

Aus der Neurologischen Klinik und Poliklinik der  
Ludwigs-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. med. Thomas Brandt (FRCP)

**Zelluläre Verteilung und Einfluss von rtPA und Hypothermie auf die Calpainaktivität  
bei zerebraler Ischämie/Reperfusion**

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

vorgelegt von  
Matthias Pichler

aus

Rotthalmünster

2006

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

Berichterstatter: Prof. Dr. med. G.F.Hamann  
2. Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. M. Bilzer

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. B. Engelmann  
Prof. Dr. med. B. F. Becker

Mitbetreuung durch den  
Promovierten Mitarbeiter: xxxxxxxxxxxxxxxxxxxx

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 09.03.2006

<b>I. EINLEITUNG</b> .....	6
1. Schlaganfall.....	6
1.1 Epidemiologie und klinische Relevanz .....	6
1.2 Definition der zerebralen Ischämie.....	6
1.3 Pathophysiologie der fokalen zerebralen Ischämie .....	8
2. Spezielle Pathophysiologie – Rolle der Calpaine .....	11
2.1 Einführung und Nomenklatur.....	11
2.2 Strukturelle Charakteristika von $\mu$ - und m-Calpain .....	11
2.3 Enzymregulation.....	13
2.4 Substrate von Calpainen.....	15
2.5 Physiologische Funktionen .....	15
2.6 Pathophysiologische Bedeutung im ZNS allgemein .....	15
2.7 Pathophysiologische Bedeutung bei zerebraler Ischämie .....	16
3. Therapie-Ansätze beim Schlaganfall .....	17
3.1 Thrombolyse mit rtPA .....	17
3.2 Neuroprotektion durch Hypothermie.....	18
4. Zusammenfassung und Fragestellung .....	20
<b>II. MATERIAL UND METHODEN</b> .....	21
1. Tiermodell .....	21
2. rtPA-Behandlung.....	23
2.1 Pharmakologie .....	23
2.2 Applikation.....	24
3. Hypothermie-Behandlung .....	24
4. rtPA-Hypothermie-Behandlung .....	25
5. Tierexperimentelle Versuchsgruppen .....	25
6. Verarbeitung des Gewebes .....	26
6.1 Kryoschnitte .....	26
6.2 Immunhistochemie .....	26
7. Videoimaging .....	31
8. Infarktmetrie .....	33
9. Proteinisolierung und Western Blot .....	35
10. Immunfluoreszenz.....	36
10.1 Methode .....	36
10.2 Antikörper.....	37
10.3 Färbeprotokoll .....	39
10.4 Auswertung .....	41
11. Statistik .....	43
<b>III. ERGEBNISSE</b> .....	44
1. Calpain-Differenzierung .....	44
1.1 Kortex – absolute Verteilung Calpain positiver Zellen.....	44
1.2 Kortex – relative Verteilung Calpain positiver Zellen.....	46
1.3 Basalganglien – absolute Verteilung Calpain positiver Zellen.....	48
1.4 Basalganglien – relative Verteilung Calpain positiver Zellen.....	50
1.5 Relativer Anteil an der Calpain-Aktivität: Zellarten einzeln.....	52
2. Normotherme Kontrolle versus rtPA 0,9/9/18 mg/kg KG.....	54
3. Normothermie versus Hypothermie .....	57
3.1 Western Blot.....	57

<b>3.2 Immunhistochemie</b> .....	58
<b>3.3 Infarktvolumentrie</b> .....	60
<b>4. Normothermie versus Kombination Hypothermie/rtPA</b> .....	60
<b>IV. DISKUSSION</b> .....	62
<b>1. Calpain-Differenzierung: zelluläres Verteilungsmuster</b> .....	62
<b>2. Calpainaktivität unter rtPA -Gabe</b> .....	65
<b>3. Calpain-Aktivität und Hypothermie</b> .....	67
<b>4. Calpain-Aktivität unter rtPA/Hypothermie</b> .....	71
<b>Zusammenfassung</b> .....	73
<b>VI. LITERATURVERZEICHNIS</b> .....	75
<b>VII. DANKSAGUNG</b> .....	92
<b>VIII. LEBENSLAUF</b> .....	93

## I. EINLEITUNG

### 1. Schlaganfall

#### 1.1 Epidemiologie und klinische Relevanz

Zerebrale Durchblutungsstörungen zählen zu den häufigsten Krankheitsbildern in der Neurologie. Das Spektrum reicht dabei von transitorischen ischämischen Attacken, sog. TIA's, ohne bleibendes neurologisches Defizit, hin zum Vollbild des Hirninfarktes mit irreparablen Gewebsschaden und zum Teil irreversiblen klinisch-neurologischen Defektzuständen.

Der Schlaganfall, sog. Stroke, steht in den Industrienationen hinter kardiovaskulären Krankheiten im engeren Sinne und Tumorerkrankungen an der dritten Stelle der häufigsten Todesursachen.<sup>(1)</sup>

Darüber hinaus stellt er den häufigsten Grund frühzeitiger Invalidität dar und weist die höchste Inzidenz akut lebensbedrohlicher neurologischer Erkrankungen auf.<sup>(66)</sup>

Die jährliche Inzidenz korreliert positiv mit dem Lebensalter und beläuft sich auf 600-800/100.000 in der Altersgruppe der 65- bis 74-Jährigen.<sup>(97)</sup>

2/3 aller zerebralen Durchblutungsstörungen ereignen sich im vorderen Stromgebiet, demgemäß entfallen auf die sog. hintere Strombahn 1/3 der Fälle.<sup>(38)</sup>

In 80-85% aller Fälle handelt es sich um ischämische Schlaganfälle, in 10-12% um intrazerebrale Blutungen, in weiteren 7-8% um Subarachnoidalblutungen.<sup>(38)</sup>

Damit spielt die ischämische Genese die epidemiologisch und klinisch-neurologisch dominierende Rolle beim Schlaganfall.

#### 1.2 Definition der zerebralen Ischämie

Der Begriff „Ischämie“ (griech. „ischein“, hindern, zurückhalten) bedeutet Verminderung oder Unterbrechung der Organdurchblutung durch mangelnde arterielle Blutzufuhr.

Die zerebrale Ischämie ist damit die durch Thrombose, Embolie, Vasospasmus, mechanische Kompression, Entzündung, Abfall des Perfusionsdruckes o. ä. bedingte arterielle Minderperfusion des Gehirns. Unmittelbare Folge ist die Entstehung eines hypoxischen Zustandes im betroffenen Gewebe mit Dysregulation metabolischer Regelkreise aufgrund progredienter Energieverarmung und drohendem Funktionsverlust der Zelle und nachfolgendem Zelltod. Auf Organebene manifestiert sich dies als Infarzierung des betroffenen Gewebes. Der mittlere zerebrale Blutfluss (CBF) bewegt sich physiologischerweise zwischen 50-60ml/100g/min.<sup>(29)</sup> Die Reduzierung auf Werte um 35 ml/100g/min resultiert in einer Dysregulation bestimmter Zellfunktionen, etwa einem subtotalen Ausfall der Proteinbiosynthese.<sup>(29)</sup> Eine drastischere Reduktion des CBF auf +/-20ml/100g/min führt zu generalisierter Verlang-

samung bzw. Ausfall des Hirnströme im EEG, zur Akkumulation exzitatorischer Aminosäuren und beginnendem zytotoxischem Ödem. In diesem Stadium wird von einer prinzipiellen Reversibilität des zellulären Schadens in Abhängigkeit von der Dauer der Ischämie ausgegangen.<sup>(60)</sup>

Bei der zerebralen Ischämie sind zwei konzeptionelle Arten zu unterscheiden: die globale und die fokale Ischämie. Die globale Ischämie ist klinisch in der Regel die Folge eines Herzstillstandes, im Zuge dessen die gesamte arterielle Versorgung des Gehirns unterbleibt, mit Reduzierung des CBF auf 0ml/100mg/min. Symptomatisch geht ein CBF von 0ml//100g/min mit Bewusstlosigkeit nach ca. 10 Sekunden einher, dem Sistieren der elektrischen Hirnaktivität nach ca. 30-40 Sekunden, irreparablen Schäden nach wenigen Minuten, histologisch als Pannekrose des Gehirns erkennbar.<sup>(109)</sup>

Anders verhält sich dies im Falle einer fokalen Ischämie, wie dies etwa beim klassischen Schlaganfall der Fall ist. Im Unterschied zur globalen Ischämie manifestiert sich in der fokalen Ischämie eine durch Kollateralisierung modifizierte Morphologie und Dynamik, da der regionale zerebrale Blutfluss (rCBF) in der Regel nicht völlig sistiert, sondern in unterschiedlichem Ausmaß reduziert ist.

Wichtig für das Grundverständnis der fokalen Ischämie ist, dass im Zentrum des Infarktes, sog. „Core“, der zerebrale Blutfluss unter 10% sinkt, während in der Randzone durch Kollateralisierung ein Blutfluss von 10-20% erhalten bleibt. In dieser „Penumbra“ (lat. Halbschatten) genannten Zone liegt metabolisch (noch) aktives, aber funktionell bereits avitales Gewebe vor.<sup>(87)</sup> Aufgrund dieses Interimsstatus gilt die Penumbra als prinzipiell rettbares Gewebe.

Die experimentelle fokale zerebrale Ischämie ist Gegenstand dieser Arbeit. Dafür existieren mehrere konzeptionelle Gründe:

Der Schlaganfall stellt beim Menschen pathoanatomisch in nahezu hundert Prozent der Fälle eine fokale Ischämie dar: Ein okkludiertes Gefäß führt zum Perfusionsausfall in einer Hirnregion.

In Analogie dazu ist die fokale Ischämie auch tierexperimentell etabliert, zum Beispiel in Form des sog. Fadenmodells der Ratte als „middle cerebral artery occlusion and reperfusion“, kurz MCAO-R (ausführliche Beschreibung siehe Punkt 1., Teil Material und Methoden).

### 1.3 Pathophysiologie der fokalen zerebralen Ischämie

#### 1.3.1 Anoxische Depolarisation, Exzitotoxizität und Kalziumüberladung der Zelle

Der thrombotische oder thrombembolische Verschluss eines Gefäßes führt zu einem Erliegen des Antransports und der Synthese energiereicher Äquivalente. Auf zellulärer Ebene resultiert aus der hämodynamischen Stase ein Mangel an O<sub>2</sub> und Glukose. Der Ausfall der oxidativen Phosphorylierung unter Hypoxie- /Anoxie-Bedingungen führt zur dramatischen ATP-Verarmung der Zelle.<sup>(110)</sup> Dies wiederum bedingt ein sukzessives Sistieren der energieabhängigen Prozesse. Dazu zählen energieintensive Regulationsmechanismen wie die Aufrechterhaltung des Ruhemembranpotentials (im weiteren RMP) durch die Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase und anderer Ionenpumpen-abhängiger Vorgänge wie die intrazelluläre Kalziumhomöostase.<sup>(79)</sup>

In Bezug auf das RMP bedeutet dies einen unkontrollierten Na<sup>+</sup> - sowie Cl<sup>-</sup>-Einstrom in die Zelle und damit den Zusammenbruch des RMP. Durch den Na<sup>+</sup>-Einstrom kommt es zur Zellschwellung und zur sog. „anoxischen Depolarisation“. Der Na<sup>+</sup>-Einstrom geht mit einem passiv-diffusiven H<sub>2</sub>O-Einstrom in die Zelle einher. Dieser Vorgang entspricht dem Pathomechanismus des intrazellulären zytotoxischen Ödems<sup>(5)</sup>, welches durch entsprechende Volumenzunahme raumfordernde Wirkung erreichen kann und eine eventuelle Restzirkulation in der Penumbra beeinträchtigen oder primär nicht infarziertes Gewebe durch Kompression zusätzlich schädigen kann.

Infolge der anoxischen Depolarisation strömt Ca<sup>2+</sup> über somatodendritische und präsynaptische spannungsabhängige Ca<sup>2+</sup>-Kanäle in den Intrazellulärraum ein.<sup>(49) (94) (110)</sup> Dies führt zu einer Freisetzung exzitatorischer Aminosäuren in den synaptischen Spalt, wo selbige akkumulieren, weil die energieabhängigen Wiederaufnahmemechanismen fehlen. Durch diese exzitatorischen Aminosäuren werden ligandenkontrollierte Ca<sup>2+</sup>-Kanäle aktiviert, darunter etwa der sog. NMDA-Rezeptor und der AMPA-Rezeptor.<sup>(92)</sup> Wichtigster Vertreter der exzitatorisch wirkenden Transmitter ist die Aminosäure Glutamat, die über o.g. Rezeptoren wesentlich zum weiteren Anstieg der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration beiträgt.

Neben dem exzessiven Ca<sup>2+</sup>-Einstrom ins Cytosol von extrazellulär trägt die ebenfalls ATP-abhängige und daher ausbleibende Ca<sup>2+</sup>-Speicherung im endoplasmatischen Retikulum zur Ca<sup>2+</sup>-induzierten Deregulierung diverser Reaktionskaskaden bei.

Ca<sup>2+</sup> spielt bereits im physiologischen Kontext eine zentrale Rolle, da es als second und third messenger sowie Enzyminduktor an multiplen zellulären Regelkreisen beteiligt ist. Physiologischerweise wird die intrazelluläre Ca-Konzentration bei etwa 10<sup>-7</sup> mol/l energieabhängig konstant gehalten gegenüber einer extrazellulären Ca-Konzentration von 10<sup>-3</sup> mol/l. Unphysiologisch hohe Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen in der Zelle führen zur Überaktivierung von Ca<sup>2+</sup>-

abhängigen Proteasen, darunter Proteinkinase C<sup>(54)</sup>, Endonukleasen<sup>(123)</sup> und die im weiteren Verlauf zu diskutierenden Calpaine. Die gesteigerte Proteasen-Aktivität führt zu Proteinphosphorylierung (Proteinkinase C), DNA-Fragmentierung (Endonukleasen) und Degradierung von zytoskelettalen Strukturproteinen (Calpaine). Damit stellt die durch anoxische Depolarisation vermittelte exzessive Akkumulation exzitatorischer Aminosäuren wie Glutamat einen zentralen Faktor der Kalziumüberladung der Zelle dar. Das erhöhte Kalzium wirkt als Trigger für viele pathologische Enzymkaskaden und stellt speziell für die Calpaine den entscheidenden Schrittmacher der pathologischen Überaktivierung dar.

### 1.3.2 Periinfarktdepolarisation

Im Zentrum des Infarktes bei fokaler Ischämie kann aufgrund des Sistierens der Energiesynthese die oben beschriebene anoxische Depolarisation mit ihren Folgen der Glutamatakkumulation und Ca-Überladung der Zelle nicht repolarisiert werden. In der Infarkttrandzone hingegen ist gemäß der Definition der Penumbra der Energiemetabolismus (noch) intakt, so dass eine initiale Depolarisation repolarisiert werden kann. Die exzitotoxischen Kaskaden ziehen aber wiederholte Depolarisationen nach sich, so dass es speziell in den ersten 6 – 8h nach dem Beginn der Ischämie zu wellenförmig wiederkehrenden sog. Periinfarktdepolarisationen kommt.<sup>(53)</sup> Letztere werden unter Energieverbrauch repolarisiert, was zu einem für die Zelle deletären sekundären Energieverlust führen kann. Auf diese Weise kann Penumbra-Gewebe zugrunde gehen, was im Tierexperiment bereits belegt ist durch Zunahme der Infarktgröße.<sup>(81)</sup> Die Antagonisierung der Depolarisationen durch z.B. Glutamat-Antagonisten resultierte tierexperimentell in einer Reduzierung der Infarktgröße.<sup>(57)</sup> Und da die Calpainaktivierung direkt mit der Exzitotoxin-Hypothese zusammenhängt, sind die Calpaine auf diesem Weg am Gewebeschaden beteiligt. Wengleich der elektrophysiologische Nachweis der Periinfarktdepolarisationen beim Menschen bisher nicht gelang, so legt die pathophysiologische Evidenz aus dem Tierexperiment doch eine Relevanz beim Menschen nahe.

### 1.3.3 Inflammation

Die Kombination aus Hypoxie, intrazellulärem Ca-Anstieg und Produktion freier Radikale führt zur Aktivierung proinflammatorischer Gene.<sup>(56) (11)</sup> Bei den daraus resultierenden Genprodukten handelt es sich um Entzündungsmediatoren wie den platelet activating factor (PAF), tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ) und Interleukin 1 $\beta$  (IL1 $\beta$ ). Diese Mediatoren bedingen die Expression von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen, wodurch Leukozyten (Neutrophile, Makrophagen, Monozyten) zur Extravasation befähigt werden und ihrerseits die



Entzündungsreaktion im Hirnparenchym unterhalten.<sup>(73) (137)</sup> Die experimentelle Blockierung dieser Prozesse führt zu kleineren ischämischen Schäden.<sup>(20) (33)</sup>

Auch die Aktivierung von Mikrogliazellen im Rahmen der Entzündungsreaktion ist beschrieben,<sup>(35)</sup> wobei die daran beteiligten Mechanismen nur zum Teil bekannt sind. Möglicherweise spielt eine Ca-vermittelte Calpain-Aktivierung beim Abbau von Myelin und anderen intrazellulären Proteinen eine Rolle.<sup>(50) (108)</sup> Eine Frage dieser Arbeit bestand deshalb im Nachweis von aktiviertem Calpain in Mikrogliazellen bei fokaler zerebraler Ischämie.

### 1.3.4 Nekrose und Apoptose

Ischämisch geschädigte Zellen im ZNS können durch Nekrose oder Apoptose zugrunde gehen. Welche der beiden Todesarten zum Tragen kommt, hängt von verschiedenen Faktoren ab. Dazu zählen Art und Ausmaß der Schädigung durch die oben diskutierten Mechanismen, der betroffene Zelltyp und das Stadium des Zellzyklus.<sup>(29)</sup> Bei der fokalen, permanenten Ischämie (Schlaganfall) ist die Nekrose der Hauptmechanismus des Zelltodes, die typischerweise durch eine starke Zellschwellung gekennzeichnet ist.<sup>(77)</sup>

Allgemein akzeptiert ist die Regel, dass ein und derselbe Stimulus je nach Stärke sowohl Nekrose als auch Apoptose nach sich ziehen kann.<sup>(14) (2)</sup> Bei zerebraler Ischämie lassen sich nach kurzen Ischämie-Intervallen vor allem apoptotische Mechanismen beobachten (verzögerte selektive Parenchymnekrose), nach längerer Ischämie-Dauer vermehrt nekrotische Prozesse.<sup>(31)</sup>

Die Caspasen, eine Familie intrazellulärer Cystein-Proteasen, sind als wichtige Exekutoren des programmierten Zelltodes bei zerebraler Ischämie etabliert.<sup>(84)</sup> Caspasen zerschneiden eine Vielzahl von Substraten und tragen so auf verschiedenen Ebenen zum Zelltod bei.

In diesem Zusammenhang sind auch die Calpaine von Interesse. Einerseits werden die Calpaine durch den intrazellulären Ca-Exzess in pathologischem Maße bereits in der ischämischen Frühphase aktiviert und tragen durch den Abbau zytoskelettaler Proteine zur Destabilisierung der Zelle und zum nekrotischen Zelltod bei.<sup>(7) (70) (103)</sup> Allerdings gibt es auch experimentelle Hinweise, dass Calpaine in apoptotische Mechanismen involviert sind. So konnte nachgewiesen werden, dass die Gabe eines Calpain-Inhibitors (Calpeptin) die internukleosomale DNA-Fragmentierung, eines typischen Apoptose-Markers, reduzierte.<sup>(101)</sup> Ferner lässt die Ko-Aktivierung von Caspasen und Calpainen unter Sauerstoff und Glukose-Deprivation ein synergistisches Wirken beider Proteasen bei der Apoptose wahrscheinlich werden.<sup>(90)</sup> Blomgren und Kollegen haben darüber hinaus eine Aktivierung des Haupteffektors der A-

apoptose, Caspase 3, durch Calpain selbst in einem Modell fokaler zerebraler Ischämie beschrieben.<sup>(13)</sup>

Zusammenfassend kann konstatiert werden, dass bei zerebraler Ischämie sowohl der nekrotische als auch der apoptotische Zelltod auftreten kann. Calpaine scheinen an beiden Formen mitzuwirken.

## **2. Spezielle Pathophysiologie – Rolle der Calpaine**

### **2.1 Einführung und Nomenklatur**

Im Zusammenhang mit den pathophysiologischen Ereignissen innerhalb einer ischämisch geschädigten Zelle wurde im Punkt 1.3.1 bereits die Aktivierung intrazellulärer Proteasen beschrieben. Eine wichtige Gruppe solcher Proteasen ist die der Calpaine.

Calpaine sind intrazelluläre, nicht-lysosomale  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Cysteinproteasen.

Über die Existenz einer Calcium-abhängigen Protease wurde erstmals 1964 berichtet.<sup>(41)</sup>

Calpaine und Calpain-ähnliche Proteine/ Peptide sind in Säugetieren, Vertebraten, Evertebraten und Mikroorganismen zu finden, wobei sowohl speziesspezifische wie auch gewebsspezifische Unterschiede bestehen.

Von den bis dato identifizierten 14 Calpain-Isoformen sind die beiden Isoenzyme  $\mu$  und m-Calpain aufgrund ihres ubiquitären Vorkommens die bestuntersuchten; sie werden daher auch als konventionelle oder klassische Calpaine bezeichnet, weil sie bei Vertebraten in allen Gewebstypen und Organsystemen exprimiert werden.

Daneben existieren gewebsspezifische Isoformen wie etwa das p94, nCL2, Capn5 und Capn6, über deren spezifische Funktionen mit Ausnahme des p94 weniger bekannt ist: Ein Defekt auf dem p94-Gen ist verantwortlich für das Krankheitsbild der Gliedergürtel-Muskeldystrophie LGMD2A.<sup>(102)</sup>

Aufgrund der pathophysiologischen Relevanz von  $\mu$ /m-Calpain (auch Calpain 1 respektive Calpain 2 genannt) im Zusammenhang mit der zerebralen Ischämie, sollen diese beiden im Folgenden näher charakterisiert werden.

### **2.2 Strukturelle Charakteristika von $\mu$ - und m-Calpain**

$\mu$ - und m-Calpain sind heterodimere Proteine, die aus je zwei Untereinheiten bestehen. Die kleine 30 kDa Untereinheit ist hochkonserviert und im Falle der konventionellen Calpaine identisch, während die große 80 kDa Untereinheit mit einer Übereinstimmung von zirka 60% variabel ist.<sup>(117)</sup>

Die große Untereinheit besteht aus 4 Domänen, wobei die Domäne II das katalytische Zentrum in Form einer Trias aus den Aminosäureresten Cystein sowie Histidin und Asparagin enthält und damit Papain-ähnliche Struktur hat. Die Domäne IV stellt funktionell im Wesentlichen eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsstelle dar, was strukturell durch fünf EF-Motive repräsentiert ist und aufgrund der sequentiellen Ähnlichkeit zum Calmodulin auch als calmodulin-like domain bezeichnet wird. Die Domänen I und III weisen keinerlei suggestive Sequenzhomologien zu anderen Proteinen auf und über ihre Funktion gibt es bis dato lediglich Vermutungen, etwa die stereochemische Stabilisierung über Phospholipidbindungen und elektrostatische Wechselwirkungen.<sup>(115) (124)</sup>

Die bei  $\mu$ - und  $m$ -Calpain identische 30K Untereinheit umfasst zwei Domänen, eine  $\text{Ca}^{2+}$ -bindende Calmodulin-ähnliche Domäne mit 5 EF-Motiven, die große Homologie zur Domäne IV der großen Untereinheit aufweist und eine hydrophobe, Glycin-reiche Domäne. Funktionell wird der 30K Untereinheit die Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  sowie die Bindung an Phospholipide zugeschrieben.<sup>(34) (72) (93)</sup> (Abb. 1)

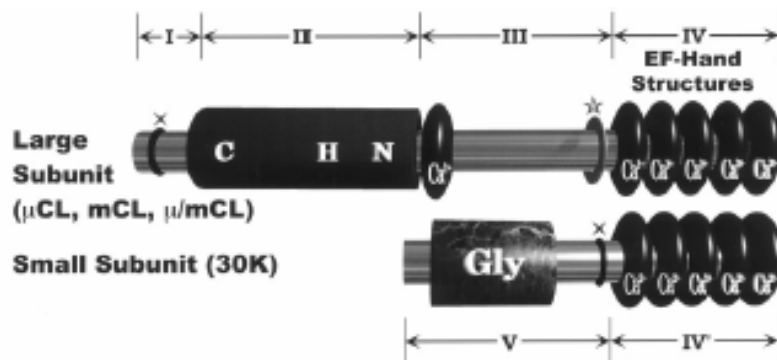


Abb. 1: Schematische Darstellung der konventionellen Calpaine ( $\mu$  und  $m$ ). Die konventionellen Calpaine sind aus einer großen, katalytischen Untereinheit (large subunit) CL (80K) und einer kleinen (small subunit) (30K) zusammengesetzt. Domäne II ist eine Zystein-Protease mit einer Trias aus Cystein (C), Histidin (H) und Asparagin (A). Die Domänen III und IV sind  $\text{Ca}$ -Bindungsstellen. Weitere Details siehe Text. Aus: Ono Y., Sorimachi H., Suzuki K., Structure and physiology of calpain, an enigmatic protease, *Biochem. Biophys. Res. Com.* 245 (1998) 289-294.

## 2.3 Enzymregulation

### 2.3.1 Kalzium-Abhängigkeit

Bei den Calpainen handelt es sich um Calcium-abhängige Proteasen, wobei die zur katalytischen Aktivierung erforderliche Calcium-Konzentration je nach Isoform unterschiedlich ist. So benötigt  $\mu$ -Calpain eine intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im mikromolaren Bereich (3-50  $\mu\text{mol}$ ) während  $m$ -Calpain eine millimolare Konzentration (0,4 - 0,9  $\text{mmol}$ ) zur enzymatischen Aktivität erfordert.<sup>(70)</sup>

Neben der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen proteolytischen Aktivität spielt die  $\text{Ca}^{2+}$ -vermittelte Autolyse der Calpaine eine wichtige und auch kontrovers diskutierte Rolle.

Unter dem Einfluss von zytoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen, die nur wenig über den für die proteolytische Aktivität notwendigen liegen, findet eine Autoproteolyse der Calpaine statt.<sup>(23) (24)</sup> Durch daran beteiligte sequentielle autohydrolytische Schritte entstehen letztlich aus der 80kDa Untereinheit im Falle des  $\mu$ -Calpain ein 76 kDa-Fragment respektive ein 78 kDa-Fragment im Falle des  $m$ -Calpain.<sup>(104)</sup> Analog resultiert aus der bei beiden Isoformen identischen 30 kDa-Untereinheit ein 18 kDa-Fragment.<sup>(105)</sup> (Abb. 2 und 3)

Die Beobachtung dieses autolytischen Prozesses führte zu der Annahme, dass es sich bei den Calpainen um Proenzyme handeln müsse, die erst in Form der oben beschriebenen Fragmente über enzymatische Aktivität verfügen. Das Proenzym- Konzept hat sich insofern als nicht zutreffend erwiesen, als auch für nicht-autolytierte Formen von  $\mu$ - und  $m$ -Calpainen zy-mografische Aktivität nachgewiesen werden konnte.<sup>(37) (82)</sup> Daneben konnte gezeigt werden, dass eine durch Mutation verunmöglichte Autolyse nicht gleichbedeutend mit dem Verlust der enzymatischen Aktivität ist.<sup>(28)</sup>

Da eine Dissoziation von Autolyse und proteolytischer Aktivität aber in (pa-tho)physiologischen Modellen nicht nachweisbar ist, ist der Nachweis von autolytisch entstandenen Fragmenten als indirekter Aktivitätsparameter der Calpaine etabliert.<sup>(37) (82)</sup> Die Funktion der Autolyse selbst ist gegenwärtig Gegenstand der Diskussion und besteht möglicherweise in der Freisetzung chemotaktisch aktiver Peptide und der Modifikation der Stabilität des dimeren Komplexes.<sup>(65)</sup>

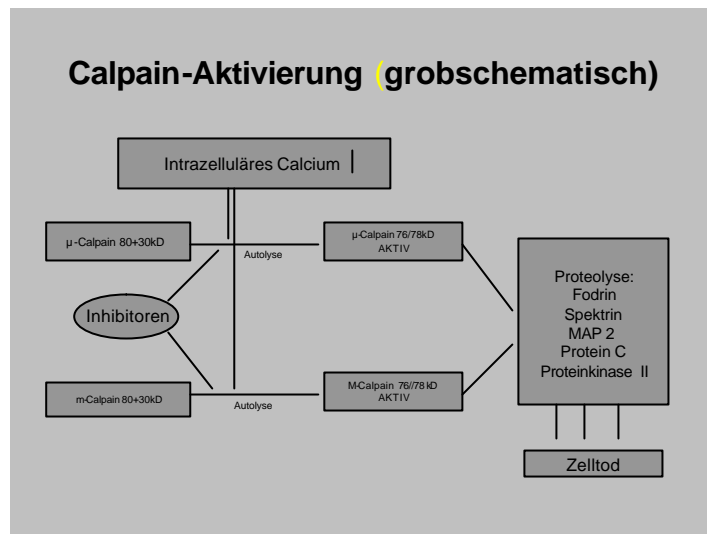


Abb. 2: Calpainaktivierung schematisch. Ca-Abhängigkeit, Autolyse-Produkte, Substrate.

