



Aus der Neurologischen Klinik und Poliklinik der Ludwig-Maximilians-
Universität München
(Direktorin: Prof. Dr. med. M. Dieterich,
ehemals Prof. Dr. med. Dr. h.c. Th. Brandt)

**Einfluss des ACE-Hemmers Ramipril auf zerebrale
Mikrogefäße und Neurone bei Spontan Hypertensiven
Ratten mit hoher Schlaganfall Sensitivität (SHR-SP)**

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

Vorgelegt von Christine Büscher
aus Bünde
2009

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. G. Hamann
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Roman Haberl Prof. Dr. Frank Weber
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. med. M. Liebetrau
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR
Tag der mündlichen Prüfung:	05. März 2009

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	5
2. Theoretische Grundlagen	8
2.1 Hypertonie.....	8
2.2 Schlaganfall.....	10
2.3 Renin-Angiotensin-Aldosteron System	11
2.3.1 ACE-Hemmer.....	13
2.3.1.1 Entwicklungsgeschichtlicher Hintergrund	13
2.3.1.2 Wirtschaftliche Bedeutung	13
2.3.1.3 Experimentelle Modelle	14
2.4 Spontan hypertensive Ratten stroke-prone (SHR-SP)	14
2.5 Aufbau der BlutgefäÙe.....	15
2.5.1 Blut-Hirn-Schranke	16
2.5.2 Basalmembran	17
2.6 Kollagen.....	20
2.7 Laminin	22
2.8 Calpain	26
2.8.1 Mikrotubulus-assoziiertes Protein 2.....	34
3. Methoden und Experimente.....	36
3.1 Tiermodell	36
3.2 Immunhistochemie	36
3.2.1 Methoden.....	36
3.2.1.1 Polyklonale Antikörper	38
3.2.1.2 Monoklonale Antikörper	38
3.2.1.3 Immunhistochemische Färbemethoden.....	38
3.2.2 Experimente	42
3.2.2.1 Kollagen	42
3.2.2.2 Laminin	43
3.2.2.3 μ -Calpain.....	44
3.2.2.4 MAP-2	45
3.2.3 Auswertungsprogramme und Geräte für die Immunhistochemie	46
3.2.3.2 Das Bildverarbeitungsprogramm Medmo	49
3.2.3.3 Konfokale Laser-Raster-Mikroskopie.....	49
3.3 Western Blot	51
3.3.1 Methoden.....	51
3.3.2 Experimente	54
3.3.3 Auswertungsprogramm für den Western Blot	54
3.4 Statistische Analyse	55
3.4.1 Statistische Grundbegriffe.....	55
4. Ergebnisse.....	57
4.1 Kollagen Typ IV	57
4.1.1 Immunhistochemie	57
4.1.2 Immunfluoreszenz	60

4.1.3 Western Blot.....	61
4.2 Laminin	62
4.2.1 Immunhistochemie	62
4.2.2 Immunfluoreszenz	66
4.3 Calpain	67
4.3.1 Immunhistochemie	67
4.3.2 Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2	70
5. Diskussion.....	71
5.1 Analyse der Basalmembran.....	71
5.1.1 Kollagen IV	71
5.1.2 Laminin	75
5.2 Calpain und sein Substrat MAP-2.....	77
5.3 ACE-Inhibitoren und Hypertonie.....	81
6. Zusammenfassung	83
7. Anhang.....	86
7.1 Material	86
7.1.1 Geräte	86
7.1.2 Verbrauchsmaterialien	86
7.1.3 Antikörper	87
7.1.4 Weitere Reagentien	88
7.2 Urwerte.....	89
7.2.1 Kollagen	89
7.2.2 Laminin	91
7.2.3 Calpain	93
8. Quellenverzeichnis	95
8.1 Literaturverzeichnis.....	95
8.2 Abbildungsverzeichnis	105
8.3 Tabellenverzeichnis.....	105
9. Danksagung	106
10. Lebenslauf	107

1. Einleitung

Die arterielle Hypertonie zählt zu den weltweit häufigsten Krankheiten: In den westlichen Industrienationen leiden bis zu 25% der Bevölkerung unter Hypertonie, bei über 50 Jährigen beträgt die Prävalenz sogar bis zu 50%¹. Einer der schwerwiegendsten Folgeschäden der Hypertonie ist der Schlaganfall, der weltweit die 3. häufigste Todesursache und die häufigste Ursache für erworbene Behinderung im Erwachsenenalter darstellt. Die Konsequenzen, die dies für den Betroffenen, Angehörige und auch das Gesundheitssystem hat, sind immens und erfordern verbesserte Prävention und intensivere Behandlung. Noch sind jedoch viele der Mechanismen, die letztendlich von der Hypertonie zum Schlaganfall führen, weitestgehend unverstanden, weshalb nähere Untersuchungen zu diesem Thema dringend notwendig sind.

In diesem Zusammenhang ist auch von Interesse, inwiefern Antihypertonika eine Rolle bei der Prävention des Schlaganfalls spielen. In Deutschland unterziehen sich etwa 20% der Bevölkerung einer antihypertensiven Therapie. Davon wiederum erhält jeder dritte ACE-Hemmer in Monotherapie und mehr als jeder zweite ACE-Hemmer in Kombination mit anderen Präparaten. In klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass Patienten durch die Gabe von Antihypertonika eine höhere Lebenserwartung sowie eine verminderte Schlaganfallrate aufweisen². Es gibt Hinweise dafür, dass es bei Hypertonie zu zerebralen Strukturveränderungen kommt, die durch Antihypertonika ganz oder teilweise verhindert werden können³. Wo genau auf zellulärer Ebene sich solcherlei Schutzmechanismen abspielen, ist aber noch größtenteils ungeklärt.

In dieser Studie haben wir daher den Einfluss einer antihypertonen Therapie bei spontan hypertensiven stroke prone Ratten (SHR-SP) auf zerebrale Strukturen untersucht. SHR-SP stellen ein genetisches Tiermodell für chronische Hypertonie dar. Die Tiere entwickeln früh hypertonieassoziierte Erkrankungen wie schwerwiegende zerebrale und kardiale Schäden und versterben meist an einem Schlaganfall. Sie sind daher optimal für Studien zum Zusammenhang von Hypertonie und Schlaganfall geeignet. Es ist bekannt, dass durch eine Therapie mit ACE-Hemmern Mortalität und Morbidität der Tiere vermindert werden können⁴, wobei diese Effekte sowohl in antihypertensiver als auch nicht-antihypertensiver Dosierung zu beobachten sind⁵. Uns interessierte deshalb, wie sich eine langfristige Behandlung mit dem ACE-Hemmer Ramipril bei SHR-SP auf zerebrale Strukturen, d.h. einerseits auf mikrovaskuläre Strukturen, andererseits auf die Neurone selbst, auswirkt. Als Marker für die vaskulären Strukturen wählten wir Kollagen und Laminin, zwei wichtige Bestandteile der

Basalmembran, für die Neurone die intrazelluläre Protease Calpain und ihr Substrat MAP-2. Die Wahl fiel auf diese Marker, da frühere Studien nahe legten, dass sie eine wichtige Rolle für die Entstehung und Ausprägung eines Schlaganfalls spielen.

Bei chronischer Hypertonie kommt es zu einer vaskulären Hypertrophie in den zerebralen Arterien und Arteriolen von Menschen und Tieren^{6,7}. Diese Hypertrophie ist hauptsächlich auf einen verdickten Intima/Media-Komplex der Gefäßwand infolge einer Leiomyozytenhypertrophie und einer Zunahme der Extrazellulärmatrix zurückzuführen, wobei sowohl Kollagen Typ IV als auch Laminin beteiligt sind. Zwar gibt es Hinweise auf protektive Effekte zerebraler Strukturen durch eine antihypertensive Therapie^{3,8}, doch gibt es zurzeit noch keine Daten zu mikrovaskulären Veränderungen von SHR-SP unter langfristiger Gabe von ACE-Hemmern. Von Bedeutung ist auch, dass es beim akuten Schlaganfall zu einem Verlust von Kollagen Typ IV und Laminin in der Basalmembran mikrovaskulärer Gefäße kommt^{9,10}. Bestandteile der Basalmembran scheinen also sowohl bei der vaskulären Reaktion auf erhöhten Druck als auch beim akuten Schlaganfall eine entscheidende Rolle zu spielen, was in unserer Studie näher untersucht werden sollte.

Weiterhin kann chronische Hypertonie zu zerebraler Ischämie und diese wiederum zu Läsionen führen¹¹. Da sowohl globale als auch fokale zerebrale Ischämie tierexperimentell eine Zunahme der Calpainaktivität und dadurch einen Abbau von MAP-2 in den betroffenen Arealen bewirkt^{12,13}, wollten wir untersuchen, ob durch eine antihypertone Therapie bei SHR-SP ein Unterschied zu unbehandelten Tieren in der zerebralen Calpainaktivierung zu beobachten ist.

Zusammenfassend lässt sich sagen: Hypertonie und Schlaganfall stellen ein schwerwiegendes und weit verbreitetes medizinisches Problem dar. Neben einer verbesserten Prävention und besseren Behandlungsmaßnahmen ist es bedeutend, die kausalen Zusammenhänge, welche zu der Erkrankung geführt haben, zu verstehen und dadurch Therapieoptionen genauer anpassen zu können. In dieser Studie wollten wir daher durch den Vergleich von Hirngewebe chronisch hypertensiver Tiere und langfristig antihypertensiv behandelte Tiere den folgenden Fragen nachgehen:

1. Gibt es, gemessen an den Markern Kollagen und Laminin, Unterschiede in der Zusammensetzung der Basalmembran zerebraler, mikrovaskulärer Gefäße?

2. Wie verhält es sich in den beiden Gruppen mit der Calpainaktivität als Ausdruck für neuronale Läsionen?
3. Welchen Stellenwert haben ACE-Hemmer bei der Verhinderung bzw. Abschwächung zerebraler Strukturveränderungen?

Die Beantwortung dieser Fragen mag uns dem Ziel der Prävention und adäquaten Therapie Betroffener ein kleines Stück näher bringen.

2. Theoretische Grundlagen

2.1 Hypertonie

Die arterielle Hypertonie (= Bluthochdruck) ist definiert als systolischer Blutdruck von ≥ 140 mm Hg oder diastolischer Blutdruck von ≥ 90 mm Hg. Als optimal gilt ein Blutdruck von $\leq 120/80$ mm Hg. Der Bereich dazwischen wird als „normal“ ($\leq 130/85$ mm Hg) bzw. „hoch normal“ ($\leq 139/89$ mm Hg) bezeichnet (s. Tab. 1). Bei Hochrisikopatienten wie z.B. Diabetikern und chronisch Nierenkranken sollte der Blutdruck Werte von $\leq 130/80$ nicht überschreiten^{14,15}.

Kategorie	Systolisch	Diastolisch
Optimal	< 120	< 80
Normal	120-129	80-84
Hoch Normal	130-139	85-89
Stufe 1 Hypertonie (leicht)	140-159	90-99
Stufe 2 Hypertonie (mittel)	160-179	100-109
Stufe 3 Hypertonie (stark)	≥ 180	≥ 110
Isolierte systolische Hypertonie	≥ 140	< 90

Tabelle 1: Definition und Klassifikation der Blutdruckstufen (mm Hg)

Wenn die systolischen und diastolischen Blutdruckwerte eines Patienten in verschiedene Kategorien fallen, dann gilt die höhere Kategorie. Isolierte systolische Hypertonie kann man auch nach systolischen Blutdruckwerten einstufen (1, 2, 3) wie oben aufgeführt, wenn die diastolischen Werte < 90 sind. (nach: Deutsche Hochdruckliga e.V. DHL © – Deutsche Hypertonie Gesellschaft, 2005)

Während die Prävalenz der Hypertonie in einigen anderen europäischen Ländern in den letzten Jahren gesunken ist¹⁶, sind die Raten in Deutschland trotz verbesserter medikamentöser Therapie in etwa gleich geblieben und liegen damit im internationalen Vergleich im mittleren bis oberen Bereich¹. Es bestehen ausgeprägte regionale Unterschiede: Während in Nordamerika 28% der über 35 Jährigen hyperton sind, finden sich in der europäischen Vergleichsgruppe 44%, wobei Deutschland mit 55% einen der Spitzenplätze anführt. Dieser Trend spiegelt sich bereits schon in der Altersgruppe der 35-39 Jährigen wider¹⁷. Auch innerhalb Deutschlands sind deutliche regionale Unterschiede zu beobachten. Im Nordosten wurden etwa 60% der Männer zwischen 25-74 Jahren als hyperton eingestuft, im Südwesten waren es hingegen nur 41%. Bei Frauen betrug die Prävalenz im Nordosten etwa 39% und 29% im Südwesten. Das qualitative Hypertonie Management hingegen war in allen Regionen etwa gleich¹⁸. Doch selbst ein optimaler Blutdruck in jungem Alter ist kein

Garant für spätere Normotension: Auch normotensive 55-Jährige haben noch ein 90%iges Lebenszeitrisko, im Laufe der Zeit eine arterielle Hypertonie zu entwickeln¹⁹.

Während die in den 60er Jahren in den USA postulierte These der „Rule of halves“, die besagt, dass nur die Hälfte aller Hypertoniker von ihrer Krankheit weiß, davon nur die Hälfte eine Behandlung erhält und davon wiederum nur die Hälfte befriedigend eingestellt werden kann, zwischenzeitlich sehr umstritten war²⁰, hat man inzwischen wiederholt Hinweise dafür gefunden, dass sich die Situation kaum gebessert hat^{21,22}. Immer wieder werden deshalb Forderungen nach besserer Kontrolle laut. In Deutschland waren im Jahre 1997 nur 22,5% der Hypertoniker auf Werte $\leq 160/95$ mm Hg eingestellt²³, im Bereich $\leq 140/90$ waren es 1995 sogar nur 7% der Männer und 13% der Frauen¹.

Das Risiko, an kardiovaskulären Folgeerscheinungen zu erkranken, beginnt schon bei 115/75 mm Hg und verdoppelt sich bei jedem Anstieg um 20/10 mm Hg¹⁹. Somit muss eher von einem kontinuierlichen als von einem Schwellenrisiko ausgegangen werden²⁴.

Langjährig bestehende Hypertonie hat zahlreiche Komplikationen an Augen, Gehirn, Herz, Nieren und Gefäßsystem sowie eine insgesamt erhöhte Letalität zur Folge^{17,22}. Dies ist hauptsächlich durch strukturelle und funktionelle Veränderungen im vaskulären System bedingt. Zerebrovaskuläre Veränderungen führen zu einem erhöhten Risiko von Schlaganfall^{17,21}, vaskulärer Demenz und Demenz vom Alzheimer Typ^{25,26}. Es entwickelt sich sowohl beim Menschen²⁷ als auch beim Tier^{6,8} eine vaskuläre Hypertrophie, die hauptsächlich durch eine vermehrte extrazelluläre Matrix und Mediahyperplasie bedingt ist.

Die Prognose hypertoner Patienten kann durch eine antihypertensive Behandlung entscheidend verbessert werden: Die Mortalität wird vermindert, die Inzidenz des Myokardinfarkts, plötzlicher Herztod und Schlaganfall nehmen ab². Außerdem kann es zu einer Rückbildung der linksventrikulären Hypertrophie kommen²⁸ und die Rate an Demenzerkrankungen gesenkt werden²⁹. Als Mittel der ersten Wahl gelten ACE-Hemmer und Angiotensin-1-Antagonisten, Diuretika, Calcium-Antagonisten und β -Blocker, wobei Kombinationen den besten Effekt erbringen² (s. Abb. 1).

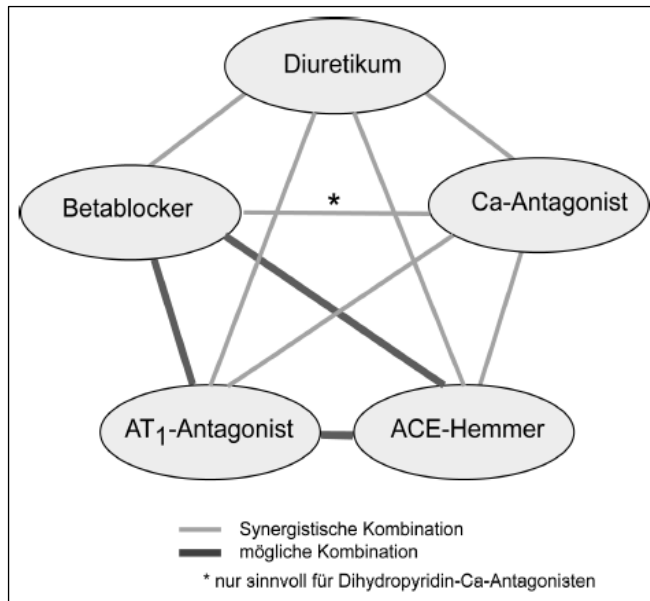


Abbildung 1: Effiziente und gut verträgliche Medikamentenkombinationen
 (Deutsche Hypertonie Gesellschaft, 2005)

2.2 Schlaganfall

Bei ca. 15% der Hypertoniker kommt es zum Tod durch Schlaganfall, wobei die Häufigkeit von hypertonen Massenblutungen ca. 15% und die von ischämischen Infarkten 85% beträgt. Das Risiko, einen Schlaganfall zu erleiden, ist bei Hypertonikern um das 3-4fache im Vergleich zur Normalbevölkerung erhöht³⁰, was die Hypertonie unabhängig von geographischer Lage und ethnischer Zugehörigkeit zum wichtigsten Risikofaktor beim Schlaganfall macht¹⁷. Man geht davon aus, dass von 10 Patienten, die am Schlaganfall versterben, 4 durch adäquate Blutdruckeinstellung hätten gerettet werden können³¹. Während früher vor allem der erhöhte diastolische Blutdruck als Risikofaktor galt, geht man heute davon aus, dass auch der systolische Wert für kardiovaskuläre Folgekrankheiten wie den Schlaganfall verantwortlich ist¹⁹. Weitere wichtige Risikofaktoren für einen Apoplex sind ein Nikotinabusus³² (relatives Risiko 1,8-3,7x erhöht), Diabetes mellitus, Hypercholesterinämie, Adipositas, körperliche Inaktivität, Vorhofflimmern und Herzinsuffizienz³¹. Weltweit starben 2002 5,5 Millionen Menschen an einem Schlaganfall, was einen Anteil von 10% aller Todesursachen ausmachte. Mit zunehmendem Alter steigt die Inzidenz deutlich an und gewinnt durch den in den Industrienationen stetig steigenden Anteil der über 65-jährigen immer mehr an Bedeutung. In Deutschland liegt die Inzidenz von Schlaganfällen derzeit bei ca. 200.000/Jahr, wobei im Jahre 2002 79.326 Patienten daran verstarben³³. Damit handelt es sich beim Schlaganfall nach den Herz-Kreislaufkrankheiten und den Krebserkrankungen um die 3.-häufigste Todesursache in Deutschland. Vor allem aber in den Entwicklungsländern, in

denen die meisten aller Schlaganfälle auftreten³³ und in denen sich erwartungsgemäß die Bevölkerung über 60 Jahre in den nächsten 2 Dekaden verdoppeln wird³⁴, fehlt es an Präventionsmaßnahmen und Basismedikamenten.

Der Trend zu verminderter körperlicher Aktivität, vermehrter Kalorienaufnahme und schädlichen Gewohnheiten wie Nikotinkonsum wird das Auftreten von Schlaganfällen weltweit sogar noch verstärken³⁵. Auch ein gleichzeitiger leichter Gegentrend zu gesundheitsbewußterem Verhalten wird diese Entwicklung wohl nicht maßgeblich beeinflussen können^{36,37}.

Noch sind die genauen Pathomechanismen, welche vom erhöhten Blutdruck zur Entstehung eines Schlaganfalls führen, nicht genau bekannt, doch scheinen unterschiedliche Faktoren mit daran beteiligt zu sein. So bewirken atheromatöse Plaques, die sich in arteriellen Mikrogefäßen ablagern, eine Einengung bzw. einen Verschluss des Lumens und fördern so eine lokale Gerinselbildung. Dies wiederum führt zu ischämischen Gefäßschäden und konsekutiven Mikroinfarkten des umliegenden Hirngewebes. Auch können plötzliche Druckschwankungen in den Zerebralf Gefäßen langandauernde Gefäßspasmen hervorrufen, die ebenfalls eine Ischämie der Gefäße zur Folge haben³⁸. Ein weiterer wichtiger Faktor für die Reaktion zerebraler Gefäße auf Bluthochdruck ist die Zusammensetzung der Basalmembran. Veränderungen in der Zusammensetzung sind sowohl bei chronischer Druckbelastung der Gefäße als auch beim akuten Schlaganfall zu beobachten, was in den Kapiteln 2.5-2.7 näher erläutert werden soll.

Im Hinblick auf die bedeutende Rolle, die ein erhöhter Blutdruck für die Entstehung von Schlaganfällen spielt, stellt sich die Frage, welche Systeme regulierend darauf Einfluss nehmen und deshalb bei Störung der Regelkreise zur Hypertonie führen können. Neben Barorezeptoren, Dehnungsrezeptoren in der Herzwand und reflektorischen Kreislaufzentren in der Medulla oblongata gilt als das wohl potenteste Regulationssystem das Renin-Angiotensin-Aldosteron System ist, weshalb darauf im folgenden näher eingegangen werden soll.

2.3 Renin-Angiotensin-Aldosteron System

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron System (= RAAS) reguliert den Flüssigkeits- und Elektrolythaushalt des Körpers und wirkt somit in entscheidender Weise auf den Blutdruck ein.

Die Komponenten des RAAS stehen in enger Wechselwirkung zueinander. Durch eine Reihe enzymatischer Spaltungen entsteht letztendlich das physiologisch wirksame Angiotensin II. Renin ist eine hauptsächlich von den juxtaglomerulären Zellen der Niere produzierte Protease. Seine Sekretion unterliegt einer Vielzahl von regulatorischen Einflüssen: So wird beispielsweise bei Minderdurchblutung der Niere, Abfall der glomerulären Filtrationsrate, verminderter Natriumchloridkonzentration an der Macula densa oder Stimulation des Sympathikus vermehrt Renin ins Blut ausgeschüttet. Die Aufgabe des Renins ist die Spaltung von Angiotensinogen in das Dekapeptid Angiotensin I. Dieses wiederum wird durch das in der Lunge gebildete Angiotensin converting enzyme (= ACE) in das Oktapeptid Angiotensin II überführt. Dieser Schritt kann durch Antihypertensiva vom Typ der ACE-Hemmer gehemmt werden und erhält dadurch therapeutische Bedeutung.

Angiotensin II bewirkt an den Blutgefäßen eine Vasokonstriktion und in der Nebennierenrinde eine vermehrte Ausschüttung von Aldosteron. Aldosteron ist ein Steroidhormon und bewirkt hauptsächlich eine Natrium- und Wasserretention in der Niere. Durch die Wirkung des Angiotensin II wird also der Blutdruck sowohl über Steigerung des intravasalen Volumens als auch durch die Verengung der Blutgefäße erhöht.

Angiotensin II wirkt über verschiedene Rezeptoren auf die Zielstrukturen. Für die kardiovaskulären Effekte ist die Wirkung am AT₁-Rezeptor entscheidend, welche durch den Einsatz von AT₁-Rezeptorantagonisten aufgehoben werden kann (s. Abb. 2).

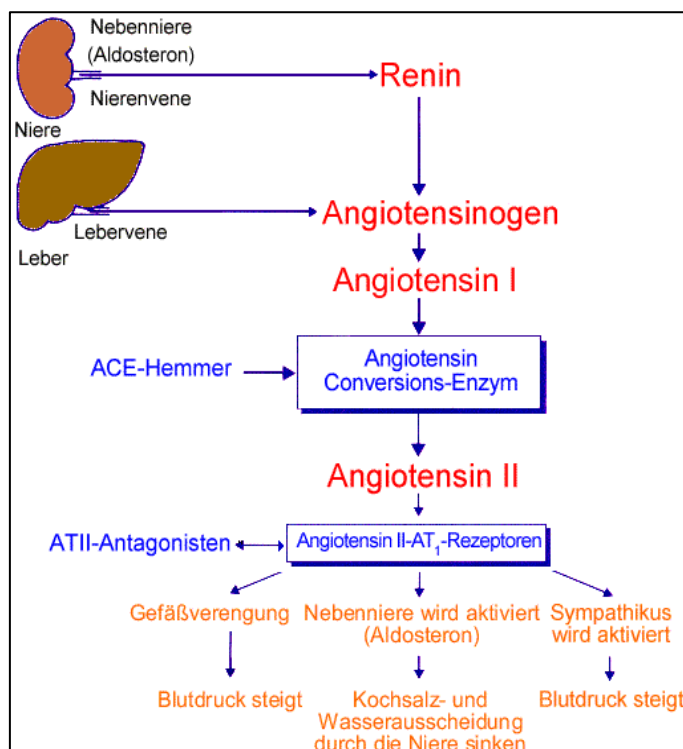


Abbildung 2: Das Renin-Angiotensin-Aldosteron System

Aktivierungskaskade, therapeutische Angriffsstellen der ACE-Hemmer und ATII-Antagonisten und Wirkung auf den Blutdruck

2.3.1 ACE-Hemmer

2.3.1.1 Entwicklungsgeschichtlicher Hintergrund ³⁹

Der Grundstein für die Entwicklung der ACE-Hemmer wurde 1956 mit der Aufklärung der Funktion des Angiotensin Converting Enzyms ⁴⁰ durch Leonard T. Skeggs gelegt. Die Bedeutung dieses Enzyms für die Blutdruckregulation wurde anfangs noch unterschätzt.

Erst 14 Jahre nach der Entdeckung des Angiotensin Converting Enzyms wurde 1970 durch den Pharmakologen Sergio H. Ferreira herausgefunden, dass das Gift der Jararaca-Lanzenotter in-vitro zu einer Hemmung des Enzyms führt. Mit dem in diesem Schlangengift enthaltenen Pentapeptid BPP_{5a} wurde sogleich eine der wirksamen Komponenten isoliert.

Da BPP_{5a} im Körper sehr instabil ist, startete fast gleichzeitig eine Suche nach potenteren und stabileren Inhibitoren des Enzyms. Ein erster Erfolg gelang 1971 mit der Entdeckung der ACE-hemmenden Wirkung des Nonapeptids Teprotid. Die klinische Weiterentwicklung von Teprotid wurde jedoch zwei Jahre später aus mangelndem kommerziellen Interesse seitens der Hersteller eingestellt.

Ebenfalls anfangs der 1970er Jahre konnte die wirksame Teilstruktur der ACE-hemmenden Peptide BPP_{5a} und Teprotid aufgeklärt werden. Anhand dieser Entdeckungen wurden neue nichtpeptidische ACE-Hemmer entwickelt. 1974 wurde erstmalig der ACE-Hemmer Captopril beschrieben, der Produkt einer groß angelegten Wirkstoffsuche der Pharmafirma Squibb war. 1981 wurde er als erster ACE-Hemmer in die Therapie eingeführt. Zwei Jahre später folgte mit Enalapril die Markteinführung eines zweiten ACE-Hemmers.

Aufgrund des großen therapeutischen und wirtschaftlichen Erfolges der Arzneistoffe Captopril und Enalapril wurde eine 2. Generation der ACE-Hemmer entwickelt, die seit Anfang der 1990er Jahre erhältlich sind (z.B. Lisinopril und Ramipril).

2.3.1.2 Wirtschaftliche Bedeutung

Die Behandlung der Hypertonie hat eine große ökonomische Bedeutung: Der Anteil von Personen, die Antihypertensiva einnehmen, beträgt in Nordamerika ca. 44% und in Europa 27% ¹⁷. In Deutschland sind es in etwa 20 % der Bevölkerung und jeder Zweite über 55 Jahre. Etwa 35 % der Bluthochdruckpatienten werden mit einem ACE-Hemmer in Monotherapie und ca. 55 % in Kombination mit einem weiteren Blutdruck senkenden Arzneimittel behandelt. In den USA wurden im Jahr 2001 114 Millionen Packungen ACE-Hemmer verschrieben, was einem Gesamtumsatz von ca. 4,3 Milliarden US-Dollar entspricht. Den Hauptanteil daran trägt der ACE-Hemmer Lisinopril (47 %), gefolgt von Enalapril (17 %),

Captopril und Ramipril (je 9 %). Auf dem von Generika geprägten deutschen Markt dominiert hingegen der Arzneistoff Enalapril.

2.3.1.3 Experimentelle Modelle

In klinischen Studien am Menschen wurde vielfach beobachtet, dass es durch Behandlung mit ACE-Hemmern zu einer Verlängerung der Überlebenszeit, verminderter Mortalität, einer Verminderung von Schlaganfällen und einer verzögerten Progression der dilatativen Kardiomyopathie kommen kann^{41,42}. Der Effekt ist umso ausgeprägter, je mehr der Blutdruck gesenkt werden kann⁴³. Es gibt jedoch auch Hinweise darauf, dass eine Protektion unabhängig von der Senkung des Blutdrucks bzw. im Vergleich mit anderen Antihypertensiva verstärkt auftritt, was einen Schutz allein durch die Substanzklasse möglich erscheinen lässt⁴⁴.

Auch zur Wirkung von ACE-Hemmern auf Tiere gibt es zahlreiche Studien, derer sich viele dem Tiermodell der Spontan hypertensiven Ratte bedienen. Weshalb gerade dieses Modell für Studien zum Zusammenhang von Hypertonie und Schlaganfall so geeignet ist, soll im folgenden näher erläutert werden.

2.4 Spontan hypertensive Ratten stroke-prone (SHR-SP)

Die in dieser Studie verwendeten SHR-SP Ratten stellen ein genetisches Modell für schwere arterielle Hypertonie mit konsekutiven vaskulären Veränderungen dar, die denen chronisch hypertensiver Patienten gleichen.

1963 wurde die erste Reihe spontan hypertensiver Ratten (SHR) aus Wistar Kyoto Ratten gezüchtet, die in den folgenden Jahren durch Selektion und Inzucht zu den spontan hypertensiven Ratten stroke-prone (SHR-SP) weiterentwickelt wurden^{45,46}. Die SHR-SP haben im Vergleich mit den SHR ein geringeres Körpergewicht, einen um etwa 40-50 mm Hg höheren Blutdruck und versterben noch früher als ihre Artgenossen an Folgekrankheiten der Hypertonie.

Unbehandelt entwickeln die Tiere nach spätestens 7-15 Wochen einen malignen Hypertonus⁴⁵ mit einem systolischen Wert von durchschnittlich 240mm Hg und erkranken im Verlauf ihres Lebens an den mit Hypertonie assoziierten Folgeschäden wie Arteriosklerose, Niereninsuffizienz, kardialen Mikrogefäßschäden, schwerwiegenden zerebralen Schäden, Herzhypertrophie oder -insuffizienz. Sie versterben nach spätestens 1 1/2 Jahren an den

Folgen von Myokardinfarkten oder Schlaganfällen^{45,47}. Normotensive Wistar-Kyoto Ratten überleben hingegen durchschnittlich 30 Monate⁴. Sowohl durch die kurzfristige als auch die langfristige Gabe eines ACE-Hemmers lässt sich bei den SHR-SP jedoch eine Verlängerung der Überlebenszeit erreichen^{4,5}. Mögliche Effekte, die dazu beitragen, sind Verhinderung der linksventrikulären Hypertrophie⁴⁸, Protektion der Herzfunktion und des Metabolismus sowie Protektion der Endothelien⁴. Protektive Effekte können sowohl in blutdrucksenkender Dosierung als auch in nicht-blutdrucksenkender Dosierung der ACE-Hemmer an der Aorta⁴⁹, den Mesenterialgefäßen⁵⁰, den zerebralen Gefäßen⁵¹ und den Koronararterien⁴⁷ nachgewiesen werden.

Bei der Untersuchung von Gefäßen kommt es darauf an, strukturelle Veränderungen möglichst genau zu lokalisieren. Fundierte Kenntnisse vom physiologischen Aufbau sowie der Funktion der Blutgefäße in verschiedenen Organen sind dabei von großer Bedeutung.

2.5 Aufbau der Blutgefäße

Die Wand von Blutgefäßen ist aus drei verschiedenen Schichten aufgebaut, die sich bei Venen und Arterien sehr ähnlich sind, aber je nach Lokalisation im Körper unterschiedlich stark ausgeprägt sein können. Die Blutgefäße sind dadurch optimal an ihre jeweiligen Aufgaben angepasst.

Folgende drei Schichten werden unterschieden:

- **Tunica intima (= Intima):** Die innerste Schicht von Blutgefäßen besteht aus dem Endothel, einem einschichtigen Verband flacher Zellen, an das eine Basalmembran (s.u.) und das aus zarten Kollagenfasern und elastischen Netzen bestehende subendotheliale Bindegewebe anschließen. Am Übergang zur Media findet sich die Membrana elastica interna. Die Faserzüge und Zellen sind vorwiegend in Richtung des Blutstroms ausgerichtet.

Mikrovaskuläres Endothel kann phänotypisch sehr unterschiedlich vorliegen: kontinuierlich, fenestriert mit oder ohne Diaphragma oder diskontinuierlich. Die jeweilige Ausprägung hängt von lokalen Mediatoren ab, wobei man von löslichen Faktoren, Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen ausgeht^{52,53}.

Die Intima ist bei herznahen Arterien gewöhnlich stärker ausgeprägt als bei herzfernen.

- **Tunica media (= Media):** Die mittlere Schicht besteht aus glatten Muskelzellen, Kollagenfasern und elastischen Fasern, die vorwiegend ringförmig angeordnet sind. Bei Arterien verdichten sich am Übergang zur Adventitia die elastischen Strukturen zur Membrana elastica externa, die aber zum Teil nur sehr schwach ausgeprägt sein kann. Der Mengenanteil der einzelnen Gewebsbestandteile hängt von der Lage und der Beanspruchung im Organismus ab. Bei den Arterien ist die Media die am kräftigsten entwickelte Wandschicht.

- **Tunica externa (= Adventitia):** Die äußere Schicht von Blutgefäßen wird von Bindegewebe gebildet, das kollagene und elastische Fasern enthält. Sie stellt dadurch eine Verbindung mit der jeweiligen Umgebung her. In dieser Schicht können bei größeren Arterien auch die Arterienwand versorgende Blutgefäße (= Vasa vasorum) und Gefäßnerven eingebunden sein.

Im Rahmen dieser Arbeit ist vor allem die die Endothelzellen und Basalmembran umfassende Tunica intima von Interesse, welche im Gehirn die spezifische Funktion der Blut-Hirn-Schranke erfüllt.

2.5.1 Blut-Hirn-Schranke

Die Blut-Hirn-Schranke dient dem Schutz des Hirngewebes vor potentiell toxischen Substanzen. Es handelt sich um eine selektiv durchlässige Schranke zwischen Hirnsubstanz und Blutstrom, die den Stoffaustausch im ZNS kontrolliert. Nur wenn die Integrität der Blut-Hirn-Schranke bewahrt ist, kann ihre Schutzfunktion aufrechterhalten bleiben.

1885 zeigte Paul Ehrlich, daß saure Vitalfarbstoffe das Hirn nach Injektion in den Liquor Cerebrospinalis färbten, nicht jedoch nach intrarterieller Injektion. Die eigentliche Barriere wird nicht, wie zunächst gedacht, aus den Astrogliazellen, sondern aus dem Endothel selber gebildet. Im Unterschied zu den meisten anderen Endothelien liegt es im Hirn nämlich dicht durch Tight junctions (Zonulae occludentes) mit den jeweils benachbarten Endothelzellen verbunden vor (s. Abb. 3). Für die morphologische Integrität wie die Extravasation von zellulären Bestandteilen sind jedoch außerdem noch die Basalmembran sowie in geringerem Umfang die Astrozytenfortsätze von Bedeutung. Je nach ihrer Zusammensetzung ist das Wechselspiel der unterschiedlichen Strukturen entscheidend für die zerebralen Mikrogefäße.

So wird beispielsweise die Ausbildung der Tight junctions erst durch die Astrozytenfortsätze induziert, wohingegen die Basalmembran u.a. Einfluss auf das Überleben des Endothelzellverbandes nimmt (s.u.).

Fettlösliche Substanzen wie Nikotin, Alkohol und Blutgase, aber auch Narkotika wie Halothan, können die Blut-Hirn-Schranke per Diffusion passieren und somit ins Gehirn gelangen. Ionen und polare Substanzen wie Glukose sind hingegen auf spezifische Transportsysteme angewiesen. Durch die Blut-Hirn-Schranke kann die chemische Zusammensetzung der Interzellularflüssigkeiten des Gehirns weitgehend konstant gehalten werden.

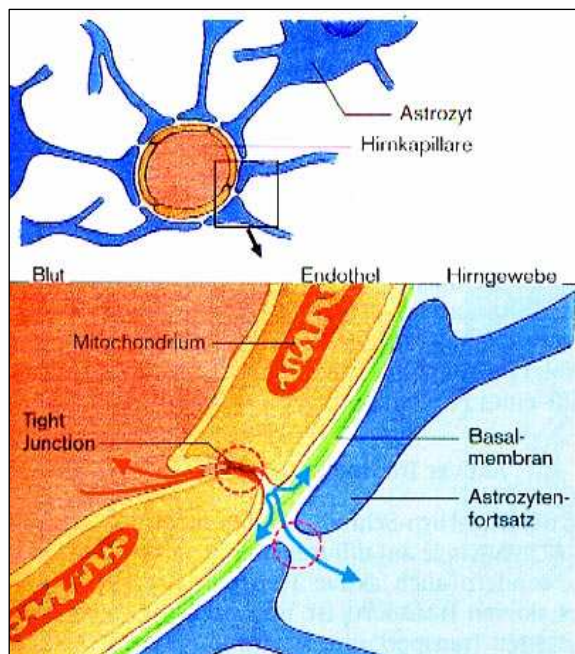


Abbildung 3: Blut-Hirn-Schranke
Schematische Darstellung der beteiligten Strukturen

Während die Basalmembran als Bestandteil der Intima keinen direkten Anteil an der Blut-Hirn-Schranke hat, ist sie dennoch für die angrenzenden Endothelzellen und somit die zerebrovaskuläre Integrität von höchster Wichtigkeit⁵⁴.

2.5.2 Basalmembran

Alle Endothelien grenzen mit ihrer dem Bindegewebe zugewandten Seite an eine Basalmembran, durch die sie mittels transmembranöser Verbindungsproteine in der Umgebung befestigt sind. Die Basalmembran ist eine spezialisierte extrazelluläre Matrix, die

sowohl von Epithel- als auch Endothelzellen aufgebaut wird. Sie kann bis zu 1 µm dick sein und ist für die meisten Stoffe permeabel, wodurch die Ernährung des Endothels gewährleistet ist. Basalmembranen erfüllen wichtige Funktionen für das angrenzende Gewebe: einerseits sorgen sie für mechanische Stabilität und wirken als Barriere zwischen unterschiedlichen Zelltypen, andererseits sind sie entscheidend beteiligt an Zelldifferenzierung, -überleben und -migration^{55,56}.

Lichtmikroskopisch erscheint die Basalmembran als homogene Einzelschicht. Mithilfe elektronenmikroskopischer Darstellung lässt sich jedoch ein vierschichtiger Aufbau erkennen:

Lamina rara externa (= Lamina lucida): Diese Schicht stellt eine Verbindung zwischen Endothel und Lamina densa der Basalmembran her. Laminin ist in diesem Zusammenhang ein wichtiges vermittelndes Glykoprotein.

Lamina densa (= Basallamina): Die Lamina densa ist der zentrale Anteil der Basalmembran. Sie ist zwischen 20-100 nm dick und stellt sich elektronenmikroskopisch sehr dicht dar. Charakteristisch ist das Vorkommen von Kollagen Typ IV. Das Kollagen Typ IV bildet ein geflechtartiges räumliches Netzwerk, welches als Grundstruktur der Basallamina anzusehen ist und die Verbindung zu den angrenzenden Strukturen darstellt. Eingebettet sind verschiedene Proteoglykane und Glykoproteine.

Lamina rara interna: Die Lamina rara interna ist als Verbindungsschicht zur Lamina fibroreticularis zu betrachten. Das Glykoprotein Fibronectin ist zusammen mit anderen ein wichtiger Vermittler.

Lamina fibroreticularis: Die Lamina fibroreticularis verbindet die Basalmembran mit dem unmittelbar angrenzenden Bindegewebe. Einstrahlende Bindegewebsfasern werden durch so genannte Ankerfibrillen befestigt, außerdem enthält sie als wichtige Faser Kollagen Typ III.

