebenszeiten der Vergleichsgruppen; ipsilateral: n (pro Überlebenszeit) = 12, kontralateral: n (pro Überlebenszeit) = 12; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; Two-way ANOVA

5.4 Immunhistochemie

Immunhistochemisch erfolgt die relative Quantifizierung der Proteine GFAP, CD68, EAAT1 nach CCI in a priori definierten Arealen (vgl. 4.6.2 Wahl der Bildausschnitte und Quantifizierung, Abb. 11). Abb. 18 zeigt beispielhaft die Anfärbung im Anschnitt des CGL und der CA3-Region. Zudem erfolgt die isolierte Untersuchung von VGLUT2 im Bereich des CGL.

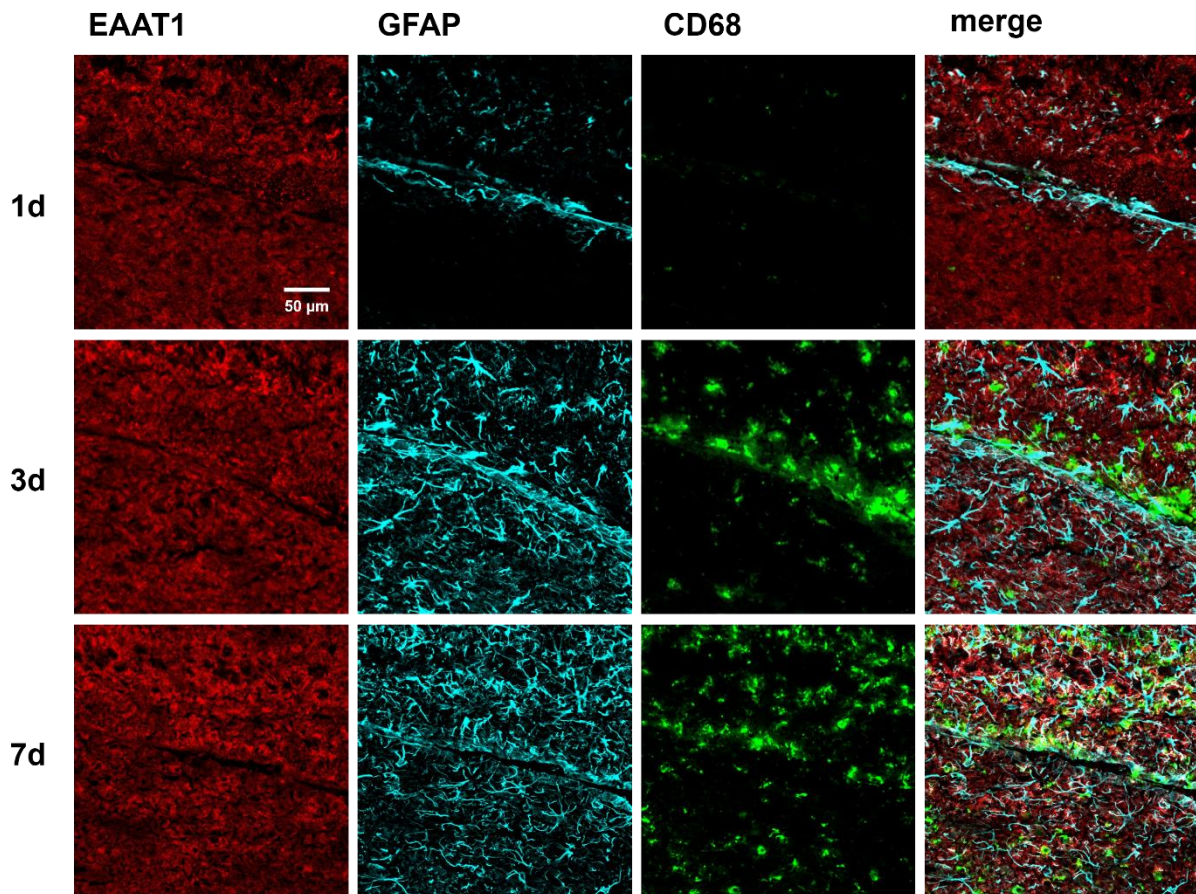


Abbildung 18 Darstellung des ipsilateralen Bildausschnittes iCA3 CGL im Zeitverlauf

Beispielhaft dargestellt ist die immunhistochemischen Anfärbung von EAAT1, GFAP, CD68 und merge eines Gehirnschnittes zu den jeweiligen Untersuchungszeitpunkten mit Anschnitt der CA3-Region (obere Bildhälfte) und des CGL (untere Bildhälfte).

5.4.1 GFAP

GFAP zeigt nach 3 d medial der Läsion (iML, Abb. 11) eine reduzierte ipsilaterale Expression gegenüber kontralateral (kKL, Abb. 11) mit $p < 0,05$ (Abb. 19A). Lateral der Läsion (iIL, Abb. 11) zeigt sich eine signifikant erhöhte ipsilateralen GFAP-Expression zu den Zeitpunkten 3 d und 7 d mit jeweils $p < 0,001$ im Vergleich zu kontralateral (Abb. 19B). Im Bereich der CA3-Region zeigt sich zu keinem Untersuchungszeitpunkt ein signifikanter Unterschied zwischen der ipsi- und kontralateralen GFAP-Expression (Abb. 19C). Im Bereich des CGL zeigt sich eine signifikant erhöhte ipsilaterale Expression nach 3 d und 7 d mit jeweils $p < 0,001$ (vgl. Abb. 18D).

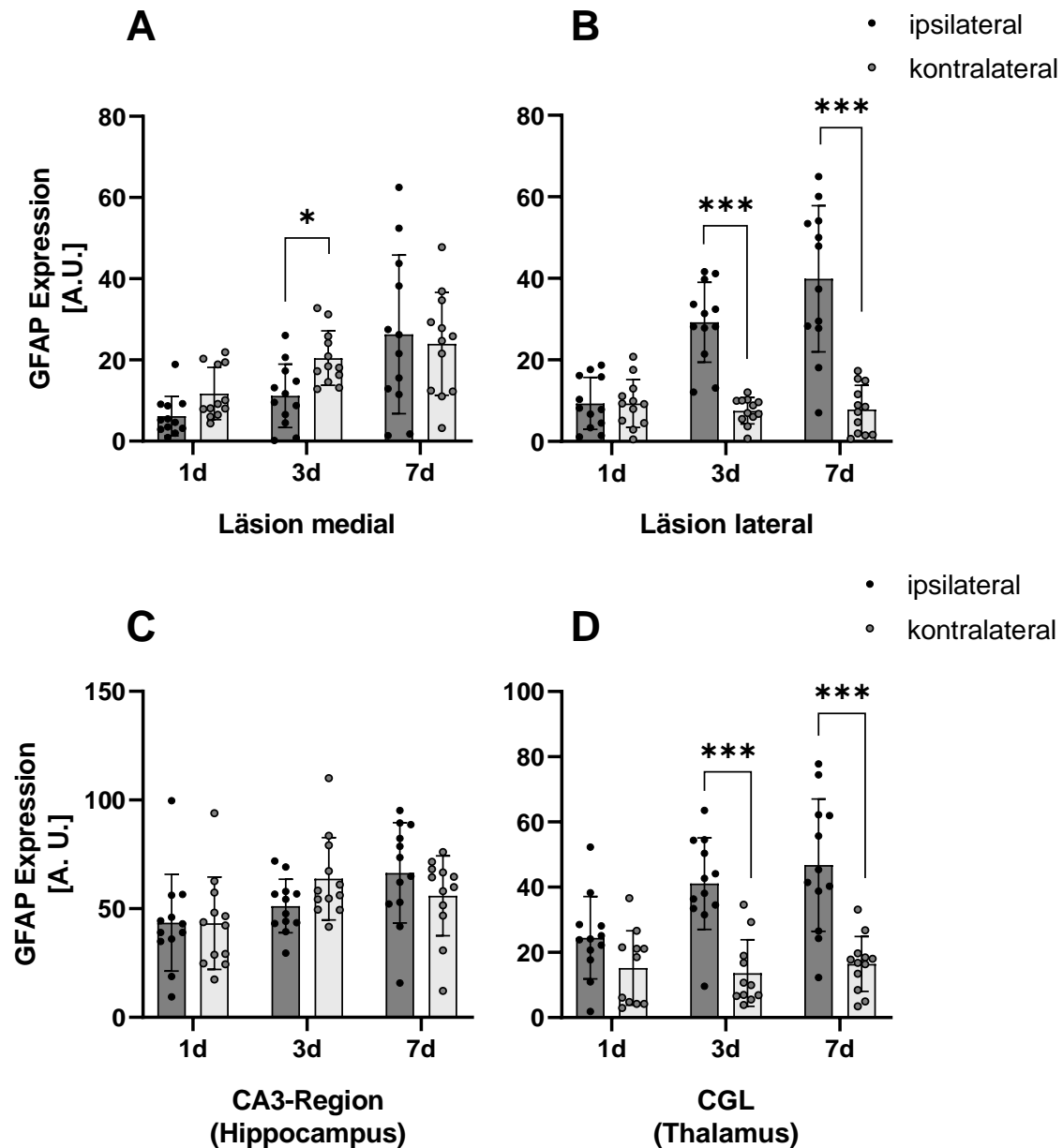


Abbildung 19 Immunhistochemie – GFAP-Expression im Zeitverlauf nach CCI

A-D Die Balkendiagramme zeigen die gemittelte GFAP-Intensität zu den Untersuchungszeitpunkten erster postoperativer Tag (1d), dritter postoperativer Tag (3d) und siebter postoperativer Tag (7d) entsprechend der jeweiligen Überlebenszeiten der CCI-Gruppe in den vier definierten cerebralen Regionen: Läsion medial, Läsion lateral, CA3-Region des Hippocampus sowie CGL des Thalamus; ipsilateral: n (pro Überlebenszeit) = 12, kontralateral: n (pro Überlebenszeit) = 12; * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001; Two-way ANOVA

5.4.2 CD68

Medial der Läsion zeigt sich eine signifikant erhöhte ipsilaterale Expression von CD68 nach 3 d und 7 d gegenüber der kontralateralen Expression mit $p < 0,001$ (Abb. 20A). Im Bereich lateral der Läsion zeigt sich ebenfalls ein signifikant erhöhter ipsilateraler Nachweis zu den Zeitpunkten 3 d und 7 d mit $p < 0,001$ (Abb. 20B). In der CA3-Region sowie im Bereich des

CGL zeigt sich eine signifikant erhöhte ipsilaterale Expression zum Zeitpunkt 7 d mit $p < 0,001$, bzw. $p < 0,05$ im Vergleich zu kontralateral (Abb. 20C, D).

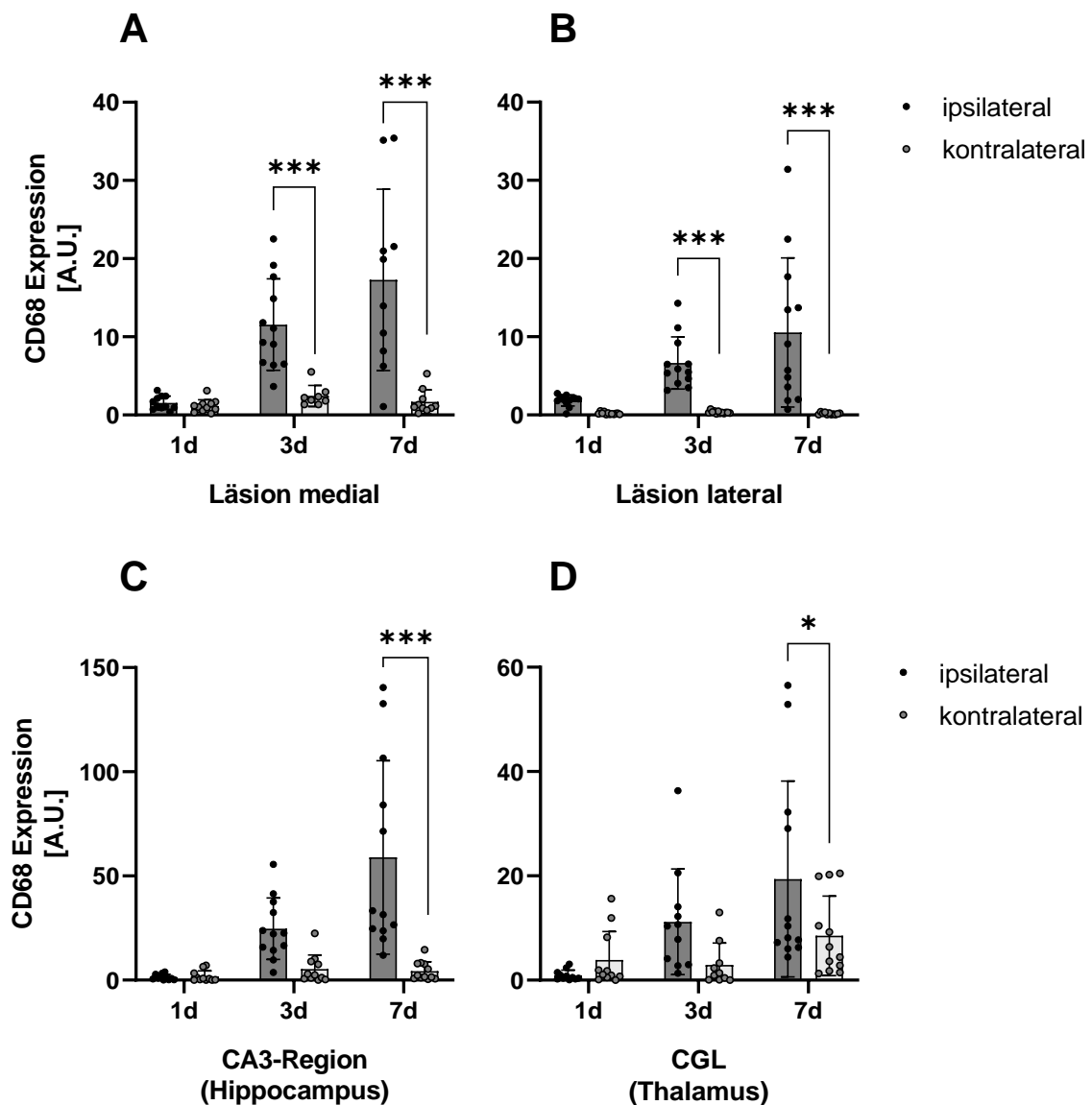


Abbildung 20 Immunhistochemie – CD68-Expression im Zeitverlauf nach CCI

A-D Die Balkendiagramme zeigen die gemittelte CD68-Intensität zu den Untersuchungszeitpunkten erster postoperativer Tag (1d), dritter postoperativer Tag (3d) und siebter postoperativer Tag (7d) entsprechend der jeweiligen Überlebenszeiten der CCI-Gruppe in den vier definierten cerebralen Regionen: Läsion medial, Läsion lateral, CA3-Region des Hippocampus sowie CGL des Thalamus; ipsilateral: n (pro Überlebenszeit) = 12, kontralateral: n (pro Überlebenszeit) = 12; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; Two-way ANOVA

5.4.3 EAAT1

Es zeigt sich medial der Läsion keine signifikante Veränderung zwischen der ipsi- und kontralateralen EAAT1-Expression (Abb. 21A). Lateral der Expression zeigt sich eine signifikant erhöhte ipsilaterale Expression nach 3 d mit $p < 0,05$ (Abb. 21B). Im Anschnitt der

CA3-Region sowie des CGL zeigt sich keine signifikante Veränderung zwischen ipsi- und kontralateraler Expression im Zeitverlauf (Abb. 21C, D).

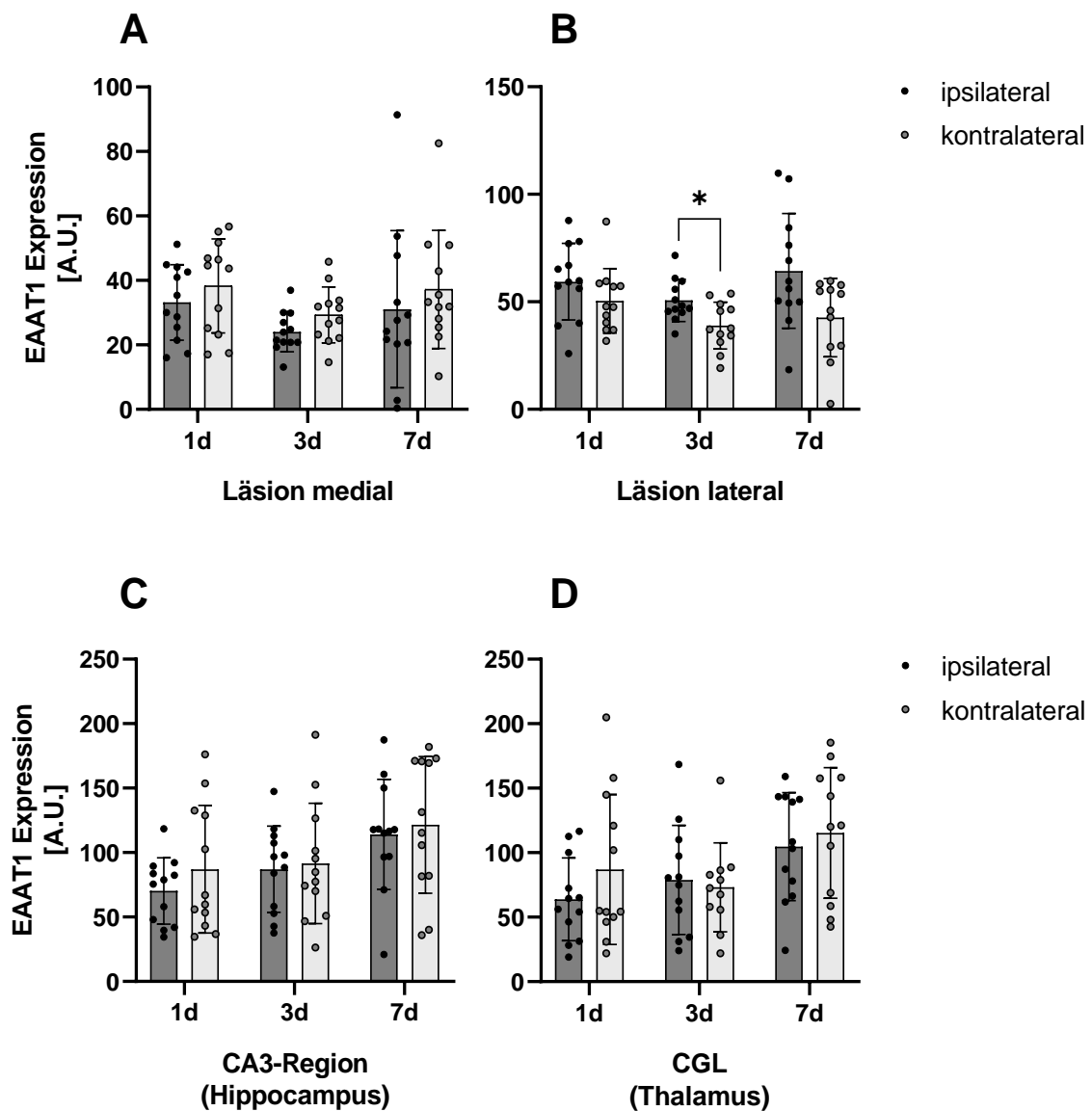


Abbildung 21 Immunhistochemie – EAAT1-Expression im Zeitverlauf nach CCI

A-D Die Balkendiagramme zeigen die gemittelte EAAT1-Intensität zu den Untersuchungszeitpunkten erster postoperativer Tag (1d), dritter postoperativer Tag (3d) und siebter postoperativer Tag (7d) entsprechend der jeweiligen Überlebenszeiten der CCI-Gruppe in den vier definierten cerebralen Regionen: Läsion medial, Läsion lateral, CA3-Region des Hippocampus sowie CGL des Thalamus; ipsilateral: n (pro Überlebenszeit) = 12, kontralateral: n (pro Überlebenszeit) = 12; * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001; Two-way ANOVA

5.4.4 VGLUT2

Es zeigt sich im Bereich des CGL ipsilateral eine signifikant erhöhte absolute VGLUT2-Expressionsrate gegenüber kontralateral am ersten postoperativen Tag mit p < 0,05 (Abb. 22).

