

Aus der Klinik für Anaesthesiologie der Technischen Universität München
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. E. Kochs
und aus dem Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung der
Technischen Universität München
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. B. Gänsbacher

Angefertigt unter der Leitung von Herrn Univ.-Prof. Dr. med. C. Werner

Vorgelegt über den
Lehrstuhl für Allgemeine Pathologie und Neuropathologie
am Institut für Tierpathologie
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Univ.-Prof. Dr. med. vet. W. Schmahl

**Methodische Evaluierung der immunhistochemischen Detektion aktivierter Caspase-3 im
Hippokampus als Apoptoseparameter nach inkompletter zerebraler Ischämie bei der Ratte**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von
Susanne Matz
aus
Fürstenfeldbruck
München 2003

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. R. Stolla
Referent: Univ.-Prof. Dr. W. Schmahl
Koreferent: Univ.-Prof. Dr. F. Sinowatz

Tag der Promotion: 7. Februar 2003

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	7
2	Schrifttum.....	9
2.1	Anatomie des Gehirns	9
2.1.1	Blutversorgung und Stoffwechsel des Gehirns	10
2.1.2	Der Hippokampus.....	10
2.2	Zerebrale Ischämie	12
2.2.1	Tiermodelle zur zerebrale Ischämie	13
2.2.2	Pathophysiologie der zerebralen Ischämie	14
2.2.2.1	Nekrose.....	14
2.2.2.2	Apoptose.....	16
2.2.2.3	Caspasen und ihre Substrate.....	18
2.3	Immunhistochemische Verfahren zur Darstellung von Antigenen	20
2.3.1	Immunglobuline	20
2.3.1.1	Poly- und monoklonale Antikörper.....	20
2.3.1.2	Herstellung von Antikörpern.....	21
2.3.1.3	Einflussgrößen auf die Stabilität von Antikörpern.....	22
2.3.2	Grundprinzip der direkten und indirekten immunhistochemischen Färbetechniken ..	22
2.3.3	Entwicklung der verschiedenen immunhistochemischen Verfahren	23
2.3.4	Immunenzy-m-Verfahren	24
2.3.4.1	Immunperoxidase-Verfahren.....	25
2.3.4.2	Unterschiedliche Immunperoxidase-Techniken.....	25
3	Eigene Untersuchungen.....	28
3.1	Material und Methodik.....	28
3.1.1	Das Tiermodell	28
3.1.1.1	Versuchstiere	28
3.1.1.2	Versuchsaufbau	29
3.1.1.3	Versuchsdurchführung	31
3.1.1.4	Physiologische Messparameter	36
3.1.1.5	Präparation, Entnahme und Einfrieren des Gehirns	36
3.1.1.6	Dissektionsschema zur Gewinnung von Gewebeschnitten	37
3.1.2	Etablierung verschiedener polyklonaler Antikörper zur Detektion aktivierter Caspase-3	38
3.1.2.1	Polyklonale Primärantikörper.....	38

3.1.3	Vergleich des Färbeverhaltens verschiedener Antikörper gegen aktivierte Caspase-3 in der indirekten Immunhistochemie	40
3.1.3.1	Ermittlung der individuellen Arbeitskonzentration der Antikörper	41
3.1.3.2	Erklärung zur Vorgehensweise	42
3.1.3.3	Überprüfung der Spezifität der Antikörper	42
3.1.3.4	Durchführung der Immunhistochemie	43
3.1.4	Vergleich der aktivierten Caspase-3 Antikörper in der Western-Blot-Analyse	47
3.1.4.1	Aufbereitung des Probenmaterials für die Western-Blot-Analyse	47
3.1.4.2	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	48
3.1.4.3	Elektrotransfer von Proteinen	49
3.1.4.4	Immunoblot	49
3.1.4.5	Entwicklung	50
3.1.5	Nachweis von Proenzym Caspase-3 und Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) p85 Fragment als Apoptoseparameter	51
3.1.5.1	Polyklonale Primärantikörper	51
3.1.5.2	Detektion des Proenzym Caspase-3 CPP 32	52
3.1.5.2.1	Immunhistochemie	52
3.1.5.2.2	Western-Blot-Analyse	52
3.1.5.3	Detektion von Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) Fragment p85	53
3.1.5.3.1	Immunhistochemie	53
3.1.5.3.2	Western-Blot-Analyse	53
3.1.6	Geräte, Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Lösungen	54
3.2	Ergebnisse	60
3.2.1	Physiologische Messparameter	60
3.2.2	Vergleich der Primärantikörper gegen aktivierte Caspase-3	61
3.2.2.1	Vorgehensweise in der Immunhistochemie	61
3.2.2.2	Ergebnisse des Färbeverhaltens der Antikörper in der Immunhistochemie	62
3.2.2.3	Ergebnisse des Antikörpervergleichs in der Western-Blot-Analyse	80
3.2.3	Nachweis von Proenzym Caspase-3 und PARP Fragment p85 als Apoptoseparameter	85
3.2.3.1	Detektion des Proenzym Caspase-3	85
3.2.3.1.1	Ergebnisse in der Immunhistochemie	85
3.2.3.1.2	Ergebnisse in der Western-Blot-Analyse	87
3.2.3.2	Detektion des p85 Fragment von PARP	88
3.2.3.2.1	Ergebnisse in der Immunhistochemie	88
3.2.3.2.2	Ergebnisse in der Western-Blot-Analyse	90
4	Diskussion	91
4.1	Diskussion der Ergebnisse	91
4.1.1	Physiologische Messparameter	92
4.1.2	Unterschiede im Färbeverhalten der Primärantikörper gegen aktivierte Caspase-3	94
4.1.2.1	Einfluss der Antikörperherstellung	94
4.1.2.2	Lagerung und Handhabung	95

4.1.2.3	Mögliche Ursachen in der Immunhistochemie	96
4.1.2.4	Mögliche Ursachen in der Western-Blot-Analyse	96
4.1.3	Detektion des Proenzym Procaspase-3 CPP32	97
4.1.4	Detektion des p85 Fragment von PARP.....	98
4.2	Diskussion der Methoden.....	99
4.2.1	Das Tiermodell.....	99
4.2.2	Imunhistochemische Detektion von Antigenen	100
4.2.3	Bestimmung von Proteinen durch die Western-Blot-Analyse	100
4.3	Abschließende Betrachtung und Ausblick	101
5	Zusammenfassung	102
6	Summary	103
7	Literaturverzeichnis.....	104
8	Abkürzungsverzeichnis	112
9	Danksagung	115

1 EINLEITUNG

Laut Angaben des Statistischen Bundesamts Wiesbaden sterben in der Bundesrepublik Deutschland jährlich über 400 000 Menschen an den Folgen einer Herz-Kreislaufkrankung mit Minderperfusion von Organen, speziell der des Gehirns. Die komplette Unterbrechung der Blutzufuhr zum Gehirn ist in der Regel das Resultat eines vorübergehenden Herzstillstandes und manifestiert sich in einer globalen zerebralen Ischämie.

Störungen der Durchblutung im Versorgungsgebiet einzelner Hirnarterien führen zu fokalen Perfusionsdefiziten und werden als ischämischer Schlaganfall bezeichnet. Eine solche fokale zerebrale Ischämie kann permanent oder temporär bestehen und führt in dem betroffenen Bereich häufig zu erheblichen Ausfallserscheinungen.

Durch die Fortschritte der Notfall- und Intensivmedizin überleben immer mehr Menschen einen Schlaganfall oder Herzstillstand und sind damit potentiell den Folgen der zerebralen Ischämie ausgesetzt. In Abhängigkeit von Dauer und Ausprägung des ischämischen Insults kommt es zu nekrotischem und/oder apoptotischem (programmiertem) Zelltod, welcher für die auftretenden Defizite in Sensorium und Motorik verantwortlich ist.

Der akut verlaufende nekrotische Zelltod lässt nur eingeschränkte Möglichkeiten zur therapeutischen Intervention zu, wohingegen der langsame apoptotische Zelltod, der u.a. durch pro- und antiapoptotische Proteine und die Aktivierung der Caspase-Kaskade reguliert wird, ein breiteres therapeutisches Fenster bieten kann.

Ziel dieser Forschungsgruppe ist es, neuroprotektive Effekte von Anästhetika und Sedativa während einer inkompletten zerebralen Ischämie anhand der Verminderung der Apoptoserate im Hippokampus zu untersuchen. Hierzu ist zunächst ein zuverlässiger und eindeutiger immunhistochemischer Nachweis für Apoptose anhand der Detektion aktivierter Caspase-3, einem Schlüsselenzym des Apoptosezyklus, im durch Ischämie geschädigten Gewebe nötig.

In Vorversuchen wurde die aktivierte Caspase-3 mit einem polyklonalen Antikörper gegen die Fragmente 17-20 kD der aktivierten Caspase-3 (Cell Signaling Lot 4) immunhistologisch im ischämischen Hippokampus nachgewiesen. Dieses Enzym ist in seiner aktivierten Form nur in Zellen anzutreffen, die apoptotisch zugrunde gehen und gilt daher in der Literatur als Apoptosenachweis. Mit dem nachfolgenden Antikörper (Cell Signaling Lot 6) gelang es uns nicht, ein vergleichbares spezifisches Färbeergebnis zu erzielen.

EINLEITUNG

Dieses inkonstante Färbeverhalten der Antikörper, die sich nur durch ihre Chargennummer unterscheiden, war der Anlass in der vorliegenden Arbeit polyklonale Antikörper verschiedener Hersteller gegen aktivierte Caspase-3 für den immunhistologischen Nachweis von Apoptose nach inkompletter zerebraler Ischämie bei der Ratte zu testen. Die Antikörper werden vergleichend auf ihre Empfindlichkeit gegenüber der 17-20 Kilodalton (kD) schweren aktivierten Caspase-3 mit Hilfe der immunhistochemischen Streptavidin-Biotin-Komplex-Methode und der Western-Blot-Analyse untersucht.

2 SCHRIFTTUM

2.1 Anatomie des Gehirns

Das Gehirn lässt sich aufgrund seiner ontogenetischen und phylogenetischen Entwicklung, von kaudal betrachtet, in folgende vier Abschnitte einteilen: Rhombencephalon mit Myelencephalon und Metencephalon, Mesencephalon, Diencephalon und Telencephalon. Das Gehirn liegt von den drei Hirnhäuten (Dura mater, Arachnoidea und Pia mater) umgeben in der soliden Knochenkapsel des Hirnschädels und geht beim Austritt aus der Schädelhöhle im Bereich der Medulla oblongata in das Rückenmark über (NICKEL et al. 1992).

Das Rautenhirn, Rhombencephalon gehört zu den stammesgeschichtlich ältesten Teilen des Gehirns und besteht aus dem rostralen Hinterhirn, Metencephalon, und dem kaudalen Nachhirn, Myelencephalon und umschließt gemeinsam den IV. Ventrikel.

Das Mittelhirn, Mesencephalon gehört zum Hirnstamm und übernimmt bei niederen Wirbeltieren weitgehend die Rolle des Endhirns der Säugetiere, es ist neben optisch-statischen Koordination auch für Flucht- und Abwehrreaktionen verantwortlich.

Das Zwischenhirn, Diencephalon ist zum größten Teil von Endhirn überdeckt und deshalb erst nach Abtragen beider Hemisphären überblickbar. Es stellt die zentrale Sammelstelle für alle afferenten Erregungen dar, bevor sie an die Großhirnrinde übermittelt werden. Ebenso dient es mit dem Hypothalamus der Kontrolle und Regulation vegetativer Funktionen wie Stoffwechsel, Kreislauf, Wärmeregulation, usw. (NICKEL et al. 1992).

Der größte Teil des Hirns, das Telencephalon oder Endhirn, ist beim Säugetier der am stärksten differenzierte Gehirnabschnitt und zugleich das höchste Integrationszentrum des ZNS. Es besteht aus den zwei Hemisphären und dem unpaaren Mittelstück, dem Telencephalon medium mit mehreren unpaarigen Basalganglien. Diese übernehmen Teilaufgaben der motorischen Aktivität, besonders die Einleitung und Durchführung langsamer Bewegungen.

Die Hemisphären mit den Hippokampusformationen sind Sitz der Zentren für willkürliche Bewegung, für Sinneswahrnehmung von Auge, Nase und Ohr, Sitz des limbischen Systems und der Persönlichkeit (LIEBMAN 1993).

2.1.1 Blutversorgung und Stoffwechsel des Gehirns

Das Gehirn wird ausschließlich über zwei paarige Arterien, die Aa. carotides internae und die Aa. vertebrales perfundiert. Die Aa. vertebrales verlaufen entlang der Halswirbelsäule und treten über das Foramen magnum in die Schädelhöhle ein. Dort verbinden sie sich auf Höhe der Pons zur A. basilaris und versorgen besonders die medialen und basalen Anteile der Hemisphären. Die Aa. carotides internae treten über des Foramen lacerum in den Schädel ein und teilen sich in die Aa. cerebri anteriores und mediae auf. Die Aa. cerebri anteriores versorgen die beiden medialen Anteile der Hemisphären, während die Aa. cerebri mediae zu temporalen und frontalen Anteilen ziehen (PAXINOS 1995). Durch Anastomosen zwischen Aa. cerebri anteriores und der Aa. cerebri posterior (aus der A. basiliaris) bildet sich an der Hirnbasis der sogenannte Circulus arteriosus Willisii. Dieser Kollateralkreislauf stellt eine Verbindung zwischen anteriorem und posteriorem Stromgebiet dar und ist somit von großer klinischen Bedeutung (LIEBMAN 1993).

Das Gehirn eines Menschen wiegt etwa 2 % des gesamten Körpergewichtes und wird von 12-15 % des Herzzeitvolumens durchströmt (DRUMMOND und SHAPIRO 1990). Die starke Durchblutung ist Ausdruck des hohen Energiebedarfs. Das Gehirn verbraucht ca. 20 % (170 $\mu\text{mol}/100 \text{ g}/\text{min}$) des Sauerstoffs und über ein Viertel (31 $\mu\text{mol}/100 \text{ g}/\text{min}$) der Glukose, die dem gesamten Körper zur Verfügung steht (FITCH 1994).

Eine Unterbrechung der Substratzufuhr durch Mangel durchblutung (zerebrale Ischämie) führt innerhalb von Sekunden zu funktionellen Einschränkungen in der Erregungsübertragung oder auch zu strukturellen, irreversiblen Schäden, wie dem Zusammenbruch wichtiger metabolischer Funktionen, die letztlich zum Tod der Zellen führen können (DRUMMOND und SHAPIRO 1990; DIRNAGL und MEISEL 1999).

2.1.2 Der Hippokampus

Die Hippokampusformation, bestehend aus Hippokampus oder Ammonshorn, Gyrus parahippocampalis, Gyrus dentatus, Fimbria hippocampi und Fornix gehört zum Limbischen System welches zum Telecephalon zählt. Der Hippokampus stellt sich im Querschnitt durch das Gehirn als bogenförmig abgekrümmte Formation im Unterhorn des Seitenventrikels dar

(NICKEL et al. 1992). Er lässt sich in folgende Abschnitte einteilen: CA1-, CA2- und CA3-Region, die kappenartig vom oberen und unteren Ast des Gyrus dentatus umschlossen wird (PAXINOS 1995).

Die Formation des Hippokampus steht in experimentellen Studien zur zerebralen Ischämie häufig im Mittelpunkt des Interesses. Sie ist selektiv vulnerabel, d.h. die einzelnen Abschnitte reagieren auf Energie- und Sauerstoffmangel unterschiedlich sensibel. Eine durch Ischämie bedingte Zellschädigung tritt demzufolge im Hippokampus zuerst in der CA1-Region auf (DIRNAGL und MEISEL 1999). Andere Teile des Gehirns entwickeln in Abhängigkeit von Schwere und Dauer des Insults auch ischämie-induzierte Veränderungen (NEWBERG MILDE und WEGLINSKI 1994).

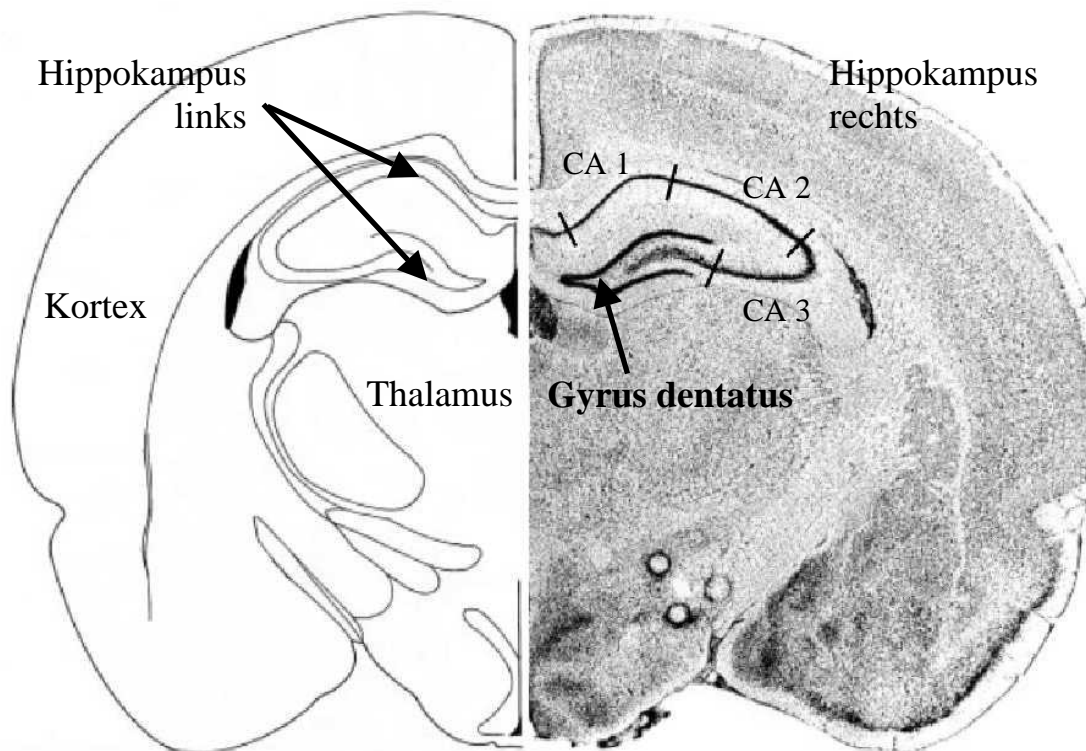


Abb. 1: Koronarer Schnitt durch ein Rattengehirn mit Hippokampus einschließlich gekennzeichnete CA1-, CA2-, und CA3-Region und Gyrus dentatus; Lokalisation im Gehirn: Ebene 33, modifiziert Abbildung nach PAXINOS und WATSON (1998).

2.2 Zerebrale Ischämie

Zerebrale Ischämie bezeichnet die Verminderung oder vollständige Unterbrechung der Hirndurchblutung durch Verlegung oder Spasmen der zuführenden Gefäße. In den betroffenen Arealen kommt es zu einer Unterversorgung mit Energie und Sauerstoff und somit zur Schädigung des Gewebes. Bei der zerebralen Ischämie lassen sich eine fokale und eine globale Ischämieform unterscheiden. Die fokale Form betrifft nur Teile des Gehirns, während bei der globalen Form das gesamte Gehirn in Mitleidenschaft gezogen ist (WERNER 2000).

Die fokale zerebrale Ischämie tritt häufig als Folge von Embolien, Thrombosen, Vasospasmen oder Verlegung von Gefäßen durch raumfordernde Prozesse (Neoplasien) in der Umgebung auf. Gekennzeichnet ist diese Schädigung durch ein im Zentrum liegenden Infarktbereich mit Pannekrose, der von einer mäßig durchbluteten Randzone, der sog. Penumbra umgeben ist. In der Penumbra ist die Perfusion soweit abgesunken (etwa 2-4 ml/g/min), dass der Funktionsstoffwechsel gestört ist, der Strukturstoffwechsel bleibt jedoch zunächst erhalten. Bei anschließender Reperfusion in einem bestimmten Zeitfenster ist das Areal überlebensfähig (SIESJÖ 1992; HOSSMANN 1994).

Die komplette globale zerebrale Ischämie ist in der Regel das Resultat eines Herz-Kreislaufstillstandes, die Durchblutung z.B. im Kortex fällt von 8 ml/g und min (PULSINELLI et al. 1982) auf praktisch 0 ab. Nach etwa 10 sec kommt es zur Bewusstlosigkeit und nach wenigen Minuten ist mit irreversiblen Schäden bzw. dem Hirntod zu rechnen. Bei Perfusionsstörungen durch erhöhten intrakraniellen Druck, z.B. durch ein diffuses Hirnödem spricht man von einer inkompletten globalen Ischämie (WERNER 2000).

Im Unterschied zur fokalen Ischämie kommt es bei der globalen Ischämie mit anschließender Reperfusion normalerweise zur verzögerten Schädigung von neuronalen Zellen. Neurone sind selektiv vulnerabel, d.h. sie reagieren unterschiedlich auf eine ischämische Schädigung. Die Selektivität betrifft sowohl den Zelltyp als auch die Hirnregion. Am empfindlichsten sind Zellen der CA1-Region des Hippokampus, weniger vulnerabel sind Neurone des Cortex und der Basalganglien. Gliazellen und Gefäßendothelien werden zu Beginn einer globalen Ischämie mit Perfusion meist nicht geschädigt (DIRNAGL und MEISEL 1999; KRISTIAN und SIESJÖ 1998).

2.2.1 Tiermodelle zur zerebrale Ischämie

Es sind viele, zum Teil sehr unterschiedliche Tiermodelle beschrieben, die eine zerebrale Ischämie mit Zellschädigung herbeiführen. Die verschiedenen globalen und fokalen Ischämie-Modelle unterscheiden sich hinsichtlich der Ausbreitung und Intensität des Schadens, aber auch im Ausmaß des operativen Eingriffs.

Um eine transiente globale Ischämie auszulösen, wird die Blutversorgung des gesamten Gehirns für einen Zeitraum von bis zu 30 min, durch Okklusion der zuführenden Gefäße unterbrochen. Beim „two-vessel-occlusion model“ werden beide Aa. carotides communes vorübergehend verschlossen, zusätzlich wird der Blutdruck durch systemische Hypotension gesenkt. Hier sind besonders Strukturen der frontalen Hirnareale betroffen (GINSBERG und BUSTO 1989).

PULSINELLI und BRIERLEY beschrieben 1979 erstmals die sogenannte „four-vessel occlusion“, den Verschluss aller das Gehirn direkt versorgenden Arterien. Hierbei werden zunächst die Aa. vertebrales auf Höhe des ersten Halswirbels dauerhaft verschlossen. Dann wird die Ischämie durch den zeitweisen Verschluss (10 und 20 min) beider Aa. carotides communes eingeleitet (PULSINELLI et al. 1982).

Eine weitere Methode besteht darin, durch gezielte intrakranielle Infusion von Liquor cerebrospinalis in die Ventrikel den Hirndruck über das Level des normalen Blutdrucks hinaus zu erhöhen. Dadurch wird eine Kompression der Hirngefäße ausgelöst, eine Versorgung des Gewebes mit Sauerstoff und Glukose ist nicht mehr möglich (LJUNGGREN et al. 1974).

NAKASHIMA et al. (1995) induzierte eine globale Ischämie, indem er einen durch Kalium ausgelösten Herzstillstand provozierte. Die Reanimation der Tiere, und somit die konsekutive Reperfusion des Gehirns, wird durch Elektrostimulation erreicht.

Zur Induktion einer fokalen zerebralen Ischämie wird häufig das Model der Okklusion der A. cerebri media (MCA) angewendet. Der Nachteil dieser Methode ist die oft sehr inkonstante Infarktgröße, da bei den einzelnen Tieren das Vorhandensein von Kollateralgefäßen stark variieren kann und so das Gewebe von Tier zu Tier unterschiedlich durchblutet wird (GINSBERG und BUSTO 1989; SIESJÖ 1992).

In einer Studie zum apoptotischen Zelltod von CA1 Pyramidenzellen im Hippokampus führt NITATORI et al. (1995) eine milde zerebrale Ischämie bei Wüstenspringmäusen herbei, indem er beidseits die Aa. carotis communis für 5 min verschließt.

Andererseits verschließt HOFFMAN et al. (1990) nur die rechte A. carotis communis und senkt gleichzeitig durch Hypotension den mittleren arteriellen Blutdruck (MAP) für 30 min auf 30 mmHg. (Dieses Ischämiemodell entspricht zum großen Teil dem in der vorliegenden Studie verwendeten Modell).

Die verschiedenen etablierten Ischämiemodelle haben unterschiedliche Auswirkungen auf das neuronale Gewebe, sowohl im Bezug auf den Pathomechanismus (Entstehung von Pannekrose und selektiv neuronalem Zelltod), als auch auf Ausmaß und Lokalisation des Schadens (STOLL et al. 1998). Der Untersucher kann sich so, je nach gewünschter Ausprägung des Gewebeschadens, für das geeignete Modell entscheiden.

2.2.2 Pathophysiologie der zerebralen Ischämie

Der Substratmangel im Gehirn bei Einschränkung der zerebralen Perfusion triggert eine Kaskade von Schadensmechanismen, welche sich über Stunden, Tage und Wochen entwickeln. Bei ungenügendem Angebot an Sauerstoff und Glukose wird die Energiegewinnung der Zelle in Form von Adenosintriphosphatbildung (ATP) stark eingeschränkt (FABER et al. 1981). Steht Sauerstoff nicht mehr zur Verfügung muss auf die viel ineffektivere anaerobe Glykolyse ausgewichen werden. Sind alle Energiereserven der Zelle verbraucht, steuert sie ihrem baldigen Tod (Nekrose) entgegen. Sind noch Reste an Energie vorhanden, so besteht die Möglichkeit, dass die Zelle dem verzögerten Zelltod (programmierter Zelltod, Apoptose) erliegt (NEWBERG MILDE und WEGLINSKI 1994).

Ausmaß und Qualität der Zellschädigung hängen hierbei entscheidend von der Form und der Dauer der Ischämie, der betroffenen Hirnregion, der Reperfusion und eventueller intra- oder postischämischer protektiver Maßnahmen ab (WERNER 2000).

2.2.2.1 Nekrose

In der Regel tritt der nekrotische Zelltod bereits 12-24 Stunden nach dem ischämischen Insult ein (GRAHAM und LANTOS 1997).

Es kommt aufgrund der nicht mehr ausreichenden ATP Reserven zur Stimulierung der anaeroben Glykolyse mit Akkumulation von Laktat und anderer saurer Valenzen. Durch die Laktazidose wird die Membranpermeabilität gesteigert, energieabhängige Ionenpumpen versagen; Na^+ , Cl^- und Wasser strömen in die Zelle ein, K^+ strömt aus. Die energieabhängigen Na^+ - Ca^{2+} -Antiporter kehren ihre Richtung um, was zu einem weiteren Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führt (SIESJÖ 1992). Durch die beginnende anoxische Depolarisation kommt es zur massiven Ausschüttung von exzitatorischen Neurotransmittern, vor allem von Glutamat. Dies führt über postsynaptische Rezeptoren wiederum zu einem Ca^{2+} -Einstrom in die Zellen. Zusätzlich wird die massive Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern stimuliert. Als Folge der hohen Ca^{2+} -Konzentration in der Zelle kommt es zur unspezifischen Induktion einer Vielzahl von Enzymsystemen, wie den Proteasen, den Endonukleasen z.B. der Proteinkinase C und der Phospholipase A2. Diese Enzyme induzieren die Hydrolyse zellulärer Strukturen und führen zum Untergang der Zelle. Es kommt auf verschiedenen Wegen zur Bildung von freien Radikalen, die ebenfalls zur Zerstörung von Membranen und Strukturproteinen beitragen. Wenn Sauerstoff nach der Reperfusion als Substrat wieder zu Verfügung steht, sind freie Sauerstoffradikale wichtige Mediatoren der Zellschädigung (CHALMERS-REDMAN et al. 1997; DIRNAGL und MEISEL 1999).

Histologisch lassen sich nekrotische Zellen anhand einiger morphologischer Kriterien identifizieren. Durch den Verlust der Membranintegrität zu einem relativ frühen Zeitpunkt kommt es zum passiven Einstrom von Ionen und Wasser. Die Zelle schwillt an, es entsteht ein Zellödem. Das Chromatin dekondensiert durch das veränderte Ionenmilieu, die Desoxyribonukleinsäure (DNS) zerfällt unkontrolliert in verschieden große Fragmente und die Zellorganellen treten in den Extrazellularraum aus (WYLLIE et al. 1972). Die Zellkerne erscheinen unter dem Lichtmikroskop pyknotisch, sie sind mit Hämalaun dunkelblau anfärbbar, Eosin färbt das Zytoplasma mit Zunahme der sauren Abbauprodukte rot. Während der Nekrose kommt es überwiegend zum Tod ganzer Zellgruppen. Die sterbenden Zellen bzw. die austretenden Zellbestandteile werden als Antigen erkannt, durch Makrophagen und neutrophile Granulozyten phagozytiert und rufen somit eine Endzündungsreaktion hervor (GRAHAM und LANTOS 1997).

Nekrose

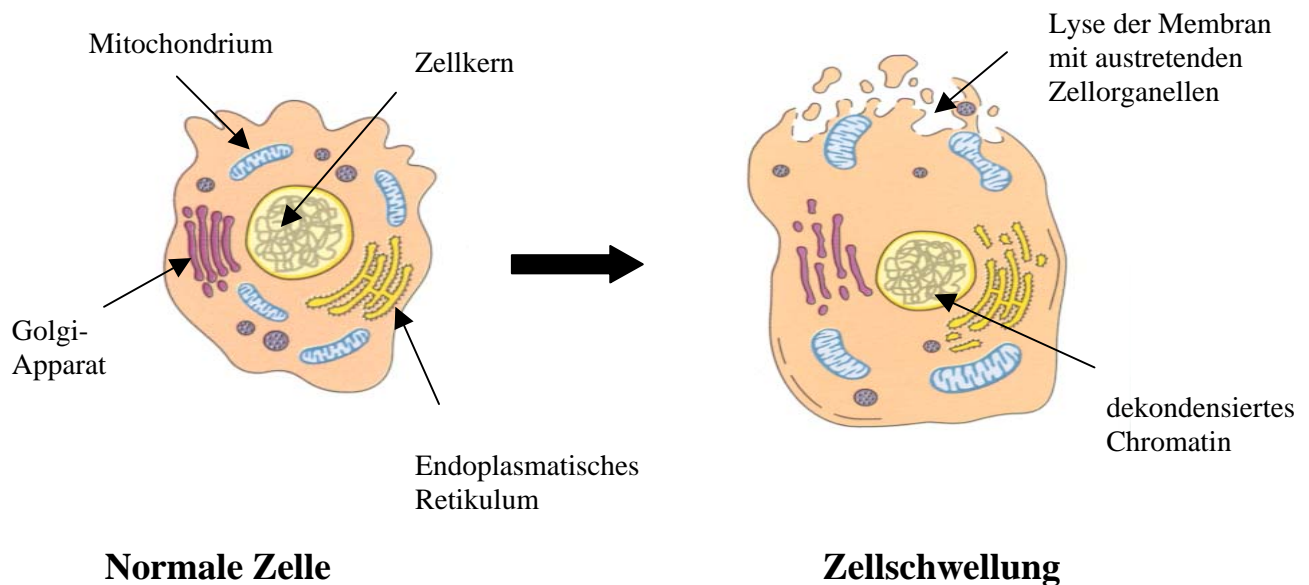


Abb. 2: Illustration der morphologischen Veränderung der Zelle während der Nekrose (modifizierte Abbildung von Boehringer, Mannheim: „Apoptosis and Cell Proliferation“ 1998).

2.2.2.2 Apoptose

Von KERR et al. wurde erstmals 1972 der Terminus Apoptose geprägt, um damit die langsame, zeitlich später eintretende Form des programmierten Zelltods gegen den schnellen nekrotischen Zelluntergang abzugrenzen.

Der programmierte Zelltod (Apoptose) ist ein bedeutendes Schlüsselement bei der Aufrechterhaltung der physiologischen Stabilität vielzelliger Organismen. Zusammen mit Proliferation und Differenzierung reguliert diese Form des organisierten Zelltods das Gleichgewicht zwischen Verlust und Zugewinn an Zellen, welches für den Aufbau, besonders in der Embryogenese, und den Erhalt der verschiedenen Gewebe unerlässlich ist (HALE et al. 1996). Auch bei pathologischen Geschehen wie neurodegenerativen Erkrankungen (Chorea Huntington, Alzheimer Krankheit), Autoimmunerkrankungen und zerebraler Ischämie wird der Apoptose heute eine bedeutende Rolle zugeschrieben (NIWA et al. 2001).

Die Apoptose kann durch unterschiedliche Faktoren ausgelöst werden. Zum einen durch Stimuli, die über Oberflächenrezeptoren (FAS, TNF-Rezeptorfamilie) auf die Zelle einwirken (extrinsischer Aktivierungsweg). Oder aber durch Stress im weitesten Sinne, ausgelöst durch

Toxine, Hitzebelastung oder radioaktive Strahlung, kann die Expression apoptose-assoziiierter Proteine angeregt werden (intrinsischer Aktivierungsweg) (BUDIHardJO et al. 1999; ELDADAH und FADEN 2000). Auch ein Mangel an für die Zelle überlebenswichtigen Substanzen kann zum Zelltod durch Apoptose führen. Darüber hinaus haben tierexperimentelle Studien gezeigt, dass die Aktivierung der Apoptose bei der Vermittlung des Zelltods nach einer zerebralen Ischämie große Bedeutung hat (LEIST und NICOTERA 1998).

Zellen mit apoptotischem Schicksal zeigen initial keine morphologischen Veränderungen im Sinne einer Nekrose, sondern stellen nach einem Insult zunächst wieder eine ausreichende Energieversorgung und ein physiologisches Membranpotential her. Nach Stunden oder Tagen zeigen sich jedoch die Charakteristika für den Start des programmierten Zelltods (COHEN 1993). Es kommt zu einem diskreten Umbau der Zellmembran durch Translokation von Phosphatidylserin an die Oberfläche, zum Abbau der Kernmembran, zu einer Kondensation des Chromatins und zur gleichmäßigen Fragmentierung der DNA, sowie zur Entstehung abgeschnürter Zellbestandteile (apoptotic bodies) bestehend aus kondensiertem Intrazellulärmaterial, welches von einer intakten Zellmembran umgeben ist (KERR et al. 1972; JOHNSON et al. 1995).

