

---

Klinik für Neonatologie, Campus Virchow Klinikum

Direktor: Prof. Dr. med. Michael Obladen

---

**DIE BEDEUTUNG APOPTOTISCHER  
SIGNALTRANSDUKTIONSMECHANISMEN IN KLINISCHEN UND  
EXPERIMENTELLEN SCHÄDIGUNGSMODELLEN  
DES UNREIFEN GEHIRNS**

**HABILITATIONSSCHRIFT**

zur Erlangung der Venia Legendi

für das Fach Kinderheilkunde

vorgelegt dem

Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät Charité

der Humboldt Universität zu Berlin

von

Dr. med. Ursula Felderhoff-Müser

geboren am 23.04.1965 in Bonn

Präsident: Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Mlynek

Dekan: Prof. Dr. med. Joachim W. Dudenhausen

eingereicht: im Juni 2003

Öffentlich-wissenschaftlicher Vortrag am: 04. Dezember 2003

Gutachter: 1. Prof. Dr. Ingeborg Krägeloh-Mann

2. Prof. Dr. Hans-Ulrich Bucher

Meinem lieben Mann

Dr. Christoph Müser

und

In memoriam meinem Vater

Dr. Bernhard Felderhoff

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>KURZFASSUNG</b>	7
<b>1. EINLEITUNG</b>	
<b>1.1 Ursachen der Schädigung des unreifen Gehirns</b>	10
1.1.1 Hypoxie, Hyperoxie, Inflammation	10
1.1.2 Intrazerebrale Blutungen	13
1.1.3 Hydrozephalus	13
1.1.4 Trauma	14
<b>1.2 Mechanismen der Schädigung des unreifen Gehirns</b>	15
1.2.1 Apoptotische Signaltransduktion	17
<b>1.3 Modellsysteme zur Untersuchung des unreifen Gehirns</b>	25
1.3.1 Tiermodelle	25
1.3.2 Klinische Modelle	26
<b>2. FRAGESTELLUNGEN IN DEN VORGESTELLTEN ARBEITEN</b>	
<b>2.1 Histologische Untersuchungen der Hirnschädigung von Frühgeborenen im Vergleich mit der Magnetresonanztomographie</b>	28
<b>2.2 Die Rolle des pro-apoptotischen Zelloberflächenrezeptors Fas bei der hypoxisch-ischämischen Enzephalopathie (HIE)</b>	29
2.2.1 Fas Expression im Tiermodell der HIE	29
2.2.2 Fas Expression im humanen System bei HIE	30

<b>2.3 Die Aktivierung und Regulation der apoptotischen Stoffwechselkaskade nach Trauma des unreifen Rattengehirns</b>	<b>31</b>
<b>2.4 Lösliche apoptotische Faktoren im Liquor von Kindern mit Hydrozephalus</b>	<b>32</b>
<b>3. AUSGEWÄHLTE ORIGINALARBEITEN ZUM THEMA</b>	
<b>3.1 Histologische Untersuchungen der Hirnschädigung von Frühgeborenen im Vergleich mit der Magnetresonanztomographie</b>	<b>33</b>
<b>3.2 Die Rolle des pro-apoptotischen Zelloberflächenrezeptors Fas bei HIE</b>	<b>33</b>
<b>3.3 Die Aktivierung und Regulation der apoptotischen Stoffwechselkaskade nach Trauma des unreifen Rattengehirns</b>	<b>34</b>
<b>3.4 Lösliche apoptotische Faktoren im Liquor von Kindern mit Hydrozephalus</b>	<b>34</b>
<b>4. DISKUSSION DER ERGEBNISSE</b>	
<b>4.1 Histologische Korrelation der Hirnschädigung von Frühgeborenen mit der Magnetresonanztomographie</b>	<b>35</b>
<b>4.2 Die Rolle des pro-apoptotischen Zelloberflächenrezeptors Fas bei HIE</b>	<b>38</b>
4.2.1 Fas Expression im Tiermodell der hypoxisch-ischämischen Schädigung des neonatalen Rattengehirns	38
4.2.2 Neuroprotektion im Modell der HIE durch Inhibition von Caspasen	39
4.2.3 Bestätigung der Fas Expression in post-mortem Gewebe nach hypoxischer Hirnschädigung des Neugeborenen	40

<b>4.3 Apoptotische Signalgebung im Tiermodell der traumatischen Hirnschädigung der unreifen Ratte</b>	42
4.3.1 Die Aktivierung des extrinsischen apoptotischen Systems	43
4.3.2 Die Aktivierung des intrinsischen apoptotischen Systems	43
4.3.3 Die Regulation durch Wachstumsfaktoren	44
4.3.4 Neuroprotektion im Traumamodell durch Inhibition von Caspasen	45
<b>4.4 Die Rolle von löslichen apoptotischen Faktoren beim kindlichen Hydrozephalus</b>	46
4.4.1 Lösliches Fas, löslicher Fas Ligand und aktivierte Caspase 3 im Liquor von Kindern mit Hydrozephalus	46
4.4.2 Lösliches Fas bei Patienten mit Hydrozephalus und periventrikulärer Leukomalazie	48
<b>4.5 Schlußfolgerung und Ausblick</b>	49
<b>LISTE DER ABKÜRZUNGEN</b>	50
<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	51
<b>DANKSAGUNG</b>	63
<b>EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG</b>	65

## **KURZFASSUNG**

### ***Einleitung***

Das Wissen um die Schädigungsmechanismen im unreifen Gehirn ist limitiert und gängige Modelle zur Untersuchung von neuronalen Verletzungen des reifen Nervensystems lassen sich nicht einfach auf das unreife übertragen. Programmierter Zelltod oder Apoptose wird im sich entwickelnden Gehirn nicht nur physiologisch zur Reduktion überschüssig angelegter neuronaler Zellen beobachtet, sondern ist auch der vorwiegende Modus des Zelltodes durch einen schädigenden Insult.

In den hier vorliegenden klinischen und experimentellen Arbeiten sollten Mechanismen einer Schädigung des unreifen Gehirns näher charakterisiert werden. Im tierexperimentellen Teil der Studien wurden apoptotische Faktoren und deren Regulation an zwei unterschiedlichen experimentellen Schädigungsmodellen des unreifen Gehirns (Hypoxie, Trauma) untersucht, mit dem Ziel mögliche neuroprotektive Ansätze zu identifizieren. In einem weiteren Teil der Arbeiten ging es darum, die Darstellung der Hirnschädigung von sehr unreifer Frühgeborenen in der Magnetresonanztomographie (MRT) histologisch an Autopsiematerial zu charakterisieren. An Autopsiefällen mit pontosubikulärer Nekrose (PSN) sollten die molekularen Mechanismen einer Hypoxie mittels pro-apoptischer Marker näher untersucht werden. Der klinische Teil der Arbeiten hatte die Identifizierung Apoptose-regulierender Faktoren im Liquor von Patienten mit Hydrozephalus zum Ziel.

### ***Methodik***

Tiermodelle: Am Modell der hypoxisch-ischämischen und der traumatischen Hirnschädigung des unreifen Rattengehirns wurden mittels Immunhistochemie, RT-PCR, ELISA Technik und Western Blotting molekulare Mechanismen der apoptotischen Stoffwechsellkaskade untersucht.

Autopsiematerial: MRT-Bilder des Gehirns von schwer kranken Frühgeborenen wurden kurz vor oder nach ihrem Tod angefertigt und mit histologischen Untersuchungen verglichen. Autopsiefälle nach hypoxischer Hirnschädigung mit dem Bild einer PSN wurden immunhistochemisch auf die Expression des pro-apoptotischen Zelloberflächenrezeptors Fas und seines Liganden untersucht.

Liquor: Im Liquor von Neugeborenen und älteren Kindern mit Hydrozephalus wurden die Apoptose-regulierenden Faktoren lösliches Fas (sFas), löslicher Fas Ligand (sFasL) und aktivierte Caspase 3 mittels ELISA Technik untersucht.

## **Resultate**

### Tiermodell der hypoxisch-ischämischen Hirnschädigung des unreifen Rattengehirns

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß der pro-apoptotische Zelloberflächenrezeptor Fas auf neuronalen Zellen exprimiert wird und als Todesrezeptor wirksam ist. Zudem wurde eine Hochregulation dieses Rezeptors nach hypoxisch-ischämischer Hirnschädigung mit einem Maximum von 6 bis 12 Stunden beobachtet. Mittels pharmakologischer Inhibition der Fas-abhängigen Stoffwechselkaskade mit Caspaseninhibitoren ließ sich *in vitro* an primären neuronalen Zellkulturen ein neuroprotektiver Effekt nachweisen.

### Autopsiematerial nach hypoxischer Hirnschädigung

An Autopsiefällen von asphyktischen Neugeborenen ließ sich eine Hochregulation der Expression von Fas in den pontinen Kerngebieten und im Subiculum des Hippocampus nachweisen. Diese war am stärksten auf Neuronen ausgeprägt, die die histologischen Zeichen eines frühen apoptotischen Stadiums aufwiesen. Fas Ligand Expression zeigte sich überwiegend auf Astrozyten und Mikroglia.

### Tiermodell der traumatischen Hirnschädigung des unreifen Rattengehirns

Es konnte gezeigt werden, dass bei der Neurodegeneration nach Trauma auf das unreife Gehirn mindestens zwei verschiedene apoptotische Stoffwechselwege aktiviert werden: Der extrinsische Weg führt über die Aktivierung von Fas zur Hochregulation von

Caspase 8. Der intrinsische Weg beinhaltet die Freisetzung von Cytochrom C in das Zytoplasma mit anschließender Aktivierung von Caspase 9. Zudem war die Expression von Mitgliedern der Bcl-2 Familie erniedrigt. Durch Einsatz eines Caspaseninhibitors als neuroprotektive Maßnahme konnte auch in diesem Modell die apoptotische Schädigung deutlich reduziert werden. Zudem wurde die Expression der neurotrophen Wachstumsfaktoren BDNF und NT-3 durch Trauma moduliert.

#### MRT des Frühgeborenengehirns und Histologie

Diese Studie konnte mittels der MRT Auffälligkeiten des unreifen Gehirns extrem kleiner Frühgeborener ab einem Gestationsalter von 24 Schwangerschaftswochen demonstrieren, die sehr gut mit den histologischen Befunden korrelierten. Mit den hier verwendeten konventionellen Sequenzen ließen sich die anatomischen Strukturen, Blutungen und Infarkte gut darstellen. Diffuse Veränderungen der Signalintensität der weißen Substanz korrelierten mit apoptotischen und gliösen Arealen in der Histologie.

#### Apoptose-regulierende Faktoren im Liquor von Kindern mit Hydrozephalus

Es konnte gezeigt werden, daß die anti-apoptotisch wirkende lösliche Form des Zelloberflächenrezeptors Fas (sFas) bei allen untersuchten Patientengruppen von Kindern mit Hydrozephalus (Frühgeborene, Neugeborene, ältere Kinder mit Shuntrevision) signifikant erhöht war. Bei einer Untergruppe von Kindern mit periventrikulärer Leukomalazie (PVL) korrelierte die Höhe von sFas mit dem späteren Auftreten einer PVL. sFasL und aktivierte Caspase 3 fanden sich in keinem Fall im Liquor erhöht.

#### **Schlußfolgerungen**

Die in dieser kumulativen Habilitationsschrift aufgeführten Arbeiten haben die weitreichende Rolle apoptotischer Mechanismen in unterschiedlichen klinischen und experimentellen Schädigungsmodellen des unreifen Gehirns demonstriert und weiterführende Fragestellungen aufgezeigt. Im klinischen Umfeld besteht mit neueren bildgebenden Verfahren und der Untersuchung biochemischer Marker die Möglichkeit, Schädigungen des Gehirns näher zu charakterisieren. Mit diesen Untersuchungen wurden Grundlagen zur Identifikation möglicher neuroprotektiver Angriffspunkte erarbeitet.

## 1. EINLEITUNG

### 1.1 Ursachen der Schädigung des unreifen Gehirns

Wesentliche Gründe für neurologische Folgeerkrankungen im unreifen Gehirn sind perinataler Sauerstoffmangel, Hyperoxie, Hirnblutungen, Trauma, Infektionen, metabolische Störungen, Intoxikationen und Fehlbildungen. Im Folgenden werden fokussiert einige wichtige Ursachen einer frühkindlichen Hirnschädigung dargestellt. Diese sind auch Gegenstand der vorliegenden klinischen und experimentellen Arbeiten.

#### 1.1.1 Hypoxie, Hyperoxie, Inflammation

Die perinatale Hirnschädigung trägt wesentlich zu frühkindlicher Morbidität und Mortalität bei [Volpe 2001]. Allein in Deutschland erleiden etwa 1000 Kinder im Jahr eine gravierende Schädigung des Nervensystems, die aus einem perinatal einwirkenden Insult resultiert [Berger 2002]. Bei Reifgeborenen sind perinatale Asphyxien, beim Frühgeborenen die Schädigung der weißen Substanz, durch eine Vielzahl von Ursachen, wesentliche Faktoren eines neurologischen Folgeschadens [Kirpalani 2001].

Die Empfindlichkeit gegenüber einer Hypoxie hängt sehr stark von der intrazerebralen Durchblutung und dem Energiemetabolismus ab. Nach einer perinatalen Asphyxie kommt es im unreifen Gehirn zu einer ganzen Kaskade von neurotoxischen Ereignissen: Zusammenbrechen des Energiehaushaltes, Freisetzung von Glutamat, Aktivierung des N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptors, Einstrom von Calcium-Ionen und Formierung freier Radikale wie NO. Dies resultiert in mitochondrialer Dysfunktion, Schädigung von Membranlipiden und Proteinen und führt schließlich zum Tod der Zelle.

Die neuropathologische Manifestation der Schädigung hängt ganz entscheidend vom Entwicklungsstatus des Gehirns, aber auch von der Art der Schädigung und der

stattgefundenen Interventionen ab [Vexler 2001]. Die wichtigsten neuropathologischen Korrelate einer hypoxisch-ischämischen Enzephalopathie (HIE) sind selektive neuronale Nekrosen, der Status marmoratus, parasagittale Verletzungen, die periventrikuläre Leukomalazie (PVL) und multifokale ischämische Läsionen. Beim Reifgeborenen beobachtet man typischerweise die Schädigung der Basalganglien, den Status marmoratus, während bei Frühgeborenen die PVL, aber auch die diffuse multifokale Schädigung, deren Ursache nicht abschließend geklärt ist, dominiert. Das klinische Bild ist sehr variabel und reicht von motorischen und kognitiven Entwicklungsverzögerungen bis zum Vollbild einer Zerebralparese [Volpe 2001].

Frühgeborene repräsentieren 5% aller Geburten, aber 50% aller Kinder mit frühkindlichen Hirnschädigungen [Berkowitz 1993]. Die Überlebensraten dieser Kinder sind ständig gestiegen, nicht jedoch die Chance ohne Behinderung zu überleben. Die Gruppe der sehr kleinen Frühgeborenen unter 1000g Geburtsgewicht hat ein besonders hohes Risiko für die Entwicklung motorischer und insbesondere kognitiver Defizite [Grunau 2002, Tommiska 2003].

Neuere Studien zeigen, dass bei Frühgeborenen möglicherweise neben einer Hypoxie auch andere Mechanismen für die Entstehung dieser Schäden verantwortlich sind. Das Frühgeborene ist im Verlauf seiner frühen extrauterinen Entwicklung aufgrund der Unreife der Lunge und des Hirnstamms wechselnden Sauerstoffkonzentrationen ausgesetzt. Hypoxische Situationen, aber auch die relative postnatale Hyperoxie (verglichen mit dem intrauterinen Sauerstoffpartialdruck von 25 mmHg) spielen eine wesentliche Rolle in der Genese der Hirnschädigung [Taglialatela 2000, Felderhoff-Müser 2002, Höhn 2003]. Hypoxische Insulte haben bei Frühgeborenen oft eine Hirnblutung zur Folge, die die Prognose dieser Kinder entscheidend verschlechtert [Volpe 2001].

In den letzten Jahren werden inflammatorische Prozesse fernab vom kindlichen Gehirn als Auslöser für eine zerebrale Schädigung diskutiert. Auslöser wie eine mütterliche Chorioamnionitis [Yoon 1997; Gomez 1997; Dammann 1999, 2002; Berger 2002] oder

auch kindliche inflammatorische Erkrankungen, wie z.B. eine nekrotisierende Enterokolitis sind mit einer schlechten neurologischen Prognose assoziiert [Sonntag 1999]. Ein weiterer möglicher Hinweis auf eine inflammatorische Genese dieser Schädigungen ist die Tatsache, dass pränatal erhöhte Serumspiegel von inflammatorischen Zytokinen mit einem hohen Risiko der Entwicklung einer Zerebralparese vergesellschaftet sind [Nelson 1998]. In postnatal abgenommenen Blutproben konnte dies jedoch nicht bestätigt werden, wie eine neuere Studie derselben Gruppe gezeigt hat [Nelson 2003].

Untersuchungen am Tiermodell haben gezeigt, dass Inflammationen nicht nur den, durch einen hypoxisch-ischämischen Insult ausgelösten Schaden potenzieren, sondern auch direkt schädigend auf das Gehirn einwirken können [Eklind 2001, Dommergues 2000]. Dies wird möglicherweise durch kardiovaskuläre Effekte von Endotoxinen vermittelt, was zur zerebralen Hypoperfusion mit daraus resultierender Gewebhypoxie führt [Berger 2002]. Als Folge werden neben fokalen insbesondere diffuse Hirnschädigungen vermutet, über deren zugrundeliegenden Mechanismen nur wenig bekannt ist. Leider ist es bisher nicht gelungen, ein Tiermodell der spezifischen Schädigung des Frühgeborenengehirns zu etablieren, da es sich wahrscheinlich um ein multifaktorielles Geschehen handelt [Hagberg 2002].

Im der klinischen Praxis wird angenommen, dass sich gerade diese subtilen, multifokalen Läsionen bei Frühgeborenen in den gängigen Ultraschalluntersuchungen nicht darstellen [Maalouf 2001, Hüppi 2002]. Neuere Untersuchungsmodalitäten wie die Magnetresonanztomographie (MRT) zeigen diffuse Veränderungen der Signalintensität der weißen Substanz und eine reduzierte Entwicklung des zerebralen Kortex [Battin 1997, Maalouf 1999, Ajayi-Obe 2000]. An ehemaligen Frühgeborenen durchgeführte Untersuchungen beschreiben eine Reduktion des Hirnvolumens und eine Korrelation mit schlechter psychomotorischer Entwicklung dieser Kinder [Inder 1999; Peterson 2000, 2003]. Die

pathophysiologischen Korrelate dieser Läsionen sind gerade Gegenstand intensiver Forschungen.

