

Aus der Neurologischen Klinik und Poliklinik der Universität München
(Direktor: Prof. Dr.med.Dr.h.c.Th.Brandt)

**Vergleich der Infarktgröße bei fokaler zerebraler Ischämie in der
Ratte mittels immunhistochemischer Volumetrie und
Magnetresonanztomographie und deren Beeinflussung durch den
Calpaininhibitor A-558693**

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

vorgelegt von
Nora Thomassen
aus Bodö / Norwegen
2006

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

Berichterstatter: **Prof. Dr. med. G. Hamann**

Mitberichterstatter: **Priv.Doz.Dr.M.Bilzer**
Prof.Dr.B.Engelmann
Prof.Dr.N.Plesnila

Dekan: **Prof. Dr. med. D. Reinhardt**

Tag der mündlichen Prüfung: **22.06.2006**

Für meinen Vater

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	6
2.	Theoretische Grundlagen	9
2.1	Allgemeine und zelluläre Pathophysiologie der zerebralen Ischämie	9
2.2	Magnetresonanztomographie (MRT)	11
2.2.1	Grundlagen	11
2.2.2	MRT und die zerebrale Ischämie	12
2.3	Calpaine	13
	Einteilung und Struktur der Calpaine	13
2.3.2	Funktion der Calpaine	15
2.3.3	Calpainsubstrate	16
2.3.3.1	Mikrotubulinassoziiertes Protein 2 (MAP-2)	17
2.3.4	Calpainaktivierung	18
2.4	Calpaininhibitoren	21
2.4.1	Calpastatin	21
2.4.2	Peptidische Calpaininhibitoren	22
2.4.3	Nicht-Peptidische Calpaininhibitoren	24
2.4.4	Calpaininhibitor A-558693	25
3.	Material und Methoden	27
3.1	Das Tiermodell	27
3.1.1	Präparationsbeschreibung	27
3.1.2	Calpaininhibitorgabe	30
3.2	Versuchsgruppen	31
3.3	Gewebeverarbeitung	31
3.3.1	Magnetresonanztomographie (MRT)	31
3.3.2	Kryoschnitte	32
3.3.3	Immunhistochemie	33
3.3.4	Silberinfarktfärbung	34
3.4	Auswertung	35
3.4.1	Bildverarbeitung und Mikroskopie	35
3.4.2	Volumetrie	36
3.4.3	Statistische Analyse	36

4.	Ergebnisse	37
4.1	Methode: Der Vergleich von Infarktgrößen durch MAP-2, SIS und MRT	37
4.2	Diagnostik: Calpainaktivierung	39
4.2.1	μ-Calpainfärbung	39
4.2.2	MAP-2-Demarkierung	42
4.3	Therapie: Neuroprotektion durch Calpaininhibitor A-558693	43
5.	Diskussion	46
5.1	Methode: Der Vergleich von Infarktgrößen durch MAP-2, SIS und MRT	46
5.2	Diagnostik: Calpainaktivierung	49
5.3	Therapie: Neuroprotektion durch Calpaininhibitor A-558693	51
6.	Zusammenfassung	54
7.	Literaturverzeichnis	57
8.	Danksagung	74
9.	Lebenslauf	75

1. Einleitung

Der Schlaganfall stellt die dritthäufigste Todesursache in den Industrieländern dar und ist in mehr als 80% durch eine Ischämie bedingt. Ein ischämischer Infarkt entsteht, wenn in einem Versorgungsgebiet einer Hirnarterie der zerebrale Blutfluss vorübergehend oder permanent verringert ist.

In der experimentellen Schlaganfallforschung ist das Infarktvolumen ein wichtiger Outcome-Parameter. Jedoch haben etablierte Methoden für Infarktgrößenbestimmung Nachteile. Die histologische Färbung mit Hämatoxylin und Eosin (H&E) ist technisch einfach auszuführen. Das Ergebnis hängt jedoch stark vom Auswerter ab und die Ausführung ist zeitaufwendig (Osborne et al.1987). Die Infarktbestimmung durch eine Injektion prä-mortem mit 2,3,5-triphenyl-tetra-zoliumhydro-chlorid (TTC) ergibt eine deutliche Markierung der Läsion post-mortem, jedoch ist die Methode wenig gewebesparend, da das gesamte Gehirn verwendet wird und das Gewebe nicht zur Auswertung weiterer Analysen zur Verfügung steht (Hatfield et al.1991). Die Magnetresonanztomographie (MRT) mit T2 -oder diffusionsgewichteten Sequenzen erlaubt eine genaue Bestimmung der Läsionsgröße in vivo, ist jedoch technisch schwierig durchzuführen und nur in wenigen Zentren verfügbar.

Eine histochemische Methode für die Messung einer Läsionsgröße ist bei Primaten beschrieben worden (Young et al.1997). Es gibt aber keine ähnliche Methode für Ratten. Im Gegensatz dazu sind zahlreiche histologische und immunhistochemische Methoden für Infarktbestimmung in Kryoschnitten aus Rattenhirn beschrieben worden, wie zum Beispiel Kresylviolett (Nedregaard et al.1987), Silberinfarkt-färbung (SIS) (Vogel et al.1999) und MAP-2-Färbung (Dawson et al.1996).

Die Entwicklung und das Ausmass des endgültigen ischämischen Infarkts hängen von zahlreichen physiologischen und biochemischen Faktoren ab. Hierzu zählen Dauer und Schweregrad der initialen Durchblutungsstörung sowie das Ausmass der Reperfusion im ischämischen Randbezirk (Penumbra). Durch den entstandenen Energiemangel wird die Na^+/K^+ -ATPase gehemmt, es kommt zu einer zellulären Akkumulation von Na^+ und Ca^{2+} (Siesjö et al.1989) sowie zu einer Zunahme der extrazellulären K^+ -Konzentration und somit einer Depolarisation. Die Depolarisation führt zum Cl^- -Einstrom, Zellschwellung und Zelltod (Silbernagl et al.). Nach ischämischer und

traumatischer Hirnschädigung kommt es zu einer Störung der Kalziumhomöostase und zu einer Zunahme der intrazellulären Kalziumkonzentration und somit zu einer Aktivierung von neutralen Zysteinproteasen, wie Calpainen (Zivin et al.1991, Bartus et al.1995, Liebetrau et al.1999, Vanderklish und Bahr, 2000, Kampfl et al.1997, Huang et al.2001, Branca et al.2004).

Aktiviertes Calpain greift an vielen Substraten an, unter anderem zytoskelettalen Proteinen wie Spektrin (Czogalla et al.2005), Mikrotubulin-assoziiertem Protein 2 (MAP-2) oder Neurofilamentproteinen NF68 und NF200 (Saido et al.1994, Dawson et al.1996, Posmantur et al.1997, Lofvenberg et al.1999).Die vorliegende Arbeit befasst sich vor allem mit dem Abbau des Zytoskeletts (Siman et al.1990, Croall et al.1991, Takagaki et al.1997, Saatman et al.1996).

Weitere Mechanismen, die bei der zerebralen Ischämie eine wichtige Rolle spielen, sind: Entzündung (Kochanek et al.1992), Periinfarktdepolarisation (Hossmann et al.1996), Apoptose (Choi et al.1996, Chopp et al.1996) und die Entstehung freier Radikale durch eine kalziumbedingte Aktivierung von Phospholipase A2 und Cyclooxygenase. Durch freie Sauerstoffradikale werden die endogenen Schutzmechanismen überfordert und es kommt zur DNA-Schädigung, zur Lipidperoxidation und letztlich zum Zellmembranschaden (Sies et al.1986, Kirsch et al.1992). Auf diese Mechanismen wird in der vorliegenden Arbeit nicht eingegangen.

Neben den fast ausschliesslich allgemeinen Therapiemöglichkeiten eines Schlaganfalls, haben sich in den letzten Jahren zwei verschiedene Ansätze in der Akuttherapie des ischämischen Schlaganfalls herauskristallisiert. Zum einen gibt es den neurovaskulären Ansatz im Sinne einer Wiederherstellung der Durchblutung des betroffenen Gebietes und damit der Wiederherstellung der Versorgung mit Energie und Sauerstoff, zum anderen den neuroprotektiven Ansatz im Sinne einer Protektion des neuronalen und glialen Gewebes.

Eine pharmakologische Hemmung von Calpainen kann zu einer signifikanten Reduktion der Infarktgröße nach fokaler, zerebraler Ischämie führen. Es ist von mehreren Gruppen gezeigt worden, dass die Gabe von Calpaininhibitoren das Infarktvolumen signifikant reduzieren kann, sowohl bei Gabe vor der Ischämie (Hong et al.1994) als auch mehrere Stunden nach der Ischämie (Bartus et al.1994a, Bartus et al.1994b, Markgraf et al.1998).

In unserer Arbeit werden wir uns mit der postischämischen Gabe von Calpaininhibitoren befassen.

Ziele

A) Methode: Der Vergleich von Infarktgrößen durch MAP-2, SIS und MRT

Der erste Teil dieser Arbeit befasst sich mit dem Vergleich von verschiedenen Methoden für eine Infarktbestimmung. Anhand des Modells der transienten Ischämie an der Ratte, wird die Bestimmung des Läsionsvolumens post-mortem in Kryoschnitten durch die Färbungen MAP-2 und SIS mit den Ergebnissen einer MRT-geführten Volumetrie verglichen. Anhand dieser Färbemethoden wird ein gewebesparendes, infarkt-volumetrisches Verfahren vorgestellt.

B) Diagnostik: Die Calpainaktivierung

Das Ziel des zweiten Teils dieser Arbeit ist die Calpainaktivierung darzustellen. Zum einen durch die μ -Calpainfärbung mit immunohistochemischer Expression von μ -Calpain in calpainpositiven Zellen, zum anderen durch das Calpainsubstrat MAP-2 und die MAP-2-Demarkierung im zerstörten, ischämischen Gewebe.

C) Therapie: Neuroprotektion durch Calpaininhibitor A-558693

Im dritten Teil dieser Arbeit soll die Wirkung des Calpaininhibitor A-558693, einem neuen nicht-peptidischen Inhibitor, bei intravenöser Gabe 150 Minuten nach Okklusion der Arteria carotis media überprüft werden. Die neuroprotektive Wirkung des Calpaininhibitors A-558693 soll anhand des Infarktvolumens mittels Infarktvolumetrie überprüft werden.

2. Theoretische Grundlagen

2.1. Allgemeine und zelluläre Pathophysiologie der zerebralen Ischämie

Ein ischämischer Infarkt entsteht, wenn in einem Versorgungsgebiet einer Hirnarterie der zerebrale Blutfluss vorübergehend oder permanent verringert ist. In den meisten Fällen liegt dem verringerten Blutfluss ein Verschluss der zerebralen Arterie – entweder durch eine lokale Thrombose oder durch einen Embolus – zugrunde. Das durchblutungsgestörte Versorgungsareal einer verschlossenen Hirnarterie besteht aus mehreren Zonen. Im Zentrum befindet sich ein als „Core“ (Kern) bezeichnetes Gebiet, in dem sich schon innerhalb wenigen Minuten nach dem Beginn der Ischämie eine dauerhafte Depolarisation der Zellen eintritt und sich in der ersten Stunde infarziertes Gewebe histologisch nachweisen lässt (Touho et al.1996). Um diesen ischämischen Kern herum besteht ein Randsaum, die Penumbra (Astrup et al.1981), ein Areal in dem der Funktionsstoffwechsel des Gewebes eingeschränkt oder gar erloschen ist, aber dessen Grund- oder Erhaltungsstoffwechsel und die Membranfunktion noch intakt ist. Dieses Gewebe kann überleben und seine normale neurologische Funktion wieder aufnehmen, wenn innerhalb von wenigen Stunden durch geeignete therapeutische Maßnahmen (hier ist die genaue Dauer noch Gegenstand kontroverser Diskussion, der Bereich liegt bei ca. 6h) (Touho et al.1996) der zerebrale Blutfluss wiederhergestellt wird.

Die mikrovaskuläre Zirkulation hängt von mehreren Faktoren ab. Zu den mechanischen Faktoren gehört das intrazelluläre Ödem, bei dem Neurone, Gliazellen und Perizyten durch Störung der energieabhängigen Zellmembranfunktionen durch einen Einstrom von Ionen und Wasser ödematös anschwellen. Im Verlauf führt der Zusammenbruch energieabhängiger endothelialer Funktionen zu einer Schädigung der Blut-Hirn-Schranke, wodurch Plasmaproteine den Extrazellulärraum des Gehirns erreichen und sich ein vasogenes, interstitielles, extrazelluläres Ödem bildet.

Die fokale Verringerung des mikrozirkulatorischen Blutflusses im Hirngewebe geht mit zahlreichen Veränderungen einher: der Abtransport der metabolischen Abbauprodukte ist beeinträchtigt und die Zufuhr energiereicher Substrate zum Gehirn ist verringert. Das im Gehirn produzierte ATP wird zum größten Teil verbraucht, um die Ionengradienten über die $\text{Na}^+\text{-K}^+$ -ATPase und damit das Ruhemembranpotenzial (-80mV) der Nervenzellen zu erhalten bzw. nach synaptischer Erregung wieder aufzubauen. ATP ist auch für den Erhalt des Gliarhemembranpotenzials erforderlich.