Apoptose

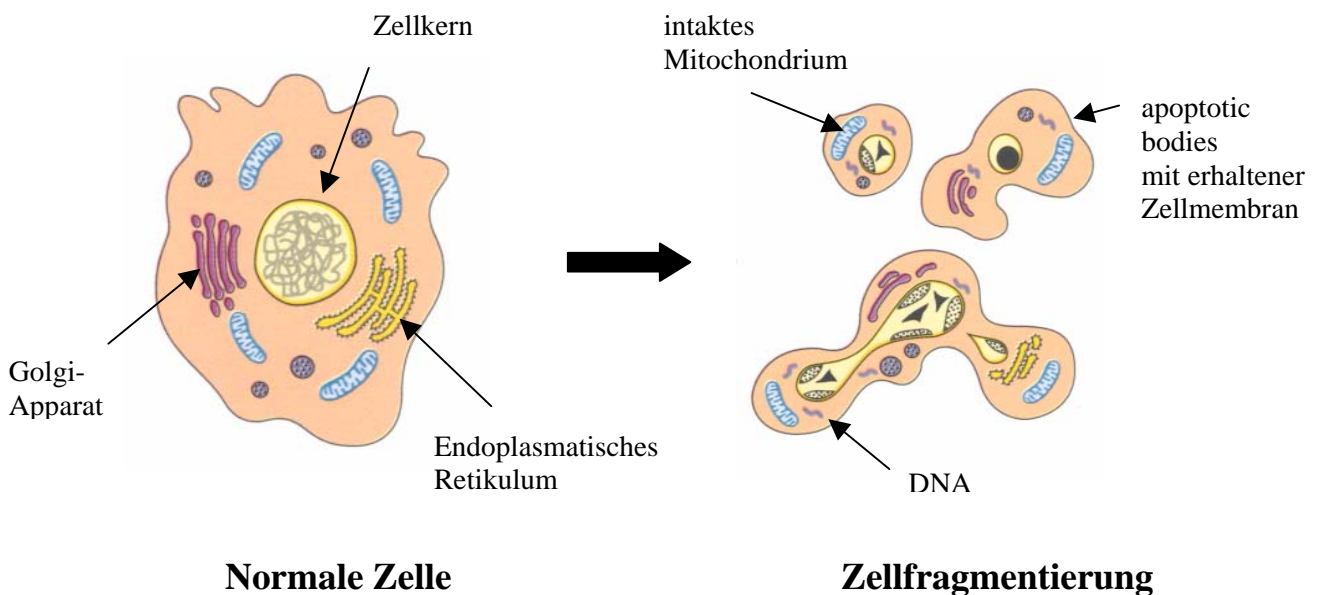


Abb. 3: Illustration der morphologischen Veränderungen der Zelle während der Apoptose (modifizierte Abbildung von Boehringer, Mannheim: „Apoptosis and Cell Proliferation“ 1998).

Obwohl die Faktoren bezüglich der Initiierungsphase des Zelltodprogramms sehr heterogen sind, führen alle letztlich zur Aktivierung von proteolytischen Enzymen, den sogenannten Caspasen. Die Aktivierung der Apoptose kann als reine Caspase Reaktionskaskade ablaufen, bei schwacher Stimulation spielen aber auch mitochondriale Auflösungsprozesse mit der Freisetzung von Cytochrom C eine entscheidende Rolle (WHITE et al. 2000; PUKA-SUNDEVALL et al. 2000).

2.2.2.3 Caspasen und ihre Substrate

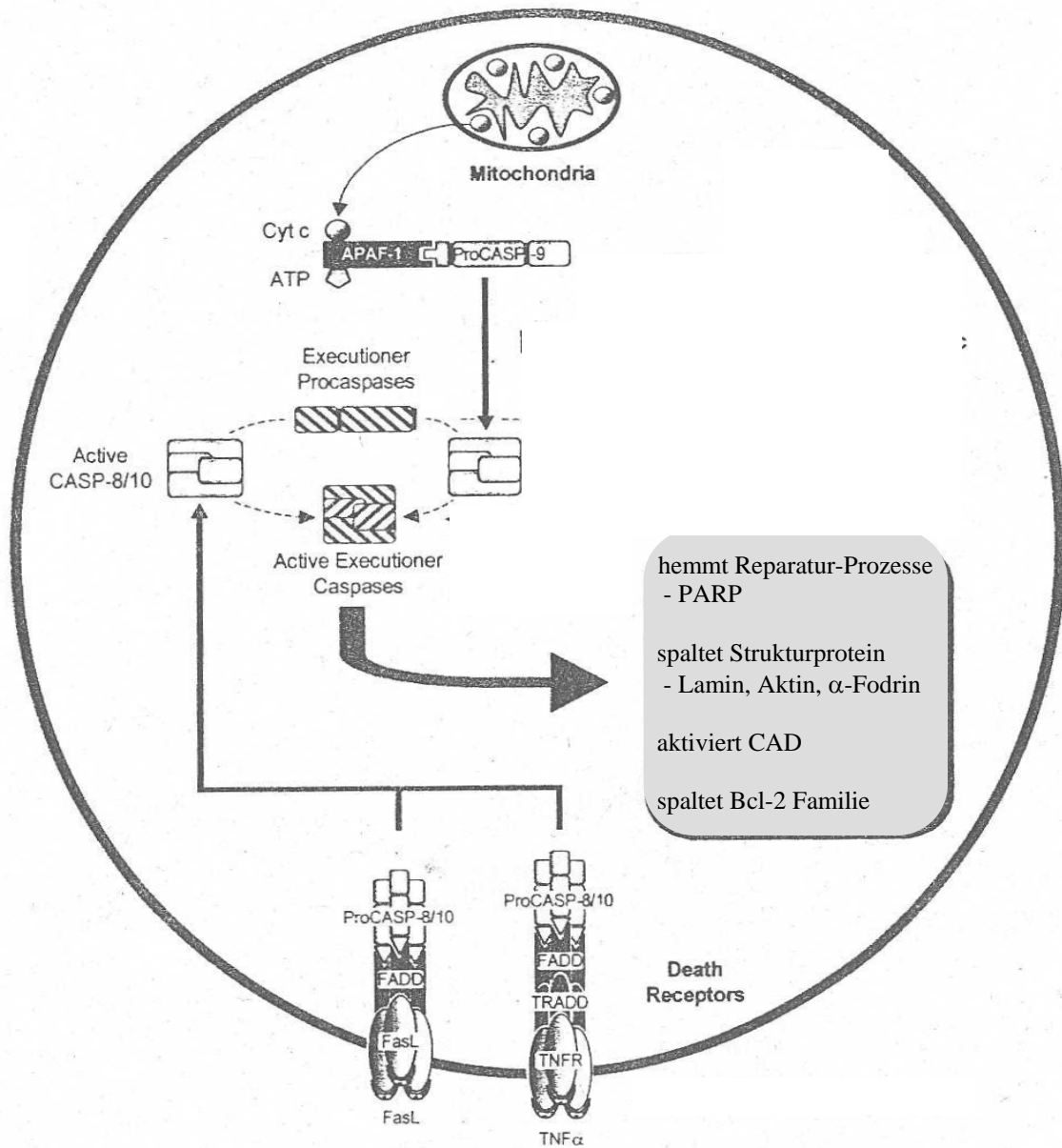
Die Caspasen (Cystein Aspartate-specific Proteinases) bilden eine Familie aus asparaginsäurespezifischen proteolytischen Enzymen, deren Aktivierung auf ein proapoptotisches Signal hin erfolgt und zur Zerlegung einer Vielzahl zellulärer Proteine führt. Caspasen liegen in einer inaktivierten Form, auch Procaspasen genannt, konstitutiv im Zytoplasma vor und können durch Proteolyse in ihre aktive Form überführt werden. Die Procaspasen bestehen aus je drei Domänen: Einer N-terminalen Prodomäne (~23-216 Aminosäuren), einer großen Untereinheit (~20 kD) und einer kleinen Untereinheit (~10 kD) (BREDESEN 2000). Die Aktivierung erfolgt in der Regel durch proteolytische Prozessierung nach einem Aspartat, das sich zwischen den jeweiligen Untereinheiten befindet. Die Prodomäne wird abgespalten, es lagern sich zwei große und zwei kleine Untereinheiten zu einem stabilen Tetramer zusammen, welcher dann katalytisch aktiv ist (ELDADAH und FADEN 2000; LOS et al. 1999). Caspasen besitzen einerseits die Fähigkeit zur eigenen Prozessierung, können aber auch als Teil einer Kaskade andere Caspasen aktivieren.

Man unterscheidet sogenannte Initiatorcaspasen (Caspase-2, -8, -9 und -10), die am Anfang der Signalkette stehen, von sog. Effektorcaspasen (Caspase-3, -6 und -7), die von den Initiatorcaspasen aktiviert werden und dann ihrerseits andere Substrate abbauen (RAGHUPATHI et al. 2000).

Eines dieser Substrate ist die Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP), ein in Eukaryonten hochkonserviertes Zellkernenzym, das Zn^{2+} -abhängig an DNA-Stränge binden kann und dort in der Lage ist, Brüche zu erkennen und zu beheben. Durch aktivierte Caspase-3 wird PARP (116 kD) in ein 85-89 kD und ein 27-31 kD Fragment gespalten (KAUFMANN et al. 1993). Granzym B, eine Serin-Protease, wird ebenfalls durch Caspase-3 oder Caspase-8 aktiviert und spaltet PARP in ein 54 kD und ein 64 kD Fragment (DURIEZ und SHAH 1997). Caspase-3 setzt aus

einem für die Zelle zunächst unschädlichen Komplex die ihrerseits für die Fragmentierung chromosomaler DNA verantwortliche Nuclease CAD (Caspase-Activated Desoxyribonuclease) frei (CAO et al. 2001). Ebenso werden vorher antiapoptotisch wirksame Proteine der Bcl-2 Familie gespalten (Bid, Bcl-xL), die dann einen proapoptotischen Einfluss auf die Zelle ausüben. Daneben sind Strukturproteine wie das nukleäre Matrixprotein Lamin, Aktin oder α -Fodrin mögliche Ziele der Aktivität von Caspasen (PETTMANN und HENDERSON 1998).

Intrinsischer Aktivierungsweg



Extrinsischer Aktivierungsweg

Abb. 4: modifiziertes Schema der Caspase-Aktivierungswege (ELDADAH und FADEN 2000)

2.3 Immunhistochemische Verfahren zur Darstellung von Antigenen

Immunhistochemische Färbemethoden zählen heute zu den Standardverfahren in der Histologie und Diagnostik insbesondere von Tumorerkrankungen. Zentrales Reagenz aller immunhistochemischer Färbungen sind Immunglobuline, die als spezifisches Antikörperserum oder als monoklonaler Antikörper gegen ein Vielzahl von verschiedenen Gewebsantigenen gerichtet sind (BOENISCH 2000).

2.3.1 Immunglobuline

Antikörper sind Serumproteine, die als spezifische Antwort auf den Kontakt mit einer körperfremden Substanz (Antigen) vom Immunsystem des Organismus gebildet werden (STRYER 1996; VOET 1996). Sie gehören zur Gruppe der Immunglobuline (Ig) welche hinsichtlich ihrer Größe, Gewicht, Struktur und Funktion in folgende 5 Klassen eingeteilt werden: IgA, IgD, IgE, IgG und IgM (LÖFFLER und PERTIDES 1998).

Die vollständige Aminosäuresequenz eines Immunglobulins wurde 1968 von EDELMAN aufgeklärt. Demnach besteht jedes Immunglobulin aus zwei identischen schweren und zwei identischen leichten Proteinketten. Die schweren Ketten unterscheiden sich in antigenen und strukturellen Eigenschaften und bestimmen so die Klassen (STRYER 1996).

Antikörperlösungen, die für immunhistochemische Färbungen eingesetzt werden, enthalten vorwiegend Antikörper vom Typ IgG und IgM (BOENISCH 2000; BOURNE 2000).

2.3.1.1 Poly- und monoklonale Antikörper

Die Spezifität eines Antikörpers richtet sich gegen eine bestimmte Stelle auf dem Antigen, die sogenannte „antigene Determinante“ oder das „Epitop“ (STRYER 1996). Jedes Antigen besitzt mehrere Epitope, aber ein B-Lymphozyt kann nur gegen ein Antigenepitop Antikörper bilden. Im Organismus entstehen natürlicherweise polyklonale (d.h. durch viele Zellen gebildete) Antikörper. Verschiedene B-Zellen bilden unterschiedliche Antikörper gegen die Vielzahl der

Epitope des gleichen Antigens. Als Konsequenz davon sind polyklonale Antikörper immunchemisch unterschiedlich und reagieren mit verschiedenen Epitopen eines Antigens.

Im Gegensatz dazu werden in vitro monoklonale Antikörper von einer einzigen selektierten B-Zell-Linie (Klon) gebildet. Sie sind immunchemisch identisch und reagieren nur mit einem spezifischen Epitop des Antigens, gegen das sie gerichtet sind (BOENISCH 2000; BOURNE 2000).

2.3.1.2 Herstellung von Antikörpern

Um Antikörper für den Laborbedarf zu produzieren, ist es zunächst notwendig das Antigen zu reinigen. Das hochreine Antigen wird dann einem Tier, das einer anderen Spezies (meist Kaninchen) angehören muss, als das Tier von dem das Antigen stammt, injiziert. In Abhängigkeit von der Immunogenität des Antigens werden unterschiedliche Konzentrationen, oder zusätzlich immunstimulierende Adjuvantien, z.B. Keyhole limpet haemocyanin (KLH) oder Freund's Adjuvans eingesetzt, um eine ausreichende Immunantwort, d.h. die Produktion polyklonaler Antikörper im Tier, auszulösen (BENNETT et al. 1992). Abhängig von der zur Immunisierung eingesetzten Antigenosis variiert die Höhe des Antikörpertiters und die Affinität der gebildeten Antikörper (SISKIND et al. 1967).

Die Antikörperproduktion beginnt bereits 20 min nach der Injektion, eine messbare Antikörpermenge ist jedoch erst nach 5-13 Tagen feststellbar. Booster-Injektionen zur Erhaltung oder Steigerung des Titers sind alle vier Wochen erforderlich, um eine gleichbleibende Antikörperproduktion zu fördern. Die Blutabnahme erfolgt alle zwei Wochen, beim Kaninchen aus der Ohrvene, bei größeren Tieren aus der V. jugularis. Die zellulären Bestandteile und unerwünschten Proteinfractionen werden entfernt. Über eine Affinitäts-Chromatographie werden die antigenspezifischen polyklonalen Antikörper isoliert und von Immunglobulinen, welche mit anderen Spezies kreuzreagieren, getrennt (BOENISCH 2000).

Zur Herstellung monoklonaler Antikörper werden aus ökonomischen Gründen fast ausschließlich Mäuse verwendet, ihnen wird ebenfalls zuerst das Antigen injiziert. Die Selektion des B-Zell-Klons, der den Antikörper gegen das gewünschte Epitop produziert, muss außerhalb des Tieres erfolgen. Hierzu wird die Milz, die große Mengen von B-Lymphozyten enthält, entnommen und eine Zellsuspension hergestellt. Diese Zellen sind jedoch in Kultur nicht lebensfähig und werden

deshalb mit Myelom-Zellen (tumorösen B-Zellen) fusioniert. Es entstehen Hybridome die außerhalb des Wirtsorganismus fast unbegrenzt lebensfähig sind (PASTERNAK 1997).

Ist der Klon identifiziert, der Antikörper gegen das gewünschte Epitop produziert, werden Zellen dieses Klon wiederum in eine Maus injiziert, wo sie die Bildung eines Tumors hervorrufen. Die Aszitesflüssigkeit des Tumors enthält eine hohe Konzentration des Antikörpers, aber auch andere Immunglobuline und Proteine, weshalb auch hier ein Reinigungsschritt erfolgen muss.

Eine andere Herstellungsmethode für monoklonale Antikörper besteht darin, die Hybridome in Zellkultur zu züchten. Die Zellüberstände enthalten geringere Antikörperkonzentrationen als Aszites, allerdings enthalten sie keine unerwünschten Mäuse-Immunglobuline oder andere Proteine (PASTERNAK 1997; WARD et al. 1998).

2.3.1.3 Einflussgrößen auf die Stabilität von Antikörpern

Isolierte Antikörper erweisen sich bei Lagerung zwischen 2 und 8 °C im Vergleich zu Antikörpern, denen zusätzlich Serumproteine beigemischt sind, als weniger stabil.

Die Stabilität gereinigter Antikörper-Präparationen hängt vor allem vom Reinigungsverfahren ab. Werden Antikörper dabei niedrigen pH-Werten oder aber hohen, bzw. extrem niedrigen Salzkonzentrationen ausgesetzt, beeinträchtigt das ihre Haltbarkeit. (BOENISCH 2000).

Durch hydrophobe Interaktionen zwischen IgG-Molekülen kann es zur Bildung von unlöslichen Polymeren kommen, die bei immunhistochemischer Anwendung für unspezifische Bindungen verantwortlich sein können.

Wie Untersuchungen von UNDERWOOD und BEAN (1985) zeigen, haben verschiedene physikalische Bedingungen wie Hitze und Kälte Einfluss auf die Spezifität, Affinität und Kreuzreaktivität auf 42 % der untersuchten monoklonalen Antikörper.

2.3.2 Grundprinzip der direkten und indirekten immunhistochemischen Färbetechniken

Das Prinzip aller immunhistochemischen Färbeverfahren beruht auf einer Komplexbildung zwischen den jeweils gesuchten Antigenen und den dazugehörigen spezifisch bindenden Antikörpern. Um die sich bildenden Antigen-/Antikörper-Komplexe im Gewebeschnitt sichtbar

zu machen, sind die verwendete Antikörper mit verschiedenen Markersystemen gekoppelt (AVRAMEAS 1972). Es wird zwischen einer direkten und indirekten Nachweismethode unterschieden. Bei der „direkte Methode“ wird nur ein für das gesuchte Antigen spezifischer Antikörper, gekoppelt mit einem Marker verwendet. Bei der „indirekte Methode“ führt ein System von mindestens zwei Antikörpern zu einer Signalverstärkung, die, wie im Weiteren beschrieben, über verschiedene Nachweismethoden sichtbar gemacht werden kann (NOLL und SCHAUB-KUHNEN 2000).

2.3.3 Entwicklung der verschiedenen immunhistochemischen Verfahren

Am Beginn aller immunhistologischen Nachweisverfahren steht die von COONS et al. 1941, sowie COONS und KAPLAN 1950 eingeführte Kopplung von Fluoreszein-Isothiocyanat (FITC) an einen Antikörper. Obwohl die Immunfluoreszenz-Methode alle Vorteile immunhistochemischer Verfahren bezüglich Sensitivität und Spezifität besitzt, ist sie mit folgenden Nachteilen behaftet:

- der Notwendigkeit eines Fluoreszenzmikroskops
- dem schnellen Ausbleichen (sog. fading) der Fluoreszenz
- der Verwendung von Kryoschnitten mit ihrer, im Vergleich zu dünneren Paraffinschnitten schlechteren Darstellbarkeit morphologischer Kriterien
- der Notwendigkeit der Verwendung von Frischmaterial.

Bei formalin-fixiertem, in Paraffin eingebettetem Material kann es zu starker Hintergrundfärbung und Auftreten unspezifischer Gewebeautofluoreszenz kommen, was die Interpretation der eigentlichen Anfärbung des Gewebes erschweren kann (NAKANE und PIERCE 1966 und 1967; WITTING 1977).

Da FITC nicht elektronendicht ist und somit für immunelektronenmikroskopische Untersuchungen ungeeignet ist (NAKANE und PIERCE 1967), wurde von SINGER 1959 erstmals Ferritin eingesetzt. Ferritin kann aber wegen seines hohen Molekulargewichtes (M 650 000) nur sehr schlecht das Gewebe penetrieren (RIFKIND et al. 1964; STERNBERGER et al. 1970). Auch Schwermetalle kamen zur Anwendung, befriedigten jedoch ebenfalls nicht, da sie nur einen unzulänglichen Kontrast zwischen der Immunreaktion und dem Gewebe ergaben (PEPE 1961; RIFKIND et al. 1964).

Ein wesentlicher Fortschritt gelang NAKANE und PIERCE 1966 mit der Einführung enzymgekoppelter Antikörper, welche viele Vorteile gegenüber den bisherigen Markersubstanzen haben (TAYLER 1978). Die Gewebeproben können mit einem Durchlichtmikroskop untersucht und beurteilt werden, das Reaktionsprodukt ist permanent und aufgrund seiner Elektronendichte auch für die Immunelektronenmikroskopie geeignet. Aufgrund des Multiplikationseffektes der enzymatischen Reaktion (ein Molekül des konjugierten Enzyms kann viele Chromogenmoleküle in das Farbprodukt umwandeln) erweist sich das Verfahren als ähnlich sensitiv wie die Fluoreszenz-Methode (NAKANE und PIERCE 1966 und 1967). Die Gewebedurchdringung ist aufgrund des geringeren Molekulargewichts enzymgekoppelter Antikörper in Vergleich zu Ferritin-markierten Antikörpern sehr viel besser (KEILIN und HARTREE 1951). Im Gegensatz zur Immunfluoreszenz-Methode kann auch lang aufbewahrtes, in formalin-fixiertes und in Paraffin eingebettetes Gewebe untersucht werden (TAYLER 1978).

2.3.4 Immunenzym-Verfahren

Das Prinzip der Immunenzym-Verfahren beruht auf der Sichtbarmachung der Lokalisation des gesuchten Antigens mit Hilfe von enzymgekoppelten Antikörpern. Das Enzym wandelt ein Chromogen in einen Farbkomplex um, der am Ort der Antigen-Antikörper-Reaktion präzipitiert (NAKANE und PIERCE 1967).

Jedes durch histochemische Methoden darstellbare Enzym, das den Antikörper und die Zellstruktur des Gewebsschnittes nicht negativ verändert, kann als Marker verwendet werden (PEARSE 1961). Enzyme beschleunigen die chemischen Reaktionen im Organismus, ihre katalytische Wirksamkeit kann sehr hoch sein (TAYLER 1978). Zum Einsatz in der Immunhistochemie sollten folgende Kriterien erfüllt sein:

- hohe spezifische Aktivität und Umsatzrate,
- hohe Stabilität bei Raumtemperatur,
- Konjugierbarkeit ohne Aktivitätsverlust (AVRAMEAS 1972).

2.3.4.1 Immunperoxidase-Verfahren

Die Kopplung des Antikörpers an das Enzym Peroxidase, das aus Meerrettich gewonnen wird, oder an alkalische Phosphatase gilt seit Jahren als das Standardverfahren und hat sich bestens bewährt. Meerrettich-Peroxidase wird aus folgenden Gründen häufig eingesetzt:

- niedriges Molekulargewicht (M 40 000), keine Überlagerung von möglichen benachbarten Bindungsstellen,
- gute Penetration und Darstellbarkeit von intrazellulären Antigenen,
- stabile, haltbare Verbindung, einfach herzustellen,
- kostengünstige Handhabung (NAKANE und PIERCE 1966 und 1967).

Die Peroxidase bewirkt die Freisetzung molekularen Sauerstoffs aus Peroxiden, die je nach Gewebeart in unterschiedlichen Konzentrationen vorliegen. Durch Zugabe von Wasserstoffperoxid im Überschuss wird die endogene Peroxidaseaktivität eliminiert, dies führt letztlich zu einer Verringerung der unspezifischen Färbung des Hintergrunds (TAYLER 1978).

Das Chromogen muss spezifisch für das jeweils verwendete Enzymsubstrat sein und zu einem stabilen, farbigen Endprodukt präzipitieren, das gut unter dem Lichtmikroskop sichtbar ist. Zusätzlich sollte das Reaktionsprodukt kompatibel mit den in der Histologie gebräuchlichen Gegenfärbungen sein, bei der Dehydratation und nach dem Eindecken nicht verblassen und die enzymatische Aktivität nicht beeinträchtigen (TAYLER 1978). Für die Darstellung der Meerrettichperoxidase ist das 3,3'-Diaminobenzidin-tetra-hydrochlorid (DAB) am gebräuchlichsten. Es polymerisiert in Anwesenheit von Peroxidase und H₂O₂ zu einem unlöslichen braunen Farbprodukt (HEYDERMAN 1979; DELELLIS 1979). Sein einziger Nachteil ist die immer wieder diskutierte Karzinogenität (TAYLER 1978).

2.3.4.2 Unterschiedliche Immunperoxidase-Techniken

Die gängigsten Verfahren, um zelluläre Antigene nachzuweisen, umfassen die direkte und die indirekte Methode. Hierzu zählen die **Peroxidase-Anti-Peroxidase (PAP)**-, sowie die (Strept)-**Avidin-Biotin-Complex (ABC)**-Methode.

Direkte Methode

Bei der „direkten Methode“ ist der primäre, spezifisch gegen das gesuchte Antigen gerichtete Antikörper direkt mit dem Enzym Peroxidase bzw. Phosphatase konjugiert. Der konjugierte Antikörper wird dem Präparat zugegeben und reagiert mit dem vorhandenen Antigen. Ein anschließend zugegebenes Substrat färbt das Reaktionsprodukt.

Obwohl das direkte Verfahren die schnellste Methode ist, hat sie den Nachteil, dass jedes Antiserum separat konjugiert werden muss (BOENISCH 2000). Die direkte Methode ist zudem auch weniger empfindlich als indirekte Methoden, da eine Potenzierung des Signals ausbleibt.

Indirekte (Sandwich-) Methode

Bei der „indirekten Methode“ kommt es zur Bindung des Antigens an einen unkonjugierten Primärantikörper. Der zweite Antikörper, der gegen die Immunglobulinfraktion derjenigen Spezies gerichtet ist, von der der Primärantikörper gewonnen wurde, ist mit Peroxidase konjugiert und lagert sich an den Antigen-Antikörper-Komplex an (HEYDERMAN 1979; DELELLIS 1979). Wurde ein primärer Antikörper z.B. im Kaninchen hergestellt, so muss der konjugierte Sekundärantikörper spezifisch gegen Kaninchenantigen gerichtet sein. Das anschließend zugegebene Chromogensubstrat färbt das Endprodukt (DELELLIS 1979; BOURNE 1998). Diese Methode ist sensitiver und vielseitiger zu verwenden als die direkte Methode. Eine Vielzahl von Primärantikörpern der selben Tierspezies können mit einem einzigen konjugierten Sekundärantikörper reagieren. Diese Methode dauert jedoch etwa doppelt so lang wie die direkte Methode, da ein weiterer Inkubationsschritt hinzukommt, zusätzlich sind unspezifische Anfärbungen wahrscheinlicher (BOENISCH 2000).

Peroxidase-Anti-Peroxidase-Methode

In der 1970 von STERNBERGER et al. beschriebenen PAP-Methode werden zwei unkonjugierte Antikörper und ein Immunkomplex aus Peroxidase-Anti-Peroxidase verwendet. An den ungekoppelten Primärantikörper bindet ein ebenfalls ungekoppelter Sekundär- oder Brückenantikörper, der außerdem den löslichen Komplex aus Peroxidase und Anti-Peroxidase bindet. Dabei muss dieser aus der selben Tierspezies stammen, wie der Primärantikörper (STERNBERGER 1970; HEYDERMAN 1978; DELELLIS 1978).

(Strept-) Avidin-Biotin-Komplex-Methode

Ein noch empfindlicheres Verfahren stellt die von HSU et al. 1981 vorgestellte ABC-Methode der Antigenmarkierung dar. Diese Methode basiert auf der Fähigkeit des Eiweißglykoproteins Avidin, vier Moleküle des Vitamins Biotin physikalisch zu binden (BOENISCH 2000). Der Primärantikörper ist unkonjugiert und der Sekundärantikörper wird mit dem Vitamin Biotin gekoppelt. Die dritte Komponente ist ein löslicher Komplex aus biotinylierter Peroxidase und Avidin. Das Avidin ist in der Lage vier Moleküle Biotin mit sehr hoher Affinität zu binden (HSU 1981; BOENISCH 2000). Der Komplex ist so eingestellt, dass freie Bindungsstellen des Avidins die Bindung an das Biotin des Sekundärantikörpers ermöglichen. Bei der enzymmarkierten Streptavidin-Biotin-Methode (LSAB-Methode) ist das Streptavidin direkt an das Enzym Peroxidase gekoppelt und kann ohne Komplexbildung an den biotinylierten Sekundärantikörper binden. Die Sichtbarmachung des gesuchten Antigens erfolgt wieder über die Umsetzung von Chromogensubstrat durch Peroxidase.

Schlüssel

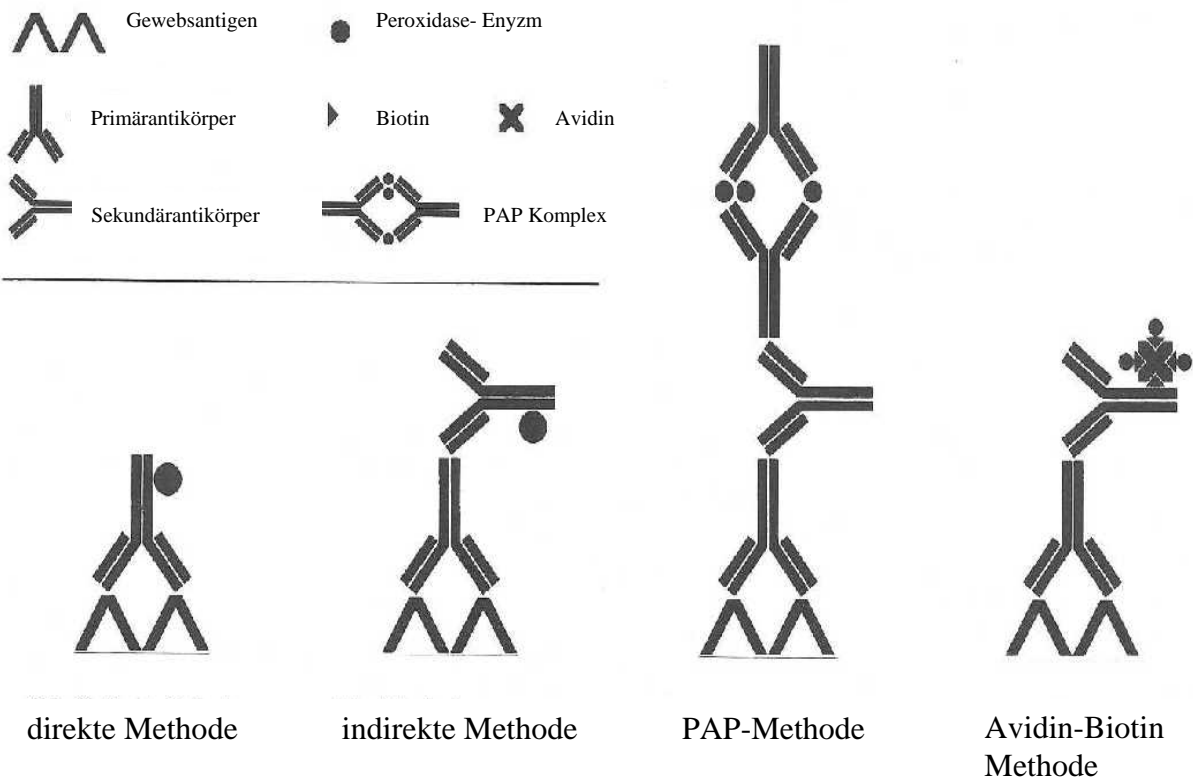


Abb. 5: Schematische Darstellung der Markierungsprinzipien von Antigenen der beschriebenen immunhistochemischen Untersuchungsmethoden nach BOENISCH (2000).

3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Zielsetzung

Ziel der hier vorliegenden Arbeit ist es, ein immunhistologisches Verfahren zum Nachweis von aktivierter Caspase-3 im Hippokampus nach inkompletter zerebraler Ischämie mit Reperfusion in der Ratte zu etablieren.

3.1 Material und Methodik

3.1.1 Das Tiermodell

In dem hier beschriebene Tiermodell wird bei Ratten eine inkomplette Hemisphärenischämie durch Okklusion der rechten A. carotis communis mit hämorrhagischer Hypotension durch Blutentzug und anschließender Reperfusion induziert.

3.1.1.1 Versuchstiere

Die Untersuchungen werden an männlichen Sprague-Dawley Ratten (Charles River Deutschland GmbH, Sulzfeld) durchgeführt. Das Gewicht der Tiere liegt bei 420 ± 50 Gramm. Zur Adaptation werden die Tiere mindestens eine Woche vor Versuchsbeginn in Gruppenkäfigen (Makrolon Typ 4) mit maximal fünf Tieren gehalten.

Die Tiere werden zwölf Stunden präoperativ nüchtern gesetzt, um einen niedrigen normoglykämien Zustand zu erreichen, Wasser wird ad libitum angeboten.

Die Ratten sind gemäß den Vorgaben zur Versuchstierhaltung bei einer Raumtemperatur von 20 bis 23 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50 bis 60 % untergebracht. Die Beleuchtungsintervalle, hell (50 bis 100 Lux) und dunkel wechseln alle 12 Stunden.

Das Tierversuchsvorhaben wurde gemäß §8 des deutschen Tierschutzgesetzes (TierSchG i.d.F. vom 25.05.1998, BGB II S. 1105) durch die Regierung von Oberbayern genehmigt.

Aktenzeichen 211-2531-29/99, Genehmigungsbescheid vom 22.06.1999, Zusatzgenehmigungsbescheid vom 26.04.2000.

3.1.1.2 Versuchsaufbau

Der komplette Versuch besteht aus einem operativen Teil (Präparation, Ischämie, Reperfusion) mit unterschiedlicher Überlebensdauer der Tiere und anschließender Analyse der Gehirne zum Nachweis von aktivierter Caspase-3 als Apoptoseparameter.

Die Versuchstiere werden in zwei Gruppen eingeteilt:

Die Tiere der Kontrollgruppe durchlaufen alle Operationsphasen einschließlich der Ischämie mit einer Narkose aus Fentanyl i.v. und 66 % N₂O in 33 % O₂.

Die Tiere der Dexmedetomidin-Gruppe erhalten 30 min vor Beginn der Ischämiephase zusätzlich zur Narkose mit Fentanyl und 66 % N₂O in 33 % O₂ einen Bolus Dexmedetomidin intraperitoneal.

Es werden nur klinisch gesunde Tiere in diesem Versuch eingesetzt.

Im Folgenden wird ein kurzer Überblick über die sieben Abschnitte der operativen Phase gegeben.

1. Präparation ca. 1,5 Std

Intubation, Anästhesie durch Isofluran, Katheterisierung der Gefäße,
Applikation der Messsonden

2. Äquilibrationsphase 52 min

Anästhesie durch Fentanyl und N₂O/ O₂ im Verhältnis 2:1
in der Dexmedetomidin-Gruppe zusätzlich 30 min präischämisch Dexmedetomidin i.p.