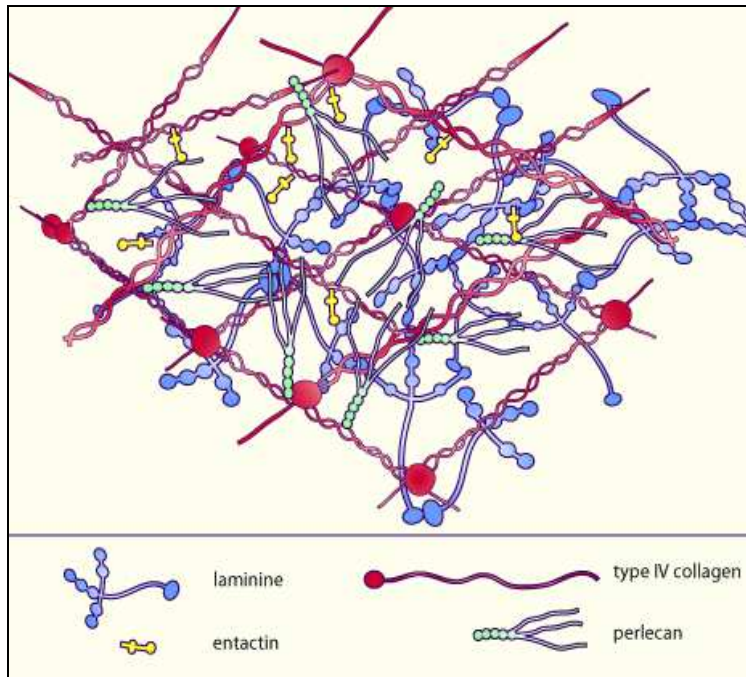


Abbildung 4: Struktur der Basalmembran

Hier sind nur 4 Komponenten aufgeführt von einer Vielzahl von über 50 Glykoproteinen und mehreren Proteoglykanen, die in der Basalmembran vorkommen können.

Hauptbestandteile der Basalmembranen sind Kollagen Typ IV, das Glykoprotein Laminin, Heparansulfat und einige quantitativ weniger häufige Bestandteile wie BM40 (= Osteonektin), Fibulin 1 und 2, Entactin, Perlecan, Kollagen Typ VIII, XV, XVIII und Thrombospondin 1 und 2 (s. Abb. 4). Je nach Gewebe setzen sich Basalmembranen sehr unterschiedlich zusammen und erfüllen auch unterschiedliche Funktionen⁵⁷. Dies ist zum einen durch das unterschiedliche Verhältnis der Proteine zueinander sowie die multiplen Isoformen der einzelnen Proteine zu erklären^{58,59}. Auch das Entwicklungsalter spielt eine Rolle für die Zusammensetzung der Basalmembran: scheint in frühen Phasen noch Laminin als membranähnliche Matrix ausreichend zu sein, ist die Inkorporation von Kollagen in späteren Phasen unverzichtbar für Integrität, Stabilität und Funktionalität⁶⁰.

Alle Bestandteile der Basalmembran sind multifunktionell und haben mehrere spezifische, aktive Domänen, die mit Zellen, anderen Molekülen der Extrazellulärmatrix oder Wachstumsfaktoren wie VEGF oder FGF-2 interagieren können⁶¹ und dadurch Einfluss auf das Wachstum von Gefäßen ausüben. Auch Proenzyme (z.B. inaktive Formen der Metallomatrixproteasen) und Spaltprodukte der Extrazellulärmatrix (z.B. die α 4-Kette G4-5)⁵⁸ können pro- oder antiangiostatisch wirken.

Menschliche und tierische Zellen können mehrere verschiedene Matrixtypen bilden. Eine Auswahl zeigt Tab. 2:

Kollagen	Anker	Proteoglykan	Oberflächenrezeptor	Zellen
I	Fibronectin	Chondroitin und Dermatansulfate	Integrin	Fibroblasten
II	Fibronectin	Chondroitin-Sulfate	Integrin	Chondrozyten
III	Fibronectin	Heparansulfate und Heparin	Integrin	inaktive Hepatozyten, Epithelien; assoz. Fibroblasten
IV	Laminin	Heparansulfate und Heparin	Lamininrezeptoren	alle epithelialen Zellen, endotheliale Zellen, regenerierende Hepatozyten
V	Fibronectin	Heparansulfate und Heparin	Integrin	inaktive Fibroblasten
VI	Fibronectin	Heparansulfate	Integrin	inaktive Fibroblasten

Tabelle 2: Auswahl möglicher Extrazellulärmatrix-Typen

Im folgenden soll auf zwei der wichtigsten Bestandteile von Basalmembranen, das Kollagen Typ IV und das Glykoprotein Laminin, näher eingegangen werden.

2.6 Kollagen

Der Name Kollagen kommt aus dem Griechischen und bedeutet „Leim bildend“. Gewählt wurde diese Bezeichnung aufgrund seiner Eigenschaft als Strukturprotein des Knochens („Knochenleim“), welches heute in Form von Gelatine Anwendung findet.

Kollagen ist das mengenmäßig wichtigste Strukturprotein des Bindegewebes im menschlichen Körper und das erste biochemisch analysierte Protein von Basalmembranen⁵⁵. Zurzeit sind 27 verschiedene Kollagentypen (Typ I bis XXVII) sowie zusätzlich mindestens zehn weitere Proteine mit kollagenähnlichen Domänen bekannt.

Kollagen wird im endoplasmatischen Retikulum von Fibroblasten synthetisiert und besteht aus helikalen Peptidketten, die untypischerweise eine linksgängige Helix aufweisen. Drei dieser Helices umschlingen einander zu einer rechtsgängigen Superhelix (s. Abb. 5), die sich wiederum mit weiteren Superhelices zu Mikrofibrillen zusammenlagert. Die Mikrofibrillen schließlich bilden die endgültige Kollagenfaser. Auffallend an der Primärstruktur des Kollagens ist, dass als jede dritte Aminosäure Glycin vorkommt. Ein häufig wiederholtes Sequenzmotiv ist Prolin-Hydroxyprolin-Glycin (s. Abb. 6).

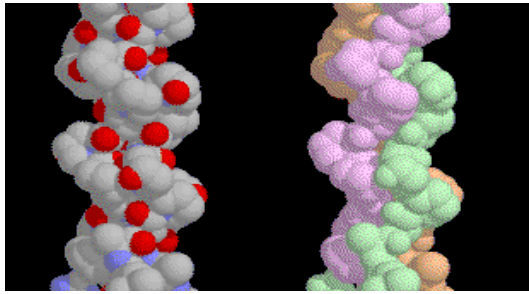


Abbildung 5: Aufbau einer Kollagen-Superhelix aus 3 Polypeptidketten

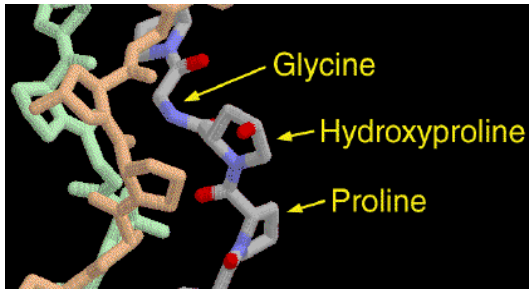


Abbildung 6: Primärstruktur des Kollagens. Häufiges Sequenzmotiv ist Prolin-Hydroxyprolin-Glycin

Die Art der Vernetzung bestimmt die enorme Zugfestigkeit und Dehnbarkeit, die die Fasern später aushalten können und die oftmals bis zum 10.000fachen des Eigengewichts ausmachen. Typisches Zeichen von Kollagen ist, dass seine Fasern sich nicht verzweigen und im Mikroskop gewellt aussehen.

Die Einteilung der Kollagene erfolgt nach der Struktur der Molekülketten des Tropokollagens, einer der Vorstufen des Kollagens. Die wichtigsten Kollagentypen sind Typ I bis Typ IV (s. Tab 3).

	Typ	polymerisierte Form	Vorkommen
fibrillen-bildend	I	Fibrillen	Knochen, Haut, Sehnen, Bänder, Hornhaut, innere Organe (ca. 90%)
	II	Fibrillen	Knochen, Zwischenwirbelscheiben
	III	Fibrillen	Haut, Blutgefäße, Haare
	V	Fibrillen (mit Typ I)	s. Typ I
	XI	Fibrillen (mit Typ II)	s. Typ II
fibrillen-assoziert	IX	seitliche Verbindung mit Fibrillen des Typs II	Knorpel
	XII	seitliche Verbindung mit manchen Fibrillen des Typs II	einige andere Gewebe
geflecht-bildend	IV	flächiges Netz	Basalmembran
	VII	Verankerungsfibrillen	unter geschichtetem Plattenepithel

Tabelle 3: Einteilung der Kollagene anhand ihrer Struktur

Bei dem in dieser Arbeit untersuchten Kollagen handelt es sich um das Kollagen Typ IV, welches vornehmlich in Basalmembranen vorkommt. In experimentellen Studien am Tier konnte gezeigt werden, dass es sowohl beim traumatischen Hirnschaden⁶² als auch bei akuter zerebraler Ischämie und anschließender Reperfusion zu einem Verlust an Kollagen Typ IV kommt¹⁰. Bezüglich des Verhaltens von Kollagen bei chronischer Hypertonie konnte noch keine Einigung erzielt werden: Untersuchungen an der Aorta⁶³, den Carotiden⁶⁴ bzw. den Mesenterialgefäßen⁵⁰ ergaben, dass chronisch erhöhter Blutdruck zu einer Zunahme von Kollagen führt, häufig ausgedrückt durch ein vergrößertes Kollagen/Elastin Verhältnis. Studien an zerebralen Arteriolen von SHR-SP im Vergleich zu normotensiven Ratten zeigten hingegen nur eine relative Zunahme von Elastin und glatten Muskelzellen, und der Gehalt von Kollagen und die Dicke der Basalmembran blieben gleich oder nahmen sogar ab. Die Dehnbarkeit der Gefäße nahm dadurch zu. Dies stand im Gegensatz zu den größeren zerebralen Gefäßen, die verhältnismäßig mehr Kollagen und weniger glatte Muskelzellen enthielten⁶⁵. Ein endgültiger Konsens bezüglich der Komposition der vaskulären Extrazellulärmatrix bei chronischer Hypertonie besteht zurzeit nicht, weshalb wir in unserer Studie die Auswirkungen chronischer Hypertonie auf die Basalmembran zerebraler Gefäße von SHR-SP im Vergleich mit einer antihypertensiv behandelten Gruppe untersuchen wollten. Zwar gibt es Hinweise auf protektive Effekte auf die Struktur von Hirngefäßen durch Antihypertonika^{3,8}, jedoch ist zurzeit noch wenig über die mikrovaskulären Veränderungen bekannt.

2.7 Laminin

Laminine wurden erstmals vor ca. 25 Jahren als essentieller Bestandteil von Basalmembranen entdeckt⁶⁶. Es handelt sich um große Glykoproteine (850-1000 kDa) mit antigenen Eigenschaften, die von verschiedenen epithelialen und mesenchymalen Zellen synthetisiert werden. Sie sind in der Lamina rara externa der Basalmembran lokalisiert und stellen die Verbindung zwischen dieser und den Epithelzellen her. Seit einigen Jahren ist bekannt, dass Laminine nicht immer auf die Basalmembran beschränkt sind: So lässt sich beispielsweise die γ 3-Kette des Laminin 12 in den meisten endothelialen Zellen der Arteriolen und Kapillaren oder der apikalen Oberfläche von ziliären Geweben in Lunge und Reproduktionstrakt nachweisen^{67,68}.

Laminine bestehen aus 3 glykosilierten Polypeptidketten, einer α -Kette (5 mögliche Subtypen), einer β -Kette (= β 1-Kette, 4 Subtypen) und einer γ -Kette (= β 2-Kette, 3

Subtypen)⁵⁸, die sich spiralförmig umeinander winden und über Disulfidbrücken verbunden sind. Durch das Vorhandensein der Subtypen können mehrere verschiedene Isoformen gebildet werden, von denen zurzeit 15 bekannt sind⁶⁹. Die α -Kette enthält an ihrem Ende eine funktionelle Domäne für die Verbindung zu organspezifischen Zellrezeptoren, während die β -Kette und γ -Kette für die Bindung von Kollagen Typ IV sowie die Aggregation von Lamininen untereinander verantwortlich sind. Des Weiteren finden sich Bindungsstellen für Heparin, Heparansulfat und Nidogen (s. Abb. 7).

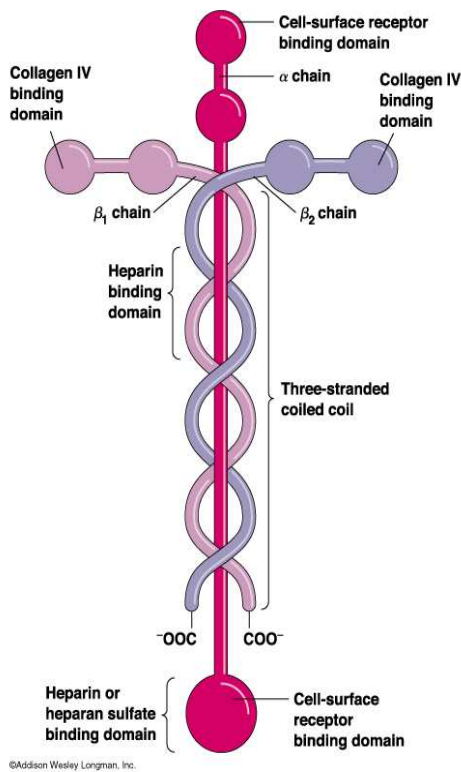


Abbildung 7: Aufbau von Laminin aus 3 Polypeptidketten. α -, β 1- und β 2-Kette sind spiralförmig umeinander gewunden. Außerdem sind die Bindungsdomänen für Kollagen, Heparin und Zelloberflächen-Rezeptoren zu erkennen.

Die Familie der Laminine besteht aus multifunktionellen Makromolekülen und stellt das am meisten vorkommende strukturgebende nicht-kollagene Glykoprotein dieser hochspezialisierten Extrazellulärmatrix dar. In den letzten Jahren sind im Rahmen von Studien der Basalmembran neben den Kollagenen auch zunehmend die Laminine auf ihre Verteilung und Funktion untersucht worden. Laminine spielen eine wichtige Rolle für zahlreiche zelluläre und biologische Prozesse wie Adhäsion, Migration, Chemotaxis, Proteinexpression, Signaltransduktion und zelluläre Entwicklung⁷⁰⁻⁷². Die Interaktion zwischen Zellen und Lamininen erfolgt durch eine Reihe unterschiedlicher Oberflächenrezeptoren wie den Integrinen, membrangebundenen Proteoglykanen und Glykoproteinen wie Dystroglykan^{71,73}. Die wichtigsten Domänen, die mit den zellulären Rezeptoren reagieren, befinden sich auf der α -Kette der Laminine, weshalb diese als der funktionell aktive Teil des Heterotrimer angesehen werden. Dies konnte in Studien, in denen α -Ketten inaktiviert wurden, und durch die Analyse genetischer Krankheiten bestätigt werden. So kommt es bei Elimination oder Mutation der α 2-Kette bei Mäusen und Menschen zu muskulärer Dystrophie⁷⁴, Elimination oder Mutation von α 3-Ketten zu Epidermolysis

bullosa⁷⁵, Elimination der α 4-Kette zu einem embryonalen Gefäßdefekt⁷⁶ und Elimination der α 5-Kette zu multiplen embryonalen Defekten und Tod durch Plazentadefekte⁷⁷. Außerdem gibt es Hinweise darauf, dass Laminin eine wichtige Rolle bei der Entstehung und Ausbreitung von Tumoren⁷⁸⁻⁸⁰ und der Entwicklung der Myokardhypertrophie und Herzinsuffizienz⁸¹ spielt. Für unsere Studie sind vor allem die Studien der α 4-Kette und α 5-Kette von Interesse, da diese beiden Isoformen in den Basalmembranen von Endothelien vorkommen.

Mehrere Krankheitsbilder gehen mit einer Zunahme im Lamininegehalt des betroffenen Organs einher: Myokardhypertrophie bei diabetischen Ratten⁸², alkoholassoziierte Lebererkrankungen⁸³ oder auch der M. Binswanger, eine obliterierende Mikroangiopathie der weißen Hirnsubstanz⁸⁴. Ebenso kommt es bei der akuten Vaskulopathie nach Transplantation zu einer Zunahme von Kollagen IV und Laminin in der EZM, während diese Bestandteile bei der chronischen Vaskulopathie mit Intimafibrose vermindert vorliegen. Der Zeitpunkt der Läsion scheint also eine wichtige Rolle zu spielen⁸⁵. Es gibt noch einige weitere Zustände, in denen es zu einem Verlust an Laminin kommt, wie zum Beispiel bei der akuten zerebralen Ischämie⁹ oder bei der physiologischen Alterung⁸⁶, die beide mit Verlust der mikrovaskulären Integrität einhergehen. Wie auch beim Kollagenabbau, scheinen bei den Lamininen das Plasmin-Plasminogen System⁸⁷ und die Metallomatrixproteasen, insbesondere MMP-9^{88,89}, an der Degradation und konsekutivem Hirnschaden beteiligt zu sein. Spezifische Antagonisten der Proteasen werden zurzeit als Erfolg versprechende Interventionsmöglichkeit beim Schlaganfall diskutiert.

Zurzeit sind 15 Isoformen der Laminine bekannt (s. Tab. 4). Für Endothelien sind dabei hauptsächlich Laminin 8 (α 4, β 1 und γ 1-Ketten) und Laminin 10 (α 5, β 1 und γ 1-Ketten) von Bedeutung, deren Expression jeweils vom Entwicklungszustand, dem Gefäßtyp und der Aktivität des Endothels abhängt^{90,91}. Laminin 8 wird von allen Endothelien unabhängig des Reifezustands exprimiert und kann durch Einfluss von proinflammatorischen Zytokinen (v.a. TNF- α) und Wachstumsfaktoren stark hochreguliert werden, wohingegen Laminin 10 sich erst 3-4 Wochen nach der Geburt hauptsächlich in endothelialen Basalmembranen von Kapillaren und Venolen nachweisen lässt⁵⁸. Vermehrte Expression von Laminin 10 lässt sich durch angiostatische Substanzen wie Progesteron erreichen, die offenbar auch für die Erhaltung des Endothelzell-Phänotyps notwendig sind⁹². Sowohl Laminin 8 als auch 10 scheinen eine wichtige Rolle für die Integrität der Blut-Hirn-Schranke zu spielen⁵⁴: Während

Laminin 8 einen permissiven Effekt auf die Migration von T-Zellen durch das Gefäßendothel hat, wirkt Laminin 10 inhibierend. Dies scheint sowohl über direkte Effekte auf die Leukozytenadhäsion als auch indirekte Effekte auf Endothel und Leukozyten zurückzuführen zu sein. Versuche an $\alpha 4$ knock-out Mäusen lassen vermuten, dass Laminin mit diesem Bestandteil vor allem als Modulator von Verzweigung und Reifung in embryonaler und pathologischer Angiogenese von Bedeutung ist^{76,93}. So kommt es beispielsweise in der Entwicklung von Mäusen, denen die $\alpha 4$ -Kette der Laminine fehlt, zu defekten Mikrogefäßen und fehlerhafter bzw. verspäteter Zusammensetzung von endothelialen Basalmembranen⁷⁶.

	Trimer	Vorkommen	Referenz
Laminin 1	$\alpha 1\beta 1\gamma 1$	Epithelien (Entwicklung)	Beck et al. 1990
Laminin 2	$\alpha 2\beta 1\gamma 1$	Muskelgewebe, periphere Nerven	Engvall et al. 1990
Laminin 3	$\alpha 1\beta 2\gamma 1$	Muskel-Sehnen Übergang	Engvall et al. 1990
Laminin 4	$\alpha 2\beta 2\gamma 1$	Neuromuskuläre Synapse, mesangiale Matrix des Glomerulus	Engvall et al. 1990
Laminin 5	$\alpha 3\beta 3\gamma 1$	Epidermis	Rousselle et al. 1991
Laminin 6	$\alpha 3\beta 1\gamma 1$	Epidermis	Marinkovich et al. 1992
Laminin 7	$\alpha 3\beta 2\gamma 1$	Epidermis	Champlaud et al. 1996
Laminin 8	$\alpha 4\beta 1\gamma 1$	Endothel, glatter Muskel, Fettgewebe, periphere Nerven	Miner et al. 1997
Laminin 9	$\alpha 4\beta 2\gamma 1$	Endothel, glatter Muskel, neuromuskuläre Synapse, mesangiale Matrix des Glomerulus	Miner et al. 1997
Laminin 10	$\alpha 5\beta 1\gamma 1$	Reifes Epithel, reifes Endothel, glatter Muskel	Miner et al. 1997
Laminin 11	$\alpha 5\beta 2\gamma 1$	Reifes Epithel, reifes Endothel, glatter Muskel, neuromuskuläre Synapse, glomeruläre Basalmembran	Miner et al. 1997
Laminin 12	$\alpha 2\beta 1\gamma 3$	Oberfläche von Zilienepithel	Koch et al. 1999
Laminin 13	$\alpha 3\beta 2\gamma 3$	ZNS	Burgeson et. al 1999
Laminin 14	$\alpha 4\beta 2\gamma 3$	ZNS	Burgeson et. al 1999
Laminin 15	$\alpha 5\beta 2\gamma 3$	ZNS	Burgeson et. al 2001

Tabelle 4: Familie der Laminine. Aufbau und Vorkommen

Während es im ersten Teil unserer Arbeit um die Auswirkungen von Hypertonie auf die Zusammensetzung der vaskulären Basalmembran am Beispiel von Kollagen Typ IV und Laminin geht, handelt es sich im zweiten Teil um die Folgen von Bluthochdruck auf die Neurone. Dazu wählten wir einen empfindlichen Marker für neuronale Schäden, das μ -Calpain, sowie sein Substrat MAP-2.

2.8 Calpain

Die Familie der Calpaine wurde erstmals 1964 von Guroff et al. im Rattenhirn beschrieben⁹⁴, anschließend in verschiedenen Spezies nachgewiesen⁹⁵ und 1991 im Rahmen der Internationalen Konferenz über intrazellulären Proteinkatabolismus schließlich mit dem Namen „Calpain“ versehen⁹⁶. Es handelt sich um neutrale Kalzium-abhängige Cystein Proteasen (= CANP), die intrazellulär liegen und im inaktivierten Zustand eine Kristallstruktur zeigen⁹⁷(s. Abb. 8).

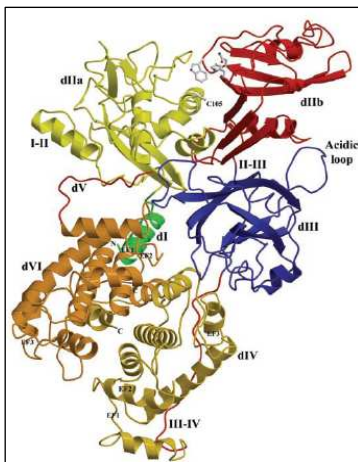


Abbildung 8:
Kristallstruktur der Calpaine
(hier: m-Calpain)

Calpaine kommen beim Menschen und auch beim Säuger ubiquitär vor, wobei einige Isoformen jedoch gewebsspezifisch zu finden sind^{98,99}. Zu unterscheiden sind Calpain I (= μ -Calpain) und Calpain II (= m-Calpain), die durch unterschiedlich hohe Calcium Konzentrationen aktiviert werden, gewebsspezifische Calpaine (= n-Calpaine) sowie einige Calpain-assoziierte Proteine in cDNA Form¹⁰⁰. Zurzeit kennt man 15 verschiedene Calpaine sowie 2 so genannte „Calpain Small Subunits“ (s. Tab. 5).

Calpain	Calpaingen	Andere Namen	EF-Hand	Gewebetyp	Spezies	Chromosom	Genbank
Calpain 1	capn1	μ -Calpain, CAPN1	+	Ubiquitär	Mensch	11q13	X04366
					Maus	19	NM_007600
					Ratte	NV	NM_019152
Calpain 2	capn2	m-Calpain, CAPN2	+	Ubiquitär	Mensch	1q41	NM_001748
					Maus	NV	NM_009794
					Ratte	NV	NM_017116
Calpain 3	capn3	nCL-1, p94, (Lp82, Lp85 Rt88)	+	Skelettmuskel, Augenlinse, Retina	Mensch	15q15.1	X85030
					Maus	2	NM_007601 AF091998
					Ratte	NV	NM_017117 U96367
Calpain 4	-	-	-	-	-	-	-
Calpain 5	capn5	htra3, nCL-3	-	Ubiquitär (v.a. im Kolon, Dünndarm und Testis)	Mensch	11q14	NM_004055
					Maus	7	NM_007602
					Ratte	NV	NV

Calpain 6	capn6	CAPNX, Calpamodulin	-	Plazenta?	Mensch	Xq28	NM_014289
					Maus	X	NM_007603
					Ratte	NV	AF067793
Calpain 7	capn7	palBH	-	Ubiquitär	Mensch	3p24-p25	AB028639
					Maus	NV	NM_009796
					Ratte	NV	NV
Calpain 8	capn8	nCL-2	+	Magenmukosa	Mensch	1q41	AA_043093^
					Maus	NV	NV
					Ratte	NV	D14479- D14480
Calpain 9	capn9	nCL-4	+	Verdauungstrakt	Mensch	1q42	NM_006615
					Maus	NV	U89513
					Ratte	NV	U89514
Calpain 10	capn10	CAPN10, CAPN8	-	Ubiquitär	Mensch	2q37.3	AF089088, AF089090-96
					Maus	NV	NM_011796 AF089089
					Ratte	NV	AF227909
Calpain 11	capn11	CAPN11	+	Testis	Mensch	6p12	AJ242832
					Maus	NV	NV
					Ratte	NV	NV
Calpain 12	capn12	CAPN12	+	Ubiquitär (v.a. im Haarfollikel)	Mensch	NV	NV
					Maus	19q13	AJ289241
					Ratte	NV	NV
Calpain 13	capn13	CAPN13	+	Testis/Lunge	Mensch	2p22.2-p22.3	(AC068689)
Calpain 14	capn14	CAPN14	-	Ubiquitär	Mensch	2p22.2-p22.3	(AC015980)
Calpain 15	capn15	Sol H	-	Ubiquitär	Mensch	16p13.3	U85647
					Maus	17A3.3	NM015830
					Ratte	NV	NV
Calpain Small Subunit 1	capn-s1 oder cpns1	CAPN4	+	Ubiquitär	Mensch	19q13.1	NM_001749
					Maus	NV	NM_009795
					Ratte	NV	RNU10861
Calpain Small Subunit 2	capn-s2 oder cpns2	-	+	NV	Mensch	16	AC026802
					Maus	NV	AK009171
					Ratte	NV	NV

Tabelle 5: Familie der Calpaine

NV = nicht verfügbar, EF-Hand: Kalzium-bindende Strukturen. Anmerkung: Es gibt kein Calpain 4. μ -Calpain = Protein-Heterodimer von Calpain 1 und einer kleinen Untereinheit. m-Calpain = Protein-Heterodimer von Calpain 2 Protein und einer kleinen Untereinheit

Die zwei wichtigsten Calpaingruppen, μ -Calpain und m-Calpain, bestehen aus einer schweren (80 kDa) Untereinheit mit vier Domänen und einer leichten (28 kDa – 30 kDa) Untereinheit mit zwei Domänen (s. Abb. 9). Die großen Untereinheiten der beiden Isoenzyme sind nicht identisch, sondern unterscheiden sich in der Zusammensetzung der Aminosäuren und der Proteasenstruktur. Das Molekulargewicht variiert somit um etwa 5 kDa¹⁰¹. Domäne I, die das N-terminale Ende der Protease beinhaltet, ist von Bedeutung für die Stabilität und Aktivierung der Calpaine. Sie wird bei Kalzium-induzierter Autolyse abgespalten (s.u.). Das katalytische Zentrum findet sich in der Domäne 2 der schweren Untereinheit¹⁰², die Papain-ähnlichen Cysteinproteasen ähnelt. Domäne IV, die das carboxyterminale Ende des Proteins beinhaltet, hat Ähnlichkeit mit dem Kalzium-bindenden Protein Calmodulin und zählt zu den Kalzium-bindenden Domänen der Calpaine. Domäne IV interagiert mit Domäne II und

hemmt in Abwesenheit von Kalzium die intrinsische Proteasenaktivität. Durch die Bindung von Kalzium an die Domäne IV kommt es zu einer Konformationsänderung, wodurch die Protease aktiviert wird. Domäne III gilt ebenfalls als Calmodulin-ähnliche Domäne, kann Kalzium und Phospholipide binden¹⁰³ und reagiert mit der Ca²⁺-gebundenen Domäne IV und/oder Domäne VI. Durch diese Interaktion wird das aktive Zentrum der Domäne II freigelegt und ihre proteolytische Funktion ermöglicht. Die leichte Untereinheit von μ -Calpain und m-Calpain ist identisch und nimmt vornehmlich regulatorische Funktionen wahr. Die N-terminale, hydrophobe Domäne V besteht aus Glycinresten und hat Bedeutung für die Membranbindung und die Interaktion mit Phospholipiden. Domäne VI hat Ähnlichkeit mit dem carboxyterminalen Ende der großen Untereinheit und zählt daher ebenso zu den calmodulinähnlichen, Kalzium-bindenden Domänen. Sowohl Domäne IV als auch VI besitzen vier Regionen, in denen Calcium gebunden werden kann, die so genannten EF-Hände. Eine fünfte EF-Hand, die 1997 von Lin et al.⁴ zum ersten Mal beschrieben wurde und Kalzium nicht binden kann, ist wahrscheinlich von Bedeutung für die Bindung zwischen der großen und kleinen Untereinheit.

μ -Calpain und m-Calpain werden durch unterschiedlich hohe Kalziumkonzentrationen aktiviert: Während μ -Calpain schon bei 10–50 μ M seine halbmaximalen Aktivität erreicht und somit eine relativ hohe Affinität zu Kalzium aufweist, benötigt m-Calpain dazu etwa 400–800 μ M. Keines der Isoenzyme zeigt in Abwesenheit von Kalzium eine messbare Aktivität¹⁰⁴.

Ein weiterer Unterschied von μ -Calpain und m-Calpain ist das Verteilungsmuster im ZNS: So findet sich μ -Calpain vorwiegend im Zellkern und in den Dendriten, wohingegen m-Calpain in den Axonen vorkommt.

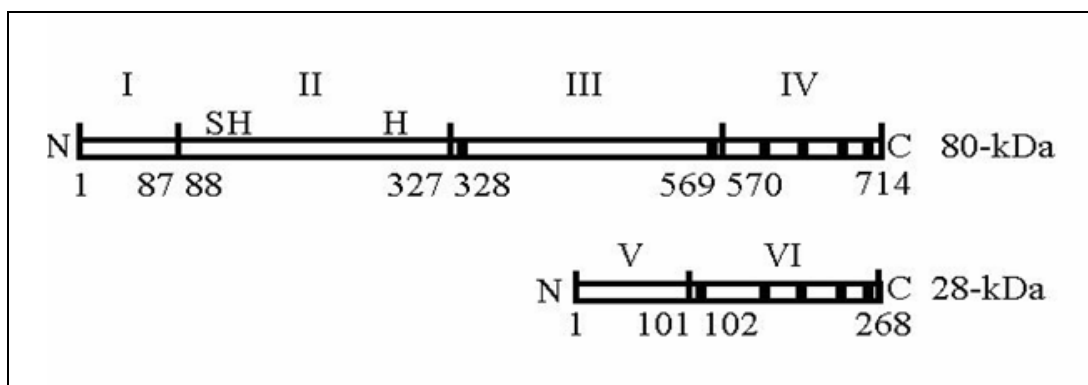


Abbildung 9: Calpainaufbau. μ -Calpain und m-Calpain bestehen aus einer schweren (80 kDa) Untereinheit mit vier Domänen und einer leichten (28 kDa) Untereinheit mit zwei Domänen. Hier dargestellt: μ -Calpain.

Calpaine haben als Substrat verschiedene Enzyme, Rezeptorproteine und regulatorische Proteine der Membran und des Zytoskeletts. Dazu gehören Spektrin, Fodrin, Ankyrin, tau-Protein, Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2 (MAP2, s. unten) und Protein-Kinase 2¹⁰¹. Der endogene Gegenspieler der Calpaine ist das Calpastatin.

Die Calpainaktivierung wird über eine Zunahme der intrazellulären Kalziumkonzentration vermittelt^{105,106}, welche zu einer Konformationsänderung der Protease führt und dadurch das katalytische Zentrum freilegt¹⁰⁷. Obwohl die zentrale Rolle des Kalziums unumstritten ist, konnte noch nicht genau geklärt werden, wie die Calpainaktivität reguliert wird: Die Kalziumkonzentrationen, die beispielsweise zur Aktivierung von μ -Calpain oder m-Calpain notwendig sind, würden auch ohne Calpainaktivierung zum sofortigen Zelltod führen. Man geht daher davon aus, dass es Mechanismen gibt, die den Kalziumbedarf der Calpaine herabsetzen, wobei vor allem zwei Thesen wahrscheinlich erscheinen: 1) Es ist möglich, auch mit geringeren Kalziumkonzentrationen eine Calpainautolyse zu induzieren, wobei die autolytierten Enzyme allerdings bei einer physiologischen Kalziumkonzentration aktiv sein müssten, und 2) es gibt andere Zellmoleküle, die mit den Calpainen interagieren und dadurch den zur Aktivierung notwendigen Kalziumgehalt reduzieren¹⁰⁰. Für die zweite These sprechen Studien wie beispielsweise die von Saido et al., die einen Zusammenhang von Calpainaktivität und dem Vorhandensein von Phosphatidylinositolphosphat (PIP) aufzeigt¹⁰⁸. Suzuki et al. stellten 1995 ein mögliches Modell zur Calpainaktivierung vor (s. Abb. 10). Darin werden zwei unterschiedliche Wege zur Aktivierung vorgestellt, deren einer über die Kalzium-aktivierte Dissoziation der 30K und 80K Untereinheiten abläuft, während es bei dem anderen zunächst zur Autolyse der Untereinheiten und erst anschließend zur Dissoziation kommt.

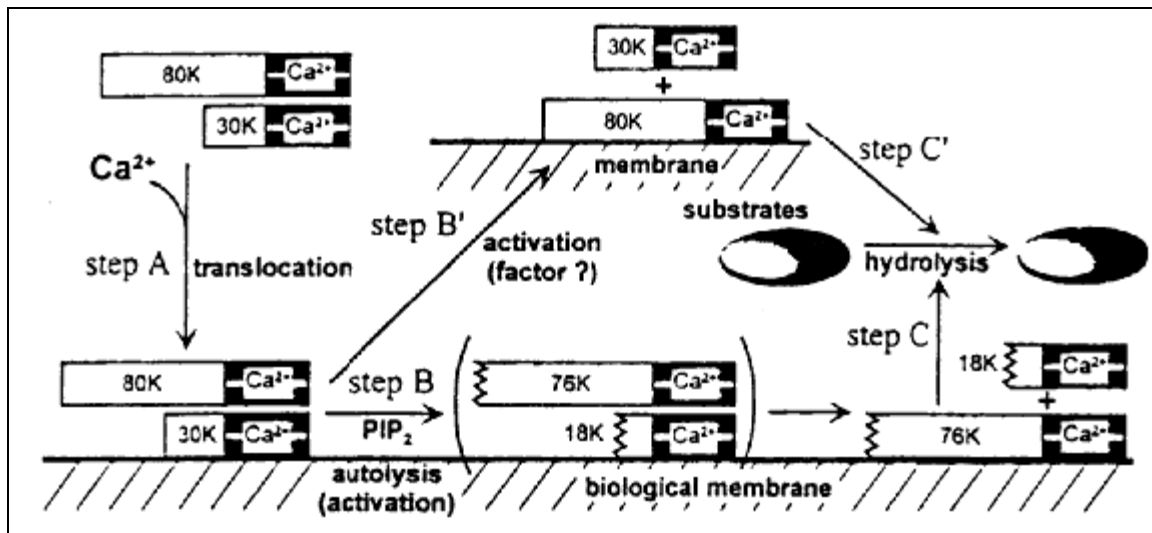


Abbildung 10: Calpainaktivierung an der biologischen Membran¹⁰⁹.

Kalzium bindet an das im Zytosol vorhandene Calpain. Dadurch kommt es zu einer Konformationsänderung der Protease, hydrophobe Regionen werden freigelegt und Calpain kann an die Phospholipidmembran wandern. Die Wanderung an die Phospholipidmembran ist der erste wichtige Schritt in der Aktivierungskaskade von Calpain (Step A). An der Membran bindet Calpain an vorhandene Calpainsubstrate oder an Aktivierungsfaktoren. Der weitere Aktivierungsweg ist entweder über eine Autolyse (Step B) mit nachfolgender Dissoziation der Untereinheiten (Step C) oder über eine Dissoziation der Untereinheiten allein zu erklären (Step B', Step C'). Eine erste Möglichkeit der weiteren Aktivierung läuft folgendermaßen ab: An der Membran findet zunächst eine Autolyse von Calpain statt (Step B). Durch die Abspaltung der Domäne I entsteht aus der 80K-Untereinheit eine 76K-Untereinheit, durch die Abspaltung der Domäne V aus der 30K-Untereinheit eine 18K-Untereinheit. Die Spaltung der Domäne I ist der entscheidende Vorgang, der die benötigte Kalziummenge für die weitere Calpainaktivität reduziert. Bevor Calpain proteolytisch aktiv wird (Step C), dissoziieren die autolysierten Untereinheiten 76K und 18K. Diese Dissoziation ist ein irreversibler Prozess und findet nur bei Vorhandensein von Phospholipiden und Kalzium statt. Der zweite Aktivierungsweg ist unabhängig von der Autolyse. Es kommt zu einer reversiblen Dissoziation der katalytischen 80K-Untereinheit und der regulatorischen 30K-Untereinheit (Step B'), wobei der Einfluss von Aktivierungsfaktoren noch diskutiert wird. Die Kalziumaffinität der katalytischen 80K-Untereinheit ist viel höher als die Kalziumaffinität des Gesamtcalpains.

Nakagawa et al. hingegen zeigte, dass eine Autolyse der Untereinheiten zwar notwendig für die Dissoziation ist, diese Dissoziation aber erst nach der Aktivierung stattfindet und somit nicht für diese notwendig ist¹¹⁰.

Zum nicht-autolytischen Weg konnte Suzukis Arbeitsgruppe 2004 neue Erkenntnisse vorstellen¹¹¹ (s. Abb. 11): Diese besagen, dass Kalzium und Phospholipide eine Konformationsänderung der Protease bewirken, dadurch die Domänen IIa und IIb ein katalytisches Zentrum ausbilden und es zur Dissoziation der Untereinheiten kommt.

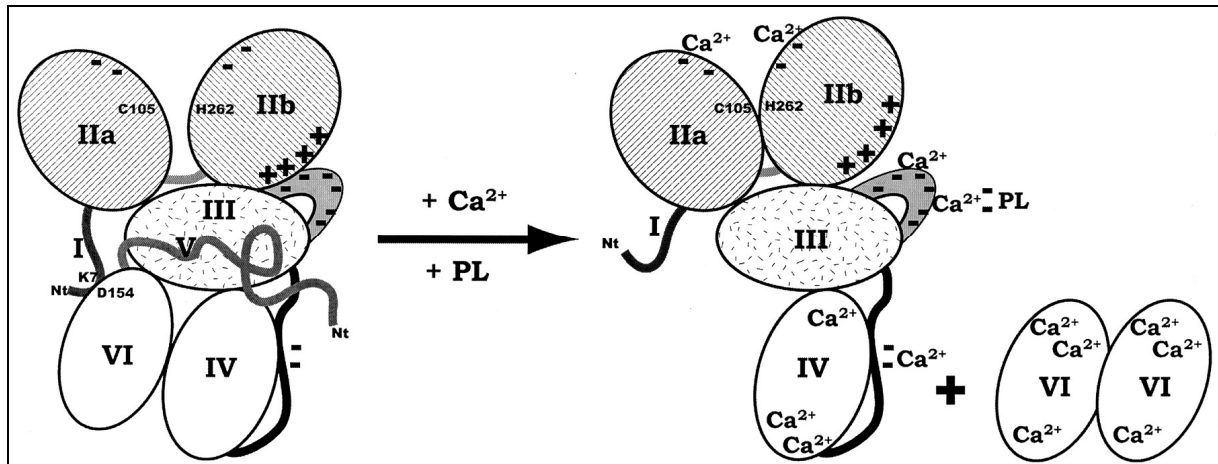


Abbildung 11: Calpainaktivierung durch Kalzium.