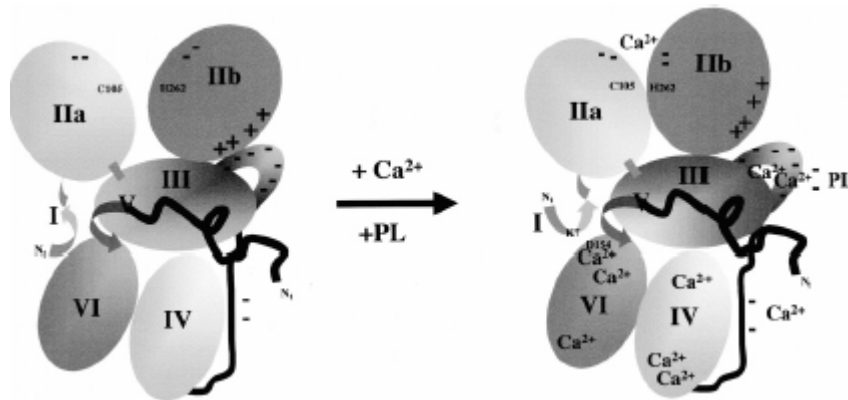


Abb. 3: Ca-Abhängigkeit der Aktivierung von Calpain schematisch. Die rechte Bildhälfte zeigt die  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsstellen an den einzelnen Domänen. Aus: Reverter D., Sorimachi H., Bode W., The structure of calcium-free human m-calpain. Implications for calcium activation and function, Trends Cardiovasc. Med. 11 (2001) 222-229.

### 2.3.2 Calpain-Calpastatin-System

Calpastatin ist der endogene Inhibitor der ubiquitären Calpaine ( $\mu$  und  $m$ ).

Calpastatin hemmt beide Isoformen spezifisch, d.h. ohne Hemmung anderer Proteasen wie etwa Cathepsin B oder Papain.<sup>(128) (129)</sup> Der Hemmmechanismus beruht auf der Bindung an die Domäne IV der großen Untereinheit.<sup>(119)</sup> Eine entscheidende Rolle scheint Calpastatin bei der physiologischen Regulation der Calpain-Aktivität zu spielen.

Dabei spielt Calpastatin neben intrazellulären Schwankungen der Calciumhomöostase die ausschlaggebende Rolle. Hingegen im Falle zerebraler Ischämie versagt der hemmende Effekt auf Calpain, da Calpastatin zwar hochreguliert wird, aber selbst durch Calpain degradiert wird.<sup>(12) (100)</sup> Insofern kommt dem endogenen Calpain-Inhibitor bei der zerebralen Ischämie kein therapeutisches Potential zu. (Abb. 2)

## 2.4 Substrate von Calpainen

Hinsichtlich des Spektrums an Substraten bestehen - so weit bekannt - keine Unterschiede zwischen den beiden Isoformen.<sup>(89)</sup>

Die Gesamtzahl an Proteinen, die als Substrate für Calpaine identifiziert werden, wächst ständig und umfasst eine heterogene Vielfalt verschiedenster Klassen von Proteinen, wobei zytoskelettale und Membranproteine eine wichtige Gruppe darstellen. Relevante Vertreter dieser Gruppe sind das microtubule-associated protein 2,<sup>(59) (96)</sup> im Folgenden MAP-2 genannt, Spektrin,<sup>(113)</sup> Vimentin, Ankyrin, Desmin, Fibronectin, und  $\alpha$ -Aktinin und verschiedene Integrine.<sup>(58)</sup> Desweiteren zählen zum Spektrum Enzyme wie Proteinkinase C und andere regulatorische Proteine.<sup>(104) (118)</sup>

## 2.5 Physiologische Funktionen

Calpaine sind an vielen zellulären Regulationsmechanismen beteiligt, darunter die Regulation des Auf- und Umbaus des Zytoskeletts, die Muskelzellendifferenzierung und die Myoblastenfunktion.<sup>(83)</sup>

Im Bereich des zentralen Nervensystems sind Calpaine am Nervenzell-Metabolismus beteiligt, an der Neuriten-Differenzierung, sog. „neurite outgrowth“,<sup>(39)</sup> und dem „dendrite remodeling“.<sup>(32)</sup>

Ferner scheint Calpain über Regulierung der long-term potentiation der Gedächtnisbildung beteiligt zu sein.<sup>(26) (122)</sup>

## 2.6 Pathophysiologische Bedeutung im ZNS allgemein

Im Bereich des ZNS ist bis dato kein Krankheitsbild beschrieben, das pathogenetisch auf einer selektiven Dysregulation von  $m$ - bzw.  $\mu$ -Calpain beruht. Nachgewiesen ist ein derartiger Kausalzusammenhang hingegen für die Gliedergürtel-Muskeldystrophie Typ 2A (LGMD 2A), einer genetischen Erkrankung, der eine Mutation des Skelettmuskel-spezifischen Calpain-Suptyps p94 zugrunde liegt.<sup>(102)</sup>

Calpain-Aktivierung wird mit diversen neurologischen Erkrankungen assoziiert. Squier wies in vitro über Fodrinolyse eine Rolle bei der Apoptose nach.<sup>(112)</sup> Außerdem scheinen Calpaine bei diversen neurodegenerativen Erkrankungen eine Rolle zu spielen, im Gehirn von Patienten mit M. Alzheimer etwa wurden erhöhte Konzentrationen von Calpain nachgewiesen.<sup>(40)</sup>

## 2.7 Pathophysiologische Bedeutung bei zerebraler Ischämie

Da Calpaine intrazelluläre Proteasen sind, ist ihre Aktivierung abhängig von zytoplasmatischen Reaktionskaskaden. Im Falle zerebraler Ischämie führt die ATP-Verarmung zu einem Zusammenbruch der transmembranalen Ionengradienten und zu einem Transmitter-induzierten exzessiven Kalzium-Einstrom in die Zelle (siehe Punkt 1.3.1, Einleitung). Durch steigende intrazelluläre Kalzium-Konzentrationen wird das Aktivierungsniveau (3-50µmol für µ-Calpain, 0,4-0,9mmol für m-Calpain) erreicht. Die dabei auftretenden Calcium-Konzentrationen liegen erheblich über den physiologischen Schwankungen, weshalb die endogene Inhibition durch Calpastatin versagt.<sup>(12) (100)</sup> Durch die in Punkt 2.3.1 dargelegten autoproteolytischen Veränderungen resultieren stabile katalytisch aktive Formen der Calpaine, die zu o.g. schweren strukturellen Schäden führen.

Der erste Hinweis auf die Involvierung von Calpain in die Pathophysiologie der zerebralen Ischämie wurde 1989 erbracht und zwischenzeitlich in diversen Ischämie-Modellen belegt.<sup>(67)</sup> <sup>(107)</sup> Eine Calpain-vermittelte Proteolyse von Fodrin im Hippocampus nach transients globaler Ischämie wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen nachgewiesen.<sup>(103) (106)</sup> Diese Experimente bestätigten einen durch Calpain bedingten strukturellen Zellschaden sowie eine mögliche Implikation von Calpain bei der postischämischen Apoptose, da die Fodrinolyse eines der wesentlichen Kennzeichen des apoptotischen Zelluntergangs darstellt.<sup>(86) (113)</sup>

In einem Modell der permanenten fokalen Ischämie der Ratte konnten Bartus und Kollegen sowohl im Kortex als auch in den Basalganglien eine Zunahme der Fodrinolyse durch Calpain nachweisen.<sup>(7)</sup> Den Nachweis von Calpain-Aktivität führte auch Neumar in einem Ratten-Modell mit transients fokaler Ischämie.<sup>(89)</sup> Dabei wurde die Proteolyse von α-Spectrin, einem weiteren Calpain-Substrat, in kortikalen und subkortikalen Hirnarealen nachgewiesen. Die Degradation von Spektrin stellt einen zentralen Faktor struktureller postischämischer Zellschädigung durch Calpaine dar. Desweiteren beschrieb Neumar immunhistochemisch ein distinktes zeitlich-räumliches Verteilungsmuster in den genannten Regionen. Dabei wurde das Verteilungsmuster der Calpaine innerhalb der Neurone im Zeitverlauf untersucht, nicht aber das Vorkommen von Calpainen in nicht neuronalen Zellen. Immunhistochemisch wurde eine erhöhte intrazelluläre Calpainexpression in einem Ratten-Modell der fokalen zerebralen Ischämie (MCAO-R) von Liebetrau und Kollegen nachgewiesen.<sup>(70)</sup> Bei dieser Untersuchung gelang der Nachweis, dass mit zunehmender Reperfusionsdauer eine steigende Zahl Calpain positiver Zellen verbunden ist und nach 24 h Reperfusion 88,4% aller Zellen im ischämischen Kortex bzw. 47,3% aller Zellen in den Basalganglien Calpain positiv waren.

Neben der Evidenz für Calpain vermittelten Abbau von Proteinen des Zytoskeletts gibt es Anhaltspunkte für eine Beteiligung an apoptotischen Prozessen bei zerebraler Ischämie, was eine effektive Neuroprotektion durch selektive Calpain-Hemmer wünschenswert erscheinen lässt.<sup>(13) (90) (101)</sup>

Hinweise auf die Rolle von Calpain bei zerebraler Ischämie ergaben sich auch durch Untersuchungen mit synthetischen Calpain-Inhibitoren. Bartus konnte zeigen, dass die Gabe AK295 bzw. AK 275 neuroprotektive Wirkung hat und das Infarktvolumen bei MCAO-R der Ratte drastisch reduziert.<sup>(7) (9)</sup> Die Applikation von MDL28,170, eines anderen synthetischen Calpain-Inhibitors, führte in einem Setting fokaler Ischämie der Ratte zu einer dosisabhängigen Reduktion des Infarktvolumens um bis zu 60%.<sup>(78)</sup> Vergleichbare Ergebnisse erzielten auch Inhibitor-Untersuchungen an Gerbilen.<sup>(69)</sup> Die Demonstration erheblich verringerter Infarktgrößen durch Blockierung der Calpain-abhängigen Strukturschäden ist ein unzweifelhafter Hinweis für die tragende Rolle der Calpaine bei zerebraler Ischämie.

### **3. Therapie-Ansätze beim Schlaganfall**

#### **3.1 Thrombolyse mit rtPA**

Basierend auf der einführend erörterten Tatsache, dass 80 - 85% aller Schlaganfälle beim Menschen ischämischer Natur sind, d.h. vor allem thrombotische oder thrombembolische Gefäßverschlüsse vorliegen, erscheint es nahe liegend, ein durch ein Blutkoagel verschlossenes Gefäß durch Auflösung dieses Gerinnsels zu rekanalisieren und damit die Perfusion zu normalisieren.

Thrombotisches Material besteht im Wesentlichen aus einer Aggregation von Thrombozyten und polymerisierten Fibrinmolekülen.

Ein physiologischer Antagonismus dazu besteht in Form des Fibrinolyse-Systems, das in der Lage ist, oben genannte Fibrin-Polymere zu spalten und so einen bestehenden Thrombus aufzulösen. Exekutive Funktion hat dabei die Protease Plasmin, die aus einer inaktiven Vorstufe, dem Zymogen Plasminogen, hervorgeht.

Therapeutisch macht man sich dieses Prinzip zunutze, indem man rekombinante Formen physiologischer Aktivatoren des Plasminogen-Plasmin-Systems appliziert, um eine forcierte Fibrinolyse zu erreichen. Der verwendete Wirkstoff ist recombinant tissue plasminogen activator, rtPA (Actilyse®), ein gentechnologisch hergestelltes Derivat des endogenen Gewebsplasminaktivators tPA. Hierbei handelt es sich um die einzige derzeit zugelassene Akuttherapie des Schlaganfalls. Vier große Studien belegen den Nutzen der Therapie mit rtPA beim akuten Schlaganfall.<sup>(21) (42) (43) (121)</sup>



Als Dosierung werden 0,9mg/kg Körpergewicht zugrunde gelegt, wobei eine strenge Indikationsstellung zu beachten ist, insbesondere ein Intervall von maximal 3 Stunden zwischen Symptombeginn und Initiation der i.v.-Lysetherapie. Ein Intervall von mehr als 3 Stunden ist mit einer signifikant schlechteren Rate an klinischem Benefit verbunden, das heißt mit einer signifikant höheren Rate an unerwünschten Wirkungen. Insbesondere das Risiko einer symptomatischen intrazerebralen Blutung steigt bei Überschreiten des 3-Stunden-Fensters an.<sup>(121)</sup> Generell ist das Risiko einer Hirnblutung unter rtPA-Therapie, auch wenn diese innerhalb des 3-Stunden-Intervalls liegt, erheblich vergrößert gegenüber Placebo. Dieses Risiko liegt statistisch bei ca. 6%.<sup>(43)</sup>

Die Reduktion der Letalität nach 3 Monaten von 20 auf 17% und eine signifikante Reduktion der Postinfarkt-Morbidität stellen die Rationale für die Etablierung von rtPA als Akuttherapie des ischämischen Schlaganfalls dar.<sup>(21)</sup>

Im Kontext der mikrovaskulären Prozesse in der Ischämie erscheint die vermehrte Aktivierung von Plasmin durch rtPA und damit auch die Plasmin-vermittelte Degradierung von EZM-Proteinen plausibel. Tierexperimentell konnte jedoch gezeigt werden, dass die pauschale Aussage eines erhöhten Blutungsrisikos durch rtPA nicht korrekt ist, sondern dass vielmehr eine differenzierte Dosis-Wirkungs-Kinetik in Betracht zu ziehen ist. Burggraf und Grobholz konnten zeigen, dass niedrige bis mittlere rtPA-Dosen im Rattenmodell mit einer signifikanten Verminderung des Verlustes von Basallamina-Bestandteilen einhergingen, dass also ein dosisabhängiger vasoprotektiver Effekt anzunehmen ist.<sup>(17) (39)</sup> Ursächlich kommt eine verbesserte mikrovaskuläre Flussrate durch weniger Mikrothrombosierungen in Frage.

Über die molekularen Mechanismen der Nebenwirkungen von rtPA ist wenig bekannt, aber es existieren Hinweise für eine neurotoxische Wirkung von tPA.<sup>(125)</sup>

Eine der Fragestellungen dieser Arbeit bestand darin zu untersuchen, ob analog zur Vasoprotektion eine Neuroprotektion oder Neurotoxizität in Abhängigkeit von der rtPA-Dosis feststellbar ist, wobei die Calpainaktivität als Parameter für den Zellschaden herangezogen wird.

### **3.2 Neuroprotektion durch Hypothermie**

Eine Reduzierung des Energieverbrauchs der Zelle in der zerebralen Ischämie durch Absenken der Temperatur stellt ein plausibles Konzept der Neuroprotektion dar, zumal die Konservierung suffizienter ATP-Reserven die genannten pathologischen Kaskaden unterdrückt. Im Schadensfalle ist unter Hypothermiebedingungen sowohl zellulär als auch mikrovaskulär von verringerter Enzymaktivität auszugehen und damit von einer langsameren Progression der Schädigungsmechanismen.

Die genauen Mechanismen der Protektion durch Hypothermie sind nicht bekannt, jedoch scheinen neben einer Verhinderung des Zusammenbruchs der Blut-Hirn-Schranke eine geringere Entstehung freier Radikale und eine Verminderung des exzessiven  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms nach intrazellulär eine Rolle zu spielen.<sup>(36) (120)</sup> In diesem Zusammenhang ist eine verringerte Aktivierung  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiger Proteasen wie der Calpaine bei experimenteller traumatischer Axonschädigung beschrieben.<sup>(16)</sup>

Die Neuroprotektivität in der experimentellen fokalen zerebralen Ischämie ist erwiesen, wobei der klinische Nutzen der Hypothermie noch in großen Studien validiert werden muss.<sup>(22) (62)</sup>

(64)

#### 4. Zusammenfassung und Fragestellung

Der Schlaganfall stellt epidemiologisch eine der häufigsten neurologischen Erkrankungen dar. Neben der Prävention stellt die adäquate Akuttherapie den Hauptpfeiler der modernen Therapie dar. Da über 80% aller Schlaganfälle ischämischer Genese sind, ist die systemische intravenöse Lysetherapie mit rtPA der therapeutische Goldstandard bei Fehlen von Kontraindikationen. Die therapeutische Hypothermie gewinnt als komplementäres Verfahren an Bedeutung. Die klinische Situation mit fokaler Ischämie durch einen Gefäßverschluss wurde in dieser Arbeit anhand eines Rattenmodells mit fokaler Ischämie simuliert. Neben zahlreichen anderen Faktoren spielen die Calpaine eine wesentliche Rolle bei der zerebralen Ischämie. Pathologische Calpainaktivierung führt zu schweren strukturellen Zellschäden und ist Bestandteil des nekrotischen Zelluntergangs und mutmaßlich auch der postischämischen Apoptose. Im Rahmen dieses Projektes sind folgende Fragen untersucht worden:

- I. In welchen Zellen ist Calpainaktivität ohne therapeutische Beeinflussung nachweisbar? Wie ist das zelluläre Verteilungsmuster in Abhängigkeit von der Reperfusiondauer?
- II. Hat die Gabe von rtPA in unterschiedlichen Dosierungen einen Einfluss auf die Calpainaktivierung? Kann ein neuroprotektiver oder neurotoxischer Effekt durch rtPA beobachtet werden?
- III. Hat eine Hypothermie-Therapie Einfluss auf die Calpainaktivierung?
- IV. Welchen Effekt hat die Kombination von rtPA und Hypothermie auf die Calpainaktivierung?

## II. MATERIAL UND METHODEN

### 1. Tiermodell

Die Versuche wurden an erwachsenen, männlichen Wistarratten mit einem Gewicht von 300 g bis 350g (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Germany) durchgeführt. Die Ratten wurden vor der Operation eine Woche akklimatisiert, und in einem 12-Stunden-Hell/Dunkel-Rhythmus gehalten. Die Tiere hatten während dieser Zeit freien Zugang zu Futter und Wasser. Dabei entsprach jeder Einzelschritt des Tierversuchsprotokolls den Richtlinien der Europäischen Ethikkommission und war von der Regierung von Oberbayern genehmigt (Tierversuchsnummer 209.1/211-2531-76/03). Unter Beachtung dieser Standards wurde alles daran gesetzt, die Tierzahl gering zu halten sowie Schmerz- und Stressfreiheit zu gewährleisten.

Nach intraperitonealer Einleitung der Narkose mit Thiopental (100mg/kg Körpergewicht) wurden die Tiere tracheotomiert, intubiert (Polyethylenschlauch PE 250) und unter Gabe von Isofluran künstlich beatmet (Gasgemisch aus 38,5% O<sub>2</sub>, 60% N<sub>2</sub>O und 1,5 Vol% Isofluran [entsprechend 0,2 l/min]). Die Ventilation erfolgte über ein Beatmungsgerät (Harvard small animal ventilator, Model 683, South Natick, MA). Die Sicherstellung der Volumenregulation erfolgte über einen Venenkatheter in der rechten Femoralvene. Zur kontinuierlichen arteriellen Blutdruckmessung (Ziel: arterieller Mitteldruck 80-100mmHg) sowie zur intermittierenden Blutgasanalyse wurde ein Katheter in die rechte Femoralarterie inseriert.

Das Monitoring des arteriellen Mitteldruckes erfolgte über einen Stratham P23-Druckwandler, die Blutgasanalysen wurden über einen Analysator durchgeführt (Chiron diagnostics, Aying, CIBA-corning; 278 Blood Gas System).

Die bedarfsweise Volumensubstitution erfolgte mit 0,9% Kochsalzlösung bei einem Volumen von 1-1,5 ml/h über einen Perfusor (Perfusor ED 1-300, B-Braun).

Zur Überprüfung der Narkosetiefe wurden im Versuchsverlauf regelmäßig mechanische Schmerzreize gesetzt. Bei Abwehrreaktionen wurden gegebenenfalls zusätzliche Dosen von Trapanal (20mg/kg i.p.) appliziert.

Die Körpertemperatur wurde kontinuierlich über eine rektale Temperatursonde gemessen und mit Hilfe eines regulierbaren Heizkissens in einem Zielbereich von 37,5°C gehalten.

Die transitorische fokale zerebrale Ischämie wurde durch eine leicht modifizierte Methode der intraluminalen Gefäßokklusion nach Longa, Weinstein, 1989 induziert.<sup>(76)</sup> Der wesentliche Unterschied zu der Methode nach Longa et al. 1989 besteht in der Kanülierung der linken Arteria carotis communis mittels eines Polyethylenschlauches (Ethicon, Norderstedt, Deutschland), der als Führungskatheter für den monofilären 3-0 Nylonfaden dient.

Unter Zuhilfenahme eines Operationsmikroskopes (Vergrößerung 3-20-fach) wurde der linke laterale Halssitus über eine mediane Inzision dargestellt. Das Platysmaäquivalent, Musculus sternocleidomastoideus und die Vena jugularis externa wurden nach lateral gedrängt, und mit einem selbstnachstellenden Retraktor gehalten. Der Musculus omohyoideus wurde in Richtung der Arteria carotis communis durchtrennt.

Nun wurde die Arteria carotis communis, die Arteria carotis externa und die Arteria carotis interna dargestellt und unter Schonung der abgehenden Gefäße mobilisiert. Der Nervus vagus und die Vena jugularis interna wurden, um Blutdruck- und Herzfrequenzschwankungen zu vermeiden, unter äußerster Schonung der Arteria carotis communis und der Arteria carotis interna abpräpariert und die Vena jugularis interna nach lateral und der Nervus vagus nach medial verlagert. Die Arteria carotis interna wurde bis zum Foramen jugulare dargestellt und die Arteria carotis communis ligiert, um über diese Arterie mit einem Polyethylenschlauch die Arteria carotis interna zu kanülieren. Der Polyethylenschlauch fungierte als Insertionsschiene für einen modifizierten Nylonfaden (Monofil, 3-0), dessen Ende durch Hitzeeinwirkung abgerundet und mit Sekundenkleber minimal kolbenförmig verdickt war. Der 3-0 Nylonfaden wurde unter Sicht nach intrakraniell bis an den Abgang der Arteria cerebri media vorgeschoben. Die korrekte Lokalisation des okkludierenden Fadens resultiert zum einen aus einem standardisiertem Vorschubintervall von 18 mm gemessen ab der Bifurkationsstelle der Arteria carotis communis sowie über einen spürbaren Widerstand. (Abb. 4)

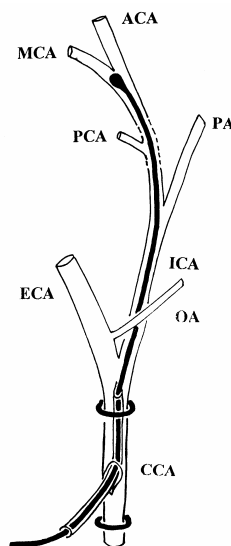


Abb. 4: Schematische Darstellung des intraoperativen Gefäßsitues. Insertion des Fadens in die A. carotis communis (CCA) und Okklusion durch Vorschub an den Abgang der A. cerebri media (MCA).

An die konstant 180 Minuten dauernde Okklusionsphase schloss sich eine Reperfusionphase an, die je nach Fragestellung von variabler Dauer war (siehe Punkt 4.3 Versuchsgruppen).

Die Ermöglichung der Reperfusion erfolgte durch Zurückziehen des Fadens bis zur Arteria carotis communis. Während der Reperfusionphase, die mit Ausnahme der unter Hypothermiebedingungen untersuchten Versuchsgruppen nach Ende der Narkose bei Raumtemperatur stattfand, hatten die Tiere freien Zugang zu Futter und Wasser. Nach 0 bis maximal 24-stündiger Reperfusion – in Abhängigkeit von der Fragestellung – wurden die Tiere durch eine intrakardiale Infusion mit kalter physiologischer Kochsalzlösung (9g NaCl/l), die daneben bovines Serum-Albumin (10g/l), Heparin (10 iE/l) und Na-Nitroprussid-Lösung (2ml/l, entsprechend 1,8g/l) enthielt, getötet und die Hirne unmittelbar danach entnommen und bei -80° Celsius kryokonserviert.

## **2. rtPA-Behandlung**

### **2.1 Pharmakologie**

rtPA ist ein synthetisch gewonnenes, gentechnisch hergestelltes Analogon des so genannten tissue plasminogen activators, kurz tPA. tPA ist eine Serinprotease, die sowohl beim Menschen als auch zahlreichen anderen Vertebraten in vielen Geweben vorkommt. Insbesondere Endothelzellen weisen eine hohe tPA-Syntheseleistung auf, wobei das Enzym relativ spezifisch an Orten gesteigerter Fibrinablagerung oder lokal thrombotischer Prozesse freigesetzt wird.

(r)tPA aktiviert direkt das Zymogen Plasminogen zu Plasmin, indem es die Peptidbindung Arg 560-Val 561 spaltet. Plasmin seinerseits ist in der Lage, bestehende Fibrin-Polymere zu spalten. Speziell die Bildung eines ternären, thermostabilen Komplexes aus Plasminogen und (r)tPA unter Kopplung an Fibrin lässt die enzymatische Aktivität des (r)tPA um 2 bis 3 Zehnerpotenzen zunehmen. (r)tPA weist also eine Fibrin-Spezifität auf, in Abwesenheit von Fibrin ist (r)tPA kaum wirksam, so dass eine effektive lokale Aktivierung der Fibrinolyse gewährleistet ist.

Die Applikation von (r)tPA erfolgt ausschließlich intravenös. Nach Beendigung einer Infusion mit (r)tPA erfolgt eine Phase schneller Eliminierung ( $t_{1/2} = 3-5$  Minuten) und eine langsame Phase ( $t_{1/2} = 46$  Minuten), wobei die schnelle Elimination für die fibrinolytische Wirkung bedeutsamer ist. Pharmakokinetisch ergibt sich eine mittlere Eliminationshalbwertszeit von 25 – 40 Minuten. Die Elimination erfolgt in der Leber über rezeptorvermittelte Endozytose.

## **2. Applikation**

30 Minuten vor dem Beginn der Reperfusion (i.e. 150 Minuten nach dem Beginn der Ischämie) wurde in aqua bidest. gelöstes rtPA (Actilyse®, Boehringer Ingelheim, Deutschland) intravenös in die rechte Vena jugularis externa über einen Katheter (Polyethylen 50) in den Dosierungen 0, 0,9, 9, und 18 mg/kg Körpergewicht verabreicht. Dabei fungierte die Gruppe mit 0 mg/kg rtPA als Kontrollgruppe, bei der stattdessen isotonische Kochsalzlösung infundiert wurde. Entsprechend dem therapeutisch angewandten Regime wurden 10% der Gesamtkörperdosis als initialer Bolus und 90% als perfusorgesteuerte Infusion (Precidor 5003 INFORS AG, Basel, Switzerland) über 1 Stunde appliziert.

## **3. Hypothermie-Behandlung**

In den unter Hypothermiebedingungen untersuchten Versuchsgruppen wurde das oben beschriebene Operationsmodell geringfügig modifiziert.

Analog dem normothermen Versuchsablauf wurde während der Operation die Körpertemperatur kontinuierlich über eine Thermoelektrode im rechten M. temporalis gemessen und mit einem Heizkissen konstant gehalten.

30 Minuten vor dem Beginn der Reperfusion wurde das Heizkissen entfernt und das Tier in einen auf  $4 - 8^{\circ}\text{C}$  gekühlten Käfig verbracht, wobei eine konstante Körpertemperatur von  $32^{\circ}\text{C}$  eingehalten wurde (Abb. 5). Es handelt sich bei diesem Verfahren um eine Adaptation des von Yanamoto beschriebenen Hypothermie-Modells.<sup>(131)</sup>



Abb. 5: Fotografische Dokumentation der Hypothermiebehandlung. Die Messung der Körpertemperatur erfolgte über eine rektale Temperatursonde (grün); Konstanthaltung bei 32°Celsius.

#### **4. rtPA-Hypothermie-Behandlung**

In einer Versuchsgruppe wurden die Tiere einer Kombination aus rtPA-Gabe und Hypothermiebedingung ausgesetzt (n=6). Dabei wurden die Tiere mit 18 mg/kg KG behandelt (Einzelheiten zur Applikation siehe Punkt 2.2) und analog der reinen Hypothermie-Gruppe behandelt (Details siehe Punkt 3).

#### **5. Tierexperimentelle Versuchsgruppen**

Entsprechend den verschiedenen Fragestellungen wurden für die einzelnen Experimente folgende Gruppen untersucht, das operative Procedere entsprach stets dem oben erörterten Protokoll:

(A) Für die immunhistochemische, volumetrische und Western Blotanalyse der Calpain-Aktivität wurden zwei experimentelle Gruppen festgesetzt:

Gruppe 1: Hypothermie (32°C), n = 6

Gruppe 2: Normothermie, n = 6;

(B) Für die immunhistochemische Untersuchung des dosisabhängigen Einflusses von rtPA auf die Calpainaktivität wurden folgende Gruppen gebildet:

Gruppe 1: Kontrollgruppe, kein rtPA, Normothermie, n = 6

Gruppe 2: Versuchsgruppe, rtPA-Dosis 0,9mg/kg KG, Normothermie, n = 6

Gruppe 3: Versuchsgruppe, rtPA-Dosis 9,0mg/kg KG, Normothermie, n = 6

Gruppe 4: Versuchsgruppe, rtPA-Dosis 18mg/kg KG, Normothermie, n = 6

Gruppe 5: Versuchsgruppe, rtPA-Dosis 18mg/kg KG in Kombination mit Hypothermie, n = 6;



(C) Für die Analyse des zellulären Verteilungsmusters der Calpain-Aktivität in der zerebralen Ischämie wurden folgende Gruppen untersucht, wobei die induzierte Ischämiedauer in jeder Gruppe konstant bei 3 h lag (I3) bei jedoch variablen Reperfusionzeiten (R) :

Gruppe 1: I3R0, n = 6

Gruppe 2: I3R3, n = 6

Gruppe 3: I3R6, n = 6

Gruppe 4: I3R9, n = 6

Gruppe 5: I3R24, n = 6

## **6. Verarbeitung des Gewebes**

### **6.1 Kryoschnitte**

Nach Ablauf der 24-Stunden-Reperfusionzeit wurden die Tiere mittels der unter Punkt 4.1 besprochenen intrakardialen Infusion getötet, wobei jedes Tier, das vor dem Erreichen der 24-Stunden –Grenze verstarb, aus der Studie ausgeschlossen wurde.

Die Ratten wurden dekapitiert und das Hirn in toto entfernt. Das Gehirn wurde in Isopentan bei  $-80^{\circ}$  Celcius eingefroren. Zum Ausschluss einer subarachnoidalen Blutung wurde die Schädelbasis inspiziert. Mit einem Kryotom (Frigocut 2800 Reichert-Jung, Bensheim, Deutschland) wurden bei  $-20^{\circ}$ Celcius  $10\mu\text{m}$  dicke Schnitte in koronarer Schnittführung unter Einschluss der gesamten Hemisphären angefertigt.