### 1.1.2 Intrazerebrale Blutungen

Intrazerebrale Blutungen können bei Gerinnungsstörungen, nach Trauma, Hypoxie, Malformationen und assoziiert mit Infektionen im unreifen Gehirn auftreten. Periventrikuläre und/oder intraventrikuläre Blutungen sind typische Läsionen des Frühgeborenengehirns. Meist haben sie ihren Ursprung im Gefäßbett des periventrikulären Keimlagers, einer Hirnregion, die beim Reifgeborenen nicht mehr vorhanden ist [Volpe 2001]. Die Gefäße dieser Region sind sehr fragil und können Fluktuationen im zerebralen Blutfluss oft nicht standhalten [Milligan 1980]. Auch werden Blutungen durch andere Faktoren, wie Koagulationsstörungen oder Thrombozytenaggregationsstörungen verstärkt [Amato 1988]. Kürzlich wurde ein Zusammenhang zwischen einer Chorioamnionitis, der Erhöhung pro-inflammatorischer Zytokine (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8) im Nabelschnurblut und dem Auftreten von Hirnblutungen beschrieben [Tauscher 2003]. Mögliche Konsequenzen einer Hirnblutung sind die Zerstörung des Keimlagers, ein hämorrhagischer Parenchyminfarkt, die Entwicklung eines Hydrozephalus und eine periventrikuläre Leukomalazie.

### 1.1.3 Hydrozephalus

Hydrozephalus ist eine pathologische Erweiterung der zerebralen Ventrikel, die aus einer gestörten Liquorzirkulation resultiert. Bei Kindern ist die Ätiologie des Hydrozephalus vielfältig. Beim Frühgeborenen tritt ein shuntpflichtiger Hydrozephalus meist nach einer intrazerebralen Blutung auf und ist der wichtigste prognostische Faktor für eine schlechte psychomotorische Entwicklung. Als weitere Ursachen für den kindlichen Hydrozephalus kommen Infektionen, Fehlbildungen (Arnold Chiari Malformation, Dandy Walker Malformation, Aquäduktstenose etc.), Traumen oder Liquorzirkulationsstörungen

ungeklärter Genese in Frage [Volpe 2001]. Als Resultate dieser Störungen vermutet man die Entstehung einer Art chronischen Gewebehypoxie, die unter anderem zu einer axonalen Schädigung führen kann. Da es nur wenige experimentelle Modelle gibt, sind die dem Hydrozephalus zugrundeliegenden Pathomechanismen nur unzureichend geklärt [del Bigio 1998]. Zudem fehlen objektive klinische Parameter, um die oft diffuse klinische Symptomatik bei Shunt-dysfunktion näher einzuordnen.

#### 1.1.4 Trauma

Die traumatische Hirnschädigung trägt in Industrieländern entscheidend zur gesellschaftlichen Morbidität und Mortalität bei [Goldstein 1990, Sosin 1995, Thurman 1999] und ist ein wesentlicher Grund für Tod und neurologische Residualsyndrome in der Kindheit. Als Ursachen für mechanische Hirnverletzungen bei Neugeborenen und Säuglingen kommen perinatale Traumen im Rahmen von Geburtsverletzungen, oft in Verbindung mit einer Asphyxie, und Kindesmißhandlungen in Frage [Volpe 2001]. Bei Kleinkindern und jungen Schulkindern stehen Unfälle, insbesondere im Straßenverkehr, an erster Stelle.

Im Gegensatz zum Trauma des Erwachsenen sind die dem kindlichen Hirntrauma zugrundeliegenden Pathomechanismen noch weitgehend ungeklärt. Die Annahme, dass die Pathophysiologie von Hirntraumen bei Kindern identisch mit denen der Erwachsenen ist, ist nicht korrekt. Klinische Studien haben gezeigt, dass Kinder unter 4 Jahren die schlechteste neurologische Prognose aufweisen [Mahoney 1983, Koskiniemi 1995, Adelson 1998]. Unterschiede in den Umständen wie es zum Trauma kommt, sind sicher nur eine Begründung für die erhöhte Vulnerabilität des juvenilen Gehirns [Kraus 1987, James 1999]. Obwohl diese Kinder die größte Gruppe der Hirnverletzten repräsentieren, haben sich bisher nur wenige Forschergruppen diesem Thema zugewandt [Adelson 1998].

## **1.2 Mechanismen der Schädigung des unreifen Gehirns**

Kinder, deren Gehirn während seiner Entwicklung geschädigt wurde, leiden ihr ganzes Leben unter den oft dramatischen Konsequenzen. Obwohl die klinischen und sozioökonomischen Folgen gravierend sind, ist die Entwicklung effektiver neuroprotektiver Therapiestrategien bisher noch in weiter Ferne.

Die Ursachen einer frühkindlichen Hirnschädigung, aber auch die Mechanismen, unterscheiden sich deutlich vom adulten Gehirn [Towfighi 1997, Back 2002]. Auch sind die klinischen Möglichkeiten der diagnostischen Darstellung von Pathologien bedingt durch die begrenzte Belastbarkeit der kleinen Patienten limitiert.

Verschiedene experimentelle Modelle sind in den letzten Jahren zur Erforschung der kindlichen Hypoxie [Rice 1981, Taylor 1999, Hagberg 2002], der Meningitis [Leib 1998, Reiss 2002] und des Hirntraumas etabliert worden [Ikonomidou 1996, Pohl 1999]. Es konnte gezeigt werden, dass bei einer Verletzung des unreifen Gehirns zwischen der akuten Schädigung, die sofort auftritt, und einem sekundären oder verzögerten Zelltod unterschieden werden muss. Dieser tritt Stunden bis Tage nach dem Insult auf und bestimmt letztlich die Langzeitprognose der neurologischen Entwicklung [Mehmet 1994, Taylor 1999, Ishimaru 1999].

Die Freisetzung und Akkumulation von potentiell schädigenden Faktoren wie Calcium und exzitotoxische Aminosäuren, z.B. Glutamat und Aspartat, mit konsekutiver Aktivierung ihrer spezifischen Rezeptoren werden als Initiatoren des sekundären Zelluntergangs angesehen [Faden 1989]. Auch können Insulte die elektrophysiologischen Eigenschaften von Ionenkanälen verändern, die mit den Rezeptoren von exzitotoxischen Aminosäuren verbunden sind.

Als Resultat treten mindestens zwei Formen von Zelltod auf, der schnelle exzitotoxische und der langsame apoptotische oder programmierte neuronale Zelltod [Faden 1989, Conti

1998], die morphologisch unterschieden werden können [Olney 1971, Wyllie 1980, Ishimaru 1999]. Im unreifen Gehirn ist der langsame apoptotische Zelltod nach einem Insult morphologisch identisch mit physiologisch auftretender Apoptose. Insbesondere während der intrauterinen Entwicklung wird im Gehirn Apoptose als Regulationsmechanismus für überschüssig angelegte Neurone regelhaft beobachtet [Cheema 1999, Dikranian 2001]. Zudem ist die Menge der apoptotischen Zellschädigung regional unterschiedlich und direkt proportional zum physiologischen Zelltod in einer bestimmten Hirnregion. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass es sich bei schädigungsbedingter Apoptose im unreifen Gehirn um eine Art Überaktivierung von physiologischen Apoptosemechanismen handeln könnte [Bittigau 1998, 1999; Pohl 1999].

Was sind die Gründe dafür, dass ein bestimmter Insult mit minimal schädigendem Potential im erwachsenen Gehirn im unreifen Gehirn massiven, disseminierten apoptotischen Zelltod auslöst? Eine Erklärung dafür könnte sein, dass es altersspezifische Unterschiede im Grad der Myelinisierung und im Wassergehalt des Gehirns gibt. Zudem liegt das Maximum der entwicklungsabhängigen Vulnerabilität in etwa in der Phase des stärksten Hirnwachstums, dem sogenannten „brain growth spurt“, der sich beim Menschen vom letzten Trimester der Schwangerschaft bis ins zweite Lebensjahr ausdehnt [Dobbing 1979]. Apoptotischer Zelltod während dieser extrem vulnerablen Phase des Hirnwachstums könnte ein wesentlicher Faktor sein, um neurologische Folgeschäden nach Insulten auf das unreife Gehirn zu erklären [Mehmet 1994; Mazarakis 1997; Adelson 1998; Taylor 1999; Bittigau 1999, 2002].

Im Gegensatz zum adulten Gehirn werden Untersuchungen zu apoptosespezifischen Signaltransduktionsmechanismen und apoptoseregulierenden Faktoren bei der Schädigung des unreifen Gehirns derzeit nur von wenigen Forschergruppen durchgeführt.

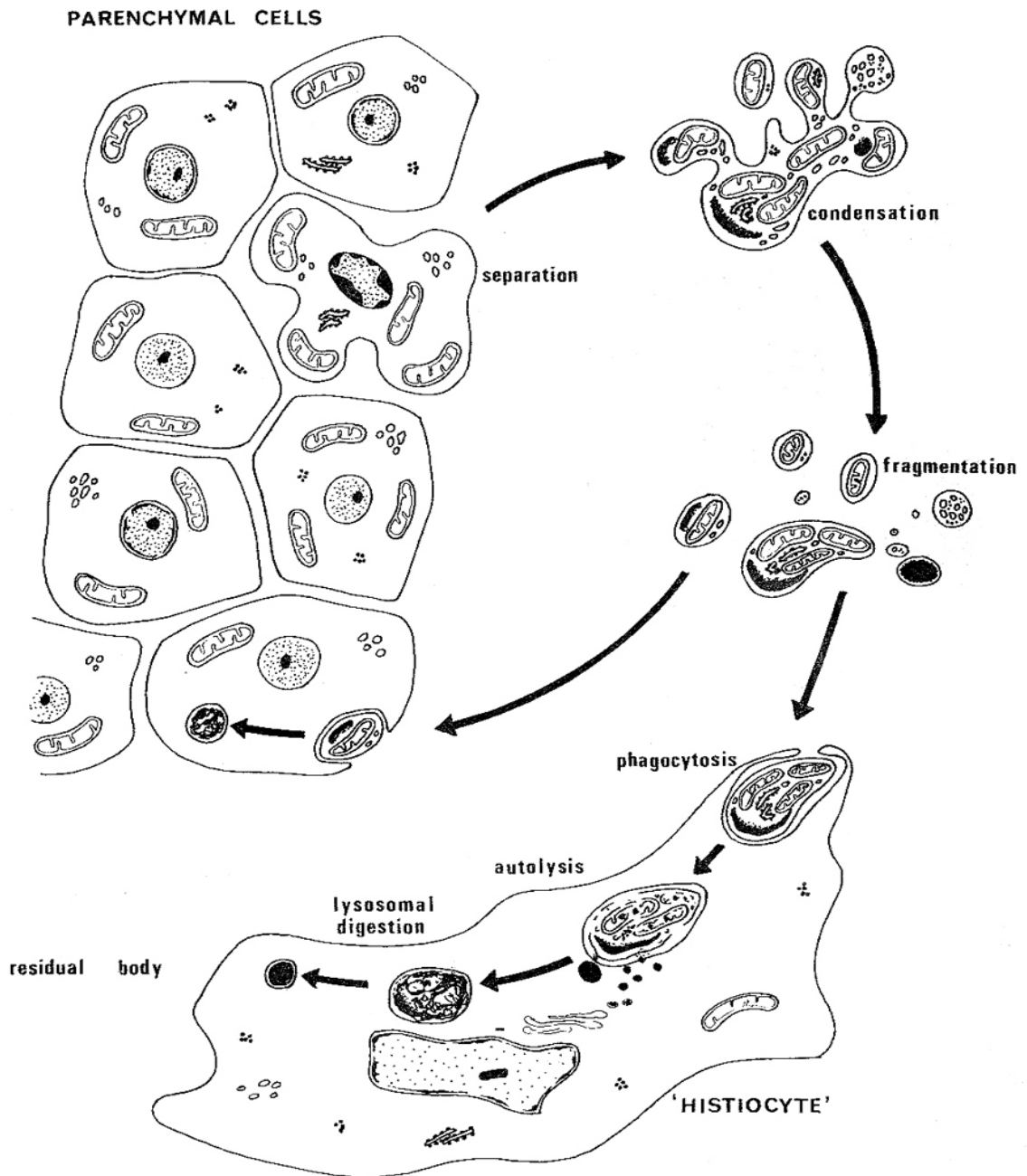
Das Verständnis der Pathophysiologie von Zelluntergängen im sich entwickelnden Gehirn kann möglicherweise zur Konzeption sinnvoller präventiver und neuroprotektiver Therapieansätze beitragen. Dabei sind Therapieansätze, die das Ziel haben, die

apoptotische Kaskade zu unterbrechen, vielversprechend, müssen aber im unreifen Gehirn, wo Apoptose wesentlich zur physiologischen Hirnentwicklung beiträgt [Dikranian 2001], sorgfältig getestet werden.

### 1.2.1 Apoptotische Signaltransduktion

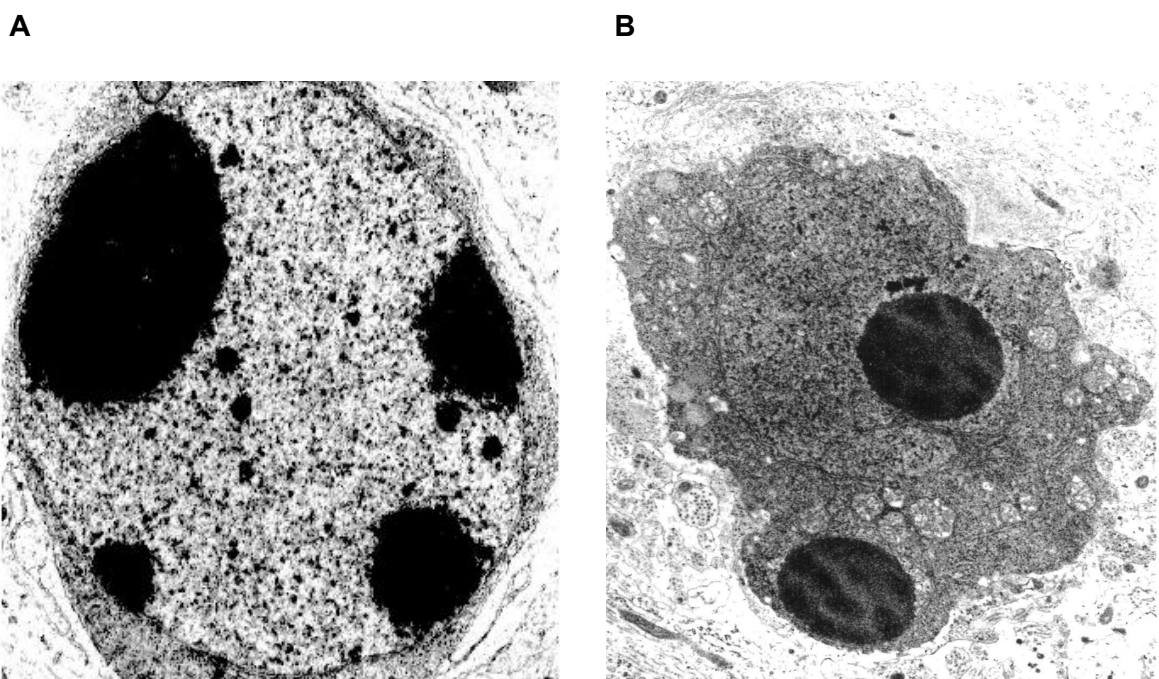
In den letzten Jahren sind die unterschiedlichen Mechanismen des Zelltodes zum Gegenstand intensiver Forschungen geworden. Die akute exzitotoxische Zelldegeneration ist durch rapides Anschwellen von Dendriten, Zellkörpern und intrazytoplasmatischen Organellen, Kernfragmentation und Lyse der Zelle gekennzeichnet.

Neben der klassischen Form des akuten Zelltodes beschrieben Wyllie und Kerr 1972 erstmals an nicht-neuronalen Zellen einen physiologischen, programmierten Zelltod, den sie Apoptose nannten [Kerr 1972]. Der Begriff *apoptosis* stammt aus dem Griechischen und beschreibt das Herabfallen der Blätter im Herbst. Bei der Apoptose handelt es sich um eine verzögerte Form des Zelltodes, die physiologisch in der Entwicklung aber auch Stunden oder manchmal sogar Tage und Wochen nach einem Insult auftreten kann [Hamrick 2002]. Die Zelle schrumpft langsam bei zunächst noch intakter Zellintegrität. Die Zellkontakte lösen sich, das Chromatin kondensiert entlang der Kernmembran, der Kern schrumpft (Karyopyknose) und die DNA wird fragmentiert. Die Zellorganellen lösen sich auf, beim Zerfall der Zelle entstehen Fragmente, sogenannte Apoptosekörperchen ("apoptotic bodies"), die anschließend phagozytiert werden, ohne dass es dabei zu einer wesentlichen inflammatorischen Reaktion kommt (Abb. 1), [Kerr 1972].



**Abb. 1:** Schematische Darstellung der Morphologie des, von Wyllie und Kerr erstmals beschriebenen, apoptotischen Zelluntergangs aus: Brit J Cancer (1972) 26, S. 242.

Ein elementares Problem bei der histologischen Detektion apoptotischer Zellen im Vergleich zu anderen Zelltodmechanismen ist der Mangel an zuverlässigen Labormethoden. Die Darstellung der DNA Fragmentation mittels TUNEL-Technik (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling) wird angewendet, gilt jedoch nicht in jedem Fall als zuverlässig [Dikranian 2001]. Außerdem bestehen auch Übergangsformen zwischen Nekrose und Apoptose, die die Detektion erschweren [Friedlander 2003]. Als sicherer Marker wird die Elektronenmikroskopie eingesetzt. Auch in neuronalem Gewebe lassen sich so elektronenmikroskopisch frühe von späten Stadien der Apoptose unterscheiden [Dikranian 2001], (Abb.2).