Das Binden von Kalzium und Phospholipiden (PL) an m-Calpain induziert eine Konformationsänderung, durch die die Domänen IIa und IIb näher zueinander gebracht werden und dadurch ein funktionell katalytisches Zentrum bilden. Dies führt zu einer Dissoziation der 30K Untereinheit von der 80K Untereinheit, was in einer 30K Homodimer Formation resultiert.

m-Calpain besitzt mindestens drei verschiedene Kalzium-bindende Regionen, zwei Calmodulin-ähnliche EF-Hände in den Domänen IV und VI, ein saure Schleife in Domäne III und zwei Kalzium-bindende nicht-EF-Hände in IIa und IIb.

C105 und H262 sind katalytische Residuen. K7 und D154 bilden in der Abwesenheit von Kalzium Ionen eine Salzbrücke. Nt = N-terminales Ende, + bzw. - = basische bzw. saure Aminosäurereste zur Bindung von Kalzium-Ionen

Da die genauen Mechanismen der Calpainaktivierung noch immer unklar sind, konnte auch noch nicht geklärt werden, was der Einstrom von freiem Kalzium in die Zelle letztendlich bewirkt. Die Kenntnis, dass der Kalziumeinstrom im Gehirn hauptsächlich über eine Überaktivierung der NMDA- und Glutamat-Rezeptoren erfolgt^{112,113}, wird in nächster Zeit vielleicht auch zu weiteren Einsichten in die Regulation der Calpainaktivierung führen.

Calpaine erfüllen vielfältige Aufgaben im Organismus: Sie spielen eine wichtige Rolle bei Zellproliferation und Gewebedifferenzierung^{114,115}, sind beteiligt an der Reorganisation des Zytoskeletts während der Wundheilung¹¹⁶ sowie der Zellmigration¹¹⁷, wobei der Prozessierung von Aktin eine zentrale Bedeutung zukommt (s. Abb. 9). Außerdem sind sie mit der Vermittlung des apoptotischen Zelltods einiger Zellen assoziiert^{118,119}. Ein Zusammenhang zwischen einer Malfunktion von Calpain 9 und Magenkarzinom, Calpain 3a und Muskeldystrophie Typ 2a (= Gliedergürteltyp) sowie Calpain 10 und Diabetes mellitus Typ II konnte in den letzten Jahren bestätigt werden^{120,121}. Auch bei der Entstehung und Ausdehnung von Myokardinfarkten wurde mittlerweile ein Einfluss der Calpaine geltend gemacht¹²².

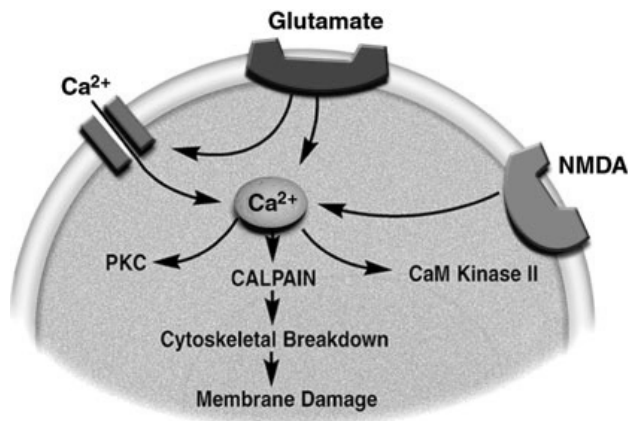


Abbildung 12: Aktivierung der Calpaine im Gehirn. Der Kalziumeinstrom wird durch NMDA-, Glutamat- und Kalziumrezeptoren vermittelt und führt zum proteolytischen Abbau des Zytoskeletts und Membranschäden.

In vielen Studien konnte gezeigt werden, dass Calpaine, vermittelt durch die Kalziumhomöostase, einen wichtigen Einfluss auf die Hirnfunktion haben. So geht man heute davon aus, dass sie zur Langzeitpotenzierung^{123,124} beitragen, einen Faktor in der Pathogenese der Multiplen

Sklerose¹²⁵ und neurodegenerativer Erkrankungen wie dem M. Alzheimer¹²⁶ und dem M. Parkinson¹²⁷ darstellen und entscheidend an der Ausprägung von

Schlaganfall und Hirntrauma mitwirken¹⁰⁰. Sowohl bei globaler^{112,128} als auch bei fokaler Hirnischämie^{13,129}, der Sinusvenenthrombose¹³⁰, dem traumatischen Hirnschaden^{131,132} und dem traumatischen Rückenmarkschaden¹³³ kommt es zu einer Aktivierung bzw. vermehrten Expression von Calpainen und protrahiertem, vermehrtem Abbau ihrer Substrate wie Fodrin, Spektrin und MAP-2^{129,134}. Dieser Mechanismus geht dem neuronalen Zelltod voran und scheint mit einem Kalziumeinstrom über die Glutamat- und NMDA-Rezeptoren assoziiert zu sein^{112,135} (s. Abb. 12). Im Tierexperiment konnte beispielsweise ein Abbau von MAP-2 und α -Spektrin schon nach 5¹³⁶ bzw. 60 Minuten¹²⁹ experimenteller Ischämie nachgewiesen werden, was die Calpaine und ihre Substrate zu sehr frühen Markern einer neuronalen Verletzung macht. Der Gewebeschaden scheint bei besonders vulnerablen Neuronen (z.B. CA1 Bereich des Hippocampus) zu beginnen, zur dendritischen Fragmentierung und Aktivierung von Calpainen in den Somata zu führen¹²⁹ und letztendlich den Zelltod durch Apoptose bzw. Nekrose auszulösen¹³⁷. Zeitlich gesehen spielen die Calpaine vor allem in der frühen Induktionsphase und in der späten Exekutionsphase des ischämischen Zelltods eine Rolle¹³⁸. Der geschilderte Ablauf wird durch die μ -Calpain induzierte Aktivierung der Cysteineprotease Caspase-3 und der lysosomalen Protease Cathepsin B unterstützt^{137,139}. Was die Isoformen angeht, werden sowohl μ -Calpain als auch m-Calpain beim traumatischen Hirnschaden vermehrt detektiert¹⁴⁰, wobei die vermehrte Aktivierung jedoch nicht nur auf die Seite der Läsion und damit den Bereich des Zelluntergangs beschränkt ist, sondern auch in primär nicht geschädigten Gebieten nachgewiesen werden kann und somit eine generalisierte Reaktion auf Hirnschaden darstellen mag. Letztere Beobachtung wird noch kontrovers diskutiert und konnte von einigen Arbeitsgruppen bestätigt^{136,141}, von anderen widerlegt werden¹³¹. Während in den meisten Studien davon ausgegangen wird, dass Calpaine

hauptsächlich für die Induktion von Apoptose bzw. Nekrose neuronaler Zellen verantwortlich zu machen sind, gibt es auch Ansätze, die den regulatorischen Aspekt hervorheben: Faddis et al. wiesen nach, dass es bei einem sublethalen Schaden von Neuronen zwar zu vermehrter Calpainexpression kommt, dies aber eher einem dendritischen Remodelling als einem bevorstehenden Zelltod zuzuschreiben ist¹⁴². Eine Calpainaktivierung muss also nicht unbedingt einen schädlichen Einfluss auf Zellen ausüben, sondern kann ebenso ein Indiz für die Erholung von Neuronen sein.

Verschiedene Substanzen können über das Calpain-Calpastatin-Caspase System neuroprotektive Wirkungen entfalten und wurden daher in den letzten Jahren zunehmend experimentell eingesetzt¹⁴³. Es wird inzwischen vermutet, dass nicht die Protease Calpain an sich zellschädigend wirkt, sondern sie lediglich als Mediator des pathologischen Prozesses fungiert⁹⁹. Die Größe der Fläche, in der beim ischämischen Infarkt oder traumatischen Hirnschaden Substrat abgebaut wird, kann durch verschiedene synthetische Calpain Inhibitoren wie z.B. CX295, A275 oder A295^{129,137} vermindert bzw. neuronale Strukturen vor dem Abbau geschützt werden¹³². Ebenso kann die Gabe eines solchen Inhibitors tierexperimentell zu verbesserten motorischen und kognitiven posttraumatischen Funktionen führen¹⁴⁴. Auch die Applikation eines Caspase-3 Inhibitors (wie z-DEVD-fmk)^{145,146} bzw. Cathepsin B oder L Inhibitors (wie CA-074 und E-64c)^{135,147} hat einen protektiven Effekt auf das Hirngewebe, was auf die enge Verknüpfung der Protease-Systeme hinweist. Alle diese Schutzmechanismen stellen möglicherweise eine zukünftige therapeutische Intervention beim akuten Hirnschaden in Aussicht. Auch eine topische Applikation zur Verminderung des postoperativen Hirnschadens wird diskutiert¹³⁶.

Der physiologische Gegenspieler der Calpaine, das Calpastatin, wird in ischämischen Hirnarealen zu einem membrangebundenen 50 kDa Polypeptid abgebaut, in unbeschädigten Arealen hingegen hochreguliert¹⁴⁸. Eine Neuroprotektion über dieses System wird beispielsweise durch die Applikation eines β -2-Rezeptoragonisten wie Clenbuterol erreicht, was eine Hochregulation der Calpastatinexpression zur Folge hat¹⁴⁹.

Noch ist nur wenig über die genaue Funktion der Calpaine im Hirngewebe bekannt, doch die Bedeutung für vielfältige pathologische Hirnprozesse und -strukturen ist offensichtlich. In unserer Arbeit wollten wir deshalb untersuchen, wie sich chronische Hypertonie auf die Calpainaktivität neuronaler Strukturen auswirkt und ob sich durch die Behandlung mit einem ACE-Hemmer Unterschiede in der Aktivität ergeben.

2.8.1 Mikrotubulus-assoziiertes Protein 2

Das Mikrotubulus-assoziierte Protein (MAP) gehört zu den Proteinen des Zytoskeletts und ist essentiell für die mikrotubuläre Stabilität und neuronale Plastizität. Gemeinsam mit Tubulin bildet es die grundlegende Struktur der Mikrotubuli. Bislang konnten durch Protein-Trennverfahren zwei unterschiedliche MAPs nachgewiesen werden, das so genannte MAP-1 und MAP-2. MAP-2, ein 280 kD schweres Protein, findet sich in hoher Konzentration in neuronalen Somata und Dendriten, wohingegen es in den Axonen kaum vorkommt¹⁵⁰. Es gibt mindestens 3 verschiedene Isoformen des MAP-2, die vom Entwicklungszustand des Hirns abhängen^{40,151}. Der Abbau von MAP-2 erfolgt durch kalziumabhängige Dephosphorylierung und anschließende Spaltung durch Vertreter der Familie der Cystein-Proteasen (= Calpaine). Umgekehrt kann die Degradationsrate durch Phosphorylierung des Substrats vermindert werden. Generell gilt, dass die Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung von MAP-2 die Assoziation mit den Mikrotubuli bestimmt und dieser Prozess altersabhängig ist^{152,153}. In vitro wird MAP-2 von Kinasen wie cAMP-abhängigen Kinasen, Kalzium-abhängigen Kinasen und Proteinkinase C phosphoryliert.

MAP-2 gilt als eines der Calpain-sensitivsten Proteine, reagiert sehr empfindlich auf neuronale Schäden und kann daher gut als früher Marker herangezogen werden^{12,100}. Tierexperimentell ließ sich ein Verlust von MAP-2 schon nach 3 Minuten andauernder, einseitiger Okklusion der A. carotis communis nachweisen, wobei die Demarkierung zunächst in ipsilateralen hippocampalen Dendriten, im Verlauf jedoch auch in weiteren Teilen des Hippocampus und im Kortex nachweisbar war¹⁵⁴. Interessanterweise fanden Huh et al. in ihrer Studie Hinweise darauf, dass der Verlust von MAP-2 nicht unbedingt als Anzeichen für einen bevorstehenden Zelltod, sondern ebenso gut als Zeichen für zelluläre Reparaturmechanismen zu werten ist¹⁵⁵. Weitere Untersuchungen dazu werden vielleicht neue wichtige Erkenntnisse zur biologischen Funktion von MAP-2 und seinen Abbau durch Calpaine bringen.

Zusammenfassend verfolgen wir in dieser Arbeit folgende Ziele:

- 1) Im ersten Teil der Arbeit sollen die Auswirkungen chronischer Hypertonie auf zerebrale, mikrovaskuläre Strukturen dargestellt werden. Dazu wählten wir zwei wichtige Marker der Basalmembran, Kollagen Typ IV und Laminin.

- 2) Der zweite Teil der Arbeit befasst sich mit den Folgen, die ein chronisch erhöhter Blutdruck und auch mögliche mikrovaskuläre Veränderungen auf die Neurone haben können. Ein geeigneter Marker hierzu ist das μ -Calpain sowie sein Substrat MAP-2.
- 3) Anhand der Ergebnisse in den verschiedenen Versuchsgruppen soll darüber diskutiert werden, ob ACE-Hemmer einen protektiven Effekt auf zerebrale Strukturen ausüben.

3. Methoden und Experimente

3.1 Tiermodell

Die Tierversuche wurden von der Geburt der Tiere bis zur Hirnentnahme mit freundlicher Unterstützung von PD Dr. Linz der Firma Hoechst (Sanofi-Aventis) durchgeführt.

12 spontan hypertensive Wistar Ratten (SHR-SP, Møllegaard Dänemark) wurden gleich nach der Geburt in zwei Gruppen aufgeteilt: Jeweils 6 von ihnen erhielten 6 Monate lang entweder Ramipril oder Placebo in einer Dosierung von 1mg/kg KG/Tag mit dem Trinkwasser. Dieses stand ihnen ad libitum zur Verfügung. Um mögliche andere Einflussgrößen auf die Ergebnisse weitestgehend auszuschließen, wurden sie ansonsten unter gleichen Bedingungen bezüglich Temperatur, Feuchtigkeit, Nahrungsangebot und Licht großgezogen. Den Versuchsgruppen wurden 5 normotensive Wistar Ratten als Kontrolle gegenübergestellt. Nach 6 Monaten unterschied sich der systolische Blutdruck der einzelnen Gruppen deutlich: Bei den unbehandelten SHR-SP betrug er im Durchschnitt 170mmHg, bei den Ramipril-behandelten Tieren und in der Kontrollgruppe im Schnitt 120mmHg. Im Alter von 6 Monaten wurden die Tiere mit Trapanal narkotisiert und intrakardial perfundiert, die Gehirne zur weiteren Aufarbeitung entnommen und bei -80° Celsius tiefgefroren. In diesem Zustand wurden die Gehirne unserer Arbeitsgruppe zugeführt.

Nach üblicher Kryofixation wurden bei einer Kammertemperatur von -20° Celsius 10µm dicke Präparate geschnitten, wobei im anterioren und posterioren Teil des Gehirns alle 500µm 5 Koronarschnitte und zusätzlich im medialen Anteil 100 Koronarschnitte angefertigt wurden. Durch die Schnitttechnik konnte sichergestellt werden, dass im medialen Hirnanteil in der Aufarbeitung sowohl eine Aussage über Kortexareale als auch Basalganglien möglich ist. Die Gefrierschnitte wurden auf Objektträger übertragen und bis zur Verarbeitung bei -80° Celsius aufbewahrt.

Alle Versuche fanden unter Zustimmung des Deutschen Tierschutzgesetzes statt.

3.2 Immunhistochemie

3.2.1 Methoden

Seit Anfang der 40er Jahre¹⁵⁶ wird die Immunhistochemie erfolgreich zum spezifischen Nachweis zellulärer und extrazellulärer Antigene durch Antigen-Antikörper (= AG-AK-)

Reaktion eingesetzt und zählt heute zu den zentralen Methoden der modernen histopathologischen Diagnostik und Forschung. Proteine, Polysaccharide und andere Strukturen, gegen die Antikörper gebildet werden können, können auf diese Art spezifisch nachgewiesen und lokalisiert werden. Aus Körperflüssigkeiten (z.B. Aszites) oder in-vitro (Zellkultur) gewonnen, lassen sich diese Antikörper in verschiedenen Untersuchungsverfahren zum Nachweis der von ihnen erkannten Antigene einsetzen. Dadurch kann die konventionell-histologische Analyse von Differenzierungsmustern um die Ermittlung von Expressionsmustern ergänzt werden.

Der Organismus kann sich gegen eingedrungene Fremdstoffen durch die Bildung von Antikörpern zur Wehr setzen, was als spezifische humorale Immunität im Gegensatz zur relativ unspezifischen zellulären Immunität bezeichnet wird. Substanzen, die im Organismus eine Immunreaktion hervorrufen können, werden als Antigene bezeichnet. Dazu gehören beim Menschen Proteine, Oligopeptide, Polysaccharide und Lipide. Die molekularen Strukturen eines Antigens, die von einem Antikörper erkannt werden können, werden als antigene Determinanten oder Epitope bezeichnet, wobei die Anzahl der verschiedenen Epitope die Spezifität des Antigens bestimmt. Bei der Antigen-Antikörper Reaktion werden die Epitope eines Antigens mit Antikörpern besetzt und das Antigen dadurch unschädlich gemacht.

Antikörper gehören zur Proteinfamilie der Immunglobuline, die in der Serumelektrophorese in der γ -Globulinfraktion wandern. Produziert werden sie im Rahmen der humoralen Immunantwort von aktivierten Plasmazellen, finden sich jedoch auch auf der Oberfläche von B-Lymphozyten. Die Einteilung in 5 Klassen erfolgt hinsichtlich Größe, Molekulargewicht, Struktur und Funktion in Immunglobulin G (IgG), IgA, IgM, IgD und IgE (geordnet nach abnehmender Quantität im Plasma). Am Anfang einer Immunreaktion dominieren Antikörper der Klasse IgM, später meist solche der Klasse IgG. Für immunhistologische Färbungen werden vorwiegend Antikörper der Klasse IgG eingesetzt.

In der Immunhistochemie unterscheidet man 2 Arten von Antikörpern: polyklonale und monoklonale Antikörper.

3.2.1.1 Polyklonale Antikörper

Bei der physiologisch vorkommenden Immunantwort auf ein in den Organismus eingedrungenes Antigen produzieren B-Zellklone mehrere verschiedene Antikörper, was als „polyklonal“ bezeichnet wird. Die Antikörper sind dazu in der Lage, an unterschiedliche Epitope der Antigene zu binden. Für die Immunhistochemie lassen sich solcherlei polyklonale AK gut von Spezies wie der Maus, Kaninchen, Ziege, Schwein, Esel, Schaf, Pferd, Meerschweinchen oder Hamster gewinnen. Jedes Tier besitzt allerdings eine Reihe spontan entstandener AK, die Störfaktoren bei der immunchemischen Reaktion darstellen können. Der Vorteil polyklonaler AK besteht darin, dass ein AG trotz leichter Veränderungen durch z.B. Polymorphismen oder Glykolysierung aufgrund der Vielfalt an AK, die verschiedene Epitope erkennen können, weiterhin gebunden werden kann. Auch werden sie häufig benutzt, wenn es darum geht, in einer noch ungetesteten Spezies ein unbekanntes AG nachzuweisen. Der Nachteil wiederum besteht in ihrem breiten Reaktionsspektrum, welches zu Kreuzreaktionen, d.h. Bindung eines AK an verschiedene AG mit ähnlichen Epitopen, führen kann.

3.2.1.2 Monoklonale Antikörper

Monoklonale Antikörper werden aus so genannten Hybridomazellen gewonnen. Dazu werden Plasmazellen mit Zellen eines unbegrenzt teilungsfähigen Plasmazelltumors, eines Plasmozytoms, fusioniert, wodurch die resultierenden Hybridome die Wachstumseigenschaften von Tumorzellen und die Spezifität von antikörperbildenden Zellen, die nur einen einzigen ganz spezifischen Antikörper bilden, vereinen.

Die Produktion der AK erfolgt entweder in der Zellkultur oder in Tieren. Vorteile der monoklonalen AK sind die Möglichkeit eines praktisch unbegrenzten Nachschubs, die hohe Standardisierung und ihre hohe und enge Spezifität, welche zu einer vergleichsweise geringen Hintergrundfärbung führt, außerdem wegen ihrer Homogenität die gute Reproduzierbarkeit von Ergebnissen unter standardisierten Versuchsbedingungen. Nachteilig erweist sich hingegen eine teilweise geringe Stabilität und eine für einige Nachweismethoden zu enge Spezifität.

3.2.1.3 Immunhistochemische Färbemethoden

Immunhistochemische Techniken werden häufig in Diagnostik und Forschung angewandt und dienen dazu, antigene Komponenten in Zellen und Gewebsschnitten im mikroskopischen Bild nachzuweisen. Das Grundprinzip basiert darauf, die gesuchten Antigene mithilfe von spezifischen AK zu binden und diese wiederum durch Markersubstanzen wie

Fluoreszenzfarbstoffe, Enzyme, partikuläres Material (z.B. Goldpartikel) oder radioaktive Isotope sichtbar zu machen. Wesentliche Voraussetzungen für die Aussagekraft der Methode sind die Spezifität der verwendeten AK und die Stabilität der nachzuweisenden antigenen Determinanten. Ein negativer Ausfall der Reaktion beweist daher nicht unbedingt das Fehlen des Antigens.

In dieser Arbeit werden als Markersubstanzen Fluoreszenzfarbstoffe (= Fluorochrome) und Enzyme verwendet.

Fluoreszenzfarbstoffe in Form von Fluoresceinisothiocyanat (FITC) und Tetramethylrhodamin-Isouthiocyanat (TRITC), aber auch Cy2 und Cy3, werden bevorzugt als Marker an Antikörper gekoppelt. Bei Anregung im UV-Licht oder bei Blau-Anregung mit entsprechenden Anregungs- und Sperrfiltern kommt es zu einer gelbgrünen (FITC, Cy2) oder roten (TRITC, Cy3) Fluoreszenz. Die in dieser Arbeit verwendeten Cyanine sind Cy2 und Cy3 (s. auch Abb. 13).

Cy2: Dieses grün fluoreszierende Carbocyanin ist dem klassischen Label Fluorescein und DTAF (Dichlortriazinylaminofluorescein) in wesentlichen Parametern deutlich überlegen. Das betrifft vor allem die Leuchtintensität von Cy2, die Langzeitstabilität dieses Fluorophors nach Einbettung gefärbten Gewebes in organische Medien sowie die geringe Tendenz von Cy2, beim Fotografieren auszubleichen. Mit einem Exzitationsmaximum bei 490nm und einem Emissionsmaximum bei 508nm weist Cy2 ähnliche Spektraleigenschaften wie Fluorescein auf und ist mit üblichen FITC-Filtern kompatibel.

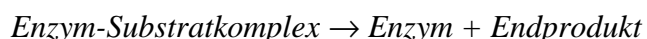
Cy3: Im Vergleich zu den klassischen Fluoreszenzfarbstoffen wie Tetramethylrhodamin und Texas Red erweist sich das rot fluoreszierende Carbocyanin 3 (Cy3) als extrem leuchtintensiv und photostabil. Die relativ hydrophilen Cy3 konjugierten Nachweisreagenzien zeigen kaum unspezifische Bindungen an biologisches Gewebe. Da Cy3 ein Exzitationsmaximum von 550nm aufweist und sein Emissionsmaximum bei 570nm liegt, kann die Untersuchung Cy3-markierter Präparate ohne apparativen Mehraufwand mit einem konventionellen Rhodaminfilter am Fluoreszenzmikroskop erfolgen. Alternativ ist die Analyse von Cy3-Markierungen am konfokalen Laser-Raster-Mikroskop möglich, die sowohl nach Anregung mit einem Argonlaser (bei 514 oder 528nm) als auch mit einem Helium- Neon-Laser (bei 543nm) erfolgen kann. Bei Aufbewahrung Cy3-gefärbter Präparate in geeigneten organischen Eindeckmedien, bei Dunkelheit und 4° Celsius bleibt die Intensität oft jahrelang erhalten.

Fluorochrom	AMCA	Cy2	DTAF	FITC	TRITC	Cy3	Texas Red	Rhodamine Red-X	Cy5
Exzitationsmaximum (Wellenlänge in nm)	347	490	495	495	520 / 554	553	558 / 594	570	651
Emissionsmaximum (Wellenlänge in nm)	456	508	528	528	582	575	623	590	674

Abbildung 13: Extinktions- und Emissionsmaxima der wichtigsten Fluorochrome

Ein optimales Verhältnis von Fluoreszein, Protein und AK ist notwendig, um eine geringe unspezifische Hintergrundfärbung bei bestmöglicher Intensität der spezifischen Fluoreszenz zu erreichen. Die Konjugation eines Fluorochroms mit einem AK über eine chemische Bindungsreaktion kann eventuell die AK-Struktur und damit die Immunreaktivität beeinflussen. Der Vorteil der Fluoreszenzmethode liegt in ihrer schnellen und einfachen Durchführbarkeit. Von Nachteil sind hingegen die Instabilität der Fluoreszenzfarbstoffe, was sich in einer raschen Abnahme der Fluoreszenz äußert, und die oftmals erschwerte Durchführung an anderen Geweben außer Gefrierschnitten. Auch bereiten die Interpretation der Befunde und die Zuordnung zu bestimmten Gewebsstrukturen häufig Probleme.

Als Enzyme finden bei immunhistochemischen Färbemethoden hauptsächlich Meerrettich-Peroxidase¹⁵⁷ und alkalische Phosphatase¹⁵⁸ Verwendung. Die Methode basiert auf dem Prinzip, dass ein farbloses Chromogen mithilfe eines AK-gekoppelten Enzyms in ein farbiges Enzymprodukt umgewandelt wird. Die Reaktion verläuft in 2 Schritten:



Enzyme können die 10 000 bis 1 000 000fache Menge an Substrat pro Minute umsetzen, so dass die Methode eine hohe Empfindlichkeit erreicht. Die enzymatische Aktivität ist abhängig von der Konzentration von Enzym und Substrat, dem pH-Wert, der Ionenkonzentration des Puffermilieus sowie der Temperatur und dem Lichteinfall. Die Intensität einer immunhistochemischen Färbung hängt stark von seiner Enzymaktivität ab, was bedeutet, dass durch eine erhöhte Anzahl an gebundenen Enzymmolekülen im Gewebe eine bessere Sensitivität erreicht werden kann.

Peroxidase ist aus einer Reihe von Gründen besonders gut für die Enzymmethode geeignet: Das Molekül ist klein, stabil und behindert nicht die Bindung des AK an das Antigen, ist in

hochgereinigter Form leicht zu gewinnen und bleibt auch während der Kopplung an den AK sowie während der Lagerung und Anwendung aktiv. Außerdem sind physiologischerweise im Gewebe nur geringe Mengen von Peroxidase vorhanden, deren Aktivität sich mit Methanol-H₂O₂ oder Puffer-H₂O₂-NaN₃ unterdrücken lässt, so dass die Reaktion gut von außen steuerbar ist. Ein weiterer Vorteil ist die hohe Anzahl an Chromogenen, die mit Peroxidase Farbprodukte bilden, was diese Methode in weitem Umfang anwendbar macht.

Es gibt mehrere unterschiedliche Vorgehensweisen, ein AG nachzuweisen: Die direkte, die indirekte und die 3-Schritt-indirekte Methode, außerdem Nachweisverfahren mit löslichen Enzymkomplexen (PAP-Methode und APAAP-Methode) und die (Strept-)Avidin-Biotin-Methode. Da in dieser Arbeit mit der Avidin-Biotin-Methode gearbeitet wurde, soll im folgenden kurz darauf eingegangen werden.

Die (Strept-)Avidin-Biotin-Methode wird seit 1981 verwendet¹⁵⁹ und zeichnet sich durch ihre besonders gute Möglichkeit der AG Darstellung aus, was durch eine hohe Enzymkonzentration pro Gewebsantigen erreicht wird. Sie nutzt die starke Affinität von Avidin (aus Hühnerei) oder Streptavidin (aus *Streptomyces avidinii*) für Biotin zur Bildung von Komplexen aus enzymmarkierten Avidin-Biotin-Komplexen mit biotinylierten Sekundär-AK (= ABC-Methode, Abb. 14) oder zur Kopplung enzymmarkierten Avidins an biotinylierte Sekundär-AK (= labeled avidin biotin technique, LAB). In beiden Fällen ist also ein biotinylierter Sekundär-AK notwendig, wobei das Biotin kovalent an den AK gebunden ist. Bei der Reaktion bindet das Avidin der A-B-Komplexe oder enzymgekoppeltes Avidin allein an den Sekundär-AK. Das Verhältnis der Enzymmoleküle zum Avidin beträgt 3:1, wodurch es zu einer hohen Enzymkonzentration im Gewebe kommt. Heutzutage wird Avidin meist durch Streptavidin ersetzt. Die Reihenfolge der Applikation ist Primär-AK → biotinylierter Sekundär-AK → vorgeformte Avidin-Biotin-Enzymkomplexe oder enzymmarkiertes Avidin → Substratlösung. Als Enzyme werden am häufigsten Meerrettichperoxidase (= Horseradish peroxidase = HRP) oder alkalische Phosphatase (= AP) verwendet.

Die ABC- und die LAB-Technik haben durch ihre höheren Enzymkonzentrationen pro AG die höchste Sensitivität und Signalintensität im Vergleich zu den anderen Färbemethoden, wobei die LAB-Technik nochmals 4-8fach sensitiver als die ABC-Technik ist¹⁶⁰. Weitere Vor- und Nachteile der ABC-Methode zeigt Tabelle 6.

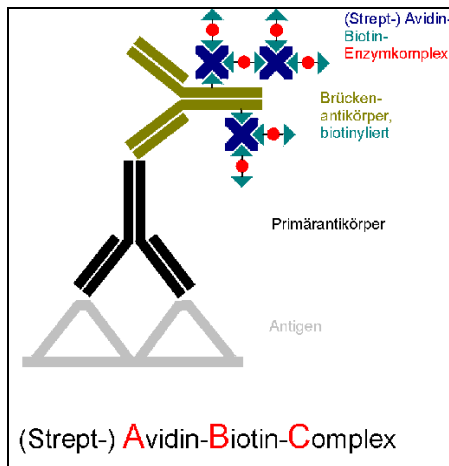


Abbildung 14: ABC-Methode

Vorteile der ABC-Methode	Nachteile der ABC-Methode
<ul style="list-style-type: none"> • Erhöhte Enzymkonzentration pro Antigen, dadurch verbesserte Detektion • Weniger Primär-AK notwendig • Verminderte Färbezeit im Vergleich mit der PAP-Methode 	<ul style="list-style-type: none"> • Evt. bei einigen Geweben endogene Biotin-Blockierung zur Vermeidung unspezifischer Anfärbung nötig • Größe des ABC-Komplexes, was das Eindringen in einige Gewebe behindern kann

Tabelle 6: Vor- und Nachteile der ABC-Methode

3.2.2 Experimente

Für die Immunhistochemie wurden 10 µm dicke Kryostatschnitte der Region +/-1mm vom Bregma entfernt verwendet. Bei jeder Färbung wurden standardmäßig Positiv- und Negativkontrollen erstellt. Um ein optimales Färbeergebnis zu erreichen, wurden vor Versuchsbeginn Färbereihen mit unterschiedlichen AK-Konzentrationen, Inkubationszeiten und Chromogenen durchgeführt.

3.2.2.1 Kollagen

Mithilfe der Kollagenfärbung sollte der Frage nach den Durchmessern von Basalmembran und Lumen, der absoluten Anzahl an Gefäßen pro Gesichtsfeld und der Gesamtfläche von Kollagen IV markierten Schnitten in Kortex und Basalganglien nachgegangen werden. Auch die Färbeintensität sollte bestimmt werden. Die Nachweise erfolgten sowohl mit der Methode der klassischen Immunhistochemie (ABC-Methode) als auch der Immunfluoreszenz.

Die Schnitte wurden auf Raumtemperatur erwärmt und 10 Minuten lang luftgetrocknet, dann mit Aceton-Chloroform (1:1) für 5 Minuten bei 4° Celsius fixiert, 10 Minuten mit PBS bedeckt und anschließend 3 x 5 Minuten mit PBS gespült. Um unspezifische Bindungen zu vermeiden, wurde 20 Minuten lang mit Blotto bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden pro Schnitt 150µl der Primär-AK-Lösung in einer Konzentration von 1:800 hinzugegeben und 2 Stunden lang im Brutschrank bei einer Temperatur von 37° Celsius inkubiert. Abermals wurde 3 x 5 Minuten mit PBS gewaschen, dann der Sekundär-AK in einer Konzentration von 1:200 hinzugefügt und bei 37° Celsius für 30 Minuten inkubiert. Nach 3 x 5 Minuten Spülen mit PBS wurden die endogenen Peroxidasen mit H₂O₂ (30% H₂O₂ 1ml/1L PBS) 20 Minuten lang bei Raumtemperatur blockiert und die Schnitte abermals mit PBS gespült. Vectastain ABC wurde aufgetragen und nochmals 30 Minuten bei 37° Celsius inkubiert. Anschließend wurde für 10 Minuten das Chromogen (AEC Kit, Biomedica Corp.) zur Darstellung der Peroxidaseaktivität aufgetragen, die Schnitte für 3 Minuten mit Leitungswasser und destilliertem Wasser gespült, luftgetrocknet und in Glycerin Gelatine eingedeckelt.

Für die Immunfluoreszenz galt das gleiche Färbeprotokoll, nur wurde statt des Avidin-haltigen ABC Kits Avidin-markiertes Cy3 in einer Verdünnung von 1:500 aufgetragen, 30 Minuten in Dunkelheit bei 37° Celsius inkubiert, mit PBS 3 x 5 Minuten gespült und in Vectashield Mounting Medium eingedeckelt.

Die Auswertung erfolgte mit den Bildverarbeitungsprogrammen OPTIMAS und Medmo sowie mit dem Konfokalen Laser-Raster-Mikroskop.

3.2.2.2 Laminin

Analog der Kollagenfärbung sollte die Lamininfärbung Aufschluss geben über die totale Anzahl und die Gesamtfläche von gefärbten Gefäßen sowie deren Färbeintensität. Auch hier wurden sowohl die klassische Immunhistochemie als auch die Fluoreszenzimmunhistochemie eingesetzt.

Die Schnitte wurden ebenfalls auf Zimmertemperatur erwärmt und für 10 Minuten luftgetrocknet, anschließend bei Raumtemperatur in Aceton-Chloroform (1:1) fixiert, abermals für 5 Minuten luftgetrocknet, 3 x 5 Minuten in PBS gespült und zur Vermeidung unspezifischer Bindungen 20 Minuten bei Raumtemperatur in Blotto inkubiert.

Nach dem Auftragen des Primärantikörpers (1:800 in Reagent dilution, optimale Konzentration wurde in Verdünnungsreihen festgestellt) wurden die Schnitte 2 Stunden bei 37° Celsius und über Nacht bei 4° Celsius inkubiert.

Am Folgetag wurden die Schnitte zunächst 3x10 Minuten mit PBS gespült, dann mit dem Sekundärantikörper (1:200 in PBS, Pferdeserum und 10% Tween im Verhältnis 1000:15:1) für 30 Minuten bei 37° Celsius inkubiert und erneut 3 x 10 Minuten mit PBS gespült. Um unspezifische Anfärbungen zu vermeiden, wurde die Aktivität der endogenen Peroxidasen mit H₂O₂ (30% H₂O₂ 1ml/1L PBS) für 20 Minuten bei Raumtemperatur blockiert. Die Schnitte wurden für 3 Minuten in Leitungswasser und 3 x 5 Minuten in PBS gespült.

Anschließend wurden die Schnitte mit dem Avidin-Biotin-Komplex aus dem Vectastain Elite Kit für 30 Minuten bei 37° Celsius inkubiert, 3 x 5 Minuten in PBS und 30 Sekunden in destilliertem Wasser gespült und schließlich mit dem AEC Kit für weitere 10 Minuten bei 37° Celsius im Dunkeln inkubiert, um die Aktivität der exogenen Peroxidase darzustellen.

Abschließend wurde für jeweils 3 Minuten mit Leitungswasser und destilliertem Wasser gespült, die Schnitte getrocknet und in Glycerin Gelatine eingedeckelt. Die Schnitte wurden bei 4° Celsius im Dunkeln aufbewahrt.

Die Färbemethode für die Laminin Cy2 Fluoreszenz war bis zum Auftragen des Primär-AK am ersten Tag identisch. Am Folgetag wurde abermals für 3 x 10 Minuten mit PBS gespült, dann in Dunkelheit der Fluoreszenz- Sekundärantikörper (1:200, optimale Konzentration wurde in Verdünnungsreihen festgestellt) aufgetragen und für 60 Minuten in Dunkelheit inkubiert. Nachdem die Schnitte 3 x 5 Minuten mit PBS gespült und in Vectashield Mounting Medium eingedeckelt worden waren, erfolgte die Auswertung per Konfokalem Laser-Raster-Mikroskop und dem Bildverarbeitungsprogramm OPTIMAS. Die Schnitte wurden bei 4° Celsius im Dunkeln aufbewahrt.

3.2.2.3 μ -Calpain

Die μ -Calpain Färbung sollte zeigen, ob es in den unterschiedlichen Versuchgruppen Hinweise auf eine Aktivierung der Protease in den Neuronen gab. Dafür wurden sowohl die Calpain-positive Fläche als auch die Anzahl Calpain-positiver Zellen immunhistochemisch dargestellt.

Die Färbung erfolgte analog der Kollagen- und Lamininfärbungen: Die bei -80° Celsius tiefgefrorenen Schnitte wurden auf Zimmertemperatur erwärmt und für 10 Minuten

luftgetrocknet, anschließend bei Raumtemperatur in Aceton-Chloroform (1:1) fixiert, abermals für 5 Minuten luftgetrocknet, 3 x 5 Minuten in PBS gespült und zur Vermeidung unspezifischer Bindungen 20 Minuten bei Raumtemperatur in Blotto inkubiert.

Nach dem Auftragen des Primärantikörpers (1:400 in Reagent dilution, optimale Konzentration wurde in Verdünnungsreihen festgestellt) wurden die Schnitte 2 Stunden bei 37° Celsius und über Nacht bei 4° Celsius inkubiert.

Am folgenden Tag wurden die Schnitte zunächst 3 x 10 Minuten mit PBS gespült, dann mit dem Sekundärantikörper (1:200 in PBS, Pferdeserum und 10% Tween im Verhältnis 1000:15:1) für 30 Minuten bei 37° Celsius inkubiert und erneut 3 x 10 Minuten mit PBS gespült. Um unspezifische Anfärbungen zu vermeiden, wurde die Aktivität der endogenen Peroxidasen mit H₂O₂ (30% H₂O₂ 1ml/1L PBS) für 20 Minuten bei Raumtemperatur blockiert. Die Schnitte wurden für 3 Minuten in Leitungswasser und 3 x 5 Minuten in PBS gespült.

Anschließend wurden die Schnitte mit dem Avidin-Biotin-Komplex aus dem Vectastain Elite Kit für 30 Minuten bei 37° Celsius inkubiert, 3 x 5 Minuten in PBS und 30 Sekunden in destilliertem Wasser gespült und schließlich mit dem AEC Kit für 10 Minuten bei 37° Celsius im Dunkeln inkubiert, um die Aktivität der exogenen Peroxidase darzustellen.

Abschließend wurde für jeweils 3 Minuten mit Leitungswasser und destilliertem Wasser gespült, die Schnitte getrocknet und in Glycerin Gelatine eingedeckelt. Die Schnitte wurden bei 4° Celsius im Dunkeln aufbewahrt.

Die Auswertung erfolgte mit dem Bildverarbeitungsprogramm OPTIMAS.

3.2.2.4 MAP-2

Mit der MAP-2 Färbung sollte geprüft werden, ob lichtmikroskopisch Hinweise auf eine Degradation von MAP-2 und somit indirekt der Aktivierung der Protease Calpain gegeben waren. Auch für diese Färbung wurde die klassische Immunhistochemie gewählt.

Die Schnitte wurden auf Zimmertemperatur erwärmt und für 10 Minuten luftgetrocknet, anschließend bei Raumtemperatur in Aceton-Chloroform (1:1) fixiert, abermals für 5 Minuten luftgetrocknet, 3 x 5 Minuten in PBS gespült und zur Vermeidung unspezifischer Bindungen 20 Minuten bei Raumtemperatur in Blotto inkubiert.

Nach dem Auftragen des Primärantikörpers (1:800 in Reagent dilution, optimale Konzentration wurde in Verdünnungsreihen festgestellt) wurden die Schnitte 2 Stunden bei 37° Celsius und über Nacht bei 4° Celsius inkubiert.

