

**Die Rolle des mTOR-Signalweges
in einem in vivo-Modell der neonatalen
hypoxisch-ischämischen Hirnschädigung**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. med.)
der Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Hanna Kaibel

aus Bonn

2025

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Hemmen Sabir

2. Gutachter: Prof. Dr. Albert Becker

Tag der Mündlichen Prüfung: 09.04.2025

Aus der Klinik für Neonatologie und Pädiatrische Intensivmedizin

Für meine Eltern und Großeltern

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	7
1. Einleitung	12
1.1 Hypoxisch-ischämische Enzephalopathie	12
1.1.1 Pathophysiologische Prozesse im Gehirn bei Hypoxie-Ischämie	14
1.1.2 Neuroinflammation	17
1.1.3 Therapeutische Hypothermie	24
1.2 Der mTOR-Signalweg	26
1.2.1 Einflüsse auf den Signalweg stromaufwärts von mTORC1	27
1.2.2 Funktion im Gehirn	29
1.2.3 Autophagie	32
1.2.4 Bedeutung bei HIE	34
1.2.5 Bedeutung im Immunsystem und bei Inflammation	36
1.3 Hypothese und Zielsetzung	38
1.3.1 Methodischer Ansatz	40
2. Material und Methoden	42
2.1 Material	42
2.1.1 Verbrauchsmaterial und Geräte	42
2.1.2 Chemikalien	43
2.1.3 Selbst hergestellte Puffer und Lösungen	44
2.1.4 Antikörper	45
2.1.5 Fertigsysteme („Kits“)	46
2.1.6 Software	46
2.2 Methoden	46
2.2.1 Tiermodell: modifiziertes Rice-Vannucci-Modell	46
2.2.2 Gewebeschnitte und immunhistochemische Färbung	48
2.2.3 Western Blot	48
2.2.4 RT-PCR	52
2.2.5 Statistik	53
2.3 Weiterführung des Projekts	54
3. Ergebnisse	55

3.1 Einfluss des hypoxisch-ischämischen Insults und therapeutischer Hypothermie auf den mTOR-Signalweg	55
3.1.1 Regulation von Akt, mTOR, S6 und 4E-BP1	55
3.1.2 Einfluss der Hypothermie-Behandlung auf den mTOR-Signalweg	56
3.2 Einfluss von Hypoxie-Ischämie und normo- bzw. hypothermischer Behandlung auf die Autophagieleistung	57
3.3 Entzündungsreaktion nach HI und deren Beeinflussung durch th-HT	65
3.4 Zusammenfassung	74
4. Diskussion	75
4.1 Das Rice-Vannucci-Modell als Modell für neonatale hypoxisch-ischämische Hirnschädigung	75
4.2 Der mTOR-Signalweg bei Hypoxie-Ischämie und therapeutischer Hypothermie	77
4.3 Autophagie bei Hypoxie-Ischämie und Hypothermie	84
4.4 Neuroinflammation bei hypoxisch-ischämischer Hirnschädigung und therapeutische Wirkung der Hypothermie	90
4.5 Einfluss von mTOR auf die Entzündungsreaktion im Gehirn	96
4.6 Limitationen	97
4.7 Ausblick	100
5. Zusammenfassung	106
6. Anhang	108
6.1 Protokolle	108
6.2 Klassifikation einer HIE nach perinataler Asphyxie	110
7. Abbildungsverzeichnis	111
8. Tabellenverzeichnis	112
9. Literaturverzeichnis	113
10. Erklärung zum Eigenanteil	125
11. Veröffentlichungen	126
12. Danksagung	127

Abkürzungsverzeichnis

4E-BP1	eukaryotischen Initiationsfaktor 4E-bindendes Protein 1
5'-TOP	5'-terminaler Oligopyrimidintrakt
5'-UTR	5'-untranslatierte Region
ACC	Arteria carotis communis
ACM	Arteria cerebri media
AMP	Adenosin-Monophosphat
AMPA	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionsäure
AMPK	AMP-abhängige Kinase
ANOVA	Varianzanalyse (<i>ANalysis Of VAriance</i>)
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Arg1	Arginase 1
Atg	Autophagy-related protein
ATP	Adenosin-Triphosphat
Bax	Bcl-2-associated X protein
BCA	Bicinchoninsäure
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
Bcl-xl	B-cell lymphoma – extra large
BDNF	Brain-Derived Neurotrophic Factor
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BSA	Bovine Serum Albumin
CBP80	Cap-Binding Protein 80
CCT β	Chaperonin containing TCP-1 (t-complex protein 1) β
CD206	Cluster of differentiation 206
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure (<i>complementary DNA</i>)
cGMP	Cyclo-Guanosinmonophosphat
COX-2	Cyclooxygenase 2
CREB	cAMP response element-binding protein
CREM	cAMP responsive element modulator
Ctx	Kortex

DAMP	Damage-Associated Molecular Pattern
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
Deptor	DEP-domain-containing mTOR interacting protein
DNA	Desoxyribonukleinsäure
eEF2K	Eukaryotic Elongation Factor 2 Kinase
eIF	eukaryotischer Initiationsfaktor
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ER α	Östrogenrezeptor α
FasL	Fas-Ligand
FoxO1/3a	Forkhead box O1/3a
GABA	γ -Aminobuttersäure
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein
GSK3	Glykogen Synthase Kinase 3
HI	Hypoxie-Ischämie
HIE	Hypoxisch-Ischämische Enzephalopathie
HIF-1 α	Hypoxie-induzierbarer Faktor 1 α
Hip	Hippocampus
HSF1	Heat Shock Factor 1
HT	Hypothermie
Iba-1	Ionisiertes calcium-bindendes Adaptermolekül 1
ICP	Infantile Zerebralparese
IGF-1	Insulin-like Growth Factor 1
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare NO-Synthase
IRES	Internal Ribosome Entry Site
LC3	Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3
mAb	monoklonaler Antikörper (<i>monoclonal Antibody</i>)
MAF	Muskuloaponeurotisches Fibrosarkom-Onkogen-Homolog
MAPK	MAP (mitogen activated protein)-Kinase
mLST8	mammalian lethal with Sec13 protein 8

MMP	Matrix-Metalloprotease
mRNA	messenger-RNA
mSin1	mammalian stress-activated protein kinase [SAPK]-interacting protein
mTOR	mammalian/mechanistic Target of Rapamycin
mTORC1/2	mTOR-Komplex 1/2
MOPS	3-N-Morpholinopropansulfonsäure
MRI	Magnetic Resonance Imaging
MRS	Magnetresonanzspektroskopie
MRT	Magnetresonanztomographie
MW	Molekulargewicht
NBR1	Neighbor of BRCA1 gene 1 protein
NET	Neutrophil Extracellular Trap
NeuN	Neuronal Nuclei
NFAT5	Nuclear factor of activated T-cells 5
NFκB	Nuclear Factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NGF	Neuronaler Wachstumsfaktor
NGS	Normal Goat Serum
NLRP3	NLR family pyrin domain containing 3
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NNT	Number Needed to Treat
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
Nrf2	Nuclear factor erythroid 2-related factor 2
NT	Normothermie
OGD	Oxygen-Glukose Deprivation
OPC	Oligodendrozytäre Progenitorzelle
P62	Sequestosom 1
P7	postnataler Tag 7
P70S6K	P70-S6-Kinase
PBS	Phosphate-buffered Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDCD4	Programmed Cell Death 4

PDK	PI3K-abhängige Kinase
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PI3K	Phosphoinositol-3-Kinase
PL	Phospholipase
PP2A	Protein Phosphatase 2A
PRAS40	Proline-rich Akt substrate of 40kDa
PTEN	Phosphatase- und Tensinhomolog
PVDF	Polyvinylidendifluorid
PVL	Periventrikuläre Leukomalazie
qPCR	quantitative Polymerase-Kettenreaktion
Rag	Rekombination-aktivierendes-Gen
RANKL	Receptor Activator of NF-κB Ligand
Raptor	Regulatory protein associated with mTOR
REDD1	Regulated in DNA damage and development 1
Rheb	Ras-homolog-enriched-in-brain
Rictor	rapamycin insensitive companion of mTOR
RIP	receptor-interacting protein
RIPA	Radio-Immunoprecipitation Assay
RNA	Ribonukleinsäure
RNS	Reaktive Stickstoffspezies
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rpS6	ribosomales Protein S6
RR	Riva-Rocci
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
S6K1/2	S6-Kinase 1/2
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Ser	Serin
SKAR	S6K1 Aly/REF-like target
SREBP	Sterol Responsive Element Binding Protein
STAT3	Signal Transducer and Activator of Transcription
TBS	Tris-buffered saline

TBS	Tris-buffered saline-Tween
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGF	Tumor Growth Factor
th-HT	Therapeutische Hypothermie
Thr	Threonin
TIGAR	TP53-induced glycolysis and apoptosis regulator
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF α	Tumor-Nekrosefaktor α
TSC	Tuberöser Sklerosekomplex
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick-End Labeling
ULK1/2	Unc-51-like kinase 1/2
uORF	untranslated Open Reading Frame
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
YY1	Ying Yang 1
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Einleitung

1.1 Hypoxisch-ischämische Enzephalopathie

Als perinatale Asphyxie wird eine Sauerstoff-Minderversorgung lebenswichtiger Organe durch einen gestörten plazentaren oder fetal-pulmonalen Gasaustausch (mit Hypoxie, Hyperkapnie und Azidose) kurz vor, während oder kurz nach der Geburt bezeichnet. (Gesellschaft für Neonatologie und Pädiatrische Intensivmedizin, 2013)

Die perinatale Asphyxie kann zu einer hypoxisch-ischämischen Enzephalopathie (HIE) führen, die als Hirnschädigung aufgrund von Minderversorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen aus dem Blut definiert ist.

Mit einer Inzidenz von 1-4 pro 1000 Lebendgeburten in Industrienationen stellt die perinatale Asphyxie eine Hauptursache für Langzeitmorbidity und –mortality bei Neugeborenen dar. (Osredkar et al., 2014; Serdar et al., 2020) In Entwicklungsländern, in denen die Inzidenz noch einmal fünf- bis zehnmals so hoch ist und mangelnde Infrastruktur Behandlung und Langzeitbetreuung erschwert, ist sie eine noch wesentlich größere Herausforderung. (McGuire, 2007)

Die Hauptursachen, die zur perinatalen Asphyxie führen, sind intrauterin unter anderem Plazentaruptur, eine vorzeitige Plazentalösung, Infektionen, Präeklampsie, Schwangerschaftsdiabetes oder bestimmte Medikation in der Schwangerschaft (Anästhetika oder Narkotika inkl. Opioide). Weitere auslösende Faktoren sind angeborene Lungen- oder Herzfehlbildungen (u.a. Lungenunreife bei Frühgeborenen), ein Vorfall der Nabelschnur während der Geburt, schwere Mekoniumaspiration oder traumatische Ereignisse. Postnatal führen vor allem kongenitale Sepsis, eine Verlegung der Luftwege oder die prä-natale Gabe von Opioiden an die Mutter (diese rufen eine Atemdepression beim Kind hervor) zur Asphyxie. (AMBOSS, 2017; McGuire, 2007)

Die Pathophysiologie bei HIE kann akut in zwei Phasen aufgegliedert werden:

Initial kommt es durch Sauerstoff- und Nährstoffmangel zu einer Unterversorgung der Zellen im Hirn mit Energie, was zu einem frühen Zelltod führt. Nach einer Latenzphase (unter der Bedingung, dass die Sauerstoff- und Nährstoffversorgung wiederhergestellt wird) führen jedoch freie Radikale, Kalziumeintritt in die Zellen, Entzündung und Apoptose nach

einigen Stunden zur weiteren Zellschädigung (sekundäres Energieversagen, s.u.). (McGuire, 2007; Sabir et al., 2012)

Nach Empfehlung der bis 2018 in Deutschland gültigen S2k-Leitlinie von 2013 kann die Diagnose einer perinatal erworbenen HIE gestellt werden, wenn die folgenden vier Kriterien erfüllt sind: (1) fetale Azidose ($\text{pH} < 7,0$ im Nabelschnurarterienblut), (2) frühe klinische Zeichen einer schweren oder moderaten Enzephalopathie (d.h. Störungen der kortikalen oder Hirnstammfunktion, des Muskeltonus und der Reflexe), (3) Zeichen einer globalen Hirnschädigung (d.h. eine tetraplegische oder dyskinetische infantile Zerebralparese im Verlauf der kindlichen Entwicklung) und (4) Ausschluss anderer Ursachen einer lokalen oder globalen Hirnschädigung. (Gesellschaft für Neonatologie und Pädiatrische Intensivmedizin, 2013) Ein weiteres wichtiges klinisches Diagnosekriterium ist ein niedriger Apgar-Score (< 5 10 min nach Geburt). (Chalak et al., 2019; McGuire, 2007)

Die akuten Symptome der HIE hängen von der Schwere der Schädigung ab und reichen von Bewusstseinsveränderungen, veränderter Atmung und Übererregbarkeit (mild) über Lethargie und muskuläre Hypotonie (moderat) bis zu Stupor und Ausfall der Primitivreflexe sowie gelegentlich Krämpfen (schwer). (AMBOSS, 2017; Ma et al., 2012) Im Verlauf kommt es durch die bleibende Hirnschädigung zu motorischen, kognitiven und Entwicklungsdefiziten und zerebralen Krampfanfällen. Die maximale Ausprägung der HIE stellt die spastische infantile Zerebralparese (ICP) dar.

Die momentane Standardbehandlung ist, zusätzlich zu einer initialen Stabilisierung (ggf. mittels Wiederbelebung) und Sauerstoffgabe direkt nach der Geburt zur Wiederherstellung der Blut- und Sauerstoffversorgung, die therapeutische Hypothermie (th-HT). Dies bedeutet eine moderate Kühlung des Körpers auf $33\text{-}34^\circ\text{C}$ für 72 h, welche innerhalb von 6h nach Geburt beginnen sollte. (Deutsches Hypothermieregister, 2023; Gesellschaft für Neonatologie und Pädiatrische Intensivmedizin, 2013; Sabir et al., 2016; Sabir et al., 2012; Serdar et al., 2020) Die Indikation hierfür besteht bei Vorliegen mindestens eines Asphyxie-Kriteriums (Nabelschnurarterien-, arterieller oder venöser pH (in der ersten Lebensstunde) $< 7,0$, Nabelschnurarterien-Base Excess < -15 mmol/l, 10 min-Apgar ≤ 5 oder Reanimation ≥ 10 Minuten postnatal) und zusätzlich mindestens eines Enzephalopathie-Kriteriums. Als Enzephalopathie-Kriterien gelten Symptome einer mittelschweren oder schweren HIE in mindestens drei der sechs klinischen Kategorien nach Sarnat & Sarnat

(Bewusstsein, Aktivität, Muskeleigenreflexe, Tonus, Primitiv- und autonome Reflexe, siehe 6.2 Klassifikation einer HIE nach perinataler Asphyxie) oder definierte aEEG-Veränderungen. (Deutsches Hypothermieregister, 2023)

Der individuelle Verlauf korreliert mit der Schwere der Asphyxie und dem damit verbundenen Hirnschaden. Mögliche Folgen der HIE sind: Nekrosen der kortikalen Substanz (die v.a. zu spastischen Paresen führen) sowie periventrikuläre Leukomalazie (PVL) und daraus resultierende spastische ICP, die sowohl motorische als auch kognitive Defizite umfasst. Des Weiteren können mentale Entwicklungsverzögerungen und zerebrale Krampfanfälle vorkommen. (AMBOSS, 2017)

Als wichtiger Risikofaktor ist die bereits bestehende Inflammation, z.B. durch Infektion unter der Geburt, zu nennen. Diese sensibilisiert das Hirn zusätzlich für den Schaden durch Hypoxie-Ischämie (HI) und erhöht die Wahrscheinlichkeit eines Therapieversagens der therapeutischen Hypothermie.

Mittels MRT/MRS 2-8 h nach HI kann eine erste Einschätzung des Hirnschadens und eine Prognoseabschätzung erfolgen. (Hassell et al., 2015; Rumajogee et al., 2016) Insgesamt entwickeln 10-20 % aller Neugeborenen mit Asphyxie eine ICP. (AMBOSS, 2017)

1.1.1 Pathophysiologische Prozesse im Gehirn bei Hypoxie-Ischämie

Das Hirn befindet sich perinatal in einem noch sehr dynamischen, aber auch vulnerablen Entwicklungszustand. (Rumajogee et al., 2016) Eine Gewebeschädigung in diesem Stadium kann also schwerwiegende Folgen auf die Hirnentwicklung des Neugeborenen haben.

Bei HI reagiert der zerebrale Blutkreislauf insofern, als er präferenziell die verbleibende Blutversorgung auf die zentral lebenswichtigen Hirngebiete (Hirnstamm und Kleinhirn) lenkt, um die kardiovaskuläre und respiratorische Stabilität so lange wie möglich aufrecht zu erhalten. Im Gegensatz dazu führt HI in anderen Regionen zu einer deutlich reduzierten Durchblutung und somit zu neuronalem Schaden. Besonders betroffen sind hiervon Kortex, subkortikale weiße Masse, Striatum und Hippocampus. (Vannucci et al., 1988) MRT-Untersuchungen und die mikroskopische Betrachtung von Gewebezellen konnten zeigen, dass nach hypoxisch-ischämischem Insult der Kortex als erstes betroffen ist und

deutlich stärker geschädigt wird als der Hippocampus, was sich u.a. in einer massiven Ödembildung manifestierte. (Sabir et al., 2012)

Die grundlegende Ursache der Hirnschädigung bei HI ist der Mangel an Sauerstoff (Hypoxie) und an Glukose durch die Ischämie.

Bei Hypoxie sind die Zellen darauf angewiesen, ihre Level von ATP und Phosphokreatin mittels anaerober Glykolyse sowie durch die Aufnahme von Laktat (aus Astrozyten) und Ketonkörpern aufrechtzuerhalten. Der Glukose- und Ketonkörperfluss ist durch die Ischämie jedoch begrenzt. Es resultiert der Verbrauch der Energiereserven und daraus wiederum ein Gewebeschaden. (Vannucci et al., 1988) Ihre biochemischen Eigenschaften machen Neurone besonders anfällig für HI: Zur Energiegewinnung sind sie auf Glukose als Energiequelle angewiesen, deren effizienter Abbau über die Atmungskette Sauerstoff benötigt. Zudem hat das Hirn als Organ einen extrem hohen Energie- und Sauerstoffverbrauch, u.a. um die Membranintegrität und den aktiven Ionentransports an den Nervenzellen aufrecht zu erhalten (es benötigt je nach Quelle 25-50 % der gesamten Glukose im Körper und ca. 20 % des Sauerstoffs). (Ma et al., 2012; Perez-Alvarez et al., 2018; Yang et al., 2018)

Hypoxie-Ischämie resultiert in drei Phasen der Zellschädigung (vgl. a. Abb. 1)

Während der primären Phase (akute Hypoxie-Ischämie) kommt es durch den Mangel an Sauerstoff und Glukose zu einer Abnahme der zellulären ATP- und Phosphokreatinlevel und einer Zunahme der Laktatkonzentration sowie Azidose. Die $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase funktioniert nicht mehr ausreichend, wodurch es zur neuronalen Depolarisation und Glutamat-Ausschüttung kommt. Diese Depolarisation wird verstärkt durch die entstehende Azidose und Überaktivierung von AMPA-Rezeptoren und anderen Transportern und Kanälen. Es kommt zu einem Ca^{2+} -Einstrom, wodurch Mitochondrien aktiviert werden. Dadurch werden verstärkt freie Radikale und reaktive Sauer- und Stickstoffmetaboliten (ROS/RNS) produziert. Der resultierende oxidative Stress beeinträchtigt wiederum zentrale Zellfunktionen (wie Enzymfunktionen, Transkription, Lipidoxidation und DNA-Integrität) zusätzlich (Rumajogee et al., 2016) und schädigt Membranen, was wiederum die Depolarisation und das intrazelluläre Kalziumlevel noch weiter erhöht.

Die Kalziumerhöhung setzt weitere neurotoxische Prozesse in Gang: Durch den erhöhten

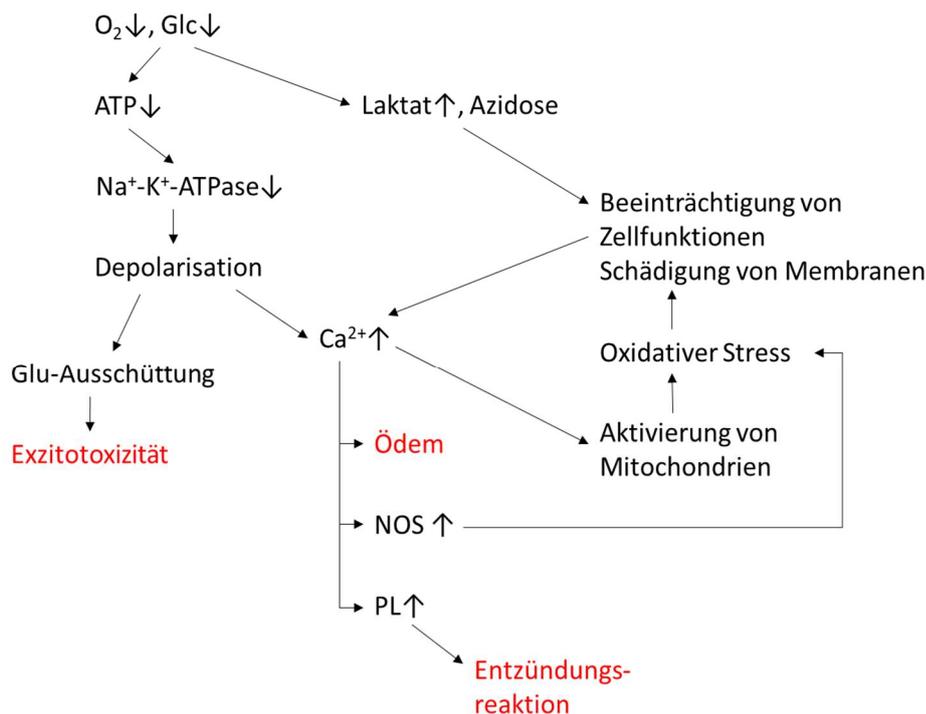


Abb. 1: Molekulare Kaskade in der Pathophysiologie der HIE. Sauerstoff- und Glukosemangel führt über Energiemangel (ATP-Reduktion) zur Funktionseinschränkung der $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$, was in Depolarisation der Neuronen mit Glutamat-Ausschüttung und Exzitotoxizität sowie einem Anstieg des intrazellulären Kalziumlevels resultiert. Dieser wird durch die Beeinträchtigung von Zellfunktionen und Membranschädigung weiter verstärkt. Es resultiert ein Ödem und Aktivierung der NO-Synthase und der Phospholipase, was wiederum oxidativen Stress bzw. Verstärkung der Entzündungsreaktion zur Folge hat.

ATP: Adenosin-Triphosphat, Glc: Glucose, Glu: Glutamat, NOS: NO-Synthase, PL: Phospholipase

osmotischen Gradienten entsteht ein zelluläres Ödem mit ggf. Lyse des Neurons. Die Aktivierung der induzierbaren und neuronalen Stickoxidsynthase (NOS) verstärkt den oxidativen Stress. Eine weitere wichtige Folge ist die Aktivierung zytosolischer Phospholipase, die zu einer Freisetzung von Eikosanoiden und damit zur Induktion der Entzündungsreaktion führt. (Hassell et al., 2015) (s.u.) Dieser akut stattfindende Teufelskreis zellulärer Veränderungen und Schäden führt letztlich zu Zelltod und Nekrose.

Bei Reperfusion und Reoxygenierung setzt nach ca. 1 h die Latenzphase ein, die je nach Ausmaß der Schädigung 6 bis 24 h dauert. Der Hirnstoffwechsel kann sich wieder normalisieren. (Ma et al., 2012) Der oxidative Stoffwechsel wird heruntergefahren und die Gewebeoxygenierung steigt. In dieser Phase liegt das sogenannte „therapeutische Fenster“, in der durch Intervention eine Verbesserung des Outcomes erfolgen kann. (Descloux

et al., 2015; Ma et al., 2012) Eine kürzere Dauer der Latenz korreliert mit einem schwereren Hirnschaden in der Sekundärphase.

Im darauf folgenden sekundären Energieversagen akkumulieren exzitatorische Neurotransmitter. In der Reperusionsphase werden toxische Substanzen, wie u.a. freie Radikale, produziert. Oxidative Membranschäden und anaerober Stoffwechsel nehmen wieder zu. (Ma et al., 2012) Zudem besteht eine Aktivierung multipler intrazellulärer Kaskaden und Transkriptionsfaktoren, die letztlich in programmiertem Zelltod (Apoptose) resultieren. (Descloux et al., 2015) Die in der primären HI begonnene Entzündungsreaktion entwickelt sich zu einer Hyperinflammation im Hirngewebe mit Anhäufung von Zytokinen. Dadurch kommt es zu einem sekundären Energiemangel. Die dabei trotz adäquater Durchblutung entstehende ATP-Verminderung und Laktaterhöhung halten im Vergleich zum primären Energieversagen wesentlich länger an. Auch ein sekundäres zytotoxisches Ödem ist zu beobachten. (Hassell et al., 2015) Kennzeichnend sind vor allem ein erneutes mitochondriales Versagen und Initiierung der Apoptosekaskade, (Ma et al., 2012) die zu einem verzögerten Zelltod führen. Die neuronale Entwicklung wird durch diese Mechanismen stark beeinträchtigt; die Mortalität steigt. Klinisch imponiert diese Phase mit beginnenden Krämpfen. (Hassell et al., 2015)

Auch über Jahre kann noch eine Laktatazidose bestehen. Kennzeichnend für den persistierenden Schaden sind außerdem Gliose/Gliarben, anhaltende Inflammation und epigenetische Veränderungen (tertiäre Phase), welche Neurogenese, axonales Wachstum und Synaptogenese beeinträchtigen. (Dixon et al., 2015; Hassell et al., 2015; Wu et al., 2024)

Die genannten destruktiven Zellläsionen führen zu einer beeinträchtigten Hirnentwicklung mit bleibenden Schäden, die in motorischen und kognitiven Beeinträchtigungen resultieren. (Rumajogee et al., 2016)

1.1.2 Neuroinflammation

In der Pathophysiologie der HIE hat die Entzündungsreaktion im Hirn einen zentralen Stellenwert. Sie wird durch den oben beschriebenen Zellschaden, reaktive Sauerstoff-

und Stickstoffspezies, Exzitotoxizität (vor allem durch übermäßige Glutamat-Ausschüttung), Beeinträchtigung der mitochondrialen Funktion und eine veränderte Integrität der Gefäße verursacht und verstärkt. (Hagberg et al., 2015) Die Folge ist die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine (wie v.a. $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ und IL-6 (Girard et al., 2009)) und Chemokine und die Aktivierung von Abwehrzellen.

Auf zellulärer Ebene sind sowohl periphere Immunzellen als auch die Hirnzellen selbst, also geschädigte Neurone und Gliazellen, beteiligt.

Durch den Zelltod oder Verletzung der zellulären Integrität unreifer Neurone und oligodendrozytärer Vorläuferzellen (OPC) werden DAMPs (Damage-Associated Molecular Pattern), ATP, Exzitotoxine und andere Alarmsignale freigesetzt. Diese haben Effekte sowohl auf das zerebrale Gefäßbett (erhöhte Endotheldurchlässigkeit, die die Entstehung von Ödemen begünstigt, und Öffnung der Blut-Hirn-Schranke) als auch auf die eingewanderten und aktivierten Immunzellen, die zur weiteren Produktion proinflammatorischer Zytokine und Verstärkung der Entzündungsreaktion angeregt werden. (Hagberg et al., 2015) (vgl. Abb. 2)

Am schnellsten werden nach perinataler HI Mikroglia, Mastzellen (Hagberg et al., 2015) und Astrozyten aktiviert. (Fleiss et al., 2021) Mikroglia produzieren Zytokine, u.a. $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 , IL-10 und iNOS , die proinflammatorisch und zytotoxisch auf Neurone und insbesondere oligodendrozytäre Progenitorzellen wirken (Fleiss et al., 2021; Leavy und Jimenez Mateos, 2020; Ma et al., 2012). Damit sind sie zentrale Regulatoren in der Pathologie der HIE. (Fleiss et al., 2021; Leavy und Jimenez Mateos, 2020) Auf der anderen Seite ist ihre Aktivierung jedoch für die Beseitigung des Zellschadens durch Phagozytose und auch im Rahmen der Immunantwort wichtig für die physiologische Reaktion auf den Schaden durch HI. (Fleiss et al., 2021)

Die Blut-Hirn-Schranke (BHS) wird durch die Schädigung nach ca. 6-24 h zerstört, sodass auch periphere Immunzellen einwandern können. (Hagberg et al., 2015) Früh während der beginnenden Reperfusion invadieren neutrophile Granulozyten (Neutrophile). In der verzögerten Erholungsphase spielen vor allem Leukozyten (T- und natürliche Killerzellen) eine Rolle. (Hagberg et al., 2015)

Diese Zellen produzieren proinflammatorische Zytokine, ROS und exzitatorische Amino-

säuren und exprimieren Todesrezeptorliganden (TNF, FasL (Fas-Ligand), RANKL (Receptor Activator of NF- κ B Ligand) u.a.). So tragen sie noch zusätzlich zum erhöhten Zelltod in den geschädigten Arealen bei (vgl. Abb. 2).

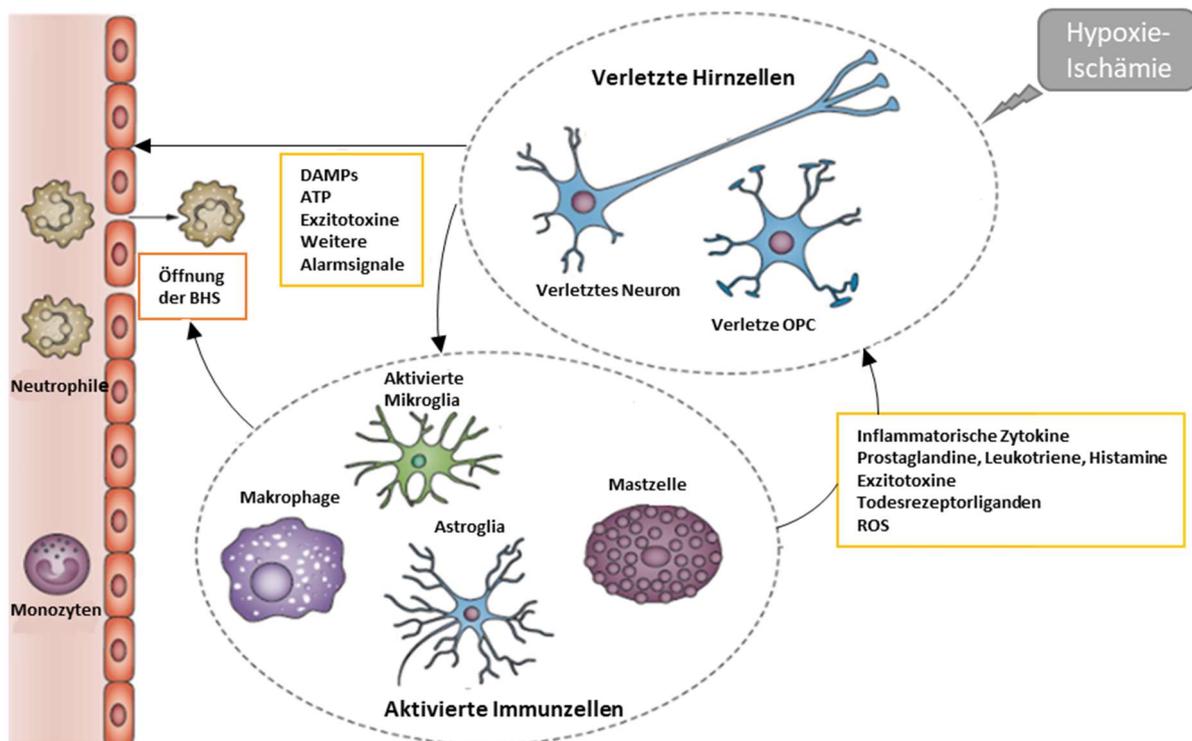


Abb. 2: Hyperinflammation bei hypoxisch-ischämischer Hirnschädigung

Aus den durch die Hypoxie-Ischämie geschädigten Neuronen und oligodendrozytären Progenitorzellen werden DAMPs und weitere Alarmsignale frei, die im Hirn residierende Immunzellen aktivieren und durch Öffnung der BHS weitere Immunzellen anlocken. Freisetzung verschiedener Mediatoren durch diese führt zu weiterem Schaden und Tod von Neuronen und OPC, der inflammatorische und neurotoxische Teufelskreis verstärkt sich. ATP: Adenosin-Triphosphat, BHS: Blut-Hirn-Schranke, DAMPs: Damage-Associated Molecular Pattern, OPC: Oligodendrozytäre Progenitorzelle, ROS: Reaktive Sauerstoffspezies

modifiziert nach Hagberg et al. (2015)

Hagberg et al. (2015) und Fleiss et al. (2021) beschreiben einen dreiphasigen Verlauf der Neuroinflammation: Zunächst entsteht eine proinflammatorische Reaktion durch Erhöhung von u.a. IL-1 β , IL-6 und iNOS sowie auf zellulärer Ebene insbesondere von Neutrophilen, Makrophagen, Mikroglia und Mastzellen im Zeitraum vor allem zwischen ca. 4-6 und 24 h nach hypoxisch-ischämischem Insult. (Fleiss et al., 2021; Hagberg et al., 2015)

Darauf folgt eine antiinflammatorische Phase ca. 24-72 h nach HI, die u.a. durch Veränderungen im Expressionslevel des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 sowie neuroinflammatorischer Zellen wie Mikroglia und Astrozyten getragen wird. Auf eine dadurch ausgelöste reparative Phase (72 h bis ca. 12 d nach HI) folgt die Auflösung oder Chronifizierung der Entzündung, wobei u.a. TGF- β 1 eine Rolle spielt.

Nach HI schütten also Gliazellen, aktivierte Monozyten sowie Neurone selbst proinflammatorische Zytokine wie IL-1 β , IL-6 und TNF α aus. (Girard et al., 2009; Hagberg et al., 2015; Hassell et al., 2015)

Diese haben im ZNS hauptsächlich schädigende Wirkung, die zentral zum sekundären Energieversagen beiträgt. (vgl. Box 1)

Schädigende Effekte proinflammatorischer Zytokine bei HIE

- Apoptose von Oligodendrozyten
 - Myelinschäden
 - Erhöhte Durchlässigkeit der BHS
 - Ödem
 - Hämorrhagie
 - Freisetzung toxischer Moleküle
 - Chemotaxis
 - Transkription proinflammatorischer Zytokine
- } Inflammation

Box 1: Schädigende Effekte proinflammatorischer Zytokine bei HIE

BHS: Blut-Hirn-Schranke

IL-1 β gilt als einer der frühesten Mediatoren, die nach Schädigung von Nervengewebe ausgeschüttet werden. (Fleiss et al., 2021; Girard et al., 2009; Hagberg et al., 2015) Im ZNS wirkt es neurotoxisch: (Hagberg et al., 1996) Gemeinsam mit TNF α trägt es wesentlich zur Zerstörung der Blut-Hirn-Schranke, Hämorrhagie und Ödembildung bei. Zudem befördert es die Aktivierung von Glia- und Rekrutierung von weißen Blutzellen aus dem peripheren Kreislauf (chemotaktische Wirkung), (Girard et al., 2009; Hassell et al., 2015) die proinflammatorische M1-Polarisation von Mikroglia, Ausschüttung proinflammatorischer Mediatoren (u.a.a. IL-6 (Hagberg et al., 1996)), die NF κ B (nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells)-Aktivität sowie die Produktion freier Radikale und Matrix-Metalloprotease (MMP) in Mikrogliazellen. Durch diese Effekte kommt es in einem Teufelskreis mit einer weiteren Potenzierung der Entzündungsreaktion. Zusätzlich

wird die Nekroptose direkt über eine RIP-Kinase-Aktivierung und die Apoptose über Caspase 3-Aktivierung ausgelöst. Dies fördert wiederum neuronalen Zelltod, Myelinscheiden und Neurodegeneration. (Girard et al., 2009; Hagberg et al., 2015; Rumajogee et al., 2016; Savard et al., 2015) Außerdem sensibilisiert IL-1 β das Gewebe gegenüber weiterem Stress (Fleiss et al., 2021) und könnte so auch zur Schädigung der kontralateralen Hemisphäre beitragen. Zudem führt es zur Übererregbarkeit von Neuronen und bedingt so Krampfanfälle. (Leavy und Jimenez Mateos, 2020)

Auch die iNOS-Produktion wird durch IL-1 β verstärkt und trägt zusätzlich zur erhöhten Permeabilität der BHS und Ödembildung bei. (Savard et al., 2015)

Auf der anderen Seite sind TNF α und IL-1 β sogenannte biphasische Zytokine: Abhängig vom umgebenden Milieu können sie entweder pro- oder antiinflammatorische Reaktionen auf eine Verletzung bewirken, weshalb ihre Rolle immer zweischneidig zu sehen ist. Die durch sie induzierte Mikroglia-Aktivierung führt u.a. zu einer erhöhten Phagozytose nekrotischer/apoptotischer Zellen, die zur Beseitigung des Zellschadens wichtig ist. (Rumajogee et al., 2016) Zudem unterstützen sie beispielsweise Zellüberleben, Zellproliferation und –wachstum von Astrozyten und Neuronen und induzieren die Synthese von NGF (Neuronaler Wachstumsfaktor) und BDNF (Brain-derived neurotrophic factor) sowie antiinflammatorischer Zytokine. (Girard et al., 2009)

IL-6 erfüllt im Hirn ebenfalls eine zweideutige Rolle (Leavy und Jimenez Mateos, 2020) und kann je nach Kontext sowohl protektive als auch schädliche Wirkung haben: Auf der einen Seite ist es an der frühen proinflammatorischen Reaktion auf HI beteiligt und wie IL-1 bei hypoxisch-ischämischen Neugeborenen mit einem schlechteren Outcome assoziiert. (Chalak et al., 2019; Fleiss et al., 2021; Hagberg et al., 2015) Über COX-2-Induktion werden vermehrt Prostaglandine ausgeschüttet, die u.a. eine vermehrte Entzündungsreaktion und Ödembildung bedingen. (Rumajogee et al., 2016) Außerdem führt es zur Beendigung des Zellzyklus und damit zur verfrühten Ausreifung oligodendrozytärer Progenitorzellen, was den Pool der Progenitorzellen reduziert und so zur Demyelinisierung beiträgt. (Hagberg et al., 2015)

Auf der anderen Seite unterstützt es zu späteren Zeitpunkten nach der Schädigung die Differenzierung, Selbsterneuerung, Wachstum und Tripotenzialität neuronaler Vorläuferzellen in vitro, die Astrozytenproliferation und die Angiogenese. (Hagberg et al., 2015; Rumajogee et al., 2016) Außerdem reguliert IL-6 die Expression von TNF α (Hagberg et

al., 1996) und IL-1 β , was für die Beendigung der Entzündungsreaktion von Bedeutung ist. (Hagberg et al., 1996)

IL-12 hat als Zytokin ebenfalls im Kontext der ausgeschütteten Entzündungsmediatoren eine proinflammatorische Wirkung und wurde bereits von anderen Arbeitsgruppen zur Einschätzung des inflammatorischen Status nach neonataler HI im Rattenmodell verwendet. (Li et al., 2015) Seine exakte Rolle ist dabei bis dato noch nicht klar. Von Mikrogliazellen wird es beispielsweise nach Infektion produziert, wodurch u.a. die T_{H1}- und T_{H2}-Immunantwort im ZNS moduliert wird. (Hsieh et al., 1993)

iNOS ist die in Gliazellen induzierbare Form der Ca²⁺-abhängigen NO-Synthase. Dieses Enzym produziert nach Induktion durch verschiedene proinflammatorische Stimuli das freie Radikal Stickstoffmonoxid (NO), welches sowohl neurotoxisch als auch neuroprotektiv wirken kann. (Es wird angenommen, dass das von iNOS in Gliazellen produzierte NO über Vasodilatation benachbarter Gefäße neuroprotektiv und über Eingriff in den neuronalen Energiehaushalt neurotoxisch wirkt. Entsprechend wirkt eNOS (endotheliale NOS) eher protektiv, nNOS (neuronale NOS) eher toxisch.) (Bolaños und Almeida, 1999) Als parakrines Hormon erhöht es die intrazellulären cGMP-Level (durch Aktivierung der Guanylatcyclase) und bedingt damit eine Relaxation glatter Muskelzellen und damit Vasodilatation. Auch iNOS beteiligt sich an der frühen proinflammatorischen Immunreaktion bis ca. 24 h nach HI. (Fleiss et al., 2021; Hagberg et al., 2015) Es wird nach Ischämie vor allem von Gliazellen exprimiert und trägt durch mitochondriale Dysfunktion, Energiedepression (Bolaños und Almeida, 1999), erhöhte Durchlässigkeit der BHS und verstärkte intrazerebrale Ödembildung (Savard et al., 2015) zum Hirnschaden bei. Auf molekularer Ebene wirkt es neurotoxisch u.a. durch DNA-Schaden, Peroxidation von Lipiden und Proteinen und Nitrosylierung von Proteinen in Neuronen. (Bolaños und Almeida, 1999) iNOS-Inhibition verringert den Hirnschaden nach Hypoxie-Ischämie im Rattenmodell. (Iadecola et al., 1995; Zhang et al., 1996)

Auf der anderen Seite können andere, antiinflammatorische Zytokine jedoch auch neuroprotektive Wirkung haben.