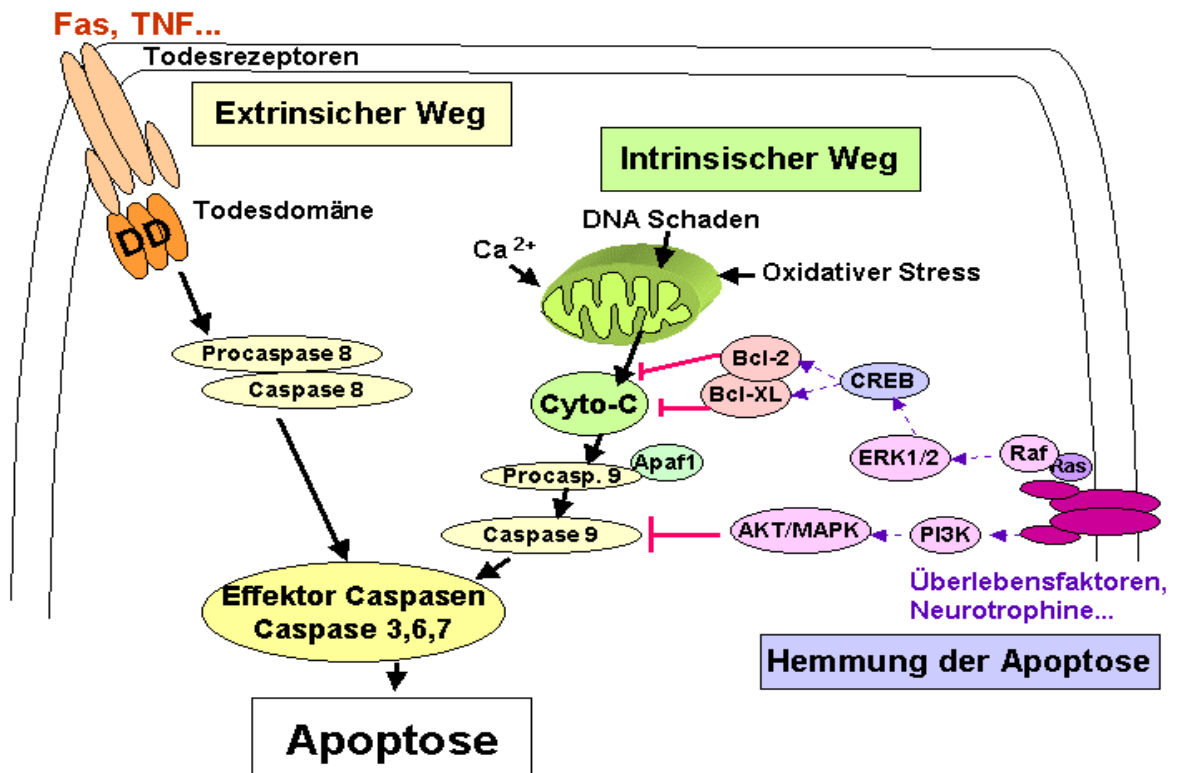
**Abb. 2:** Elektronenmikroskopische Darstellung des Nukleus von apoptotischen Neuronen: Bild A zeigt die charakteristische Morphologie eines frühen apoptotischen Stadiums mit intakter nukleärer Membran und kondensierten “Chromatinbällen“. Ein spätes Stadium der Apoptose ist in Bild B dargestellt: Mit fortschreitender Neurodegeneration entrundet sich die nukleäre Membran und kondensiertes Chromatin stülpt sich ins Zytoplasma vor (unterer Bildrand).

Apoptose ist die häufigste Form von Zelltod im Organismus. So können bestimmte Zellen des Immunsystems ihre Anzahl über Apoptose selbst regulieren, wie z.B. T-Lymphozyten, die mit speziellen "Todessystemen" Selbstmord begehen oder auch andere T-Lymphozyten töten. Dies ist von entscheidender Bedeutung für das Gleichgewicht des Immunsystems [Krammer 1994].

Aber auch in anderen Organsystemen, wie im Gehirn, ist Apoptose ein wichtiger Mechanismus, um die Gewebshomöostase unter pathologischen, aber auch physiologischen Bedingungen aufrecht zu erhalten. Große Fortschritte sind in der Aufklärung der molekularen Mechanismen der Apoptosesignalgebung gemacht worden. Diese sind von Bedeutung für die Erklärung der Pathogenese von Erkrankungen und für die Entwicklung rationaler Therapieansätze [Friedlander 2003].

Allen oben genannten Schädigungsmechanismen gemeinsam ist die Tatsache, dass Apoptose der vorwiegende Modus des Zelltodes im sich entwickelnden Gehirn ist [Mazarakis 1997, Taylor 1999, Hamrick 2002]. Ob im unreifen Gehirn dieselben Mechanismen während des programmierten Zelltodes ablaufen wie im adulten System ist momentan Gegenstand intensiver Forschungen.

An multiplen experimentellen Modellen hat sich gezeigt, dass im wesentlichen zwei zentrale Stoffwechselwege zur Apoptose führen: Ein Rezeptor-vermittelter, extrinsischer und ein mitochondrialer, intrinsischer Weg, wie in Abbildung 3 schematisch dargestellt (Abb.3). Beiden ist gemeinsam, dass sie in der Aktivierung von Caspasen, wichtigen Schlüsselenzymen auf dem Weg der Exekution der Zelle, resultieren. Caspasen sind Cysteinproteasen und Homologe des menschlichen Interleukin-1 $\beta$ -Converting-Enzyme (ICE/Caspase 1), [Thornberry 1998].



**Abb. 3** Schematische Darstellung der Aktivierung der apoptotischen Stoffwechsellkaskade: Beim extrinsischen Weg kommt es durch einen schädigenden Insult zur Bindung der Todesrezeptoren an ihren spezifischen Liganden. Nach Rezeptortrimerisation erfolgt die Formierung einer Todesdomäne mit konsekutiver Aktivierung von Caspasen. Der intrinsische Weg ist durch eine direkte Schädigung der Mitochondrien durch ein definiertes Agens charakterisiert. Es kommt zur Änderung des mitochondrialen Membranpotentials und zur konsekutiven Ausschüttung von Cytochrom C ins Zytoplasma. Dies führt wiederum zur Caspasenaktivierung. Wichtige Regulatoren des Prozesses sind die Mitglieder der Bcl-2 Familie, denen die Stabilisation der mitochondrialen Membran zugeschrieben wird. Wachstumsfaktoren, sowie deren Regulatoren kommen Apoptose-hemmende Funktionen zu.

Ein wesentliches Merkmal der extrinsischen Stoffwechsellkaskade ist das Binden von Liganden an spezifische Zelloberflächenrezeptoren, von denen Fas (CD95/Apo-1) eine prominente Rolle einnimmt. Mit Fas wurde 1989 erstmals ein Zelloberflächenrezeptor

beschrieben, der nach Bindung an einen spezifischen Antikörper in der Lage ist, Apoptose auszulösen [Trauth 1989, Nagata 1995, Krammer 1999].

Fas gehört neben dem Apo-2/TRAIL-Komplex zur Tumor-Nekrose-Faktor (TNF)-Rezeptorfamilie und ist ein 40-kDa Typ-II-Transmembranprotein. Nach Bindung an seinen spezifischen Liganden erfolgt die Trimerisation des Rezeptors mit Bildung einer Todesdomäne, der sogenannten "death domain" und eines "death inducing signalling complex" (DISC), der wiederum durch Adaptermoleküle und Enzyme die Durchführung des apoptotischen Programmes vermittelt (Abb. 3, Abb. 4). Eine wesentliche Rolle spielen dabei die Caspasen, die als intrazelluläre Schaltstellen fungieren. Im Fall der Fas-induzierten Apoptose gilt Caspase 8 als Schlüsselenzym, das wiederum sogenannte Effektorcaspasen, die für die Exekution der Zelle verantwortlich sind, rekrutiert [Krammer 2000, Peter 2003].

Das Fas System ist insbesondere bei inflammatorischen Effektorzellen gut untersucht. Dort fungiert Fas neben dem TNF-alpha Rezeptor als ein wesentlicher Zelloberflächenrezeptor, der die lokale Elimination von Entzündungszellen ohne erneute Freisetzung von Entzündungsmediatoren erlaubt und so die Lebensdauer dieser Zellen reguliert [Nagata 1995, Krammer 1999]. Außerdem wird Fas von vielen anderen Geweben exprimiert und spielt bei immunologisch vermittelten pathologischen Prozessen des Gehirns wie Multiple Sklerose und Morbus Alzheimer eine Rolle [Dowling 1996, Nishimura 1997, Zipp 1999]. Bei hypoxisch-ischämischen Insulten ließ sich im Tierexperiment Fas mRNA nachweisen [Matsuyama 1995].

Die im Rahmen der normalen Hirnentwicklung ablaufende apoptotische Neurodegeneration ist ebenfalls Fas-getriggert [Cheema 1999].

Der intrinsische Stoffwechselweg führt unter anderem zur Änderung des mitochondrialen Membranpotentials ( $\Delta\Psi$ ), welches zusammen mit Proteinen der Bcl-2 Familie die mitochondriale Wand kontrolliert [Kroemer 1997a, 1997b; Peter 1998; Kayahara 1998].

Cytochrom C wird ins Zytoplasma ausgeschüttet und reguliert dann die Produktion pro-apoptotischer Peptide, die die für Apoptose charakteristische DNA-Fragmentierung vermitteln [Peter 1998, Susin 1999]. Cytochrom C ist in der Lage einen Komplex mit Apoptotic-Protease-Activating-Factor (Apaf-1) und Caspase 9 zu bilden [Susin 1999, Yuan 2000]. Dies wiederum führt zur proteolytischen Aktivierung von Caspase 3. Caspase 3 ist eine Schlüsselprotease, die in der Lage ist, vitale Proteine zu schneiden und Endonukleasen zu aktivieren. Sie nimmt eine ganz entscheidende Rolle bei der Exekution des apoptotischen Programmes ein [Thornberry 1998, Porter 1999].

Auch Apoptose ohne Einbeziehung der Mitochondrien [Jouvet 2001] und Caspasen-unabhängige Formen sind kürzlich beschrieben worden [Braun 2001, Murahashi 2003]. Welche Faktoren der apoptotischen Kaskade aktiviert werden, hängt ganz entscheidend von der Art des Schädigungsmodells ab.

Neuere Arbeiten beschreiben protektive Maßnahmen, die sich auf die Unterbrechung der apoptotischen Kaskade geschädigter ZNS-Zellen fokussieren. Interessante Ansätze ergeben sich durch den Einsatz von Caspaseninhibitoren, die auch auf neuronale Apoptose hemmend einwirken können. Untersuchungen an einem Tiermodell der Meningitis des adulten Kaninchens konnten ihren neuroprotektiven Effekt klar demonstrieren [Braun 1999]. Im unreifen Gehirn sind diese Substanzen bisher noch nicht hinreichend getestet.

Innerhalb und außerhalb der eigentlichen apoptotischen Signaltransduktionskaskade gibt es eine ganze Reihe von Apoptose-regulierenden Elementen. Dazu gehören zum Beispiel die Mitglieder der Bcl-2 Familie, lösliche Formen von Zelloberflächenrezeptoren und endogene neurotrophe Wachstumsfaktoren [Cheng 1994, Kroemer 1997, Yuan 2000].

Lösliches Fas (Soluble Fas - sFas) entsteht durch differentielles Spleißen mit Deletion eines Exons, welches die transmembranöse Domäne von Fas codiert. sFas blockiert Zelltod durch Inhibition der Interaktion zwischen Fas und Fas Ligand auf der

Zelloberfläche und dient so als Apoptose-regulierendes Protein (Abb.4), [Cheng 1994, Hughes 1995].

Im Gegensatz dazu entsteht löslicher Fas Ligand (soluble Fas Ligand - sFasL) durch proteolytisches Schneiden der Membran-gebundenen Form und wirkt verstärkend auf pro-apoptotische Prozesse (Abb.4), [Tanaka 1995, 1998]. Die Regulation der sFas and sFasL Synthese ist derzeit Gegenstand intensiver Forschungen in Zellkulturen und tierexperimentellen Modellen. Im klinischen Umfeld kommt sFas und sFasL eine Rolle als biochemischer Marker zu.

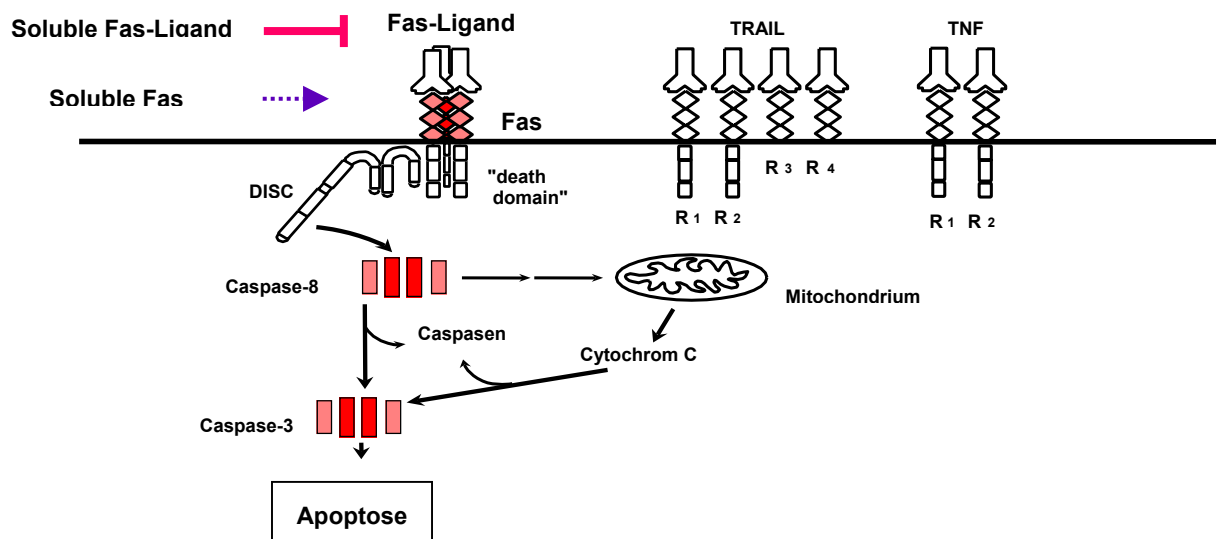


Abb. 4: Schematische Darstellung Fas-induzierter Apoptose: Durch einen Insult kommt es zur Bindung des Zelloberflächenrezeptors Fas an Fas Ligand. Es erfolgt die Trimerisation des Rezeptors mit Bildung der "death domain" und eines "death inducing signaling complex" (DISC), der wiederum die Durchführung des apoptotischen Programmes vermittelt. sFas inhibiert die Interaktion zwischen Fas und Fas Ligand auf der Zelloberfläche. Im Gegensatz dazu wirkt sFasL verstärkend auf pro-apoptotische Prozesse.

Auch Neurotrophine können regulatorisch auf die apoptotische Signalgebung einwirken. Sie gehören zu einer Familie von Wachstumsfaktoren, die notwendig für die Hirnentwicklung aber auch für die Funktion des zentralen Nervensystems sind (Abb.3).

Obwohl sie ursprünglich als neuronale Überlebenssignale identifiziert worden sind, werden ihnen inzwischen multiple biologische Funktionen wie Proliferation, synaptische Modulation und axonaler Transport zugeschrieben. Es konnte kürzlich gezeigt werden, dass Neurotrophinorstufen je nach Aktivierungsgrad pro- und anti-apoptotische Prozesse über Trk oder p75 Rezeptoren triggern können [Chao 2002]. Auch daraus ergeben sich möglicherweise in Zukunft neuroprotektive Ansätze.

### **1.3 Modellsysteme zur Untersuchung der Schädigung des unreifen Gehirns**

Es gibt eine Vielzahl von experimentellen und klinischen Ansätzen zur Untersuchung der Schädigung des sich entwickelnden Gehirns. Aus ethischen Gründen sind die Möglichkeiten der Beantwortung klinischer Fragestellungen bei Kindern sehr limitiert. Deshalb werden im wesentlichen experimentelle Modelle zur Untersuchung eingesetzt. Im Folgenden soll auf gängige Tier- und Zellkulturmodelle und die für diese Arbeit relevanten klinischen Untersuchungsansätze näher eingegangen werden.

#### **1.3.1 Tiermodelle**

Viele tierexperimentell arbeitende Gruppen, die sich mit der Schädigung des sich entwickelnden Gehirns beschäftigen, setzen 7 bis 14 Tage alte Ratten (P7 – P14) für ihre Untersuchungen ein [Hagberg 2002]. Dobbing und Sands haben sich in ihren Studien ausführlich mit dem Hirnwachstum verschiedener Species (Ratte, Schwein, Affe, Mensch) beschäftigt. Das Rattengehirn befindet sich in diesem Entwicklungsstadium in der Phase des rapiden Wachstums und ist sehr vulnerabel gegenüber äußeren Schädigungen [Dobbing 1979]. Ratten haben den Vorteil, dass sie unkompliziert zu züchten und billig sind. Damit ist gewährleistet, dass Daten an einer größeren Menge von Versuchstieren validiert werden können. Dies ist insbesondere zur Testung neuroprotektiver Substanzen

von großer Bedeutung. Es lassen sich außerdem primäre kortikale, zerebelläre und hippocampale Zellkulturen der einzelnen, im ZNS residenten, Zellen anzüchten und mittels gängiger Techniken analysieren. Zudem gibt es eine ganze Reihe von in der Ratte angezüchteten, kommerziell erhältlichen Zelllinien. Beispielsweise bietet die Phäochromozytom-Zelllinie PC12 nach Differenzierung mit dem Wachstumsfaktor Nerve Growth Factor (NGF) interessante Möglichkeiten, um das Verhalten von Neuronen unterschiedlichen Reifegrades in Hypoxie zu untersuchen [Charlier 2002].

Insbesondere zu *in vivo* Untersuchungen der HIE liegen für das, von Rice und Vannucci beschriebene Modell, eine Reihe von Studien vor [Rice 1981]. Auch unsere Versuche zu dem Thema wurden an diesem Modell durchgeführt. Zur Untersuchung der Mechanismen der traumatischen Schädigung eignet sich ebenfalls das Rattenmodell. Die histologischen Veränderungen nach Trauma wurden im adulten [Feeney 1981] wie auch im infantilen Gehirn ausführlich [Ikonomidou 1996; Bittigau 1998, 1999; Felderhoff-Müser 2000] charakterisiert. Über die Beteiligung der apoptotischen Signaltransduktion im Traumamodell des unreifen Rattenhirns war bisher wenig bekannt.