Am folgenden Tag wurden die Schnitte zunächst 3 x 10 Minuten mit PBS gespült, dann mit dem Sekundärantikörper (1:200 in PBS, Pferdeserum und 10% Tween im Verhältnis 1000:15:1) für 30 Minuten bei 37° Celsius inkubiert und erneut 3 x 10 Minuten mit PBS gespült. Um unspezifische Anfärbungen zu vermeiden, wurde die Aktivität der endogenen Peroxidasen mit H₂O₂ (30% H₂O₂ 1ml/1L PBS) für 20 Minuten bei Raumtemperatur blockiert. Die Schnitte wurden für 3 Minuten in Leitungswasser und 3 x 5 Minuten in PBS gespült.

Anschließend wurden die Schnitte mit dem Avidin-Biotin-Komplex aus dem Vectastain Elite Kit für 30 Minuten bei 37° Celsius inkubiert, 3 x 5 Minuten in PBS und 30 Sekunden in destilliertem Wasser gespült und schließlich mit dem DAB Kit für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um die Aktivität der exogenen Peroxidase darzustellen.

Abschließend wurde für jeweils 3 Minuten mit Leitungswasser und destilliertem Wasser gespült, die Schnitte getrocknet und in Glycerin Gelatine eingedeckelt. Die Schnitte wurden bei 4° Celsius im Dunkeln aufbewahrt.

Die Auswertung der MAP-2 gefärbten Schnitte hinsichtlich zellulärer Läsionen erfolgte lichtmikroskopisch bei 40facher Vergrößerung.

3.2.3 Auswertungsprogramme und Geräte für die Immunhistochemie

3.2.3.1 Das Bildverarbeitungsprogramm OPTIMAS

Ptolemäus (Kloss et al., 2002), eine Makrosammlung von OPTIMAS, ermöglicht das Digitalisieren und die quantitative Auswertung eines gefärbten Schnittes, dessen Größe über ein mikroskopisches Gesichtsfeld hinausgeht. Dies geschieht, indem es den gesamten Schnitt mittels einer Aufzeichnungskamera, Mikroskoptisch-Ansteuerung und Verrechnungscomputer direkt am Mikroskop digitalisiert. Es erstellt verrechnete Bilder, so genannte Karten, nach wählbaren Vorgaben wie z.B. Gefäßdichte, Farbintensität etc., welche bei Bedarf mit anderen Karten kombiniert werden können.

Abb. 15 gibt eine Übersicht über den zeitlichen Ablauf vom Tierversuch bis hin zur Auswertung mit OPTIMAS:

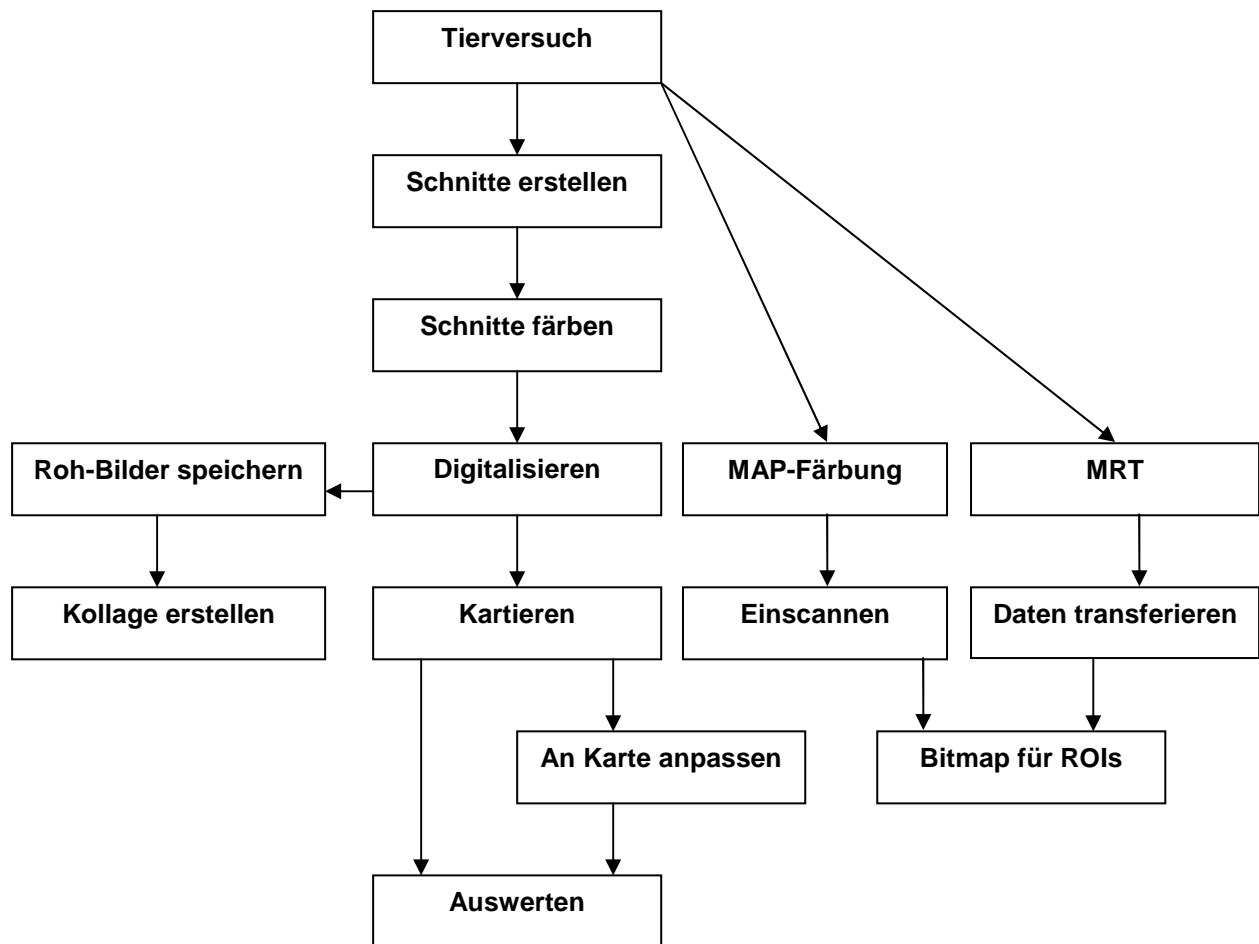


Abbildung 15: Vom Versuch zur Auswertung mit OPTIMAS

Für die Bildverarbeitung müssen verschiedene Schritte, so genannte Makros, mit folgenden Funktionen durchlaufen werden:

Makro 1 - Digitalisieren und Kartieren

Vom immunhistochemisch gefärbten Schnitt werden Kacheln erstellt. Eine Kachel entspricht einem einzelnen Kamerabild, welches wiederum weiter in Subkacheln und Pixel unterteilt wird. Das Makro steuert die Aufzeichnungskamera und das Mikroskop über eine Mikroskoptisch-Ansteuerung automatisch. Dabei kann im einfachsten Fall entweder nur der Grauwert kartiert werden, was etwa dem in Grau umgewandelten gewöhnlichen Blick durch das Mikroskop entspricht, oder aber es können gleichzeitig Berechnungen wie z.B. Farbintensität, Gefäßzahl und Gefäßdichte gemacht werden. Die so erzeugten Kacheln werden im Microsoft Bitmap-Format abgespeichert.

Folgende Parameter können für die Kartierung gewählt werden:

1. Der logarithmische Grauwert gibt die Lichtextinktion an und ist damit der Farbstoffkonzentration direkt proportional. Er gibt die Menge eines Farbstoffes im Schnitt semi-quantitativ wieder.
2. Die Flächenzahl mit variablem Schwellenwert pro Kacheleinheit ermöglicht die Identifikation eines genauen Farbschwellenwertes und der Größe der Flächen. Der variable Schwellenwert ist insbesondere bei inhomogenem Hintergrund einem fixen Schwellenwert vorzuziehen. Nachteilig ist, dass auch Schmutz bei sehr schwacher Färbung als Fläche berechnet wird. Die einzelnen Pixel-Werte geben quantitativ die Flächenzahl wieder.
3. Diese Option, der variable Schwellenwert, gibt den prozentualen Anteil der mit Kartierung 1 gefundenen Flächen am Schnitt an. 100% hat den Pixel-Wert 255.
4. Der Grauwert (Mittelwert) stellt die einfachste Kartierung dar. Es wird eine Karte entsprechend dem Blick durchs Mikroskop erstellt, allerdings ohne Gesichtsfeldeinschränkung.
5. Der Grauwert (Mittelwert-Standardabweichung) stellt eine einfache semiquantitative Kartierung für besonders kleine Strukturen dar (z.B. Mikroglia).
6. Bei der Flächenzahl mit fixem Schwellenwert wird ein bestimmter Schwellenwert gesetzt, was diese Option von Kartierung 1 unterscheidet. Diese Einstellung ist nur sinnvoll bei homogenen Färbungen. Verschmutzte Flächen können gut erkannt und herausgefiltert werden
7. Der prozentuale Anteil der Flächen (fester Schwellenwert) benutzt die Parameter aus Kartierung 6 für eine prozentuale Flächenberechnung. Für jede Berechnung wird jedem Pixel der Karte ein Wert zwischen 0 und 255 zugeordnet, wobei die Bedeutung je nach Färbung variiert (hier z.B. Kollagen-/Laminingehalt oder Gefäßzahldichte).

Makro 2 – Kartenerzeugung

Die einzelnen Kacheln werden zu einer Gesamtkarte zusammengestellt.

Makro 3 - Bitmap anpassen

Dieses Makro passt zwei Karten mit verschiedenen Formaten aneinander an. Dabei werden Position, Verzerrungen und die Auflösung angeglichen, um die Voraussetzung für eine gemeinsame Auswertung zu schaffen. Es entsteht eine so genannte orthotope Karte.

Makro 4 - Auswertung

Das Makro ermöglicht es, in einer Karte Auswertungsregionen (regions of interest, ROI) zu markieren, diese ROIs auf eine andere orthotope Karte zu übertragen und hier die mittleren Pixel-Werte in den ROIs zu berechnen.

Die ausgewerteten Daten der Masken-Karte können jetzt in eine andere Anwendung, z.B. EXCEL oder auch SPSS, übertragen werden.

Die Versuchsreihen in dieser Arbeit wurden hinsichtlich ihres logarithmischen Grauwerts, der Flächenzahl mit variablem Schwellenwert, des variablen Schwellenwerts, des einfachen Grauwerts und des Grauwerts mit Standardabweichung untersucht und daraus die Anzahl der Peroxidase-positiven Gefäße bzw. Neurone sowie die Gesamtfläche der gefärbten Strukturen bestimmt. Der RISC (relative intensity of staining coefficient) wurde dabei als der relative Wert der logarithmischen Darstellung des Quotienten aus Hintergrundfärbung und Zellfärbung berechnet. Alle Grundeinstellungen wie die Helligkeit oder die Köhlerung blieben innerhalb der einzelnen Versuchsreihen identisch. Kollagen wurde mit 40- und 100facher Vergrößerung ausgewertet, Laminin und Calpain mit 10- und 40facher. Die ROIs wurden folgendermaßen definiert: ROI-1: Gesamtfläche Schnitt, ROI-2: li. Hemisphäre, ROI-3: re. Hemisphäre, ROI-4: li. Kortex, ROI-5: re. Kortex, ROI-6: li. Basalganglienregion, ROI-7: re. Basalganglienregion.

3.2.3.2 Das Bildverarbeitungsprogramm Medmo

Zur Einschätzung der Basalmembranhypertrophie wurde das Medmo-Bildverarbeitungsprogramm benutzt. Pro Tier wurde bei 20 Gefäßen der Kortexregion in der Größenordnung von 10-15µm Durchmesser das Verhältnis zwischen Basalmembrandurchmesser und Gefäßlumen semiquantitativ berechnet. Nur annähernd quere Gefäßquerschnitte wurden dafür ausgewählt, um Fehlbestimmungen des Lumendurchmessers zu vermeiden. Es wurde mit einer 40fachen Vergrößerung gearbeitet.

3.2.3.3 Konfokale Laser-Raster-Mikroskopie

Die konfokale Laser-Raster-Mikroskopie (= confocal laser scanning microscopy = CLSM) ist eine neuere mikroskopische Methode, mit der man die Intensität einer Fluoreszenz beurteilen

kann. Gegenüber der Durchlicht- und insbesondere gegenüber der konventionellen Epifluoreszenzmikroskopie zeichnet sie sich durch einen besseren Kontrast aus. Besonders von Vorteil ist jedoch die Möglichkeit, optische Schnitte (z.B. x-y-Ebenen) mit definiertem Abstand durch ein Präparat zu legen, wobei die Tiefenschärfe bei etwa $0,5\mu\text{m}$ liegt. Diese Akquirierung von optischen Serienschritten¹⁶¹ ermöglicht die dreidimensionale Rekonstruktion aus einem zweidimensionalen Datensatz. Grundsätzlich kann jede Markierung, die in der konventionellen Fluoreszenzmikroskopie eingesetzt wird, auch mit der konfokalen Laser-Raster-Mikroskopie verwendet werden.

Als Lichtquelle wird ein Laser verwendet, der sich aufgrund seines linienförmigen Spektrums besser zur Herausfilterung einer für ein gegebenes Fluorochrom benötigten Anregungswellenlänge eignet. Dies setzt allerdings voraus, dass diese Wellenlänge im Linienspektrum des benutzten Lasers vorkommt. Am häufigsten werden Argon, Krypton oder Mischgaslaser verwendet. Die Hauptlinien eines Ar-Kr-Lasers liegen bei 488, 568 und 647nm und eignen sich damit gut zur Anregung der Standardfluorochrome FITC (488nm), TRITC (568nm) und Carbocyanin Cy2-Cy5 (s.o.).

Im Gegensatz zur konventionellen Mikroskopie, in der das Objektfeld als ganzes ausgeleuchtet wird, wird bei der konfokalen Laser-Raster-Mikroskopie durch Einbringen einer Illuminationslochblende nur ein scheibenförmiger Objektbereich beleuchtet und das Objektfeld Punkt für Punkt abgerastert. Dies führt zu weniger Streulicht aus benachbarten Objektbereichen und erhöht somit die Schärfe und den Kontrast des resultierenden Bildes.

Das Einbringen einer zweiten, in ihrem Durchmesser veränderbaren Lochblende, in die aufnehmende Optik, die in dieselbe Objektebene fokussiert wie die beleuchtende Optik (Prinzip der Konfokalität), bewirkt, das Licht aus tieferen und höheren Objektebenen als der Fokusebene nicht zum Photomultiplier (oder einer CCD-Kamera) gelangt. Dies führt zu einer erheblichen Erhöhung der Bildschärfe durch Reduktion des so genannten "out of focus blur", Streulicht aus nicht im Fokus liegenden Ebenen, und ist die Voraussetzung für die Akquirierung von optischen Serienschritten durch ein Präparat.

Zusätzlich sind umfangreiche digitale Bildbearbeitungsmöglichkeiten gegeben: Simultane Rotationen um die drei Raumachsen, simultane Verschiebungen entlang der drei Raumachsen, Intensitätsmessungen, Intensitätsschwellenwertdarstellungen, Histogramme, Operationen mit Konstanten sowie Bildern und vieles mehr.

Des Weiteren stehen meist mindestens zwei Kanäle zur Verfügung, so dass zwei Fluoreszenzsignale (Doppelmarkierungen) im identischen Präparat simultan oder sequentiell gescannt und anschließend digital zu einem Bild rekonstruiert werden können.

Die Auswertung dieser Arbeit per CLSM erfolgte nach erprobten Grundeinstellungen⁹. Helligkeit, Kontrast, Zoom und Laserzeit waren innerhalb der einzelnen Versuchsreihen identisch. Weiterhin wurden folgende Einstellungen gewählt: Voltage 700-726, Pinhole 100, Laser Power 6000-7000. Um Verlust der Fluoreszenz zu vermeiden und ein möglichst starkes Signal zu erhalten, wurden die Schnitte so bald als möglich nach Beendigung der Färbung ausgewertet.

In der Kollagenversuchsreihe wurden pro Tier 20 Mikrogefäße der Kortexregion von 7,5-30µm Durchmesser ausgewählt, in der Lamininreihe jeweils 10 Gefäße. Jedes Gefäß wurde zunächst in der z-Ebene eingescannt (10 Scans pro 1mm) und daraus ein stereoskopisches Bild erstellt. In der Nähe eines jeden gemessenen Gefäßes wurde außerdem eine Bestimmung der Hintergrundintensität vorgenommen, um die Intensität der Gefäße entsprechend anzupassen. Diese „normalisierte Intensität“ wurde mithilfe einer relativen Skalierung von 0 bis 255 U (niedrigste bis höchste Intensität) bestimmt und als Mittelwert \pm Standardabweichung ausgedrückt.

3.3 Western Blot

3.3.1 Methoden

Die Bezeichnung Western Blot geht auf den Namen des Erfinders der Blotting Technik, Edwin Southern, zurück. Dieser entwickelte 1975 eine Methode zur Auftrennung und anschließenden Hybridisierung von DNA-Fragmenten, welche als Southern Blot bekannt wurde. In Anlehnung an dieses Verfahren wurde der spezifische RNA-Nachweis Northern Blot und der spezifische Protein-Nachweis Western Blot genannt. Die erste Publikation, die sich mit dem Proteintransfer von einem Gel auf eine feste Membran beschäftigt, erschien 1979¹⁶².

Der Western Blot kombiniert die Methoden der Gelelektrophorese mit spezifischem AK-Nachweis, was eine Aussage über das Molekulargewicht eines Proteins und seinen relativen Anteil in einem Proteingemisch ermöglicht. Dieses Verfahren ist besonders dann von Vorteil, wenn das gesuchte Antigen entweder schwer löslich, schwierig zu markieren oder instabil ist und somit dem Nachweis durch Immunpräzipitation entfällt.

Beim Western Blot wird zunächst das Proteingemisch mit der SDS-PAGE (= Sodium dodecyl sulfate- polyacrylamide gel electrophoresis) Technik aufgetrennt. Dies geschieht, indem die Probe durch einen Überschuss an SDS, einem anionischen Detergens, und Hitze denaturiert, die Proteine dann von SDS gebunden, dadurch negativ geladen und anschließend auf eine Polyacrylamidmatrix aufgetragen werden. Optional können Disulfidbrücken zwischen Cysteinen durch Reduktion gespalten werden. Dazu werden reduzierende Thiolverbindungen wie β -Mercaptoethanol oder Dithiothreitol (= DTT) dem Probenpuffer zugesetzt. Im elektrischen Feld, welches nun senkrecht zum Polyacrylamidgel erzeugt wird, wandern die Teilchen entsprechend ihrer Molekülgröße und erzeugen ein Muster unterschiedlich großer Proteinbanden.

Im anschließenden Blot werden die aufgetrennten Proteine auf eine feste Membran, meist eine Nitrozellulose- oder PVDF (= Polyvinylidendifluorid)-Membran, übertragen und durch AK sichtbar gemacht. Dabei bleibt das Muster der elektrophoretischen Auftrennung erhalten. Für den elektrophoretischen Transfer sind zwei unterschiedliche Verfahren im Einsatz, das „Tankblot System“ (= Kapillarelektrophorese) und das „Semidryblot System“ (= Elektroblot). Die effizientere und häufiger benutzte Transfermethode ist der Elektroblot. Dabei werden das Gel und die Membran eingebettet in Puffersubstanz in einer Kassette geschichtet und eine Gleichspannung im rechten Winkel zum Gel angelegt (Abb. 16). Die immer noch negativ geladenen Proteine wandern vom Gel auf die Membran und werden dort durch hydrophobe Wechselwirkung fest gebunden. Da diese Wechselwirkung zwischen Protein und Membran nicht sehr stabil ist, müssen die Umgebungsbedingungen der Elektrophorese sehr genau eingehalten werden.

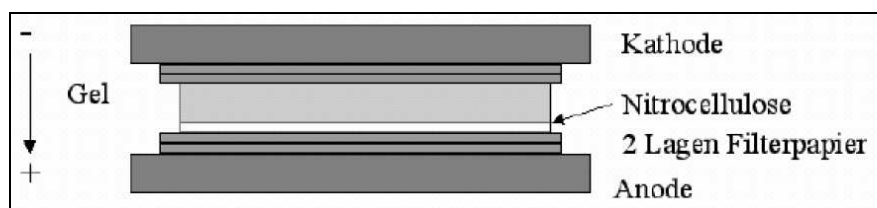


Abbildung 16: Elektroblot. Durch das Gel fließt eine Gleichspannung.

Bevor nun der Primär-AK hinzugegeben werden darf, müssen die freien hydrophoben Bindungsstellen der Membran mit einer Proteinlösung blockiert werden, um eine Bindung des AK an die Membran zu vermeiden. Dies würde sonst jeglichen spezifischen Nachweis eines Antigens unmöglich machen. Dieses Blockieren freier Bindungsstellen (blocking) wird mit einem nicht für die Antikörper erkennbaren Protein bewerkstelligt. Oft wird BSA (= bovine serum albumin) verwendet, seltener aber auch fettfreies Milchpulver, Myoglobin,

Hämoglobin und andere Materialien, insbesondere Seren. Es muss darauf geachtet werden, keine Blockingsubstanz mit Antigen zu verwenden, die vom Primär- oder Sekundär-AK erkannt werden kann.

Bei diesem Vorgang wird zudem das an den Proteinen angelagerte SDS ausgewaschen. Die Proteine können renaturieren und dabei teilweise ihre Sekundär- und Tertiärstruktur wieder einnehmen, allerdings nicht ihre Quartärstruktur. Sie können somit von Antikörpern erkannt werden. Diese Renaturierung ist nicht vollständig, wodurch es Probleme mit monoklonalen Antikörpern geben kann, die spezifisch nur ein Epitop des Antigens erkennen.

Um abschließend das gesuchte Antigen visuell nachzuweisen, muss der hinzugefügte Primär-AK mit einem Enzym wie beispielsweise Meerrettichperoxidase oder alkalischer Phosphatase gekoppelt sein. Durch Hinzufügen eines geeigneten Substrats, häufig Chlornaphthol, Minoethylcarbazol oder Diaminobenzidin, kommt es entweder zu einer Farbreaktion an der Stelle des AG-AK Komplexes (Colorimetrische Substrate = Chromogene) oder zur Aussendung von Licht (Chemoluminiszierende Substrate), welches auf Röntgenfilm dargestellt werden kann.

Eine schematische Darstellung des Western Blots zeigt Abb. 17.

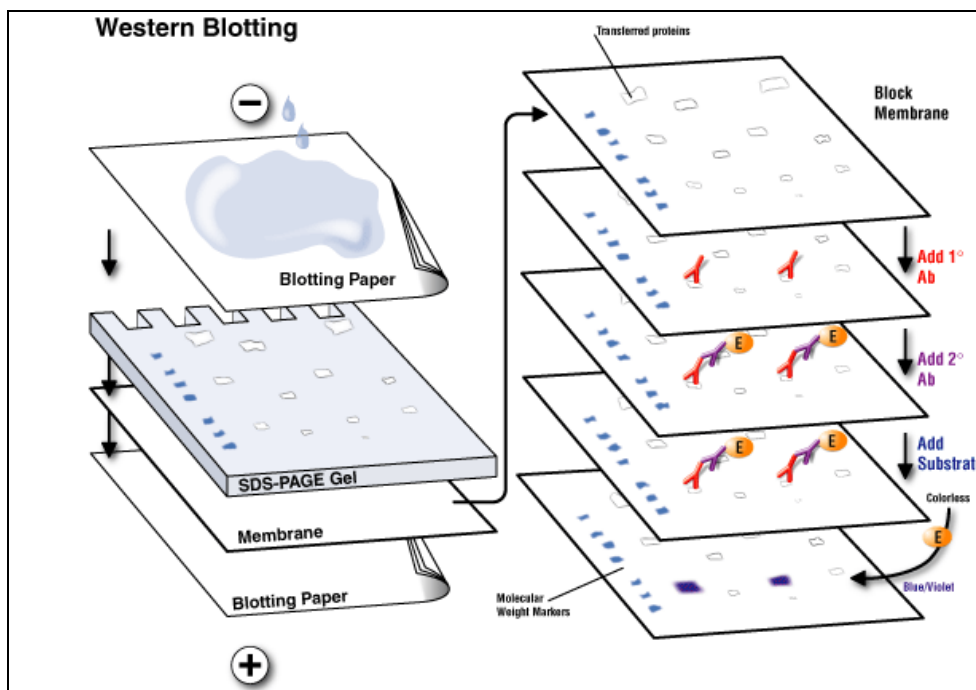


Abbildung 17: Western Blot

3.3.2 Experimente

Mithilfe des Western Blots sollte der Gesamtgehalt von Kollagen IV quantifiziert werden, um eventuelle Unterschiede in Versuchs- und Placebogruppe und damit Hinweise auf Gefäßhypertrophie nachzuweisen.

Die Homogenisierung und Zentrifugation des Hirngewebes fand in einer Kältekammer bei 4° Celsius statt. Es wurde unter Zuhilfenahme der in unserer Arbeitsgruppe entwickelten „Kratztechnik“ Gewebe von 10µm dicken Kryoschnitten verwendet ¹⁶³.

Das Hirngewebe wurde unter Zuhilfenahme eines Lyse Puffers homogenisiert, zur Vermeidung von Proteindegradation mit den Proteaseinhibitoren PMSF (100 µg/ml), Aprotinin (10 µg/ml) und Leupeptin (10 µg/ml) vermengt, schließlich sonifiziert und bei 13000 rpm zentrifugiert.

Anschließend wurden die Proteine per SDS-PAGE getrennt: Gleiche Proteinmengen wurden in einem 2fach konzentrierten Ladepuffer gelöst und 5 Minuten auf 95° Celsius erhitzt, dann auf ein 7,5 % Polyacrylamidgel übertragen und 2 Stunden lang bei 100 V laufen gelassen. Die Proteine wurden bei 4° Celsius auf eine PVDF Membran übertragen, indem in einem Transferpuffer für 1 Stunde eine Gleichspannung von 400mA angelegt wurde. Nach Immobilisation der Proteine wurde die Membran mit Ponceaurot angefärbt, um gleiche Mengenverteilung und Laufstärke in allen Linien zu bestätigen. Dann wurden die Blots für 1 Stunde bei Raumtemperatur in einer Lösung von 3% Rinderserum Albumin, TBS und 0,2% Tween-20 geblockt, um unspezifische Bindungen des Primär-AK an der Membran zu vermeiden. Über Nacht wurden die Blots bei 4° Celsius mit dem Primär-AK (1:1000 in 3% Rinderserumalbumin und Tween-20) inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Blots 3 x 10 Minuten mit TBS gespült, der biotinylierte Sekundär-AK (1:1000 in 3% Rinderserumalbumin und Tween-20) aufgetragen und bei Raumtemperatur 1 Stunde lang inkubiert. Daraufhin wurde 3 x 5 Minuten mit TBST gespült, dann für 30 Minuten bei Raumtemperatur Vectastain ABC hinzugefügt und nach erneutem Waschen mit TBST der Blot mit dem ECL Entwicklungskit abgeschlossen. Die Auswertung erfolgte mit dem optischen Analyseprogramm Tina, Version 2.08.

3.3.3 Auswertungsprogramm für den Western Blot

Das optische Analyseprogramm Tina, Version 2.08, vergleicht die unterschiedlichen Banden mittels optischer Densitometrie und überträgt die Resultate auf eine Dichteskala. Das

Verhältnis der Dichtemessung bei Ramipril-behandelten Tieren im Vergleich zur Placebogruppe wurde als Mittelwert \pm Standardabweichung bestimmt.

In dieser Arbeit wurde bei einer Extinktionsmessung von 590nm mit dem Bradford-Protein Assay gearbeitet. Zur Eichung diente Rinderserum Albumin.

3.4 Statistische Analyse

Für die Auswertung der Daten wurde das Statistikprogramm SPSS Version 10.5 herangezogen. Die Daten wurden mithilfe des t-Tests evaluiert und als Mittelwert \pm Standardabweichung (= Standard deviation = SD) dargestellt. Das Signifikanzniveau lag, sofern nicht anders angegeben, bei 0,05.

3.4.1 Statistische Grundbegriffe

Beim **t-Test** handelt es sich um ein Verfahren zur statistischen Hypothesenprüfung, bei dem geprüft wird, ob eine Teststatistik im Ablehnungsbereich der t-Verteilung liegt.

Das wichtigste Anwendungsgebiet ist der Vergleich der Mittelwerte zweier Gruppen, wobei zwei Fälle unterschieden werden:

1. Mittelwertvergleich bei unabhängigen Stichproben
2. Mittelwertvergleich bei abhängigen (oder verbundenen) Stichproben

Der t-Test kann eingesetzt werden, wenn die zu untersuchende abhängige Variable mindestens (mehr oder weniger) intervallskaliert ist. Außerdem sollte das Merkmal in den untersuchten Populationen normalverteilt sein; vor allem bei großen Stichproben und nicht zu unterschiedlichem Umfang der beiden Gruppen ist das Verfahren jedoch relativ robust gegen die Verletzung dieser Annahme. In unserem Versuch wurde ein Mittelwertvergleich unabhängiger Stichproben vorgenommen.

Die **Varianz** ist die Summe der quadrierten Abweichungen der einzelnen Werte eines Datenbündels vom Mittelwert dividiert durch n, d.h. durch die Anzahl der Beobachtungen. Die Varianz ist also ein Maß dafür, wie weit die einzelnen Werte im Durchschnitt vom Mittelwert entfernt liegen; es handelt sich damit um ein Streuungsmaß.

Die **Standardabweichung** ist die Wurzel aus der Varianz eines Datenbündels.

Statistische **Signifikanz** bezieht sich auf das Problem des Schlusses von einer (Zufalls-) Stichprobe auf die Grundgesamtheit. Als signifikant in diesem Sinne gilt das Ergebnis eines

Hypothesentests – des Signifikanztests –, wenn die Annahme berechtigt ist, dass ein theoretisch angenommener und in den Daten vorgefundener Zusammenhang zwischen Merkmalen oder ein Unterschied zwischen Gruppen nicht alleine durch die Unschärfe erklärt werden kann, die mit der Stichprobenziehung verbunden ist. Die Berechtigung dieser Annahme kann nie mit Sicherheit erwiesen werden, sondern nur mit einer gewissen, vorab festzulegenden Irrtumswahrscheinlichkeit. Diese bezeichnet man in diesem Kontext als Signifikanzniveau.

4. Ergebnisse

4.1 Kollagen Typ IV

Schnitte aus den Versuchsreihen der normotensiven (= Kontrollgruppe), der unbehandelten hypertensiven (= Placebogruppe) und der Ramipril behandelten Tiere (= Ramiprilgruppe) wurden mittels der Immunhistochemie, der Immunfluoreszenz und Western Blot untersucht.

4.1.1 Immunhistochemie

Mithilfe der klassischen Immunhistochemie wurden die Durchmesser von Basalmembran und Gefäßlumen, deren Verhältnis, die absolute Anzahl an Kollagen IV gefärbten Gefäßen pro Gesichtsfeld sowie die Gesamtfläche an Kollagen Typ IV gefärbten Gefäßen im Verhältnis zum Gesichtsfeld analysiert. Durch die Bestimmung [Kollagen IV/mikroskopischem Feld]/[Gefäße/mikroskopischem Feld] konnte somit die Menge an Kollagen pro Gefäß errechnet werden. Je nach Analyse wurden 10, 40 oder 100fache Vergrößerungen angewendet. Makroskopisch stellten sich die Schnitte homogen und intensiv angefärbt dar.

Zunächst wurden die Durchmesser von Basalmembran und Gefäßlumen bestimmt. Dazu dienten 20 zufällig ausgewählte, quer geschnittene Gefäße des Kortex, deren externer Durchmesser zwischen 10-15 μm lag. Im Vergleich zu den normotensiven Tieren, die eine durchschnittliche Dicke der Basalmembran von $2,9 \pm 0,2 \mu\text{m}$ aufwiesen, zeigten unbehandelte hypertensive Tiere in der Immunhistochemie eine verdickte Basalmembran ($3,9 \pm 0,5 \mu\text{m}$, $p < 0,0001$). Ramipril behandelte Tiere hatten durchschnittlich jedoch im Gegensatz zu den hypertensiven Tieren eine deutlich dünnere Basalmembran ($3,2 \pm 0,8 \mu\text{m}$, $p < 0,0001$). Die Dicke der Basalmembran der Ramipril behandelten Tiere war vergleichbar mit der der nicht hypertensiven Kontrollgruppe. Außerdem hatte die Gruppe der hypertensiven Ratten ein kleineres Lumen ($3,0 \pm 0,3 \mu\text{m}$) als die normotensive ($4,3 \pm 0,4 \mu\text{m}$) oder die Ramipril behandelte ($4,6 \pm 0,4 \mu\text{m}$). Der Vergleich zwischen dem Verhältnis von Dicke der Basalmembran und Lumendurchmesser ergab bei den Ramipril behandelten ($0,69 \pm 0,13$) und den normotensiven Tieren ($0,68 \pm 0,06$) keinen signifikanten Unterschied, jedoch war das Verhältnis signifikant kleiner als in der Placebogruppe ($1,31 \pm 0,08$, $p < 0,0001$, Abb.18+19).

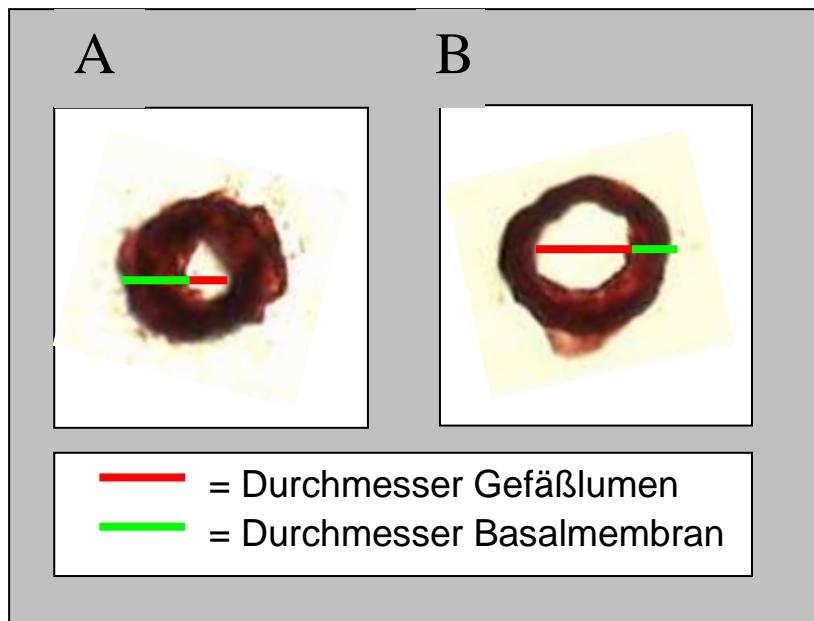


Abbildung 18: Durchmesser von Basalmembran und Gefäßlumen, 400fache Vergrößerung.
 A: Placebogruppe, B: Ramiprilgruppe. Gruppe B zeigt ein deutlich breiteres Lumen und eine schmalere Basalmembran.

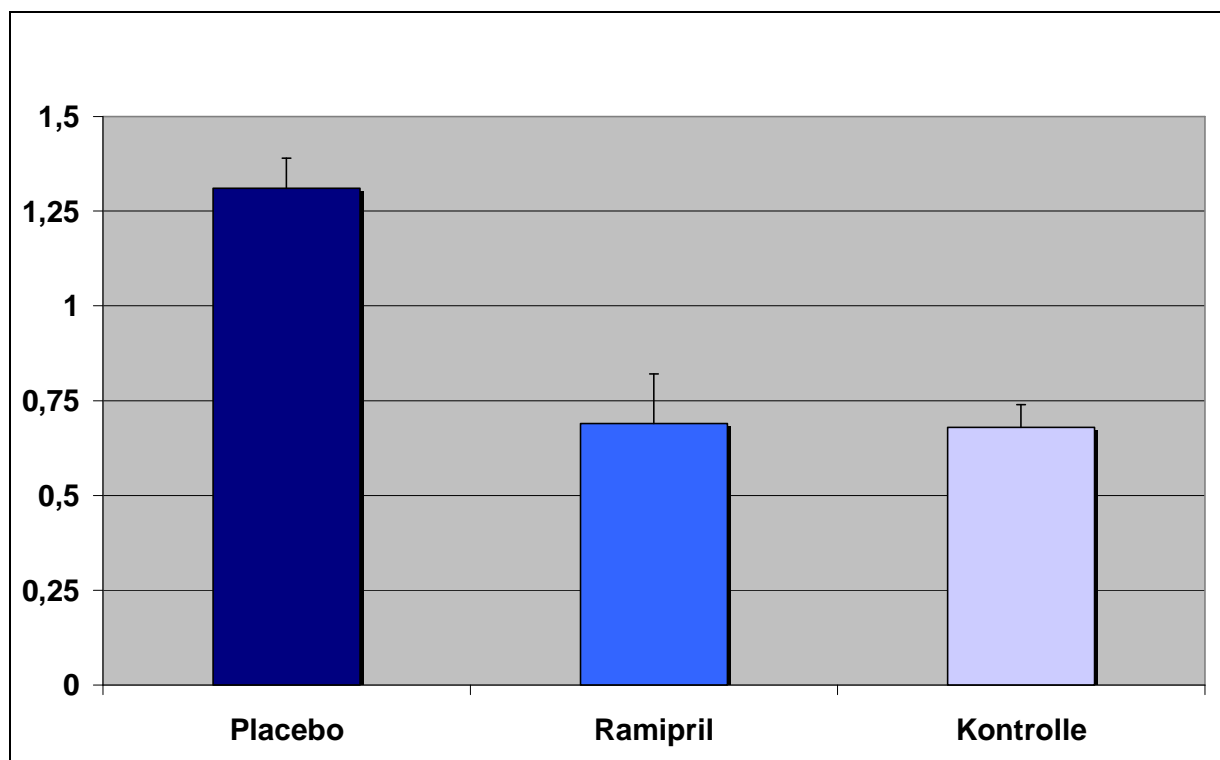


Abbildung 19: Verhältnis von Basalmembran und Gefäßlumen. Die Placebogruppe zeigt signifikant größere Werte als die Ramiprilgruppe oder die Kontrollgruppe.

Als nächstes wurde die Anzahl von Kollagen IV gefärbten Gefäßen und deren Gesamtfläche in Kortex und Basalganglien untersucht.

Kortex

In der Gruppe der normotensiven Tiere wurden im Kortex $22,8 \pm 0,8$ Gefäße pro mikroskopischem Bild nachgewiesen, vergleichbar mit der Gruppe der Ramipril behandelten Tiere mit $23,4 \pm 1,0$ Gefäßen, während die unbehandelten Tiere mit $20,4 \pm 2,0$ Gefäßen pro mikroskopischem Feld signifikant weniger Gefäße aufwiesen, als die mit Ramipril behandelten Tiere ($p < 0,05$, Abb. 20). Keinen signifikanten Unterschied ergab die relative Fläche an Kollagen Typ IV gefärbten Gefäßen pro mikroskopischem Feld in den verschiedenen Versuchsgruppen. Bei den normotensiven Tieren betrug diese $11,3 \pm 0,6$, bei den hypertensiven $12,1 \pm 1,1$ und bei den Ramipril behandelten Tieren $12,7 \pm 1,1$ (Abb. 21). Die Menge von Kollagen Typ IV pro Gefäß, berechnet als [Kollagen IV/mikroskopischem Feld]/[Gefäße/ mikroskopischem Feld], ergab keinen Unterschied bei normotensiven ($0,50 \pm 0,02$) und Ramipril behandelten Ratten ($0,54 \pm 0,04$), war jedoch bei den unbehandelten hypertensiven Tieren signifikant erhöht ($0,60 \pm 0,08$, $p < 0,05$).