Bei Arg1 (Arginase 1) und CD206 handelt es sich um Marker für die M2-Polarisation von Mikroglia. (Zhou et al., 2020) Insbesondere CD206 ist mit diesem antiinflammatorischen

M2-Phänotyp assoziiert, während die Hauptfunktion von Arg1 darin zu liegen scheint, durch Detoxifikation des Gewebes von überschüssigem Stickstoff, der im Aminosäurestoffwechsel anfällt, zu verminderter NO-Produktion (durch Konkurrenz mit iNOS um Arginin), Promotion von Neurogenese und axonalen Reparaturmechanismen beizutragen. (Jacobsen et al., 2007)

TGF β ist in vielen physiologischen wie pathologischen Situationen involviert und beeinflusst u.a. Zellwachstum, Differenzierung, Inflammation und Gewebereparatur in Neuronen, Mikroglia und Astrozyten. (Henrich-Noack et al., 1996) Dabei können je nach Kontext sehr unterschiedliche Effekte überwiegen, sodass keine klare protektive oder toxische Wirkung zugeordnet werden kann. Hierbei ist das Ausmaß und das Timing der Erhöhung entscheidend dafür, ob sich die Entzündungsreaktion eher verstärkt oder auflösen kann. (Kanal und Levison, 2024)

Fleiss et al. (2021) beschreiben eine Bedeutung in der späten Phase ab ca. 12 Tagen nach hypoxisch-ischämischer Hirnschädigung, in der eine Auflösung oder Chronifizierung stattfinden kann. Insbesondere hier scheint TGF β deutlich schädigende Effekte zu haben und eins der Schlüsselmoleküle für verspätete Neurodegeneration zu sein: TGF β fördert die Astrozytenproliferation und damit die Ausbildung einer Gliazarbe. Während dies in der Frühphase noch zur Entfernung toxischer Moleküle und einer Begrenzung des Wachstums der Läsion hilfreich sein kann, beeinträchtigt es im Verlauf die funktionelle Regeneration, da die Narbe Angiogenese, Axonogenese, Synaptogenese und Myelinisierung hemmt. Zudem induziert es in Astrozyten die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 β und IL-6. (Kanal und Levison, 2024) Entsprechend konnte einem (adulten) Rattenmodell der transienten globalen Ischämie die Injektion von TGF β -1 1 h vor der Ischämie den Neuronenverlust im Hippocampus vermindern, vermutlich aufgrund seiner antioxidativen und antiapoptotischen Effekte. (Henrich-Noack et al., 1996) In der Zellkultur hippocampaler Pyramidenzellen zeigte sich eine protektive Wirkung gegen den ischämischen Insult bei Applikation davor; bei Applikation nach dem Insult potenzierte das Zytokin jedoch die oxidativen und neurotoxischen Effekte des verwendeten NO-Bildners. (Henrich-Noack et al., 1996) Die Apoptose der Zellen wurde in beiden Fällen gemindert. Hagberg et al. (2015) und Leavy et al. (2020) erwähnen für TGF β einen toxischen Effekt, u.a. durch verstärkte exzitotoxische Verletzung des Hirngewebes, (Leavy und Jimenez

Mateos, 2020) der durch das von Mastzellen in der Entzündungsreaktion ausgeschüttete Histamin noch verstärkt wird. (Hagberg et al., 2015)

1.1.3 Therapeutische Hypothermie

Die therapeutische Hypothermie greift an unterschiedlichen Stellen in die Pathophysiologie bei HIE ein und wirkt dadurch neuroprotektiv. Sie moduliert die oben beschriebene Kaskade molekularer Mechanismen, die zum Neuronenschaden führen, und verändert die Stoffwechselrate sowie die Genexpression in verschiedenen Bereichen. (s. Abb. 3)

Die Senkung der Stoffwechselrate bei geringerer Temperatur vermindert den Sauerstoff- und Energieverbrauch im Hirn. Gleichzeitig erhöht Hypothermie die O₂-Bindungsaffinität des Hämoglobins. Dadurch kommt es nach hypothermischer Behandlung zu höheren Glukose- und niedrigeren Laktatspiegeln sowie höheren Leveln energiereicher Phosphate, Phosphokreatin und ATP im Blut als nach Normothermie. (Hassell et al., 2015; Ma et al., 2012)

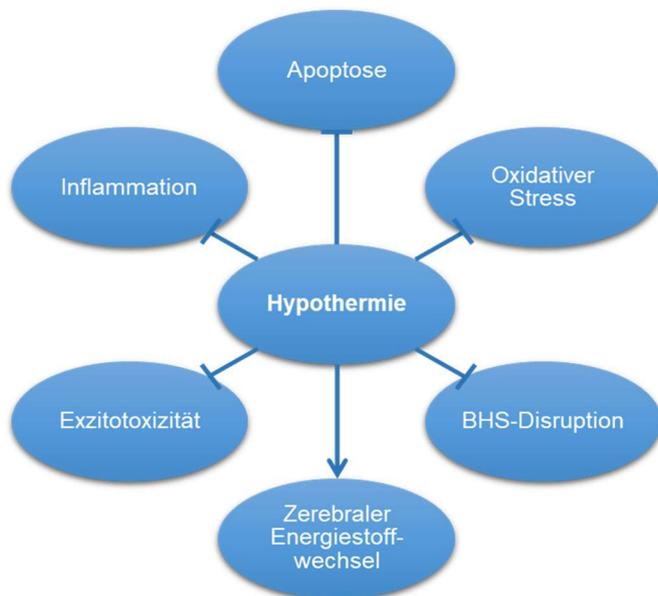


Abb. 3: Wirkungen der Hypothermie im Hirn

Hypothermie vermindert die Entzündungsreaktion, Exzitotoxizität, die Zerstörung der BHS und oxidativen Stress sowie neuronale Apoptose, während sie den Energiestoffwechsel im Hirn verbessert.

BHS: Blut-Hirn-Schranke

Modifiziert nach Ma et al. (2012)

Eine weitere Schlüsselfunktion ist die Abmilderung der Immunantwort, d.h. der Entzündungsreaktion, durch th-HT. Proinflammatorische Zytokine und Stickoxide werden vermindert ausgeschüttet (Hagberg et al., 2015; Hassell et al., 2015; Ma et al., 2012; Yuan

et al., 2014), die HI-induzierte Heraufregulation proinflammatorischer Gene in myeloischen Zellen abgemildert (Seitz et al., 2021) und Mikroglia weniger stark aktiviert. (Yuan et al., 2014) Ein weiterer Effekt ist die erhaltene Integrität der Blut-Hirn-Schranke mit reduzierter Infiltration peripherer Makrophagen. Im Tierversuch zeigte sich eine Reduktion von GFAP (glial fibrillary acidic protein), der Astrozytenzahl und der Calcium-Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II, welche in Nervenzellen den Energiestoffwechsel, die Ionenpermeabilität sowie die Synthese und Freisetzung von Neurotransmittern reguliert. (Ma et al., 2012)

Auf der anderen Seite bewirkte HT im Rattenmodell neonataler HIE eine vermehrte Formation von NETs (neutrophil extracellular traps) und eine verstärkte Aktivierung des NLRP3 (NLR family pyrin domain containing 3)-Inflammasoms. (Bernis et al., 2023), was einen komplexeren Wirkmechanismus bezogen auf die Entzündungsreaktion nahelegt.

Die meisten Studien belegen eine Verbesserung des behavioralen Outcomes nach HT-Behandlung und dadurch vermittelter Abmilderung der Immunantwort. Diese Funktion ist jedoch zweischneidig zu sehen, da die Entzündungsreaktion auch positive Wirkung auf das sich entwickelnde Hirn haben kann. Unter anderem wird die Immundepression durch th-HT als Grund diskutiert, warum diese Therapie bei vorbestehender Infektion sogar eher schädliche Effekte hat. (Hassell et al., 2015)

Außerdem inhibiert th-HT die Synthese, Freisetzung und Wiederaufnahme von ischämieinduzierten Neurotransmittern und Neuromodulatoren (Glutamat, Glycin, GABA, Dopamin, Noradrenalin, Serotonin und Adenosin) und vermindert die Phosphorylierung des NMDA (N-Methyl-D-Aspartat)-Rezeptors, was die Exzitotoxizität reduziert. (Hassell et al., 2015) Antioxidativ wirkt th-HT über eine erniedrigte ROS-Freisetzung und geringere Spiegel von Eisenionen im Blut. Dazu kommt eine antiapoptotische Wirkung über Blockade des intrinsischen Signalwegs der Caspaseaktivierung sowie ebenfalls verminderte Eisen- und Ascorbinsäurespiegel. In Versuchen zur traumatischen Hirnschädigung wurden zudem eine geringere Durchlässigkeit der BHS und Ödembildung beobachtet. (Ma et al., 2012)

Auch die Genexpression von Genen, die z.B. in Synapsenorganisation, Biogenese (erhöhte Syntheserate durch th-HT) und Inflammation (verminderte Syntheserate) involviert sind, zeigt sich durch th-HT verändert. (Ma et al., 2012)

1.2 Der mTOR-Signalweg

Das mammalian (oder auch mechanistic) Target of Rapamycin (mTOR) ist eine aus 2.549 Aminosäuren bestehende Serin-/Threoninkinase, die die katalytische Untereinheit zweier verschiedener Komplexe, mTOR-complex (mTORC) 1 und 2, bildet. (Bockaert und Marin, 2015; Saxton und Sabatini, 2017) Beide Proteinkomplexe enthalten die Proteine mTOR (katalytische Untereinheit), Deptor (DEP-domain-containing mTOR interacting protein: inhibitorische Untereinheit), mLST8 (mammalian lethal with Sec13 protein 8: Gerüstprotein und aktivierende Untereinheit) und Tit/Tel2 (strukturelle Untereinheit). mTORC1 enthält weiterhin die Proteine Raptor (Regulatory protein associated with mTOR) und PRAS40 (Proline-rich Akt substrate of 40kDa: mTOR-Inhibitor), während mTORC2 zusätzlich die Proteine Rictor (rapamycin-insensitive companion of mTOR), mSin1 (mammalian stress-activated protein kinase [SAPK]-interacting protein) und Protor1/2 umfasst. (Villa-Gonzalez et al., 2022) mTORC1 wird durch Rapamycin inhibiert, während mTORC2 unabhängig von Rapamycin ist.

Dabei ist über die Rolle von mTORC1 deutlich mehr bekannt und erforscht.

mTORC2 scheint eine Rolle vor allem in der Organisation des Zytoskeletts, Zellmigration und der Zellzyklusprogression, Zellwachstum und –überleben sowie im Glukosemetabolismus und Ionentransport zu spielen. (Bockaert und Marin, 2015; Saxton und Sabatini, 2017) Damit beeinflusst mTORC2 in Neuronen insbesondere auch synaptische Plastizität und neuronale Morphologie, der in der Hirnentwicklung eine wichtige Rolle zukommt. Hierfür werden Informationen von Neurotransmittern, Hormonen und Wachstumsfaktoren integriert. (Villa-Gonzalez et al., 2022) Zudem ist er Teil einer positiven Feedback-Schleife bei der mTORC1-Aktivierung über Aktivierung von Akt. (Saxton und Sabatini, 2017) Demgegenüber bewirkt mTORC1 diverse hauptsächlich anabole Reaktionen, wie Protein-, Lipid- und Nukleotidsynthese, Zellwachstum und -differenzierung, trägt zum Glukosemetabolismus bei und stimuliert im Hirn einige weitere wichtige Prozesse (wie bspw. Synaptogenese, s.u.).

Der mTORC1-Signalweg integriert eine Vielzahl intra- und extrazellulärer Signale, um die Balance zwischen Anabolismus und Katabolismus der Zelle aufrechtzuerhalten. Er hat u.a. Effekte auf Proteinsynthese, den allgemeinen Metabolismus der Zelle, Autophagie und die Entzündungsreaktion und ist somit ebenfalls bei hypoxisch-ischämischer Hirnschädigung relevant.

Während mTOR ubiquitär im Körper exprimiert wird, ist es besonders reichlich im Hirn zu finden, was dieses besonders anfällig für Störungen des Proteins (wie bspw. auch in verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen) macht und die Bedeutung des Signalweges für die physiologische ZNS-Funktion hervorhebt. (Villa-Gonzalez et al., 2022)

1.2.1 Einflüsse auf den Signalweg stromaufwärts von mTORC1

Für einen besseren Überblick über die Aktivierungskaskade und um Mechanismen der Inhibition bei Stress besser erläutern zu können, werde ich zunächst kurz die Aktivierung des mTORC1 durch Zytokine und Wachstumsfaktoren beschreiben:

Diverse Zytokine und Wachstumsfaktoren (u.a. IGF-1, VEGF, NGF, BDNF und einige Neurotransmitter) üben über ihre jeweiligen Rezeptoren einen meist stimulierenden Einfluss auf mTOR aus. (Bockaert und Marin, 2015)

Es handelt sich um eine Phosphorylierungskaskade (vgl. Abb. 4): Nach Bindung der Wachstumsfaktoren an ihre Rezeptoren (Tyrosinkinaserzeptoren oder G-Protein-gekoppelte Rezeptoren) phosphoryliert die Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K) die PI3K-abhängige Kinase (PDK). Diese wiederum aktiviert Akt, das über Disinhibition des Tuberösen Sklerosekomplexes 2 (TSC2) Rheb (Ras-homolog-enriched-in-brain) aktiviert. Rheb aktiviert schließlich mTORC1. (Bracho-Valdés et al., 2011)

Über die Inhibition von TSC 1 oder 2 läuft auch die mTOR-Aktivierung durch zahlreiche andere Zytokine/Wachstumsfaktoren einschließlich TNF α . (Bracho-Valdés et al., 2011; Perez-Alvarez et al., 2018; Saxton und Sabatini, 2017)

Im Zusammenhang mit neonataler Hypoxie-Ischämie sind als beeinflussende Signale besonders Stressfaktoren wie der verminderte Energiestatus der Zelle (Aramburu et al., 2014; Saxton und Sabatini, 2017), Hypoxie selbst (Aramburu et al., 2014; Bracho-Valdés et al., 2011; Perez-Alvarez et al., 2018; Saxton und Sabatini, 2017), osmotischer Stress (Aramburu et al., 2014), O₂-Radikale, DAMPs und DNA-Schäden (Aramburu et al., 2014; Saxton und Sabatini, 2017; Spriggs et al., 2010) relevant, die alle mTORC1 inhibieren:

Bei einem geringen Energiestatus wird ein hoher AMP/ATP-Quotient durch die AMP-abhängige Kinase (AMPK) detektiert. Diese hemmt mTORC1 sowohl direkt (über Raptor)

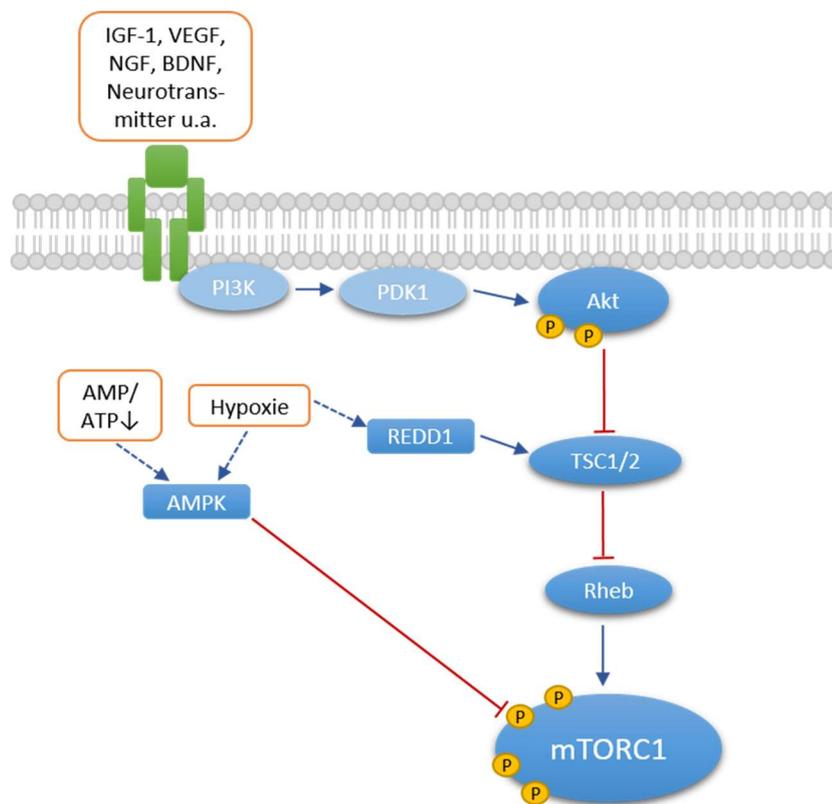


Abb. 4: Aktivierung des mTORC1 durch Zytokine/Wachstumsfaktoren und seine Inhibition bei niedrigen zellulären Energieleveln oder Hypoxie

AMP: Adenosin-Monophosphat, ATP: Adenosin-Triphosphat, AMPK: AMP-abhängige Kinase, BDNF: Brain-Derived Neurotrophic Factor, IGF-1: Insulin-like Growth Factor 1, mTORC1: mTOR-Komplex 1, NGF: Neuronaler Wachstumsfaktor, PDK1: PI3K-abhängige Kinase 1, PI3K: Phosphoinositol-3-Kinase, REDD1: Regulated in DNA damage and development 1, Rheb: Ras-homolog-enriched-in-brain, TSC: Tuberöser Sklerosekomplex, VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

also auch indirekt über Stimulation von TSC2, sodass Wachstum und Proliferation allgemein gedrosselt wird und kein ATP für die sehr energieaufwändige Proteinsynthese verschwendet wird.

Hypoxie führt zu einer Inaktivierung von mTORC1, zum einen über AMPK, zum anderen auch über REDD1 (Regulated in DNA damage and development 1), das TSC aktiviert. REDD1 wird durch HIF-1 α (Hypoxie-induzierbarer Faktor 1 α) verstärkt exprimiert. Auf der anderen Seite kann aktiviertes mTOR unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen das zelluläre HIF-1 α -Level erhöhen. Damit steht der Zelle eine negative Feedbackschleife zur Verfügung, um eine Balance zwischen mTOR-Aktivität und Antwort auf die Hypoxie zu finden.

Unter (mildem) osmotischem Stress wird die mTOR-Aktivität reduziert (u.a. über mitochondriale ROS-Produktion), sie bleibt jedoch hoch genug, um Proteinsynthese, Zellwachstum und Proliferation zu verstärken. Demgegenüber wird bei starker Hyperosmolarität die mTOR-Aktivität verstärkt, jedoch die Phosphorylierung von S6K1 und 4E-BP1 unterdrückt.

Bei DNA-Schaden werden verschiedene Zielgene von p53 transkribiert (AMPK β , PTEN, Sestrine, TIGAR und TSC2 selbst), die alle über Aktivierung von TSC mTORC1 hemmen. Auch REDD1 spielt hierbei eine Rolle. Andererseits findet eine Deaktivierung von mTOR nicht bei allen Arten von DNA-Schaden statt.

Aktivatoren des Signalweges sind u.a. Aminosäuren (über Rags (Rekombination-aktivierendes-Gen) bei zusätzlicher Anwesenheit von Wachstumsfaktoren). (Bracho-Valdés et al., 2011; Saxton und Sabatini, 2017)

Der PI3K/Akt-Signalweg stromaufwärts von mTOR stellt eine Kreuzungsstelle einer Vielzahl unterschiedlicher Signalwege dar. Eine Aktivierung bewirkt unter anderem eine verminderte neuronale Apoptose und Stabilisierung der BHS. (Li et al., 2015) Akt ist, wie mTOR, wichtig für Zellproliferation, -wachstum und -überleben. (Talos et al., 2012) Es besitzt diverse Schlüsselsubstrate, zu denen u.a.a. FoxO1/3a-Transkriptionsfaktoren (Forkhead box O1/3a, ein Tumorsuppressor, der den Zellzyklus arretiert und Apoptose fördert), das metabolische Regulatorprotein GSK3 β , Bad (Bcl-2-Antagonist of Cell Death, ein proapoptotisches Protein), Caspase 9, p21 und NF κ B und TSC2 (dieser inhibiert mTORC1 und wird selbst wiederum durch Phosphorylierung durch Akt gehemmt) gehören. (Saxton und Sabatini, 2017; Xu et al., 2020)

1.2.2 Funktion im Gehirn

mTORC1 integriert diverse extrazelluläre Signale und vermittelt unter geeigneten Bedingungen hauptsächlich Zellwachstum und -proliferation. Dies beinhaltet die Stimulation anaboler Prozesse wie Protein-, Lipid- und Nukleotidsynthese und die Hemmung kataboler Mechanismen, vor allem Autophagie. Im Hirn ist mTOR damit ein wichtiger Regulator der neuronalen Entwicklung und Synapsenbildung. (Bockaert und Marin, 2015; Perez-Alvarez et al., 2018; Saxton und Sabatini, 2017)

Die Haupteffektorproteine für die Proteinsynthese stromabwärts von mTOR sind 4E-BP1 (eukaryotischen Initiationsfaktor 4E-bindendes Protein 1) und P70S6K (P70-S6-Kinase) (Perez-Alvarez et al., 2018; Saxton und Sabatini, 2017), die über unterschiedliche Mechanismen vor allem für die Initiation und Elongation der Translation zuständig sind. (Perez-Alvarez et al., 2018)

Zudem erhöht mTORC1 direkt die Aktivität der RNA-Polymerasen I und III (Aramburu et al., 2014) sowie die Biogenese von Ribosomen durch Transkription ribosomaler RNA und ribosomaler Proteinsynthese (über P70S6K und PP2A (Protein Phosphatase 2A)). (Bracho-Valdés et al., 2011; Hay und Sonenberg, 2004; Perez-Alvarez et al., 2018) Insbesondere die Translation von mRNAs mit sogenannten 5'-TOP (5'-terminaler Oligopyrimidintrakt)-Motiven wird durch mTORC1 speziell verstärkt. Diese codieren überwiegend für Proteine, die selbst an der Proteinsynthese beteiligt sind (Bockaert und Marin, 2015; Hay und Sonenberg, 2004; Saxton und Sabatini, 2017; Spriggs et al., 2010; Weichhart et al., 2015), was die Rolle des Signalweges in diesem Prozess noch einmal unterstreicht.

4E-BP1 wird durch die Phosphorylierung inaktiviert. Damit gibt es den Initiationsfaktor eIF4E (eukaryotischer (Translations-)Initiationsfaktor 4E) am 5'-Ende der mRNA frei, so dass er mit eIF4G interagieren kann, mit anderen Initiationsfaktoren assoziiert und den 48S-Präinitiationskomplex bildet. (Fingar et al., 2002) Dieser wird für die 5'-Cap-abhängige Translation benötigt. (Bracho-Valdés et al., 2011; Perez-Alvarez et al., 2018; Saxton und Sabatini, 2017)

4E-BP existiert in verschiedenen Isoformen, wobei über 4E-BP1 am meisten bekannt ist. Im Hirn liegt vor allem 4E-BP2 vor (Bockaert und Marin, 2015), dessen Aktivität jedoch durch Hypoxie-Ischämie weniger stark beeinflusst wird. (Ayuso et al., 2010) Insofern ist es für die Untersuchung neonataler HIE sinnvoll, die 4E-BP1-Isoform zu betrachten.

Zur Familie der S6-Kinasen gehören S6K1 und S6K2, die jeweils in verschiedenen Isoformen existieren (P70- und P85S6K1 bzw. P54- und P56S6K2), wobei über P70S6K1 am meisten erforscht ist. (Tavares et al., 2015)

Zur vollständigen Aktivierung der S6Ks müssen diese zunächst an 4 (bzw. 3) Stellen phosphoryliert vorliegen. Dies macht eine Phosphorylierung durch mTOR an einem weiteren Threoninrest (Thr389) möglich, auf die dann noch eine Phosphorylierung durch

PDK1 folgt. (Tavares et al., 2015) Es wird deutlich, dass die S6-Kinase ein wichtiges Effektormolekül stromabwärts von mTOR ist, jedoch auch durch andere Signalwege beeinflusst wird.

Nach Aktivierung der S6Ks folgt eine Phosphorylierung diverser Substrate, die die Proteinsynthese an verschiedenen Punkten stimulieren (sowohl Translation als auch mRNA-Splicing und Transkription).

Das Haupt-Zielprotein von S6Ks ist das ribosomale S6-Protein (S6 oder rpS6). Dieses ist Teil der 40S-Untereinheit des Ribosoms und damit zentral für die Translation (Initiation und Elongation) von mRNA. Zur Aktivierung von S6 sind beide S6Ks nötig, es scheint jedoch hauptsächlich S6K2 relevant zu sein. (Tavares et al., 2015) Die spezielle Funktion von S6 ist Proteinsynthese allgemein und Zellzyklusprogression. (Tavares et al., 2015) Es scheint vor allem in der Regulation der Zellgröße einiger Zelltypen wichtig zu sein; für die Translation von mRNA mit 5'-TOP-Motiven ist es verzichtbar (diese Hypothese wird jedoch diskutiert). (Hay und Sonenberg, 2004; Ruvinsky und Meyuhas, 2006) Des Weiteren stimulieren S6Ks die Proteinsynthese an diversen Stellen: (Saxton und Sabatini, 2017)

In der Translation fördert S6K1 die Helikaseaktivität von eIF4A durch Phosphorylierung von eIF4B und PDCD4 (Programmed Cell Death 4), außerdem disinhibiert sie die Elongation durch Phosphorylierung von eEF2K (Eukaryotic Elongation Factor 2 Kinase). Auch in die Proteinfaltung greift S6K1 über CCT β (Chaperonin containing TCP-1 (t-complex protein 1) β) ein. Durch Phosphorylierung der nukleären Proteine SKAR (S6K1 Aly/REF-like target) und CBP80 (Cap-Binding Protein 80) wird das mRNA-Splicing beeinflusst; und bei der Transkription wirken S6K1 und S6K2 über CREM (cAMP responsive element modulator), Era (Östrogenrezeptor α) und YY1 (Ying Yang 1). (Tavares et al., 2015)

P70S6K ist außerdem auch für andere mTOR-Effekte, wie die de-novo-Lipidsynthese (hauptsächlich über SREBP (sterol responsive element binding protein)) (Bracho-Valdés et al., 2011) und die Nukleotidsynthese (Perez-Alvarez et al., 2018), verantwortlich. Zudem wird über andere Zielproteine u.a. Apoptose blockiert und Zellproliferation und die Organisation des Zytoskeletts gefördert. (Tavares et al., 2015)

1.2.3 Autophagie

mTORC1 unterdrückt außerdem den Proteinkatabolismus, insbesondere die Autophagie. Dabei gilt mTOR als zentraler Regulator der Autophagie (Carloni et al., 2010) und stellt den einzigen inhibierenden Einfluss dar. (Wei et al., 2021) Da der Autophagie in der Pathogenese der HIE eine entscheidende Rolle zukommt, liegen in diesem Signalweg möglicherweise vielversprechende Ansatzpunkte für zukünftige Therapieoptionen.

Autophagie erfüllt ubiquitär in Zellen und speziell in Immunzellen vielfältige Funktionen: Zunächst dient sie über den Abbau intrazellulärer Makromoleküle der Qualitätskontrolle intrazellulärer Proteine und der Detoxifizierung sowie der Gewinnung von Aminosäuren bei Energiemangel.

In Neuronen trägt moderate Autophagie zum Erhalt der Homöostase und der Zellfunktion bei. (Wei et al., 2021) Insbesondere im neonatalen Hirn nimmt dieser Prozess während Entwicklungsphasen eine Sonderrolle in Zellwachstum und -differenzierung ein. (Descloux et al., 2015)

Auf der anderen Seite führt exzessive Autophagie jedoch zu Zelltod und –schaden. (Sun et al., 2018b; Wei et al., 2021)

Zudem erfüllt sie immunologisch sowohl Mediator- als auch Effektorfunktionen, indem sie situationsabhängig pro- oder antiinflammatorische Wirkung entfalten kann und (besonders in Immunzellen wie Makrophagen und Mikroglia) zum Abbau und zur Elimination (phagozytierter oder intrazellulärer) Pathogene beiträgt. (Deretic, 2012) Außerdem wird durch die Bereitstellung von Aminosäuren die Synthese sekretorischer Proteine wie der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-8 erhöht. (Weichhart et al., 2015)

Aus diesem Grund ist die Regulation (bzw. Dysregulation) von Autophagie bei Hypoxie-Ischämie im Hirn biologisch von höchster Bedeutung.

Die Bildung des Autophagosoms beginnt mit der Bildung der prä-autophagosomalen Membran (Phagophor), die an unterschiedlichen Organellen möglich ist. Dort werden später die meisten an der Autophagie beteiligten Proteine rekrutiert. Die Isolierung dieses Membranabschnitts kann durch Energie- bzw. Nährstoffmangel, Hypoxie oder intrazelluläres Kalzium induziert werden. (Descloux et al., 2015)

ULK1/2 (Unc-51-like kinase 1/2) markieren sehr früh in der Formation des Autophago-

soms, noch vor dessen Beladung, dessen Initiationsstelle an der Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) und binden dort das Autophagie-Adapterprotein p62 (Sequestosom 1) und NBR1 (Neighbor of BRCA1 gene 1 protein). Diese beiden Moleküle dienen der Erkennung des Cargos, indem sie ubiquitinylierte Proteine im Zytoplasma binden. (Bjørkøy et al., 2006; Bjørkøy et al., 2009; Sun et al., 2018b) mTORC1 inhibiert Autophagie (bzw. deren Initiation) durch Phosphorylierung von ULK1 (an Ser 757) und ULK2 (Atg1 (autophagy-related protein 1)). (Weichhart et al., 2015) Dadurch kann keine Aktivierung dieser Proteine (durch Phosphorylierung an Ser 317, Ser555 und Ser777), die die Bildung des Autophagosoms beschleunigen, durch AMPK stattfinden. (Bracho-Valdés et al., 2011; Deretic, 2012; Egan et al., 2011; Saxton und Sabatini, 2017)

Ein weiteres System, das die Formation des Autophagosoms sowie den Autophagiefluss kontrollieren, ist bspw. das sog. Proteinkonjugationssystem (oder ubiquitin-like conjugating system, bestehend aus verschiedenen Atg-Molekülen, u.a. LC3 (Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3)), das v.a. für die Elongation der autophagosomalen Membran und deren Schluss verantwortlich ist. (Descloux et al., 2015) LC3 wird ebenfalls in die Membran eingelagert und ist in der Lage, u.a. p62 zu binden. (Bjørkøy et al., 2005; Bjørkøy et al., 2006) Weiterhin sind verschiedene Proteine, die mit Beclin1 (Atg6) interagieren (wie bspw. auch durch DAMPs aktivierte Moleküle), zu nennen, (Deretic, 2012) welche vor allem für die Induktion der Autophagie sowie die Bildung des Autophagosoms und dessen Fusion mit dem Lysosom verantwortlich sind. (Wei et al., 2021)

Wenn das Autophagosom geschlossen ist, fusioniert es zuletzt mit einem Lysosom; der resultierende pH-Abfall sowie lysosomale Enzyme sorgen für den Abbau des Inhalts. (Descloux et al., 2015)

p62 interagiert außerdem mit anderen Proteinen, die an Entzündungsreaktionen beteiligt sind. (Deretic, 2012)

Es muss berücksichtigt werden, dass Autophagie durch vielfältige weitere Mechanismen kontrolliert wird, die teils mTOR involvieren und teils unabhängig davon ablaufen, und dass auch bei mTOR-Inhibition noch verschiedene weitere intrazelluläre Prozesse nötig sind, damit die Autophagie starten kann. (Bockaert und Marin, 2015; Perluigi et al., 2015; Sun et al., 2018b) Unter anderem bestimmen HIF-1 α (stimulierend teils via, teils unabhängig von mTOR) und der MAPK (MAP (mitogen activated protein)-Kinase)-Signalweg

das Autophagiegeschehen mit. (Sun et al., 2018b) Zudem konnte gezeigt werden, dass antiapoptotische Proteine wie Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) oder Bcl-xl (B-cell lymphoma – extra large) Autophagie (durch Komplexbildung mit Beclin-1 und dessen Sequestrierung) inhibieren, während proapoptotische Proteine wie Bax (Bcl-2-associated X protein) und Caspase einen stimulierenden Einfluss haben. (Sie können Beclin-1 durch kompetitiven Antagonismus wieder aus diesen Komplexen befreien) (Descloux et al., 2015) Auf der anderen Seite haben Bcl-2 sowie auch Caspase die Fähigkeit, autophagie-verbundene Proteine zu spalten und diese so zu inhibieren. (Descloux et al., 2015; Sun et al., 2018b) Apoptose und Autophagie können sich demnach gegenseitig sowohl positiv als auch negativ beeinflussen.

GABA-Rezeptoraktivierung spielt in diesem Zusammenhang ebenfalls eine Rolle: Aktivierung des GABA_B-Rezeptors mittels Baclofen inhibiert Autophagie im Hippocampus im Rattenmodell chronischer zerebraler Hypoperfusion. (Descloux et al., 2015; Liu et al., 2015; Sun et al., 2018b)

Um einen Eindruck über die Autophagieleistung im Gewebe zu erhalten, nutzten wir den Western Blot. Als Markerprotein verwendeten wir hierfür p62. Weitere Möglichkeiten, die Autophagieleistung im Gewebe zu ermitteln, wären LC3 bzw. LC3-II oder Beclin1. (Deretic, 2012; Kirkin et al., 2009; Sun et al., 2018a; Sun et al., 2018b; Wei et al., 2021) Auch der Phosphorylierungsstatus von ULK1 an Ser757 wäre möglich zu bestimmen, da dies das direkte intrazelluläre Mediatormolekül für die Autophagiehemmung durch mTOR ist. (Cell Signaling Technology®, 2017)

1.2.4 Bedeutung bei HIE

Der mTOR-Signalweg spielt bei Hypoxie-Ischämie in unterschiedlichen zellulären Prozessen eine zentrale Rolle. Viele der o.g. Einflüsse auf den Signalweg sind bei HI verändert, wobei zentral eine Herabregulation von mTOR bei Hypoxie und Nährstoff- bzw. Energiemangel ist. Zudem spielen die diversen Funktionen von mTORC1 eine Rolle bei der Antwort auf akute wie auch chronische hypoxisch-ischämische Schädigung.

In der Stressantwort ist eine regulierte Aktivierung des mTORC1 essenziell, um das Zellüberleben zu sichern: Eine leicht geminderte Aktivität resultiert in reduzierter entzündlicher Aktivität, ROS-Produktion, Biogeneserate und ATP-Verbrauch; eine Mindestaktivität ist jedoch erforderlich, um die protektive Antwort auf den Gewebeschaden aufrecht zu erhalten. (Aramburu et al., 2014) (vgl. Abb. 5)

Dabei ist der Einfluss von mTOR auf die Proteinsynthese bei Hypoxie-Ischämie zentral. Sie ist einerseits mit einem hohen Energieaufwand verbunden. (Aramburu et al., 2014; Saxton und Sabatini, 2017) Außerdem wird hiermit zum einen die Gewebeantwort auf die Schädigung (inkl. Metabolismus der Zellen und Reparatur) sowie zum anderen die Entzündungsreaktion via Produktion von Zytokinen und anderen Botenstoffen reguliert. (Zu diesen zählen u.a. HIF-1 α , HSF1 (Heat shock factor 1; Transkriptionsfaktor, der u.a. bei Hitzeschock, niedrigem pH und osmotischem Stress aktiviert wird), Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Transkriptionsfaktor für Gene zur Redox-Balance bei erhöhten ROS) oder NFAT5 (Nuclear factor of activated T-cells 5; Protein zum Schutz gegen osmotischen Stress)). (Aramburu et al., 2014)

In Bezug auf den Glukose- und Sauerstoffmetabolismus führt mTOR dazu, dass der Glukosestoffwechsel eher von oxidativer Phosphorylierung auf Glykolyse verlegt wird, was zum einen der erhöhten Bereitstellung von Bausteinen für den Aufbau neuer Makromoleküle dient, (Saxton und Sabatini, 2017) zum anderen aber auch in einer geringeren Sauerstoffverwertung resultiert.

Auf der anderen Seite verstärkt mTORC1 oxidative Stoffwechselprozesse in Mitochondrien durch erhöhte Expression deren Gene. (Bockaert und Marin, 2015; Bracho-Valdés et al., 2011) Dies spielt in der Pathophysiologie der HIE insofern eine entscheidende Rolle, als die resultierende ROS-Entstehung zum Zellschaden insbesondere im sekundären Energieversagen beiträgt.

Es wird allgemein beschrieben, dass mTOR bei Hypoxie herabreguliert wird.