### 1.3.2 Klinische Modelle

Um histologische Untersuchungen an humanem Gewebe durchführen zu können, muss in der Regel auf Archivmaterial von verstorbenen Kindern zurückgegriffen werden. Das hat den Nachteil, dass nicht jeder Fall die gleiche Fixationsdauer aufweist, wie es bei der histologischen Aufarbeitung von Tierexperimenten der Fall ist. Dies kann sich unter Umständen negativ auf die Bandbreite der Möglichkeiten der immunhistochemischen Techniken auswirken [van Landeghem 2002]. Zudem gibt es selten tiefgefrorenes, frisches Hirnmaterial von in der Routine sektionierten Patienten, was den Einsatz spezieller Techniken wie RT-PCR, in-situ Hybridisierung und Western Blotting limitiert.

Als Modellsystem der hypoxisch-ischämischen Hirnschädigung eignet sich Archivmaterial

von Fällen mit pontosubikulärer Neuronennekrose (PSN), [Brück 1996]. Die PSN ist eine neuropathologische Diagnose und definiert eine Hirnschädigung, die zwischen der 30. Schwangerschaftswoche und dem 2. Lebensmonat auftritt [Friede 1972]. Während die makroskopische Inspektion unauffällig ist, zeigt sich mikroskopisch akuter neuronaler Zelltod, charakteristischerweise in den ventralen Anteilen der pontinen Kerngebiete und im Subiculum des Hippocampus. Die Pathogenese ist noch weitgehend unbekannt: Asphyktische Ereignisse, angeborene Herzfehler, schwere pulmonale Erkrankungen, Hypoxie, Hyperoxie, periventrikuläre Leukomalazien sowie intraventrikuläre Blutungen sind mit der PSN assoziiert [Skullerud 1988, Mito 1993]. Die morphologischen Veränderungen wurden zunächst als akute neuronale Nekrose verbunden mit dem Auftreten von Karyorrhexis und Zellschrumpfung beschrieben. Die von Friede beschriebene Morphologie der akuten Neuronennekrose ist der später beschriebenen Apoptose sehr ähnlich. Brück und Mitarbeiter wiesen 1996 bei der PSN die, für Apoptose typische Kernfragmentation nach [Brück 1996]. Diese neuropathologische Entität wurde für die folgenden Untersuchungen der apoptotischen Signalgebung bei der hypoxisch-ischämischen Schädigung des unreifen menschlichen Gehirns herangezogen.

Liquor- oder auch Blutproben zu sammeln und aufzuarbeiten hat sich in der Vergangenheit als minimal invasive Methode etabliert um bei pathologischen Prozessen Marker von prädiktivem oder diagnostischem Wert zu erhalten. Im zentralen Nervensystem hat man bisher multiple Faktoren der neuronalen Degeneration, Astroglie, Aktivierung des Immunsystems und neurotrophe Faktoren untersucht, um den Pathomechanismus neurodegenerativer Erkrankungen aber auch akuter Verletzungen näher charakterisieren zu können [Zipp 1999, Galasko 2001, Zandbergen 2001]. Bei Kindern liegen dazu nur wenige Untersuchungen vor [Heyes 1995].

## **2. FRAGESTELLUNGEN IN DEN VORGESTELLTEN ARBEITEN**

Es existieren umfassende Forschungen zur Schädigung des reifen Gehirns von einer Vielzahl von Arbeitsgruppen. Das Wissen um die Schädigungsmechanismen im unreifen Gehirn ist jedoch zum jetzigen Zeitpunkt sehr limitiert und gängige Modelle zur Untersuchung von neuronalen Verletzungen im reifen lassen sich nicht einfach auf das unreife Nervensystem übertragen. Dieser Forschungsbedarf führte zu den im Folgenden geschilderten Projekten: Zum einen sollten relevante Fragestellungen in einem klinischen Umfeld mit begrenzten Mitteln (limitierte Materialgewinnung) beantwortet werden. Zum anderen sollten molekulare Mechanismen an unterschiedlichen Tiermodellen der Schädigung des unreifen Gehirns untersucht werden mit dem Ziel, mögliche neuroprotektive Ansätze zu identifizieren.

### **2.1 Histologische Untersuchungen der zerebralen Schädigung von Frühgeborenen im Vergleich mit der Magnetresonanztomographie**

Fortschritte im Verständnis der fetalen Physiologie haben die Überlebensraten sehr kleiner Frühgeborener (< 1500 g) deutlich gesteigert [Tin 1997]. Jedoch ist das Risiko, eine zerebrale Schädigung zu entwickeln, hoch [Horwood 1998, Emslie 1998]. Der Ultraschall ist derzeit die Methode der Wahl um in der Routine Schädigungen des Gehirns dieser Kinder zu erfassen. Die Magnetresonanztomographie (MRT) bietet jedoch eine deutlich bessere anatomische Auflösung. Insbesondere neuere Techniken mit diffusionsgewichteten Aufnahmen verbessern die Darstellung von kleineren Hirnläsionen und Myelinisierungsstörungen [Hüppi 2002, Miller 2002]. Im Hammersmith Hospital in London wurde ein speziell für Frühgeborene entwickeltes MRT System installiert, welches die Darstellung des Gehirns sehr kleiner, intensivmedizinisch pflegebedürftiger Frühgeborener erlaubt [Hall 1997, Battin 1997, Maalouf 1998].

MRT-Bilder des Gehirns von schwer kranken Frühgeborenen wurden kurz vor oder direkt nach ihrem Tod angefertigt und mit histologischen Untersuchungen an Autopsiematerial verglichen. Ziel dieser Studie war es, die Darstellung von Hirnläsionen in der MRT mit histopathologischen Befunden von verstorbenen Kindern zu korrelieren.

## **2.2 Die Rolle des pro-apoptischen Zelloberflächenrezeptors Fas nach hypoxisch-ischämischer Enzephalopathie (HIE)**

### 2.2.1 Fas Expression im Tiermodell der HIE

Fas ist ein Zelloberflächenrezeptor, der nach Bindung an seinen Liganden apoptotische Todessignale bei einer Vielzahl von Erkrankungen aussendet. Apoptose ist die vorwiegende Form des Zelltodes im sich entwickelnden Gehirn. Bei der hypoxisch-ischämischen Hirnschädigung kann Apoptose durch verschiedene Signale wie beispielsweise DNA Schädigung durch freie Radikale, das Wegfallen von Überlebenssignalen, Mangel an ATP oder auch die Aktivierung von pro-apoptischen Faktoren, getriggert werden. Zu diesen zählen vor allem inflammatorische Zytokine wie Tumor-Nekrosefaktor (TNF) und Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), die bei akuten Hirnverletzungen exprimiert werden und zur Ausbreitung der neuronalen Schädigung nach einem hypoxischen Insult beitragen könnten [Szaflarski 1995, Kato 1996, Silverstein 1997]. Über ihre Funktion im Rahmen der perinatalen Hirnschädigung und ihre Rolle als mögliche Ziele für neuroprotektive Interventionen im Zeitfenster nach dem hypoxischen Insult ist wenig bekannt.

Aus Voruntersuchungen war klar, dass Fas eine wichtige Rolle bei neurodegenerativen Erkrankungen des adulten Gehirns einnimmt [Nishimura 1995, Dowling 1996]. Außerdem zeigte sich eine deutliche Induktion von Fas [Matsuyama 1995] und Fas L [Herdegen 1998] mRNA nach adulter hypoxisch-ischämischer Hirnschädigung. Diese Beobachtungen führten zur der Hypothese, dass Fas möglicherweise auch bei der

perinatalen Asphyxie eine wichtige Rolle zukommt. Ziel der vorliegenden Studie war es, zu testen, ob Fas in neuronalen Zelllinien und unreifen, primären neuronalen Zellkulturen exprimiert wird, um dann die Funktion des Fas Systems in einem *in vivo* Modell der hypoxisch-ischämischen Hirnschädigung des infantilen Rattengehirns zu bestätigen.

### 2.2.2 Fas Expression im humanen System nach HIE

Die PSN repräsentiert eine altersspezifische Antwort auf einen hypoxischen Insult und ist eine neuropathologische Diagnose nach Autopsie. Dieses Phänomen wird typischerweise zwischen 30 Schwangerschaftswochen und dem 2. Lebensmonat beobachtet und ist histologisch durch akuten neuronalen Zelltod in den pontinen Kerngebieten und dem Subiculum des Hippocampus gekennzeichnet [Friede 1972]. In diesen Hirnregionen fanden sich die morphologischen Kennzeichen des programmierten Zelltodes. Um den Prozeß der humanen neuronalen Apoptose bei HIE des sich entwickelnden Gehirns zu untersuchen, eignet sich die PSN als ein Modellsystem [Brück 1996].

In unserer tierexperimentellen Vorarbeit konnte gezeigt werden, dass der Zelloberflächenrezeptor Fas auf neuronalen Zellen exprimiert wird und die Aktivierung von Apoptose im unreifen Gehirn triggert. Zudem zeigte sich eine deutliche Hochregulation von Fas nach hypoxisch-ischämischer Hirnschädigung der unreifen Ratte [Felderhoff-Müser 2000]. Diese Beobachtungen führten dazu, die Expression von Fas und seinem Liganden an diesem Modellsystem der HIE zu untersuchen und damit möglicherweise seine Rolle auch bei der hypoxischen Hirnschädigung des menschlichen Neugeborenen zu bestätigen.

### **2.3 Die Aktivierung und Regulation der apoptotischen Stoffwechselkaskade nach Trauma des unreifen Rattengehirns**

Die traumatische Hirnschädigung ist ein wesentlicher Faktor für Morbidität im Kindesalter [Goldstein 1990]. Die Prävalenz ist bei Kindern unter 6 Jahren am höchsten, außerdem haben sie die schlechteste neurologische Entwicklung im Vergleich zu anderen Altersstufen [Koskiniemi 1995, Diamond 1996, Adelson 1998].

Um die genauen Mechanismen, die zu dieser Hirnschädigung beitragen, zu untersuchen, wurde ein infantiles Rattenmodell entwickelt. Es konnte gezeigt werden, dass auch eine traumatische Schädigung diffusen apoptotischen neuronalen Zelltod im unreifen Gehirn triggert. Das Ausmaß der Schädigung ist altersabhängig mit einer erhöhten Vulnerabilität in den sehr jungen Altersgruppen [Ikonomidou 1996, Bittigau 1999, Pohl 1999].

Um die Pathogenese dieser Schädigung genauer zu beschreiben und neuroprotektive Ansätze zu eruieren, wurden drei mögliche Mechanismen in diesem Modell untersucht: Die Aktivierung des extrinsischen und des intrinsischen apoptotischen Systems sowie die Modulation der Schädigung durch endogene Neurotrophine.

Um die Beteiligung des extrinsischen Systems an der Hirnschädigung zu beschreiben, wurde die Expression des pro-apoptotischen Zelloberflächenrezeptors Fas und die Aktivierung von Caspase 8 untersucht. Zur Charakterisierung des intrinsischen apoptotischen Systems wurde die Expression von anti-apoptotischen Proteinen der Bcl-2 Gruppe, die Aktivierung des intrinsischen apoptotischen Stoffwechselweges mit Ausschüttung von Cytochrom C in das Zytoplasma sowie die Aktivierung von Caspase 9 untersucht. Zur Identifikation Apoptose-regulierender Elemente wurde die Expression der endogenen, neuronalen Wachstumsfaktoren Neurotrophin-3 (NT-3) und Brain-Derived-Neurotrophic Factor (BDNF) getestet.

Ein Hauptziel dieser Arbeit war zudem die Untersuchung eines neuroprotektiven Ansatzes durch pharmakologische Inhibition von Caspasen.

## **2.4 Lösliche apoptotische Faktoren im Liquor von Kindern mit Hydrozephalus**

Je nach Intensität des erhöhten intrakraniellen Druckes kann es zu einem sekundären Verlust von Hirngewebe kommen. Eine Vielzahl von Faktoren wie chronische Gewebehypoxie, Ischämie, eine Kombination aus mechanischen und metabolischen Faktoren sowie der Verlust axonaler Kontakte wurde mit der Pathogenese in Verbindung gebracht [Del Bigio 1998, Braun 1998]. Die neuropathologischen Konsequenzen sind moderat im adulten, aber schwerwiegend im sich entwickelnden Gehirn, wie ultrastrukturelle Untersuchungen zeigen konnten. Insbesondere die weiße Substanz ist betroffen. Apoptotische Prozesse spielen auch beim Gewebeuntergang durch chronisch erhöhten Hirndruck eine Rolle, die molekularen Mechanismen sind jedoch weitgehend unbekannt [Del Bigio 1998, Del Bigio 2003].

Die Interaktion zwischen dem Zelloberflächenrezeptor Fas und seinem Liganden (FasL) ist wichtig zur Triggerung von Apoptose [Nagata 1995]. Beide, Fas und FasL, existieren als Membran-gebundene und lösliche Formen (sFas, sFasL). sFas blockiert Zelltod durch Inhibition der Interaktion zwischen Fas und Fas Ligand [Cheng 1994, Hughes 1995]. Im Gegensatz dazu hat sFasL eine pro-apoptotische Funktion [Tanaka 1995, 1998]. Innerhalb der apoptotischen Signaltransduktion zeigt das Vorhandensein der aktivierten Form von Caspase 3 die Exekution der Zelle an [Porter 1999]. Unter Apoptose-induzierenden Bedingungen, beispielsweise getriggert durch die Aktivierung von Fas Rezeptor, können verschiedene Zelltypen aktivierte Caspase 3 ins Zytoplasma ausschütten [Hentze 2001].

Beide Komponenten der apoptotischen Kaskade, das Fas/FasL System und Caspase 3 sind bisher weder experimentell noch klinisch beim Hydrozephalus untersucht worden. Das Ziel der vorliegenden Studien war es, bei unterschiedlichen Patientengruppen mit Hydrozephalus die intrathekale Ausschüttung von sFas, sFasL und Caspase 3 als potentielle Apoptose-regulierende Elemente zu untersuchen.

### **3. AUSGEWÄHLTE ORIGINALARBEITEN ZUM THEMA**

#### **3.1 Histologische Untersuchungen der zerebralen Schädigung von Frühgeborenen im Vergleich mit der Magnetresonanztomographie**

Felderhoff-Müser U, Squier W, Rutherford M, Cox P, Maalouf E, Counsell S, Bydder G, Edwards AD. Relation between magnetic resonance images and histopathological findings of the brain in extremely preterm infants AJNR 1999; 20:1349-1357

#### **3.2 Die Rolle des pro-apoptischen Zelloberflächenrezeptors Fas bei HIE**

Felderhoff-Müser U, Taylor DL, Greenwood KG, Stibenz D, Kozma M, Joashi U, Edwards AD, Mehmet H. Fas/CD95/Apo-1 can function as a death receptor for neuronal cells *in vitro* and *in vivo* and is upregulated following cerebral hypoxic-ischemic injury to the developing rat brain. Brain Pathol 2000; 10:19-27

van Landeghem \*, Felderhoff-Müser U\*, Moysich A, Stadelmann C, Obladen M, Brück W, Bühner C. Fas (CD95/Apo-1)/Fas ligand expression in neonates with pontosubicular neuron necrosis. Ped Res 2002; 51:129-135

\* Diese Arbeit wurde in Ko-Erstautorenschaft verfaßt.

### **3.3 Die Aktivierung der apoptotischen Stoffwechsellkaskade nach Trauma des unreifen Rattengehirns**

Felderhoff-Müser U, Sifringer M, Pesditschek S, Kuckuck H, Moysich A, Bittigau P, Ikonomidou C. Pathways leading to apoptotic neurodegeneration following trauma to the developing rat brain. *Neurobiol Dis* 2002; 11:231-245

### **3.4 Lösliche apoptotische Faktoren im Liquor von Kindern mit Hydrozephalus**

Felderhoff-Müser U, Herold R, Hochhaus F, Koehne P, Ring-Mrozik E, Obladen M, Bühner C. Increased cerebrospinal fluid levels of soluble Fas (CD95/Apo-1) in children with hydrocephalus. *Arch Dis Child* 2001; 84:369-372

Felderhoff-Müser U, Bühner C, Groneck P, Obladen M, Bartmann P, Heep A Soluble Fas (CD95/Apo-1), soluble Fas ligand and activated caspase 3 in the CSF of infants with posthemorrhagic and non-hemorrhagic hydrocephalus. *Ped Res* 2003; 54: 659-664

## **4. DISKUSSION DER ERGEBNISSE**

### **4.1 Histologische Korrelation der Hirnschädigung von Frühgeborenen mit der Magnetresonanztomographie**

In der Vergangenheit waren die Möglichkeiten das unreife menschliche Gehirn magnetresonanztomographisch zu untersuchen sehr begrenzt, da die gängigen Systeme im wesentlichen auf Erwachsene zugeschnitten sind. In der vorliegenden Studie wurde ein Prototyp eines Magnetresonanztomographen eingesetzt, um die Struktur und Pathologie des Frühgeborenengehirns näher zu untersuchen. In diesem System konnte eine kontinuierliche intensivmedizinische Betreuung der Kinder bei Konstanthaltung der Körpertemperatur gewährleistet werden [Battin 1997].

Die auf diese Weise an schwer kranken Kindern erhobenen Befunde wurden mit der Histologie aus Obduktionsergebnissen derselben Patienten korreliert. Die Studie bestand nur aus einer kleinen Anzahl von Patienten, da nur verstorbene Kinder, deren Eltern in die Obduktion eingewilligt hatten, eingeschlossen wurden.

Wie zuvor in anderen, intrauterin durchgeführten Studien beschrieben, ergab sich in mikroskopisch gesunden Hirnregionen eine klare Korrelation zwischen Signalintensität und Zelldichte [Brisse 1997, Sibony 1998]. Regionen mit einer hohen Zelldichte, wie das periventrikuläre Keimlager, der Kortex und die Schicht der migrierenden Gliazellen, stellten sich magnetresonanztomographisch mit niedriger Signalintensität dar. Faserreiche Regionen wie die periventrikuläre und subkortikale weiße Substanz hatten eine hohe Signalintensität im T2 gewichteten Bild. An Blutgefäßen entlang migrierende Gliazellen [Childs 1998] formten in der untersuchten Altersgruppe Strukturen, die den Vorder- und Hinterhörnern der Seitenventrikel kappenartig aufsitzen und aus dichten Faserbündeln bestehen. Diese verschwanden mit zunehmender Hirnreifung.

Auch die Orientierung der Fasern und ihre Dichte im Gewebeverband scheint bei der Art der Signalintensität in der magnetresonanztomographischen Darstellung des unreifen Gehirns eine Rolle zu spielen. Der Balken stellte sich beispielsweise trotz Faserreichtum und Zellarmut im T2-gewichteten Bild mit niedriger Signalintensität dar, möglicherweise bedingt durch stark erniedrigten Wassergehalt.