3. Blutentzug über 8 min

zur hämorrhagischen Hypotension

4. Ischämie 45 min

Hypotension (MAP konstant bei 40 mmHg) und Verschluss der rechten A. carotis
communis

5. Reinfusion 15 min

des entzogenen Blutes und Reperfusion des Gehirns

6. Erholungsphase 45 min

7. Ende der operativen Phase

Wundverschluss und Ende der Narkose

VERLAUFSPROTOKOLL DER OPERATIVE PHASE

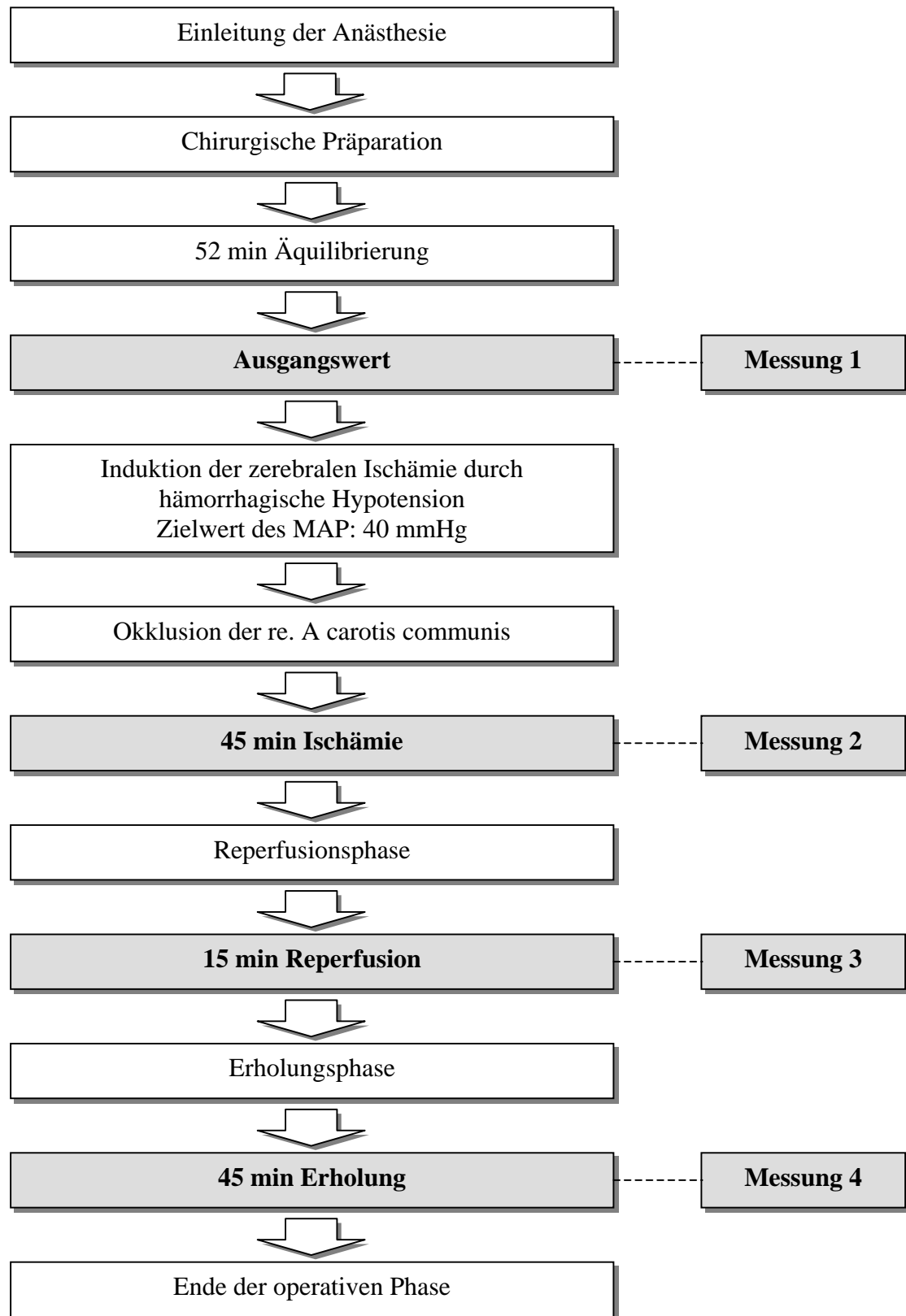


Abb. 6: Schematischer Überblick über den Verlauf der operativen Phase

3.1.1.3 Versuchsdurchführung

Narkose und maschinelle Beatmung

Die Ratte wird für die Intubation in einem geschlossenen Glaszylinder mit Hilfe von mit Halothan (Halothan, Hoechst AG, Frankfurt am Main) getränktem Zellstoff anästhesiert. Sobald Bewusstlosigkeit erreicht ist (nach ca. 30-45 sec) wird die Ratte herausgenommen und mit einem abgestumpften 18G Herzkatheter (Cavafix Certo 358, Braun, Melsungen) als Tubus unter Sichtkontrolle mit Hilfe eines eigens von Steigenberger konstruierten Laryngoskops intubiert.

Zur Aufrechterhaltung der Narkose wird die Ratte mit 33 % Sauerstoff, 66 % Lachgas und 2 % Isofluran (Forene, Abbott GmbH, Wiesbaden) über eine volumengesteuerte Beatmungspumpe (Harvard Rodent Ventilator, Model 683, Harvard Apparatus Inc., South Nantick, Massachusetts, 01760 USA) beatmet. Die durch einen Atemgasmonitor (Capnomac, Datex, Helsinki, Finnland) überwachten Parameter umfassen die endexpiratorischen Gaskonzentrationen von CO₂, O₂, N₂O und Isofluran. Die endexpiratorische CO₂-Konzentration wird durch die Regulation der Beatmungsfrequenz bei Werten zwischen 38 und 42 mmHg konstant gehalten.

Bei diesem Narkosesystem handelt es sich um ein halboffenes System ohne Rückatmung mit einer konstanten Frischgaszufuhr von etwa 2 l/min und einer Gasabsaugung.

In der Äquilibrationsphase wird die Narkose auf Fentanyl i.v. und 66 % Lachgas in 33% O₂ umgestellt. Initial wird ein Bolus von 10 µg/kg Fentanyl (Fentanyl 0,1 mg, Janssen-Cilag GmbH, Neuss), pro Tier über die rechte V. jugularis appliziert. Die Aufrechterhaltung erfolgt per Dauerinfusion durch einen Injektor mit 25 µg/kg/h Fentanyl i.v.

In der Dexmedetomidin-Gruppe erfolgt zusätzlich eine einmalige Applikation von 1 ml Dexmedetomidinlösung (Kennan Marsh, Abbott Laboratories, North Chicago, USA) 30 min vor Beginn der Ischämie in der Konzentration von 0,04 mg/ml intraperitoneal.

Präparation und Installation der Messgeräte

Die Haut wird an der rechten Halsseite, der rechten Inguinalgegend und am Kopf rasiert und für den chirurgischen Eingriff vorbereitet. Die Augen werden mit Augensalbe (Bepanthen, Roche, Mannheim) und Gaze bedeckt um ein Austrocknen zu verhindern.

Es folgt die Installation einer Temperatursonde (Hypodermic needle probe, Omega Technologies Co, Stanford CT, USA) knochennah im rechten M. temporalis um die perikranielle Temperatur zu messen und konstant zu halten. Die Sonde ist an eine Rotlichtlampe gekoppelt, welche direkt über dem Kopf des Tieres angebracht ist und sich ein schaltet sobald die vom Kontrollgerät (Omega Technologies Co, Stanford CT, USA) gemessene Temperatur unter die physiologische Körpertemperatur von 37,4 °C fällt. Zusätzlich wird die Körpertemperatur über ein in das Rektum eingeführtes Thermometer bestimmt und dokumentiert.

Das Elektrokardiogramm (EKG)(Cadiocap II, Datex, Helsinki, Finnland) wird über zwei Sonden abgeleitet, die ca. 2 cm rechts und links vom Sternum an der Mitte des Thorax unter die Haut gestochen werden. Mit Hilfe des EKGs wird die Herzfrequenz bestimmt.

Zur Ableitung eines Elektroenzephalogramms (EEG) (Oscilloscope, Hameg 20 MHz, HM205-3, Frankfurt) werden auf jeder Seite 2 mm lateral des kaudalen Augenwinkels Nadelelektroden eingestochen. Zwei weitere Elektroden werden je 3 mm kranial der Ohrbasis plziert. Eine Erdungselektrode in der Schwanzwurzel ermöglicht die störungsfreie Ableitung des EEGs der linken und rechten Hirnhälfte. Die Ableitungen des EEGs und des EKGs dient zur Beurteilung der physiologischen Hirnaktivität und der Narkosetiefe.

Präparation der Gefäßzugänge

Zur Katheterisierung der A. und V. femoralis wird in der rechten Leiste ein ca. 1 cm langer Hautschnitt gesetzt und stumpf in die Tiefe präpariert. Das im Leistenspalt liegende Gefäßpaket enthält von kaudal betrachtet die V. femoralis, die A. femoralis und den N. femoralis. Die Gefäße werden unter Schonung des N. femoralis getrennt und von Faszien und Bindegewebe befreit. In die A. femoralis wird ein Katheter zur invasiven Blutdruckmessung (Cadiocap II, Datex, Helsinki, Finnland) und zum Blutentzug für die Blutgasbestimmung eingesetzt. Neben dem systolischen und diastolischen Blutdruck wird

auch der mittlere arterielle Blutdruck (MAP) angezeigt. Die Blutgasanalyse umfasst die Parameter PaO₂ (arterieller Sauerstoffpartialdruck), PaCO₂ (arterieller Kohlendioxidpartialdruck), BE (Basenabweichung) und den Blut-pH (pH/Blutgasanalyser 1306, Instrumentation Laboratory, 20128 Mailand, Italien). Die Blutglukosebestimmung erfolgt mit einem Schnelltestgerät (Glucometer Elite, Bayer Diagnostics, München).

In die V. femoralis wird ein Katheter eingesetzt, mit welchem später durch Blutentzug die hämorrhagische Hypotension induziert wird.

Es folgt die Präparation der rechten V. jugularis. Hier werden zwei Katheter zur Medikamentenapplikation (Fentanyl, Esmeron, Natriumbikarbonat) eingesetzt. Um Blutungen zu verhindern wird das Gefäß mit Tabotamp (Ethicon, Norderstedt) abgedichtet. Die in der Tiefe ventrolateral neben der Trachea liegende rechte A. carotis communis wird dargestellt und vorsichtig von Truncus vagosympaticus gelöst. Die Arterie wird zunächst lose durch einen untergelegten Gummischlauch angeschlossen, mit dessen Hilfe später der temporäre Verschluss des Gefäßes erfolgt.

Äquilibrationsphase

Am Ende der Präparation wird die Narkose mit Isofluran und 66 % Lachgas in 33 % Sauerstoff beendet und auf Fentanyl i.v. und 66 % N₂O in 33 % O₂ umgestellt. Die Tiere der Dexmedetomidin-Gruppe erhalten zusätzlich 30 min vor Ischämiebeginn einen einmaligen Bolus von 0,04 mg Dexmedetomidin i.p.. Zur Muskelrelaxation wird Esmeron 50 mg/5 ml (Wirkstoff: Rocuroniumbromid, Organon, Oss, Niederlande) in der Dosierung von 0,8 ml/Tier/h ebenfalls in die V. jugularis über einen zweiten Injektor injiziert.

Die Dauer der Äquilibrationsphase beträgt 52 min.

Blutentzug

Unmittelbar vor dem Blutentzug wird das Muskelrelaxans durch 8,4 %iges Natriumbikarbonat (Delta-Pharma GmbH, Pfullingen) ersetzt, das während der gesamten Ischämiephase als Ausgleich des Säure-Base-Haushalts in der Dosierung von 1,4 ml/Tier/h appliziert wird.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Über den Katheter in der V. femoralis wird nun mit Hilfe einer heparinisierten Spritze innerhalb von 8 min so viel Blut entzogen, dass der MAP auf 40 mmHg abfällt. Die nötige Blutmenge um diese hämorrhagischen Hypotension zu erreichen liegt je nach Gewicht und Konstitution des Tieres und Narkoseform zwischen 7 und 12 ml.

Ischämie

Ist der MAP von 40 mmHg nach 8 min erreicht, erfolgt der temporäre Verschluss der rechten A. carotis communis. Mit Hilfe eines Gefäßclips wird der Blutfluss in diesem Gefäß unterbrochen. Durch die Hypotension herrscht eine Minderdurchblutung im gesamten Gehirn, die in der rechten Hemisphäre durch den Verschluss der rechten A. carotis communis noch verstärkt wird.

Die Dauer der Ischämie beträgt 45 min. Während dieser Zeit wird der MAP durch kontrollierten Blutentzug bzw. Blutzufuhr konstant bei 40 mmHg gehalten.

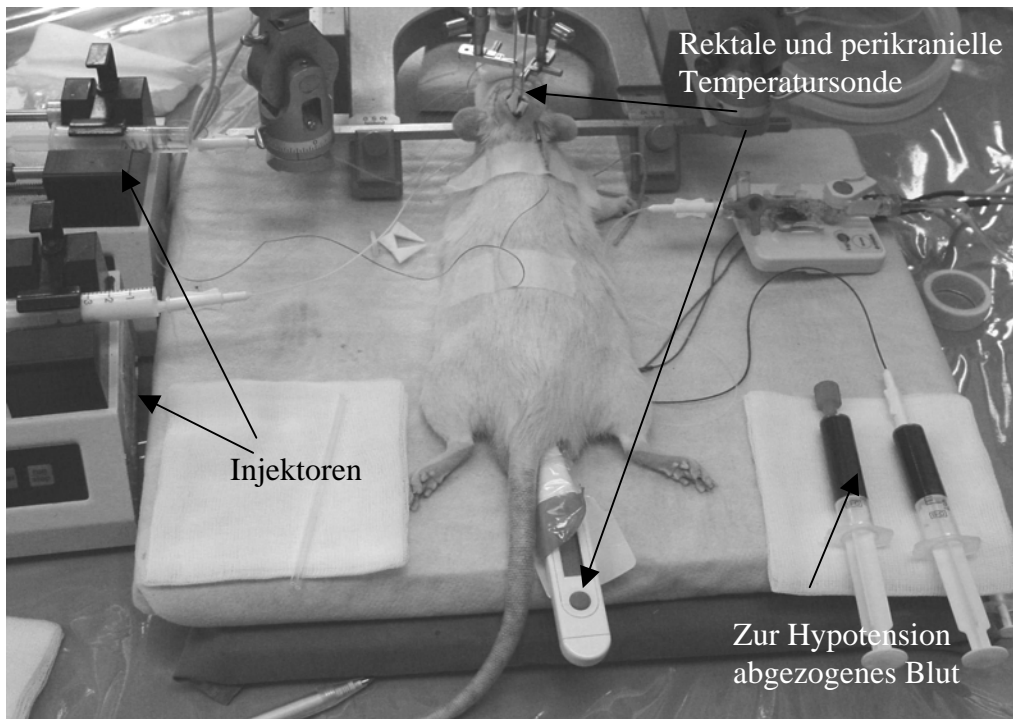


Abb. 7: Überblick über den Arbeitsplatz während des Versuchs; Versuchstier mit installierten Sonden zur Erfassung der Messparameter bzw. zur Medikamentenapplikation

Reperfusion/Reinfusion

Nach 45 min Ischämie wird der Clip entfernt, das Gefäß ist wieder durchgängig, es kommt zur Reperfusion des Gehirns. Gleichzeitig wird das entnommene Blut innerhalb von 15 min gleichmäßig reinfundiert.

Es folgt eine Erholungsphase von 45 min, in der sich der Kreislauf wieder vollständig stabilisiert.

Versuchsende

Nach der 45 minütigen Erholungszeit werden die Sonden und Katheter entfernt, die Wundränder werden mit einem langwirkenden Lokalanästhetikum (Bucain 0,5 %, Wirkstoff: Bupivacainhydrochlorid, Curasan Pharma AG, Kleinostheim) unterspritzt und verschlossen. Nach Beendigung der Narkose wird das Tier bis zum Einsatz der Spontanatmung mit O₂ und Luft beatmet. Mit der Rückkehr der Reflexe und des Muskeltonus wird das Tier extubiert. Das Tier wird weiterhin sorgfältig überwacht, um bei spontanem Atemstillstand oder anderen Komplikationen sofort eingreifen zu können.

Tötung

Je nach Gruppenzugehörigkeit werden die Tiere 1, 3, 7 oder 28 Tage nach Versuchsende getötet. Am Tag der Tötung werden die Tiere einer gründlichen Allgemeinuntersuchung unterzogen.

Die Dekapitierung erfolgt unter tiefer Halothannarkose. Nachdem die Nackenmuskulatur durchtrennt wurde, wird die Halswirbelsäule mit einer starken Schere durchschnitten und das Gehirn zur weiteren Analyse entnommen.

3.1.1.4 Physiologische Messparameter

Während der operativen Phase werden verschiedene Messparameter (Blutdruck, Herzfrequenz, Atmung, Temperatur, Hirndurchblutung, Blutgasanalyse) nach folgendem Schema dokumentiert. Der erste Messzeitpunkt am Ende der Äquilibrationsphase dient als Ausgangswert (AW) vor der Ischämie.

Tab. 1: Messzeitpunkte der Messparameter

Messwert	Gemessene Parameter	Messzeitpunkt
Ausgangswert (AW)	MAP PaO ₂	Gegen Ende der Äquilibrationsphase
45 min Ischämie (45 Isch)	PaCO ₂ BE	45 min nach Beginn der Ischämie
15 min Reperfusion (15 Rep)	Blut-pH-Wert Blutglukose Perikranielle Temperatur	Nach Abschluss der Reinfusion des entnommenen Blutes
45 min Erholung (45 Erh)	Rektale Temperatur	Nach der 45 minütigen Erholungsphase

Messzeitpunkte der Messparameter während der operativen Phase

3.1.1.5 Präparation, Entnahme und Einfrieren des Gehirns

Die Kopfhaut und die Muskulatur werden von der Schädelkralotte abpräpariert und die Schädeldecke wird mit einer Hohlmeisselzange vorsichtig entfernt. Nach der Durchtrennung der kranial und basal gelegenen Gehirnnerven wird das Hirn aus der Schädelkapsel herausgelöst. Von den rostralen und kaudalen Anteilen des Gehirns werden jeweils ca. 1 mm abgetrennt, das Kleinhirn wird ebenfalls entfernt. Das Gehirn wird in einen ca. 1,5 cm breiten Zylinder aus Aluminium verbracht, welcher vollständig mit dem Einfriermedium (Tissue Freezing Medium, Jung, Leica Instruments, Nussloch) aufgefüllt wird. Einfriermedium und Gewebe werden mit auf Trockeneis stehendem Methylbutan durchgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -70 °C gelagert. Aus gesunden unbehandelten Ratten, die keiner Ischämie unterzogen werden, wird nach

oben beschriebenen Schema das Gehirn und zusätzlich der Thymus entnommen und in Einfriermedium mit Methylbutan auf Trockeneis tiefgefroren.

3.1.1.6 Dissektionsschema zur Gewinnung von Gewebeschnitten

Das eingefrorene Gehirn wird von Einfriermedium und Aluminium weitgehend befreit und auf den Objektisch des Kryotoms (Microtom-Kryostat, HM 500 OM, Microm GmbH, Walldorf) aufgebracht. Bei einer Kammertemperatur von $-24\text{ }^{\circ}\text{C}$ werden zuerst Probeschnitte angefertigt. Die Ausrichtung des Gehirns zum Messer wird so eingestellt, dass exakt die Schnittebene Bregma (Schnittpunkt der Sutura coronalis und sagittalis) -2.3 mm getroffen wird. Bei Erreichen der Schnittebene werden $7\text{ }\mu\text{m}$ dicke Schnitte für die Immunhistochemie angefertigt und jeweils zwei auf einen Objektträger (Objektträger SuperFrost Plus, Menzel-Gläser, Braunschweig) aufgenommen.

Für die Immunhistochemie werden als Positiv- und Negativkontrollen $7\text{ }\mu\text{m}$ dicke Gefrierschnitte von Gehirn und Thymus der unbehandelten Tiere (ohne zerebrale Ischämie) angefertigt.

Auch dieses Gewebematerial wird bis zur weiteren Verarbeitung bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert.

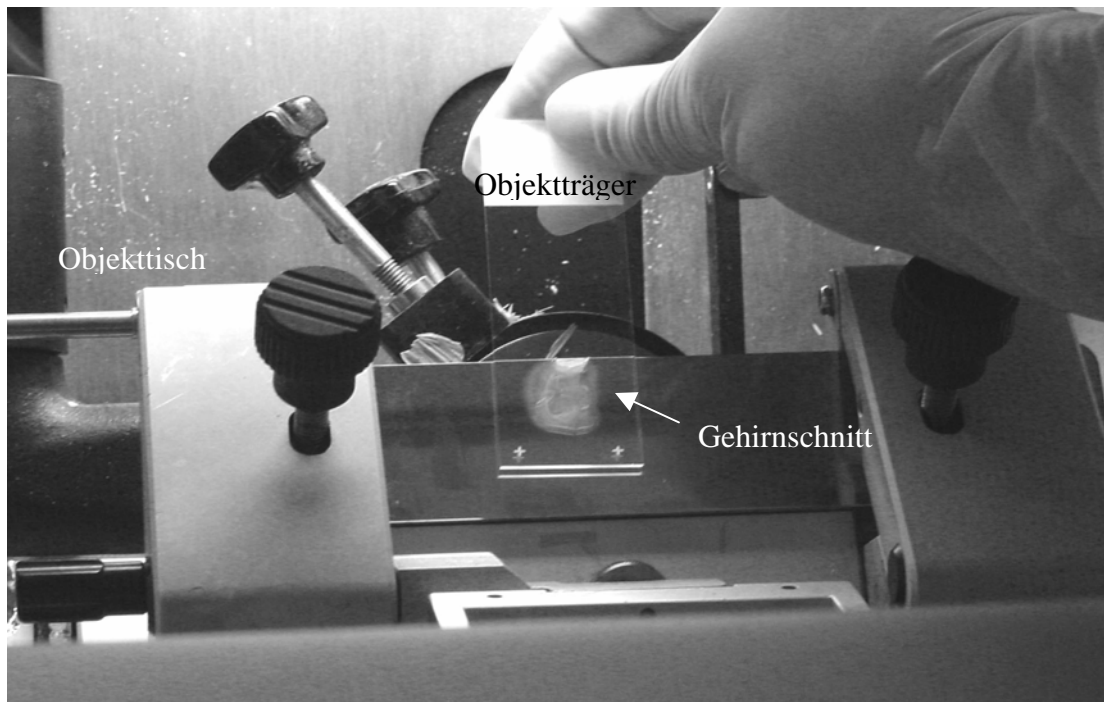


Abb. 8: Aufnahme eines mit dem Kryotom geschnittenen Gehirnschnittes

3.1.2 Etablierung verschiedener polyklonaler Antikörper zur Detektion aktivierter Caspase-3

In der folgenden Untersuchung werden polyklonale Antikörper gegen aktivierte Caspase-3 (produziert im Kaninchen) von verschiedenen Firmen auf ihre Detektionsfähigkeit von aktivierter Caspase-3 mit Hilfe der enzymgekoppelten Streptavidin-Biotin-Methode verglichen.

Insgesamt stehen sieben verschiedene Antikörper bzw. Chargennummern von vier Firmen zur Verfügung, die direkt, unter den exakt selben Bedingungen in einem immunhistochemischen Färbedurchgang miteinander verglichen werden.

Mit Hilfe der Western-Blot-Analyse erfolgt ein weiterer Vergleich des Färbemusters der Antikörper anhand gleicher Mengen einer genetisch hergestellten aktivierten Caspase-3.

3.1.2.1 Polyklonale Primärantikörper

Im Folgenden sind die verwendeten polyklonalen Antikörper gegen aktivierte Caspase-3 der verschiedenen Hersteller inklusive aller verfügbaren Produktinformationen beschrieben.

Cell Signalling Technology

Cleaved Caspase-3 (D175) Antikörper #9661

- Chargennummern:

Lot 4	300 µl
Lot 6	100 µl
Lot 8	300 µl
Lot 1681-D.1.8.	100 µl
- Detektion: großes Fragment der aktivierten Caspase-3 (17 – 20 kD), das nach Spaltung des Aspartat an Position 175 entsteht
- Produktion: Polyklonaler Antikörper entstanden durch Immunisieren von Kaninchen mit synthetischem Protein (KLH gekoppelt) um Antikörper gegen die die Schnittstellen humaner Caspase-3 umgebenden Peptidreste zu erhalten
- Reinigung: durch Protein A und Proteinchromatographie
- Lagerung: in 10 mM Na HEPES (pH 7,5), 150 mM NaCl, 100 µg/ml BSA, 50 % Glycerol, bei –20 °C
- Spezifität: nur großes Fragment der aktivierten Caspase-3 (17 – 20 kD) wird detektiert, nicht detektiert wird die inaktivierte Caspase-3 oder andere Caspasen

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

- Verdünnungsempfehlung: Immunhistochemie: Lot 4, 6 und 8 1:100 -1:50
Lot 1681 1:500 – 1:5000
- Western-Blot: Lot 4, 6 und 8 1:1000
Lot 1681 1:10000

Promega Corporation

Anti-Active Caspase-3 pAb

- Chargennummer: G748 50 µl
- Detektion: detektiert das p18 Fragment humaner Caspase-3
- Produktion: im Kaninchen produzierter, polyklonaler Antikörper
- Reinigung: affinitätsgereinigt
- Lagerung: Dulbecco's PBS
gefroren lagern bei -20 °C
enthält kein Glyzerin
- Spezifität: überprüft an Jurkat-Zellen (Apoptose induziert durch Anti-Fas mAb)
- Verdünnungsempfehlung: Immunhistochemie: 1:250
Western-Blot: keine Angaben

BD BioSciences

Rabbit Anti-Active Caspase-3 Polyclonal Antibody (CM1)

- Chargennummer: M069679 100 µl
- Detektion: die 18 kD Einheit aktivierter Caspase-3 von Mensch und Maus,
detektiert nicht 32 kD Procaspase-3
- Produktion: durch Immunisierung von Kaninchen mit einem Peptid, das dem C-Terminus der großen Untereinheit humaner Caspase-3 und Caspase-3 der Maus entspricht
- Spezifität: Die Antikörper werden routinemäßig im Western-Blot an apoptotischen Jurkat-Zellen getestet
- Reinigung: nicht hochgereinigt
- Lagerung: bei 4 °C in Serum mit 0,09 % Natriumazid
- Verdünnungsempfehlung: Immunhistochemie: keine Angaben
Western-Blot: 1:2000 – 1:8000

Chemicon International Rabbit Anti-Active-Caspase-3 Polyclonal Antibody

- Chargennummer : 21120981 50 µg
- Detektion: detektiert das p17 Fragment der gespaltenen Caspase-3 von Mensch, Maus und Ratte
- Produktion: keine Angaben
- Reinigung: affinitätsgereinigt
- Lagerung: bei -20 °C in PBS, 50 % Glyzerol, Natriumazid
- Verdünnungsempfehlung: Immunhistochemie: keine Angaben
Western-Blot: 1:100 bis 1:200

3.1.3 Vergleich des Färbeverhaltens verschiedener Antikörper gegen aktivierte Caspase-3 in der indirekten Immunhistochemie

Zur Sichtbarmachung des gesuchten Antigens (aktivierte Caspase-3) wird ein Gewebeschnitt mit einem unkonjugierten Primärantikörper aus dem Kaninchen beschichtet, welcher spezifisch an aktivierte Caspase-3 bindet. Darauf wird der Sekundärantikörper gegen Kaninchen-Immunglobulin aus dem Kit LSAB 2 von DAKO (Universal DAKO LSAB 2 Kit, Peroxidase für Rattengewebe, DAKO, Carpinteria, USA), welcher mit dem Vitamin Biotin gekoppelt ist aufgetragen. In einem dritten Inkubationsschritt werden die Präparate mit peroxidase-konjugiertem Streptavidin (Universal DAKO LSAB 2 Kit, Peroxidase für Rattengewebe, DAKO, Carpinteria, USA) beschichtet, welches sich an die biotinylierten Sekundärantikörper anlagert. Das Enzym Peroxidase ist ein Katalysator, der die Umwandlung des zugegebenen Chromogens DAB (Liquid DAB substrat-chromogen System, DAKO, Carpiteria, USA) in ein braunes Farbprodukt beschleunigt. Dieses Farbmolekül präzipitiert an der Stelle, an welcher die Reaktion stattgefunden hat und markiert damit das gesuchte Antigen.

3.1.3.1 Ermittlung der individuellen Arbeitskonzentration der Antikörper

Um die optimale Arbeitskonzentration für jeden Antikörper zu ermitteln, werden Verdünnungsreihen angefertigt. Als beste und aussagekräftigste Konzentration gilt die Verdünnung des Antikörpers, bei der aktivierte Caspase-3 positive Zellen deutlich und klar erkennbar braun gefärbt sind. Gleichzeitig soll der Hintergrund und gesundes Gewebe so wenig wie möglich unspezifisch angefärbt sein. Präparate bei denen eine höhere Antikörperkonzentration verwendet wird, zeigen eine gleichmäßig unspezifische, leicht braune Färbung der Gliazellen und Neurone. Bei zu geringer Antikörperkonzentration verblassen die positiven Zellen, es kann keine eindeutige Unterscheidung zwischen spezifisch positiven Zellen und unspezifischer Anlagerung der Antikörper getroffen werden.

Es wurden folgende Verdünnungsstufen angefertigt:

- Cell Signaling: Lot 4: 1:50, 1:100, 1:250, 1:500
Die optimale Arbeitskonzentration liegt bei 1:100
Lot 6: 1:100, 1:200, 1:400, 1:600, 1:800, 1:1000
Arbeitskonzentration 1:400
Lot 8: 1:100, 1:250, 1:500, 1:1000
Arbeitskonzentration 1:250
Lot 1681: 1:500, 1:1000, 1:3000, 1:5000, 1:10.000, 1:20.000, 1:50.000
Arbeitskonzentration 1:10.000
- Promega: 1:100, 1:250, 1:500, 1:750, 1:1000
Arbeitskonzentration 1:500
- BD BioScience CM1: 1:1000, 1:2500, 1:5000, 1:7500, 1:10.000, 1:20.000
Arbeitskonzentration 1:10.000
- Chemicon: 1:50, 1: 100, 1:200, 1:300, 1:500
Arbeitskonzentration 1:100

3.1.3.2 Erklärung zur Vorgehensweise

Nach der Ermittlung der optimalen Arbeitskonzentration für jeden Antikörper werden die sieben zu untersuchenden Antikörper gegen aktivierte Caspase-3 direkt in einem Färbedurchgang miteinander verglichen.

Hierfür werden für jeden Antikörper jeweils ein Folgeschnitt aus dem Gehirn (Bregma -2.3 mm) eines exemplarisch für alle Versuchsgruppen stehenden Tieres ausgewählt.

Kriterien für die Auswahl des Tieres sind der deutliche Zellschaden in der H & E-Färbung, das möglichst geringe Ödem im Hippokampus (Ödeme führen zu Rissen im Gewebeschnitt) und die gute Schnittqualität (ohne Faltenbildung oder Messerscharten).

Es wird das Tier mit der Versuchsnummer A37 ausgewählt, es gehört zur Dexmedetomidin-gruppe und wurde einen Tag nach Versuchsende getötet.

Weiterhin werden für jeden Antikörper jeweils ein Folgeschnitt eines nativen Rattenhirns (ohne zerebrale Ischämie) aus der gleichen Hirnregion als Spezifitätskontrolle für eine eventuell unspezifische Anlagerung der Antikörper verwendet.

Folgeschnitte eines Thymuspräparates einer gesunden juvenilen Ratte dienen für jeden Antikörper als Positivkontrolle.

Insgesamt werden in einem Färbedurchgang für jeden der sieben Antikörper drei Objektträger, je ein Schnitt von Tier A37, Nativtier und Thymus gefärbt, zusätzlich wird ein Thymusschnitt ohne Primärantikörper als Negativkontrolle mitgeführt. Das entspricht einer Gesamtanzahl von 22 Objektträgern pro Färbedurchgang.

3.1.3.3 Überprüfung der Spezifität der Antikörper

Um das Gelingen und die Qualität der Färbung zu beurteilen, werden in jedem Färbedurchgang sogenannte Positiv- und Negativkontrollen mitgeführt.

Zur Überprüfung der Spezifität der Bindung des Primärantikörpers an das gesuchte Antigen (aktivierte Caspase-3) wird ein Hirnschnitt eines Nativtieres (völlig unbehandelt, ohne zerebrale Ischämie) mit der Arbeitskonzentration jedes Antikörpers beschichtet. In einem gesunden, nicht geschädigten Gehirn ist keine Apoptose zu erwarten und somit auch keine Anfärbbarkeit von

aktivierter Caspase-3. Dieser Schnitt dient als Spezifitätskontrolle, denn wenn positive Zellen sichtbar sind, bindet der Antikörper unspezifisch.

Als Positivkontrolle wird Gewebe, in dem gesichert Apoptose erwartet wird, verwendet, wie z.B. der Thymus juveniler Tiere (UCKER et al. 1994; SUN und SHI 2001; URBAN 2002). Weisen die Thymusschnitte keine positiven Zellen auf, so ist mit einem Fehler im Färbedurchgang, einer zu hohen Antikörperverdünnung oder mit geminderter Qualität des Antikörpers zu rechnen.

Zur Überprüfung der Spezifität des Sekundäantikörpers (Negativkontrolle) werden die Hirnschnitte anstelle des Primäantikörpers mit Blockierungsserum überschichtet und anschließend mit dem Sekundäantikörper inkubiert. Sind hier später positive Zellen vorhanden, so hat sich der Sekundäantikörper unspezifisch an Gewebselemente angelagert.

Ein guter, aussagekräftiger immunhistochemischer Färbedurchgang mit spezifischer Anfärbung des Antigens (aktivierte Caspase-3) sollte folgende Kriterien erfüllen:

- Die Positivkontrolle (Thymus) muss eindeutig positive Zellen mit intrazellulärer Braunfärbung enthalten.
- Die Negativkontrolle (Thymus ohne Primäantikörper) darf keine Caspase-3 positiven Zellen aufweisen.
- Die Spezifitätskontrolle (Nativtier) darf keine Caspase-3 positiven Zellen aufweisen, der Hintergrund sollte so wenig wie möglich angefärbt sein.
- Im zu untersuchenden, ischämisch geschädigten Gewebe sollten einzelne Zellen selektiv braun angefärbt sein, diese müssen sich deutlich von Hintergrund abheben und bei der 200fachen Vergrößerung gut erkennbar sein.

Zur weiteren Überprüfung der Spezifität werden die Antikörper im Western-Blot vergleichend an käuflich erworbener, gentechnisch hergestellter aktivierter Caspase-3 getestet.

3.1.3.4 Durchführung der Immunhistochemie

Zunächst werden die Gewebsschnitte direkt aus dem -70 °C Kühlschrank in ein 4 °C kaltes Fixierungsbad aus 4 %igem Paraformaldehyd in PBS mit pH 7,4 verbracht. Ohne Fixierung könnten sich die Schnitte bei den folgenden Arbeitsschritten von den Objektträgern lösen.