Jedoch scheint in Gliazellen eine Aktivierung von mTOR nach OGD (oxygen-glucose deprivation) zur Proliferation, Migration und Produktion inflammatorischer Botenstoffe zu führen. (Aramburu et al., 2014)

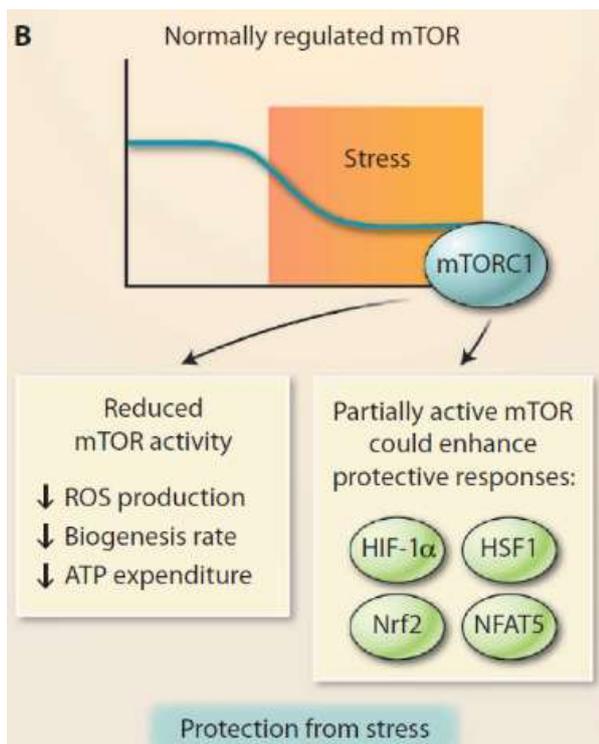


Abb. 5: Bedeutung einer balancierten mTOR-Aktivität als Reaktion auf zellulären Stress

Partielle mTOR-Aktivität bei zellulärem Stress senkt die ROS-Produktion, die Biogenese sowie den ATP-Verbrauch, stimuliert jedoch über verschiedene Mediatoren die Stressantwort der Zelle. Insgesamt resultiert eine protektive Wirkung, während zu hohe oder zu niedrige Aktivität einen schädlichen Effekt hat.

ATP: Adenosin-Triphosphat, HIF-1 α : Hypoxie-induzierbarer Faktor 1 α , HSF1: Heat Shock Factor 1, mTOR: mammalian Target of Rapamycin, mTORC1: mTOR-Komplex 1, NFAT5: Nuclear factor of activated T-cells 5, Nrf2: Nuclear factor erythroid 2-related factor 2, ROS: Reaktive Sauerstoffspezies
aus Aramburu et al. (2014)

1.2.5 Bedeutung im Immunsystem und bei Inflammation

mTORC1 spielt über Steuerung des Zellstoffwechsels (insbesondere der Proteinsynthese), der Zytokinantwort, der Zellmigration und der Antigenpräsentation eine wichtige Rolle in Immunzellen und bei der Regulation der Entzündungsantwort und trägt im Hirn zum Gleichgewicht zwischen pro- und antiinflammatorischer Antwort bei:

Die Ergebnisse verschiedener Studien bezüglich des Effekts von mTOR hinsichtlich Zytokinausschüttung sind uneinheitlich. (Weichhart et al., 2015)

mTOR hat allgemein weitreichende proinflammatorische Funktionen:

So führt eine Inhibition von mTOR im Mausmodell eines ischämischen Schlaganfalls zu verminderter Produktion proinflammatorischer Zytokine und Chemokine und einer Verschiebung der Mikroglia-Polarisation hin zum M2-Phänotyp (Li et al., 2016) und wirkt darüber neuroprotektiv. (Perez-Alvarez et al., 2018)

In Neutrophilen führt eine mTOR-gesteuerte selektive Translation bestimmter mRNAs zu Entzündung und Vasodilatation. (U.a. wird COX2 (Cyclooxygenase 2) vermehrt gebildet, was zu einer erhöhten Prostaglandinfreisetzung führt.) Die Transkription der proinflammatorischen Zytokine IL-6, IL-8 und TNF und teilweise auch die Funktionsausübung der

Neutrophilen in Form von NET (Neutrophil extracellular trap)-Formation wird durch mTOR begünstigt. (Weichhart et al., 2015)

S6K1 speziell wirkt proinflammatorisch im Signalweg mit Akt und mTOR, indem es bei Stimulation durch Phosphatidsäure (die von Phospholipasen D1 und D2 gebildet wird) die Produktion von TNF α , IL-1 β und IL-6 erhöht. Außerdem ist es für die durch LPS induzierte iNOS-Expression nötig. (Tavares et al., 2015)

Das bedeutet, dass bei HI die gesteigerte Inflammation durch Zellschäden und Aktivierung des Immunsystems der durch die mTOR-Inhibition verursachten verminderten Zytokinproduktion gegenübersteht.

Auch zur Aktivierung, Funktionsausübung und Regulation der Chemotaxis (verstärkte Migration dendritischer Zellen und Neutrophiler, verminderte Migration von Makrophagen) von Immunzellen ist mTOR essenziell. Hierbei spielt vor allem die Funktion, Informationen über Substrat- und Energieverfügbarkeit sowie von Zytokinen und Wachstumsfaktoren zu integrieren, sowie der Einfluss auf Protein-, Glukose-, Nukleinsäure- und Lipidmetabolismus und die Organisation des Zytoskeletts eine Rolle. (Weichhart et al., 2015)

Auf der anderen Seite berichten Weichhart et al. (2015), dass die IL-12-Produktion nach Behandlung mit mTOR-Inhibitoren in TLR (Toll-like receptor)-stimulierten Primärkulturen dendritischer Zellen und Monozyten bzw. Makrophagen erhöht war, während IL-10 und Typ I-Interferon abnahm. Als Erklärung für diese proinflammatorischen Effekte einer mTOR-Inhibition vermuten die Autoren hier eine verstärkte Aktivierung von NF κ B sowie eine verminderte Aktivität von STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription) und GSK3 β . (Weichhart et al., 2015) Zudem polarisierten Makrophagen im Mausmodell und in der Zellkultur bei mTOR-Aktivierung eher in Richtung M2-Phänotyp. (Weichhart et al., 2015)

Eine Überexpression von S6K1 führt *in vitro* ebenfalls zu einer reduzierten NF κ B-Aktivität und damit verminderter Reduktion proinflammatorischer Zytokine. (Tavares et al., 2015)

Es lässt sich also festhalten, dass mTOR tendenziell eher proinflammatorisch wirkt, der Effekt jedoch sehr komplex und eine zeitlich detailliert abgestimmte Aktivität für das Entzündungsgeschehen hoch relevant ist.

1.3 Hypothese und Zielsetzung

Hypothermiebehandlung als Standard in der Versorgung asphyktischer Neugeborener verringert das Risiko für neurologische Entwicklungsstörungen und die Mortalität deutlich (RR 0,75; absolute Risikoreduktion 11 %, NNT 6). (Hassell et al., 2015; Ma et al., 2012) Das bisherige Wissen zum molekularen Wirkmechanismus dieses Verfahrens ist jedoch noch sehr begrenzt.

Trotz dieser Behandlung leiden 40-50 % der Kinder an teilweise schweren Folgeschäden; besonders bei sehr schwerer perinataler Asphyxie und bei zusätzlicher Infektion und/oder Inflammation ist der Nutzen der Hypothermie begrenzt. (Ma et al., 2012; Sabir et al., 2016) Auch für Frühgeborene wird die hypothermische Behandlung nicht empfohlen, (Rumajogee et al., 2016) sodass als Alternative Magnesiumsulfat eingesetzt wird. (Kanal und Levison, 2024) Th-HT kann den Stoffwechsel anderer Organe beeinflussen, die Herzfrequenz senken und die benötigte Menge an Vasopressoren erhöhen, die Plättchenlevel senken und die Rate von Krampfanfällen erhöhen. (Ma et al., 2012) Mögliche therapielimitierende Nebenwirkungen sind Herzrhythmusstörungen, Beeinträchtigung der Myokardkontraktilität, pulmonale Hypertension, Gerinnungsstörungen, Fettgewebsnekrosen und ein Sklerem. (Deutsches Hypothermieregister, 2023) In einer retrospektiven Analyse des Children's Hospital of Fudan hatten die mit th-HT behandelten Neugeborenen einen höheren 5 min-Apgar-Score und einen geringeren Hirnschaden und enzephalopathische Progression. Auf der anderen Seite waren eine höhere Rate an Intubationen und Thoraxkompressionen > 30 min, ein höherer Gebrauch von Analgetika und Sedativa und ein längerer Krankenhausaufenthalt zu verzeichnen. (Wang et al., 2023b) Zudem ist für die Therapie ein hohes Level an technischer Ausstattung auf neonatalen Intensivstationen nötig, das nicht überall auf der Welt zur Verfügung steht.

Aus diesem Grund ist es von zentraler Bedeutung, in Zukunft weitere Therapiemöglichkeiten zu erforschen. Zusätzliche neuroprotektive Medikation könnten die Wirkung der th-HT potenzieren oder in Fällen, in denen th-HT nicht durchgeführt werden kann, als Monotherapie angewandt werden.

Aktuelle Forschungen zielen u.a. auf die Abmilderung der Hyperinflammation (s.u.) ab. Sie umfassen z.B. medikamentöse Therapien mit Tetrahydrobiopterin, Melatonin, Cannabinoide, Erythropoietin, Xenon oder Inhibitoren freier Radikale. Weitere Ansätze sind

„Remote Ischemic Postconditioning“, Modulation der langanhaltenden Inflammation, der Mikroglia oder Leukozyten, Zell- oder Stammzelltherapie und spezifische miRNAs. (Hagberg et al., 2015; Hassell et al., 2015; Ma et al., 2012; Rumajogee et al., 2016) Pränatal kann die Gabe von Magnesiumsulfat aufgrund seiner vasodilatierenden und antioxidativen Eigenschaften präventiv wirken. (Rumajogee et al., 2016) Mögliche zusätzliche Ziele zukünftiger Therapien sind Reduktion von Exzitotoxizität, oxidativem Stress und Apoptose, Stabilisierung der BHS und Promotion von Angio-, Neuro- und Synaptogenese. (Dixon et al., 2015; European Medicines Agency; NIH National Library of Medicine)

Hierzu ist es sinnvoll, die molekularen Vorgänge bei HI und die Wirkweise der th-HT genauer zu verstehen und zu analysieren.

Die überschießende Inflammation im Hirn spielt in der Pathogenese der HIE sowie als ein Ansatzpunkt der th-HT eine zentrale Rolle. In vorangegangenen Versuchen konnte eine erhöhte Mikroglia-Aktivierung nach Hypoxie-Ischämie im neonatalen Rattenhirn gezeigt werden. (McRae et al., 1995; Serdar et al., 2019) Zudem wurde nachgewiesen, dass der mTOR-Signalweg bei dieser Aktivierung eine Hauptrolle spielt. (Dello Russo et al., 2009) Auch in Neuronen ist eine Veränderung der mTOR-Aktivität nach HI gut möglich, da diese u.a. durch NMDA-Rezeptoraktivierung und Kalziumeintritt in die Zelle beeinflusst wird. (Bockaert und Marin, 2015) Eine Beteiligung des mTOR-Signalweges konnte auch bereits in anderen neuroinflammatorischen (und neurodegenerativen) Erkrankungen wie bspw. der Alzheimer-Demenz, Morbus Parkinson, Epilepsie und traumatischer Hirnschädigung belegt werden.

Bekannt ist zudem, dass th-HT über eine Reduktion der Stoffwechselrate neuroprotektiv wirkt; (Yang et al., 2018) mTOR ist ein zentraler Mediator in der Regulation und Stimulation metabolischer Prozesse.

Des Weiteren spricht für eine Beteiligung von mTOR seine Funktion der Integration diverser, u.a. stressabhängiger Signale (Aramburu et al., 2014) in der Zelle und seine Funktion, zelluläres Überleben, Wachstum/Differenzierung, Proteinsynthese sowie Autophagie, Apoptose u.v.m. zu regulieren. Dies ist für Antwort der Neurone und Immunzellen auf hypoxisch-ischämische Schädigung essenziell.

Verschiedene Studien berichten von einer neuroprotektiven Wirkung einer mTOR-Inhibi-

tion bei hypoxisch-ischämischer Hirnschädigung durch vermehrte Induktion von Autophagie, verminderte Inflammation und reduzierte metabolische Anforderungen für Wachstum und Proteintranslation. (Chen et al., 2012; Crino, 2016; Srivastava et al., 2016) Die hierzu bisher durchgeführten Studien kommen jedoch zu teils sehr verschiedenen Schlussfolgerungen und bedienen sich unterschiedlicher Tiermodelle oder Zellkulturen.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es deshalb, detailliertere Erkenntnisse über die molekulare Rolle des mTOR-Signalweges in neonataler Hypoxie-Ischämie zu gewinnen und insbesondere zu verstehen, inwiefern therapeutische Hypothermie dessen Veränderungen bei HI beeinflusst.

Nach Hypoxie-Ischämie und normo- bzw. hypothermischer Behandlung erwarten wir:

- veränderte Phosphorylierungslevel der Proteine im mTOR-Signalweg
- eine veränderte Expression pro- und antiinflammatorischer Zytokine, wobei die Inflammation nach HI und NT verstärkt und demgegenüber nach HT abgemildert sein sollte
- eine Veränderung des Autophagiemarkers p62 als Konsequenz aus der Aktivierung/Deaktivierung des mTOR-Signalweges

1.3.1 Methodischer Ansatz

Beim angewandten Modell handelt es sich um ein etabliertes Rattenmodell der unilateralen hypoxisch-ischämischen Hirnschädigung (modifiziertes Rice-Vannucci-Modell).

Wir untersuchten den zur Läsion ipsilateralen Kortex und Hippocampus der Tiere 6 bzw. 24 h nach dem hypoxisch-ischämischen Insult, da bisherige Versuche eine besonders starke Schädigung dieser Areale ergeben haben. (Sabir et al., 2012; Vannucci et al., 1988) Zudem konnte gezeigt werden, dass die Mikroglia-Dichte in diesen Arealen besonders hoch ist. (Fleiss et al., 2021)

Folgende Analysemethoden wurden angewendet:

1) Western Blot:

Wir analysierten das Aktivierungslevel spezifischer im mTOR-Signalweg involvier-

ter Proteine, indem wir deren Regulation über Phosphorylierung nach der Behandlung bestimmten. Die Menge an phosphoryliertem Protein verglichen wir jeweils mit der Gesamtmenge.

- a. Akt als einer der wichtigsten Regulatoren des Signalweges stromaufwärts von mTOR.
- b. mTOR als zentrales Protein des Signalweges
- c. 4E-BP1 und S6 als wichtige Zielproteine im Zusammenhang mit Proteinsynthese (bzw. S6 als repräsentativer Marker für die P70S6K-Aktivität (Hay und Sonenberg, 2004))
- d. p62 als Autophagiemarker

2) Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR):

Zu den angegebenen Zeitpunkten quantifizierten wir die Genexpression ausgewählter pro- und antiinflammatorischer Zytokine mittels RT-PCR. Wir bestimmten die mRNA-Menge der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-6, IL-12 und iNOS sowie als antiinflammatorische Zytokine Arg1, CD206 und TGF β zur Beurteilung der Entzündungsaktivität.

3) Immunhistochemie (IHC):

Diese Technik wurde angewendet, um die Resultate des Western Blot zu bestätigen.

Gefärbt wurden die Gewebeschnitte mit Antikörpern gegen phosphoryliertes S6 sowie gegen den Autophagiemarker p62.

(Anmerkung: Wir wählten p-S6 in der IHC als Marker für die Aktivierung des mTOR-Signalweges, da sich in früheren Versuchen herausgestellt hatte, dass die Immunhistochemie für p-mTOR und p-P70S6K mit den uns zur Verfügung stehenden Antikörpern keine Resultate bzw. ein zu hohes Hintergrundsignal brachte.)

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verbrauchsmaterial und Geräte

Tab. 1: Verbrauchsmaterial

IHC: Immunhistochemie, PVDF: Polyvinylidenfluorid

Verbrauchsmaterial	Hersteller
BD Plastikpak™ Kunststoffspritzen 1 ml	fisher scientific (Schwerte, Deutschland)
Filterpapier	GE Healthcare (Solingen, Deutschland)
Glasplättchen für IHC	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Immobilon®-P PVDF-Membran	Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland)
Mini-PROTEAN Tetra Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH (Feldkirchen, Deutschland)
Pap-Pen	Daido Sangyo Co. Ltd. (Tokyo, Japan)
Pipettenspitzen	eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Reaktionsgefäß 2 ml	eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Reaktionsgefäße 15/50 ml	Falcon®, Corning (Amsterdam, Niederlande)
Sterican® Kanülen 30 G	B.Braun SE (Melsungen, Deutschland)

Tab. 2: Geräte

BCA: Bicinchoninsäure, PCR: Polymerase-Kettenreaktion, RNA: Ribonukleinsäure

Gerät	Spezifikation	Hersteller
BCA-Konzentrationsmessung	FLUOstar Omega	BMG Labtech (Ortenberg, Deutschland)
Brutschrank		memmert (Schwabach, Deutschland)
RNA-Konzentrationsbestimmung	DS-11 Spectrophotometer	DeNovix (Wilmington, USA)
Gewebe-Homogenisierer	Perecellys 24 Tissue Homogenizer	bertin instruments (Montigny-le-Bretonneux, Frankreich)
Inkubator 95°C für 2 ml-Reaktionsgefäße	ThermoMixer F1.5	eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Mikroskop für Immunhistochemie	AxioScan Z.1	Zeiss (Oberkochen, Deutschland)
Mikrotom	Reichert-Jung 2030	
PCR-Gerät (Thermocycler)	Mastercycler pro vapo.protect	eppendorf (Hamburg, Deutschland)

Pipette elektrisch	Pipetboy 2	Integra (Biebertal, Deutschland)
Pipette manuell		eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Shaker	Low Speed Orbital Shaker	Corning (Amsterdam, Niederlande)
Spannungsgerät	PowerPac™ Basic Power Supply	Bio-Rad Laboratories GmbH (Feldkirchen, Deutschland)
Spektrophotometer zur RNA-Quantifizierung		DeNovix (Wilmington, USA)
Vortexer	Vortex-Genie 2	Scientific Industries (New York, USA)
Western-Blot-Auslese	Odyssey Imaging System	Li-cor Biosciences GmbH (Bad Homburg, Deutschland)
Zentrifuge	Ventrifuge 5430	eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Zentrifuge	Personal Mini Centrifuge	NeoLab Line (Heidelberg, Deutschland)
Zentrifuge 4°C	Centrifuge 5415 R	eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Zentrifuge für PCR-Platte	Centrifuge 5810 R	eppendorf (Hamburg, Deutschland)

2.1.2 Chemikalien

Tab. 3: Chemikalien

APS: Ammoniumperoxodisulfat, BSA: Bovine Serum Albumin, DAPI: 4,6-Diamidino-2-phenylindol, MOPS: 3-N-Morpholinopropansulfonsäure, NGS: Normal Goat Serum, RIPA: Radio-Immuno-precipitation Assay, SDS: Sodium Dodecyl Sulfate, TEMED: Tetramethylethyldiamin

Reagenz	Hersteller
Acrylamid	AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland)
APS 10 %	
Bis-Tris	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Bovine Serum Albumin (BSA)	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Bromphenol-Blau	
Ethanol	
Fluoromont-G with DAPI	invitrogen
Glycerol	
Glycin	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
HCl 2 N	
Isopropanol	Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland)
Methanol 99,9 %	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Milchpulver Anfangsmilch	dm babylove (dm-drogerie markt GmbH + Co. KG)
MOPS-SDS-Running-Puffer 10 X	life technologies (Thermo Fisher scientific, Deutschland/USA)
NGS	
Phosphatase-Inhibitor Cocktail 100 X	ThermoFisher Scientific (Deutschland/USA)

Ponceau S solution	Sigma-Aldrich/Merck (Darmstadt, Deutschland)
Protease-Inhibitor 100 X	ThermoFisher Scientific (Deutschland/USA)
RIPA Lysis Puffer 10 X	Merck Millipore (Darmstadt, Deutschland)
RLT Puffer	Qiagen (Hilden, Deutschland)
RPE Puffer	Qiagen (Hilden, Deutschland)
RW1 Puffer	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Roti®fair PBS 7,4	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
TEMED	Sigma-Aldrich/Merck (Darmstadt, Deutschland)
Trimza® Base	Sigma-Aldrich/Merck (Darmstadt, Deutschland)
Tris-Base	Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Heidelberg, Deutschland)
Tris-HCl	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Germany)
Triton X	Sigma-Aldrich/Merck (Darmstadt, Deutschland)
Tween® 20	Sigma-Aldrich/Merck (Darmstadt, Deutschland)
Xylen	
β-Mercaptoethanol	

2.1.3 Selbst hergestellte Puffer und Lösungen

Tab. 4: Selbst hergestellte Puffer und Lösungen

BSA: Bovine Serum Albumin, IHC: Immunhistochemie, PBS: Phosphate-buffered saline, RIPA: Radio-Immunoprecipitation Assay, SDS: Sodium Dodecyl Sulfate, TBS: Tris-buffered saline, TBS-T: TBS-Tween

Bezeichnung	Rezeptur
5 X Laemmli-Puffer	17,5 % Tris-HCl pH 6,8, 45 % Glycerol, 20 % SDS (0,25 g/ml in Tris-HCl), 5 % Bromphenol-Blau (2,5 mg/ml in ddH ₂ O), 12,5 % β-Mercaptoethanol in ddH ₂ O
BSA	5 % Bovine Serum Albumin in ddH ₂ O
Lysatpuffer	10 % RIPA-Puffer 10 X, 1 % Phosphatase-Inhibitor 100 X, 1 % Protease-Inhibitor 100 X in ddH ₂ O
Milch	5 % Milchpulver in TBS-T
Stripping-Puffer	1,5 gew% Glycin, 0,1 gew% SDS, 1 vol% Tween 20 Titriert auf pH 2,2 mit HCl 2 N
TBS	48 gew% Tris-Base, 176 gew% NaCl, titriert auf pH 7,4 mit HCl 2 N
TBS-T	0,05 % v/v Tween 20 in TBS
Transfer Buffer 10 X	3,027 gew% Trimza, 14,4 gew% Glycin in ddH ₂ O
Verdünnungsmedium des Primärantikörpers für IHC (PBS/carrageenan)	0,7 % Carrageenan, 0,02 % NaN ₃ in PBS

2.1.4 Antikörper

Tab. 5: Primäre Antikörper

4E-BP1: eukaryotischen Initiationsfaktor 4E-bindendes Protein 1, Iba-1: Ionisiertes calcium-bindendes Adaptermolekül 1, mAb: monoklonaler Antikörper, mTOR: mammalian Target of Rapamycin, WB: Western Blot

Primäre Antikörper		Molekular-ge-wicht	Hersteller	Kata-log-num-mer	Verdün-nungsver-hältnis
4E-BP1	(53H11) Rabbit mAb	15-20	Cell Signaling Technology (Massachusetts, USA)	#9644	WB 1:1000
Akt (pan)	(11E7) Rabbit mAb	60	Cell Signaling Technology (Massachusetts, USA)	#4685	WB 1:1000
beta-Aktin	antibody produced in mouse	42	Sigma-Aldrich (Missouri, USA)		WB 1:3000
Iba-1		17	Abcam (Berlin, Deutschland)	ab5076	IHC 1:500
mTOR	(7C10) Rabbit mAb	289	Cell Signaling Technology (Massachusetts, USA)	#2983	WB 1:1000
P62		62	Abcam (Berlin, Deutschland)	ab109012	WB 1:10.000, IHC 1:500
Phospho-4E-BP1 (Thr37/46)	(236B4) Rabbit mAb	15-20	Cell Signaling Technology (Massachusetts, USA)	#2855	WB 1:500
Phospho-Akt (Ser473)	(D9E) XP Rabbit mAb	60	Cell Signaling Technology (Massachusetts, USA)	#4060	WB 1:1000
Phospho-mTOR (Ser2448)	Antibody	289	Cell Signaling Technology (Massachusetts, USA)	#2971	WB 1:1000
Phospho-S6 Ribosomal Protein (Ser240/244)	XP Rabbit mAb	32	Cell Signaling Technology (Massachusetts, USA)	#5364	WB 1:1000, IHC 1:500
S6 Ribosomal Protein	(5G10) Rabbit	32	Cell Signaling Technology (Massachusetts, USA)	#2217	WB 1:500

Tab. 6: Sekundäre Antikörper

IHC: Immunhistochemie

Sekundäre Antikörper	Hersteller	Verdünnungsverhältnis
Goat Anti-Mouse IgG	invitrogen (Massachusetts, USA)	WB 1:10.000, IHC 1:500
Goat Anti-Rabbit IgG	invitrogen (Massachusetts, USA)	WB 1:5.000, IHC 1:500

2.1.5 Fertigsysteme („Kits“)

Tab. 7: Fertigsysteme

BCA: Bicinchoninsäure, cDNA: komplementäre Desoxyribonukleinsäure

Kit	Hersteller
Pierce™ Microplate BCA Protein Assay Kit	ThermoFisher Scientific (Deutschland/USA)
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	ThermoFisher Scientific (Deutschland/USA)
TaqMan™ Gene Expression Assay	ThermoFisher Scientific (Deutschland/USA)

2.1.6 Software

Tab. 8: Software

Zweck	verwendete Software	Herausgeber
Bildverarbeitung und Western-Blot-Analyse	ImageJ	Rasband, W.S.(Bethesda, USA)
Statistik	Microsoft Excel	Microsoft (Washington, USA)
	GraphPad Prism 9	GraphPad Software, Inc. (San Diego, USA)
Immunhistochemie-Bildbearbeitung	ZEN 3.1 (blue edition)	ZEISS (Oberkochen, Deutschland)

2.2 Methoden

2.2.1 Tiermodell: modifiziertes Rice-Vannucci-Modell

Beim untersuchten Modell handelt es sich um ein Rattenmodell der unilateralen neonatalen hypoxisch-ischämischen Hirnschädigung, das sich in der Forschung zur HIE bei Neugeborenen etabliert hat.

Neugeborene Wistar-Ratten werden am postnatalen Tag 7 unter Analgoanästhesie mit

Buprenorphin und Isofluran einer Ligatur der A. carotis communis (ACC) unterzogen und halten sich anschließend für 90 min in einer 8 % O₂-Hypoxie-Kammer bei einer rektalen Temperatur von 36°C auf.

Vorher findet eine erste Randomisierung in Behandlungs- und Kontrollgruppe statt, wobei bei der Kontrollgruppe (sham) ebenfalls unter Narkose ein Hautschnitt am Hals und eine Darstellung der ACC durchgeführt, diese jedoch nicht abgebunden wird.

Die Behandlungsgruppe wird erneut in zwei Untergruppen randomisiert: In der Hypothermie (HT)-Gruppe wird für 5 h mithilfe einer Kältematte die Körpertemperatur auf 32°C rektal gesenkt, während sie in der Normothermie (NT)-Gruppe bei 37°C gehalten wird.

Nach definierten Zeiträumen werden die Tiere durch intraperitoneale Injektion einer Überdosis Chloralhydrat getötet und der zur Läsion ipsilaterale Kortex und Hippocampus zur weiteren Analyse entnommen. Diese Regionen wählen wir, weil sie sich nach hypoxisch-ischämischer Hirnschädigung am stärksten geschädigt zeigen. (Wei et al., 2021)

Als Zeitpunkte für die weiteren Analysen in der vorliegenden Arbeit wählen wir 6 und 24 h nach Ende der Hypoxie-Phase, um als ersten Ansatz einen eher frühen und einen eher späten Zeitpunkt betrachten zu können.

Abb. 6 gibt einen Überblick über den Versuchsablauf.

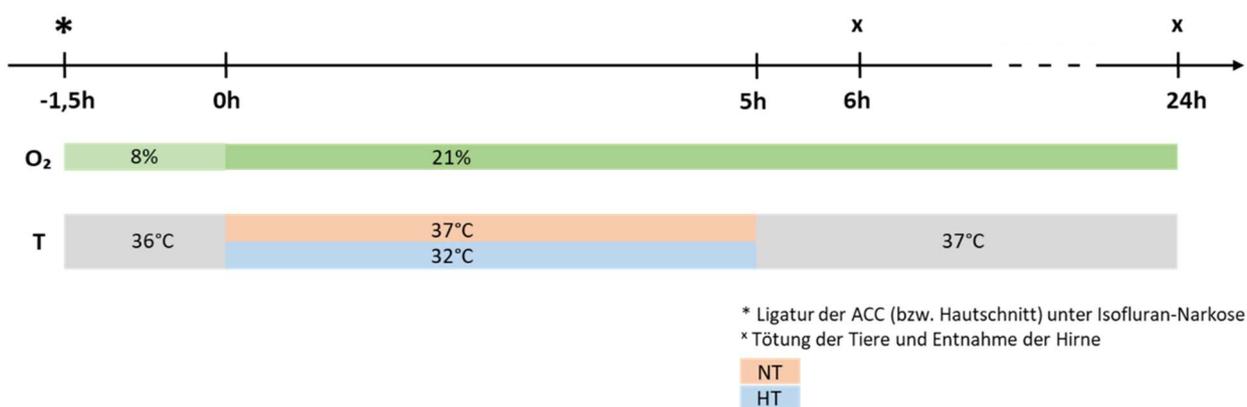


Abb. 6: Überblick über das verwendete Rattenmodell der neonatalen Hypoxie-Ischämie

ACC: Arteria carotis communis, HT: Hypothermie, NT: Normothermie, T: rektal gemessene Körpertemperatur

2.2.2 Gewebeschnitte und immunhistochemische Färbung

Nach der Tötung wurden die Tiere mit 1X PBS und anschließend 4 % Formaldehyd transkardial perfundiert und ihre Hirne entnommen. Diese wurden in einer aufsteigenden Ethanolreihe dehydriert, in Paraffin eingebettet und anschließend in 10 µm dünne Scheiben geschnitten, die auf Glasplatten aufgenommen wurden.

Im Anschluss erfolgte die Färbung mit Primärantikörpern gegen p-S6, p62 (Autophagie) und DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindol) (Zellkerne) und fluoreszierenden Sekundärantikörpern.

Dafür wurden die Paraffinschnitte zunächst in einer absteigenden Ethanolreihe rehydriert und mit PBS gewaschen. Das Antigen-Retrieval erfolgte ebenfalls mittels PBS. Um das Gewebe für die immunhistochemische Färbung permeabel zu machen, wurde das milde Detergens Triton X 100 (1 % v/v in PBS) für 30 min appliziert.

Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Schnitte 30 min bei Raumtemperatur mit NGS inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Anschließend wurden der Primärantikörper (in PBS/carrageenan verdünnt, Inkubation bei 4°C über Nacht) und nach Waschen mit PBS der Sekundärantikörper (Inkubation für 1 h abgedunkelt bei Raumtemperatur) appliziert. Zuletzt wurden die Schnitte mit einem Eindeckmedium, das DAPI zur Zellkernfärbung enthält, eingedeckt.

Die Proben wurden mithilfe des Axioscan-Z.1 (Zeiss) bei 20-facher Vergrößerung angesehen. Die damit aufgenommenen Bilder wurden mithilfe der Programme Zen Blue (Zeiss) und ImageJ analysiert.

2.2.3 Western Blot

Der Western Blot ist eine bewährte Methode, um Signalwege wie den mTOR-Signalweg näher zu untersuchen.

Die von uns verwendeten Antikörper richten sich gegen Phosphorylierungsstellen, die bereits von anderen Arbeitsgruppen in Versuchen zum mTOR-Signalweg zur Aktivitätsbestimmung der Proteine verwendet wurden (vgl. a. 1.2.2 Funktion im Gehirn). (Chen et al., 2012; Gao et al., 2020; Lechpammer et al., 2017; Lee et al., 2016)

Aufbereitung der Proben für den Western Blot (s. 6.1 Protokolle)

Schockgefrorene und bei -80°C verwahrte Proben aus dem ipsilateralen Kortex und Hippocampus der Versuchstiere wurden gewogen und mit $5\ \mu\text{l}$ Lysatpuffer pro $1\ \text{mg}$ Probe behandelt. Das Gewebe wurde manuell homogenisiert, zentrifugiert und der Überstand abgenommen.

Proteinquantifizierung

Die Quantifizierung der Proteinkonzentration erfolgte mithilfe des Pierce™ Microplate BCA Protein Assay Kit. Je $15\ \mu\text{l}$ verdünnte Proben sowie Lösungen mit Referenzkonzentrationen werden in die dafür vorgesehenen Felder einer BCA-Mikroplatte pipettiert und mit je $150\ \mu\text{l}$ BCA-Puffer bei 30°C inkubiert. Zweiwertige Kupferionen binden an die Peptidbindungen der Proteine und werden bei alkalischem pH zu einwertigen Ionen reduziert, wodurch sie mit BCA einen blauen Farbstoffkomplex bilden. Die Proteinkonzentration wird über den entstandenen Farbstoff photometrisch quantifiziert.

Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die Gelelektrophorese verwendeten wir in diesem Versuch ein 10 %iges Trenn- und ein 4 %iges Sammelgel. Bei der Herstellung werden Acrylamid-Moleküle durch das Methylbisacrylamid im Bis-Tris-Puffer quervernetzt und bilden so Poren einer definierten Porengröße im Gel (wobei die Porengröße sich invers zur Gesamtkonzentration von Acrylamid und Bis-Tris verhält). Zugabe von APS als Radikalstarter und TEMED als Polymerisierungskatalysator führen dazu, dass das Gel zügig nach dem Gießen zwischen zwei Glasplatten fest wird.

Je $50\ \mu\text{g}$ Protein wurden mit Probenpuffer und ddH_2O versetzt und unter schneller Bewegung ($350\ \text{rpm}$) bei 95°C für $10\ \text{min}$ inkubiert. Dadurch werden Wasserstoffbrücken zwischen einzelnen Aminosäuren aufgebrochen und somit die Sekundär- und Tertiärstruktur des Proteins zerstört. Das im Probenpuffer enthaltene SDS (Natriumdodecylsulfat) bindet in konstanter Menge (ein Molekül SDS pro 2 Aminosäuren) an die Proteine und überdeckt so deren Eigenladung. Das ist die Voraussetzung dafür, dass im später angelegten elektrischen Feld eine (annäherungsweise) konstante Kraft auf alle Proteine wirkt und sie somit allein anhand ihrer unterschiedlichen Molekülgröße und damit ihrer Laufgeschwindigkeit durch die Poren des Gels aufgetrennt werden.

Die vorbereiteten Proben wurden in die Taschen des Sammelgels gefüllt und in MOPS-

Puffer bei 80 V Spannung Richtung Anode laufen gelassen, bis sie den Beginn des Trenngels erreicht haben. Nun wurde die Spannung auf 100 V erhöht und die Proteine im Trenngel aufgetrennt. (Aufgrund der gleichen negativen Ladung wandern die relativ kleineren Moleküle schneller durch die Poren des Trenngels).

Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran

Die Proteine im Gel wurden mithilfe einer Spannung von 100 V senkrecht zum Gel für 1 h auf eine PVDF (Polyvinylidendifluorid)-Membran transferiert.

Identifizierung der Proteine (s. 6.1 Protokolle)

1. Unspezifische Kontrolle: Zur Überprüfung einer etwa gleichen Proteinbeladungsmenge wurden die Membranen zunächst kurz in Ponceau S inkubiert, welches unspezifisch alle auf der Membran gebundenen Proteine färbt. Die Färbung wurde anschließend mit TBS-T wieder ausgewaschen.

2. Blocken: Durch Behandlung mit Lösung aus Milchpulver oder BSA wurden die freien Bindungsstellen der Proteine auf der Membran abgesättigt, sodass der später applizierte Antikörper nicht unspezifisch an diese binden konnte. So wurde eine spezifische Bindung an die jeweiligen Epitope erst möglich gemacht.

3. Primärer Antikörper: Zur Identifizierung und anschließenden Quantifizierung bestimmter Proteine wurde eine Lösung verdünnter Antikörper zugegeben. Dieser bindet spezifisch an bestimmte Epitope des Proteins. Wir verwenden im Hasen hergestellte Antikörper. (vgl. 2.1.4 Antikörper)

Zur Untersuchung der phosphorylierten Proteine verwendeten wir folgende Phosphorylierungsstellen:

Akt: Ser473

mTOR: Ser2448

S6: Ser240/244

4E-BP1: Thr37/46

Zur internen Kontrolle, ob die Proteinbeladung in allen Proben gleich war, applizierten wir zusätzlich einen in der Maus hergestellten Anti- β -Aktin-Antikörper. Aktin ist ein Protein, das konstitutiv in allen Zellen unabhängig von der Behandlung exprimiert wird. Somit wurde ein genauere Vergleich der Proteinmenge der einzelnen Proben ermöglicht.

4. Waschschritte: Um nur leicht bzw. unspezifisch bindende Antikörper von der Membran zu entfernen, wuschen wir die Membranen in TBS-T.
5. Sekundärer Antikörper: Anti-Hasen- und Anti-Maus-Antikörper binden spezifisch an den F_c-Teil des jeweiligen primären Antikörpers auf der Membran. Bei Bestrahlung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge fluoreszieren diese Sekundärantikörper (aufgrund ihrer Konjugation mit einem Infrarot-Farbstoff) und können so sichtbar gemacht werden.
6. Waschschritte: Erneut wuschen wir mit TBS-T und TBS, um unspezifisch bindende Sekundärantikörper zu entfernen.

Antikörperdetektion (Scanning)

Die fluoreszierenden Sekundärantikörper werden photometrisch bei 700 bzw. 800 nm Wellenlänge detektiert. Das Scannen erfolgt mittels des Odyssey Imaging System (Li-Cor).

Stripping

Mehrere Schritte aus Waschen und Inkubation mit Stripping-Puffer entfernen die primären und sekundären Antikörper, sodass es möglich wird, mithilfe neuer Antikörper andere Proteine zu detektieren. (s. 6.1 Protokolle)

Analyse

Zur Analyse verwendeten wir die Softwareprogramme ImageJ und Microsoft Excel: Zunächst wurde der Scan in ein Schwarzweißbild umgewandelt. Mithilfe des „Rechteck“-Tools setzten wir einen Rahmen um die einzelnen Proteinbanden. Aus diesen ermittelt ImageJ den Grauwert der einzelnen Pixelzeilen des Rahmens abhängig von der Höhe im Rahmen und stellt diese Werte dann als Graph dar. Um Hintergrundsignal herauszurechnen, bestimmten wir die Fläche unter der Kurve des Peaks des Graphen, der an der Stelle der detektierten Proteinbande liegt.

So gingen wir sowohl für die einzelnen Proteine als auch für β -Aktin, das wir als Referenz immer mitbestimmen, vor.

Die Daten wurden in eine Microsoft Excel-Tabelle übertragen und für jedes Protein das Verhältnis zwischen der Graufäche des Proteins und der entsprechenden Graufäche des β -Aktins in derselben Probe berechnet.

Die Aktivitätslevel der Proteine von Interesse (also die Phosphorylierungsgrade) wurden nach Normalisierung auf die Gesamtmenge an Protein errechnet.

2.2.4 RT-PCR

Die RT-PCR nutzten wir, um einen Eindruck vom inflammatorischen Status im Gewebe zu erhalten. Zur Beurteilung der pro- und antiinflammatorischen Aktivität im Hirn wählten wir je vier bzw. drei repräsentative Zytokine aus: IL-1 β , IL-6, IL-12 und iNOS sowie Arg1, CD206 und TGF β , die als prototypische pro- bzw. antiinflammatorische Zytokine gelten und wichtige Funktionen in der Regulation der Immunantwort nach HIE übernehmen. (Fleiss et al., 2021; Leavy und Jimenez Mateos, 2020; Weichhart et al., 2015)

RNA-Isolierung aus den Gewebeproben (s.a. Anhang: Protokolle)

Die RNA-Isolierung und die Reverse Transkription erfolgten nach dem Protokoll des RNeasy Mini Kit.