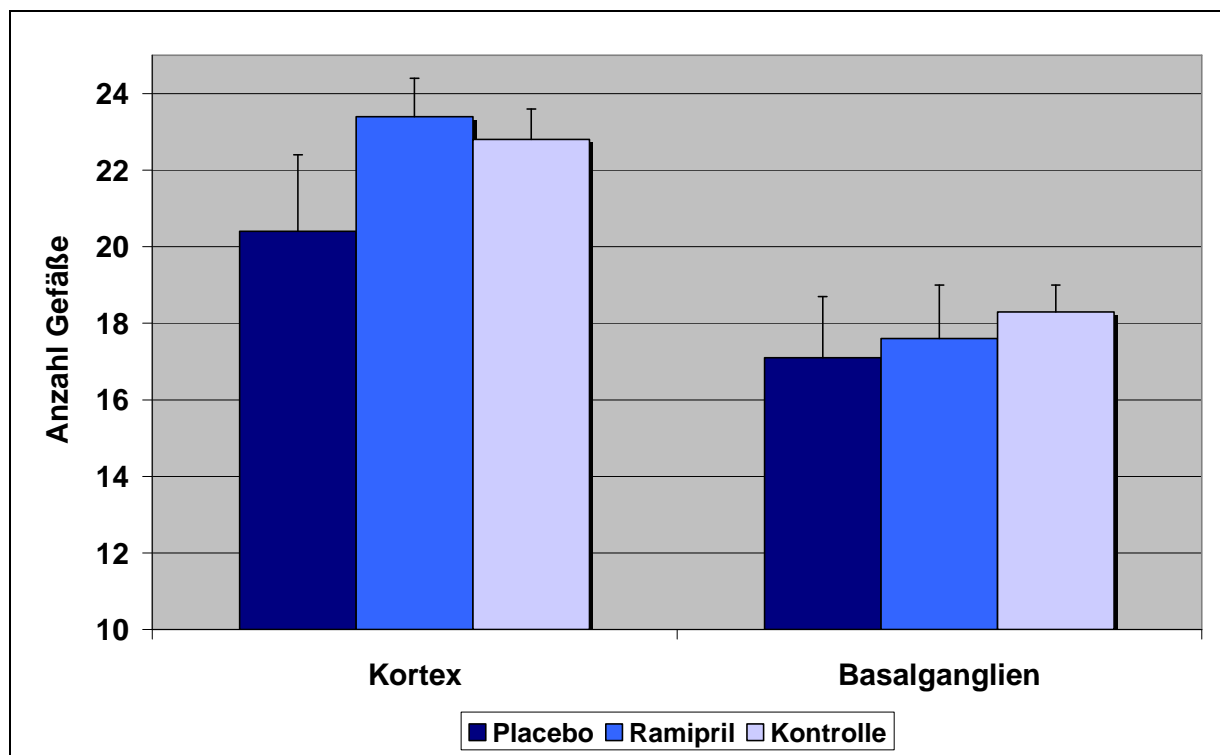


Abbildung 20: Anzahl Kollagen positiver Gefäße pro Gesichtsfeld, 10er Objektiv. Normotensive und Ramipril-behandelte Tiere zeigen im Vergleich mit der Placebogruppe signifikant mehr Gefäße im Kortex, nicht aber in den Basalganglien.

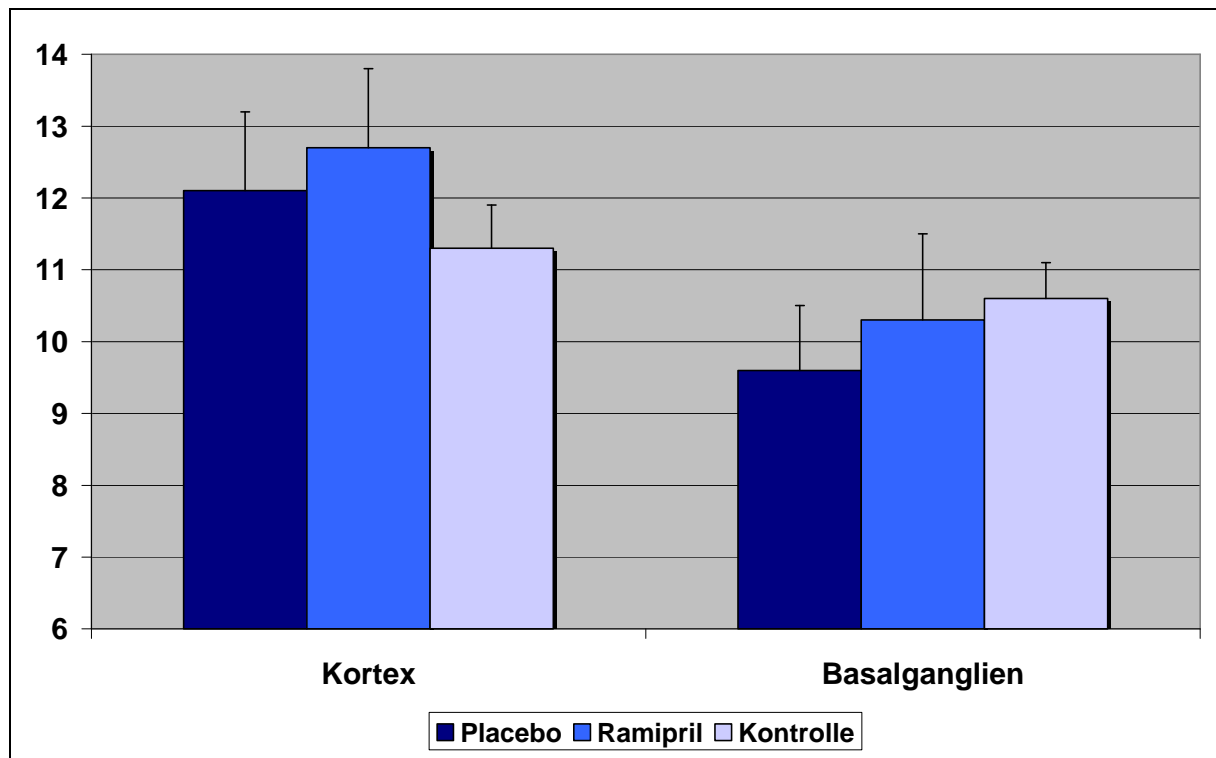


Abbildung 21: Relative Gesamtfläche von Kollagen Typ IV pro mikroskopischem Feld, 10er Objektiv. Es besteht kein signifikanter Unterschied in den Gruppen.

Basalganglien

Die quantitative Analyse der Basalganglien ergab $18,3 \pm 0,7$ Gefäße pro mikroskopischem Gesichtsfeld bei den normotensiven Ratten, $17,1 \pm 1,6$ bei den hypertensiven und $17,6 \pm 1,4$ bei den Ramipril behandelten (Abb. 20), während die relative Kollagen Typ IV positive Fläche mit $10,6 \pm 0,5$ bei den normotensiven, $9,6 \pm 0,9$ bei den unbehandelten Tieren und $10,3 \pm 1,2$ bei den Ramipril behandelten in allen Gruppen vergleichbar war (Abb.21). Bei der Menge an Kollagen pro Gefäß wurde ebenfalls kein Unterschied beobachtet, $0,58 \pm 0,03$ bei den normotensiven, $0,59 \pm 0,09$ bei den unbehandelten und $0,57 \pm 0,07$ bei den Ramipril behandelten Tieren.

4.1.2 Immunfluoreszenz

Die relative Intensität Kollagen Typ IV gefärbter Gefäße wurde in der Gruppe der unbehandelten hypertensiven Tiere und der Ramipril behandelten Tiere mit dem Konfokalen Laser-Raster Mikroskop bestimmt. Die für die Auswertung gewählte Fläche der Gefäße im Kortex war mit $113,9 \pm 59,4 \mu\text{m}^2$ in der Ramiprilgruppe und $136,0 \pm 53,0 \mu\text{m}^2$ in der Placebogruppe vergleichbar. Ramipril behandelte Tiere zeigten mit $94,5 \pm 5,0$ im Vergleich

zu den hypertensiven Tieren mit $115,0 \pm 7,9$ relativer Immunfluoreszenz eine signifikante Reduktion der Intensität von $18,1 \pm 4,7\%$ ($p < 0,0001$, Abb. 22).

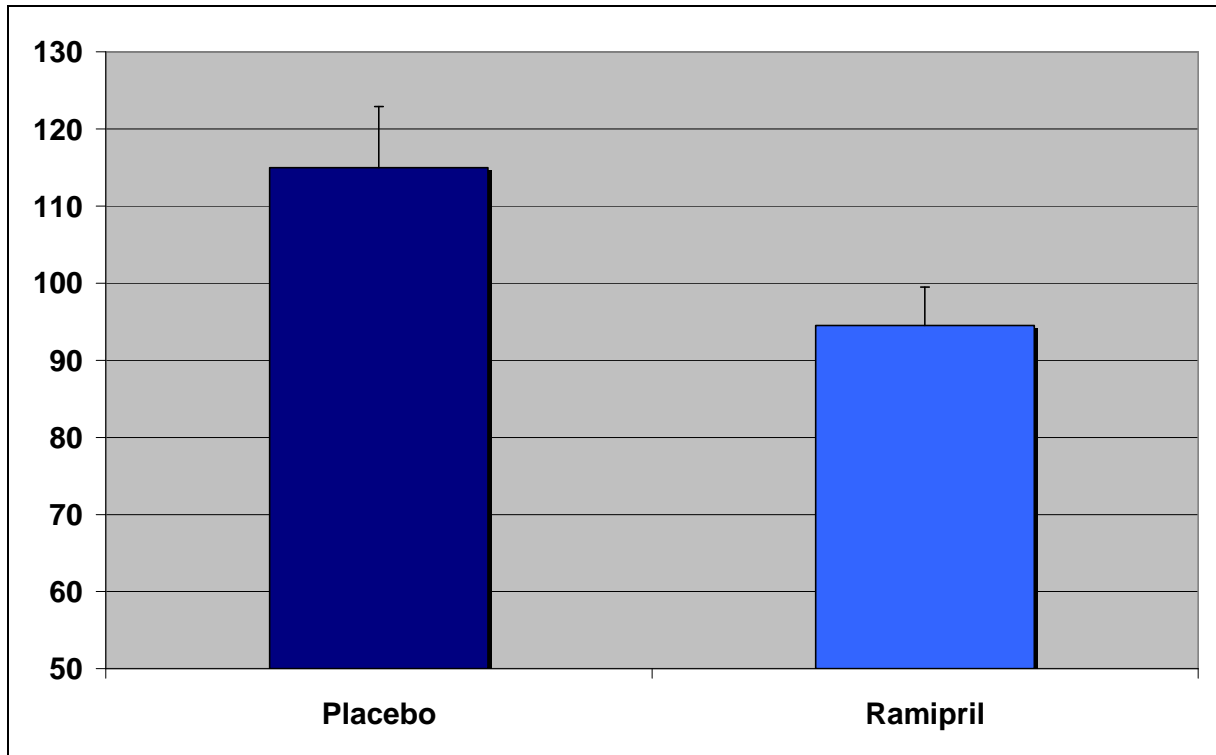


Abbildung 22: Relative Intensität der Fluoreszenz. Die Ramiprilgruppe zeigt eine signifikant geringere Intensität der Fluoreszenz.

4.1.3 Western Blot

Kryostatschnitte der Ramipril- und Placebogruppe wurden bezüglich ihres Kollagen Typ IV Gehalts untersucht.

Zur Darstellung des Kollagenase-sensitiven Kollagens IV wurden die Blots mit den Proteasen MMP-2 und MMP-9, die beide Fibrillenkollagen spalten können, vorbehandelt. Im Vergleich mit den unbehandelten Proben zeigten die MMP Blots einen Verlust der Bande unterhalb einer unveränderten, Kollagenase-insensitiven Bande. In den weiteren Experimenten wurde diese Kollagenase-sensitive Bande zum Vergleich des Kollagen IV Gehalts in den Versuchsgruppen herangezogen (Abb. 23). Bei den Ramipril behandelten Tieren war der Gehalt an Kollagen IV verglichen mit den unbehandelten Tieren deutlich um 51% vermindert (7775 ± 1340 vs. 15438 ± 2504 , $p = 0,0004$).

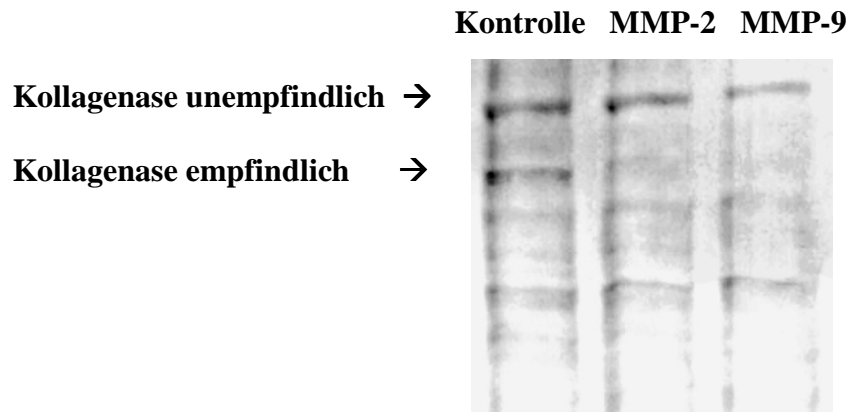


Abbildung 23: Nachweis von Kollagenase-sensitiven Banden

4.2 Laminin

Schnitte aus den Versuchsreihen der Placebogruppe und der Ramiprilgruppe wurden mittels der Immunhistochemie und der Immunfluoreszenz analysiert.

4.2.1 Immunhistochemie

Die Auswertung der immunhistochemischen Lamininfärbungen mit OPTIMAS erfolgte sowohl mit 10facher als auch mit 40facher Vergrößerung. Es wurde hinsichtlich der Gefäßanzahl pro Gesichtsfeld, der relativen Laminin positiven Fläche in den Hemisphären, im Kortex und den Basalganglien sowie dem Lamingehalt pro Gefäß untersucht. In beiden Versuchsgruppen zeigten sich makroskopisch gleichmäßig gut angefärbte Schnitte.

Zunächst wurde in 10facher Vergrößerung die Gefäßanzahl pro mikroskopischem Gesichtsfeld ermittelt, wobei sich in den beiden Gruppen ähnliche Resultate ergaben. In den Hemisphären ließen sich in der Placebogruppe $18,30 \pm 1,02$ vs. $17,98 \pm 0,98$ Gefäße in der Ramiprilgruppe nachweisen, im Kortex zeigten sich $23,04 \pm 1,50$ Gefäße vs. $22,39 \pm 1,56$, und auch in den Basalganglien ergaben sich mit $16,99 \pm 2,15$ vs. $16,58 \pm 0,97$ Gefäßen keine signifikanten Unterschiede (Abb. 24).

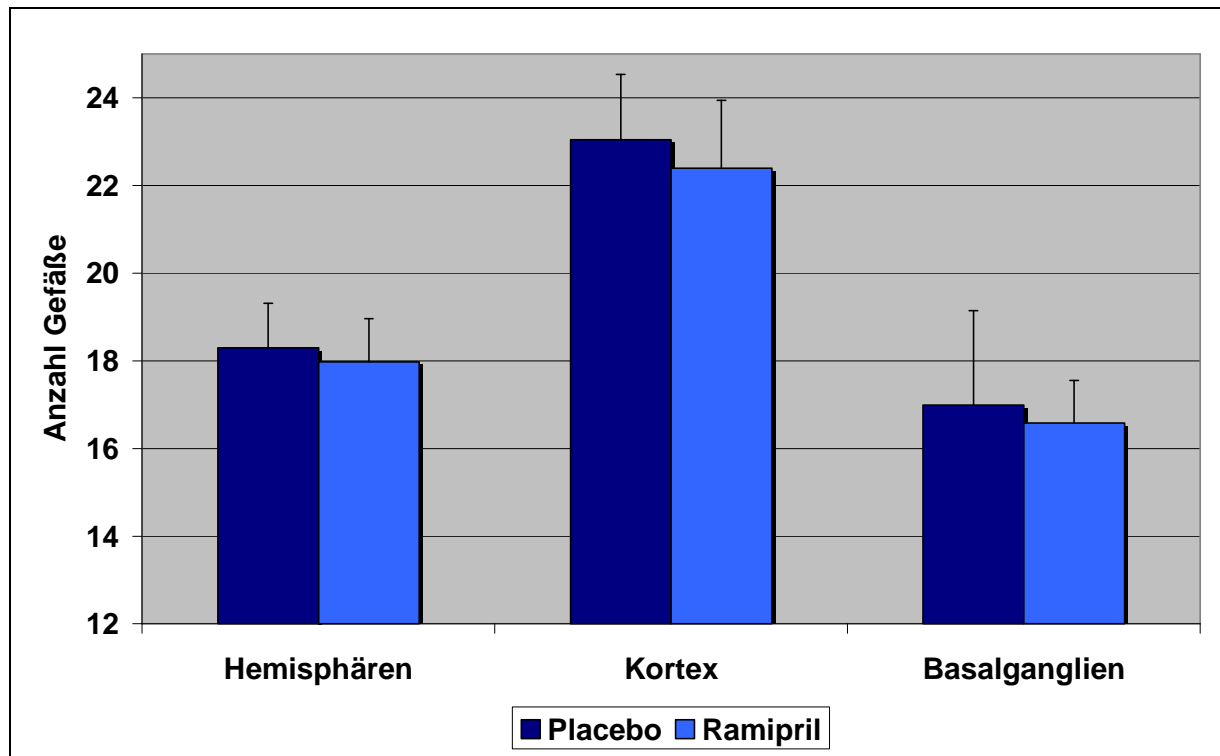


Abbildung 24: Anzahl Laminin positiver Gefäße pro Gesichtsfeld, 10er Objektiv. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

Anschließend wurden die Schnitte hinsichtlich ihrer relativen Laminin gefärbten Fläche analysiert. Auch diese Untersuchung ergab sowohl in den Hemisphären ($16,54 \pm 0,66$ in der Placebogruppe vs. $17,07 \pm 1,18$ in der Ramiprilgruppe), dem Kortex ($19,79 \pm 0,95$ vs. $19,77 \pm 1,58$) als auch den Basalganglien ($14,52 \pm 1,39$ vs. $14,93 \pm 1,08$) keine signifikanten Unterschiede (Abb. 25).

Bei der Bestimmung der Menge an Laminin pro Gefäß, berechnet als $[\text{Laminin/mikroskopischem Feld}]/[\text{Gefäße/mikroskopischem Feld}]$, ließ sich insgesamt ein Trend zu größeren Werten in der Ramiprilgruppe erkennen ($0,95 \pm 0,07$ vs. $0,90 \pm 0,03$ in den Hemisphären, $0,88 \pm 0,08$ vs. $0,86 \pm 0,02$ im Kortex, $0,90 \pm 0,06$ vs. $0,85 \pm 0,08$ in den Basalganglien), wobei die Ergebnisse jedoch aufgrund der großen Standardabweichungen keinen signifikanten Unterschied zur Placebogruppe zeigten (Abb. 26).

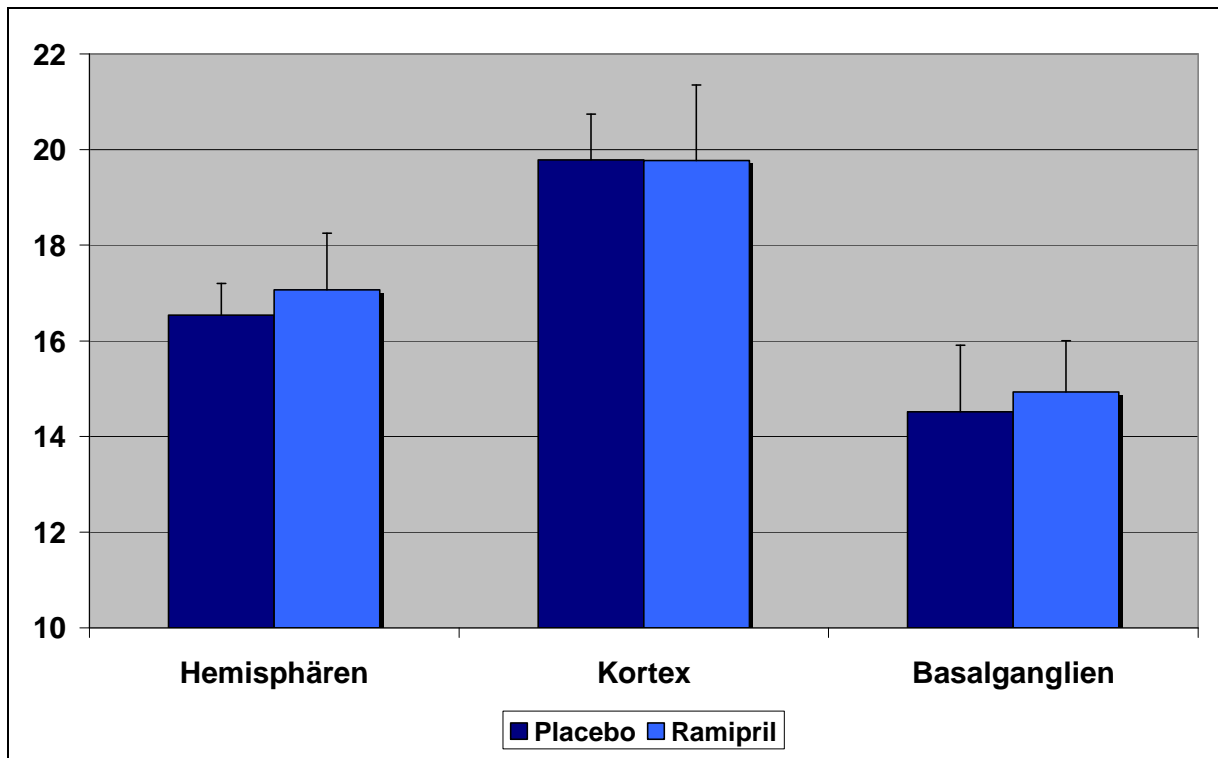


Abbildung 25: Relative Gesamtfläche von Laminin pro mikroskopischem Feld, 10er Objektiv. Auch hier zeigt sich kein signifikanter Unterschied in den Gruppen.

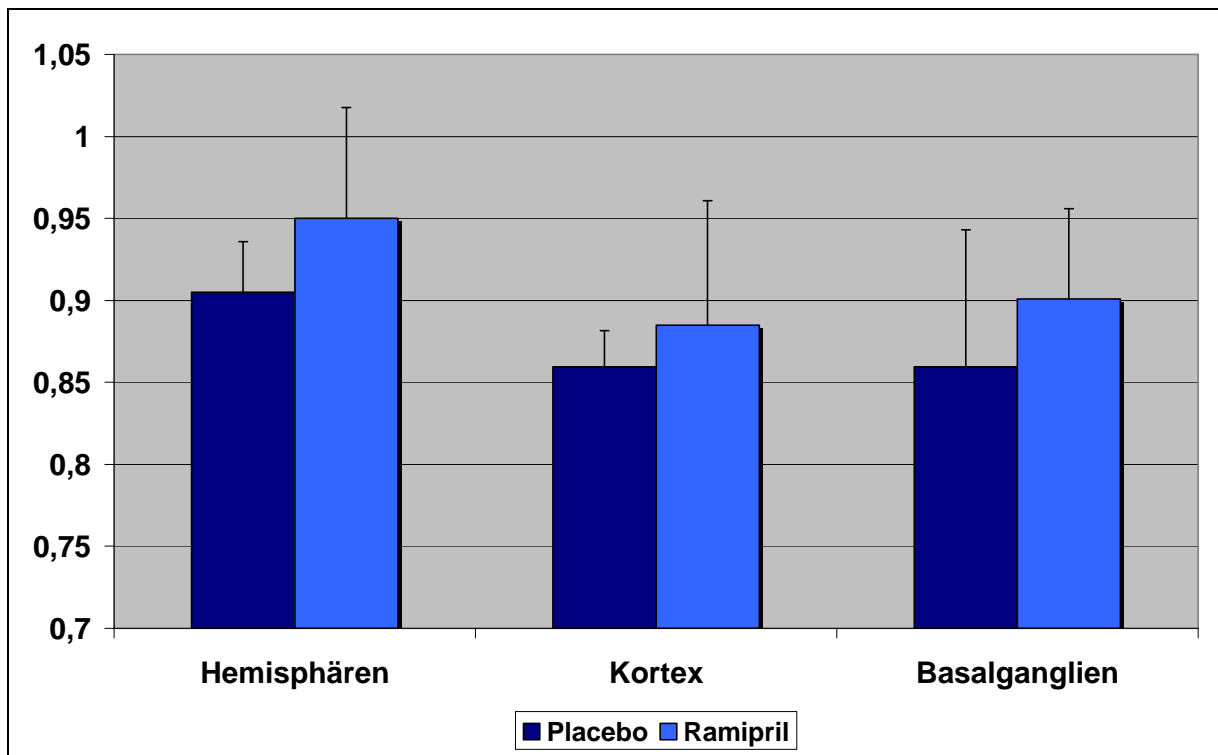


Abbildung 26: Laminin pro Gefäß, 10er Objektiv. In der Placebogruppe ist ein Trend zu geringeren Werten zu beobachten, es besteht jedoch kein signifikanter Unterschied.

Anschließend wurde zur genaueren Untersuchung der Basalganglien und des Kortex eine Analyse mit dem 40er Objektiv vorgenommen. Dazu wurden sowohl im Kortex als auch den Basalganglien im zentralen Bereich der markierten Flächen zufällige ROIs etwa gleicher Größe ausgewählt und ausgewertet. In der Placebogruppe fanden sich in den Basalganglien durchschnittlich $2,22 \pm 0,33$ Gefäße im Vergleich zu $2,48 \pm 0,41$ Gefäßen in der Ramiprilgruppe, in der ROI der Basalganglien waren es $1,69 \pm 0,15$ vs. $1,93 \pm 0,45$, im Kortex $2,08 \pm 0,27$ vs. $2,34 \pm 0,36$ und in der ROI des Kortex $1,84 \pm 0,19$ vs. $1,77 \pm 0,29$ Gefäße. Somit konnte gezeigt werden, dass auch bei größerer Auflösung bezüglich der Gefäßanzahl pro Bild kein Unterschied in der unbehandelten Gruppe und der Ramiprilgruppe bestand. Ein Trend zu mehr Gefäßen in der Ramiprilgruppe war jedoch erkenntlich (Abb. 27). Anschließend wurde die relative Laminin gefärbte Fläche bestimmt. Hier ergab sich zunächst ein Unterschied im Gesamtkortex von $18,25 \pm 0,69$ in der Placebogruppe im Vergleich zu $16,81 \pm 1,31$ in der Ramiprilgruppe, was jedoch nicht in der ROI des Kortex (manuell nachgeprüfte, neu eingestellte ROI) bestätigt werden konnte ($17,75 \pm 2,04$ in der Placebogruppe vs. $16,17 \pm 2,02$ in der Ramiprilgruppe). Auch in den Basalganglien konnten mit $17,69 \pm 1,12$ in der Placebogruppe vs. $17,33 \pm 0,70$ in der Ramiprilgruppe wie auch der ROI der Basalganglien mit $13,60 \pm 1,32$ vs. $13,56 \pm 0,94$ vergleichbare Werte in den Versuchsgruppen festgestellt werden (Abb. 28).

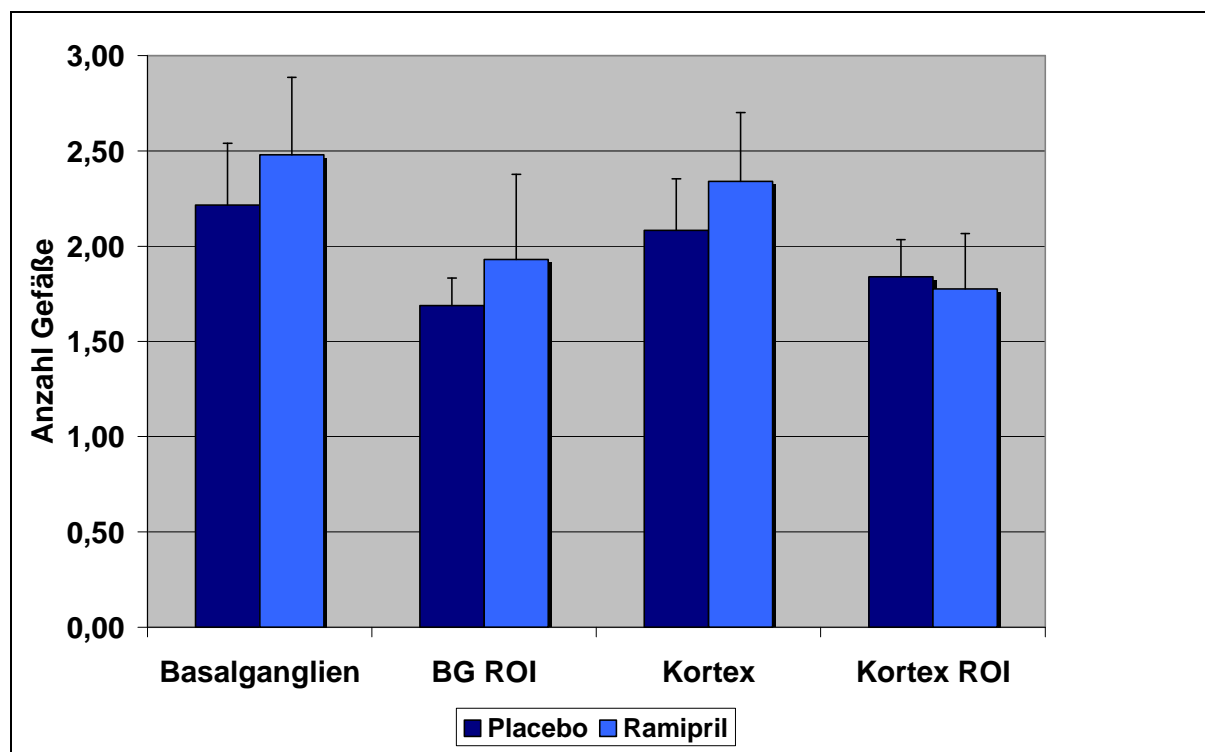


Abbildung 27: Anzahl Laminin positiver Gefäße pro Gesichtsfeld, 40er Objektiv. Es besteht kein signifikanter Unterschied in den Versuchsgruppen.

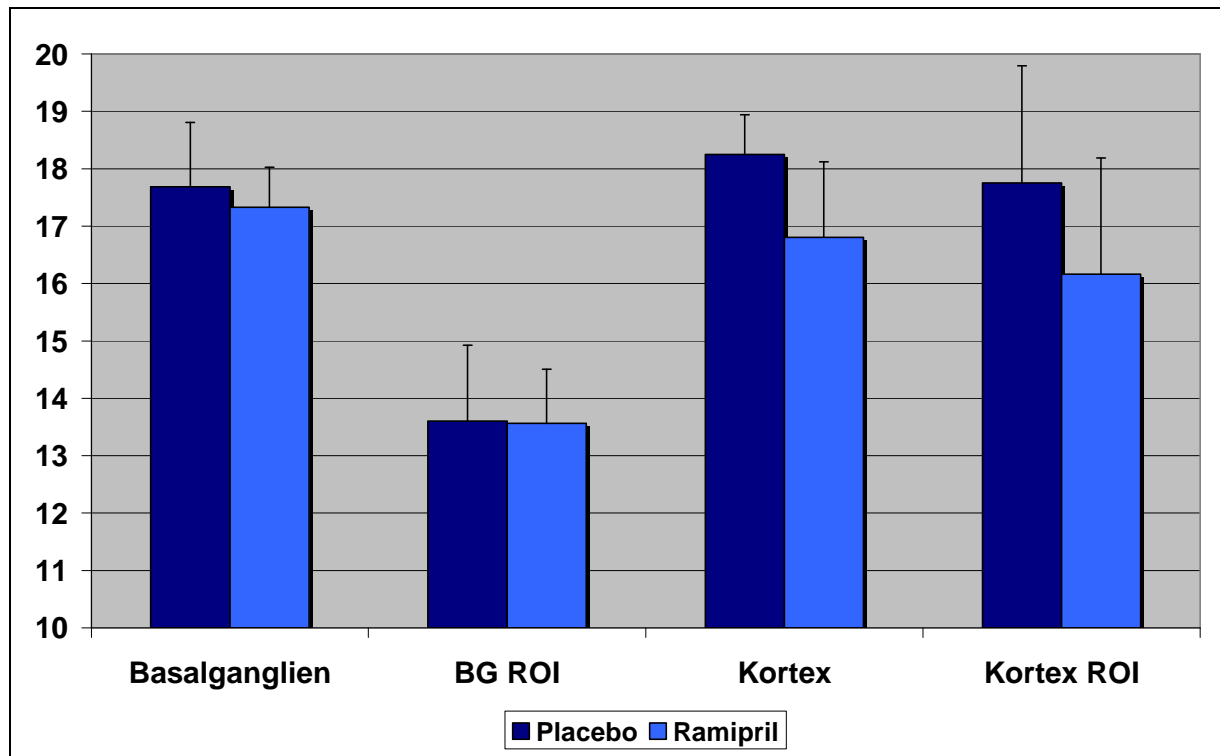


Abbildung 28: Gesamtfläche Laminin, 40er Objektiv. Ein signifikanter Unterschied im Kortex konnte im Kortex ROI nicht bestätigt werden.

Um mögliche vom Versuchsleiter abhängige Fehler, wie z.B. eine ungenaue Zuordnung der „regions of interest (ROI)“, in der Auswertung zu erkennen, erfolgte eine zweite Auswertung durch einen unabhängigen Versuchsleiter. Die jeweils erhaltenen Werte wurden als gepaarte Stichproben verglichen und ihre Korrelation sowie Signifikanz errechnet. Dabei zeigte sich, dass bis auf die Auswertung in den Basalganglien eine sehr starke Korrelation in allen untersuchten Hirnregionen bestand, und dass aber auch in den Basalganglien unabhängig von den Auswertern kein statistischer Unterschied zwischen den Gruppen gefunden werden konnte.

4.2.2 Immunfluoreszenz

Die Auswertung der Lamininfärbungen anhand ihrer Immunfluoreszenz erfolgte mit dem Konfokalen Laser-Raster-Mikroskop. Die zwei Versuchsgruppen bestanden aus den unbehandelten hypertensiven Tieren und den Ramipril behandelten Tieren. Pro Schnitt wurden jeweils im Kortex zufällig 10 Gefäße in etwa der gleichen Größenordnung gewählt (mittlere Größe zwischen $122,30 \mu\text{m}^2$ und $201,57 \mu\text{m}^2$) und hinsichtlich ihrer Intensität untersucht.

Während die mittlere Intensität der untersuchten Gefäße in der Ramiprilgruppe bei $24,24 \pm 5,26$ lag, ergaben sich bei der hypertensiven unbehandelten Kontrollgruppe Werte von $28,13 \pm 7,82$ (Abb. 29). Somit zeigte sich ein Trend, nicht jedoch ein signifikanter Unterschied im Lamineingehalt der Basalmembranen der beiden Gruppen.

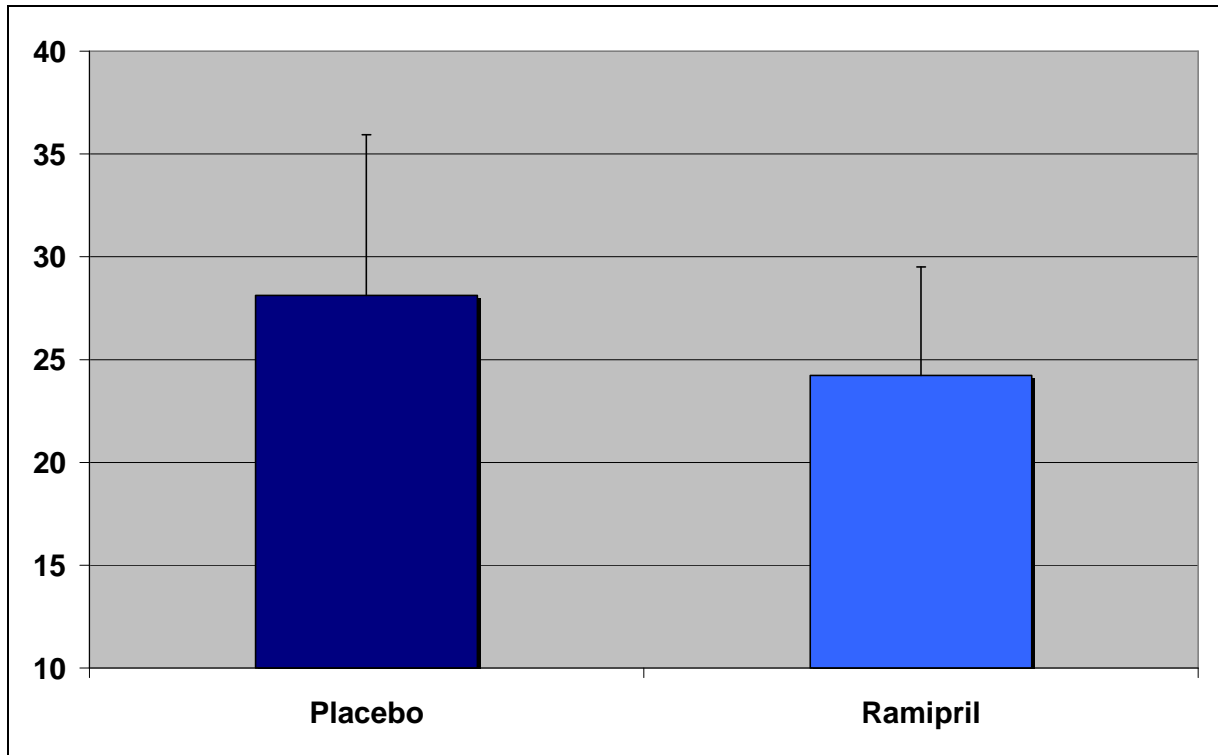


Abbildung 29: Relative Intensität der Fluoreszenz. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen.

4.3 Calpain

Gefärbte Schnitte der unbehandelten hypertensiven und der Ramipril behandelten Tiere wurden mittels der Immunhistochemie untersucht.

4.3.1 Immunhistochemie

Calpain positive Zellen wurden mithilfe des Bildverarbeitungsprogramms OPTIMAS in 10- und 40facher Vergrößerung detektiert. Angefärbte Strukturen, die größer oder kleiner als neuronale Zellen waren, wurden in die Auswertung nicht miteinbezogen. Die Placebogruppe und die Ramiprilgruppe wurden hinsichtlich der Anzahl der Calpain positiven Zellen sowie der relativen Calpain gefärbten Fläche in Hemisphären, Kortex und Basalganglien untersucht. Makroskopisch stellten sich die Schnitte dezent, aber gleichmäßig angefärbt dar.

Zunächst wurde in 10facher Vergrößerung die Gesamtfläche der Calpain positiven Zellen berechnet (Abb. 30). In den Hemisphären betrug die Fläche in der Placebogruppe $5,47 \pm 1,21$ vs. $5,76 \pm 0,84$ in der Ramiprilgruppe, im Kortex $5,98 \pm 1,25$ vs. $6,37 \pm 1,12$ und in den Basalganglien $6,20 \pm 1,60$ vs. $6,46 \pm 1,02$. Unabhängig der Lokalisation zeigte sich somit kein signifikanter Unterschied in den beiden Versuchsgruppen.

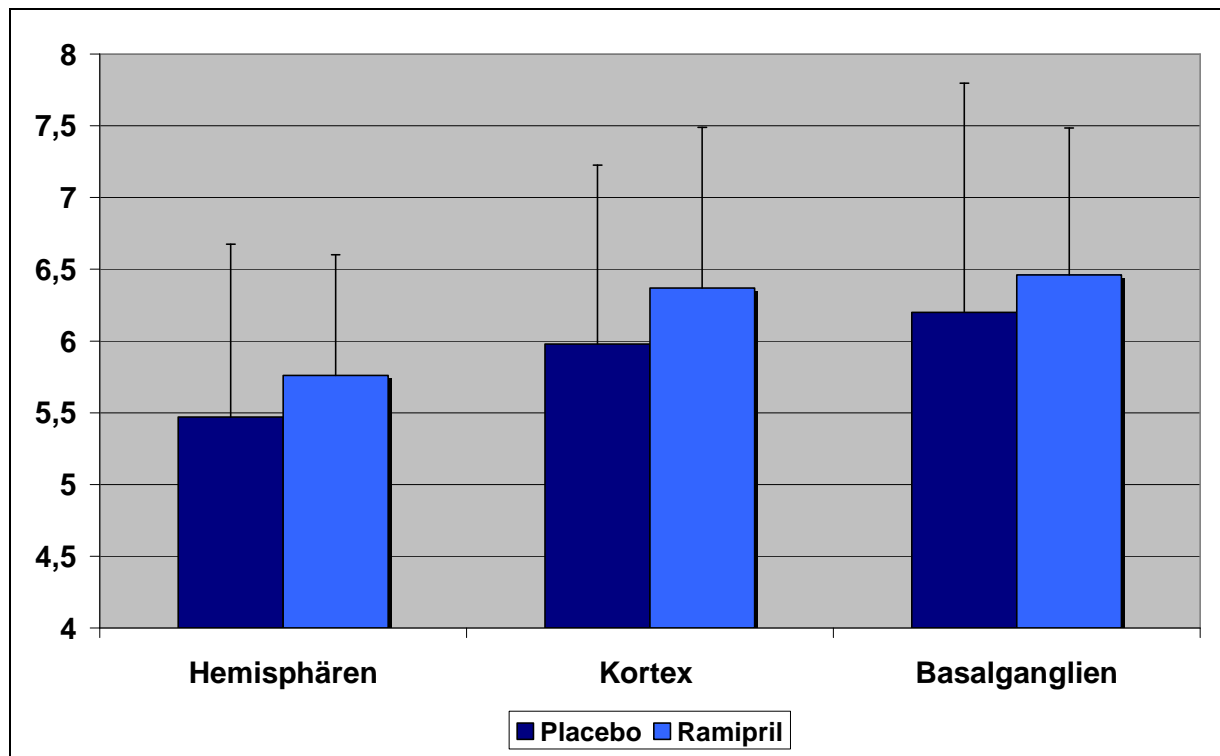


Abbildung 30: Relative Gesamtfläche Calpain-positiver Zellen, 10er Objektiv. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

Dann wurde, ebenfalls mit dem 10er Objektiv, die Anzahl gefärbter Zellen bestimmt. Die Untersuchung der Hemisphären ($65,31 \pm 6,24$ in der Placebogruppe vs. $65,01 \pm 8,74$ in der Ramiprilgruppe) und des Kortex ($66,46 \pm 12,64$ vs. $65,01 \pm 15,64$) zeigte in den beiden Versuchsgruppen ähnliche Ergebnisse, und auch die Untersuchung der Basalganglien ($68,25 \pm 8,99$ vs. $59,36 \pm 22,33$) ergab wegen großer Standardabweichungen keinen statistisch signifikanten Unterschied (Abb. 31).