Das Gliaruhemembranpotential unterstützt den energieabhängigen Aufnahmemechanismus für exzitotoxische Aminosäuren (insbesondere Glutamat) und ist zusätzlich für den Erhalt einer niedrigen Konzentration von extrazellulärem Kalium verantwortlich. Die extrazelluläre Kaliumkonzentration ist wiederum für das Ruhemembranpotential von großer Bedeutung. Bei verringertem zerebralem Blutfluss nimmt die Zufuhr an energiereichen Substanzen ab und somit auch die ATP-Produktion. Infolge des ATP-Mangels nimmt weiter die Funktion der energieabhängigen Ionenpumpen (Na^+/K^+ -ATPase) ab. Dadurch kommt es zu einer zellulären Akkumulation von Na^+ und Ca^{2+} sowie einer Zunahme der extrazellulären K^+ -Konzentration und damit zur Depolarisation. Na^+ - und Cl^- – und nachfolgend Wasser strömt in die Zelle und ein zytotoxisches, intrazelluläres Ödem entsteht (Silbernagl et al). Bricht das Ruhemembranpotential der Zellen zusammen oder werden Neurone unter diesen Bedingungen infolge einer glutaminergen Erregung depolarisiert, so kann der Repolarisationsmechanismus versagen.

Diese glutaminerge Erregung, auch Exzitotoxizität genannt (Lipton et al.1994, Fryer et al. 1999), kommt durch folgender Mechanismus zustande: Durch den Energiemangel werden somatodendritische und prä-synaptische spannungsabhängige Kalziumkanäle aktiviert und exzitatorische Aminosäuren in den Extrazellulärraum freigesetzt. Gleichzeitig wird die energieabhängige, präsynaptische Wiederaufnahme erregender Aminosäuretransmitter gestört, so dass sich die extrazelluläre Anreicherung von zum Beispiel Glutamat weiter zunimmt. Glutamat aktiviert n-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptoren, AMPA-Rezeptoren und ionenkanalunabhängige Glutamatrezeptoren. NMDA-Rezeptoren kontrollieren die Permeabilität von Ionenkanälen für Ca^{2+} , Na^+ und K^+ (Choi et al.1988, Lipton et al.1994, Rothmann, Olney et al. 1995, Bano et al .1995). AMPA-Rezeptoren öffnen Ionenkanäle für Na^+ und K^+ und erhöht indirekt den Ca^{2+} -Einstrom über den NMDA-Rezeptor-Ionenkanal. Metabotrope Glutamatrezeptoren wirken über G-Proteine und benutzen Phospholipase C und Inositol- (1,4,5)Triphosphat (IP3) als Signalweg.

Eine Stimulation des NMDA-Rezeptors durch Glutamat führt also direkt, eine Aktivierung des AMPA-Rezeptors indirekt zu einem Anstieg des intrazellulären Kalziums. Bei ATP-Mangel ist auch das $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschsystem gestört (Philipson et al.2000), welches normalerweise Kalzium aus der Zelle entfernt.

Der erhöhte Einstrom von Kalzium und Natrium durch den NMDA-Kanal führt in den ATP-verarmten Dendriten zu einem verstärkten Bedarf der aktiven Ionenpumpe für

ATP, die ihrerseits das zytoplasmatische ATP aufbraucht. Bei hohen intrazellulären Kalzium-konzentrationen nehmen dann Mitochondrien eher das zytoplasmatische Kalzium auf (Schinder et al.1996), als dass sie ATP produzieren und es kommt zu einen irreversiblen Schaden der Mitochondrien (Ankarcona et al.1995, Reynolds 1999, Ward et al. 2000).

Die erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentration setzt über eine Calpainaktivierung eine Reihe von zytoplasmatischen und nukleären Prozessen in Gang, die zur Nekrose führen.

2.2. Magnetresonanztomographie (MRT)

2.2.1. Grundlagen

1973 beschrieb P.C.Lauterbuhr (1973) eine auf dem Prinzip der magnetischen Kernresonanz basierende Technik, mit der vom menschlichen Körper Schnittbilder angefertigt werden können. Das zugrundeliegende physikalische Prinzip war bereits 1946 von dem Schweizer Physiker Felix Bloch und dem amerikanischen Physiker Edward Purcell beschrieben worden. Mit der Magnetresonanztomographie (MRT) können in allen Ebenen des Raumes und ohne radioaktive Strahlenbelastung Schnittbilder des menschlichen Köpers angefertigt werden. Die im Gewebe enthaltene Wasserstoffkerne (Protonen) nehmen in einem starken Magnetfeld die Energie eines eingestrahlten Radiofrequenzimpulses auf. Wie kleine Stabmagneten werden sie senkrecht zum Magnetfeld ausgelenkt und können so mit Detektionsspulen nachgewiesen werden. Durch die Wechselwirkung der angeregten Protonen mit Nachbarmolekülen in verschiedenen chemischen Bindungen entstehen je nach Struktur des Gewebes charakteristische Signale. Um eine Ortsauflösung zu erreichen, werden dem statischen Magnetfeld in den drei Raumrichtungen Magnetfeldgradienten überlagert. So können sowohl zweidimensionale Abbildungen als auch dreidimensionale Datensätze akquiriert werden. Durch diese Schnittbildtechnik können u.a. auch unterschiedliche Strukturen innerhalb eines Organs differenziert werden. 1980 wurde die MRT in die Klinik eingeführt und hat seither stetig an Bedeutung gewonnen.

Bei Kernspintomographie ist dem spezifischen Einsatzgebiet und -zweck sehr gut anpaßbar, da der Untersucher zur Erzeugung des maximalen Bildkontrastes eine Vielzahl von Parametern optimieren kann. Dies betrifft die Repetitionszeit TR („Time

of Repetition“ – Zeitspanne zwischen zwei aufeinanderfolgenden Anregungsimpulsen in derselben Schicht), die Echozeit TE („Time of Echo“ – Zeitspanne zwischen Anregungs-impuls und Messung des Echos), die Art der eingestrahlten Hochfrequenzimpulse (z.B Spinecho, Gradientenecho), die Pulswinkel („Flip angle“-Auslenkungswinkel bei Anregung des Spinsystems) und evt. Sättigungspulse (z.B zur Fettunterdrückung oder zur Vermeidung von Gefäßartefakten). Außerdem wird die Qualität der Aufnahmen bestimmt durch die Auflösung („Matrix“), die Bildgröße („Field of view“), die Schichtdicke, die Anzahl der Messungen die gemittelt werden („Acquisition“) und durch die verwendete Spule.

2.2.2. MRT und die zerebrale Ischämie

Das Erscheinungsbild großer zerebraler Infarkte ist abhängig vom Zeitpunkt des Ereignisses. Drei Stadien der zerebralen Ischämie werden unterschieden: das akute Stadium (die ersten vier Tage nach dem Ereignis), das subakute Stadium (vom vierten Tag bis acht Wochen nach dem Ereignis) und das chronische Stadium (mehr als acht Wochen nach dem Ereignis).

Die Möglichkeit differenzierter, aggressiver Behandlungsmethoden zur Revaskularisation und damit zur Reduktion der Infarktgröße und zur Neuroprotektion der Penumbra haben den Stellenwert der neuoradiologischen Bildgebung verändert.

Die MRT hingegen kann rasch und zuverlässig eine Aussage über die Infarktgröße treffen. T1-gewichtete MR-Sequenzen dienen der anatomischen Orientierung und der differenzierten Strukturanalyse des Gehirns, während pathologische Veränderungen wie das zytotoxisch und vasogene Ödem, Nekrosen oder zystische Veränderungen durch ihr erhöhtes Wassergehalt sich in T2-gewichtete Sequenzen gut darstellen lassen.

Neuere MR-Techniken, wie die diffusionsgewichtete Bildgebung, ermöglichen die Früherkennung eines beginnenden zytotoxischen Ödems als Folge einer zerebralen Durchblutungsstörung innerhalb der ersten Stunde.

Die Einleitung einer thrombolytischen Therapie sieht ein sehr enges Zeitfenster bis zu drei Stunden nach Eintritt des Ereignisses vor. Zur Diagnosesicherung ist daher eine schnelle Diagnostik notwendig. Die Sensitivität der Computertomographie in den ersten Stunden ist eingeschränkt.

2.3. Calpaine

2.3.1 Einteilung und Struktur der Calpaine

Calpaine sind kalziumabhängige Zysteinproteasen und befinden sich im Zytosol aller tierischen Zellen. Es gibt aber auch Hinweise für eine extrazelluläre Lokalisation (Nishihara et al.2001, Xu et al. 2004) sowie ein mitochondriales Calpain (Garcia et al. 2005). Calpain wurde erstmals im Rattengehirn beschrieben (Guroff et al.1964), damals unter dem Namen kalziumabhängige neutrale Protease (CANP). Im Jahre 1984 wurde die cDNA der großen Untereinheit von Hühnercalpain zum ersten Mal geklont (Ohno et al.1984). Später folgte die Entdeckung der Struktur der großen Untereinheit. Zahlreiche Calpainuntereinheiten und deren Homologen sind beschrieben worden. Nach Empfehlungen der Internationalen Konferenz über intrazellulären Proteinkatabolismus, wurde dem Enzym 1991 der Name Calpain gegeben (Suzuki et al.1991).

Gen	Ursprünglicher Name	Anderer Namen	Name als Nummer	Expression	Bemerkung
CAPN1	μCANP/ Calpain I großer Untereinheit	μ-Calpain,großer Untereinheit, μ80K	Calpain 1	Ubiquitär	+30K = μ-Calpain
CANP2	mCANP/ Calpain II großer Untereinheit	m-Calpain,großer Untereinheit, m80K	Calpain 2	Ubiquitär	+30K= m-Calpain
CANP3	p94/Lp82	nCL-1, Calpain 3	Calpain 3a/3b	Skelettmuskulatur	
CANP5	Calpain 5, hTRA-3	nCL-3	Calpain 5	Hoden, Gehirn	
CANP6	Calpain 6	Calpamodulin, CANPX	Calpain 6	Plazenta, embryonaler Muskel	
CANP7	Calpain 7, PalBH		Calpain 7	Ubiquitär	Aspergillus, PalB Homolog
CANP8	nCL-2/nCL-2'		Calpain 8a/8b	Magen, glatte Muskulatur	
CANP9	nCL-4		Calpain 9	Gastrointestinaltrakt	30K für Aktivität nötig
CANP10	Calpain 10a-h		Calpain 10a-h	Ubiquitär	Zusammenhang mit NIDDM
CANP11	Calpain 11		Calpain 11	Hoden	
CANP12	Calpain 12a-c		Calpain 12a-c	Haarfollikel	
SOLH	SOLH		Calpain 13	Ubiquitär	Drosophila,SOL Homolog
	Hühner-CANP, großer Untereinheit	μ/m-Calpain,großer Untereinheit (μ/mCL)		Ubiquitär	Nur bei Vögeln gefunden

CANP: Ca²⁺aktivierte neutrale Protease, nCL: neue große Calpainuntereinheit, PalB: Phosphatase-Mutants, PalBH: PalB Homolog, NIDDM: nicht-insulinpflichtiger Diabetes mellitus, SOL: small optic lobes, SOLH: SOL Homolog

Tabelle 1 zeigt die Calpainfamilie und die Expression der verschiedenen Calpainen.

Die Calpainfamilie besteht aus Calpain 1 bis Calpain 14 (Huang et al.2001). Die wichtigsten Calpaingruppen sind Calpain 1 (μ -Calpain) und Calpain 2 (m-Calpain), die ubiquitär in der Natur vorhanden sind. Im zentralen Nervensystem ist μ -Calpain vor allem im Zellkern und in Dendriten vorhanden, während m-Calpain überwiegend in den Axonen vorkommt.

M-Calpaine und μ -Calpaine bestehen aus einer katalytischen, für die proteolytische Aktivität verantwortlichen 80kDa (80K) Untereinheit und einer regulatorischen 30kDa (30K) Untereinheit. Die katalytische Untereinheit besteht aus vier (I-IV) Abschnitten, die regulatorische Untereinheit aus zwei (IV', V) Abschnitten. Die Raute und das Quadrat zeigen den aktiven Teil mit Zystein- und Histidinresten. Die vier Kreise in den Abschnitten IV und IV' sind Strukturen, die Kalzium binden können (siehe Abbildung 1).

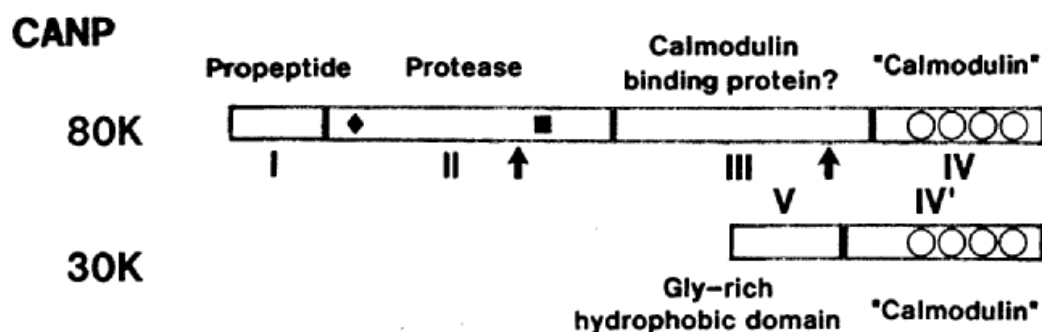


Abbildung 1 zeigt die Struktur von Calpain (CANP) mit einer großen Untereinheit (80K) und einer kleinen Untereinheit (30K) (Perrin et al.2002).