Die Schnitte wurden auf vorbeschriftete, zimmertempериerte Glasobjektträger aufgezogen und zeitnah wieder bei  $-80^{\circ}$ Celcius eingefroren.

### **6.2 Immunhistochemie**

#### **6.2.1 Methode**

Die immunhistochemische Aufarbeitung von Geweben spielt sowohl in der modernen histo(patho)logischen Diagnostik als auch in der Forschung eine herausragende Rolle.

Grundprinzip der Methode ist die spezifische Sichtbarmachung einzelner Strukturen durch Antikörper, die an bestimmte Teile der gewünschten Struktur binden, so dass letztere durch eine Farbreaktion sichtbar gemacht werden können.

Dabei macht man sich die Kenntnis spezifischer Abschnitte der zu untersuchenden Struktur zunutze, die über antigene Eigenschaften für spezielle Antikörper verfügen. Als mögliche Antigene fungieren Peptid-, Oligosaccharid- oder Nucleosid-Sequenzen. Bei den immunhistochemischen Analysen wurde die indirekte Methode angewendet, bei der ein unkonjugierter

ter Primärantikörper spezifisch an das gesuchte Antigen im Präparat bindet. Ein Sekundärantikörper bindet spezifisch an den Fc-Teil des Primärantikörpers und ist konjugiert mit einer Markersubstanz, in diesem Falle Biotin, ein wasserlösliches Vitamin. Biotin wiederum fungiert als Bindungspartner für Streptavidin, einem gentechnisch hergestelltem Derivat des Hühnereiweißes Avidin (isoliert aus *Streptomyces avidinii*). Zur Anwendung kam an Meerrettich-Peroxidase gebundenes, sog. Labeled Streptavidin (LSAB-Methode: Labeled Streptavidin Biotin-Methode).

Der Komplex aus gesuchtem Gewebeantigen, Primärantikörper, biotinyliertem Sekundärantikörper wurde somit durch die LSAB-Methode sichtbar gemacht, wobei die enthaltene exogene Peroxidase ein Chromogen, gelöstes 3,3'-Diaminobenzidin (DAB, Spezifikation siehe Punkt 5.2.3 Färbeprotokoll) unter Reduktion von  $H_2O_2$  oxidiert. Das oxidierte Diaminobenzidin polymerisiert und bildet einen unlöslichen, rot-bräunlichen Niederschlag.

### 6.2.2 Antikörper

Antikörper sind Proteine, die von B-Lymphozyten (Plasmazellen) als Reaktion auf die Exposition von Antigenen synthetisiert werden und zählen zum spezifischen körpereigenen Abwehrsystem eines Organismus.

Immunelektrophoretisch unterscheidet man die Immunglobulinklassen IgG, A, M, D, und E, wobei das IgG quantitativ die größte Klasse darstellt und auch das in Diagnostik und Forschung meistverwendete ist. IgG ist ein Glykoprotein mit zwei langen H-Ketten (H = heavy) und zwei kurzen L-Ketten (L = light), wobei die Polypeptidketten durch Disulfidbrücken verbunden sind.

Zur immunhistochemischen Beurteilung der Calpainaktivität unter Normothermie- und Hypothermiebedingungen sowie der Aktivität unter dem Einfluss verschiedener rtPA-Dosen, wurde ein Antikörper gewählt, der spezifisch an die große 76 kD Untereinheit von  $\mu$ Calpain bindet (R&D Laboratories, Munich, Germany). Der Vorteil in der Verwendung dieses Antikörpers besteht in der Erkennung und Bindung an das 76 kDa-Fragment, das ein enzymatisch aktives Autolysat des  $\mu$ -Calpains darstellt und somit Hinweise auf tatsächliche Calpain-Aktivität zulässt.

Die zur Detektion benötigte Kopplung an einen Sekundärantikörper erfolgte mit einem biotinylierten anti-rabbit IgG (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA).

### 6.2.3 Färbeprotokoll

Aufgrund der guten Repräsentation des Infarktareals wurden 10 $\mu$ m-Kryoschnitte aus dem Bereich des Bregma +/- 1 mm für die Färbung verwendet (Abb. 6). Die Schnitte enthielten sowohl die ischämische als auch die nicht-ischämische Hemisphäre.

Die bei -80°C konservierten Schnitte wurden bei Raumtemperatur aufgetaut, getrocknet und anschließend 5 Minuten in einem Aceton/Chloroform-Gemisch (Verhältnis 1:1) fixiert.

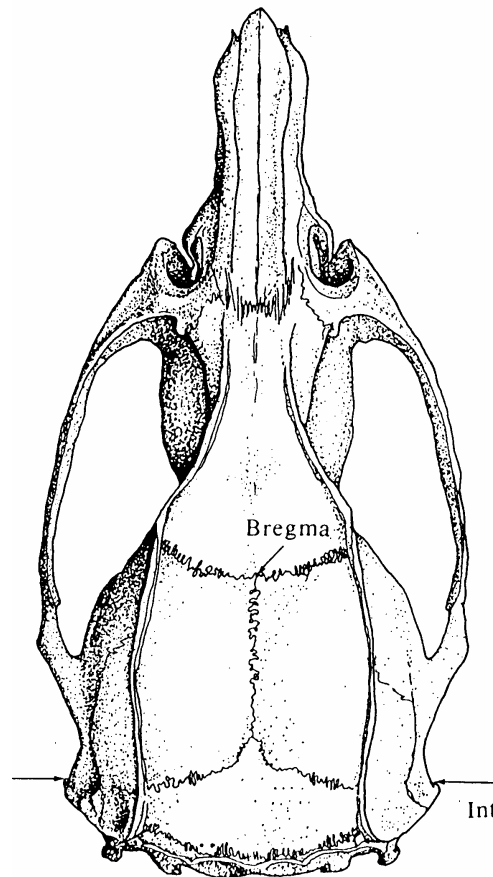


Abb.. 6: Rattenschädel, knöcherne Bestandteile, von oben. Lokalisation des Bregma als Landmarke für die Wahl der Schnittebene. Das Bregma markiert die Kreuzung der Koronarnaht (horizontal) und der Sagittalnaht (vertikal).

Nach dreimal 5-minütigem Spülen in Phosphat gepufferter Kochsalz-Lösung (PBS:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1,48g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,43g, NaCl 7,2g in 1000ml  $\text{H}_2\text{O}$  dest., pH 7,15) wurden die Schnitte 20 Minuten bei Raumtemperatur (RT) in Blotto-Lösung (Tris saline stock 100ml, nonfat dry milk 5g, horse serum 1ml, Natriumazid 20mg) inkubiert, um unspezifische Bindungen im Folgenden zu vermeiden.

Anschließend wurde jeder Schnitt über 2 Stunden bei  $37^\circ\text{C}$  und danach über Nacht bei  $4^\circ\text{C}$  mit dem Primärantikörper inkubiert.

Die Konzentration des Antikörpers betrug dabei 1:50, gelöst in reagent diluent (Tris saline stock 50ml, BSA 20mg, Thimerosal 25mg).

Nach einer 3x10 Minuten langen Spülung mit Phosphat-Buffer Lösung (PBS), wurden die Schnitte mit dem biotinylierten Sekundärantikörper (biotinyliertes anti-rabbit IgG ;Vector Laboratories , Burlingame, CA, USA; Verdünnung 1:200 in 1ml PBS mit  $15\mu\text{l}$  Horse-Serum,  $1\mu\text{l}$  Tween 20[Merck 822184]) 60 Minuten lang bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert.

Nach einer erneuerten Spülung mit PBS über 3x10 Minuten, folgte die Blockade der endogenen Peroxidase, indem die Schnitte 20 Minuten in einer Lösung von 100µl 30%  $H_2O_2$  in 100ml PBS inkubiert wurden.

Nach Spülungen mit Leitungswasser (3 Minuten) und PBS (3x5 Minuten) folgte die Inkubation mit Streptavidin (horse radish peroxidase HRP, PO 397, DAKO, Denmark; 20µl Streptavidin, 1ml PBS, 1µl Tween) bei 37°C im Dunkeln für 30 Minuten.

Nach weiteren Spülgängen mit PBS (3x5 Minuten) und destilliertem Wasser (15 Sekunden) wurde als Chromogen DAB (3,3'-Diaminobenzidin, Peroxidase Substrate Kit, SK 4100, Vector Laboratories, Burlingame, CA94010; Konzentrationen entsprechend Herstellerangaben) für 3-6 Minuten in Abhängigkeit von der Färbintensität aufgetragen und die Schnitte schließlich 3 Minuten in Leitungswasser gespült und anschließend getrocknet.

Negativkontrollen wurden bei jeder Färbung durchgeführt.

Die Fixierung der gefärbten Hirnschnitte erfolgte durch Einbettung in Glycerin-Gelatine (Kayser's Glycerin-gelatine, OB 065823, Merck, Darmstadt, Deutschland) und Versiegelung mittels eines Deckglases.

## 7. Videoimaging

Die Auswertung der Calpain-positiven Zellen als Peroxidase-gefärbte Zellen erfolgte mittels eines Lichtmikroskops (Zeiss, Axioskop 2, Germany), das mit einer Videokamera (Sony, Power HAD, Japan) gekoppelt war. Dazu wurde zunächst der gesamte Hirnschnitt unter einem 5-fach Objektiv digitalisiert und in ein Videoimagingssystem (Optimas Software, Version 6.5 von Media Cybernetics, Silver Spring, USA) importiert.

Abb. 7 illustriert den Ablauf der einzelnen Arbeitsschritte als Flussdiagramm.

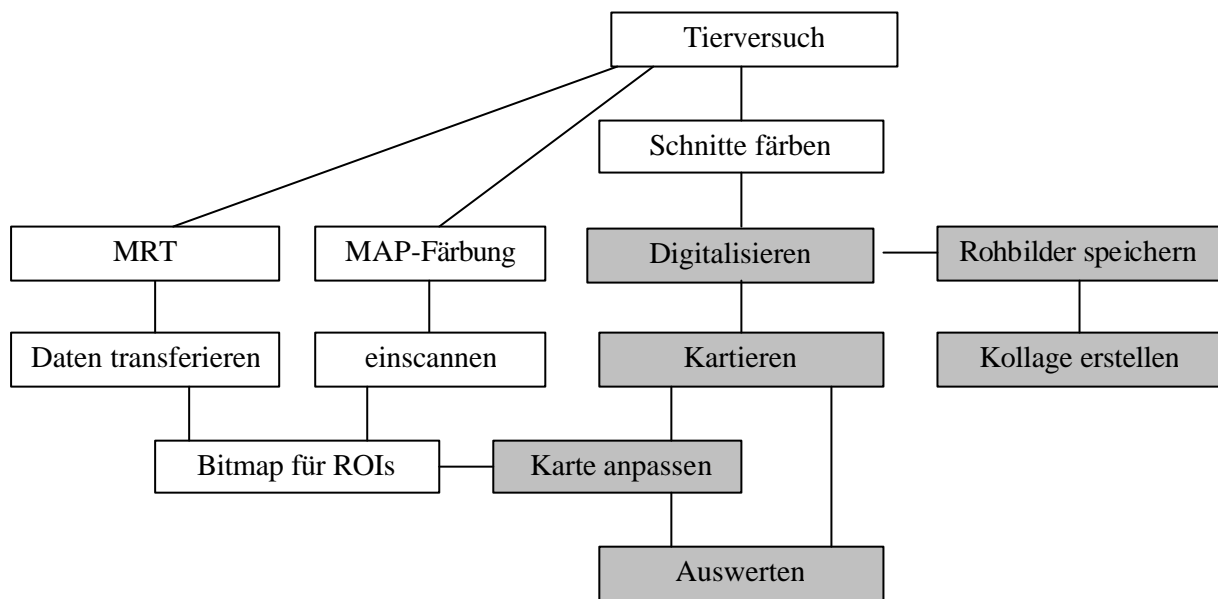


Abb. 7: Darstellung der Einzelschritte der digitalen Bildverarbeitung mit Optimas-Software. Die grau hinterlegten Kästen repräsentieren die vom Computer automatisiert vollzogenen Arbeitsschritte.

Dazu wurden auf jedem Hirnschnitt computerbasiert folgende vier Regionen demarkiert: Ipsilateral zu MCAO-R, i.e. der ischämischen Hemisphäre, erfolgte die Unterteilung in ein kortikales und subkortikales Infarktareal (Basalganglien), entsprechend wurde auf der kontralateralen, nicht-ischämischen Seite verfahren, so dass vier sogenannte regions of interest, ROI, entstanden (Abb. 8).

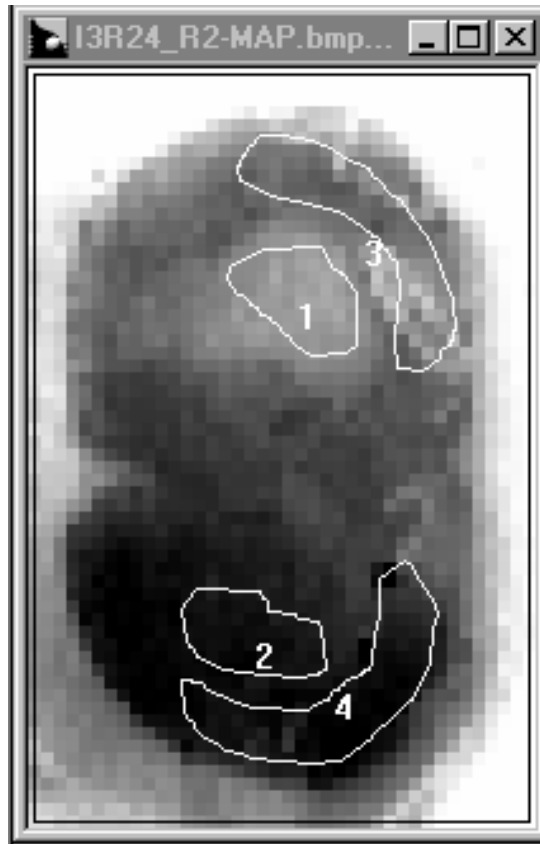


Abb. 8: Screenshot eines digitalisierten Hirnschnittes (MAP-2 –Färbung). Darstellung der kortikalen Regions of interest (ROI) auf der ischämischen (3) und nicht ischämischen Hemisphäre (4) sowie der ROI's in den Basalganglien auf der ischämischen (1) und nicht ischämischen (2) Hemisphäre. (Vergrößerung x50)

Die einzelnen ROI's wurden separat analysiert und anschließend der relative Anstieg der Calpain-positiven Zellen in dem Vergleich zweier korrespondierender ROI's ermittelt:

$ROI_{\text{Kortex ipsilateral}}$  vs  $ROI_{\text{Kortex kontralateral}}$

$ROI_{\text{Basalganglien ipsilateral}}$  vs  $ROI_{\text{Basalganglien kontralateral}}$

## 8. Infarktvolumentrie

Die volumetrische Darstellung des infarzierten Gewebes erfolgte auf der Basis der immunhistochemischen Darstellung mittels MAP-2-Färbung. Dabei dient Membran-assoziiertes Protein 2, MAP-2, als Marker für die ischämische Zellschädigung. MAP-2 fungiert als Substrat für intrazelluläre Proteasen und wird im Falle zerebraler Ischämie von Calpain hydrolysiert.

Die Calpain-vermittelte Destruktion von MAP-2 dient somit als Marker für den intrazellulären neuronalen Schaden. Die dabei generierten Spaltprodukte werden durch den verwendeten monoklonalen Antikörper (Boehringer Ingelheim, Cat. No. 1284959) nicht detektiert, d.h. es entsteht in der MAP-Darstellung ein Negativbild des Infarktareals (Abb. 9).

Das Färbeprotokoll der MAP-Färbung entsprach in den Einzelschritten dem Protokoll der Calpain-Färbung mit Ausnahme des verwendeten Primärantikörpers (s.o.) in der Konzentration 1:800 und des Sekundärantikörpers (biotinyliertes anti-Maus-IgG, BA 2001, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) in der Konzentration 1:200.

Zur Analyse der MAP-2-Proteolyse wurden Hirnschnitte in 500 $\mu$ m-Abständen gefärbt und anschließend gescannt (Epson Perfection 1240U flatbed scanner), und in Optimas (Version 6.5, Media Cybernetics, Silver Spring, USA) importiert. Das infarzierte Areal wurde durch ein halb-automatisiertes Verfahren markiert und dessen Größe in das metrische System konvertiert. Der nächste Schritt bestand in der Ermittlung des partiellen Volumens zwischen zwei benachbart liegenden Schnitten, wobei die Formel zur Volumenbestimmung eines sphärischen Körpers zugrunde liegt:



Partialvolumen =

$$\frac{(\text{Fläche}_{i-1} + \text{Fläche}_i + (\text{Abstand zwischen den Schnitten } i - 1_i)^2 \times (\text{Abstand zwischen den Schnitten } i - i,1))}{2},$$

wobei sich Fläche<sub>1,2,3...n-1</sub> auf die Größe des infarzierten Areal jedes der seriellen Schnitte bezieht und Fläche<sub>0</sub> respektive Fläche<sub>n</sub> den ersten bzw. den letzten Schnitt der Serie ohne Infarkt bezeichnet. Das Infarktvolumen errechnete sich demnach als Summe der Partialvolumina:

Infarktvolumen = Gesamtvolumen = S (partielle Volumina)

Die erhaltenen Daten wurden als Mittelwert  $\pm$  SD angegeben.

Die Werte aus Infarktarealen wurden mit Werten aus nicht ischämischen Kontroll-Arealen mittels eines Mann-Whitney Testes auf einem Signifikanzniveau von 5% verglichen.

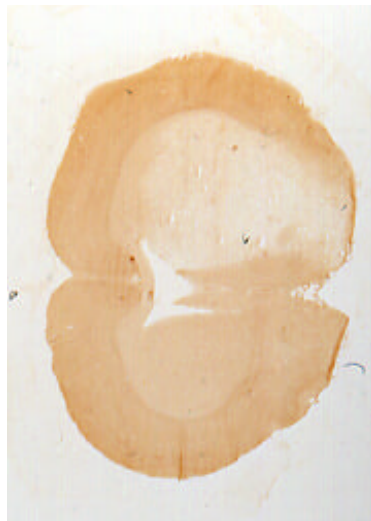


Abb. 9: Hirnschnitt (Ratte), Koronarebene. Demarkierung des Infarktareals in der ischämischen Hemisphäre (oben) in der MAP-2-Färbung. Infarziertes Gewebe stellt sich heller/ungefärbt dar. Vergrößerung x50.

## 9. Proteinisolierung und Western Blot

Der semiquantitative Nachweis von Calpain erfolgte mittels Western Blot.

(A) Durchführung und Protokoll: Sämtliche Arbeitsschritte zur Proteinisolierung und Zentrifugation wurden bei 4° C durchgeführt.

Das Material für die Western Blots wurde aus 10µm-Kryoschnitten mittels Skalpell abgekratzt, wobei für jeden Blot 6 Objektträger mit je 2 Hirnschnitten, also insgesamt 12 Hirnschnitte, verwendet wurden. Zur Differenzierung zwischen kortikalen und basalganglionären Infarktanteilen wurden entsprechende Areale separat isoliert. Zu Kontrollzwecken erfolgte dasselbe Procedere auf der kontralateralen Seite, so dass pro Hirnschnitt 4 separate Gewebefractionen resultierten: Kortex ipsilateral/kontralateral und Basalganglien ipsilateral/kontralateral, jeweils bezogen auf die Seite der Ischämie. Standardisierterweise entstammten die Schnitte der Koronarebene +/- 1,2 mm vom Bregma.

Das gewonnene Material wurde anschließend erst für 2 h in flüssigem Stickstoff tiefgekühlt und dann der Proteinisolierung zugeführt.

Jede Gewebefraktion wurde mit 500 µl Homogenisierungspuffer (20mM TrisHCl [4ml], 150 mM NaCl [3ml], 5mM EDTA [1ml], 5mM EGTA [1ml], 1mM DTT [0,1ml], 100µl PMSF, 1 ml 5% SDS; pH 7,4; 2° - 4° Celsius) versetzt und anschließend unter Eiskühlung gemörsert. Das entstandene Homogenisat wurde 30 min bei 4° Celsius inkubiert und nachfolgend 10 min bei 4500 U/min zentrifugiert.

Der durch Zentrifugation gewonnene Überstand wurde in Volumina von 20 µl in Eppendorf-Cups unter Zugabe von 5 µl Western Blot-Auftragspuffer (aus stock solution: 9 ml 0,5 M Tris/HCl [pH 6,8], 4,0g SDS 15%, 20ml H<sub>2</sub>O, 13g Glycerin 45%, Spatelspitze Bromphenolblau 0,02%; Gesamtvolumen: 188ml stock solution und 12µl 2-Mercaptoethanol (Sigma, lot 062KO114) verdünnt.

Die Homogenisierungslösung wurde 5 Minuten im Wasserbad gekocht und anschließend 30 Sekunden bei 14.000 U/min zentrifugiert.

Der für die folgende Elektrophorese notwendige Ionenpuffer wurde in Form eines Einfach-SDS-Puffers zugegeben (aus 10-fach SDS-Puffer; 10g SDS, 30g Tris, 144g Glycin; ad 1l H<sub>2</sub>O).

Das Zentrifugat wurde für die Elektrophorese auf ein 10% SDS-Gel aufgetragen mit einer Laufzeit von 2h bei 80 V. Die Proteinseparation erfolgte somit als SDS-PAGE, die Proteinkonzentrationen wurden standardmäßig mittels eines Bradford Protein Assays (TEBU GmbH, Deutschland) mit BSA als Standard ermittelt.

Im Anschluss daran wurden die Proteine bei 4° C auf eine PVDF Membran (Sequi-Blot; Bio-rad) mit einer Laufzeit von 1 h bei 400 mA mittels eines Transfer-Puffers (10mM CAPS, pH 11.0 in 10% Methanol) transferiert. Nach der Immobilisation wurden die Membranen mit Ponceau S gefärbt, um gleiches Protein-Loading in allen Proben zu verifizieren.

Die Blots wurden in 3% BSA in TBS (Tris buffered saline) unter Zugabe von 0,2% Tween (TBST) bei Raumtemperatur 1 h blockiert.

Anschließend wurden die Blots mit anti- $\mu$ -Calpain (R&D Laboratories, Munich, Germany), das in einer Konzentration von 1:1000 in einer Blockier-Lösung (3% BSA in TBST) angesetzt wurde, über Nacht bei 4°C inkubiert.

Auf die Inkubation mit dem Primärantikörper folgte nach dreimaligem Waschen über je 10 Minuten in TBS die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (Konzentration 1:200 in TBST; biotinyliertes anti-rabbit-IgG, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) für 1 h bei RT.

Im nächsten Schritt wurde als exogene Peroxidase Avidin-Biotin-Komplex (AB-Komplex, Vectastatin Elite Kit, PK 6100, Dosierungen nach Herstellerangaben) für 30 Minuten bei RT zugegeben, nachdem die Blots zuvor nochmals mit TBST gespült worden waren.

Nach erneutem Waschen (3 x 10 Min in TBST) folgte zum Schluss des Western Blot-Protokolls die Entwicklung der Blots mittels eines ECL Development Kits (Amersham Biosciences, UK). Damit ist umfasst jeder Blot mindestens drei Experimente.

(B) Auswertung der Western Blots: Der densitometrische Vergleich der verschiedenen Banden gelang mittels eines optischen Analyse-Programmes (Tina, Version 2.08, Raytest Isotopenmessgeräte GmbH, Deutschland), wobei die Resultate auf einer arbiträren OD-Skala (OD = optical density) abgebildet wurden.

Um Vergleichbarkeit zwischen den einzelnen Proben, die auf mehrere Gele verteilt waren, zu gewährleisten, wurde die Proteinmenge der ischämischen Seite durch Division durch die Proteinmenge der nicht-ischämischen Seite normalisiert.

## **10. Immunfluoreszenz**

### **10.1 Methode**

Immunfluoreszenzfärbungen sind methodisch den oben besprochenen immunhistochemischen Färbungen ähnlich. Analog zu letzteren wurde auch hier ein indirektes Verfahren angewendet, bei dem zunächst ein unkonjugierter Primärantikörper auf das im Präparat darzustellende Antigen aufgetragen wurde. Die farbliche Detektion der gesuchten Strukturen gelang in diesem Experiment durch die Kopplung eines gegen den Fc-Teil des Primärantikörpers gerichteten

fluorochromierten Sekundärantikörpers (cy-2/cy-3, siehe Tabelle unten), der im Fluoreszenzmikroskop angeregt wird, wodurch ein Farbsignal sichtbar wird.

Vorteil dieser Methode bei der vorliegenden Fragestellung ist zum einen die hohe Kontrastschärfe vor dunklem Hintergrund und insbesondere die exaktere Darstellung feiner Strukturen. Letzteres liegt an den im Vergleich zu den enzymatischen Färbemethoden wesentlich kleineren Farbmolekülen. Bei der Frage nach dem Vorhandensein zweier in einer Zelle lokalisierter Antigenen und deren farblicher Darstellung ist speziell die fehlende/minimale Hintergrundfärbung ein Hauptkriterium für die Auswertbarkeit.

Das Experiment wurde als Doppelfluoreszenzstudie durchgeführt, was bedeutet, dass jedes Präparat gleichsam simultan auf die Expression zweier antigener Strukturen untersucht wurde. Dazu wurden die Schnitte mit zwei spezifischen Primärantikörpern beschickt und jeder der beiden an ein Fluorochrom mit unterschiedlichem Farbsignal gekoppelt. In der Konsequenz entstehen zwei Fluoreszenzfärbungen an einem Präparat, die je nach Filter sowohl getrennt von einander als auch als kolokalisierte Doppelmarkierung untersucht werden können.

Nach diesem Prinzip erfolgte die Immunfluoreszenz-Analyse des Verteilungsmusters Calpain-positiver Zellen unter konstanter Ischämie-Dauer von  $I = 3h$  und variabler Reperfusionsdauer (angegeben in h) R0 (keine Reperfusion), R3, R6, R9, R24.

## 10.2 Antikörper

Das zugrunde liegende Prinzip war die Detektion Calpain-positiver Zellen durch einen anti-Calpain-Antikörper (1:200; Anti-Calpain-1, large subunit, aus Hase, Calbiochem 208732, It B24833) sowie die Markierung eines spezifischen Zelltyps durch einen Antikörper, der spezifisch nur an zelluläre Antigene des jeweiligen Zelltyps bindet.

Durch einen zellspezifischen Antikörper wurden folglich bestimmte Zellarten identifiziert und auf das Vorliegen einer durch Calpain bedingten Fluoreszenz überprüft.

Folgende Zellarten des ZNS wurden mit spezifischen Antikörpern als Primärantikörper detektiert und auf Kolokalisation mit Calpain-Positivität untersucht:

- Neuronen
- Mikroglia
- Endothelzellen

Die folgende Übersicht (Tab 1) gibt die Spezifikation der für den jeweiligen Zelltyp verwendeten Antikörper und die im Rahmen dieses Projektes experimentell ermittelten optimalen Konzentrationen wieder:

Neuronen	NeuN, Dianova, MAB 377, lt 21030466; Wirt: Maus IgG, monoklonal	1:1000
Mikroglia	Anti-GFAP, cloneG-A-5, Sigma, G3893; Maus IgG, monoklonal	1:100
Endothelzellen	Anti-CD-31(PECAM-1), klone TLD 3A12, Chemicon, MAB 1393, lt 22031541; Maus IgG1,	1 : 200

Tabelle 1: Übersicht Primärantikörper Immunfluoreszenz: Spezifikationen und verwendete Konzentrationen

Als Sekundärantikörper wurden cy-3 respektive cy-2 als Fluorochrome verwendet, nachfolgende Tabelle gibt deren Spezifikationen wieder:

Cy-2	Anti-Maus, Dianova, 715225150, lt 49685	1:200
Cy3	Anti-Hase, Dianova, 705165102, lt 40813	1:200

Tabelle 2: Übersicht Sekundärantikörper Immunfluoreszenz: Spezifikationen und verwendete Konzentrationen

Cy-2, Carbocyanin, ist ein grün leuchtendes, relativ photostabiles Fluorochrom mit einem Absorptionsspektrum von 490 nm und einem Emissionsspektrum von 508 nm. Cy-3, Indocarbocyanin, leuchtet rot und hat typischerweise eine hohe Fluoreszenzausbeute bei einem Absorptionsspektrum von 550 nm und einem Emissionsspektrum von 570 nm.

In Anlehnung an die Spezifikation der Primärantikörper ergab sich folgendes Schema für die Kombination von Primär- und Sekundärantikörper (Tabelle 3):

Primärantikörper	Sekundärantikörper	Farbsignal
Anti-Calpain-1, Calbiochem, 208732, Wirt: Hase (IgG)	Cy3, Anti-Hase, Dianova	rot
Anti-NeuN, dianova, MAB 377, Wirt: Maus (IgG)	Cy2, Anti-Maus, Dianova	grün
Anti-GFAP, Sigma, G3893; Wirt: Maus (IgG)	Cy2, Anti-Maus, Dianova	grün
Anti-CD-31, Chemicon, MAB 1393, Wirt: Maus (IgG)	Cy2, Anti-Maus, Dianova	grün

Tabelle 3: Kombinationen Primär-/Sekundärantikörper Immunfluoreszenz und resultierendes Fluoreszenz-Signal.

### 10.3 Färbeprotokoll

Das protokollarische Procedere der Immunfluoreszenzfärbung erfolgte stets nach demselben Schema, lediglich die verwendeten Antikörper (Primär-/Sekundär-) variierten entsprechend den o. g. Schemata.

Aufgrund der guten Repräsentation des Infarktareals wurden, analog der immunhistochemischen Färbung, 10µm-Kryoschnitte aus dem Bereich des Bregma +/- 1 mm für die Färbung verwendet. Die Schnitte enthielten sowohl die ischämische als auch die nicht-ischämische Hemisphäre.

Die bei -80°C konservierten Schnitte wurden bei Raumtemperatur aufgetaut, getrocknet und anschließend 5 Minuten in einem Aceton/Chloroform-Gemisch (Verhältnis 1:1) fixiert.