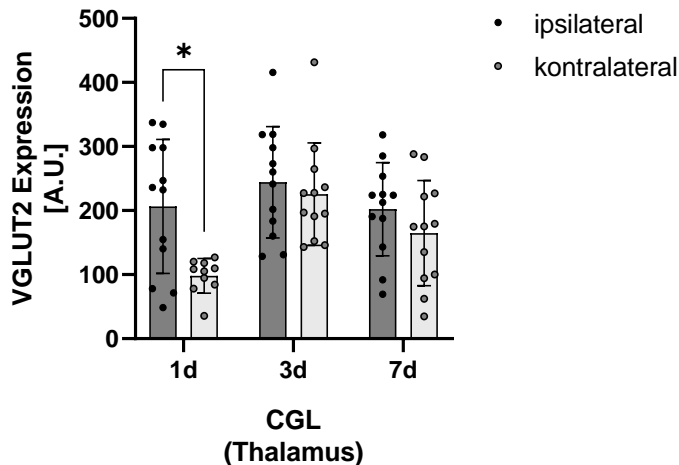


Abbildung 22 Immunhistochemie – VGLUT2-Expression im Zeitverlauf nach CCI

A Das Balkendiagramm zeigt die gemittelte VGLUT2-Intensität zu den Untersuchungszeitpunkten erster postoperativer Tag (1d), dritter postoperativer Tag (3d) und siebter postoperativer Tag (7d) entsprechend der jeweiligen Überlebenszeiten der CCI-Gruppe im Bereich des CGL des Thalamus; ipsilateral: n (pro Überlebenszeit) = 12; kontralateral: n (pro Überlebenszeit) = 12; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; Two-way ANOVA

5.5 Quantitative Polymerasekettenreaktion

Das für die qPCR verwendete Gewebe wurde durch serielle Kryosektion im Bereich Bregma + 0,64 mm bis -2,86 mm aufbereitet. Die ROI umfasst die dorsalen zwei Drittel des Gehirns, ventrale Anteile wurden entsprechend verworfen (vgl. Abb. 8). Die Aufbereitung und Analyse erfolgte in gleicher Weise für CCI und SHAM.

Mittels qPCR erfolgt die Bestimmung der ipsilateralen mRNA-Expression der Glutamattransporter der SHAM- und CCI-Gruppe zu den jeweiligen Untersuchungszeitpunkten. Dabei wird die Expression der SHAM- und der CCI-Gruppe jeweils relativ zu PPIA untersucht. Die Ergebnisse beider Gruppen werden graphisch dargestellt, signifikante Unterschiede (*Two-way* ANOVA mit Korrektur des Signifikanzniveaus nach Holm-Sidak) zwischen den Gruppen werden zum jeweiligen Untersuchungszeitpunkt entsprechend gekennzeichnet (Abb. 23-29A). Zudem wird die Expression der CCI-Gruppe relativ zur durchschnittlichen Expression der SHAM-Gruppe dargestellt, hier werden signifikante Unterschiede der relativen Expression im Zeitverlauf (*One-way* ANOVA mit Korrektur des Signifikanzniveaus nach Holm-Sidak) ergänzend zu den signifikanten Unterschieden zum jeweiligen Untersuchungszeitpunkt zwischen CCI und SHAM gekennzeichnet.

5.5.1 EAAT1

Hinsichtlich EAAT1 zeigt sich zu keinem Zeitpunkt eine signifikante Veränderung der Expressionsrate zwischen CCI- und SHAM Gruppe (Abb. 23A, B). Es zeigt sich ein

signifikanter Anstieg der relativen Expressionsrate (CCI relativ zu SHAM) mit $p < 0,05$ zwischen 1 d und 7 d (Abb. 23B).

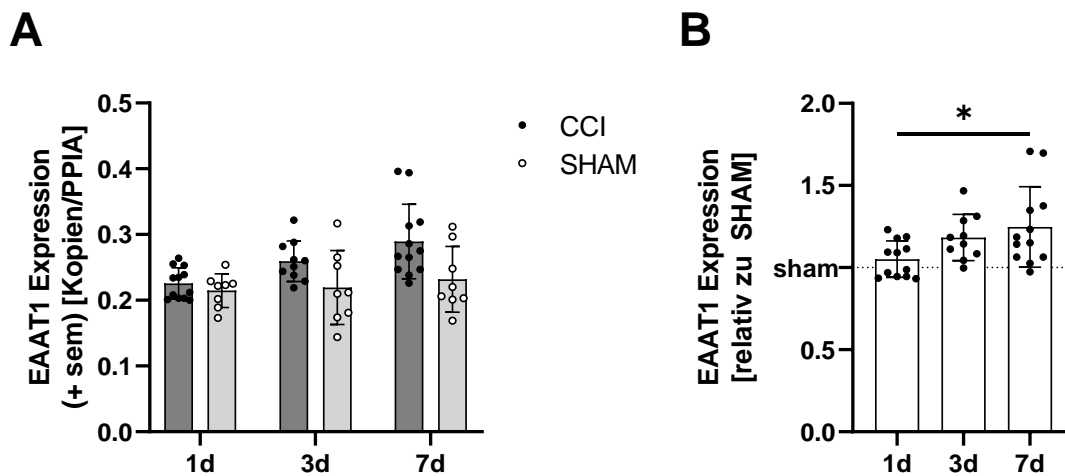


Abbildung 23 qPCR – EAAT1-Expression im Zeitverlauf nach CCI

A Das Balkendiagramm zeigt die EAAT1-Expression normalisiert zu PPIA zu den Untersuchungszeitpunkten erster postoperativer Tag (1d), dritter postoperativer Tag (3d) und siebter postoperativer Tag (7d) entsprechend der jeweiligen Überlebenszeiten beider Versuchsgruppen; CCI: n (pro Überlebenszeit) = 10-12, SHAM: n (pro Überlebenszeit) = 8; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; Two-way ANOVA; **B** Das Balkendiagramm zeigt die EAAT1-Expression relativ zu SHAM zu den Untersuchungszeitpunkten erster postoperativer Tag (1d), dritter postoperativer Tag (3d) und siebter postoperativer Tag (7d) entsprechend der jeweiligen Überlebenszeiten beider Versuchsgruppen; n = 10-12; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; One-way ANOVA

5.5.2 EAAT2

EAAT2 weist im Vergleich zu SHAM eine signifikant reduzierte Expressionsrate der CCI-Gruppe nach 1 d auf mit $p < 0,01$. Nach 7 d zeigt sich eine signifikant erhöhte Expression mit $p < 0,001$ (Abb. 24A, B). Zudem zeigt sich ein signifikanter Anstieg der relativen Expressionsrate zwischen allen Untersuchungszeitpunkten mit jeweils $p < 0,001$ (Abb. 24B).

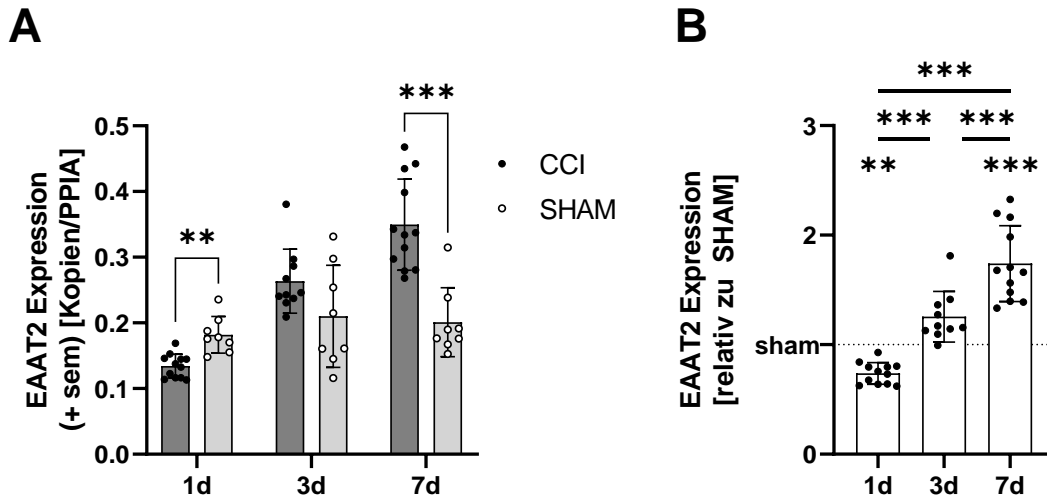


Abbildung 24 qPCR – EAAT2-Expression im Zeitverlauf nach CCI

A Das Balkendiagramm zeigt die EAAT2-Expression normalisiert zu PPIA zu den Untersuchungszeitpunkten erster postoperativer Tag (1d), dritter postoperativer Tag (3d) und siebter postoperativer Tag (7d) entsprechend der jeweiligen Überlebenszeiten beider Versuchsgruppen; CCI: n (pro Überlebenszeit) = 10-12, SHAM: n (pro Überlebenszeit) = 8; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; Two-way ANOVA; **B** Das Balkendiagramm zeigt die EAAT2-Expression relativ zu SHAM zu den Untersuchungszeitpunkten erster postoperativer Tag (1d), dritter postoperativer Tag (3d) und siebter postoperativer Tag (7d) entsprechend der jeweiligen Überlebenszeiten beider Versuchsgruppen; n = 10-12; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; One-way ANOVA

5.5.3 EAAT3

EAAT3 weist nach CCI eine reduzierte mRNA-Expressionsrate gegenüber SHAM nach 3 d und 7 d auf mit jeweils $p < 0,05$, dabei zeigt sich keine signifikante Veränderung der relativen Expressionsrate im Zeitverlauf (Abb. 25A, B).

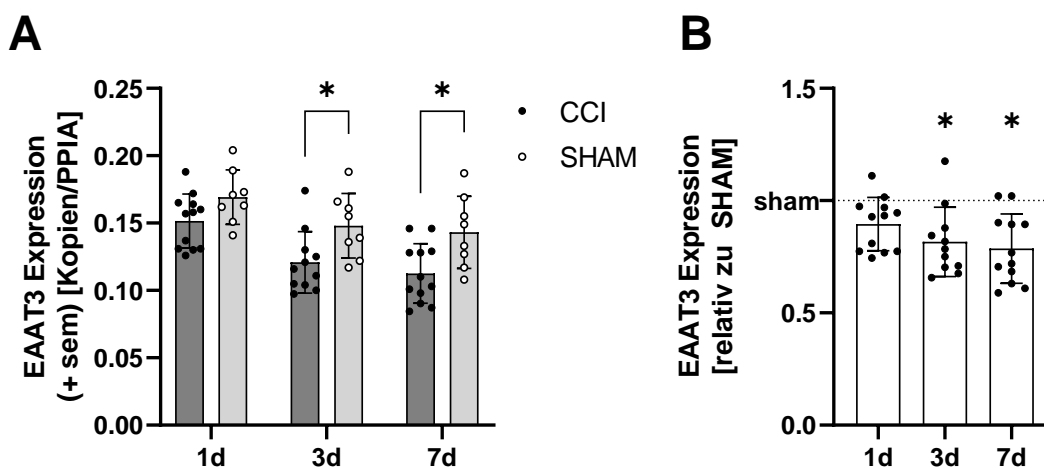


Abbildung 25 qPCR – EAAT3-Expression im Zeitverlauf nach CCI

A Das Balkendiagramm zeigt die EAAT3-Expression normalisiert zu PPIA zu den Untersuchungszeitpunkten erster postoperativer Tag (1d), dritter postoperativer Tag (3d) und siebter postoperativer Tag (7d) entsprechend der jeweiligen Überlebenszeiten beider Versuchsgruppen. CCI: n (pro Überlebenszeit) = 11-12, SHAM: n (pro Überlebenszeit) = 8; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; Two-way ANOVA; **B** Das Balkendiagramm zeigt die

EAAT3-Expression relativ zu SHAM zu den Untersuchungszeitpunkten erster postoperativer Tag (1d), dritter postoperativer Tag (3d) und siebter postoperativer Tag (7d) entsprechend der jeweiligen Überlebenszeiten beider Versuchsgruppen; n = 11-12; * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001; One-way ANOVA

5.5.4 EAAT4

EAAT4 zeigt nach CCI gegenüber SHAM eine signifikant reduzierte mRNA-Expressionsrate nach 7 d mit p < 0,01, dabei zeigt sich keine Veränderung der relativen Expressionsrate im Zeitverlauf (Abb. 26A, B).

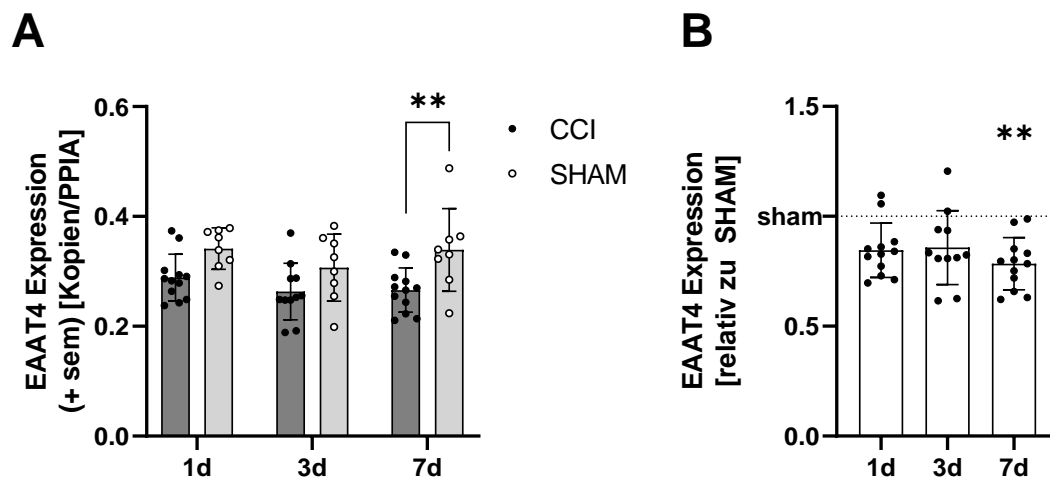


Abbildung 26 qPCR – EAAT4-Expression im Zeitverlauf nach CCI

A Das Balkendiagramm zeigt die EAAT4-Expression normalisiert zu PPIA zu den Untersuchungszeitpunkten erster postoperativer Tag (1d), dritter postoperativer Tag (3d) und siebter postoperativer Tag (7d) entsprechend der jeweiligen Überlebenszeiten beider Versuchsgruppen; CCI: n (pro Überlebenszeit) = 11-12, SHAM: n (pro Überlebenszeit) = 8; * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001; Two-way ANOVA; **B** Das Balkendiagramm zeigt die EAAT4-Expression relativ zu SHAM zu den Untersuchungszeitpunkten erster postoperativer Tag (1d), dritter postoperativer Tag (3d) und siebter postoperativer Tag (7d) entsprechend der jeweiligen Überlebenszeiten beider Versuchsgruppen; n = 11-12; * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001; One-way ANOVA

5.5.5 VGLUT1

VGLUT1 zeigt nach CCI eine signifikant reduzierte mRNA-Expressionsrate nach 3 d und 7 d im Vergleich zu SHAM mit jeweils p < 0,01 (Abb. 27A). Zudem zeigt sich ein signifikanter Rückgang der relativen Expressionsrate zwischen 1 d und 7 d mit p < 0,05 (Abb. 27B).

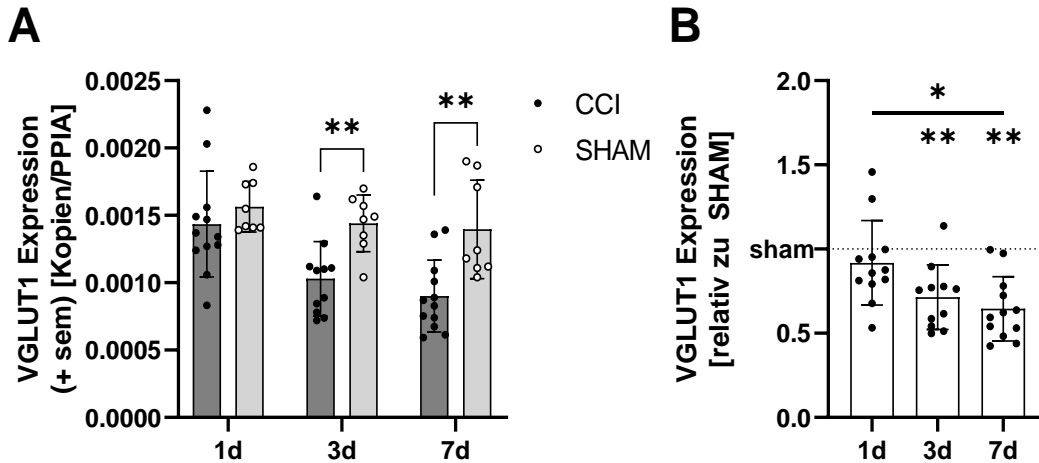


Abbildung 27 qPCR – VGLUT1-Expression im Zeitverlauf nach CCI

A Das Balkendiagramm zeigt die VGLUT1-Expression normalisiert zu PPIA zu den Untersuchungszeitpunkten erster postoperativer Tag (1d), dritter postoperativer Tag (3d) und siebter postoperativer Tag (7d) entsprechend der jeweiligen Überlebenszeiten beider Versuchsgruppen; CCI: n (pro Überlebenszeit) = 11-12, SHAM: n (pro Überlebenszeit) = 8; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; Two-way ANOVA; **B** Das Balkendiagramm zeigt die VGLUT1-Expression relativ zu SHAM zu den Untersuchungszeitpunkten erster postoperativer Tag (1d), dritter postoperativer Tag (3d) und siebter postoperativer Tag (7d) entsprechend der jeweiligen Überlebenszeiten beider Versuchsgruppen; n = 11-12; * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; One-way ANOVA

5.5.6 VGLUT2

VGLUT2 weist nach CCI eine signifikante Reduktion der mRNA-Expressionsrate nach 7 d im Vergleich zu SHAM auf mit $p < 0,01$ (Abb. 28A, B). Hierbei zeigt sich ein signifikanter Rückgang der relativen Expression zwischen 1 d und 7 d mit $p < 0,001$ sowie zwischen 3 d und 7 d mit $p < 0,01$ (Abb. 28B).

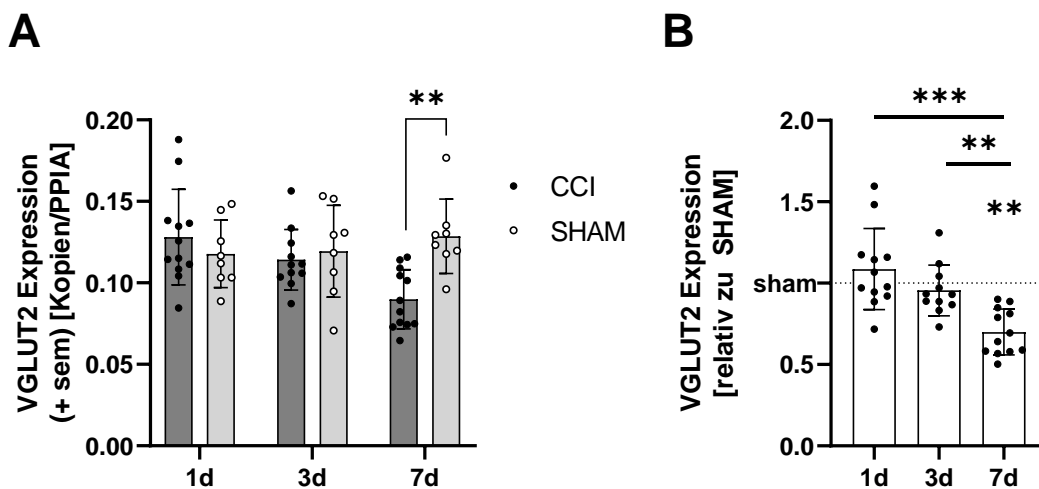


Abbildung 28 qPCR – VGLUT2-Expression im Zeitverlauf nach CCI

A Das Balkendiagramm zeigt die VGLUT2-Expression normalisiert zu PPIA zu den Untersuchungszeitpunkten erster postoperativer Tag (1d), dritter postoperativer Tag (3d) und siebter postoperativer Tag (7d) entsprechend der

jeweiligen Überlebenszeiten beider Versuchsgruppen; CCI: n (pro Überlebenszeit) = 11-12, SHAM: n (pro Überlebenszeit) = 8; * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001; Two-way ANOVA; **B** Das Balkendiagramm zeigt die VGLUT2-Expression relativ zu SHAM zu den Untersuchungszeitpunkten erster postoperativer Tag (1d), dritter postoperativer Tag (3d) und siebter postoperativer Tag (7d) entsprechend der jeweiligen Überlebenszeiten beider Versuchsgruppen; n = 11-12; * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001; One-way ANOVA

5.5.7 VGLUT3

VGLUT3 weist zu keinem Beobachtungszeitpunkt einen signifikant veränderte mRNA-Expressionsrate zwischen CCI und SHAM auf (Abb. 29A, B). Es zeigt sich ein signifikanter Rückgang der relativen Expressionsrate zwischen den Zeitpunkten 1 d und 3 d sowie zwischen 1 d und 7 d mit jeweils p < 0,05 (Abb. 29B).