Die katalytischen Untereinheiten (80K) der beiden Isoenzyme sind nicht identisch. Das Molekulargewicht variiert mit ungefähr 5kDa weil die Zusammensetzung der Aminosäuren und der Proteasenstruktur unterschiedlich ist (Croall et al.1991). Abschnitt II ist wahrscheinlich für die proteolytische Aktivität verantwortlich (Suzuki et al.1994, Hata et al.2001, Franco et al.2005). Abschnitt IV, das COOH-Terminus, hat Ähnlichkeit mit dem kalziumbindenden Protein Calmodulin. Durch die Bindung von Kalzium an Abschnitt IV kommt es zu einer Konformationsänderung, wodurch die Protease aktiviert wird: Abschnitt III interagiert mit dem Ca^{2+} -gebundenem Abschnitt

IV und/oder IV' (Alexa et al.200), wodurch Abschnitt II frei und aktiv wird. In Abwesenheit von Kalzium interagiert Abschnitt IV mit Abschnitt II und hemmt die intrinsische Proteasenaktivität. Abschnitt I, das N-Terminus, wird bei Autolyse durch Kalzium gespalten und ist für die Stabilität und Aktivierung der Calpaine sehr wichtig (Guttmann et al.1997, Suzuki, Sorimachi et al.1998).

Die regulatorische Untereinheit (30K) ist bei μ -Calpain und m-Calpain identisch. Sie besteht aus zwei Abschnitten (V, IV'). Der N-terminale, hydrophobe Abschnitt (V) aus Glyzinresten hat Bedeutung für die Membranbindung und Interaktion mit Phospholipiden. Abschnitt IV' ähnelt dem COOH-Terminus der großen Untereinheit und ist ein calmodulinähnlicher, kalziumbindender Abschnitt.

Der größte Unterschied zwischen μ -Calpain und m-Calpain ist ihre Affinität zu Kalzium. μ -Calpain wird durch Kalzium im mikromolaren Bereich aktiviert, während m-Calpain von einer Kalziumkonzentration im millimolaren Bereich abhängig ist (Suzuki et al. 1981b). Keiner der Proteasen hat in der Abwesenheit von Kalzium eine messbare Aktivität (Croall et al.1984).

2.3.2. Funktion der Calpaine

Proteasen sind Enzyme die den Abbau von Proteinen und Peptiden durch hydrolytische Spaltung der Peptidbindung (Proteolyse) katalysieren. Sie werden je nach Angriffsort in Endo- und Exopeptidasen eingeteilt. Endopeptidasen, wie Papain, spalten die Peptidkette spezifisch nach bestimmten Aminosäuren.; die Spaltprodukte sind Peptide verschiedener Längen. Die Exopeptidasen spalten immer einzelne Aminosäuren von Kettenenden ab, entweder vom N-terminalen Ende (Aminopeptidasen) oder vom C-terminalen Ende (Karbonylpeptidasen). Proteasen können auch nach ihrer abbauenden Funktion oder regulatorischen Funktion bezeichnet werden. Abbauende Proteasen sind im intra- und extrazellulären Proteinabbau miteinbezogen, während regulatorische Proteasen limitierte Proteolysen von spezifischen Substraten katalysieren. Die limitierte Proteolyse führt zu einer funktionellen Veränderung eines spezifischen Substrats, hat aber keine Bedeutung für den normalen Proteinabbau. Die genaue Funktion von Calpainen ist nicht klar. Wahrscheinlich haben Calpaine sowohl eine abbauende als auch eine regulatorische Funktion (Schollmeyer et al.1988, Watanabe et al.1989).

Calpaine spielen eine wichtige Rolle bei Signaltransduktion, Zellproliferation, Zellmigration, dazuhörend Chemotaxis (Glading et al. 2002, Goll et al.2003, Franco et al.2005).

Viele Calpainhomologe sind ubiquitär vorhanden, während andere gewebespezifisch und somit in wichtigen Organfunktionen involviert sind. Es sind Zusammenhänge zwischen Defekte bei einigen Calpaingenen und Krankheiten des menschlichen Körpers festgestellt worden (Zatz und Starling, 2005), zum Beispiel bei Katarakt (m-Calpain) (Azuma et al.1992), Anfälligkeit für Diabetes mellitus Typ II (Calpain 10) (Suzuki et al. 2004, Logie et al.2005), Beckengürtel-Muskeldystrophie (Calpain 3) (Sorimachi et al.2000), neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer (Saito et al.1993) sowie Progression von Tumorerkrankungen wie Brustkrebs (Calpain 2) (Wang et al. 2005, Carragher et al.2004, Huber et al.2004). Calpaine spielen eine wichtige Rolle bei der sekundären Degeneration nach zerebraler Ischämie (Liebetrau et al.1999, Vanderklish und Bahr, 2000) und traumatischer Hirn- und Rückenmarkschädigung (Huang et al.2001, Branca et al.2004).

2.3.3 Calpainsubstrate

Zytoskelettale Proteine

Aktin-bindende Proteine (Fodrin oder Spektrin, Talin, Filamin),
Mikrotubulin-assoziiertes Protein; MAP-2.

Membran Proteine

Wachstumsfaktor-Rezeptoren (EGF-Rezeptoren), Adhäsionsmoleküle (Integrin, Kadherin), Ionen Transporter (Ca²⁺-ATP-ase)

*Enzyme **

Kinasen (Protein Kinase C, Myosin Leicht-Ketten Kinase, Calmodulin-abhängige Kinase), Phosphatasen (Calcineurin), Phospholipasen (Phospholipase C).

Andere

Zytokine (Interleukin 1a), Transkriptionsfaktoren (Fos, Jun)

* Einige sind zytosolisch, andere sind membranassoziiert

Tabelle 2 zeigt Calpainsubstrate. Zytoskelettale Proteine und Membranproteine sowie Enzyme gehören zu den Calpainsubstraten.

2.3.3.1 Mikrotubulinsassoziiertes Protein 2 (MAP-2)

Die Nervenzelle mit ihren Fortsätzen wird als Neuron bezeichnet. Ein Neuron besteht aus dem Perikaryon (Zellkern), dem Axon (efferente Bahn) und den Dendriten (afferente Bahnen). Es bestehen Unterschiede zwischen dem axonalen und dem dendritischen Zytoskelett; Neurofilamente kommen hauptsächlich im Axon vor, während Mikrotubuli sowohl im Axon als auch in den Dendriten vorkommen. Mikrotubuli sind Hauptbestandteile des neuronalen Zytoskeletts. Sie bestehen aus Proteinkomponenten und besitzen darüber hinaus hohle, zylindrische α - und β -Tubulinpolymere, zusammengefasst als „Microtubule-associated proteins“ (MAPs). Die MAPs gehören zu einer Gruppe hoch-molekularer Proteine mit einem Molekulargewicht von ca. 300,000kDa. Diese MAPs können auf Polyacrylamid-Gelen in eine MAP-1-Bande und in einem Proteindoublet MAP-2 getrennt werden (Bernhardt et al.1984). MAP-2 liegt in hoher Konzentration in den Dendriten vor, kommt hingegen in Axonen und nicht-neuronale Zellen kaum vor (Bernhardt et al.1984).

Am COOH-Terminus des MAPs ist eine Reihe von Aminosäuren-Triplets vorhanden, die an der Bindung von Tubulin beteiligt sind (Joly et al.1989, Lewis et al.1989). MAP-2 stabilisiert Tubulinpolymere (Hirokawa et al.1988) und induziert das Bündeln von Mikrotubuli (Lewis et al.1989). Die Affinität von MAP-2 zu Tubulin wird durch Phosphorylierung bestimmt (Brugg et al.1991). In vitro wird MAP-2 von Kinasen wie cAMP-abhängigen Kinasen, Ca^{2+} -abhängigen Kinasen und Proteinkinase-C phosphoryliert. Niedrig phosphoryliertes MAP-2 hat eine höhere Affinität zu Mikrotubuli als hoch phosphoryliertes MAP-2. Die calpaininduzierte Proteolyse betrifft eher niedrig phosphoryliertes MAP-2 (Johnson et al.1991a).

Somit ist MAP-2 essentiell für die Erhaltung der axialen Symmetrie der Neurone (Matus et al.1988). Weiter scheint MAP-2 eine dynamische Funktion mit Einwirkung auf neuronalem Wachstum und Differenzierung zu haben, mit großer Bedeutung für neuronale Antwortmechanismen auf Wachstumsfaktoren, Neurotransmitter, Neurotoxinen und synaptische Aktivität.

Der Verlust an MAP-2, durch den Verlust an Immunreaktivität sichtbar gemacht, scheint ein sensitiver Indikator für einen neuronal-dendritischen Schaden im ischämischen Gehirn zu sein. Dies ist durch mehrere Modelle der globalen und fokalen zerebralen Ischämie dokumentiert worden. Dem zytoskelettalen Abbau, je nach ausgesuchtem Tier, Gehirnregion und Art der Gefäßokklusion, scheint ein

unterschiedliches Muster zu unterliegen. Bei Mäusen hat sich bereits drei Minuten nach Verschluss der rechten Arteria carotis communis ein Verlust an MAP-2 im ipsilateralen hippocampalen Dendriten zeigen können (Kitagawa et al.1989). Mit längerer Ischämiedauer nahm der Verlust an MAP-2 zu und breitete sich in weiten Teilen des Hippocampus und auch des Kortex aus. Dawson und Mitarbeiter (1995) haben eine rasche Reduktion der MAP-2-Immunreaktivität festgestellt, die eine Stunde nach permanenter Okklusion der Arteria cerebri media sichtbar wurde und im Weiteren in Ausbreitung zunahm.

Diese Befunde zeigen, dass MAP-2 sehr empfindlich gegenüber Ischämie ist und als früher Indikator für einen ischämieinduzierten neuronal-dendritischen Schaden dienen kann (Miyazawa et al.1993, Tomimoto et al.1992, Buddle et al.2003). Der Verlust an MAP-2-Immunreaktivität ist Folge einer kalziuminduzierten Dephosphorylierung und eines proteolytischen Abbaus durch kalziumabhängige Proteasen wie Calpain (Halpain et al.1990).

2.3.4 Calpainaktivierung

Der genaue Ablauf der Calpainaktivierung ist noch nicht geklärt. In mehreren Studien (Suzuki et al. 1995, Mellgren et al.1987) wurde gezeigt, dass Calpaine durch Autolyse des N-Terminus der großen Untereinheit und durch eine Dissoziation der großen und kleinen Untereinheiten aktiviert werden (Bahi et al.1996, Elce et al.1997). Infolge Saido und Mitarbeiter (1994a) und Molinari und Mitarbeiter (1994) ist die Calpainaktivierung unabhängig von einer Autolyse. Damit Calpaine an der Zellmembran aktiviert werden können, muss die intrazelluläre Kalziumkonzentration viel höher sein als im physiologischen Zustand, die zwischen 50-300nM liegt (Friedrich et al 2004). Die Autolyse reduziert die erforderliche Menge an Kalzium und hat eine wichtige Funktion bei der Calpainaktivierung (Bahi et al.1996, Suzuki und Sorimachi 1998).

Um die benötigte Kalziummenge zu reduzieren, ist die Bindung der Calpaine mit Phospholipiden der Zellmembran, wie zum Beispiel PIP₂ von Bedeutung (Saido et al.1992, Arthur und Crawford 1996, Tompa et al.2001). Abschnitt V der regulatorischen 30K-Untereinheit spielt eine wichtige Rolle bei der Bindung mit Phospholipiden der Zellmembran (Imajoh et al.1995). Bei der Autolyse der 30K Untereinheit geht Abschnitt V verloren und es ist somit verständlich, dass die 30K-

Autolyse, im Gegensatz zu der 80K-Autolyse, nicht zu einer Phospholipidbindung führt und somit auch nicht die benötigte Kalziumkonzentration verringert.

Weiter haben Molinari und Mitarbeiter (1994) gezeigt, dass die 80K-Untereinheit unter kalziumregulierten Verhältnissen an die Membran wandert und zur Proteolyse der membrangebundenen Ca^{2+} -ATPase führt. Die autolytierte Form wurde jedoch nicht in der Membranfraktion gefunden. Danach wäre es wahrscheinlich, dass autolytiertes Calpain die membranbindende Eigenschaft verliert, wie bei der 30K-Autolyse durch den Verlust von Abschnitt V.

Über die Bedeutung dieser Phospholipid-Hypothese *in vivo* wird diskutiert. Es ist nicht bewiesen, dass unter physiologischen Bedingungen die *in vivo* gefundene Kalziumkonzentration zu einer Aktivierung der Calpaine durch Membranassoziation führt (Goll et al.1992). Sorimachi (1997) hat gezeigt, dass Calpaine durchaus im Zytosol verteilt sind und keine spezifische Lokalisation in der Membran haben, auch nicht nach Aktivierung. Die Assoziation mit der Membran lässt sich nicht durch Phospholipide allein erklären. Es sind Proteine nachgewiesen worden, die bei einer Interaktion mit der Membran eine Rolle spielen (Inomata et al.1995).

Suzuki und Mitarbeiter (1995) haben die Calpainaktivierung über zwei Wege erklärt; ein autolytischer (B) und ein nicht-autolytischer Weg (B'). Bei beiden Wegen kommt es zu einer Dissoziation der beiden Calpainuntereinheiten (siehe Abbildung 2).