Die gefrorenen Proben aus dem Kortex bzw. Hippocampus der Versuchstiere wurden mit je 600 μ l RLT-Puffer, dem im Verhältnis 1:100 β -Mercaptoethanol zugesetzt wurde, versetzt und mithilfe von Beads in einem Gewebehomogenisierer zerstört und homogenisiert. Das Lysat wurde zentrifugiert und der Überstand für die weitere Analyse abgenommen. Nach Zugabe von je 600 μ l 70 %igem Ethanol wurde dieser für 30 s mit 10.000 rpm in einer RNeasy-Spin-Säule zentrifugiert und die Membran in der Säule, auf der die RNA verblieben ist, in mehreren Schritten gewaschen. Die lange Zentrifugierzeit im letzten Waschschritt sorgt hierbei dafür, dass die Membran trocknet und somit kein verbleibendes Ethanol die Reaktionen im Folgenden beeinflusst.

Im folgenden Schritt wurde in einer neuen Sammelröhre die RNA mit RNase-freiem Wasser die RNA aus der Membran ausgewaschen. Es erfolgte eine Messung der RNA-Konzentration und anschließende Lagerung bei -20°C bis zur Reversen Transkription.

Reverse Transkription

2 μ g der RNA wurden jeweils transkribiert. Hierzu wurde das benötigte Volumen RNA mit RNA-freiem Wasser auf 10 μ l ergänzt und auf eine 96-well-Reaktionsplatte pipettiert. Dazu hinzugefügt wurden je 10 μ l Master-Mix, der wie folgt zusammengesetzt war:

- 2,0 μ l 10 X RT-Puffer
- 0,8 μ l 25 X dNTP-Mix (100mM): Die Desoxyribonukleotide lagern sich an die komplementären Basen der RNA an und dienen zur Synthese der cDNA.

- 2,0 µl 10 X Zufallsprimer: Die Primer sind zur Initiation der cDNA-Synthese durch die Reverse Transkriptase nötig.
- 1,0 µl MultiScribe™ Reverse Transkriptase: Diese synthetisiert enzymatisch die cDNA aus den an die RNA angelagerten dNTPs.
- 1,0 µl Rnase-Inhibitor: Dieser schützt die RNA vor RNAsen.
- 3,2 µl RNase-freies Wasser.

Die Reaktionsplatten wurden kurz zentrifugiert; im Anschluss fand die Reverse Transkription im ThermoCycler statt:

1. DNA-Polymerisierung: 25°C, 10 min
2. Reverse Transkription: 37°C, 120 min
3. Deaktivierung der Reversen Transkriptase: 85°C, 5 min
4. 4°C

Die fertige (einsträngige) cDNA wurde bei -20°C bis zur eigentlichen Polymerase-Kettenreaktion gelagert.

Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) erfolgte nach dem Protokoll TaqMan® Gene Expression Assays – single-tube assays der Firma ThermoFisher Scientific.

In eine 384-well-Platte wurden je 9 µl PCR-Reaktionsmix, bestehend aus 5 µl Master Mix (2X), 0,5 µl TaqMan® Gene Expression Assay (20 X) und 3,5 µl Nuclease-freiem Wasser, pipettiert und 1 µl der vorbereiteten cDNA hinzugegeben. Die Platte wurde verschlossen und kurz gevortext und zentrifugiert. Zur RNA-Amplifikation wurden die Proben nun für 20 s auf 95°C erhitzt, um die Enzyme zu aktivieren, und anschließend in 40 Zyklen erst für 1 s bei 95°C die cDNA und RNA denaturiert und dann die RNA-Kette für 20 s bei 60°C verlängert.

2.2.5 Statistik

Zum Berechnen der finalen Ergebnisse verwendeten wir Microsoft Excel.

Die statistische Analyse und graphische Darstellung erfolgte mittels zweifacher Varianzanalyse (2-way-ANOVA) und anschließendem Tukey-Mehrfachvergleichstest mithilfe des Programms GraphPad Prism9.

2.3 Weiterführung des Projekts

Die AG Sabir hat zur Ergänzung der vorliegenden Arbeit weitere Analysen zu anderen Zeitpunkten und unter Zugabe verschiedener Agenzien zur Beeinflussung des mTOR-Signalwegs (Compound C, einem AMPK-Inhibitor, und Rapamycin) durchgeführt. Die Ergebnisse wurden am 01.01.2025 unter dem Titel „The Neuroprotective Effects of Caffeine in a Neonatal Hypoxia-Ischemia Model are Regulated through the AMPK/mTOR Pathway“ von Bernis et al. im International Journal of Biological Sciences publiziert. (Bernis et al., 2025)

3. Ergebnisse

3.1 Einfluss des hypoxisch-ischämischen Insults und therapeutischer Hypothermie auf den mTOR-Signalweg

3.1.1 Regulation von Akt, mTOR, S6 und 4E-BP1

Um den mTOR-Signalweg zu analysieren, führten wir Western Blots von Proben aus Kortex und Hippocampus der behandelten Ratten durch, deren Hirne 6 bzw. 24 h nach dem Insult entnommen worden waren. Wir normalisierten die Menge an phosphoryliertem Protein auf die Gesamtmenge des entsprechenden Proteins, um einen Eindruck vom Aktivierungsstatus der intrazellulären Signalmoleküle zu erlangen.

Zunächst analysierten wir einen charakteristischen Haupt-Regulator stromaufwärts von mTOR, Akt. Akt ist einer der wichtigsten Regulatoren stromaufwärts von mTORC1. (Hay und Sonenberg, 2004) Wir beobachteten im Kortex nach HI und NT eine leicht, aber nicht signifikant verminderte Phosphorylierung; im Hippocampus zeigte sich jedoch keine Veränderung. Abb. 7 zeigt eine quantitative Analyse der p-Akt/Akt-Ratio im Kortex (A) bzw. Hippocampus (C) nach 6 und 24 h sowie zugehörige repräsentative Western-Blot-Banden (B, D).

Es wurde gezeigt, dass Akt kein spezifischer Aktivator von mTOR ist, sondern eine Wirkung auf eine Vielzahl intrazellulärer Proteine hat. (Saxton und Sabatini, 2017; Xu et al., 2020) Außerdem besitzt mTOR außer Akt noch viele weitere Regulatoren stromaufwärts, sodass sich aus einer geringen Akt-Veränderung nicht automatisch auch ein fehlender Einfluss der HI auf die mTOR-Aktivierung schlussfolgern lässt. (Saxton und Sabatini, 2017) Aus diesem Grund fokussierten wir unsere Analysen auf die Aktivierung von mTOR selbst und auf durch mTOR regulierte Proteine stromabwärts im Signalweg, wie S6 und 4E-BP1, nach den verschiedenen Behandlungen.

Zunächst analysierten wir mTOR selbst in beiden Arealen. Hierfür beobachteten wir sowohl im Kortex als auch im Hippocampus eine deutliche Inhibition nach HI und NT verglichen mit der Kontrollgruppe. Diese war statistisch signifikant im Kortex nach 6h (Ctx 6h sham vs. NT: $P=0,0140$) und im Hippocampus nach 24 h (Hip 24 h sham vs. NT:

$P=0,0306$). Auch zu den jeweils anderen Zeitpunkten zeigte sich die Phosphorylierung von mTOR reduziert; bedingt durch eine (bekannte) hohe Variabilität in der Kontrollgruppe konnten wir hier jedoch keine Signifikanz nachweisen (Ctx 24 h sham vs. NT: $P=0,1348$ und mit Hip 6 h sham vs. NT: $P=0,1501$). (vgl. Abb. 8)

Wir betrachteten in unseren Untersuchungen außerdem Regulatorproteine stromabwärts im mTOR-Signalweg, S6 und 4E-BP1. Hier zeigten unsere Ergebnisse nach 6 und 24 h in keinem der Areale eine Veränderung im Phosphorylierungslevel. Die Resultate aus der Western-Blot-Analyse von S6 und 4E-BP1 zeigen Abb. 9 und Abb. 11.

Diese Ergebnisse bestätigten wir mittels immunhistochemischer Färbung der Gewebeschnitte: Wie erwartet konnten wir hier ebenfalls keine deutlichen Veränderungen nach HI, weder im Kortex noch im Hippocampus, beobachten. Abb. 10 zeigt eine repräsentative Färbung der ipsilateralen Hemisphäre, mit positiver Färbung von phosphoryliertem S6 in grün und Färbung der Zellkerne in blau.

3.1.2 Einfluss der Hypothermie-Behandlung auf den mTOR-Signalweg

Für keins der in unserem Projekt analysierten Proteine ließ sich eine signifikante Änderung der Aktivität nach hypothermischer Behandlung im Vergleich zur Normothermie nachweisen.

Im Kortex zeigte sich eine sichtbar verminderte Aktivität für Akt nach 6 h (nicht signifikant: Ctx 6 h NT vs. HT: $P=0,1390$), die im Vergleich zur Kontrolle signifikant war (Ctx 6 h sham vs. HT: $P=0,0203$). (vgl. Abb. 7)

Auch der p-mTOR/mTOR-Quotient war hier verglichen mit der NT-Gruppe nach 6 h unverändert und nach 24 h sichtbar reduziert (Ctx 24 h NT vs. HT: $P=0,3513$ (nicht signifikant), sham vs. HT: $P=0,0074$). (vgl. Abb. 8)

Eine Tendenz zu einem ähnlichen Effekt wie auf mTOR ließ sich bei 4E-BP1 erkennen (s. A); in der Aktivierung von S6 beobachteten wir jedoch keine Veränderungen. (vgl. Abb. 11 A)

Im Hippocampus übte HT verglichen mit NT zu den beobachteten Zeitpunkten keinen Einfluss auf die Phosphorylierung der Proteine des Signalwegs aus.

Diese Daten wurden durch die immunhistochemische Färbung bestätigt: Auch hier beobachteten wir keine Veränderungen im Aktivierungslevel von S6 in keinem der Areale (Abb. 10).

Damit lässt sich festhalten, dass die Hypothermie-Behandlung zu den beobachteten Zeitpunkten in unserem Versuch nur zu einer geringen Veränderung im Phosphorylierungsstatus der betrachteten Proteine des mTOR-Signalwegs führt. Allerdings zeigt sich speziell im Kortex nach 6 und 24 h eine Tendenz, dass HT die Inhibition von mTOR und Akt durch HI noch verstärkt; einen geringen Einfluss übt HT also trotzdem möglicherweise aus. Dies unterstreicht die Notwendigkeit, den Signalweg in Zukunft zu anderen Zeitpunkten noch genauer zu analysieren.

3.2 Einfluss von Hypoxie-Ischämie und normo- bzw. hypothermischer Behandlung auf die Autophagieleistung

Eine wichtige Zellfunktion, in die mTOR involviert ist, ist die Regulation von Autophagie. Wir analysierten in unseren Proben p62, eins der Proteine, die bei der Bildung des Autophagosoms involviert sind. Dieses wird bei erfolgreicher Autophagie mit abgebaut, ist also umso weniger in den Zellen zu finden, je stärker die Autophagieleistung ist.

Der hypoxisch-ischämische Insult führte zu einer verstärkten Autophagie, die sich in einer Reduktion des p62 zeigte. Diese Beobachtung war im Hippocampus nur nach 6 h (Hip 6 h sham vs. NT: $P=0,0251$) im Kortex jedoch zu beiden Zeitpunkten hoch signifikant (Ctx 6 h sham vs. NT: $P=0,0043$; 24 h sham vs. NT: $P=0,0012$). Die quantitative Western-Blot-Analyse von p62 ist in Abb. 12 graphisch (A: Kortex, C: Hippocampus) und mit repräsentativen Banden (B, D) zu sehen.

Nach hypothermischer Behandlung war p62 im Kortex nach HT im Vergleich zu NT zu beiden Zeitpunkten leicht, jedoch nicht signifikant erhöht; es erreichte dabei nicht wieder Kontrollniveau. Im Hippocampus beeinflusste die Behandlung die Autophagie zu den untersuchten Zeitpunkten nicht.

Auch in der immunhistochemischen Färbung erhielten wir eine positive Färbung für p62 in den untersuchten Arealen. Dies bestätigt, dass in den betroffenen Bereichen, Kortex und Hippocampus, Autophagie stattfindet. (vgl. Abb. 13)

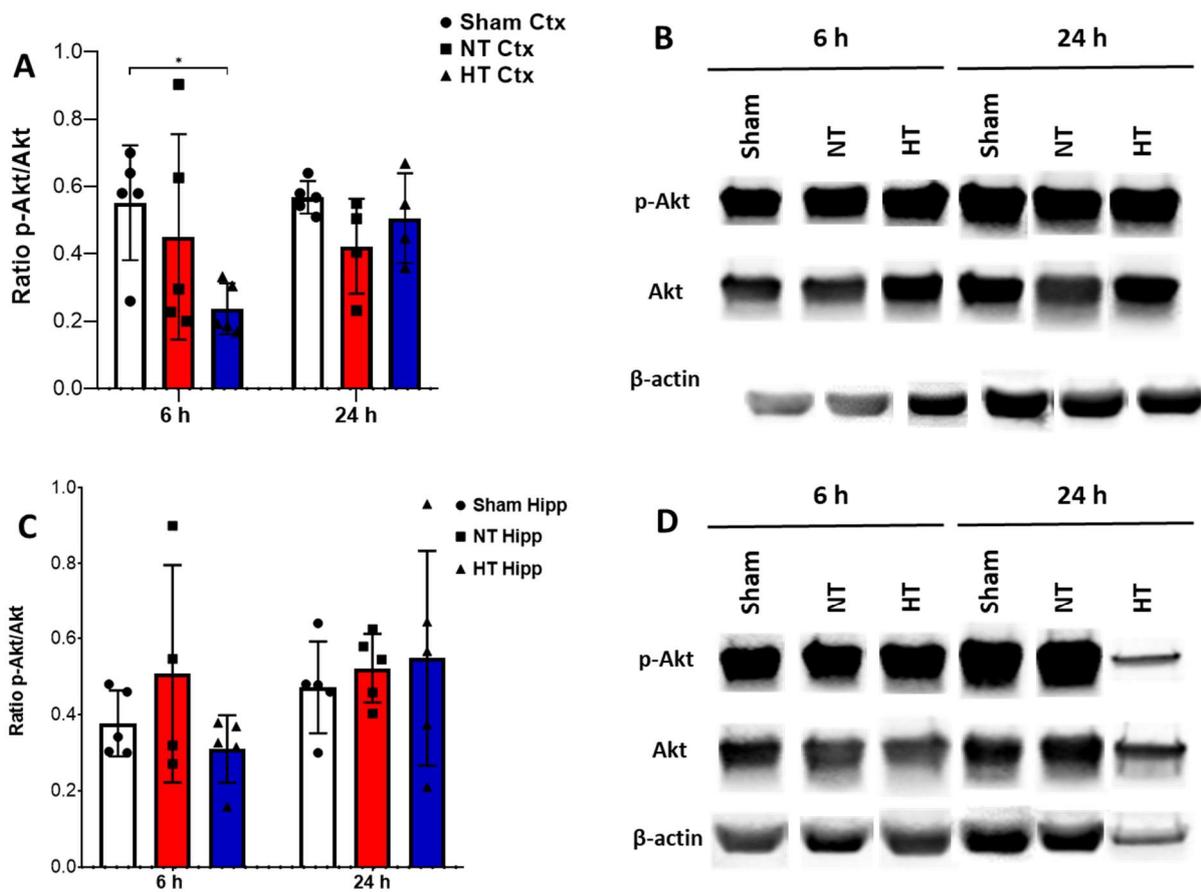


Abb. 7: Regulation von Akt nach HI und NT/HT

A, C: quantitative Analyse von p-Akt normalisiert gegen Akt. β -Aktin diente als Ladungskontrolle. **A:** Kortex: sichtbare Reduktion von p-Akt nach NT nach 6 und 24 h; signifikante ($P=0,0203$ vs. sham) Reduktion 6 h nach HT bei annähernder Normalisierung auf Kontrolllevel nach 24 h. **C:** Hippocampus: sichtbare Erhöhung von p-Akt/Akt 6 h nach NT, Normalisierung auf Kontrolllevel durch HT. Keine Veränderung nach 24 h. **B, D:** Repräsentative Western-Blot-Proteinbanden der Kontroll- sowie Interventionsgruppe. (**B:** Kortex, **D:** Hippocampus)

Zweifache Varianzanalyse, Tukey-Mehrfachvergleichstest. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$. $n=5$ pro Kondition und Zeitpunkt

Ctx: Kortex, Hipp: Hippocampus, HI: Hypoxie-Ischämie, HT: Hypothermie, NT: Normothermie, p-Akt: Phospho-Akt

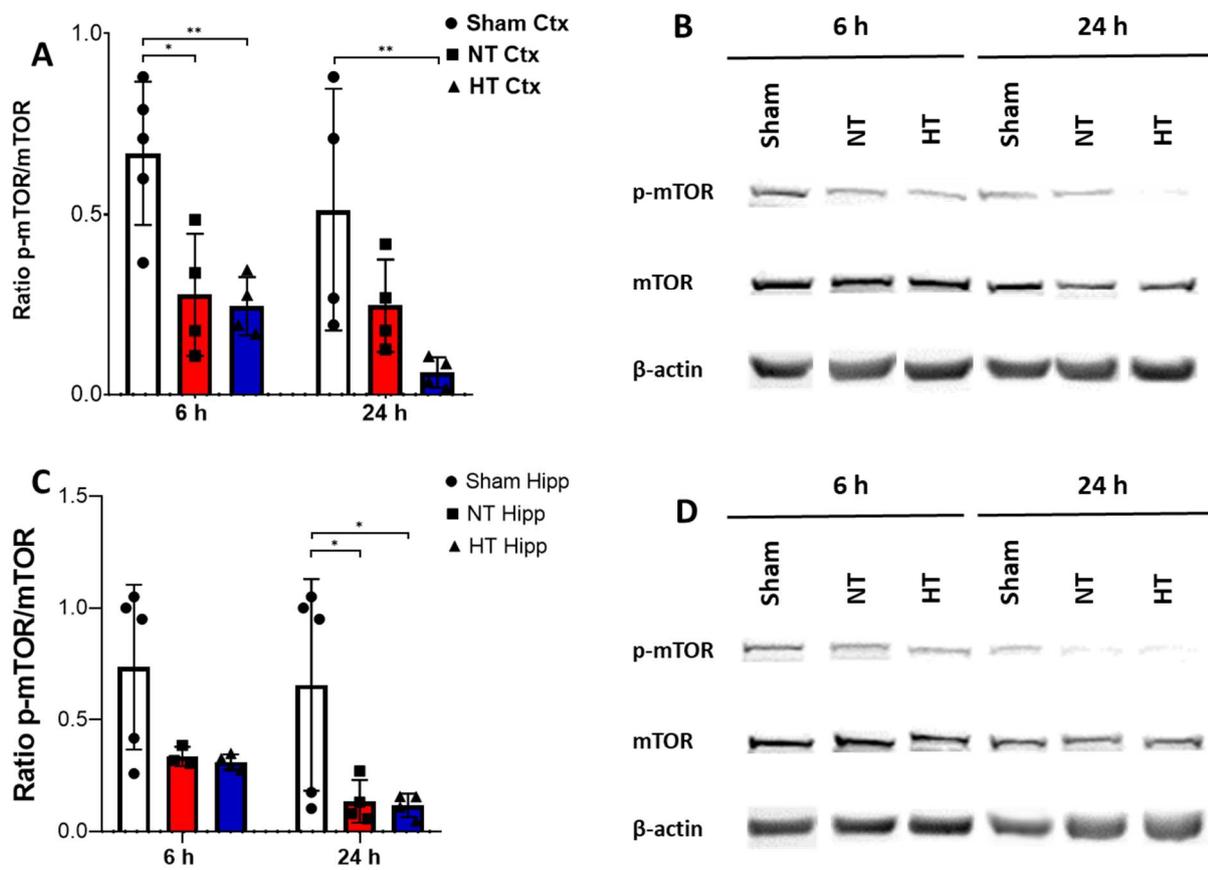


Abb. 8: Regulation von mTOR nach HI und NT/HT

A, C: quantitative Analyse von p-mTOR normalisiert gegen mTOR. β -Aktin diente als Ladungskontrolle. **A:** Kortex: signifikante ($P=0,1040$ vs. sham) bzw. sichtbare Reduktion von p-mTOR 6 und 24 h nach NT. Signifikante ($P=0,0080$ vs. sham nach 6 h, $P=0,0074$ vs. sham nach 24 h) Reduktion durch HT, wobei das p-mTOR/mTOR-Level nach 6 h gleich dem nach NT ist, nach 24 h sichtbar reduziert. **C:** Hippocampus: sichtbare Reduktion 6 h nach HI, signifikante ($P=0,0306$ NT vs. sham, $P=0,0251$ HT vs. sham) Reduktion 24 h nach HI. Keine Unterschiede zwischen NT- und HT-Behandlung. **B, D:** Repräsentative Western-Blot-Proteinbanden der Kontroll- sowie Interventionsgruppe. (**B:** Kortex, **D:** Hippocampus)

Zweifache Varianzanalyse, Tukey-Mehrfachvergleichstest. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$. $n=5$ pro Kondition und Zeitpunkt

Ctx: Kortex, Hipp: Hippocampus, HI: Hypoxie-Ischämie, HT: Hypothermie, mTOR: mammalian Target of Rapamycin, NT: Normothermie, p-mTOR: Phospho-mTOR

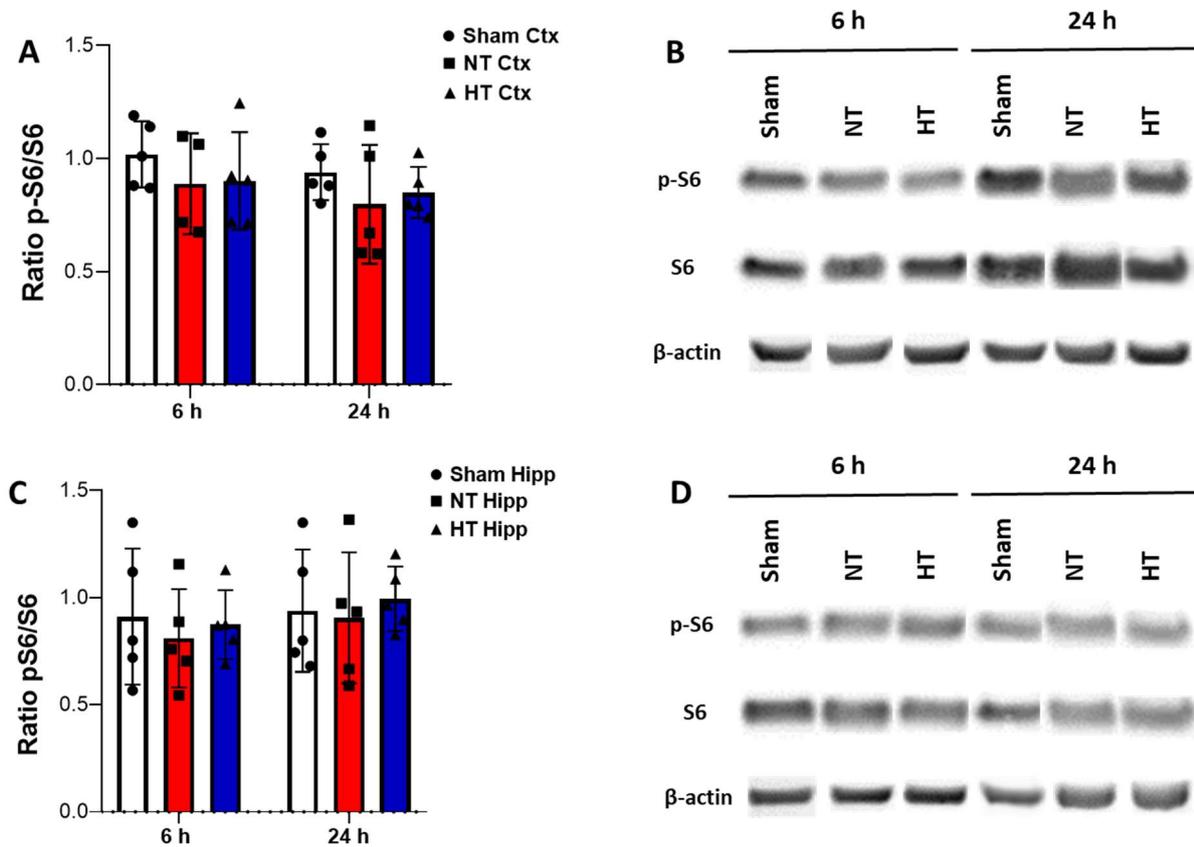


Abb. 9: Regulation von S6 nach HI und NT/HT

A, C: quantitative Analyse von p-S6 normalisiert gegen S6. β -Aktin diente als Ladungskontrolle. Keine deutliche Veränderung durch HI, tendenzielle Verminderung durch NT bei leichter Kompensation durch HT in beiden Arealen **A:** Kortex **C:** Hippocampus **B, D:** Repräsentative Western-Blot-Proteinbanden der Kontroll- sowie Interventionsgruppe. (**B:** Kortex, **D:** Hippocampus)

Zweifache Varianzanalyse, Tukey-Mehrfachvergleichstest. n=5 pro Kondition und Zeitpunkt

Ctx: Kortex, Hipp: Hippocampus, HI: Hypoxie-Ischämie, HT: Hypothermie, NT: Normothermie, p-S6: Phospho-S6

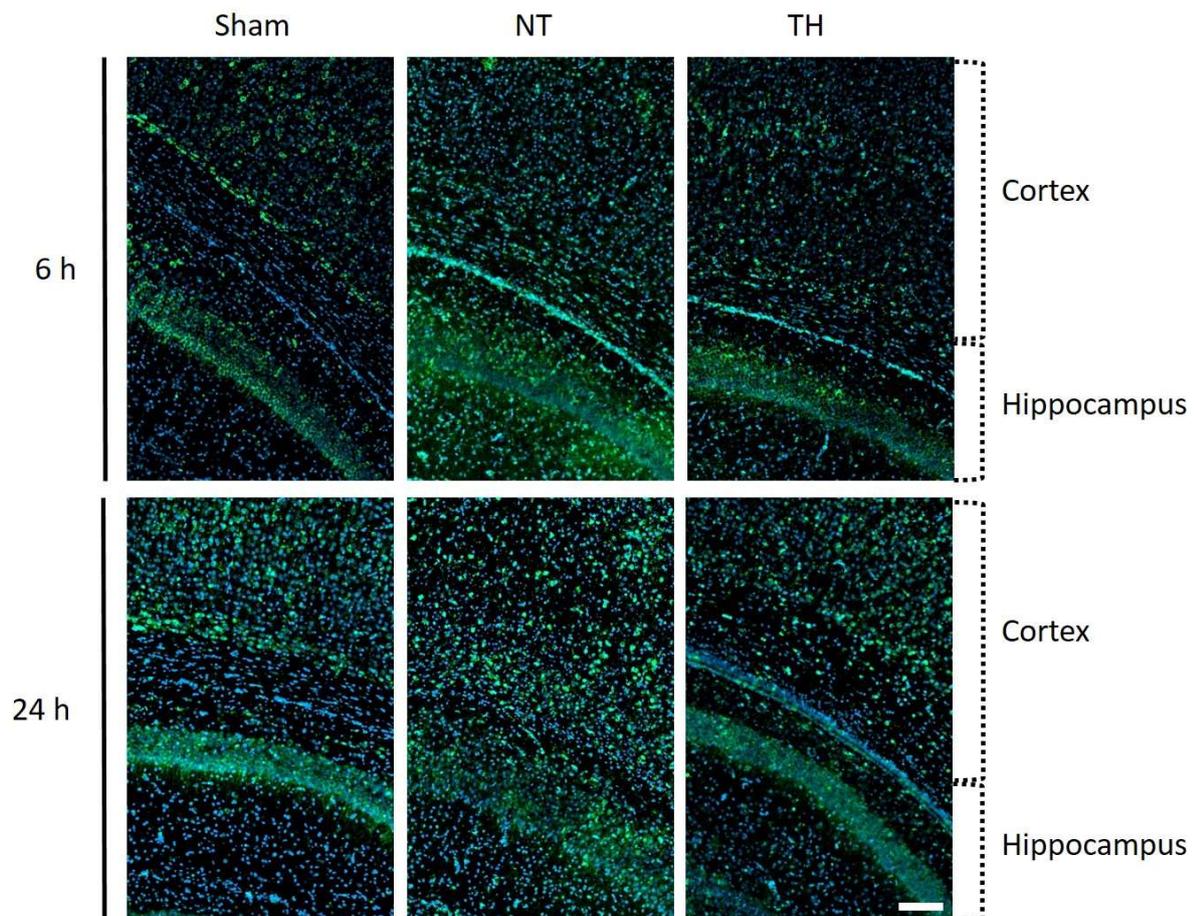


Abb. 10: p-S6 nach HI und NT/HT

Immunohistochemische Färbungen gegen p-S6 (grün) und DAPI (blau) als Zellkernmarker

Keine wesentlichen Veränderungen in der Färbungsintensität nach NT oder HT zu beiden Zeitpunkten. Tendenziell leichte Abnahme nach NT nach 6 h im Kortex und nach 24 h im Hippocampus, die durch HT wieder aufgehoben werden.

Maßstabsleiste 50 µm

Ctx: Kortex, Hipp: Hippocampus, HI: Hypoxie-Ischämie, HT: Hypothermie, NT: Normothermie, TH: therapeutische Hypothermie, p-S6: Phospho-S6

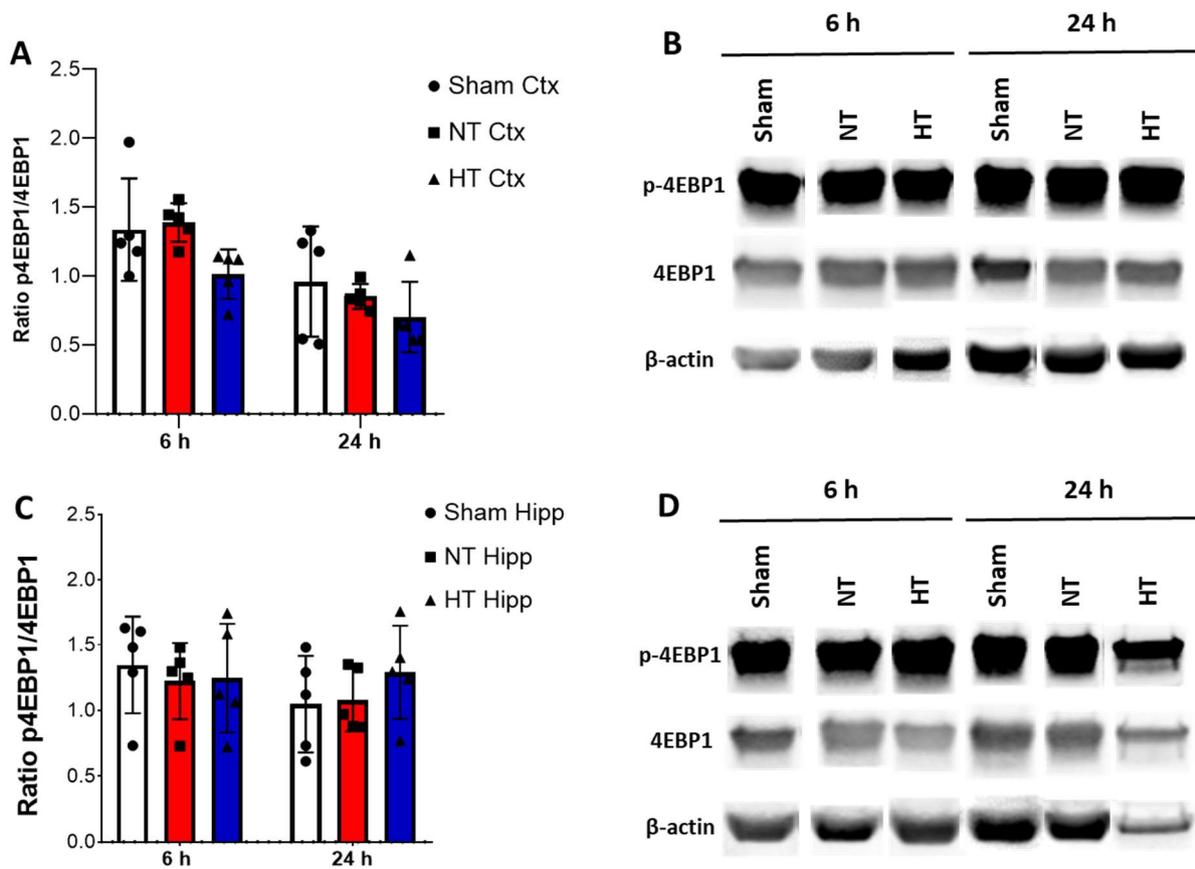


Abb. 11: Regulation von 4E-BP1 nach HI und NT/HT

A, C: quantitative Analyse von p-4E-BP1 normalisiert gegen 4E-BP1. β -Aktin diente als Ladungskontrolle. **A:** Kortex: keine Veränderung (oder tendenziell leichte Erhöhung nach 6 h) nach NT, sichtbare Reduktion 6 und 24 h nach HT. **C:** Hippocampus: keine Veränderung nach NT, sichtbare Erhöhung 24 h nach HT. **B, D:** Repräsentative Western-Blot-Proteinbanden der Kontroll- sowie Interventionsgruppe. (**B:** Kortex, **D:** Hippocampus) Zweifache Varianzanalyse, Tukey-Mehrfachvergleichstest. $n=5$ pro Kondition und Zeitpunkt

4E-BP1: eukaryotischen Initiationsfaktor 4E-bindendes Protein 1, Ctx: Kortex, Hipp: Hippocampus, HI: Hypoxie-Ischämie, HT: Hypothermie, NT: Normothermie, p-S6: Phospho-4E-BP1

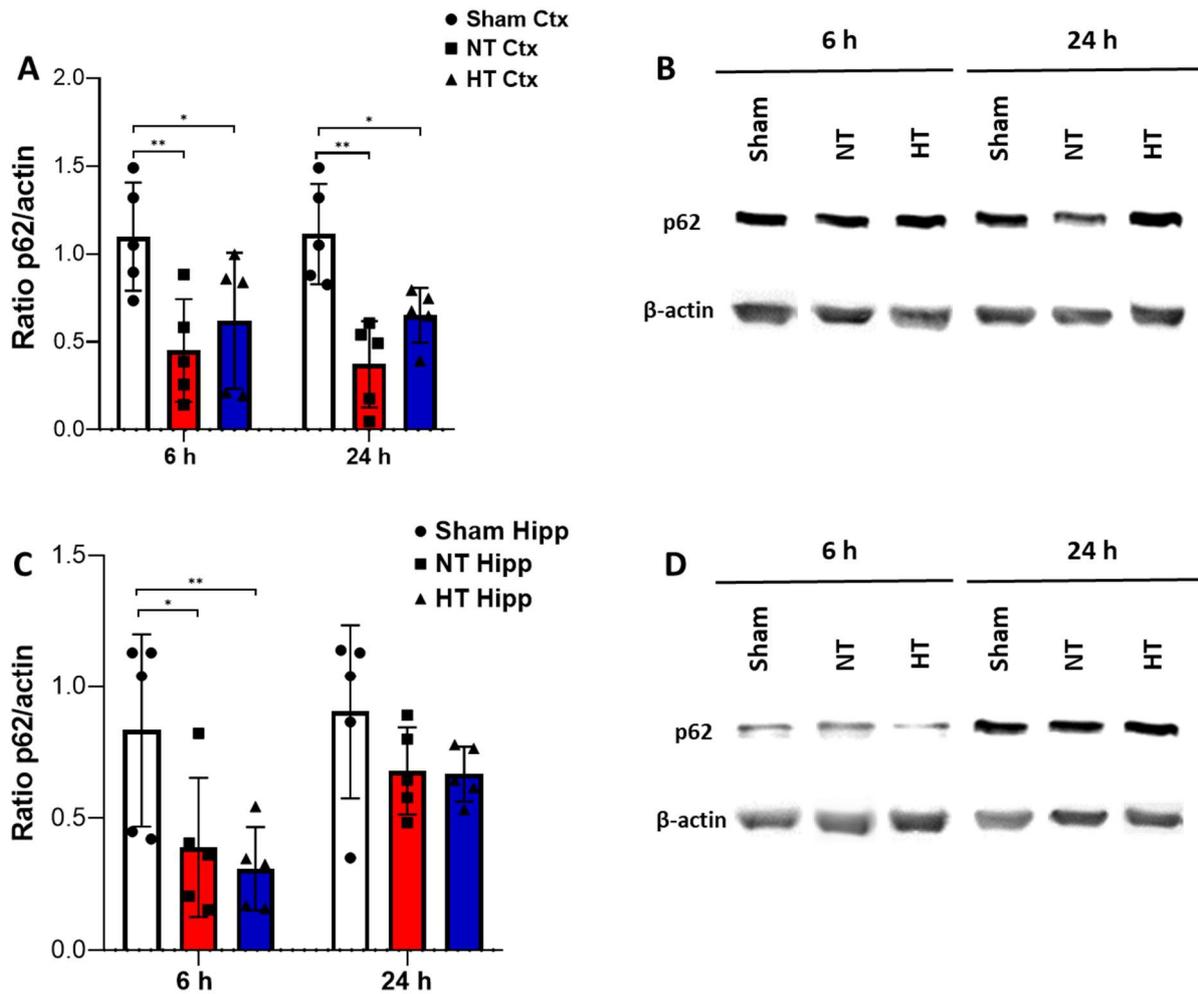


Abb. 12: p62 nach HI und NT/HT

Western Blot von p-P62 und P62.