Pathologische Prozesse der weißen und grauen Substanz waren magnetresonanztomographisch ebenfalls gut darzustellen und korrelierten mit histopathologischen Befunden. Blutungen, ein venöser Infarkt und ischämische Läsionen ließen sich in Lokalisation und Alter sehr gut magnetresonanztomographisch demonstrieren. Darüber hinaus korrespondierten Areale mit sehr hoher Signalintensität histologisch mit kalzifizierten Neuronen. In kleineren Hirnstrukturen wie dem Hirnstamm, dem Hippocampus und dem Zerebellum war es, wie zuvor schon beschrieben, bedingt durch Artefakte und Schnittwinkel der konventionellen Technik, schwierig, Läsionen zu lokalisieren [Barkovich 1990].

In der Histologie zeigte sich in zwei Fällen eine PVL mit diffuser Schädigung der weißen Substanz ohne Bildung von größeren Zysten. Areale mit apoptotischen Zellen und gliösen Veränderungen standen im Vordergrund. Die magnetresonanztomographischen Veränderungen in diesen Arealen waren diskret, es zeigte sich ein Fehlen der oben beschriebenen Ventrikelkappe und somit eine Aufhebung der, durch migrierende Gliazellen bedingten Schichtung der weißen Substanz. Ähnliche histologische Befunde wurden bereits als "diffuse periventrikuläre Leukomalazie" und "Teloleukenzephalopathie" von Leviton und Gilles beschrieben. Auch besteht möglicherweise ein Zusammenhang zwischen einer Sepsis und diesen Veränderungen [Leviton 1976, Gilles 1977].

Magnetresonanztomographische Studien an ehemaligen Frühgeborenen zeigen eine hohe Inzidenz von pathologischen Befunden, insbesondere Pathologie der weißen Substanz [Skranes 1998]. Möglicherweise entwickeln sich diese späten Veränderungen

aus Arealen mit diskreter, im Ultraschall nicht immer sichtbarer PVL oder auch diffuser Schädigung der weißen Substanz [Maalouf 2001, Roelants-van Rijn 2001]. In einer Reihenuntersuchung von überlebenden Kindern ohne wesentliche Hirnschädigung zeigte sich eine hohe Inzidenz von hyperintensiven Arealen innerhalb der weißen Substanz besonders nach 30 Wochen Gestationsalter. Die Kinder entwickelten am oder nach dem Geburtstermin überdurchschnittlich häufig eine beträchtliche Hirnatrophie [Maalouf 1999, 2001]. Die Gruppe überlebender Kinder kann nicht direkt mit den sehr kranken und zum Zeitpunkt der Untersuchung sehr jungen Patienten (23 bis 28 Wochen Gestationsalter) verglichen werden, die diese Veränderungen (noch?) nicht zeigten.

Unsere Studie konnte mittels der MRT Auffälligkeiten des unreifen Gehirns extrem kleiner Frühgeborener ab einem Gestationsalter von 24 Schwangerschaftswochen demonstrieren, die sehr gut mit histologischen Befunden korrelierten. Mit den hier verwendeten konventionellen Sequenzen ließen sich die anatomischen Strukturen, Blutungen und Infarkte, aber auch diffuse Veränderungen der weißen Substanz feststellen. Mit neueren, diffusionsgewichteten Techniken wird eine noch größere Sensitivität bei der Untersuchung erreicht, so dass auch kleinere Veränderungen, wie lokale Gliosen und kleinere Nekrosen, früh sichtbar werden [Hüppi 2002, Miller 2002].

Bisher gibt es zur MRT des sehr unreifen Frühgeborenengehirns nur wenige Daten. Erste prospektive Reihenuntersuchungen von sehr kleinen Frühgeborenen wurden durchgeführt und mit entwicklungsneurologisch erhobenen Daten und Ultraschallbefunden korreliert [Maalouf 2001]. Aufgrund der Kostenintensität und der, in vielen Kliniken bestehenden, räumlichen Distanz der Magnetresonanztomographen bleiben diese Untersuchungen zunächst nur wissenschaftlichen Fragestellungen vorbehalten. In privilegierten Zentren ist diese Methode eine wertvolle Ergänzung zum Ultraschall, insbesondere in der Darstellung der Pathologie der weißen Substanz.

## 4.2 Die Rolle des pro-apoptotischen Zelloberflächenrezeptors Fas bei HIE

In den vorliegenden Studien konnte gezeigt werden, daß der pro-apoptotische Zelloberflächenrezeptor Fas *in vitro* und *in vivo* auf neuronalen Zellen exprimiert wird. Er wird sowohl im Tiermodell der zerebralen Hypoxie-Ischämie der Ratte wie auch bei der HIE des Neugeborenen hochreguliert.

### 4.2.1 Fas Expression im Tiermodell der hypoxisch-ischämischen Schädigung des neonatalen Rattengehirns

Im neonatalen Hypoxie-Modell der Ratte konnte demonstriert werden, dass Fas auf neuronalen Zellen exprimiert wird. Er funktioniert *in vitro* und *in vivo* als Todesrezeptor und kann Apoptose triggern.

Die Expression von Fas ist im gesunden neonatalen Rattengehirn am stärksten in hippocampalen und kortikalen Neuronen. Diese Ergebnisse sind in Einklang mit anderen Studien, die Fas eine wesentliche Rolle in der Hirnentwicklung zuschreiben [Park 1998, Cheema 1999]. Fas wird nur in bestimmten Hirnregionen exprimiert, was die vergleichsweise niedrige Expression im Zerebellum zeigt.

Fas-induzierte Apoptose wird immer wieder in der physiologischen Hirnentwicklung mit gerichteter Elimination überschüssiger Neurone diskutiert. Beispielsweise leben transgene Mäuse, denen das FADD Gen fehlt, nicht länger als bis zum Tag 11.5 der Embryonalentwicklung [Yeh 1998, Zhang 1998]. Andererseits wird FADD nicht zur selben Zeit in kortikalen Neuronen exprimiert wie Fas Rezeptor und sein Ligand [Cheema 1999], was gegen eine Rolle bei der Hirnentwicklung spricht. In humanen embryonalen Zellkulturen konnte zu verschiedenen Stadien der Entwicklung die Rolle von Fas als funktionierender Todesrezeptor bestätigt werden [Nat 2001a, 2001b].

In der vorliegenden Studie konnten wir zeigen, dass Fas nach intrazerebraler Injektion eines agonistischen anti-Fas Antikörpers als Todesrezeptor funktioniert. Unsere Daten weisen darauf hin, dass eine Vielfalt von neuronalen Zellen die Fähigkeit besitzt, durch Fas-induzierte Apoptose zu sterben.

Nach Hypoxie-Ischämie war ein signifikanter Anstieg der Fas Expression auf der Seite des Insultes zu verzeichnen. Zu späteren Zeitpunkten kam es zu einem Abfall der Fas Expression. Nach 48 Stunden sank die Expression im Hippocampus sogar unterhalb physiologische Werte, was mit exzessivem Gewebeuntergang zu erklären ist. Unsere Ergebnisse stehen in Einklang mit früheren Untersuchungen, die Fas mRNA Expression im adulten Mäusegehirn nach zerebraler Ischämie nachweisen konnten [Matsuyama 1995, Herdegen 1998]. Weitere Evidenz für eine Beteiligung des Fas Systems an neuronalen Schädigungen kommt aus der Beobachtung, daß lpr Mäuse, denen ein funktioneller Fas Rezeptor fehlt, resistent gegenüber einer zerebralen Ischämie sind [Martin-Villalba 1999].

Inzwischen haben auch andere Gruppen die Rolle von Fas bei der zerebralen Ischämie im adulten sowie im sich entwickelnden Gehirn bestätigt [Northington 2001, Padosch 2003]. Jedoch kann Fas-induzierte Apoptose nicht der einzige Mechanismus sein, durch den nach Hypoxie neuronale Zellen sterben. Im Zerebellum sahen wir einen signifikanten Anstieg der Apoptoserate bei vergleichsweise niedriger Fas Expression.

#### 4.2.2 Neuroprotektion im Modell der HIE durch Inhibition von Caspasen

In diesem experimentellen Modell konnten wir *in vitro* an neuronalen Zelllinien und primären neuronalen Kulturen einen neuroprotektiven Effekt von Caspaseninhibitoren zeigen. Der Pancaspaseninhibitor Boc-aspartyl(OMe)-fluoromethylketone (BAF) und der selektivere Caspase 8 - Inhibitor IETD-FMK (IETD) reduzierten Fas-induzierte Apoptose in PC12 Zellen und primären hippocampalen und kortikalen neuronalen Zellkulturen. *In*

*vivo* gibt es im unreifen Gehirn nur wenige Untersuchungen zur Wirksamkeit der Inhibition von Caspasen. Cheng und Mitarbeiter konnten den neuroprotektiven Effekt des Pancaspaseninhibitors BAF im neonatalen Hypoxie-Modell der Ratte demonstrieren [Cheng 1998].

Aber auch andere inhibitorische Substanzen, die das Fas/FasL System zum Ziel haben, sind möglicherweise erfolgversprechend. Eine deutliche Reduktion des Infarkt Volumens brachte beispielsweise der Einsatz eines Anti-Fas Ligand Antikörpers im zerebralen Ischämie-Modell der adulten Ratte [Martin-Villalba 2001].

Die Beobachtung, dass Fas auf neuronalen Zellen im sich entwickelnden Gehirn exprimiert wird und dass dieses Molekül zudem nach zerebraler Hypoxie-Ischämie hochreguliert wird, hat wesentliche Bedeutung für die Erarbeitung neuroprotektiver Strategien, um neuronalen Zelluntergang zu verhindern. Neuere therapeutische Ansätze, die die Blockierung Fas-abhängiger apoptotischer Stoffwechsellaskaden zum Ziel haben, können möglicherweise auch Schädigungen des unreifen Gehirns limitieren.

#### 4.2.3 Bestätigung der Fas Expression in post-mortem Gewebe nach hypoxischer Hirnschädigung des Neugeborenen

Diese Studie hatte zum Ziel die, im Tiermodell der Hypoxie-Ischämie gemachten Beobachtungen der Fas Expression im menschlichen System zu untersuchen [Felderhoff-Müser 2000]. Unsere immunhistochemischen Untersuchungen an paraffinfixiertem Autopsiematerial von Fällen mit PSN ergab eine deutliche Erhöhung der Expression von Fas Rezeptor auf pontinen und pyramidalen hippocampalen Neuronen. Diese Zellen trugen gleichzeitig die charakteristischen Merkmale des apoptotischen Zelluntergangs, nukleäre Kondensation und Margination.

In späteren Stadien der Apoptose, wo nur noch die sogenannten Apoptosekörperchen sichtbar waren, färbten sich die Zellen nicht mehr positiv für Fas. Diese Beobachtungen stehen in Übereinstimmung mit unseren Untersuchungen am oben beschriebenen Rattenmodell der Hypoxie-Ischämie, wo die Fas Rezeptor Hochregulation ihr Maximum 12 bis 24 Stunden nach dem Insult erreichte [Felderhoff-Müser 2000].

Auch in Kontrollfällen ohne PSN zeigte sich eine geringe Zahl von Fas/FasL positiven Zellen. Primäre hippocampale und kortikale Neurone sowie bis zu 14 Tage alte Ratten zeigen ebenfalls physiologische Expression von Fas und seinem Liganden [Cheema 1999, Felderhoff-Müser 2000]. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die absolute Zellzahl des adulten Gehirns durch Rezeptor-vermittelten Selbstmord der Zelle *in situ* durch Fas Ligand tragende Zellen erreicht wird. Aus ethischen Gründen konnten wir kein anderes Untersuchungsmaterial als das von kranken Kindern gewinnen. Deshalb können wir die Möglichkeit einer Überschätzung der Anzahl apoptotischer und Fas-positiver Zellen, auch in Fällen ohne die histologischen Kriterien einer PSN, nicht komplett ausschließen.

Die PSN tritt unter verschiedenen pathophysiologischen Bedingungen wie perinatale Hypoxie, Ischämie, Hypoglykämie und Hyperoxie mit Ausbildung von freien Radikalen auf. Während die physiologische Apoptose ein wichtiges Regulatorium für die Entwicklung des unreifen menschlichen Gehirns ist, sind die Mechanismen der induzierten Apoptose nicht vollständig bekannt. In den ersten beiden Lebenswochen der neonatalen Ratte durchläuft die NMDA-Untereinheit des Glutamaterezeptors eine Phase der Überempfindlichkeit gegenüber Exzitotoxizität. Somit sind Hirnareale mit einer hohen Dichte an Neuronen, die den NMDA Rezeptor tragen, in dieser Zeit besonders empfindlich [Ikonomidou 1999]. Bezogen auf die PSN ist noch ungeklärt, ob auch die Fas-positiven Zellen eine erhöhte Empfindlichkeit für Stimuli wie Hypoxie, Hyperoxie oder Hypoglykämie besitzen.

Eine kürzlich durchgeführte Studie an PSN Fällen zeigte neben anderen Faktoren, wie p53, Bcl-2 und Bax, die Aktivierung von Caspase 3 in apoptotischen Zellen, was die Beteiligung weiterer apoptotischer Faktoren bei der PSN bestätigt [Stadelmann 2001].

Die Rolle von Fas Ligand bleibt weiterhin Gegenstand der Diskussion. Mittels immunhistochemischer Techniken wurde eine physiologische Expression von Fas Ligand bisher auf Astrozyten und Neuronen bei Maus und Ratte sowie im adulten, humanen ZNS gefunden [Saas 1997, Bechmann 1999, Quallet 1999]. Auch fand sich im neonatalen Rattengehirn eine physiologische Expression von Fas Ligand und eine Hochregulation unter hypoxisch-ischämischen Bedingungen, wie wir in einer Pilotstudie zeigen konnten [Felderhoff-Müser 2000]. Im vorliegenden Autopsiematerial ließ sich zur neuronalen Expression von Fas Ligand keine klare Aussage machen. Dies kann möglicherweise an der zu langen Fixation des Gewebes im Routinebetrieb liegen.

Weitere tierexperimentelle und prospektive humane Studien sind notwendig, um die Rolle des Fas/Fas Ligand Systems im sich entwickelnden Gehirn näher zu untersuchen und neuroprotektive Maßnahmen, die diesen Todesrezeptor zum Ziel haben, zu testen.

#### **4.3 Apoptotische Signalgebung im Tiermodell der traumatischen Hirnschädigung der unreifen Ratte**

Wir konnten zeigen, dass bei der Neurodegeneration nach Trauma auf das unreife Gehirn mindestens zwei verschiedene apoptotische Stoffwechselwege aktiviert werden. Durch Einsatz eines Caspaseninhibitors als neuroprotektive Maßnahme konnte in diesem Modell die apoptotische Schädigung deutlich reduziert werden. Zudem wurde die Expression der neurotrophen Wachstumsfaktoren BDNF und NT-3 durch Trauma moduliert.

#### 4.3.1 Die Aktivierung des extrinsischen apoptotischen Systems

Der extrinsische Weg beinhaltet die Aktivierung von Caspase 8 und kann durch Anschalten von Todesrezeptoren initiiert werden. In dieser Arbeit konnten wir zeigen, dass ebenso wie im adulten [Beer 2000], auch im Traumamodell der infantilen Ratte der Todesrezeptor Fas hochreguliert wird. Diese Ergebnisse sind in Einklang mit unserer Studie am Hypoxiemodell, die ebenfalls die Hochregulation von Fas beschrieb [Felderhoff-Müser 2000]. Unsere Daten am Traumamodell zeigten Fas Expression in Zellen, die auch die Merkmale von apoptotischem Zelluntergang trugen und diese Fas Expression korrelierte mit einer erhöhten Caspase 8 Aktivität. Es ist aber nicht auszuschließen, dass in diesem experimentellen Modell neben Fas auch andere Todesrezeptoren und ihre Liganden, wie beispielsweise TNF oder TRAIL, bei der Aktivierung von Caspase 8 eine Rolle spielen.

Interaktionen zwischen der extrinsischen und der intrinsischen apoptotischen Stoffwechsellkaskade sind beschrieben. So kann die Aktivierung von Caspase 8 über Proteolyse des pro-apoptotischen Proteins bid zur Ausschüttung von Cytochrom C aus den Mitochondrien führen [Hengartner 2000].

#### 4.3.2 Die Aktivierung des intrinsischen apoptotischen Systems

Der intrinsische Weg beinhaltet die mitochondriale Freisetzung von Cytochrom C in das Zytoplasma mit anschließender Aktivierung von Caspase 9. Im Modell der apoptotischen Neurodegeneration nach Trauma auf das infantile Rattengehirn fand sich Cytochrom C schon 2 Stunden nach Insult im Zytoplasma, zu einem Zeitpunkt, wo mit histologischen Methoden noch keine Apoptose zu detektieren war. Unsere Ergebnisse bestätigen die Aktivierung des intrinsischen Systems auch im infantilen Rattengehirn, was bisher nur im adulten Gehirn nachgewiesen werden konnte [Morita-Fujimura 1999, Raghupathi 2000, Keane 2001]. Wie Cytochrom C ins Zytoplasma gelangt, ist nicht geklärt. Die anti-apoptotischen Proteine aus der Bcl-2 Familie gewährleisten die Stabilität der

mitochondrialen Membran [Kroemer 1997b, Hengartner 2000, Nicholson 2000]. Wir konnten eine stark erniedrigte Expression von Bcl-2 und Bcl-x<sub>L</sub> 1/2 - 2 Stunden nach dem Insult feststellen, was eine Erklärung für die erhöhte Permeabilität der mitochondrialen Membran sein könnte.