Nach dreimal 5-minütigem Spülen in Phosphat gepufferter Kochsalz-Lösung (PBS, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,48g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,43g, NaCl 7,2g in 1000ml H<sub>2</sub>O dest., pH 7,15) wurden die Schnitte 20 Minuten bei Raumtemperatur (RT) in Blotto-Lösung (Tris saline stock 100ml, nonfat dry milk 5g, horse serum 1ml, Natriumazid 20mg) inkubiert, um unspezifische Bindungen im Folgenden zu vermeiden.

Das Auftragen der beiden Primärantikörper vollzog sich in zwei Schritten:

Zunächst wurde Anti-m-Calpain (Konzentration 1:200, in reagent diluent (Tris saline stock 50ml, BSA 20mg, Thimerosal 25mg) aufgetragen und 30 min bei RT inkubiert, bevor im zweiten Schritt der zweite Primärantikörper (Konzentration siehe Tabelle, ebenfalls in reagent diluent) hinzugefügt wurde.

Nach der Beschickung mit beiden Antikörpern wurde jeder Schnitt über 2 Stunden bei 37°C und danach über Nacht bei 4°C inkubiert.

In der Folge wurden die inkubierten Objektträger erneut gewaschen (3 x 10 min in PBS).

Der nächste sowie alle weiteren Schritte wurden unter Lichtschutz vollzogen, was durch Reduktion des Tageslichtes auf ein Minimum und Abschirmung sämtlicher Reagenzien und der Kammer für die Objektträger durch handelsübliche Alufolie realisiert wurde:

Die Sekundärantikörper wurden in folgender, analoger Weise zu den Primärantikörpern appliziert: cy3 (Konzentration 1:200 in PBS) 30 min Inkubation bei RT, cy2 (Konzentration 1:200 in PBS), anschließend Inkubation bei 37°C über 1h.

Abschließend erneut Spülung mit PBS (3 x 10 min) zur Entfernung überschüssiger, nicht Antigen-gebundener cy2/3-Moleküle.

Vor der Konservierung der Schnitte in Fluoreszenzmedium (Vectashield Mounting Medium For Fluorescence, Vector Pharma) und Abschluss mittels Deckglas wurde überschüssige Spüllösung unter Feuchthaltung der Schnitte abgetupft. Den letzten Schritt stellte die Versiegelung der Grenzfläche zwischen Deckglas und Objektträger mit konventionellem Nagellack dar, um das nicht aushärtende Medium vor Austrocknung zu schützen.

Zum Ausschluss von Autofluoreszenz- und Kreuzreaktionsphänomenen wurden jeweils Negativkontrollen (ohne Primärantikörper) durchgeführt. (Abb. 10)

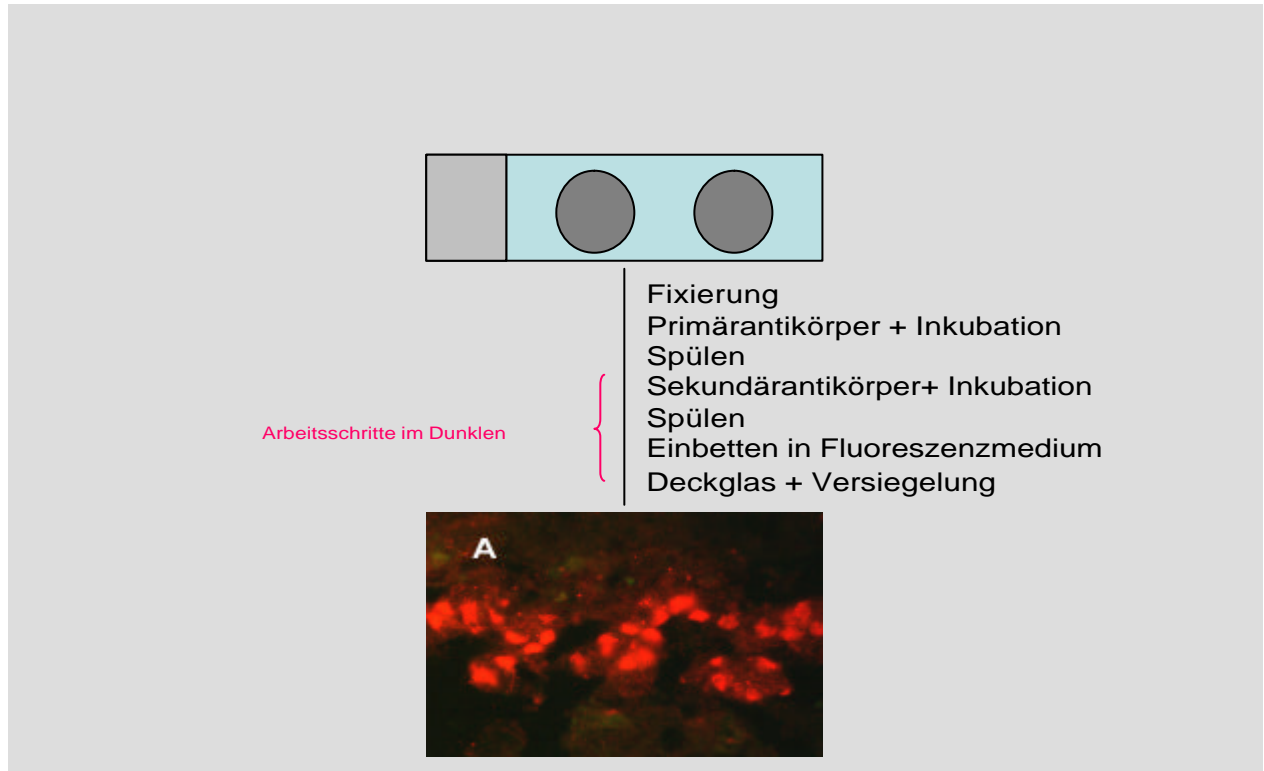


Abb. 10: Schematische Darstellung der Fluoreszenzfärbung. Objektträger mit zwei Hirnschnitten (graue Kreise). Rotes Fluoreszenz-Signal durch Verwendung von cy3 als Sekundärantikörper. Vergrößerung x100.

#### 10.4 Auswertung

Die Auswertung erfolgte mit einem an eine Fluoreszenzlampe (Quecksilberdampf-Kurzbogenlampe HBO 50, Osram, über Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland) gekoppeltes Lichtmikroskop (Zeiss, Axioskop 2, Germany).

Zur Anwendung kam im vorliegenden Experiment die Auflicht-Fluoreszenzmethode. Dabei gelangt das erzeugte Licht über ein Wärmeschutzfilter auf das Anregungsfilter. Die gefilterte kurzwellige Anregungsstrahlung wird nach Reflexion durch einen dichromatischen Strahlenteiler über das Objektiv auf das Präparat fokussiert. Das Präparat, d.h. das Fluorochrom, absorbiert die kurzwellige Strahlung und emittiert eine längerwellige Fluoreszenz-Strahlung gemäß dem Stokes'schen Gesetz.

In Anlehnung an die emittierten Wellenlängen der Fluorochrome wurden folgende Filter zur Detektion verwendet:

Cy2	Filter rot	Signal grün
Cy3	Filter grün	Signal rot
Cy2/Cy3	Filter blau	Signal gelb (Kokalisation)

Tabelle 4: Überblick über Fluorochrome, zugeordnete Filter und detektiertes Fluoreszenzsignal.

Bei einer Gesamtvergrößerung von  $\times 400$  wurden an jedem Präparat jeweils repräsentative Gesichtsfelder im Bereich des ischämischen Kortex sowie der ischämischen Basalganglien numerisch erfasst und der Mittelwert ( $n = 6$ ) gebildet.

Der Analyse lagen dabei zwei Schemata zugrunde. Zum einen wurde untersucht, wie hoch der Anteil Calpain positiver Zellen innerhalb einer bestimmten Gruppe von Zellen in Abhängigkeit von R (0, 3, 6, 9, 24) sei. Dieser Anteil wurde in Prozent angegeben und jeweils auf  $\times \frac{\text{calpain+NeuN/GFAP/CD31}}{100 \text{ NeuN/GFAP/CD31}}$  positive Zellen bezogen.

1. Identifikation und Zählung von 100 NeuN/GFAP/CD31 positiven Zellen im Gesichtsfeld, repräsentiert durch das cy-2 assoziierte rote Signal. Dadurch Festlegung der spezifischen Gesamtfluoreszenz auf 100%.

2. Identifikation und Zählung aller doppeltfluoreszenten Zellen, repräsentiert durch das cy-2/cy-3-assozierte gelbe Signal. Die korrekte Erfassung doppelt fluoreszenter Zellen erfolgte durch wiederholtes, exaktes Abgleichen mit der cy3-Fluoreszenz unter dem entsprechenden Filter.

3. Berechnung des prozentualen Anteils der doppelt markierten Zellen an der Gesamtzahl Calpain-positiver Zellen. Darstellung als  $\times \frac{\text{doppelt positiv}}{100(\%)}$ .



Die Einzelwerte der Präparate wurden für jede Gruppe ( $n = 6$ ) und jeden Zelltyp zusammengefasst und als Mittelwerte  $\pm$  SD angegeben.

Zum anderen wurde untersucht, wie hoch der prozentuale Anteil einzelner Zellarten an der Gesamtzahl Calpain positiver Zellen sei. Dazu wurde ein reziprokes Zählverfahren angewendet, bei dem die Calpain positiven Zellen die Grundgesamtheit darstellten. Daher wurde ermittelt, wie viele Zellen positiv waren für einen zellspezifischen Marker und Calpain (gelbes Signal) bezogen auf 100 Calpain positive Zellen (rotes Signal). Somit konnte der Anteil einzelner Zellarten an der Calpain-Gesamtaktivität in Abhängigkeit von R aufgeschlüsselt werden.

Die Einzelwerte der Präparate wurden für jede Gruppe ( $n = 6$ ) und jeden Zelltyp zusammengefasst und als Mittelwerte  $\pm$  SD angegeben.

Die nachfolgende Abbildungsreihe zeigt exemplarisch Hirnschnitte in Doppelfluoreszenztechnik zu verschiedenen Reperfusionzeiten (R0, R3, R6, R24). Die Schnitte wurden gefärbt mit anti-Calpain (1. Fluoreszenz, rot) und anti-NeuN (2. Fluoreszenz, grün), so dass speziell Neurone auf Kolokalisation mit Calpain untersucht werden konnten.

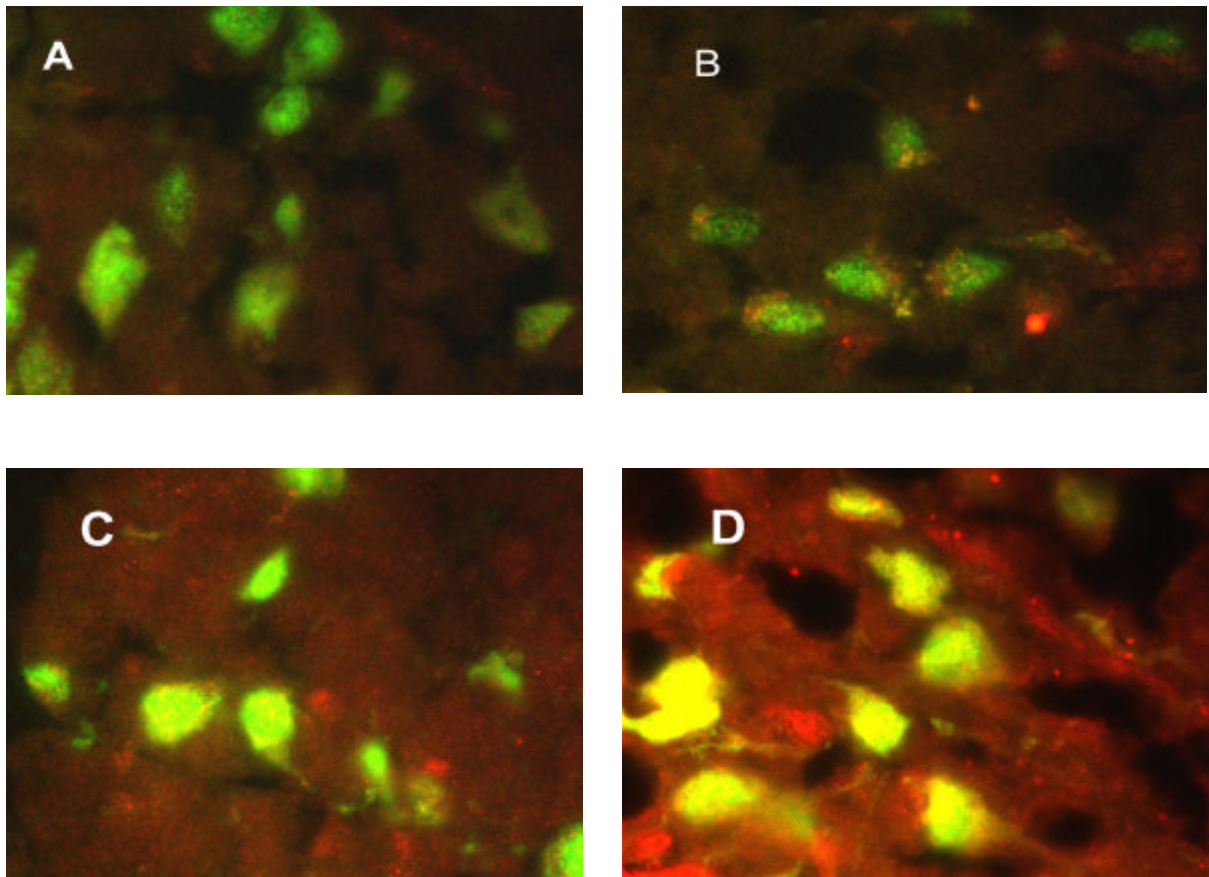


Abb. 11: Doppelimmunfluoreszenz-Markierung von Neuronen zu verschiedenen Ischämie-Reperfusionzeitpunkten. Neurone (antiNeuN, grün), aktiviertes Calpain (anti-Calpain, rot), Kolokalisation (gelb). Vergrößerung x400. (A) I3R0; (B) I3R3; (C) I3R6; (D) I3R24,

## 11. Statistik

Alle Daten wurden als Mittelwert  $\pm$  SD angegeben. Die Werte der Infarkt- und der Kontroll-Areale wurden mittels eines Mann-Whitney-Testes auf einem Signifikanzniveau von 5% verglichen.

Parametrische Daten der einzelnen Gruppen wurden mit der Varianzanalyse (One Way ANOVA) auf Signifikanz geprüft. Die Auswertung erfolgte mit Microsoft Excel® Software (Microsoft, California, USA).

### III. ERGEBNISSE

#### 1. Calpain-Differenzierung

##### 1.1 Kortex – absolute Verteilung Calpain positiver Zellen

Kortex und Basalganglien wurden getrennt von einander untersucht.

Im ersten Teil wurde die Frage behandelt, wie viele Zellen einer jeden Zellart in Abhängigkeit von R Calpainaktivität entwickelten.

Für den Kortex ergab sich nach Auszählung von jeweils 100 spezifisch markierten Zellen folgendes Bild (alle Angaben als Mittelwert  $\pm$  SD):

In der Gruppe der Neuronen, repräsentiert als NeuN positive Zellen, nahm die Zahl NeuN und Calpain positiver Zellen mit längerer Reperfusionsdauer stetig zu. Zum Zeitpunkt I3R0 waren  $9,6 \pm 2,1$  Neurone Calpain positiv, zum Zeitpunkt I3R3 (n = 6) waren es  $25,4\% \pm 4,4$  und zum Zeitpunkt I3R6  $34,2\% \pm 4,3$ . Nach 9 h Reperfusion stieg die Zahl auf  $49,6\% \pm 5,2$  und nach 24 h Reperfusion auf  $53,7\% \pm 7,6$ .

In der Gruppe der Mikroglia-Zellen, die spezifisch detektiert werden konnten durch den Antikörper gegen GFAP, lag der Wert Calpain positiver Zellen zum Zeitpunkt I3R0 bei  $0,3\% \pm 0,51$  und stieg auf  $1,2\% \pm 0,4$  zum Zeitpunkt I3R3 respektive  $1,8\% \pm 0,7$  zum Zeitpunkt I3R6. Mit  $4,1\% \pm 2,3$  wurde ein weiterer Anstieg nach 9 h Reperfusion beobachtet und ein Maximalwert nach 24 h Reperfusion von  $12,3\% \pm 3,5$  erreicht.

Ein im Verlauf ähnliches Bild ergab sich bei der Analyse der mittels anti-cd 31 markierten Endothelzellen. In dieser Gruppe stieg der Anteil Calpain positiver Zellen ausgehend von  $0,3\% \pm 0,5$  bei I3R0 über  $2,8\% \pm 0,7$  bei I3R3 und  $5,8\% \pm 2,5$  bei I3R6 auf  $10,2\% \pm 1,9$  zum Zeitpunkt I3R9. Der höchste Wert Calpain positiver Zellen zeigte sich auch in dieser Gruppe zum Zeitpunkt I3R24, der bei  $19,4\% \pm 4,2$  lag.

Abb. 12 gibt die zahlenmäßigen Verhältnisse im ischämischen Kortex für alle drei Zellarten wieder:

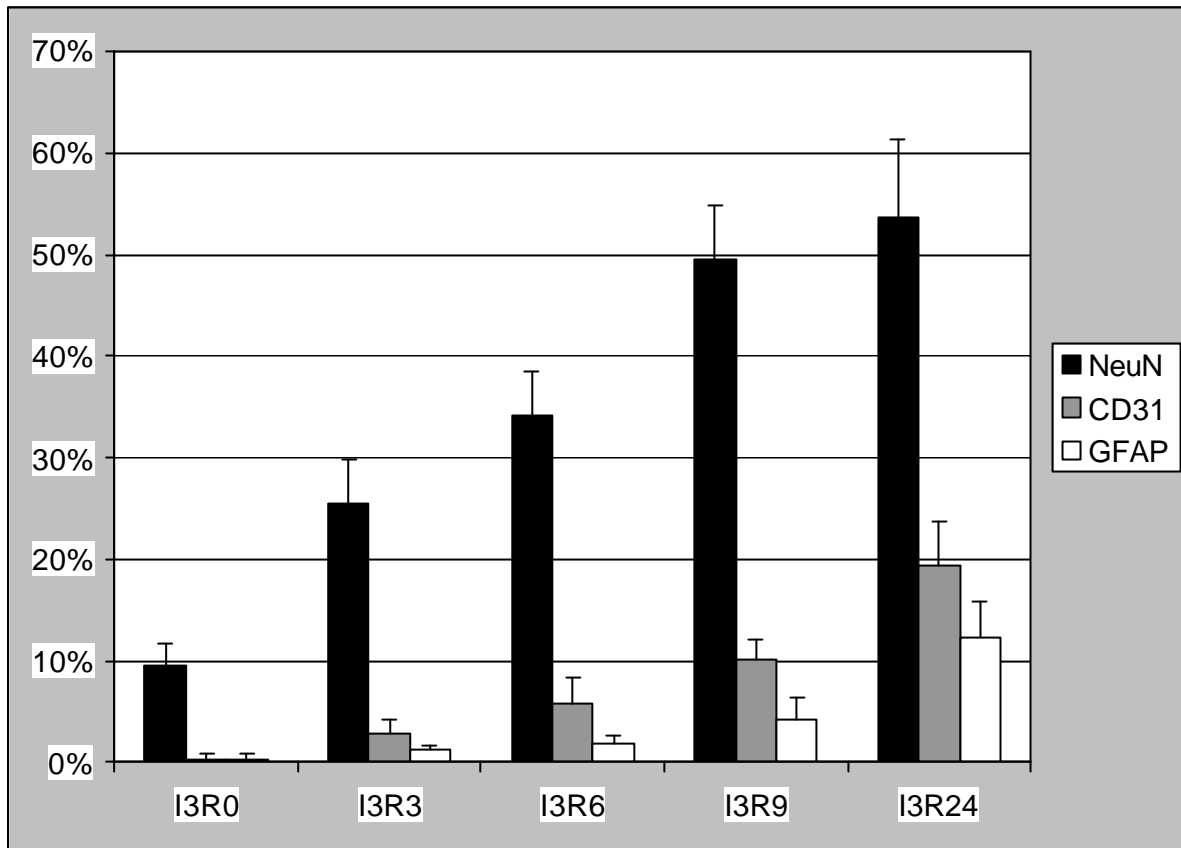


Abb. 12: Absolute Verteilung Calpain positiver Zellen im Kortex nach 3 h Ischämie und verschiedenen Reperfusionzeiten. Die schwarzen Säulen zeigen neuronale Zellen, die grauen Säulen zeigen CD31 positive Zellen und die weißen Säulen zeigen GFAP positive Zellen.

## 1.2 Kortex – relative Verteilung Calpain positiver Zellen

Im zweiten Teil der Differenzierungsanalyse wurden jeweils 100 Calpain positive Zellen ausgezählt und auf Kolo-kalisation mit zellspezifischen Markern geprüft. Ziel war hier die Bestimmung des relativen/prozentualen Anteils der jeweiligen Zellart an der Gesamtaktivität des Calpains.

In der Calpain/NeuN gefärbten Gruppe zeigte sich für den Kortex der ischämischen Hemisphäre zum Zeitpunkt I3R0 ein Neuronenanteil von  $87,7 \pm 4,8\%$ , nach 3 h Reperfusion ein Anteil von  $82,2 \pm 4,8\%$  sowie nach 6 h Reperfusion von  $76,0 \pm 8,1\%$ . Dieser prozentuale Anteil der neuronalen Zellen an der Gesamtzahl Calpain positiver Zellen ging in den Gruppen mit 9 h bzw. 24 h Reperfusion auf  $73,0 \pm 8,2\%$  (I3R9, n = 6) respektive  $61,0 \pm 8,9\%$  (I3R24, n = 6) zurück.

In der Calpain/GFAP gefärbten Gruppe war eine stetige Zunahme zu verzeichnen. In der Gruppe ohne Reperfusion (I3R0, n = 6) lag der Anteil GFAP positiver Zellen an der Gesamtzahl Calpain positiver Zellen bei  $2,7 \pm 1,9\%$ , nach 3 h Reperfusion (I3R3, n = 6) bei  $3,8 \pm 1,9\%$ . In der Gruppen mit 6 h bzw. 9 h Reperfusion stieg der Prozentsatz auf  $4,0 \pm 1,4\%$  (I3R6, n = 6) respektive  $6,0 \pm 2,2\%$  (I3R9, n = 6). Mit einem Anteil von  $14,0 \pm 2,8\%$  wies die Gruppe mit 24 h Reperfusion den höchsten Anteil an GFAP und Calpain positiven Zellen auf. In der Calpain/CD31 gefärbten Gruppe zeigte sich ein Anteil von  $2,7 \pm 2,2\%$  Endothelzellen (I3R0, n = 6) bzw.  $9,0 \pm 2,8\%$  (I3R3, n = 6). Dieser Anteil erhöhte sich in den Gruppen mit 6 h Reperfusion (I3R6, n = 6) auf  $12,8 \pm 3,3\%$  bzw.  $15,0 \pm 3,9\%$  nach 9 h Reperfusion (I3R9, n = 6). Am höchsten lag der mit  $22,0 \pm 6,8\%$  Prozentsatz auch hier in der Gruppe mit 24 h Reperfusion. Abb. 13 demonstriert diese Zusammenhänge im Zeitverlauf grafisch für alle drei untersuchten Zellarten im Verhältnis zur Calpain-Gesamtfluoreszenz.

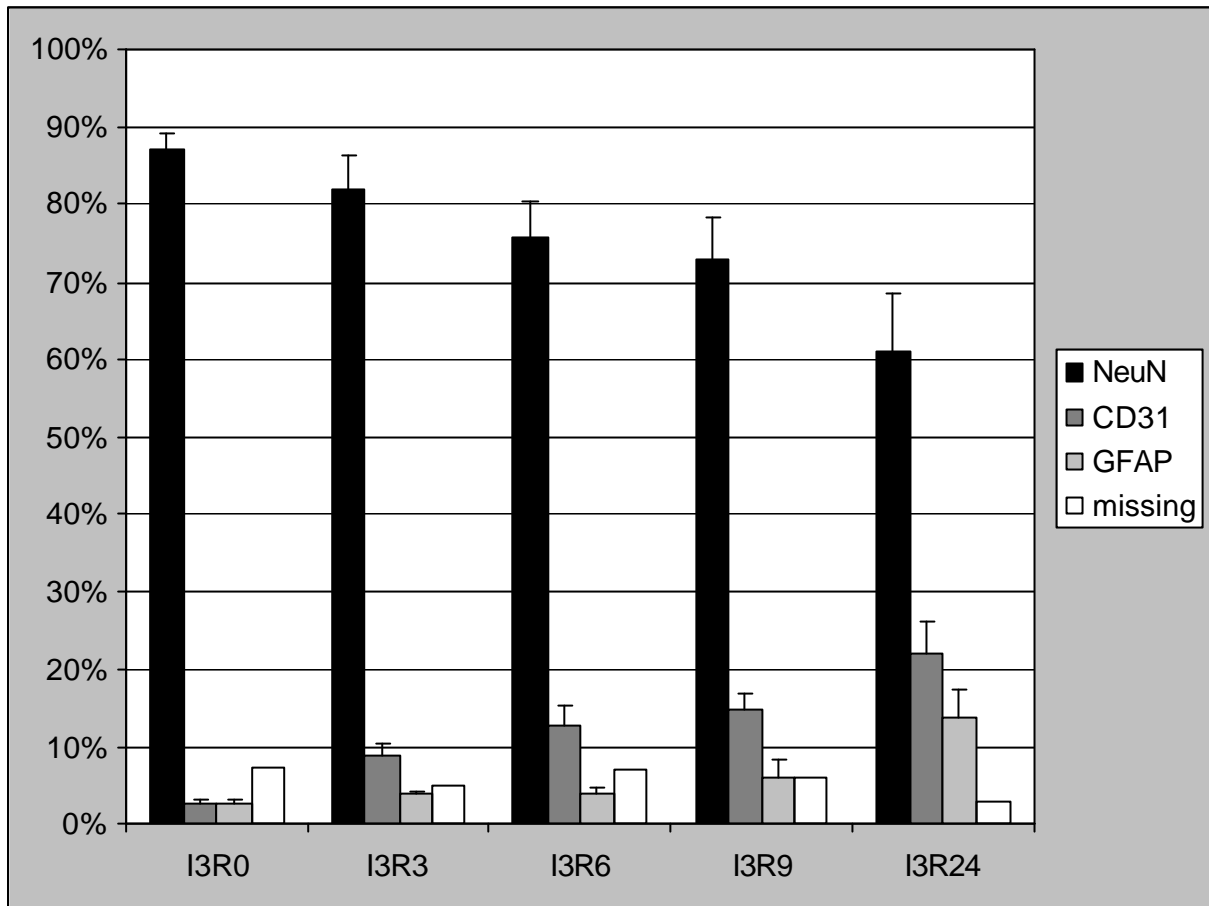


Abb. 13: Relative Verteilung Calpain positiver Zellen im Kortex nach 3 h Ischämie und verschiedenen Reperfusionzeiten. Schwarze Säulen zeigen neuronale Zellen, dunkelgraue Säulen CD31 positive Zellen, hellgraue Säulen GFAP positive Zellen und weiße Säulen ausschließlich Calpain positive Zellen ohne Doppelfärbung.

### 1.3 Basalganglien – absolute Verteilung Calpain positiver Zellen

Analog zum Kortex wurde auch in den Basalganglien der Frage nachgegangen, wie viele Zellen einer Zellart in Abhängigkeit von R Calpainaktivität entwickelten.

Die Auszählung von jeweils 100 spezifisch markierten Zellen erfolgte nach demselben Prinzip wie im Kortex (Alle Angaben als Mittelwert  $\pm$  SD, alle Gruppen mit  $n = 6$ ). In der Gruppe der Neuronen, repräsentiert als NeuN positive Zellen, nahm die Zahl Calpain positiver Zellen mit längerer Reperfusionsdauer stetig zu. Zum Zeitpunkt I3R0 waren  $7,0 \pm 3,0/100$  Neurone Calpain positiv, zum Zeitpunkt I3R3 waren es  $20,3\% \pm 2,9$  und zum Zeitpunkt I3R6  $24,8\% \pm 3,5$ . Nach 9 h Reperfusion stieg die Zahl auf  $26,8\% \pm 4,0$  und nach 24 h Reperfusion auf  $26,9\% \pm 7,7$ .

In der Gruppe der Mikroglia-Zellen, spezifisch detektiert durch anti-GFAP, lag der Wert Calpain positiver Zellen zum Zeitpunkt I3R0 bei  $0,8\% \pm 0,7$  und stieg auf  $3,5\% \pm 1,4$  zum Zeitpunkt I3R3 respektive  $5,1\% \pm 2,1$  zum Zeitpunkt I3R6. Mit  $9,6\% \pm 3,5$  wurde ein weiterer Anstieg nach 9 h Reperfusion beobachtet und ein Maximalwert nach 24 h Reperfusion von  $13,4\% \pm 4,2$  erreicht.

Ein im Verlauf ähnliches Bild ergab sich bei der Analyse der mittels anti-CD 31 markierten Endothelzellen. In dieser Gruppe stieg der Anteil Calpain positiver Zellen ausgehend von  $0,4\% \pm 0,3$  bei I3R0 über  $1,2\% \pm 0,9$  bei I3R3 und  $3,5\% \pm 1,9$  bei I3R6 auf  $4,2\% \pm 2,2$  zum Zeitpunkt I3R9. Der höchste Wert Calpain positiver Zellen zeigte sich auch in dieser Gruppe zum Zeitpunkt I3R24, der bei  $6,2\% \pm 2,6$  lag.