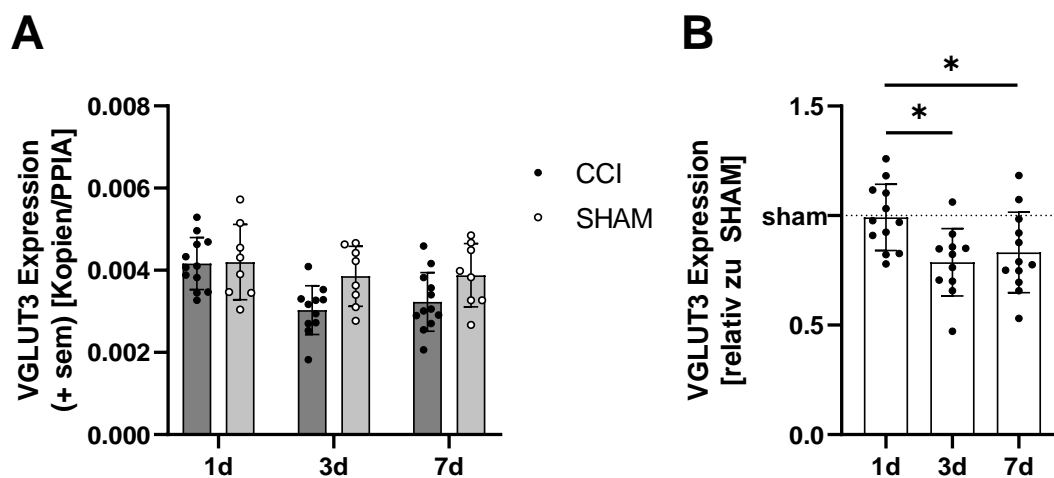


Abbildung 29 qPCR – VGLUT3-Expression im Zeitverlauf nach CCI

A Das Balkendiagramm zeigt die VGLUT3-Expression normalisiert zu PPIA zu den Untersuchungszeitpunkten erster postoperativer Tag (1d), dritter postoperativer Tag (3d) und siebter postoperativer Tag (7d) entsprechend der jeweiligen Überlebenszeiten beider Versuchsgruppen; CCI: n (pro Überlebenszeit) = 11-12, SHAM: n (pro Überlebenszeit) = 8; * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001; Two-way ANOVA; **B** Das Balkendiagramm zeigt die VGLUT3-Expression relativ zu SHAM zu den Untersuchungszeitpunkten erster postoperativer Tag (1d), dritter postoperativer Tag (3d) und siebter postoperativer Tag (7d) entsprechend der jeweiligen Überlebenszeiten beider Versuchsgruppen. n = 11-12; * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001; One-way ANOVA

5.6 Korrelationsanalyse

Ein Teil der Ergebnisse wird abschließend auf Korrelation hin überprüft. Es erfolgt die Untersuchung der Korrelation der mittels qPCR erhobenen mRNA-Expression aller Transporter sowohl mit dem Läsionsvolumen als auch mit der Dicke der GCL. Zusätzlich wird die mRNA-Expression der EAATs auf Korrelation mit der Expression der VGLUTs hin untersucht. Die Ergebnisse dieser Analysen sind tabellarisch dargestellt. Eine signifikant positive Korrelation wird farblich grün hervorgehoben, eine signifikant negative Korrelation wird dem gegenüberstehend rot dargestellt.

5.6.1 mRNA-Expression mit LV und Dicke der GCL

Zunächst erfolgt die Korrelationsanalyse zu den jeweils definierten Zeitpunkten. Dabei zeigt sich, dass EAAT4 und VGLUT1 nach 1 d negativ mit dem LV korreliert sowie VGLUT2 nach 7 d negativ mit dem LV korreliert. Die mRNA-Expressionsrate der untersuchten Transporter korreliert zu keinem Zeitpunkt mit der Dicke der GCL (Tab. 13).

Zeitpunkt	relative mRNA-Expression	Läsionsvolumens [mm ³]	Dicke der GCL [mm]
1d	EAAT1	r ² 0,08136 p 0,3688	r ² 0,00001655 p 0,99
	EAAT2	r ² 0,2675 p 0,085	r ² 0,07844 p 0,3779
	EAAT3	r ² 0,2785 p 0,0778	r ² 0,2044 p 0,5239
	EAAT4	r ² 0,4436 p 0,018	r ² 0,2523 p 0,4288
	VGLUT1	r ² 0,5646 p 0,0048	r ² 0,4387 p 0,1537
	VGLUT2	r ² 0,03782 p 0,5447	r ² 0,5651 p 0,0555
	VGLUT3	r ² 0,04261 p 0,5198	r ² 0,02127 p 0,6511
3d	EAAT1	r ² 0,01031 p 0,7802	r ² 0,01298 p 0,754
	EAAT2	r ² 0,245 p 0,1458	r ² 0,01159 p 0,7672
	EAAT3	r ² 0,2028 p 0,1646	r ² 0,02462 p 0,645
	EAAT4	r ² 0,1585 p 0,2252	r ² 0,002368 p 0,887
	VGLUT1	r ² 0,3608 p 0,0507	r ² 0,1122 p 0,314
	VGLUT2	r ² 0,03321 p 0,5917	r ² 0,009931 p 0,7707
	VGLUT3	r ² 0,03083 p 0,6056	r ² 0,03211 p 0,598
7d	EAAT1	r ² 0,001137 p 0,9172	r ² 0,0004481 p 0,9479
	EAAT2	r ² 0,005294 p 0,8222	r ² 0,01133 p 0,7419
	EAAT3	r ² 0,02405 p 0,6303	r ² 0,03021 p 0,589
	EAAT4	r ² 0,2129 p 0,131	r ² 0,00561 p 0,8171
	VGLUT1	r ² 0,06754 p 0,4146	r ² 0,02066 p 0,6558
	VGLUT2	r ² 0,3374 p 0,0476	r ² 0,05468 p 0,4645
	VGLUT3	r ² 0,08621 p 0,3543	r ² 0,1144 p 0,2822

Tabelle 13 Korrelation – mRNA-Expression mit LV und Dicke der GCL

Die Tabelle zeigt p-Wert und r² der Korrelationsanalyse der Dicke der GCL sowie des Läsionsvolumens mit der Expression der jeweiligen Transporter zu den einzelnen Untersuchungszeitpunkten. Die Analyse erfolgt nach Pearson. Eine signifikant negative Korrelation ist farblich rot hervorgehoben.

5.6.2 mRNA-Expression von EAATs mit VGLUTs

Die mRNA-Expressionsrate der EAATs korreliert zu fast allen Zeitpunkten positiv mit der Expression von VGLUT1. Zugleich korreliert die Expression der meisten EAATs nach 7 d positiv mit VGLUT2. Die meisten EAATs weisen nach 3 d eine positive Korrelation mit VGLUT3 auf, EAAT2 zusätzlich noch nach 7 d (Tab. 14).

Zeitpunkt	relative mRNA-Expression	VGLUT1	VGLUT2	VGLUT3
1d	EAAT1	r^2 0,3986 p 0,0277	r^2 0,2267 p 0,1176	r^2 0,2649 p 0,0869
	EAAT2	r^2 0,7134 p 0,0005	r^2 0,1015 p 0,3128	r^2 0,1629 p 0,1933
	EAAT3	r^2 0,7148 p 0,0005	r^2 0,172 p 0,1801	r^2 0,1511 p 0,2118
	EAAT4	r^2 0,7761 p 0,0002	r^2 0,1688 p 0,1846	r^2 0,01769 p 0,6803
3d	EAAT1	r^2 0,0007197 p 0,9454	r^2 0,05452 p 0,5454	r^2 0,004237 p 0,8679
	EAAT2	r^2 0,7047 p 0,0024	r^2 0,2129 p 0,1795	r^2 0,7437 p 0,0013
	EAAT3	r^2 0,8358 p <0,0001	r^2 0,06668 p 0,4433	r^2 0,4243 p 0,0299
	EAAT4	r^2 0,4592 p 0,0219	r^2 0,05328 p 0,4947	r^2 0,4769 p 0,0186
7d	EAAT1	r^2 0,3532 p 0,0416	r^2 0,5508 p 0,0057	r^2 0,3059 p 0,0621
	EAAT2	r^2 0,775 p 0,0002	r^2 0,4852 p 0,0118	r^2 0,5806 p 0,004
	EAAT3	r^2 0,8853 p <0,0001	r^2 0,5905 p 0,0035	r^2 0,3001 p 0,0652
	EAAT4	r^2 0,2057 p 0,1386	r^2 0,2991 p 0,0658	r^2 0,2156 p 0,1283

Tabelle 14 Korrelation – mRNA-Expression von EAATs mit VGLUTs

Die Tabelle zeigt p-Wert und r^2 der Korrelationsanalyse der Expression der VGLUTs und EAATs zu den einzelnen Untersuchungszeitpunkten. Die Analyse erfolgt nach Pearson. Eine signifikant positive Korrelation ist farblich grün hervorgehoben.

6. Diskussion

6.1 Methodendiskussion

Für diese Forschungsarbeit wurden a priori definierte Methoden zur Durchführung der Versuche festgelegt. Das Maus-Modell bietet als Säugetierorganismus mehrere Vorteile in der Anwendung. Es ist weitreichend etabliert und bietet ein hohes Maß an Standardisierung, so können beispielsweise verhaltensbiologische Untersuchungen durch einheitliche Scores direkter verglichen werden. Das CCI-Modell zur Darstellung der Pathologie des SHT ist ebenfalls ein in der Forschung etabliertes Verfahren und wird in diversen Studien angewandt. Aus der fokalen Schädigung resultiert, dass dynamische Prozesse wie der DAI oder Blutungen nicht umfangreich dargestellt werden können (181). Dem steht gegenüber, dass verwendete Schadensparameter bekannt sind und damit die Reproduzierbarkeit des Versuches gegeben ist. Im vorliegenden Versuch wurde das SHT mittels CCI initiiert. Entsprechende Schadensparameter wurden aufgrund von fundierten Studienergebnissen vorheriger Forschungsarbeiten gewählt (243–245).

Die verhaltensbiologischen Tests orientieren sich ebenfalls am derzeitigen Standard der Wissenschaft. Sie kommen gemeinsam mit volumetrischen Untersuchungen bei Interventionsstudien zum Einsatz, um zum Beispiel substanzabhängige Veränderungen der motorischen Fähigkeiten oder des Läsionsvolumens beurteilen zu können (246). Die hier durchgeführten Versuche wurden vollständig an unbehandelten Tieren vorgenommen. Sie dienen daher der reinen Untersuchung der Trauma-induzierten Schädigung und der Beobachtung dieser Schädigung im Zeitverlauf.

Die Expression der Glutamattransporter wurde mittels Immunhistochemie und qPCR untersucht. Bisherige Forschungsarbeiten zur Untersuchung der Expressionsrate von Glutamattransportern nutzten ebenfalls diese standardisierten Verfahren (228, 229, 247–249). Sowohl das verwendete Tier- und SHT-Modell als auch die im Rahmen der Versuche durchgeführten Untersuchungen werden von der an der Forschungsarbeit beteiligten Arbeitsgruppe über mehrere Jahre hinweg regelmäßig angewendet. Dabei liegen standardisierte Vorgehensweisen vor.

6.2 Entwicklung des Körpergewichts nach CCI

Die Erhebung des Körpergewichts ist ein etablierter Standard im Rahmen diverser tierexperimenteller Studien. Das Körpergewicht fungiert als relevanter Parameter zur Beurteilung des körperlichen Zustands des Versuchstiers. Bei Aufrechterhaltung eines physiologischen Metabolismus und einer unbehinderten Nahrungsaufnahme ist zu erwarten,

dass sich das Körpergewicht des Versuchstieres konstant auf dem Ausgangsniveau befindet und sich im Verlauf allenfalls moderat erhöht (250). Nach Induktion des SHT ist durch die körperliche Beeinträchtigung mit stressbedingt verändertem Metabolismus und reduzierter Nahrungsaufnahme von einer initialen Reduktion des Körpergewichts auszugehen, welches sich jedoch im Zeitverlauf wieder selbst reguliert (250).

Im durchgeführten Versuch zeigte sich in der CCI-Gruppe mit einer Überlebensrate von 3 d und 7 d eine signifikante Reduktion des Körpergewichts am ersten postoperativen Tag. Gleichzeitig zeigt sich in beiden Gruppen ein signifikanter Anstieg des Körpergewichts im postoperativen Verlauf. In keiner der SHAM-Gruppen zeigte sich eine Gewichtsreduktion, einzig in der Gruppe mit 3 d Überlebenszeit zeigte sich eine signifikante Veränderung mit leichtem Anstieg des Körpergewichts. Es konnte zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied zwischen dem durchschnittlichen Gewicht der CCI- und SHAM-Gruppe festgestellt werden. Dies lässt sich durch eine hohe Abweichung des initialen Körpergewichts innerhalb der beiden Gruppen bei einem im Vergleich zum Gesamtgewicht nur leichten Rückgang des Körpergewichts der CCI-Gruppe erklären.

Aus den vorliegenden Ergebnissen lässt sich ableiten, dass die Induktion des SHT einen größeren Einfluss auf den Gesundheitszustand des Versuchstieres hat als das operationsäquivalente Vorgehen (SHAM). Dies steht in Einklang mit den in der Literatur bereits beschriebenen Ergebnissen (251, 252).

6.3 Verhaltensbiologische Untersuchungen nach CCI

6.3.1 Neuroscore

Die Erhebung des Neuroscores dient der Quantifizierung neurologisch-motorischer Defizite der Maus (253). Dabei sind feinmotorische Defizite nur bedingt darstellbar. Zudem gibt es hinsichtlich einzelner Teilscores eine hohe interindividuelle Variabilität (254). In der Literatur ist dabei umfangreich beschrieben, dass der Neuroscore sehr gut mit dem Ausmaß des zerebralen Schadens in der Bildgebung korreliert (246, 255). Insbesondere für die vorliegende Untersuchung ist der Test gut geeignet, da durch die spezifische Lokalisation der zerebralen Schädigung ein kontralaterales motorisches Defizit zu erwarten ist (10). Um eine Beobachtungsverzerrung zu vermeiden, wurde die Erhebung des Scores verblindet durchgeführt. In der durchgeführten Studie zeigte sich in allen CCI-Gruppen ein signifikanter Anstieg des Neuroscores, was mit einer entsprechend hohen Beeinträchtigung korreliert. Trotz signifikanter Reduktion des Neuroscores im Zeitverlauf, zeigt sich bis zum Ende der jeweiligen Untersuchungsperiode ein persistierendes Defizit. Daraus wird deutlich, dass das hier verwendete Modell geeignet ist, um neurologische Beeinträchtigungen mittels Scoring zu

erfassen. In der SHAM-Gruppe konnte mittels Neuroscore zu keinem Zeitpunkt ein Defizit nachgewiesen werden. Die Ergebnisse sind kohärent mit den Ergebnissen bisheriger Forschungsarbeiten (243, 245, 246, 256).

6.3.2 RotaRod-Test

Der RotaRod-Test ist ein weiteres etabliertes Verfahren zur Untersuchung motorischer Defizite im Mausmodell (257). Durch die maschinelle Messung der Zeit bis zum Fall bietet der Test eine Objektivierbarkeit der Leistungen und damit eine im Vergleich zu anderen Testverfahren höhere Reliabilität (258, 259). Dabei sind auch hier Störvariablen in die Bewertung der Testergebnisse mit einzubeziehen, etwa das initiale Körpergewicht oder die individuelle Ermüdbarkeit des Versuchstieres (259). In den Vergleichsgruppen mit Überlebenszeiten von 1 d und 3 d zeigt sich nach CCI ein signifikanter Rückgang der Zeit bis zum Fall am ersten postoperativen Tag, wohingegen es in der jeweiligen SHAM-Gruppe zu einem signifikanten Anstieg kommt. Dies weist auf einen Lernprozess motorischer Fähigkeiten hin, der durch die strukturelle Schädigung des Gehirns deutlich beeinträchtigt wird (260). Postoperativ zeigt sich bei allen Vergleichsgruppen zu jedem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied der Zeit bis zum Fall mit variablem Signifikanzniveau. Die vorliegenden Ergebnisse stehen im Einklang mit diversen Studien, die bereits zu gleichen Ergebnissen gekommen sind (259, 261).

6.3.3 Open-Field-Test

Mittels Open-Field-Test lässt sich die Lokomotorik und das Stressverhalten des Versuchstieres untersuchen (262). Dabei zeigt das Tier physiologisch eine hohe Aktivität bei der ersten Exposition. Bei wiederholter Testung ist durch Habituation mit einem konstanten Rückgang der absoluten Laufstrecke bis zu einer Stabilisierungsphase zu rechnen. Tiere mit reduziertem Gesundheitszustand sowie gestresste Tiere weisen dabei eine zusätzlich reduzierte Laufleistung auf (262, 263). Für mit der verwendeten Population artverwandte Stämme (C57BL/6J) ist ein im Vergleich zu anderen Stämmen schnellerer Rückgang der absoluten Laufstrecke im Open-Field-Test bei wiederholter Testung beschrieben (264). In den durchgeführten Versuchen zeigte sich für alle Versuchsgruppen, bis auf die SHAM-Gruppe mit einer Überlebenszeit von 1 d, ein signifikanter Rückgang der absoluten Laufstrecke am ersten postoperativen Tag. Der Rückgang der absoluten Laufstrecke ist im Rahmen der zu erwartenden Habituation nachvollziehbar. Dabei konnten keine Unterschiede zwischen CCI und Kontrolle nachgewiesen werden. Diese haben sich entweder nicht dargestellt oder wurden durch mögliche Confounder überlagert. Um lokomotorische Defizite besser zu untersuchen, könnte eine genauere Aufzeichnung des Bewegungsprofils sinnvoll sein (262), wie es zum Beispiel durch die Verwendung von sogenannten *IntelliCages* in Kombination mit *Radio frequency identification* (RFID)-Chips möglich ist (265).

Für die eigentliche Fragestellung der Forschungsarbeit sind immunhistochemische und molekularbiologische Untersuchungen notwendig. Die erwartungskonformen Ergebnisse der verhaltensbiologischen Untersuchungen zeugen jedoch bereits von methodischer Korrektheit und bilden damit ein wichtiges Kriterium für die Validität der weiteren Untersuchungsergebnisse.

6.4 Volumetrie und Schichtdickenanalyse nach CCI

6.4.1 Läsionsvolumen

Im Rahmen des SHT kommt es durch den bereits dargestellten Pathomechanismus zur Ausbildung eines lokalen Läsionsareals. Die Kresylviolett-Färbung stellt eine Standardmethode zur Darstellung von Nervengewebe dar und findet Anwendung in diversen CCI-Studien (240, 241). Es erfolgte die extrapolierte Berechnung des Läsionsvolumens sowie der Volumina der ipsi- und kontralateralen Hemisphären. Wie bereits zu Beginn dieser Arbeit erläutert, folgt der anatomische Aufbau des Neocortex einer geordneten Schichtung. Dabei weist der Cortex eine hohe Dichte an Nervenzellkörpern auf und zeigt sich in der Kresylviolett-Färbung deutlich kontrastiert. Nach CCI zeigt sich das Aufbrechen der kortikalen Schichtung mit einer durch den zellulären Untergang bedingten reduzierten Anfärbung im Läsionsareal.