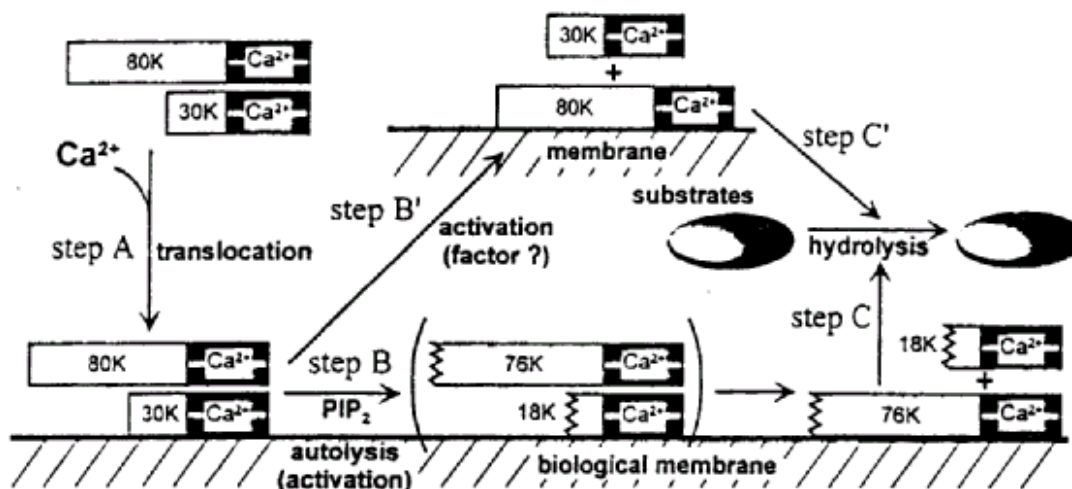


Abbildung 2 zeigt die Calpainaktivierung an der biologischen Membran.

Kalzium bindet an das im Zytosol vorhandene Pro-Calpain. Es kommt zu einer Konformationsänderung der Protease, wodurch hydrophobe Regionen freigelegt werden und Pro-Calpain an die Phospholipidmembran wandern kann. Die Wanderung an die Phospholipidmembran ist der erste wichtige Schritt in der Aktivierungskaskade von Calpain (Abb. 2, Step A). An der Membran bindet Calpain an Calpainsubstrate oder an Aktivierungsfaktoren. Der weitere Aktivierungsweg ist entweder über eine Autolyse (Step B) mit nachfolgender Dissoziation der Untereinheiten (Step C) oder über eine Dissoziation der Untereinheiten allein zu erklären (Step B', Step C').

Die Autolyse findet an der Membran statt (Step B). Durch eine Abspaltung von Abschnitt I entsteht aus der 80K-Untereinheit eine 76K-Untereinheit. Durch eine Abspaltung von Abschnitt V entsteht aus der 30K-Untereinheit eine 18K-Untereinheit. Die Abspaltung von Abschnitt I ist der entscheidende Vorgang, der die benötigte Kalziummenge für die weitere Calpainaktivität reduziert. Bevor Calpain proteolytisch aktiv wird (Step C), dissoziieren die autolysierten Untereinheiten 76K und 18K. Diese Dissoziation ist ein irreversibler Prozess und findet nur bei Vorhandensein von Phospholipiden und Kalzium statt.

Der zweite Aktivierungsweg ist unabhängig von der Autolyse. Es kommt zu einer reversiblen Dissoziation der katalytischen 80K-Untereinheit und der regulatorischen 30K-Untereinheit (Step B'). Die Kalziumaffinität der katalytischen 80K-Untereinheit ist viel höher als die Kalziumaffinität des Gesamtcalpains (Suzuki et al.1995).

Zusammengefasst folgt entweder eine Dissoziation der autolysierten Untereinheiten 76K und 18K oder eine Dissoziation der Untereinheiten 80K und 30K. Die aktive Form des Calpains ist die 80K-Untereinheit oder die autolysierte 76K-Untereinheit.

Laut Suzuki (1981) findet die Autolyse der katalytischen 80K-Untereinheit vor der Autolyse der regulatorischen 30K-Untereinheit statt. Durch die Spaltung des N-Terminus am 80K-Untereinheit entsteht erst ein 78K Protein und danach ein 76K Protein. Interessanterweise hat der physiologische Calpaininhibitor Calpastatin keine Einwirkung auf die autolytische Spaltung zum 78K, während die Konversion in das 76K Protein fast komplett inhibiert werden kann (Zimmermann et al.1991).

Gegen eine Autolyse sprechen Befunde von Yoshizawa und Mitarbeiter (1995). Diese haben gezeigt, dass die 30K-Untereinheit eine inhibitorische Wirkung auf die proteolytische Calpainaktivität hat. Durch die kalziumabhängige Dissoziation der 80K- und 30K-Untereinheiten geht aber die inhibitorische Wirkung der 30K-Untereinheit verloren und die 80K-Untereinheit liegt als aktives Monomer vor. Somit wäre es wahrscheinlich, dass Calpaine nicht als autolyseabhängige Proenzyme vorliegen, sondern aktive Proteasen im intakten Zustand sind.

Gegen die Dissoziation der beiden Untereinheiten spricht eine wohl enge Bindung zwischen dem kalziumbindenden Abschnitts IV der 30K-Untereinheit und dem Abschnitt IV der 80K-Untereinheit.

2.4. Calpaininhibitoren

2.4.1. Calpastatin

Die Calpainaktivität wird durch die intrazelluläre Kalziumkonzentration, durch Bindung an Phospholipiden, durch Phosphorylierung, durch Autolyse und durch selektive Inhibitoren reguliert (Wendt et al.2004). Das endogene Polypeptid Calpastatin ist einer der wichtigsten intrazellulären Calpaininhibitoren. Calpastatin besteht aus vier Abschnitten, die alle in drei weitere Abschnitte geteilt werden: eine N- und eine C-Randregion und eine zentrale inhibitorische Region, welche Calpain bindet. Dazu kommt ein N-terminaler Schwanz, dessen Funktion unbekannt ist (Kawasaki et al.1989). Calpastatin bindet μ -Calpain und m-Calpain an drei verschiedenen Stellen und mindestens zwei dieser Bindungen sind kalziumabhängig (Goll et al.2003). Auch weitere biochemische Data deuten daraufhin dass Calpastatin vorzugsweise an kalziumaktiviertes Calpain bindet (Barnoy et al.1999, Tullio et al.1994). Calpastatin kann die Membranbindung von μ -Calpain bei einer Kalziumkonzentration von 1,4 μ M hemmen (Inomata et al.1989). Oswald und Mitarbeiter (1991) haben gezeigt, dass bei einer Ischämie die Calpastatinaktivität in der Zellmembran reduziert und die proteolytische Aktivität der Proteasen somit erhöht ist.

Calpastatin hat eine hohe Affinität und Spezifität für μ - und m-Calpain (Suzuki et al.1987). Andere Zysteinproteasen, wie Kathepsin B oder Papain, werden nicht von Calpastatin inhibiert.

2.4.2. Peptidische Calpaininhibitoren

Calpaine werden als Zysteinproteasen bezeichnet, weil sie an der aktiven Seite ein Zystein besitzen (siehe Abbildung 1). Die große Calpainuntereinheit hat eine große Ähnlichkeit mit Teilen der Zysteinproteasen Kathepsin B und Papain und es wird vermutet, dass auch bei Calpainen eine Zystein-Thiolgruppe als Katalysator dient.

Zysteinproteasen binden entweder irreversibel kovalent oder reversibel kovalent mit dem Inhibitor. Reversible Inhibitoren besitzen meistens ein Aldehyd oder ein Keton als reaktive Anteile. Bekannte irreversible reaktive Anteile sind Epoxide, Vinylsulfone oder α -Haloketone.

Streptomyceten-Spezies sind eine gute Quelle für Calpaininhibitoren. Das Peptidylaldehyd Leupeptin wurde zum Beispiel aus Aktinomyceten-Kulturen isoliert. Dieses Tripeptid (AcLeuLeuArgH) ist ein reversibler, nicht calpainspezifischer Inhibitor; er inhibiert auch andere Zysteinproteasen wie Kathepsin B, Plasmin, Trypsin und Papain.

Ein anderer aus Mikroben gewonnener Inhibitor ist E-64 (Hanada et al.1978), ein peptidyl-epoxysuccinat Inhibitor, der aus *Aspergillus japonicus*-Kulturen isoliert worden ist. E-64 ist ebenfalls calpainunspezifisch und inhibiert auch Kathepsin B. Diese beiden Inhibitoren sind aufgrund ihrer geringen Spezifität und ihrer schlechten Membrandurchgängigkeit von begrenzter pharmakologischer Bedeutung. Leupeptin und E-64 haben beide eine Guanidingruppe, die bei neutralem pH positiv geladen ist. E-64 hat zusätzlich eine Karboxylgruppe, die bei neutralem pH ionisiert vorliegt. Es wurden deswegen mehrere Studien durchgeführt, um diese Peptide zu modifizieren.

Der erste beschriebene zellpenetrierende Calpaininhibitor EST (Tamai et al.1986) ist ein E-64 Abkömmling und hat keine geladenen Gruppen. Statt der Guanidingruppe von E-64 hat EST eine Alkylgruppe und die Karboxylgruppe an C2 ist verestert.

Weitere zellpenetrierende Inhibitoren sind die Tripeptide Calpaininhibitor I (AcLeuLeuNleH) und Calpaininhibitor II (AcLeuLeuMetH) (Sasaki et al.1990). Calpaininhibitor I inhibiert neben Calpain auch Kathepsin L und Calpaininhibitor II inhibiert zusätzlich Kathepsin B.

Ein häufig beschriebener zellpenetrierender, reversibler Inhibitor ist das Peptidylaldehyd MDL 28170 (ZValPheH) (Mehdi et al.1988). Er inhibiert Kathepsin B, und wenn auch nur schwach, α -Chymotrypsin.

Bei einem häufig benutztem Modell für Exzitotoxizität und Ischämie *in vitro* (Siman et al.1990, Arai et al.1992) an Schnitten aus dem Hippocampus, haben mehrere Gruppen gezeigt, dass der zellpermeable Calpaininhibitor I und MDL28170 die funktionelle Erholung der hippocampalen Schnitte nach Hypoxie verbessert (Lee et al.1991, Arlinghaus et al.1991).

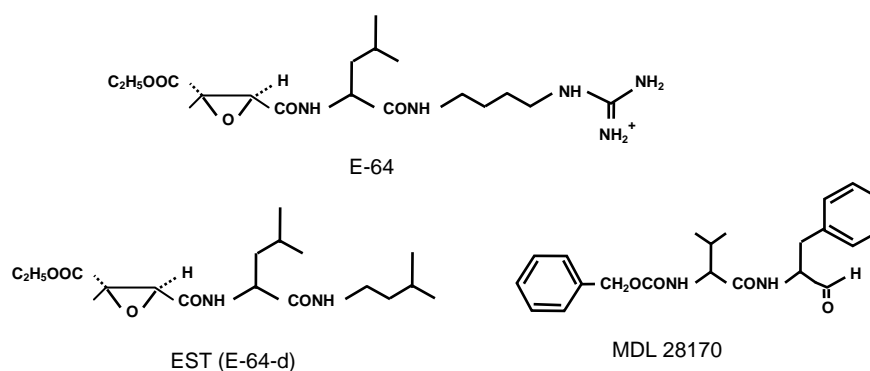


Abbildung 3 zeigt peptidische Calpaininhibitoren. E-64 hat eine geladene Guandingruppe. Der E-64-Abkömmling EST besitzt keine geladene Gruppe und ist der erste beschriebene zellpenetrierende Inhibitor. MDL 28170 ist ein weiterer zellpenetrierender Inhibitor.

Trotz der verbesserten Zellpermeabilität der Peptidylaldehyde aus der zweiten Generation, wie Calpaininhibitor I, II und MDL 28170, ist es immer noch schwierig, eine genaue Aussage über die therapeutisch relevante Dosis der Inhibitoren zu geben. Die Inhibitoren sind nicht calpainspezifisch genug, um eine sinnvolle Interpretation von positiven Medikamenteneffekten zu ermöglichen. Neuere, chemisch hergestellte Inhibitoren, wie α -Ketoester und α -Ketoamide, sind entwickelt worden, um diese Probleme zu verringern.

Peptidyl α -Ketoester wurden ursprünglich als Serinproteaseinhibitoren verwendet (Hori et al.1985). Es wurde gezeigt dass der dipeptidische α -Ketoester CX216 relativ zu Kathepsin B ($K_i = 340 \mu\text{M}$) und Papain ($K_i = 75 \mu\text{M}$) eine Selektivität für μ -Calpain ($K_i = 1,8 \mu\text{M}$) und m-Calpain ($K_i = 0,4 \mu\text{M}$) besitzt. α -Ketoester werden schnell *in vivo* von Plasmästerasen abgebaut. Eine andere Gruppe, die α -Ketoamide, wurde von Li (1993) untersucht, um die Plasmastabilität und die Membranpermeabilität der Inhibitoren zu optimieren. Ein α -Ketoamid Analoga, das Dipeptid AK275, zeigt eine protektive Wirkung gegen fokale zerebrale Ischämie bei Ratten bei postschämischer Gabe (Bartus et al.1994a). Die calpaininhibitorische Potenz ergibt sich in der Reihenfolge: α -Ketoazide > α -Ketoamide > α -Ketoester (Li et al.1993). Das Ketoamid AK295, ein Dipeptid und AK275-Abkömmling, ist einer der ersten wasserlöslichen

Inhibitoren und hat sich wirksam beim Okklusionsmodell der Arteria cerebri media (MCAO) gezeigt (Bartus et al. 1994b). Es besitzt eine höhere Löslichkeit als AK275, bei gleicher Potenz, Selektivität und neuronaler Permeabilität wie die herkömmlichen α -Ketoamide.