Zur Hemmung der endogenen Peroxidase werden die Schnitte mit 3 %igem H_2O_2 in Methanol behandelt. Bei ungenügender Hemmung kann die endogene Peroxidase ebenfalls mit dem

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Chromogen DAB reagieren und so zu vermehrt unspezifischem Hintergrund und eventuell falsch-positiven Ergebnissen führen. Vorversuche mit 3 %igen H_2O_2 in Ethanol erzielten weniger gute Ergebnisse.

Eine Behandlung der Schnitte mit Proteinblockierungsreagenz soll die Bindung des Primärantikörpers an unspezifische Bindungsstellen verhindern. Die Blockierungsproteine lagern sich vor allem an stark geladene Kollagen- und Bindegewebelemente an und verhindern so eine unspezifische Ionenbindung zwischen Antikörper und Gewebe. Um zu verhindern, dass der Sekundärantikörper an Komponenten des Blockierungsserum bindet, wird ein Serum verwendet, welches aus der Tierspezies stammt, aus der der Sekundärantikörper gewonnen wurde.

Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen werden zwei Blockierungsmedien getestet. Zum einen das gebrauchsfertige Protein Block Serum-Free der Firma DAKO (DAKO, Carpinteria, USA), in welchem 0,25 % Casein, 15 mM Natriumazid und ein Trägerprotein in PBS enthalten sind. Zum anderen wird ein selbst hergestelltes Blockierungsmedium, das sich wie folgt zusammensetzt, getestet:

- 2 % bovines Serumalbumin (BSA)
- 0,2 % Magermilchpulver
- 2 % Ziegenserum
- 0,4 % Triton X-100, in PBS.

Es können keine Unterschiede im Blockierungsverhalten festgestellt werden. Aufgrund der leichteren Handhabung wird das gebrauchsfertige Blockierungsreagenz von DAKO unverdünnt bei einer Inkubationszeit von 20 min verwendet. Längere Inkubationszeiten beider Blockierungsreagenzien verursachen keine Reduktion der scheinbar unspezifischen Detektion einiger Antikörper.

Zwischen jedem Arbeitsgang, außer nach der Proteinblockierung, wird mehrmals gründlich gewaschen um ungebundene Reste von H_2O_2 , Primär-, Sekundärantikörper oder Streptavidin zu entfernen.

Die optimale Verdünnung des Primärantikörpers im Blockierungsmedium wird mit Hilfe von Verdünnungsreihen für jeden Antikörper getrennt ermittelt (siehe 3.1.3.1).

Der Sekundärantikörper gegen Kaninchen- und Maus-Immunglobulin wird aus Ziegen gewonnen. Er wird in der vorliegenden Gebrauchskonzentration unverdünnt und direkt aus dem Kit der Firma DAKO verwendet.

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Die Arbeitsgänge (Überschichten mit Proteinblockierung, Überschichten mit dem Primärantikörper und Überschichten mit dem Sekundärantikörper) werden jeweils in einer feuchten Kammer durchgeführt, um ein Austrocknen der Schnitte während der langen Inkubationszeiten zu vermeiden. Ausgetrocknetes Gewebe würde sich mit DAB kräftig braun anfärben.

Die DAB-Pufferlösung, welche die Antigen-Antikörperreaktion markiert, darf erst kurz vor Gebrauch mit H_2O_2 versetzt werden, da die Gewebeschnitte ansonsten diffus rötlich-braun gefärbt werden.

Eine Gegenfärbung mit 4° C kaltem Hämalaun nach Mayer stellt die Zellkerne in einem konstanten blasslila Farbton dar. Die Schnitte werden in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 96 % und 100 % Ethanol) dehydriert und in Rotihistol eingelegt. Die Objektträger werden mit zwei Tropfen RotihistoKit und eines Deckglases blasenfrei eingedeckt.

Protokoll der Durchführung der Immunhistochemie

Alle Schritte erfolgen bei Raumtemperatur

Fixierung

10 min in 4 % igem Paraformaldehyd in PBS mit pH 7,4

Waschen in PBS

5 min

Hemmung der endogenen Peroxidaseaktivität

10 min in 3 % H_2O_2 in Methanol

Waschen in PBS

3 x 3 min

Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen

20 min mit Proteinblockierungsreagenz

Entfernung des Blockierserums ohne waschen

Überschichten mit dem Primärantikörper

Inkubationszeit 50 min, verdünnt (je nach Antikörper) in Blockierungsreagenz

Waschen in PBS

3 x 3 min

Überschichten mit dem Sekundärantikörper

gebrauchsfertig vorverdünnt, Inkubationszeit 30 min

Waschen in PBS

3 x 3 min

Überschichten mit Streptavidin-Meerrettichperoxidase

gebrauchsfertig vorverdünnt, Inkubationszeit 45 min

Waschen in PBS

3 x 3 min

Inkubation mit Chromogensubstrat DAB

2 min

Waschen in Aqua dest.

3 x 10 min

Gegenfärben in Mayers Hämalan

45 sec in 4 °C kaltem Hämalan

Waschen in Leitungswasser

3 x 10 min

Dehydrierung

aufsteigende Ethanolreihe, in 70 % 1 min, in 96 % 2 min, in 100 % 2 min,

in 100 % 1 min

Einlegen in Rotihistol

2 min und 5 min

Eindecken mit RotihistoKit

3.1.4 Vergleich der aktivierten Caspase-3 Antikörper in der Western-Blot-Analyse

Zur Überprüfung der immunhistochemischen Befunde werden die Antikörper gegen aktivierte Caspase-3 auch in der Western-Blot-Analyse auf ihr Färbeverhalten getestet. Hierzu wurde das gentechnisch hergestellte Protein rekombinante Caspase-3 von Alexis (Caspase-3, rat, recombinant, Alexis Deutschland, Grünberg) aus der Ratte in den Konzentrationen 0,2 µg, 0,1 µg und 0,05 µg aufgetragen. Die rekombinante Caspase-3 enthält sowohl das Proenzym Caspase-3 (32 kD) als auch die aktivierte Form der Caspase-3 mit 17-20 kD.

Die Western-Blot-Analyse ist ein Verfahren zur qualitativen Proteinbestimmung und beinhaltet eine diskontinuierliche Gelelektrophorese, den Elektrotransfer der Proteine auf eine Membran, die Markierung des gesuchten Antigens und dessen Sichtbarmachung mit Hilfe eines lumineszierenden Farbstoffes.

3.1.4.1 Aufbereitung des Probenmaterials für die Western-Blot-Analyse

Nachdem die 7 µm Kryoschnitte für die Immunhistochemie angefertigt wurden, wird das gewonnene Gehirngewebe für die Western-Blot-Analyse standardisiert aufbereitet. Hierzu wird zunächst eine 1 mm dicke Scheibe vom Gehirn abgeschnitten und in die linke und rechte Hemisphäre unterteilt. Aus beiden Hemisphären wird der Hippokampus herauspräpariert und zur Homogenisierung in je ein Eppendorfgefäße mit zwölf Kugeln, sog. „beads“ und Lysispuffer verbracht. In einer Kugelmühle wird das Gewebe homogenisiert. Danach wird das Lysat 10 min in einer Ultrazentrifuge mit 13 000 U/min zentrifugiert. 220 µl des Überstandes werden mit der doppelten Menge (440 µl) PBS verdünnt.

Für eine semi-quantitative Auswertung der Western-Blot-Analyse muss die Gesamtproteinkonzentration in allen Proben gleich groß sein. Der Proteingehalt jeder Probe wird durch eine modifizierte Proteinbestimmung nach BRADFORD (1976) mit Hilfe einer Proteinstandardkurve (BSA in der Konzentration von 50, 100, 200, 500, 1000, und 2000 µg/ml) bestimmt.

Es werden 1000 µl Bradfordreagenz mit je 5 µl des Gewebelysats bzw. der BSA-Verdünnungsreihe vermischt und deren Extinktion im Photometer innerhalb einer Stunde bei der Wellenlänge von 595 nm gemessen. Die gemessenen Werte der BSA-Verdünnungsreihe dienen

als Standardkurve, daran angelehnt wird das Absorbptionsmaximum des Gewebelysate ermittelt. Das Grundprinzip der Proteinbestimmung nach Bradford beruht auf der Beobachtung, dass sich das Absorbptionsmaximum von Coomassie Brilliant Blue R-250 bei der Bindung an Protein von 465 nm auf 595 nm verschiebt (BRADFORD 1976).

Die Verdünnung der Proben mit PBS im Verhältnis 1:2 gewährleistet, dass die Absorption des Lysats im linearen Messbereich der Bradfordreagenz mit einem Absorbtionskoeffizient zwischen 0,16 und 0,30 liegt. Die Proteinkonzentration wird innerhalb der Proben angeglichen. Schließlich werden die Proben mit reduziertem SDS-Probenpuffer im Verhältnis 1 : 3 vermischt und im Schüttelinkubator bei 95 °C für 5 min denaturiert. Die so aufbereiteten Proben sind mit Kühlung bis zu einem Jahr haltbar.

3.1.4.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE wird nach dem Verfahren von Lämmli (LÄMMLI 1970) durchgeführt. Die Gelelektrophorese, ein diskontinuierliches Gelsystem, wird auf Vertikalgelen in Elektrophorese-Kammern durchgeführt. In einem niedrig prozentigen (5 %ig) Sammelgel werden die Proteine konzentriert, um im folgenden Trenngel entsprechend ihrer Größe und ihres Molekulargewichts aufgetrennt zu werden.

Die verwendeten Trenngele werden der Größe der zu untersuchenden Proteine angepasst. Die aktivierte Caspase-3 hat ein Molekulargewicht von 17-20 kD. Man wählt ein engmaschiges Gel mit 12 % Polyacrylamid-Anteil, in welchem kleine Proteine zuverlässiger hängenbleiben als in einem weitmaschigeren Gel mit z.B. nur 7 % Polyacrylamid-Anteil.

Die Gele werden vertikal zwischen zwei Glasplatten gegossen. Zuerst wird zu zwei Dritteln mit Trenngel aufgegossen, nach dem Auspolymerisieren wird das letzte Drittel mit dem 5 %igen Sammelgel aufgefüllt. Es werden Kämme eingelegt, die 15 Taschen für das Probenmaterial formen. Nach einer Lagerungszeit von mindestens 24 Stunden in kühl-feuchter Umgebung sind die Gele vollständig polymerisiert, und es kann mit der Befüllung der Taschen begonnen werden (WESTERMEIER 1997).

Zum Vergleich des Färbeverhaltens der verschiedenen Antikörper wird die gentechnisch hergestellte Caspase-3, die sowohl die aktivierte Caspase-3 als auch die Proform enthält, in der Konzentration von 0,2 µg, 0,1 µg, und 0,05 µg aufgetragen.

Weiterhin wird ein Rainbow-Marker als Größenstandard, 1:2 mit SDS-Probenpuffer verdünnt, pipettiert.

In der Elektrophorese-Kammer werden die Gele an Gleichstrom bei konstanter Spannung von 200 V angeschlossen. Die angelegte Spannung bewirkt, dass die Proteine mit Hilfe des SDS-Laufpuffers durch das Gel wandern und sich entsprechend ihrer Größe innerhalb von drei Stunden auftrennen und im Trenngel hängenbleiben.

3.1.4.3 Elektrotransfer von Proteinen

Der Transfer der gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf eine Polyvinyliden-Fluorid-Membran (PVDF-Membran) wird nach dem „Semi-dry“-Verfahren (KYSHE-ANDERSEN 1984) durchgeführt. Unter Verwendung eines diskontinuierlichen Puffersystems erfolgt der Transfer in zwei Stunden bei $0,95 \text{ mA/cm}^2$ Geloberfläche und einer Spannung von 16-18 V.

Der „Semi-dry“ Blot wird wie folgt aufgebaut:

Kathode (-)

6 Whatmann 3MM Filterpapiere, getränkt in Kathodenpuffer

Polyacrylamidgel mit Proteinen

PVDF-Membran, getränkt in 100 % Ethanol

2 Whatmann 3MM Filterpapiere, getränkt in Anodenpuffer II

4 Whatmann 3MM Filterpapiere, getränkt in Anodenpuffer I

Anode (+)

Es ist darauf zu achten, dass alle Papiere und die Membran gleich groß sind und exakt übereinander liegen. Luftblasen werden sorgfältig durch Ausstreichen entfernt.

3.1.4.4 Immunoblot

Nach dem Waschen der proteinbeladenen PVDF-Membran für 30 min in PBST werden zunächst die unspezifischen Bindungsstellen der Proteine mit einem Blockierungsmedium abgesättigt. Die Blockierung erfolgt mit 10 %igem fetalen Kälberserum in PBST für 90 min bei Raumtemperatur.

Anschließend wird die Membran mit einem der im Kaninchen produzierten Primärantikörper gegen aktivierte Caspase-3 inkubiert. Der Antikörper wird zuerst kurz zentrifugiert, um eventuelle Verunreinigungen zu entfernen. In 10 ml 10 %igem fetalem Kälberserum (FKS) wird die gewünschte Verdünnung angemischt z.B. 1:2000, das entspricht 5 µl Antikörper in 10 ml FKS.

Die Membran wird bei 4 °C über Nacht auf einem Schüttler inkubiert.

Danach wird nicht gebundener Antikörper durch 45 minütiges Waschen in PBST entfernt.

Der Sekundärantikörper (Anti-rabbit Ig, Horseradish Peroxidase, Amersham Life Science, Piscataway, USA) ist gegen Kaninchenserum/Protein gerichtet und an das Enzym Horseradish Peroxidase HRP gekoppelt. Er wird ebenfalls in 10 %igem FKS 1:2000 (5 µl in 10 ml) verdünnt.

Nach der Inkubationszeit von 1,5 Stunden bei Raumtemperatur und einem erneuten Waschgang von 45 min wird die Membran entwickelt. Hierzu wird ein Western-Blot Chemiluminiszenz Reagenz (Chemiluminiszenz Reagent Plus, PerkinElmer, Bosten, USA) verwendet.

3.1.4.5 Entwicklung

Die Membran wird genau eine Minute mit Chemiluminiszenz Reagent Plus, bestehend aus Luminol und Oxidationsreagenz unter Schwenken inkubiert und dann auf die Image Station, einem Aufnahmesystem zur quantitativen Abbildung chemilunineszierender Membranen, gelegt. Das Enzym Horseradish Peroxidase (HRP) katalysiert die Oxidation von Luminol, es kommt zu einer Lichtemission der Wellenlänge 428 nm, die durch eine Fotolinse erfasst und mit Hilfe eines Computers dargestellt wird. Anhand der unterschiedlichen Schwärzung der Proteinbanden, entstanden durch die Antikörpermarkierung der Caspase-3 Fraktion, kann das Färbemuster der verschiedenen Antikörper miteinander verglichen werden.

3.1.5 Nachweis von Proenzym Caspase-3 und Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) p85 Fragment als Apoptoseparameter

Aktiviert Caspase-3 entsteht aus Proenzym Caspase-3 CPP32 (32 kD), welches in jeder Zelle vorhanden ist und nach einem Insult verstärkt exprimiert wird. Durch proteolytische Prozessierung wird das Proenzym in die aktivierte Form der Caspase-3 überführt. Somit ist das Vorhandensein von Proenzym Caspase-3 die Voraussetzung für das Entstehen von aktivierter Caspase-3 und ist daher dem apoptotischen Zelltod vorgeschaltet.

Nachgeschaltet hingegen ist das p85 Fragment der Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP), welches nur bei der Spaltung durch aktivierte Caspasen auftritt und daher als Hinweis auf Apoptose gilt. Wird das p85 Fragment nachgewiesen, lassen sich Rückschlüsse auf das Vorhandensein von Apoptose und die Aktivierung von Caspasen ziehen.

3.1.5.1 Polyklonale Primärantikörper

Es folgt die von den Herstellern angegebene Produktbeschreibung zu den verwendeten Antikörpern gegen die Proform Caspase-3 CPP32 und das p85 Fragment von PARP.

Chemicon International Rabbit Anti-Caspase-3 Polyclonal Antibody

- Chargennummer: 21020374 50 µg
- Detektion: detektiert 32 kD Procaspase-3 (CPP32, Apopain) und das p20 Fragment
- Produktion: im Kaninchen produzierter, polyklonaler Antikörper
- Reinigung: affinitätsgereinigte IgG Fraktion
- Lagerung: bei -20 °C, in PBS mit 50 % Glycerol, 1 % BSA und 0,02 % Natriumazid
- Verdünnungsempfehlung: Immunhistochemie: keine Angaben
Western-Blot : 1:100 bis 1:200

Promega Anti-PARP p85 Fragment pAb

- Chargennummer: G734A 12204301 50 µl

- Detektion: detektiert das durch Caspasen gespaltene 85 kD Fragment humaner Poly(ADP-Ribose)-Polymerase
- Produktion: polyklonaler Antikörper im Kaninchen produziert
- Reinigung: keine Angaben
- Lagerung: als Aliquots bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ enthält kein Glycerin
- Spezifität: gegen N-terminales Peptid des p85 Fragments, detektiert kein intaktes 116 kD PARP
- Verdünnungsempfehlung: Immunhistochemie und Western-Blot 1:100

3.1.5.2 Detektion des Proenzym Caspase-3 CPP 32

3.1.5.2.1 Immunhistochemie

Der Antikörper gegen das Proenzym Caspase-3 CPP32 und das p20 Fragment aktivierter Caspase-3 werden ebenfalls auf einen Thymusschnitt, einen Schnitt des Nativtier und einen durch Ischämie geschädigten Gehirnschnitt aufgetragen. Der Antikörper wird in der Konzentration von 1:200 in Blockierungsmedium verwendet. Die Inkubationszeit beträgt 60 min in der feuchten Kammer bei Raumtemperatur. Da dieser Antikörper auch aus dem Kaninchen stammt, kann ebenfalls der Sekundärantikörper aus dem LSAB 2 Kit der Firma DAKO in der gebrauchsfertigen Verdünnung eingesetzt werden. Die restlichen Arbeitsschritte erfolgen analog dem Färbeprotokoll zur Detektion der aktivierten Caspase-3 (siehe 3.1.3.4).

3.1.5.2.2 Western-Blot-Analyse

Die Western-Blot-Analyse für CPP32 erfolgt nach dem gleichen Schema wie bei der Detektion der aktivierten Caspase-3 (siehe 3.1.4.2 bis 3.1.4.5). Zusätzlich zu der gentechnisch hergestellten aktivierten Caspase-3 in den Konzentrationen 0,2 μg , 0,1 μg und 0,05 μg wurden auch Proben

des rechten und linken Hippokampus von Tieren der Kontrollgruppe (je 30 µg Gesamtprotein) aufgetragen.

Die Inkubation mit dem Primärantikörper wird mit einer Konzentration von 1:1000 in FKS über Nacht bei 4 °C durchgeführt. Die übrigen Schritte erfolgen analog dem Western-Blot Protokoll für aktivierte Caspase-3 (siehe 3.1.4).

3.1.5.3 Detektion von Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) Fragment p85

3.1.5.3.1 Immunhistochemie

Auch hier werden wieder Schnitte des Thymus, des Nativtieres und des durch Ischämie geschädigten Tieres gefärbt. Als Arbeitskonzentration des Primärantikörpers gegen das p85 Fragment der Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase wird die Verdünnung 1:250 in Blockierungsmedium ermittelt. Die Inkubationszeit beträgt 50 min. Auch dieser Antikörper stammt aus dem Kaninchen, weshalb für den weiteren Färbeverlauf ebenfalls der Kit LSAB 2 von DAKO eingesetzt wird. Die weitere Detektion des p85 Fragments erfolgt anhand des oben beschriebenen Färbeprotokolls für die aktivierte Caspase-3 (siehe 3.1.3.4).

3.1.5.3.2 Western-Blot-Analyse

Die Western-Blot-Analyse für den p85 Anti-Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase Antikörper von Promega erfolgt ebenfalls analog dem oben beschriebenen Ablauf (siehe 3.1.4.2 bis 3.1.4.5). Die Inkubation erfolgt über Nacht bei 4 °C mit einer Konzentration von 1:500 in FKS. Hier werden auch zusätzlich Proben des rechten und linken Hippokampus von Tieren der Kontrollgruppe mit 30 µg Gesamtprotein pro Probe aufgetragen.

3.1.6 Geräte, Chemikalien, Verbrauchsmaterialien und Lösungen

Geräte

- Elektrophorese Power-supply, EPS-301, Amersham Pharmacia Biotech Inc, Piscataway, USA
- Elektrophoresekammer, Pharmacia Biotech, San Francisco, USA
- Feuchte Kammer, Eigenbau
- Kühlzentrifuge, Biofuge fresco, Heraeus, Osterode
- Reagenzglas-Schüttler, Assistent Reamix, K. H. Assistent GmbH, Altnau, Schweiz
- Schüttelinkubator, Thermomixer comfort, Eppendorf, Hamburg
- Schüttler, Rocky 3D, Fröbel Labortechnik, Lindau
- Sonifiziergerät, Sonifier Labsonic 2000, Braun, Meisungen
- Spektrometer, DU 640, Beckman-Coulter, Oberschleißheim
- Transfergeräte, Roth, Karlsruhe
- Wasservollentsalzer Seradest SD-Reihe, USF Wallace& Tiernan, Ransbach-Baumbach

Chemikalien und Verbrauchsmaterial

- Bio-Rad protein Assay, Bio-Rad Laboratories, München
- BSA, bovines Albumin, Fraction V, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
- Capronsäure (ϵ -Amino-n-Caproic Acid), Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
- Coomassie Brilliant Blue R 250, Fluka, Neu-Ulm
- DDT (Dithiothreitol), Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
- Deckgläser 22 x 50 mm, Marienfeld
- Einmal-Küvetten PS, Plastibrand, Brand, Wertheim
- Eisessig 100, Merck, Darmstadt

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

- Eppendorf-Reaktionsgefäße, Eppendorf, Hamburg
- Ethanol 100 % pro analysi, Merck, Darmstadt
- FKS, fetales Kälberserum, Biochrom AG, Berlin
- Glycerol anhydrous, Fluka Chemica, Buchs, Schweiz
- Immobilon-P (PVDF-) Transfer Membran, Millipore, Bedford, MA, USA
- Kombitablette Aprotinin und PMSF, Complete Mini, EDTA-free, Boeringer, Mannheim
- Methanol pro analysi, Merck, Darmstadt
- Milchpulver (0,1 % Fett), Naturaflo, Töpfer, Dietmannsried
- Paraformaldehyd, Merck, Darmstadt
- PBS-Dubecco w/o Ca^{2+} , Mg^{2+} , Biochrom AG, Berlin
- Plastiktüten, Plastibrand Entsorgungsbeutel, Brand, Wertheim
- Rainbow RPN 756 protein molecular weight marker, Amersham Life Science Inc, Piscataway, USA
- Roti-Histokit, Roth, Karlsruhe
- Rotihistol, Roth, Karlsruhe
- Rotiphorese Gel 40 Acrylamid/Bisacrylamid, Roth, Karlsruhe
- Saures Hämalun nach Mayer, Apotheke des Klinikums rechts der Isar, München
- SDS (Na-Dodecylsulfat), Fluka, Neu-Ulm
- TEMED (N,N,N',N') Tetramethylenethyldiamid, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
- TPP-Röhrchen (15 ml/50 ml), Transadingen, Schweiz
- Tris, Roche, Mannheim
- Triton X-100, Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
- Tween 20 (Polyoxyethylensorbitolmonolaurat), Fluka Chemica, Buchs, Schweiz

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

- Wasserstoffperoxid 30 %, Merck, Darmstadt
- Western Lightning Enhanced Luminol Reagent, Perkin Elmer, Boston, MA, USA
- Whatman Chromatographiepapier, Meldstone, England
- Ziegenserum, DAKO Corporation, Carpinteria, CA, USA
- Zirconia beads 2,5 mm, Roth, Karlsruhe

Verwendete Lösungen

Anodenpuffer I für die Western-Blot-Analyse

300 mM Tris

20 % Ethanol pro analysi

Anodenpuffer II für die Western-Blot-Analyse

25 mM Tris

20 % Ethanol pro analysi

Kathodenpuffer für die Western-Blot-Analyse

40 mM Capronsäure

20 % Ethanol pro analysi

Coomassie-Färbelösung zur Färbung der Polyacrylamidgele

0,8 g Coomassie Brilliant Blue R250

200 ml Ethanol

200 ml ddH₂O

40 ml Eisessig

500 ml ddH₂O

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Destain für die Entfärbung nach Coomassie-Färbung

25 % Ethanol

10 % Eisessig

65 % ddH₂O

Laufpuffer (10x) für die SDS-PAGE

30,28 g Tris

144 g Glyzin

10 g SDS

0,1 g NaN₃

ad 1000 ml ddH₂O

Lysispuffer für die Probenaufbereitung

0,5 % Triton X-100

20 mM Tris-HCl pH 8,0 / 7,4

137 mM NaCl

2 mM EDTA

auf 10 ml 1 Tablette Combi Aprotinin und PMSF (Complete[®], Mini EDTA-free, Boehringer Mannheim, Germany)

PBS (20x) für die Immunhistochemie

320 g NaCl

57,6 g NaHPO₄

9,6 g KH₂PO₄

8 g KCl

ad 2000 ml ddH₂O

auf pH 7,4 einstellen

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

PBS (1x) für die Immunhistochemie

200 ml PBS 20x
mit Aqua dest. auf 2 l auffüllen

PBST (1x) für die Western-Blot-Analyse

100 ml PBS (20x)
1000 µl Tween 20
ad 2000 ml ddH₂O

4 %iges Paraformaldehyd zur Fixierung in der Immunhistochemie

4 g Paraformaldehyd
10 µl NaOH
ad 100 ml PBS (1x)
bei 70 °C

Reduzierender SDS-Probenpuffer für die Probenaufbereitung und SDS-PAGE

0,2 M Tris-HCl pH 6,8
6 % SDS
20 % Glyzerol
10 % DTT
0,1 mg/ml Bromphenolblau
aliquotiert bei -20°C lagern

Sammelgel 5 % (für 4 große Gele) für die SDS-PAGE

5 ml Rotiphorese[®] Gel 40
10 ml Sammelgelpuffer
25 ml ddH₂O

EIGENE UNTERSUCHUNGEN

320 µl Ammoniumpersulfat (10 %)

30 µl TEMED

Sammelpuffer (4x)

für die SDS-PAGE

0,5 M Tris-HCl pH 6,8

0,4 % SDS

0,1 % NaN₃

Trenngel 12 %

für die SDS-PAGE

12 ml Rotiphorese[®] Gel 40

10 ml Trenngelpuffer

18 ml ddH₂O

240 µl Ammoniumpersulfat (10 %)

30 µl TEMED

Trenngelpuffer (4x)

für die SDS-PAGE

1,5 M Tris-HCl pH 8,8

0,4 % SDS

0,01 % NaN₃

10 %iges Ammoniumpersulfat

für die Gele

10 g Feststoff

ad 100 ml ddH₂O, bei -20 °C lagern

3.2 Ergebnisse

Im vorliegenden Modell wurde bei Ratten eine inkomplette Hemisphärenischämie mit Reperfusion induziert. Zur Etablierung eines Apoptosenachweises wurden im Vergleich sieben Antikörper gegen aktivierte Caspase-3 untersucht.

3.2.1 Physiologische Messparameter

Die errechneten Mittelwerte und Standardabweichungen der während der operativen Phase gemessenen physiologischen Parameter sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

Tab. 2: Ergebnisse der physiologischen Messparameter

Gruppen	Kontrollgruppe				DexmedetomidinGruppe			
	AW	45 Isch	15 Rep	45 Erh	AW	45 Isch	15 Rep	45 Erh
MAP (mmHg)	126 ± 11	40 ± 1	125 ± 10	113 ± 13	143 ± 16	40 ± 1	139 ± 11	94 ± 18
Pa O ₂ (mmHg)	145 ± 22	154 ± 23	142 ± 27	117 ± 27	143 ± 24	125 ± 26	116 ± 18	113 ± 37
Pa CO ₂ (mmHg)	38 ± 4	38 ± 6	40 ± 5	41 ± 5	40 ± 4	41 ± 6	44 ± 5	44 ± 5
PH	7,41 ± 0,03	7,42 ± 0,06	7,41 ± 0,05	7,43 ± 0,05	7,41 ± 0,03	7,44 ± 0,05	7,42 ± 0,04	7,41 ± 0,04
Glukose (mg/dl)	65 ± 10	55 ± 11	66 ± 12	80 ± 18	82 ± 18	80 ± 20	79 ± 22	83 ± 18
T. perik (°C)	37,5 ± 0,2	37,5 ± 0,2	37,8 ± 0,4	37,7 ± 0,3	37,5 ± 0,1	37,5 ± 0,1	37,6 ± 0,1	37,6 ± 0,1
T. rektal (°C)	37,8 ± 0,4	38,1 ± 0,3	38,1 ± 0,3	38,1 ± 0,3	37,7 ± 0,4	37,9 ± 0,5	38,0 ± 0,5	37,0 ± 0,4

Mittelwerte (MW) und Standardabweichung (± SD) des mittleren arteriellen Blutdrucks (mmHg), des Sauerstoffpartialdrucks (mmHg), des Kohlendioxidpartialdrucks (mmHg), des pH-Wertes, der Blutglukose (mg/dl), der perikraniellen und der rektalen Temperatur (°C) an vier definierten intraoperativen Messzeitpunkten aller Tiere der zwei Versuchsgruppen

In der Tabelle sind die Werte aller Tiere der Kontroll- bzw. Dexmedetomidin-Gruppe zusammengefasst, ohne nach den unterschiedlichen Überlebenszeiten zu unterscheiden.

In der Kontrollgruppe sind hinsichtlich der Mittelwerte des mittleren arteriellen Blutdrucks, der Mittelwerte des PaO₂ und PaCO₂, der Mittelwerte des Blut-pH und der Blutglukose sowie der Mittelwerte der perikraniellen und rektalen Temperatur keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Dexmedetomidin-Gruppe aufgetreten.

3.2.2 Vergleich der Primärantikörper gegen aktivierte Caspase-3

3.2.2.1 Vorgehensweise in der Immunhistochemie

Das hier verwendete Färbeprotokoll ist an die Herstellerempfehlungen angelehnt und entspricht in Aufbau und Durchführung dem gängigen Laborstandard.

Eine Fixierung für 10 min im 4 °C kaltem 4 %igem Paraformaldehyd hat sich als ausreichend erwiesen, eine Ablösung der Schnitte trat nicht auf.

Mittels eines 10 minütigen Bades der Schnitte in 3 %igem H₂O₂ in Methanol wird die endogene Peroxidaseaktivität vollständig unterdrückt, es tritt keine bräunliche Hintergrundfärbung in den Kontrollschnitten auf.

Die Inkubationszeit des Primärantikörpers wird aufgrund der Vergleichbarkeit der Ergebnisse konstant bei 50 min bei Raumtemperatur gehalten. Die jeweilige Arbeitskonzentration der einzelnen Primärantikörper wird durch Verdünnungsreihen ermittelt und festgelegt. Höhere Verdünnungen ergeben eine zu blasse spezifische Färbung, niedrigere Verdünnungen setzen die Beurteilbarkeit der spezifischen Anfärbung in der Weise herab, dass auch Areale außerhalb der Antigenlokalisation bzw. der Hintergrund diffus braun angefärbt werden.

Der biotinylierte Sekundärantikörper und das Streptavidin aus dem Kit LSAB 2 von DAKO liegen gebrauchsfertig vor. Sie werden unverdünnt bei konstanten Inkubationszeiten von 30 bzw. 45 min verwendet.

Zur Sichtbarmachung der Biotin-Septavidin gekoppelten Antikörper mittels DAB-Pufferlösung reicht ein Inkubation für 2 min aus, eine längere Inkubation führt zu unspezifischer Braunfärbung des Gewebes.

Die Schnitte können ohne Farbverlust gewaschen und mit Mayers Hämalaun bei 4 °C für 45 sec gegengefärbt werden. So entsteht ein guter Farbkontrast zwischen der Braunfärbung der positiven Zellen und der blasslila Gegenfärbung der Zellkerne. Bei intensiverer Hämalaunfärbung kommt es zur Überdeckung der zum Teil schwachen spezifischen Braunfärbung.

3.2.2.2 Ergebnisse des Färbeverhaltens der Antikörper in der Immunhistochemie

Die Gewebeschnitte (je ein Schnitt des geschädigten Tieres, des Nativtieres und des Thymus) werden mit der jeweiligen Arbeitskonzentration der Antikörper beschichtet und entsprechend des Färbeprotokolls in einem Färbedurchgang unter exakt den selben Bedingungen gefärbt. Die histologische Auswertung und Beurteilung der Färbeergebnisse erfolgt im direkten Vergleich mit einem Durchlichtmikroskop (Axiolab, Carl Zeiss, Jena) in der 25fachen, 100fachen, 200fachen und 400fachen Vergrößerung. Zur besseren Vergleichbarkeit der Färbeergebnisse werden zur Dokumentation, in allen Gehirnschnitten einheitlich, die Spitze des Gyrus dentatus (GD) mit einer digitalen Kamera (Digital Still Camera DSC-S75, Sony Corporation, Japan) fotografiert. Für jeden untersuchten Antikörper sind diese Fotos der Positivkontrolle, des GD des Nativtieres und des rechten und linken GD des geschädigten Tieres auf einer Bildtafel zusammengefasst. Thymuspräparate werden in der 400fachen Vergrößerung beschrieben und dokumentiert, die Gehirnschnitte werden in der 200fachen Vergrößerung verglichen.