A, C: p-P62/P62 normalisiert auf β-Aktin. **A:** Kortex: signifikante ($P=0,0043$ nach 6 h, $P=0,0012$ nach 24 h) Reduktion nach HT. Sichtbare teilweise Erholung durch HT i. Vgl. zu NT, wobei das Level i. Vgl. zur Kontrolle immer noch signifikant ($P=0,0377$ nach 6 h, $P=0,0456$ nach 24 h) vermindert ist. **C:** Hippocampus: signifikante ($P=0,0251$ NT vs. sham, $P=0,0077$ HT vs. sham) nach 6 h bzw. sichtbare Reduktion 24 h nach HI. Kein Unterschied zwischen NT- und HT-Behandlung. **B, D:** Repräsentative Western-Blot-Proteinbanden der Kontroll- sowie Interventionsgruppe. (**B:** Kortex, **D:** Hippocampus) Zweifache Varianzanalyse, Tukey-Mehrfachvergleichstest. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$. $n=5$ pro Kondition und Zeitpunkt

Ctx: Kortex, Hipp: Hippocampus, HI: Hypoxie-Ischämie, HT: Hypothermie, NT: Normothermie,

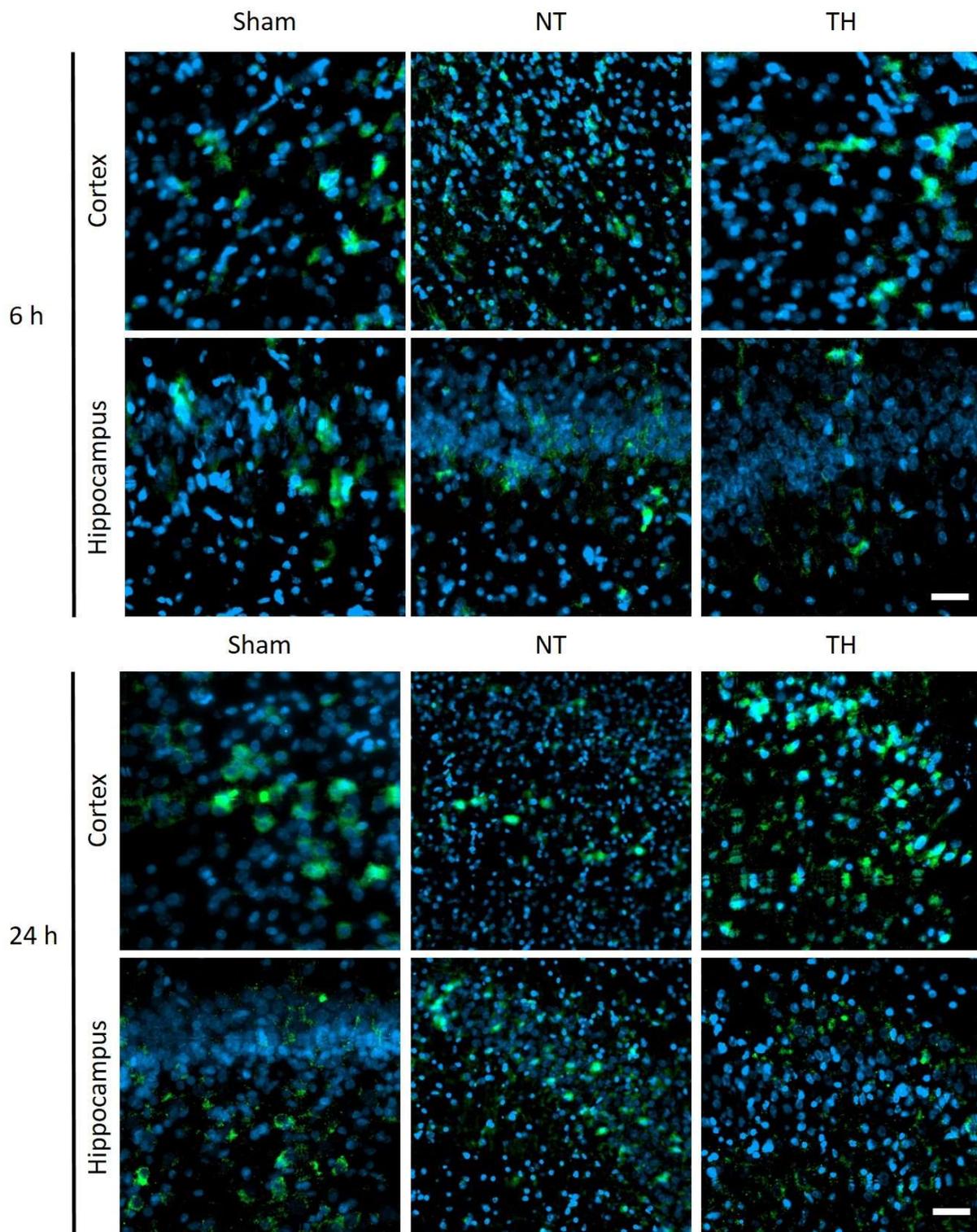


Abb. 13: p62 nach HI und NT/HT

Immunohistochemische Färbungen gegen p62 (grün) und DAPI (blau) als Zellkernmarker
 Abnahme der angefärbten Zellen 24 h nach NT im Kortex, die durch HT aufgehoben und
 über Kontrollniveau verstärkt wird. Im Kortex etwa gleichbleibende Färbung 6 und leicht
 verstärkte Färbung 6 und leicht verstärkte Färbung 24 h nach NT, die durch HT geschwächt wird.

Maßstabsleiste 20 µm

Ctx: Kortex, Hipp: Hippocampus, HI: Hypoxie-Ischämie, HT: Hypothermie, NT: Normo-
 thermie, TH: therapeutische Hypothermie

3.3 Entzündungsreaktion nach HI und deren Beeinflussung durch th-HT

Die Entzündungsreaktion spielt in der Pathogenese der neonatalen HIE eine zentrale Rolle. In deren Regulation ist unter anderem mTOR involviert.

Um den pro- oder antiinflammatorischen Status der Zellen in den jeweiligen Arealen einschätzen zu können, quantifizierten wir mittels RT-PCR die mRNA verschiedener beispielhafter pro- (IL-1 β , IL-6, IL-12, iNOS) und antiinflammatorischer Zytokine (Arg1, CD206, TGF- β).

Nach Hypoxie-Ischämie und normothermischer Behandlung konnten wir eine starke Entzündungsreaktion beobachten; der Zytokinsturm betraf hierbei sowohl pro- als auch antiinflammatorische Zytokine im Kortex sowie proinflammatorische im Hippocampus.

In Abb. 14 sind die relativen Veränderungen der Genexpression („fold change“) der ausgewählten proinflammatorischen Zytokine in Kortex (A, C, E, G) und Hippocampus (B, D, F, H) aus der RT-PCR graphisch dargestellt. Im Kortex zeigte sich 6 und 24 h nach HI und NT eine deutlich signifikante Erhöhung der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und IL-6 im Vergleich zur Kontrollgruppe (IL-1 β Ctx 6 h NT vs. sham: $P=0,0136$, 24 h NT vs. sham: $P <0,0001$; IL-6 Ctx NT vs. sham: $P <0,0001$, 24 h: $P=0,0006$). Die Genexpression von IL-12 war nach 6 h leicht erhöht, nach 24 h signifikant vermindert (24 h sham vs. NT: $P=0,0259$); die von iNOS zu beiden Zeitpunkten war sichtbar leicht, jedoch nicht signifikant erhöht.

Im zeitlichen Verlauf war diese Entzündungsreaktion allgemein etwa gleichbleibend bis leicht zunehmend (Zunahme bei IL-1 β , leichte Abnahme bei IL-12).

Im Hippocampus ließ sich ein etwas anderer Verlauf erkennen: Hier fand sich für IL-1 β keine Veränderung 6 h und eine sichtbare Erhöhung 24 h nach NT. Die Genexpression von IL-6 war zu beiden Zeitpunkten signifikant verstärkt (Hip 6 h und 24 h sham vs. NT: beide $P <0,0001$). IL-12 war nach 6 h ebenfalls signifikant heraufreguliert (IL-12 Hip 6 h sham vs. NT: $P <0,0001$), wies nach 24 h jedoch sogar ein vermindertes Genexpressionslevel im Vergleich zur Kontrollgruppe auf. Ein ähnliches Bild (sichtbare Verstärkung nach 6 und Verminderung nach 24 h) bot sich für iNOS.

Die Entzündungsreaktion lief im Hippocampus also allgemein früher und etwas schwächer als im Kortex ab.

Für alle betrachteten antiinflammatorischen Zytokine mit Ausnahme von Arg1 nach 24 h zeigte sich eine signifikant vermehrte Genexpression nach HI und NT im Kortex (Arg1 Ctx 6 h sham vs. NT: $P=0,0122$; CD206 6 h: $P=0,0064$, 24 h: $P=0,0004$; TGF β 6 h: $P=0,0003$, 24 h: $P=0,0002$). Arg1-mRNA war nach 24 h im Vergleich zur Kontrolle vermindert exprimiert (Arg1 Ctx 24 h sham vs. NT: $P=0,0177$).

Währenddessen fand im Hippocampus größtenteils keine Veränderung der Genexpression antiinflammatorischer Zytokine 6 bzw. 24 h nach NT statt, allein Arg1 war auch hier nach 24 h signifikant reduziert (Arg1 Hip 24 h sham vs. NT: $P=0,0488$), TGF- β nach 6 h sichtbar erhöht. Die Ergebnisse der RT-PCR-Analyse der antiinflammatorischen Zytokine ist in Abb. 15 zu sehen.

Es lässt sich zusammenfassen, dass wir nach HI und NT einen stattfindenden Zytokin-sturm mit Betonung der proinflammatorischen Zytokine in beiden Arealen beobachten, wobei interessanterweise der Hippocampus zu den beobachteten Zeitpunkten überhaupt keine Expression antiinflammatorischer Zytokine zeigt.

Die Hypothermie-Behandlung übte, verglichen mit der NT-Gruppe, einen starken Einfluss auf die pro- und antiinflammatorische Genexpression aus:

Im Kortex beobachteten wir nach 6 h eine hoch signifikante Erhöhung der Genexpression von IL-1 β (Ctx 6 h sham vs. HT: $P < 0,0001$, NT vs. HT: $P < 0,0001$). IL-6 und IL-12 waren zu dem Zeitpunkt im Vergleich zur NT-Gruppe vermindert (IL-6 Ctx 6 h NT vs. HT: $P=0,0021$, IL-12 sichtbar) und erreichten damit wieder ungefähr Kontrollniveau, während die mRNA von iNOS im Vergleich zu NT sichtbar und im Vergleich zur Kontrolle signifikant (Ctx 6 h sham vs. HT: $P=0,0026$) vermehrt exprimiert wurde. Demgegenüber zeigte sich die Genexpression von IL-1 β nach 24 h im Vergleich zu NT hoch signifikant vermindert (Ctx 24 h NT vs. HT: $P < 0,0001$). Auf das mRNA-Level von IL-6 und IL-12 übte HT nach 24 h keine Wirkung aus, das von iNOS lag deutlich erhöht vor (Ctx 24 h NT vs. HT: $P < 0,0001$). (vgl. Abb. 14 A, C, E, G)

Für die antiinflammatorischen Zytokine ließ sich im Kortex erkennen, dass sie zu beiden Zeitpunkten zu einer Reduktion der Genexpression aller Zytokine mit Ausnahme von Arg1 nach 24 h führte, die immer in einem etwa Kontrollniveau entsprechenden Level zu beiden

Zeitpunkten resultierte. Diese Abmilderung war verglichen mit der NT-Gruppe in allen Fällen signifikant (Arg Ctx 6 h HT vs. NT: $P=0,0331$, CD206 6 h: $P=0,0105$, 24 h: $P=0,0001$, TGF β 6 h: $P=0,0183$, 24 h: $P=0,0006$); die Erhöhung von Arg1 nach 24 h sichtbar. (vgl. Abb. 15 A, C, E)

Im Hippocampus fand nach 6 und 24 h teils eine Verstärkung, teils eine Abmilderung der Entzündungsreaktion nach HT statt: IL-1 β und IL-6 zeigten 6 h nach HT eine hoch signifikant verstärkte Genexpression auf (IL-1 β und IL-6 hip 6 h NT vs. HT: beide $P < 0,0001$), während diese für IL-12 und iNOS vermindert war (IL-12 Hip 24 h NT vs. HT: $=P < 0,0001$; iNOS sichtbar), sodass das Level der mRNA dieser beiden Zytokine Kontrollniveau entsprach. Nach 24 h war die Genexpression aller proinflammatorischen Zytokine nach HT etwa auf Kontrollniveau. Dies entsprach einer Verminderung im Vergleich zu NT für IL-1 β und IL-6 (IL-1 β sichtbar; IL-6 hip 24 h NT vs. HT: $P=0,0004$) und einer Steigerung für IL-12 und iNOS (IL-12 Hip 24 h NT vs. HT: $P=0,0263$; iNOS sichtbar). Insgesamt führte HT im Hippocampus also, mit Ausnahme von IL-1 β und IL-6 nach 6 h, zu beiden Zeitpunkten zu einer Angleichung der Genexpression proinflammatorischer Zytokine an das Kontrolllevel. (vgl. Abb. 14 B, D, F, H)

Die antiinflammatorischen Zytokine zeigten hier nach 6 h keine Veränderung verglichen mit der NT-Gruppe und waren so ebenfalls auf deren Kontrolllevel. Nach 24 h konnten wir durchgehend eine Erhöhung der Genexpression beobachten (Arg1 Hip 24 h NT vs. HT: $P=0,0147$; CD206: $P < 0,0001$; TGF β sichtbar), was zu einer gleichen (Arg1) bzw. erhöhten Expression gegenüber der Kontrolle (CD206, TGF β) führte. (vgl. Abb. 15 B, D, F)

Zusammenfassend können wir festhalten, dass die Hypothermie-Behandlung den Verlauf der Entzündungsreaktion nach Hypoxie-Ischämie im neonatalen Hirn stark beeinflusste: Im Hinblick auf die proinflammatorische Genexpression hatte sie arealspezifisch und abhängig vom Zytokin einen deutlichen Einfluss. Im Hippocampus führte sie nach 24 h durchgehend zu einer Angleichung des RNA-Levels an die Kontrolle.

Diese Angleichung an die Kontrollgruppe konnten wir im Kortex für alle antiinflammatorischen Zytokine zu beiden Zeitpunkten beobachten. Im Hippocampus war die antiinflammatorische Genexpression 6 h nach HT unverändert, nach 24 h führte diese Behandlung hier gegenüber NT zu einer deutlichen Verstärkung.

Eine erhöhte Expression der mRNA von Zytokinen muss jedoch nicht zwangsläufig auch zur tatsächlichen Expression der jeweiligen Proteine und deren Ausschüttung führen. Dies eröffnet der Zelle eine Vielzahl an Möglichkeiten, die Zytokinantwort weiter und genauer zu modulieren (translationale Kontrolle).

Da die Genexpression also nicht immer dem tatsächlichen Proteom entspricht, überprüfen wir unsere Ergebnisse mittels Western Blot beispielhaft an iNOS und CD206. Hier konnten wir die deutliche Diskordanz zwischen Genexpressionslevel und dem tatsächlichen Proteom in den Proben bestätigen (Abb. 16):

Während NT auf mRNA-Ebene zum oben beschriebenen Zytokinsturm führte, zeigte sich im Western Blot für iNOS eine signifikante Reduktion zu beiden Zeitpunkten im Kortex (Ctx 6 h sham vs. NT: $P=0,0418$ und 24 h sham vs. NT: $P=0,0304$) und nach 24 h im Hippocampus (Hip 24 h sham vs. NT: $P=0,0111$). Für CD206 zeigte sich keine signifikante Änderung nach NT, jedoch war in beiden Arealen nach 6 h tendenziell weniger Protein vorhanden.

Nach Hypothermie-Behandlung war iNOS im Hippocampus nach 6 h vermindert und nach 24 h erhöht (Hip 6 h sham vs. HT: $P=0,0494$; 24 h sham vs. HT: $P=0,0073$ und NT vs. HT: $P < 0,001$). CD206 zeigte sich nach HT unverändert mit ggf. ebenfalls einer leichten Tendenz zur Reduktion nach 6 und Erhöhung nach 24 h im Hippocampus (nicht signifikant).

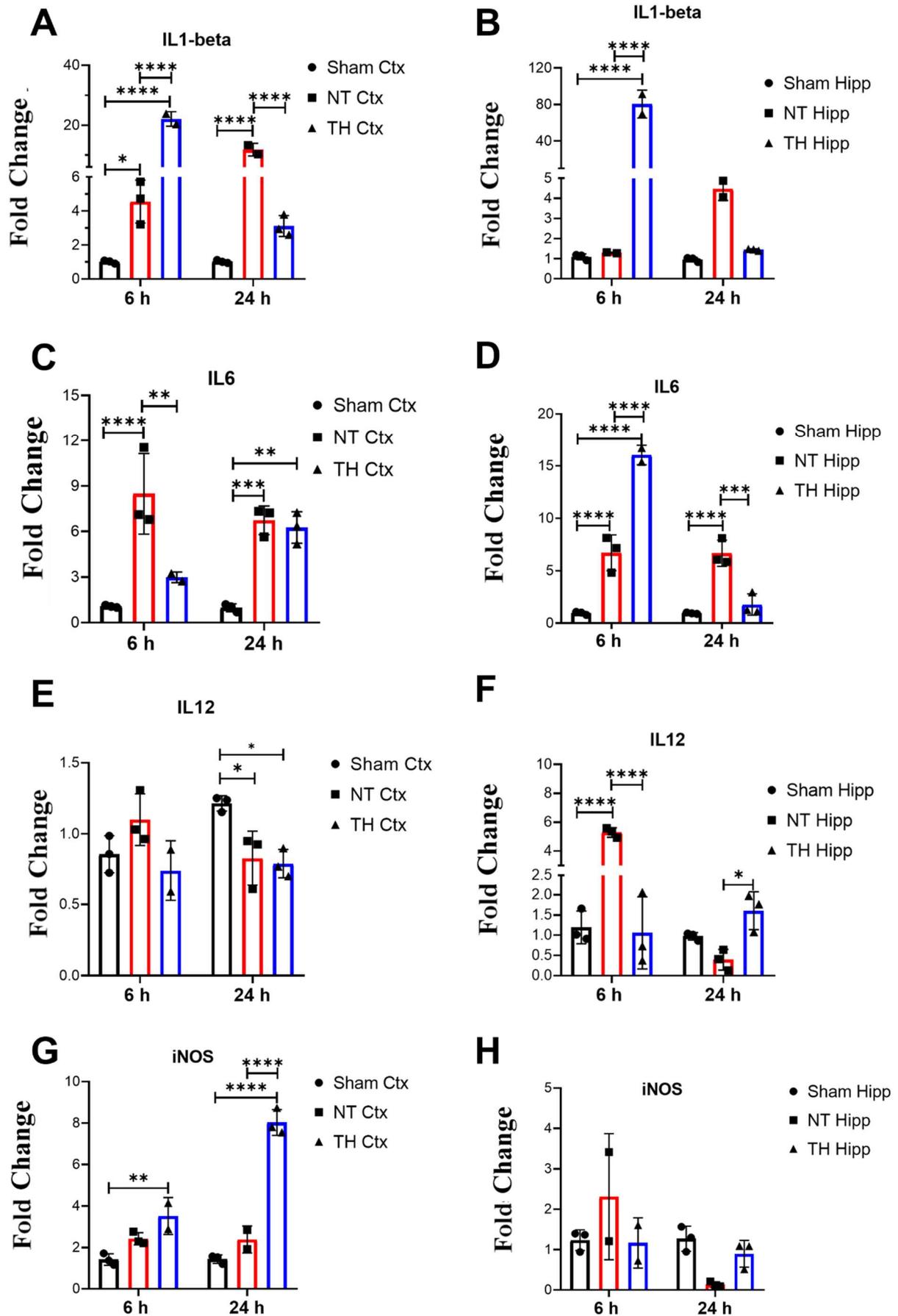


Abb. 14: RT-PCR-Analyse proinflammatorischer Zytokine nach HI und NT/HT

A: IL-1 β , Kortex: signifikante Erhöhung nach NT (6 h sham vs. NT: $P=0,0136$, 24 h: $P < 0,0001$. Erhöhung 6 h (6 h sham vs. HT: $P < 0,0001$ und NT vs. HT: $P < 0,0001$) und Abmilderung 24 h nach HT (24 h NT vs. HT: $P < 0,0001$). **B:** IL-1 β , Hippocampus: keine Veränderung 6 h nach NT, sichtbare Erhöhung nach 24 h. Deutliche Erhöhung durch NT nach 6 h (6 h sham vs. HT: $P < 0,0001$, NT vs. HT: $P < 0,0001$), sichtbare Senkung auf Kontrollniveau nach 24 h. **C:** IL-6, Kortex: Erhöhung durch NT (6 h sham vs. NT: $P < 0,0001$, 24 h: $P=0,0006$). Absenkung durch HT nach 6 h (6 h NT vs. HT: $P=0,0021$), kein Unterschied zu NT nach 24 h. **D:** IL-6, Hippocampus: Erhöhung durch NT (6 h sham vs. NT: $P < 0,0001$, 24 h: $P < 0,0001$). Erhöhung 6 h nach HT gegenüber Kontrolle und NT (6 h sham vs. HT: $P < 0,0001$, NT vs. HT: $P < 0,0001$) und Verminderung auf Kontrollniveau nach 24 h (24 h NT vs. HT: $P=0,0004$). **E:** IL-12, Kortex: sichtbare Erhöhung 6 h nach NT, Reduktion nach 24 h (24 h sham vs. NT: $P=0,0259$). Sichtbare Reduktion auf Kontrollniveau 6 h nach HT, kein Unterschied zu NT nach 24 h (24 h sham vs. HT: $P=0,0151$). **F:** IL-12, Hippocampus: Erhöhung 6 h nach NT (6 h sham vs. NT: $P < 0,0001$) und sichtbare Reduktion nach 24 h. Senkung durch HT nach 6 h (6 h NT vs. HT: $P < 0,0001$) bzw. Anhebung nach 24 h (24 h NT vs. HT: $P=0,0263$) jeweils etwa auf Kontrollniveau. **G:** iNOS, Kortex: leichte Tendenz zur Erhöhung nach NT (6 h sham vs. NT: $P=0,0894$, 24 h: $P=0,1686$). Erhöhung durch HT (6 h sham vs. HT: $P=0,0026$, NT vs. HT: $P=0,1003$, 24 h sham vs. HT: $P < 0,0001$, NT vs. HT: $P < 0,0001$). **H:** iNOS, Hippocampus: sichtbare Erhöhung 6 h und Reduktion 24 h nach NT. Abmilderung bzw. Anhebung nach 6 bzw. 24 h durch HT im Vergleich zu NT etwa auf Kontrollniveau.

Zweifache Varianzanalyse, Tukey-Mehrfachvergleichstest. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$. $n=3$ pro Kondition und Zeitpunkt

Ctx: Kortex, Hipp: Hippocampus, HI: Hypoxie-Ischämie, HT: Hypothermie, IL: Interleukin, iNOS: induzierbare NO-Synthase, NT: Normothermie, TH: therapeutische Hypothermie

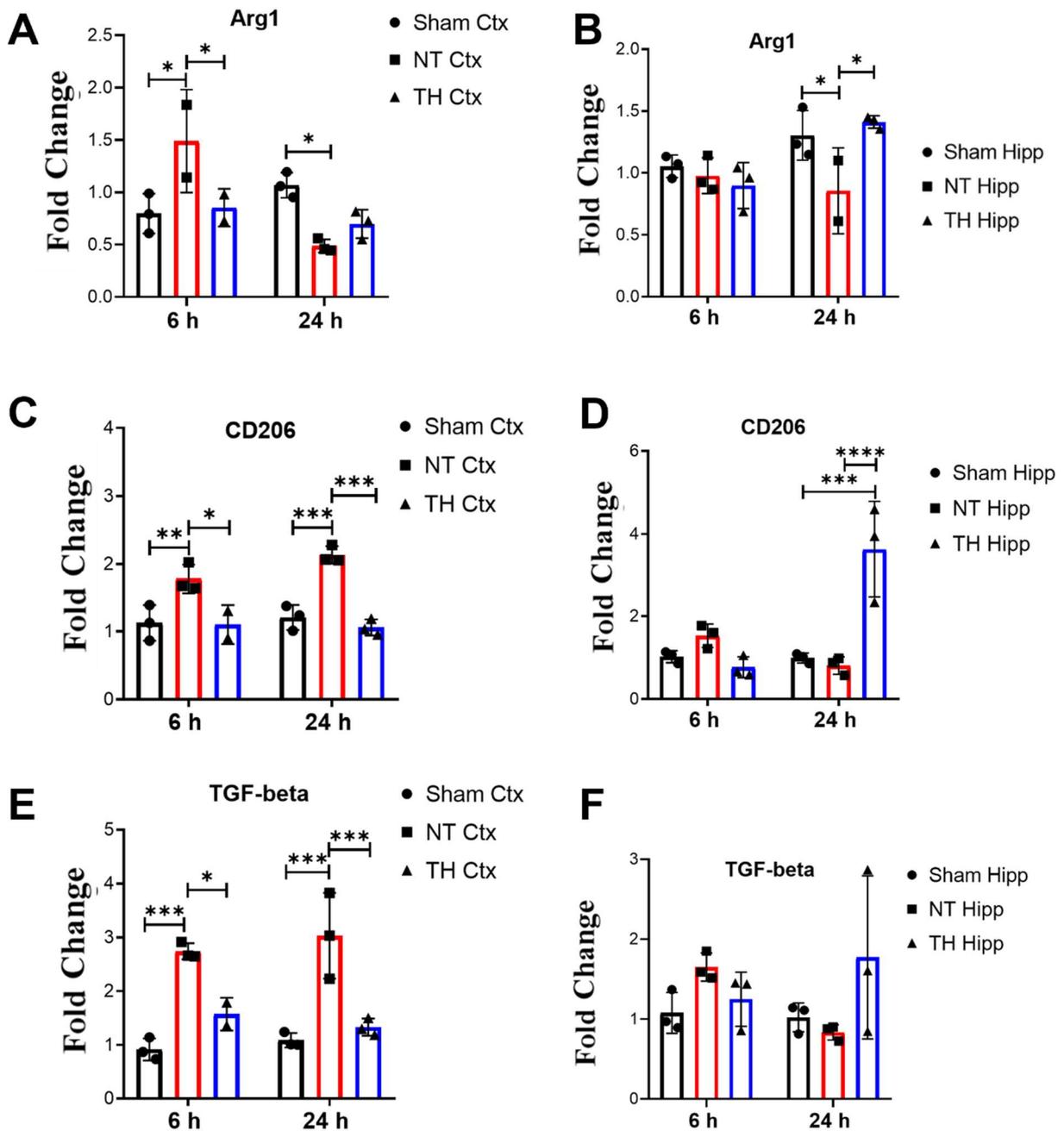


Abb. 15: RT-PCR-Analyse antiinflammatorischer Zytokine nach HI und NT/HT

A: Arg1, Kortex: Erhöhung der Genexpression 6 h nach NT (6 h sham vs. NT: $P=0,0122$) und Verminderung 24 h nach NT (24 h sham vs. NT: $P=0,0177$). Aus der Verminderung 6 h (6 h NT vs. HT: $P=0,0331$) bzw. sichtbare Erhöhung 24 h nach HT folgt eine Angleichung an Kontrollniveau. **B:** Arg1, Hippocampus: keine Veränderung 6 h nach NT, Senkung nach 24 h (24 h sham vs. NT: $P=0,0488$). HT übt nach 6 h keinen Einfluss auf die Genexpression aus, nach 24 h hebt sie sie auf Kontrollniveau (24 h NT vs. HT: $P=0,0147$). **C:** CD206, Kortex: Erhöhung durch HI und NT (6 h sham vs. NT: $P=0,0064$, 24 h: $P=0,0004$), Senkung und damit Angleichung an Kontrollniveau durch HT (6 h NT vs. HT: $P=0,0105$, 24 h: $P=0,0001$). **D:** CD206, Hippocampus: leichte erkennbare Steigerung 6 h

nach NT, keine Veränderung nach 24 h. HT bewirkt nach 6 h eine leicht sichtbare Reduktion, nach 24 h eine Steigerung (24 h sham vs. HT: $P=0,0001$, NT vs. HT: $P < 0,0001$). **E:** TGF β , Kortex: Erhöhung der Genexpression durch HI und NT (6 h sham vs. NT: $P=0,0003$, 24 h: $P=0,0002$) und Senkung durch HT fast auf Kontrollniveau (6 h NT vs. HT: $P=0,0183$, 24 h: $P=0,0006$). **F:** TGF β , Hippocampus: sichtbare Steigerung 6 h nach NT, keine Veränderung nach 24 h. Sichtbare Senkung nahe Kontrollniveau durch HT nach 6 h, sichtbare Erhöhung nach 24 h.

Zweifache Varianzanalyse, Tukey-Mehrfachvergleichstest. * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$. $n=3$ pro Kondition und Zeitpunkt

Arg1: Arginase 1, CD206: Cluster of differentiation 206, Ctx: Kortex, Hipp: Hippocampus, HI: Hypoxie-Ischämie, HT: Hypothermie, NT: Normothermie, TGF: Tumor growth factor, TH: therapeutische Hypothermie

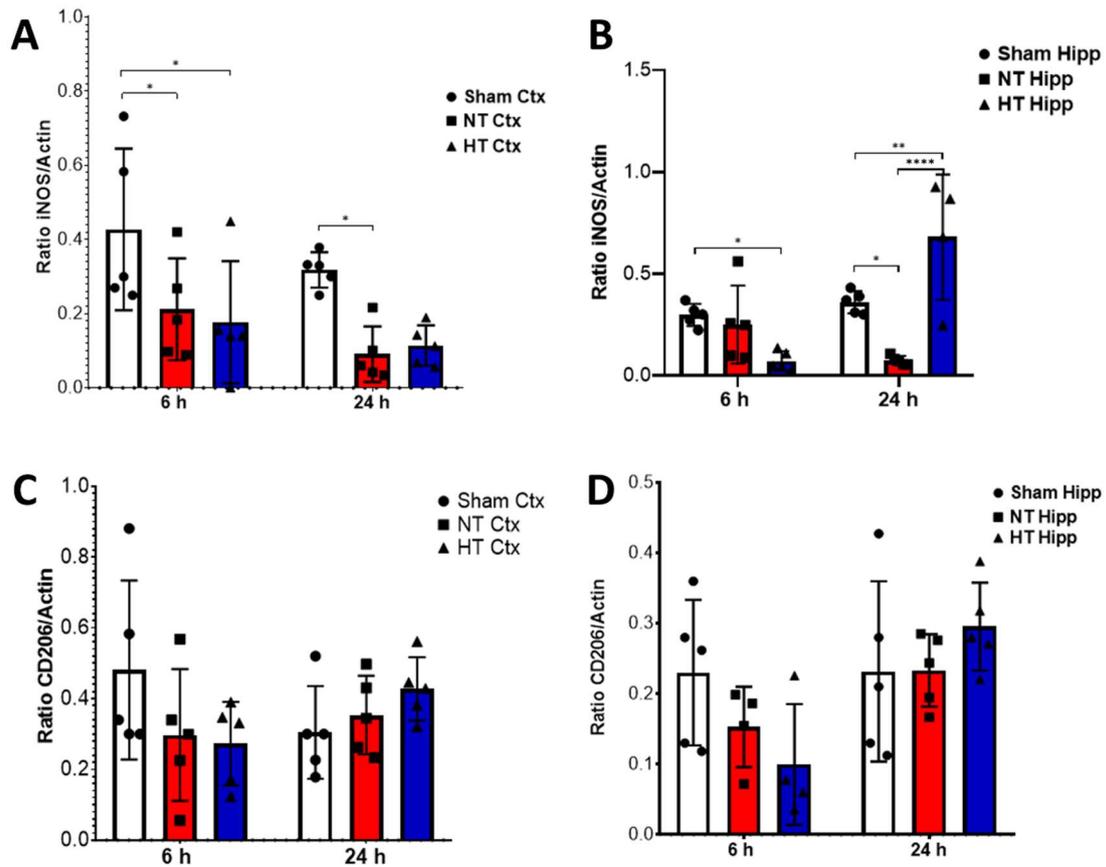


Abb. 16: iNOS und CD206 nach HI und NT/HT

A, B: quantitative Analyse von iNOS. β -Aktin diente als Ladungskontrolle. **A:** Kortex: signifikante Reduktion nach NT (6h sham vs. NT: $P=0,0418$, 24 h: $P=0,0301$) und HT (6h sham vs. HT: $P=0,0165$). **B:** Hippocampus: signifikante Reduktion 24 h nach NT (24 h sham vs. NT: $P=0,0494$). Signifikante Reduktion durch HT nach 6h (6h sham vs. HT: $P=0,011$) und Erhöhung nach 24 h (24 h sham vs. HT: $P=0,0073$, NT vs. HT: $P < 0,0001$). **C, D** quantitative Analyse von CD206. **C:** Kortex: sichtbare Abnahme 6h nach NT, keine Veränderung nach 24 h. Kein Einfluss der HT-Behandlung. **D:** Hippocampus: sichtbare Abnahme 6h nach NT und weitere Reduktion durch HT; keine Veränderung 24 h nach NT, leicht sichtbare Erhöhung durch HT.

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$

CD206: Cluster of differentiation 206, Ctx: Kortex, Hipp: Hippocampus, HI: Hypoxie-Ischämie, HT: Hypothermie, iNOS: induzierbare NO-Synthase, NT: Normothermie

3.4 Zusammenfassung

Wie erwartet beobachten wir eine Reduktion der mTOR-Aktivität nach Hypoxie-Ischämie in beiden Arealen. Die Zielproteine 4E-BP1 und S6 zeigen sich jedoch zu den betrachteten Zeitpunkten unverändert; die Autophagieleistung im Kortex war erhöht, was sich in einer geringeren p62-Expression äußerte.

Therapeutische Hypothermie übt auf den mTOR-Signalweg zu den beobachteten Zeitpunkten einen geringen Einfluss vornehmlich im Kortex aus, in der Art, dass sie auf Akt und mTOR inhibitorisch wirkt, Autophagie jedoch tendenziell eher vermehrt.

Demgegenüber konnten wir mithilfe der Quantifizierung der mRNA pro- und antiinflammatorischer Zytokine eine deutliche Entzündungsreaktion mit Zytokinsturm nach hypoxisch-ischämischer Schädigung in beiden Hirnarealen nachweisen, der besonders auf der proinflammatorischen Komponente ablief. Therapeutische Hypothermie führte für die proinflammatorischen Zytokine im Hippocampus sowie für die antiinflammatorischen Zytokine im Kortex zu einer Normalisierung der Genexpression auf Kontrolllevel; im Hippocampus beobachteten wir eine deutliche Heraufregulation antiinflammatorischer Zytokine nach 24 h. Die proinflammatorische Komponente zeigte sich, besonders nach 6 h, in beiden Arealen teils auch durch HT-Behandlung deutlich verstärkt (insbesondere für IL-1 β nach 6 h in beiden Arealen, IL-6 nach 6 h im Hippocampus und iNOS nach 24 h im Kortex). Diese Ergebnisse ließen sich mittels Western Blot beispielhafter Zytokine jedoch nicht verifizieren.

Die therapeutische Hypothermie übt also auf den mTOR-Signalweg zu den beobachteten Zeitpunkten nur im Kortex einen geringen Einfluss aus. Die Neuroinflammation moduliert sie in beiden Arealen deutlich, wobei starke arealspezifische Unterschiede zu beobachten sind.

4. Diskussion

Das Ziel der hier vorgestellten Arbeit war zu untersuchen, ob der mTOR-Signalweg im Zusammenhang mit einer Modulation der Entzündungsreaktion und der Autophagie eine Rolle bei neonataler HIE und hypothermischer Behandlung spielt. Die Auswertung der Experimente hat ergeben, dass der mTOR-Signalweg, die Entzündungsreaktion und Autophagie zeit- und arealspezifisch durch hypoxisch-ischämische Hirnschädigung und durch therapeutische Hypothermie beeinflusst werden:

Die Hyperinflammation nimmt in der Pathophysiologie der hypoxisch-ischämischen Enzephalopathie einen hohen Stellenwert ein. Wir zeigen nun, dass HT den Verlauf der Entzündungsreaktion nach HIE stark moduliert und in Kortex und Hippocampus eine frühe Heraufregulation der Entzündungsmediatoren IL-1 β und IL-6 bewirkt, während ansonsten der Zytokinsturm abgemildert und im Hippocampus eine starke antiinflammatorische Antwort nach 24 h induziert wird.

Zusätzlich weisen wir für den mTOR-Signalweg nach, dass mTOR 24 h nach HT im Kortex im Modell inhibiert wird, während auf Proteine weiter stromabwärts nach 6 und 24 h kein Effekt zu beobachten ist.

Auch die Autophagieleistung im Gewebe zeigt sich im Kortex durch HT leicht beeinflusst. Diese Ergebnisse beweisen, dass die Entzündungsreaktion eine Schlüsselfunktion in der HIE einnimmt und ein wichtiger molekularer Angriffspunkt der th-HT ist. Dies ist jedoch wahrscheinlich größtenteils auf andere Mechanismen als den mTOR-Signalweg zurückzuführen. Dieser zeigt sich jedoch nach HT, genauso wie Autophagie, zu den betrachteten Zeitpunkten im Kortex ebenfalls leicht verändert, was diese beiden Faktoren als weitere mögliche Angriffspunkte der th-HT und neuer Medikamente erscheinen lässt und den Bedarf an weiterer Forschung in diesem Bereich unterstreicht.

4.1 Das Rice-Vannucci-Modell als Modell für neonatale hypoxisch-ischämische Hirnschädigung

Das 1981 entwickelte Rice-Vannucci-Modell war das erste Tiermodell für Hypoxie-Ischämie in Neugeborenen und wird seitdem in verschiedenen Modifikationen als Modell der neonatalen HIE etabliert. (Leavy und Jimenez Mateos, 2020; Ourednik et al., 2024;

Shevtsova et al., 2024) Es leistete unter anderem einen entscheidenden Beitrag zur Etablierung therapeutischer Hypothermie als momentane Standardtherapie für asphyktische Neugeborene sowie zur Aufklärung der der HIE zugrunde liegenden Pathophysiologie. (Millar et al., 2017; Vannucci und Back, 2022)

Im klassischen Modell werden neugeborene Ratten werden am postnatalen Tag 7 einer unilateralen Ligatur der ACC unterzogen. Nach einer 4-8-stündigen Ruhephase werden sie für 3,5 h bei 37°C einer Hypoxie mit 8 % Sauerstoff exponiert. Anschließend gelangen sie wieder zu ihrer Mutter.

In früheren Publikationen wurde für das Rice-Vannucci-Modell eine unterschiedliche Änderung der Durchblutungsrate einzelner Hirnregionen nach Hypoxie-Ischämie beschrieben: Im klassischen Modell (Rumajogee et al., 2016) sank sie im Kortex um 83 %, im Striatum um 67 % und im Thalamus um 59 %. Im Hippocampus konnte in der Originalpublikation aufgrund seiner Lage umgeben von weißer Masse die Durchblutungsrate nicht bestimmt werden, die visuelle Beurteilung zeigte aber eine ähnliche oder sogar stärkere Beeinträchtigung dieser Region. (Vannucci et al., 1988) Es wird deutlich, dass die einzelnen Hirnareale sehr unterschiedlich vom hypoxisch-ischämischen Insult betroffen sind. Demzufolge sind unterschiedlich starke Schädigung und Einfluss auf Signalwege und Zytokine, sowohl zeitlich als auch quantitativ, wahrscheinlich. Hierbei trägt eine individuell unterschiedliche Kollateralisierung über den Circulus arteriosus Willisii zu einer erhöhten Varianz der Durchblutungsraten für die verschiedenen Hirnareale bei. (Ourednik et al., 2024)

In den Versuchen von Vannucci et al. (1988) trat der Hirnschaden nach 50h ein; andere Autoren beobachteten diesen schon deutlich früher (bspw. nach 2 h). (Rumajogee et al., 2016) Dies deutet auf eine hohe Variabilität im zeitlichen Verlauf hin.

Auch das genaue Alter der Ratten spielt hierbei mutmaßlich eine Rolle, da die verschiedenen Hirnareale je nach Ausreifungsgrad mehr oder weniger vulnerabel zu sein scheinen. (Ourednik et al., 2024)

Ein weiterer Faktor, die die Ergebnisse im verwendeten Modell beeinflussen kann, ist der Grad der Hypoglykämie (Ourednik et al., 2024) Aus diesem Grund wird idealerweise der Zeitraum der Milchdeprivation der Ratten notiert und konstant gehalten. Bezüglich des Timings bei der Wiedererwärmung nach Hypothermie zeigten sich im Schafmodell keine

signifikanten Unterschiede zwischen langsamem und schnellem Vorgehen. (McDouall et al., 2024)

Alternative Tiermodelle der neonatalen HIE sind z.B. das neugeborene Schaf, Schwein oder Primaten. Das Schwein hat sich dabei als das akkurateste Modell herausgestellt; Versuche hiermit sind jedoch mit wesentlich höherem Aufwand und Kosten und damit mit einer geringeren Zahl an Versuchstieren verbunden.