#### 4.3.3 Die Regulation durch Wachstumsfaktoren

Die Gründe für die erniedrigte Expression der Mitglieder der Bcl-2 Familie sind nicht geklärt. Xing und Mitarbeiter konnten zeigen, dass die Transkription von Bcl-2 von CREB beeinflusst wird, welches wiederum in seiner Aktivität durch Wachstumsfaktoren geregelt wird [Xing 1996]. Die Ausschüttung von Neurotrophinen und deren Wirkung auf sich entwickelnde Neurone wird durch das Maß an neuronaler Aktivität geregelt [Mc Callister 1996, Liou 1997]. Nach Hirntrauma ist die physiologische, synaptische Aktivität vermindert, was eine Beeinträchtigung neurotrophin-vermittelter Überlebenssignale zur Folge haben könnte. Im Gegensatz dazu fanden wir eine Hochregulation der Neurotrophine BDNF und NT-3 nach Trauma. Dies ist möglicherweise im unreifen Gehirn als intrinsischer Kompensationsmechanismus der Zelle zu verstehen, um zumindest einen Teil des neuronalen Untergangs zu verhindern. Neurotrophine können aber nicht nur Überlebenssignale aussenden und die Differenzierung der Zelle fördern, sondern auch über den p75 Neurotrophinrezeptor (NTR) Zelltod induzieren. P75 wird besonders während der frühen neuronalen Entwicklung exprimiert und ist strukturell verwandt mit der Fas/TNF Rezeptorfamilie. Seine Funktion wird hauptsächlich nach Aktivierung über Nerve Growth Factor (NGF) vermittelt [Troy 2002, Dechant 2002]. Ebenso können Neurotrophin-4 (NT-4) und Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF), zwei Wachstumsfaktoren aus unterschiedlichen Familien, eine Neurodegeneration fördern [Lobner 2002, McDonald 2002]. Ob die beiden, in der vorliegenden Arbeit untersuchten, Neurotrophine unter bestimmten Umständen auch Zelltod-induzierende Wirkungen haben, ist nicht geklärt.

#### 4.3.4 Neuroprotektion im Traumamodell durch Inhibition von Caspasen

Im Traumamodell konnten wir zeigen, daß die apoptotische Neurodegeneration effektiv durch die intrazerebroventrikuläre Injektion des Pancaspaseninhibitors z-VAD.FMK geblockt werden kann. Diese Substanz war in der Lage, den Zelluntergang bei Injektion von bis zu einem Zeitfenster von 8 Stunden nach Insult deutlich zu reduzieren. Zudem ließen sich auch neuroprotektive Effekte in vom primären Insult entfernt gelegenen Hirnregionen zeigen. Dies ist für den Einsatz in einem klinischen Umfeld von großer Bedeutung.

In adulten Tiermodellen der experimentellen Meningitis und der zerebralen Hypoxie zeigten Caspaseninhibitoren signifikante neuroprotektive Effekte [Endres 1998, Fink 1998, Himi 1998, Braun 1999]. Auch im Traumamodell erwiesen sich z-VAD.FMK und der selektive Caspase 3 Inhibitor z-DEVD.FMK als wirksam [Yakovlev 1997, Clark 2000]. Im sich entwickelnden Gehirn gibt es nur wenige Daten zur Wirksamkeit von Caspaseninhibitoren. Zusätzlich zu unseren *in vitro* Untersuchungen in hippocampalen und kortikalen neuronalen Kulturen existiert nur eine weitere *in vivo* Studie. Cheng und Mitarbeiter demonstrierten den neuroprotektiven Effekt des Pancaspaseninhibitors BAF im neonatalen Hypoxie-Modell [Cheng 1998].

Unsere Ergebnisse verdeutlichen, dass die Blockierung von Effektormolekülen der neuronalen Apoptose therapeutisches Potential bei der traumatischen Schädigung des infantilen Gehirns hat. Derartige antiapoptotische Therapien geben möglicherweise genug Zeit, um zelleigene Schutzsysteme zu aktivieren und die zelluläre Homöostase und Funktion wiederherzustellen [Han 2000]. Es existieren Daten zur funktionellen Langzeitentwicklung nach Caspaseninhibition im adulten zerebralen Ischämie-Modell [Mouw 2002]. Da aber Apoptose auch ein physiologischer Prozeß im sich entwickelnden Gehirn ist, sind Studien, die neurologische Folgeuntersuchungen nach Caspaseninhibition zum Ziel haben, von großem wissenschaftlichen Interesse [Gillardon 1999].

## **4.4 Die Rolle von löslichen apoptotischen Faktoren beim kindlichen Hydrozephalus**

### **4.4.1 Lösliches Fas, löslicher Fas Ligand und aktivierte Caspase 3 im Liquor von Kindern mit Hydrozephalus**

In diesen klinischen Untersuchungen wurden lösliche Formen von pro-apoptotischen Faktoren im Liquor von Neugeborenen und Kindern mit Hydrozephalus untersucht. Es konnte gezeigt werden, daß die lösliche Form des pro-apoptotischen Zelloberflächenrezeptors Fas bei allen Patientengruppen von Kindern mit Hydrozephalus signifikant erhöht war. Dieser löslichen Form wird eine anti-apoptotische Wirkung zugeschrieben, um die zelluläre Homöostase bei Fas-gerigterter Apoptose im Gleichgewicht zu halten [Matsuki 2002].

In der ersten Serie von Patienten wurden ältere Kinder mit Hydrozephalus untersucht. Der Liquor wurde bei Shuntimplantationen oder Shuntrevisionen aufgrund von klinischer Hirndrucksymptomatik gewonnen, eingefroren und mittels ELISA-Technik aufgearbeitet. In der zweiten Patientengruppe wurden Früh- und Neugeborene mit posthämorrhagischem und kongenitalem Hydrozephalus untersucht. Der Liquor wurde bei klinischer Symptomatik entweder bei Shuntimplantation oder Punktion eines implantierten Rickham Reservoirs gewonnen.

In beiden Untersuchungsserien wurden Patienten mit Infektionen und Tumoren ausgeschlossen, um eine Interaktion von Fas tragenden Immun- und Tumorzellen zu vermeiden [Faßbender 1999, Riffkin 2001].

Bei Patienten mit Hydrozephalus fanden sich signifikant höhere intrathekale Spiegel der löslichen Form des Fas Rezeptors. Fas Ligand war nicht erhöht. Zur Zeit der ersten Studie war ein ELISA zur Messung von aktivierter Caspase 3 noch nicht verfügbar. Die aktivierte Form von Caspase 3 wurde deshalb nur in der zweiten Studie an Früh- und

Neugeborenen untersucht. Im Vergleich zur Kontrollgruppe waren keine erhöhten Spiegel zu finden.

sFas wurde bisher bei einigen neurodegenerativen Erkrankungen erhöht im Liquor gefunden, insbesondere bei Autoimmunerkrankungen, HIV, zerebralen Ischämien, Traumen und malignen Erkrankungen [Zipp 1998, Tarkowski 1999, Sabri 2001, Lenzlinger 2001, Liu 2002]. In einer Studie an Schlaganfallpatienten war die Konzentration von sFas im Liquor erniedrigt und korrelierte negativ mit dem Ausmaß der Schädigung. Die Autoren schlugen eine initial im akuten Ereignis erhöhte sFas Produktion mit anschließendem konsumptiven Verbrauch des Moleküls vor [Tarkowski 1999]. Im Gegensatz zum Schlaganfall ist der Hydrozephalus ein eher chronisches Ereignis mit schneller klinischer Erholung nach Reduktion des intrakraniellen Druckes. Möglicherweise kommt es bei Hydrozephaluspatienten zu einer Hochregulation von anti-apoptischen Faktoren, um schwererem Schaden vorzubeugen. Erhöhte sFas Werte im Liquor von Patienten mit Hydrozephalus, sprechen für ein endogenes Protektionssystem gegen parallel ablaufende apoptotische Prozesse [Zipp 1998, Tarkowski 1999]. Neurone, Oligodendrozyten und Astrozyten haben alle das Potential, Fas zu bilden; die genaue Stätte der Produktion bleibt zu untersuchen [Becher 1998, Cheema 1999].

Im Gegensatz zu Untersuchungen beim akuten Hirntrauma war die lösliche Form des pro-apoptisch wirkenden Liganden von Fas nicht erhöht. Ertel und Mitarbeiter machen Fas-tragende inflammatorische Leukozyten für eine intrinsische Produktion von sFasL verantwortlich, um diese Zellen per Fas-induzierter Apoptose zu eliminieren [Ertel 1997]. Eine mögliche Erklärung für unsere negativen sFasL Ergebnisse könnte das Fehlen einer solchen Reaktion beim Hydrozephalus sein [Del Bigio 1998].

Die Gewebeexpression von Fas und Caspase 3 wurde ausführlich in Tiermodellen der traumatischen Hirnschädigung untersucht [Bittigau 1999, Beer 2000, Felderhoff-Müser 2002]. In klinischen Studien an hirntraumatisierten Erwachsenen fand sich eine erhöhte

Caspase 3 Aktivität und eine Erhöhung der löslichen Form von Fas Ligand [Ertel 1997, Hentze 2001, Harter 2001]. Demgegenüber fand sich in unseren Untersuchungen weder sFasL noch die aktivierte Form der Caspase 3 erhöht. Im Gegenteil zum Hirntrauma, welches mit ausgedehnten Gewebeuntergängen einhergeht, handelt es sich beim Hydrozephalus um ein chronisches Ereignis. Es wäre möglich, dass die ELISA Technik nicht sensibel genug ist, kleinste Mengen dieser Moleküle zu erkennen. Zudem spielen beim Hydrozephalus inflammatorische Prozesse, die Apoptose verstärken könnten, keine Rolle. Leider existieren nicht viele tierexperimentelle Studien, die die Pathophysiologie der Apoptose bei Hydrozephalus im Kindesalter genauer untersucht haben [Del Bigio 1998]. Unsere Ergebnisse weisen darauf hin, daß apoptotische Signaltransduktionsmechanismen auch bei der Pathogenese des Hydrozephalus eine Rolle spielen. Ein Monitoring von sFas im Liquor könnte zudem zusätzliche Informationen ergeben, wenn die klinische Symptomatik unklar ist.

#### 4.4.2 Lösliches Fas bei Patienten mit Hydrozephalus und periventrikulärer Leukomalazie

In einer Untergruppe von frühgeborenen Patienten mit posthämorrhagischem Hydrozephalus, die im Verlauf eine zystische PVL entwickelten, war sFas signifikant erhöht. Eine Vielzahl von inflammatorischen Zytokinen wurde bisher im Serum bei Patienten mit PVL erhöht gefunden [Nelson 1998, Kadhim 2001, Dammann 2002, Leviton 2002]. Eine kürzlich erschienene Arbeit beschreibt eine erhöhte Gewebeexpression von TNF-alpha, einem Fas sehr verwandten Zytokin, bei verstorbenen Frühgeborenen mit PVL [Kadhim 2003]. Auch gibt es einen Zusammenhang zwischen histologischer Chorioamnionitis, erhöhten Zytokinen und Hirnblutungen [Tauscher 2003].

Obwohl die Anzahl der Patienten mit PVL gering war, sind hohe sFas Werte möglicherweise ein Hinweis auf Gewebeuntergang im sich entwickelnden Gehirn. Weitere Studien an einer größeren Anzahl von Patienten sind notwendig, um diese Ergebnisse zu verifizieren.

#### **4.5 Schlussfolgerungen und Ausblick**

In den letzten Jahren hat sich das Verständnis der Mechanismen des Zelltodes bei akuten Schädigungen des Nervensystems sowie neurodegenerativen Erkrankungen deutlich verbessert [Friedlander 2003]. Die Tatsache, dass die Aktivierung apoptotischer Stoffwechselkaskaden bei einer Vielzahl von Schädigungsmustern im Gehirn eine Rolle spielt, macht diese interessant für neuroprotektive Interventionen [Nicholson 2000]. Die Kenntnis der genauen intrazellulären Stoffwechselwege soll therapeutische Ziele identifizieren, um so selektiv Zelltodmechanismen zu inhibieren ohne umliegende intakte Zellen zu schädigen. Die überwiegende Mehrzahl der experimentellen Studien wurde in adulten Systemen durchgeführt. Für das unreife Gehirn liegen vergleichsweise wenige Daten vor. Die zugrundeliegenden biochemischen Abläufe sind dem adulten zentralen Nervensystem zwar prinzipiell ähnlich, in vielen experimentellen Modellen wird jedoch das Ausmaß einer Schädigung deutlich vom Alter beeinflusst [Bittigau 1999, Back 2002].

Die vorliegenden klinischen und tierexperimentellen Arbeiten haben gezeigt, dass apoptotischen Signaltransduktionsmechanismen im unreifen Gehirn eine wesentliche Rolle zukommt. Das Verständnis der modulierenden Faktoren, die das Ausmaß einer Schädigung bestimmen, ist entscheidend für die Entwicklung neuroprotektiver Therapien für das unreife zentrale Nervensystem. Im klinischen Umfeld ist es notwendig, Schädigungsmuster mit neuen, sensiblen bildgebenden Techniken wie der Magnetresonanztomographie zu identifizieren [Hüppi 2002, Miller 2002], sowie empfindliche biochemische Verlaufparameter zu erarbeiten. Zur Entwicklung neuroprotektiver Strategien ist die Untersuchung der Ausbreitung einer Schädigung in verschiedenen Hirnregionen und unreifen Zellsystemen unter Bezugnahme auf die genauen zeitlichen Abläufe wichtig. Der Entwicklung pharmakologischer Interventionen sollte in jedem Fall die sorgfältige Untersuchung der physiologischen Reifeprozesse vorausgehen.

## ABKÜRZUNGEN

HIE	Hypoxisch-ischämische Enzephalopathie
PVL	Periventrikuläre Leukomalazie
PSN	Pontosubikuläre Nekrose
MRT	Magnetresonanztomographie
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
TUNEL	terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling
sFas	soluble Fas, lösliches Fas
sFasL	soluble Fas Ligand, löslicher Fas Ligand
BDNF	Brain-Derived Neurotrophic Factor
NT-3	Neurotrophin-3
NT-4	Neurotrophin-4
NGF	Nerve Growth Factor
bFGF	Basic Fibroblast Growth Factor
NTR	Neurotrophinrezeptor

## LITERATURVERZEICHNIS

1. Adelson PD, Kochanek PM. Head injury in children. *J. Child Neurol* 1998; 13:2-15
2. Ajayi-Obe M, Saeed N, Cowan FM, Rutherford MA, Edwards AD. Reduced development of cerebral cortex in extremely preterm infants. *Lancet* 2000; 356:1162-1163
3. Amato M, Fauchere JC, Hermann U Jr. Coagulation abnormalities in low birth weight infants with peri-intraventricular hemorrhage. *Neuropediatrics* 1988; 19:154-157
4. Back SA, Han BH, Luo NL, Chricton CA, Xanthoudakis S, Tam J, Arvin KL, Holtzman DM. Selective vulnerability of late oligodendrocyte progenitors to hypoxia-ischemia. *J Neurosci* 2002; 22:455-463
5. Barkovich AJ, Truwit LT. Brain damage from perinatal asphyxia: correlation of MR findings with gestational age. *Am J Neuroradiol* 1990; 11:1087-1096
6. Battin M, Maalouf EF, Counsell S, Herilhy AH, Edwards AD. Magnetic resonance imaging of the brain of premature infants. *Lancet* 1997; 349:1741
7. Becher B, D'Souza SD, Troutt AB, Antel JP. Fas expression on human fetal astrocytes without susceptibility to Fas-mediated cytotoxicity. *Neurosci* 1998; 84:627-634
8. Bechmann I, Mor G, Nilsen J, Eliza M, Nitsch R, Naftolin F. FasL (CD95L, Apo1L) is expressed in the normal rat and human brain: evidence for the existence of an immunological brain barrier. *Glia* 1999; 27:62-74
9. Beer R, Franz G, Schopf M, Reindl M, Zelger B, Schmutzhard E, Poewe W, Kampfl A. Expression of Fas and Fas ligand after experimental traumatic brain injury in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 2000; 20:669-677
10. Berger R, Garnier Y, Jensen A. Perinatal brain damage: underlying mechanisms and neuroprotective strategies. *J Soc Gynecol Investig* 2002; 9:319-328
11. Berkowitz GS, Papiernik E. Epidemiology of preterm birth. *Epidemiol Rev* 1993; 15:414-443
12. Bittigau P, Pohl D, Sifringer M, Shimizu H, Ikeda M, Stadthaus D, Fuhr S, Dikranian K, Olney JW, Ikonomidou C. Modeling pediatric head trauma: Mechanisms of degeneration and potential strategies for neuroprotection. *Restor Neurol Neurosci* 1998; 13:11-23
13. Bittigau P, Sifringer M, Pohl D, Stadthaus D, Ishimaru M, Shimizu H, Ikeda M, Lang D, Speer A, Olney JW, Ikonomidou C. Apoptotic neurodegeneration following trauma is markedly enhanced in the immature brain. *Ann Neurol* 1999; 45:724-735
14. Bittigau P, Sifringer M, Genz K, Reith E, Pospischil D, Govindarajalu S, Dzierko M, Pesditschek S, Mai I, Dikranian K, Olney JW, Ikonomidou C. Antiepileptic drugs and apoptotic neurodegeneration in the developing brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99:15089-15094

15. Braun KP, de Graaf RA, Vandertop WP, Gooskens RH, Tulleken KA, Nicolay K. In vivo 1H MR spectroscopic imaging and diffusion weighted MRI in experimental hydrocephalus. *Magn Reson Med* 1998; 40:832-839
16. Braun JS, Novak R, Herzog KH, Bodner SM, Cleveland JL, Tuomanen E. Neuroprotection by a caspase inhibitor in acute bacterial meningitis. *Nature Med* 1999; 5:298-302
17. Braun JS, Novak R, Murray PJ, Eischen CM, Susin SA, Kroemer G, Halle A, Weber JR, Tuomanen EI, Cleveland JL. Apoptosis-inducing factor mediates microglial and neuronal apoptosis caused by pneumococcus. *J Infect Dis* 2001; 184:1300-1309
18. Brisse H, Fallet C, Sebag G, Nessmann C, Blot P, Hassan M. Supratentorial parenchyma in the developing fetal brain: in vitro MR study with histologic comparison. *Am J Neuroradiol* 1997; 18:1491-1497
19. Brück Y, Brück W, Kretschmar HA, Lassmann H. Evidence for neuronal apoptosis in pontosubicular neuron necrosis. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1996; 22:23-29
20. Chao MV, Bothwell M. Neurotrophins: to cleave or not to cleave. *Neuron* 2002; 33:9-12
21. Charlier N, Leclere N, Felderhoff U, Heldt J, Kietzmann T, Obladen M, Gross J. Hypoxia-induced cell death and changes in hypoxia-inducible factor-1 activity in PC12 cells upon exposure to nerve growth factor. *Brain Res Mol Brain Res* 2002;104:21-30
22. Cheema ZF, Wade SB, Sata M, Walsh K, Sohrabji F, Miranda RC. Fas/Apo-1 and associated proteins in the differentiating cerebral cortex: induction of caspase-dependent cell death and activation of NF-kappaB. *J Neurosci* 1999; 19:1754-1770
23. Cheng J, Zhou T, Liu C, Shapiro JP, Brauer MJ, Kiefer MC, Barr PJ, Mountz JD. Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule. *Science* 1994; 263:1759-1762
24. Cheng Y, Deshmukh M, D'Costa A, Demaro JA, Gidday JM, Shah A, Sun Y, Jacquin MF, Johnson EM, Holtzman DM. Caspase inhibitor affords neuroprotection with delayed administration in a rat model of neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *J Clin Invest* 1998; 101:1992-1999
25. Childs AM, Ramenghi LA, Evans DJ. MR features of developing periventricular white matter in preterm infants: evidence of glial cell migration. *AJNR* 1998; 19:971-976
26. Clark RS, Kochanek PM, Watkins SC, Chen M, Dixon CE, Seidberg NA, Melick J, Loeffert JE, Nathaniel PD, Jin KL, Graham SH. Caspase-3 mediated neuronal death after traumatic brain injury in rats. *J Neurochem* 2000; 74:740-753
27. Conti AC, Raghupathi R, Trojanowski JQ, McIntosh TK. Experimental brain injury induces regionally distinct apoptosis during the acute and delayed post-traumatic period. *J Neurosci* 1998; 18:5663-5672
28. Dammann O, Leviton A. Brain damage in preterm newborns: might enhancement of developmentally regulated endogenous protection open a door for prevention? *Pediatrics* 1999; 104:541-550