Im nächsten Schritt wurde zur genaueren Untersuchung des Kortex die Anzahl Calpain positiver Zellen pro Gesichtsfeld in 40facher Vergrößerung bestimmt. Strukturen, die in die Auswertung miteingehen sollten, wurden erneut manuell definiert und eingestellt. Auch hier ergaben sich jedoch mit $2,07 \pm 0,40$ Zellen in der Placebogruppe vs. $2,00 \pm 0,23$ Zellen in der Ramiprilgruppe ähnliche Werte in den beiden Gruppen (Abb. 32).

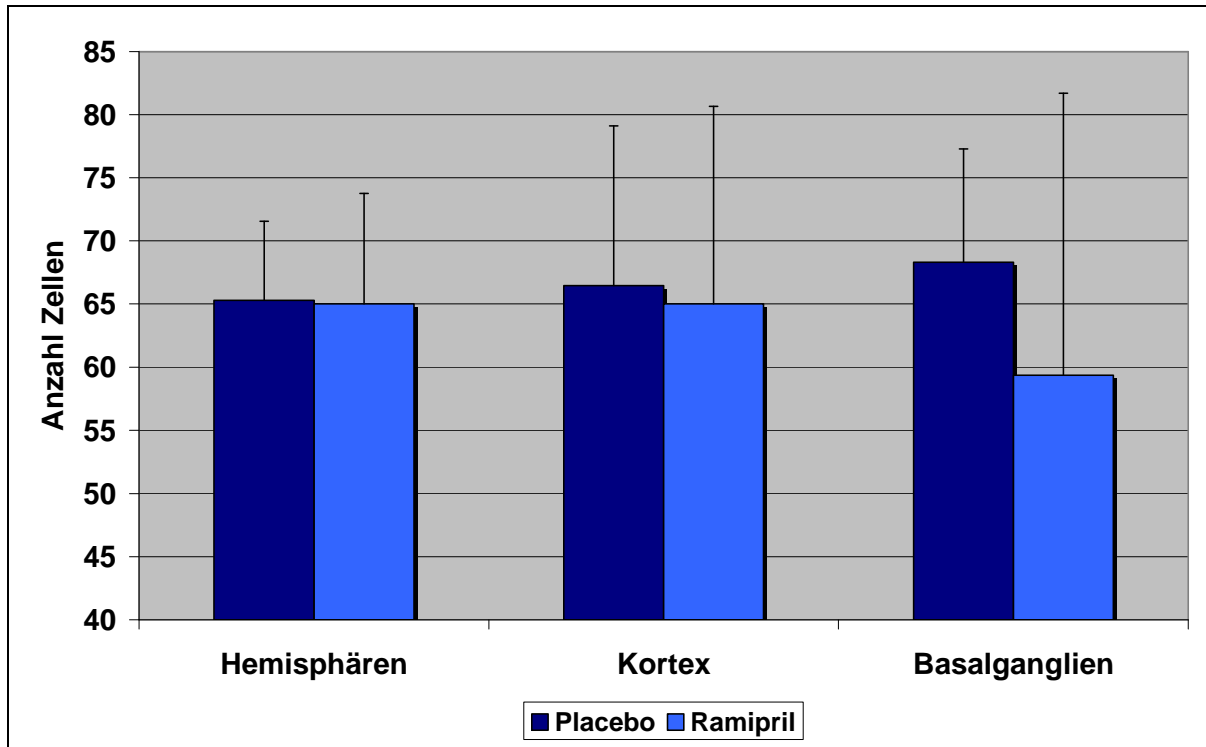


Abbildung 31: Anzahl Calpain-positiver Zellen pro Gesichtsfeld, 10er Objektiv. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen in den verschiedenen Regionen.

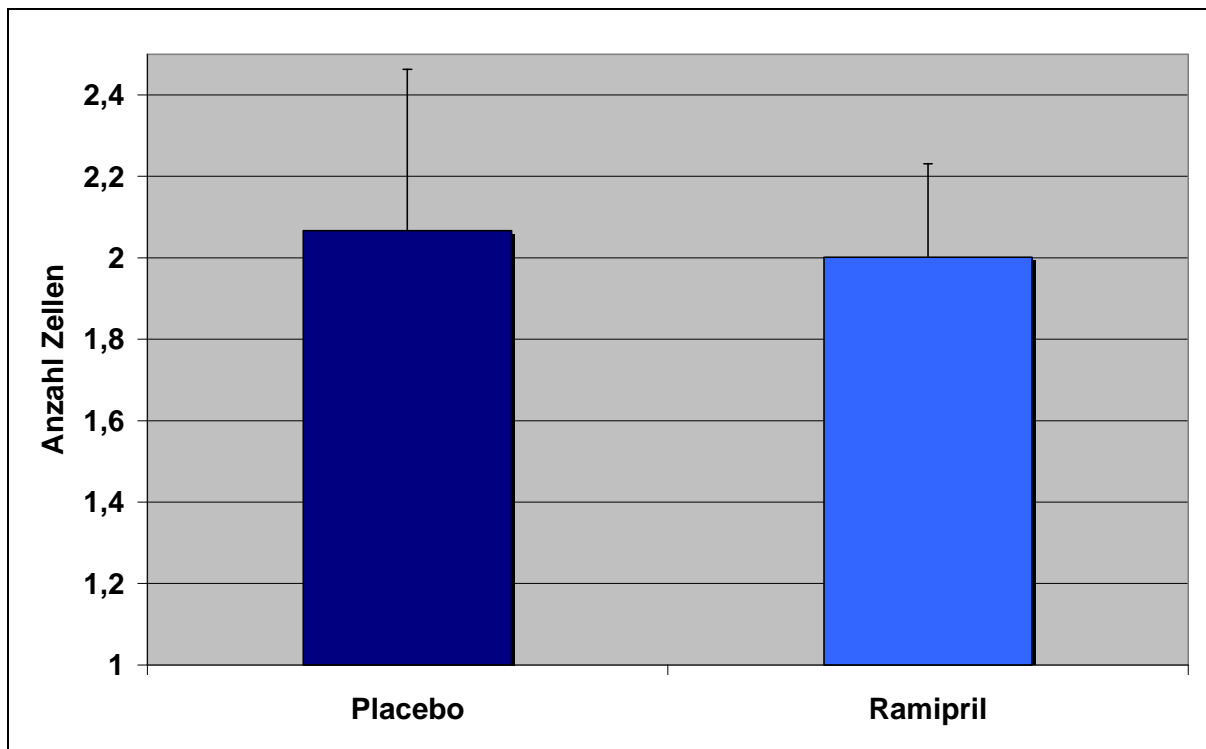


Abbildung 32: Calpaine 40er Objektiv, Zellen pro Gesichtsfeld im Kortex (ROI). Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen.

4.3.2 Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2

Um die Aktivität der Protease Calpain auf eine weitere Art darzustellen, wurden in der Placebo- und der Ramiprilgruppe immunhistochemische MAP-2 Färbungen angefertigt und lichtmikroskopisch ausgewertet. Die Vergrößerung erfolgte mit dem 10er und 40er Objektiv. Es wurde daraufhin überprüft, ob sich im Schnitt auffällige Farbverminderungen, insbesondere in Kortex und Basalganglien, als Ausdruck für den Abbau von MAP-2 durch Calpain finden ließen.

Makroskopisch zeigten sich bei allen Tieren homogen und intensiv gefärbte Schnitte, die keinen Hinweis auf MAP-2 Demarkierung gaben (Abb. 33 + 34). Dies konnte lichtmikroskopisch bestätigt werden, denn auch dabei ließ sich unabhängig der Vergrößerung, der Region und der Versuchsgruppe keine verminderte Farbintensität nachweisen.

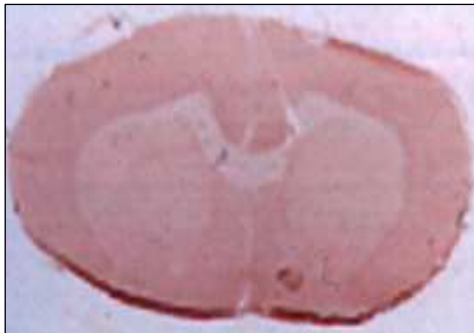


Abbildung 33: Beispiel für eine MAP-2 Färbung in der Placebogruppe

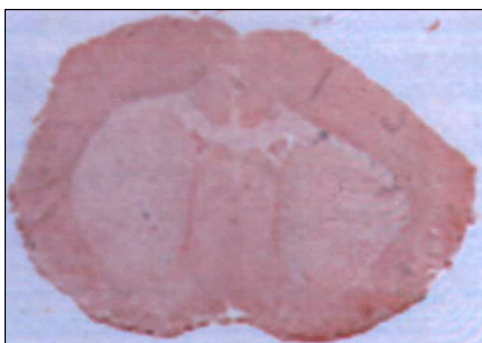


Abbildung 34: Beispiel für eine MAP-2 Färbung in der Ramiprilgruppe

5. Diskussion

In dieser Arbeit wurde der Einfluss des ACE-Hemmers Ramipril einerseits auf die zerebrale vaskuläre Extrazellulärmatrix und andererseits auf neuronale Hirnstrukturen von SHR-SP untersucht.

5.1 Analyse der Basalmembran

Im ersten Teil der Arbeit analysierten wir zwei der Hauptbestandteile vaskulärer Basalmembranen, das strukturgebende Protein Kollagen Typ IV und das Glykoprotein Laminin.

5.1.1 Kollagen IV

Durch die Gabe des ACE-Hemmers Ramipril kam es zu einer signifikanten Verminderung von Kollagen Typ IV in der Basalmembran behandelter Tiere verglichen mit den unbehandelten hypertensiven Tieren. Dies konnte sowohl im Western-Blot, in der immunhistochemischen Färbung als auch in der konfokalen Laser-Raster-Mikroskopie gezeigt werden. Außerdem wurde beobachtet, dass das Verhältnis zwischen der Dicke der Basalmembran und dem Gefäßlumendurchmesser bei den Ramipril behandelten Tieren signifikant niedriger war als in der Kontrollgruppe. Die Behandlung mit dem ACE-Hemmer war dabei so effektiv, dass die Kollagenbestimmung behandelter Tiere beinahe gleiche Werte wie die der normotensiven Kontrollgruppe ergab.

Verschiedene frühere Studien haben sich mit den morphologischen Veränderungen zerebraler Gefäße unter physiologischen und pathologischen Umständen beschäftigt. So konnte gezeigt werden, dass es im Laufe des Alterungsprozesses sowohl beim Tier¹⁶⁴ als auch beim Menschen¹⁶⁵ zu einer verstärkten Einlagerung von Kollagen in die Basalmembran zerebraler Mikrogefäße kommt, die daher ein vergleichsweise kleineres Lumen aufweisen. Die Gefäßanzahl ist außerdem vermindert. Beim Menschen ließ sich diesbezüglich jedoch kein Unterschied bei hypertensiven und nicht-hypertensiven Personen feststellen¹⁶⁵. Ein Zusammenhang der Kollageneinlagerung mit der Entwicklung kognitiver Defizite wird angenommen. Auch bei anderen nicht-hypertensiven Erkrankungen, wie beispielsweise der HIV- Enzephalopathie, kommt es zu Veränderungen der Gefäßmorphologie, wobei sich

widersprechende Ergebnisse finden. In einer Studie ergab die Basalmembrananalyse eine Verdickung¹⁶⁶, in einer anderen jedoch erwies sich der Kollagengehalt als insgesamt vermindert, was mit einer Ausdünnung der Basalmembran in Verbindung gebracht wurde¹⁶⁷. Diese Ausdünnung der Basalmembran konnte bei AIDS-Patienten auch mithilfe der Elektronenmikroskopie nachgewiesen werden. Beide Studien schlussfolgern aus ihren Ergebnissen, dass die Veränderung der Basalmembranzusammensetzung das morphologische Pendant zur Blut-Hirn-Schrankenstörung darstellt. Mehrere andere Arbeiten haben sich außerdem mit den Folgen chronischer Hypertonie der zerebralen Gefäße befasst. In den Arteriolen des Kortex und der Basalganglien von SHR-SP kam es zu einer verdickten Basalmembran, einer Ablagerung von Kollagenfibrillen und einem Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schrankenfunktion¹⁶⁸. Aufgrund der nur geringfügig vorhandenen, kurzstreckigen Veränderungen und der Lokalisation der Gefäßveränderungen in den Versorgungsgrenzgebieten wurde jedoch davon ausgegangen, dass noch andere Faktoren als die chronische Hypertonie an den Veränderungen beteiligt sind. In dieser Arbeit konnte kein direkter Zusammenhang zwischen der Dicke der Basalmembran und dem Anteil an Kollagen Typ IV hergestellt werden. Eine andere Arbeit konnte zeigen, dass es in den pialen und basalen Arterien von SHR-SP zu einem vergrößerten Tunica media – Gefäßlumen Verhältnis kam, was bei moderater Hypertonie entweder auf eine verdickte Media oder einen geringeren inneren Gefäßdurchmesser, bei schwerer Hypertonie jedoch beinahe ausschließlich auf einen geringeren inneren Gefäßdurchmesser zurückzuführen war¹⁶⁹. Spezifische Marker für das veränderte Wand-Lumen Verhältnis wurden jedoch auch hier nicht näher untersucht. Ähnliche Resultate erhielt eine Arbeit von Ferrante et al.¹⁷⁰, die zusätzlich zu der Bestimmung des Media - Lumen Durchmessers noch den Effekt des Antihypertonikums Darodipine, eines Kalzium Kanal Inhibitors, auf piale Arterien untersuchte. Es zeigte sich, dass die antihypertensiv behandelten Tiere nach 3 Monaten einen größeren Lumendurchmesser, eine dünnere Tunica Media und ein geringeres Media - Lumen Verhältnis aufwiesen als nicht behandelte Tiere. Im Gegensatz zu Ferrantes Studie erhielten die hypertensiven Versuchstiere in einer Studie von Hajdu et al.³ jeweils 3 Monate lang die Antihypertonika Cilazapril, einen ACE-Hemmer, oder den Vasodilatator Hydralazin. Auch hier konnte eine verminderte piale Gefäßwanddicke, ein größerer externer Gefäßdurchmesser und zusätzlich ein verminderter intraluminaler arterieller Druck festgestellt werden, wobei Cilazapril, abgesehen von der Reduktion der Gefäßwanddicke, bei der beide Antihypertonika gleich effektiv waren, bessere Wirkungen zeigte als Hydralazin. Harper et. al.¹⁷¹ konnte ebenfalls bestätigen, dass eine antihypertensive Therapie bei chronischer Hypertonie einen protektiven Effekt auf zerebrale

Arteriolen hat, auch wenn diese erst verhältnismäßig spät begonnen wird. In seiner Arbeit wurden SHR im Alter von 18-19 Wochen jeweils 25 ± 1 Tage lang mit Hydralazin, Reserpin oder Chlorothiazid behandelt, was in einem größeren Durchmesser der Arteriolen, einer geringeren Dicke der Tunica media und einem verminderten intraluminalen Druck resultierte. Es wurde jedoch auch beobachtet, dass hypertensive Tiere unabhängig der Therapie eine erhöhte Resistance in den größeren zerebralen Gefäßen aufwiesen. Klassenspezifische Vorteile der einzelnen Antihypertonika wurden nicht erkannt. In einer weiteren seiner Arbeiten konnte gezeigt werden, dass Antihypertonika auch bei renaler Hypertonie protektive Wirkungen entfalten, die Art der Hypertonie also nicht ausschlaggebend für den Erfolg einer Therapie ist¹⁷².

Trotz der bekannten Zunahme des Gefäßwand-Gefäßlumen Verhältnisses durch einen verdickten Intima-Media Komplex haben sich bisher nur wenige Studien mit den Veränderungen der Zusammensetzung der Basalmembran in zerebralen Gefäßen befasst. Eine dieser Studien untersucht die Expression der Extrazellulärmatrixproteine Prokollagen und Kollagen IV in humanen intrazerebralen und meningealen Gefäßen verschiedener Größe¹⁷³. Bei hypertensiven Individuen zeigte sich ubiquitär eine deutliche Zunahme von Kollagen in der Intima und Media, und beide Schichten, v.a. aber die Basalmembran, schienen verbreitert. Auch Nag et al. konnte eine Zunahme extrazellulärer Matrixproteine unter chronischer Hypertonie nachweisen⁶. Im Unterschied untersuchte er jedoch zerebrale Arteriolen von Wistar-Kyoto-Ratten, die nach einer Operation unter renaler Hypertonie litten. Zwei Wochen nach der Operation wurde die Hälfte der Tiere 5 Wochen lang mit dem ACE-Hemmer Enalapril behandelt. Auch hier konnte beobachtet werden, dass behandelte Tiere eine vergleichsweise verminderte Expression von Kollagen in pialen und intrazerebralen Arteriolen aufwiesen. Bei den nicht behandelten Tieren zeigte sich außerdem, dass parallel zu den Arealen mit der höchsten Immunreaktivität für Kollagen der Nachweis von Serumproteinen als Ausdruck für die Blut-Hirn-Schrankenstörung ebenfalls am höchsten war. Eine andere Studiengruppe konnte bei der Untersuchung pialer Arteriolen von SHR-SP feststellen, dass es zwar zur Hypertrophie kam, diese aber hauptsächlich durch die elastischen Komponenten wie Elastin oder glatten Gefäßmuskel bedingt war, wohingegen sich der Kollagengehalt nicht änderte bzw. sogar abnahm. Dies steht im Gegensatz zu den meisten anderen Arbeitsergebnissen, was damit erklärt zu werden versucht, dass zerebrale Arteriolen verhältnismäßig mehr glatte Muskelzellen und weniger Kollagen enthalten als größere Arterien⁶⁵. Diese spezielle Zusammensetzung soll auch die mit Hinsicht auf die Hypertrophie

paradoxe Dehnbarkeit arteriöler Gefäße bedingen. Die gleiche Arbeitsgruppe untersuchte einige Jahre später spontan hypertensive Mäuse im Vergleich mit transgenen Mäusen, die durch eine Überexpression von Renin und Angiotensin einen erhöhten Blutdruck hatten. Dabei konnte entdeckt werden, dass die spontan hypertensiven Mäuse zwar genau wie die transgenen Mäuse eine Hypertrophie der zerebralen Arteriolen zeigten (gemessen an der Gefäßwanddicke), es jedoch nicht zum Remodelling (gemessen am externen Gefäßdurchmesser) kam¹⁷⁴. Daraus wurde geschlossen, dass das Renin-Angiotensin-Aldosteron System eine wichtige Rolle beim vaskulären Remodelling unter chronischer Hypertonie spielt.

Die meisten der oben angeführten Arbeiten haben sich mit der Analyse von zerebralen Arteriolen beschäftigt, doch sind es vermutlich hauptsächlich die kapillären Gefäße, die am mikrovaskulären Schaden beteiligt sind. Diese sind zudem um ein vielfaches zahlreicher als die Arteriolen. Daher mag die in dieser Arbeit gewählte Analyse von Kapillaren mehr Informationen über Basalmembranveränderungen unter ACE-Hemmern geben als die der Arteriolen. Desweiteren ist die von uns gewählte Zeitspanne der antihypertensiven Therapie deutlich länger als die der meisten vergleichbaren Studien. Da auch die meisten hypertensiven Patienten längere Zeit medikamentös behandelt werden, mögen der Ansatz dieser Arbeit daher eher dem humanen Modell entsprechen und Ergebnisse auf den Menschen übertragbar sein. Ein weiterer Vorteil ist die Verwendung mehrerer verschiedener Methoden zum Nachweis der Reduktion von Kollagen Typ IV in der Basalmembran zerebraler Gefäße, während andere Studien meist nur eine Methode anwandten. Beispielsweise wurde die Analyse des Wand-Lumen Verhältnisses häufig als einziger Parameter für die Gefäßwandhypertrophie untersucht^{170,171}. Die Ergebnisse unserer Studie bestätigen daher einerseits schon bekannte Fakten, gehen andererseits aber durch die gleichzeitige Bestimmung von Gefäßanzahl, Kollagen-positiver Fläche in einer bestimmten ROI und den Gebrauch der konfokalen Laser-Raster-Mikroskopie darüber hinaus. Soweit bekannt hat bisher keine andere Studie eine quantitative und qualitative Verminderung von Kollagen Typ IV in zerebralen Mikrogefäßen nachgewiesen, weder bei lang- oder kurzfristiger Gabe von ACE-Hemmern.

Da auch Studien mit anderen Antihypertensiva wie Reserpin, Hydralazin oder Chlorothiazid zu ähnlichen Resultaten kamen^{171,172}, scheint vor allem der Einfluss eines erhöhten Blutdrucks auf die Zusammensetzung der Extrazellulärmatrix fundamental¹⁷⁵ und die Ergebnisse dieser Arbeit hauptsächlich darauf zurückzuführen zu sein. Auf der anderen Seite ist es gut möglich,

dass weitere Faktoren als nur die Senkung des erhöhten Blutdrucks mitverantwortlich sind: Himeno et al. beispielsweise zeigten, dass bereits durch eine subtherapeutische, nicht-antihypertensive ACE-Hemmer Gabe die Level der mRNA für die Synthese von extrazellulären Matrixproteinen sanken¹⁷⁶. Am Umbau der Extrazellulärmatrix scheinen außerdem Proteasesysteme wie das Plasmin-Plasminogen System oder die Metallomatrixproteasen beteiligt zu sein^{163,177}, deren Aktivität tierexperimentell durch die Gabe eines ACE-Hemmers vermindert werden konnte¹⁷⁸. Unklar bleibt derzeit jedoch noch, ob ein direkter Einfluss der Proteasesysteme auf die Gefäßstruktur besteht.

Ob die Verminderung von Kollagen IV bei Ramipril behandelten Tieren in dieser Arbeit auf eine verminderte Synthese oder vermehrten Abbau zurückzuführen ist, bleibt zurzeit noch offen und sollte in weiteren Studien untersucht werden.

5.1.2 Laminin

Analog den Kollagenstudien wurden Ramipril behandelte Tiere mit unbehandelten Tieren hinsichtlich des Laminin gehalts der Basalmembranen, dem Laminin gehalt pro Gefäß und der Anzahl an Laminin positiven Gefäßen verglichen. Die beiden Gruppen unterschieden sich weder signifikant in den Laminin positiven Flächen, der Gefäßanzahl noch im Laminin gehalt pro Gefäß, was sowohl in der klassischen Immunhistochemie als auch der Immunfluoreszenz bestätigt werden konnte. Bei den Ramipril behandelten Tieren zeigte sich jedoch ein Trend zu insgesamt mehr Gefäßen und einem höheren Laminin gehalt pro Gefäß.

Nur wenige Studien haben sich bisher mit den Auswirkungen von Hypertonie auf die Laminin expression beschäftigt, und nur in zwei Fällen wurden zerebrale Gefäße analysiert.

In einer Arbeit wurden die Auswirkungen einer portalen Hypertonie auf die Lebersinusoiden untersucht. Im Tierversuch konnte gezeigt werden, dass es in Sinusoiden von Ratten mit hepatischer Fibrose mit Zunahme der portalen Hypertonie zu einer Zunahme von Laminin kommt¹⁷⁹. In diesem Fall wurden zwar keine zerebralen Gefäße untersucht, doch konnte ein direkter Zusammenhang von Hypertonie und einer Zunahme von Laminin in der Basalmembran von Blutgefäßen hergestellt werden. Nag et al. wies tierexperimentell nach, dass es bei Ratten, die unter operativ herbeigeführter renaler Hypertonie litten, zu einer Zunahme des Laminin gehalts in den zerebralen vaskulären Basalmembranen und vermehrter Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke in Kortex und Basalganglien kam und dies durch die Gabe des ACE-Hemmers Enalapril stark gemindert werden konnte^{6,180}. Im Gegensatz zu

unserer Arbeit wurden jedoch zerebrale Arteriolen untersucht, die Überlebenszeit der Ratten unter Hypertonie war sehr viel kürzer, und der ACE-Hemmer wurde nur für wenige Wochen gegeben. Außerdem wird ein Vergleich durch die mangelnde Altersangabe der Versuchstiere zu Beginn des Versuchs erschwert. Ähnliche Resultate wie Nags Arbeit ergab eine postmortale Untersuchung von humanen zerebralen Gefäßen inklusiv der Kapillaren: Die Basalmembran der Versuchsgruppe mit chronischer Hypertonie war deutlich verdickt im Vergleich mit der normotensiven Kontrollgruppe, was sowohl auf einen erhöhten Kollagen-IV- als auch Lamininegehalt der Basalmembran zurückgeführt werden konnte¹⁷³.

Die Ergebnisse unserer Arbeit stehen damit im Gegensatz zu diesen früheren Studien, da es trotz des erhöhten Blutdrucks in der Placebogruppe nicht zu einer Zunahme von Laminin kam, sondern im Gegenteil eher ein Trend zu weniger Laminin pro Gefäß und weniger Gefäßen zu beobachten war. Es stellt sich die Frage, in welchem Verhältnis Laminin in der EZM vaskulärer Gefäße unter physiologischen Umständen überhaupt vorhanden ist und wie sich die Expression im Laufe der Zeit verändert⁵⁹. Poschl et al. wies nach, dass eine hauptsächlich aus Laminin bestehende Basalmembran in frühen Entwicklungsphasen als basalmembran-ähnliche Matrize ausreicht, später jedoch die Integration von Kollagen IV für Integrität, Stabilität und Funktion unerlässlich ist⁶⁰. Es wäre also denkbar, dass in unterschiedlichen Entwicklungsphasen auch unterschiedliche Isoformen der Laminine vorherrschen, die verschiedene Reaktionen auf erhöhten Druck in den Blutgefäßen zeigen. Wenn unsere Versuchstiere sich altersgemäß in einer anderen Entwicklungsphase als die Tiere anderer Studien befänden, würde dies erklären, weshalb die Ergebnisse unterschiedlich ausfallen.

Eine weitere wichtige Überlegung ist, inwiefern sich ein nur kurzzeitig erhöhter Blutdruck⁶ anderweitig auswirken mag als, wie in diesem Fall, längerfristige Hypertonie. Versuchstiere, die vormals einen normalen Blutdruck aufwiesen, mögen auf plötzliche Druckerhöhung in den Blutgefäßen anders reagieren als Tiere, die Zeit ihres Lebens hypertensive Werte hatten. Jedoch auch die Patienten, die Roggendorf in seine Studie aufnahm¹⁷³, litten sehr wahrscheinlich schon längere Zeit unter Hypertonie, was diese These eher unwahrscheinlich erscheinen lässt.

Andererseits passt unsere Arbeit durch den Trend zu insgesamt mehr Gefäßen und mehr Laminin pro Gefäß in der Ramiprilgruppe gut zu den Arbeitsergebnissen, die einen Lamininverlust bei akuter Ischämie und im Laufe des Alterungsprozesses zeigen^{9,86}. Beide

gehen mit einem Verlust der mikrovaskulären Integrität einher. Bei unseren hypertensiven Versuchstieren mögen bei einer durchschnittlichen Lebenserwartung von 1,5 Jahren im Alter von 6 Monaten durchaus schon erste Alterserscheinungen aufgetreten sein, wohingegen die Ramipril behandelten normotensiven Tiere eine höhere Lebenserwartung haben und der Prozess daher erst später beginnen mag.

Denkbar wäre allerdings auch, dass die chronische Hypertonie erste Folgen von zerebraler Minderdurchblutung nach sich gezogen hat, die zwar noch keine erkennbaren ischämischen Infarkte bewirkt (s. Calpain und MAP-2), aber dennoch bereits zu einem geringfügigen Lamininverlust geführt hat. Eine Degradation von Laminin mit anschließendem Zellschaden kann dabei sowohl durch das Plasmin-Plasminogen System⁸⁷ wie auch die Metallomatrixproteasen, insbesondere MMP-9^{88,89}, erfolgen. Eine längere Überlebenszeit der Tiere hätte durch deutlichere Ischämiezeichen vielleicht darüber Aufschluss gegeben. Ob es sich bei den Ergebnissen dieser Arbeit primär um die Folgen zerebraler Minderperfusion, einen einsetzenden Alterungsprozess oder eine Kombination von beidem handelt, kann nicht sicher beantwortet werden und bedarf weiterer Studien.

5.2 Calpain und sein Substrat MAP-2

Im zweiten Teil der Arbeit wurden neuronale Zellen hinsichtlich der intrazellulären Protease Calpain und ihres Substrats MAP-2 untersucht. Bei der Analyse der μ -Calpain positiven Zellen und der μ -Calpain positiven Fläche in den Hemisphären, im Kortex und den Basalganglien ergaben sich keinerlei Unterschiede in den beiden Versuchsgruppen. Die Analyse der MAP-2 Färbungen bestätigte diese Ergebnisse. Während sich normalerweise bei neuronalen Schäden wie z.B. nach ischämischen Infarkten in der MAP-2 Färbung bereits makroskopisch eine deutliche Farbminderung findet, konnte in unserer Arbeit weder mikro- noch makroskopisch eine Demarkierung des Substrats MAP-2 gefunden werden. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass unter den gegebenen Studienbedingungen eine arterielle Hypertonie nicht zu einer vermehrten Expression von Calpainen und einem Abbau ihres Substrats MAP-2 als Ausdruck neuronaler Schäden führt.

Unsere Ergebnisse konnten die These zur Entstehung ischämischer Mikroinfarkte analog des Schemas

Hypertonie → autochthone Thrombose zerebraler Mikrogefäße → Calpainaktivierung → MAP-2-Degradation

nicht unterstützen. Verschiedene Ursachen sind hierfür denkbar, was im folgenden näher erläutert werden soll.

Bei chronischer Hypertonie finden sich als Ausdruck der Ischämie häufig frühe zerebrale Mikroinfarkte, die einem größeren Schlaganfall vorausgehen können^{11,181}. Da in früheren Arbeiten übereinstimmend davon berichtet wird, dass zerebrale Ischämie eine vermehrte Expression bzw. Aktivierung der Calpaine sowie eine Degradation von MAP-2 bewirkt^{13,100,129}, in unseren Versuchsgruppen jedoch keine Unterschiede bemerkbar waren, ist davon auszugehen, dass es bei unseren Versuchstieren auch nicht hypertoniebedingt zu Mikroinfarkten gekommen ist. Weshalb es trotz der sehr unterschiedlichen Blutdruckwerte in den Gruppen keinen Unterschied in der Calpaindetektion bzw. den MAP-Färbungen gab, mag mehrere Gründe haben: Zum einen ist es möglich, dass die Tiere zum Zeitpunkt des Versuchs unabhängig ihres Blutdrucks noch zu jung waren, um nachweisbare zerebrale Schäden auszubilden. Dies mag erst im späteren Leben der Tiere der Fall sein. Zwar konnte tierexperimentell bei SHR-SP bereits nach 3 Monaten eine Störung der Blut-Hirn-Schrankenfunktion festgestellt werden¹⁸², doch mag ein ischämischer neuronaler Schaden zu diesem Zeitpunkt noch zu leicht für einen immunhistochemischen Nachweis ausfallen. Erst bei größeren Infarkten mag Calpain in seiner Expression hochreguliert und damit nachweisbar werden. Da in einer früheren Studie jedoch auch schon ein sublethaler neuronaler Schaden tierexperimentell zu einem vermehrten Abbau von Calpainsubstraten führte¹⁴², erscheint dies eher unwahrscheinlich. Auch ist nicht bekannt, ob SHR-SP überhaupt auf dieselbe Art und Weise Mikroinfarkte ausbilden, wie sie beim Menschen zu beobachten sind. Im großen und ganzen sind sich die zerebralen vaskulären Strukturen von Menschen und Ratten zwar sehr ähnlich¹⁸³, und insbesondere kleinere Kollateralgefäße, die im Falle einer zerebralen Gefäßokklusion die Blutversorgung im menschlichen Gehirn gewährleisten, sind auch bei der Ratte vorhanden. Andere vaskuläre Mikrostrukturen wie die langen penetrierenden Marklagerarterien weisen die Tiere im Gegensatz zum Menschen jedoch nicht auf, weshalb unklar ist, ob eine Ischämie tatsächlich die gleichen Auswirkungen auf das umliegende Hirngewebe hat. Desweiteren muss überlegt werden, ob das Auswertungsprogramm OPTIMAS sensitiv genug für eine Calpainerkennung ist und feine Nuancen im Färbeverhalten unterscheiden kann. Das Programm wurde jedoch bestens eingestellt, manuell gegengeprüft und auch in anderen Studien erprobt¹³⁰. Ein anderer Grund könnte die Auswahl

der gefärbten Schnitte aus der Nähe des Bregmas sein, so dass frische oder auch ältere Infarkte in anderen Arealen der Detektion entgangen sein mögen. Statistisch gesehen sollten sich zufällige Unterschiede in der Lokalisierung von Infarkten aber herausmitteln, weshalb auch diese Begründung für die Ergebnisse dieser Arbeit eher unwahrscheinlich ist.

Einen weiteren Erklärungsansatz liefert eine neuere Arbeit von Averna et al., in welcher Rattenhirne auf unterschiedliche Regulationsmechanismen der Calpainaktivität überprüft wurden¹⁸⁴. Normotensive bzw. hypertensive Tiere wurden im Alter von 2 Monaten 14 Tage lang entweder mit oder ohne eine stark salzhaltige Diät ernährt und die Gruppen anschließend hinsichtlich der Calpainaktivität, dem Fodrinabbau, der Calpastatinexpression und dem Vorkommen der membranständigen Ca^{2+} -ATPase untersucht. Obgleich sich in beiden Gruppen der salzhaltig ernährten Tiere ein deutlicher Blutdruckanstieg nachweisen lies, zeigten sich lediglich ein geringgradig vermehrter Fodrinabbau sowie eine mäßige Verringerung der Ca^{2+} -ATPase als Ausdruck der Calpainaktivität, und die Calpainexpression selbst war im Vergleich zur salzfrei ernährten Gruppe nicht verändert. Die Calpastatinexpression hingegen war bei den salzhaltig ernährten Tieren deutlich reduziert, und es konnte eine Akkumulation von Calpastatinabbauprodukten der Größe 15 kDa beobachtet werden, welche jedoch weiterhin eine starke Aktivität von bis zu 50 % der ursprünglichen Calpastatinaktivität erzielten. Nach 12 Wochen andauernder salzhaltiger Diät erwiesen sich sowohl Calpastatinaktivität als auch die Expression der Ca^{2+} -ATPase annähernd auf dem gleichen Niveau wie vor Beginn der Diät, wobei die Level der schon vor Versuchsbeginn hypertensiven Tiere nur geringfügig unter denen der normotensiven Tiere lagen. Diese Angleichung konnte größtenteils auf eine erhöhte Synthese von Calpastatin- und Ca^{2+} -ATPase zurückgeführt werden. Die Calpainaktivität wurde nach 12 Wochen nicht noch einmal bestimmt. Die Autoren interpretieren ihre Ergebnisse dahingehend, dass es durch eine Blutdruckerhöhung kurzfristig zwar zu einer Verschiebung der Kalzium-Homöostase und konsekutiver Calpainaktivierung kommt, diese Aktivierung jedoch durch die Degradation von Calpastatin in das enzymatisch aktive 15 kDa Abbauprodukt inhibiert und langfristig zusätzlich noch durch die Hochregulation der Calpastatin- und Ca^{2+} -ATPase-Synthese abgeschwächt wird. Physiologische intrazelluläre Kalziumlevel können dadurch wiederhergestellt, die Aktivierung und Aktivität von Calpain vermindert und die Balance des Calpain-Calpastatin Systems aufrechterhalten bleiben.

Avernas Studie steht größtenteils im Einklang mit den Ergebnissen unserer Arbeit. Die Messungen der Calpainexpression zeigten auch bei unseren Tieren keine nennenswerten

Unterschiede trotz unterschiedlicher Blutdruckwerte, was daran liegen mag, dass es entweder noch gar nicht zu einer Imbalance im Calpain-Calpastatin System gekommen bzw. diese durch unterschiedliche Regulationsmechanismen wie beispielsweise die hemmende Aktivität der Calpastatinabbauprodukte bereits wieder ausgeglichen ist. Der erste Fall wäre dann denkbar, wenn unsere Tiere zur Zeit des Versuchs, d.h. im Alter von 6 Monaten, noch gar nicht auf die Unterschiede im Blutdruck mit einer Calpainaktivierung reagiert hätten, sie also, wie bereits oben angedacht, noch zu jung für messbare Veränderungen waren. Hierbei ist sowohl möglich, dass die Erhöhung des Blutdrucks noch zu kurz ange dauert hat, als auch dass das Calpain-Calpastatin System noch in der Lage ist, beginnende biochemische Prozesse zu kompensieren und eine übermäßige Calpainaktivierung durch ein negatives Feedback zu hemmen. Kritisch ist dabei jedoch zu sehen, dass die Tiere in Avernas Arbeit zur Zeit der Calpainbestimmung erst 14 Tagen einer Hypertonie ausgesetzt worden waren, unsere Tiere hingegen weitaus länger. Auch stammten die Tiere in Avernas Arbeit aus einer anderen Zuchtreihe als die unseren (Milan Ratten vs. Wistar-Kyoto Ratten SHR-SP) und zeigten im Vergleich um 20 mmHg höhere maximale Blutdruckwerte (170 mmHg vs. 190 mmHg). Somit bleibt unklar, bei welchen Tieren wahrscheinlich eher mit einer Calpainaktivierung zu rechnen gewesen wäre. Einen Hinweis darauf mag liefern, dass es in Avernas Versuchen nach 14 Tagen zu einem wenn auch geringfügigen Abbau des Calpainsubstrats Fodrin kam, bei dem von uns gewählten Substrat MAP-2 hingegen kein Abbau nachweisbar war, so dass die Milan Ratten unter den gegebenen Versuchsbedingungen letztendlich sensitiver auf einen Blutdruckanstieg reagiert haben mögen als unsere Wistar Ratten. Möglich ist jedoch auch, dass bei unseren Tieren, wie im Falle der Milan Ratten mit langfristiger salzhaltiger Diät, im Alter von 6 Monaten bereits zelluläre Kompensationsmechanismen in Kraft getreten sind, die eine möglicherweise vorher bestehende Calpainaktivierung maskieren. Sollten beispielsweise hypertensive Tiere durch die Hochregulation der Calpastatinexpression oder der Ca^{2+} -ATPase in der Lage sein, die Kalzium-Homöostase wiederherzustellen, oder sollte das 15 kDa Calpastatinabbauprodukt auch in diesem Alter noch effektiv eine Calpainaktivierung inhibieren, würde dies die mangelnden Unterschiede in unseren Versuchsgruppen erklären. Um den genauen Nachweis dazu zu bringen, sollten in anschließenden Versuchen bei SHR-SP neben der Calpainaktivität auch das Calpastatin, seine Abbauprodukte sowie die Expression der Ca^{2+} -ATPase bestimmt werden.

Eine offensichtliche Fehlerquelle ist in der Durchführung und Auswertung unserer Versuche nicht zu finden, weshalb die Annahme, dass hauptsächlich das Alter unserer Versuchstiere

und in Verbindung damit eine wiederhergestellte Kalzium-Homöostase für den mangelnden Unterschied in der Calpainexpression verantwortlich ist, am wahrscheinlichsten erscheint.