4.2 Der mTOR-Signalweg bei Hypoxie-Ischämie und therapeutischer Hypothermie

Wie oben beschrieben (siehe 1.2 Der mTOR-Signalweg) schließt der mTOR-Signalweg die beiden mTOR-Komplexe mTORC1 und mTORC2 ein. Da mTORC1 in der Zelle eine zentralere Rolle einnimmt, insbesondere im Kontext von Hypoxie-Ischämie, und darüber hinaus bisher über mTORC2 nur wenig bekannt ist, beziehe ich mich im Folgenden auf mTORC1.

Akt wird als einer der wichtigsten Regulatoren stromaufwärts von mTOR angesehen. Seine Funktionen sind u.a. Hemmung neuronaler Apoptose, Stabilisierung der BHS und Stimulation von Zellproliferation, -wachstum und -überleben. (s.o.: 1.2 Der mTOR-Signalweg). Wir beobachteten im Kortex eine sichtbar verminderte Aktivierung von Akt. HT bewirkte nur im Kortex nach 6 h eine weitere Reduktion von p-Akt/Akt. Hier ist jedoch anzumerken, dass in unseren Proben der Wert in der NT-Gruppe durch zwei Ausreißer nach oben relativ hoch ist; ohne diese beiden Proben bestünde kein Unterschied zwischen NT und HT. Diese Beobachtung ist also mit Vorsicht zu betrachten; weitere Analysen mit mehr Proben könnten hier Aufschluss geben. Gleiches gilt für die Beobachtung einer leichten Akt-Aktivierung 6 h nach NT und -Reduktion nach HT im Hippocampus.

Insgesamt lässt sich also festhalten, dass wir eine leicht verminderte Akt-Aktivität im Kortex 6 und 24 h nach dem Insult beobachten. Dies könnte zum einen in Zusammenhang mit verstärkter neuronaler Apoptose und einer erhöhten Permeabilität der BHS zu sehen sein, zum anderen, wie die mTOR-Inhibition (s.u.) eine verminderte Proteinsynthese, Zellwachstum und -proliferation bedingen.

Da Akt, wie oben erwähnt, auf eine Vielzahl externer und interner Stimuli reagiert sowie diverse Zielproteine und -funktionen hat, ist die Analyse dieses Signalweges ein komplexes Thema und lag nicht im Rahmen dieser Arbeit, deren Fokus der mTOR-Signalweg darstellt.

mTOR selbst unterliegt, neben Akt, dem Einfluss diverser anderer Faktoren. So spielt beispielsweise AMPK als negativer Regulator von mTOR im Rahmen des Energiedefizits bei neonataler HIE eine entscheidende Rolle. (Nacarkucuk et al., 2024) Diese beeinflussen teilweise die Proteine stromabwärts von Akt, TSC1/2 und Rheb, teilweise direkt mTORC1. (vgl. auch 1.2 Der mTOR-Signalweg). Deshalb analysierten wir die Aktivierung des mTOR-Proteins selbst sowie seiner Zielproteine 4E-BP1 und S6.

mTOR wird durch verschiedene Stresssignale deaktiviert. (Bockaert und Marin, 2015; Carloni et al., 2010; Perez-Alvarez et al., 2018; Spriggs et al., 2010) So beobachteten bspw. Lee et al. (2021) und Wei et al. (2021) im modifizierten Rice-Vannucci-Modell nach 72 h eine Inhibition von Akt, mTOR und P70S6K in der ipsilateralen Hemisphäre. Bei den meisten Studien zum Einfluss von Hypoxie-Ischämie auf den mTOR-Signalweg handelt es sich jedoch um Reviews oder Untersuchungen, die sich allgemein mit Einflüssen auf den mTOR-Signalweg in verschiedenen Zellen (Aramburu et al., 2014) oder allgemein im Hirn (Perez-Alvarez et al., 2018) beschäftigen oder aber mit anderem Fokus an adulten Ratten forschen. (Ayuso et al., 2010) Zudem wird häufig der zeitliche Verlauf nicht untersucht.

Im sich entwickelnden Gehirn nimmt mTOR jedoch eine Sonderrolle ein, da es, wie oben beschrieben, u.a. in der Hirnreifung wichtige Funktionen übernimmt.

Insgesamt existieren nur wenige Studien zum mTOR-Signalweg im speziellen Fall der neonatalen Hirnschädigung im Rattenmodell. Die Untersuchungen zum Thema variieren in der Schwere des hypoxischen bzw. ischämischen Insults sowie im Alter der Ratten. Dies ist vermutlich der Grund für sich teilweise deutlich unterscheidende Aussagen im Hinblick auf den Einfluss von Hypoxie-Ischämie auf den Signalweg.

Besonders über die Zielproteine 4E-BP1 und S6 sowie den Einfluss therapeutischer Hypothermie ist das Wissen bisher sehr begrenzt: Die Studien, deren Modell unserem ähnelt, betrachten größtenteils nicht die Proteine weiter stromabwärts von mTOR und wenn, dann meist zu späteren Zeitpunkten oder unter anderen Bedingungen:

Im modifizierten Rice-Vannucci-Modell konnte von mehreren Arbeitsgruppen an neugeborenen Ratten am postnatalen Tag 7 eine Inhibition verschiedener Proteine des mTOR-Signalweges (Akt, mTOR und P70S6K) in Kortex und Hippocampus bzw. der gesamten ipsilateralen Hemisphäre 4, 5, 24, 48 bzw. 72 h nach HI nachgewiesen werden. (Bernis et al., 2025; Deng et al., 2023; Lee et al., 2016; Nacarkucuk et al., 2024; Wei et al., 2021) Auch in verschiedenen Zellkulturen, wie bspw. einer Primärkultur hippocampaler Neurone, konnte eine Inhibition von Akt und mTOR 24 h nach OGD und Reperfusion nachgewiesen werden. (Wei et al., 2021)

Insgesamt existiert ein großer Konsens über die Inhibition des mTOR-Signalweges durch Hypoxie und Ischämie bzw. Energiemangel allgemein sowie im Rattenmodell neonataler HIE.

Diese Inhibition konnten wir in unseren Versuchen bestätigen. Sie war sowohl nach 6 als auch nach 24 h in beiden Arealen zu beobachten. Demgegenüber zeigte Akt nach 6 und 24 h nur im Kortex eine Tendenz zur verminderten Aktivität nach HI (s.o.), die Veränderungen in der mTOR-Aktivität sind also (auch) auf andere Mechanismen und Signalwege zurückzuführen.

Auf der anderen Seite beobachten Chen et al. in P10-Ratten eine Aktivierung von mTOR zu verschiedenen frühen Zeitpunkten (zwischen 2 und 24 h) nach Ligatur der rechten ACC und 2,5 h Hypoxie. Sie analysierten allerdings Lysate des gesamten Gehirns, was die Vergleichbarkeit mit unseren Ergebnissen deutlich einschränkt. Auch sie treffen keine Aussage über die Aktivitätsänderung von 4E-BP1 und S6. Einige andere Autoren berichten ebenfalls von einer mTOR-Aktivierung nach hypoxisch-ischämischer Hirnschädigung. (Chen et al., 2012)

Das Ziel der mTOR-Deaktivierung ist bei Hypoxie-Ischämie bzw. Energiemangel, dass nicht unnötige Energie zum Wachstum und Differenzierung verschwendet wird, sondern für zentral überlebenswichtige Zwecke in der Zelle verwendet werden kann. (Aramburu et al., 2014; Saxton und Sabatini, 2017)

Therapeutische Hypothermie reduziert allgemein Stoffwechselfvorgänge, was eine Erklärung für die tendenziell noch weiter reduzierte mTOR-Aktivität nach HT im Kortex nach 24 h sein könnte. Da es gerade während dieser Phase zum sekundären Energieversagen

kommt, könnte eine reduzierte mTOR-Aktivität hilfreich sein, den Energieverbrauch der Zelle zu drosseln.

Die meisten Studien zum Thema sind sich einig, dass eine reduzierte mTOR-Aktivität einen neuroprotektiven Effekt bei neonataler HIE hat: In verschiedenen Tiermodellen zu hypoxisch-ischämischer Hirnschädigung, unter anderem Rattenmodellen neonataler HIE, milderte eine Inhibition des Signalwegs hypoxisch-ischämisch induzierten Hirnschaden und neuronalen Zelltod und verbesserte das funktionelle Outcome. (Crino, 2016; Srivastava et al., 2016; Talos et al., 2012) Die Mechanismen, die dahinter vermutet werden, sind verminderte mTOR-induzierte Apoptose, vermehrte Autophagie und reduzierte Neuroinflammation sowie Energiebedarf für die Proteinsynthese. (Crino, 2016; Srivastava et al., 2016) Rapamycin (ein medikamentöser mTOR-Inhibitor) und HT konnten im adulten Rattenmodell des globalen ischämischen Schlaganfalls bei Kombination synergistische Effekte in Bezug auf die Reduktion von Anzahl und Stärke von Krampfanfällen erzielen, wirkten jedoch auch einzeln. Dies deutet auf die Möglichkeit sowohl einer Mono- als auch einer kombinierten Therapie aus pharmakologischer und hypothermischer Behandlung hin. (Yang et al., 2018)

Zusammenfassend belegen diese Studien, dass der mTOR-Signalweg in der Pathogenese der HIE involviert ist und eine therapeutische Inhibition sowohl allein bei Kontraindikation für th-HT sowie auch additiv zu th-HT eine vielversprechende Perspektive bei der Behandlung der HIE ist. Da wir in unserem Experiment eine mTOR-Inhibition 24 h nach HT im Vergleich zur NT-Gruppe im Kortex sowie eine tendenziell verminderte Phosphorylierung von Akt nach 6 h und 4E-BP1 zu beiden Zeitpunkten nachweisen konnten, könnte ein neuroprotektiver Wirkmechanismus der th-HT in einer Inhibition dieses Signalweges liegen.

Auf der anderen Seite ist nach hypoxisch-ischämischer Hirnschädigung eine Erhöhung der mTOR-Aktivität zur funktionalen Regeneration des ZNS mit axonalen Aussprossung und Regeneration sowie im noch unreifen Hirn des Neugeborenen für Neurogenese, Zelldifferenzierung, Morphogenese und Myelinisierung essenziell wichtig. (Bockaert und Marin, 2015; Perez-Alvarez et al., 2018; Saxton und Sabatini, 2017) Eine Rolle in der Synaptogenese wurde auch im neonatalen Rattenmodell belegt. (Talos et al., 2012)

So berichten auch Wei et al. (2021) von einer verbesserten neurofunktionellen Entwicklung und einer Verminderung von Hirnwasser, pathologischen Gewebsveränderungen und neuronaler Nekrose nach Aktivierung des PI3K/Akt/mTOR-Signalwegs (und konsekutiv reduzierter Autophagie) durch Oxymatrin im modifizierten Rice-Vannucci-Modell nach 48 h. Diese neuroprotektiven Effekte waren bei zusätzlicher Gabe von Rapamycin nicht zu beobachten. (Wei et al., 2021)

Nacarkucuk et al. fanden ebenfalls ein vermehrtes Vorkommen von Oligodendrozyten, verbesserte Myelinisierung in verschiedenen Arealen, einen verminderten Verlust von Hirnfläche und verbesserte motorische Leistungen nach Behandlung mit Melatonin im Rattenmodell neonataler HIE, die mit einer Erhöhung der mTOR-Aktivität im Vergleich zur HI/Vehikel-Gruppe einherging. (Nacarkucuk et al., 2024)

Auch in Tiermodellen zum ischämischen Schlaganfall konnte eine neuroprotektive Wirkung durch mTOR-Aktivierung nachgewiesen werden. (Fu et al., 2016)

Es gilt also zu berücksichtigen, dass akut eine mTOR-Inhibition zwar zum Sparen von Energie beitragen kann und so über Abmilderung der pathophysiologischen Kaskade neuroprotektiv wirkt, nach bestimmter Zeit aber notwendigerweise wieder heraufreguliert werden muss, um eine regulierte Stressantwort zu ermöglichen (Aramburu et al., 2014) und Folgeschäden gering zu halten sowie den Zellen eine Rückkehr in die Homöostase zu ermöglichen. Eine in Zeit und Quantität genau abgestimmte Regulation dieses Signalwegs ist hierbei entscheidend.

Im Tiermodell zum ischämischen und hämorrhagischen Schlaganfall fanden sich dementsprechend sehr unterschiedliche Wirkungen einer mTOR-Inhibition abhängig vom inflammatorischen Status im Gewebe, dem Alter und dem Zeitpunkt der Therapie. (Crino, 2016) Mögliche weitere Parameter, die hierbei einen Einfluss haben, sind u.a. das betroffene Areal und die verfügbare Kollateralisierung, die Kompensation über andere molekulare Mechanismen sowie der metabolische Allgemeinzustand.

Auch bezüglich neonataler HIE bleibt der Effekt neuroprotektiver Agenzien, die in den mTOR-Signalweg eingreifen, kontrovers. (Bernis et al., 2025) Dies liegt in der Komplexität des Signalwegs und seiner diversen Einflussfaktoren begründet.

In unserem Versuch beobachteten wir trotz nach HI deutlich inhibiertem mTOR keine Hemmung der mTOR-Zielproteine 4E-BP1 und S6 nach 6 oder 24 h. Dafür gibt es verschiedene mögliche Erklärungen:

Wir können anhand des Einflusses der Hypothermie auf den Signalweg im Kortex klar eine zeitliche Abfolge erkennen: Während 6 h nach HT nur Akt vermindert aktiviert ist, ist als Folge dessen mTOR nach 24 h geringer aktiviert als in der NT-Gruppe. Talos et al. beobachten eine zeitliche Latenz der Reaktion des Signalwegs auf äußere Einflüsse insofern, als die S6-Phosphorylierung in vivo deutlich hinter der von P70S6K hinterherhinkt. (Talos et al., 2012) Insofern ist es möglich, dass eine Veränderung in der Phosphorylierung von S6 und 4E-BP1, die beide weit stromabwärts liegen, erst zu späteren Zeitpunkten stattfindet.

Zudem unterliegt P70S6K und damit auch S6 dem Einfluss diverser anderer Stimuli und Repressoren. Für 4E-BP1 existieren ebenfalls eine Vielzahl weiterer Proteine, die dessen Aktivität entweder direkt oder durch Regulation seiner stromabwärts gelegenen Effektorproteine beeinflussen können. Eine Beteiligung anderer Signalwege erscheint somit ebenfalls denkbar.

Eine weitere mögliche Erklärung für die fehlende Beeinflussung durch HI und HT wäre die erhöhte ROS-Produktion in der initialen Reperfusion: ROS inhibieren die Proteinphosphatase 2A. (Ayuso et al., 2010) Diese dephosphoryliert im aktiven Zustand (in Experimenten an glatten Muskelzellen) 4E-BP1, (Rocic et al., 2003) sodass durch die ROS-Erhöhung eine verminderte Dephosphorylierung denkbar wäre. Dies würde in einer unveränderten Phosphorylierung von 4E-BP1 trotz mTOR-Inhibition resultieren.

Die Phosphorylierung von mTOR an Ser2448 ist mit beiden mTOR-Komplexen, mTORC1 und mTORC2, assoziiert. (Talos et al., 2012) Möglich ist also auch, dass die von uns beobachteten Veränderungen in der Phosphorylierung hauptsächlich an mTORC2 stattfinden, der keinen Einfluss auf P70S6K und 4E-BP1 ausübt. Da bei HI jedoch, wie oben beschrieben, diverse Einflüsse auf mTORC1 verändert sind und auch von anderen Autoren eine Modulierung des mTORC1-Signalwegs nach zerebraler HI beschrieben wird, ist dies unwahrscheinlich.

Zudem existieren zwei verschiedene regulatorische Motive in der mTOR-Aminosäuresequenz (TOS und RAIP), die jeweils für die Phosphorylierung von 4E-BP1 an Thr69 bzw. Thr36/45 zuständig sind. (Ayuso et al., 2010) Ayuso et al. stellen die Hypothese auf, dass

im Hirngewebe mTOR hauptsächlich über das TOS-Motiv Thr69 phosphoryliert, was erklären könnte, weshalb Thr36/45 von der reduzierten mTOR-Aktivität in unserem Versuch unbeeinträchtigt bleibt.

Anders als in dieser Arbeit beschrieben betrachteten Nacarkucuk et al. sowie Bernis et al. die Zielproteine 4E-BP1 und S6 in einem unserem Rattenmodell entsprechenden Versuch 4, 5 bzw. 24 h nach HI und fanden teils signifikant verminderte Phosphorylierungslevel. (Bernis et al., 2025; Nacarkucuk et al., 2024)

Es wird deutlich, dass es diverse Gründe für die von uns beobachtete unveränderte Aktivität von 4E-BP1 und S6 gibt, was vor allem in der Komplexität des Signalwegs begründet liegt. Weitere Analysen zu späteren Zeitpunkten sowie möglichst nach Minimierung der interindividuellen Variabilität der Versuchstiere werden hier mehr Klarheit bringen. (Bernis et al., 2025; Nacarkucuk et al., 2024)

Leider war im direkten Vergleich zwischen Normo- und Hypothermie keine unserer Beobachtungen statistisch signifikant mit $P < 0,05$. Wie oben beschrieben können wir trotzdem erkennen, dass der Signalweg eine Rolle bei HIE und HT spielt. Dies legt nahe, dass dieser ein vielversprechender Ansatzpunkt weiterer Forschung zum neonatalen hypoxisch-ischämischen Hirnschaden ist.

Zur Ermittlung des Aktivierungsniveaus der spezifischen Proteine im mTOR-Signalweg nutzten wir den Western Blot. Hiermit bestimmten wir die Phosphorylierung an spezifischen Aminosäureresten der Proteine, die bereits von anderen Arbeitsgruppen betrachtet wurden:

Akt besitzt zwei Phosphorylierungsstellen: Thr308 ist für die Aktivität des Enzyms essenziell, während Ser473, das danach phosphoryliert wird, in vitro das höchste Aktivitätslevel bedingt. (Ayuso et al., 2010) Insofern wäre es hier ggf. auch sinnvoll, die Phosphorylierung an Thr308 zu bestimmen, um eine vollständige Aussage über die enzymatische Funktionsausübung treffen zu können. Auf der anderen Seite wurde nach Ischämie ein Rückgang der Phosphorylierung an Ser473 beobachtet, der in einer mTOR-Inhibition resultierte. (Ayuso et al., 2010) Dies spricht dafür, dass die Betrachtung von Ser473 in unserem Fall ausreichend ist. Anzumerken ist, dass es sich bei der von uns untersuchten Akt-Phosphorylierungsstelle Ser473 um eines der Hauptsubstrate des mTORC2 handelt. (Bockaert und Marin, 2015; Villa-Gonzalez et al., 2022)

Die mTOR-Aktivität korreliert mit seiner Phosphorylierung an Ser2448; diese ist nach ischämischem Stress reduziert. (Ayuso et al., 2010) Deshalb wählten wir diesen Serinrest für unsere Experimente aus.

S6 wird von S6K an insgesamt fünf verschiedenen Stellen phosphoryliert; (Ruvinsky und Meyuhas, 2006) wir betrachteten Ser 240/244. p-S6 gilt allgemein als repräsentativ für die P70S6K-Aktivität, allerdings kann S6K auch ohne S6 die Proteinsynthese fördern. (Hay und Sonenberg, 2004) Als weiteres Substrat der S6K wäre eIF4B zur Analyse geeignet, dies lag jedoch nicht im Rahmen dieser Arbeit.

4E-BP1 ist ein direktes Substrat von mTORC1 und wird durch diesen hierarchisch an vier Stellen phosphoryliert: Zunächst an Thr69 (oder Thr36/45, je nach Zelltyp), dann an Thr36/45 (bzw. Thr69) und zuletzt an Ser64. Dabei ist die Phosphorylierung an Thr36/45 entscheidend, damit das Protein von eIF4E dissoziiert; alleinige Phosphorylierung an Thr69 reicht hierfür nicht aus. Zudem sind Thr36/45 und Ser64 deutlich stärker von Ischämie betroffen als Thr69. (Ayuso et al., 2010) Aus diesen Gründen ist die Phosphorylierung an Thr36/46 die entscheidende; eine Analyse dieser Stellen erscheint deshalb am sinnvollsten zur Aktivitätsbestimmung.

Zur Verifizierung unserer Ergebnisse und um einen genaueren Eindruck über die räumliche Verteilung der Reaktion des mTOR-Signalweges zu erlangen, färbten wir mit immunhistochemischen Methoden Gewebeschnitte der Hirne der behandelten Ratten gegen das mTOR-Zielprotein p-S6. Die hierbei beobachteten Resultate konnten größtenteils die Aussagen, die wir bereits mittels Western Blot treffen konnten, bestätigen.

4.3 Autophagie bei Hypoxie-Ischämie und Hypothermie

Zur Quantifizierung der Autophagie bestimmten wir die Menge an p62, das als verlässlicher Autophagiemarker gilt, (Deretic, 2012; Sun et al., 2018b) mittels Western Blot und in der immunhistochemischen Färbung.

Bei erfolgreicher Autophagie wird p62 nach der Fusion des Autophagosoms mit dem Lysosom mit abgebaut; (Bjørkøy et al., 2009; Deretic, 2012) es akkumuliert also vor allem im Falle von chronisch erfolgloser Autophagie oder geringem Flux. Das von uns beobachtete verminderte p62-Level nach HI entspricht demnach, in grober Vereinfachung, einem erhöhten Autophagiefluss. (Ginet et al., 2014)

Dieses Wissen stammt, in Bezug auf Neurone, jedoch hauptsächlich aus dem Forschungsgebiet der neurodegenerativen Erkrankungen. (Bjørkøy et al., 2006) Hier wird p62 in ubiquitinylierten und nicht abgebauten Proteinaggregaten wie den Lewy-Bodies des M. Parkinson, neurofibrillären Tangles des M. Alzheimer oder in Huntingtin-Aggregaten bei Chorea Huntington detektiert. Auch bei verschiedenen Leberpathologien (Mallory bodies bei alkoholischer und nicht-alkoholischer Fettleber, hyaline Körperchen bei hepatozellulärem Karzinom und α_1 -Antitrypsin-Aggregaten) spielen p62-positive Proteinaggregate eine Rolle. (Pankiv et al., 2007)

Im neonatalen Hirn, das sich in einem sehr dynamischen Prozess befindet, nimmt die Autophagie jedoch eine Sonderrolle ein. Zudem handelt es sich bei HIE zumindest zunächst nicht um einen chronischen Prozess, sondern um eine akute Schädigung. Proteinaggregate spielen hier also weniger eine Rolle, können jedoch auch durch oxidativen Stress entstehen. (Bjørkøy et al., 2006) Zudem erfüllt die Autophagie insbesondere in der Hirnentwicklung und -reifung zahlreiche physiologische Funktionen. Insofern ist an dieser Stelle wichtig zu erwähnen, dass es sich bei der Autophagie um ein komplexes Geschehen handelt, das nicht anhand der Analyse eines einzelnen Proteins beschrieben werden kann. Zum Erlangen eines tieferen Verständnisses von Autophagie im Kontext der neonatalen HIE wäre es sinnvoll, weitere molekulare Marker (wie bspw. ULK1, LC3 oder LC3II) zu unterschiedlichen Zeitpunkten zu untersuchen und mit molekularen und morphologischen Betrachtungen zu korrelieren. (Ginet et al., 2014)

Da der Autophagie in der Pathogenese der HIE eine entscheidende Rolle zukommt, liegen in diesem Signalweg möglicherweise vielversprechende Ansatzpunkte für zukünftige Therapieoptionen. Bisherige Studien zur Rolle von mTOR und Autophagie bei zerebraler Hypoxie-Ischämie variieren in ihren Aussagen jedoch stark je nach Modell und bedürfen weiterer Aufklärung. (Sun et al., 2023; Sun et al., 2018b)

Nach hypoxisch-ischämischer Hirnschädigung und bei mTOR-Inhibition ist die Autophagierate im Gewebe erhöht. Wei et al. und verschiedene weitere Publikationen berichten von einer Erhöhung von LC3 und Beclin1 und einer Minderung von p62 nach hypoxisch-ischämischer Hirnschädigung im modifizierten Rice-Vannucci- und anderen Modellen, was einem vermehrten Autophagiefluss entspricht. (Descloux et al., 2015; Fu et al., 2016; Li et al., 2015; Nacarkucuk et al., 2024; Shen et al., 2025; Wei et al., 2021) In diesem

Zusammenhang waren immunhistochemisch mehr Autophagosomen zu detektieren. (Ginet et al., 2014; Wei et al., 2021) Auch in Biopsien menschlicher Neugeborener nach HIE war im Thalamus eine stark erhöhte Anzahl von Autophagosomen und Lysosomen nachweisbar. (Ginet et al., 2014)

Carloni et al., Deng et al. sowie Shen et al. weisen eine reduzierte Aktivität des mTOR-Signalweges 24 h bzw. 48 h nach HI in der neugeborenen Ratte nach, die wir bestätigen konnten, und beobachteten infolgedessen eine vermehrte Autophagie mit vermindertem p62 und erhöhtem LC3II. (Carloni et al., 2010; Deng et al., 2023; Shen et al., 2025)

Die Wirkung therapeutischer Hypothermie auf die Autophagie nach zerebralem Ischämie-Reperfusionsschaden untersuchten Wang et al. (2023a) im Schweinmodell. Hier zeigte sich nach NT-Behandlung eine Inhibition des PI3K/Akt/mTOR-Signalwegs, die mit einer erhöhten Autophagieleistung (vermehrte TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick-End Labeling)-positive Zellen und Autophagievakuolen sowie erhöhte Level von Beclin1 und LC3-II bzw. vermindertes p62) einherging. Milde HT revertierte diese Veränderungen signifikant und verbesserte auch neurologische Defizit-Scores. (Wang et al., 2023a)

Sun et al. (2018a, 2018b) und Xue et al. (2017) berichten ebenfalls von einer Verstärkung der Autophagie bei OGD/Reperfusion bzw. zerebraler Ischämie, die durch HT-Behandlung zumindest partiell aufgehoben wird. (Xue et al., 2017) An diesen Studien sind jedoch Unterschiede zu unserem Modell anzumerken: Sun et al. verwendeten eine Primärkultur kortikaler Neurone der Ratte und imitierten hypoxisch-ischämische Hirnschädigung mittels vierstündiger OGD. Die Gruppe um Xue et al. verwendete ein Modell adulter Ratten zur Schlaganfallforschung. Die Ratten wurden einer 90-minütigen Okklusion der rechten Arteria cerebri media (ACM) unterzogen. Therapeutische Hypothermie wurde medikamentös durch intraperitoneale Injektion von PD149163 0, 4, 7 und 10 h nach Infarkt ausgelöst; untersucht wurden kortikale Regionen in der Umgebung des Infarktes.

Die Stimulation der Autophagie nach HI, die aufgrund der von uns beobachteten mTOR-Inhibition zu erwarten war, (Sun et al., 2018b) konnten wir anhand des signifikant verminderten (bzw. nach 24 h im Hippocampus sichtbaren) p62-Levels nach 6 und 24 h in beiden Arealen bestätigen.

Wie auch für den mTOR-Signalweg zeigte sich zu den betrachteten Zeitpunkten ein Einfluss der Hypothermie nur im Kortex. Hier beobachteten wir, in Übereinstimmung mit bisher vorliegenden Studien, eine leicht verminderte Autophagieleistung mit erhöhtem p62-Level nach HT im Vergleich zu NT zu beiden Zeitpunkten.

Auf der anderen Seite beobachteten Li et al. im Rattenmodell der ischämischen Rückenmarksschädigung einen durch HT weiter inhibierten mTOR-Signalweg, der mit einer gesteigerten Autophagieleistung einherging. Sie betrachteten außerdem in einem in vitro OGD-Modell die Wirkung von HT auf BV2-Zellen, die als Modell für Mikroglia verwendet werden. Hier konnten sie ebenfalls vermehrte Autophagie nach HT nachweisen. (Li et al., 2022)

Es wird deutlich, dass bei Untersuchung der Autophagie, sowohl bezüglich der Veränderung durch HT als auch bezüglich der Funktion nach hypoxisch-ischämischer Hirnschädigung, eine differenziertere Betrachtung des Modells, des Kontextes der Schädigung und der betroffenen Zelllinie notwendig ist.

Die nach HI verstärkte Autophagie dient in Immunzellen dem Abbau geschädigter Makromoleküle. Nach therapeutischer Hypothermie ist die Stoffwechselrate im Gewebe sowie die Entzündungsreaktion deutlich abgemildert, woraus ein verminderter zellulärer Schaden entsteht. Insofern ist zu seiner Beseitigung in Immunzellen eine geringere Autophagie nötig.

In Neuronen ist exzessive Autophagie an der Pathophysiologie bei zerebraler Ischämie und Reperfusion beteiligt, da diese zu neuronalem Zelltod und Zellschaden führt. (Ginet et al., 2014; Shen et al., 2025; Wei et al., 2021; Xue et al., 2017) Formen des Zelltods, die durch Autophagie gefördert bzw. induziert werden (können), sind sowohl Apoptose als auch Nekrose sowie eine unabhängige Form des Zelltods, die sog. Autose. (Ginet et al., 2014) Insofern könnte die von uns beobachtete leichte Abmilderung des Autophagieflusses als ein neuroprotektiver Wirkmechanismus der th-HT interpretiert werden. Eine neuroprotektive Wirkung durch Inhibition von Autophagie konnte in verschiedenen Versuchen nachgewiesen werden. (Ginet et al., 2014) Deng et al. berichten von einer negativen Korrelation zwischen synaptischer Funktion und Autophagie mit verschlechterter Performance in Gedächtnis- und globalen Kognitionstests bei verstärkter Autophagie im Ratten-

modell neonataler HIE. (Deng et al., 2023) Durch Gabe von Punicalagin (einem Polyphenol) konnte exzessive Autophagie abgemildert werden, was mit einer Reduzierung von neuronaler Apoptose und Hirngewebsschäden sowie einer verbesserten zerebralen Perfusion, Lernleistung und kognitiven Fähigkeiten im Rattenmodell einherging. (Shen et al., 2025)

Die von uns beobachtete Abmilderung der Autophagie nach HT kann jedoch nicht nur als Folge einer Veränderung des mTOR-Signalweges gesehen werden, da mTOR eine nochmalig reduzierte Aktivität einzig 24 h nach HT im Vergleich zu NT zeigte, während die Autophagie zu beiden Zeitpunkten nach HT leicht sichtbar verstärkt war. Somit liegen vermutlich zumindest teilweise andere Einflüsse als Ursache für diese Beobachtung vor.

Es muss berücksichtigt werden, dass Autophagie durch vielfältige weitere Mechanismen kontrolliert wird, die teils mTOR involvieren und teils unabhängig davon ablaufen, und dass auch bei mTOR-Inhibition noch verschiedene weitere intrazelluläre Prozesse nötig sind, damit die Autophagie starten kann (vgl. 1.2.3 Autophagie). (Bockaert und Marin, 2015; Perluigi et al., 2015; Sun et al., 2018b) Beispielsweise könnten die Stimulation der Autophagie durch GABA_B-Rezeptoraktivierung (Liu et al., 2015) sowie der Einfluss pro- und antiapoptotischer Proteine (Descloux et al., 2015) Gründe dafür sein, dass nach HI eine vermehrter Abbau von p62 zu verzeichnen ist. Der Insult führt zu deutlich verstärkter Apoptose sowie auch einer starken Exzitotoxizität mit Ausschüttung diverser Neurotransmitter.

Es muss außerdem beachtet werden, dass moderate Autophagie insbesondere im sich entwickelnden Gehirn auch eine Vielzahl physiologischer Aufgaben übernimmt und wichtig für neuronale Homöostase, Synapsenbildung, Zellfunktion sowie die Regulation von Zellwachstum, -überleben und -entwicklung ist. (Descloux et al., 2015; Xue et al., 2017) Zudem ist es notwendig, dass der durch den Insult entstandene Schaden nach HI durch Immunzellen u.a. mittels Autophagie beseitigt wird, damit das Gewebe regenerieren kann. Es bestehen also auch neuroprotektive Eigenschaften der Autophagie. (Wu et al., 2024) Insofern ist eine durch HT verminderte Autophagie differenziert zu betrachten. (Dixon et al., 2015; Millar et al., 2017) Zum einen unterscheidet sich die Funktion und der Effekt einer Modulation der Autophagie stark je nach Zelltyp. Des Weiteren kann zwischen nicht-selektiver Autophagie als Antwort auf einen Nährstoffmangel, die eher schädlich wirkt,

und selektiver Autophagie zur gezielten Entfernung dysfunktioneller Organellen und Proteinaggregaten, die eine weitere Zellschädigung vermeidet, unterschieden werden. (Wu et al., 2024) Anhand unserer Untersuchungen ist eine genauere Aussage über diese Aspekte jedoch nicht möglich.

Da nach HT das p62-Level immer noch deutlich unter dem der Kontrollgruppe liegt, ist bisher eine Beeinträchtigung vitaler neuronaler Funktionen durch inhibierte Autophagie jedoch eher unwahrscheinlich.

Bisher durchgeführte Studien zur Autophagie bei neonataler HI treffen sehr unterschiedliche Aussagen bezüglich protektiver oder schädigender Wirkung (He et al., 2024), wobei jedoch die Annahme, dass vermehrte Autophagie nach HIE vor allem zu erhöhtem neuronalem Zelltod führt, leicht überwiegt. (Descloux et al., 2015; Ginet et al., 2014)

Hier ist also die Interpretation etwaiger Veränderungen mit Vorsicht zu genießen. Ebenso sind areal- sowie geschlechtsspezifische Unterschiede zu berücksichtigen. (Ginet et al., 2014)

Wir konnten zeigen, dass ein hypoxisch-ischämischer Insult u.a. via mTOR-Inhibition zu einer deutlich verstärkten Autophagie führt. Dass therapeutische Hypothermie im Kortex eine tendenzielle Abmilderung der Autophagie bewirkt, ist als neuroprotektiver Wirkmechanismus zu verstehen, wird jedoch wahrscheinlich über andere Mechanismen als mTOR ausgeübt. Eine differenziertere Evaluierung der Wirkung von HT auf die Autophagieleistung sowie deren Langzeitfolgen unter Berücksichtigung weiterer Autophagiemarker sowie funktioneller Aspekte erscheint notwendig.

Zusätzlich zum Western Blot führten wir immunhistochemische Färbungen gegen p62 durch, mit denen wir das Vorhandensein von Autophagie bestätigen konnten.

Es ist anzumerken, dass neben der Autophagie auch andere Formen des regulierten Zelltods, wie Nekroptose, Pyroptose oder Ferroptose, eine Rolle spielen können. (Wu et al., 2024)

4.4 Neuroinflammation bei hypoxisch-ischämischer Hirnschädigung und therapeutische Wirkung der Hypothermie

Hypoxisch-ischämische Hirnschädigung führt zu einer Entzündungsreaktion im Hirn, (Fleiss et al., 2021; Hagberg et al., 1996; Hagberg et al., 2015) während therapeutische Hypothermie diese abschwächt. (Chalak et al., 2019; Hassell et al., 2015; Ma et al., 2012)

Anhand der Quantifizierung von mRNA pro- und antiinflammatorischer Zytokine konnten wir die Inflammationsreaktion nach 6 und 24 h in unserem Versuch bestätigen.

In Konkordanz mit den Ergebnissen einer Vielzahl von Studien an Tier und Mensch beobachteten wir in unserem Modell nach hypoxisch-ischämischer Schädigung einen Zytokinsturm mit Betonung der proinflammatorischen Komponente: Zu beiden Zeitpunkten waren im Kortex die Gene sowohl pro- als auch antiinflammatorischer Zytokine stark vermehrt exprimiert, wobei die proinflammatorischen überwogen. Im Hippocampus beschränkte sich die Reaktion auf eine starke proinflammatorische Reaktion des Gewebes, wobei hier nach 24 h die weniger zentralen Zytokine, IL-12 und iNOS, sogar im Vergleich zur Kontrolle vermindert vorlagen.

Diese Beobachtung zeigt, dass unser Modell den Zytokinsturm, der in der Pathophysiologie der HIE eine essenzielle Rolle spielt, erfolgreich abbilden kann und somit gut zur Analyse dessen und der Wirkung von th-HT auf diesen geeignet ist.

Der Verlauf der Entzündungsreaktion nach hypoxisch-ischämischem Insult sowie nach therapeutischer Hypothermie war dabei arealspezifisch sehr unterschiedlich. Dies ist aufgrund der im Modell verschieden stark beeinträchtigten Durchblutung und Schädigung nach HI sowie des unterschiedlichen Gewebeaufbaus, seiner Zusammensetzung und der Mikroglia-Dichte (Fleiss et al., 2021) nicht verwunderlich und wird von anderen Autoren sowohl im Tiermodell als auch am Menschen beobachtet (vgl.a.o.). (Furukawa et al., 2014; Kadhim et al., 2003; Sabir et al., 2016; Sabir et al., 2012) Dazu kommt, dass eine von extern applizierte Kühlung durch die unterschiedliche Lage von Kortex und Hippocampus die Gebiete ggf. verschieden stark erreichen und dadurch beeinflussen kann.

So erhalten verschiedene Autoren in leicht unterschiedlichen Ratten- oder Mausmodellen der neonatalen HIE andere Ergebnisse für die Veränderung und den zeitlichen Verlauf der einzelnen betrachteten Zytokine. (Mo et al., 2023) Ein häufiges Muster ist eine Erhö-

hung pro- und eine Minderung antiinflammatorischer Zytokine nach hypoxisch-ischämischem Insult. (Kanal und Levison, 2024; Yu et al., 2024; Zuo et al., 2024) Anzumerken ist hierzu, dass diese Studien meist spätere Zeitpunkte nach dem Insult betrachten.

Die Heraufregulation der mRNA proinflammatorischer Zytokine konnten wir in unseren Versuchen bestätigen. Für die ausgewählten antiinflammatorischen Zytokine beobachteten wir jedoch, wie auch bspw. Mo et al. (2023) für Arg1, ebenfalls eine Steigerung des mRNA-Levels. Eine Erhöhung beispielhafter Zytokine aus beiden Gruppen (TNF α und IL-1 β als pro- und TGF β also antiinflammatorisches Zytokin) konnte zu früheren Zeitpunkten (2-24 h nach Insult) auch im Schweinemodell neonataler HIE nachgewiesen werden. (Mo et al., 2023; Teo et al., 2023)

Es wird deutlich, dass es sich bei der Entzündungsreaktion nach HI im Hirn um ein komplexes Geschehen handelt. Mit Bezug auf Zytokine muss immer der Kontext und deren Wechselwirkung mit anderen Zellen und Signalstoffen betrachtet werden. Das verwendete Modell kann ebenfalls einen starken Einfluss auf den Verlauf der Inflammation nehmen.