29. Dammann O, Kuban KC, Leviton A. Perinatal infection, fetal inflammatory response, white matter damage, and cognitive limitations in children born preterm. *Acta Paediatr* 2002; 91:9-13
30. Dechant G, Barde YA. The neurotrophin receptor p75 (NTR): novel functions and implications for diseases of the nervous system. *Nat Neurosci* 2002; 5:1131-1136
31. Del Bigio MR, Zhang YW. Cell death, axonal damage, and cell birth in the immature rat brain following induction of hydrocephalus. *Exp Neurol* 1998; 154:157-169
32. Del Bigio MR, Wilson MJ, Enno T. Chronic hydrocephalus in rats and humans: white matter loss and behavior changes. *Ann Neurol* 2003; 53:337-346
33. Diamond PT. Brain injury in the Commonwealth of Virginia: an analysis of Central registry data 1988-1993. *Brain Injury* 1996; 10:414-419
34. Dikranian K, Ishimaru MJ, Tenkova T, Labruyere J, Qin YQ, Ikonomidou C, Olney JW. Apoptosis in the in vivo mammalian forebrain. *Neurobiol Dis* 2001; 8:359-379
35. Dobbing J, Sands J. Comparative aspects of the brain growth spurt. *Early Hum Dev* 1979; 3:79-83
36. Dommergues MA, Patkai J, Renauld JC, Evrard P, Gressens P. Proinflammatory cytokines and interleukin-9 exacerbate excitotoxic lesions of the newborn murine neopallium. *Ann Neurol* 2000; 47:54-63
37. Dowling P, Shang G, Sumul R, Menonna J, Cook S, Husar W. Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) receptor/ligand system in the multiple sclerosis brain. *J Exp Med* 1996; 184:1513-1518
38. Eklind S, Mallard C, Leverin AL, Gilland E, Blomgren K, Mattsby-Baltzer I, Hagberg H. Bacterial endotoxin sensitizes the immature brain to hypoxic-ischaemic injury. *Eur J Neurosci* 2001;13:1101-1106
39. Emslie HC, Wardle SP, Sims DG, Chiswick ML, D'Souza SW. Increased survival and deteriorating developmental outcome in 23-25 weeks gestation infants, 1990-1994 compared with 1984-1989. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 1998; 78:99-104
40. Endres M, Namura S, Shimizu-Sasamata M, Waeber C, Zhang L, Gomez-Isla T, Hyman BT, Moskowitz MA. Attenuation of delayed neuronal death after mild focal ischemia in mice by inhibition of the caspase family. *J Cereb Blood Flow Metab* 1998; 18:238-247
41. Ertel W, Keel M, Stocker R, Imhof HG, Leist M, Steckholzer U, Tanaka M, Trentz O, Nagata S. Detectable concentrations of Fas ligand in cerebrospinal fluid after severe head injury. *J Neuroimmunol* 1997; 80:93-96
42. Faden AI, Demediuk P, Panter SS, Vink R. The role of excitatory amino acids and NMDA receptors in traumatic brain injury. *Science* 1989; 44:798-800
43. Fassbender K, Eschenfelder C, Hennerici M. Fas (APO-1/CD95) in inflammatory CNS diseases: intrathecal release in bacterial meningitis. *J Neuroimmunol* 1999; 93:122-125
44. Feeney DM, Boyeson MG, Linn RT, Murray HM, Dail WG. Responses to cortical injury: I. Methodology and local effects of contusions in the rat. *Brain Res* 1981; 211:67-77

45. Felderhoff-Müser U, Taylor DL, Greenwood KG, Stibenz D, Kozma M, Joashi U, Edwards AD, Mehmet H. Fas/CD95/Apo-1 can function as a death receptor for neuronal cells in vitro and in vivo and is upregulated following cerebral hypoxic-ischemic injury to the developing rat brain. *Brain Pathol* 2000; 10:19-27
46. Felderhoff-Mueser U, Ikonomidou C. Mechanisms of neurodegeneration after paediatric brain injury. *Curr Opin Neurol* 2000; 13:141-145
47. Felderhoff-Mueser U, Bittigau P, Sifringer M, Mahler L, Hoehn T, Ikonomidou C, Obladen M, Bühner C. Expression of cytokines and growth factors in oxygen-induced apoptotic cell death in the developing rat brain. *Ped Res* 2002; 52: A76
48. Fink K, Zhu J, Namura S, Shimizu-Sasamata M, Endres M, Ma J, Dalkara T, Yuan J, Moskowitz MA. Prolonged therapeutic window for ischemic brain damage caused by delayed caspase activation. *J Cereb Blood Flow Metab* 1998; 18:1071-1076
49. Friede RL. Ponto-subicular lesions in perinatal anoxia. *Arch Pathol* 1972; 94:343-354
50. Friedlander RM. Apoptosis and caspases in neurodegenerative diseases. *N Engl J Med* 2003; 348:1365-1375
51. Galasko D. Biological markers and the treatment of Alzheimer's disease. *J Mol Neurosci* 2001; 17:119-125
52. Gillardon F, Kiprianova I, Sandkuhler J, Hossmann HA, Spranger M. Inhibition of caspases prevents cell death of hippocampal CA1 neurons, but not impairment of hippocampal long-term potentiation following global ischemia. *Neuroscience* 1999; 93: 1219-1222
53. Gilles FH, Averill DR Jr, Kerr CS. Neonatal endotoxin encephalopathy. *Ann Neurol* 1977; 2:49-56.
54. Goldstein M. Traumatic brain injury: a silent epidemic. *Ann Neurol* 1990; 27:327
55. Gomez R, Romero R, Edwin SS, David C. Pathogenesis of preterm labor and preterm premature rupture of membranes associated with intraamniotic infection. *Infect Dis Clin North Am* 1997; 11:135-176
56. Grunau RE, Whitfield MF, Davis C. Pattern of learning disabilities in children with extremely low birth weight and broadly average intelligence. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2002; 156:615-620
57. Hagberg H, Ichord R, Palmer C, Yager JY, Vannucci SJ. Animal models of developmental brain injury: relevance to human disease. *Dev Neurosci* 2002; 24:364-366
58. Hall AS, Young IR, Davies FJ, Mohaparta SN. A dedicated magnetic resonance system in a neonatal intensive therapy unit (In) Bradley WG, Bydder GM (Eds) *Advanced MR imaging techniques*. London: Martin Dunitz, 1997 S. 281-289
59. Hamrick SEG, Ferriero DM. The injury response in the term newborn brain: can we neuroprotect ? *Curr Opin Neurol* 2003; 16:147-154

60. Han BH, Holtzman DM. BDNF protects the neonatal brain from hypoxic-ischemic injury in vivo via the ERK pathway. *J Neurosci* 2000; 20:5775-5781
61. Harter L, Keel M, Hentze H, Leist M, Ertel W. Caspase-3 activity is present in cerebrospinal fluid from patients with traumatic brain injury. *J Neuroimmunol* 2001; 121:76-78
62. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000; 407:770-776
63. Hentze H, Schwoebel F, Lund S, Keel M, Ertel W, Wendel A, Jaattela M, Leist M, Kehl M. In vivo and in vitro evidence for extracellular caspase activity released from apoptotic cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 283:1111-1117
64. Herdegen T, Claret FX, Kallunki T, Martin Villalba A, Winter C, Hunter T, Karin M. Lasting N-terminal phosphorylation of c-Jun and activation of c-Jun N-terminal kinases after neuronal injury. *J Neurosci* 1998; 18:5124-5135
65. Heyes MP, Saito K, Milstien S, Schiff SJ. Quinolinic acid in tumors, hemorrhage and bacterial infections of the central nervous system in children. *J Neurol Sci* 1995;133:112-118
66. Himi T, Ishizaki Y, Murota S. A caspase inhibitor blocks ischaemia-induced delayed neuronal death in the gerbil. *Eur J Neurosci* 1998; 10: 777-781
67. Hoehn T, Felderhoff-Mueser U, Maschewski K, Stadelmann C, Siffringer M, Bittigau P, Koehne P, Hoppenz M, Obladen M, Bührer C. Hyperoxia causes inducible nitric oxide synthase mediated cellular damage to the immature rat brain. 2003; *Ped Res* (in press)
68. Horwood LJ, Mogridge N, Darlow BA. Cognitive, educational and behavioural outcomes at 7 to 8 years in a national very low birthweight cohort. *Arch Dis Child Fetal Neonat Ed* 1998; 79:F12-F20
69. Hüppi PS. Advances in postnatal neuroimaging:relevance to pathogenesis and treatment of brain injury. *Clin Perinatol* 2002; 29:827-856
70. Hughes DP, Crispe IN. A naturally occurring soluble isoform of murine Fas generated by alternative splicing. *J Exp Med* 1995; 182:1395-1401
71. Ikonomidou C, Qin Y, Labruyere J, Kirby C, Olney JW. Prevention of trauma-induced neurodegeneration in infant rat brain. *Pediatr Res* 1996; 39:1020-1027
72. Ikonomidou C, Bosch F, Miksa M, Bittigau P, Vockler J, Dikranian K, Tenkova TI, Stefovaska V, Turski L, Olney JW. Blockade of NMDA receptors and apoptotic neurodegeneration in the developing brain *Science* 1999; 283:70-74
73. Inder TE, Hüppi PS, Warfield S, Kikinis R, Zientara GP, Barnes PD, Jolesz F, Volpe JJ. Periventricular white matter injury in the premature infant is followed by reduced cerebral cortical gray matter volume at term. *Ann Neurol* 1999; 46:755-760
74. Ishimaru MJ, Ikonomidou C, Tenkova TI, Der TC, Dikranian K, Sesma MA, Olney JW. Distinguishing excitotoxic from apoptotic neurodegeneration in the developing rat brain. *J Comp Neurol* 1999; 408:461-476

75. James HE. Pediatric head injury: what is unique and different. *Acta Neurochir Suppl (Wien)* 1999; 73 :85-88
76. Jouvett P, Rustin P, Taylor DL, Pocock JM, Felderhoff-Mueser U, Mazarakis ND, Sarraf C, Joashi U, Kozma M, Greenwood K, Edwards AD, Mehmet H. Branched chain amino acids induce apoptosis in neural cells without mitochondrial membrane depolarization or cytochrome c release: implications for neurological impairment associated with maple syrup urine disease. *Mol Biol Cell* 2000; 11:1919-32
77. Kadhim H, Tabarki B, Verellen G, De Prez C, Rona AM, Sebire G. Inflammatory cytokines in the pathogenesis of periventricular leukomalacia. *Neurology* 2001; 56:1278-1284
78. Kadhim H, Tabarki B, Prez CD, Sebire G. Cytokine immunoreactivity in cortical and subcortical neurons in periventricular leukomalacia: are cytokines implicated in neuronal dysfunction in cerebral palsy? *Acta Neuropathol (Berl)* 2003; 105:209-216
79. Kato H, Kogure K, Liu X-H, Araki T, Itoyama Y. Progressive expression of immunomolecules on activated microglia and invading leucocytes following focal cerebral ischemia in the rat. *Brain Res* 1996; 734:203-212
80. Kayahara M, Felderhoff-Mueser U, Pocock J, Hughes MN, Mehmet H. NO<sup>-</sup> and NO<sup>+</sup> reduce mitochondrial membrane potential and trigger apoptosis in neural PC12 cells. *Biochem Soc Trans* 1998; 26:S 340
81. Keane RW, Kraydieh S, Lotocki G, Alonso OF, Aldana P, Dietrich WD. Apoptotic and antiapoptotic mechanisms after traumatic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 2001; 21:1189-1198
82. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26:239-257
83. Kirpalani H, Asztalos E. Neonatal brain injury. *Curr Opin Pediatr* 2001; 13:227-233
84. Koskiniemi M, Kykkä T, Nybo T, Jarho L. Long-term outcome after severe brain injury in preschoolers is worse than expected. *Arch Pediatr Adolesc Med* 1995; 149:249-254
85. Krammer PH, Dhein J, Walczak H, Behrmann I, Mariani S, Matiba B, Fath M, Daniel PT, Knipping E, Westendorp MO. The role of APO-1-mediated apoptosis in the immune system. *Immunol Rev* 1994;142:175-191
86. Krammer PH. CD95(APO-1/Fas)-mediated apoptosis: live and let die. *Adv Immunol* 1999; 71:163-210
87. Krammer PH. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 2000; 407:789-795
88. Kraus JF, Fife D, Conroy C. Pediatric brain injuries: the nature, clinical course and early outcomes in a defined United States population. *Pediatrics* 1987; 79:501-507
89. Kroemer G, Zamzami N, Susin SA. Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol Today* 1997a; 18:44-51
90. Kroemer G. The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nat Med* 1997b; 3:614-620

91. Leib SL, Kim YS, Black SM, Tureen JH, Tauber MG. Inducible nitric oxide synthase and the effect of aminoguanidine in experimental neonatal meningitis. *J Infect Dis* 1998; 177: 692-700
92. Lenzlinger PM, Marx A, Trentz O, Kossmann T, Morganti-Kossmann MC. Prolonged intrathecal release of soluble Fas following severe traumatic brain injury in humans. *J Neuroimmunol* 2002; 122:167-174
93. Leviton A, Gilles FH. An epidemiologic study of perinatal leucoencephalopathy in an autopsy population. *Am J Epidemiol* 1976; 104:621-626
94. Leviton A, Dammann O. Brain damage markers in children. Neurobiological and clinical aspects. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 2002; 8:46-50
95. Liou JC, Fu WM. Regulation of quantal secretion from developing motoneurons by postsynaptic activity-dependent release of NT-3. *J Neurosci* 1997; 17:2459-2468
96. Liu JH, Wei S, Lamy T, Li Y, Epling-Burnette PK, Djeu JY, Loughran TP Jr. Blockade of Fas-dependent apoptosis by soluble Fas in LGL leukemia. *Blood* 2002; 100:1449-1453
97. Lobner D, Ali C. Mechanisms of bFGF and NT-4 potentiation of necrotic neuronal death. *Brain Res* 2002; 954:42-50
98. Maalouf E, Counsell S, Battin M, Cowan F. Magnetic resonance imaging of the neonatal brain. *BJHM* 1998; 59:41-45
99. Maalouf EF, Duggan PJ, Rutherford MA, Counsell SJ, Fletcher AM, Battin M, Cowan F, Edwards AD. Magnetic resonance imaging of the brain in a cohort of extremely preterm infants. *J Pediatr* 1999; 135:351-357
100. Maalouf EF, Duggan PJ, Counsell SJ, Rutherford MA, Cowan F, Azzopardi D, Edwards AD. Comparison of findings on cranial ultrasound and magnetic resonance imaging in preterm infants. *Pediatrics* 2001; 107:719-727
101. Mahoney WJ, D'Souza BJ, Haller A, Rogers MC, Epstein MH, Freeman JM. Long-term outcome of children with severe head trauma and prolonged coma. *Pediatrics* 1983; 1:756-762
102. Martin-Villalba A, Herr I, Jeremias I, Hahne M, Brandt R, Vogel J, Schenkel J, Herdegen T, Debatin KM. CD95 ligand (Fas-L/APO-1L) and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand mediate ischemia-induced apoptosis in neurons. *J Neurosci* 1999 19:3809-3817
103. Martin-Villalba A, Hahne M, Kleber S, Vogel J, Falk W, Schenkel J, Krammer PH. Therapeutic neutralization of CD95-ligand and TNF attenuates brain damage in stroke. *Cell Death Differ* 2001; 8:659-661
104. Matsuki Y, Li L, Hsu HC, Yang PA, Zheng R, Edwards CK 3rd, Chaudry IH, Zhang HG, Mountz JD. Soluble Fas gene therapy protects against Fas-mediated apoptosis of hepatocytes but not the lethal effects of Fas-induced TNF-alpha production by Kupffer cells. *Cell Death Differ* 2002; 9:626-635