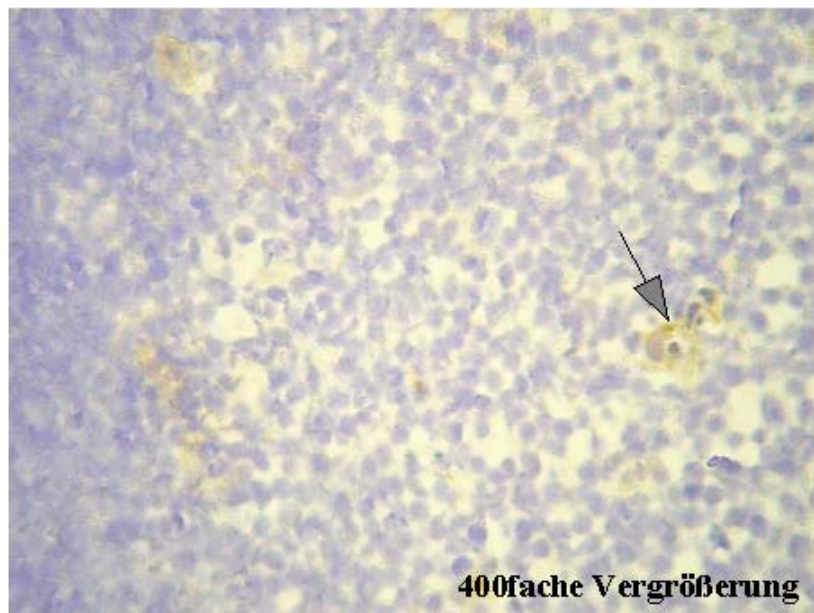
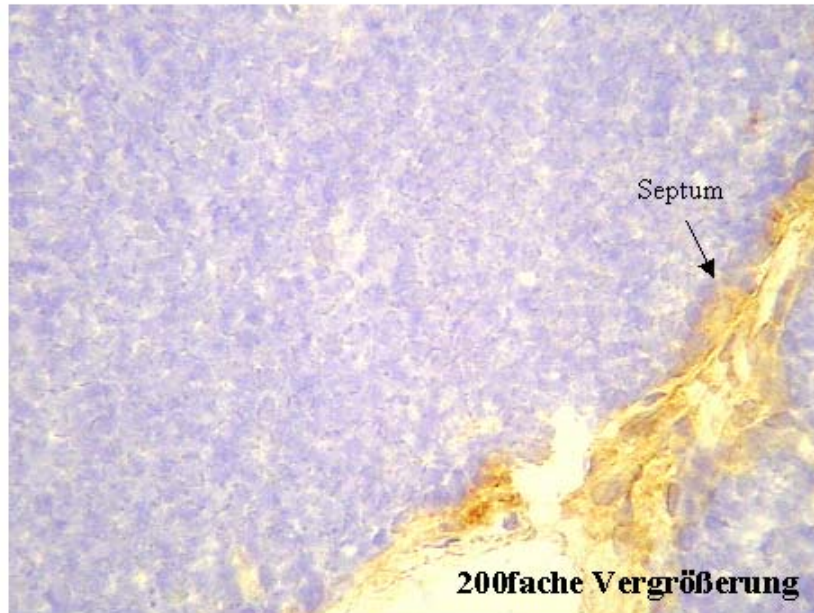
Negativkontrolle (Thymus ohne Primärantikörper) Bildtafel 1

In der Übersicht (25fache Vergrößerung) stellen sich die Bindegewebssepten zwischen den Lymphfollikeln deutlich braun dar. Am Rand dieser Septen sind z.T. braune Areale mit unscharfer Begrenzung erkennbar, die einzelne Lymphozyten umringen können. Im zellarmen Zentrum der Lymphfollikel färbt sich der Hintergrund z.T. flächig leicht braun, vereinzelt sind Erythrozyten, dunkel angefärbt, zu erkennen. Es ist jedoch auch bei maximaler Vergrößerung (400fach) keine intrazelluläre körnige Braunfärbung in Lymphozyten oder anderen Zellen erkennbar. Die vorhandene Braunfärbung (grauer Pfeil) bezieht sich ausschließlich auf den Extrazellulärraum und das Bindegewebe und wird als unspezifische Bindung des Sekundärantikörpers bei der Auswertung der übrigen Gehirnschnitte berücksichtigt.

Negativkontrolle Thymus

Bildtafel 1

(ohne Primärantikörper)



Cell Signaling Lot 4 aktivierte Caspase-3, in der Arbeitskonzentration 1:100, Bildtafel 2

Thymus: Neben den als unspezifisch geltenden braunen Bindegewebssepten und extrazellulären Arealen sind vor allem in der Trümmerzone der Lymphfollikel spezifische Braunfärbungen erkennbar. Die Kerne der Lymphozyten sind z.T. nicht mehr rund und enthalten unterschiedlich viel kleine dunkelbraune Granula. Andere Zellkerne sind vollständig dunkelbraun gefärbt. Diese intrazelluläre, oft körnige Braunfärbung stellt die spezifische durch die Antikörper markierte und angefärbte aktivierte Caspase-3 dar (schwarzer Pfeil).

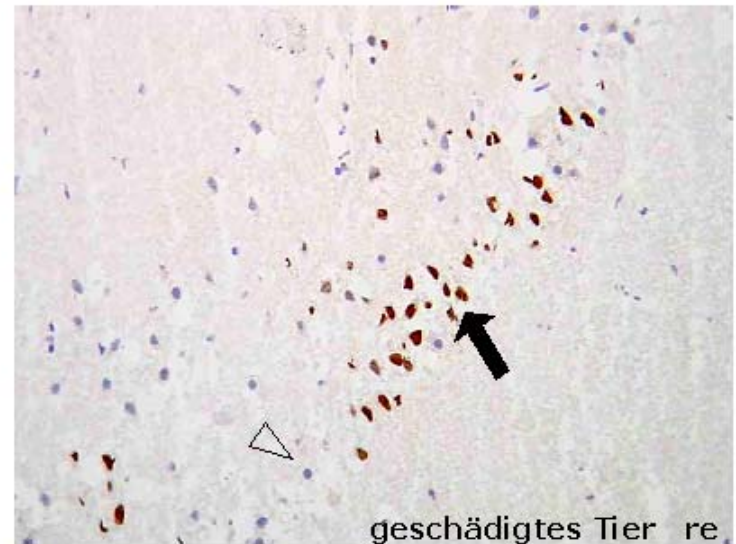
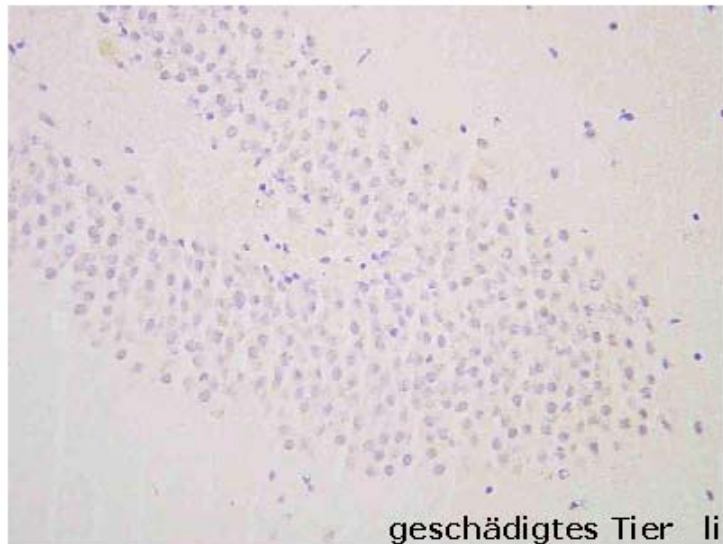
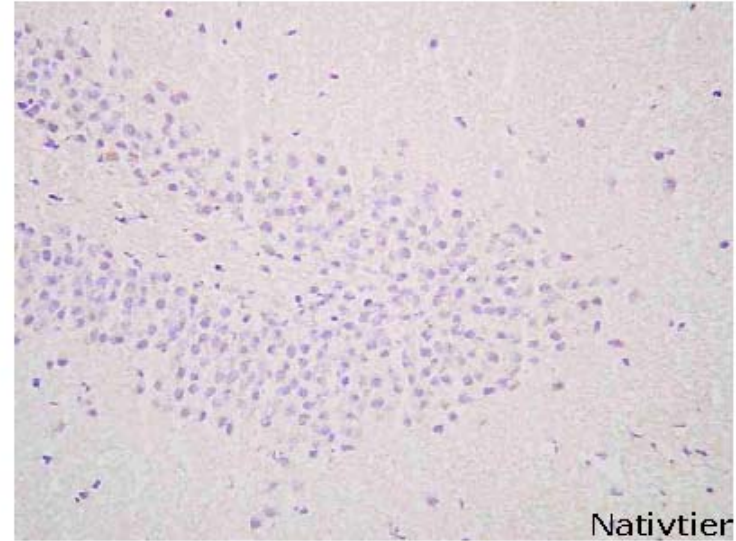
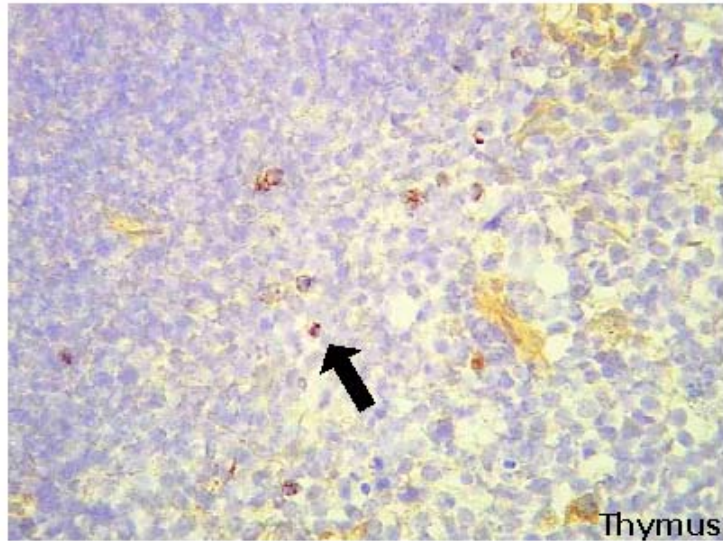
Nativtier (völlig unbehandelt, ohne zerebrale Ischämie):

Im Gehirnschnitt des nativen Tieres ist das Ependym und die Auskleidung der Ventrikel unspezifisch braun angefärbt. Im gesamten Schnitt ist keinerlei Braunfärbung von Neuronen oder Gliazellen erkennbar. Es ist keine Anfärbung des Hintergrundes vorhanden. In der Spitze des Gyrus dentatus sind die blassblau gefärbten Neurone des Zellbandes deutlich zu erkennen. Die Gliazellen sind meist kleiner und stellen sich etwas dunkler (blau) dar.

Geschädigtes Tier: Der linke Hippokampus des geschädigten Tieres enthält keine morphologisch veränderten oder angefärbten Zellen. Die Zellen des Gyrus dentatus (GD) sind blassblau ohne jeden Braunton.

Im gesamten rechten Hippokampus sind pyknotische dunkelblaue Neurone erkennbar (Pfeilspitze). Diese kondensierten Zellen sind eindeutig geschädigt, sie sind jedoch nicht braun angefärbt und werden deshalb als nekrotisch eingestuft. Daneben sind besonders in der CA1-, der CA2-Region und in der Spitze des GD stark braun angefärbte Zellen sichtbar. Die Kerne sind mit unterschiedlicher Intensität angefärbt, manche enthalten nur braune Granula andere sind vollständig intensiv dunkelbraun gefärbt (schwarzer Pfeil). Diese Braunfärbung gilt als spezifische Detektion aktivierter Caspase-3 und somit gelten diese Zellen als Apoptose positiv. Außerhalb des Zellbandes des Hippokampus ist keine Braunfärbung von Gliazellen oder anderen Neuronen erkennbar.

Cell Signaling Lot 4 aktivierte Caspase-3
(Bildtafel 2)



Cell Signaling Lot 6 aktivierte Caspase-3, Arbeitskonzentration 1:400, Bildtafel 3

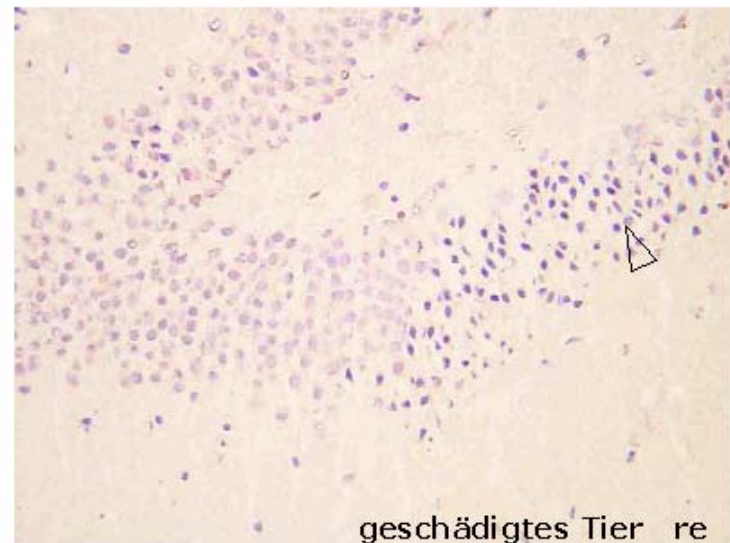
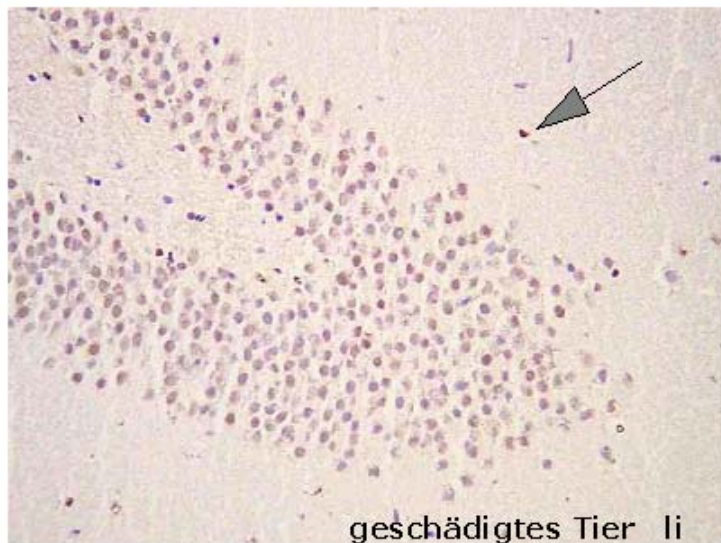
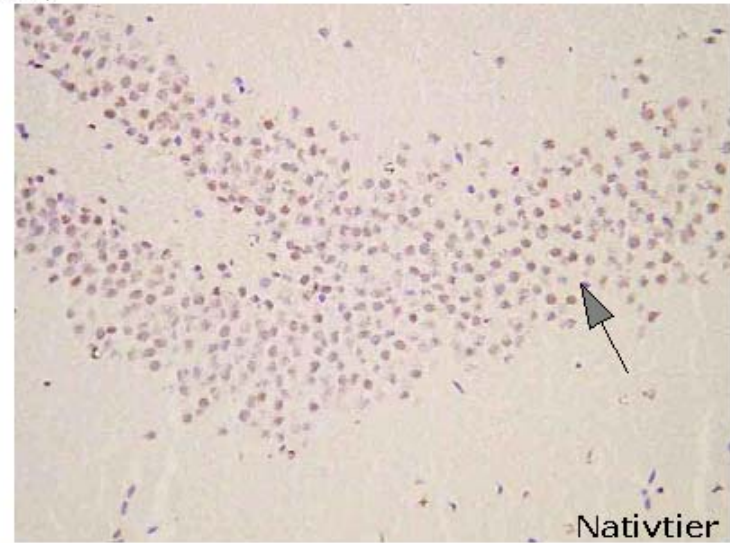
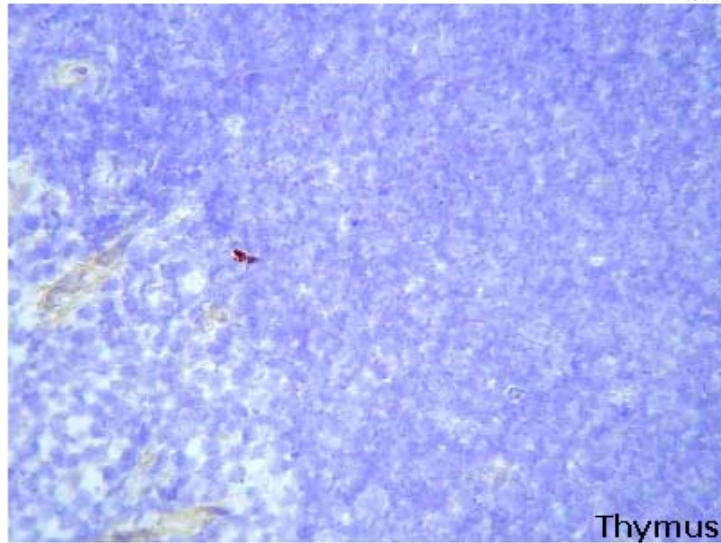
Thymus: Neben der unspezifischen Färbung der Septen und des Bindegewebes sind einige positive Zellen sichtbar (siehe Bildtafel 3, Thymus). Diese Zellen mit braunen Granula im Zellkern treten einzeln auf und sind umgeben von blau gefärbten intakten Lymphozyten.

Nativtier: Trotz der schwächeren Konzentration des Antikörpers von 1:400 sind im Gehirnschnitt des Nativtieres Zellen beider Hippokampi leicht unspezifisch braun angefärbt (vergleiche Cell Signaling Lot 4 1:100). Besonders deutlich wird diese Braunfärbung der Zellkerne im Bereich des GD, hier ist die Mehrheit der Neurone hellbraun (grauer Pfeil). In beiden Hemisphären sind Gliazellen außerhalb des Zellbandes zum Teil stark braun gefärbt (Glia-Färbemuster).

Geschädigtes Tier: Im linken Hippokampus sind besonders Glia und Neurone des Gyrus dentatus gleichmäßig hellbraun gefärbt. Auch die Glia der Umgebung des Neuronenbandes färbt sich z.T. deutlich an (grauer Pfeil).

Im rechten Hippokampus sind viele kondensierte dunkelblaue Zellen erkennbar (Pfeilspitze). Es sind jedoch keine braun gefärbten Neurone im Zellband sichtbar. Einzelne Gliazellen außerhalb des Neuronenbandes sind jedoch braun gefärbt.

Cell Signaling Lot 6 aktivierte Caspase-3
(Bildtafel 3)



Cell Signaling Lot 8 aktivierte Caspase-3, Arbeitskonzentration 1:250, Bildtafel 4

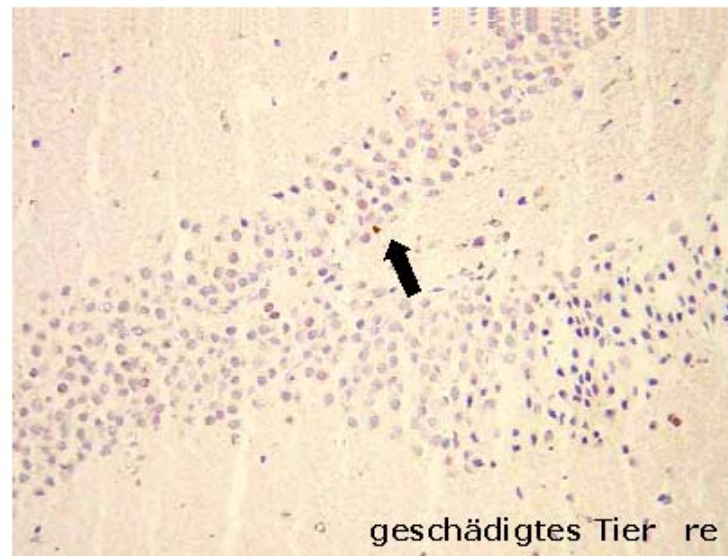
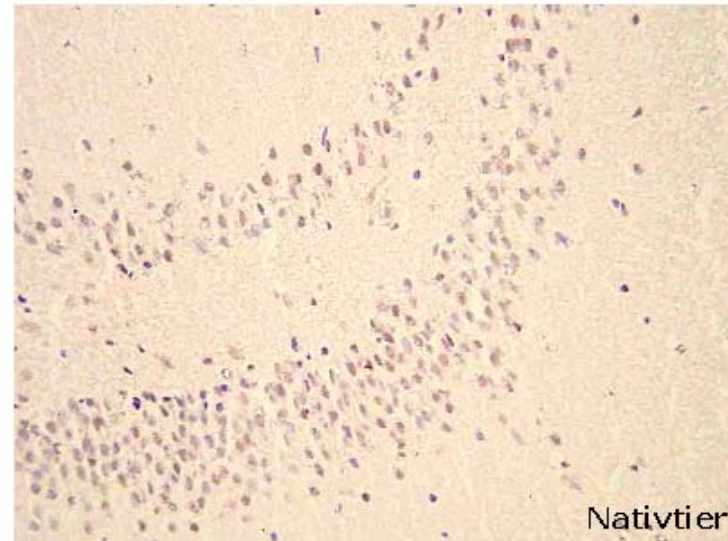
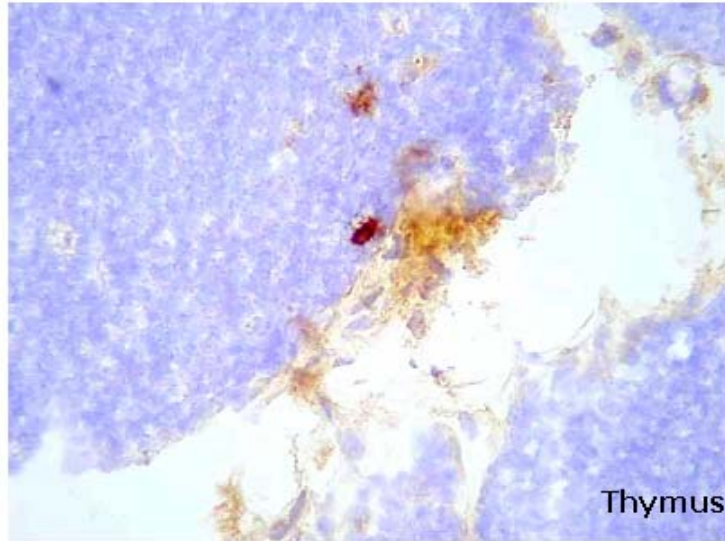
Thymus: Neben der unspezifischen braunen Bindegewebsfärbung sind einige aktivierte Caspase-3 positive Zellen sichtbar. Die leicht körnige Braunfärbung ist intrazellulär lokalisiert.

Nativtier: Das Ependym des Nativtieres ist bei der Antikörperkonzentration von 1:250 nur schwach braun, der Hintergrund ist nicht gefärbt. Trotzdem erscheinen vor allem die Neurone des GD gleichmäßig in beiden Hippokampi leicht braun. Die unspezifische Anfärbbarkeit ist nicht so stark wie bei Cell Signaling Lot 6 in der Konzentration 1: 400, ist jedoch hier in der Konzentration 1:250 noch erkennbar.

Geschädigtes Tier: Auch im geschädigten Tier ist das Ependym nur schwach braun. Im GD des linken Hippokampus sind Neurone und Glia schwach braun angefärbt (grauer Pfeil). Im gesamten Zellband des rechten Hippokampus sind dunkelblau angefärbte, nekrotische Zellkerne sichtbar (Pfeilspitze). Im Gyrus dentatus sind im Neuronenband 2-3 positive (braun gefärbte) Zellen erkennbar (schwarzer Pfeil). Die Glia des Hippokampus ist rechts nicht angefärbt.

Cell Signaling Lot 8 aktivierte Caspase-3

(Bildtafel 4)



Cell Signaling Lot 1681 aktivierte Caspase-3, in der Arbeitskonzentration 1:10.000, Bildtafel 5

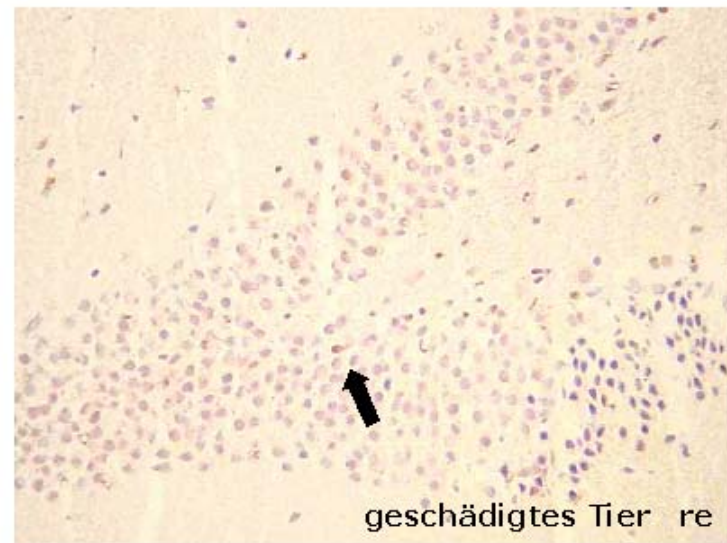
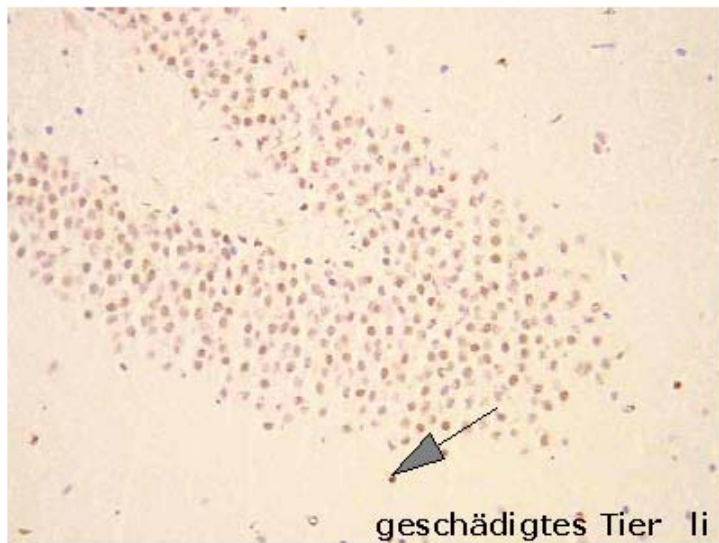
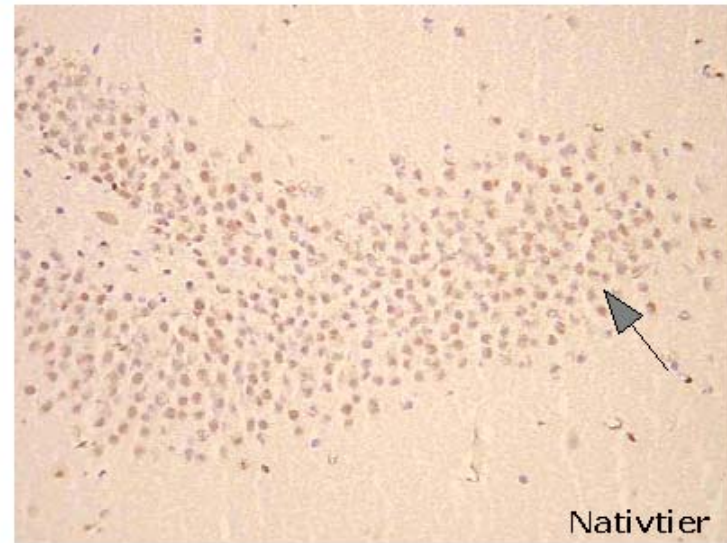
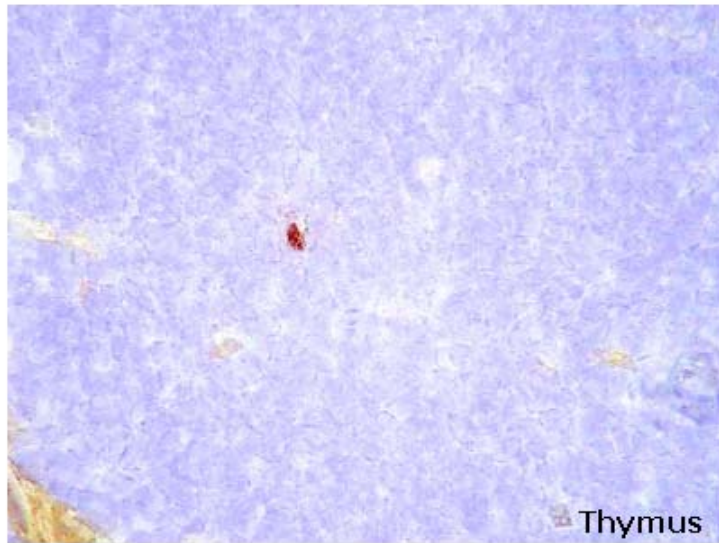
Thymus: Auch in der starken Verdünnung des Antikörpers Lot 1681 von 1:10.000 lassen sich im Thymusgewebe einzelne positive Zellen mit intrazellulärer Braunfärbung erkennen.

Nativtier: Das Ependym und die Ventrikelauskleidung sind schwach braun gefärbt. Im Gegensatz dazu sind viele Neurone des GD beidseits relativ stark gefärbt (grauer Pfeil). Zwischen der CA1-Region und dem GD fällt besonders die Braunfärbung der Glia in ihrem typischen Muster auf.

Geschädigtes Tier: Die Neurone des linken GD sind ähnlich dem Färbemuster des Nativtieres uneinheitlich braun. Die Glia außerhalb des Neuronenbandes ist im Durchschnitt stärker gefärbt als im Nativtier (grauer Pfeil).

Im rechten Hippokampus erscheinen, neben den kondensierten dunkelblauen Zellkernen, in der CA1-Region ca. fünf Zellen leicht positiv, auch in der Spitze des GD ist bei manchen Zellen eine schwache Braunfärbung angedeutet (schwarzer Pfeil). Die Gliazellen in der Umgebung des Zellbandes sind ebenfalls angefärbt.

Cell Signaling Lot 1681 aktivierte Caspase-3
(Bildtafel 5)



BD Bioscience aktivierte Caspase-3 CM1, in der Arbeitskonzentration 1:10.000, Bildtafel 6

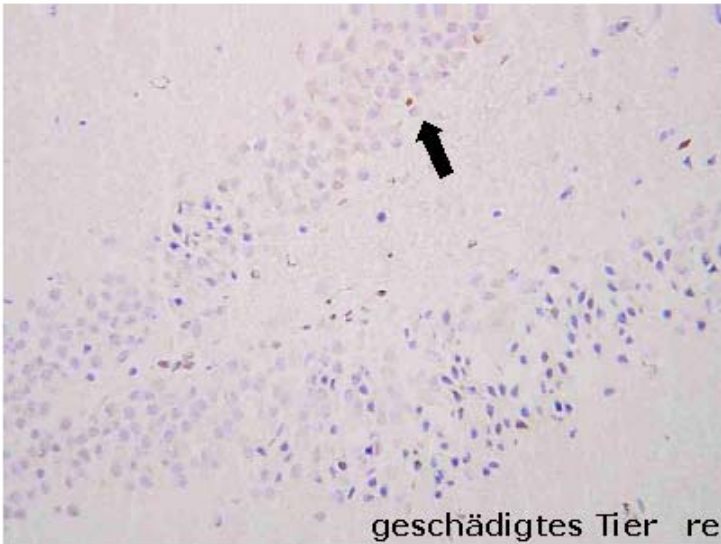
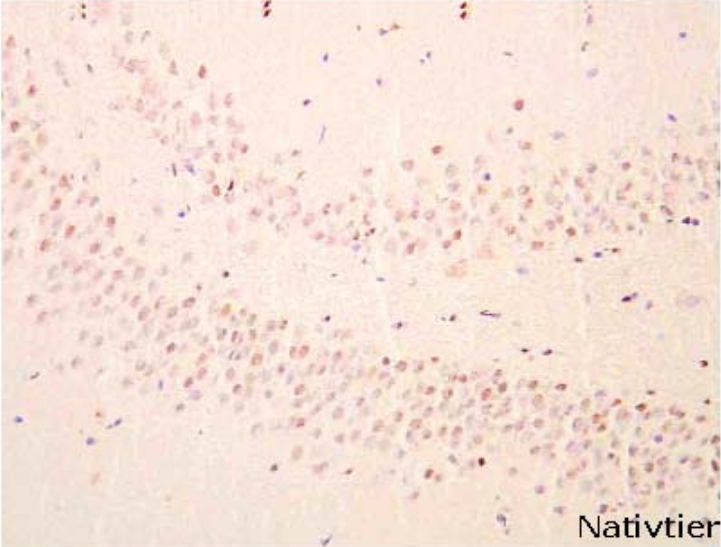
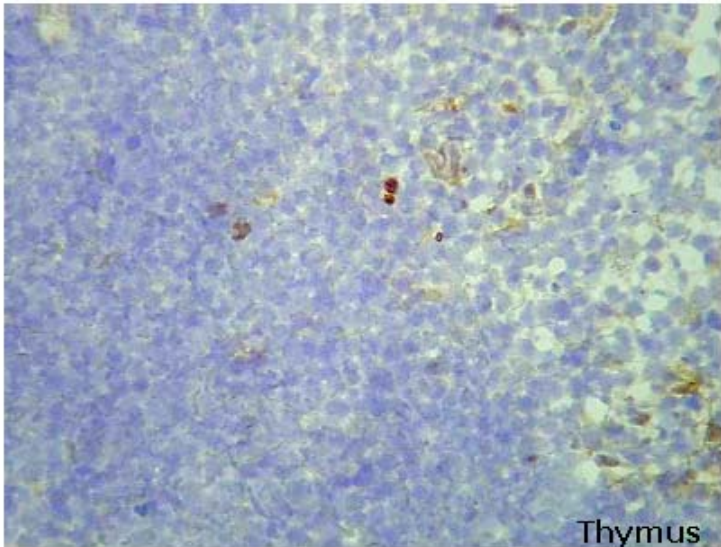
Thymus: Im Thymusgewebe sind ähnlich viele positive Zellen sichtbar wie bei Cell Signaling Lot 4, deutlich mehr als bei Cell Signaling Lot 6, Lot 8 und Lot 1681.

Nativtier: Auch hier sind die Neurone beider Gyri dentati bei der starken Verdünnung von 1:10.000 mit unterschiedlicher Intensität braun gefärbt. Es sind dunkelbraune, hellbraune und blaue Zellkerne vorhanden. Außerhalb des Neuronenbandes sind ebenfalls Zellen angefärbt. Der CM1 Antikörper liefert das „bunteste“ Färbemuster aller getesteten Antikörpern.

Geschädigtes Tier: Der linke Hippokampus, insbesondere der GD, entspricht dem Färbemuster des Nativtieres. Es sind deutlich braun gefärbte Zellen (Neurone und Gliazellen) unterschiedlicher Intensität sichtbar (grauer Pfeil).

Der rechte Hippokampus zeigt dunkelblaue kondensierte vermutlich nekrotische Neurone, besonders in der CA1-Region und im GD. Daneben sind einzelne positive, braungefärbte Neurone (schwarzer Pfeil) erkennbar. Die Morphologie der positiven Zellen entspricht der braun gefärbten Zellen von Cell Signaling Lot 4.