Zum Zeitpunkt 1 d zeigte sich nach CCI eine signifikante Zunahme des ipsilateralen Volumens mit entsprechend ausgeprägtem Läsionsvolumen. Im weiteren Zeitverlauf zeigte sich ein Rückgang des Läsionsvolumens mit einem dazu kohärenten Rückgang des ipsilateralen Hemisphärenvolumens. Dieses wies nach 7 d keinen signifikanten Unterschied mehr zum Volumen der SHAM-Gruppe auf. Das Volumen der kontralateralen Hemisphäre zeigte zu keinem Zeitpunkt eine signifikante Veränderung im Vergleich zu SHAM.

Die Ergebnisse deuten auf einen typischen Verlauf mit der Ausbildung eines zelltoxischen und vasogen bedingten Hirnödems hin (152, 158). Diese Vermutung sollte jedoch durch geeignete Methoden wie z.B. Bestimmung des Hirnwassergehalts bestätigt werden (266). Der Rückgang des Läsionsvolumens im Zeitverlauf lässt sich auf beginnende Resorptionsvorgänge sowie die Bildung von narbenartigem Gewebe durch Astrozyten zurückführen (267).

6.4.2 Dicke der GCL

Der Hippocampus hat eine zentrale Funktion im Prozess des Lernens, des Gedächtnis und der Informationsverarbeitung. Eine Schädigung führt zu ausgeprägten kognitiven Defiziten. Die GCL ist Teil des Gyrus dentatus. In vorherigen Studien konnte gezeigt werden, dass es im Rahmen des sekundären Schadens des SHT im Bereich der GCL zu einem Apoptosebedingten Zelluntergang kommt (268). Die Ergebnisse des vorliegenden Experiments zeigen

bereits zum ersten Untersuchungszeitpunkt eine Abnahme der Dicke der ipsilateralen GCL im Vergleich zu SHAM. Im weiteren Zeitverlauf zeigt sich dann eine deutliche Reduktion der Dicke sowohl gegenüber dem ersten Messpunkt 1 d als auch gegenüber SHAM. Die Dicke der GCL des kontralateralen Hippocampus zeigte zu keinem Untersuchungszeitpunkt eine Veränderung. Die dargestellte verzögerte Reduktion der Dicke der GCL lässt sich mit den Ergebnissen bisheriger Forschungsarbeiten in Einklang bringen. (268, 269) So zeigte sich nach 24 h ein moderater, vermutlich überwiegend nekrotisch-bedingter, Verlust der Schichtdicke. Im weiteren Zeitverlauf zeigte sich dann ein ausgeprägterer Untergang der Zellen durch Apoptose.

Im Vergleich zur Dicke der GCL ist das initiale Läsionsvolumen ein häufig angewandter Parameter zur primären Evaluation der Schwere des SHT und kommt sowohl in der Forschung als auch in der klinischen Praxis umfassend zur Anwendung (270, 271). Die Größe des initialen Läsionsvolumens korreliert mit dem individuellen Outcome des Patienten (272). Im Unterschied zur punktuellen Beurteilung, ist das Läsionsvolumen als Parameter nur bedingt geeignet, die fortschreitende strukturelle Schädigung des Gehirns darzustellen. Der beschriebene biphasische Verlauf des Läsionsvolumens nach SHT ist hier mit zu berücksichtigen. Nach der primären Schädigung kommt es zur Schwellung des Gewebes mit Zunahme des ipsilateralen Hemisphärenvolumens, welche sich im weiteren Zeitverlauf jedoch wieder zurückbildet (158). Zur Quantifizierung anhaltender dynamischer Prozesse könnte die Betrachtung der GCL daher besser geeignet sein, da deren Dicke über einen kontinuierlichen Zeitraum hinweg abnimmt. Dabei gilt einschränkend, dass sich im vorliegenden Experiment das Läsionsareal in direkter räumlicher Nähe unmittelbar dorsal der GCL befunden hat. Veränderungen der GCL sind in Abhängigkeit von dynamischen Prozessen sowie der Lokalisation des primären Schadens zu untersuchen und könnten sich daher anders als im durchgeführten Versuch darstellen. Im Rahmen dieser Forschungsarbeit wurde überprüft, ob die Parameter mit dem Expressionsverhalten der untersuchten Glutamattransporter korrelieren. Dabei konnte für die Dicke des GCL zu keinem Zeitpunkt eine Korrelation festgestellt werden. Das Läsionsvolumen wies lediglich vereinzelte Korrelationen mit den untersuchten Transportern auf. Die Regulation der Glutamattransporter stellt jedoch nur einen geringen Teil der komplexen Pathophysiologie des SHT dar und es ist gegenwärtig unklar, inwiefern die Expression der einzelnen Transporter mit der Schwere des SHT assoziiert ist. Die Ergebnisse dieser Korrelationsanalyse lassen somit keine direkte Bewertung der Anwendbarkeit der Dicke des GCL und des Läsionsvolumens zur Beurteilung der fortschreitenden strukturellen Schädigung des Gehirns zu.

6.5 Expression von Glutamattransportern nach SHT

6.5.1 Expression von EAATs nach SHT

EAATs bilden eine Gruppe von Transmembranproteinen, die Glutamat über die Zellmembran hinweg transportieren. Das Expressionsverhalten der einzelnen Subtypen nach SHT wurde im Rahmen dieser Forschungsarbeit untersucht. Bisher durchgeführte Studien kamen dabei zu in Teilen unterschiedlichen Ergebnissen. Daher sind die Ergebnisse dieser Forschungsarbeit in den Kontext vorheriger Studien einzuordnen, sowie hier neu gewonnene Erkenntnisse herauszuarbeiten.

Die Veränderung der Expression von EAAT1 wurde dabei in dieser Arbeit mit verschiedenen Methoden untersucht. In der qPCR zeigte sich ein signifikanter Anstieg der relativen EAAT1-Expression zwischen 1 d und 7 d, dies konnte in vorherigen Studien bereits gezeigt werden (220). Vorherige Forschungsarbeiten konnten immunhistochemisch nachweisen, dass durch reaktive Astrozytose und die Aktivierung von Mikroglia die Expression von EAAT1 und EAAT2 verstärkt wird (6, 8, 215). Dazu kohärent zeigte sich auch in dieser Arbeit eine insbesondere perilesional signifikant erhöhte Expression der Markerproteine GFAP und CD68 in der Immunhistochemie mit entsprechend signifikant erhöhter EAAT1 Expression lateral der Läsion. In den weiteren ROIs zeigte sich dabei jedoch keine Veränderung der EAAT1 Expression im Zeitverlauf. Die in der Immunhistochemie überwiegend unveränderte EAAT1-Expression wurde zum Teil auch in vorherigen Arbeiten gezeigt (222).

EAAT2 ist der bedeutsamste Glutamattransporter im adulten Gehirn. Etwa 95 % des zerebralen Glutamattransports wird durch EAAT2 vermittelt. Der Transporter macht zudem 1 % der gesamten Proteinmenge des Gehirns aus (89). Die Veränderung der zerebralen Proteinmenge von EAAT2 nach SHT wurde mittels Western Blot bereits umfangreich in diversen Studien untersucht. Dabei zeigte sich eine anhaltende Reduktion des Proteingehalts von EAAT2 nach SHT (216, 217, 223, 224).

In den durchgeführten Versuchen zeigt sich in der qPCR für EAAT2 im Vergleich zu SHAM eine signifikant reduzierte Expressionsrate nach CCI zum Zeitpunkt 1 d. Im Zeitverlauf kommt es analog zu EAAT1 zu einem Anstieg der mRNA-Expression, die im Fall von EAAT2 nach 7 d signifikant über der Expression von SHAM liegt. Dies zeigte sich ebenfalls in einem Anstieg der relativen mRNA-Expression. Kohärent mit den Ergebnissen dieser Arbeit wurde ein Rückgang der mRNA-Expression nach 1 d beschrieben (221).

Es ist zu beachten, dass EAAT1 und EAAT2 funktionelle Überschneidungen aufweisen (69). Die qPCR-Ergebnisse dieser Arbeit deuten auf einen Anstieg der mRNA-Expression von EAAT1 und EAAT2 nach SHT hin. Da Glutamattransporter eine wichtige Funktion in der Entfernung von erhöhtem extrazellulärem Glutamat haben, könnte dies einen Mechanismus neuroprotektiver Autoregulation darstellen. Passend hierzu konnten in vivo Studien zeigen,

dass extrazelluläres Glutamat die Expression astrozytärer Glutamattransporter stimuliert (273). Damit kohärent konnte gezeigt werden, dass es nach Ischämie zu einem Anstieg der Glutamin-Synthase kommt. Durch die enzymatisch-vermittelte Bildung von Glutamin kommt es zu einer Reduktion der Glutamatkonzentration und damit in der Folge zu einer Reduktion der Exzitotoxizität (274).

Es ist zu berücksichtigen, dass andere Forschungsarbeiten im Unterschied zu den Ergebnissen dieser Forschungsarbeit überregional eine reduzierte mRNA-Expression von EAAT2 nach SHT nachweisen konnten (224). In der Literatur finden sich bereits mögliche Erklärungsansätze für die unterschiedlichen Ergebnisse hinsichtlich der mRNA-Expressionsraten von EAAT2 (247). Es gilt, dass im Zustand der Ischämie EAATs den reversen Transport und damit die Freisetzung von Glutamat bewirken können (209). Folglich könnte im ischämischen Kern die verminderte Expression des Transporters eine protektive Wirkung zeigen, um eine weitere Freisetzung des Neurotransmitters zu reduzieren, wohingegen peripher eine erhöhte Expression des Transporters neuroprotektiv wirken könnte. Die Frage, ob die globale Expressionsrate von EAAT1 und EAAT2 nach SHT reduziert oder erhöht ist, könnte also in direktem Zusammenhang mit der Größe des Läsionsareals und dem Ausmaß an Ischämie stehen. Zu dieser Annahme passend, konnte in vorherigen Forschungsarbeiten mittels qPCR ebenfalls eine signifikante Reduktion der mRNA-Expression von EAAT2 in direkter Umgebung der Läsion bis zu 3 d nach SHT festgestellt werden (275).

Es zeigt sich, dass neben der überregionalen Expression der Transporter auch eine spezifische Regulation in verschiedenen Hirnregionen vorliegt. Weitere Studien kamen zu dem Ergebnis, dass nach SHT die Aktivität des Transporters abnimmt, ohne dass dabei die Expressionsrate des Proteins verändert wird (9, 219).

Im Rahmen dieser Forschungsarbeit konnte gezeigt werden, dass EAAT3 nach CCI eine reduzierte mRNA-Expressionsrate gegenüber SHAM nach 3 d und 7 d aufweist. In bisherigen Studien zeigte sich für EAAT3 eine unveränderte Expression 1 d nach SHT (221, 225). Dies ist kohärent mit den Ergebnissen dieser Arbeit. Ältere Studien konnten zeigen, dass die PKC die Expression von EAAT3 stimuliert (276). Da diese 24 h nach SHT eine gesteigerte Aktivität aufweist, könnte dies einen möglichen Erklärungsansatz für die hier gezeigten Ergebnisse bieten (213). Nach 24 h könnte so einem möglicherweise hemmenden Einfluss auf die Expression von EAAT3 entgegengesteuert werden, mit einem zunehmenden Rückgang der Aktivität der PKC würde in der Folge auch die Expression von EAAT3 sinken.

EAAT4 zeigt nach CCI gegenüber SHAM eine signifikant reduzierte mRNA-Expressionsrate nach 7 d, dabei ohne signifikante Veränderung der relativen Expressionsrate im Zeitverlauf. Wie in der durchgeführten Untersuchung wurde in vorherigen Untersuchungen keine Veränderung der EAAT4-Expression 1 d nach SHT nachgewiesen (221). Weitere

Untersuchungen wiesen eine erhöhte Proteinkonzentrationen von EAAT4 immunhistochemisch und mittels Western Blot im Hippocampus 3 d und 7 d nach LFPI nach (227). Dies lässt jedoch keine eindeutigen Rückschlüsse auf die in dieser Forschungsarbeit untersuchte überregionale Expression zu.

Weitere Untersuchungen sind notwendig, um die spezifischen Veränderungen der mRNA-Expressionen von EAAT3 und EAAT4 in spezifischen Hirnregionen und Zelltypen abbilden zu können.

6.5.2 Expression von VGLUTs nach SHT

VGLUTs vermitteln den intravesikalen Transport von Glutamat innerhalb der Präsynapse. Bezüglich des Expressionsverhaltens nach CCI zeigte sowohl VGLUT1 als auch VGLUT2 eine signifikant reduzierte mRNA-Expression im Vergleich zu SHAM mit Rückgang der relativen Expression im Zeitverlauf. Die zeitabhängige Expression von vesikulären Glutamatttransportern nach SHT wurde im Vergleich zu EAAT-Transportern bisher in deutlich geringerem Umfang untersucht. In durchgeführten in vivo Experimenten konnte durch Exzitotoxizität eine kontinuierliche Reduktion der absoluten Proteinmenge der beiden Transporter ausgelöst werden (228). Zu ähnlichen Ergebnissen kam eine Studie, die den Einfluss der Ischämie auf die Expression des Transporters untersuchte, wobei hier VGLUT2 eine deutlichere Reduktion zeigte (229).

Ein solches Ergebnis konnte auch in mehreren Studien nachgewiesen werden, die den Einfluss von SHT oder Ischämie in definierten Hirnregionen untersuchten. Nach SHT konnte immunhistochemisch keine Veränderung der kortikalen Expression von VGLUT1 unmittelbar sowie nach 7 d festgestellt werden, was sich nach Ischämie mit gleichem Verlauf präsentierte (229, 231). Es konnte eine Ischämie-bedingte Reduktion der kortikalen Expression von VGLUT2 gezeigt werden, ohne signifikante Veränderung im Bereich des Hippocampus (231). Dort zeigten jedoch andere Studienergebnisse eine signifikant erhöhte VGLUT1 Expression 7 d nach Ischämie mit anschließender Reperfusion (226). Mittels qPCR zeigte sich ein Ischämie-bedingter Anstieg der Expression von VGLUT1 in der Großhirnrinde und im dorsalen Striatum 3 d nach Initiierung der Ischämie. Dabei zeigte sich die Expression von VGLUT2 im dorsalen Striatum und in der Großhirnrinde 24 h bzw. 3 d nach der Ischämie erhöht (230). Dazu passend zeigte sich VGLUT2 im vorliegenden Experiment im Bereich des CGL ipsilateral signifikant erhöht gegenüber kontralateral zum Zeitpunkt 1 d.

Die Rolle von VGLUT3 an der glutamatergen Signalübertragung wird gegenwärtig diskutiert. In der vorliegenden Arbeit konnte für VGLUT3 ein signifikanter Rückgang der relativen Expressionsrate zwischen den Untersuchungszeitpunkten 1 d und 3 d sowie zwischen 1 d und 7 d gezeigt werden. In früheren Studien konnte eine herabgesetzte Expression des

Transporters im von Ischämie betroffenen Cortex nach 1 d gezeigt werden (231).

Weitere Studien, die allgemein die Expressionsrate von VGLUT3 untersucht haben, zeigten eine reduzierte Expression VGLUT3-positiver Zellen im Bereich des dorsalen Nucleus raphe bei Mäusen, die chronischem Stress ausgesetzt wurden (232). Es bedarf weiterer Forschung, um sowohl die genaue Funktion als auch die Regulation des Transporters vollständig erfassen zu können.

Nach SHT kommt es zu einer Verschiebung der *E/I-balance* zugunsten einer gesteigerten Exzitation (196, 197). Es ist festzuhalten, dass VGLUTs präsynaptisch den intravesikalen Transport von Glutamat bewerkstelligen und damit zur Exzitation, der Erregung der postsynaptischen Zelle beitragen (106). Gegenteilig dazu vermitteln EAATs die astrozytäre Aufnahme von Glutamat aus dem synaptischen Spalt, reduzieren somit die Signalweiterleitung und haben einen hemmenden Einfluss auf die Synapse (69). Der überwiegende Anteil der astrozytären Wiederaufnahme erfolgt EAAT2-vermittelt (89). Sowohl für EAAT2 als auch für EAAT1 konnte ein Anstieg der relativen Expression zwischen 1 d und 7 d nachgewiesen werden. Für VGLUT1 und VGLUT2 zeigt sich ein Rückgang der relativen Expression im gleichen Zeitraum. Folglich könnte im Kontext der *E/I-balance* sowohl die reduzierte Expression von VGLUTs als auch die im Zeitverlauf ansteigende Expression der EAATs zur Wiederherstellung der *E/I-balance* beitragen. Es konnte eine positive Korrelation zwischen der Expression mehrerer EAATs und VGLUTs zu unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten nachgewiesen werden. Vor dem Hintergrund deren antagonistischen Effekte hinsichtlich der glutamatergen Neurotransmission erscheint diese Korrelation zur Aufrechterhaltung der *E/I-balance* grundsätzlich schlüssig. Dabei lässt sich gegenwärtig kein Kausalzusammenhang dieser wechselseitigen Beziehung herleiten.

Es ist zu berücksichtigen, dass die untersuchten Transporter sowohl von verschiedenen Zelltypen, als auch in verschiedenen Kompartimenten exprimiert werden. Deren Expression kann folglich nicht allein auf zellulärer Ebene reguliert werden.

6.6 Limitation und Ausblick

In dieser Forschungsarbeit wurde die zeitabhängige Expressionsregulation einzelner Subtypen von Glutamattransportern untersucht und in der Übersicht dargestellt. Neben dem Gewinn neuer Erkenntnisse, konnten die Ergebnisse vorheriger Forschungsarbeiten zu einem Großteil bestätigt werden. Dabei zeigten sich jedoch sowohl in der Immunhistochemie als auch in der qPCR zum Teil widersprüchliche Ergebnisse. Mögliche Gründe, die aus der spezifischen Pathophysiologie des SHT resultieren könnten, wurden bereits an vorheriger Stelle diskutiert. Darüber hinaus sind jedoch auch die experimentellen Rahmenbedingungen mit zu

berücksichtigen. Durch die Grenzen der verwendeten Methodik wird die Aussagekraft der Ergebnisse limitiert.

Zur Verifizierung der in der Immunhistochemie verwendeten Antikörper wären ergänzende *Knock-out*-Untersuchungen notwendig gewesen. In Voruntersuchungen wiesen beispielsweise Antikörper gegen EAAT2 keine spezifische Färbung auf. Zudem erfolgte die immunhistochemische Untersuchung in ausgewählten ROIs, während für die molekularbiologischen Untersuchungen ausgewählte Trimmchnitte angefertigt wurden, bei denen der ventrale Teil des Gehirns verworfen wurde. Dies erschwert die Vergleichbarkeit zwischen den in unterschiedlichen Versuchen gewonnenen Methoden. Außerdem wurde die Expression lediglich im Zeitraum von einem Tag bis zu einer Woche nach SHT gemessen. Sowohl unmittelbare als auch langfristige Veränderungen des Expressionsverhaltens wurden somit nicht miterfasst.

Außerdem ist zu berücksichtigen, dass sich Ergebnisse dieser Arbeit nicht vollständig auf den humanen Organismus transferieren lassen. Es bestehen deutliche Unterschiede zwischen murinem und humanem Gehirn, welche sich beispielsweise in Größe, Form und Lage unterscheiden (186). So konnten im murinen Gehirn gewonnene Ergebnisse zur Modifikation der Expression von EAATs im humanen Gehirn nicht reproduziert werden (236). Im Unterschied zu den in dieser Forschungsarbeit tierexperimentell gewonnenen Ergebnissen, zeigte eine Arbeit am humanen Gehirn eine Reduktion von EAAT1 und EAAT2 nach SHT (277).