Abb. 14 gibt die zahlenmäßigen Verhältnisse in den Basalganglien der ischämischen Hemisphäre in Abhängigkeit von R wieder:

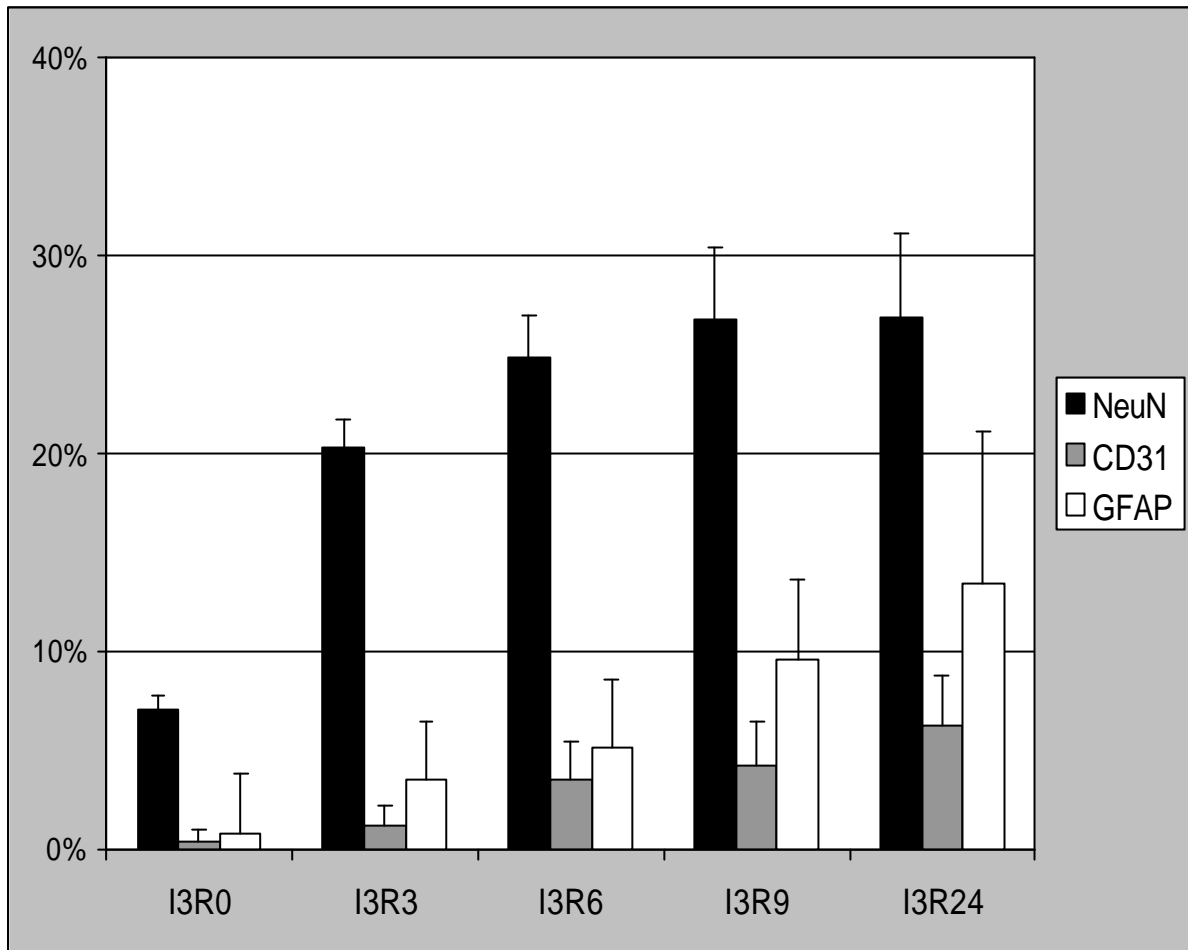


Abb. 14: Absolute Verteilung Calpain positiver Zellen in den Basalganglien nach 3 h Ischämie und verschiedenen Reperfusionzeiten. Schwarze Säulen zeigen neuronale Zellen, graue Säulen CD31 positive Zellen und weiße Säulen GFAP positive Zellen.



#### 1.4 Basalganglien – relative Verteilung Calpain positiver Zellen

Im reziproken Modus wurden jeweils 100 Calpain positive Zellen ausgezählt und auf Kollokalisation mit zellspezifischen Markern geprüft.

In der Calpain/NeuN gefärbten Gruppe (n = 6) zeigte sich für die Basalganglien der ischämischen Hemisphäre zum Zeitpunkt I3R0 ein Neuronenanteil von  $77,7\% \pm 7,1$ , nach 3 h Reperfusion ein Anteil von  $75,2\% \pm 8,5$  sowie nach 6 h Reperfusion von  $68,8\% \pm 7,2$ . Dieser prozentuale Anteil der neuronalen Zellen an der Gesamtzahl Calpain positiver Zellen ging in den Gruppen mit 9 h bzw. 24 h Reperfusion auf  $63,8\% \pm 7,4$  (I3R9, n = 6) respektive  $57,3\% \pm 8,8$  (I3R24, n = 6) zurück.

In der Calpain/GFAP gefärbten Gruppe (n = 6) war eine stetige Zunahme zu verzeichnen. In der Gruppe ohne Reperfusion (I3R0, n = 6) lag der Anteil GFAP positiver Zellen an der Gesamtzahl Calpain positiver Zellen bei  $9,0\% \pm 3,3$ , nach 3 h Reperfusion (I3R3, n = 6) bei  $13,0 \pm 4,0$ . In der Gruppen mit 6 h bzw. 9 h Reperfusion stieg der Prozentsatz auf  $14,2 \pm 2,0\%$  (I3R6, n = 6) respektive  $22,8 \pm 4,4\%$  (I3R9, n = 6). Mit einem Anteil von  $28,5 \pm 4,8\%$  wies die Gruppe mit 24 h Reperfusion den höchsten Anteil an GFAP und Calpain positiven Zellen auf.

In der Calpain/CD31 gefärbten Gruppe zeigte sich ein Anteil von  $4,5 \pm 2,1\%$  Endothelzellen (I3R0, n = 6) bzw.  $4,5 \pm 2,4\%$  (I3R3, n = 6). Dieser Anteil erhöhte sich in den Gruppen mit 6 h Reperfusion (I3R6, n = 6) auf  $8,8 \pm 3,4\%$  bzw.  $10,0 \pm 3,1\%$  nach 9 h Reperfusion (I3R9, n = 6). Am höchsten lag der mit  $13,2 \pm 4,2\%$  Prozentsatz auch hier in der Gruppe mit 24 h Reperfusion.

Abb. 15 stellt diesen Zusammenhang im Zeitverlauf grafisch für alle drei untersuchten Zellarten dar.

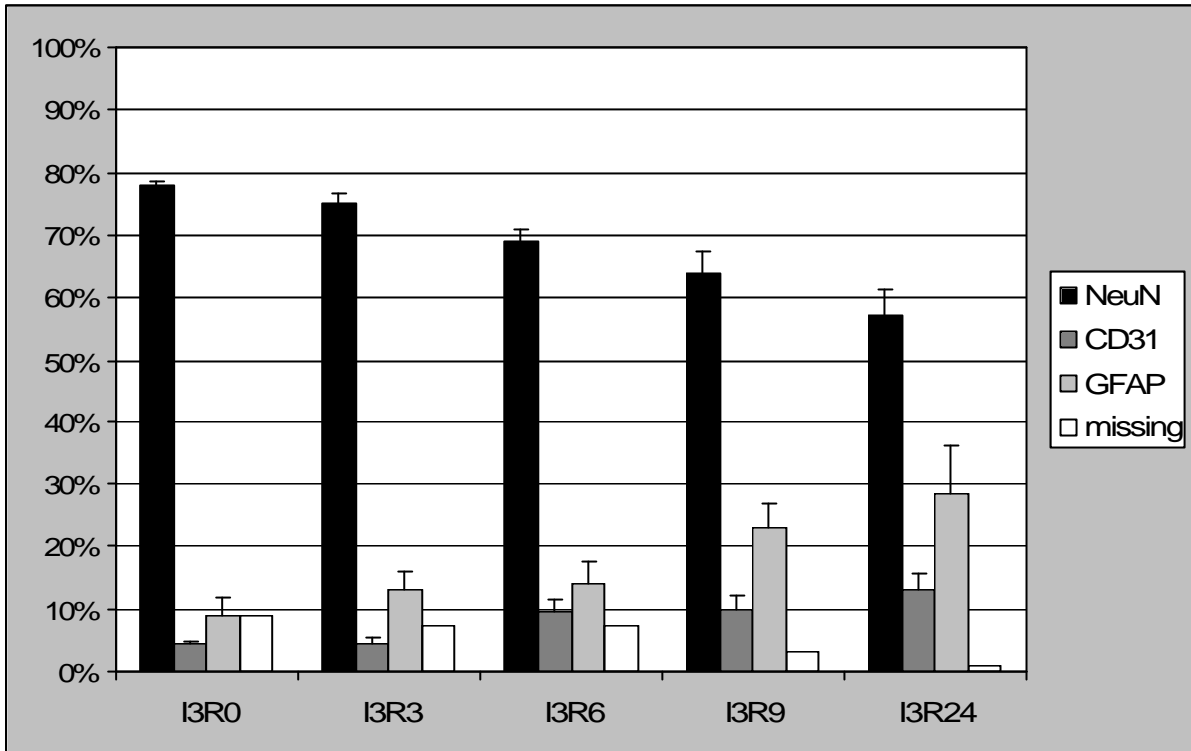


Abb. 15: Relative Verteilung Calpain positiver Zellen in den Basalganglien nach 3 h Ischämie und verschiedenen Reperfusionzeiten. Schwarze Säulen zeigen neuronale Zellen, dunkelgraue Säulen zeigen CD31 positive Zellen, hellgraue Säulen zeigen GFAP positive Zellen und weiße Säulen zeigen ausschließlich Calpain positive Zellen ohne Doppelfärbung.

## 1.5 Relativer Anteil an der Calpain-Aktivität: Zellarten einzeln

### 1.5.1 Neurone

Die nachfolgenden Abbildungen verdeutlichen in separater Form den Anteil der einzelnen Zellarten an der Calpain-Aktivität in der Gegenüberstellung von Kortex und Basalganglien für jeden untersuchten Zelltyp einzeln.

Abb. 16 zeigt gesondert den relativen Anteil der Neurone an der Gesamtaktivität von  $\mu$  Calpain im Kortex und in den Basalganglien.

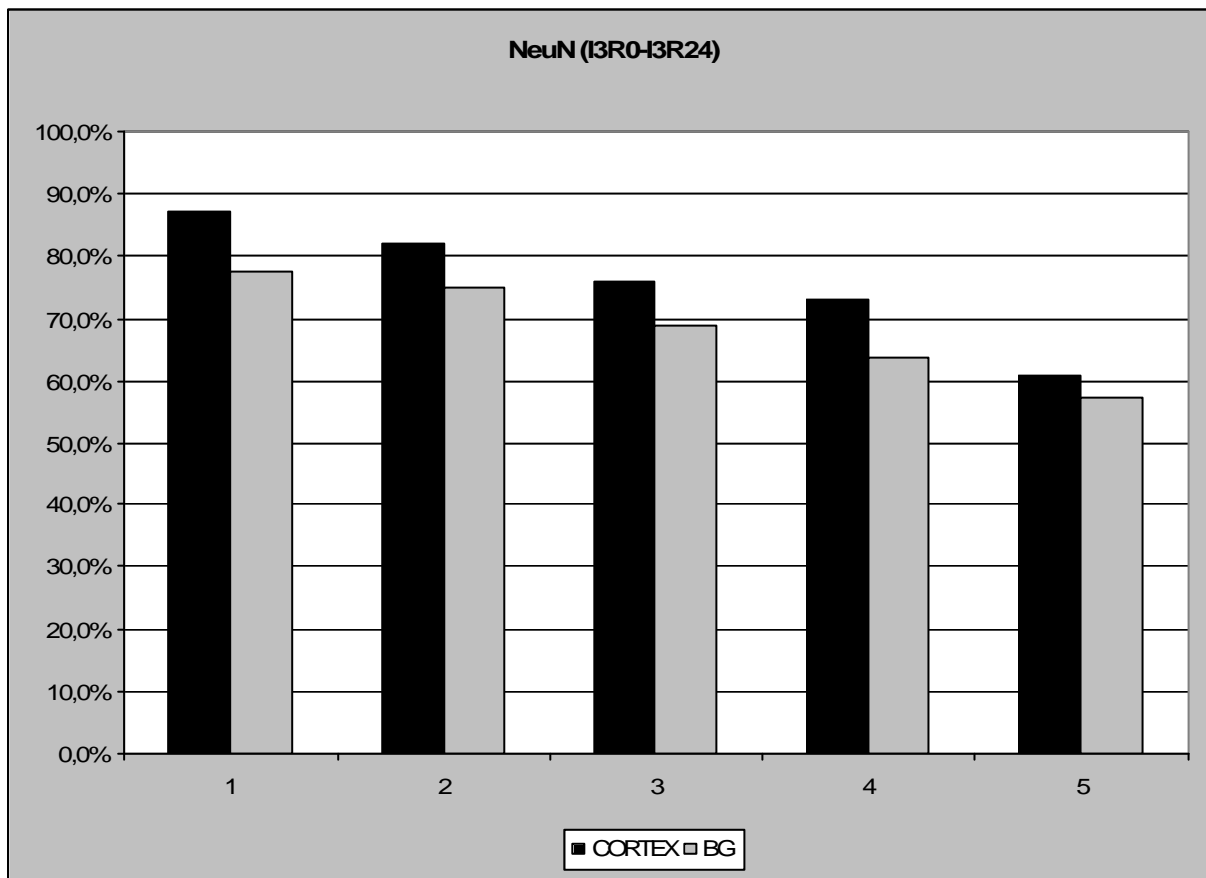


Abb. 16: Doppelimmunfluoreszenz: Anteil der Neurone (NeuN) an der Calpain-Gesamtfluoreszenz (100%) zu verschiedenen Ischämie/Reperfusionzeitpunkten: (1) I3R0, (2) I3R3, (3) I3R6, (4) I3R9 und (5) I3R24; schwarze Säulen repräsentieren den Kortex, graue Säulen die Basalganglien; Angaben in Prozent ohne Standardabweichung

Die Abbildung macht anschaulich, dass die neuronalen Zellen zu jedem Zeitpunkt der Reperfusion die größte Fraktion der Calpain-Aktivität darstellen. Mit zunehmender Reperfusiondauer nimmt deren Anteil sowohl im Kortex als auch in den Basalganglien in ähnlicher Weise ab. Für die Prozentwerte im Einzelnen siehe Ergebnisteil, Punkte 5.3.2 und 5.3.4 .

### 1.5.2 Mikrogliazellen

Abb. 24 zeigt gesondert den relativen Anteil der Mikrogliazellen an der Gesamtaktivität von  $\mu$ -Calpain im Kortex und in den Basalganglien.

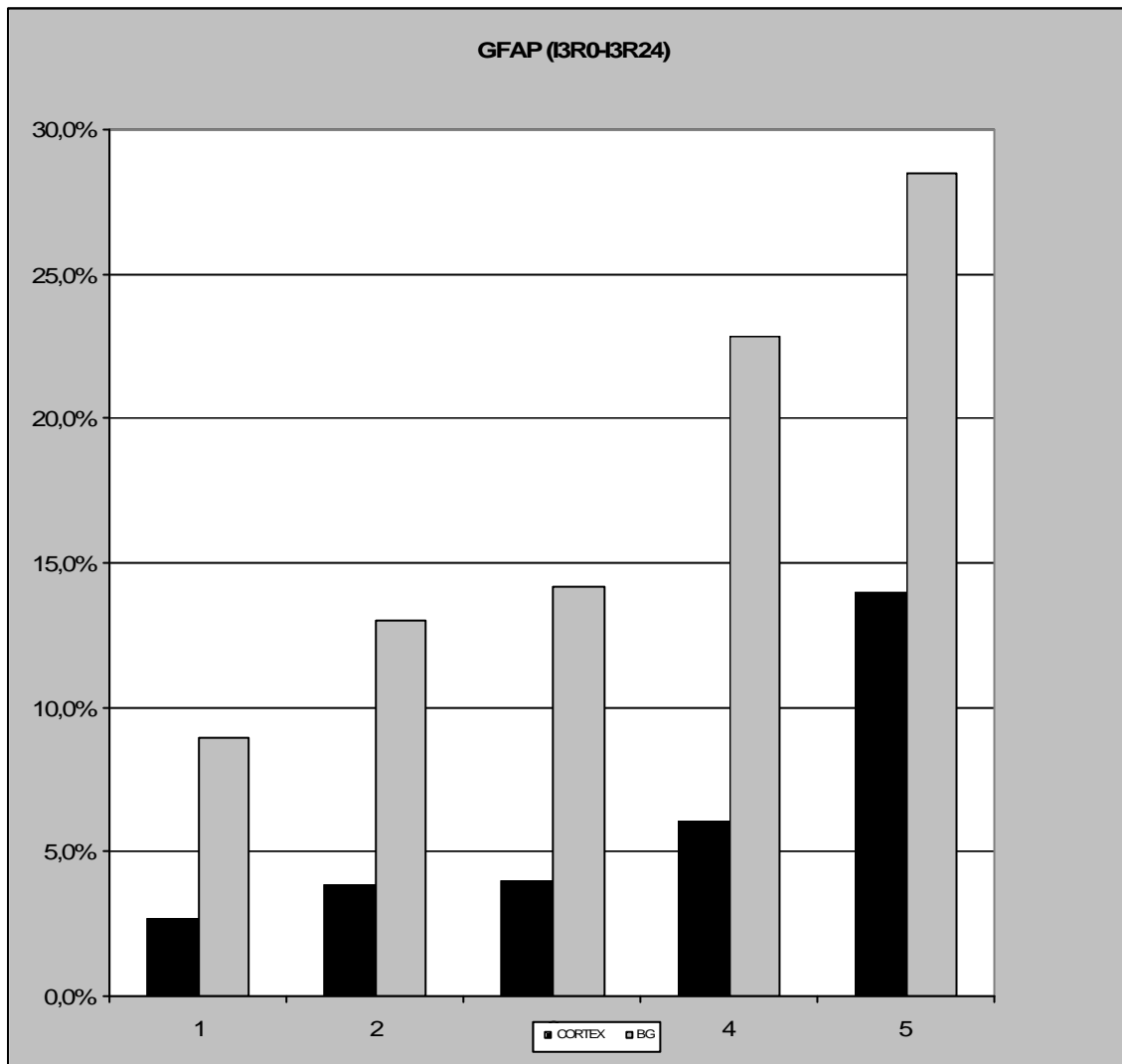


Abb. 17: Doppelimmunfluoreszenz: Anteil der Gliazellen (GFAP) an der Calpain-Gesamtfluoreszenz (100%) zu verschiedenen Ischämie/Reperfusionzeitpunkten: (1) I3R0, (2) I3R3, (3) I3R6, (4) I3R9 und (5) I3R24; schwarze Säulen repräsentieren den Kortex, graue Säulen die Basalganglien; Angaben in Prozent ohne Standardabweichung

Aus den Abb. 17 zu entnehmenden Werten ist ersichtlich, dass die Mikrogliazellen wesentlich an der Calpain-Aktivität beteiligt sind und dass deren Anteil mit steigender Reperfusiondauer zunimmt. Dieses Phänomen ist in den Basalganglien ausgeprägter als im Kortex. Für die Prozentwerte im Einzelnen siehe Ergebnisteil, Punkte 5.3.2 und 5.3.4 .

### 1.5.3 Endothelzellen

Abb. 18 zeigt gesondert den relativen Anteil der Endothelzellen an der Gesamtaktivität von  $\mu$ -Calpain im Kortex und in den Basalganglien.

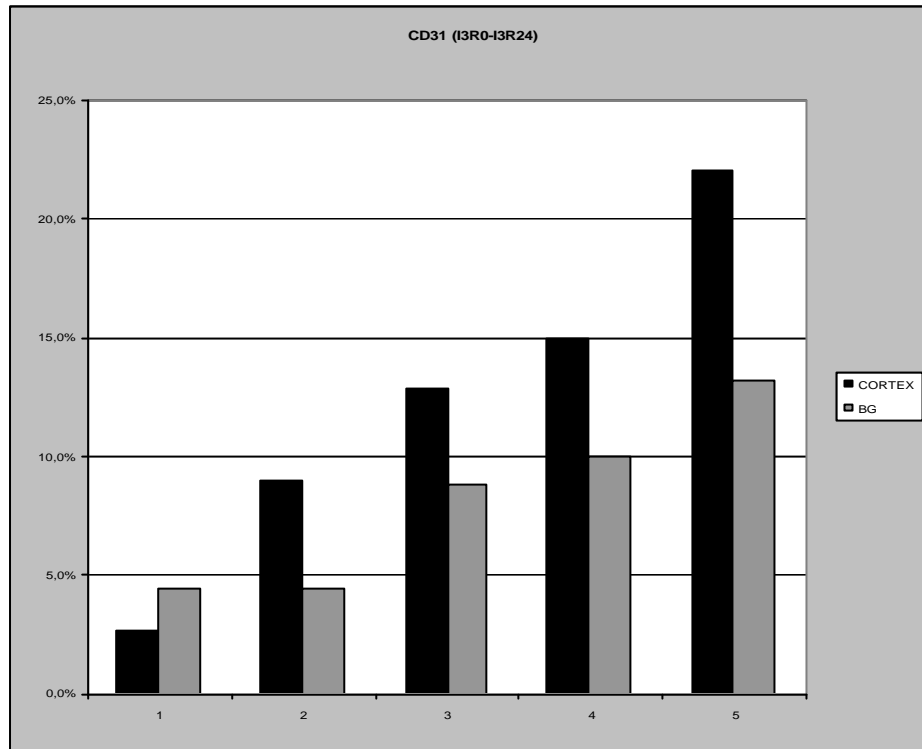


Abb. 18: Doppelimmunfluoreszenz: Anteil der Endothelzellen (CD31) an der Calpain-Gesamtfluoreszenz (100%) zu verschiedenen Ischämie/Reperusionszeitpunkten: (1) I3R0, (2) I3R3, (3) I3R6, (4) I3R9 und (5) I3R24; linke Säule jeweils Kortex, rechte Säule Basalganglien; Angaben in Prozent ohne Standardabweichung

Es wird ersichtlich, dass die Endothelzellen in Abhängigkeit von der Reperusionsdauer zunehmenden Anteil an der Aktivität von  $\mu$ -Calpain haben, wobei dieses Phänomen in den kortikalen Infarktarenen deutlicher ausgeprägt ist als in den Basalganglien. Für die Prozentwerte im Einzelnen siehe Ergebnisteil, Punkte 5.3.2 und 5.3.4 .

## 2. Normotherme Kontrolle versus rtPA 0,9/9/18 mg/kg KG

Ein fraglicher Einfluss verschiedener rtPA-Dosen auf das Aktivitätsniveau von  $\mu$ Calpain wurde in vier Gruppen (n = 6) untersucht.

Die applizierten Dosen variierten zwischen 0,9mg/kg KG, 9mg/kg KG und 18mg/kg KG und ohne rtPA in der vierten Gruppe. Alle vier Gruppen unterlagen Normothermiebedingungen.

Wie in Vorexperimenten beschrieben (Liebetau 1999), bestätigte sich ein signifikanter Anstieg der Calpainaktivität in der ischämischen Hemisphäre gegenüber der nichtischämischen

Hemisphäre. Dieser Befund traf für die kortikalen ROI's in gleicher Weise zu wie für die basalganglionären ROI's.

Weiterhin zeigte sich zwischen den einzelnen rtPA-Gruppen kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Calpainaktivität. Kortikale Infarktareale wurden getrennt von den Basalganglien untersucht.

Für den Kortex betrug die Zahl Calpain positiver Zellen in der Gruppe ohne rtPA ( $n = 6$ )  $1,26 \pm 0,18$ , in der Gruppe mit 0,9mg/kg KG ( $n = 6$ )  $1,27 \pm 0,39$ , in der Gruppe mit 9mg/kg KG ( $n = 6$ )  $1,13 \pm 0,16$  und in der Gruppe mit 18mg/kg KG  $1,16 \pm 0,09$ .

Für die Basalganglien betrug die Zahl Calpain positiver Zellen in der Gruppe ohne rtPA ( $n = 6$ )  $1,21 \pm 0,07$ , in der Gruppe mit 0,9mg/kg KG ( $n = 6$ )  $1,18 \pm 0,29$ , in der Gruppe mit 9mg/kg KG ( $n = 6$ )  $1,11 \pm 0,18$  und in der Gruppe mit 18mg/kg KG  $1,16 \pm 0,16$ .

Die Analyse der Gesamtfläche Calpain gefärbter Zellen erbrachte ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen.

Die Werte setzen sich im Einzelnen wie folgt zusammen:

Für den Kortex betrug die Gesamtfläche Calpain gefärbter Zellen in der Gruppe ohne rtPA ( $n = 6$ )  $1,27 \pm 0,17$ , in der Gruppe mit 0,9mg/kg KG ( $n = 6$ )  $1,23 \pm 0,21$ , in der Gruppe mit 9mg/kg KG ( $n = 6$ )  $1,25 \pm 0,28$  und in der Gruppe mit 18mg/kg KG  $1,26 \pm 0,21$ .

Für die Basalganglien betrug die Gesamtfläche Calpain positiver Zellen in der Gruppe ohne rtPA ( $n = 6$ )  $1,18 \pm 0,10$ , in der Gruppe mit 0,9mg/kg KG ( $n = 6$ )  $1,59 \pm 0,62$ , in der Gruppe mit 9mg/kg KG ( $n = 6$ )  $1,46 \pm 0,37$  und in der Gruppe mit 18mg/kg KG  $1,44 \pm 0,42$ . Abb. 19 gibt eine grafische übersicht über diese Ergebnisse.

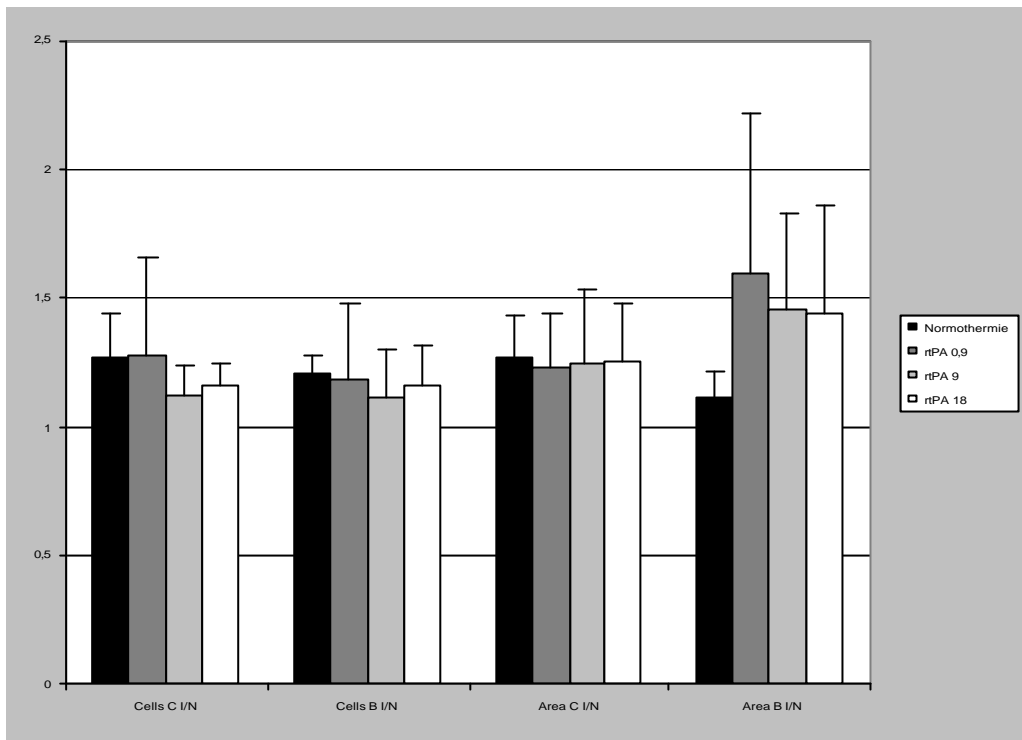


Abb. 19: Verhältnis Calpain positiver Elemente in der ischämischen Hemisphäre verglichen mit der nicht ischämischen Hemisphäre (I/N) in Kortex (C) und Basalganglien (B) nach 3 h Ischämie und 24 h Reperfusion. Ergebnisse der Immunhistochemie. Die linke Diagrammhälfte zeigt das Verhältnis Calpain positiver Zellen, die rechte Diagrammhälfte das Verhältnis der Gesamtfläche Calpain positiver Zellen. Die schwarzen Säulen repräsentieren die Normothermie-behandelte Gruppe, die dunkelgrauen Säulen die mit 0,9 mg/kg KG rtPA behandelte Gruppe, die hellgrauen Säulen die mit 9mg/kg KG rtPA behandelte Gruppe und die weißen Säulen die mit 18 mg/kg KG rtPA behandelte Gruppe. Die Unterschiede zwischen den Gruppen waren nicht signifikant, weder für den Kortex (C) noch für die Basalganglien (B).

### 3. Normothermie versus Hypothermie

#### 3.1 Western Blot

Die Western Blot-Experimente wurden in zwei Gruppen ( $n = 6$ ) durchgeführt, eine Normothermie- und eine Hypothermie-behandelte Gruppe.

Die Auswertung der Western Blots für anti- $\mu$ -Calpain zeigte einen signifikanten Anstieg von  $\mu$ -Calpain in der ischämischen Hemisphäre, und zwar sowohl in der Normothermie- als auch in der Hypothermie-behandelten Gruppe.

Diese Beobachtung traf für das kortikale Infarktareal in gleicher Weise wie für das Infarktareal in den Basalganglien zu.

Der Vergleich zwischen der Calpainaktivität in der ischämischen Hemisphäre der Normothermie-Gruppe gegenüber der Hypothermie-Gruppe zeigte eine signifikante Reduktion der Calpain-Aktivität in der Hypothermie-behandelten Gruppe.

Die niedrigere Calpainaktivität ließ sich im Kortex und in den Basalganglien der Hypothermie-Tiere nachweisen. Im Kortex war die Calpainaktivität auf  $121 \pm 15\%$  ( $n = 6$ ) reduziert gegenüber  $141 \pm 11\%$  ( $n = 6$ ) in der Normothermie-Gruppe ( $P < 0,01$ ).