BD Biosciences CM1 aktivierte Caspase-3
(Bildtafel 6)



Bildtafel 6

Promega aktivierte Caspase-3, Arbeitskonzentration 1:500, Bildtafel 7

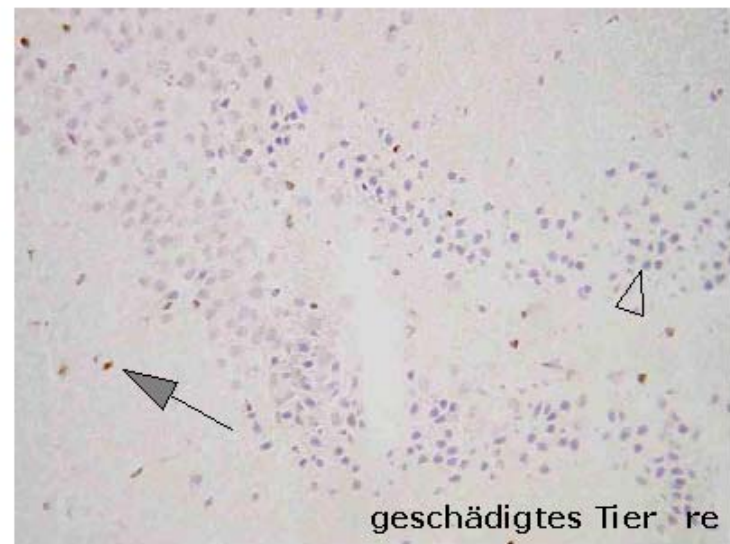
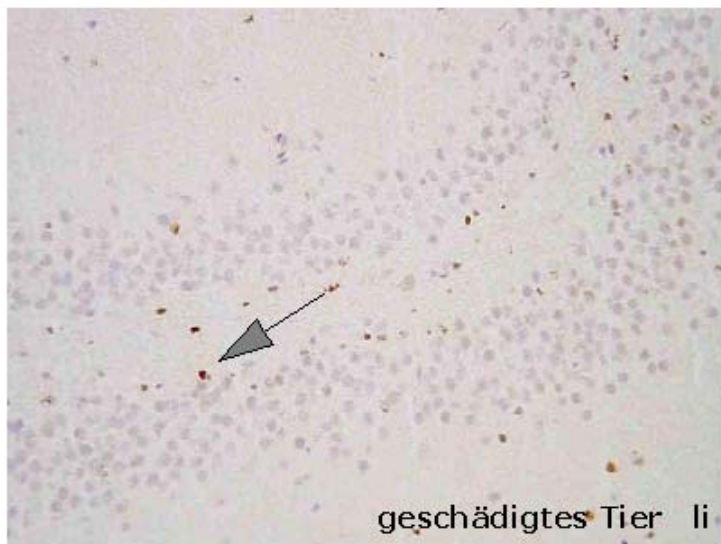
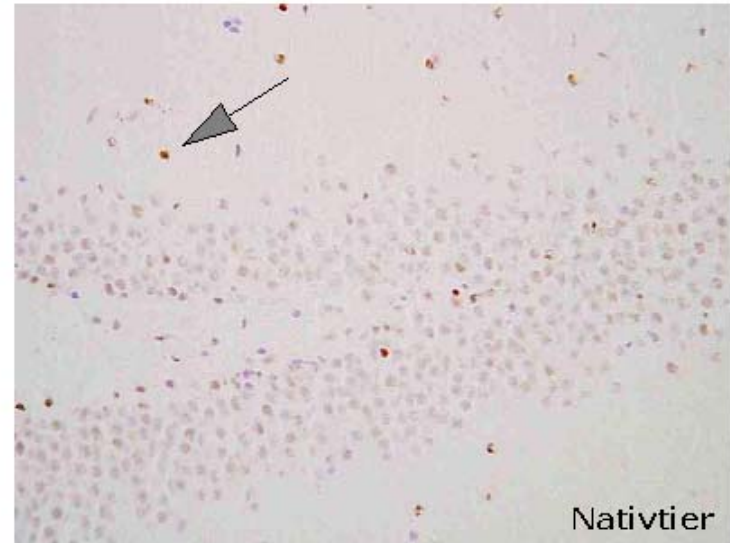
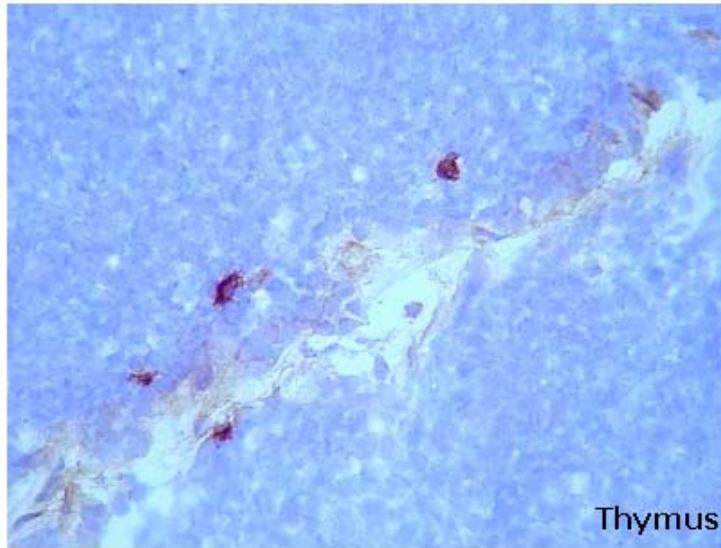
Thymus: Im Thymuspräparat sind einige Caspase-3 positive Zellen mit intrazellulärer Braunfärbung zu erkennen. Sie sind meist nahe an Bindegewebssepten lokalisiert.

Nativtier: Dieser Antikörper färbt im nicht geschädigten Tier einzelne Gliazellen im Hippokampus besonders stark an (grauer Pfeil). Es sind deutlich verschiedene Intensitäten der Gliazellfärbung erkennbar. Auch die Neurone des Gyrus dentatus sind z.T. leicht braun gefärbt.

Geschädigtes Tier: Im linken Hippokampus sind besonders am Rand des Zellbandes sehr stark gefärbte Zellen (Glia) sichtbar (grauer Pfeil). Insgesamt sind tendenziell weniger Zellen angefärbt als bei den Antikörpern von Cell Signaling Lot 6, Lot 8 und Lot 1681, diese sind dafür aber deutlicher erkennbar.

Im rechten Hippokampus sind neben den nekrotischen dunkelblauen Neuronen (Pfeilspitze) auch braun gefärbte Zellen sichtbar. Diese Zellen sind eher klein und liegen wie im Nativtier eher am Rand bzw. außerhalb des Zellbandes (grauer Pfeil).

Promega aktivierte Caspase-3
(Bildtafel 7)



Chemicon aktivierte Caspase-3, Arbeitskonzentration 1:100, Bildtafel 8

Thymus: Es sind vereinzelt positive, intrazellulär braun gefärbte Zellen erkennbar, jedoch deutlich weniger als bei allen anderen untersuchten Antikörpern.

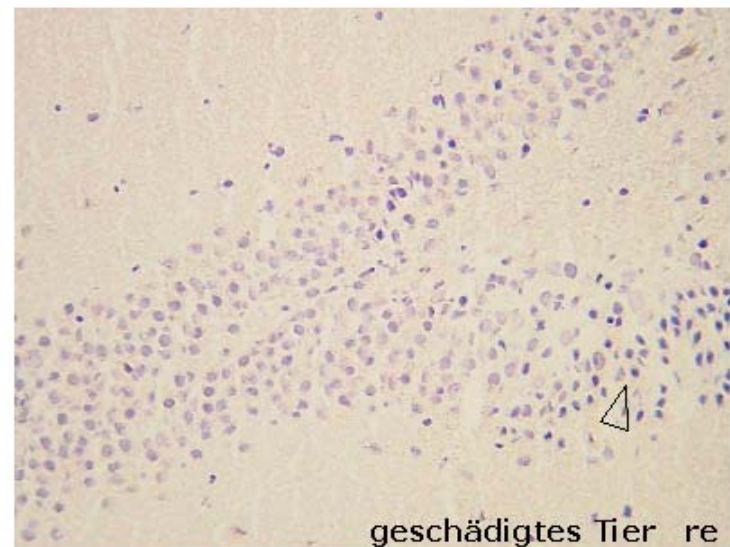
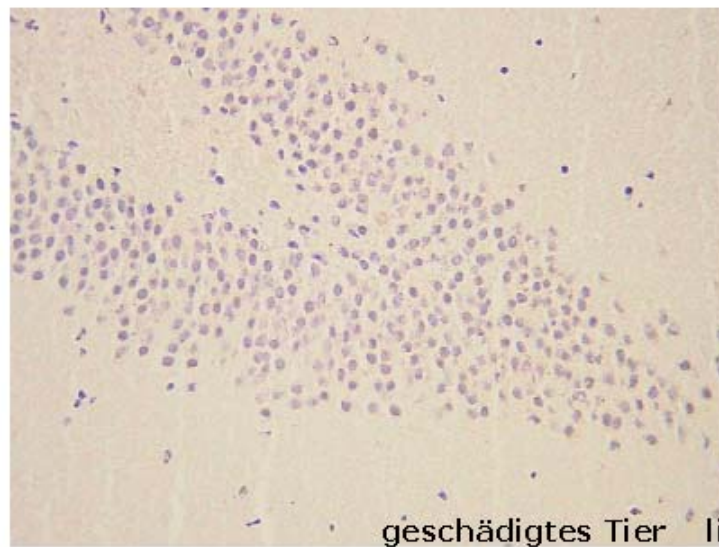
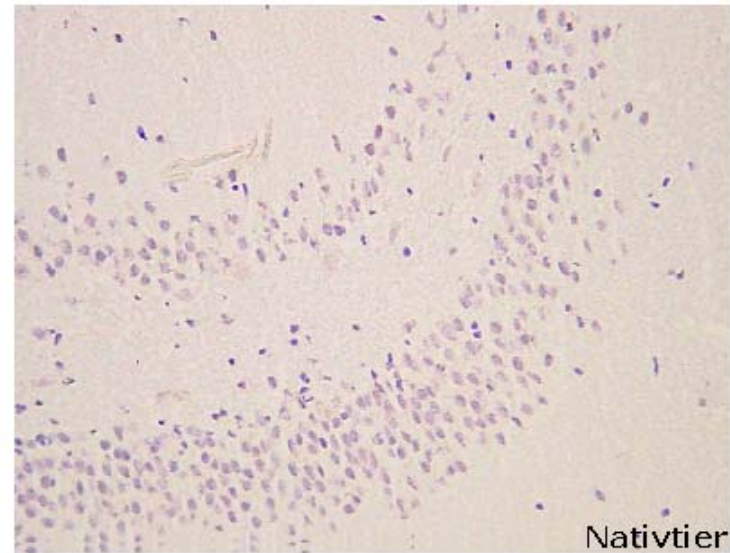
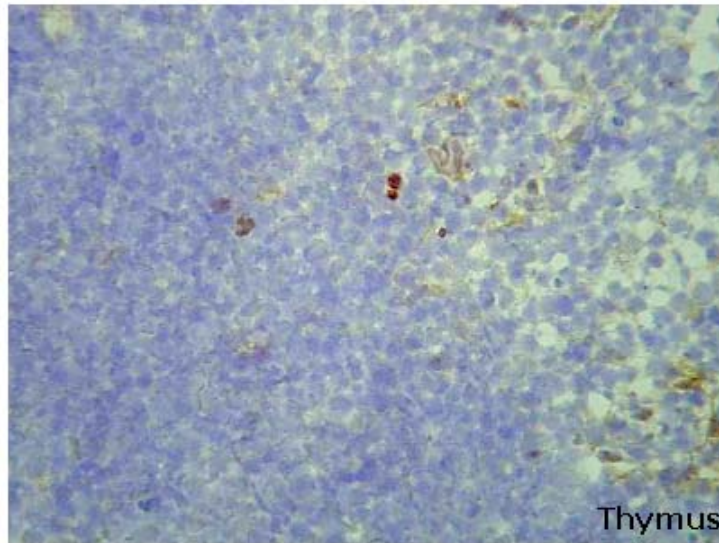
Nativtier: Das Ependym ist nur sehr schwach braun angefärbt. Weder im Cortex noch in der Hippokampusformation sind einzelne braune Zelle sichtbar. Der Hintergrund ist völlig ungefärbt. Die Neurone sind blassblau, die Gliazellen blau gefärbt.

Geschädigtes Tier: Im linken Hippokampus ist wie im Nativtier keine Braunfärbung erkennbar. Neurone und Gliazellen sind blau.

Im rechten Hippokampus sind die dunklen nekrotischen Neurone gut sichtbar (Pfeilspitze). Auch hier sind keine braun gefärbten Zellen (weder Neurone noch Glia) vorhanden. Bei höherer Konzentration des Antikörpers (1:50 und 1:20) wurde ebenfalls keine Braunfärbung von Zellen erreicht.

Chemicon aktivierte Caspase-3

(Bildtafel 8)



EIGENE UNTERSUCHUNGEN

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass sich die untersuchten polyklonalen Antikörper in ihrer Sensitivität (siehe unterschiedliche Verdünnungen) und Detektionsfähigkeit zum Teil sehr stark unterscheiden. Alle Antikörper (außer Lot 4 von Cell Signaling und Chemicon aktivierte Caspase-3) färben im Hirnschnitt des Nativtieres (das keiner Ischämie unterzogen wurde) Zellen an, obwohl in gesundem, nicht geschädigtem Gehirn keine apoptotischen Zellen mit aktivierter Caspase-3 vorhanden sein dürften. Diese Zellen gelten als unspezifisch angefärbt. In der Positivkontrolle, dem Thymus juveniler Ratten, in welchem physiologischerweise Apoptose vorkommt, färben alle Antikörper Zellen an.

Die Antikörper Cell Signaling Lot 8, Lot 1681, CM1 und Promega stellen im rechten Hippokampus des geschädigten Tieres, in welchem Apoptose zu erwarten ist, einzelne unterschiedlich intensiv braun gefärbte Zellen dar. Da im nativen Gehirnschnitt (ohne ischämischen Insult) auch Zellen angefärbt sind, kann hier nicht von einer spezifischen Anfärbung der aktivierten Caspase-3 ausgegangen werden.

Der Antikörper von Chemicon gegen aktivierte Caspase-3 färbt weder im Nativtier noch im durch Ischämie geschädigten Gehirn Zellen an.

Der Antikörper Lot 4 von Cell Signaling stellt im Nativtier keine positiv gefärbten Zellen dar, im geschädigten Tier dagegen sind deutlich positive Zellen im Zellband des rechten Hippokampus vorhanden.

3.2.2.3 Ergebnisse des Antikörpervergleichs in der Western-Blot-Analyse

Für den Antikörpervergleich mit Hilfe der Western-Blot-Analyse wird bei jedem Durchgang exakt die gleiche Menge des gentechnisch hergestellten Proteins rekombinanter Caspase-3 von Alexis (siehe oben) aufgetragen. Das Protein enthält verschiedene Fraktionen, zum größten Teil aktivierte Caspase-3 mit 17-20 kD, aber auch Procaspase-3 mit 32 kD und anderen unterschiedlich große Bruchstücke in geringen Mengen. In der Western-Blot-Analyse werden die Proteine ihrer Größe nach einzeln aufgetrennt und dann selektiv durch den Antikörper markiert.

Die aufgetragenen Konzentrationen des Proteins betragen 0,2 µg, 0,1 µg und 0,05 µg. Die Konzentrationen werden so hoch gewählt, um möglichst viele verschiedene, starke Proteinbanden zu bekommen, anhand derer das Detektionsmuster der verschiedenen Antikörper gegen aktivierte Caspase-3 gut vergleichbar ist.

Die Gelelektrophorese und der Immunoblot werden immer nach dem gleichen Schema durchgeführt. Die Membranen werden mit den verschiedenen Primärantikörpern gegen aktivierte Caspase-3 über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag werden die Membranen mit dem Sekundärantikörper beschichtet, mit dem Chemilumineszenz Reagenz entwickelt und über die Image Station sichtbar gemacht.

Die Antikörper gegen aktivierte Caspase-3 färben verschiedene Banden der aufgetragenen Proteinfraktion an. Auch die Intensität der angefärbten Banden variiert von Antikörper zu Antikörper. Jeder Antikörper hat sein individuelles Färbemuster. Die Bande bei 17/18 kD (aktivierte Caspase-3) ist bei den getesteten Antikörpern ähnlich stark, ebenso ist eine Bande bei 32 kD, die dem Proenzym entspricht, vorhanden. Es zeigen sich weitere schwache Banden bei 19 und 20 kD, die bei sinkender Proteinkonzentration deutlich an Intensität verlieren.

Der Antikörper Lot 4 von Cell Signaling markiert die 32 kD Bande (Proenzym Caspase-3) nur sehr schwach, die Bande bei 17/18 kD ist dagegen extrem stark geschwärzt.

Cell Signaling Lot 4 aktivierte Caspase-3

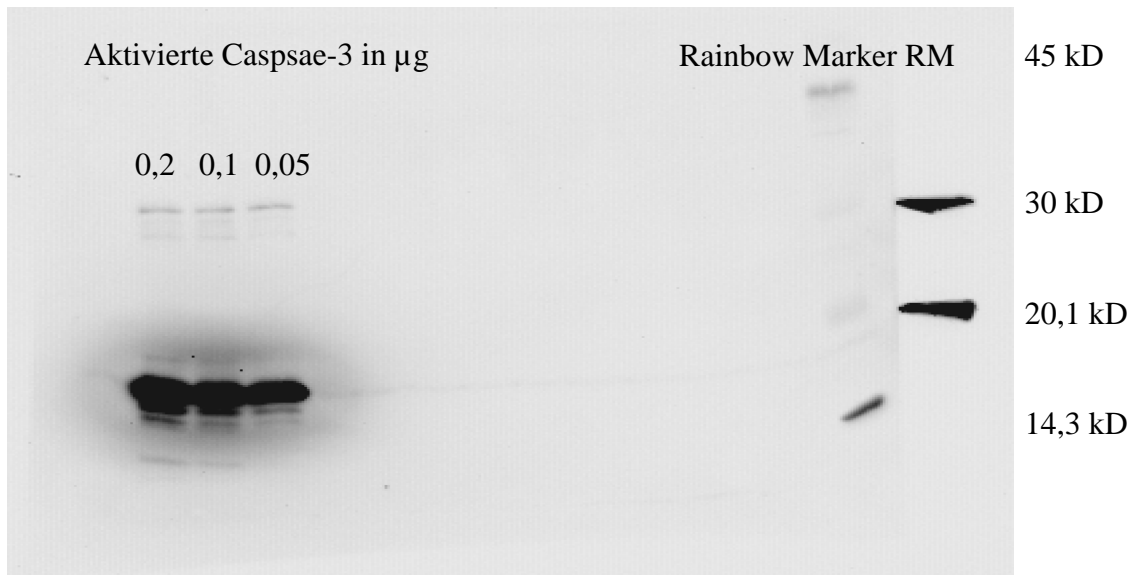


Abb. 9: Western-Blot-Analyse des Antikörpers Lot 4 von Cell Signaling

Dagegen sind bei allen anderen Antikörpern im Bereich von 32 kD zwei geschwärtzte Banden aufgetreten, die sich bei den niedrigeren Caspase-3 Proteinkonzentrationen abschwächen. Bei dem Antikörper von Promega ist die erste Bande bei 32 kD nur leicht dargestellt, bei Cell Signaling Lot 6, Lot 8 und Lot 1681 sind beide Banden bei 32 kD annähernd gleich stark, zusätzlich ist hier eine weitere schwache Bande im Bereich von 22 kD dargestellt.

Cell Signaling Lot 6 aktivierte Caspase-3

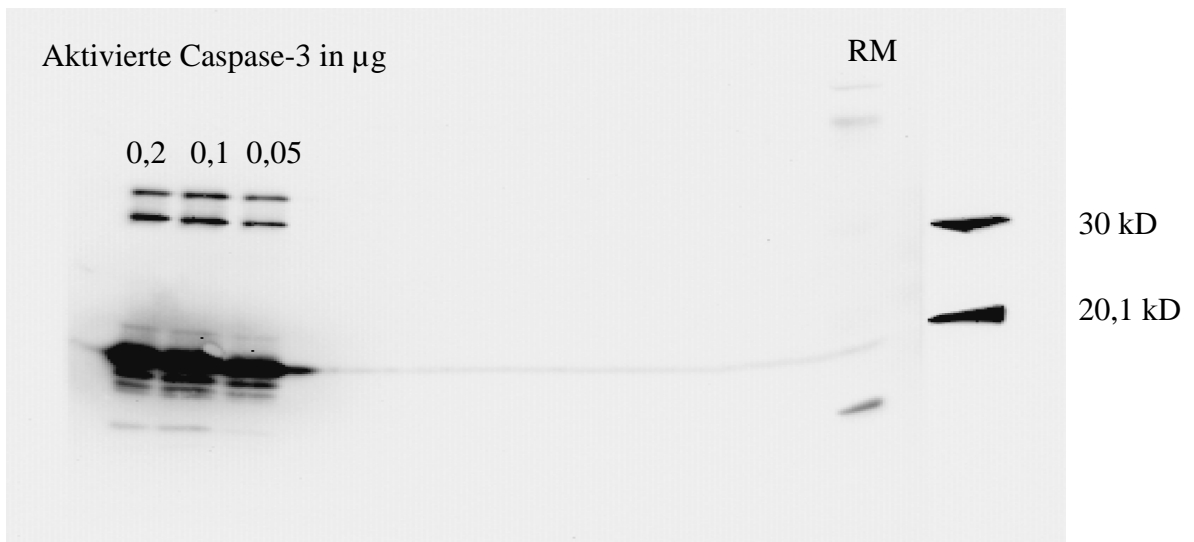


Abb. 10: Western-Blot-Analyse des Antikörpers Lot 6 von Cell Signaling

Cell Signaling Lot 8 aktivierte Caspase-3

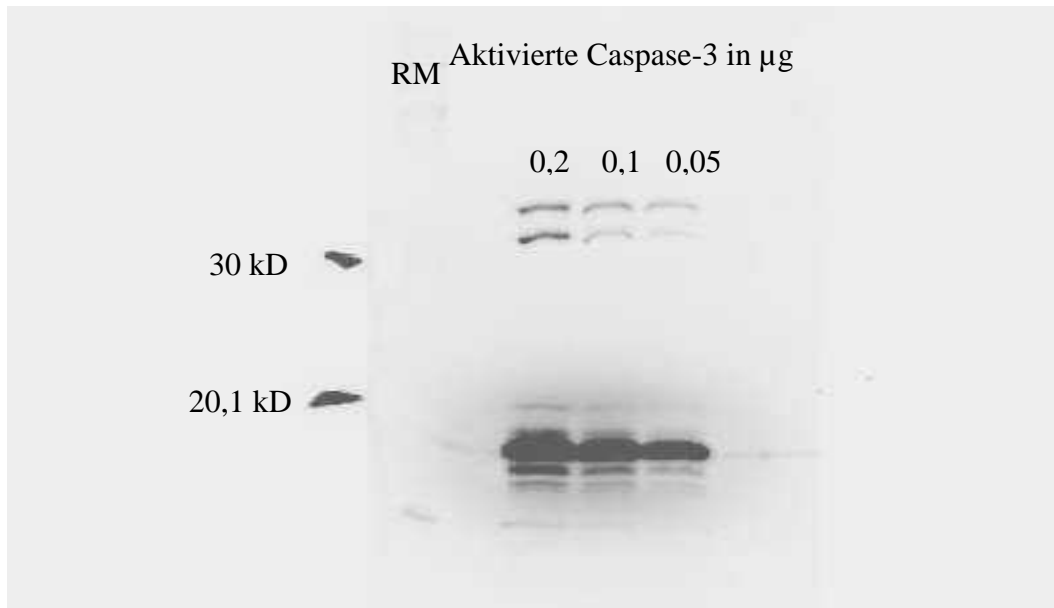


Abb. 11: Western-Blot-Analyse des Antikörpers Lot 8 von Cell Signaling

Cell Signaling Lot 1681 aktivierte Caspase-3

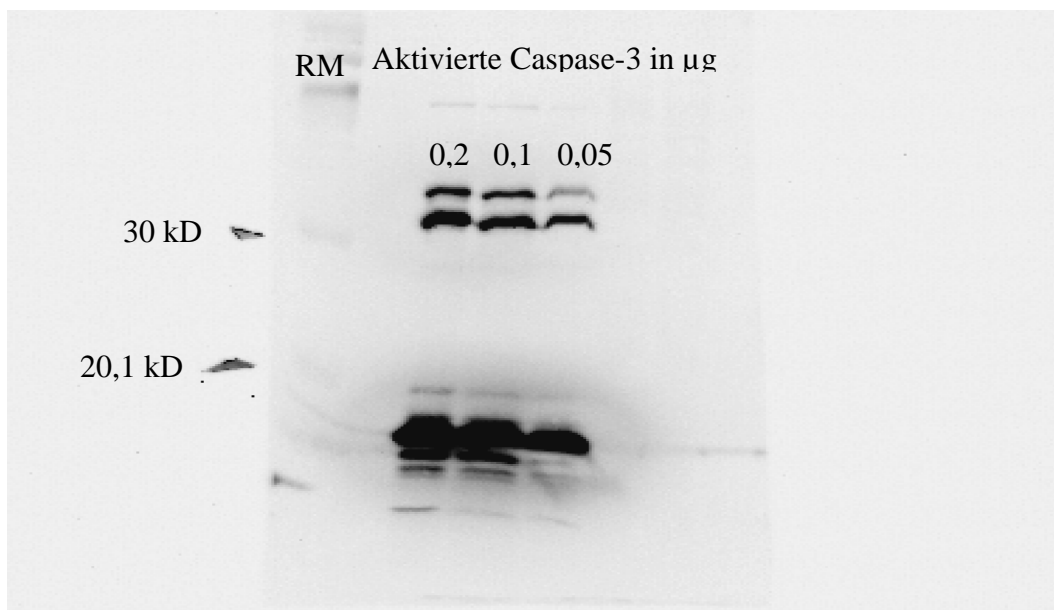


Abb. 12: Western-Blot-Analyse des Antikörpers Lot 1681 von Cell Signaling

Promega aktivierte Caspase-3

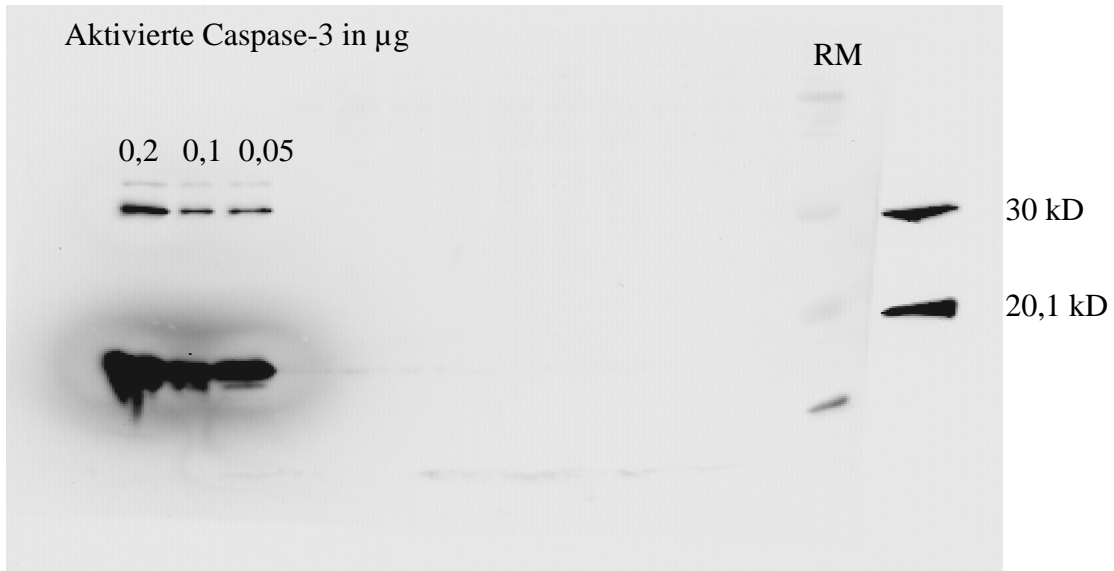


Abb. 13: Western-Blot-Analyse des Antikörpers von Promega

Des weiteren detektieren alle Antikörper mindestens zwei kleinere Banden unter 17 kD. Bei CM1 von BD Bioscience sind diese Banden nur angedeutet, dafür ist eine zusätzliche Bande bei ca. 40 kD sichtbar.

Chemicon aktivierte Caspase-3

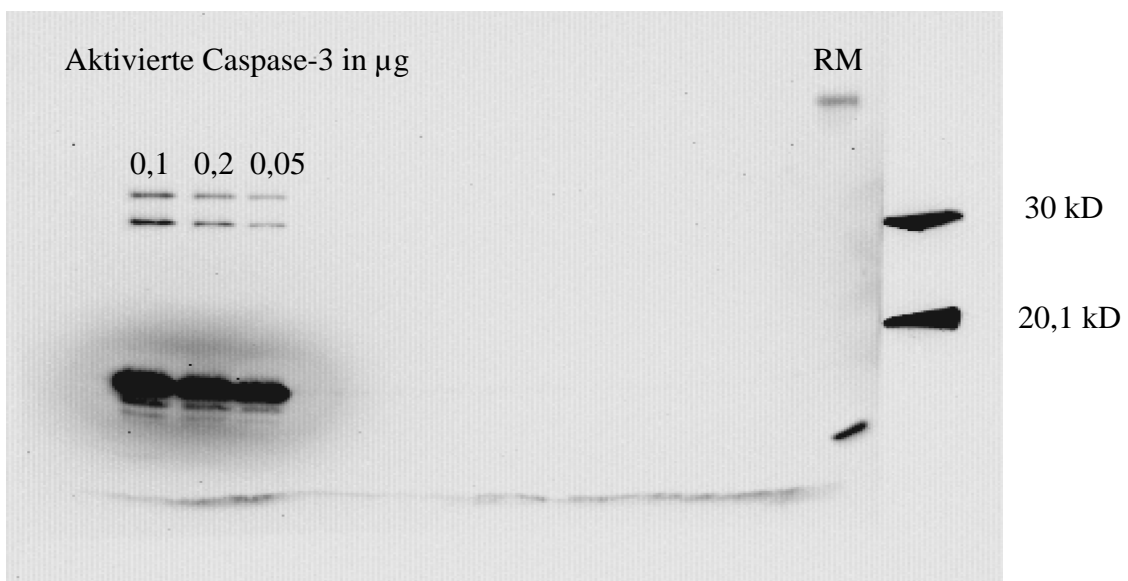


Abb. 14: Western-Blot-Analyse des Antikörpers von Chemicon

BD BioScience aktivierte Caspase-3 (CM1)

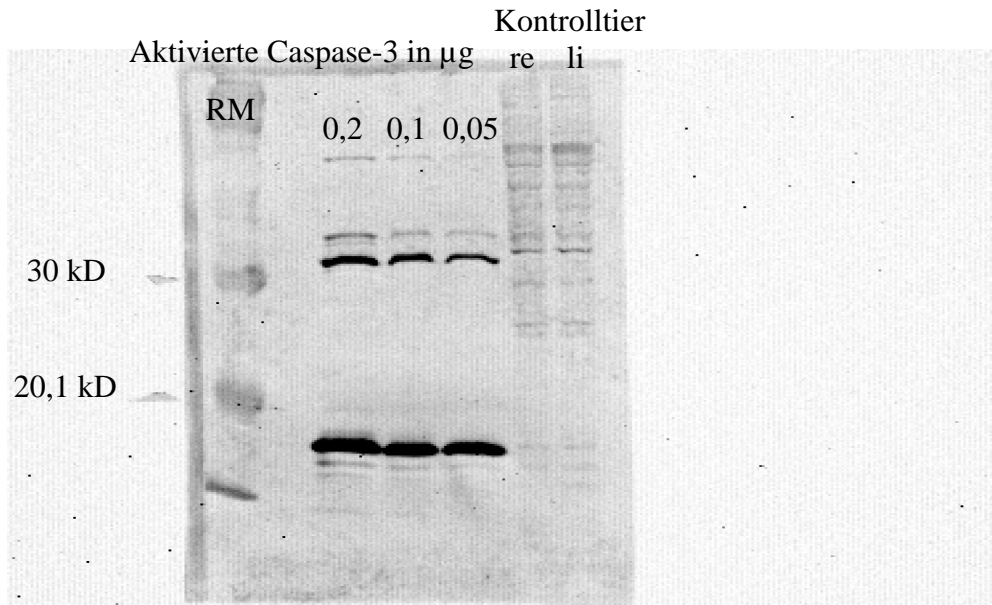


Abb. 15: Western-Blot-Analyse des Antikörpers CM1 von BD BioScience

Es ist festzuhalten, dass die Detektionsfähigkeit der verschiedenen Antikörper gegen aktivierte Caspase-3 deutlich in ihrer Quantität und Intensität variiert, obwohl exakt die gleichen Proteinmengen verwendet werden. Die Aufnahmen von Cell Signaling Lot 6 und Lot 1681 stellen die meisten Banden dar, bei Lot 4 sind die wenigsten Banden detektiert.

3.2.3 Nachweis von Proenzym Caspase-3 und PARP Fragment p85 als Apoptoseparameter

3.2.3.1 Detektion des Proenzym Caspase-3 CPP32

Zur Detektion des Proenzym Caspase-3 wurde ebenfalls Thymusgewebe, ein nativer Hirnschnitt und durch Ischämie geschädigtes Hirngewebe mit dem Antikörper gegen Caspase-3 CPP32 von Chemicon inkubiert (siehe Bildtafel 9). Ebenso wurde eine Western-Blot-Analyse mit Proben von Tieren der Kontrollgruppe und rekombinanter Caspase-3 angefertigt.

3.2.3.1.1 Ergebnisse in der Immunhistochemie

Chemicon Proenzym Caspase-3 CPP32, in der Arbeitskonzentration 1:200, Bildtafel 9

Thymus: Es stellt sich ein ähnliches Bild dar wie bei den Antikörpern gegen die aktivierte Caspase-3. Neben den angefärbten Bindegewebssepten sind einzelne Zellen mit einer intrazellulären körnigen Braunfärbung sichtbar (siehe Bildtafel 9, Thymus). Die Anfärbung der Zellen ist intensiver als bei den Antikörpern gegen aktivierte Caspase-3.