Das Gehirn des Menschen zeichnet zudem aus, dass es ihn zur Durchführung höherer kognitiver Aufgaben befähigt, wie etwa eine ausgeprägte Kommunikationsfähigkeit und abstraktes Denken. Dies lässt sich am murinen Modellorganismus nicht untersuchen (278). Darüber hinaus können die SHT-Modelle nur bestimmte Teilaspekte der Pathophysiologie des SHT darstellen. Wie bereits dargestellt resultiert aus der fokalen Schädigung des CCI-Modells beispielsweise, dass dynamische Prozesse nicht umfangreich dargestellt werden können (256, 279).

Neben den Unterschieden zwischen den Spezies ist ebenfalls das hohe Ausmaß an Individualität zu beachten, was die Erstellung einheitlicher Modelle zusätzlich erschwert. Anhand der epidemiologischen Daten konnte gezeigt werden, wie inhomogen sich das Patientenkollektiv darstellt. Dazu kommen weitere Aspekte wie Komorbiditäten und Medikation. Auch der Schadenshergang mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten, komplexen biomechanischen Abläufen und daraus resultierendem Schweregrad stellt sich äußerst individuell dar. Bezüglich des Geschlechts konnte gezeigt werden, dass dieses ebenfalls einen Einfluss auf die Pathophysiologie des SHT hat (280). Da in dieser Studie ausschließlich männliche Mäuse verwendet wurden, konnten geschlechtsspezifische Veränderung nicht

miterfasst werden. Die komplexe Realität des SHT limitiert die Aussagekraft von Forschungsergebnissen unter sterilen Laborbedingungen. Gleichzeitig können die hier gewonnenen Ergebnisse entsprechend reproduziert werden und zeigen dabei eine geringere Variabilität. Dies ist ein wichtiger Aspekt der Grundlagenforschung. Auf molekularbiologischer Ebene konnten speziesübergreifende Merkmale der Pathophysiologie beschrieben werden (185).

Ein Verständnis über die zeitabhängige Expressionsregulation von Glutamattransportern nach SHT ist für Entwicklung von Therapiestrategien zur Reduktion von Exzitotoxizität essenziell. Es wurden und werden bereits eine Vielzahl von Experimenten zur Modulation der Expressionsrate von insbesondere EAAT1 und EAAT2 durchgeführt. Neben bereits zugelassenen Substanzen wie dem beta-Laktam Antibiotikum Ceftriaxon sind weitere Substanzen wie LDN in der Lage, die Expression der Glutamattransporter zu beeinflussen (4, 5, 237). Zudem werden systemische Ansätze untersucht, etwa die Kombination von EAAT2 mit modifizierten mesenchymalen Stammzellen (235). Es bedarf weiterer Forschung, um das therapeutische Potential der übrigen Glutamattransporter in der Behandlung des SHT zu erfassen.

7. Zusammenfassung

Das Schädel-Hirn-Trauma stellt einen schwerwiegenden pathologischen Zustand dar, infolgedessen in Deutschland jährlich ca. 3500 Menschen versterben. Die hohen Versorgungskosten der Patienten stellen zudem eine gesamtgesellschaftliche sozioökonomische Belastung dar. Während der primäre Schaden des Schädel-Hirn-Traumas nur durch präventive Maßnahmen zu verhindern ist, bietet die komplexe Pathophysiologie des sekundären Hirnschadens potenziell multiple Ansatzpunkte zur therapeutischen Intervention. Bisher konnte in der Behandlung jedoch noch kein Wirkstoff zu Anwendung kommen, der direkten Einfluss auf diese pathophysiologischen Vorgänge nimmt. Einen möglichen Therapieansatz stellt die Reduktion der Exzitotoxizität durch Modulation der Expression von Glutamattransportern dar. Dabei zeigten sich zuweilen abweichende Studienergebnisse bezüglich der zeitabhängigen Expression von Glutamattransportern nach Schädel-Hirn-Trauma.

Die vorliegende Studie dient der Untersuchung der Expression von Glutamattransportern im Zeitverlauf nach Schädel-Hirn-Trauma. Hierzu wurde an einem unbehandelten murinen Modellorganismus ein Schädel-Hirn-Trauma mittels *Controlled Cortical Impact* initiiert. Es erfolgte die Randomisierung der Versuchstiere in Gruppen mit einer Überlebenszeit von einem, drei und sieben Tagen. Verhaltensbiologische Untersuchungen wurden in Abhängigkeit der Überlebenszeiten durchgeführt, deren Resultate im Einklang mit den dazu in der Literatur beschriebenen Ergebnissen stehen. Mittels Kresylviolett-Färbung erfolgte die volumetrische Bestimmung des Läsionsvolumen sowie die Bestimmung der Schichtdicke des Stratum granulosum. Es zeigte sich ein konstanter Rückgang des initialen Läsionsvolumens sowie ein Rückgang der Schichtdicke im Zeitverlauf. Diese Ergebnisse fügen sich ebenfalls in die bisherigen wissenschaftlichen Erkenntnisse ein.

Die zeitabhängige Expression der Glutamattransporter EAAT1, EAAT2, EAAT3, EAAT4, VGLUT1, VGLUT2 und VGLUT3 wurde mittels qPCR untersucht. Zusätzlich erfolgte die immunhistochemische Bestimmung der Expression von EAAT1 und VGLUT2 in a priori definierten Hirnregionen. Mittels qPCR zeigte sich eine erhöhte relative mRNA-Expression im Zeitverlauf für EAAT1 und EAAT2 sowie eine Reduktion der Expressionsrate für EAAT3 und EAAT4. Die Transporter VGLUT1, VGLUT2 und VGLUT3 zeigten alle eine Reduktion der mRNA-Expression im Zeitverlauf. Immunhistochemisch konnte bezüglich EAAT1 im Bereich lateral der Läsion eine Reduktion der ipsilateralen Expression im Vergleich zu kontralateral festgestellt werden. In weiteren Untersuchungsregionen zeigte sich keine Veränderung der EAAT1 Expression.

Die Expression von VGLUT2 wurde immunhistochemisch ausschließlich im Bereich des Corpus geniculatum laterale des Thalamus untersucht. Hier zeigte sich nach einem Tag eine relative Zunahme der ipsilateralen Konzentration im Vergleich zu kontralateral.

Der überregionale Anstieg der mRNA-Expression von EAAT1 und EAAT2 bei konstantem Rückgang der Expression von VGLUT1 und VGLUT2 könnte einen potentiellen Mechanismus zur Wiederherstellung der Exzitatorisch-Inhibitorischen-Balance darstellen. Gleichzeitig wurde in vorherigen Forschungsarbeiten auch die Reduktion der mRNA-Expression von EAAT1 und EAAT2 beschrieben. Es lässt sich die Hypothese aufstellen, dass die Regulation der Expression des Transporters von dem Ausmaß der zerebralen Ischämie abhängt und somit nach einem Schädel-Hirn-Trauma regionsspezifisch reguliert wird. Hierzu passend konnten in der Immunhistochemie regionale Unterschiede aufgezeigt werden.

Diese Arbeit leistet einen Beitrag zum Verständnis der Regulation von Glutamattransportern nach Schädel-Hirn-Trauma. Für ein tieferes Verständnis der zeitabhängigen Regulation in Abhängigkeit von sowohl der zerebralen Ischämie als auch der spezifischen Hirnregionen, benötigt es weitere Untersuchungen.

8. Literatur

1. Statistisches Bundesamt (DESTATIS). Gesundheit / Tiefgegliederte Diagnosedaten der Krankenhauspatientinnen und -patienten 2021; 2022 [Stand: 10.10.2024]. Verfügbar unter: https://www.statistischebibliothek.de/mir/receive/DEHeft_mods_00145366.
2. Deutsche Gesellschaft für Neurochirurgie e.V. Leitlinie Schädel-Hirn-Trauma im Erwachsenenalter 2015 [Stand: 10.10.2024]. Verfügbar unter: <https://register.awmf.org/de/leitlinien/detail/008-001>.
3. Werner C, Engelhard K. Pathophysiology of traumatic brain injury. *Br J Anaesth* 2007; 99(1):4–9. doi: 10.1093/bja/aem131.
4. Tejada-Bayron FA, Rivera-Aponte DE, Malpica-Nieves CJ, Maldonado-Martínez G, Maldonado HM, Skatchkov SN et al. Activation of Glutamate Transporter-1 (GLT-1) Confers Sex-Dependent Neuroprotection in Brain Ischemia. *Brain Sci* 2021; 11(1). doi: 10.3390/brainsci11010076.
5. Pajarillo E, Rizor A, Lee J, Aschner M, Lee E. The role of astrocytic glutamate transporters GLT-1 and GLAST in neurological disorders: Potential targets for neurotherapeutics. *Neuropharmacology* 2019; 161:107559. doi: 10.1016/j.neuropharm.2019.03.002.
6. Lim S-W, Su H-C, Nyam T-TE, Chio C-C, Kuo J-R, Wang C-C. Ceftriaxone therapy attenuates brain trauma in rats by affecting glutamate transporters and neuroinflammation and not by its antibacterial effects. *BMC Neuroscience* 2021; 22(1):54. doi: 10.1186/s12868-021-00659-8.
7. Fontana ACK. Current approaches to enhance glutamate transporter function and expression. *J Neurochem* 2015; 134(6):982–1007. doi: 10.1111/jnc.13200.
8. Rao VL, Başkaya MK, Doğan A, Rothstein JD, Dempsey RJ. Traumatic brain injury down-regulates glial glutamate transporter (GLT-1 and GLAST) proteins in rat brain. *J Neurochem* 1998; 70(5):2020–7. doi: 10.1046/j.1471-4159.1998.70052020.x.
9. Dorsett CR, McGuire JL, Niedzielko TL, DePasquale EAK, Meller J, Floyd CL et al. Traumatic Brain Injury Induces Alterations in Cortical Glutamate Uptake without a Reduction in Glutamate Transporter-1 Protein Expression. *J Neurotrauma* 2017; 34(1):220–34. doi: 10.1089/neu.2015.4372.
10. Trepel M. *Neuroanatomie: Struktur und Funktion*. 7. Auflage. München: Elsevier; 2017.
11. Lüllmann-Rauch R, Asan E. *Taschenbuch Histologie*. 5., vollst. überarb. Aufl. Stuttgart: Thieme; 2015.
12. Huggenberger S, Moser N, Schröder H, Cozzi B, Granato A, Merighi A. *Neuroanatomie des Menschen*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2019.
13. Sherman SM. Thalamocortical interactions. *Current Opinion in Neurobiology* 2012; 22(4):575–9. doi: 10.1016/j.conb.2012.03.005.
14. Guillery RW, Sherman SM. Thalamic relay functions and their role in corticocortical communication: generalizations from the visual system. *Neuron* 2002; 33(2):163–75. doi: 10.1016/s0896-6273(01)00582-7.
15. Kerschensteiner D, Guido W. Organization of the dorsal lateral geniculate nucleus in the mouse. *Vis Neurosci* 2017; 34:E008. doi: 10.1017/S0952523817000062.
16. Dorsett CR, McGuire JL, DePasquale EAK, Gardner AE, Floyd CL, McCullumsmith RE. Glutamate Neurotransmission in Rodent Models of Traumatic Brain Injury. *J Neurotrauma* 2017; 34(2):263–72. doi: 10.1089/neu.2015.4373.

17. Andjelkovic AV, Nikolic B, Pachter JS, Zecevic N. Macrophages/microglial cells in human central nervous system during development: an immunohistochemical study. *Brain Research* 1998; 814(1-2):13–25. doi: 10.1016/s0006-8993(98)00830-0.
18. Hickman SE, Kingery ND, Ohsumi TK, Borowsky ML, Wang L, Means TK et al. The microglial sensome revealed by direct RNA sequencing. *Nature Neuroscience* 2013; 16(12):1896–905. doi: 10.1038/nn.3554.
19. Hume DA, Perry VH, Gordon S. Immunohistochemical localization of a macrophage-specific antigen in developing mouse retina: phagocytosis of dying neurons and differentiation of microglial cells to form a regular array in the plexiform layers. *Journal of Cell Biology* 1983; 97(1):253–7. doi: 10.1083/jcb.97.1.253.
20. Paolicelli RC, Ferretti MT. Function and Dysfunction of Microglia during Brain Development: Consequences for Synapses and Neural Circuits. *Front Synaptic Neurosci* 2017; 9:9. doi: 10.3389/fnsyn.2017.00009.
21. Green KN, Crapser JD, Hohsfield LA. To Kill a Microglia: A Case for CSF1R Inhibitors. *Trends Immunol* 2020; 41(9):771–84. doi: 10.1016/j.it.2020.07.001.
22. Yuste R, Hawrylycz M, Aalling N, Aguilar-Valles A, Arendt D, Armañanzas R et al. A community-based transcriptomics classification and nomenclature of neocortical cell types. *Nature Neuroscience* 2020; 23(12):1456–68. doi: 10.1038/s41593-020-0685-8.
23. Tay TL, Mai D, Dautzenberg J, Fernández-Klett F, Lin G, Sagar et al. A new fate mapping system reveals context-dependent random or clonal expansion of microglia. *Nature Neuroscience* 2017; 20(6):793–803. doi: 10.1038/nn.4547.
24. Paolicelli RC, Sierra A, Stevens B, Tremblay M-E, Aguzzi A, Ajami B et al. Microglia states and nomenclature: A field at its crossroads. *Neuron* 2022; 110(21):3458–83. doi: 10.1016/j.neuron.2022.10.020.
25. Harting MT, Jimenez F, Adams SD, Mercer DW, Cox CS. Acute, regional inflammatory response after traumatic brain injury: Implications for cellular therapy. *Surgery* 2008; 144(5):803–13. doi: 10.1016/j.surg.2008.05.017.
26. Allen NJ, Lyons DA. Glia as architects of central nervous system formation and function. *Science* 2018; 362(6411):181–5. doi: 10.1126/science.aat0473.
27. Allen NJ. Astrocyte regulation of synaptic behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2014; 30:439–63. doi: 10.1146/annurev-cellbio-100913-013053.
28. Verkhratsky A, Butt A. *Glial Physiology and Pathophysiology*. Wiley 2013. doi: 10.1002/9781118402061.
29. Parpura V, Heneka MT, Montana V, Oliet SHR, Schousboe A, Haydon PG et al. Glial cells in (patho)physiology. *J Neurochem* 2012; 121(1):4–27. doi: 10.1111/j.1471-4159.2012.07664.x.
30. Middeldorp J, Hol EM. GFAP in health and disease. *Progress in Neurobiology* 2011; 93(3):421–43. doi: 10.1016/j.pneurobio.2011.01.005.
31. Hol EM, Pekny M. Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the astrocyte intermediate filament system in diseases of the central nervous system. *Current Opinion in Cell Biology* 2015; 32:121–30. doi: 10.1016/j.ceb.2015.02.004.
32. Brandes R, Lang F, Schmidt RF, Hrsg. *Physiologie des Menschen: Mit Pathophysiologie : mit 850 Farabbildungen*. 32. Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2019. (Springer Lehrbuch).
33. Caudal LC, Gobbo D, Scheller A, Kirchhoff F. The Paradox of Astroglial Ca²⁺ + Signals at the Interface of Excitation and Inhibition. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 2020; 14:609947. doi: 10.3389/fncel.2020.609947.

34. Savtchouk I, Volterra A. Gliotransmission: Beyond Black-and-White. *J Neurosci* 2018; 38(1):14–25. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0017-17.2017.
35. Oberheim NA, Takano T, Han X, He W, Lin JHC, Wang F et al. Uniquely hominid features of adult human astrocytes. *J Neurosci* 2009; 29(10):3276–87. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4707-08.2009.
36. Murphy-Royal C, Dupuis J, Groc L, Oliet SHR. Astroglial glutamate transporters in the brain: Regulating neurotransmitter homeostasis and synaptic transmission. *Journal of Neuroscience Research* 2017; 95(11):2140–51. doi: 10.1002/jnr.24029.
37. Andersen JV, Markussen KH, Jakobsen E, Schousboe A, Waagepetersen HS, Rosenberg PA et al. Glutamate metabolism and recycling at the excitatory synapse in health and neurodegeneration. *Neuropharmacology* 2021; 196:108719. doi: 10.1016/j.neuropharm.2021.108719.
38. Araque A, Martín ED, Perea G, Arellano JI, Buño W. Synaptically released acetylcholine evokes Ca²⁺ elevations in astrocytes in hippocampal slices. *J. Neurosci.* 2002; 22(7):2443–50. doi: 10.1523/JNEUROSCI.22-07-02443.2002.
39. Bezzi P, Carmignoto G, Pasti L, Vesce S, Rossi D, Rizzini BL et al. Prostaglandins stimulate calcium-dependent glutamate release in astrocytes. *Nature* 1998; 391(6664):281–5. doi: 10.1038/34651.
40. Porter JT, McCarthy KD. Astrocytic neurotransmitter receptors in situ and in vivo. *Progress in Neurobiology* 1997; 51(4):439–55. doi: 10.1016/s0301-0082(96)00068-8.
41. Pasti L, Volterra A, Pozzan T, Carmignoto G. Intracellular calcium oscillations in astrocytes: a highly plastic, bidirectional form of communication between neurons and astrocytes in situ. *J. Neurosci.* 1997; 17(20):7817–30. doi: 10.1523/JNEUROSCI.17-20-07817.1997.
42. Perea G, Araque A. Glial calcium signaling and neuron-glia communication. *Cell Calcium* 2005; 38(3-4):375–82. doi: 10.1016/j.ceca.2005.06.015.
43. Verkhratsky A, Nedergaard M. Physiology of Astroglia. *Physiological Reviews* 2018; 98(1):239–389. doi: 10.1152/physrev.00042.2016.
44. Heinrich PC, Müller M, Graeve L, Koch H-G, Hrsg. Löffler/Petrides *Biochemie und Pathobiochemie*. 10., vollständig überarbeitete Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2022. (Lehrbuch).
45. Petroff OAC. GABA and glutamate in the human brain. *Neuroscientist* 2002; 8(6):562–73. doi: 10.1177/1073858402238515.
46. Hertz L. The Glutamate-Glutamine (GABA) Cycle: Importance of Late Postnatal Development and Potential Reciprocal Interactions between Biosynthesis and Degradation. *Frontiers in Endocrinology* 2013; 4:59. doi: 10.3389/fendo.2013.00059.
47. Benarroch EE. Glutamate transporters: diversity, function, and involvement in neurologic disease. *Neurology* 2010; 74(3):259–64. doi: 10.1212/WNL.0b013e3181cc89e3.
48. Danbolt NC. Glutamate uptake. *Br J Dermatol* 2001; 65(1):1–105. doi: 10.1016/s0301-0082(00)00067-8.
49. Zhou Y, Danbolt NC. Glutamate as a neurotransmitter in the healthy brain. *J Neural Transm (Vienna)* 2014; 121(8):799–817. doi: 10.1007/s00702-014-1180-8.
50. Herman MA, Jahr CE. Extracellular glutamate concentration in hippocampal slice. *J. Neurosci.* 2007; 27(36):9736–41. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3009-07.2007.
51. Garey L. *Cortex: Statistics and Geometry of Neuronal Connectivity* 2nd edn. *J Anatomy* 1999; 194(1):153–7. doi: 10.1046/j.1469-7580.1999.194101535.x.