In den Basalganglien verringerte sich die Calpainaktivität in der Hypothermie-Gruppe auf  $148 \pm 25\%$  ( $n = 6$ ) verglichen mit  $164 \pm 26\%$  ( $n = 6$ ) in der Normothermie-Gruppe ( $P < 0.05$ ).

Abb. 20 gibt die Verhältnisse graphisch wieder.



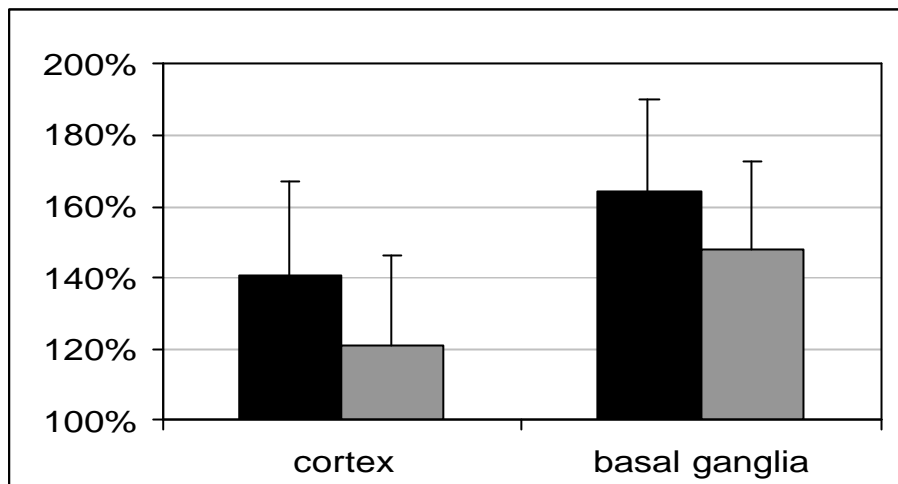


Abb. 20: Verhältnis der Calpain-Expression in der ischämischen Hemisphäre gegenüber der nicht ischämischen Hemisphäre, Western Blot Ergebnisse.

Schwarze Säulen zeigen die Normothermie-, graue Säulen die Hypothermie-behandelten Tiere. Die linke Abbildungshälfte zeigt die Calpain-Expression im Kortex, die rechte für die in den Basalganglien. Die unterschiede waren für Kortex ( $p < 0,01$ ) und Basalganglien ( $p < 0,05$ ) signifikant.

### 3.2 Immunhistochemie

In Anlehnung an die Gruppeneinteilung der Western Blot-Experimente wurden immunhistochemisch dieselben beiden Gruppen ( $n = 6$ ) der Auswertung zugeführt: Hypothermie-behandelte Tiere und Normothermie-behandelte Tiere.

Bei der Auswertung der immunhistochemischen Darstellung der Calpainaktivität wurden zwei Aspekte gleichermaßen berücksichtigt. Zum einen wurde die Gesamtzahl der Calpain-positiven Zellen quantifiziert und zum anderen wurde die Gesamtheit der Calpain-gefärbten Fläche erfasst.

Dabei konnten weder hinsichtlich Zellzahl noch hinsichtlich Gesamtfläche signifikante Unterschiede zwischen der Normothermie- und der Hypothermie-Gruppe festgestellt werden. Auch die getrennte Betrachtung von Kortex und Basalganglien erbrachte im Gruppenvergleich keine signifikanten Unterschiede in der Calpainaktivität.

Im Vergleich der kortikalen ROI's ergab sich in der Normothermie-Gruppe ( $n = 6$ ) bei der Gesamtzahl Calpain positiver Zellen ein Wert von  $1,26 \pm 0,17$  gegenüber  $1,29 \pm 0,15$  in der Hypothermie-Gruppe. In den Basalganglien ergab sich in der Normothermie-Gruppe ein Wert von  $1,21 \pm 0,07$  gegenüber  $1,15 \pm 0,11$  in der Hypothermie-Gruppe.

Bei der Analyse der Gesamtfläche Calpain positiver Zellen stellte sich folgendes Resultat dar: Im Kortex der Normothermie-Gruppe  $1,27 \pm 0,16$  gegenüber  $1,46 \pm 0,37$  im Kortex der Hypothermie-Gruppe. In den Basalganglien liegt der Wert für die Normothermie-Gruppe bei

1,12 ± 0,10, in der Hypothermie-Gruppe bei 1,27 ± 0,41. Abb. 21 fasst diese Ergebnisse grafisch zusammen:

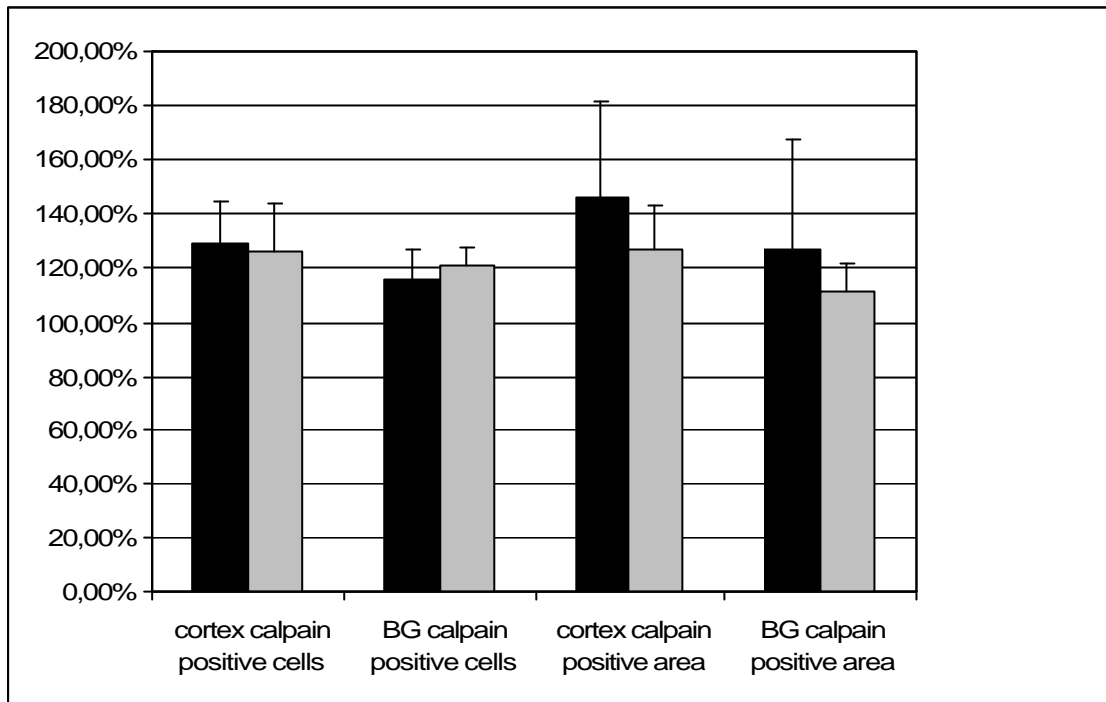


Abb. 21: Verhältnis der Calpain positiven Elemente in der ischämischen Hemisphäre verglichen mit der nicht ischämischen Hemisphäre in Kortex und Basalganglien (BG) nach 3 h Ischämie und 24 h Reperfusion. Resultate der Immunhistochemie. Die linken beiden Säulenpaare zeigen das Verhältnis Calpain positiver Zellen, die rechten beiden Säulen das Verhältnis der Gesamtfläche Calpain positiver Zellen. Schwarze Säulen repräsentieren die Hypothermie-behandelten Tiere, graue Säulen die Normothermie-behandelten Tiere. Die Unterschiede zwischen Hypothermie und Normothermie sind nicht signifikant, weder für den Kortex noch für die Basalganglien.

### 3.3 Infarktmetrie

Die volumetrische Analyse diente der Evaluierung des MAP-2-Verlustes.

Die Hypothermie-behandelten Tiere zeigten signifikant weniger Verlust des MAP-2-Substrates als die Normothermie-behandelten Tiere.

Das Infarktvolumen in der Hypothermie-Gruppe betrug  $158,3 \pm 27,8 \text{ mm}^3$  ( $n = 6$ ) gegenüber  $197,3 \pm 21,2 \text{ mm}^3$  ( $n = 6$ ) in der Normothermie-Gruppe ( $P < 0,0001$ ). Das Infarktvolumen wurde somit unter Hypothermie-Bedingungen um 20% reduziert. Die nachstehende Grafik verdeutlicht diesen Effekt (Abb. 22).

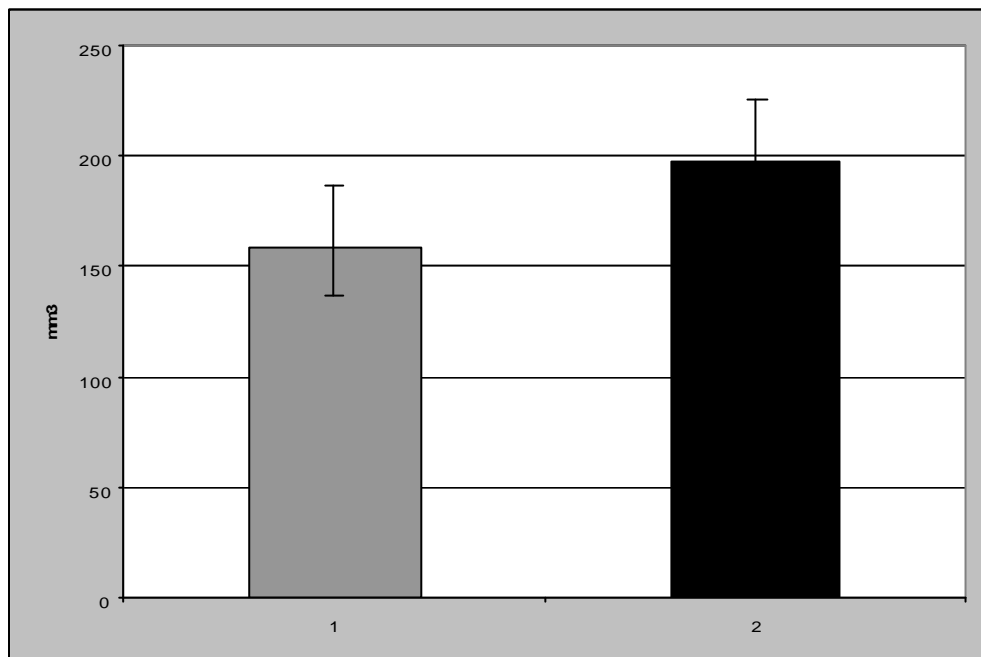


Abb. 22: Vergleich der Infarktvolumina zwischen Hypothermie-behandelten Tieren und Normothermie-behandelten Tieren nach 3 h Ischämie und 24 h Reperfusion. Die graue Säule (1) zeigt die Hypothermie-Gruppe, die schwarze Säule (2) die Normothermie-Gruppe. Das Ergebnis ist signifikant ( $P < 0,0001$ ).

### 4. Normothermie versus Kombination Hypothermie/rtPA

Die Auswertung dieser beiden Gruppen ( $n = 6$ ) zeigte, dass die rtPA/Hypothermie behandelte Gruppe gegenüber der Normothermie behandelten Gruppe weniger Aktivität aufweist. Dieser Trend trifft sowohl für den Kortex als auch für die Basalganglien zu.

Die reduzierte Calpainaktivität drückt sich sowohl in der Gesamtzahl Calpain positiver Zellen als auch in der Gesamtfläche Calpain positiver Zellen aus. Im Kortex ist die Zellzahl in der Hypothermie/rtPA-Gruppe auf das  $1,1 \pm 0,11$ -fache reduziert verglichen mit dem  $1,26 \pm 0,17$ -fachen in der Normothermie-Gruppe ( $P < 0,05$ ), für die Basalganglien betragen die Werte das  $1,21 \pm 0,14$  respektive  $0,93 \pm 0,07$ -fache ( $P < 0,05$ ).

Ein analoger Zusammenhang findet sich für den Vergleich der Gesamtfläche Calpain positiver Zellen zwischen der Normothermie- und der rtPA/Hypothermie-Gruppe.

Im Kortex beträgt die Gesamtfläche das  $1,27 \pm 0,16$  -fache in der Normothermie- und das  $1,08 \pm 0,06$  -fache in der Hypothermie/rtPA-Gruppe ( $P < 0,05$ ). In den Basalganglien ist die Fläche bei den Hypothermie-Tieren auf das  $1,07 \pm 0,06$  -fache reduziert gegenüber dem  $1,18 \pm 0,10$  -fachen in der Normothermie-Gruppe (nicht signifikant) (Abb. 23).

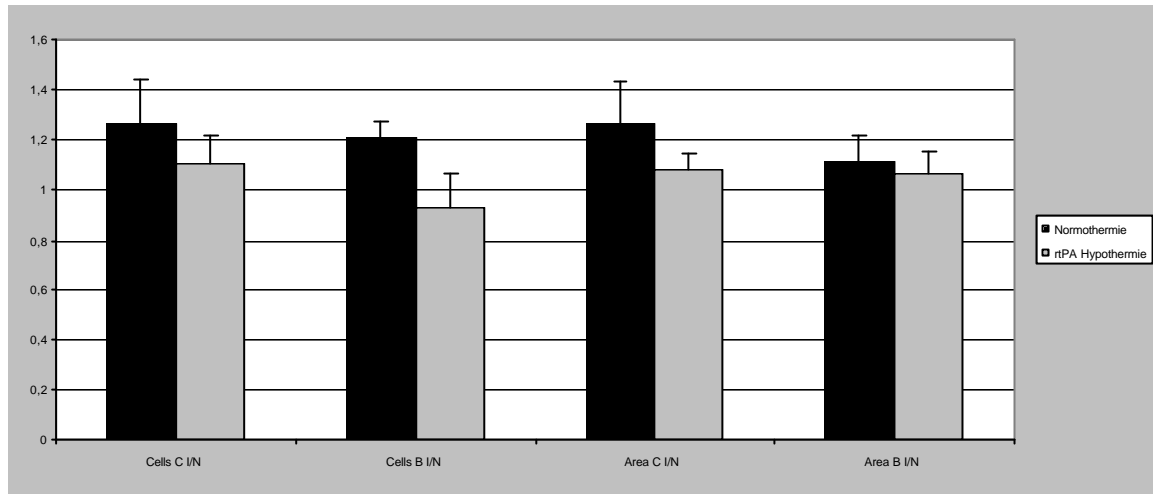


Abb. 23: Verhältnis Calpain positiver Elemente in der ischämischen Hemisphäre gegenüber der nicht ischämischen Hemisphäre (I/N) in Kortex (C) und Basalganglien (B) nach 3 h Ischämie und 24 h Reperfusion. Resultate der Immunhistochemie. Die linken vier Säulen repräsentieren das Verhältnis Calpain positiver Zellen, die rechten vier Säulen die Gesamtfläche Calpain positiver Zellen. Schwarze Säulen zeigen die Normothermie-behandelte Gruppe, graue Säulen die rtPA/Hypothermie-behandelte Gruppe. Die Ergebnisse sind signifikant für Zellzahl Basalganglien ( $P < 0,05$ ), Zellzahl Kortex ( $P < 0,05$ ) und Gesamtfläche Kortex ( $P < 0,05$ ). Nicht signifikant ist Gesamtfläche Basalganglien. (\* entspricht  $P < 0,05$ )

## IV. DISKUSSION

### 1. Calpain-Differenzierung: zelluläres Verteilungsmuster

In dem Experiment zur Charakterisierung der Calpain-Aktivität in verschiedenen Zelltypen des ZNS konnte zum ersten Mal in einem Modell der transienten fokalen Ischämie der Ratte gezeigt werden, dass mit zunehmender Dauer der postischämischen Reperfusion ein steigender Anteil nicht neuronaler Zellen zur Calpain-Aktivität beiträgt.

Liebetrau und Kollegen wiesen eine generelle Abhängigkeit der Calpain-Aktivität von der Reperfusiondauer bei der transienten fokalen Ischämie im Rattenmodell nach.<sup>(70)</sup> In diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass die Zahl Calpain positiver Zellen im ipsilateralen Kortex nach 3 h Ischämie von 30,7% (R 3) auf 88,4% (R24) und in den ipsilateralen Basalganglien von 26,9 (R3) auf 47,3% (R24) steigt. In dieser Arbeit wurde lediglich die Gesamtzahl aller Calpain positiven Zellen immunhistochemisch ermittelt. Somit konnte die Frage nach den einzelnen Zelltypen, die für die Calpain-Aktivität verantwortlich waren, nicht geklärt werden.

Generell wurde der Nachweis von Calpain-Aktivität bei zerebraler Ischämie überwiegend den Neuronen zugesprochen. Das Verteilungsmuster der Calpaine wurde bei permanenter fokaler Ischämie sowohl auf zellulärer Ebene als auch auf subzellulärer Ebene nach traumatischer Hirnschädigung untersucht.<sup>(7) (138)</sup> Dabei wurde das Verteilungsmuster innerhalb der Zelle bzw. im Zeitverlauf ohne spezielle Berücksichtigung einzelner Zelltypen eruiert.

Die hier gewonnenen Daten belegen, dass nicht ausschließlich Neuronen (strukturellen) Schaden durch Calpaine nehmen, sondern in erheblichem Maße auch Mikrogliazellen und Endothelzellen. Unter den Endothelzellen steigt die Zahl Calpain positiver Zellen mit zunehmender Reperfusiondauer auf 19,6% (R24) im ischämischen Kortex und auf 14,6% in den ischämischen Basalganglien. Für die Mikrogliazellen liegen diese Werte bei 12% (Kortex, R24) respektive 23% (Basalganglien, R24).

Die Calpainverteilung im gesunden Rattenhirn erbrachte die Erkenntnis, dass auch im physiologischen Normalfall im Großteil der Zellen des ZNS Calpain nachweisbar ist, wobei der Großteil auf Neuronen entfällt und daneben auch in Mikrogliazellen Calpain nachweisbar ist.<sup>(95)</sup> In dieser Studie wurde allerdings nicht aktiviertes Calpain nachgewiesen. Die Verwendung eines Antikörpers gegen aktiviertes Calpain in unserer Untersuchung belegt einen Zusammenhang zwischen zerebraler Ischämie und Calpain-Aktivierung in nicht neuronalen Zellen.

Pathophysiologische Hinweise für die Involvierung von Calpain in glialen Zellen ergaben sich in einem Mausmodell der Parkinsonerkrankung (Mikroglia und Astrozyten).<sup>(19)</sup>

Unsere Ergebnisse weisen ebenso auf eine große Rolle der Calpaine in Mikrogliazellen bei der zerebralen Ischämie hin. Vor allem in den Basalganglien stellen die Mikrogliazellen mit 28% einen großen Anteil an der Calpain-Gesamtaktivität dar. Möglicherweise führt die Aktivierung von Calpain in Mikrogliazellen zu einem vermehrten Abbau von Myelin und axonalen Strukturen und einer Förderung inflammatorischer Prozesse.<sup>(108)</sup> Der Calpain vermittelte Abbau extrazellulärer Proteine wie Myelin durch aktivierte Mikroglia ist tierexperimentell beschrieben.<sup>(50)</sup>

Bei den Endothelzellen findet sich der größte Anteil Calpain positiver Zellen nach 24 h Reperfusion im Kortex. Über die Folgen der Calpain-Aktivierung in Endothelzellen zerebraler Gefäße ist wenig bekannt, jedoch weist der hier beschriebene Anteil von 22% (Kortex) an der Calpain-Gesamtaktivität auf eine pathophysiologisch nicht zu unterschätzende Rolle hin. Möglicherweise führt aktives Calpain in den Endothelzellen zu einer reduzierten Bildung und Aktivität der endothelialen NO-Synthase (eNOS).<sup>(116)</sup> Diesem Enzym werden bei der zerebralen Ischämie protektive Eigenschaften zugeschrieben, da es die zerebrale Durchblutung fördert und bei eNOS knockout-Mäusen signifikant größere Infarkte zu beobachten sind.<sup>(54)</sup> Ein anderer Ansatz ist die strukturelle Schädigung zytoskelettaler Proteine innerhalb der Endothelzellen, was zu einer Desintegration der (mikro-)vaskulären Gefäßwand führen kann.<sup>(3)</sup> Die Schädigung der Gefäßwand und konsekutiv von Bestandteilen der Blut-Hirn-Schranke spielt bei der zerebralen Ischämie eine Rolle<sup>(48)</sup> unter anderem bei Extravasationsprozessen (vasogenes Ödem)<sup>(111)</sup> und (Mikro-) Blutungen.<sup>(45)(47)</sup>

Zusammenfassend lässt sich konstatieren, dass die Neurone nicht die einzige Zellart darstellen, die von gesteigerter Calpain-Aktivität bei zerebraler Ischämie betroffen ist. Die Neuronen machen auch nach längeren Reperusionszeiten (R9; R24) die größte Calpain-Aktivität aus, was darauf hinweisen kann, dass Calpain vermittelte Prozesse nicht nur in der ischämischen Frühphase bei der Nekrose eine Rolle spielen, sondern auch in der Spätphase. Somit ist ein Zusammenhang zwischen Calpain-Aktivität und Caspase-assoziierten Apoptosemechanismen denkbar.<sup>(12)(126)</sup> Wenngleich die neuronalen Zellen zu jedem Zeitpunkt den größten Anteil an der Calpain-Gesamtaktivität darstellen, so weisen auch nicht neuronale Zellen eine vermehrte Calpain-Aktivität auf. Es konnte gezeigt werden, dass im Kortex vor allem die Endothelzellen (23% der Gesamtaktivität) und in den Basalganglien die Mikrogliazellen (28% der Gesamtaktivität) zur Calpain-Positivität beitragen.

Da der akute Schlaganfall trotz der thrombolytischen Therapie mit einer schlechten Prognose verbunden ist, wurde in zahlreichen Studien nach neuroprotektiven Substanzen gesucht, die gezielt die Ischämietoleranz des ZNS erhöhen. Eine Gruppe von Proteinen, die Ziel solcher Studien waren, sind die Calpaine. Der Beitrag der Calpaine zum ischämischen Zellschaden ist tierexperimentell mehrfach belegt.<sup>(88)(89) (106)(126)</sup> Durch Applikation von synthetischen Calpain-Inhibitoren konnte eine drastische Verkleinerung des Infarktolumens erreicht werden.<sup>(6)(9) (51)(78)</sup> Allen diesen Untersuchungen waren zwei Einschränkungen gemeinsam. Zum einen handelte es sich bei den verwendeten Calpain-Inhibitoren um synthetische Peptide, die zwar eine hohe, aber keine völlige Calpain-Spezifität aufwiesen.<sup>(85) (98)(128)</sup> Damit ist wahrscheinlich, dass auch andere Cystein-Proteasen durch den Inhibitor erfasst wurden und nicht eine reine Calpain-Hemmung für den Effekt verantwortlich war. Zum anderen waren alle Inhibitor-Studien auf den Tierversuch beschränkt, so dass bis dato keine Aussagen über einen möglichen Nutzen beim Menschen vorliegen. Ein weiteres Problem besteht in der Tatsache, dass beim experimentellen Schlaganfall im Tiermodell meist das Infarktolumen als Zielparameter herangezogen wird, während beim Menschen der klinische Outcome Ziel des Interesses ist. Aus diesem Grund erscheint es sinnvoll, noch mehr über die pathophysiologischen Veränderungen bei fokaler zerebraler Ischämie im Tiermodell zu erfahren, um spezifischere Ansätze für die klinische Anwendung zu gewinnen.

Das hier gewonnene zelluläre Verteilungsmuster unterstreicht die Rolle der Calpaine als wesentliche Effektoren des ischämischen Zellschadens in verschiedenen ZNS-Zellarten. Eine Hemmung der Calpain-Aktivierung könnte somit über Protektion verschiedener Zelltypen zu geringerem Gewebsschaden und möglicherweise besserem klinischem Outcome führen.

Eine Einschränkung dieser Untersuchung besteht in der Tatsache, dass mit den verwendeten Antikörpern nicht alle typischerweise im ZNS vorkommenden Zellen auf Calpain-Aktivität untersucht werden konnten, so dass ein Prozentsatz nicht klassifizierter Zellen der näheren Bestimmung zugeführt werden muss. Allerdings nimmt dieser Anteil mit längerer Reperfusionzeit stetig ab, so dass nach 24 h Reperfusion noch 4% der Calpain-Aktivität im Kortex und 1% in den Basalganglien ohne zelluläre Attribuierung bleibt.

Diese Ergebnisse machen deutlich, dass bei der zerebralen Ischämie nicht allein Nervenzellen das pathoanatomische Korrelat darstellen, sondern dass verschiedenste Zelltypen in die Ischämie-bedingten Kaskaden involviert sind. Dies weist darauf hin, dass sie an verschiedenen Punkten des pathophysiologischen Geschehens zum Gewebeschaden beitragen: bei den Neuronen sind sie am nekrotischen/apoptotischen Zelltod beteiligt, bei Mikrogliazellen wirken sie

möglicherweise proinflammatorisch und proteolytisch, bei Endothelzellen proteolytisch und interferieren negativ mit dem zerebralen Blutfluss über vasoaktive Substanzen.

Die Vielschichtigkeit des lokalisatorischen und zeitlichen Auftretens der Calpaine unterstreicht ihre Wichtigkeit bei der zerebralen Ischämie und die Notwendigkeit von spezifischen Calpain-Inhibitoren, die das multifaktorielle Geschehen bei der zerebralen Ischämie möglicherweise an verschiedenen Punkten günstig beeinflussen können.

## 2. Calpainaktivität unter rtPA -Gabe

Ein weiterer Teil der Untersuchung befasste sich mit dem Einflusse verschiedener rtPA-Dosen (0,9; 9; 18 mg/kg KG; alle unter Normothermie) auf die Calpain-Aktivität im Vergleich mit einer Normothermie-Gruppe (alle Gruppen mit n = 6). Das Hauptergebnis dieses Experiments besteht in der Beobachtung, dass beim Vergleich der einzelnen rtPA-behandelten Gruppen hinsichtlich Zellzahl und Gesamtfläche ein Trend zu niedrigerer Calpainaktivität für den Kortex wie auch für die Basalganglien erkennbar wird. Nur die Analyse der Gesamtfläche der Basalganglien auf der ischämischen Hemisphäre bestätigte diese Beobachtung nicht und lag über dem Wert der Normothermie-Gruppe ohne rtPA.

Diese Tendenz spiegelt sich in allen applizierten rtPA-Dosen wider.

Damit ist sowohl in der klinisch zugelassenen Dosierung (0,9mg/kg KG) wie auch der Rattenspezifischen Äquivalenzdosis (9mg/kg KG) und der Hochdosisapplikation (18mg/kg KG) eine niedrigere, wenngleich nicht signifikante Aktivität zu verzeichnen.

Die Involvierung der Calpaine in die zerebrale Ischämie ist mannigfach belegt.<sup>(7) (8) (52) (88) (89) (103) (106) (130) (132) (133)</sup> Auch die Anwendung von Calpaininhibitoren hat diese Rolle der Calpaine mehrfach belegt.<sup>(51) (68) (69) (78) (99) (132) (143)</sup> Allerdings blieb der Einsatz dieser in der Regel synthetischen Inhibitoren auf den tierexperimentellen Bereich beschränkt.

In der klinischen Therapie des Schlaganfalls hingegen als Therapeutikum zugelassen ist rtPA (Actilyse®). In der Akuttherapie ist es das einzige etablierte Medikament zur Thrombolysse des (thromb-)embolischen Schlaganfalls. Vier große Studien belegen den Nutzen der Therapie mit rtPA beim akuten Schlaganfall.<sup>(21) (42) (43) (121)</sup> Neben der fibrinolytischen Aktivität, die für die positiven therapeutischen Effekte verantwortlich gemacht wird, scheint das Plasminogen-Plasmin-System in die proteolytische Zerstörung von Bestandteilen der extrazellulären Matrix involviert zu sein.<sup>(74)</sup> Auch die Aktivierung von Matrix-Metallo-Proteinasen, sog. MMP's, durch Plasmin ist experimentell belegt.<sup>(18) (71)</sup> Die erhöhte Rate an schweren Komplikationen der Lysetherapie wie intrazerebrale Blutungen werden mit diesen Pathomechanismen in Verbindung gebracht.



Über die exakten molekularen Mechanismen der Nebenwirkungen ist bis dato wenig bekannt. Allerdings bestehen Hinweise auf eine neurotoxische Wirkung von tPA. So fördert tPA die Freisetzung von Exzitotoxinen, also exzitatorisch wirkenden Aminosäuren.<sup>(91)(125)</sup> Das Phänomen der toxischen Wirkung von exzessiv freigesetzten Aminosäuren wie Glutamat ist für die zerebrale Ischämie belegt.<sup>(75)</sup> Diese deregulierte Transmitter-Akkumulation führt zu drastisch erhöhten intrazellulären Ca-Konzentrationen. Die Ca-Überladung zieht die Aktivierung von Calpainen nach sich, deren Aktivierung ja Ca-abhängig ist, und resultiert in den bereits beschriebenen schweren zytoskeletalen Schäden der Zelle. Die Frage nach der Calpain-Aktivität unter dem Einfluss von rtPA ist insofern von Relevanz, als über die Nebenwirkungen der Lysetherapie mit rtPA bis dato wenig bekannt ist. Aufgrund der Beobachtungen von Tsirka und Kollegen liegt aber eine exzitotoxische Wirkung, die eine Ca-Überladung der Zelle mit sich bringt, nahe. Vor diesem Hintergrund ist es nahe liegend, die Ca-abhängige Aktivität von  $\mu$ -Calpain unter rtPA-Einfluss zu untersuchen. Unsere Ergebnisse widersprechen dieser Hypothese, denn die immunhistochemische Analyse der Calpain-Aktivität ergab einen leichten Rückgang der Calpain-Aktivität der rtPA-behandelten Tiere. Entsprechend der postulierten rtPA-induzierten Exzitotoxizität wäre ein Anstieg in den rtPA-behandelten Gruppen zu erwarten gewesen. Letztlich zeigte sich in den niedrig dosierten Gruppen (0,9 mg/kg KG) wie auch in den mittel (9 mg/kg KG) und hoch dosierten (18 mg/kg KG) Gruppen kein Anstieg der Calpain-Aktivität.