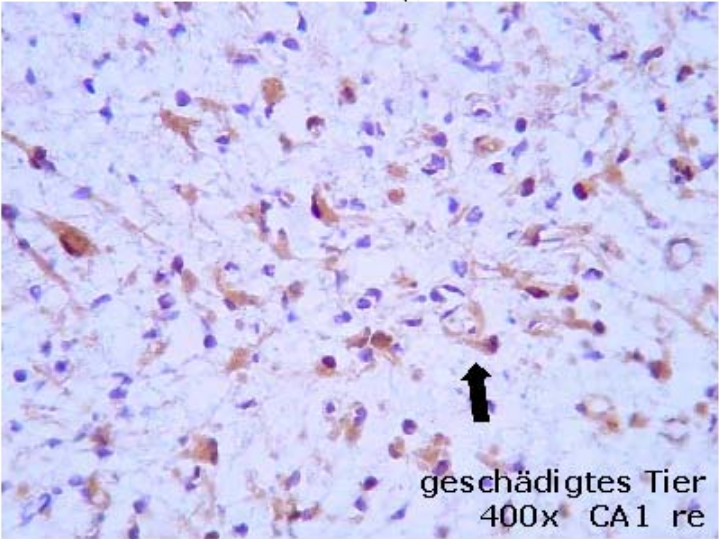
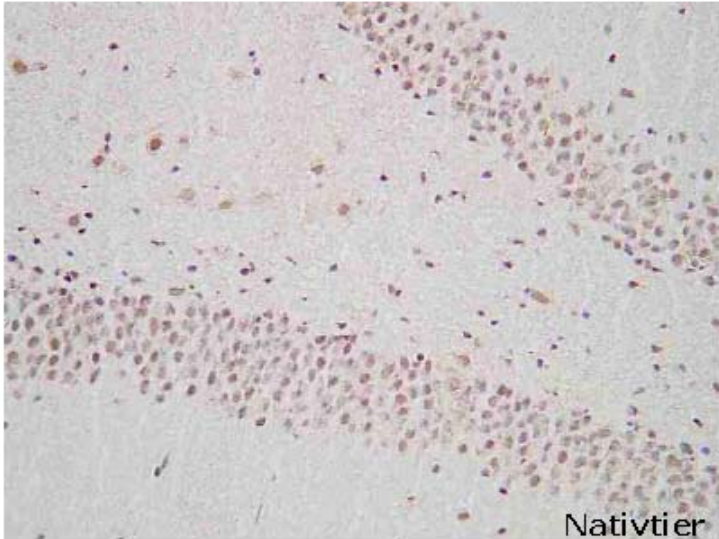
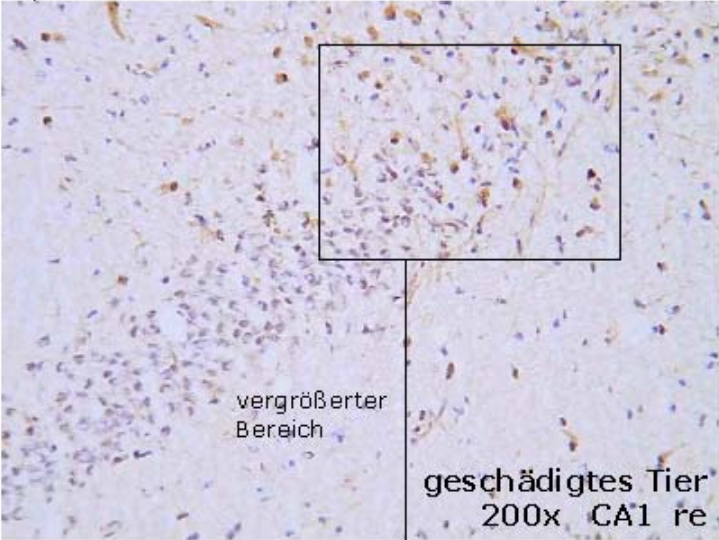
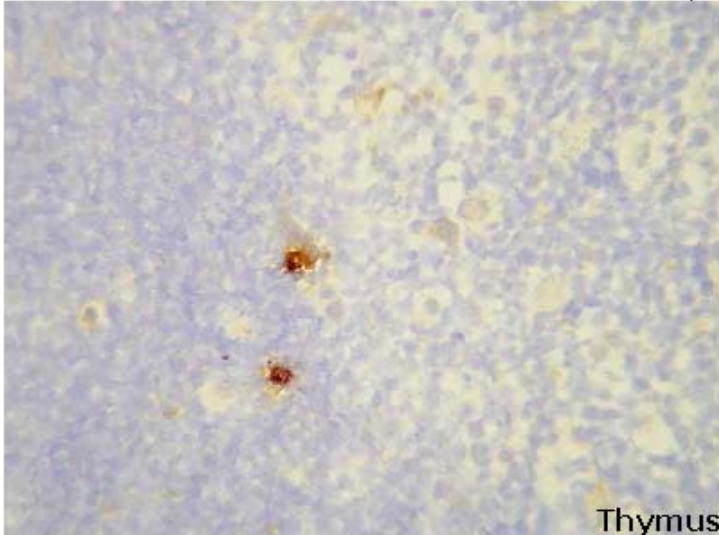
Nativtier: Es sind vor allem die größeren Neurone der Hippokampusformation und des Cortex gleichmäßig hellbraun gefärbt. Die kleineren Gliazellen sind größtenteils blau gefärbt.

Geschädigtes Tier: Im durch Ischämie geschädigten Tier sind die Zellen des linken Hippokampus gleichmäßig hellbraun gefärbt (nicht dokumentiert).

In der CA1, CA2-Region und im Gyrus dentatus des rechten Hippokampus sind intensiv braun gefärbte Zellen erkennbar. Wie bei der 400fachen Vergrößerung besonders deutlich wird, ist nicht nur der Zellkern sondern auch das Zytoplasma mit seinen Fortsätzen zum Teil intensiv braun gefärbt (schwarzer Pfeil). Morphologisch erscheinen die angefärbten Zellen noch weitgehend unverändert. Es kann jedoch keine Unterscheidung zwischen Neuronen und in den Hippokampus eingewanderte Gliazellen getroffen werden.

Chemicon Proenzym Caspase-3 CPP32

(Bildtafel 9)



3.2.3.1.2 Ergebnisse in der Western-Blot-Analyse

Auch hier wird das Protein rekombinante Caspase-3 von Alexis in den Konzentrationen von 0,2 μg , 0,1 μg , und 0,05 μg aufgetragen. Zusätzlich werden Proben des rechten und linken Hippokampus der Kontrollgruppe mit einem Gesamtproteingehalt von 30 μg pipettiert. Der Antikörper von Chemicon gegen Proenzym Caspase-3 detektiert laut Auskunft des Herstellers die Proform CPP32 der Caspase-3 mit 32 kD und das p20 Fragment der aktivierte Caspase-3. Trotz mehrmaligen Wiederholens der Western-Blot-Analyse gelang eine Detektion der 32 kD Bande in den aufgetragenen Konzentrationen der rekombinanten Caspase-3 nicht. In den Proben der Versuchstiere sind im Bereich der Proform bei 32 kD jedoch deutlich positive Banden detektiert. Das p20 Fragment der aktivierten Caspase-3 bei ca. 20 kD wird in der Caspase-3 Proteinfraktion dargestellt, jedoch nicht in den Proben der Kontrolltiere.

Chemicon Proenzym Caspase-3 CPP32

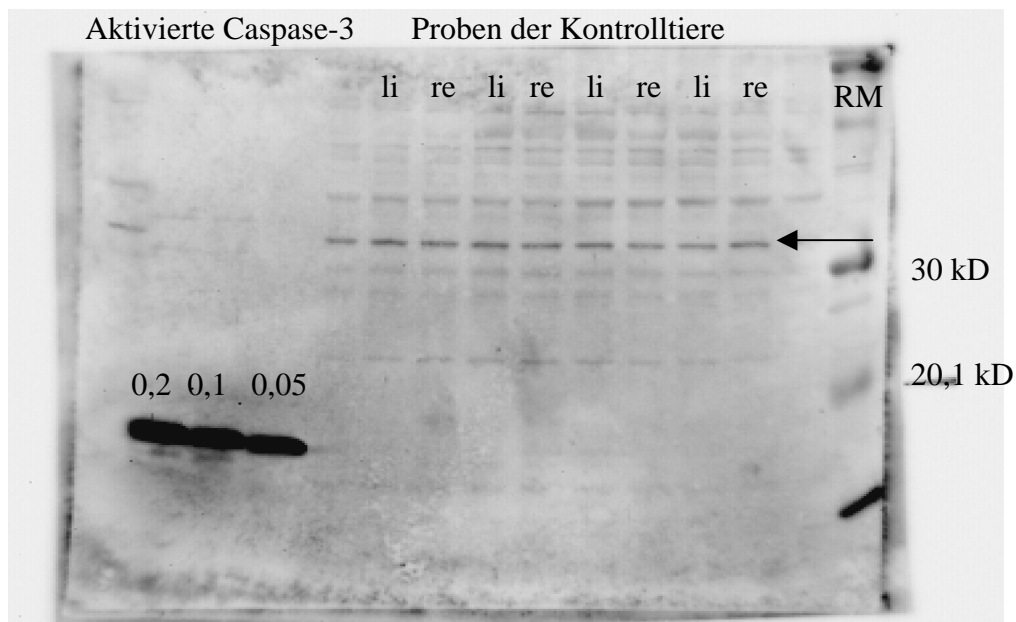


Abb. 16: Western-Blot-Analyse des Antikörpers gegen Proenzym Caspase-3 von Chemicon

3.2.3.2 Detektion des p85 Fragment von PARP

3.2.3.2.1 Ergebnisse in der Immunhistochemie

Promega p85 Fragment von PARP, in der Arbeitskonzentration 1:250, Bildtafel 10

Thymus: Als Positivkontrolle wird bei der Detektion des p85 Fragments von PARP ebenfalls Thymusgewebe eingesetzt (nicht dokumentiert). Es stellen sich vereinzelt positive Zellen mit intensiver Braunfärbung dar.

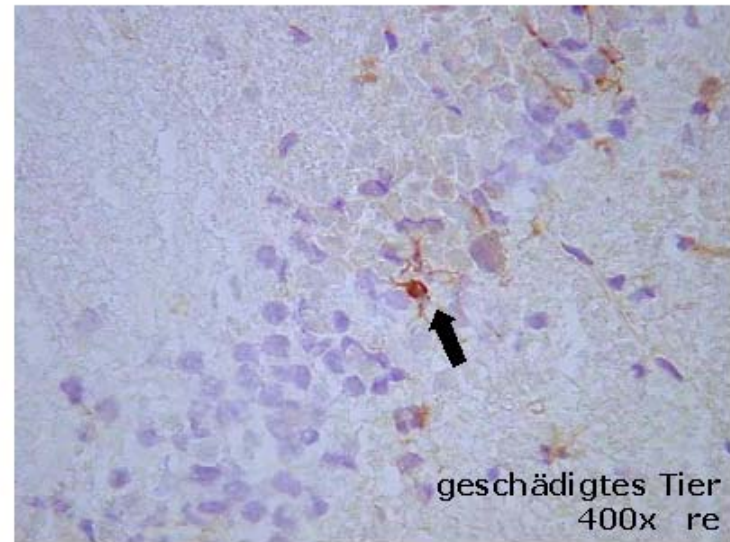
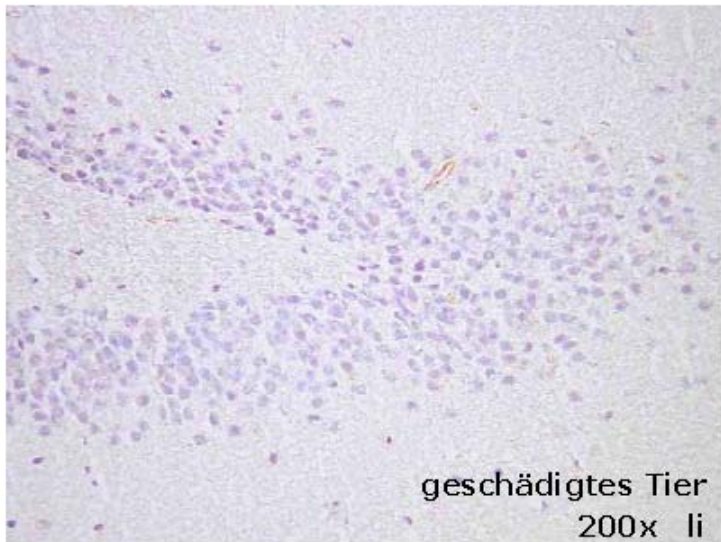
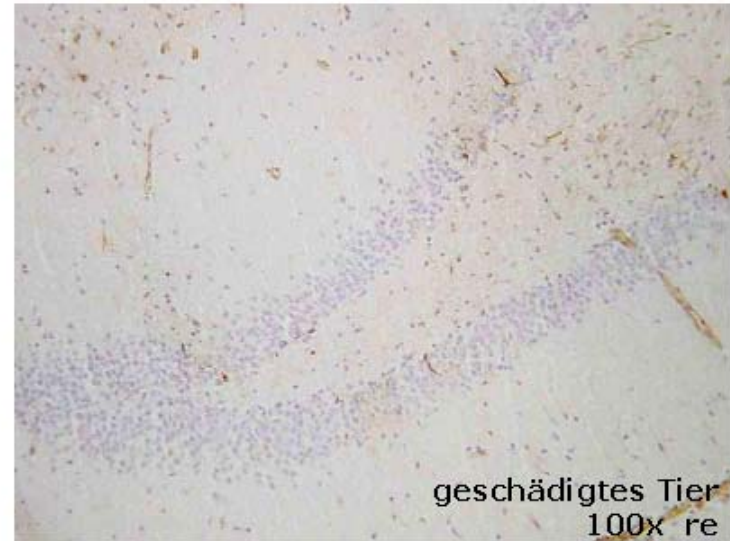
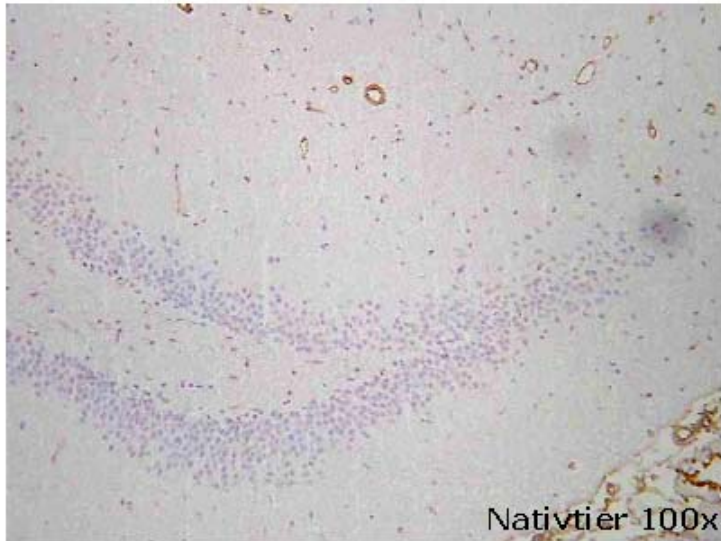
Nativtier: Im Nativtier fällt besonders die starke Anfärbung des Ependyms und der Gefäßintima auf. Die Neurone und Gliazellen sind im gesamten Präparat nicht angefärbt (siehe Bildtafel 10).

Geschädigtes Tier: Die Hippokampusformation der linken Hemisphäre des geschädigten Tieres ist ebenso bis auf einzelne Gefäßanschnitte ungefärbt.

Im rechten Hippokampus besonders in der CA1-Region und im Gyrus dentatus sind positive, zum Teil sternförmige Zellen bereits in der 100fachen Vergrößerung erkennbar. Hier ist neben dem Kern auch das Zytoplasma stark angefärbt (siehe 400fache Vergrößerung, schwarzer Pfeil). Es sind überwiegend positive Zellanschnitte dargestellt, in denen der Zellkern fehlt. Eine Unterscheidung zwischen eingewanderter Makroglia und Neurone ist nicht möglich.

Promega p85 Fragment von PARP

(Bildtafel 10)



3.2.3.2.2 Ergebnisse in der Western-Blot-Analyse

Die Western-Blot-Analyse für den Antikörper gegen das p85 Fragment (85 kD) von PARP erfolgt ebenfalls nach dem gleichen Schema. Hier werden Proben des rechten und linken Hippokampus eines Tieres der Kontrollgruppe aufgetragen. Es zeigt sich eine deutliche Differenz zwischen rechter und linker Hemisphäre. In der Probe des linken Hippokampus ist neben undeutlichen und schwachen Banden nur eine geschwärzte Bande bei 50 kD dargestellt. Im Gegensatz dazu ist im rechten geschädigten Hippokampus bei 85 kD eine Bande sichtbar. Der Antikörper detektiert hier das p85 Fragment von PARP. Des weiteren ist eine Bande bei 45 kD dargestellt, die sich in der linken Hemisphäre nicht findet.

Das aufgetragene Protein Caspase-3 wird nicht detektiert.

Promega p85 Fragment von PARP

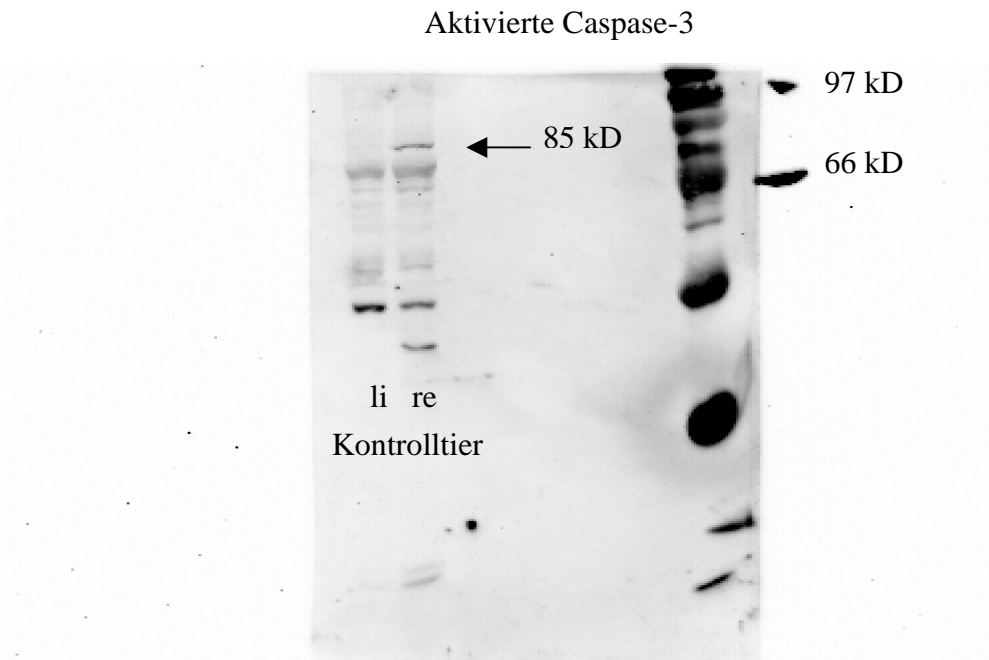


Abb. 17: Western-Blot-Analyse des Antikörpers Anti-PARP p85 Fragment von Promega

4 DISKUSSION

4.1 Diskussion der Ergebnisse

Ziel der Arbeit ist es, ein eindeutiges immunhistochemisches Nachweisverfahren für Apoptose mit Hilfe von kommerziell erhältlichen polyklonalen Antikörpern gegen aktivierte Caspase-3 im Hippokampus nach inkompletter zerebraler Ischämie mit Reperfusion zu etablieren. Hierfür wurde die Sensitivität und Spezifität der Antikörper mit der Peroxidase-konjugierten Steptavidin-Biotin-Methode (LSAB-Methode) und der Western-Blot-Analyse untersucht.

Die Ergebnisse zeigen, dass bei den verwendeten, spezifisch gegen das p17-20 Fragment der aktivierten Caspase-3 gerichteten Antikörpern, im direkten Vergleich bezüglich ihrer Sensitivität und Spezifität deutliche Unterschiede auftreten. Die individuellen Arbeitskonzentrationen der Antikörper reichen von 1:50 bis 1:10.000, alle Antikörper liefern sowohl in der Immunhistochemie als auch in der Western-Blot-Analyse ein unterschiedliches Färbemuster.

In der Immunhistochemie detektiert der Antikörper von Cell Signaling Lot 4 ausschließlich im rechten (stärker betroffenen) Hippokampus des geschädigten Tieres aktivierte Caspase-3. Hier sind einzelne Neurone selektiv angefärbt, der Hintergrund ist sowohl im Nativtier als auch im linken Hippokampus des geschädigten Tieres komplett ungefärbt. Folglich eignet sich dieser Antikörper aufgrund seiner Sensitivität, unter den gegebenen Versuchsbedingungen eine valide Aussage über das Auftreten von Apoptose nach inkompletter Hemisphärenischämie in diesem Tiermodell zu treffen.

Die übrigen Chargennummern von Cell Signaling, sowie die untersuchten Antikörper anderer Hersteller gegen aktivierte Caspase-3, zeigen alle eine unterschiedlich stark ausgeprägte unspezifische Anfärbung von Zellen, vor allem im nicht geschädigten Gewebe (Nativtier). Die Schnitte des Nativtieres dürfen bei einem aussagekräftigen Färbedurchgang (vergleiche Lot 4) keine positiven Zellen enthalten. Nur unter dieser Voraussetzung ist die Anzahl der aktivierte Caspase-3 enthaltenden Zellen im durch Ischämie geschädigten Tier eindeutig bestimmbar. Enthalten die nativen Hirnschnitte scheinbar auch positive Zellen, wie das bei den Antikörpern Cell Signaling Lot 6, Lot 8, Lot 1681, CM1 und Promega der Fall ist, kann nicht beurteilt werden, welche Zellschädigung bzw. Färbung der Zellen durch die Ischämie ausgelöst worden ist. Der Antikörper von Chemicon gegen aktivierte Caspase-3 detektiert weder im Nativtier noch

im geschädigten Tier positive Zellen und ist daher für diesen Versuchsaufbau nicht geeignet bzw. nicht sensitiv genug.

Die unterschiedliche Spezifität der Antikörper bestätigt sich auch in der Western-Blot-Analyse, denn trotz gleicher Gesamtproteinmenge an aktivierter Caspase-3 variiert die Intensität und Anzahl der detektierten Banden zum Teil erheblich.

Die gelungene Darstellung des, durch den ischämischen Insult vermehrt exprimierten, Proenzym Caspase-3 (siehe Abb: 16) zeigt, dass die Voraussetzungen für eine mögliche Aktivierung der Caspase-3 erfüllt sind. Durch die erfolgreiche Detektion des p85 Fragment von PARP (siehe Abb: 17) in der Immunhistochemie und der Western-Blot-Analyse wird der Nachweis erbracht, dass durch die zerebrale Ischämie in diesem Tiermodell Caspase-3 aktiviert wird und somit sicher Apoptose induziert wird.

Mögliche Ursachen für das unterschiedliche Detektionsmuster der einzelnen Antikörper gegen Caspase-3 sollen im Folgenden dargelegt und diskutiert werden (siehe 4.1.2).

4.1.1 Physiologische Messparameter

Die während der operativen Phase kontinuierlich gemessenen Kreislauf-, Atmungs- und Stoffwechselfparameter beinhalten die Messung des mittleren arteriellen Blutdrucks, die arterielle Blutgasanalyse (PaO_2 und PaCO_2), die Messung der Blutglukose und des pH-Wertes, sowie die Ermittlung der rektalen und perikraniellen Temperatur. Diese umfangreichen Messungen sind notwendig, um den Einfluss von unkontrollierten Schwankungen der Funktionsparameter des Organismus auf das Ausmaß des induzierten zerebralen Schadens auszuschließen.

Mittlerer arterielle Blutdruck (mmHg)

Der MAP der Kontrollgruppe und der Dexmedetomidin-Gruppe wird gemäß dem Versuchsprotokoll während der Ischämie durch Hypotension auf 40 mmHg gesenkt. In der Äquilibrations- und der Erholungsphase liegen die Werte im physiologischen Bereich und zeigen keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen.

DISKUSSION

Blutglukose (mg/dl)

Es ist bekannt, dass ein erhöhter Glukosegehalt des Blutes während der Ischämie einen negativen Einfluss auf das Ausmaß des neurologischen Schadens hat. Dieser entsteht durch eine vermehrte Laktatanreicherung in den Zellen bei anaerober Glykolyse (HOFFMAN et al. 1990). Die Blutglukose muss deshalb möglichst konstant normoglycäm gehalten werden. In diesem Modell wird das durch Futterentzug innerhalb der letzten 12 Stunden vor Versuchsbeginn erreicht. Erfahrungen haben gezeigt, dass die Glukosewerte der Tiere dadurch in einem vergleichbar niedrigen normoglycämischen Bereich liegen. Aufgrund tierartlicher Unterschiede kommt es trotzdem zu Schwankungen, die aber noch im physiologischen Normbereich liegen. Den geringgradigen Schwankungen des Blutglukosegehalts werden keine Bedeutung für das Ergebnis beigemessen.

Blutgase (mmHg)

Da man einer Hyperventilation mit konsekutiver Reduktion des PaCO₂ potentiell neuroprotektive Eigenschaften zuspricht, wird der PaCO₂ bei allen Tieren perioperativ überwacht. Die Atemfrequenz wird im physiologischen Bereich konstant gehalten, um Abweichungen im Ausmaß des neurologischen Schadens zu vermeiden.

Alle Werte liegen im Bereich der physiologischen Norm und haben somit keine Bedeutung für das Ergebnis dieses Versuchs.

pH-Wert

Der pH-Wert wird während des gesamten Versuchs bei allen Tieren durch Basenabweichungsgesteuerte Infusion von Natriumbikarbonat konstant im physiologischen Bereich gehalten, um eine Vergleichbarkeit der Daten zu gewährleisten.

Temperatur

Der Messung und der Konstanthaltung der rektalen und der perikraniellen Temperatur mit Hilfe einer Wärmelampe und eines Heizkissens wird in diesem Versuch große Bedeutung beigemessen. Die zusätzliche Messung der Gehirntemperatur ist notwendig, da die Körper- und die Gehirntemperatur während eines ischämischen Insults voneinander abweichen (BUSTO et al. 1987). Sowohl die rektale als auch die perikranielle Temperatur beider Versuchsgruppen liegen

ohne Schwankungen im physiologischen Bereich. Ein Einfluss auf das Ergebnis des Versuchs kann ausgeschlossen werden.

4.1.2 Unterschiede im Färbeverhalten der Primärantikörper gegen aktivierte Caspase-3

4.1.2.1 Einfluss der Antikörperherstellung

Zur Herstellung von polyklonalen Antikörpern erfolgt zunächst eine primäre Immunisierung eines Kaninchens durch subkutane Injektion des Antigens. Um bei kleinen Antigenen eine bessere Immunantwort auszulösen, werden diese häufig zusätzlich an immunstimulierende Adjuvantien wie zum Beispiel Freund's Adjuvans oder KLH gekoppelt. Dies führt zur Produktion von Antikörpern, sowohl gegen das Antigen als auch gegen das eingesetzte Adjuvans. Die Anlagerung von z.B. Anti-KLH-Antikörpern an das zu untersuchende Gewebe verursacht bei immunhistochemischen Färbetechniken unter Umständen eine unspezifische Anfärbung des Hintergrunds (PORANKIEWICZ-ASPLUND et al. 2000). Daher muss das gewonnene Antiserum in einer KLH beschichteten Säulenchromatographie von Anti-KLH-Antikörpern gereinigt werden. Durch eine Affinitätschromatographie z.B. mit Protein A (bindet selektiv IgG Immunglobuline) wird schließlich die IgG Immunglobulinfraktion von den restlichen Serumbestandteilen getrennt (COMPTON et al.1989).

Es sind jedoch immer geringe Restmengen anderer Antikörper in der IgG Fraktion enthalten, die sich an Antigene im Gewebe anlagern und so zu einer Verfälschung der Ergebnisse führen können (BOENISCH 2000). Dies könnte in diesem Versuchsaufbau mit ursächlich für die unterschiedlichen Detektionsmuster der einzelnen Antikörper sein.

Die Hersteller verwenden verschiedene Lagerungspuffer. Meist enthalten diese Serumproteine zur Verbesserung der Antikörperstabilität Natriumazid gegen eine mögliche bakterielle Kontamination und bis zu 50 % Glycerol, um die negativen Einflüsse von wiederholtem Auftauen und Einfrieren zu vermeiden. Ein Einfluss der verschiedenen Lagerungspuffer auf die Detektionsfähigkeit der Antikörper scheint ausgeschlossen, da auch Antikörper mit dem gleichen Puffer (Antikörper von Cell Signaling) ein sehr unterschiedliches Färbemuster aufweisen.

Die Spezifität der Antikörper wird von den Herstellern z.T. an apoptotischen Jurkat-Zellen (siehe 3.1.2.1 Promega) oder durch Präabsorption der Antikörper durch das Antigen getestet. Ihre

Anwendbarkeit in der Immunhistochemie wird nur exemplarisch an verschiedenen Geweben untersucht. Aufgrund der unterschiedlichen Gewebestruktur ist davon auszugehen, dass die Antikörper sich in verschiedenen Geweben mit unterschiedlicher Intensität unspezifisch anlagern. Daher müssen für jedes Versuchsvorhaben die Antikörper speziell auf das zu untersuchende Gewebe abgestimmt werden. In der vorliegenden Arbeit wurde Hirngewebe von Ratten nach zerebraler Ischämie mit Reperfusion untersucht. Von sieben getesteten Antikörpern gegen aktivierte Caspase-3 färbten fünf Antikörper teilweise sehr viel Hintergrund an, der Anti-aktive Caspase-3 Antikörper von Chemicon detektierte nicht sensitiv genug, einzig der Antikörper von Cell Signaling Cleaved Caspase-3 Lot 4 lieferte ein zufriedenstellendes und aussagekräftiges Ergebnis.

4.1.2.2 Lagerung und Handhabung

Die Qualität der polyklonalen Antikörper ist zum einen abhängig von der sorgfältigen Reinigung der antigen-spezifischen Antikörperfraktion bei der Antikörperherstellung sowie von der späteren Lagerung und Handhabung. Die diesbezüglichen Herstellerempfehlungen sind stets exakt einzuhalten.

Um bei immunhistochemischen Techniken ein optimales Ergebnis zu erzielen ist es nötig, die grundlegenden Regeln der „good laboratory practise“ bei der Durchführung jedes Färbedurchgangs zu beachten.

Die empfohlene Lagertemperatur des Herstellers muss stets eingehalten werden. Um eine Unterbrechung der Kühlkette beim Versand zu vermeiden, müssen Antikörper entsprechend ihrer Lagerungsempfehlung auf Trockeneis oder bei 4 °C mit Kühllakkus transportiert werden. Alle hier verwendeten Antikörper, mit Ausnahme des Antikörpers CM1 von BD Bioscience (Lagerungsempfehlung 4 °C), werden entsprechend der Herstellerempfehlung bei -20 °C gelagert. Um die Proteine durch wiederholtes Auftauen und Einfrieren nicht zu schädigen, werden die Antikörper nur sehr kurz aus dem Gefrierschrank entnommen und während dessen immer auf Eis gehalten und nach Gebrauch sofort wieder in den Tiefkühlschrank verbracht. Durch kurzes Abzentrifugieren bei 4 °C werden eventuelle kontaminierende Substanzen an den Gefäßboden verdrängt.

Es werden immer frische Pipettenspitzen und EppendorfgeläÙe verwendet um eine Kontamination des Antikörpers mit Fremdsbstanzten zu vermeiden. Die Vorbereitung und Durchführung der Färbedurchgänge wird ausschließlich von einer Person an einem Ort ausgeführt um mögliche Fremdeinflüsse weitestgehend zu vermeiden.

4.1.2.3 Mögliche Ursachen in der Immunhistochemie

Ein weiterer Grund für die unterschiedlichen Färberegebnisse könnte in der Durchführung der Färbetechnik liegen. Einflussfaktoren wie unterschiedliche Raumtemperatur, schwankende Qualität der Waschlösung oder abnehmende Enzymaktivität der Meerrettichperoxidase werden dadurch weitestgehend ausgeschlossen, dass die Antikörper direkt in einem Färbedurchgang miteinander verglichen werden. Somit herrschten für alle Antikörper die exakt gleichen Bedingungen. Die unterschiedlichen Färbemuster sind daher nicht auf Schwankungen oder Fehler in der Durchführung des Färbeprotokolls zurückzuführen. Es werden immer nur die Färbemuster der Antikörper innerhalb eines Färbedurchgangs miteinander verglichen.

Zur Beurteilung der Detektionsfähigkeit der Antikörper werden neben dem geschädigten Tier jeweils ein Thymuspräparat als Positivkontrolle, ein nativer Hirnschnitt als Spezifitätskontrolle und ein Thymuspräparat ohne Primärantikörper als Negativkontrolle mitgeführt.

Erst im Vergleich dieser Kontrollschnitte wird die unterschiedliche Sensitivität der Antikörper deutlich. Um ein valides immunhistochemisches Färberegebnis zu erhalten, ist es daher unumgänglich, in jedem Färbedurchgang Spezifitäts-, Positiv- und Negativkontrollen zur ständigen Qualitätskontrolle mit durchzuführen.

4.1.2.4 Mögliche Ursachen in der Western-Blot-Analyse

Die Ergebnisse der Western-Blot-Analyse zeigen deutlich, dass die Antikörper in der Sensitivität und Qualität ihrer Detektionsfähigkeit variieren. Es werden unterschiedlich viele Banden der Caspase-3 Proteinfraction angefärbt. Dies bedeutet, dass die Antikörper unterschiedlich große Bruchstücke der Caspase-3 erkennen und anfärben. Neben der aktivierten Caspase-3 mit 17-20 kD detektieren alle Antikörper noch andere Bruchstücke und die Proform der Caspase-3 mit 32 kD. In Untersuchungen von SRINIVASAN et al. (1998) detektierte der CM1 Antikörper gegen aktivierte Caspase-3 in der Western-Blot-Analyse ebenfalls bei ca. 30 kD eine zusätzlicher

Bande, deren Herkunft nicht erklärt werden konnte. Obwohl nach Auskunft der Hersteller die Antikörper spezifisch nur lediglich aktivierte Caspase-3 mit 17-20 kD detektieren sollen, zeigt diese Untersuchung, dass bei allen Antikörper auch ein bis zwei Banden im Bereich der Proform bei 32 kD sichtbar sind. Daraus lässt sich schließen, dass auch in der Immunhistochemie die Proform mit angefärbt werden kann und somit eine Braunfärbung einer Zelle nicht mit dem Vorhandensein von ausschließlich aktivierter Caspase-3 und damit mit Apoptose gleichzusetzen ist. Mit der unterschiedlichen Intensität der Detektion von Banden bei 32 kD könnte sich auch das unterschiedliche Färbemuster in der Immunhistochemie erklären lassen. Antikörper welche, die Proform im Western-Blot intensiv detektierten, zeigen in der Immunhistochemie ein unspezifischeres Färbemuster. Hier ist schon im Nativtier und im schwach geschädigten linken Hippokampus die Mehrheit der Zellen braun (unspezifische Anfärbung der Proform Caspase-3) gefärbt.

In der Western-Blot-Analyse des Antikörpers Lot 4 von Cell Signaling ist die Bande bei 32 kD kaum sichtbar. Dieses Ergebnis entspricht dem in der Immunhistochemie, auch hier tritt keine unspezifische Braunfärbung (eventuell Anfärbung der Proform) von Zellen im Nativtier auf. Im geschädigten Tier sind nur im Neuronenband des rechten Hippokampus braune Zellen erkennbar. Dieser Antikörper erscheint als einziger geeignet, unter den gegebenen Versuchsbedingungen spezifisch nur aktivierte Caspase-3 darzustellen und damit einen validen Nachweis für die immunhistochemische Detektion für Apoptose zu liefern.