52. Harris JJ, Jolivet R, Attwell D. Synaptic energy use and supply. *Neuron* 2012; 75(5):762–77. doi: 10.1016/j.neuron.2012.08.019.
53. Yu Y, Herman P, Rothman DL, Agarwal D, Hyder F. Evaluating the gray and white matter energy budgets of human brain function. *J Cereb Blood Flow Metab* 2018; 38(8):1339–53. doi: 10.1177/0271678X17708691.
54. Takeda K, Ishida A, Takahashi K, Ueda T. Synaptic vesicles are capable of synthesizing the VGLUT substrate glutamate from α -ketoglutarate for vesicular loading. *J Neurochem* 2012; 121(2):184–96. doi: 10.1111/j.1471-4159.2012.07684.x.
55. Bak LK, Schousboe A, Waagepetersen HS. The glutamate/GABA-glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer. *J Neurochem* 2006; 98(3):641–53. doi: 10.1111/j.1471-4159.2006.03913.x.
56. Moussawi K, Riegel A, Nair S, Kalivas PW. Extracellular glutamate: functional compartments operate in different concentration ranges. *Front Syst Neurosci* 2011; 5:94. doi: 10.3389/fnsys.2011.00094.
57. Kanner BI. Bioenergetics of neurotransmitter transport. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Bioenergetics* 1983; 726(4):293–316. doi: 10.1016/0304-4173(83)90013-7.
58. Lehre KP, Levy LM, Ottersen OP, Storm-Mathisen J, Danbolt NC. Differential expression of two glial glutamate transporters in the rat brain: quantitative and immunocytochemical observations. *J. Neurosci.* 1995; 15(3 Pt 1):1835–53. doi: 10.1523/JNEUROSCI.15-03-01835.1995.
59. Furness DN, Dehnes Y, Akhtar AQ, Rossi DJ, Hamann M, Grutle NJ et al. A quantitative assessment of glutamate uptake into hippocampal synaptic terminals and astrocytes: new insights into a neuronal role for excitatory amino acid transporter 2 (EAAT2). *Neuroscience* 2008; 157(1):80–94. doi: 10.1016/j.neuroscience.2008.08.043.
60. Rothman DL, Feyter HM de, Graaf RA de, Mason GF, Behar KL. ¹³C MRS studies of neuroenergetics and neurotransmitter cycling in humans. *NMR Biomed* 2011; 24(8):943–57. doi: 10.1002/nbm.1772.
61. Norenberg MD, Martinez-Hernandez A. Fine structural localization of glutamine synthetase in astrocytes of rat brain. *Brain Research* 1979; 161(2):303–10. doi: 10.1016/0006-8993(79)90071-4.
62. Kvamme E, Torgner IA, Roberg B. Kinetics and localization of brain phosphate activated glutaminase. *Journal of Neuroscience Research* 2001; 66(5):951–8. doi: 10.1002/jnr.10041.
63. McKenna MC. The glutamate-glutamine cycle is not stoichiometric: fates of glutamate in brain. *Journal of Neuroscience Research* 2007; 85(15):3347–58. doi: 10.1002/jnr.21444.
64. Burger PM, Mehl E, Cameron PL, Maycox PR, Baumert M, Lottspeich F et al. Synaptic vesicles immunisolated from rat cerebral cortex contain high levels of glutamate. *Neuron* 1989; 3(6):715–20. doi: 10.1016/0896-6273(89)90240-7.
65. Hediger MA, Cl  men  on B, Burrier RE, Bruford EA. The ABCs of membrane transporters in health and disease (SLC series): introduction. *Mol Aspects Med* 2013; 34(2-3):95–107. doi: 10.1016/j.mam.2012.12.009.
66. Braschi B, Denny P, Gray K, Jones T, Seal R, Tweedie S et al. Genenames.org: the HGNC and VGNC resources in 2019. *Nucleic Acids Research* 2019; 47(D1):D786-D792. doi: 10.1093/nar/gky930.
67. Sayers EW, Bolton EE, Brister JR, Canese K, Chan J, Comeau DC et al. Database resources of the national center for biotechnology information. *Nucleic Acids Research* 2022; 50(D1):D20-D26. doi: 10.1093/nar/gkab1112.

68. Sato H, Tamba M, Okuno S, Sato K, Keino-Masu K, Masu M et al. Distribution of cystine/glutamate exchange transporter, system x(c)-, in the mouse brain. *J. Neurosci.* 2002; 22(18):8028–33. doi: 10.1523/JNEUROSCI.22-18-08028.2002.
69. Malik AR, Willnow TE. Excitatory Amino Acid Transporters in Physiology and Disorders of the Central Nervous System. *International Journal of Molecular Sciences* 2019; 20(22). doi: 10.3390/ijms20225671.
70. Freidman N, Chen I, Wu Q, Briot C, Holst J, Font J et al. Amino Acid Transporters and Exchangers from the SLC1A Family: Structure, Mechanism and Roles in Physiology and Cancer. *Neurochemical Research* 2020; 45(6):1268–86. doi: 10.1007/s11064-019-02934-x.
71. Vandenberg RJ, Ryan RM. Mechanisms of glutamate transport. *Physiological Reviews* 2013; 93(4):1621–57. doi: 10.1152/physrev.00007.2013.
72. Tzingounis AV, Wadiche JI. Glutamate transporters: confining runaway excitation by shaping synaptic transmission. *Nature Reviews Neuroscience* 2007; 8(12):935–47. doi: 10.1038/nrn2274.
73. Barbour B, Brew H, Attwell D. Electrogenic glutamate uptake in glial cells is activated by intracellular potassium. *Nature* 1988; 335(6189):433–5. doi: 10.1038/335433a0.
74. Owe SG, Marcaggi P, Attwell D. The ionic stoichiometry of the GLAST glutamate transporter in salamander retinal glia. *The Journal of Physiology* 2006; 577(Pt 2):591–9. doi: 10.1113/jphysiol.2006.116830.
75. Veruki ML, Mørkve SH, Hartveit E. Activation of a presynaptic glutamate transporter regulates synaptic transmission through electrical signaling. *Nature Neuroscience* 2006; 9(11):1388–96. doi: 10.1038/nn1793.
76. Arriza JL, Eliasof S, Kavanaugh MP, Amara SG. Excitatory amino acid transporter 5, a retinal glutamate transporter coupled to a chloride conductance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94(8):4155–60. doi: 10.1073/pnas.94.8.4155.
77. Dehnes Y, Chaudhry FA, Ullensvang K, Lehre KP, Storm-Mathisen J, Danbolt NC. The glutamate transporter EAAT4 in rat cerebellar Purkinje cells: a glutamate-gated chloride channel concentrated near the synapse in parts of the dendritic membrane facing astroglia. *J. Neurosci.* 1998; 18(10):3606–19. doi: 10.1523/JNEUROSCI.18-10-03606.1998.
78. Aoyama K, Suh SW, Hamby AM, Liu J, Chan WY, Chen Y et al. Neuronal glutathione deficiency and age-dependent neurodegeneration in the EAAC1 deficient mouse. *Nature Neuroscience* 2006; 9(1):119–26. doi: 10.1038/nn1609.
79. Boudker O, Ryan RM, Yernool D, Shimamoto K, Gouaux E. Coupling substrate and ion binding to extracellular gate of a sodium-dependent aspartate transporter. *Nature* 2007; 445(7126):387–93. doi: 10.1038/nature05455.
80. Verdon G, Boudker O. Crystal structure of an asymmetric trimer of a bacterial glutamate transporter homolog. *Nature Structural & Molecular Biology* 2012; 19(3):355–7. doi: 10.1038/nsmb.2233.
81. Grewer C, Watzke N, Wiessner M, Rauen T. Glutamate translocation of the neuronal glutamate transporter EAAC1 occurs within milliseconds. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97(17):9706–11. doi: 10.1073/pnas.160170397.
82. Diamond JS, Jahr CE. Transporters buffer synaptically released glutamate on a submillisecond time scale. *J. Neurosci.* 1997; 17(12):4672–87. doi: 10.1523/JNEUROSCI.17-12-04672.1997.

83. Bergles DE, Tzingounis AV, Jahr CE. Comparison of coupled and uncoupled currents during glutamate uptake by GLT-1 transporters. *J. Neurosci.* 2002; 22(23):10153–62. doi: 10.1523/JNEUROSCI.22-23-10153.2002.
84. Tong G, Jahr CE. Block of glutamate transporters potentiates postsynaptic excitation. *Neuron* 1994; 13(5):1195–203. doi: 10.1016/0896-6273(94)90057-4.
85. Arnth-Jensen N, Jabaudon D, Scanziani M. Cooperation between independent hippocampal synapses is controlled by glutamate uptake. *Nature Neuroscience* 2002; 5(4):325–31. doi: 10.1038/nn825.
86. Storck T, Schulte S, Hofmann K, Stoffel W. Structure, expression, and functional analysis of a Na(+)-dependent glutamate/aspartate transporter from rat brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89(22):10955–9. doi: 10.1073/pnas.89.22.10955.
87. Pines G, Danbolt NC, Bjørås M, Zhang Y, Bendahan A, Eide L et al. Cloning and expression of a rat brain L-glutamate transporter. *Nature* 1992; 360(6403):464–7. doi: 10.1038/360464a0.
88. Lehre KP, Danbolt NC. The number of glutamate transporter subtype molecules at glutamatergic synapses: chemical and stereological quantification in young adult rat brain. *J. Neurosci.* 1998; 18(21):8751–7. doi: 10.1523/JNEUROSCI.18-21-08751.1998.
89. Lauriat TL, McInnes LA. EAAT2 regulation and splicing: relevance to psychiatric and neurological disorders. *Molecular Psychiatry* 2007; 12(12):1065–78. doi: 10.1038/sj.mp.4002065.
90. Berger UV, Hediger MA. Comparative analysis of glutamate transporter expression in rat brain using differential double in situ hybridization. *Anatomy and Embryology* 1998; 198(1):13–30. doi: 10.1007/s004290050161.
91. Teichberg VI, Cohen-Kashi-Malina K, Cooper I, Zlotnik A. Homeostasis of glutamate in brain fluids: an accelerated brain-to-blood efflux of excess glutamate is produced by blood glutamate scavenging and offers protection from neuropathologies. *Neuroscience* 2009; 158(1):301–8. doi: 10.1016/j.neuroscience.2008.02.075.
92. Kanai Y, Hediger MA. Primary structure and functional characterization of a high-affinity glutamate transporter. *Nature* 1992; 360(6403):467–71. doi: 10.1038/360467a0.
93. Holmseth S, Dehnes Y, Huang YH, Follin-Arbelet VV, Grutle NJ, Mylonakou MN et al. The density of EAAC1 (EAAT3) glutamate transporters expressed by neurons in the mammalian CNS. *J. Neurosci.* 2012; 32(17):6000–13. doi: 10.1523/JNEUROSCI.5347-11.2012.
94. Rothstein JD, Martin L, Levey AI, Dykes-Hoberg M, Jin L, Wu D et al. Localization of neuronal and glial glutamate transporters. *Neuron* 1994; 13(3):713–25. doi: 10.1016/0896-6273(94)90038-8.
95. Stafford MM, Brown MN, Mishra P, Stanwood GD, Mathews GC. Glutamate spillover augments GABA synthesis and release from axodendritic synapses in rat hippocampus. *Hippocampus* 2010; 20(1):134–44. doi: 10.1002/hipo.20600.
96. Larsson HP, Tzingounis AV, Koch HP, Kavanaugh MP. Fluorometric measurements of conformational changes in glutamate transporters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(11):3951–6. doi: 10.1073/pnas.0306737101.
97. Fairman WA, Vandenberg RJ, Arriza JL, Kavanaugh MP, Amara SG. An excitatory amino-acid transporter with properties of a ligand-gated chloride channel. *Nature* 1995; 375(6532):599–603. doi: 10.1038/375599a0.
98. Omote H, Miyaji T, Juge N, Moriyama Y. Vesicular neurotransmitter transporter: bioenergetics and regulation of glutamate transport. *Biochemistry* 2011; 50(25):5558–65. doi: 10.1021/bi200567k.

99. Li D, Héroult K, Silm K, Evrard A, Wojcik S, Oheim M et al. Lack of evidence for vesicular glutamate transporter expression in mouse astrocytes. *J. Neurosci.* 2013; 33(10):4434–55. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3667-12.2013.
100. Naito S, Ueda T. Characterization of glutamate uptake into synaptic vesicles. *J Neurochem* 1985; 44(1):99–109. doi: 10.1111/j.1471-4159.1985.tb07118.x.
101. Thompson CM, Chao C-K. VGLUT substrates and inhibitors: A computational viewpoint. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 2020; 1862(12):183175. doi: 10.1016/j.bbamem.2020.183175.
102. Tabb JS, Kish PE, van Dyke R, Ueda T. Glutamate transport into synaptic vesicles. Roles of membrane potential, pH gradient, and intravesicular pH. *Journal of Biological Chemistry* 1992; 267(22):15412–8. doi: 10.1016/S0021-9258(19)49549-5.
103. Bellocchio EE, Reimer RJ, Fremeau RT, Edwards RH. Uptake of glutamate into synaptic vesicles by an inorganic phosphate transporter. *Science* 2000; 289(5481):957–60. doi: 10.1126/science.289.5481.957.
104. Eriksen J, Chang R, McGregor M, Silm K, Suzuki T, Edwards RH. Protons Regulate Vesicular Glutamate Transporters through an Allosteric Mechanism. *Neuron* 2016; 90(4):768–80. doi: 10.1016/j.neuron.2016.03.026.
105. Hartinger J, Jahn R. An anion binding site that regulates the glutamate transporter of synaptic vesicles. *Journal of Biological Chemistry* 1993; 268(31):23122–7. doi: 10.1016/S0021-9258(19)49435-0.
106. Pietrancosta N, Djibo M, Dumas S, El Mestikawy S, Erickson JD. Molecular, Structural, Functional, and Pharmacological Sites for Vesicular Glutamate Transporter Regulation. *Molecular Neurobiology* 2020; 57(7):3118–42. doi: 10.1007/s12035-020-01912-7.
107. Juge N, Gray JA, Omote H, Miyaji T, Inoue T, Hara C et al. Metabolic control of vesicular glutamate transport and release. *Neuron* 2010; 68(1):99–112. doi: 10.1016/j.neuron.2010.09.002.
108. Eriksen J, Li F, Edwards RH. The mechanism and regulation of vesicular glutamate transport: Coordination with the synaptic vesicle cycle. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 2020; 1862(12):183259. doi: 10.1016/j.bbamem.2020.183259.
109. Juge N, Yoshida Y, Yatsushiro S, Omote H, Moriyama Y. Vesicular glutamate transporter contains two independent transport machineries. *J Biol Chem* 2006; 281(51):39499–506. doi: 10.1074/jbc.M607670200.
110. Bellocchio EE, Hu H, Pohorille A, Chan J, Pickel VM, Edwards RH. The localization of the brain-specific inorganic phosphate transporter suggests a specific presynaptic role in glutamatergic transmission. *J. Neurosci.* 1998; 18(21):8648–59. doi: 10.1523/JNEUROSCI.18-21-08648.1998.
111. Herzog E, Bellenchi GC, Gras C, Bernard V, Ravassard P, Bedet C et al. The existence of a second vesicular glutamate transporter specifies subpopulations of glutamatergic neurons. *J. Neurosci.* 2001; 21(22):RC181. doi: 10.1523/JNEUROSCI.21-22-j0001.2001.
112. Fremeau RT, Troyer MD, Pahner I, Nygaard GO, Tran CH, Reimer RJ et al. The expression of vesicular glutamate transporters defines two classes of excitatory synapse. *Neuron* 2001; 31(2):247–60. doi: 10.1016/S0896-6273(01)00344-0.
113. Wojcik SM, Rhee JS, Herzog E, Sigler A, Jahn R, Takamori S et al. An essential role for vesicular glutamate transporter 1 (VGLUT1) in postnatal development and control of quantal size. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(18):7158–63. doi: 10.1073/pnas.0401764101.

114. Fremeau RT, Kam K, Qureshi T, Johnson J, Copenhagen DR, Storm-Mathisen J et al. Vesicular glutamate transporters 1 and 2 target to functionally distinct synaptic release sites. *Science* 2004; 304(5678):1815–9. doi: 10.1126/science.1097468.
115. Tordera RM, Totterdell S, Wojcik SM, Brose N, Elizalde N, Lasheras B et al. Enhanced anxiety, depressive-like behaviour and impaired recognition memory in mice with reduced expression of the vesicular glutamate transporter 1 (VGLUT1). *Eur J Neurosci* 2007; 25(1):281–90. doi: 10.1111/j.1460-9568.2006.05259.x.
116. Hayashi M, Otsuka M, Morimoto R, Hirota S, Yatsushiro S, Takeda J et al. Differentiation-associated Na⁺-dependent inorganic phosphate cotransporter (DNPI) is a vesicular glutamate transporter in endocrine glutamatergic systems. *J Biol Chem* 2001; 276(46):43400–6. doi: 10.1074/jbc.M106244200.
117. Takamori S, Rhee JS, Rosenmund C, Jahn R. Identification of differentiation-associated brain-specific phosphate transporter as a second vesicular glutamate transporter (VGLUT2). *J. Neurosci.* 2001; 21(22):RC182. doi: 10.1523/JNEUROSCI.21-22-j0002.2001.
118. Bai L, Xu H, Collins JF, Ghishan FK. Molecular and functional analysis of a novel neuronal vesicular glutamate transporter. *J Biol Chem* 2001; 276(39):36764–9. doi: 10.1074/jbc.M104578200.
119. Aihara Y, Mashima H, Onda H, Hisano S, Kasuya H, Hori T et al. Molecular cloning of a novel brain-type Na⁽⁺⁾-dependent inorganic phosphate cotransporter. *J Neurochem* 2000; 74(6):2622–5. doi: 10.1046/j.1471-4159.2000.0742622.x.
120. Varoqui H, Schäfer MKH, Zhu H, Weihe E, Erickson JD. Identification of the differentiation-associated Na⁺/PI transporter as a novel vesicular glutamate transporter expressed in a distinct set of glutamatergic synapses. *J. Neurosci.* 2002; 22(1):142–55. doi: 10.1523/JNEUROSCI.22-01-00142.2002.
121. Land PW, Kyonka E, Shamalla-Hannah L. Vesicular glutamate transporters in the lateral geniculate nucleus: expression of VGLUT2 by retinal terminals. *Brain Research* 2004; 996(2):251–4. doi: 10.1016/j.brainres.2003.10.032.
122. Moechars D, Weston MC, Leo S, Callaerts-Vegh Z, Goris I, Daneels G et al. Vesicular glutamate transporter VGLUT2 expression levels control quantal size and neuropathic pain. *J Neurosci* 2006; 26(46):12055–66. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2556-06.2006.
123. Miyazaki T, Fukaya M, Shimizu H, Watanabe M. Subtype switching of vesicular glutamate transporters at parallel fibre-Purkinje cell synapses in developing mouse cerebellum. *Eur J Neurosci* 2003; 17(12):2563–72. doi: 10.1046/j.1460-9568.2003.02698.x.
124. Abbas Farishta R, Zouahi H, Casanova C. Distributions of vesicular glutamate transporters 1 and 2 in the visual thalamus and associated areas of the cat. *J. Comp. Neurol.* 2022; 530(7):1112–25. doi: 10.1002/cne.25239.
125. Gras C, Herzog E, Bellenchi GC, Bernard V, Ravassard P, Pohl M et al. A third vesicular glutamate transporter expressed by cholinergic and serotonergic neurons. *J. Neurosci.* 2002; 22(13):5442–51. doi: 10.1523/JNEUROSCI.22-13-05442.2002.
126. Fremeau RT, Burman J, Qureshi T, Tran CH, Proctor J, Johnson J et al. The identification of vesicular glutamate transporter 3 suggests novel modes of signaling by glutamate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(22):14488–93. doi: 10.1073/pnas.222546799.
127. Schäfer MK-H, Varoqui H, Defamie N, Weihe E, Erickson JD. Molecular cloning and functional identification of mouse vesicular glutamate transporter 3 and its expression in subsets of novel excitatory neurons. *J Biol Chem* 2002; 277(52):50734–48. doi: 10.1074/jbc.M206738200.