Die fehlende statistische Signifikanz der Ergebnisse der rtPA-behandelten Gruppen untereinander und im Vergleich zur normothermen Kontroll-Gruppe lässt sich mit einem methodisch bedingten Aspekt begründen. Bei der Immunhistochemie hängt die Intensität der spezifischen Färbereaktion stöchiometrisch mit der Menge vorhandenen Antigens zusammen. Je mehr des gesuchten Antigens im untersuchten Gewebe vorhanden ist, umso häufiger kommt es zu der im Teil Material und Methoden detailliert beschrieben Peroxidase-vermittelten Färbereaktion. Die in diesem Experiment standardmäßig verwendete Software zur Auswertung von Zellzahl und gefärbter Gesamtfläche arbeitet mit einem Schwellenwert-Prinzip. Dies bedeutet, dass ab Erreichen eines definierten Schwellenwertes eine Struktur (= Zelle) als positiv gewertet wird, wobei eine weitere Differenzierung verschiedener Intensitätsstufen nicht möglich ist. Bezogen auf die Ergebnis-Situation könnte dies bedeuten, analog der Immunhistochemie-Analyse der Hypothermie-Gruppe, dass die messbare Reduktion der Calpain-Aktivität nicht in einer völligen Protektion ganzer Zellen oder Zellverbände besteht, die keine Calpain-Aktivität mehr aufweisen, sondern in einem reduzierten Calpain-Gehalt einzelner Zellen.

Die Ergebnisse dieses Experiments konnten zum ersten Mal in einem Rattenmodell der fokalen transitorischen Ischämie zeigen, dass rtPA in verschiedenen hohen Dosen keine vermehrte Neurotoxizität im Sinne einer gesteigerten Calpain-Aktivität aufweist, sondern zu einer leichten Verringerung der Calpain-Aktivität führt. Zumindest für das Calpain-System kann damit die postulierte neurotoxische Wirkung von rtPA nicht bestätigt werden.

### 3. Calpain-Aktivität und Hypothermie

Die Reduzierung der Calpain-Aktivität unter Hypothermie-Bedingungen stellt die Haupteckdaten dieses Experiments dar. Daneben konnte eine Verringerung eines Substrates der Calpaine, MAP-2, beobachtet werden. Bis dato ist in keinem Modell der fokalen Ischämie gezeigt worden, dass Hypothermie die Calpainaktivität und den Substratverlust von MAP-2 reduziert. Die neuroprotektive Wirkung der milden Hypothermie bei der zerebralen Ischämie ist bereits seit längerem bekannt und konnte bereits in einem Tiermodell der traumatischen Rückenmarksverletzung durch Kompression<sup>(135)</sup> und bei traumatischer Hirnschädigung nachgewiesen werden.<sup>(16)</sup> Buki und Kollegen wiesen in ihrem Modell des traumatischen Axonschadens eine Reduktion Calpain vermittelter Abbauprodukte von alpha-Spectrin nach und schlossen auf einen geringeren zytoskelettalen Schaden durch geringere Calpain-Aktivität bei Hypothermie.<sup>(16)</sup> Im Gegensatz zu unserem Experiment wurde die Calpain-Aktivität selbst nicht erfasst, sondern ausschliesslich die Reduktion eines Calpain-Substrates verglichen mit der Normothermie-Gruppe.

Ein fraglicher klinischer Nutzen der therapeutischen Hypothermie ist Gegenstand klinischer Studien. In einer Patientenstudie konnten bei Hypothermie-behandelten Patienten mit akutem Schlaganfall im NMR signifikant kleinere Läsionen beobachtet werden.<sup>(25)</sup> Auch in der klinischen Erprobung bei neurochirurgischen Eingriffen gibt es Hinweise für ein besseres klinisches Outcome.<sup>(114)</sup>

Die positiven Effekte sowohl im Tiermodell als auch in klinischen Studien weisen auf ein großes therapeutisches Potenzial der Hypothermie als neuroprotektive Therapieform hin.

Als Schlüsselmechanismen werden die Konservierung der mikrovaskulären Basalmembran und eine anti-exzitotoxische Wirkung angesehen. Durch eine geringere Akkumulation von exzitatorischen Aminosäuren fällt der Ca-Einstrom nach intrazellulär geringer aus.<sup>(120)</sup> Der intrazelluläre Ca-Exzess stellt einen wichtigen Schrittmacher pathologischer Folgemechanismen dar, darunter die unphysiologisch hohe Calpain-Aktivierung. Im Rahmen dieses Mechanismus scheint eine verminderte Calpain-Aktivierung und eine sukzessiv geringere Proteolyse des Substrates MAP-2 wie in unserem experimentellen Setting plausibel. Ein geringerer oxi-

dativer Stress durch verminderte Produktion von freien Radikalen und reduzierte Glutamat-Freisetzung unterstützt die anti-exzitotoxische Hypothese ebenfalls für die posttraumatische Hypothermie im Tiermodell.<sup>(36)</sup>

Hamann und Kollegen konnten auf vaskulärer Ebene zeigen, dass die Hypothermie-Behandlung im Modell der fokalen Ischämie der Ratte die mikrovaskuläre Integrität verbessert, indem Proteasen inhibiert werden (MMP-2, MMP-9) und dadurch signifikant weniger Blutungen auftraten.<sup>(44)</sup>

Durch das Zusammentreffen der geschilderten Faktoren scheint die destabilisierende Wirkung exzessiver Proteasen-Aktivierung abgeschwächt zu werden, indem der Circulus vitiosus aus Ca-Einstrom und weiterer Proteasen-Aktivierung verlangsamt wird.<sup>(127)</sup> Wenngleich die Exzitotoxizität und die gestörte Ca-Homöostase in unserem Experiment nicht direkt untersucht wurden, unterstützen unsere Ergebnisse die Hypothese einer Verringerung des sekundären neuronalen Schadens durch Hypothermie.

Diese Ergebnisse sind von Wichtigkeit, da neben der Ischämie selbst auch die postischämische Reperfusion zum neuronalen Schaden und einer Vergrößerung des Infarktareals beiträgt.<sup>(4)</sup> Als Pathomechanismen des Reperfusionsschadens werden die Zerstörung mikrovaskulärer Strukturen<sup>(46) (48)</sup> und gesteigerte Freisetzung exzitatorischer Aminosäuren wie Glutamat betrachtet.<sup>(120)</sup> Damit liegen dem Reperfusionsschaden dieselben Mechanismen zugrunde wie denjenigen, die durch postischämische Hypothermie günstig beeinflusst werden.

Aus diesem Grund scheint die therapeutische Hypothermie nicht nur im Tiermodell ein viel versprechender Ansatz zu sein, sondern auch als klinische Therapieoption z.B. für Schlaganfall-Patienten. Abgesehen von einem günstigen Effekt durch die Hypothermie selbst durch oben diskutierte Aspekte kann die Hypothermie möglicherweise das Zeitfenster für andere therapeutische Interventionen verlängern. Denkbar wäre z.B. ein Zeitfenster für die intravenöse Lysetherapie mit rtPA, das deutlich länger ist als die gegenwärtig zugelassenen 3 h. Auch in der Kombination mit anderen neuroprotektiven Substanzen ist eine gesteigerte Therapieeffizienz denkbar. Zausinger und Kollegen konnten im Tiermodell eine Reduktion der Infarktgröße in Tieren zeigen, die mit einer Kombination aus Hypothermie und Neuroprotektiva behandelt wurden im Vergleich zu einer rein Hypothermie-behandelten Gruppe.<sup>(136)</sup>

Calpain-Inhibitoren haben die wichtige Rolle der Calpaine in der zerebralen Ischämie belegt.<sup>(6) (9) (78)</sup> Die Reduktion des Infarktolumens betrug je nach experimentellem Setting dabei 30 bis 75%. Eine zusätzliche Verbesserung dieses Effektes durch Hypothermie scheint nahe liegend. Die in unserem Experiment beobachtete reduzierte Infarktgröße (als Funktion der

MAP-2-Degradierung) liegt mit -20% in etwa in der Größenordnung der Infarktgrößenreduktion durch Calpain-Inhibitoren.

Die im vorliegenden Experiment im Western Blot nachgewiesene erhöhte Calpain-Aktivität in der ischämischen Hemisphäre normothermischer Tiere gegenüber der nicht ischämischen Hemisphäre bestätigt die in anderen Arbeiten gezeigte Ischämie-Abhängigkeit der Calpain-Aktivität.<sup>(7) (9) (70)</sup>

In der Western Blot Analyse war eine signifikante Reduktion der  $\mu$ -Calpain-Aktivität in der Hypothermie-behandelten Gruppe für den Kortex und die Basalganglien nachweisbar. Trotz dieses biochemischen Nachweises verminderter Calpain-Aktivität und eines ebenso verminderten Substratverlustes (MAP-2) ließ sich dieser Effekt in der immunhistochemischen Darstellung nicht bestätigen. Weder hinsichtlich der Zellzahl noch der Gesamtfläche Calpain positiver Zellen ließ sich eine Reduktion der Calpain-Aktivität in der Hypothermie-Gruppe gegenüber der Normothermie-Gruppe feststellen. Eine mögliche Ursache für diese Diskrepanz der Ergebnisse liegt in der Methode der Immunhistochemie. Möglicherweise ist diese Art der Darstellung nicht sensitiv genug, um den in der Western Blot Analyse gezeigten Rückgang der Calpain-Aktivität widerzuspiegeln. Basierend auf dem Prinzip der Immunhistochemie erfolgt nach Bindung eines spezifischen Primärantikörpers an ein Antigen die über den Sekundärantikörper vermittelte Farbreaktion. Dabei kommt es zu einer Alles-oder-Nichts-Reaktion in dem Sinne, dass ein Antikörper bindet, wenn ein passendes Antigen vorhanden ist. Und die Farbreaktion gibt dieses Verhältnis gleichsam stöchiometrisch wieder.

Daher ist es möglich, dass innerhalb einer Zelle starke graduelle Unterschiede in der gebotenen Färbeintensität resultieren in Abhängigkeit von der Menge an vorhandenem Antigen.

Mit der in unserem Falle verwendeten Software ist eine Differenzierung verschiedener Färbeintensitäten nicht möglich. Die zur Verfügung stehenden Makros unterscheiden lediglich zwischen gefärbter/ungefärbter Struktur (=Zelle) und der daraus resultierenden Gesamtheit gefärbter Fläche. Die Unterschiede in der Intensität werden nicht erfasst. Ist ein bestimmter zu definierender Schwellenwert erreicht, wird die einzelne Struktur (=Zelle) als positiv gewertet, unterhalb dieses Schwellenwertes wird die Struktur als negativ gewertet. Für unsere Ergebnisse bedeutet dies, dass die offensichtlich reduzierte Calpain-Aktivität sich nicht manifestiert in Form einer größeren Zahl komplett Calpain negativer Zellen. Es handelt sich also offenbar weniger um eine Protektion ganzer Zellen oder Zellverbände als vielmehr um eine generelle Reduktion mit verminderter aber nicht völlig fehlender Calpain-Aktivität der einzelnen Zellen.

Methodisch bedingt scheint die von uns verwendete Evaluierung eines Enzym-Substrates (MAP-2) als Parameter für die Infarktgröße nicht mit der in anderen Arbeiten verwendeten TTC-Methode vergleichbar.<sup>(136)</sup> Die TTC-Methode ist die klassische Art der Darstellung eines ischämischen Infarktareals.<sup>(10) (61)</sup> Ein Nachteil dieser Methode besteht in der Tatsache, dass das Ausmaß der Zellschädigung weder mikroskopisch noch biochemisch spezifisch analysiert werden kann und sie somit ein rein morphometrisches Instrument darstellt. In Vorarbeiten unserer Gruppe konnte gezeigt werden, dass eine enge Korrelation zwischen dem Verlust von MAP-2 und der mit MRI ermittelten Infarktgröße besteht.<sup>(63)</sup> Somit ist der (post-)ischämische MAP-2-Verlust nicht nur ein relevanter pathophysiologischer Faktor, sondern auch ein morphometrisch verwertbarer Parameter.

Neben den neuen Ergebnissen und daraus resultierenden pathophysiologischen Überlegungen weist dieses experimentelle Setting auch einige Einschränkungen auf.

Zum einen ist eine Beteiligung anderer protektiver Mechanismen an dem geringeren MAP-2-Verlust denkbar. Zwar ist bekannt, dass MAP-2 ein Substrat für  $\mu$ -Calpain ist<sup>(70) (97)</sup>, aber die Beteiligung anderer intrazellulärer Proteasen an der MAP-2 Degradation ist ebenso beschrieben worden. Insofern kann eine Hypothermie bedingte Inhibition anderer Proteasen eine weitere Komponente des reduzierten MAP-2-Abbaus darstellen. Ein denkbarer Lösungsansatz wäre, das Experiment mit längeren Ischämiezeiten zu wiederholen. Wenn die Infarktgröße der Hypothermie-Gruppe durch längere Okklusionsdauer der MCA auf die Größe der normothermischen Gruppe titriert würde und sich dennoch eine reduzierte Calpain-Aktivität nachweisen ließe, so spräche dies für eine kausale Rolle der Calpaine. Dieses experimentell-operative Vorgehen wurde in diesem Falle nicht gewählt, weil Okklusionsintervalle von mehr als 3 h Dauer mit einer drastisch erhöhten Mortalität der Versuchstiere einhergehen und somit auch keine reliablen Ergebnisse mehr zu erwarten wären.

Eine zweite Einschränkung könnte in der Sichtweise bestehen, dass die Hypothermie die Calpain-Aktivität nur indirekt senkt. Der in der Western Blot Analyse nachgewiesene Rückgang der Calpain-Aktivität könnte sekundär als Folge einer primär reduzierten Infarktgröße entstanden sein. Allerdings ist ein direkter Effekt auf Ionen- und Transmitterprozesse mehrfach beim experimentellen Schlaganfall beschrieben. Deng und Kollegen wiesen eine starke Reduktion der postischämischen Inflammationsprozesse unter Hypothermie nach.<sup>(27)</sup> Desweiteren scheint ein rein sekundärer Rückgang der Calpain-Aktivität allein aufgrund eines kleineren Infarktolumens unwahrscheinlich, da nicht die Infarktgröße allein mittels Hämatoxilin- oder Silber-Färbung bestimmt wurde. Vielmehr wurde die Infarktgröße korreliert mit dem Verlust an MAP-2. Und geringerer Verlust dieses Proteins bedeutet primär nicht nur ein klei-

neres Infarktvolume, sondern vielmehr eine verminderte proteolytische Aktivität der für den Abbau verantwortlichen Protease, d.h. von  $\mu$ -Calpain. Insofern ist die reduzierte Menge an aktivem Enzym im Western Blot konsistent mit der Beobachtung einer verminderten Proteolyse des zugehörigen Substrates.

Die Ergebnisse zur Untersuchung der Calpain-Aktivität unter Hypothermie-Bedingungen im experimentellen Schlaganfallmodell der Ratte zeigen, dass moderate Hypothermie die Calpain-Aktivität vermindert und dass auch der Abbau von MAP-2, eines Calpain-Substrates, vermindert ist, was durch Immunhistochemie demonstriert werden konnte. Die Gesamtheit dieser Resultate untermauert die Hypothese, dass Hypothermie den sekundären neuronalen Schaden mildern und möglicherweise auf diesem Weg das klinische Outcome von Schlaganfall-Patienten verbessern kann.

#### **4. Calpain-Aktivität unter rtPA/Hypothermie**

Ein weiterer Teil unserer dieser Arbeit untersuchte den Einfluss einer Kombination von rtPA und Hypothermie auf die Calpain-Aktivität bei zerebraler Ischämie.

Das Hauptergebnis dieses Versuches besteht in der Beobachtung einer signifikant geringeren Calpain-Aktivität in der rtPA/Hypothermie-Gruppe gegenüber der Normothermie-Gruppe ohne rtPA. Diese reduzierte Aktivität war sowohl für die Zahl Calpain-positiver Zellen im Kortex als auch in den Basalganglien nachweisbar. Für die Gesamtfläche Calpain-positiver Zellen war die Reduktion signifikant geringer für den Kortex, während in den Basalganglien die Gesamtfläche zwar geringer war, allerdings ohne statistisch signifikant zu sein.

Für die nur mit rtPA behandelten Gruppen konnte in dieser Arbeit immunhistochemisch ebenso eine tendenziell niedrigere Calpain-Aktivität gezeigt werden, ohne dass dabei ein statistisches Signifikanzniveau erreicht wurde. In diesem oben diskutierten Versuch konnte gezeigt werden, dass selbst eine Hochdosisapplikation (18mg rtPA/kg KG) nicht zu einer Zunahme der Calpain-Aktivität führt, wie im Zusammenhang mit der diskutierten rtPA-vermittelten Neurotoxizität beschrieben wird. <sup>(125)</sup>

Unter den Hypothermie-Bedingungen konnte in dieser Arbeit ebenso eine immunhistochemisch messbare Reduktion der Calpain-Aktivität demonstriert werden; analog den rtPA-behandelten Gruppen fiel der Aktivitätsrückgang nicht signifikant aus, wobei die Western Blot-Analyse in diesem Falle eine signifikante Reduktion zeigte, so dass die fehlende Signifikanz in der Methode der Immunhistochemie liegt (siehe auch Punkt 2 und 3 der Diskussion).

Die Kombination dieser beiden experimentellen Ansätze (rtPA + Hypothermie) resultiert in einer statistisch signifikanten Verminderung der Calpain-Aktivität.

Die statistisch signifikante Verminderung der Calpain-Aktivität in der Gruppe „rtPA+Hypothermie“ legt den Schluss nahe, dass die Kombination aus zwei Einflussfaktoren, die jeweils die Calpain-Aktivität insignifikant senken, zu einer mit der Immunhistochemie signifikant messbaren Reduzierung der Calpain-Aktivität führen. Dieser Effekt könnte mittels Western Blot-Analyse möglicherweise quantitativ bestätigt werden.

Diese Beobachtungen sprechen in summa eher für eine neuroprotektive Wirkung der Kombination dieser beiden Faktoren, wobei eine Steigerung des protektiven Effektes der Hypothermie plausibel erscheint. <sup>(16,25,135)</sup> Die klinische Bedeutung könnte in einer durch rtPA-Lysetherapie unter Hypothermiebedingungen erhöhten Neuroprotektion und besserem klinischem Outcome liegen.

## Zusammenfassung

Die effektive Therapie des ischämischen Schlaganfalls stellt trotz der Möglichkeit der Thrombolyse-Behandlung nach wie vor ein Problem dar. Gerade im Zusammenhang mit der medikamentösen Lyse wird vielfach von einer vermehrten Neurotoxizität ausgegangen. In der klinischen Praxis besteht bis dato keine in klinischen Studien validierte Möglichkeit, das Hirngewebe vor den Pathomechanismen der zerebralen Ischämie zu schützen. Die Hypothermie-Behandlung scheint in diesem Kontext ein viel versprechender Ansatz zur Neuroprotektion zu sein

Die experimentelle Forschung konzentriert sich daher darauf, die pathophysiologischen Mechanismen der Zellschädigung besser zu verstehen. Bekannt ist, dass die Dysregulierung verschiedener intra- und transzellulärer Systeme zu pathologischer Aktivierung der Calpaine führt. Unter unphysiologischer Aktivierung vermitteln Calpaine die Proteolyse zahlreicher Substrate, darunter viele Strukturproteine, und tragen so wesentlich zur Zellschädigung bei.

Zum einen sollte in unseren Experimenten das zelluläre Verteilungsmuster der Calpaine bei zerebraler Ischämie in Abhängigkeit von der Reperfusionsdauer untersucht werden. Bis dato wurde die pathologische Calpainaktivierung bei zerebraler Ischämie vor allem den neuronalen Zellen zugesprochen. Zum besseren Verständnis Calpain-vermittelter Schädigung sollte die Rolle nicht neuronaler Zellen untersucht werden. Die Ergebnisse dieser Experimente lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

Neurone stellen zu jedem Zeitpunkt den größten Anteil der Calpain positiven Zellen dar.

Mikrogliazellen stellen insbesondere in den subkortikalen Infarktanteilen einen mit der Reperfusionsdauer zunehmenden Anteil der Calpain positiven Zellen dar.

Endothelzellen stellen mit zunehmender Reperfusionsdauer vor allem in kortikalen Infarkt-arealen einen wesentlichen Beitrag zur Calpain- Aktivität dar.

Nicht neuronale Zellen sind bei fokaler zerebraler Ischämie wesentlich an der Calpain- Aktivität beteiligt, was die Komplexität Calpain vermittelter Schädigung im ZNS untermauert.

In unseren Experimenten sollte zum anderen der Zusammenhang zwischen Calpain- Aktivität und einer Hypothermie-Behandlung und der Einfluss einer Therapie mit rekombinantem Plasminogenaktivator (rtPA) untersucht werden. Die Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

Hypothermie-behandelte Tiere wiesen eine signifikant geringere Calpain- Aktivität auf als die Normothermie-behandelten Tiere.



Hypothermie-behandelte Tiere zeigten einen signifikant kleineren Infarkt als die Normothermie-behandelten Tiere, was für einen geringeren Verlust von MAP-2, das ein Substrat von Calpain ist, spricht.

rtPA-behandelte Tiere zeigten eine leicht verminderte Calpain-Aktivität (nicht signifikant), so dass nicht von einer vermehrten Neurotoxizität von rtPA ausgegangen werden kann.

rtPA- und Hypothermie-behandelte Tiere zeigten eine signifikant reduzierte Calpain-Aktivität, so dass eine neuroprotektive Wirkung dieser Kombinationstherapie vermutet werden kann (additiver Effekt).

## VI. LITERATURVERZEICHNIS

- [1] **Anonym**, Kapitel 16 Gesundheitswesen, In: Statistisches Bundesamt (Ed.): Statistisches Jahrbuch 1998 (Statistisches Bundesamt: Wiesbaden 1998).
- [2] **Ankarcrona M, Dypbukt J.M, Bonfoco E, Zhivotovsky B., Orrenius S, Lipton S.A., Nicotera P.**, Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function, *Neuron* 15(4) (1995) 961-973.
- [3] **Aono Y., Ariyoshi H., Tsuji Y., Ueda A., Tokunaga M., Sakon M., Mond M.**, Localized activation of m-calpain in human umbilical vein endothelial cells upon hypoxia, *Thromb. Res.* 102(4) (2001) 353-361.
- [4] **Aronowski J., Strong R., Grotta J.C.**, Reperfusion injury: demonstration of brain damage produced by reperfusion after transient focal ischemia in rats, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 17 (1997) 1048-1056.
- [5] **Baethmann A.**, Das ischämische Hirnödem, in: Grossmann W., Paal G. (Eds.): Schlaganfall. Pathologie und Therapie des ischämischen Infarktes, Schattauer, Stuttgart-New York, 1987.
- [6] **Bartus R.T., Baker K.L., Heiser A.D., Sawyer S.D., Dean R.L., Elliott P.J., Straub J.A.**, Postischemic administration of AK275, a calpain inhibitor, provides substantial protection against focal ischemic brain damage, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 14 (1994) 537-544.
- [7] **Bartus R.T., Dean R.L., Cavanaugh K., Eveleth D., Carriero D.L., Lynch G.**, Time-related neuronal changes following middle cerebral artery occlusion : Implications for therapeutic interventions and the role of calpain, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 15 (1995) 969-979.
- [8] **Bartus R.T., Dean R.L., Mennerick S., Eveleth D., Lynch G.**, Temporal ordering of pathogenic events following transient global ischemia, *Brain Res.* 790 (1998) 1-13.

- [9] **Bartus R.T., Hayward N.J., Elliott P.J., Sawyer S.D., Baker K.L., Dean R.L., Akiyama A., Straub J.A., Harbeson S.L., Li Z., et al.,** Calpain inhibitor AK295 protects neurons from focal brain ischemia. Effects of postocclusion intra-arterial administration, *Stroke* 25 (1994) 2265-2270.
- [10] **Bederson J.B., Pitts L.H., Germano S.M., Nishimura M.C., Davis R.L., Bartkowski H.M.,** Evaluation of 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride as a stain for detection and quantification of experimental cerebral infarction in rats, *Stroke* 17(6) (1986) 1304-1308.
- [11] **Beckman J.S., Koppenol W.H.,** Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad and ugly , *Am. J. Physiol.* 271 (1996) 1424-1437.
- [12] **Blomgren K., Hallin U., Andersson A.L., Puka-Sundvall M., Bahr B.A., McRae A., Saido T.C., Kawashima S., Hagberg H.,** Calpastatin is upregulated in response to hypoxia and is a suicide substrate to calpain after neonatal cerebral hypoxia-ischemia, *J. Biol. Chem.* 274(20) (1999) 14046-14052.
- [13] **Blomgren K., Zhu C., Wang X., Karlsson J.O., Leverin A.L., Bahr B.A., Mallard C., Hagberg H.,** Synergistic activation of caspase-3 by m-calpain after neonatal hypoxia-ischemia: a mechanism of “pathological apoptosis”?, *J. Biol. Chem.* 276(13) (2001) 10191-10198.
- [14] **Bonfoco E., Krainc D., Ankarcrona M., Nicotera P., Lipton S.A.,** Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92(16) (1995) 7162-7166.
- [15] **Boysen G., Christensen H.,** Stroke severity determines body temperature in acute stroke, *Stroke* 32(2) (2001) 413-417.

- [16] **Büki A., Koizumi H., Povlishok J.T.**, Moderate postraumatic hypothermia decreases early calpain-mediated proteolysis and concomitant cytoskeletal compromise in traumatic axonal injury, *Exp. Neurol.* 159 (1999) 319-328.
- [17] **Burggraf D., Martens H.K., Jäger G., Hamann G.F.**, Recombinant human tissue plasminogen activator protects the basal lamina in experimental focal cerebral ischemia, *Thromb. Haemost.* 89(6) (2003) 1072-1080.
- [18] **Carmeliet P., Moons L., Lijnen R., Baes M., Lemaitre V., Tipping P., Drew A., Eeckhout Y., Shapiro S., Lupu F., Collen D.**, Urokinase-generated plasmin activates matrix metalloproteinases during aneurysm formation, *Nat. Genet.* 17 (4) 439-444.
- [19] **Chera B., Schaecher K.E., Rocchini A., Imam S.Z., Sribnick E.A., Ray S.K., Ali S.F., Banik N.L.**, Immunofluorescent labeling of increased calpain expression and neuronal death in the spinal cord of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated mice, *Brain Res.* 1006(2) (2004) 150-156.
- [20] **Chopp M., Li Y., Jiang N., Zhang R.L., Probst J.**, Antibodies against adhesion molecules reduce apoptosis after transient middle cerebral artery occlusion in rat brain, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 16(4) (1996) 578-584.
- [21] **Clark W.M., Wissmann S., Albers G.W., Jhamandas J.H., Madden K.P., Hamilton S.**, Recombinant tissue-type plasminogen activator (Alteplase) for ischemic stroke 3 to 5 hours after symptom onset. The ATLANTIS Study: A randomized controlled trial. Alteplase for Acute Noninterventional Therapy in Ischemic Stroke, *JAMA* 282 (21) (1999) 2019-2026.
- [22] **Colbourne F., Corbett D., Zhao Z., Yang J., Buchan A.M.**, Prolonged but delayed postischemic hypothermia: a long-term outcome study in the rat middle cerebral artery occlusion model, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 20(12) (2000) 1702-1708.

- [23] **Cong J.Y., Goll D.E., Peterson A.M., Kapprell H.P.,** The role of autolysis in activity of the  $Ca^{2+}$ -dependent proteinases ( $\mu$ -calpain and  $m$ -calpain), *J. Biol. Chem.* 264(17) (1989) 10096-10103.
- [24] **Dayton W.R.,** Comparison of low- and high calcium requiring forms of the calcium-activated protease with their autocatalytic breakdown products, *Biochim. Biophys. Acta* 709(2) (1982) 166-172.
- [25] **De Georgia M.A., Krieger D.W., Abou-Chebl A., Devlin T.G., Jauss M., Davis S.M., Koroshetz W.J., Rordorf G., Warach S.,** Cooling for acute ischemic brain damage (COOL AID): a feasibility trial of endovascular cooling, *Neurology* 63(2) (2004) 312-317.
- [26] **Del Cerro S., Arai A., Kessler M., Bahr B.A., Vanderklish P., Rivera S., Lynch G.,** Stimulation of NMDA receptors activates calpain in cultured hippocampal slices, *Neurosci. Lett.* 167 (1994) 149-152.
- [27] **Deng H., Han H.S., Cheng D., Sun G.H., Yenari M.A.,** Mild hypothermia inhibits inflammation after experimental stroke and brain inflammation, *Stroke* 34(10) (2003) 2495-2501.
- [28] **Elce J.S., Davies P.L., Hegadorn C., Maurice D.H., Arthur J.S.,** The effects of truncations of the small subunit on  $m$ -calpain and heterodimer formation, *Biochem. J.* 326(1) (1997) 31-38.
- [29] **Endres M., Dirnagl U.,** Ätiologie und Pathogenese, in: Hamann, Siebler, von Scheidt (Eds): Schlaganfall: Klinik, Diagnostik, Therapie, ecomed (2002) 91-112.
- [30] **Endres M., Fink K., Zhu J., Stagliano N.E., Bondada V., Geddes J.W., Azuma T., Mattson M.P., Kwiatkowski D.J., Moskowitz M.A.,** Neuroprotective effects of gelsolin during murine stroke, *J. Clin. Invest.* 103 (3) (1999) 347-354.
- [31] **Endres M., Namura S., Shimizu-Sasamata M., Waeber C., Zhang L., Gomez-Isla T., Hyman B.T., Moskowitz M.A.,** Attenuation of delayed neuronal death

after mild focal ischemia in mice by inhibition of the caspase family, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 18(3) (1998) 238-247.