In einer Studie von Bartus und Mitarbeiter (1995) wurde die inhibitorische Wirkung des α -Ketoesters (CX216) und der Ketoamide (AK275 und AK295) mit den Literaturstandarden Leupeptin und Calpaininhibitor I verglichen, indem Enzymaktivität (Potenz und Selektivität), neuronale Permeabilität und Löslichkeit verglichen wurden. Diese Familie der neuen Calpaininhibitoren haben eine höhere Selektivität für Calpain gegenüber anderen Zysteinproteasen und sie inhibieren weniger Proteasen anderer Klassen. AK295 ist 80mal löslicher als AK275. Die Stabilitätsuntersuchungen ($t_{1/2}$) haben gezeigt, dass CX216 innerhalb von Minuten durch Esterase abgebaut wird, während AK275 und AK295 eine $t_{1/2}$ von mehreren Stunden haben. Insgesamt haben alle drei Inhibitoren bei niedrigerer Konzentration und kürzerer Inkubationszeit, eine größere protektive Wirkung gegen hypoxischen Schaden als die zwei Standardinhibitoren Leupeptin und Calpaininhibitor I.

Der Gebrauch von Calpaininhibitoren ist somit durch mehrere Faktoren eingeschränkt. Sie besitzen eine geringe Selektivität, niedrige metabolische Stabilität, schlechte zellpenetrierende Fähigkeit, schwache Kinetik, niedrige orale Bioverfügbarkeit und schlechte Wasserlöslichkeit, die eine intravenöse Gabe des Inhibitors verhindert.

Um stabilere Inhibitorstrukturen zu erhalten, wurde unter anderem nach nicht-peptidischen Strukturelementen gesucht, die für einen reversiblen Calpaininhibitor geeignet wären.

2.4.3 Nicht-Peptidische Calpaininhibitoren.

Aurintricarboxylsäure (ATA) ist ein nicht-peptidischer Calpaininhibitor und inhibiert sowohl μ -Calpain ($IC_{50}=22\mu M$) als auch m-Calpain ($IC_{50}=10\mu M$) und verhindert einen NMDA-induzierten Spektrinabbau und neuronalen Zelltod (Posner et al.1995). Wie bei anderen nicht-peptidischen Inhibitoren, inhibiert ATA eine Vielzahl von Enzymen wie Endonuklease, DNA-Polymerase und Glukose 6-phosphat Dehydrogenase. Laut Graybill (1995) sind Quinolinecarboxamide reversible Inhibitoren, die eine 50-fach höhere Selektivität für humanes Erythrozyten- μ -Calpain gegenüber Kathepsin B und L haben. Derivate von α -Mercaptoacrylsäure, wie PD150606 und PD151746, sind reversible Inhibitoren (Wang et al.1996). Die Mercaptoacrylate sind zellpermeabel und

extrem calpainspezifisch. Lin und Mitarbeiter (1997) haben gezeigt dass PD150606 an einer hydrophoben Tasche der Domäne IV der kleinen Calpainuntereinheit bindet. PD150606 ist das potentere Analogum und inhibiert μ -Calpain und m-Calpain mit einem K_i von jeweils 0,21 und 0,37 μ M. PD 151746 hat eine 20-fach höhere Selektivität für μ -Calpain ($K_i=0,26\mu$ M) gegenüber m-Calpain ($K_i=5,33\mu$ M) und ist wegen seiner hohen Selektivität ein wichtiger Inhibitor bei der Untersuchung von Calpainen.

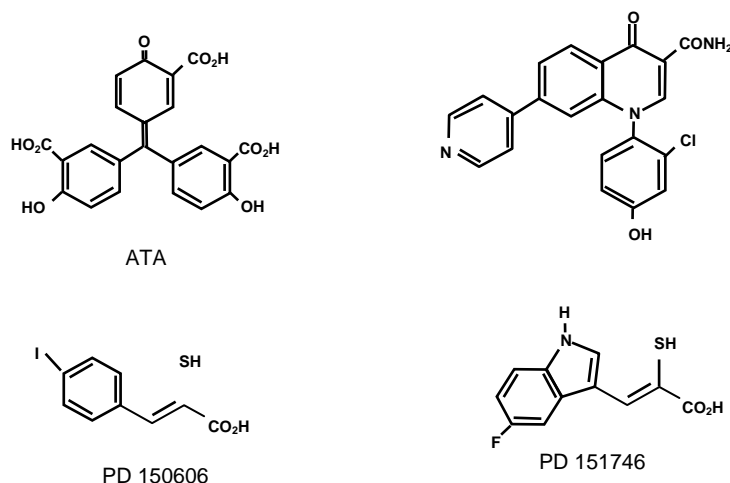


Abbildung 4 zeigt die Struktur von neueren, nicht-peptidischen Inhibitoren. PD 150606 und PD151746 sind Derivate von α -Mercaptoacrylsäure und extrem calpainspezifisch.

2.4.3. Calpaininhibitor A-558693

Der Calpaininhibitor A-558693 (N-(1-Benzyl-2-carbamoyl-2-oxoethyl)-2-[E-2-(4-diethyl-aminomethylphenyl)ethen-1-yl]nicotinamid) ist ein von mehreren Derivaten eines solchen nicht-peptidischen Inhibitors (Abbildung 5). Er hat von Benzoylalanin abstammende Strukturelemente und hat Ketoamide als Angriffstelle. Er ist ein potenter, reversibler, wasserlöslicher Calpaininhibitor mit oraler Bioverfügbarkeit (Lubisch et al.2003).

A-558693 inhibiert μ -Calpain von Ratte und Mensch mit dem gleichen Inhibitionskonstanten (K_i) von 18,3nM. Weiter inhibiert A-558693 andere Zysteinproteasen wie Kathepsin B mit einem Inhibitionskonstant (K_i) von 83 ± 11 nM, sowie Papain und Caspase 3. Eine Inhibierung von Papain und Caspase 3 wurde erst ab 10 μ M gesehen.

Da Calpain ein intrazelluläres Enzym ist, ist die zellpenetrierende Fähigkeit des Calpaininhibitors von großer Bedeutung. Die zellpenetrierende Fähigkeit von A-558693 wurde durch die Hemmung von calpaininduziertem, intrazellulärem Proteinabbau festgelegt, genauer gesagt durch die Hemmung eines Abbaus der Tyrosinkinase Pp60scr in humanen Thrombozyten. Der Inhibitor zeigte eine intrazelluläre Aktivität (IC_{50}) von $1,0\mu M$ und zeigt somit eine zellpenetrierende Fähigkeit. Die Wasserlöslichkeit des Inhibitors entspricht der Wasserlöslichkeit von Salz bei einem pH von 5 - 5,5, wodurch eine intravenöse Verabreichung ermöglicht wird. Bei pH-Werten von 7 zeigte nur A-558693 eine ausreichende Wasserlöslichkeit, was mit dem Pyridine-Anteil zusammenhängen kann. Das Derivat A-705239 wurde auf eine neuroprotektive Wirkung im Rattenmodell des experimentellen Schädel-Hirntraumas untersucht. Der Inhibitor A-705239 reduziert den neuronalen Zelltod um 41% und zeigte eine signifikante neuroprotektive Wirkung, sogar bei Verabreichung unmittelbar nach Induktion eines Traumas (Lubisch et al.2003).

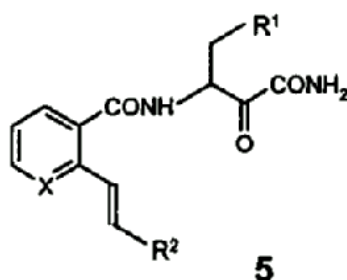


Abbildung 5 zeigt die Struktur vom Calpaininhibitor 5. Das Derivat A-558693 des Calpaininhibitors 5 besitzt als R1; Phenyl, als R2; 4-(C₆H₄)-CH₂N(CH₃)₂ und als X; N (Lubisch et al.2003).

3. Material und Methoden

3.1. Das Tiermodell

3.1.1. Präparationsbeschreibung

Die Versuche wurden an erwachsenen, männlichen Wistarratten mit einem Gewicht von 300 g bis 350g (Charles River Deutschland; Sulzfeld) durchgeführt. Die Ratten wurden vor der Operation in einem Rhythmus von 12-Stunden Helligkeit/Dunkelheit gepflegt. Die Tiere hatten dabei freien Zugang zu Futter und Wasser. Alle der folgenden Vorgänge wurden in Übereinstimmung mit der Europäischen Ethikkommission durchgeführt und waren von der Oberbayerischen Regierung geprüft und genehmigt. In Übereinstimmung mit diesen Standards wurde alles getan, um die Zahl der Tiere möglichst gering zu halten und um sicherzustellen, daß die Tiere kein Unbehagen oder Schmerz erlitten.

Als Vorbereitung für die Intubation wurden die Tiere in ein mit Äther gefüllten Glasbehälter gelegt. Anschließend wurden die Tiere mit einem Tubus (Polyethylenschlauch PE250) intubiert und mit einer Gasmischung aus 30% O₂, 60% N₂O und 1,5 Vol. % Isofluran (0,2l/min) ventiliert (Harvard small animal ventilator, Modell 683, South Natick, MA). Äther kann bei Ratten zu einer starken Sekretsekretion in der Trachea führen. Eine solche erhöhte Sekretsekretion nach Äthereinleitung stellte sich in unseren Versuchen nicht als Problem dar, da die Intubation mit maschineller Beatmung in kürzestem Abstand zu der Verabreichung von Äther folgte. Die Ventilation der Tiere und die Aufrechterhaltung der Inhalationsnarkose wurde somit nicht wesentlich beeinträchtigt und eine Atropingabe s.c, um die erhöhte Sekretsekretion zu verhindern, wurde somit nicht notwendig. Zur kontinuierlichen Überwachung der künstlichen Ventilation wurde abhängig vom Blutdruck (80-100mmHg) jede halbe Stunde eine Blutgasanalyse durchgeführt (siehe Tabelle 3).

Nach Beginn der kontrollierten Beatmung wurde die Schwanzarterie und die rechte Vena jugularis externa mit Polyethylenschläuchen (PE50) kanüliert. Vor dem Hautschnitt wurde eine Lokalanästhesie mit Lidocain durchgeführt. Über den Schwanzarterien-Katheter war es möglich den systemischen arteriellen Blutdruck (SAP) mit einem Statham P23 Druckwandler aufzuzeichnen und Blutproben zur Blutgasanalyse (Bestimmung von PaO₂, PaCO₂ und pH) mit dem Blutgasanalysator

(Chiron diagnostics, Aying, CIBA-corning; 278 Blood Gas System) abzunehmen. Über den Vena jugularis externa-Katheter wurde zur Flüssigkeitssubstitution 0,9%-ige Kochsalzlösung mit einer Präzisions-Infusionspumpe infundiert (1ml/h; Perfusor ED 1-300, B-Braun). Außerdem konnte der venöse Zugang zur Applikation von Medikamenten verwendet werden. Die Körpertemperatur wurde kontinuierlich über eine rektale Temperatursonde gemessen und mit Hilfe eines regulierbaren Heizkissens in einem Bereich von 37,5 °C gehalten.

Die transitorische fokale zerebrale Ischämie wurde durch eine leicht modifizierte Methode der intraluminalen Gefäßokklusion nach Longa und Mitarbeiter (1989) durchgeführt. Der wesentliche Unterschied zu der Methode nach Longa 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 (siehe Abbildung 6).

Unter Zuhilfenahme eines Operationsmikroskops (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. Die Arteria carotis communis wurde kurzzeitig ligiert und über diese Arterie mit einem Polyethylenschlauch die Arteria carotis interna kanüliert. In diesem Polyethylenschlauch befand sich der chirurgische monofiläre 3-0 Nylonfaden, dessen Ende durch Hitze abgerundet wurde. Der 3-0 Nylonfaden wurde nun intrakraniell vorgeschoben, um den Abgang der Arteria cerebri media zu verschließen. Die korrekte Lokalisation des monofilären Fadens wurde durch einen Widerstand festgelegt, nachdem der Faden unter Sicht 18mm von der Bifurkation der Arteria carotis communis vorgeschoben wurde. Die Arteria cerebri media wurde für einen Zeitraum von 180 Minuten okkludiert.

Die intraoperative Kontrolle der Ischämietiefe durch Laser-Doppler Fluxmetrie ist in unserem Labor eine standardisierte Methode und Teil früherer Arbeiten (Sporer, Martens et al.1997), die sich gleichfalls mit der transitorischen fokalen zerebralen Ischämie der Ratte beschäftigt haben. Es wurde die modifizierte Methode der intraluminalen Gefäßokklusion nach Longa und Mitarbeiter (1989) verwendet (siehe oben). Da sich der Abfall der Durchflutung in der ischämischen Region in den verschiedenen früheren Versuchen als konstant erwiesen hat, wurde in unserer Arbeit auf die Laser-Doppler Fluxmetrie verzichtet.