4.1.3 Detektion des Proenzym Procaspase-3 CPP32

Um sicher zu gehen, dass in diesem Tiermodell durch die ischämische Schädigung überhaupt Apoptose induziert wird, wird als Voraussetzung für die Entstehung von aktivierter Caspase-3 17-20 kD das Vorhandensein der Proform Caspase-3 untersucht.

Hierzu wird ein polyklonaler Antikörper eingesetzt, der die Proform Caspase-3 (32 kD) und das p20 (20 kD) Fragment aktivierter Caspase-3 erkennt. In der Immunhistochemie stellen sich im Thymusgewebe positive Zellen dar. Das Nativtier enthält besonders im Gyrus dentatus gefärbte Zellen, die das Vorhandensein der Proform Caspase-3 anzeigen. Im geschädigten Tier zeigt sich besonders im rechten Hippokampus eine z.T. intensive zytoplasmatische und nukleäre Anfärbung von Zellen, die auf das Vorhandensein der Proform Caspase-3 und aktivierter Caspase-3

schließen lassen. Im Bereich der ischämischen Schädigung erfolgt eine verstärkte Expressierung von Caspase-3 m-RNA mit anschließender Proteinbiosynthese der Proform Caspase-3 (CHEN et al. 1998; URASE et al. 1998; KRUPINSKI et al. 2000). Hierdurch erklärt sich die stärkere Anfärbbarkeit des geschädigten Gewebes gegenüber den nativen nicht geschädigten Gehirnschnitten. Eine Unterscheidung zwischen Neuronen und eingewanderten Gliazellen ist in dieser Studie nicht möglich. Durch eine zusätzliche Anfärbung der Neuronen z.B. mit einem Antikörper gegen NeuN (Strukturprotein in Neuronen) oder der Gliazellen z.B. mit einem Antikörper gegen GFAP (fibrilläres Strukturprotein in Gliazellen) könnte zwischen Caspase-3 positiven Neuronen und Gliazellen differenziert werden (BEER et al. 2000).

In der Western-Blot-Analyse detektiert der Antikörper die Proform Caspase-3 in den aufgetragenen Proben (Bande bei 32 kD) der Tiere der Kontrollgruppe. Es ist jedoch kein Unterschied in der Intensität zwischen den Proben des rechten (stärker geschädigten) und linken Hippokampus erkennbar. In den aufgetragenen Caspase-3 Proteinfractionen (0,2 µg, 0,1 µg und 0,01 µg) werden nur Banden im Bereich von 17-20 kD detektiert. Das Fehlen der Bande bei 32 kD kann möglicherweise mit der geringen Menge von enthaltener Proform Caspase-3 bei den aufgetragenen Konzentrationen von 0,2 µg, 0,1 µg und 0,05 µg begründet werden.

4.1.4 Detektion des p85 Fragment von PARP

Als weiterer Nachweis für Apoptose erfolgt die Detektion des p85 Fragments von PARP, das bei der Spaltung durch aktivierte Caspase-3 entsteht. In der Immunhistochemie kann das p85 Fragment sowohl in der Positivkontrolle als auch im rechten Hippokampus der geschädigten Tiere nachgewiesen werden. Im Nativtier und im linken Hippokampus ist dagegen keine spezifische Anfärbung zu erkennen. Aufgrund dieser schlüssigen Qualitätskontrollen ist davon auszugehen, dass der Antikörper spezifisch das p85 Fragment darstellt. Dies lässt sich auch durch die Ergebnisse der Western-Blot-Analyse bestätigen.

In den aufgetragenen Proben des Hippokampus eines Tieres der Kontrollgruppe sind deutliche Unterschiede zwischen rechtem und linkem Hippokampus erkennbar. In der Probe des rechten Hippokampus ist im Gegensatz zur linken Seite eine deutliche Bande im Bereich vom 85 kD dargestellt, welche das durch aktivierte Caspase-3 gespaltene p85 Fragment von PARP anzeigt (DURIEZ und SHAH 1997).

Da in beiden Nachweisverfahren das p85 Fragment von PARP im Hippokampus eindeutig detektiert wird, kann davon ausgegangen werden, dass durch den ischämischen Insult Apoptose induziert wird.

4.2 Diskussion der Methoden

4.2.1 Das Tiermodell

Es ist unumgänglich bei Untersuchungen zur zerebralen Ischämie mit reproduzierbaren und kontrollierten in vivo Tiermodellen zu arbeiten, da Ausprägung und Ursachen eines menschlichen ischämischen Infarkts vielfältig und somit für vergleichende Studien ungeeignet sind. Der direkte Zugang zum Hirngewebe ist hier meist nicht gegeben, eine vollständige histopathologische, biochemische und physiologische Untersuchung ist deshalb nicht möglich. Das Tiermodell hat weiter den Vorteil, dass der zeitliche Verlauf steuerbar ist und eine Überwachung und Kontrolle verschiedener Parameter vor, während und nach dem experimentellen Eingriff möglich ist.

In den heute verbreiteten Ischämie modellen werden überwiegend Nagetiere eingesetzt. Die Verwendung von Ratten und Mäusen im Tiermodell hat große Vorteile gegenüber anderen Tierarten. Die Kosten für Unterbringung, Zucht, Menge der zu applizierenden Medikamente und Lagerung der Proben sind aufgrund der Größe der Tiere relativ gering. Die Vergleichbarkeit der Anatomie und Physiologie zu höheren Tieren ist gegeben, zusätzlich ist die Homogenität der Nagetiere durch Inzuchtlinien sehr hoch.

Es stehen mehrere gut etablierte Rattenmodelle zur Induktion einer zerebralen Ischämie zur Verfügung, die Schäden mit unterschiedlicher Lokalisation und Ausmaß im Gehirn hervorrufen (GINSBERG und BUSTO 1989). Je nach Fragestellung einer Studie wird das passende Ischämie modell ausgewählt.

In der vorliegenden Studie wird eine inkomplette rechtsseitige Hemisphärenischämie mit Reperfusion im Gehirn induziert. Hierzu wird der mittlere arterielle Blutdruck durch Blutentzug auf 40 mmHg gesenkt und zusätzlich die rechte A. carotis communis für 45 min verschlossen. Dieses Ischämie modell verursacht einen ausgeprägten Zellschaden in den selektiv vulnerablen Neuronen, besonders der rechten Hippokampusformation.

Es gilt als gesichert, dass neben der überwiegend nekrotischen Schädigung auch ein Teil der Zellen an Apoptose zugrunde geht (CHALMERS-REDMAN et al. 1997). LI et al. (1998) beschreiben 48 Stunden nach fokaler zerebraler Ischämie bei der Ratte im Infarktgebiet den Prozentsatz an irreversibel geschädigten Zellen mit 55,2 %, davon werden 49,9 % als nekrotisch und 5,4 % als apoptotisch eingestuft. In Untersuchungen von CHOPP und LI (1996) beträgt die Anzahl an apoptotischen Zellen 48 Stunden nach fokaler zerebraler Ischämie 4 %, die Mehrheit der apoptotischen Zellen ist in der inneren Zone des ischämischen Läsion lokalisiert.

4.2.2 Immunhistochemische Detektion von Antigenen

Immunhistochemische Färbemethoden sind seit Jahren etablierte Nachweisverfahren für die Darstellung von Antigenen im Gewebematerial (STERNBERGER 1970; DELELLIS 1979).

Besonders die enzymmarkierte Streptavidin-Biotin-Technik, die auf der starken Affinität von Streptavidin für Biotin beruht, ist ein häufig angewandtes Verfahren und eignet sich zum Nachweis der meisten Antigene in einer Vielzahl unterschiedlicher Proben (BOENISCH 2000). Diese starke Anziehungskraft, sowie der chemisch milde Biotinylierungsprozess verschaffen der Streptavidin-Biotin-Technik eine höhere Sensitivität im Vergleich zu den direkten und indirekten Färbemethoden (NOLL und SCHAUB-KUHNEN 2000). Zusätzlich besitzt diese Methode eine überlegene Empfindlichkeit gegenüber dem PAP-Verfahren (HSU et al. 1981) und gilt somit in der Immunhistochemie als das sensitivste Nachweisverfahren von Gewebsantigenen.

4.2.3 Bestimmung von Proteinen durch die Western-Blot-Analyse

Zur Bestätigung der unterschiedlichen Färbemuster der Antikörper wird die Western-Blot-Analyse gewählt, die als anerkanntes und bewährtes Verfahren vor allem zur qualitativen Untersuchung und Identifizierung von Proteinen gilt (WESTERMEIER 1997). Gegenüber Methoden, die m-RNA nachweisen, wie z.B. Northern-Blot und In-situ-Hybridisierung wird durch den Western-Blot das agierende Substrat, das Protein selbst nachgewiesen. Der Nachweis von m-RNA ist zwar die sensitivere Methode, mit ihr kann allerdings nicht bestätigt werden, ob das Genprodukt (das Protein) auch tatsächlich synthetisiert wird.

Möglicherweise war die Gesamtproteinmenge der aufgetragenen Proben mit 30µg pro Tasche zu gering, um aktivierte Caspase-3 nachweisen zu können. Da nur etwa 5 % der Zellen nach einer Ischämie apoptotisch zugrunde gehen (CHOPP und LI 1996), ist es vorstellbar, dass bei der Untersuchung einer größeren Gesamtproteinmenge aktivierte Caspase-3 durchaus darstellbar gewesen wäre. Eine Konzentration der Proben war jedoch nicht möglich, da diese bei Versuchsbeginn bereits vorverdünnt waren.

4.3 Abschließende Betrachtung und Ausblick

In dieser Studie wurde gezeigt, dass die Sensitivität und Spezifität von polyklonalen Antikörpern gegen aktivierte Caspase-3 (17-20 kD) verschiedener Hersteller deutlich variiert. Da die Antikörper am selben Gewebe (Thymus, Gehirn des Nativtieres und des geschädigten Tieres) in einem Färbedurchgang direkt miteinander verglichen wurden, sind Einflüsse durch unterschiedliche Rahmenbedingungen (Temperatur, Lösungen, usw.) weitestgehend auszuschließen. Die Qualität der polyklonalen Antikörper schwankt nicht nur zwischen den verschiedenen Herstellern, sondern sie ist auch von Charge zu Charge unterschiedlich (siehe Cell Signaling). Dies lässt sich durch die Produktion im lebenden Tier erklären. Jeder Organismus reagiert auf die Antigenstimulation unterschiedlich, das Ergebnis sind polyklonale Antikörperseren, die trotz der chromatographischen Reinigung nicht identisch sein können.

Nach der erfolgreichen Etablierung einer Färbemethode und bei vorhersehbarem größerem Antikörperbedarf ist deshalb eine Reservierung der gewünschten Charge beim Hersteller zu empfehlen. Es ist unbedingt darauf zu achten, während einer Untersuchung nur polyklonale Antikörper einer Charge zu verwenden. Bei einem Chargenwechsel ist damit zu rechnen, dass die neue Antikörpercharge im Vergleich zur alten ein anderes Färbemuster liefert, somit sind vergleichende Aussagen innerhalb der Studie über Quantität und Qualität des in der Probe enthaltenen Antigens nur sehr begrenzt möglich.

In Folgeuntersuchungen sollen mit Hilfe dieser validen immunhistologischen Nachweismethode für Apoptose die möglichen neuroprotektiven Effekte bestimmter therapeutischer Maßnahmen nach inkompletter zerebraler Ischämie mit Reperfusion untersucht werden.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Methodische Evaluierung der immunhistochemischen Detektion aktivierter Caspase-3 im Hippokampus als Apoptoseparameter nach inkompletter zerebraler Ischämie

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, ein immunhistochemisches Nachweisverfahren für Apoptose nach inkompletter zerebraler Ischämie mit Reperfusion bei der Ratte zu etablieren. Die Detektion aktivierter Caspase-3, ein Schlüsselenzym des Apoptosezyklus, gilt als Nachweis für das Vorhandensein von apoptotischem Zelltod.

Im hier verwendeten Tiermodell wurde durch 45minütige Okklusion der rechten A. carotis communis mit gleichzeitiger arterieller hemorrhagischer Hypotension (Senkung des mittleren arteriellen Blutdrucks auf 40 mmHg) und anschließender Reperfusion eine inkomplette Hemisphärenischämie induziert.

Es wurden sieben polyklonale Antikörper gegen aktivierte Caspase-3 (17-20 kD) von vier verschiedenen Herstellern vergleichend auf ihre Detektionsfähigkeit in der Immunhistochemie und in der Western-Blot-Analyse untersucht.

In der Immunhistochemie lieferte jeder Antikörper ein unterschiedliches Färbemuster. Als Spezifitätskontrolle diente ein gesundes Rattenhirn (ohne Induktion einer zerebralen Ischämie), in welchem keine Zellen mit Hinweis auf aktivierte Caspase-3 zu erwarten waren. Dennoch zeigten sich in dieser Spezifitätskontrolle Zellen positiv angefärbt. Ihre Anzahl und Intensität variierten nicht nur bei polyklonalen Antikörpern unterschiedlicher Hersteller, sondern wurden auch innerhalb verschiedener Chargen deutlich. In der Positivkontrolle (Thymusgewebe juveniler Ratten) detektierten alle untersuchten Antikörper aktivierte Caspase-3 positive Zellen. Die Negativkontrolle (ohne Primärantikörper) war stets negativ. Dieses Ergebnis bestätigte sich auch in der Western-Blot-Analyse, es traten deutliche Unterschiede in der Qualität und Quantität der detektierten Banden im Bereich der aufgetragenen Caspase-3 Proteinfraction auf.

Unter den gegebenen Untersuchungsbedingungen zeigte sich nur einer der untersuchten polyklonalen Antikörper gegen aktivierte Caspase-3 als geeignet, einen aussagekräftigen und validen Nachweis für Apoptose zu erbringen. Aufgrund der hier festgestellten unterschiedlichen Sensitivität der polyklonalen Antikörper gegen aktivierte Caspase-3 ist eine sorgfältige Etablierung des gewünschten Antikörpers vor jedem immunhistochemischen Nachweisverfahren unumgänglich.

6 SUMMARY

Methodical evaluation of the immunohistochemical detection of activated caspase-3 in the hippocampus as a parameter of apoptosis after incomplete cerebral ischemia in the rat

This study investigates the immunohistochemical detection of activated caspase-3 as a parameter of apoptosis after incomplete cerebral ischemia with reperfusion in the rat.

The detection of activated caspase-3, a key enzyme in the apoptosis cycle, is considered to be a proof of existence of apoptotic cell death.

Incomplete cerebral ischemia was induced by a 45 minute occlusion of the right common carotid artery in combination with hemorrhagic hypotension (decrease of mean arterial blood pressure to 40 mmHg) and subsequent reperfusion. We tested 7 polyclonal antibodies against activated caspase-3 (17- 20 kD) of 4 different manufacturers and different lot numbers comparing their ability to detect acitvated caspase-3 immunohistochemically and by Western-Blot analysis.

In immunohistochemistry every antibody showed a different staining pattern. As a specificity control we used a healthy rat brain (without induction of cerebral ischemia) in which no activated caspase-3 positive cells were being suspected. However, in this specificity control, cells were stained positive. Likewise, the tested polyclonal antibodies of different manufacturers varied in quantity and intensity and also showed modulations within different lot numbers. In the positive control (thymoid tissue from juvenile rats) all tested antibodies detected caspase-3 positive cells. The negative control (without primary antibody) has always been negative.

This result was confirmed in the Western blot analysis which also displayed differences in quality and quantity of detected bands in the area of the caspase-3 protein fraction.

Under the given conditions only one of the tested polyclonal antibodies against activated caspase-3 proved to be able to detect activated caspase-3 solely and reliably as a valid evidence for apoptosis.

Based on the differing sensitivity of polyclonal antibodies against activated caspase-3, careful evaluation of the desired antibody is inevitable before any immunohistochemical procedure.

7 LITERATURVERZEICHNIS

AMARAL DG, WITTER MP

Hippocampal Formation *In:*

The rat nervous system, Paxinos G (Hrsg.), 2. Edition, Academic Press, San Diego, CA, USA, 1995, 443-493

AVRRAMEAS S

Enzym markers: their linkage with proteins and use in immuno-histochemistry

Histochem J 4, 1972, 321-330

BEER R, FRANZ G, SRINIVASAN A, SCHMUTZHARD E, POEWE W, KAMPFL A

Temporal profile and cell subtype distribution of activated caspase-3 following experimental traumatic brain injury

J Neurochem 2000; 75: 1264-73

BENNETT B, CHECK EJ, OLSEN M, HUNTER RL

A comparison of commercially available adjuvants for use in research

J Immunol Meth 1992; 153: 31-40

BOENISCH T

Handbuch II der Immunhistochemischen Färbemethoden

4. Auflage, DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg, 2000, 9-33

BOURNE JA

Handbuch I der Immunhistochemischen Färbemethoden

4. Auflage, DAKO Diagnostika GmbH, Hamburg, 2000, 7-13

BRADFORD MM

A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding

Analyt Biochem 1976; 72: 248-54

BREDESEN DE

Apoptosis: overview and signal transduction in pathways

J Neurotrauma 2000; 17: 801-810

BUDIHHARDJO I, OLIVER H, LUTTER M, LUO X

Biochemical pathway of caspase activation during apoptosis

Annu Rev Cell Dev Biol 1999; 15: 269-90

CAO G, PEI W, LAN J, STETLER RA, LOU Y, NAGAYAMA T, GRAHAM SH, YIN XM, SIMON RP, CHEN J

Caspase-activated DNase/DNA fragmentation factor 40 mediates apoptotic DNA fragmentation in transient cerebral ischemia and in neuronal cultures

J Neurosci 2001; 21: 4678-90

LITERATURVERZEICHNIS

CHALMERS-REDMAN RME, FRASER AD, JU WY, WADIA J, TATTON NA
Mechanism of nerve cell death: Apoptosis or necrosis after cerebral ischemia *In:*
Neuroprotektive agents and cerebral ischemia, Green AR u. Cross AJ, Academic Press, San
Diego, 1997, 1-15

CHEN J, NAGAYAMA T, JIN K, STETLER A
Induction of caspase-3-like protease may mediate delayed neuronal death in the Hippocampus
after transient cerebral ischemia
J Neuroscience 1998; 18: 4914-4928

CHOPP M, LI Y
Apoptosis in focal cerebral Ichemia
Acta Neurochir (Suppl) 66, 1996, 21-66

COHEN JJ
Overview: mechanism of apoptosis
Immunol Today 1993; 14: 126-130

COMPTON BJ, LEWIS M, WHIGHAM F, GERALD JS, COUNTRYMAN GE
Analytical potential of Protein A for affinity chromatography of polyclonal and monoclonal
antibodies
Anal Chem 1989; 61: 1314-1317

COONS AH, CREECH HJ, JONES N
Immunological properties of an antibody containing a fluorescens group
Proc. Soc. Exp. Biol. 47, 1947, 200-202

COONS AH, KAPLAN MH
Localisation of antigens in tissue cells
J. Exp. Med. 91, 1950, 1-13

DELELLIS RA, STERNBERGER LA, MANN RB, BANKS P, NAKANE PK
Immunoperoxidase Technique in diagnostic Pathology
Am. J. Clin. Pathol. 71, 1979, 483-488

DIRNAGL U, MEISEL A
Zerebrale Ischämie *In:*
Handbuch der molekularen Medizin Band 5, Ganten A (Hrsg.), Springer Verlag, Berlin 1999,
510-533

DRUMMOND JC, SHAPIRO HM
Cerebral Physiology *In:*
Anesthesia, Miller RD (Hrsg.), 4.Edition, Churchill Livingstone, New York, 689-729

DURIEZ PJ, SHAH GM
Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: a sensitive parameter to study cell death
Biochem Cell Biol 1997; 75: 337-349

LITERATURVERZEICHNIS

EDELMAN GM

Structure und Function of antibodies

Sci Amer 223, 1970, 34-42

ELDADAH BA, FADEN AI

Caspase pathways, neuronal apoptosis and CNS injury

J Neurotrauma 2000; 10: 811-829

FABER JL, CHIEN KR, MITTNACHT S

The pathogenesis of irreversible cell injury in ischemia

AJP 1981; 102: 271-81

FITCH W

Brain metabolism *In:*

Anaesthesia and Neurosurgery, Cottrell JE und Smith DS (Hrsg.), 3. Edition, Mosby, St. Louis, 1994, 1-16

GINSBERG MD, BUSTO R

Rodents models of cerebral ischemia

Stroke 1989; 20: 1627-42

GRAHAM DI, LANTOS PL

Greenfield's Neuropathology

6.Edition, Arnold, London, 1997, 86-90

HALE AJ, SMITH CA, SUTHERLAND LC, SIONEMAN VEA, LONGTHORNE VL,
CULHANE AC, WILLIAMS GT

Apoptosis: molecular regulation of cell death

Eur J Pharmacol 1996; 1-26

HEYDERMAN E

Immunoperoxidase technique in histopathology applications, methods and controls

J. Clin. Path. 32, 1979, 971-978

HOFFMAN WE, BRAUCHER E, PELLIGRINO DA, THOMAS C, ALBRECHT RF,
MILETICH DJ

Brain lactate and neurologic outcome following incomplete ischemia in fasted, nonfasted, and glucose-loaded rats

Anesthesiology 1990; 72: 1045-50

HOSSMANN KA

Disturbances of cerebral protein synthesis and ischemic cell death

Progr Brain Res 1993; 76: 161-177

HSU S, RAINE L, FANGER H

Use of Avidin-Biotin-Peroxidase Complex in Peroxidase Techniques

J. Histochem. Cytochem. 29, 1981, 577-581

LITERATURVERZEICHNIS

JOHNSON EM, GREENLUND LJ, AKINS PT, HSU CY

Neuronal apoptosis: current understanding of molecular mechanisms and potential role in ischemic brain injury

J neurotrauma 1995; 5: 843-852

KAUFMANN SH, OTTAVIANO Y, DAVIDSON NE, POIRIER GG, DESNOYERS S

Specific proteolytic cleavage of PARP an early marker of chemotherapy-induced apoptosis

Cancer Res 1993; 53: 3976-3985

KELIN D, HARTREE EF

Purification of horse-radish-peroxidase and comparison of its properties with those of catalase and methaemoglobin

Biochem J 49, 1951, 88-104

KERR JFR, WYLLIE AH, CURRIE AR

Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics

Br J Cancer 1972; 43: 239-57

KRISTIAN T, SIESJÖ BK

Calcium in ischemic cell death

Stroke 1998; 29: 705-718

KRUPINSKI J, LOPEZ E, MARTI E, FERRER I

Expression of caspase-3 and their substrates in the rat model of focal cerebral ischemia

Neurobiol Dis 2000; 7: 332-42

LAEMMLI UK

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4

Nature 15, 1970, 680-685

LEIST M, NICOTERA P

Apoptosis, excitotoxicity, and neuropathology

Exp Cell Res 1998; 239: 183-201

LI Y, POWERS C, JIANG N, CHOPP M

Intact, injured, necrotic and apoptotic cells after cerebral ischemia in the rat

J of Neurol Sci, 156, 1998, 119-132

LIEBMANN M

Blutversorgung des Gehirns

Basiswissen Neuroanatomie, Thieme Verlag, Stuttgart, 1993, 113-117

LOS M, WESSELBORG S, SCHULZE-OSTHOFF K

The role of caspases in development, immunity and apoptotic signal. Transduction: Lessons from knockout mice

Immunity 1999; 10: 629-639

LITERATURVERZEICHNIS

LÖFFLER G, PERTRDES P

Biochemie und Pathobiochemie

6.Auflage, Springer Verlag, Berlin, 1998, 1058-85

NAKANE PK, PIERCE GB

Enzyme-labeled Antibodies: preparation and application for localisation of antigens

J Histochem Cytochem. 1966; 14: 929-931

NAKANE PK, PIERCE GB

Enzym-labeled antibody for the light and electron microscopic localisation of tissue antigens

J Cell Biol 1967; 14: 307-318

NAKASHIMA K, TODD MM, WARNER DS

The relation between cerebral metabolic rate and ischemic depolarisation

Anaesthesiology 1995; 82: 1199-208

NEWBERG MILDE L, WEGLINSKI MR

Pathophysiology of metabolic brain injury *In:*

Anesthesia and Neurosurgery, 3. Edition, Cottrell JE und Smith DS (Hrsg.), Mosby, St. Louis, 1994, 59-84

NICKEL R, SCHUMMER A, SEIFERLE E

Lehrbuch der Anatomie der Haustiere: Band 4, Nervensystem, Sinnesorgane, Endokrine Drüsen

3. Edition, Paul Parey Verlag, Berlin, 1991, 74-199

NITATORI T, SARO N, WAGURI S, KARASAWA Y, SHIBANAI K, KOMINAMI E, UCHIYAMA Y

Delayed neuronal death in the CA1 pyramidal cell layer of the gerbil Hippokampus following transient bilateral ischemia is apoptosis

J Neurosci 1995; 15: 1001-1011

NIWA M, HARA A, IWAI T, WANG S, HOTTA K, MORI H, UEMATSU T

Caspase activation as an apoptotic evidence in the gerbil hippocampal CA1 pyramidal cells following transient forebrain ischemia

Neurosci Lett 2001; 300: 103-106

NOLL S, SCHAUB-KUHNEN S

Praxis der Immunhistochemie

Höfler H und Müller KM (Hrsg.), Urban & Fischer Verlag, München, 2000

OSBORN M, FRANKE WW, WEBER K

Visualization of a system of filaments 7-10 nm thick in cultured cells of an epitheloid line by immunofluorescence microscopy

Proc Natl Acad Sci USA 1977; 74: 2490-2494

PASTERNAK G

Monoklonale Antikörpertechnik *In:*

Handbuch der molekularen Medizin Band 1, Ganten A (Hrsg.), Springer-Verlag, Berlin, 1997; 145-173

PAXINOS G, WATON C

The brain in stereotaxis coordinates

4. Edition, Academic Press, San Diego, CA, USA, 1998, 128-144

PEPE FA

The use of specific antibody in electron microscopy II

J Biophys Biochem. Cytol. 11, 1961, 515-520

PETTMANN B, HENDERSON CE

Neuronal cell death

Neuron 1998; 20: 633-647

PORANKIEWICZ-ASPLUND J, NILSSON B, HÖGLUND AS, JOSEFSSON LG

Removal of cross-reactive anti-carrier (keyhole limpet haemocyanin, KLH) antibodies from rabbit serum using immobilized KLH

Life Science News 5, Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, USA, 2000

PUKA-SUNDEVALL M, WALLIN C, GILLAND E, HALLIN U, WANG X, SANDBERG M

Impairment of mitochondrial respiration after cerebral hypoxia-ischemia in immature rats: relationship to activation of caspase-3 and neuronal injury

Dev Brain Res 2000; 125: 43-50

PULSINELLI WA, BRIERLEY JB

The temporal profile of ischemic neuronal damage in the four-vessel occlusion rat model

Stroke 1979; 492

PULSINELLI WA, BRIERLEY JB, PLUM F

Temporal profile of neuronal damage in a model of transient forebrain ischemia

Ann Neurol 1982; 11: 491-8

RAGHUPATHI R, GRAHAM DI, MCINTOSH TK

Apoptosis after traumatic brain injury

J Neurotrauma 2000; 17: 927-938

RIFKIND RA, HSU KC, MORGAN C

Immunochemical staining for electron microscopy

J Histochem Cytochem 1964; 12: 131-136

SIESJÖ BK

Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia; Part I: Pathophysiology

J Neurosurg 1992a; 77: 169-84

LITERATURVERZEICHNIS

SIESJÖ BK

Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia; Part II: mechanisms of damage and treatment

J Neurosurg 1992b; 77: 337-54

SINGER SJ

Preparation of an electron-dense antibody conjugate

Nature 1959; 183: 1523-1524

SISKIND GW, DUNN P, WALKER JG

Studies on the control of antibody synthesis II. Effect of antigen dose and of suppression by passive antibody on the affinity of antibody synthesized

J experimental med 1968; 127: 31-40

SRINIVASAN A, ROTH KA, SAYERS RO, SHINDLER KS, WONG AM, FRITZ LC, TOMASELLI KJ

In situ immunodetection of activated caspase-3 in apoptotic neurons in the developing nervous system

Cell Death Diff 1998; 5: 1004-1016

STERNBERGER LA, HARDY PH, CUCULIS JJ, MEYER HG

The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry

J Histochem Cytochem 1970; 18: 315-333

STOLL G, JANDER S, SCHROETER M

Inflammation and glial responses in ischemic brain lesions

Progr Neurobiol 1998; 56: 149-171

STRYER L

Biochemie

4. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 1996, 381-404

SUN EW, SHI YF

Apoptosis: the quiet death silences the immune system

Pharm Therap 2001; 92: 135-145

TAYLER CR

Immunoperoxidase techniques

Arch Pathol Lab Med. 102, 1978, 113-121

UCKER DS, HEBSHI LD, BLOMQUIST JF, TORBETT BE

Physiological T-cell death: susceptibility is modulated by activation, aging, and transformation, but the mechanism is constant

Immun Rev 1994; 142: 273-299

LITERATURVERZEICHNIS

UNDERWOOD, BEAN

The Influence of methods of production, purification and storage of monoclonal antibody upon their observed specificities

J Immunol Meth 1985; 80: 187-197

URASE K, FUJITA E, MIHO Y, KOUROKU Y, MUKASA T, YAGI Y, MOMOI M, MOMOI
Detection of activated Caspase-3 (CPP32) in the vertebrate nervous system during development by cleavage site-directed antiserum

Dev Brain Res 1998; 111: 77-87

URBAN L, BESSENYEI B, MARKA M, SEMSEI I

On the role of aging in the etiology of autoimmunity

Gerontology 2002; 48: 179-184

VOET D, VOET JG

Biochemie

VCH Weinheim, 1996

WARD RA, ADAMS J, FAUSTMANN D, GEBHART G, GEISTFELD JG

Monoclonal antibody production: a report of the Committee on methods of producing monoclonal antibodies

National Academy Press, Washington DC, 1998

WERNER C

Neuroprotektion *In:*

Neuroanaesthesie, Jantzen J-P, Löffler W (Hrsg.), Thieme Verlag, Stuttgart, 2000, 121-142

WESTERMEIER R

Electrophoresis in practise; a guide to methods and applications of DNA and protein separations

2.Edition, VHC, Weinheim, 1997, 175ff

WHITE BC, SULLIVAN JM, DEGARCIA DJ, O'NEIL BJ, NEUMAR RW

Brain ischemia and reperfusion: Molecular mechanism of neuronal injury

J Neurolog Sci 2000; 279: 1-33

WITTING C

Immunofluorescence Studies on formalin-fixed and paraffin-embedded material

Beitr Path 101, 1977, 288-291

WYLLIE AH, KERR JFK, CURRIE AR

Cell death: the significance of apoptosis

Int Rev Cytol 1972; 68: 251-306

8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
A.	Arteria
BE	Basenabweichung (engl.: base excess)
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
Ca ²⁺	Kalzium
CAD	Caspase aktivierte Desoxyribonuklease
Cl ⁻	Chlorid
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
CPP32	Proform Caspase-3
DAB	Diaminobenzidin
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: desoxyribonucleinacid)
EEG	Elektroenzephalogramm
EKG	Elektrokardiogramm
FKS	Fetales Kälberserum
g	Gramm
GD	Gyrus dentatus
H & E	Hämatoxylin & Eosin (-Färbung)
h	Stunde/n
HEPES	N-(2-hydroxyethyl)piperazine-N'-2-ethansulfonsäure
HRP	horseradish peroxidase
i.v.	intravenös
i.p.	intraperitoneal

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

K ⁺	Kalium
kD	Kilodalton
kg	Kilogramm
KLH	Napfschnecken Hämocytein, engl.: keyhole limpet haemocyanin
l	Liter
li	links
LSAB	peroxidase-konjugierte (engl.: labeled) Streptavidin-Biotin Methode
MAP	Mittlerer arterieller Blutdruck (engl.: pressure)
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimol
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
m-RNA	messenger-Ribonukleinsäure (engl.: acid)
N.	Nervus
N ₂ O	Lachgas
Na ⁺	Natrium
O ₂	Sauerstoff
PaCO ₂	arterieller Kohlendioxidpartialdruck
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PaO ₂	arterieller Sauerstoffpartialdruck
PARP	Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase
PBS	gepuffertes Natriumphosphat (engl.: phosphored buffered sodium)
PBST	gepuffertes Natrium Phosphat mit Tween (engl.: phosphored buffered sodium and tween)
pH	arterieller pH-Wert
PVDF	Polyvinylidin-Fluorid
re	rechts
RM	Rainbow-Marker
s.o.	siehe oben
sog.	sogenannte
s.u.	siehe unten

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

SD	Standardabweichung (engl.: standard deviation)
SDS	Natriumaurylsulfat (engl.: sodium dodecyl sulfate)
sec	Sekunde/n
Tab.	Tabelle
TNF	Tumornekrosefaktor
u.a.	unter anderem
u.	und
V.	Vena
Vol. %	Volumen Prozent
z.B.	zum Beispiel
Zn ²⁺	Zink

9 DANKSAGUNG

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. vet. W. Schmahl danke ich für die Übernahme der Arbeit an die Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München.

Ebenso bedanke ich mich bei Herrn Univ.-Prof. Dr. med. E. Kochs, Direktor, und Herrn Univ.-Prof. Dr. med. C. Werner, leitender Oberarzt der Klinik für Anaesthesiologie der TU München, für die Überlassung des Themas und des Arbeitsplatzes und für die jederzeit gewährte fachliche Unterstützung.

Zudem bedanke ich mich besonders bei Herrn Prof. Dr. med. vet. Dr. med. habil. W. Erhardt für die kritische Durchsicht des Manuskripts und die jederzeit freundliche Beratung.

Mein großer Dank gilt zugleich allen Mitgliedern der Forschungsgruppe „Zerebrale Ischämie und Neuroprotektion“ der Klinik für Anaesthesiologie der TU München, besonders Frau Dr. med. Monika Pape, Frau Dr. med. Kristin Engelhard und Frau Dr. med. vet. Eva Eberspächer für ihre entscheidende praktische und theoretische Hilfe.

Frau Priv.-Doz. Dr. I. Becker vom Institut für allgemeine Pathologie und pathologische Anatomie des Klinikums Rechts der Isar der TU München danke ich für die Hilfe bei der Beurteilung und Auswertung der immunhistochemischen Schnitte.

Von ganzem Herzen bedanke ich mich bei allen Freunden und Bekannten, die durch ihren Beistand und ihre Unterstützung zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Ich möchte mich ganz besonders herzlich bei meiner Familie bedanken, die mir die Anfertigung dieser Arbeit ermöglicht hat.