- [32] **Faddis B.T., Hasbani M.J., Goldberg M.P.,** Calpain activation contributes to dendritic remodeling after brief excitotoxic injury in vitro, *J. Neurosci.* 17 (1997) 951-959.
- [33] **Feuerstein G.Z., Wang X., Barone F.C.,** Pathophysiology, diagnosis and management, in: *Cerebrovascular Disease* (Ginsberg M.D., Bogousslavsky J., Eds.), Blackwell Science (1998) 507-531.
- [34] **Gil-Parrado S., Popp O., Knoch T.A., Zahler S., Bestvater F., Felgentrager M., Holloschi A., Fernandez-Montalvan A., Auerswald E.A., Fritz H., Fuentes-Prior P., Machleidt W., Spiess E.,** Subcellular localization and in vivo subunit interactions of ubiquitous mu-calpain, *J. Biol. Chem.* 278(18) (2003) 16336-16346.
- [35] **Giulian D.,** Immune responses and dementia, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 835 (1997) 91-110.
- [36] **Globus M.Y., Alonso O., Dietrich W.D., Busto R., Ginsberg M.D.,** Glutamate release and free radical production following brain injury: effects of posttraumatic hypothermia, *J. Neurochem.* 65 (1995) 1704-1711.
- [37] **Goll D.E., Thompson V.F., Taylor R.G., Zalewska T.,** Is calpain activity regulated by membranes and autolysis or by calcium and calpastatin?, *Bioessays* 14(8) (1992) 549-556.
- [38] **Grehl H., Reinhardt F.,** *Checkliste Neurologie*, Thieme Verlag (2002).
- [39] **Grobholz K., Burggraf D., Martens K.H., Wunderlich N., Pichler M., Hamann G.F.,** Recombinant tissue plasminogen activator attenuates basal lamina antigen loss after experimental focal cerebral ischemia, *Neurol. Res.* 27 (2) (2004) 212-217.

- [40] **Grynspan F., Griffin W.B., Mohan P.S., Shea T.B., Nixon R.A.,** Calpains and calpastatin in SH-SY5Y neuroblastoma cells during retinoic acid-induced differentiation and neurite outgrowth: comparison with the human brain calpain system , *J. Neurosci Res.* 48 (1997) 181-191.
- [41] **Guroff G.,** A neutral, calcium-activated proteinase from the soluble fraction of rat brain, *J. Biol. Chem.* 239 (1964) 149-155.
- [42] **Hacke W., Kaste M., Fieschi C., Toni D., Lesaffre E., von Kummer R., Boysen G., Bluhmki E., Hoxter G., Mahagne MH., et al.,** Intravenous thrombolysis with recombinant tissue plasminogen activator for acute hemispheric stroke. The European Cooperative Acute Stroke Study (ECASS), *JAMA* 274 (13) (1995) 1017-1025,
- [43] **Hacke W., Kaste M., Fieschi C., von Kummer R. Davalos A., Meier D., Larrue V., Bluhmki E., Davis S., Donnan G., Schneider D., Diez-TejedorE., Trouillas P.,** Randomised double-blind placebo-controlled trial of thrombolytic therapy with intravenous alteplase in acute ischemic stroke (ECASS II). Second EuropeanAustralasian Acute Stroke Study Investigatores, *Lancet* 352 (9136) (1998) 1245-1251.
- [44] **Hamann G.F., Burggraf D., Martens H.K., Liebetrau M., Jäger G., Wunderlich N., De Georgia M., Krieger W.D.,** Mild to moderate hypothermia prevents microvascular basal lamina antigen loss in experimental focal cerebral ischemia, *Stroke* 35(3) (2004) 764-769.
- [45] **Hamann G.F., del Zoppo G.J., von Kummer R.,** Hemorrhagic transformation of cerebral infarction – possible mechanisms, *Thromb. Haemost.* 82 Suppl. 1 (1999) 92-94.
- [46] **Hamann G.F., Liebetrau M., Martens K.H., Burggraf D., Kloss C. U., Bültemeier G., Wunderlich N., Jäger G., Pfefferkorn T.,** Microvascular basal la-

ina injury after experimental focal cerebral ischemia and reperfusion in the rat, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 22 (2002) 526-533.

- [47] **Hamann G.F., Okada Y., del Zoppo G.J.**, Hemorrhagic transformation and microvascular integrity during focal cerebral ischemia /reperfusion, *J.Cereb. Blood Flow Metab.* 16(6) (1996) 1373-1378.
- [48] **Hamann G.F., Okada Y., Fitridge G., Del Zoppo G.J.**, Microvscular basal lamina antigens disappear during cerebral ischemia an d reperfusion, *Stroke* 26(11) (1995) 2120-2126.
- [49] **Hansen A.J., Zeuthen T.**, Extracellular ion concentration during spreading depression and ischemia in the rat brain cortex, *Acta Physiol. Scand.* 113 (1981) 437-445.
- [50] **Hinman J.D., Duce J.A., Siman R.A., Hollander J.W., Abraham C.R.**, Activation of calpain-1 in myelin and microglia in the white matter of the aged rhesus monkey, *J. Neurochem.* 89(2) (2004) 430-441.
- [51] **Hong S.C., Goto Y., Lanzino G., Soleau S., Kassell N.F., Lee K.S.**, Neuroprotection with a calpain-inhibitor in a model of focal cerebral ischemia, *Stroke* 25 (1994) 663-669.
- [52] **Hong S.C., Lanzino G., Goto Y., Klang S.K., Schottler F., Kassell N.F., Lee K.S.**, Calcium-activated proteolysis in rat neocortex induced by transient focal ischemia, *Brain Res.* 661 (1994) 43-50.
- [53] **Hossmann K.A.**, Periinfarct depolarizations, *Cerebrovasc. Brain Metab. Rev.* 8(3) (1996) 195-208.
- [54] **Huang K.P.**, The mechanisms of protein kinase C activation, *Trends Neurosci.* 12 (1989) 425-432.



- [55] **Huang Z., Huang P.L., Panahian N., Dalkara T., Fishman M.C., Moskowitz M.A.**, Effects of cerebral ischemia in mice deficient in neuronal nitric oxide synthase, *Science* 265(5180) (1994) 1883-1885.
- [56] **Iadecola C.**, Bright an dark side of nitric oxide in ischemic brain injury, *Trends Neurosci.* 20(3) (1997) 132-139.
- [57] **Iijima T., Mies G., Hossmann K.A.**, Repeated negative DC deflections in rat cortex following middle cerebral artery occlusion are abolished by MK-801: effect on volume of ischemic injury, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 12(5) 727-733.
- [58] **Inomata M., Hayashi M., Ohno-Iwashita Y., Tsubuki S., Saido T.C., Kawashima S.**, Involvement of calpain in integrin-mediated signal transduction, *Arch. Biochem. Biophys.* 328(1) (1996)129-134.
- [59] **Johnson G.V., Litsersky J.M., Jope R.S.**, Degradation of microtubule-associated protein 2 and brain spectrin by calpain: a comparative study, *J. Neurochem.* 56(5) (1991) 1630-1638.
- [60] **Jones T.H., Morawetz R.B., Crowell R.M., Marcoux F.W., FitzGibbon S.J., DeGirolami U., Ojemann R.G.**, Thresholds of focal cerebral ischemia in awake monkeys, *J. Neurosurg.* 54(6) (1981) 773-782.
- [61] **Joshi C.N., Jain S.K., Murthy P.S.**, An optimized triphenyltetrazolium chloride method for identification of cerebral infarcts, *Brain Res. Brain Res. Protoc.* 13(1) (2004) 11-17.
- [62] **Kataoka K., Yanase H.**, Mild hypothermia – a revive countermeasure against ischemic neuronal damages, *Neurosci. Res.* 32 (1998) 103-117.
- [63] **Kloss C.U., Thomassen N., Fesl G., Martens K.H., Yousri T.A., Hamann G.F.**, Tissue-saving infarct volumetry using histochemistry validated by MRI in rat focal cerebral ischemia, *Neurol. Res.* 24 (7) (2002) 713-718.

- [64] **Kollmar R., Schabitz W.R., Heiland S., Georgiadis D., Schellinger P.D., Bardutzky J., Schwab S.** Neuroprotective effect of delayed moderate hypothermia after focal cerebral ischemia: an MRI study, *Stroke* 33(7) (2002) 1899-1904.
- [65] **Kunimatsu M., Ma X.J., Nishimura J., Baba S., Hamada Y., Shioiri T., Sasaki M.** Neutrophil chemotactic activity of N-terminal peptides from the calpain small subunit, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 169(3) (1990) 1242-1247.
- [66] **Kurtzke J.F.**, The current burden of illness and injury in the US, *Neurology* 32 (1982) 1207-1212.
- [67] **Kuwaki T., Satoh H., Ono T., Shibayama F., Yamashita T., Nishimura T.** Nilvadapine attenuates ischemic degradation of gerbil brain cytoskeletal proteins, *Stroke* 20(1) (1989) 78-83.
- [68] **Lee K.S., Frank S., Vanderklish P., Arai A., Lynch G.** Inhibition of proteolysis protects hippocampal neurons from ischemia, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 (1991) 7233-7237.
- [69] **Li P.A., Howlett W., He Q.P., Miyashita H., Siddiqui M., Shuaib A.** Postischemic treatment with calpain inhibitor MDL-28170 ameliorates brain damage in a gerbil model of global ischemia, *Neurosci. Lett.* 247 (1998) 17-20.
- [70] **Liebetrau M., Stauffer B., Auerswald E.A., Gabrijelcic-Geiger D., Fritz H., Zimmermann C., Pfefferkorn T., Hamann G.F.** Increased intracellular calpain detection in experimental focal cerebral ischemia, *NeuroReport* 10 (1999) 529-534.
- [71] **Lijnen H.R., Silence J., Lemmens G., Frederix L., Collen D.** Regulation of gelatinase activity in mice with targeted inactivation of components of the plasminogen/plasmin system, *Thromb. Haemost* 79 (6) (1998) 1171-1176.
- [72] **Lin G.D., Chattopadhyay D., Maki M., Wang K.K., Carson M., Jin L., Yuen P.W., Takano E., Hatanaka M., DeLucas L.J., Narayana S.V.** Crystal structure of calcium bound domain IV of calpain at 1.9 Å resolution and its role in

enzyme assembly, regulation, and inhibitor binding, *Nat. Struct. Biol.* 4(7) (1997) 539-547.

- [73] **Lindsberg P.J., Carpen O., Paetau A., Karjalainen-Lindsberg M.L., Kaste M.**, Endothelial ICAM-1 expression associated with inflammatory cell response in human ischemic stroke, *Circulation* 94(5) (1996) 939-945.
- [74] **Liotta L.A., Goldfarb R.H., Brundage R., et al.**, Effect of plasminogen activator (urokinase), plasmin, and thrombin on glycoprotein and collagenous components of basement membrane, *Cancer Res.* 41 (1981) 4629-4636
- [75] **Lipton S.A., Rosenberg P.A.**, Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders, *New Engl. J. Med.* 330(9) (1994) 613-622.
- [76] **Longa E.Z., Weinstein P.R., Carlson S., et al.**, Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats, *Stroke* 20(1) (1989) 84-91.
- [77] **Majno G., Joris I.**, Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death, *Am. J. Pathol.* 146(1) (1995) 3-15.
- [78] **Markgraf C.G., Velayo N.L., Johnson M.P., McCarty D.R., Medhi S., Koehl J.R., Chmielewski P.A., Linnik M.D.**, Six hour window of opportunity for calpain inhibition in focal cerebral ischemia in rats, *Stroke* 29 (1998) 152-158.
- [79] **Martin R.L., Lloyd H.G., Cowan A.I.**, The early events of oxygen and glucose deprivation: setting the scene for neuronal death?, *Trends Neurosci.* 17(6) (1994) 251-257.
- [80] **Melloni E., Salamino F., Sparatore B.**, The calpain-calpastatin system: Properties and possible functions, *Biochimie* 74 (1992) 217-223.
- [81] **Mies G., Iijima T., Hossmann K.A.**, Correlation between peri-infarct DC-shifts and ischemic neuronal damage in rat, *Neuroreport* 4(6) (1993) 709-711.

- [82] **Molinari M., Anagli J., Carafoli E.,** Ca<sup>2+</sup>-activated neutral protease is active in the erythrocyte membrane in its nonautolyzed 80-kDa form, *J. Biol. Chem.* 269(45) (1994) 27992-27995.
- [83] **Murachi T.,** Introduction: Physiological significance of the calpain-calpastatin system, in: *Intracellular Calcium-Dependent Proteolysis* (Mellgren R.L., Murachi T., Eds.) Boca Raton, FL: CRC (1990) 157-162.
- [84] **Namura, S, Zhu F., Fink K., Endres M., Srinivasan A., Tomaselli K.Y., Yuan J., Moskowitz M.A.,** Activation and cleavage of caspase-3 in apoptosis induced by experimental cerebral ischemia, *J. Neurosci.* 18(10) (1998) 3659-3668.
- [85] **Nath R., Raser K.J., McGinnis K., Nadimpalli R., Stafford D., Wang K.K.,** Effects of ICE-like protease and calpain inhibitors on neuronal apoptosis, *Neuroreport* 20;8(1) (1996) 249-255.
- [86] **Nath R., Raser K.D., Stafford D., Hajimohammadreza I., Posner A., Allen H., Talanian A.V., Yuen P., Gilbertsen R.B., Wang K.K.,** Non-erythroid alpha-spectrin breakdown by calpain and interleukin-1 beta-converting-enzyme-like protease(s) in apoptotic cells: contributory rolls of both protein families in neuronal apoptosis, *Biochem. J.* 319 (1996) 683-690.
- [87] **Nehls, D.G., Park C.K., MacCormack A.G., McCulloch J.,** The effects of N-methyl-D-aspartate receptor blockade with MK-801 upon the relationship between cerebral blood flow and dglucose utilisation, *Brain Res.* 511(2) (1990) 271-279.
- [88] **Neumar R.W., Hagle S.M., DeGarcia D.J., Krause G.S., White B.C.,** Brain  $\mu$ -calpain autolysis during global cerebral ischemia, *J. Neurochem.* 66 (1996) 421-424.
- [89] **Neumar R.W., Meng F.H., Mills A.M., Xu Y.A., Zhang C., Welsh F.A., Siman A.,** Calpain activity in the rat brain after transient forebrain ischemia, *Exp. Neurol.* 170(1) (2001) 27-35.

- [90] **Newcomb-Fernandez J.K., Zhao X., Pike B.R., Wang K.K., Kampfl A., Beer R., DeFord S.M., Hayes R.L.**, Concurrent assessment of calpain and caspase-3 activation after oxygen-glucose deprivation in primary septo-hippocampal cultures, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 21(11) (2001) 1281-1294.
- [91] **Nicole O., Docagne F., Ali C., Margail I., Carmeliet P., MacKenzie E.T., Vivien D., Buisson A.**, The proteolytic activity of tissue-plasminogen activator enhances NMDA receptor-mediated signaling, *Nat. Med.* 7(1) (2001) 59-64.
- [92] **Nogawa S., Zhang F., Ross M.E., Iadecola C.**, Cyclo-oxygenase-2 gene expression in neurons contributes to ischemic brain damage, *J Neurosci.* 17(8) (1997) 46-55.
- [93] **Ohno S., Emori Y., Imajoh S., Kawasaki H., Kisaragi M., Suzuki K.**, Evolutionary origin of a calcium-dependent protease by fusion of genes for a thiol protease and a calcium-binding protein, *Nature* 312(5994) (1984) 566-570.
- [94] **Ohta K., Graf R., Rosner G., Heiss W.D.**, Profiles of cortical tissue depolarization in cat focal cerebral ischemia in relation to calcium ion homeostasis and nitric oxide production, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 17 (1997) 1170-1181.
- [95] **Perlmutter L. S., Gall C., Baudry M., Lynch G.**, Distribution of calcium-activated protease calpain in the rat brain, *J Comp. Neurol.* 296(2) (1990) 269-276.
- [96] **Pettigrew L.C., Holtz M.L., Craddock S.D., Minger S.L., Hall N., Geddes J.W.**, Microtubular proteolysis in focal cerebral ischemia, *J.Cereb. Blood Flow Metab.* 16(6) (1996) 1189-1202.
- [97] **Poeck, K., Hacke W.**, *Neurologie*, Springer-Verlag (2001).
- [98] **Posmantur R., Kampfl A., Siman R., Liu J., Zhao X., Clifton G.L., Hayes R.L.**, A calpain inhibitor attenuates cortical cytoskeletal protein loss after experimental traumatic brain injury in the rat, *Neuroscience* 77(3) (1997) 875-888.

- [99] **Rami A., Kriegstein J.**, Protective effects of calpain inhibitors against neuronal damage caused by cytotoxic hypoxia in vitro and ischemia in vivo, *Brain Res.* 609 (1993) 67-70.
- [100] **Ray S.K., Hogan E.L., Banik N.L.**, Calpain in the pathophysiology of spinal cord injury: neuroprotection with calpain inhibitors, *Brain Res. Brain Res. Rev.* 42(2) (2003) 169-185.
- [101] **Ray S.K., Wilford G.G., Matzelle D.C., Hogan E.L., Banik N.L.**, Calpeptin and methylprednisolone inhibit apoptosis in rat spinal cord injury, *Ann. N.Y.Acad. Sci.* 890 (1999) 261-269.
- [102] **Richard I., Broux O., Allamand V., Fougousse F., Chiannikulchai N., Bourg N., Brenguier L., Devaud C., Pasturaud P., Roudaut C., et al.**, Mutations in the proteolytic enzyme calpain 3 cause limb-girdle muscular dystrophy type 2A, *Cell* 81(1) (1995) 27-40.
- [103] **Roberts-Lewis J.M., Savage M.J., Marcy V.R., Pinsler L.R., Siman R.**, Immunolocalization of calpain I-mediated spectrin degradation to vulnerable neurons in the ischemic gerbil brain, *J. Neurosci.* 14 (1994) 3934-3944.
- [104] **Saido T.C., Mizuno K., Suzuki K.**, Proteolysis of protein kinase C by calpain: effect of acidic phospholipids, *Biomed. Biochim. Acta* 50(4-6) (1991) 485-489.
- [105] **Saido T.C., Shibata M., Takenawa T., Murofushi H., Suzuki K.**, Positive regulation of mu-calpain action by polyphosphoinositides, *J. Biol. Chem.* 267(34) (1992) 24585-24590.
- [106] **Saido T.C., Yokota M., Nagao S., Yamaura I., Tani E., Tsuchiya T., Suzuki K., Kawashima S.**, Spatial resolution of fodrin proteolysis in postischemic brain, *J. Biol. Chem.* 268(33) (1993) 25239-25243.
- [107] **Seubert P., Lee K., Lynch G.**, Ischemia triggers NMDA receptor-linked cytoskeletal proteolysis in hippocampus, *Brain Res.* 492(1-2) (1989) 366-370.

- [108] **Shields D.C., Schaecher K.E., Hogan E.L., Banik N.L.**, Calpain activity and expression increased in activated glial and inflammatory cells in penumbra of spinal cord injury lesion, *J Neurosci. Res.* 61(2) (2000) 146-150.
- [109] **Siegenthaler W.**, *Klinische Pathophysiologie*, Thieme-Verlag (2000).
- [110] **Siesjö, B.K.**, Pathophysiology and treatment of focal cerebral ischemia. Part I: Pathophysiology, *J Neurosurg.* 77(3) (1992) 337-354.
- [111] **Slivka A., Murphy E., Horrocks L.**, Cerebral edema after temporary and permanent middle cerebral artery occlusion in the rat, *Stroke* 26(6) (1995) 1065-1066.
- [112] **Squier M.K., Miller A.C., Malkinson A.M., Cohen J.J.**, Calpain activation in apoptosis, *J. Cell Physiol.* 159(2) (1994) 229-237.
- [113] **Stabach P.R., Cianci C.D., De Matteis M.A., Morrow J.S.**, Site-directed mutagenesis of alpha II spectrin at codon 1175 modulates its mu-calpain susceptibility, *Biochemistry* 36(1) (1997) 57-65.
- [114] **Steinberg G.K., Ogilvy C.S., Shuer L.M., Conolly E.S., Solomon R.A., Lam A., Kassell N.F., Barker C.J., Giannotta S.L., Cockroft K.M., Bell-Stephens T.E., Allgren R.L.**, Comparison of endovascular and surface cooling during unruptured aneurysm repair, *Neurosurgery* 32(8) (2004) 1648-1653.
- [115] **Strobl S., Fernandez-Catalan C., Braun M., Huber R., Masumoto H., Nakagawa K., Irie A., Sorimachi H., Bourenkow G., Bartunik H., Suzuki K., Bode W.**, The crystal structure of calcium-free human m-calpain suggests an electrostatic switch mechanism for activation by calcium, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97(2) (2000) 588-592.
- [116] **Su Y., Block E.R.**, Role of calpain in hypoxic inhibition of nitric oxide synthase activity in pulmonary endothelial cells, *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 278(6) (2000) 1204-1212.

- [117] **Suzuki K.**, The structure of the calpains and the calpain gene, in: *Intracellular Calcium-Dependent Proteolysis* (Mellgren R.L., Murachi T., Eds.) Boca Raton, FL: CRC (1990) 25-35.
- [118] **Takahashi K.**, in: *Intracellular Calcium-Dependent Proteolysis* (Mellgren R.L., Murachi T., Eds.) Boca Raton, FL: CRC (1990) 55-74.
- [119] **Takano E., Ma H., Yang H.Q., Maki M., Hatanaka M.**, Preference of calcium-dependent interactions between calmodulin-like domains of calpain and calpastatin subdomains, *FEBS Lett.* 362(1) (1995) 93-97.
- [120] **Takata T., Nabetani M., Okada Y.**, Effects of hypothermia on the neuronal activity,  $[Ca^{2+}]_i$  accumulation and ATP levels during oxygen and/or glucose deprivation in hippocampal slices of guinea pigs, *Neurosci. Lett.* 227 (1997) 41-44.
- [121] **The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group:** Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke, *N.Engl. J. Med.* 333(24) (1995) 1581-1587.
- [122] **Tomimatsu Y., Idemoto S., Moriguchi S., Watanabe S., Nakanishi H.**, Proteases involved in long-term potentiation, *Life Sci.* 72 (2002) 355-361.
- [123] **Tominaga T., Kure S., Narisawa K., Yoshimoto T.**, Endonuclease activation following focal cerebral ischemic injury in the rat brain, *Brain Res.* 608 (1993) 21-26.
- [124] **Tompa P., Emori Y., Sorimachi H., Suzuki K., Friedrich P.**, Domain III of calpain is a  $Ca^{2+}$ -regulated phospholipid-binding domain, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 280(5) (2001) 1333-1339.
- [125] **Tsirka S.E., Gualandris A., Amaral G.D., Strickland S.**, Excitotoxin-induced neuronal degeneration and seizure are mediated by tissue plasminogen activator, *Nature* 377 (6547) 340-344.



- [126] **Wang K.K.**, Calpain and caspase: can you tell the difference? *Trends Neurosci.* 23(2) (2000) 20-26
- [127] **Wang K.K., Posmantur R., Nath R., McGinnis K., Whitton M., Talanian R.V., Glantz S.B., Morrow J.S.**, Simultaneous degradation of alphaII- and betaIII-spectrin by caspase 3 (cpp32) in apoptotic cells, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 22490-22497.
- [128] **Wang K.K., Yuen P.W.**, Calpain inhibition: an overview of its therapeutic potential, *Trends Pharmacol. Sci.* 15(11) (1994) 412-419
- [129] **Wendt A., Thompson V.F., Goll D.E.**, Interaction of calpastatin with calpain: a review, *Biol. Chem.* 385(6) (2004) 465-472.
- [130] **Yamashima T., Saido T.C., Takita M., Miyazawa J., Yamano A., Miyakawa A., Nishijyo H., Yamashita J., Kawashima S., Ono T., Yoshioka T.**, Transient brain ischemia provokes Ca<sup>2+</sup>, PIP<sub>2</sub> and calpain responses prior to delayed neuronal death in monkeys, *Eur. J. Neurosci.* 8 (1996) 1932-1944.
- [131] **Yanamoto H.**, Nagata I., Niitsu Y., Zhang Z., Xue J.H., Sakai N., Kikuchi H., Prolonged mild hypothermia protects the brain against permanent focal ischemia, *Stroke* 32 (2001) 232-239.
- [132] **Yao H., Ginsberg M.D., Eveleth D., LaManna J.C., Watson B.D., Alonso O.F., Loor J.Y., Foreman J.H., Busto R.**, Local cerebral glucose utilization and cytoskeletal proteolysis as indices of evolving focal ischemic injury in core and penumbra, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 15 (1995) 398-408.
- [133] **Yokota M., Saido T.C., Tani E., Kawashima S., Suzuki K.**, Three distinct phases of fodrin proteolysis induced in postischemic hippocampus, *Stroke* 26 (1995) 1901-1907.

- [134] **Yokota M., Tani E., Tsubuki S., Yamaura I., Nakagaki I., Hori S., Saido T.C.,** Calpain inhibitor entrapped in liposomes rescues ischemic neuronal damage, *Brain Res.* 819 (1999) 8-14.
- [135] **Yu WR., Westergren H., Faroque M., Holtz A., Olsson Y.,** Systemic hypothermia following spinal cord cord compression injury in the rat : an immunohistochemical study on MAP 2 with special reference to dendrite changes, *Acta Neuropathol.* (Berlin) 100 (2000) 546-552.
- [136] **Zausinger S., Westermaier T., Plesnila N., Steiger H.J., Schmid-Elsaesser R.,** Neuroprotection in transient focal cerebral ischemia by combination drug therapy and mild hypothermia: comparison with customary therapeutic regimen, *Stroke* 34 (2003) 1526-1532.
- [137] **Zhang R., Chopp M., Zhang Z., Jiang N., Powers C.,** The expression of P- and E-selectins in three models of middle cerebral artery occlusion, *Brain Res.* 785(2) (1998) 207-214.
- [138] **Zhao X., Posmantur R., Kampfl A., Liu S.J., Wang K.K., Newcomb J.K., Pike B.R., Clifton G.L., Hayes R.L.,** Subcellular localization and duration of mu-calpain and m-calpain activity after traumatic brain injury in the rat: a casein zymography study, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 18(2) (1998) 161-167.

## VII. DANKSAGUNG

Mein Dank gilt all jenen Leuten, die maßgeblich zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen haben. An erster Stelle gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. G. F. Hamann für die Überlassung des Themas und die federführende Koordination und Betreuung in allen Phasen der Arbeit. Desweiteren Herrn Dr. M. Liebetrau, der als Kenner der Calpain-Thematik stets ein offenes Ohr für praktische und theoretische Fragen hatte. Mein besonderer Dank gilt auch Nathalie Wunderlich, die durch ihr technisches Know-How und ihre ständige Präsenz im Laboralltag wesentlich zum Gelingen dieses Projektes beitrug. Dr. Milan Vosko gilt mein Dank für die Beratung in vielen Detailfragen, ebenso Gabi Jäger und Dr. Dorothe Burggraf, die ebenfalls mit Rat und Tat zur Seite standen. Bei Dr. T. Pfefferkorn möchte ich mich für die vielen wertvollen Denkanstöße in jedweder Hinsicht bedanken.

Desweiteren gebührt mein größter Dank abermals Herrn Prof. Dr. Hamann gemeinsam mit Herrn Prof. Dr. A. Baethmann und Dr. I. v. Bülow für die Aufnahme und Förderung im DFG-Graduiertenkolleg GK 688 – eine Institution, die meine Arbeit motivational wie inhaltlich enorm bereichert hat und wichtige Einblicke und Perspektiven erbrachte. An dieser Stelle sei auch Herrn PD Dr. N. Plesnila (ICF) speziell für seine offene, kompetente Art rund um diese Arbeit gedankt.

Ohne entsprechende Unterstützung im privaten Bereich wäre diese Arbeit kaum je zustande gekommen. Mein persönlicher Dank gilt daher all jenen, die mich während der Entstehungsphase ausdauernd unterstützten, meinen Eltern, meinem Bruder Klemens, der auch fachlich in vielen Punkten eine unersetzliche Hilfe war, Pamela, Thomas, Christian. All jenen widme ich diese Arbeit.

Herrn Prof. Dr. med. Hamann danke ich außerdem für das Wecken meiner wissenschaftlichen Neugier und die Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten im Kontext dieser Doktorarbeit.

## VIII. LEBENSLAUF

**Persönliche Daten**

**Matthias Pichler**  
**Geboren am 2. April 1976 in Rotthalmünster**  
**Wohnort: Hindenburgstraße 5, 91054 Erlangen**  
**Staatsangehörigkeit: Deutsch**

**Schulbildung**

**1982-1986**                    **Grundschule Pocking**  
**1986-1995**                    **Wilhelm-Diess-Gymnasium Pocking**  
**06/1995**                      **Abitur**  
**06/1995**                      **Hochbegabtenprüfung des Freistaates Bayern**

**Studium**

**1996-1997**                    **Studium an der Universität Regensburg in den**  
**Fächern Anglistik, Romanistik, Politikwissenschaften**  
**03/1998**                      **Aufnahme des vorklinischen Studiums der Humanmedizin an**  
**der LMU München**  
**03/2000**                      **Ärztliche Vorprüfung**  
**03/2001**                      **Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung**  
**03/2003**                      **Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung**  
**04/2004**                      **Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung**

**Studienabschluss**

**04/2004**                      **Beendigung des Studiums der Humanmedizin an der**  
**Ludwig-Maximilians-Universität München**

**Berufstätigkeit**

**seit 09/2004**                    **Assistenzarzt der Med. Klinik 1 der Friedrich-Alexander-Universität**  
**Erlangen**

**Veröffentlichungen**

**(1) Liebetrau M, Burggraf D, Martens KH, Pichler M, Hamann GF:**  
**„Delayed moderate hypothermia reduces calpain activity and**  
**breakdown of its substrate in experimental focal cerebral ischemia**  
**in rats” Neuroscience Letters, 2004 Feb 26; 357(1):17-20**  
**(2) Grobholz K, Burggraf D, Martens KH, Wunderlich N, Pichler M,**  
**Hamann FG: „Recombinant tissue plasminogen activator attenuates**  
**Basal lamina antigen loss after experimental focal cerebral ischemia“**  
**Neurological Research, 2005 Mar; 27 (2): 212-17**

**Erlangen, im März 2006**

.....