Nach der Okklusion der Arteria cerebri media wurde anschließend der monofiläre Faden bis zu der Arteria carotis communis zurückgezogen um eine Reperfusion über den Circulus arteriosus Willisii zu ermöglichen. Nach 24-stündiger Reperfusion wurde der Versuch durch eine intrakardiale Infusion mit 50ml Phosphat-Pufferlösung (PBS; 1,48g l⁻¹ Na₂HPO₄, 0,43g l⁻¹, KH₂PO₄, 7,20g l⁻¹ NaCl) mit 1% Rinderalbumin beendet.

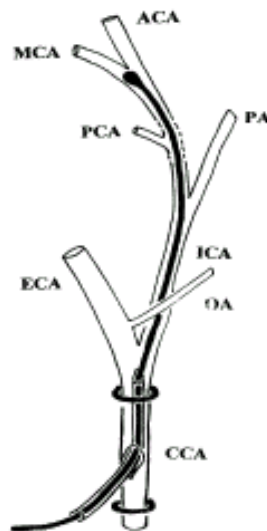


Abbildung 6 zeigt das modifizierte Fadenmodell bei der Ratte.

CCA: Arteria carotis communis, ECA: Arteria carotis externa, ICA: Arteria carotis interna, OA: Arteria ophthalmica, PA: Arteria pytergopalatina, PCA: Arteria cerebri posterior, MCA: Arteria cerebri media, ACA: Arteria cerebri anterior.

Tier	SAP	Temperatur	pH	pCO ₂	pO ₂	
Kontrolltier 1	94	37	7,61	23,1	110	MCAO
	82	37	7,58	25,2	107	
	88	37	7,53	27,1	105	
	88	37	7,53	27,1	106	MCAR
Kontrolltier 2	100	37	7,61	25,1	115	MCAO
	85	37	7,53	32,7	136	
	82	37	7,41	44,1	134	
	80	37	7,42	37,2	111	MCAR
Kontrolltier 3	112	37	7,57	37,2	125	MCAO
	107	37	7,51	35,6	127	
	102	37	7,51	33,1	141	
	107	37	7,49	30,8	114	MCAR
Calpaininhibitortier 1	93	37	7,61	25,7	160	MCAO
	90	37	7,49	33,1	141	
	90	37	7,49	30,8	124	
	90	37	7,47	30,9	113	MCAR
Calpaininhibitortier 2	88	37	7,48	35,5	193	MCAO
	88	37	7,52	32,9	177	
	82	37	7,51	32,2	168	
	85	37	7,46	36,1	184	MCAR
Calpaininhibitortier 3	102	37	7,54	31,4	154	MCAO
	96	37	7,51	34,1	134	
	90	37	7,56	25,8	145	
	109	37	7,46	30,3	151	MCAR

Tabelle 3 zeigt die Blutgasanalyse ab dem Zeitpunkt der Okklusion der A.cerebri media (MCAO) bis zum Zeitpunkt der Reperfusion der A.cerebri media (MCAR). SAP: systemischer arterieller Blutdruck.

3.1.2. Calpaininhibitorgabe

Der Calpaininhibitor A-558693 wurde in einer 5% Natriumazetat-Lösung in 0,9% Natriumchlorid gelöst und über den Vena jugularis externa Katheter gegeben. Die Gabe folgte 150 Minuten nach Einsetzen der Ischämie, also 30 Minuten vor der Reperfusion, über die Arteria cerebri media. Der Inhibitor wurde als Bolusinjektion über fünf Minuten (10mg/kg Körpergewicht) und anschließend 24 Stunden als kontinuierliche Infusion (5mg/kg Körpergewicht/ Stunde) über eine externe Pumpe (Precidor 5003 INFORS AG, Basel, Schweiz) gegeben.

3.2. Versuchsgruppen

Für den ersten Teil der Arbeit gab es eine Versuchsgruppe, die aus drei Tieren (n=3) bestand. Alle Tiere wurden nach einer dreistündigen Ischämie und anschließender Reperfusion über 24 Stunden im MRT untersucht. Diese drei Tiere bekamen keinen Calpaininhibitor A-558693 und der Versuch wurde direkt nach der MRT-Untersuchung durch eine intrakardiale Infusion der Ratten mit 1% Rinderalbuminlösung beendet.

Für den zweiten und dritten Teil der Arbeit gab es zwei Versuchsgruppen. Die erste Gruppe bestand aus fünf Tieren und diente als Kontrollgruppe. Diese Gruppe bekam kein Calpaininhibitor A-558693. Die zweite Gruppe, aus sechs Tieren wurde mit Calpaininhibitor A-558693 behandelt.

Alle Tiere unterlagen einer dreistündigen Ischämie und anschließend einer Reperfusion über 24 Stunden. 30 Minuten vor der Reperfusion bekam die Kontrollgruppe eine Dauerinfusion mit 0,9% Kochsalzlösung und die Inhibitorgruppe wie oben beschrieben eine einmalige Bolusinjektion und anschließend eine kontinuierliche Infusion mit Calpaininhibitor A-558693. Nach der Reperfusion über 24 Stunden wurde der Tierversuch durch eine intrakardiale Infusion der Ratte mit 1% Rinderalbuminlösung beendet.

3.3 Gewebeverarbeitung

3.3.1 Magnetresonanztomographie (MRT)

Die MRT-Untersuchungen wurden alle an einem klinischen MR-Tomographen der Feldstärke 1,5T durchgeführt (Siemens Vision 1,5 Tesla, Siemens, Inc., Erlangen, Deutschland) mit einer maximalen Gradientenstärke von 20mT/m. Die Spule wurde direkt über dem Kopf der Ratten platziert. Zweiunddreißig koronare T2-gewichtete Turbospinechosequenzen wurden angefertigt unter Verwendung folgender Parameter; Repetitionszeit (TR):3168ms, Echozeit (TE):96/1 ms, Anzahl der Messungen (Akquisitionen): 10:50 (x 2), Schichtdicke 2 mm, Abstand 1 mm, Bildgröße („field of view“): 88 mm x 100 mm, Auflösung (Matrix): 224 x 256 mit einer Pixelgröße von 0,39 mm x 0,39 mm x 2 mm.

3.3.2. Kryoschnitte

Jedes Tier das vor dem Ende des Versuchs verstorben war, wurde von weiteren Untersuchungen ausgeschlossen. Nach Beendigung des Tierversuches wurden die Ratten dekapitiert und das Gehirn vorsichtig entnommen. Das Gehirn wurde in Isopentan erst bei -20°C und dann bei -80°C eingefroren. Um eine subarachnoidale Blutung auszuschließen wurde die Schädelbasis untersucht.

Mit einem Kryostat (Frigocut 2800 Reichert-Jung, Bensheim, Deutschland) wurden bei -20°C $10\mu\text{m}$ dicke, koronare Gehirnschnitte angefertigt. Aus technischen Gründen wurde bei vier Tieren das Gehirn nur in der Ebene Bregma + 1mm geschnitten. Es wurden hundert aufeinanderfolgende Schnitte angefertigt.

Bei den restlichen Tieren wurde das gesamte Gehirn geschnitten. Es wurden fünf aufeinander folgende Schnitte angefertigt, dann wurden fünfzig Schnitte verworfen und anschließend wieder fünf aufeinander folgende Schnitte aufgehoben. In der Ebene Bregma +1mm wurde auch bei diesen Tieren hundert aufeinander folgende Schnitte angefertigt, da diese Ebene sich als repräsentative Ebene für die Infarktdarstellung erwiesen hat.

Die Schnitte wurden auf vorbeschrifteten, zimmertemperierten Objektträgern aus Glas aufgetragen und sofort bei -80°C eingefroren. Bei dieser Temperatur blieben die Schnitte gelagert, bis sie für immunhistochemische und histologische Färbungen verwendet wurden.

Für den ersten Teil der Arbeit, den Vergleich zwischen verschiedenen Methoden für volumetrische Infarktdarstellung, wurde bei jedem Tier ($n=3$) das gesamte Gehirn verarbeitet.

Bei den Tieren für den zweiten Teil der Arbeit, die immunhistochemische Darstellung von Calpainen und dem Calpainsubstrat MAP-2, wurde bei jedem Calpaininhibitortier ($n=6$) und jedem Kontrolltier ($n=5$), jeweils ein Schnitt in der Ebene Bregma +1mm ausgesucht.

Im dritten Teil der Arbeit, in dem anhand der Infarktvolumetrie die Wirkung von Calpaininhibitor A-558693 überprüft werden sollte, wurde bei jedem Calpaininhibitortier ($n=3$) und jedem Kontrolltier ($n=5$) durch das gesamte Gehirn Schnitte angefertigt und verarbeitet.

3.3.3 Immunhistochemie

Der neuronale Schaden wurde durch eine immunhistochemische Färbung mit monoklonalem Maus-Antikörper gegen MAP-2 (Boehringer Mannheim, Deutschland) dargestellt. MAP-2 ist ein zytoskelettales Protein. Es wird in frühen Phasen einer Ischämie durch aktivierte Proteasen abgebaut. Wo abgebautes Protein nicht durch den verwendeten Antikörper markiert wird, stellten sich die Areale mit neuronalem Schaden durch einen Verlust an Färbung dar. Diese Areale mit MAP-2-Demarkierung wurden als „regions of interest“ (ROIs) definiert. In den „ROIs“ wurde die Calpainexpression ausgewertet und mit der kontralateralen Hemisphäre verglichen. μ -calpainpositive Zellen wurden mittels eines polyklonalen Kaninchen μ -Calpain-Antikörper gegen die inaktive, große Untereinheit (80kD, R&D Laboratorien, München, Deutschland) dargestellt.

Es wurde die Bregma + 1mm Ebene als repräsentative Ebene des Mediainfarktes bei dem Fadenmodell gewählt. In dieser Ebene wurde koronare Kryostatschnitte von 10 μ m entnommen, die sowohl die ischämische als auch die nicht ischämische Hemisphäre enthielten. Die Schnitte wurden folgend behandelt: Aus einem -80°C Gefrierschrank wurden die Schnitte bei Raumlufttemperatur aufgewärmt und 5 Minuten mit Azeton/Chloroform (1:1) fixiert. Dann folgte eine 3x5 minütige Spülung in Phosphat-Buffer Lösung (PBS), bevor die Schnitte 20 Minuten in Blotto (50ml Tris-HCl, 9g l-1 NaCl, 50g l-1 fettarmes Milchpulver, 10ml l-1 Serum vom Pferd, 0,2g l-1 Natriumacetat) inkubiert wurden, um die unspezifische Bindung zu reduzieren. Jeder Schnitt wurde mit 150 μ l Primärantikörper (in 50mM Tris-HCl, 9g l-1 NaCl, 0,4g l-1 Rinderserumalbumin, 0,5g l-1 Thimrosal) für 2 Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend über Nacht bei 4°C gelagert. Die verwendete Verdünnung für μ -Calpain war 1:50 und für MAP-2 1:800. Nach einer 3x10 minütigen Spülung mit Phosphat-Buffer Lösung (PBS) wurden die Schnitte mit dem biotinylierten Sekundärantikörper 30 Minuten lang bei 37°C inkubiert. Die Verdünnung war bei beiden Färbungen 1:200. Für μ -Calpain wurde biotinyliertes Ziegenserum gegen Kaninchen-IgG aus Vectastin-Elite-Kit (PK6101) verwendet und für MAP-2 ein rat-absorbed goat-anti Maus-IgG (Vector, Burlingame, CA, USA). Nach einer erneuerten Spülung mit PBS für 3x10 Minuten, wurde die endogene Peroxidase geblockt, in dem die Schnitte 20 Minuten in einer Lösung von PBS mit 0,03% H₂O₂ inkubiert wurden. Eine Spülung mit

Leitungswasser (3 Minuten) und PBS (3x5 Minuten) folgte, um danach die Schnitte mit ABC-Reagenz (exogene Peroxidase) aus dem Vectastain-Elite-Kit (PK6101) über 30 Minuten bei 37 °C zu inkubieren. Als geeignetes Chromogen oder Peroxidase-Substrat wurde 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) verwendet in der Konzentration 30mg DAB und 20µl H₂O₂ in 60ml PBS. Diese Inkubation dauerte 5 Minuten und wurde mit Aqua dest. gestoppt und die Schnitte gründlich in Aqua dest. gewaschen. Die Schnitte wurden nun in einer Alkoholreihe (jeweils 1 Minute in Ethanol 70%, 70%, 96%, 96%, 100%, 100%) entfettet und mit Kaisers Gelatine eingebettet. Negativ und positiv Kontrollen wurden bei jeder Färbung durchgeführt. Der Komplex aus biotinyliertem Sekundärantikörper, Primärenantikörper und gesuchtem Gewebeantigen wurde somit durch das Avidin-Biotin-Peroxidasesystem sichtbar gemacht. Bei diesem System wird an dem biotinylierten Antikörper über eine Biotin-Avidin-Biotin-Brücke eine biotinylierte Peroxidase (ABC-Komplex) gebunden. Die Peroxidase oxidiert gelöstes 3,3'-diaminobenzidin (DAB) unter Reduktion von H₂O₂. Das oxidierte Diaminobenzidin polymerisiert und bildet einen hochgradig unlöslichen, rot-bräunlichen Niederschlag.