128. Nickerson Poulin A, Guerci A, El Mestikawy S, Semba K. Vesicular glutamate transporter 3 immunoreactivity is present in cholinergic basal forebrain neurons projecting to the basolateral amygdala in rat. *The Journal of Comparative Neurology* 2006; 498(5):690–711. doi: 10.1002/cne.21081.
129. Seal RP, Wang X, Guan Y, Raja SN, Woodbury CJ, Basbaum AI et al. Injury-induced mechanical hypersensitivity requires C-low threshold mechanoreceptors. *Nature* 2009; 462(7273):651–5. doi: 10.1038/nature08505.
130. Seal RP, Akil O, Yi E, Weber CM, Grant L, Yoo J et al. Sensorineural deafness and seizures in mice lacking vesicular glutamate transporter 3. *Neuron* 2008; 57(2):263–75. doi: 10.1016/j.neuron.2007.11.032.
131. Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte. ICD-10-GM Version 2021, Systematisches Verzeichnis, Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme, 10. Revision, Stand: 18. September 2020 2020 [Stand: 23.09.2020]. Verfügbar unter: https://www.bfarm.de/DE/Kodiersysteme/Services/Downloads/_node.html.
132. Williamson C, Rajajee V. Traumatic brain injury: Epidemiology, classification, and pathophysiology. UpToDate [Stand: 14.10.2021]. Verfügbar unter: <https://www.uptodate.com/contents/traumatic-brain-injury-epidemiology-classification-and-pathophysiology>.
133. Teasdale G, Jennett B. Assessment of coma and impaired consciousness. A practical scale. *Lancet* 1974; 2(7872):81–4. doi: 10.1016/s0140-6736(74)91639-0.
134. Teasdale G, Jennett B. Assessment and prognosis of coma after head injury. *Acta Neurochir (Wien)* 1976; 34(1-4):45–55. doi: 10.1007/BF01405862.
135. Balestreri M, Czosnyka M, Chatfield DA, Steiner LA, Schmidt EA, Smielewski P et al. Predictive value of Glasgow Coma Scale after brain trauma: change in trend over the past ten years. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2004; 75(1):161–2.
136. Maas AIR, Stocchetti N, Bullock R. Moderate and severe traumatic brain injury in adults. *The Lancet Neurology* 2008; 7(8):728–41. doi: 10.1016/S1474-4422(08)70164-9.
137. James SL, Theadom A, Ellenbogen RG, Bannick MS, Montjoy-Venning W, Lucchesi LR et al. Global, regional, and national burden of traumatic brain injury and spinal cord injury, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet Neurology* 2019; 18(1):56–87. doi: 10.1016/S1474-4422(18)30415-0.
138. Brazinova A, Rehorcikova V, Taylor MS, Buckova V, Majdan M, Psota M et al. Epidemiology of Traumatic Brain Injury in Europe: A Living Systematic Review. *J Neurotrauma* 2021; 38(10):1411–40. doi: 10.1089/neu.2015.4126.
139. Puljula J, Mäkinen E, Cygnel H, Kortelainen M-L, Hillbom M. Incidence of moderate-to-severe traumatic brain injuries after reduction in alcohol prices. *Acta Neurol Scand* 2013; 127(3):192–7. doi: 10.1111/j.1600-0404.2012.01697.x.
140. Jarrahi A, Braun M, Ahluwalia M, Gupta RV, Wilson M, Munie S et al. Revisiting Traumatic Brain Injury: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Interventions. *Biomedicines* 2020; 8(10). doi: 10.3390/biomedicines8100389.
141. Drew LB, Drew WE. The contrecoup-coup phenomenon: a new understanding of the mechanism of closed head injury. *Neurocritical Care* 2004; 1(3):385–90. doi: 10.1385/NCC:1:3:385.
142. Kaur P, Sharma S. Recent Advances in Pathophysiology of Traumatic Brain Injury. *Curr Neuropharmacol* 2018; 16(8):1224–38. doi: 10.2174/1570159X15666170613083606.

143. Andriessen TMJC, Jacobs B, Vos PE. Clinical characteristics and pathophysiological mechanisms of focal and diffuse traumatic brain injury. *J Cell Mol Med* 2010; 14(10):2381–92. doi: 10.1111/j.1582-4934.2010.01164.x.
144. Aromatario M, Torsello A, D'Errico S, Bertozzi G, Sessa F, Cipolloni L et al. Traumatic Epidural and Subdural Hematoma: Epidemiology, Outcome, and Dating. *Medicina (Kaunas)* 2021; 57(2). doi: 10.3390/medicina57020125.
145. Peterson AB. Surveillance Report of Traumatic Brain Injury-related Deaths by Age Group, Sex, and Mechanism of Injury—United States, 2018 and 2019. Centers for Disease Control and Prevention, U.S. Department of Health and Human Services. 2022.
146. Han JX, See AAQ, Gandhi M, King NKK. Models of Mortality and Morbidity in Severe Traumatic Brain Injury: An Analysis of a Singapore Neurotrauma Database. *World Neurosurg* 2017; 108:885-893.e1. doi: 10.1016/j.wneu.2017.08.147.
147. Bruns J, Hauser WA. The epidemiology of traumatic brain injury: a review. *Epilepsia* 2003; 44(s10):2–10. doi: 10.1046/j.1528-1157.44.s10.3.x.
148. Griswold DP, Fernandez L, Rubiano AM. Traumatic Subarachnoid Hemorrhage: A Scoping Review. *J Neurotrauma* 2022; 39(1-2):35–48. doi: 10.1089/neu.2021.0007.
149. Dennerll TJ, Lamoureux P, Buxbaum RE, Heidemann SR. The cytomechanics of axonal elongation and retraction. *Journal of Cell Biology* 1989; 109(6 Pt 1):3073–83. doi: 10.1083/jcb.109.6.3073.
150. Meythaler JM, Peduzzi JD, Eleftheriou E, Novack TA. Current concepts: diffuse axonal injury-associated traumatic brain injury. *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation* 2001; 82(10):1461–71. doi: 10.1053/apmr.2001.25137.
151. Mira RG, Lira M, Cerpa W. Traumatic Brain Injury: Mechanisms of Glial Response. *Front Physiol* 2021; 12:740939. doi: 10.3389/fphys.2021.740939.
152. Marmarou A, Signoretti S, Fatouros PP, Portella G, Aygok GA, Bullock MR. Predominance of cellular edema in traumatic brain swelling in patients with severe head injuries. *Journal of Neurosurgery* 2006; 104(5):720–30. doi: 10.3171/jns.2006.104.5.720.
153. Cunningham AS, Salvador R, Coles JP, Chatfield DA, Bradley PG, Johnston AJ et al. Physiological thresholds for irreversible tissue damage in contusional regions following traumatic brain injury. *Brain* 2005; 128(Pt 8):1931–42. doi: 10.1093/brain/awh536.
154. Stein NR, McArthur DL, Etchepare M, Vespa PM. Early cerebral metabolic crisis after TBI influences outcome despite adequate hemodynamic resuscitation. *Neurocritical Care* 2012; 17(1):49–57. doi: 10.1007/s12028-012-9708-y.
155. Steiner LA, Andrews PJD. Monitoring the injured brain: ICP and CBF. *Br J Anaesth* 2006; 97(1):26–38. doi: 10.1093/bja/ael110.
156. Demers-Marcil S, Coles JP. Cerebral metabolic derangements following traumatic brain injury. *Current Opinion in Anaesthesiology* 2022; 35(5):562–9. doi: 10.1097/ACO.0000000000001183.
157. Guilfoyle MR, Helmy A, Donnelly J, Stovell MG, Timofeev I, Pickard JD et al. Characterising the dynamics of cerebral metabolic dysfunction following traumatic brain injury: A microdialysis study in 619 patients. *PLoS ONE* 2021; 16(12):e0260291. doi: 10.1371/journal.pone.0260291.
158. Jha RM, Kochanek PM, Simard JM. Pathophysiology and treatment of cerebral edema in traumatic brain injury. *Neuropharmacology* 2019; 145(Pt B):230–46. doi: 10.1016/j.neuropharm.2018.08.004.
159. Turtzo LC, Budde MD, Gold EM, Lewis BK, Janes L, Yarnell A et al. The evolution of traumatic brain injury in a rat focal contusion model. *NMR Biomed* 2013; 26(4):468–79. doi: 10.1002/nbm.2886.

160. Lifshitz J, Sullivan PG, Hovda DA, Wieloch T, McIntosh TK. Mitochondrial damage and dysfunction in traumatic brain injury. *Mitochondrion* 2004; 4(5-6):705–13. doi: 10.1016/j.mito.2004.07.021.
161. Tavazzi B, Signoretti S, Lazzarino G, Amorini AM, Delfini R, Cimatti M et al. Cerebral oxidative stress and depression of energy metabolism correlate with severity of diffuse brain injury in rats. *Neurosurgery* 2005; 56(3):582-9; discussion 582-9. doi: 10.1227/01.neu.0000156715.04900.e6.
162. Pandya JD, Leung LY, Yang X, Flerlage WJ, Gilsdorf JS, Deng-Bryant Y et al. Comprehensive Profile of Acute Mitochondrial Dysfunction in a Preclinical Model of Severe Penetrating TBI. *Frontiers in Neurology* 2019; 10:605. doi: 10.3389/fneur.2019.00605.
163. Jalloh I, Carpenter KLH, Helmy A, Carpenter TA, Menon DK, Hutchinson PJ. Glucose metabolism following human traumatic brain injury: methods of assessment and pathophysiological findings. *Metab Brain Dis* 2015; 30(3):615–32. doi: 10.1007/s11011-014-9628-y.
164. Hakiminia B, Alikiaii B, Khorvash F, Mousavi S. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction following traumatic brain injury: From mechanistic view to targeted therapeutic opportunities. *Fundam Clin Pharmacol* 2022; 36(4):612–62. doi: 10.1111/fcp.12767.
165. Fesharaki-Zadeh A. Oxidative Stress in Traumatic Brain Injury. *International Journal of Molecular Sciences* 2022; 23(21). doi: 10.3390/ijms232113000.
166. Khatri N, Thakur M, Pareek V, Kumar S, Sharma S, Datusalia AK. Oxidative Stress: Major Threat in Traumatic Brain Injury. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2018; 17(9):689–95. doi: 10.2174/1871527317666180627120501.
167. Starkov AA. The role of mitochondria in reactive oxygen species metabolism and signaling. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2008; 1147:37–52. doi: 10.1196/annals.1427.015.
168. Arundine M, Tymianski M. Molecular mechanisms of glutamate-dependent neurodegeneration in ischemia and traumatic brain injury. *Cell Mol Life Sci* 2004; 61(6):657–68. doi: 10.1007/s00018-003-3319-x.
169. Jamjoom AAB, Rhodes J, Andrews PJD, Grant SGN. The synapse in traumatic brain injury. *Brain* 2021; 144(1):18–31. doi: 10.1093/brain/awaa321.
170. Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol* 2007; 81(1):1–5. doi: 10.1189/jlb.0306164.
171. Corps KN, Roth TL, McGavern DB. Inflammation and neuroprotection in traumatic brain injury. *JAMA Neurol* 2015; 72(3):355–62. doi: 10.1001/jamaneurol.2014.3558.
172. Escartin C, Galea E, Lakatos A, O'Callaghan JP, Petzold GC, Serrano-Pozo A et al. Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions. *Nature Neuroscience* 2021; 24(3):312–25. doi: 10.1038/s41593-020-00783-4.
173. Sofroniew MV. Astroglialosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2014; 7(2):a020420. doi: 10.1101/cshperspect.a020420.
174. Burda JE, Sofroniew MV. Reactive gliosis and the multicellular response to CNS damage and disease. *Neuron* 2014; 81(2):229–48. doi: 10.1016/j.neuron.2013.12.034.
175. Kang W, Hébert JM. Signaling pathways in reactive astrocytes, a genetic perspective. *Molecular Neurobiology* 2011; 43(3):147–54. doi: 10.1007/s12035-011-8163-7.
176. Li L, Lundkvist A, Andersson D, Wilhelmsson U, Nagai N, Pardo AC et al. Protective role of reactive astrocytes in brain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 2008; 28(3):468–81. doi: 10.1038/sj.jcbfm.9600546.

177. Bonde C, Noraberg J, Noer H, Zimmer J. Ionotropic glutamate receptors and glutamate transporters are involved in necrotic neuronal cell death induced by oxygen-glucose deprivation of hippocampal slice cultures. *Neuroscience* 2005; 136(3):779–94. doi: 10.1016/j.neuroscience.2005.07.020.
178. Galgano M, Toshkezi G, Qiu X, Russell T, Chin L, Zhao L-R. Traumatic Brain Injury: Current Treatment Strategies and Future Endeavors. *Cell Transplant* 2017; 26(7):1118–30. doi: 10.1177/0963689717714102.
179. Pannen BHJ, Loop T. Evidenzbasierte Intensivtherapie des erhöhten intrakraniellen Drucks nach Schädel-Hirn-Trauma. *Anaesthesist* 2005; 54(2):127–36. doi: 10.1007/s00101-004-0785-y.
180. Morganti-Kossmann MC, Semple BD, Hellewell SC, Bye N, Ziebell JM. The complexity of neuroinflammation consequent to traumatic brain injury: from research evidence to potential treatments. *Acta Neuropathologica* 2019; 137(5):731–55. doi: 10.1007/s00401-018-1944-6.
181. Johnson VE, Meaney DF, Cullen DK, Smith DH. Animal models of traumatic brain injury. *Handb Clin Neurol* 2015; 127:115–28. doi: 10.1016/B978-0-444-52892-6.00008-8.
182. Nilsson B, Pontén U, Voigt G. Experimental head injury in the rat. Part 1: Mechanics, pathophysiology, and morphology in an impact acceleration trauma model. *Journal of Neurosurgery* 1977; 47(2):241–51. doi: 10.3171/jns.1977.47.2.0241.
183. Dixon CE, Lyeth BG, Povlishock JT, Findling RL, Hamm RJ, Marmarou A et al. A fluid percussion model of experimental brain injury in the rat. *Journal of Neurosurgery* 1987; 67(1):110–9. doi: 10.3171/jns.1987.67.1.0110.
184. Dixon CE, Clifton GL, Lighthall JW, Yaghmai AA, Hayes RL. A controlled cortical impact model of traumatic brain injury in the rat. *J Neurosci Methods* 1991; 39(3):253–62. doi: 10.1016/0165-0270(91)90104-8.
185. Osier N, Dixon CE. The Controlled Cortical Impact Model of Experimental Brain Trauma: Overview, Research Applications, and Protocol. *Methods Mol Biol* 2016; 1462:177–92. doi: 10.1007/978-1-4939-3816-2_11.
186. Marklund N, Hillered L. Animal modelling of traumatic brain injury in preclinical drug development: where do we go from here? *Br J Pharmacol* 2011; 164(4):1207–29. doi: 10.1111/j.1476-5381.2010.01163.x.
187. Fox GB, Fan L, Levasseur RA, Faden AI. Sustained sensory/motor and cognitive deficits with neuronal apoptosis following controlled cortical impact brain injury in the mouse. *J Neurotrauma* 1998; 15(8):599–614. doi: 10.1089/neu.1998.15.599.
188. Xiong Y, Mahmood A, Chopp M. Animal models of traumatic brain injury. *Nature Reviews Neuroscience* 2013; 14(2):128–42. doi: 10.1038/nrn3407.
189. Cernak I. Animal models of head trauma. *NeuroRX* 2005; 2(3):410–22. doi: 10.1602/neurorx.2.3.410.
190. Shreiber DI, Bain AC, Ross DT, Smith DH, Gennarelli TA, McIntosh TK et al. Experimental investigation of cerebral contusion: histopathological and immunohistochemical evaluation of dynamic cortical deformation. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 1999; 58(2):153–64. doi: 10.1097/00005072-199902000-00005.
191. Gennarelli TA, Thibault LE, Adams JH, Graham DI, Thompson CJ, Marcincin RP. Diffuse axonal injury and traumatic coma in the primate. *Annals of Neurology* 1982; 12(6):564–74. doi: 10.1002/ana.410120611.

192. LUCAS DR, NEWHOUSE JP. The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina. *AMA Arch Ophthalmol* 1957; 58(2):193–201. doi: 10.1001/archopht.1957.00940010205006.
193. Olney JW, Rhee V, Ho OL. Kainic acid: a powerful neurotoxic analogue of glutamate. *Brain Research* 1974; 77(3):507–12. doi: 10.1016/0006-8993(74)90640-4.
194. Neves D, Salazar IL, Almeida RD, Silva RM. Molecular mechanisms of ischemia and glutamate excitotoxicity. *Life Sciences* 2023; 328:121814. doi: 10.1016/j.lfs.2023.121814.
195. Ladak AA, Enam SA, Ibrahim MT. A Review of the Molecular Mechanisms of Traumatic Brain Injury. *World Neurosurg* 2019; 131:126–32. doi: 10.1016/j.wneu.2019.07.039.
196. Guerriero RM, Giza CC, Rotenberg A. Glutamate and GABA imbalance following traumatic brain injury. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2015; 15(5):27. doi: 10.1007/s11910-015-0545-1.
197. Witkowski ED, Gao Y, Gavsyuk AF, Maor I, DeWalt GJ, Eldred WD et al. Rapid Changes in Synaptic Strength After Mild Traumatic Brain Injury. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 2019; 13:166. doi: 10.3389/fncel.2019.00166.
198. Cantu D, Walker K, Andresen L, Taylor-Weiner A, Hampton D, Tesco G et al. Traumatic Brain Injury Increases Cortical Glutamate Network Activity by Compromising GABAergic Control. *Cereb Cortex* 2015; 25(8):2306–20. doi: 10.1093/cercor/bhu041.
199. Brizuela M, Blizzard CA, Chuckowree JA, Pitman KA, Young KM, Dickson T. Mild Traumatic Brain Injury Leads to Decreased Inhibition and a Differential Response of Calretinin Positive Interneurons in the Injured Cortex. *J Neurotrauma* 2017; 34(17):2504–17. doi: 10.1089/neu.2017.4977.
200. Moon IS, Apperson ML, Kennedy MB. The major tyrosine-phosphorylated protein in the postsynaptic density fraction is N-methyl-D-aspartate receptor subunit 2B. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91(9):3954–8. doi: 10.1073/pnas.91.9.3954.
201. Choi DW. Excitotoxicity: Still Hammering the Ischemic Brain in 2020. *Frontiers in Neuroscience* 2020; 14:579953. doi: 10.3389/fnins.2020.579953.
202. Choi DW. Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture is calcium dependent. *Neuroscience Letters* 1985; 58(3):293–7. doi: 10.1016/0304-3940(85)90069-2.
203. Choi DW. Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. *J. Neurosci.* 1987; 7(2):369–79. doi: 10.1523/JNEUROSCI.07-02-00369.1987.
204. Sattler R, Charlton MP, Hafner M, Tymianski M. Distinct influx pathways, not calcium load, determine neuronal vulnerability to calcium neurotoxicity. *J Neurochem* 1998; 71(6):2349–64. doi: 10.1046/j.1471-4159.1998.71062349.x.
205. Angelova PR, Vinogradova D, Neganova ME, Serkova TP, Sokolov VV, Bachurin SO et al. Pharmacological Sequestration of Mitochondrial Calcium Uptake Protects Neurons Against Glutamate Excitotoxicity. *Molecular Neurobiology* 2019; 56(3):2244–55. doi: 10.1007/s12035-018-1204-8.
206. Schäfer MKE, Pfeiffer A, Jaeckel M, Pouya A, Dolga AM, Methner A. Regulators of mitochondrial Ca(2+) homeostasis in cerebral ischemia. *Cell Tissue Res* 2014; 357(2):395–405. doi: 10.1007/s00441-014-1807-y.
207. Lewén A, Fujimura M, Sugawara T, Matz P, Copin JC, Chan PH. Oxidative stress-dependent release of mitochondrial cytochrome c after traumatic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 2001; 21(8):914–20. doi: 10.1097/00004647-200108000-00003.
208. Choi DW. Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* 1988; 1(8):623–34. doi: 10.1016/0896-6273(88)90162-6.