5.3 ACE-Inhibitoren und Hypertonie

Antihypertensive Therapie, egal welcher Art, führt zu einer Reduktion des Schlaganfallrisikos¹⁸⁵, und zwar gilt: Je niedriger der Blutdruck, umso geringer das Schlaganfallrisiko⁴³. Andererseits gibt es viele Hinweise darauf, dass bestimmte antihypertensive Substanzgruppen wie die ACE-Hemmer das Risiko eines Schlaganfalls mehr herabsetzen, als allein von der Reduktion des Blutdrucks zu erwarten gewesen wäre^{44,175}. Auch Dosen, die an sich zu keiner wesentlichen Verbesserung des Blutdrucks führten, konnten sowohl im Tierversuch als auch in klinischen Studien die Mortalität senken^{186,187}. Unterstützt wird diese Beobachtung auch dadurch, dass genetisch determinierte hypertensive Tiere unabhängig ihres Blutdrucks vaskuläres Remodelling zeigen¹⁸⁸, eine Reduktion des Blutdrucks also nicht allein für die Verhinderung struktureller Veränderungen verantwortlich zu machen ist. Andere Effekte kommen in der Behandlung mit ACE-Hemmern anscheinend zusätzlich zum Tragen. Chronische Hypertonie, Ischämie und endotheliale Dysfunktion induzieren eine verstärkte ACE-Synthese im Gewebe, die permanente strukturelle Veränderungen wie myokardiales und vaskuläres Remodelling nach sich ziehen kann^{175,189}. ACE-Hemmer reduzieren eine kardiale Hypertrophie, wirken nephroprotektiv, antagonisieren Angiotensin-II vermitteltes Wachstum und Proliferation von glattem Gefäßmuskel, vermindern Makrophagenmigration und -funktion, wirken antioxidativ und senken die thrombotische Aktivität im Gewebe^{188,189}. Sowohl in der LIFE-Studie¹⁹⁰, der HOPE-Studie⁴² als auch in der MOSES-Studie¹⁹¹ konnte bezüglich Myokardinfarkt und Schlaganfall ein deutlicher Vorteil einer Inhibition des RAAS-Systems im Vergleich mit anderen Substanzklassen nachgewiesen werden¹⁹⁰. Desweiteren haben ACE-Hemmer im Gegensatz zu anderen Antihypertensiva nicht nur einen positiven Effekt auf den Blutdruck, sondern können auch präventiv auf Diabetes mellitus wirken¹⁹². Dies ist besonders daher von Vorteil, da Hypertonie und Diabetes mellitus im Rahmen des metabolischen Syndroms oft gemeinsam auftreten und beide einen bedeutenden kardiovaskulären Risikofaktor darstellen. Zur Frage, an welcher Stelle des RAAS-Systems durch Inhibition der beste Effekt zu erzielen ist, konnte noch kein Konsens erreicht werden. Rizzoni et al. fanden in ihrer Studie keinen Beleg dafür, dass ACE-Hemmer einen besseren Effekt als Angiotensin-II-Rezeptor Antagonisten

aufweisen. Beide senkten den Blutdruck in zufrieden stellendem Maße und konnten gleich gut eine Verringerung struktureller Veränderungen in mesenterialen Gefäßen, eine Normalisierung der Herzmasse und eine Verbesserung der Endothelfunktion erreichen¹⁹³.

Es gibt jedoch auch Skeptiker eines zusätzlichen Effekts von Hemmern des RAAS-Systems: Zwar gilt ein protektiver Effekt hinsichtlich der sekundären Entstehung eines Schlaganfalls als gesichert, doch wird dies eher der Blutdruckreduktion als einem davon unabhängigen Effekt zugeschrieben¹⁹⁴. Die Rolle der ACE-Hemmer in der Sekundärprävention eines Schlaganfalls ist somit, wie auch Davis et al. in ihrer Metaanalyse bemerkten⁵⁶, hinsichtlich ihrer Wirkung noch nicht abschließend geklärt, doch ist man sich darin einig, dass diese Substanzgruppe wegen ihres grundsätzlichen schützenden Effekts auf jeden Fall in Kombination Anwendung finden sollte¹⁸⁵.

Für diese Arbeit bedeutet das nun folgendes: 1) Die Kollagenanalyse unterstützt die Annahme, dass ACE-Hemmer eine protektive Wirkung auf zerebrale Mikrogefäße entfalten, auch wenn bezüglich eines potentiellen klassenspezifischen Vorteils keine Aussage möglich ist. 2) Auch die Trends der Lamininanalyse weisen auf eine gewisse Schutzfunktion hin, doch bestehen in den Versuchsgruppen keine signifikanten Unterschiede. 3) Theoretisch wären Unterschiede im Calpainsnachweis in den beiden Versuchsgruppen zu erwarten gewesen, was diese Arbeit jedoch nicht bestätigen konnte. Dies mag nach dem neuesten Erkenntnisstand jedoch am ehesten auf das Alter der Versuchstiere zurückzuführen sein und erlaubt daher keinen sicheren Rückschluss auf die Schutzfunktion von ACE-Hemmern.

Ob sich unsere Ergebnisse damit erklären lassen, dass Kollagen in zerebralen vaskulären Basalmembranen stärker auf chronische Hypertonie reagiert und außerdem mehr Einfluss auf die Entstehung eines Schlaganfalls hat als Laminin, oder ob sich die Expression von Laminin und Calpain erst nach längerer Zeit ändert und in dieser Arbeit daher noch keine Aussage über Langzeitschäden der Hypertonie möglich ist, bleibt derzeit offen. Auch ein zu weit fortgeschrittenes Alter der Versuchstiere, welches im Falle der Calpaine zu effektiven Kompensationsmechanismen geführt haben mag, muss diskutiert und bei nachfolgenden Studien eingeplant werden. Die Frage, ob ACE-Hemmer bei chronischer Hypertonie einen Schutzmechanismus auf das Hirngewebe ausüben, kann daher mit den von uns gewählten Markern Calpain und MAP-2 nicht eindeutig beantwortet werden, ein positiver Effekt auf Basalmembranstrukturen hingegen konnte gezeigt werden.

6. Zusammenfassung

Der Schlaganfall hat weltweit eine hohe Inzidenz und Prävalenz und rangiert zurzeit in westlichen Ländern in der Todesursachenstatistik an dritter Stelle. Einer der wichtigsten Risikofaktoren für einen Schlaganfall ist ein erhöhter Blutdruck. Es wird vermutet, dass es bei Hypertonikern zu strukturellen Veränderungen in den zerebralen Gefäßen kommt, die zum Verlust der vaskulären Integrität und konsekutivem neuronalen Zelltod führen. In diesem Zusammenhang wurde in den letzten Jahren häufig die Komposition der Basalmembran als entscheidender Faktor diskutiert. Von Interesse ist auch, inwiefern ein chronisch erhöhter Blutdruck neuronale Strukturveränderungen bewirkt, die letztendlich auch zum Zelltod führen mögen.

In Deutschland werden je nach Altersgruppe zwischen 20% und 50% der Bevölkerung mit Antihypertensiva behandelt, wovon wiederum jeder dritte ACE-Hemmer in Monotherapie und mehr als jeder zweite ACE-Hemmer in Kombination mit anderen Präparaten erhält. Aus diesem Grund wählten wir in dieser Arbeit den ACE-Hemmer Ramipril für unsere Versuchsreihen. Der blutdrucksenkende Effekt der ACE-Hemmer ist unbestritten, doch sind eventuell vorhandene klassenspezifische Wirkungen, die einen zusätzlichen Schutz bedeuten könnten, noch nicht genau geklärt und deshalb Gegenstand zahlreicher Forschungsprojekte.

In dieser Arbeit wurde untersucht, wie sich die Gabe von ACE-Hemmern bei chronischer Hypertonie auf gewisse Hirnstrukturen auswirkt. Als geeignetes Tiermodell für diese Fragestellung boten sich SHR-SP an, die, genetisch determiniert, im Laufe ihres Lebens an maligner Hypertonie erkranken und meist früh an einem Schlaganfall versterben. Es stellte sich die Frage, ob es bezüglich der Zusammensetzung der zerebralen Basalmembranen von Blutgefäßen und der neuronalen Strukturen zu Unterschieden kommt, wenn eine Gruppe SHR-SP mit dem ACE-Hemmer Ramipril, die andere hingegen mit einem Placebo behandelt wird.

Im ersten Teil der Arbeit ging es um die Zusammensetzung der zerebralen vaskulären Basalmembran. Mittels unterschiedlicher Nachweisverfahren wurden zwei essentielle Bestandteile der Basalmembran untersucht, zum einen das strukturegebende Protein Kollagen Typ IV und zum anderen das Glykoprotein Laminin.

Für die Kollagenanalyse wurden mithilfe der Immunhistochemie der Durchmesser von Basalmembran und Gefäßlumen, deren Verhältnis, die absolute Anzahl an Kollagen IV gefärbten Gefäßen sowie die Kollagen IV positive Gesamtfläche bestimmt. Anhand der

letzteren beiden Parameter konnte zusätzlich die Menge an Kollagen pro Gefäß berechnet werden. Es zeigte sich, dass in der Ramiprilgruppe die Basalmembran dünner ($3,2 \pm 0,8 \mu\text{m}$ vs. $3,9 \pm 0,5 \mu\text{m}$, $p < 0,0001$), das Gefäßlumen größer ($4,6 \pm 0,4 \mu\text{m}$ vs. $3,0 \pm 0,3 \mu\text{m}$) und das Verhältnis von Basalmembran zu Gefäßlumen signifikant kleiner war als bei den hypertensiven Tieren ($0,69 \pm 0,13$ vs. $1,31 \pm 0,08$, $p < 0,0001$). Der Kortex behandelte Tiere wies signifikant mehr Gefäße pro Gesichtsfeld auf ($23,4 \pm 1,0$ vs. $20,4 \pm 2,0$, $p < 0,05$) und ergab eine geringere Menge von Kollagen pro Gefäß ($0,54 \pm 0,04$ vs. $0,60 \pm 0,08$, $p < 0,05$). Die relative Kollagen-positive Fläche hingegen war in allen Versuchsgruppen vergleichbar. In den Basalganglien zeigte sich weder in der Anzahl der Gefäße, der relativen Kollagen-positiven Fläche noch der Menge von Kollagen pro Gefäß in den Gruppen ein signifikanter Unterschied.

Mithilfe der Immunfluoreszenz konnten die Ergebnisse der Immunhistochemie bestätigt werden. Ramipril behandelte Tiere zeigten mit $94,5 \pm 7,9$ im Vergleich zu den hypertensiven Tieren ($115 \pm 5,0$) eine signifikante Reduktion der Intensität von $18,1 \pm 4,7\%$ ($p < 0,0001$).

Auch im Western Blot war der Gehalt von Kollagen IV bei den Ramipril behandelten Tieren verglichen mit den unbehandelten Tieren deutlich um 51% vermindert (7775 ± 1340 vs. 15438 ± 2504 , $p < 0,001$).

Die immunhistochemischen Lamininfärbungen wurden hinsichtlich der Gefäßanzahl, der relativen Laminin-positiven Fläche in den Hemisphären, im Kortex und den Basalganglien sowie dem Lamininegehalt pro Gefäß untersucht. Es zeigte sich weder in der Gefäßanzahl noch der relativen Laminin-positiven Fläche ein signifikanter Unterschied, doch konnte in der Bestimmung von Laminin pro Gefäß bei den behandelten Tieren ein Trend zu größeren Werten beobachtet werden (Kortex $0,88 \pm 0,08$ vs. $0,86 \pm 0,02$, Basalganglien $0,90 \pm 0,06$ vs. $0,85 \pm 0,08$). Auch in der genaueren Analyse von Kortex und Basalganglien konnte hinsichtlich der Gefäßanzahl kein Unterschied in den beiden Gruppen festgestellt werden, jedoch zeichnete sich insgesamt eine Tendenz zu mehr Gefäßen bei Ramipril behandelten Tieren ab (Basalganglien $2,48 \pm 0,41$ vs. $2,22 \pm 0,33$, $p = 0,239$; Kortex $2,34 \pm 0,36$ vs. $2,08 \pm 0,27$, $p = 0,199$). Eine in dieser Gruppe signifikant niedrigere Laminin-positive Fläche im Gesamtkortex konnte bei der genaueren Bestimmung der ROIs nicht bestätigt werden. In der Immunfluoreszenz ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in den beiden Versuchsgruppen, doch war hier ein leichter Trend zu einer geringeren Intensität in der Ramiprilgruppe zu erkennen ($24,24 \pm 5,26$ vs. $28,13 \pm 7,82$).

Im zweiten Teil der Arbeit wurden neuronale Strukturen hinsichtlich der Expression der Protease Calpain analysiert. Neben dem direkten Nachweis von Calpain war der Nachweis seines Substrats MAP-2 von Interesse.

Beide Versuchsgruppen wurden in verschiedenen Vergrößerungen auf die Anzahl der Calpain positiven Zellen im Kortex sowie der gesamten Calpain gefärbten Fläche in Hemisphären, Kortex und Basalganglien untersucht. Sowohl in der Gesamtfläche der Calpain positiven Fläche wie auch der Anzahl der gefärbten Zellen bestand unabhängig der Lokalisation kein signifikanter Unterschied. Die zusätzliche Untersuchung des Kortex in stärkerer Vergrößerung erbrachte keine weiteren Ergebnisse. Auch die immunhistochemische Färbung mit MAP-2 konnte bekräftigen, dass es nicht zu einer Calpainaktivierung gekommen war, da weder mikro- noch makroskopisch eine Demarkierung des Substrats zu entdecken war.

Diese Arbeit zeigt, dass die Behandlung mit dem ACE-Hemmer Ramipril bei SHR-SP zu einer signifikanten Verminderung im Kollagen Typ IV Gehalt der Basalmembran führt und dass das Verhältnis von Basalmembrandicke zu Gefäßlumendurchmesser geringer ist. In der Lamininanalyse konnte in der Ramiprilgruppe ein Trend zu mehr Laminin pro Gefäß und insgesamt mehr gefärbten Gefäßen beobachtet werden, jedoch bestand kein signifikanter Unterschied. Die Gabe von Ramipril hat unter den in dieser Arbeit gewählten Versuchsbedingungen keine signifikante Wirkung auf die Expression von Calpain.

Trotz der nicht eindeutigen Ergebnisse scheinen extrazelluläre Matrixproteine und darunter insbesondere Kollagen IV eine wichtige Rolle in der Reaktion zerebraler Gefäße auf chronische Hypertonie zu spielen und ACE-Hemmer in der klinischen Anwendung zur Verhinderung struktureller Veränderungen sinnvoll zu sein.

7. Anhang

7.1 Material

7.1.1 Geräte

Bildanalysesoftware:	„OPTIMAS 6.1“	Optimas Version 6.5, Media Cybernetics, Silver Spring, USA
	Medmo	Homburg/Saar, D
Bildanalysekomponenten:	Computer:	Pentium III, 500 MHz
	Kamera:	Sony, Power HAD, 3CCD Color Video Camera
	Mikroskop:	Zeiss, Axioskop 2, HAL 100 Fluoreszenzlampe HBO 50/AC, Göttingen, D
	Mikroskoptischkontrolle:	Multicontrol 2000
:	Objektive:	Zeiss, Plan Neofluar 5x, 10x, 20x, 40x, 100x, Göttingen, D
	Installation:	Weiss Imaging Solutions, Olching, D
Brutschrank:		Heraeus Instruments Function line Type B12, Hanau, D
Konfokales Laser-Raster- Mikroskop (CLSM):		Leica, Heidelberg, D
Kryostat:		CM 3000, Leica
pH-Meter:		WTW, Multical pH 526
Pipetten:		Eppendorf research, Hamburg, D
Rührer:		Colora Magnetomix, Colora Messtechnik GmbH, Lorch/Württemberg, D
Rüttler:		Heidolph Reax 2000, Ludwigshafen, D
Scanner:		EPSON Perfection 1240C
Western Blot Analyse:	Tina, Version 2.08	Raytest Isotopenmeßgeräte GmbH, München, D
Waage:		Sartorius und Sartorius Micro M 500P, Göttingen, D
Zentrifugen:		Mikroliter-Zentrifuge Typ 2027, Hettlich, Tuttlingen, D

7.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tiere:	
Ramipril- und Placebogruppe:	Wistar Ratten, SHR-SP, Møllegaard, Dänemark
Kontrollgruppe:	Wistar Ratten, Charles River Laboratories, Sulzfeld, D

Chemikalien:	
Alkohol	Klinikumsapotheke
Aprotinin	Sigma
Aqua dest.	Millipore H ² O
Azeton	Merck
Diaminobenzidin	Sigma
CAPS	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Cyclohexylamino-1-Propanschwefelsäure	Sigma
Chloroform	Merck
CoCl ₂	Merck
Gelatine	Sigma
Glycerin	Sigma
Kaliumdihydrogenphosphat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, D
Leupeptin	Sigma
Milchpulver	Fluka
Natriumazid	Sigma
Natriumchlorid	Merck
Natriumdihydrogenphosphat	Merck
Natriumhydrogenphosphat	Merck
NiSO ₄	Merck
PMSF	Roth
Salzsäure	Merck
Sodium Pentobarbital	Merck
Thimerosal	Sigma
Wasserstoffperoxid	Merck
Xylene	Merck
Tierseren:	
Pferdeserum	Vector, Wiesbaden, D
Rinderserum Albumin (BSA)	Sigma

7.1.3 Antikörper

Primäre Antikörper:

1) Immunhistochemie:

Antigen	Wirt	Verdünnung	Herkunft
Kollagen IV	Ziege	1:800	Dunn, Southern Biotechnology Associates, Inc., USA
Laminin	Kaninchen	1:800	Dako A/S, Glostrup, Dänemark
MAP 2	Kaninchen	1:800	Chemicon, Hofheim, D
Calpain 1	Kaninchen	1:400	Calbiochem, San Diego, USA

2) Western Blot:

Antigen	Wirt	Verdünnung	Herkunft
Kollagen IV	Ziege	1:1000	Southern Biotechnology, Birmingham, AL, USA

Sekundäre Antikörper:

1) Immunhistochemie:

Kollagen/Laminin/Calpain/MAP 2:

Antigen	Wirt	Verdünnung	Herkunft
anti-Kaninchen	Ziege	1:200	Vector, Wiesbaden, D
anti-Ziege	Kaninchen	1:200	Vector, Wiesbaden, D

Fluoreszenz:

Antigen	Wirt	Verdünnung	Herkunft
anti-Kaninchen Cy2	Esel	1:200	Jackson Immuno Research, Baltimore, USA
anti-Ziege Cy3	Kaninchen	1:500	Dianova, Hamburg, D

2) Western Blot:

Antigen	Wirt	Verdünnung	Herkunft
anti-Ziege	Kaninchen	1:1000	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA

7.1.4 Weitere Reagentien

AEC-Kit	AEC Kit SK-4200, Biomedica Corporation, Foster City, USA (5ml Aqua dest. + 2 Tropfen Puffer-Lösung + 3 Tropfen AEC + 2 Tropfen Wasserstoffperoxid)
Bradford Protein Assay	TEBU GmbH, Frankfurt, D
ECL Development Kit	Amersham, Beckinghamshire, UK
Fluormount-G	Southern Biotechnology Ass, Birmingham, USA
PVDF Membran	Sequi-Blot; Biorad, München, D
Tween-20	Merck
Tissue Teck	Jung
Vectorstain® Elite Kit	ABC Kit Vectastain PK-6100; Vector, Wiesbaden, D (Lösung A 1:125/20µl + Lösung B 1:125/20µl + 1ml PBS + 1µl Tween20 (10%))
Lösungen, Puffer:	
Blotto:	100ml Tris saline stock (s.u.), 5g Milchpulver (Fluka), 1ml Pferdeserum, 20mg Natriumacid
Ladepuffer für SDS-PAGE:	0,5 M Tris (pH 6,8), 5% SDS, 15% Glycerol, 2% β-Mercaptoethanol, 0,02% Bromophenolblau (BPB)
Lyse Puffer für SDS-PAGE:	20mM Tris (pH 7,3), 1mM EDTA, 2% SDS
Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (PBS):	10 mM Na ₂ HPO ₄ , 8,4 g/l NaCl, mit H ₃ PO ₄ auf pH 7,4 eingestellt
Reagent dilution:	50ml Tris saline stock (s.u.), 20mg Rinderserum Albumin (Bovineserum albumin, BSA), 25mg Thimerosal
TBST:	0,05% Tween-20 in TBS (pH 7,3), Milchpulver
Transferpuffer für SDS-PAGE:	10 mM/1 3-Cyclohexylamino-1-Propan-Schwefelsäure (pH 11,0), 10 % Methanol
Tris saline stock:	0,05 M Tris-HCl, 8,7g/l NaCl, mit 1N HCL auf pH 7,4 einstellen

7.2 Urwerte

7.2.1 Kollagen

zu **Abbildung 25**: Verhältnis von Basalmembran und Gefäßlumen

Placebo	Außendurchmesser	Innendurchmesser	A/I
Tier 1	4,49	3,31	1,36
Tier 2	3,47	2,46	1,41
Tier 3	3,73	2,84	1,31
Tier 4	4,40	3,32	1,33
Tier 5	3,54	2,81	1,26
Tier 6	3,51	2,95	1,19
Mittelwert	3,86	2,95	1,31
Stabwert	0,46	0,33	0,08

Ramipril	Außendurchmesser	Innendurchmesser	A/I
Tier 1	4,61	5,10	0,90
Tier 2	3,64	4,73	0,77
Tier 3	2,54	3,96	0,64
Tier 4	2,49	4,63	0,54
Tier 5	3,03	4,84	0,63
Tier 6	2,68	4,32	0,62
Mittelwert	3,17	4,60	0,69
Stabwert	0,83	0,40	0,13

Kontrolle	Außendurchmesser	Innendurchmesser	A/I
Tier 1	2,856	4,108	0,70
Tier 2	2,732	4,088	0,67
Tier 3	2,732	4,249	0,64
Tier 4	3,031	4,236	0,72
Tier 5	3,311	4,964	0,67
Mittelwert	2,9324	4,329	0,68
Stabwert	0,24454918	0,36235204	0,03

zu **Abbildung 26**: Kollagen positive Gefäße pro mikroskopischem Gesichtsfeld, 10er Objektiv

Gefäße Placebo	ges. Fläche	li. Hemisph.	re. Hemisph.	li. Kortex	re. Kortex	li. BG	re. BG
Tier 1	11,7796	16,7947	18,4743	16,9293	18,0571	19,2883	16,8182
Tier 2	12,2967	18,623	17,4205	20,4186	19,6667	18,8684	18,6404
Tier 3	12,1939	18,5101	16,4914	22,0096	19,9022	17,5889	15,3974
Tier 4	12,981	18,7804	19,6457	19,1953	24,0385	17,9101	17,3425
Tier 5	12,3489	15,6501	18,2224	22,589	19,5086	14,1264	15,4242
Tier 6	14,4074	18,3062	18,1544	21,7372	21,0977	17,7848	16,2198
Mittelwert	12,6679167	17,7774167	18,0681167	20,4798333	20,3784667	17,5944833	16,6404167
Stabwert	0,93564899	1,26717257	1,05739728	2,12743053	2,03921522	1,8251217	1,24303283
Gefäße Ramipril							
Tier 1	11,3077	17,139	17,5304	24,7517	21,431	19,0571	19,4167
Tier 2	11,2228	17,7509	17,4595	22,8219	23,0833	18,4143	16,4935
Tier 3	14,2511	18,2411	18,9168	23,9658	24,4068	19,7083	18,0556

Tier 4	13,8153	16,871	17,7872	24,5533	24,3254	15,7636	15,4737
Tier 5	12,4254	17,5573	16,8838	22,7076	23,4686	18,1648	16,7375
Tier 6	12,9779	17,5166	17,8832	22,9389	22,6264	16,283	17,1846
Mittelwert	12,6667	17,51265	17,7434833	23,6232	23,2235833	17,8985167	17,2269333
Stabwert	1,25828492	0,47764856	0,6727868	0,91702176	1,11925843	1,55706991	1,36637148

Gefäße Kontrolle	BG ges.	Kortex ges.
Tier 1	19,1429	23,5291
Tier 2	18,7808	23,54
Tier 3	17,9839	21,8271
Tier 4	17,3474	22,6957
Tier 5	18,5085	22,3114
Mittelwert	18,3527	22,78066
Stabwert	0,70331373	0,75389978

zu **Abbildung 27**: Relative Gesamtfläche von Kollagen Typ IV pro mikroskopischem Feld, 10er Objektiv

Fläche Placebo	ges. Fläche	li. Hemisph.	re. Hemisph.	li. Kortex	re. Kortex	li. BG	re. BG
Tier 1	18,0776	8,35847	9,04577	9,33696	13,1	11,2577	7,87013
Tier 2	29,4175	10,4034	12,6889	11,9767	11,3519	10,5263	9,57303
Tier 3	16,0878	10,6686	9,90634	12,8365	13,8478	9,45556	9,17949
Tier 4	6,66528	10,6736	10,9895	11,8359	12,1827	9,11236	9,45205
Tier 5	6,63955	9,8286	10,7963	13,0137	11,3314	9,42529	9,07576
Tier 6	9,98099	11,1989	10,7323	12,2336	12,2556	10,2785	10,3187
Mittelwert	14,47812	10,188595	10,693185	11,8722267	12,3449	10,009285	9,24486
Stabwert	8,73430281	1,00114394	1,21786246	1,32689009	0,98756255	0,81859113	0,80330644
Fläche Ramipril							
Tier 1	24,7216	10,7533	12,063	13,2759	12,7586	7,94286	11,6111
Tier 2	23,8877	10,1333	10,4066	12,2808	13,0303	10,5571	9,77922
Tier 3	21,3004	10,2768	10,6341	12,8562	12,661	9,61111	9,95833
Tier 4	8,43889	11,1187	10,924	14,18	13,7929	12,2	11,2807
Tier 5	7,33174	10,6627	10,609	12,6725	13	11,1099	10,1
Tier 6	6,6575	9,40114	9,51946	10,5056	10,8736	9,18868	10,1538
Mittelwert	15,3896383	10,39099	10,6926933	12,6285	12,6860667	10,1016083	10,480525
8,76050834	0,59898301	0,82462194	1,22537031	0,97293942	1,50742121	0,76609982	8,76050834

Fläche Kontrolle	BG ges.	Kortex ges.
Tier 1	10,7619	11,4359
Tier 2	10,6849	12,2879
Tier 3	11,3548	10,9248
Tier 4	10,1368	10,6667
Tier 5	10,0254	11,2216
Mittelwert	10,59276	11,30738
Stabwert	0,53563046	0,62091332

zu **Abbildung 28**: Relative Intensität der Fluoreszenz

	Placebo	Ramipril
Tier 1	118,33	93,34
Tier 2	100,37	98,60
Tier 3	122,16	91,09
Tier 4	113,79	98,75
Tier 5	119,20	86,69
Tier 6	118,76	98,45
Mittelwert	115,43	94,49
Stabwert	7,854352848	4,988214901

zu **Western Blot**: Anti-Kollagen Typ IV

	Placebo	Ramipril
Tier 1	12480	7885
Tier 2	15200	5375
Tier 3	13332	7386
Tier 4	17258	8739
Tier 5	15089	8061
Tier 6	19270	9206
Mittelwert	15438,1667	7775,33333
Stabwert	2504,39888	1340,31887

7.2.2 Laminin

zu **Abbildung 30**: Anzahl Laminin positiver Gefäße pro Gesichtsfeld, 10er Objektiv

Gefäße Placebo	ges. Fläche	li. Hemisph.	re. Hemisph.	li. Kortex	re. Kortex	li. BG	re. BG
Tier 1	17,6491	18,2426	17,7151	24,2602	21,2362	17,202	16,12
Tier 2	19,0297	20,093	18,9513	26	22,9384	19,4578	19,5111
Tier 3	17,6491	18,2426	17,7151	24,2602	21,2362	17,202	16,12
Tier 4	18,006	18,5958	19,0536	22,7521	24,0632	18,1443	16,2469
Tier 5	17,1416	15,8364	18,7997	20,9806	22,2239	11,5313	19,1359
Tier 6	17,6863	18,1207	18,1825	23,5714	22,9113	16,1798	17,0522
Mittelwert	17,8603	18,1885167	18,4028833	23,6374167	22,4348667	16,6195333	17,36435
Stabwert	0,63635547	1,36644344	0,61258748	1,68548727	1,10001041	2,72553443	1,56140135

Gefäße Ramipril	ges. Fläche	li. Hemisph.	re. Hemisph.	li. Kortex	re. Kortex	li. BG	re. BG
Tier 1	16,8196	17,7803	16,4271	22,0088	19,3358	16,6556	15,0978
Tier 2	17,8237	18,0163	18,6493	23	21,4435	15,046	16,875
Tier 3	18,5453	17,6683	19,7911	21,6519	22,5517	17,9	18,3838
Tier 4	17,2336	17,7548	17,2285	22,7651	21,8958	16,5146	16,7982
Tier 5	16,8129	17,2285	17,1824	22,5563	21,5	16,7525	16,6979
Tier 6	18,6519	19,4354	18,6037	25,6202	24,3264	16,5455	15,7453
Mittelwert	17,64783333	17,9806	17,98035	22,9337167	21,8422	16,5690333	16,5996667
Stabwert	0,824523954	0,757893	1,2433393	1,40648398	1,62699824	0,90948045	1,12192258

zu **Abbildung 31**: Gesamtfläche Laminin, 10er Objektiv

zu **Abbildung 32**: Laminin pro Gefäß, gemittelte Werte, 10er Objektiv

Fläche Placebo	ges. Fläche	li. Hemisph.	re. Hemisph.	li. Kortex	re. Kortex	li. BG	re. BG
Tier 1	16,948	16,7645	16,6051	20,9431	19,2913	14,202	13,81
Tier 2	17,5547	16,9566	16,9642	21	20,3562	15,2651	13,5889
Tier 3	16,948	16,7645	16,6051	20,9431	19,2913	14,202	13,81
Tier 4	17,0899	15,8442	17,5747	19,5868	20,3368	14,567	15,6667
Tier 5	16,2656	15,3337	17,2507	17,8194	19,3881	12,5208	18,1359
Tier 6	16,8601	15,7806	16,0423	19,4662	19,0645	14,4494	13,9913
Mittelwert	16,94438333	16,2406833	16,84035	19,9597667	19,6213667	14,20105	14,8338
Stabwert	0,415099552	0,67123751	0,54232182	1,26331753	0,57170389	0,91115766	1,78625317

Fläche Ramipril	ges. Fläche	li. Hemisph.	re. Hemisph.	li. Kortex	re. Kortex	li. BG	re. BG
Tier 1	15,9194	15,2516	15,7027	18,2632	18,1898	12,6889	14,1304
Tier 2	17,5827	16,8737	17,8646	20,9107	20,8783	14,8161	15,325
Tier 3	17,6318	16,4138	17,7479	17,7025	17,8276	15,45	16,0808
Tier 4	19,5882	18,3744	19,4274	21,3087	22,7986	16,165	16,5138
Tier 5	17,1273	16,4528	16,3515	19,5282	20,1949	14,3267	14,1458
Tier 6	17,5076	17,6246	16,7024	20,2636	19,3681	15,1414	14,3962
Mittelwert	17,5595	16,8318167	17,2994167	19,6628167	19,8762167	14,7646833	15,0986667
Stabwert	1,183284216	1,07937938	1,33066612	1,44547399	1,8409274	1,18960587	1,03512025

zu **Abbildung 33**: Anzahl der Laminin positiven Gefäße pro Gesichtsfeld, 40er Objektiv

Gefäße Placebo	BG ges.	BG ROI	Kortex ges.	Kortex ROI
Tier 1	2,82	1,60	2,43	1,68
Tier 2	1,94	1,65	2,28	2,00
Tier 3	2,25	1,79	1,95	1,78
Tier 4	2,24	1,74	1,88	1,73
Tier 5	1,95	1,47	1,73	1,70
Tier 6	2,09	1,88	2,24	2,15
Mittelwert	2,22	1,69	2,08	1,84
Stabwert	0,33	0,15	0,27	0,19

Gefäße Ramipril	BG ges.	BG ROI	Kortex ges.	Kortex ROI
Tier 1	2,43	1,91	2,03	2,11
Tier 2	2,22	1,69	2,20	1,66
Tier 3	2,41	2,63	2,24	1,49
Tier 4	1,94	1,29	2,19	1,46
Tier 5	3,05	2,14	3,05	1,80
Tier 6	2,83	1,92	2,32	2,13
Mittelwert	2,48	1,93	2,34	1,77
Stabwert	0,41	0,45	0,36	0,29

zu **Abbildung 34**: Relative Gesamtfläche Laminin, 40er Objektiv

Fläche Placebo	BG ges.	BG ROI	Kortex ges.	Kortex ROI
Tier 1	17,29	11,83	18,65	14,58
Tier 2	16,12	13,10	18,06	20,44
Tier 3	17,64	14,01	17,03	19,08

Tier 4	18,78	15,14	18,36	17,68
Tier 5	19,16	14,94	18,35	16,49
Tier 6	17,15	12,60	19,06	18,24
Mittelwert	17,69	13,60	18,25	17,75
Stabwert	1,12	1,32	0,69	2,04

Fläche Ramipril	BG ges.	BG ROI	Kortex ges.	Kortex ROI
Tier 1	17,13	13,27	16,58	17,95
Tier 2	17,61	14,03	18,60	18,74
Tier 3	16,47	13,51	16,75	13,19
Tier 4	18,42	15,06	17,82	16,58
Tier 5	17,60	12,21	16,31	15,15
Tier 6	16,78	13,29	14,78	15,38
Mittelwert	17,33	13,56	16,81	16,17
Stabwert	0,70	0,94	1,31	2,02

zu **Abbildung 35**: Relative Intensität der Fluoreszenz

	Placebo	Ramipril
Tier 1	30,42	27,78
Tier 2	40,25	31,58
Tier 3	22,58	22,73
Tier 4	24	22,14
Tier 5	32,62	25,04
Tier 6	18,89	16,19
Mittelwert	28,1266667	24,2433333
Stabwert	7,81710347	5,26383384

7.2.3 Calpain

zu **Abbildung 36**: Gesamtfläche Calpain positiver Zellen, 10er Objektiv

Fläche Placebo	ges. Fläche	li. Hemisph.	re. Hemisph.	li. Kortex	re. Kortex	li. BG	re. BG
Tier 1	6,53	8,49	5,35	8,70	6,02	10,07	6,73
Tier 2	5,22	6,26	4,54	7,10	4,60	6,61	6,27
Tier 3	5,18	6,15	4,50	6,96	5,34	6,44	5,34
Tier 4	4,93	5,34	5,17	5,84	5,39	6,28	4,96
Tier 5	4,14	4,73	3,69	5,05	4,07	4,07	3,96
Tier 6	5,40	5,55	5,81	6,47	6,23	6,86	6,75
Mittelwert	5,23	6,09	4,84	6,69	5,27	6,72	5,67
Stabwert	0,77	1,31	0,75	1,24	0,82	1,92	1,11

Fläche Ramipril	ges. Fläche	li. Hemisph.	re. Hemisph.	li. Kortex	re. Kortex	li. BG	re. BG
Tier 1	5,67	6,28	5,50	8,02	6,26	5,73	5,63
Tier 2	5,96	6,68	6,01	7,97	6,11	6,74	8,38
Tier 3	4,92	5,60	4,92	7,05	5,39	6,20	5,00

Tier 4	5,45	5,71	5,62	6,43	6,10	6,72	6,22
Tier 5	4,83	5,11	4,53	5,75	4,53	6,26	6,23
Tier 6	6,66	7,70	5,49	7,69	5,16	8,44	6,00
Mittelwert	5,58	6,18	5,34	7,15	5,59	6,68	6,24
Stabwert	0,68	0,92	0,53	0,92	0,68	0,94	1,14

zu **Abbildung 37**: Anzahl Calpain positiver Zellen pro Gesichtsfeld, 10er Objektiv.

Zellen Placebo	ges. Fläche	li. Hemisph.	re. Hemisph.	li. Kortex	re. Kortex	li. BG	re. BG
Tier 1	65,15	63,75	66,19	64,38	75,37	69,28	73,95
Tier 2	64,58	64,63	66,64	58,15	66,98	89,33	72,91
Tier 3	64,89	63,66	66,85	61,46	79,42	59,26	66,86
Tier 4	62,62	51,23	78,93	40,70	88,18	69,76	61,36
Tier 5	62,49	65,71	65,01	74,65	55,52	54,47	72,92
Tier 6	64,85	69,70	61,40	73,13	59,56	67,96	61,59
Mittelwert	64,10	63,11	67,50	62,08	70,84	68,34	68,27
Stabwert	1,21	6,23	5,95	12,31	12,42	11,99	5,83

Zellen Ramipril	ges. Fläche	li. Hemisph.	re. Hemisph.	li. Kortex	re. Kortex	li. BG	re. BG
Tier 1	64,78	60,59	76,08	28,65	71,67	84,23	81,73
Tier 2	62,34	58,56	65,45	59,07	64,81	51,89	57,47
Tier 3	72,81	71,30	79,11	68,61	90,97	95,96	63,00
Tier 4	57,89	66,47	52,16	71,23	52,74	60,87	38,63
Tier 5	66,21	63,66	74,52	52,80	79,53	69,48	58,96
Tier 6	54,40	56,30	55,87	68,80	71,26	19,30	30,82
Mittelwert	63,07	62,81	67,20	58,19	71,83	63,62	55,10
Stabwert	6,48	5,51	11,24	16,09	12,96	26,89	18,18

zu **Abbildung 38**: Calpain 40er Objektiv, Zellen pro Gesichtsfeld im Kortex (ROI)

	Placebo	Ramipril
Tier 1	1,98889	2,10448
Tier 2	2,48361	1,63793
Tier 3	2,37374	1,88194
Tier 4	1,7875	1,96503
Tier 5	2,31003	2,11594
Tier 6	1,45455	2,30328
Mittelwert	2,06638667	2,00143333
Stabwert	0,39649239	0,22916384

8. Quellenverzeichnis

8.1 Literaturverzeichnis

1. Gasse, C., *et al.* Assessing hypertension management in the community: trends of prevalence, detection, treatment, and control of hypertension in the MONICA Project, Augsburg 1984-1995. *J Hum Hypertens* **15**, 27-36 (2001).
2. Rahn, K.H. [Recent intervention studies with antihypertensive drugs and their influence on guidelines]. *Med Klin (Munich)* **98**, 771-775 (2003).
3. Hajdu, M.A., Heistad, D.D. & Baumbach, G.L. Effects of antihypertensive therapy on mechanics of cerebral arterioles in rats. *Hypertension* **17**, 308-316 (1991).
4. Linz, W., Jessen, T., Becker, R.H., Scholkens, B.A. & Wiemer, G. Long-term ACE inhibition doubles lifespan of hypertensive rats. *Circulation* **96**, 3164-3172 (1997).
5. Linz, W., *et al.* Late treatment with ramipril increases survival in old spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* **34**, 291-295 (1999).
6. Nag, S. & Kilty, D.W. Cerebrovascular changes in chronic hypertension. Protective effects of enalapril in rats. *Stroke* **28**, 1028-1034 (1997).
7. Scheinker, I.M. Hypertensive disease of the brain. *Arch Pathol.* **1943**, 259-296 (2002).
8. Clozel, J.P., Kuhn, H. & Hefti, F. Vascular protection with cilazapril in hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* **19 Suppl 5**, S28-33 (1992).
9. Hamann, G.F., Okada, Y., Fitridge, R. & del Zoppo, G.J. Microvascular basal lamina antigens disappear during cerebral ischemia and reperfusion. *Stroke* **26**, 2120-2126 (1995).
10. Hamann, G.F., *et al.* Microvascular basal lamina injury after experimental focal cerebral ischemia and reperfusion in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* **22**, 526-533 (2002).
11. Pantoni, L. & Simoni, M. Pathophysiology of cerebral small vessels in vascular cognitive impairment. *Int Psychogeriatr* **15 Suppl 1**, 59-65 (2003).
12. Liebetrau, M., Burggraf, D., Martens, H.K., Pichler, M. & Hamann, G.F. Delayed moderate hypothermia reduces calpain activity and breakdown of its substrate in experimental focal cerebral ischemia in rats. *Neurosci Lett* **357**, 17-20 (2004).
13. Kambe, A., *et al.* Spatial resolution of calpain-catalyzed proteolysis in focal cerebral ischemia. *Brain Res* **1040**, 36-43 (2005).
14. Whitworth, J.A. 2003 World Health Organization (WHO)/International Society of Hypertension (ISH) statement on management of hypertension. *J Hypertens* **21**, 1983-1992 (2003).
15. Ramsay, L.E., *et al.* British Hypertension Society guidelines for hypertension management 1999: summary. *Bmj* **319**, 630-635 (1999).
16. Cifkova, R., *et al.* Trends in blood pressure levels, prevalence, awareness, treatment, and control of hypertension in the Czech population from 1985 to 2000/01. *J Hypertens* **22**, 1479-1485 (2004).
17. Wolf-Maier, K., *et al.* Hypertension prevalence and blood pressure levels in 6 European countries, Canada, and the United States. *Jama* **289**, 2363-2369 (2003).
18. Meisinger, C., *et al.* Regional disparities of hypertension prevalence and management within Germany. *J Hypertens* **24**, 293-299 (2006).
19. Chobanian, A.V., *et al.* The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: the JNC 7 report. *Jama* **289**, 2560-2572 (2003).