3.3.4 Silberinfarkt-färbung (SIS)

Als Methode wurde die von Vogel und Mitarbeiter (1999) beschriebene Silberinfarkt-färbung (SIS) verwendet. Die Entwicklungslösung wurde hergestellt indem 20 ml einer 37%-igen Formaldehydlösung mit 70 ml Aqua dest. gemischt wurde. 0,3 g Hydrochinon und 15 ml Azeton wurden hinzugefügt und aufgelöst. Als Letztes wurde 1,1 g Tri-sodium-citrate-dihydrate in der Lösung aufgelöst und bei Raumlufttemperatur ½ Stunde –1 Stunden aufbewahrt, bis die Lösung kupferrot wurde. Die Impregnationslösung wurde hergestellt indem 10 ml gesättigte Lithiumcarbonatlösung (LiCo₃ in Aqua dest. gesättigt) zu 5 ml einer 10%-Silbernitratlösung (0,5 g AgNO₃ in 5 ml Aqua dest.) hinzugefügt wurde. Zur Auflösung des Präzipitats wurden wenige Tropfen einer 25%-Ammoniumlösung zugegeben, bis die Lösung klar wurde. Anschließend wurde 75 ml Aqua dest. gut mit der Lösung vermischt und die Lösung unter Lichtschutz aufbewahrt.

Der Färbevorgang lief wie gefolgt ab: Die Schnitte wurden 2 Minuten mit Impregnationslösung auf einem Schütteltisch inkubiert, 6x1 Minute mit Aqua dest. gespült und danach 3 Minuten in die Entwicklungslösung gestellt. Nach der Spülung

(3x1 Minute) mit Aqua dest., wurden die Schnitte in Raumlufttemperatur getrocknet und in Glyceringelatine (Kaisers Gelatine) eingedeckelt.

3.4 Auswertung

3.4.1. Bildverarbeitung und Mikroskopie

Alle Calpain- und MAP-2-Schnitte wurden in einem Epson Perfection 1240U Flachbettscanner (Seiko Epson, Nagano, Japan) digitalisiert und die „regions of interest“ (ROIs) mit Hilfe eines computerisierten Bildverarbeitungssystems (Optimas software, Version 6,5 von Media Cybernetics Silver Spring, USA) markiert.

Um den Infarkt bestimmen zu können wurde das MAP-2 Demarkationsareal in der ischämischen Hemisphäre durch ein halbautomatisiertes Verfahren mit Hilfe von Optimas 6,5 markiert. Zusätzlich wurde durch dasselbe Verfahren spiegelbildliche ROIs in der kontralateralen Hemisphäre als Kontrollen markiert. Die ROIs wurden in beiden Hemisphären manuell markiert und die Größe des Areal in das metrische System konvertiert.

Für die Analyse wurde ein Lichtmikroskop verwendet (Zeiss, Axioskop 2, Deutschland), kombiniert mit einer Photokamera (Sony, PowerHAD, Japan). Die Zahl der peroxidase-positiven Zellen konnte mit Hilfe von Optimas 6,5 und EXCEL (Microsoft, Seattle, WA, U.S.A) bestimmt werden, in dem der RISC (relative intensity of staining coefficient) bestimmt wurde. RISC ist der relative Wert aus der logarithmischen Darstellung des Quotienten aus Hintergrundfärbung durch die Zellkernfärbung) (Kloss et al.2002).

3.4.2. Volumetrie

Um das Infarkt volumen bestimmen zu können, wurden MAP-2 und Silberschnitte mit dem Epson Perfection 1240U Flachbettscanner gescannt und in die Optimas 6,5-Imaging Software importiert. Die zerebrale Läsion wurde wie oben beschrieben durch ein halbautomatisiertes Verfahren markiert, und die Größe in das metrische System konvertiert. Als nächstes wurde für jede Ermittlungsmethode das partielle Volumen zwischen zwei angrenzende Schnitte berechnet. Für dieses Volumen wurde das Volumen eines Kegels berechnet:

$$\text{Partielles Volumen} = (\text{Areal}_{i-1} + \text{Areal}_i + \sqrt{\text{Areal}_{i-1} \times \text{Areal}_i})/3 \times (\text{Abstand zwischen Schnitte})_{i-1,i}$$

Areal 1,2,3,..., n-1 sind die Läsionsareale in den fortgesetzten Schnitten, die mit der gleichen Methode berechnet wurden. Areal 0 und Areal n sind die ersten und letzten Schnitte, bei denen keine Läsion sichtbar war. Dann wurde die gesamten partiellen Volumina addiert, und das totale Volumen der zerebralen Läsion berechnet: Totales Volumen = Σ (partielle Volumina).

Das Areal der ödemkorrigierten Infarkte wurde mit dieser Formel berechnet:

$$\text{Infarktareal}_{\text{ödemkorrigiert}} = \text{Infarktareal}_{\text{gesamt}} - \text{Ödemareal, wobei}$$

$$\text{Ödemareal} = \text{Areal linke Hemisphäre} - \text{Areal rechte Hemisphäre}$$

3.4.3 Statistische Analyse

Die Daten wurden als Mittelwert +/- SD dargestellt. Der Vergleich zwischen den Werten der ischämischen Areale und den Werten der Kontrollareale, wurde mit Hilfe des Mann-Whitney Tests, bei einem Signifikanzbereich von 5% erhoben.

4. Ergebnisse

4.1. Methode: Der Vergleich von Infarktgrößen durch MAP-2, SIS und MRT

In der nicht-ischämischen Kontrollhemisphäre zeigte sich eine homogene Anfärbung der gesamten Hemisphäre für Mikrotubulin-Assoziiertes Protein 2 (MAP-2), mit Ausnahme des Corpus callosum, wo die Immunreaktivität nicht vorhanden ist, da MAP-2 nur in der grauen Substanz vorkommt und das Corpus callosum Kommissurenfasern der weißen Substanz enthält. Im Unterschied dazu, wurde in der Silberinfarktfärbung (SIS) sowohl die graue als auch die weiße Substanz in der nicht-ischämischen Kontrollhemisphäre dargestellt. Die SIS war aber zwischen den verschiedenen Schnitten weniger konstant als die MAP-2-Färbung und zum Teil auch heller an den äußeren Rändern als die MAP-2-Färbung.

Nach 3 Stunden MCA-Okklusion und 24 Stunden Reperfusion, zeigten alle drei Methoden eine deutliche Demarkierung des Infarkts. Die Läsionen waren bei den Tieren unterschiedlich groß: zwei Ratten zeigten einen großen Infarkt und eine Ratte zeigte einen kleinen Infarkt. Alle Läsionen waren zwischen Basalganglien und Kortex ausgebreitet. Die MAP-2-Immunoreaktivität war in dem zerstörten Gewebe verschwunden (MAP-2-Demarkierung). Die SIS zeigte ebenfalls einen Verlust an Farbintensität in dem betroffenen Gewebe, die Läsion wurde hyperintens in der T2-gewichteten MRT. Wie in Abbildung 7 gezeigt, haben sich bei den drei verschiedenen, von einander unabhängigen Methoden, die Areale mit zerstörtem Gewebe komplett überlagert.

Abhängig von der Infarktgröße, hat sich die Läsion bei MAP-2 vom Schnitt 5 bis Schnitt 22 ausgebreitet, bei SIS von 6 bis 18 und bei MRT von 4 bis 16. Die gesamte Läsionsgröße hat sich bei den drei Versuchstieren durchschnittlich nur um 3,5% zwischen der MAP-2-Demarkierung und SIS-Berechnung unterschieden (291 versus 288 μ l, 451 versus 479 μ l, 23,5 versus 24,4 μ l). Bei den größeren Läsionen waren die mit der MRT berechneten Läsionen tendenziell größer (20%) als die mit postmortem durchgeführten Färbemethoden (124%, 115%). Die Varianzanalyse zeigte einen statistisch signifikanten Unterschied der Läsionsgrößen zwischen den verschiedenen Tieren ($p=0,000056$). Zwischen den verschiedenen Darstellungsmethoden konnte keine statistisch signifikante Übereinstimmung gefunden werden (t-Test).

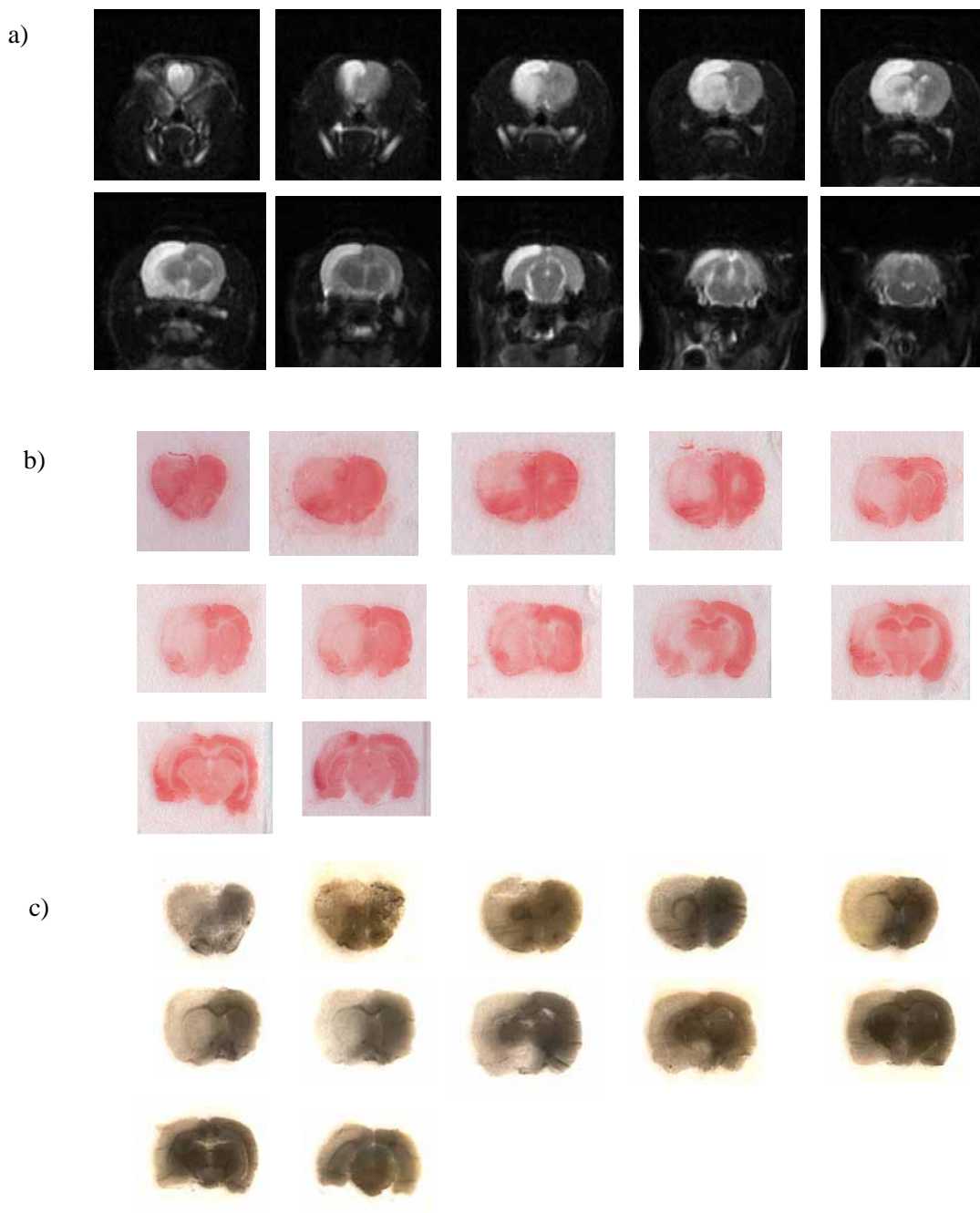


Abbildung 7a-c zeigt drei verschiedene Methoden, um den Infarkt bei demselben Tier darzustellen. MRT-T2, MAP-2 und SIS. Die Bilder zeigen den Zustand nach 3-stündiger Ischämie, gefolgt von 24 Stunden Reperfusion.

Die oberen Reihen zeigen T2-gewichtete MRT-Sequenzen. Die T2-Hyperintensität zeigt das Infarktgebiet. Die mittleren Reihen zeigen eine immunohistochemische MAP-2-Färbung. Es zeigte sich eine deutliche und scharfe Infarktdemarkierung in der ischämischen Hemisphäre. Die Läsion befand sich zwischen Basalganglien und Kortex. In der nicht-ischämischen kontralateralen Hemisphäre zeigt MAP-2 eine besonders deutliche Färbung im Kortex, während die weiße Substanz keine Reaktion zeigt. Die unteren Reihen zeigen eine Silberinfarktfärbung (SIS). SIS zeigte auch eine deutliche Demarkierung des Infarkts mit hohem Kontrast. Jedoch war die Farbintensität zwischen den verschiedenen Schnitten unterschiedlich. Die Abbildung zeigt eine komplette Überlappung zwischen MAP-2-Demarkierung und SIS. Obwohl der Winkel bei MRT sich leicht von MAP-2 und SIS unterscheidet, ist die Übereinstimmung zwischen den gefundenen Infarkten deutlich erkennbar.

4.2 Diagnostik: Calpainaktivierung

Eine Calpainaktivierung kann durch calpainpositive Zellen, wie in der μ -Calpainfärbung dargestellt werden (siehe 4.2.1) oder durch das Calpainsubstrat Mikrotubulinassoziiertes Protein 2 (MAP-2), wie in der MAP-2-Färbung (siehe 4.2.2). Die MAP-2-Immunreaktivität verschwindet im zerstörten, ischämischen Gewebe (MAP-2-Demarkierung).