Therapeutische Hypothermie wurde in der Vergangenheit bereits als neuroprotektive Therapie in Hirnschädigungen verschiedener Art, wie Schlaganfall, traumatischer Hirnverletzung und neonataler Asphyxie diskutiert; heutzutage findet sie jedoch fast nur in der Neonatologie sowie (mit uneindeutiger Datenlage) nach Reanimation nach Herz-Kreislauf-Stillstand Anwendung. (Deutsche Gesellschaft für Neurologie, 2023a; Fischer und Kainz, 2022; Nolan et al., 2021) Als Einzelfallentscheidung kann der Einsatz bei erhöhtem intrazerebralem Druck und als Akuttherapie des raumfordernden ischämischen Schlaganfalls ohne neurochirurgische Interventionsmöglichkeit erwogen werden. (Deutsche Gesellschaft für Neurologie, 2022; 2023b) Als ein molekularer Wirkmechanismus wird die Abmilderung der Entzündungsreaktion, die sich unter anderem in einer Herabregulation der Genexpression proinflammatorischer Zytokine wie TNF α , IL-1 β manifestiert, beschrieben. (Goss et al., 1995; Gu et al., 2015; Guan et al., 2019; Yuan et al., 2014; Zhang et al., 2008)

Konkordant mit dem Großteil der Studien zum Thema sind in unserem Versuch mit IL-1 β und IL-6 24 h nach HT die zentralen proinflammatorischen Zytokine in beiden Arealen (bzw. IL-6 6 h nach HT im Kortex) wieder fast auf Kontrollniveau gesenkt. Für IL-6 und IL-

IL-12 im Kortex findet diese Abmilderung bereits nach 6 h statt; gleiches gilt für IL-12 und iNOS im Hippocampus.

Erstaunlicherweise bewirkte Hypothermie in unserem Versuch für die zentralen proinflammatorischen Zytokine IL-1 β und IL-6 früh (nach 6 h) eine enorm verstärkte Genexpression in Kortex (hier nur IL-1 β) und Hippocampus. Nach 24 h war diese im Vergleich zu NT durch HT deutlich reduziert und erreichte fast Kontrolllevel.

Es liegt nahe zu schlussfolgern, dass die drastische Erhöhung von IL-1 β und IL-6 ein direkter Effekt der Applikation der Hypothermie ist. Dies steht im Widerspruch zu der Annahme einer abgemilderten Entzündungsreaktion durch th-HT.

In der frühen Wiederaufwärmungsphase nach therapeutischer Hypothermie werden viele Organe und Gewebe im Neugeborenen wieder vermehrt durchblutet (sekundäre Reperfusion). Das führt zu einem Anstieg der zirkulierenden proinflammatorischen Zytokine. Diese kann zu zusätzlicher Schädigung und Pathologie des Hirns sowie anderer Organe beitragen, (Chalak et al., 2019) was unterstreicht, weshalb die Anwendung therapeutischer Hypothermie mit äußerster Vorsicht erfolgen muss. Eine mögliche Erklärung für den drastischen Anstieg dieser Zytokine nach 6 h könnte also sein, dass die Analyse hier direkt im Anschluss an die Hypothermiephase erfolgte.

Die während des hypoxisch-ischämischen Insults ausgeschütteten Zytokine könnten zudem durch die geringere Gewebedurchblutung bei der Applikation therapeutischer Hypothermie weniger Möglichkeit haben, aus dem Gewebe ausgewaschen zu werden, und dadurch dort akkumulieren.

Die Zeit reicht nach 6 h für HT also ggf. nicht aus, um ein günstiges Ergebnis zu erzielen. Auch für iNOS beobachten wir im Kortex zu beiden Zeitpunkten, besonders 24 h nach HT, ein erhöhtes mRNA-Level im Vergleich zu NT. Im Hippocampus lag eine verstärkte Expression der mRNA von IL-12 und iNOS nach 24 h vor. Dies führte jedoch dadurch, dass diese beiden Zytokine nach NT im Vergleich zur Kontrolle vermindert transkribiert wurden, zu einer erneuten Angleichung des mRNA-Levels nach HT ans Kontrollniveau.

IL-1 β führt zu einer vermehrten Ausschüttung von iNOS, sodass diese Beobachtung Resultat der IL-1 β -Erhöhung 6 h nach th-HT sein könnte. Um mehr Klarheit über den Effekt von IL-1 β auf iNOS zu bekommen, ist jedoch noch mehr Evidenz nötig.

Eine gewisse Menge an proinflammatorischen Zytokinen ist auch wichtig für die Beseitigung des Zellschadens und für die adäquate Reaktion des Gewebes auf den Insult. Die

Erhöhung im Hippocampus führt zudem nur zu einer Normalisierung des Levels auf Kontrollniveau. Deshalb kann man hier also keinesfalls von einer überschießenden Immunantwort sprechen. Demzufolge könnten diese Effekte der HT in diesem Areal u.U. als neuroprotektiv zu werten sein.

Die Hyperinflammation trägt, wie oben erläutert, wesentlich zum andauernden Hirnschaden nach HIE bei, während eine Inhibition von Zyto- und Chemokinen zu einer Abmilderung des Schadens führt. (Bhalala et al., 2014) Deshalb liegt eine wesentliche neuroprotektive Wirkung therapeutischer Hypothermie in der Abmilderung des Zytokinsturms im Rahmen der überschießenden Immunreaktion, insbesondere der proinflammatorischen Antwort. Diese konnten wir hiermit belegen.

Auch in Bezug auf die antiinflammatorische Antwort konnten wir im Kortex eine Abmilderung des Zytokinsturms durch HT zu beiden Zeitpunkten erkennen, wobei sich das mRNA-Level der Zytokine durch die Kühlung ausnahmslos wieder dem Kontrolllevel annäherte. Da, wie oben beschrieben, HT eine Reduktion der proinflammatorischen Zytokine bewirkt, könnte somit auch eine geringere antiinflammatorische Antwort nötig sein; die Angleichung an das Kontrolllevel könnte somit ebenfalls positiv gewertet werden.

Auffällig ist die deutliche Erhöhung der antiinflammatorischen Immunantwort nach 24 h im Hippocampus nach HT. Dies deckt sich nicht mit dem sonstigen Mechanismus der HT, den Zytokinsturm eher zu mildern. Zu diesem Zeitpunkt ist das Gewebe ggf. schon bereit, als Reaktion auf die unvermeidlich stattfindende Inflammation nach der Schädigung eine antiinflammatorische Antwort zu induzieren, um wieder eine Normalisierung des Immunsystems zu bewirken. Auch Hagberg et al. (2015) berichten, dass ca. 24-72 h nach HI eine antiinflammatorische Phase folgt. Insofern ist möglich, dass Hypothermie im Hippocampus dazu führt, dass diese antiinflammatorische Phase früher als nach normothermischer Behandlung einsetzen kann. Hierin könnte ein weiterer positiver Wirkmechanismus der th-HT liegen. Yang et al. (2022) untersuchten die Wirkung von Koffein auf TNF α , IL-1 β , IL-10 und TGF β nach neonataler HIE im Rattenmodell nach 7, 14 und 21 Tagen. Ihre Ergebnisse haben Gemeinsamkeiten mit unseren Beobachtungen: Nach HI war die mRNA und Proteinexpression der proinflammatorischen Zytokine signifikant erhöht, während sich für die antiinflammatorischen Zytokine nur auf Proteinlevel eine signifikante Erhöhung ergab (das mRNA-Level war unverändert). Koffein wirkte neuroprotektiv und war

mit einer Herabregulation pro- und Heraufregulation antiinflammatorischer Zytokine assoziiert. (Yang et al., 2022) Insofern ist es möglich, dass hierbei Koffein und th-HT über einen ähnlichen Mechanismus neuroprotektiv wirken, indem sie die Entzündungsreaktion abmildern und eine antiinflammatorische Antwort (wie von uns nach 24 h im Hippocampus beobachtet) induzieren.

Bei der Entzündungsreaktion ist es wichtig, ihre duale Rolle zu beachten: Auf der einen Seite haben besonders TNF α und IL-1 β deutlich schädigende Effekte, auf der anderen Seite können sie auch neuroprotektiv wirken. (Girard et al., 2009) IL-6 nimmt im Hirn ebenfalls eine duale Rolle ein. (Leavy und Jimenez Mateos, 2020) TGF β hat genauso, je nach weiteren Zytokinen in der Umgebung, pro- oder antiinflammatorische Eigenschaften; insbesondere in der tertiären Phase nach HI fördert es verspätete Neurodegeneration durch Induktion der Astrozytenproliferation und Ausbildung einer Glianarbe. (Kanal und Levison, 2024). Eine einfache Deutung, dass die reduzierte Entzündungsreaktion allgemein vorteilhaft ist, wäre zu eindimensional gedacht, da diese wesentlich komplexer abläuft. Ein bedeutsames Beispiel im Falle neonataler HIE ist die eher schädliche Wirkung therapeutischer Hypothermie und einer dadurch bedingten Immunsuppression bei vorbestehender Inflammation. (Hassell et al., 2015) Entsprechend ist es notwendig, eine beobachtete Modulation der Inflammation je nach verwendetem (Tier-)Modell, Hirnareal, Zeitpunkt nach dem Insult und dem Vorhandensein einer zusätzlichen Infektion differenziert zu interpretieren.

Zudem verändern sich die Eigenschaften des Immunsystems im Laufe der Entwicklung. (Hagberg et al., 1996) Erkenntnisse über den Effekt verschiedener Zytokine aus Experimenten an adulten Säugetieren können somit nicht eins zu eins auf die Situation neonataler Tiere und Menschen übertragen werden, da sich das unreife Hirn unter anderem in der Verwendung metabolischer Energiequellen, der Vulnerabilität gegenüber Exzitotoxizität durch Glutamat und oxidativem Stress, der Antwort auf Zytokine und den Mechanismen von Schädigung und Reparatur unterscheidet. (Bhalala et al., 2014)

Diskrepanz zwischen mRNA und Proteinlevel bei Zytokinen

Es ist bekannt, dass die Bioaktivität von Zytokinen sowohl auf transkriptionaler als auch auf translationaler Ebene reguliert wird. (Hagberg et al., 1996) Besonders nach HI, die die

Proteinsynthese drosselt, spielt translationale Kontrolle eine wichtige Rolle. Wir analysierten für ausgewählte Zytokine auch die Menge tatsächlich vorliegenden Proteins, um einen Eindruck über die tatsächliche Translation der mRNA zu gewinnen.

Hier erhielten wir Ergebnisse, die keine Kongruenz zu unseren Ergebnissen in der RT-PCR lieferten.

In der Stressantwort wird Proteinsynthese allgemein heruntergefahren, spezifische Gene werden jedoch vermehrt exprimiert. (Spriggs et al., 2010) Bei neonataler HI und akutem Stress allgemein spielt dabei vor allem translationale Kontrolle als schnelle Möglichkeit, auf Umweltfaktoren zu reagieren, eine Rolle.

Mechanismen, die die Proteinexpression spezifischer mRNAs modulieren, sind z.B. Splicing, Export aus dem Kern, Lokalisation der mRNA im Zytoplasma und ggf. deren Sequestrierung, Translation, posttranslationale Modifikation und letztlich der Abbau des Proteins. (Spriggs et al., 2010)

Zudem existieren verschiedene Motive innerhalb der mRNA, die es ihr ermöglichen, der globalen Repression cap-abhängiger Translation u.a. durch mTOR-Inhibition bei Stress zu entgehen. Diese beinhalten bspw. sog. Internal ribosome entry sites (IRES), untranslatierte open reading frames (uORFs), kurze 5'-untranslatierte Regionen (5'-UTRs), das GAIT (IFN- γ -activated inhibitor of translation)-Element, sowie micro-RNAs. (Spriggs et al., 2010)

Daraus wird ersichtlich, dass aufgrund vielfältiger Mechanismen besonders unter Stress kein konstantes Verhältnis zwischen der Menge an mRNA und Protein vorliegen muss und auch die mTOR-Inhibition nur bedingten Einfluss auf die Produktion bestimmter Zytokine hat.

Das Muster der beobachteten mRNA-Expression lässt sich gut in bisher Bekanntes über die Pathophysiologie bei HIE einordnen und zeigt eine eindeutige Neuroprotektion durch HT. Die ermittelte Proteinexpression jedoch ist auch nach eingehender Recherche keinem Schema zuzuordnen. Zudem liefert eine Studie von Hagberg et al. Hinweise darauf, dass bei HI im neonatalen Rattenmodell die IL-1 β -Expression mit der tatsächlichen Bioaktivität übereinstimmt. (Hagberg et al., 1996) Yu et al. (2024) untersuchten im Rattenmodell neonataler HIE und in einer Mikrogliakultur mit OGD das mRNA-Level von iNOS, TNF α , Arg1 und TGF β mittels RT-qPCR sowie das entsprechende Proteinlevel mittels

ELISA. Dies ergab ebenfalls sich entsprechende Veränderungen der Zytokine auf mRNA- und Proteinlevel. Ähnliche Resultate erhielten auch Yang et al. (2022) für TNF α , IL-1 β , IL-10 und TGF β . Auf andere Zytokine lässt sich dies nicht ohne weiteres übertragen; jedoch legt die zentrale Rolle der Entzündungsreaktion bei neonataler HIE nahe, dass die beobachtete mRNA-Erhöhung auch in einer verstärkten Bioaktivität resultiert.

Diese Gründe sprechen eher dafür, dass ggf. eher die Methode der Proteindetektion im Western Blot unzureichend war (s.u.: 4.6 Limitationen) und entgegen unseren Ergebnissen Zytokine auch in Proteinform vorliegen.

4.5 Einfluss von mTOR auf die Entzündungsreaktion im Gehirn

Zum Einfluss von mTOR auf die Neuroinflammation, die Zytokinproduktion, Chemotaxis, Makrophagen- (bzw. Mikroglia-) Polarisation und Autophagie durch Immunzellen einschließt, liefern Studien mit mTOR-Inhibitoren sehr unterschiedliche Ergebnisse, die teils eine pro-, teils eine antiinflammatorische Wirkung nahelegen. (Weichhart et al., 2015) Dies liegt hauptsächlich in der Komplexität des Signalweges begründet. (Weichhart et al., 2015) (U.a. übt Akt einen wesentlichen Einfluss auf die Zytokinproduktion und Makrophagenpolarisation aus. Akt wirkt stromaufwärts von mTORC1 und –abwärts von mTORC2, wobei jedoch auch ein negatives Feedback von mTORC1 existiert. Die Wirkung und Substratspezifität von Akt ist wiederum abhängig von dessen Isoform und Phosphorylierungsstatus. Zudem existieren stromabwärts von mTOR diverse weitere Mediatoren, die zusätzlich von anderen Signalwegen beeinflusst werden können (wie z.B. NF κ B, STAT3, GSK3 β , MAP3K8, IRF7 oder PDCD4) und unterschiedliche Effekte auf Zytokinexpression haben.)

Wir beobachteten im vorliegenden Versuch eine deutlich veränderte Genexpression pro- und antiinflammatorischer Zytokine im Kortex und Hippocampus 6 h und 24 h nach HT; die mTOR-Aktivität ist jedoch im Vergleich zur NT eher gering verändert.

Das führt zu der Schlussfolgerung, dass HT zwar auf transkriptionaler Ebene inflammationshemmend wirkt, dies jedoch wahrscheinlich hauptsächlich über andere intrazelluläre Mediatoren als den mTOR-Signalweg vermittelt wird (zumindest zu den von uns untersuchten Zeitpunkten). Es existiert eine große Vielfalt von Faktoren, Mediatoren und Signalwegen, die die Entzündungsreaktion modulieren.

mTOR ist im Hinblick auf die Protein- und damit auch Zytokinsynthese wesentlich stärker an der Translation als an der Transkription beteiligt. Über diesen Prozess können wir leider aufgrund der oben erwähnten Schwächen der Zytokinanalyse mittels Western Blot keine Aussage treffen und somit nicht beurteilen, welche Folge die mTOR-Inhibition nach HI (sowohl nach NT als auch nach HT) auf die Translation der Zytokine hat. Zudem müssten dazu vor allem spätere Zeitpunkte betrachtet werden, da sich Veränderungen in der mTOR-Aktivität erst ab ca. 12-24 h oder auch nach Tagen oder Wochen in einer modulierten Proteinsynthese widerspiegelt. (Talos et al., 2012)

Zudem gilt es zu berücksichtigen, dass nicht nur mTOR das Entzündungsgeschehen, sondern dieses umgekehrt auch mTOR beeinflusst. Speziell in Immunzellen wird eine mTOR-Aktivierung bei Inflammation beschrieben, die zu erhöhter Proteinsynthese und darüber zur Anpassung des Metabolismus, Zytokinantworten, Antigenpräsentation, Makrophagenpolarisation und Zellmigration beiträgt. (Weichhart et al., 2015)

4.6 Limitationen

Obwohl das Rice-Vannucci-Modell ein etabliertes und allgemein anerkanntes Rattenmodell zur hypoxisch-ischämischen Hirnschädigung ist, offenbarten sich in bisherigen Untersuchungen verschiedene Schwachstellen:

- Die Technik beinhaltet eine große Variabilität in Infarktareal und Symptomen; (Leavy und Jimenez Mateos, 2020; Millar et al., 2017) in Versuchen mit dem ursprünglichen Rice-Vannucci-Modell entstand beispielsweise nur bei 56 % der Tiere überhaupt ein Infarkt. (Rumajogee et al., 2016) Zudem kann nicht jede Operation mit exakt dem gleichen Maß an Stress und Verletzung des Tieres durchgeführt werden, was die Ursache für zusätzliche Variabilität in der Hirnschädigung einzelner Versuchstiere sein kann.
- Es wird vermutet, dass sowohl im Menschen als auch in der Ratte die Reaktion männlicher und weiblicher Individuen auf Hirnschädigung in der Entwicklung unterschiedlich sind. (Leavy und Jimenez Mateos, 2020; Millar et al., 2017; Rumajogee et al., 2016) In unserem Versuch erfolgte eine Randomisierung der Geschlechter, um diesen Einflussfaktor auszuschließen. Bezüglich des p-mTOR/mTOR-Verhältnisses konnten im

Rice-Vannucci-Modell 4 und 24 h nach HI keine geschlechtsspezifischen Unterschiede nachgewiesen werden. (Bernis et al., 2025)

- Es wurde gezeigt, dass dieses Modell die Bedingungen im menschlichen Gehirn nicht ganz optimal repräsentiert; Defizite liegen vor allem im Entwicklungsstadium der weißen Masse am P7 und in der Art der entstehenden Hirnschädigung. (Rumajogee et al., 2016) Ratten am postnatalen Tag 7 entsprechen am ehesten menschlichen Feten in der 32.-36. Gestationswoche. Daher wird von einigen Autoren für Rattenmodelle der HIE empfohlen, vorzugsweise P10-Ratten zu verwenden. (Patel et al., 2015)

Anzumerken bleibt weiterhin, dass wir in unserem Modell die therapeutische Hypothermie für nur 6 h applizierten, während der Standard in der Versorgung menschlicher Neugeborener eine Behandlung für 72 h ist. Zudem könnte die persistierende Ligatur der ACC im Versuch ein Verfälschungsfaktor sein, da bei Neugeborenen mit HIE in der Regel die Perfusion durch initiale Wiederbelebensmaßnahmen und Kreislaufstabilisation wiederhergestellt wird. Dabei ist die Reperfusion ein wichtiger Teil der Pathophysiologie bei HIE: Während dieser werden vermehrt freie Radikale, Zytokine und andere proinflammatorische Faktoren produziert bzw. aus dem geschädigten Gewebe ausgewaschen, was in einer weiteren Schädigung der Blut-Hirn-Schranke resultieren kann. (Zhang et al., 2023) Trotzdem ist die Reperfusion für die Erholung und weitere Entwicklung des Hirnparenchyms unabdingbar. Es existieren Tiermodelle zur hypoxisch-ischämischen Hirnschädigung mit anschließender Reperfusion. Diese kann bspw. durch eine Muskelbrücke erreicht werden, die nach einer definierten Ischämiezeit wieder gelöst wird. Solche Modelle haben sich jedoch in der Vergangenheit aufgrund des technischen Anspruchs der OP sowie einer hohen Mortalitätsrate nicht durchgesetzt. (Zhang et al., 2023) Zhang et al. (2023) beobachteten im Rattenmodell zur Hirnschädigung durch Hypoxie-Ischämie und Reperfusion ein im Vergleich zur alleinigen HI verändertes Proteom.

Zur Protein- bzw. mRNA-Quantifizierung mittels Western Blot bzw. RT-PCR nutzen wir jeweils Lysate der Proben des gesamten ipsilateralen Kortex bzw. Hippocampus der Tiere. Dies gibt uns einen guten Überblick über die Menge an Protein bzw. mRNA im Gewebe, hat jedoch den Nachteil, dass nicht mehr nachvollziehbar ist, aus welchen Zellen diese Moleküle stammen. Besonders für den mTOR-Signalweg inkl. Autophagie wäre es entscheidend, zu wissen, ob die mTOR-Hemmung durch HI hauptsächlich in Neuronen,

Gliazellen, wie Mikroglia, oder Immunzellen stattfindet, da mTOR in diesen Zellen teils sehr unterschiedliche Funktionen erfüllt. Eine verstärkt stattfindende Autophagie würde beispielsweise in Neuronen Proteinkatabolismus als Reaktion auf Nährstoffmangel und eine Störung der zellulären Homöostase bewirken, während sie in Mikroglia mit dem Abbau von phagozytiertem Material eine wichtige Rolle zur Beseitigung des Gewebeschaadens spielt. Eine mTOR-Aktivierung bzw. -Inhibition kann also in verschiedenen Zelltypen vielfältige, teils protektive und teils schädigende Wirkungen haben. (Villa-Gonzalez et al., 2022)

Eine Beeinflussung des Signalweges erscheint sowohl in Neuronen wie auch in Mikrogliazellen möglich (vgl. a. 1.3 Hypothese und Zielsetzung). (Dello Russo et al., 2009)

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, allgemein einen Eindruck zu gewinnen, ob und in welchem Maße mTOR bei Hypoxie-Ischämie im neonatalen Hirn und in der therapeutischen Hypothermie eine Rolle spielt. Dafür erscheint die Untersuchung von Gewebelysaten ausreichend.

Da P70S6K das direkte Substrat des mTORC1 ist, wäre es sinnvoll gewesen, dessen Aktivitätsstatus zu beurteilen. Leider war uns dies nicht möglich, da der hier verwendete Antikörper nicht für Western Blots geeignet ist. Alternativ ermittelten wir die Phosphorylierung des einen Schritt stromabwärts liegenden S6-Proteins. Dieses gilt allgemein als repräsentativ für die S6K-Aktivität. (Hay und Sonenberg, 2004) Allerdings ist es keine direkte Bestimmung, was Ungenauigkeiten (in Bezug auf Quantität und zeitlichen Verlauf) verstärkt. Dazu kommt, dass P70S6K nicht nur über S6, sondern auch über zahlreiche weitere Zielproteine die Translation sowie viele andere Funktionen von mTOR mit und ohne Zusammenhang mit der Proteinsynthese vermittelt. Deren Analyse (bspw. von eIF4B) wäre insofern ebenfalls sinnvoll, lag jedoch nicht im Rahmen dieser Arbeit.

Eine weitergehende Untersuchung des mTOR-Signalwegs im Kontext der neonatalen HIE sollte auch berücksichtigen, welcher der beiden mTOR-Komplexe konkret beeinflusst wird. Zudem spielen weitere Phosphorylierungsstellen, nicht nur an mTOR selbst, sondern auch an anderen Subunits der Komplexe, eine modulierende Rolle. (Villa-Gonzalez et al., 2022)

Des Weiteren bleibt anzumerken, dass wir in unseren Untersuchungen eine teils hohe Varianz der Ergebnisse innerhalb der Versuchsgruppen beobachten konnten. Eine genauere Exploration möglicher weiterer Einflussvariablen mit dem Ziel, diese in zukünftigen Versuchen zu verringern, sollte Bestandteil weiterer Experimente in diesem Bereich sein.

Im Hinblick auf die Analyse der Entzündungsreaktion ist das Ergebnis eines Western Blots kritisch zu sehen. Allgemein ist die Methode wenig sensitiv für Zytokine. Diese eignen sich aufgrund ihrer geringen Halbwertszeit nur bedingt hierfür, (Girard et al., 2009) insbesondere, wenn die Probe schon längere Zeit eingefroren ist. Für die Analyse der Proteinlevel von Zytokinen werden allgemein eher Methoden wie ELISA, das hier eine höhere Sensitivität besitzt, (Gressner und Gressner) oder Durchflusszytometrie (FACS) empfohlen. (Robert-Koch-Institut, 2004) Eine andere Möglichkeit wäre ansonsten auch eine Betrachtung der Bioaktivität mittels Bioassay. (Gressner und Gressner; Hagberg et al., 1996)

4.7 Ausblick

Die in unserem Versuch erzielten Ergebnisse sowie Resultate weiterer Studien legen eine Beteiligung des mTOR-Signalweges bei neonataler HIE sowie in der molekularen Wirkweise therapeutischer Hypothermie nahe:

Mögliche neuroprotektive Wirkmechanismen therapeutischer Hypothermie nach HI, auf die unsere Versuche einen Hinweis liefern könnten, sind:

- Inhibition des mTOR-Signalweges
- Reduktion der Autophagie
- Abmilderung des Zytokinsturms und Induktion einer antiinflammatorischen Reaktion

Anhand der uns vorliegenden Daten ist es jedoch noch nicht möglich, eine exakte Aussage über die Bedeutsamkeit dieser Aussagen sowie darüber zu treffen, wie genau und zu welchen Zeitpunkten Hypothermie den mTOR-Signalweg, Autophagie und das Entzündungsgeschehen beeinflusst. Die Beobachtungen, die wir bereits 6 h und 24 h nach hypoxisch-ischämischer Hirnschädigung und normo- bzw. hypothermischer Behandlung

machen konnten, unterstreichen die Notwendigkeit, noch weitere frühe und späte Zeitpunkte zu analysieren und ggf. weitere Untersuchungen zu anderen Proteinen und bezüglich des funktionellen Outcomes durchzuführen.

Für unsere Western-Blot- und PCR-Untersuchungen nutzten wir Gewebelysate des ipsilateralen Kortex und Hippocampus. Diese geben einen Überblick über das Vorliegen von Proteinen in diesen Arealen, lassen jedoch keine Zuordnung zu bestimmten Zelltypen zu. Um detailliertere Erkenntnisse über die pathophysiologischen Prozesse bei HI sowie die Wirkung von HT zu bekommen, sind in Zukunft immunhistochemische Kofärbungen gegen die jeweiligen Zielproteine und Iba-1 (ionisiertes calcium-bindendes Adaptermolekül 1, Marker für Mikroglia) bzw. NeuN (neuronal nuclei, Marker für Neuronen) oder auch Western-Blot- oder PCR-Analysen von isolierten Mikroglia und/oder Zellkulturen sinnvoll. (vgl. auch 4.6 Limitationen)

Allgemein ist es zur Analyse eines Signalwegs wie der mTOR-Aktivierungskaskade sowie des Entzündungsgeschehens nötig, noch mehr Zeitpunkte in die Untersuchungen einzuschließen. Nur so ist es möglich, bedeutsame Veränderungen zu erkennen, nachverfolgen und beschreiben zu können. Sinnvolle Zeitpunkte wären hier früh z.B. 0 h und 4 h, dann noch ggf. 12 h und im längeren zeitlichen Verlauf 48 h.

Wir konnten in unseren Versuchen Hinweise darauf erkennen, dass HT einen inhibierenden Einfluss auf den mTOR-Signalweg haben könnte. Im direkten Vergleich zwischen NT und HT konnten wir leider zu keinem der Zeitpunkte Signifikanz ($P < 0,05$) erreichen.

Die Inhibition konnten wir bisher nur im Kortex nach 24 h für mTOR sowie ansatzweise für 4E-BP1 zu beiden Zeitpunkten beobachten. Eine weitere Analyse auch des Hippocampus zu späteren Zeitpunkten, mit mehr Versuchstieren und ggf. unter anderen Versuchsbedingungen erscheint lohnenswert und wird mehr Aufschluss über die tatsächliche Bedeutung der mTOR-Deaktivierung nach HT geben.

Außerdem konnten wir keine (deutliche) Veränderung in der Phosphorylierung der mTOR-Zielproteine S6 und 4E-BP1 nach NT oder HT beobachten, wofür ein möglicher Grund die zeitliche Latenz in der Reaktion des Signalwegs sein könnte. (vgl. 4.2 Der mTOR-Signalweg bei Hypoxie-Ischämie und therapeutischer Hypothermie) Auch hierüber wird eine Analyse späterer Zeitpunkte weitere Informationen liefern.

Von verschiedenen Autoren wird eine neuroprotektive Wirkung einer Inhibition des Signalweges beschrieben. mTOR erfüllt im ZNS, insbesondere bei Neugeborenen, jedoch auch zentrale Funktionen in der Entwicklung. Eine in Zeit und Quantität genau abgestimmte Regulation dieses Signalwegs ist demnach entscheidend. Aus diesem Grund ist es wichtig, detaillierteres Wissen über den Einfluss der Hypothermie auf den mTOR-Signalweg auch zu späteren Zeitpunkten und in unterschiedlichen Zelltypen, insbesondere Neuronen, Astro- und Oligodendrozyten, Mikroglia und anderen Immunzellen, zu erlangen. Auch funktionelle Tests nach HI und HT könnten hier weitere Aufschlüsse bringen, ebenso wie die Langzeitbeobachtung menschlicher Säuglinge, die mit th-HT therapiert wurden.

Zu allen Untersuchungen bezüglich des molekularen Wirkmechanismus verschiedener therapeutischer Interventionen ist zu sagen, dass eine finale Aussage, ob dieser wirklich in einem bestimmten Signalweg begründet liegt, erst dann getroffen werden kann, wenn die entsprechende Wirkung bei zusätzlicher Gabe eines Inhibitors ebendieses Signalwegs ausbleibt. Andernfalls kann eine Korrelation ohne Kausalität nicht ausgeschlossen werden. Zur endgültigen Gewissheit sollten noch entsprechende Studien durchgeführt werden.

Zu berücksichtigen gilt hierbei außerdem, dass eine systemische Beeinflussung des mTOR-Signalweges nicht nur das Hirn, sondern auch diverse weitere Organe beeinflussen kann. Untersuchungen zu möglichen diesbezüglichen Nebenwirkungen, auch abhängig von der Applikationsform, sollten sich ebenfalls anschließen, um das klinische Potenzial solcher Agenzien einzuschätzen.

Bei der Autophagie handelt es sich um ein komplexes Geschehen. Ihre genaue Beurteilung bedarf der Analyse mehrerer Signalwege und Markerproteine (wie LC3 oder Beclin1). (Descloux et al., 2015) Um exakte Aussagen über den genauen Status der Autophagieleistung zu treffen, ist deren Analyse also unerlässlich.

Auch hier kann die Analyse weiterer Zeitpunkte in Zukunft mehr Wissen über die Rolle von Autophagie bei HI und insbesondere bei th-HT bringen. Diese Notwendigkeit wird dadurch unterstrichen, dass wir in unseren Versuchen einen leichten Einfluss von HT auf p62 erkennen konnten, der nicht signifikant war, jedoch ggf. einen vielversprechenden Ansatz für weitere Forschung in dem Gebiet bieten könnte.

Im Hinblick auf Autophagie gilt zu beachten, dass sie insbesondere im sich entwickelnden Gehirn sowie in der Immunantwort diverse physiologische Funktionen erfüllt, sodass unsere Beobachtung einer tendenziellen Inhibition differenziert betrachtet werden muss. Längerfristige funktionelle Untersuchungen können hier mehr Aufschluss geben.

Die Entzündungsreaktion ist ein zeitlich und räumlich sehr dynamischer und exakt koordinierter Prozess. Im Rahmen des Zusammenspiels verschiedener pro- und antiinflammatorischer Zytokine gilt es immer, ihre komplexe zeitliche und räumliche Interaktion sowie ihre qualitativ unterschiedliche Wirkung je nach Rezeptor, Umgebung etc. zu berücksichtigen. Die exakte Rolle zu den analysierten Zeitpunkten ist unklar. (Girard et al., 2009) Um darüber genauere Aussagen machen zu können, müssen in Zukunft noch weitere Zeitpunkte betrachtet werden.

Im Hinblick auf unsere Beobachtungen wäre es insbesondere interessant zu untersuchen, ob und wie die von verschiedenen Autoren (Fleiss et al., 2021; Hagberg et al., 2015) postulierte antiinflammatorische Antwort zwischen 24-72 h nach HI in den geschädigten Arealen einsetzt und welchen Effekt HT darauf ausübt bzw. ob sich die von uns vermutete Verfrühung und Verstärkung der antiinflammatorischen Antwort durch HT weiterhin bestätigen lässt. Dass bisher im Zeitraum zwischen 6 und 24 h, den wir untersuchten, nur eine proinflammatorische Antwort beschrieben wurde (Fleiss et al., 2021; Hagberg et al., 2015) und allgemein wenig über die antiinflammatorische Reaktion nach HI und HT bekannt ist, unterstreicht diese Notwendigkeit zusätzlich.

Zur Beurteilung des inflammatorischen Status im Gewebe wählten wir mit IL-1 β , IL-6, IL-12 und iNOS sowie Arg1, CD206 und TGF β repräsentative pro- und antiinflammatorische Zytokine aus, die eine Rolle in der Pathophysiologie der HIE spielen und bereits von anderen Arbeitsgruppen als Marker für die Entzündungsreaktion genutzt wurden. (vgl. a. 1.1.2 Neuroinflammation und 2.2.4 RT-PCR) Allerdings ist daneben u.a. auch TNF α ein nach HI sehr wichtiges und viel untersuchtes Zytokin im Tiermodell sowie im neonatalen Hirn. (Kadhim et al., 2003) Es wäre also sinnvoll, dieses in zukünftige Analysen mit einzuschließen.

Wie oben beschrieben bringt eine Immunsuppression im Rahmen der durch th-HT abgemilderten Inflammation jedoch nicht nur Vorteile, sondern auch Risiken mit sich. Für mehr Sicherheit bei der Verwendung dieser Behandlungsmethode ist also erweitertes Wissen über die pathophysiologischen Prozesse, die dadurch in Gang gesetzt werden, nötig, was

die Notwendigkeit detaillierterer Untersuchungen bezüglich des zeitlichen Verlaufs und der Effekte dieser Modulation des Immunsystems inkl. funktioneller Testungen unterstreicht. Insbesondere über die Rolle antiinflammatorischer Zytokine bei neonataler HIE ist das Wissen bisher sehr begrenzt.

Zudem sollten sich in Zukunft weitergehende Versuche mittels ELISA zum Proteom der ausgewählten Zytokine anschließen. Dies könnte weitere Hinweise auf einen möglichen Einfluss des mTOR-Signalweges auf deren Produktion liefern.

Die Komplexität der Regulation der Entzündungsreaktion und die Vielzahl von Einflüssen darauf stellen in der Erforschung dieses Gebiets jedoch eine nicht zu vernachlässigende Herausforderung dar.

Eine langfristige Beobachtung der Versuchstiere erscheint ebenfalls sinnvoll, da ein Großteil des Schadens nach HI, der die weitere Entwicklung beeinflusst, erst nach einigen Tagen entsteht. (Kanal und Levison, 2024)

Schließlich ist es zur Einschätzung der klinischen Bedeutsamkeit aller hier untersuchten Laborparameter zentral, beobachtete Veränderungen mit funktionellen Parametern im Verlauf zu korrelieren, um genauere Hinweise auf die klinische Wirksamkeit möglicher therapeutischer Modulationen ebendieser zu erhalten. Beispiele für Gedächtnis-, Kognitions- und motorische Tests im Rattenmodell sind der Morris Water Maze Test, die Novel Object Recognition oder der Catwalk Test.

Aus den komplexen Pathomechanismen hinter neonataler HIE (vgl. 1.1.1 Pathophysiologische Prozesse im Gehirn bei Hypoxie-Ischämie) ergeben sich eine Vielzahl möglicher Targets für künftige therapeutische Optionen (siehe auch 1.3 Hypothese und Zielsetzung). Es existiert eine Reihe von Substanzen, die zurzeit in präklinischen oder klinischen Studien erprobt werden. Dazu zählen autologe Stammzellen aus Nabelschnurblut, neuronale Prekursor-Zellen, Koffein, Melatonin, Sonic Hedgehog Agonist, Clemastin, Erythropoietin, Allopurinol, Topiramat und viele weitere. (European Medicines Agency ; NIH National Library of Medicine; Sabir et al., 2023)

Bezüglich der bereits etablierten therapeutischen Hypothermie sind u.a. die korrekte Indikationsstellung, der Zeitpunkt des Beginns der Therapie, die Dauer, die Phase des Wiedererwärmens sowie die begleitende Analgosedierung zu optimierende Variablen. (Garcia-Alix et al., 2020)

Ebenso bieten nicht-pharmakologische Ansätze wie bspw. Constraint-induced movement therapy (CIMT) Potenzial zur Verbesserung des funktionellen Outcomes. (Rumajogee et al., 2024)

Zudem ist in der Betreuung asphyktischer Neugeborener ein optimales Management von Sedation, Analgesie, Beatmung, Blutgase, Blutzucker etc. sowie die (symptomatische) Therapie von Komorbiditäten und, auch subklinisch auftretenden, Krampfanfällen von zentraler Bedeutung. (Cannavo et al., 2023)

Ein weiterer Ansatz ist der Einsatz von Biomarkern (z.B. Aminosäuren, Carnitine und Nukleotide) zur sichereren Indikationsstellung zur therapeutischen Hypothermie und Einschätzung der Prognose. (Shevtsova et al., 2024) Weitere präklinische und klinische Studien werden hierüber mehr Aufschluss geben und die Therapie asphyktischer Neugeborener mit HIE in Zukunft verbessern können.

5. Zusammenfassung

Wir beobachteten in unserem Rattenmodell der neonatalen hypoxisch-ischämischen Hirnschädigung eine eindeutige Beeinflussung des mTOR-Signalweges durch die Hypoxie-Ischämie nach 6 und 24 h in Kortex und Hippocampus sowie ebenfalls einen Einfluss der Hypothermie-Behandlung.

Dies zeigte sich in einer Reduktion der mTOR-Aktivität nach Hypoxie-Ischämie, die durch Hypothermie im Kortex verstärkt wurde. Eine genauere Analyse des mTOR-Signalweges zu anderen Zeitpunkten sollte sich an die vorliegende Arbeit anschließen.

Im Zusammenhang mit der reduzierten mTOR-Aktivität konnten wir eine vermehrte Autophagie mit vermindertem p62-Level in beiden untersuchten Hirnarealen beobachten. Diese trägt zur Pathogenese der HIE bei und konnte durch Hypothermie im Kortex leicht abgeschwächt werden.

Mittels RT-PCR konnten wir nachweisen, dass Hypoxie-Ischämie zu einer deutlichen Entzündungsreaktion und einem Zytokinsturm in Kortex und Hippocampus führt, der durch therapeutische Hypothermie abgeschwächt werden kann. Zudem induziert Hypothermie im Hippocampus nach 24 h bereits eine beginnende antiinflammatorische Reaktion.

Im Western Blot konnten wir die in der PCR gezeigte erhöhte mRNA der Zytokine jedoch auf Proteinlevel nicht nachweisen. Das liegt jedoch wahrscheinlich in der unzureichenden Qualität des Verfahrens begründet.

Die Frage, welchen Einfluss therapeutische Hypothermie auf die Translation von Zytokinen, auch via Modulation der mTOR-Aktivität, ausübt, bleibt offen und kann Gegenstand weiterer Forschung sein.

Wir können festhalten, dass wir in unseren Versuchen vielversprechende Ergebnisse zur Neuroprotektion durch therapeutische Hypothermie, durch Modulation der Entzündungsreaktion sowie auch des mTOR-Signalweges inklusive Autophagie erhalten. Diese Ansatzpunkte könnten wegweisend für die Entwicklung von Medikamenten sein, die bei neonataler HIE synergistisch mit therapeutischer Hypothermie oder auch bei alleiniger Applikation neuroprotektiv wirken. Diese würden somit zu einem besseren Outcome der Patienten, insbesondere derer, bei denen hypothermische Behandlung nicht möglich bzw.

kontraindiziert ist, beitragen. Das Wissen in diesem Bereich ist jedoch zurzeit noch sehr begrenzt und sollte in Zukunft ausgebaut werden, um der bestmöglichen Therapie asphyktischer Neugeborener ein Stück näher zu kommen.