209. Rossi DJ, Oshima T, Attwell D. Glutamate release in severe brain ischaemia is mainly by reversed uptake. *Nature* 2000; 403(6767):316–21. doi: 10.1038/35002090.
210. Haroon E, Miller AH, Sanacora G. Inflammation, Glutamate, and Glia: A Trio of Trouble in Mood Disorders. *Neuropsychopharmacology* 2017; 42(1):193–215. doi: 10.1038/npp.2016.199.
211. Castro-Coronel Y, Del Razo LM, Huerta M, Hernandez-Lopez A, Ortega A, López-Bayghen E. Arsenite exposure downregulates EAAT1/GLAST transporter expression in glial cells. *Toxicol Sci* 2011; 122(2):539–50. doi: 10.1093/toxsci/kfr126.
212. Susarla BTS, Robinson MB. Internalization and degradation of the glutamate transporter GLT-1 in response to phorbol ester. *Neurochem Int* 2008; 52(4-5):709–22. doi: 10.1016/j.neuint.2007.08.020.
213. Celine G, Thomas M. Temporal characterisation and electrophysiological implications of TBI-induced serine/threonine kinase activity in mouse cortex. *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)* 2025; 82(1):102. doi: 10.1007/s00018-025-05638-4.
214. Olmos G, Lladó J. Tumor necrosis factor alpha: a link between neuroinflammation and excitotoxicity. *Mediators Inflamm* 2014; 2014:861231. doi: 10.1155/2014/861231.
215. van Landeghem FK, Stover JF, Bechmann I, Brück W, Unterberg A, Bührer C et al. Early expression of glutamate transporter proteins in ramified microglia after controlled cortical impact injury in the rat. *Glia* 2001; 35(3):167–79. doi: 10.1002/glia.1082.
216. Zhuang Z, Liu M, Luo J, Zhang X, Dai Z, Zhang B et al. Exosomes derived from bone marrow mesenchymal stem cells attenuate neurological damage in traumatic brain injury by alleviating glutamate-mediated excitotoxicity. *Exp Neurol* 2022; 357:114182. doi: 10.1016/j.expneurol.2022.114182.
217. Zhuang Z, Liu M, Dai Z, Luo J, Zhang B, Yu H et al. Bone marrow stromal cells-derived exosomes reduce neurological damage in traumatic brain injury through the miR-124-3p/p38 MAPK/GLT-1 axis. *Exp Neurol* 2023; 365:114408. doi: 10.1016/j.expneurol.2023.114408.
218. Gržeta Krpan N, Harej Hrkać A, Janković T, Dolenc P, Bekyarova E, Parpura V et al. Chemically Functionalized Single-Walled Carbon Nanotubes Prevent the Reduction in Plasmalemmal Glutamate Transporter EAAT1 Expression in, and Increase the Release of Selected Cytokines from, Stretch-Injured Astrocytes in Vitro. *Cells* 2024; 13(3). doi: 10.3390/cells13030225.
219. Fontana AC, Fox DP, Zouboulis A, Mortensen OV, Raghupathi R. Neuroprotective Effects of the Glutamate Transporter Activator (R)-(-)-5-methyl-1-nicotinoyl-2-pyrazoline (MS-153) following Traumatic Brain Injury in the Adult Rat. *J Neurotrauma* 2016; 33(11):1073–83. doi: 10.1089/neu.2015.4079.
220. Romariz SAA, Main BS, Harvey AC, Longo BM, Burns MP. Delayed treatment with ceftriaxone reverses the enhanced sensitivity of TBI mice to chemically-induced seizures. *PLoS ONE* 2023; 18(7):e0288363. doi: 10.1371/journal.pone.0288363.
221. Piao C-S, Holloway AL, Hong-Routson S, Wainwright MS. Depression following traumatic brain injury in mice is associated with down-regulation of hippocampal astrocyte glutamate transporters by thrombin. *J Cereb Blood Flow Metab* 2019; 39(1):58–73. doi: 10.1177/0271678X17742792.
222. Garcia JP, Armbruster M, Sommer M, Nunez-Berenger A, Dulla CG. Glutamate uptake is transiently compromised in the perilesional cortex following controlled cortical impact. *Cereb Cortex* 2025; 35(2). doi: 10.1093/cercor/bhaf031.
223. Goodrich GS, Kabakov AY, Hameed MQ, Dhamne SC, Rosenberg PA, Rotenberg A. Ceftriaxone treatment after traumatic brain injury restores expression of the glutamate

- transporter, GLT-1, reduces regional gliosis, and reduces post-traumatic seizures in the rat. *J Neurotrauma* 2013; 30(16):1434–41. doi: 10.1089/neu.2012.2712.
224. Hameed MQ, Hsieh T-H, Morales-Quezada L, Lee HHC, Damar U, MacMullin PC et al. Ceftriaxone Treatment Preserves Cortical Inhibitory Interneuron Function via Transient Salvage of GLT-1 in a Rat Traumatic Brain Injury Model. *Cereb Cortex* 2019; 29(11):4506–18. doi: 10.1093/cercor/bhy328.
 225. Yi J-H, Pow DV, Hazell AS. Early loss of the glutamate transporter splice-variant GLT-1v in rat cerebral cortex following lateral fluid-percussion injury. *Glia* 2005; 49(1):121–33. doi: 10.1002/glia.20099.
 226. Akçay G, Aslan M, Kipmen Korgun D, Çeker T, Akan E, Derin N. Effects of transcranial direct current stimulation on the glutamatergic pathway in the male rat hippocampus after experimental focal cerebral ischemia. *J. Neurosci. Res.* 2024; 102(1):e25247. doi: 10.1002/jnr.25247.
 227. Yi J-H, Herrero R, Chen G, Hazell AS. Glutamate transporter EAAT4 is increased in hippocampal astrocytes following lateral fluid-percussion injury in the rat. *Brain Research* 2007; 1154:200–5. doi: 10.1016/j.brainres.2007.04.011.
 228. Melo CV, Okumoto S, Gomes JR, Baptista MS, Bahr BA, Frommer WB et al. Spatiotemporal resolution of BDNF neuroprotection against glutamate excitotoxicity in cultured hippocampal neurons. *Neuroscience* 2013; 237:66–86. doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.01.054.
 229. Munoz-Ballester C, Mahmutovic D, Rafiqzad Y, Korot A, Robel S. Mild Traumatic Brain Injury-Induced Disruption of the Blood-Brain Barrier Triggers an Atypical Neuronal Response. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 2022; 16:821885. doi: 10.3389/fncel.2022.821885.
 230. Pomierny B, Krzyżanowska W, Skórkowska A, Jurczyk J, Bystrowska B, Budziszewska B et al. Inhibition of Vesicular Glutamate Transporters (VGLUTs) with Chicago Sky Blue 6B Before Focal Cerebral Ischemia Offers Neuroprotection. *Molecular Neurobiology* 2023; 60(6):3130–46. doi: 10.1007/s12035-023-03259-1.
 231. Michalski D, Härtig W, Krügel K, Edwards RH, Böddener M, Böhme L et al. Region-specific expression of vesicular glutamate and GABA transporters under various ischaemic conditions in mouse forebrain and retina. *Neuroscience* 2013; 231:328–44. doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.11.046.
 232. Prakash N, Stark CJ, Keisler MN, Luo L, Der-Avakian A, Dulcis D. Serotonergic Plasticity in the Dorsal Raphe Nucleus Characterizes Susceptibility and Resilience to Anhedonia. *J. Neurosci.* 2020; 40(3):569–84. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1802-19.2019.
 233. Del Godino MC, Romera VG, Sánchez-Tomero JA, Pacheco J, Canals S, Lerma J et al. Amelioration of ischemic brain damage by peritoneal dialysis. *J Clin Invest* 2013; 123(10):4359–63. doi: 10.1172/JCI67284.
 234. Da Silva-Candal A, Pérez-Díaz A, Santamaría M, Correa-Paz C, Rodríguez-Yáñez M, Ardá A et al. Clinical validation of blood/brain glutamate grabbing in acute ischemic stroke. *Annals of Neurology* 2018; 84(2):260–73. doi: 10.1002/ana.25286.
 235. Wang F, Tang H, Zhu J, Zhang JH. Transplanting Mesenchymal Stem Cells for Treatment of Ischemic Stroke. *Cell Transplant* 2018; 27(12):1825–34. doi: 10.1177/0963689718795424.
 236. Cudkovic ME, Titus S, Kearney M, Yu H, Sherman A, Schoenfeld D et al. Safety and efficacy of ceftriaxone for amyotrophic lateral sclerosis: a multi-stage, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet Neurology* 2014; 13(11):1083–91. doi: 10.1016/S1474-4422(14)70222-4.

237. Kong Q, Chang L-C, Takahashi K, Liu Q, Schulte DA, Lai L et al. Small-molecule activator of glutamate transporter EAAT2 translation provides neuroprotection. *J Clin Invest* 2014; 124(3):1255–67. doi: 10.1172/JCI66163.
238. Lin C-H, You J-R, Wei K-C, Gean P-W. Stimulating ERK/PI3K/NFκB signaling pathways upon activation of mGluR2/3 restores OGD-induced impairment in glutamate clearance in astrocytes. *Eur J Neurosci* 2014; 39(1):83–96. doi: 10.1111/ejn.12383.
239. Carriel V, Campos A, Alaminos M, Raimondo S, Geuna S. Staining Methods for Normal and Regenerative Myelin in the Nervous System. *Methods Mol Biol* 2017; 1560:207–18. doi: 10.1007/978-1-4939-6788-9_15.
240. Smith DH, Soares HD, Pierce JS, Perlman KG, Saatman KE, Meaney DF et al. A model of parasagittal controlled cortical impact in the mouse: cognitive and histopathologic effects. *J Neurotrauma* 1995; 12(2):169–78. doi: 10.1089/neu.1995.12.169.
241. SAATMAN KE, Feeko KJ, Pape RL, Raghupathi R. Differential behavioral and histopathological responses to graded cortical impact injury in mice. *J Neurotrauma* 2006; 23(8):1241–53. doi: 10.1089/neu.2006.23.1241.
242. Oshina I, Spigulis J. Beer-Lambert law for optical tissue diagnostics: current state of the art and the main limitations. *J Biomed Opt* 2021; 26(10). doi: 10.1117/1.JBO.26.10.100901.
243. Hummel R, Ulbrich S, Appel D, Li S, Hirnet T, Zander S et al. Administration of all-trans retinoic acid after experimental traumatic brain injury is brain protective. *Br J Pharmacol* 2020; 177(22):5208–23. doi: 10.1111/bph.15259.
244. Ritter K, Jung K, Dolderer C, Appel D, Oswald CC, Ritz U et al. Early Reciprocal Effects in a Murine Model of Traumatic Brain Injury and Femoral Fracture. *Mediators Inflamm* 2021; 2021:8835730. doi: 10.1155/2021/8835730.
245. Gölz C, Kirchhoff FP, Westerhorstmann J, Schmidt M, Hirnet T, Rune GM et al. Sex hormones modulate pathogenic processes in experimental traumatic brain injury. *J Neurochem* 2019; 150(2):173–87. doi: 10.1111/jnc.14678.
246. Liu N-K, Zhang Y-P, Zou J, Verhovshek T, Chen C, Lu Q-B et al. A semicircular controlled cortical impact produces long-term motor and cognitive dysfunction that correlates well with damage to both the sensorimotor cortex and hippocampus. *Brain Research* 2014; 1576:18–26. doi: 10.1016/j.brainres.2014.05.042.
247. Shen Y, Lu H, Xu R, Tian H, Xia X, Zhou FH et al. The Expression of GLAST and GLT1 in a Transient Cerebral Ischemia Mongolian Gerbil Model. *Neuropsychiatr Dis Treat* 2020; 16:789–800. doi: 10.2147/NDT.S238455.
248. López-Redondo F, Nakajima K, Honda S, Kohsaka S. Glutamate transporter GLT-1 is highly expressed in activated microglia following facial nerve axotomy. *Molecular Brain Research* 2000; 76(2):429–35. doi: 10.1016/S0169-328x(00)00022-x.
249. Ikematsu K, Tsuda R, Kondo T, Nakasono I. The expression of excitatory amino acid transporter 2 in traumatic brain injury. *Forensic Science International* 2002; 130(2-3):83–9. doi: 10.1016/S0379-0738(02)00344-4.
250. Wallace J. The assessment and control of the severity of scientific procedures on laboratory animals. Report of the Laboratory Animal Science Association Working Party. *Lab Anim* 1990; 24(2):97–130. doi: 10.1258/002367790780890185.
251. Kahrman A, Bouley J, Bosco DA, Shazeeb MS, Henninger N. Differential association of baseline body weight and body-weight loss with neurological deficits, histology, and death after repetitive closed head traumatic brain injury. *Neuroscience Letters* 2022; 771:136430. doi: 10.1016/j.neulet.2021.136430.

252. Graham MA, Juzang PT, White TE. Effects of repetitive mild traumatic brain injury on weight gain and chronic behavioral outcomes in male rats. *PLoS ONE* 2023; 18(7):e0287506. doi: 10.1371/journal.pone.0287506.
253. Zhang YP, Cai J, Shields LBE, Liu N, Xu X-M, Shields CB. Traumatic brain injury using mouse models. *Transl Stroke Res* 2014; 5(4):454–71. doi: 10.1007/s12975-014-0327-0.
254. Schaar KL, Brenneman MM, Savitz SI. Functional assessments in the rodent stroke model. *Exp Transl Stroke Med* 2010; 2(1):13. doi: 10.1186/2040-7378-2-13.
255. Tsenter J, Beni-Adani L, Assaf Y, Alexandrovich AG, Trembovler V, Shohami E. Dynamic changes in the recovery after traumatic brain injury in mice: effect of injury severity on T2-weighted MRI abnormalities, and motor and cognitive functions. *J Neurotrauma* 2008; 25(4):324–33. doi: 10.1089/neu.2007.0452.
256. Xiong Y, Mahmood A, Chopp M. Animal models of traumatic brain injury. *Nature Reviews Neuroscience* 2013; 14(2):128–42. doi: 10.1038/nrn3407.
257. Deacon RMJ. Measuring motor coordination in mice. *Journal of Visualized Experiments* 2013; (75):e2609. doi: 10.3791/2609.
258. Hamm RJ, Pike BR, O'Dell DM, Lyeth BG, Jenkins LW. The rotarod test: an evaluation of its effectiveness in assessing motor deficits following traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 1994; 11(2):187–96. doi: 10.1089/neu.1994.11.187.
259. Brooks SP, Dunnett SB. Tests to assess motor phenotype in mice: a user's guide. *Nature Reviews Neuroscience* 2009; 10(7):519–29. doi: 10.1038/nrn2652.
260. Cording KR, Bateup HS. Altered motor learning and coordination in mouse models of autism spectrum disorder. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 2023; 17:1270489. doi: 10.3389/fncel.2023.1270489.
261. Kim D, Hwang J, Yoo J, Choi J, Ramalingam M, Kim S et al. The time-dependent changes in a mouse model of traumatic brain injury with motor dysfunction. *PLoS ONE* 2024; 19(9):e0307768. doi: 10.1371/journal.pone.0307768.
262. Kraeuter A-K, Guest PC, Sarnyai Z. The Open Field Test for Measuring Locomotor Activity and Anxiety-Like Behavior. *Methods Mol Biol* 2019; 1916:99–103. doi: 10.1007/978-1-4939-8994-2_9.
263. Kalueff AV, Tuohimaa P. Grooming analysis algorithm for neurobehavioural stress research. *Brain Research Protocols* 2004; 13(3):151–8. doi: 10.1016/j.brainresprot.2004.04.002.
264. Võikar V, Vasar E, Rauvala H. Behavioral alterations induced by repeated testing in C57BL/6J and 129S2/Sv mice: implications for phenotyping screens. *Genes Brain Behav* 2004; 3(1):27–38. doi: 10.1046/j.1601-183x.2003.0044.x.
265. Vogel A, Wilken-Schmitz A, Hummel R, Lang M, Gurke R, Schreiber Y et al. Low brain endocannabinoids associated with persistent non-goal directed nighttime hyperactivity after traumatic brain injury in mice. *Sci Rep* 2020; 10(1):14929. doi: 10.1038/s41598-020-71879-x.
266. Sebastiani A, Hirnet T, Jahn-Eimermacher A, Thal SC. Comparison of speed-vacuum method and heat-drying method to measure brain water content of small brain samples. *J Neurosci Methods* 2017; 276:73–8. doi: 10.1016/j.jneumeth.2016.11.012.
267. Timaru-Kast R, Coronel-Castello SP, Krämer TJ, Hugonnet AV, Schäfer MKE, Sebastiani A et al. AT 1 inhibition mediated neuroprotection after experimental traumatic brain injury is dependent on neutrophils in male mice. *Sci Rep* 2023; 13(1):7413. doi: 10.1038/s41598-023-33797-6.
268. Yang L-Y, Greig NH, Huang Y-N, Hsieh T-H, Tweedie D, Yu Q-S et al. Post-traumatic administration of the p53 inactivator pifithrin- α oxygen analogue reduces hippocampal

- neuronal loss and improves cognitive deficits after experimental traumatic brain injury. *Neurobiology of Disease* 2016; 96:216–26. doi: 10.1016/j.nbd.2016.08.012.
269. Zhou H, Chen L, Gao X, Luo B, Chen J. Moderate traumatic brain injury triggers rapid necrotic death of immature neurons in the hippocampus. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 2012; 71(4):348–59. doi: 10.1097/NEN.0b013e31824ea078.
270. Mistral T, Roca P, Maggia C, Tucholka A, Forbes F, Doyle S et al. Automated Quantification of Brain Lesion Volume From Post-trauma MR Diffusion-Weighted Images. *Frontiers in Neurology* 2021; 12:740603. doi: 10.3389/fneur.2021.740603.
271. Brossard C, Grèze J, Busschère J-A de, Attyé A, Richard M, Tornior FD et al. Prediction of therapeutic intensity level from automatic multiclass segmentation of traumatic brain injury lesions on CT-scans. *Sci Rep* 2023; 13(1):20155. doi: 10.1038/s41598-023-46945-9.
272. Jacobs B, Beems T, van der Vliet TM, Diaz-Arrastia RR, Borm GF, Vos PE. Computed tomography and outcome in moderate and severe traumatic brain injury: hematoma volume and midline shift revisited. *J Neurotrauma* 2011; 28(2):203–15. doi: 10.1089/neu.2010.1558.
273. Duan S, Anderson CM, Stein BA, Swanson RA. Glutamate induces rapid upregulation of astrocyte glutamate transport and cell-surface expression of GLAST. *J Neurosci* 1999; 19(23):10193–200. doi: 10.1523/JNEUROSCI.19-23-10193.1999.
274. Zhang W, Miao Y, Zhou S, Jiang J, Luo Q, Qiu Y. Neuroprotective effects of ischemic postconditioning on global brain ischemia in rats through upregulation of hippocampal glutamine synthetase. *J Clin Neurosci* 2011; 18(5):685–9. doi: 10.1016/j.jocn.2010.08.027.
275. Gupta RK, Prasad S. Early down regulation of the glial Kir4.1 and GLT-1 expression in pericontusional cortex of the old male mice subjected to traumatic brain injury. *Biogerontology* 2013; 14(5):531–41. doi: 10.1007/s10522-013-9459-y.
276. González MI, Robinson MB. Protein kinase C-dependent remodeling of glutamate transporter function. *Molecular Interventions* 2004; 4(1):48–58. doi: 10.1124/mi.4.1.48.
277. van Landeghem FKH, Weiss T, Oehmichen M, Deimling A von. Decreased expression of glutamate transporters in astrocytes after human traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 2006; 23(10):1518–28. doi: 10.1089/neu.2006.23.1518.
278. Panzer MB, Wood GW, Bass CR. Scaling in neurotrauma: how do we apply animal experiments to people? *Exp Neurol* 2014; 261:120–6. doi: 10.1016/j.expneurol.2014.07.002.
279. Osier N, Dixon CE. The Controlled Cortical Impact Model of Experimental Brain Trauma: Overview, Research Applications, and Protocol. *Methods Mol Biol* 2016; 1462:177–92. doi: 10.1007/978-1-4939-3816-2_11.
280. Kalimon OJ, Vekaria HJ, Velmurugan GV, Hubbard WB, Sullivan PG. Characterizing Sex Differences in Mitochondrial Dysfunction After Severe Traumatic Brain Injury in Mice. *Neurotrauma Rep* 2023; 4(1):627–42. doi: 10.1089/neur.2023.0046.

9. Danksagung

Zuallererst möchte ich mich herzlich bei [...] für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die Möglichkeit zur Promotion bedanken. Zudem gilt ihm mein Dank für die Überlassung des Themas meiner Dissertation sowie für seine Hilfestellungen und Anregungen während der gesamten Forschungsarbeit.

Mein besonderer Dank gilt zudem meiner Betreuerin [...], sowie [...] und [...] für deren fachliche Expertise und wertvolle Unterstützung.

Darüber hinaus möchte ich mich bei den weiteren Mitarbeitenden der Arbeitsgruppe Neuroprotektion bedanken, insbesondere bei [...] und [...] für deren tatkräftige Unterstützung und unentwegte Mithilfe bei der praktischen Umsetzung des Forschungsvorhabens.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie – meinen Eltern und meinen Geschwistern – sowie meiner Partnerin für deren Rückhalt, die pausenlose Unterstützung und die vielen guten Ratschläge.