105. Matsuyama T, Hata R, Yamamoto Y, Tagaya M, Akita H, Uno H, Wanaka A, Furuyama J, Sugita M. Localisation of Fas antigen mRNA induced in postischemic murine forebrain by in situ hybridisation. *Mol Brain Res* 1995; 34:166-172
106. Mazarakis ND, Edwards AD, Mehmet H. Apoptosis in neural development and disease. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 1997; 77:F165-170
107. McCallister AK, Katz LC, Lo DC. Neurotrophin regulation of cortical dendritic growth requires activity. *Neuron* 1996; 17:1057-1064
108. McDonald JW, Stefovaska VG, Liu XZ, Shin H, Liu S, Choi DW. Neurotrophin potentiation of iron-induced spinal cord injury. *Neuroscience* 2002; 115:931-939
109. Mehmet H, Yue X, Squier MV, Lorek A, Cady E, Penrice J, Sarraf C, Wylezinska M, Kirkbride V, Cooper C, Brown GC, Wyatt JS, Reynolds EOR, Edwards AD. Increased apoptosis in the cingulate sulcus of new-born piglets following transient hypoxia-ischaemia is related to the degree of high energy phosphate depletion during the insult. *Neurosci Lett* 1994; 181:121-125
110. Miller SP, Vigneron DB, Henry RG, Bohland MA, Ceppi-Cozzio C, Hoffman C, Newton N, Partridge JC, Ferriero DM, Barkovich AJ. Serial quantitative diffusion tensor MRI of the premature brain: development in newborns with and without injury. *J Magn Reson Imaging*. 2002; 16:621-632
111. Milligan DW. Failure of autoregulation and intraventricular haemorrhage in preterm infants. *Lancet* 1980; 1:896-898
112. Mito T, Kamei A, Takashima S, Becker LE. Clinicopathological study of pontosubicular necrosis. *Neuropediatrics* 1993; 24:204-207
113. Morita-Fujimura Y, Fujimura M, Kawase M, Chen SF, Chan PH. Release of mitochondrial cytochrome c and DNA fragmentation after cold injury-induced brain trauma in mice: possible role in neuronal apoptosis. *Neurosci Lett* 1999; 267:201-205
114. Mouw G, Zechel JL, Zhou Y, Lust WD, Selman WR, Ratcheson RA. Caspase-9 inhibition after focal cerebral ischemia improves outcome following reversible focal ischemia. *Metab Brain Dis* 2002;17:143-151
115. Murahashi H, Azuma H, Zamzami N, Furuya KJ, Ikebuchi K, Yamaguchi M, Yamada Y, Sato N, Fujihara M, Kroemer G, Ikeda H. Possible contribution of apoptosis-inducing factor (AIF) and reactive oxygen species (ROS) to UVB-induced caspase-independent cell death in the T cell line Jurkat. *J Leukoc Biol* 2003; 73:399-406
116. Nagata S, Golstein P. The Fas death factor. *Science* 1995; 267:1449-1456
117. Nat R, Radu E, Regalia T, Popescu LM. Apoptosis in human embryo development: Fas-induced apoptosis in brain primary cultures. *J Cell Mol Med* 2001a; 5:417-428
118. Nat R, Voiculescu B, Stanciu C, Vidulescu C, Cergan R, Badiu C, Popescu LM. Apoptosis in human embryo development: Cerebellum. *J Cell Mol Med* 2001b; 5:179-187
119. Nelson KB, Dambrosia JM, Grether JK, Phillips TM. Neonatal cytokines and coagulation factors in children with cerebral palsy. *Ann Neurol* 1998; 44:665-675

120. Nelson KB, Grether JK, Dambrosia JM, Walsh E, Kohler S, Satyanarayana G, Nelson PG, Dickens BF, Phillips TM. Neonatal cytokines and cerebral palsy in very preterm infants. *Pediatr Res* 2003; 53:600-607
121. Nicholson DW. From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents. *Nature* 2000; 407:810-816
122. Nishimura T, Akiyama H, Yonehara S, Kondo H, Ikeda K, Kato H, Iseki E, Kosaka K. Fas antigen expression in brains of patients with Alzheimer-type dementia. *Brain Res* 1995; 695:137-145
123. Northington FJ, Ferriero DM, Flock DL, Martin LJ. Delayed neurodegeneration in neonatal rat thalamus after hypoxia-ischemia is apoptosis. *J Neurosci* 2001; 21:1931-1938
124. Olney JW, Adamo NJ, Ratner A. Monosodium glutamate effects. *Science* 1971; 172:294
125. Padosch SA, Popp E, Vogel P, Bottigerr BW. Altered protein expression levels of Fas/CD95 and Fas Ligand in differentially vulnerable brain areas in rats after global cerebral ischemia. *Neurosci Lett* 2003; 338:247-251
126. Park C, Sakamaki K, Tachibana O, Yamashima T, Yamashita J, Yonehara S. Expression of fas antigen in the normal mouse brain. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 252:623-628
127. Peter ME, Krammer PH. Mechanisms of CD95(Apo-1/Fas)-mediated apoptosis. *Curr Opi Immunol* 1998; 10:545-551
128. Peter ME, Krammer PH The CD95(APO-1/Fas) DISC and beyond. *Cell Death Differ* 2003; 10:26-35
129. Peterson BS, Vohr B, Staib LH, Cannistraci CJ, Dolberg A, Schneider KC, Katz KH, Westerveld M, Sparrow S, Anderson AW, Duncan CC, Makuch RW, Gore JC, Ment LR. Regional brain volume abnormalities and long-term cognitive outcome in preterm infants. *JAMA* 2000; 284:1939-1947
130. Peterson BS, Anderson AW, Ehrenkranz R, Staib LH, Tageldin M, Colson E, Gore JC, Duncan CC, Makuch R, Ment LR. Regional brain volumes and their later neurodevelopmental correlates in term and preterm infants. *Pediatrics* 2003;111:939-948
131. Pohl D, Bittigau P, Ishimaru MJ, Stadthaus D, Hübner C, Olney JW, Turski L, Ikonomidou C. N-Methyl-D-aspartate antagonists and apoptotic cell death triggered by head trauma in developing rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:2508-2513
132. Porter AG, Janicke RU. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ* 1999; 6:99-104
133. Ouallet J, Baumann N, Marie Y, Villarroya H. Fas system up-regulation in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurol Sci* 1999;170:96-104
134. Raghupathi R, Graham DI, McIntosh TK. Apoptosis after traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 2000; 17:927-938

135. Reiss A, Felderhoff-Mueser U, Braun J, Bühner C, Weber J. Bacterial toxins contribute to neuronal damage in pneumococcal neonatal rat meningitis. *Ped Res* 2002; 52:A203
136. Rice JE 3rd, Vannucci RC, Brierley JB. The influence of immaturity on hypoxic-ischemic brain damage in the rat. *Ann Neurol* 1981; 9:131-141
137. Riffkin CD, Gray AZ, Hawkins CJ, Chow CW, Ashley DM. Ex vivo pediatric brain tumors express Fas (CD95) and FasL (CD95L) and are resistant to apoptosis induction. *Neuro-oncol* 2001; 3:229-240
138. Roelants-van Rijn AM, Groenendaal F, Beek FJ, Eken P, van Haastert IC, de Vries LS. Parenchymal brain injury in the preterm infant: comparison of cranial ultrasound, MRI and neurodevelopmental outcome. *Neuropediatrics* 2001; 32:80-89
139. Saas P, Walker PR, Hahne M, Quiquerez AL, Schnuriger V, Perrin G, French L, Van Meir EG, de Tribolet N, Tschopp J, Dietrich PY. Fas ligand expression by astrocytoma in vivo: maintaining immune privilege in the brain? *J Clin Invest* 1997; 99:1173-1178
140. Sabri F, De Milito A, Pirskanen R, Elovaara I, Hagberg L, Cinque P, Price R, Chiodi F. Elevated levels of soluble Fas and Fas ligand in cerebrospinal fluid of patients with AIDS dementia complex. *J Neuroimmunol* 2001; 114:197-206
141. Sibony O, Stempfle N, Luton D, Oury JF, Blot PH. In utero fetal cerebral intraparenchymal ischemia diagnosed by nuclear magnetic resonance. *Dev Med Child Neurol* 1998; 40:122-123
142. Silverstein F, Barks J, Hagan P, Liu X, Ivacko J, Szaflarski J. Cytokines and perinatal brain injury. *Neurochem Int* 1997; 30:375-383
143. Skranes JS, Nilsen G, Smevik O, Vik T, Brubakk AM. Cerebral MRI of very low birthweight children at 6 years of age compared with the findings at 1 year. *Pediatr Radiol* 1998; 28:471-475
144. Skullerud K, Skjaeraasen J. Clinicopathological study of germinal matrix hemorrhage, pontosubicular necrosis, and periventricular leukomalacia in stillborn. *Childs Nerv Syst* 1988; 4:88-91
145. Sonntag J, Grimmer I, Scholz T, Metze B, Wit J, Obladen M. Growth and neurodevelopmental outcome of very low birthweight infants with necrotizing enterocolitis. *Acta Paediatr* 2000; 89:528-532
146. Sosin DM, Sniezek JE, Waxweiler RJ. Trends in death associated with traumatic brain injury, 1979 through 1992. Success and failure. *JAMA* 1995; 273:1778-1780
147. Stadelmann C, Mews I, Anu Srinivasan, Deckwerth TL, Lassmann H, Brück W. Expression of cell death-associated proteins in neuronal apoptosis associated with pontosubicular necrosis. *Brain Pathol* 2001; 11:273-281
148. Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 1999; 397:441-446

149. Szafarski J, Burtrum D, Silverstein F. Cerebral hypoxia-ischemia stimulates cytokine gene expression in perinatal rats. *Stroke* 1995; 26:1093-1100
150. Tagliatalata G, Perez-Polo JR, Rassin DK. Induction of apoptosis in the CNS during development by the combination of hyperoxia and inhibition of glutathione synthesis. *Free Radic Biol Med* 1998; 25:936-942
151. Tanaka M, Suda T, Takahashi T, Nagata S. Expression of the functional soluble form of human fas ligand in activated lymphocytes. *EMBO J* 1995; 14:1129-1135.
152. Tanaka M, Itai T, Adachi M, Nagata S. Downregulation of Fas ligand by shedding. *Nat Med* 1998; 1:31-36
153. Tarkowski E, Rosengren L, Blomstrand C, Jensen C, Ekholm S, Tarkowski A. Intrathecal expression of proteins regulating apoptosis in acute stroke. *Stroke* 1999; 30: 321-327
154. Tauscher MK, Berg D, Brockmann M, Seidenspinner S, Speer CP, Groneck P. Association of histologic chorioamnionitis, increased levels of cord blood cytokines, and intracerebral hemorrhage in preterm neonates. *Biol Neonate* 2003; 83:166-170
155. Taylor DL, Edwards AD, Mehmet H. Oxidative metabolism, apoptosis and perinatal brain injury. *Brain Pathol* 1999; 9:93-117
156. Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science* 1998; 281:1312-1316
157. Thurman DJ, Alverson C, Dunn KA, Guerrero J, Sniezek JE. Traumatic brain injury in the United States: A public health perspective. *J. Head Trauma Rehabil* 1999; 14:602-615
158. Tin W, Wariyar U, Hey E. Changing prognosis for babies of less than 28 weeks gestation in the north of England between 1983 and 1994. Northern Neonatal Network. *BMJ* 1997; 314:107-111
159. Tommiska V, Heinonen K, Kero P, Pokela ML, Tammela O, Jarvenpaa AL, Salokorpi T, Virtanen M, Fellman V. A national two year follow up study of extremely low birthweight infants born in 1996-1997. *Arch Dis Child Neonatal Ed* 2003; 88:F29-F35
160. Towfighi J, Mauger D, Vannucci RC, Vannucci SJ. Influence of age on the cerebral lesions in an immature rat model of cerebral hypoxia-ischemia: a light microscopic study. *Brain Res Dev Brain Res* 1997; 100 :149-160
161. Trauth BC, Klas C, Peters AM, Matzku S, Moller P, Falk W, Debatin KM, Krammer PH. Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science* 1989; 245:301-305
162. Troy CM, Friedman JE, Friedman WJ. Mechanisms of p75-mediated death of hippocampal neurons. Role of caspases. *J Biol Chem* 2002; 277:34295-34302
163. Vexler ZS , Ferriero DM. Molecular and biochemical mechanisms of perinatal brain injury. *Semin Neonatol* 2001; 6:99-108
164. Volpe JJ *Neurology of the newborn* (4. Ausgabe), WB Saunders, Philadelphia 2001, S. 314 ff.

165. van Landeghem FK, Felderhoff-Mueser U, Moysich A, Stadelmann C, Obladen M, Bruck W, Bühner C. Fas (CD95/Apo-1)/Fas ligand expression in neonates with pontosubicular neuron necrosis. *Pediatr Res* 2002; 51:129-135
166. Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 1980; 68:251-306
167. Xing J, Ginty DD, Greenberg ME. Coupling of the RAS-MAPK pathway to gene activation by RSK2, a growth factor-regulated CREB kinase. *Science* 1996; 273:959-963
168. Yakovlev AG, Knobloch SM, Fan L, Fox GB, Goodnight R, Faden AL. Activation of CPP32-like caspases contributes to neuronal apoptosis and neurological dysfunction after traumatic brain injury. *J. Neurosci* 1997; 17:7415-7424
169. Yeh W-C, de la Pompa JL, McCurrach ME, Shu H-B, Elia AJ, Shahinian A, Ng M, Wakeham A, Khoo W, Mitchell K, El-Deiry WS, Lowe SW, Goeddel DV, Mak TW. FADD: Essential for embryo development and signaling from some, but not all, inducers of apoptosis. *Science* 1998; 279:1954-1958
170. Yoon BH, Kim CJ, Romero R, Jun JK, Park KH, Choi ST, Chi JG. Experimentally induced intrauterine infection causes fetal brain white matter lesions in rabbits. *Am J Obstet Gynecol* 1997; 177:797-802#
171. Yuan J, Yankner BA. Apoptosis in the nervous system. *Nature* 2000; 407:802-809
172. Zandbergen EG, de Haan RJ, Hijdra A. Systematic review of prediction of poor outcome in anoxic-ischaemic coma with biochemical markers of brain damage. *Intensive Care Med* 2001; 27:1661-1667
173. Zhang J, Cado D, Chen A, Kabra NH, Winoto-A. Fas-mediated apoptosis and activation-induced T-cell proliferation are defective in mice lacking FADD/Mort1. *Nature* 1998; 392: 296-300
174. Zipp F, Weller M, Calabresi PA, Frank JA, Bash CN, Dichgans J, McFarland HF, Martin R. Increased serum levels of soluble CD95 (APO-1/Fas) in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Ann Neurol* 1998; 43:116-120

## **DANKSAGUNG**

Großer Dank gilt Herrn Professor Dr. Michael Obladen, dem Direktor der Klinik für Neonatologie am Campus Virchow Klinikum, der mir ermöglichte, diese Arbeit zu schreiben und meinen klinischen und wissenschaftlichen Werdegang organisatorisch motiviert und unterstützt hat. Er ermutigte mich in den letzten Jahren, kontinuierlich wissenschaftliche Fragestellungen, auch in einem klinischen Umfeld, aufzugreifen, diese zu strukturieren und konsequent zu bearbeiten.

Besonders dankbar bin ich meinem langjährigen wissenschaftlichen Kooperationspartner und lieben Freund PD Dr. Christoph Bühner. Seine Inspiration und sein Ideenreichtum gepaart mit seiner großen Fähigkeit zu motivieren sind die Grundlage meines wissenschaftlichen Arbeitens und einer sehr fruchtbaren Zusammenarbeit.

In besonderer Weise danke ich allen guten Seelen unseres Labores, die mir mit Rat und Tat zur Seite standen: Boris Metze war eine große Hilfe, wenn es darum ging, mich schnell am Computer bei Graphiken, Dias und allen Problemen zu unterstützen. Evelyn Strauss danke ich für das Erlernen neuer Methoden, die sorgfältige Verwaltung unseres Labores, die Unterstützung unserer Doktoranden und ganz besonders für ihr akurates und zuverlässiges Arbeiten. Herrn PD Dr. Dietger Stibenz bin ich besonders dankbar für die geduldige Einweisung in die Techniken der Durchflußzytometrie und des Western Blotting sowie die Beantwortung all meiner biochemischen Fragen.

Diese Arbeit hätte nicht entstehen können ohne die fruchtbare Kooperation mit der Klinik für Neuropädiatrie. Frau PD Chrissanthy Ikonomidou danke ich von Herzen für die freundliche Aufnahme in ihre Gruppe und die Unterstützung meiner tierexperimentellen Tätigkeiten. Besonderer Dank gilt Frau Dr. Petra Bittigau für die praktische Hilfe bei der Einarbeitung und für die jahrelange gute organisatorische Zusammenarbeit, aus der sich eine Freundschaft entwickelt hat. Marco Sifringer bin ich überaus dankbar für seine geduldige Einweisung in die Geheimnisse der Proteinanalyse und natürlich für seine

Begeisterung und unermüdliche Mitarbeit an neonatologischen Fragestellungen. Jessica Faßbender danke ich für ihre Hilfe bei Tierexperimenten und Histologie.

Mein Dank gilt außerdem meinen Kooperationspartnern aus England, Professor David Edwards und Huseyin Mehmet, Weston Laboratory for Neonatal Neurosciences, Hammersmith Hospital, Imperial College, London, in deren Labor ich die Gelegenheit hatte, für ein Jahr arbeiten zu können, um wichtige Techniken der Apoptosedetektion zu erlernen und damit eine wesentliche Grundlage zu dieser Habilitationsschrift zu legen.

Außerdem danke ich Herrn Professor Dr. Jörg Weber, Neurologische Klinik der Charité, Campus Mitte, Herrn Professor Dr. Wolfgang Brück, Direktor des Instituts für Neuropathologie der Universität Göttingen, Herrn Professor Dr. Johann Groß, Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Campus Virchow Klinikum der Charité, Herrn Dr. Axel Heep und Herrn Professor Bartmann, Universitätskinderklinik Bonn, für die gute Zusammenarbeit über die letzten Jahre.

Für die vorliegende Arbeit gilt, daß für ihre Entstehung der Austausch von Gedanken, Proben und Meßgeräten und die Unterstützung vieler fleißiger Doktoranden und Mitarbeiter beider Standorte der Charité essentiell waren. Mein besonderer Dank gilt in diesem Zusammenhang: Axel Moysich, Anja Reiß, Mark Dzierko, Dr. Thomas Höhn, Dr. Alexander Gratopp, Nico Charlier, Lille Mahler, Stefanie Pesdidzek, Turid Piening, Katja Maschweski, Dr. Christine Stadelmann und Dr. Frank van Landeghem.

Mein tiefster Dank jedoch gebührt meiner Familie. Insbesondere meinem Mann Christoph danke ich von ganzem Herzen. Ohne seine Liebe und Toleranz, sein Verständnis, seine Geduld und Leidenschaft, seinen Ehrgeiz für seine Frau und sein Organisationstalent gäbe es diese Arbeit nicht. Auch unsere Tochter Katharina soll nicht unerwähnt bleiben, sie mußte ihre Mutter schon in frühen Tagen ins Labor begleiten. Meiner lieben Mutter danke ich ganz herzlich für ihre liebevolle Unterstützung meines beruflichen wie auch privaten Werdegangs.

## EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

gemäß Habilitationsordnung der Charité

Hiermit erkläre ich, daß

- keine staatsanwaltschaftlichen Ermittlungsverfahren anhängig sind,
- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde,
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfaßt, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen wurden, sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlerinnen oder Wissenschaftlern und technischen Hilfskräften und die Literatur vollständig angegeben sind,
- dem Bewerber die im SS 2003 geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

---

Datum

---

Unterschrift