20. Marques-Vidal, P. & Tuomilehto, J. Hypertension awareness, treatment and control in the community: is the 'rule of halves' still valid? *J Hum Hypertens* **11**, 213-220 (1997).
21. Weinehall, L., *et al.* High remaining risk in poorly treated hypertension: the 'rule of halves' still exists. *J Hypertens* **20**, 2081-2088 (2002).
22. Erdine, S. & Aran, S.N. Current status of hypertension control around the world. *Clin Exp Hypertens* **26**, 731-738 (2004).
23. Erdine, S. How well is hypertension controlled in Europe? *J Hypertens* **18**, 1348-1349 (2000).
24. MacMahon, S. Blood pressure and the risk of cardiovascular disease. *N Engl J Med* **342**, 50-52 (2000).
25. Skoog, I. & Gustafson, D. Update on hypertension and Alzheimer's disease. *Neurol Res* **28**, 605-611 (2006).
26. Roman, G.C. Vascular dementia. Advances in nosology, diagnosis, treatment and prevention. *Panminerva Med* **46**, 207-215 (2004).
27. Chester, E.M., Agamanolis, D.P., Banker, B.Q. & Victor, M. Hypertensive encephalopathy: a clinicopathologic study of 20 cases. *Neurology* **28**, 928-939 (1978).
28. McVeigh, G.E., Flack, J. & Grimm, R. Goals of antihypertensive therapy. *Drugs* **49**, 161-175 (1995).
29. Forette, F., *et al.* The prevention of dementia with antihypertensive treatment: new evidence from the Systolic Hypertension in Europe (Syst-Eur) study. *Arch Intern Med* **162**, 2046-2052 (2002).
30. Gorelick, P.B. New horizons for stroke prevention: PROGRESS and HOPE. *Lancet Neurol* **1**, 149-156 (2002).
31. Mackay J, M.G. *The Atlas of Heart Disease and Stroke*, (World Health Organization, Centers of Disease Control and Prevention, 2004).
32. Wannamethee, S.G., Shaper, A.G., Whincup, P.H. & Walker, M. Smoking cessation and the risk of stroke in middle-aged men. *Jama* **274**, 155-160 (1995).
33. (WHO), W.H.O. Global Info Base. (2003).
34. Bonita, R., Beaglehole, R. & Asplund, K. The worldwide problem of stroke. *Curr Opin Neurol* **7**, 5-10 (1994).
35. Beaglehole, R. Global cardiovascular disease prevention: time to get serious. *Lancet* **358**, 661-663 (2001).
36. Casas, S.B. & Klijn, T.P. [Health promotion and a healthy workplace.]. *Rev Lat Am Enfermagem* **14**, 136-141 (2006).
37. World Health Organisation, E. Public health action for healthier children and populations. *The European health report 2005* (2005).
38. Dickinson, C.J. Strokes and their relationship to hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens* **12**, 91-96 (2003).
39. Cushman, D.W. & Ondetti, M.A. History of the design of captopril and related inhibitors of angiotensin converting enzyme. *Hypertension* **17**, 589-592 (1991).
40. Binder, L.I., *et al.* Heterogeneity of microtubule-associated protein 2 during rat brain development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 5613-5617 (1984).
41. Karpati, P. [The role of ACE inhibition and angotensin receptor blockade on the treatment and prevention of chronic heart failure]. *Orv Hetil* **146**, 827-831 (2005).
42. Yusuf, S., *et al.* Effects of an angiotensin-converting-enzyme inhibitor, ramipril, on cardiovascular events in high-risk patients. The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med* **342**, 145-153 (2000).
43. Turnbull, F. Effects of different blood-pressure-lowering regimens on major cardiovascular events: results of prospectively-designed overviews of randomised trials. *Lancet* **362**, 1527-1535 (2003).

44. Iadecola, C. & Gorelick, P.B. Hypertension, angiotensin, and stroke: beyond blood pressure. *Stroke* **35**, 348-350 (2004).
45. Yamori, Y. Development of the Spontaneously Hypertensive Rat (SHR) and of various spontaneous rat models and their implications. *Handbook of Hypertension, Elsevier, New York; DeJong, W* **4**, 224-239 (1984).
46. Okamoto, K., Yamori, Y., Nagaoka, A. Establishment of stroke-prone spontaneously hypertensive rat (SHR). *Circulation Research* **34-35 (suppl.)**, I143-I153 (1974).
47. Stier, C.T., Jr., Chander, P., Gutstein, W.H., Levine, S. & Itskovitz, H.D. Therapeutic benefit of captopril in salt-loaded stroke-prone spontaneously hypertensive rats is independent of hypotensive effect. *Am J Hypertens* **4**, 680-687 (1991).
48. Harrap, S.B. & O'Sullivan, J.B. Cardiac transplantation, perindopril, and left ventricular hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* **28**, 622-626 (1996).
49. Novosel, D., Lang, M.G., Noll, G. & Luscher, T.F. Endothelial dysfunction in aorta of the spontaneously hypertensive, stroke-prone rat: effects of therapy with verapamil and trandolapril alone and in combination. *J Cardiovasc Pharmacol* **24**, 979-985 (1994).
50. Intengan, H.D., Thibault, G., Li, J.S. & Schiffrin, E.L. Resistance artery mechanics, structure, and extracellular components in spontaneously hypertensive rats : effects of angiotensin receptor antagonism and converting enzyme inhibition. *Circulation* **100**, 2267-2275 (1999).
51. Wang, H., Smeda, J.S. & Lee, R.M. Prevention of stroke and preservation of the functions of cerebral arteries by treatment with perindopril in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Can J Physiol Pharmacol* **76**, 26-34 (1998).
52. Risau, W. Development and differentiation of endothelium. *Kidney Int Suppl* **67**, S3-6 (1998).
53. Witmer, A.N., van Blijswijk, B.C., van Noorden, C.J., Vrensen, G.F. & Schlingemann, R.O. In vivo angiogenic phenotype of endothelial cells and pericytes induced by vascular endothelial growth factor-A. *J Histochem Cytochem* **52**, 39-52 (2004).
54. Sixt, M., *et al.* Endothelial cell laminin isoforms, laminins 8 and 10, play decisive roles in T cell recruitment across the blood-brain barrier in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Cell Biol* **153**, 933-946 (2001).
55. Sasaki, T., Fassler, R. & Hohenester, E. Laminin: the crux of basement membrane assembly. *J Cell Biol* **164**, 959-963 (2004).
56. Davis, S.M. & Donnan, G.A. Blood pressure reduction and ACE inhibition in secondary stroke prevention: mechanism uncertain. *Stroke* **34**, 1335-1336 (2003).
57. Erickson, A.C. & Couchman, J.R. Still more complexity in mammalian basement membranes. *J Histochem Cytochem* **48**, 1291-1306 (2000).
58. Hallmann, R., *et al.* Expression and function of laminins in the embryonic and mature vasculature. *Physiol Rev* **85**, 979-1000 (2005).
59. Boot-Handford, R.P., Kurkinen, M. & Prockop, D.J. Steady-state levels of mRNAs coding for the type IV collagen and laminin polypeptide chains of basement membranes exhibit marked tissue-specific stoichiometric variations in the rat. *J Biol Chem* **262**, 12475-12478 (1987).
60. Poschl, E., *et al.* Collagen IV is essential for basement membrane stability but dispensable for initiation of its assembly during early development. *Development* **131**, 1619-1628 (2004).
61. Hohenester, E. & Engel, J. Domain structure and organisation in extracellular matrix proteins. *Matrix Biol* **21**, 115-128 (2002).

62. Muellner, A., *et al.* Microvascular basal lamina antigen loss after traumatic brain injury in the rat. *J Neurotrauma* **20**, 745-754 (2003).
63. Levy, B.I., *et al.* Effects of chronic inhibition of converting enzyme on mechanical and structural properties of arteries in rat renovascular hypertension. *Circ Res* **63**, 227-239 (1988).
64. Szmigielski, C., Raczkowska, M., Styczynski, G., Pruszczyk, P. & Gaciong, Z. Metabolism of collagen is altered in hypertensives with increased intima media thickness. *Blood Press* **15**, 157-163 (2006).
65. Baumbach, G.L., Walmsley, J.G. & Hart, M.N. Composition and mechanics of cerebral arterioles in hypertensive rats. *Am J Pathol* **133**, 464-471 (1988).
66. Timpl, R., *et al.* Laminin--a glycoprotein from basement membranes. *J Biol Chem* **254**, 9933-9937 (1979).
67. Koch, M., *et al.* Characterization and expression of the laminin gamma3 chain: a novel, non-basement membrane-associated, laminin chain. *J Cell Biol* **145**, 605-618 (1999).
68. Iivanainen, A., Morita, T. & Tryggvason, K. Molecular cloning and tissue-specific expression of a novel murine laminin gamma3 chain. *J Biol Chem* **274**, 14107-14111 (1999).
69. Odenthal, U., *et al.* Molecular analysis of laminin N-terminal domains mediating self-interactions. *J Biol Chem* **279**, 44504-44512 (2004).
70. Li, S., *et al.* Matrix assembly, regulation, and survival functions of laminin and its receptors in embryonic stem cell differentiation. *J Cell Biol* **157**, 1279-1290 (2002).
71. Aumailley, M. & Smyth, N. The role of laminins in basement membrane function. *J Anat* **193** (Pt 1), 1-21 (1998).
72. Shang, M., Koshikawa, N., Schenk, S. & Quaranta, V. The LG3 module of laminin-5 harbors a binding site for integrin alpha3beta1 that promotes cell adhesion, spreading, and migration. *J Biol Chem* **276**, 33045-33053 (2001).
73. Timpl, R. & Brown, J.C. Supramolecular assembly of basement membranes. *Bioessays* **18**, 123-132 (1996).
74. Miyagoe-Suzuki, Y., Nakagawa, M. & Takeda, S. Merosin and congenital muscular dystrophy. *Microsc Res Tech* **48**, 181-191 (2000).
75. Capt, A., *et al.* Inherited junctional epidermolysis bullosa in the German Pointer: establishment of a large animal model. *J Invest Dermatol* **124**, 530-535 (2005).
76. Thyboll, J., *et al.* Deletion of the laminin alpha4 chain leads to impaired microvessel maturation. *Mol Cell Biol* **22**, 1194-1202 (2002).
77. Miner, J.H., Cunningham, J. & Sanes, J.R. Roles for laminin in embryogenesis: exencephaly, syndactyly, and placentopathy in mice lacking the laminin alpha5 chain. *J Cell Biol* **143**, 1713-1723 (1998).
78. Hagedorn, H.G., Bachmeier, B.E. & Nerlich, A.G. Synthesis and degradation of basement membranes and extracellular matrix and their regulation by TGF-beta in invasive carcinomas (Review). *Int J Oncol* **18**, 669-681 (2001).
79. Rissanen, J., Korhonen, M., Lehto, V.P. & Virtanen, I. Laminin alpha1 chain in human renal cell carcinomas and integrin-mediated adhesion of renal cell carcinoma cells to human laminin isoforms. *J Pathol* **200**, 157-167 (2003).
80. Berno, V., *et al.* The 67 kDa laminin receptor increases tumor aggressiveness by remodeling laminin-1. *Endocr Relat Cancer* **12**, 393-406 (2005).
81. Oliviero, P., *et al.* Expression of laminin alpha2 chain during normal and pathological growth of myocardium in rat and human. *Cardiovasc Res* **46**, 346-355 (2000).
82. Fredersdorf, S., *et al.* Myocardial hypertrophy and enhanced left ventricular contractility in Zucker diabetic fatty rats. *Cardiovasc Pathol* **13**, 11-19 (2004).

83. Tsutsumi, M., Urashima, S., Nakase, K. & Takada, A. Changes in laminin content in livers of patients with alcoholic liver disease. *Liver* **15**, 324-331 (1995).
84. Zhang, W.W. & Olsson, Y. The angiopathy of subcortical arteriosclerotic encephalopathy (Binswanger's disease): immunohistochemical studies using markers for components of extracellular matrix, smooth muscle actin and endothelial cells. *Acta Neuropathol (Berl)* **93**, 219-224 (1997).
85. Kemeny, E., Nadasdy, T., Szenohradszky, P., Csajbok, E. & Ormos, J. Comparative distribution of laminin and collagen types I, III and IV in transplant vasculopathy. *Acta Morphol Hung* **39**, 177-186 (1991).
86. Morita, T., Mizutani, Y., Sawada, M. & Shimada, A. Immunohistochemical and ultrastructural findings related to the blood-brain barrier in the blood vessels of the cerebral white matter in aged dogs. *J Comp Pathol* **133**, 14-22 (2005).
87. Indyk, J.A., Chen, Z.L., Tsrirka, S.E. & Strickland, S. Laminin chain expression suggests that laminin-10 is a major isoform in the mouse hippocampus and is degraded by the tissue plasminogen activator/plasmin protease cascade during excitotoxic injury. *Neuroscience* **116**, 359-371 (2003).
88. Gu, Z., *et al.* A highly specific inhibitor of matrix metalloproteinase-9 rescues laminin from proteolysis and neurons from apoptosis in transient focal cerebral ischemia. *J Neurosci* **25**, 6401-6408 (2005).
89. Horstmann, S., Kalb, P., Koziol, J., Gardner, H. & Wagner, S. Profiles of matrix metalloproteinases, their inhibitors, and laminin in stroke patients: influence of different therapies. *Stroke* **34**, 2165-2170 (2003).
90. Iivanainen, A., *et al.* Primary structure, developmental expression, and immunolocalization of the murine laminin alpha4 chain. *J Biol Chem* **272**, 27862-27868 (1997).
91. Fujiwara, H., Kikkawa, Y., Sanzen, N. & Sekiguchi, K. Purification and characterization of human laminin-8. Laminin-8 stimulates cell adhesion and migration through alpha3beta1 and alpha6beta1 integrins. *J Biol Chem* **276**, 17550-17558 (2001).
92. Tokida, Y., Aratani, Y., Morita, A. & Kitagawa, Y. Production of two variant laminin forms by endothelial cells and shift of their relative levels by angiostatic steroids. *J Biol Chem* **265**, 18123-18129 (1990).
93. DeHahn, K.C., *et al.* The alpha4 laminin subunit regulates endothelial cell survival. *Exp Cell Res* **294**, 281-289 (2004).
94. Guroff, G. A Neutral, Calcium-Activated Proteinase from the Soluble Fraction of Rat Brain. *J Biol Chem* **239**, 149-155 (1964).
95. Dayton, W.R., Goll, D.E., Zeece, M.G., Robson, R.M. & Reville, W.J. A Ca²⁺-activated protease possibly involved in myofibrillar protein turnover. Purification from porcine muscle. *Biochemistry* **15**, 2150-2158 (1976).
96. Suzuki, K. Nomenclature of calcium dependent proteinase. *Biomed Biochim Acta* **50**, 483-484 (1991).
97. Hosfield, C.M., Elce, J.S., Davies, P.L. & Jia, Z. Crystal structure of calpain reveals the structural basis for Ca(2+)-dependent protease activity and a novel mode of enzyme activation. *Embo J* **18**, 6880-6889 (1999).
98. Rojas, F.J., Brush, M. & Moretti-Rojas, I. Calpain-calpastatin: a novel, complete calcium-dependent protease system in human spermatozoa. *Mol Hum Reprod* **5**, 520-526 (1999).
99. Sorimachi, H., Ishiura, S. & Suzuki, K. Structure and physiological function of calpains. *Biochem J* **328** (Pt 3), 721-732 (1997).
100. Goll, D.E., Thompson, V.F., Li, H., Wei, W. & Cong, J. The calpain system. *Physiol Rev* **83**, 731-801 (2003).

101. Croall, D.E. & DeMartino, G.N. Calcium-activated neutral protease (calpain) system: structure, function, and regulation. *Physiol Rev* **71**, 813-847 (1991).
102. Murachi, T. [Calpain and calpastatin]. *Rinsho Byori* **38**, 337-346 (1990).
103. Tompa, P., Emori, Y., Sorimachi, H., Suzuki, K. & Friedrich, P. Domain III of calpain is a Ca²⁺-regulated phospholipid-binding domain. *Biochem Biophys Res Commun* **280**, 1333-1339 (2001).
104. Croall, D.E. & DeMartino, G.N. Comparison of two calcium-dependent proteinases from bovine heart. *Biochim Biophys Acta* **788**, 348-355 (1984).
105. Reverter, D., *et al.* Structural basis for possible calcium-induced activation mechanisms of calpains. *Biol Chem* **382**, 753-766 (2001).
106. Alexa, A., Bozoky, Z., Farkas, A., Tompa, P. & Friedrich, P. Contribution of distinct structural elements to activation of calpain by Ca²⁺ ions. *J Biol Chem* **279**, 20118-20126 (2004).
107. Strobl, S., *et al.* The crystal structure of calcium-free human m-calpain suggests an electrostatic switch mechanism for activation by calcium. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 588-592 (2000).
108. Saido, T.C., Shibata, M., Takenawa, T., Murofushi, H. & Suzuki, K. Positive regulation of mu-calpain action by polyphosphoinositides. *J Biol Chem* **267**, 24585-24590 (1992).
109. Suzuki, K., Sorimachi, H., Yoshizawa, T., Kinbara, K. & Ishiura, S. Calpain: novel family members, activation, and physiologic function. *Biol Chem Hoppe Seyler* **376**, 523-529 (1995).
110. Nakagawa, K., Masumoto, H., Sorimachi, H. & Suzuki, K. Dissociation of m-calpain subunits occurs after autolysis of the N-terminus of the catalytic subunit, and is not required for activation. *J Biochem (Tokyo)* **130**, 605-611 (2001).
111. Suzuki, K., Hata, S., Kawabata, Y. & Sorimachi, H. Structure, activation, and biology of calpain. *Diabetes* **53 Suppl 1**, S12-18 (2004).
112. Yokota, M., *et al.* Calpain induces proteolysis of neuronal cytoskeleton in ischemic gerbil forebrain. *Brain Res* **984**, 122-132 (2003).
113. Minger, S.L., *et al.* Glutamate receptor antagonists inhibit calpain-mediated cytoskeletal proteolysis in focal cerebral ischemia. *Brain Res* **810**, 181-199 (1998).
114. Murray, S.S., *et al.* The calpain-calpastatin system and cellular proliferation and differentiation in rodent osteoblastic cells. *Exp Cell Res* **233**, 297-309 (1997).
115. Janossy, J., *et al.* Calpain as a multi-site regulator of cell cycle. *Biochem Pharmacol* **67**, 1513-1521 (2004).
116. Potter, D.A., *et al.* Calpain regulates actin remodeling during cell spreading. *J Cell Biol* **141**, 647-662 (1998).
117. Dourdin, N., *et al.* Reduced cell migration and disruption of the actin cytoskeleton in calpain-deficient embryonic fibroblasts. *J Biol Chem* **276**, 48382-48388 (2001).
118. Squier, M.K., *et al.* Calpain and calpastatin regulate neutrophil apoptosis. *J Cell Physiol* **178**, 311-319 (1999).
119. Martin, S.J. & Green, D.R. Protease activation during apoptosis: death by a thousand cuts? *Cell* **82**, 349-352 (1995).
120. Branca, D. Calpain-related diseases. *Biochem Biophys Res Commun* **322**, 1098-1104 (2004).
121. Yoshikawa, Y., Mukai, H., Hino, F., Asada, K. & Kato, I. Isolation of two novel genes, down-regulated in gastric cancer. *Jpn J Cancer Res* **91**, 459-463 (2000).
122. Perrin, C., Ecartot-Laubriet, A., Vergely, C. & Rochette, L. Calpain and caspase-3 inhibitors reduce infarct size and post-ischemic apoptosis in rat heart without modifying contractile recovery. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* **49 Online Pub**, OL497-505 (2003).

123. Muller, D., Molinari, I., Soldati, L. & Bianchi, G. A genetic deficiency in calpastatin and isovalerylcarnitine treatment is associated with enhanced hippocampal long-term potentiation. *Synapse* **19**, 37-45 (1995).
124. Suzuki, T., *et al.* Calpain may produce a Ca(2+)-independent form of kinase C in long-term potentiation. *Biochem Biophys Res Commun* **189**, 1515-1520 (1992).
125. Shields, D.C., Schaecher, K.E., Saido, T.C. & Banik, N.L. A putative mechanism of demyelination in multiple sclerosis by a proteolytic enzyme, calpain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 11486-11491 (1999).
126. Nixon, R.A., *et al.* Calcium-activated neutral proteinase (calpain) system in aging and Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* **747**, 77-91 (1994).
127. Mouatt-Prigent, A., Karlsson, J.O., Agid, Y. & Hirsch, E.C. Increased M-calpain expression in the mesencephalon of patients with Parkinson's disease but not in other neurodegenerative disorders involving the mesencephalon: a role in nerve cell death? *Neuroscience* **73**, 979-987 (1996).
128. Neumar, R.W., *et al.* Calpain mediates eukaryotic initiation factor 4G degradation during global brain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* **18**, 876-881 (1998).
129. Neumar, R.W., *et al.* Calpain activity in the rat brain after transient forebrain ischemia. *Exp Neurol* **170**, 27-35 (2001).
130. Liebetrau, M., Gabriejcic-Geiger, D., Meyer, P., Roether, J. & Hamann, G.F. Increased calpain expression following experimental cerebral venous thrombosis in rats. *Thromb Res* **112**, 239-243 (2003).
131. Kampfl, A., *et al.* mu-calpain activation and calpain-mediated cytoskeletal proteolysis following traumatic brain injury. *J Neurochem* **67**, 1575-1583 (1996).
132. Posmantur, R., *et al.* A calpain inhibitor attenuates cortical cytoskeletal protein loss after experimental traumatic brain injury in the rat. *Neuroscience* **77**, 875-888 (1997).
133. Banik, N.L., Matzelle, D.C., Gantt-Wilford, G., Osborne, A. & Hogan, E.L. Increased calpain content and progressive degradation of neurofilament protein in spinal cord injury. *Brain Res* **752**, 301-306 (1997).
134. Takagaki, Y., *et al.* Inhibition of ischemia-induced fodrin breakdown by a novel phenylpyrimidine derivative NS-7: an implication for its neuroprotective action in rats with middle cerebral artery occlusion. *J Neurochem* **68**, 2507-2513 (1997).
135. Yamashima, T. Implication of cysteine proteases calpain, cathepsin and caspase in ischemic neuronal death of primates. *Prog Neurobiol* **62**, 273-295 (2000).
136. Bartus, R.T., Chen, E.Y., Lynch, G. & Kordower, J.H. Cortical ablation induces a spreading calcium-dependent, secondary pathogenesis which can be reduced by inhibiting calpain. *Exp Neurol* **155**, 315-326 (1999).
137. Blomgren, K., *et al.* Synergistic activation of caspase-3 by m-calpain after neonatal hypoxia-ischemia: a mechanism of "pathological apoptosis"? *J Biol Chem* **276**, 10191-10198 (2001).
138. Ziemka-Nalecz, M., Zalewska, T., Zajac, H. & Domanska-Janik, K. Decrease of PKC precedes other cellular signs of calpain activation in area CA1 of the hippocampus after transient cerebral ischemia. *Neurochem Int* **42**, 205-214 (2003).
139. Yamashima, T., *et al.* Inhibition of ischaemic hippocampal neuronal death in primates with cathepsin B inhibitor CA-074: a novel strategy for neuroprotection based on 'calpain-cathepsin hypothesis'. *Eur J Neurosci* **10**, 1723-1733 (1998).
140. Zhao, X., *et al.* Subcellular localization and duration of mu-calpain and m-calpain activity after traumatic brain injury in the rat: a casein zymography study. *J Cereb Blood Flow Metab* **18**, 161-167 (1998).
141. Inuzuka, T., *et al.* Changes in the concentrations of cerebral proteins following occlusion of the middle cerebral artery in rats. *Stroke* **21**, 917-922 (1990).

142. Faddis, B.T., Hasbani, M.J. & Goldberg, M.P. Calpain activation contributes to dendritic remodeling after brief excitotoxic injury in vitro. *J Neurosci* **17**, 951-959 (1997).
143. Wang, K.K. & Yuen, P.W. Development and therapeutic potential of calpain inhibitors. *Adv Pharmacol* **37**, 117-152 (1997).
144. Saatman, K.E., *et al.* Calpain inhibitor AK295 attenuates motor and cognitive deficits following experimental brain injury in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 3428-3433 (1996).
145. Knoblach, S.M., *et al.* Caspase inhibitor z-DEVD-fmk attenuates calpain and necrotic cell death in vitro and after traumatic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* **24**, 1119-1132 (2004).
146. Rami, A. Ischemic neuronal death in the rat hippocampus: the calpain-calpastatin-caspase hypothesis. *Neurobiol Dis* **13**, 75-88 (2003).
147. Tsuchiya, K., *et al.* Postictal blockade of ischemic hippocampal neuronal death in primates using selective cathepsin inhibitors. *Exp Neurol* **155**, 187-194 (1999).
148. Blomgren, K., *et al.* Calpastatin is up-regulated in response to hypoxia and is a suicide substrate to calpain after neonatal cerebral hypoxia-ischemia. *J Biol Chem* **274**, 14046-14052 (1999).
149. Rami, A., *et al.* beta2-Adrenergic receptor responsiveness of the calpain-calpastatin system and attenuation of neuronal death in rat hippocampus after transient global ischemia. *Neurosci Res* **47**, 373-382 (2003).
150. Bernhardt, R. & Matus, A. Light and electron microscopic studies of the distribution of microtubule-associated protein 2 in rat brain: a difference between dendritic and axonal cytoskeletons. *J Comp Neurol* **226**, 203-221 (1984).
151. Kalcheva, N., *et al.* Genomic structure of human microtubule-associated protein 2 (MAP-2) and characterization of additional MAP-2 isoforms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 10894-10898 (1995).
152. Sanchez, C., Diaz-Nido, J. & Avila, J. Phosphorylation of microtubule-associated protein 2 (MAP2) and its relevance for the regulation of the neuronal cytoskeleton function. *Prog Neurobiol* **61**, 133-168 (2000).
153. Brugg, B. & Matus, A. Phosphorylation determines the binding of microtubule-associated protein 2 (MAP2) to microtubules in living cells. *J Cell Biol* **114**, 735-743 (1991).
154. Kitagawa K, M.M., Niinobe M, Mikoshiba K, Hata R, Ueda H, Handa N, Fukunaga R, Isaka Y, Kimura K, Kamada T. Microtubule-associated protein 2 as a sensitive marker for cerebral ischemic damage-immunohistochemical investigation of dendritic damage. *Neuroscience* **31**, 401-411 (1989).
155. Huh, J.W., Raghupathi, R., Laurer, H.L., Helfaer, M.A. & Saatman, K.E. Transient loss of microtubule-associated protein 2 immunoreactivity after moderate brain injury in mice. *J Neurotrauma* **20**, 975-984 (2003).
156. Coons AH, C.H., Jones RN. Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. *Proc Soc Exp Biol Med* **47**, 200-202 (1941).
157. Avrameas, S. & Uriel, J. [Method of antigen and antibody labelling with enzymes and its immunodiffusion application]. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D* **262**, 2543-2545 (1966).
158. Mason, D.Y. & Sammons, R. Alkaline phosphatase and peroxidase for double immunoenzymatic labelling of cellular constituents. *J Clin Pathol* **31**, 454-460 (1978).
159. Hsu, S.M. & Raine, L. Protein A, avidin, and biotin in immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem* **29**, 1349-1353 (1981).
160. Giorno, R. A comparison of two immunoperoxidase staining methods based on the avidin-biotin interaction. *Diagn Immunol* **2**, 161-166 (1984).

161. Ghosh, S. & Stack, M.S. Proteolytic modification of laminins: functional consequences. *Microsc Res Tech* **51**, 238-246 (2000).
162. Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 4350-4354 (1979).
163. Burggraf, D., *et al.* Matrix metalloproteinase induction by EMMPRIN in experimental focal cerebral ischemia. *Eur J Neurosci* **22**, 273-277 (2005).
164. Keuker, J.I., Luiten, P.G. & Fuchs, E. Capillary changes in hippocampal CA1 and CA3 areas of the aging rhesus monkey. *Acta Neuropathol (Berl)* **100**, 665-672 (2000).
165. Uspenskaia, O., Liebetrau, M., Herms, J., Danek, A. & Hamann, G.F. Aging is associated with increased collagen type IV accumulation in the basal lamina of human cerebral microvessels. *BMC Neurosci* **5**, 37 (2004).
166. Taruscio, D., *et al.* Increased reactivity of laminin in the basement membranes of capillary walls in AIDS brain cortex. *Acta Neuropathol (Berl)* **81**, 552-556 (1991).
167. Buttner, A., Mehraein, P. & Weis, S. Vascular changes in the cerebral cortex in HIV-1 infection. II. An immunohistochemical and lectin histochemical investigation. *Acta Neuropathol (Berl)* **92**, 35-41 (1996).
168. Fredriksson, K., Nordborg, C., Kalimo, H., Olsson, Y. & Johansson, B.B. Cerebral microangiopathy in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. An immunohistochemical and ultrastructural study. *Acta Neuropathol (Berl)* **75**, 241-252 (1988).
169. Nordborg, C., Fredriksson, K. & Johansson, B.B. The morphometry of consecutive segments in cerebral arteries of normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Stroke* **16**, 313-320 (1985).
170. Ferrante, F., Ricci, A., Rossodivita, I. & Amenta, F. Influence of treatment with the calcium channel blocker darodipine (PY 108-068) on the morphology of pial and coronary arteries in spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Hypertens* **16**, 341-357 (1994).
171. Harper, S.L. Effects of antihypertensive treatment on the cerebral microvasculature of spontaneously hypertensive rats. *Stroke* **18**, 450-456 (1987).
172. Harper, S.L. Antihypertensive drug therapy prevents cerebral microvascular abnormalities in hypertensive rats. *Circ Res* **60**, 229-237 (1987).
173. Roggendorf, W., Opitz, H. & Schuppan, D. Altered expression of collagen type VI in brain vessels of patients with chronic hypertension. A comparison with the distribution of collagen IV and procollagen III. *Acta Neuropathol (Berl)* **77**, 55-60 (1988).
174. Baumbach, G.L., Sigmund, C.D. & Faraci, F.M. Cerebral arteriolar structure in mice overexpressing human renin and angiotensinogen. *Hypertension* **41**, 50-55 (2003).
175. Baumbach, G.L. & Chillon, J.M. Effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors on cerebral vascular structure in chronic hypertension. *J Hypertens Suppl* **18**, S7-11 (2000).
176. Himeno, H., Crawford, D.C., Hosoi, M., Chobanian, A.V. & Brecher, P. Angiotensin II alters aortic fibronectin independently of hypertension. *Hypertension* **23**, 823-826 (1994).
177. Ulrich, R., Gerhauser, I., Seeliger, F., Baumgartner, W. & Alldinger, S. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in the developing mouse brain and spinal cord: a reverse transcription quantitative polymerase chain reaction study. *Dev Neurosci* **27**, 408-418 (2005).
178. Liebetrau, M., *et al.* ACE inhibition reduces activity of the plasminogen/plasmin and MMP systems in the brain of spontaneous hypertensive stroke-prone rats. *Neurosci Lett* **376**, 205-209 (2005).

179. Lu, X., *et al.* [The role of hepatic sinusoid capillarization during the formation of portal hypertension in fibrotic rats induced by dimethylnitrosamine]. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* **11**, 595-598 (2003).
180. Nag, S. Immunohistochemical localization of extracellular matrix proteins in cerebral vessels in chronic hypertension. *J Neuropathol Exp Neurol* **55**, 381-388 (1996).
181. van Boxtel, M.P., *et al.* Ambulatory blood pressure, asymptomatic cerebrovascular damage and cognitive function in essential hypertension. *J Hum Hypertens* (2005).
182. Ueno, M., *et al.* Blood-brain barrier disruption in the hypothalamus of young adult spontaneously hypertensive rats. *Histochem Cell Biol* **122**, 131-137 (2004).
183. Lee, R.M. Morphology of cerebral arteries. *Pharmacol Ther* **66**, 149-173 (1995).
184. Averna, M., *et al.* Regulation of calpain activity in rat brain with altered Ca²⁺ homeostasis. *J Biol Chem* **282**, 2656-2665 (2007).
185. PROGRESS-Studie. Randomised trial of a perindopril-based blood-pressure-lowering regimen among 6,105 individuals with previous stroke or transient ischaemic attack. *Lancet* **358**, 1033-1041 (2001).
186. Bosch, J., *et al.* Use of ramipril in preventing stroke: double blind randomised trial. *Bmj* **324**, 699-702 (2002).
187. Boschi, S., *et al.* Protective effects of delapril combined with indapamide or hydrochlorothiazide in spontaneously hypertensive stroke-prone rats: a comparative dose-response analysis. *J Cardiovasc Pharmacol* **36**, 321-328 (2000).
188. Ledingham, J.M. & Laverty, R. Renal afferent arteriolar structure in the genetically hypertensive (GH) rat and the ability of losartan and enalapril to cause structural remodelling. *J Hypertens* **16**, 1945-1952 (1998).
189. Anderson, C. Blood pressure-lowering for secondary prevention of stroke: ACE inhibition is the key. *Stroke* **34**, 1333-1334 (2003).
190. Lindholm, L.H., *et al.* Cardiovascular morbidity and mortality in patients with diabetes in the Losartan Intervention For Endpoint reduction in hypertension study (LIFE): a randomised trial against atenolol. *Lancet* **359**, 1004-1010 (2002).
191. Schrader, J., *et al.* Morbidity and Mortality After Stroke, Eprosartan Compared with Nitrendipine for Secondary Prevention: principal results of a prospective randomized controlled study (MOSES). *Stroke* **36**, 1218-1226 (2005).
192. Mancia, G. The association of hypertension and diabetes: prevalence, cardiovascular risk and protection by blood pressure reduction. *Acta Diabetol* **42 Suppl 1**, S17-25 (2005).
193. Rizzoni, D., *et al.* Effects of candesartan cilexetil and enalapril on structural alterations and endothelial function in small resistance arteries of spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol* **32**, 798-806 (1998).
194. Bath, P. Blood pressure-lowering for secondary prevention of stroke: ACE inhibition is not the key. *Stroke* **34**, 1334-1335 (2003).
195. Connors, J.J., 3rd. Pharmacologic agents in stroke prevention, acute stroke therapy, and interventional procedures. *J Vasc Interv Radiol* **15**, S87-101 (2004).

8.2 Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Deutsche Hochdruckliga e.V. DHL ® – Deutsche Hypertonie Gesellschaft, 2005
- Abb. 2: Deutsche Hochdruckliga e.V. DHL ® – Deutsche Hypertonie Gesellschaft, 2005
- Abb. 3: Universität Freiburg, Schweiz
- Abb. 4: LRZ München
- Abb. 5 + 6: RCSB Protein Data Bank
- Abb. 7: Memorial University of Newfoundland, Canada
- Abb. 8: Reverter D., Sorimachi H., Bode W.: The structure of calciumfree human m-calpain. Implications for calcium activation and function. Trends Cardiovasc Med. 2001 Aug;11(6):222-9.
- Abb. 9: University of Arizona, USA
- Abb. 10: Croall, D. E., DeMartino, G. N.: Calcium-activated neutral protease (calpain) system: structure, function, and regulation. Physiol Rev. 1991 Jul;71¹⁹⁵:813-47
- Abb. 11: Koichi Suzuki K., Hata S., Kawabata Y., Sorimachi H.: Structure, Activation, and Biology of Calpain. Diabetes. 2004 Feb;53 Suppl 1:S12-8
- Abb. 12: EMD Biosciences
- Abb. 13: Dianova, Hamburg
- Abb. 13: HAL Allergie GmbH
- Abb. 14: Pathologie Online, Dr. C. Henne, Fa. DAKO, Hamburg
- Abb. 16: Naturwissenschaftlicher Verein für Kärnten, Biochemie, Schweiz
- Abb. 17: Chemicon, Millipore, USA
- Abb. 18 + 23: Liebetrau M, Burggraf D, Büscher C, Linz W, Hamann GF.: Ramipril prevents extracellular matrix accumulation in cerebral microvessels. Neurol Res. 2005 Jul;27(5):477-82

8.3 Tabellenverzeichnis

- Tab. 1: Deutsche Hochdruckliga e.V. DHL® – Deutsche Hypertonie Gesellschaft, 2005
- Tab. 2: Indiana State University
- Tab. 3: http://www.ruhr.de/home/mcm/micro/artikel/text_bindegewebe.htm
- Tab. 4: University of Arizona, USA
- Tab. 5: Piercenet, Proteomics

9. Danksagung

Mein Dank gilt allen Mitarbeitern der Forschungsgruppe „Schlaganfall“ des Klinikums Großhadern, allen voran meinen Betreuern Prof. G.F. Hamann und Dr. Martin Liebetrau. Prof. Hamann möchte ich danken für die Überlassung des Themas, seinen fachlichen Rat und sein stetes Interesse am Fortgang der Arbeit. Besonderer Dank gebührt Dr. Liebetrau, der mir während meiner gesamten Arbeit hilfreich mit Rat und Tat zur Seite gestanden, mich in schwierigen Situationen unterstützt und einen Großteil der fachlichen Korrekturen übernommen hat. Das Entstehen der Arbeit in dieser Form wäre ohne ihn undenkbar gewesen. Danken möchte ich auch Nathalie Wunderlich und Gabriele Jäger für ihre geduldige Einarbeitung und Hilfe im Labor, außerdem Dr. Angela Müllner, Dr. Helge Martens und Dr. Milan Vosko für ihre Ratschläge und freundlichen Worte. Desweiteren gilt mein Dank PD Dr. Linz für die Durchführung der Tierversuche und die Bereitstellung der Gewebeproben.

Danken möchte ich auch meinen Eltern, die mir das Medizinstudium ermöglicht und mich im Entstehungsprozess dieser Arbeit fortwährend begleitet haben. Ohne sie wäre ich heute sicherlich nicht dort, wo ich bin. Dank auch an meine Geschwister Christoph, Sebastian und Dorothee für die zahlreichen Gespräche und ihre emotionale Unterstützung. Abschließend noch ein spezieller Dank an meinen Freund Sebastian Propp, der mir all die Zeit fachlich und emotional zur Seite gestanden und mich immer dann motiviert hat, wenn ich es am dringendsten brauchte.

10. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Christine Ingeborg Büscher
Geburtsdatum/-ort: 22.07.1978, Bünde

Schulbildung:

1989-1998 Immanuel-Kant-Gymnasium, Bad Oeynhausen
1995-1996 Bishop Hartley High School, Columbus, Ohio

Universitäre Ausbildung:

1998-2000 Medizinstudium an der Universität Rostock
2000-2005 Medizinstudium an der Ludwig-Maximilians-Universität, München
2005-2006 Aufbaustudium „Interkulturelle Japankompetenz“ an der Eberhard Karls Universität Tübingen und der Dōshisha Universität Kyōto, Japan
Stipendiatin der Alfred Krupp von Bohlen und Halbach-Stiftung

Famulaturen:

Stiftsklinik Augustinum, München: Innere Medizin
Osaka City University Hospital, Japan: Neurologie
Osaka City University Hospital, Japan: Pädiatrie
Sahlgrenska University Hospital, Göteborg, Schweden: Neurologie
China Medical College Hospital, Taichung, Taiwan: Akupunktur
Chubu Hospital, Okinawa, Japan: Pädiatrie
Rugby, England: Allgemeinarztpraxis

Praktisches Jahr:

1. Tertial Dr. von Haunersches Kinderspital, München: Pädiatrie
2. Tertial University Hospital of North Norway, Tromsø, Norwegen: Chirurgie
3. Tertial Kantonsspital St. Gallen, Schweiz: Innere Medizin

Berufliche Tätigkeit

seit 2007 Assistenzärztin an der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin der Friedrich-Schiller-Universität Jena

Publikationen:

M. Liebetrau, D. Burggraf, C. Büscher, W. Linz, G.F. Hamann, „Ramipril prevents extracellular matrix accumulation in cerebral microvessels“, Neurol. Res. 2005 July; 27: 477-82