6. Anhang

6.1 Protokolle

Western Blot: Aufbereitung der Proben

Tab. 9: Western Blot: Aufbereitung der Proben

		<u>Lösung</u>	<u>Wiederholungen, Zeit</u>	
1.	Einwirken des Lysatpuffers	Lysatpuffer	20 min	auf Eis
2.	Homogenisieren			
3.	Einwirken des Lysatpuffers	Lysatpuffer	20 min	auf Eis
4.	Zentrifugieren		15 min	13.200 rpm, 4°C
5.	Abpipettieren des Überstandes			

Western Blot: Proteinidentifizierung

Tab. 10: Western Blot: Proteinidentifizierung

BSA: Bovine Serum Albumin, TBS: Tris-buffered saline, TBS-T: TBS-Tween

		<u>Lösung</u>	<u>Wiederholungen, Zeit</u>	
1.	Unspezifische Kontrolle	Ponceau	1 min	
2.	Ponceau herauswaschen	TBS-T	Bis die Ponceau-Färbung nicht mehr sichtbar ist	
3.	Blocken	Milch/BSA	1 h	
4.	Primärer Antikörper	Antikörper in Milch/BSA verdünnt	Über Nacht	4°C
5.	Waschen	TBS-T	3 x 10 min	
6.	Sekundärer Antikörper	Antikörper in Milch/BSA verdünnt	1 h	Lichtgeschützt
7.	Waschen	TBS-T, TBS	3 x 10 min TBS-T 1 x 10 min TBS	

Western Blot: Stripping

Tab. 11: Western Blot: Stripping

PBS: Phosphate-buffered Saline, TBS-T: Tris-buffered saline-Tween

	<u>Lösung</u>	<u>Wiederholungen, Zeit</u>
1.	TBS-T	3 x 15 min
2.	Stripping-Puffer	2 x 15 min
3.	PBS	3 x 15 min
4.	TBS-T	3 x 20 min

RNA-Isolierung

Tab. 12: RNA-Isolierung

RNA: Ribonukleinsäure

		<u>Zugegebene Lösung</u>	<u>Prozedur</u>
1.	Zerstörung und Homogenisierung der Proben	600 µl RLT-Puffer, mit beta-Mercaptoethanol (1:100) versetzt	Zerstörung und Homogenisierung im Gewebehomogenisierer mithilfe von Beads
2.	Zentrifugieren, Abnahme des Überstandes		
3.	RNA-Isolierung aus dem Lysat	600 µl 70 % Ethanol	Zentrifugieren in der RNeasy spin column: 30 s, 10.000 rpm
4.	Waschen	1. 700 µl RW1-Puffer	Zentrifugieren: 30 s, 10.000 rpm
		2. 500 µl RPE-Puffer	Zentrifugieren: 30 s, 10.000 rpm
		3. 500 µl RPE-Puffer	Zentrifugieren: 2 min, 10.000 rpm
5.	Auswaschen der RNA	30 µl RNase-freies Wasser	Zentrifugieren: 1 min, 10.000 rpm

6.2 Klassifikation einer HIE nach perinataler Asphyxie

Tab. 13: Klassifikation einer HIE nach perinataler Asphyxie, modifiziert nach Sarnat & Sarnat

aus: Therapieprotokoll: Hypothermiebehandlung bei Neugeborenen mit hypoxisch-ischämischer Enzephalopathie (Deutsches Hypothermieregister, 2023)

<u>HIE Klassifikation nach Sarnat & Sarnat</u>	<u>Leicht (Schweregrad 1)</u>	<u>Mittel (Schweregrad 2)</u>	<u>Schwer (Schweregrad 3)</u>
1) <u>Bewusstsein</u>	wach	lethargisch	Stupor/Koma
2) <u>Aktivität</u>	normal	vermindert	keine
3) <u>Muskeigenreflexe/Haltung</u>	verstärkt normal	verstärkt distale Flexion/komplette Extension	reduziert/fehlend schlaff
4) <u>Tonus</u>	normal	hypoton	schlaff
5) <u>Primitive Reflexe</u>			
- Saugen	aktiv	schwach	fehlend
- Moro	verstärkt	inkomplett	fehlend
- Greifen	normal/verstärkt	verstärkt	fehlend
- Vestibulookulärer Reflex	normal	überschießend	reduziert/fehlend
6) <u>Autonome Reflexe</u>			
- Pupillen	dilatiert/reagibel	eng, reagibel	entrundet, weit, lichtstarr
- Herzfrequenz	normal/tachykard	bradykard	bradykard, variabel
- Atmung	regelmäßig	periodisch, unregelmäßig	Apnoen
- Krämpfe	nein	häufig	häufig

7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Molekulare Kaskade in der Pathophysiologie der HIE.	16
Abbildung 2: Hyperinflammation bei hypoxisch-ischämischer Hirnschädigung	19
Abbildung 3: Wirkungen der Hypothermie im Hirn	24
Abbildung 4: Aktivierung des mTORC1 durch Zytokine/Wachstumsfaktoren und seine Inhibition bei niedrigen zellulären Energieleveln oder Hypoxie	28
Abbildung 5: Bedeutung einer balancierten mTOR-Aktivität als Reaktion auf zellulären Stress	36
Abbildung 6: Überblick über das verwendete Rattenmodell der neonatalen Hypoxie-Ischämie	47
Abbildung 7: Regulation von Akt nach HI und NT/HT	58
Abbildung 8: Regulation von mTOR nach HI und NT/HT	59
Abbildung 9: Regulation von S6 nach HI und NT/HT	60
Abbildung 10: p-S6 nach HI und NT/HT	61
Abbildung 11: Regulation von 4E-BP1 nach HI und NT/HT	62
Abbildung 12: p62 nach HI und NT/HT	63
Abbildung 13: p62 nach HI und NT/HT	64
Abbildung 14: RT-PCR-Analyse proinflammatorischer Zytokine nach HI und NT/HT	70
Abbildung 15: RT-PCR-Analyse antiinflammatorischer Zytokine nach HI und NT/HT	71
Abbildung 16: iNOS und CD206 nach HI und NT/HT	73
Box 1: Schädigende Effekte proinflammatorischer Zytokine bei HIE	20

8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verbrauchsmaterial	42
Tabelle 2: Geräte	42
Tabelle 3: Chemikalien	43
Tabelle 4: Selbst hergestellte Puffer und Lösungen	44
Tabelle 5: Primäre Antikörper	45
Tabelle 6: Sekundäre Antikörper	46
Tabelle 7: Fertigsysteme	46
Tabelle 8: Software	46
Tabelle 9: Western Blot: Aufbereitung der Proben	108
Tabelle 10: Western Blot: Proteinidentifizierung	108
Tabelle 11: Western Blot: Stripping	109
Tabelle 12: RNA-Isolierung	109
Tabelle 13: Klassifikation einer HIE nach perinataler Asphyxie, modifiziert nach Sarnat & Sarnat	110

9. Literaturverzeichnis

1. AMBOSS, 2017: Asphyxie in der Perinatalperiode. <https://next.amboss.com/de/article/h40cQT#Zbfa2918764dd033fa54a7ca49ef5c223> (Zugriffsdatum: 06.07.2021)
2. Aramburu J, Ortells M C, Tejedor S, Buxadé M und López-Rodríguez C. Transcriptional regulation of the stress response by mTOR. *Sci Signal* 2014; 7: re2
3. Ayuso M I, Hernández-Jiménez M, Martín M E, Salinas M und Alcázar A. New hierarchical phosphorylation pathway of the translational repressor eIF4E-binding protein 1 (4E-BP1) in ischemia-reperfusion stress. *J Biol Chem* 2010; 285: 34355-34363
4. Bernis M E, Burkard H, Bremer A S, Grzelak K, Zweyer M, Maes E, Nacarkucuk E, Kaibel H, Hakvoort C, Muller A und Sabir H. The Neuroprotective Effects of Caffeine in a Neonatal Hypoxia-Ischemia Model are Regulated through the AMPK/mTOR Pathway. *Int J Biol Sci* 2025; 21: 251-270
5. Bernis M E, Zweyer M, Maes E, Schleehuber Y und Sabir H. Neutrophil Extracellular Traps Release following Hypoxic-Ischemic Brain Injury in Newborn Rats Treated with Therapeutic Hypothermia. *Int J Mol Sci* 2023; 24:
6. Bhalala U S, Koehler R C und Kannan S. Neuroinflammation and neuroimmune dysregulation after acute hypoxic-ischemic injury of developing brain. *Front Pediatr* 2014; 2: 144
7. Bjørkøy G, Lamark T, Brech A, Outzen H, Perander M, Overvatn A, Stenmark H und Johansen T. p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J Cell Biol* 2005; 171: 603-614
8. Bjørkøy G, Lamark T und Johansen T. p62/SQSTM1: a missing link between protein aggregates and the autophagy machinery. *Autophagy* 2006; 2: 138-139
9. Bjørkøy G, Lamark T, Pankiv S, Øvervatn A, Brech A und Johansen T. Monitoring autophagic degradation of p62/SQSTM1. *Methods Enzymol* 2009; 452: 181-197
10. Bockaert J und Marin P. mTOR in Brain Physiology and Pathologies. *Physiol Rev* 2015; 95: 1157-1187
11. Bolaños J P und Almeida A. Roles of nitric oxide in brain hypoxia-ischemia. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1411: 415-436

12. Bracho-Valdés I, Moreno-Alvarez P, Valencia-Martínez I, Robles-Molina E, Chávez-Vargas L und Vázquez-Prado J. mTORC1- and mTORC2-interacting proteins keep their multifunctional partners focused. *IUBMB Life* 2011; 63: 896-914
13. Cannavo L, Perrone S und Gitto E. Brain-Oriented Strategies for Neuroprotection of Asphyxiated Newborns in the First Hours of Life. *Pediatr Neurol* 2023; 143: 44-49
14. Carloni S, Girelli S, Scopa C, Buonocore G, Longini M und Balduini W. Activation of autophagy and Akt/CREB signaling play an equivalent role in the neuroprotective effect of rapamycin in neonatal hypoxia-ischemia. *Autophagy* 2010; 6: 366-377
15. Cell Signaling Technology®, 2017: Phospho-ULK1 (Ser757) Antibody #6888. https://www.cellsignal.de/products/primary-antibodies/phospho-ulk1-ser757-antibody/6888?utm_strategy=lev&utm_conv=mon&utm_stage=ous&utm_tactic=ppc&utm_region&gclid=CjwKCAjwy7CKBhBMEiwA0Eb7ai9omv9i1BIyDZDALWvpzOUSq5fRfuHc3C5zoaBf4GGQkJQd75-9-RoCqBEQAvD_BwE&gclsrc=aw.ds
(Zugriffsdatum: 20.09.2021)
16. Chalak L, Ferriero D M, Gressens P, Molloy E und Bearer C. A 20 years conundrum of neonatal encephalopathy and hypoxic ischemic encephalopathy: are we closer to a consensus guideline? *Pediatr Res* 2019; 86: 548-549
17. Chen H, Xiong T, Qu Y, Zhao F, Ferriero D und Mu D. mTOR activates hypoxia-inducible factor-1 α and inhibits neuronal apoptosis in the developing rat brain during the early phase after hypoxia-ischemia. *Neurosci Lett* 2012; 507: 118-123
18. Crino P B. The mTOR signalling cascade: paving new roads to cure neurological disease. *Nat Rev Neurol* 2016; 12: 379-392
19. Dello Russo C, Lisi L, Tringali G und Navarra P. Involvement of mTOR kinase in cytokine-dependent microglial activation and cell proliferation. *Biochem Pharmacol* 2009; 78: 1242-1251
20. Deng J, Liao Y, Chen J, Chen A, Wu S, Huang Y, Qian H, Gao F, Wu G, Chen Y, Chen X und Zheng X. N6-methyladenosine demethylase FTO regulates synaptic and cognitive impairment by destabilizing PTEN mRNA in hypoxic-ischemic neonatal rats. *Cell Death Dis* 2023; 14: 820

21. Deretic V. Autophagy as an innate immunity paradigm: expanding the scope and repertoire of pattern recognition receptors. *Curr Opin Immunol* 2012; 24: 21-31
22. Descloux C, Ginet V, Clarke P G, Puyal J und Truttmann A C. Neuronal death after perinatal cerebral hypoxia-ischemia: Focus on autophagy-mediated cell death. *Int J Dev Neurosci* 2015; 45: 75-85
23. Deutsche Gesellschaft für Neurologie. S2e-Leitlinie: Akuttherapie des ischämischen Schlaganfalls. Stand: 10/2022. Verfügbar unter: <https://register.awmf.org/de/leitlinien/detail/030-046>. (Zugriffsdatum: 12.02.2025)
24. Deutsche Gesellschaft für Neurologie. S1-Leitlinie: Hypoxisch-ischämische Enzephalopathie (HIE) im Erwachsenenalter. Stand: 03/2023. Verfügbar unter: <https://dgn.org/leitlinie/hypoxisch-ischamische-enzephalopathie-hie-im-erwachsenenalter>. (Zugriffsdatum: 12.02.2025)
25. Deutsche Gesellschaft für Neurologie. S1-Leitlinie: Intrakranieller Druck (ICP). Stand: 02/2023. Verfügbar unter: <https://dgn.org/leitlinie/intrakranieller-druck-icp>. (Zugriffsdatum: 12.02.2025)
26. Deutsches Hypothermieregister, 2023: Therapieprotokoll: Hypothermiebehandlung bei Neugeborenen mit hypoxisch-ischämischer Enzephalopathie https://www.neonatologie-bonn.de/wp-content/uploads/2023/05/Therapieplan-final-_v5.pdf (Zugriffsdatum: 09.02.2025)
27. Dixon B J, Reis C, Ho W M, Tang J und Zhang J H. Neuroprotective Strategies after Neonatal Hypoxic Ischemic Encephalopathy. *Int J Mol Sci* 2015; 16: 22368-22401
28. Egan D F, Shackelford D B, Mihaylova M M, Gelino S, Kohnz R A, Mair W, Vasquez D S, Joshi A, Gwinn D M, Taylor R, Asara J M, Fitzpatrick J, Dillin A, Viollet B, Kundu M, Hansen M und Shaw R J. Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy. *Science* 2011; 331: 456-461
29. European Medicines Agency, EU Clinical Trials Register. <https://www.clinicaltrialsregister.eu/ctr-search/search?query=neonatal+hypoxic+ischemic+encephalopathy> (Zugriffsdatum: 05.02.2025)

30. Fingar D C, Salama S, Tsou C, Harlow E und Blenis J. Mammalian cell size is controlled by mTOR and its downstream targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E. *Genes Dev* 2002; 16: 1472-1487
31. Fischer M und Kainz E. ERC-ESICM guidelines on temperature control after cardiac arrest. *Anaesthesiologie* 2022; 71: 709-713
32. Fleiss B, Van Steenwinckel J, Bokobza C, I K S, Ross-Munro E und Gressens P. Microglia-Mediated Neurodegeneration in Perinatal Brain Injuries. *Biomolecules* 2021; 11:
33. Fu L, Huang L, Cao C, Yin Q und Liu J. Inhibition of AMP-activated protein kinase alleviates focal cerebral ischemia injury in mice: Interference with mTOR and autophagy. *Brain Res* 2016; 1650: 103-111
34. Furukawa S, Yang L, Sameshima H und Ikenoue T. Repetitive administration of acetylcholine receptor agonist rescues brain inflammation and brain damage after hypoxia-ischemia in newborn rat. *J Perinat Med* 2014; 42: 379-384
35. Gao X, Yang H, Su J, Xiao W, Ni W und Gu Y. Aescin Protects Neuron from Ischemia-Reperfusion Injury via Regulating the PRAS40/mTOR Signaling Pathway. *Oxid Med Cell Longev* 2020; 2020: 7815325
36. Garcia-Alix A, Arnaez J, Herranz-Rubia N, Alarcon A, Arca G, Valverde E, Blanco D, Lubian S und Grupo Cerebro N. Ten years since the introduction of therapeutic hypothermia in neonates with perinatal hypoxic-ischaemic encephalopathy in Spain. *Neurologia (Engl Ed)* 2020;
37. Gesellschaft für Neonatologie und Pädiatrische Intensivmedizin. S2k-Leitlinie: Behandlung der neonatalen Asphyxie unter besonderer Berücksichtigung der therapeutischen Hypothermie. Stand: 06/2013. Verfügbar unter: <https://gnpi.de/leitlinien/#a9b007bf8a93e6f9d>. (Zugriffsdatum: 27.01.2025)
38. Ginet V, Pittet M P, Rummel C, Osterheld M C, Meuli R, Clarke P G, Puyal J und Truttmann A C. Dying neurons in thalamus of asphyxiated term newborns and rats are autophagic. *Ann Neurol* 2014; 76: 695-711
39. Girard S, Kadhim H, Roy M, Lavoie K, Brochu M E, Larouche A und Sébire G. Role of perinatal inflammation in cerebral palsy. *Pediatr Neurol* 2009; 40: 168-174
40. Goss J R, Styren S D, Miller P D, Kochanek P M, Palmer A M, Marion D W und DeKosky S T. Hypothermia attenuates the normal increase in interleukin 1 beta

- RNA and nerve growth factor following traumatic brain injury in the rat. *J Neurotrauma* 1995; 12: 159-167
41. Gressner A M und Gressner O A, Zytokine. https://www.springermedizin.de/emedpedia/lexikon-der-medizinischen-laboratoriumsdiagnostik/zytokine?epediaDoi=10.1007%2F978-3-662-49054-9_3385 (Zugriffsdatum: 05.09.2021)
42. Gu X, Wei Z Z, Espinera A, Lee J H, Ji X, Wei L, Dix T A und Yu S P. Pharmacologically induced hypothermia attenuates traumatic brain injury in neonatal rats. *Exp Neurol* 2015; 267: 135-142
43. Guan L, Guo S, Yip J, Elkin K B, Li F, Peng C, Geng X und Ding Y. Artificial Hibernation by Phenothiazines: A Potential Neuroprotective Therapy Against Cerebral Inflammation in Stroke. *Curr Neurovasc Res* 2019; 16: 232-240
44. Hagberg H, Gilland E, Bona E, Hanson L A, Hahin-Zoric M, Blennow M, Holst M, McRae A und Söder O. Enhanced expression of interleukin (IL)-1 and IL-6 messenger RNA and bioactive protein after hypoxia-ischemia in neonatal rats. *Pediatr Res* 1996; 40: 603-609
45. Hagberg H, Mallard C, Ferriero D M, Vannucci S J, Levison S W, Vexler Z S und Gressens P. The role of inflammation in perinatal brain injury. *Nat Rev Neurol* 2015; 11: 192-208
46. Hassell K J, Ezzati M, Alonso-Alconada D, Hausenloy D J und Robertson N J. New horizons for newborn brain protection: enhancing endogenous neuroprotection. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2015; 100: F541-552
47. Hay N und Sonenberg N. Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev* 2004; 18: 1926-1945
48. He Y, Liu Y und Wu Z. [Research progress on the dynamic role and intervention value of autophagy in neonatal hypoxic-ischemic brain damage]. *Zhonghua Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue* 2024; 36: 552-556
49. Henrich-Noack P, Prehn J H und Kriegelstein J. TGF-beta 1 protects hippocampal neurons against degeneration caused by transient global ischemia. Dose-response relationship and potential neuroprotective mechanisms. *Stroke* 1996; 27: 1609-1614; discussion 1615

50. Hsieh C S, Macatonia S E, Tripp C S, Wolf S F, O'Garra A und Murphy K M. Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science* 1993; 260: 547-549
51. Iadecola C, Zhang F und Xu X. Inhibition of inducible nitric oxide synthase ameliorates cerebral ischemic damage. *Am J Physiol* 1995; 268: R286-292
52. Jacobsen L C, Theilgaard-Mönch K, Christensen E I und Borregaard N. Arginase 1 is expressed in myelocytes/metamyelocytes and localized in gelatinase granules of human neutrophils. *Blood* 2007; 109: 3084-3087
53. Kadhim H, Tabarki B, De Prez C und Sébire G. Cytokine immunoreactivity in cortical and subcortical neurons in periventricular leukomalacia: are cytokines implicated in neuronal dysfunction in cerebral palsy? *Acta Neuropathol* 2003; 105: 209-216
54. Kanal H D und Levison S W. Neuroprotective Effects of Delayed TGF-beta1 Receptor Antagonist Administration on Perinatal Hypoxic-Ischemic Brain Injury. *Dev Neurosci* 2024; 46: 188-200
55. Kirkin V, McEwan D G, Novak I und Dikic I. A role for ubiquitin in selective autophagy. *Mol Cell* 2009; 34: 259-269
56. Leavy A und Jimenez Mateos E M. Perinatal Brain Injury and Inflammation: Lessons from Experimental Murine Models. *Cells* 2020; 9:
57. Lechpammer M, Tran Y P, Wintermark P, Martínez-Cerdeño V, Krishnan V V, Ahmed W, Berman R F, Jensen F E, Nudler E und Zagzag D. Upregulation of cystathionine β -synthase and p70S6K/S6 in neonatal hypoxic ischemic brain injury. *Brain Pathol* 2017; 27: 449-458
58. Lee H J, Koh S H, Song K M, Seol I J und Park H K. The Akt/mTOR/p70S6K Pathway Is Involved in the Neuroprotective Effect of Erythropoietin on Hypoxic/Ischemic Brain Injury in a Neonatal Rat Model. *Neonatology* 2016; 110: 93-100
59. Li D, Wang C, Yao Y, Chen L, Liu G, Zhang R, Liu Q, Shi F D und Hao J. mTORC1 pathway disruption ameliorates brain inflammation following stroke via a shift in microglia phenotype from M1 type to M2 type. *Faseb j* 2016; 30: 3388-3399

60. Li J, Cheng X, Fu D, Liang Y, Chen C, Deng W und He L. Autophagy of Spinal Microglia Affects the Activation of Microglia through the PI3K/AKT/mTOR Signaling Pathway. *Neuroscience* 2022; 482: 77-86
61. Li L, McBride D W, Doycheva D, Dixon B J, Krafft P R, Zhang J H und Tang J. G-CSF attenuates neuroinflammation and stabilizes the blood-brain barrier via the PI3K/Akt/GSK-3 β signaling pathway following neonatal hypoxia-ischemia in rats. *Exp Neurol* 2015; 272: 135-144
62. Liu L, Li C J, Lu Y, Zong X G, Luo C, Sun J und Guo L J. Baclofen mediates neuroprotection on hippocampal CA1 pyramidal cells through the regulation of autophagy under chronic cerebral hypoperfusion. *Sci Rep* 2015; 5: 14474
63. Ma H, Sinha B, Pandya R S, Lin N, Popp A J, Li J, Yao J und Wang X. Therapeutic hypothermia as a neuroprotective strategy in neonatal hypoxic-ischemic brain injury and traumatic brain injury. *Curr Mol Med* 2012; 12: 1282-1296
64. McDouall A, Zhou K Q, Davies A, Wassink G, Jones T L M, Bennet L, Gunn A J und Davidson J O. Slow rewarming after hypothermia does not ameliorate white matter injury after hypoxia-ischemia in near-term fetal sheep. *Pediatr Res* 2024;
65. McGuire W. Perinatal asphyxia. *BMJ Clin Evid* 2007; 2007:
66. McRae A, Gilland E, Bona E und Hagberg H. Microglia activation after neonatal hypoxic-ischemia. *Brain Res Dev Brain Res* 1995; 84: 245-252
67. Millar L J, Shi L, Hoerder-Suabedissen A und Molnar Z. Neonatal Hypoxia Ischaemia: Mechanisms, Models, and Therapeutic Challenges. *Front Cell Neurosci* 2017; 11: 78
68. Mo Y, Zeng Y, Huo L, Liu G, Tao J, Jiang Y, Zhao T, Zhou Z und Mu X. Early-stage effect of HIBD on neuro-motor function and organic composition of neurovascular units in neonatal rats. *Front Neurosci* 2023; 17: 1242936
69. Nacarkucuk E, Bernis M E, Bremer A S, Grzelak K, Zweyer M, Maes E, Burkard H und Sabir H. Neuroprotective Effect of Melatonin in a Neonatal Hypoxia-Ischemia Rat Model Is Regulated by the AMPK/mTOR Pathway. *J Am Heart Assoc* 2024; 13: e036054
70. NIH National Library of Medicine, ClinicalTrials.gov. <https://clinicaltrials.gov/search?cond=Neonatal%20Hypoxic%20Ischemic%20Enc>

[ephalopathy&aggFilters=status:rec%20not%20act&limit=100&page=1](#)

(Zugriffsdatum: 05.02.2025)

71. Nolan J P, Sandroni C, Bottiger B W, Cariou A, Cronberg T, Friberg H, Genbrugge C, Haywood K, Lilja G, Moolaert V R M, Nikolaou N, Olasveengen T M, Skrifvars M B, Taccone F und Soar J. European Resuscitation Council and European Society of Intensive Care Medicine guidelines 2021: post-resuscitation care. *Intensive Care Med* 2021; 47: 369-421
72. Osredkar D, Thoresen M, Maes E, Flatebø T, Elstad M und Sabir H. Hypothermia is not neuroprotective after infection-sensitized neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *Resuscitation* 2014; 85: 567-572
73. Ourednik J, Ourednik V, Ghosh N und Snyder E Y. Protocol to optimize the Rice-Vannucci rat pup model of perinatal asphyxia to ensure predictable hypoxic-ischemic cerebral lesions *STAR Protocols* 2024; 5:
74. Pankiv S, Clausen T H, Lamark T, Brech A, Bruun J A, Outzen H, Øvervatn A, Bjørkøy G und Johansen T. p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J Biol Chem* 2007; 282: 24131-24145
75. Patel S D, Pierce L, Ciardiello A, Hutton A, Paskewitz S, Aronowitz E, Voss H U, Moore H und Vannucci S J. Therapeutic hypothermia and hypoxia-ischemia in the term-equivalent neonatal rat: characterization of a translational preclinical model. *Pediatr Res* 2015; 78: 264-271
76. Perez-Alvarez M J, Villa Gonzalez M, Benito-Cuesta I und Wandosell F G. Role of mTORC1 Controlling Proteostasis after Brain Ischemia. *Front Neurosci* 2018; 12: 60
77. Perluigi M, Di Domenico F und Butterfield D A. mTOR signaling in aging and neurodegeneration: At the crossroad between metabolism dysfunction and impairment of autophagy. *Neurobiol Dis* 2015; 84: 39-49
78. Robert-Koch-Institut. Bedeutung von Zytokinbestimmungen in der umweltmedizinischen Praxis. Mitteilung der Kommission „Methoden und Qualitätssicherung in der Umweltmedizin“. *Bundesgesundheitsblatt – Gesundheitsforschung – Gesundheitsschutz* 2004;

79. Rocic P, Seshiah P und Griending K K. Reactive oxygen species sensitivity of angiotensin II-dependent translation initiation in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 2003; 278: 36973-36979
80. Rumajogee P, Altamentova S, Li J, Puvanenthirarajah N, Wang J, Asgarihafshejani A, Van Der Kooy D und Fehlings M G. Constraint-Induced Movement Therapy (CIMT) and Neural Precursor Cell (NPC) Transplantation Synergistically Promote Anatomical and Functional Recovery in a Hypoxic-Ischemic Mouse Model. *Int J Mol Sci* 2024; 25:
81. Rumajogee P, Bregman T, Miller S P, Yager J Y und Fehlings M G. Rodent Hypoxia-Ischemia Models for Cerebral Palsy Research: A Systematic Review. *Front Neurol* 2016; 7: 57
82. Ruvinsky I und Meyuhas O. Ribosomal protein S6 phosphorylation: from protein synthesis to cell size. *Trends Biochem Sci* 2006; 31: 342-348
83. Sabir H, Maes E, Zweyer M, Schleehuber Y, Imam F B, Silverman J, White Y, Pang R, Pasca A M, Robertson N J, Maltepe E und Bernis M E. Comparing the efficacy in reducing brain injury of different neuroprotective agents following neonatal hypoxia-ischemia in newborn rats: a multi-drug randomized controlled screening trial. *Sci Rep* 2023; 13: 9467
84. Sabir H, Osredkar D, Maes E, Wood T und Thoresen M. Xenon Combined with Therapeutic Hypothermia Is Not Neuroprotective after Severe Hypoxia-Ischemia in Neonatal Rats. *PLoS One* 2016; 11: e0156759
85. Sabir H, Scull-Brown E, Liu X und Thoresen M. Immediate hypothermia is not neuroprotective after severe hypoxia-ischemia and is deleterious when delayed by 12 hours in neonatal rats. *Stroke* 2012; 43: 3364-3370
86. Savard A, Brochu M E, Chevin M, Guiraut C, Grbic D und Sébire G. Neuronal self-injury mediated by IL-1 β and MMP-9 in a cerebral palsy model of severe neonatal encephalopathy induced by immune activation plus hypoxia-ischemia. *J Neuroinflammation* 2015; 12: 111
87. Saxton R A und Sabatini D M. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell* 2017; 168: 960-976

88. Seitz M, Koster C, Dzietko M, Sabir H, Serdar M, Felderhoff-Muser U, Bendix I und Herz J. Hypothermia modulates myeloid cell polarization in neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *J Neuroinflammation* 2021; 18: 266
89. Serdar M, Kempe K, Herrmann R, Picard D, Remke M, Herz J, Bendix I, Felderhoff-Müser U und Sabir H. Involvement of CXCL1/CXCR2 During Microglia Activation Following Inflammation-Sensitized Hypoxic-Ischemic Brain Injury in Neonatal Rats. *Front Neurol* 2020; 11: 540878
90. Serdar M, Kempe K, Rizazad M, Herz J, Bendix I, Felderhoff-Müser U und Sabir H. Early Pro-inflammatory Microglia Activation After Inflammation-Sensitized Hypoxic-Ischemic Brain Injury in Neonatal Rats. *Front Cell Neurosci* 2019; 13: 237
91. Shen M, Lu J, Li C, Li Y, Yu Q, Gao X, Wang Z, Yang G, Li S und Lin Z. Punicalagin inhibits excessive autophagy and improves cerebral function in neonatal rats with hypoxia-ischemia brain injury by regulating AKT-FOXO4. *Phytomedicine* 2025; 136: 156330
92. Shevtsova Y, Starodubtseva N, Tokareva A, Goryunov K, Sadekova A, Vedikhina I, Ivanetz T, Ionov O, Frankevich V, Plotnikov E, Sukhikh G, Zorov D und Silachev D. Metabolite Biomarkers for Early Ischemic-Hypoxic Encephalopathy: An Experimental Study Using the NeoBase 2 MSMS Kit in a Rat Model. *Int J Mol Sci* 2024; 25:
93. Spriggs K A, Bushell M und Willis A E. Translational regulation of gene expression during conditions of cell stress. *Mol Cell* 2010; 40: 228-237
94. Srivastava I N, Shperdheja J, Baybis M, Ferguson T und Crino P B. mTOR pathway inhibition prevents neuroinflammation and neuronal death in a mouse model of cerebral palsy. *Neurobiol Dis* 2016; 85: 144-154
95. Sun B, Ou H, Ren F, Huan Y, Zhong T, Gao M und Cai H. Propofol inhibited autophagy through Ca⁽²⁺⁾/CaMKK β /AMPK/mTOR pathway in OGD/R-induced neuron injury. *Mol Med* 2018a; 24: 58
96. Sun Y, Wang H, Qu T, Luo J, An P, Ren F, Luo Y und Li Y. mTORC2: a multifaceted regulator of autophagy. *Cell Commun Signal* 2023; 21: 4
97. Sun Y, Zhu Y, Zhong X, Chen X, Wang J und Ying G. Crosstalk Between Autophagy and Cerebral Ischemia. *Front Neurosci* 2018b; 12: 1022

98. Talos D M, Sun H, Zhou X, Fitzgerald E C, Jackson M C, Klein P M, Lan V J, Joseph A und Jensen F E. The interaction between early life epilepsy and autistic-like behavioral consequences: a role for the mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway. *PLoS One* 2012; 7: e35885
99. Tavares M R, Pavan I C, Amaral C L, Meneguello L, Luchessi A D und Simabuco F M. The S6K protein family in health and disease. *Life Sci* 2015; 131: 1-10
100. Teo E J, Chand K K, Miller S M, Wixey J A, Colditz P B und Bjorkman S T. Early evolution of glial morphology and inflammatory cytokines following hypoxic-ischemic injury in the newborn piglet brain. *Sci Rep* 2023; 13: 282
101. Vannucci R C, Lyons D T und Vasta F. Regional cerebral blood flow during hypoxia-ischemia in immature rats. *Stroke* 1988; 19: 245-250
102. Vannucci S J und Back S A. The Vannucci Model of Hypoxic-Ischemic Injury in the Neonatal Rodent: 40 years Later. *Dev Neurosci* 2022; 44: 186-193
103. Villa-Gonzalez M, Martin-Lopez G und Perez-Alvarez M J. Dysregulation of mTOR Signaling after Brain Ischemia. *Int J Mol Sci* 2022; 23:
104. Wang L, Sun Y, Kong F, Jiang Y, An M, Jin B, Cao D, Li R, Guan X, Liang S, Abudurexiti S und Gong P. Mild Hypothermia Alleviates Complement C5a-Induced Neuronal Autophagy During Brain Ischemia-Reperfusion Injury After Cardiac Arrest. *Cell Mol Neurobiol* 2023a; 43: 1957-1974
105. Wang Z, Zhang D, Zhang P, Zhou W, Hu L, Wang L und Cheng G. Safety and efficacy of therapeutic hypothermia in neonates with mild hypoxic-ischemic encephalopathy. *BMC Pediatr* 2023b; 23: 530
106. Wei W, Lu M, Lan X B, Liu N, Su W K, Dushkin A V und Yu J Q. Neuroprotective Effects of Oxymatrine on PI3K/Akt/mTOR Pathway After Hypoxic-Ischemic Brain Damage in Neonatal Rats. *Front Pharmacol* 2021; 12: 642415
107. Weichhart T, Hengstschläger M und Linke M. Regulation of innate immune cell function by mTOR. *Nat Rev Immunol* 2015; 15: 599-614
108. Wu L, Chang E, Zhao H und Ma D. Regulated cell death in hypoxic-ischaemic encephalopathy: recent development and mechanistic overview. *Cell Death Discov* 2024; 10: 277
109. Xu F, Na L, Li Y und Chen L. Roles of the PI3K/AKT/mTOR signalling pathways in neurodegenerative diseases and tumours. *Cell Biosci* 2020; 10: 54

110. Xue T F, Ding X, Ji J, Yan H, Huang J Y, Guo X D, Yang J und Sun X L. PD149163 induces hypothermia to protect against brain injury in acute cerebral ischemic rats. *J Pharmacol Sci* 2017; 135: 105-113
111. Yang G S, Zhou X Y, An X F, Liu X J, Zhang Y J und Yu D. mTOR is involved in stroke-induced seizures and the anti-seizure effect of mild hypothermia. *Mol Med Rep* 2018; 17: 5821-5829
112. Yang L, Yu X, Zhang Y, Liu N, Xue X und Fu J. Caffeine treatment started before injury reduces hypoxic-ischemic white-matter damage in neonatal rats by regulating phenotypic microglia polarization. *Pediatr Res* 2022; 92: 1543-1554
113. Yu L, Huang L, Zhao Y, Liu S, Zhou R, Yue Y, Sun H, Su X, Liu Q, Li S, Ying J, Zhao F und Qu Y. Atorvastatin Promotes Pro/anti-inflammatory Phenotypic Transformation of Microglia via Wnt/beta-catenin Pathway in Hypoxic-Ischemic Neonatal Rats. *Mol Neurobiol* 2024; 61: 3559-3577
114. Yuan X, Ghosh N, McFadden B, Tone B, Bellinger D L, Obenaus A und Ashwal S. Hypothermia modulates cytokine responses after neonatal rat hypoxic-ischemic injury and reduces brain damage. *ASN Neuro* 2014; 6:
115. Zhang F, Casey R M, Ross M E und Iadecola C. Aminoguanidine ameliorates and L-arginine worsens brain damage from intraluminal middle cerebral artery occlusion. *Stroke* 1996; 27: 317-323
116. Zhang H, Zhou M, Zhang J, Mei Y, Sun S und Tong E. Therapeutic effect of post-ischemic hypothermia duration on cerebral ischemic injury. *Neurol Res* 2008; 30: 332-336
117. Zhang T L, Zhang Z W, Lin W, Lin X R, Lin K X, Fang M C, Zhu J H, Guo X L und Lin Z L. Reperfusion after hypoxia-ischemia exacerbates brain injury with compensatory activation of the anti-ferroptosis system: based on a novel rat model. *Neural Regen Res* 2023; 18: 2229-2236
118. Zhou D, Ji L und Chen Y. TSPO Modulates IL-4-Induced Microglia/Macrophage M2 Polarization via PPAR- γ Pathway. *J Mol Neurosci* 2020; 70: 542-549
119. Zuo H, Duan Z, Wang Z, Guo T, Shi J, Shi H und Li J. [Gastrodin improves microglia-mediated inflammatory response after hypoxic-ischemic brain damage in neonatal rats via PI3K/AKT pathway]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao* 2024; 44: 1712-1719

10. Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Klinik für Neonatologie und Pädiatrische Intensivmedizin des Universitätsklinikums Bonn unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. Hemmen Sabir durchgeführt. Die Konzeption der Arbeit erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Maria Eugenia Bernis, PostDoc der AG Sabir am Deutschen Zentrum für Neurodegenerative Erkrankungen (DZNE) Bonn.

Die folgenden Versuche und Analysen wurden nach Einarbeitung durch Frau Dr. Bernis und Herrn Prof. Dr. Sabir von mir eigenständig durchgeführt: Anfertigung und Auswertung der Western Blots, Auswertung der Ergebnisse der RT-PCR sowie der immunhistochemischen Färbungen.

Die folgenden Versuche wurden gemeinsam mit Frau Yvonne Schleeuber bzw. Frau Margit Zweyer (AG Sabir, DZNE Bonn) durchgeführt: RT-PCR, immunhistochemische Färbungen

Die Tierversuche wurden durch die AG Sabir am Deutschen Zentrum für Neurodegenerative Erkrankungen Bonn durchgeführt.

Das zur Auswertung verwendete Datenmaterial wurde in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Bernis zusammengestellt.

Die statistische Auswertung erfolgte durch Frau Dr. Bernis und mich selbst.

Ich versichere, die Dissertationsschrift selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

11. Veröffentlichungen

Teile der Inhalte der vorliegenden Dissertationsschrift wurden bereits in der folgenden Publikation veröffentlicht:

Bernis M E, Burkard H, Bremer A S, Grzelak K, Zweyer M, Maes E, Nacarkucuk E, Kaibel H, Hakvoort C, Muller A und Sabir H. The Neuroprotective Effects of Caffeine in a Neonatal Hypoxia-Ischemia Model are Regulated through the AMPK/mTOR Pathway. Int J Biol Sci 2025; 21: 251-270

<https://doi.org/10.7150/ijbs.101087>

12. Danksagung

Ganz herzlich danke ich Dr. Eugenia Bernis, Margit Zweyer, Yvonne Schleeuber und Elke Maes aus der AG Sabir und insbesondere meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Hemmen Sabir für ihre wertvolle Unterstützung.