4.2.1 μ -Calpainfärbung

In der nicht ischämischen Hemisphäre waren kaum calpainpositive Zellen darstellbar. Es fand sich eine Reduktion der calpainpositiven Zellen in den ischämischen Basalganglien bei den mit Calpaininhibitor A-558693 behandelten Tieren im Vergleich zu den mit Placebo behandelten Tieren. Als Wert wurde RISC (relative intensity of staining coefficient = relativer Wert aus der logarithmischen Darstellung des Quotienten aus Hintergrundfärbung durch die Zellkernfärbung) verwendet.

Basalganglien		RISC:		Differenz-RISC
		ischämische Hemisphäre	nicht-ischämische Hemisphäre	
Calpaininhibitor	Tierzahl	6	6	6
	Mittelwert	0,203	-0,017	0,220
	Standardfehler	0,038	0,002	0,038
Placebo	Tierzahl	5	5	5
	Mittelwert	0,356	0,012	0,344
	Standardfehler	0,049	0,088	0,045
p (t-test; zweiseitig)				0,0619

Tabelle 4 zeigt den RISC (relative intensity of staining coefficient = relativer Wert aus der logarithmischen Darstellung des Quotienten aus Hintergrundfärbung durch die Zellkernfärbung) sowie den Differenz-RISC zwischen ischämischer und nicht-ischämischer Hemisphäre. Der Differenz-RISC war in den Basalganglien bei den Calpaininhibitortieren 0,22 +/- 0,038 und bei den Placebotieren 0,34 +/- 0,045 (p=0,06, n.s).

Kortex		RISC:		Differenz-RISC
		ischämische Hemisphäre	nicht-ischämische Hemisphäre	
Calpaininhibitor	Tierzahl	6	6	6
	Mittelwert	0,139	0,030	0,109
	Standardfehler	0,081	0,020	0,073
Placebo	Tierzahl	5	5	5
	Mittelwert	0,227	0,009	0,218
	Standardfehler	0,092	0,007	0,088
p (t-test; zweiseitig)				0,3619

Tabelle 5 zeigt den RISC (relativer Wert aus der logarithmischen Darstellung des Quotienten aus Hintergrundfärbung durch die Zellkernfärbung) im Kortex der Calpaininhibitor-tieren und Placebo-tieren, sowie den Differenz-RISC zwischen ischämischer und nicht-ischämischer Hemisphäre. Im Kortex der Calpaininhibitor-tieren war der Differenz-RISC 0,109+/-0,073 und im Kortex der Placebo-tieren 0,218+/-0,088 (p=0,36, n.s.).

Kortex		Anteil calpainpositiver Zellen		Differenz
		ischämische Hemisphäre	nicht-ischämische Hemisphäre	
Calpaininhibitor	Tierzahl	6	6	6
	Mittelwert	40,5%	10,7%	29,8%
	Standardfehler	13,5%	0,8%	13,8%
Placebo	Tierzahl	5	5	5
	Mittelwert	60,7%	10,7%	50,1%
	Standardfehler	18,3%	0,5%	18,1%
p (t-test; zweiseitig)				0,3684
Mann-Whitney Test				0,465

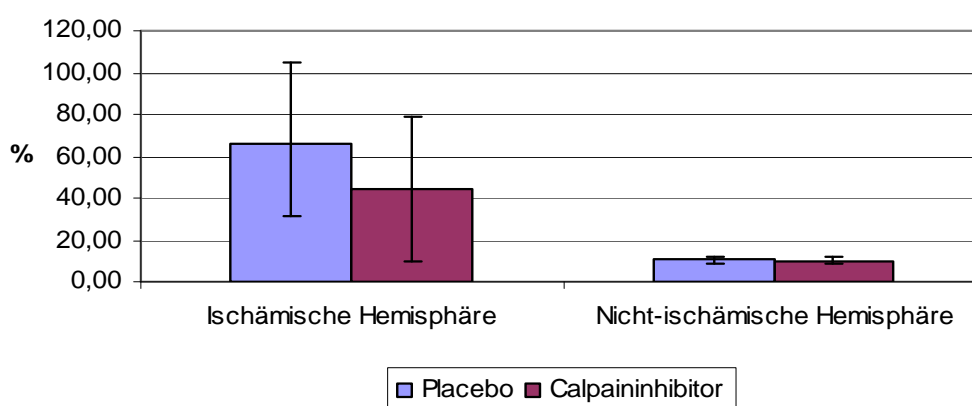


Tabelle 6 und **Abbildung 8** zeigen den Anteil calpainpositiver Zellen im Kortex nach 3h Ischämie und 24h Reperfusion. Im kortikalen Bereich zeigt sich einen Trend zu weniger calpainpositiven Zellen unter Verwendung des Calpaininhibitors. Der Anteil calpainpositiver Zellen im Kortex bei den Calpaininhibitor-tieren war 40,5% in der ischämischen Hemisphäre, in der nicht-ischämischen Hemisphäre 10,7%, mit einem Differenz von 29,8% +/- 13,8%. Bei den Placebotieren war der Anteil calpainpositiver Zellen im Kortex der ischämischen Hemisphäre 60,7% und in der nicht-ischämischen Hemisphäre 10,7%: Differenz 50,1% +/- 18,1%. Aufgrund der großen Schwankung war auch hier der Unterschied nicht signifikant (p=0,3).

Basalganglien		Anteil calpainpositiver Zellen		Differenz
		ischämische Hemisphäre	nicht-ischämische Hemisphäre	
Calpaininhibitor	Tierzahl	6	6	6
	Mittelwert	82,1%	10,5%	71,6%
	Standardfehler	4,6%	0,4%	4,6%
Placebo	Tierzahl	5	5	5
	Mittelwert	88,6%	10,6%	78,1%
	Standardfehler	4,2%	0,7%	3,9%
p (t-test; zweiseitig)				0,3273
Mann-Whitney Test				0,233

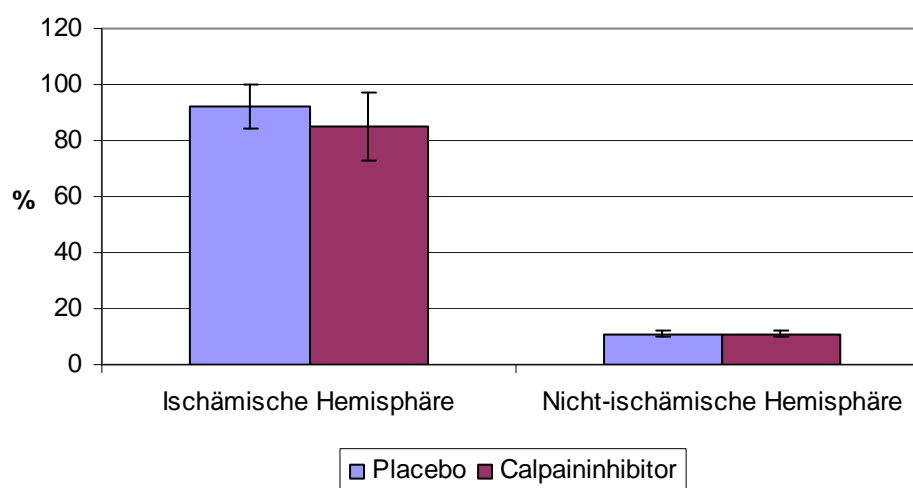


Tabelle 7 und **Abbildung 9** zeigen den Anteil calpainpositiver Zellen in den Basalganglien nach 3h Ischämie und 24h Reperfusion. Der Anteil calpainpositive Zellen in den mit Calpaininhibitor A-558693 behandelten Tieren war in der ischämischen Hemisphäre 82,1%, in der nicht-ischämischen Hemisphäre 10,5%, mit einer Differenz von 71,6%, +/-4,6%. Bei den Placebotieren war der Anteil calpainpositiver Zellen in den Basalganglien 88,6% in der ischämischen Hemisphäre und in der nicht-ischämischen Hemisphäre 10,6%, mit einer Differenz von 78,1%, +/-3,9%. Aufgrund der großen Schwankung war auch hier der Unterschied nicht signifikant ($p=0,3$).

Es zeigte sich jedoch ein signifikanter Unterschied der calpainpositiven Zellen in der ischämischen Hemisphäre gegenüber der nicht-ischämischen Hemisphäre, sowohl in den Basalganglien als auch im Kortex. Dieser signifikante Unterschied zeigte sich sowohl bei den Calpaininhibitor-tieren, als auch bei den Placebotieren (nicht in Tabelle dargestellt).

4.2.2 MAP-2-Demarkierung

Neben der Calpainfärbung mit Expression von calpainpositiven Zellen lässt sich die Calpainaktivität durch das Calpainsubstrat MAP-2 in der MAP-2-Färbung darstellen. In der MAP-2-Färbung war die MAP-2-Immunreaktivität in dem zerstörten Gewebe nicht nachweisbar (MAP-2-Demarkierung). Ausgewertet wurden Infarkt, Infarktödem, ödemkorrigierter Infarkt, Größe der Hemisphären und der Anteil des Infarkts an der Hemisphäre. In den Punkten Infarkt, ödemkorrigierter Infarkt und Anteil Infarkt an der Hemisphäre wurden Trends zu kleineren Infarkten unter Calpaininhibitor A-558693 als unter Placebo festgestellt.

Der Infarkt war bei den Calpaininhibitortieren mit $24,1 \pm 15,7 \text{mm}^2$ gegenüber Placebotieren mit $37,6 \pm 12,1 \text{mm}^2$ kleiner ($p=0,17$), der ödemkorrigierte Infarkt war bei den Calpaininhibitortieren mit $13,74 \pm 8,9 \text{mm}^2$ gegenüber Placebotieren mit $21 \pm 7,1 \text{mm}^2$ kleiner ($p = 0,19$). Der Infarktanteil an der gesamten Hemisphäre war bei den Calpaininhibitortieren mit $37 \pm 19\%$ gegenüber Placebotieren mit $55 \pm 13\%$ tendenziell kleiner ($p=0,14$). Das Ödem bei den Calpaininhibitortieren war mit $10,3 \pm 10,5 \text{mm}^2$ gegenüber Placebotieren mit $16,7 \pm 5,6 \text{mm}^2$ ($p=0,27$) nur geringfügig kleiner.

		Infarkt [mm ²]	Ödem [mm ²]	Infarkt,ödem- korrigiert [mm ²]	Infarktanteil an Hemisphäre [%]
Calpaininhibitor	Tierzahl	5	5	5	5
	Mittelwert	24,08	10,34	13,74	37,0
	Standardfehler	15,73	10,54	8,92	19,0
Placebo	Tierzahl	5	5	5	5
	Mittelwert	37,62	16,68	20,95	55,0
	Standardfehler	12,13	5,62	7,06	13,0
P (t-test; zweiseitig) Mann-Whitney Test		0,17	0,27	0,19	0,14 0,117

Tabelle 8 zeigt den anhand der MAP-2-Demarkierung berechneten Infarkt, das Ödem, den ödemkorrigierten Infarkt und den Infarktanteil an der gesamten Hemisphäre. Der Infarkt war bei den Calpaininhibitortieren mit $24,1 \pm 15,7 \text{mm}^2$ gegenüber Placebotieren mit $37,6 \pm 12,1 \text{mm}^2$ kleiner ($p=0,17$), der ödemkorrigierte Infarkt war bei den Calpaininhibitortieren mit $13,7 \pm 8,9 \text{mm}^2$ gegenüber den Placebotieren mit $21 \pm 7,1 \text{mm}^2$ kleiner ($p = 0,19$) (siehe Abbildung 10). Der Infarktanteil an der gesamten Hemisphäre war bei den Calpaininhibitortieren mit $37 \pm 19\%$ gegenüber den Placebotieren mit $55 \pm 13\%$ tendenziell kleiner ($p=0,27$). Das Ödem bei den Calpaininhibitortieren war mit $10,3 \pm 10,5 \text{mm}^2$ gegenüber den Placebotieren mit $16,7 \pm 5,6 \text{mm}^2$ ($p=0,27$) nur geringfügig kleiner.

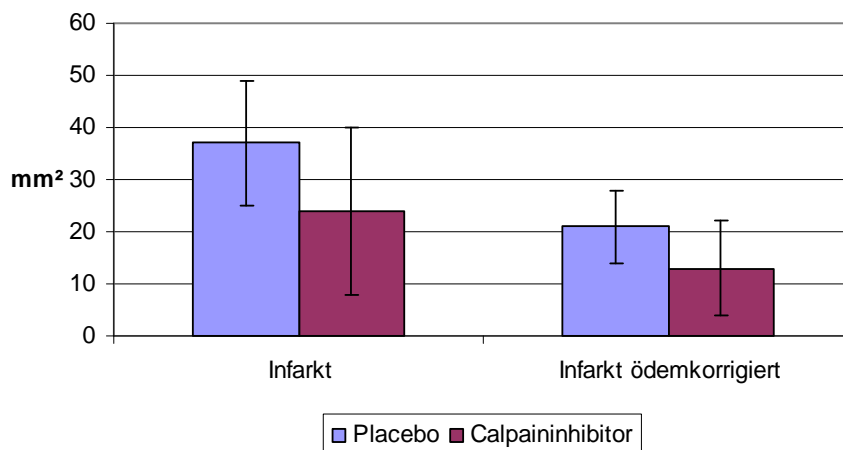


Abbildung 10 zeigt die MAP-2-Demarkierung in entsprechender Koronarebene, 0-1mm hinter Bregma. Der Unterschied zwischen der Calpaininhibitorgruppe und der Placebogruppe war in keinem der Teilaspekte signifikant.

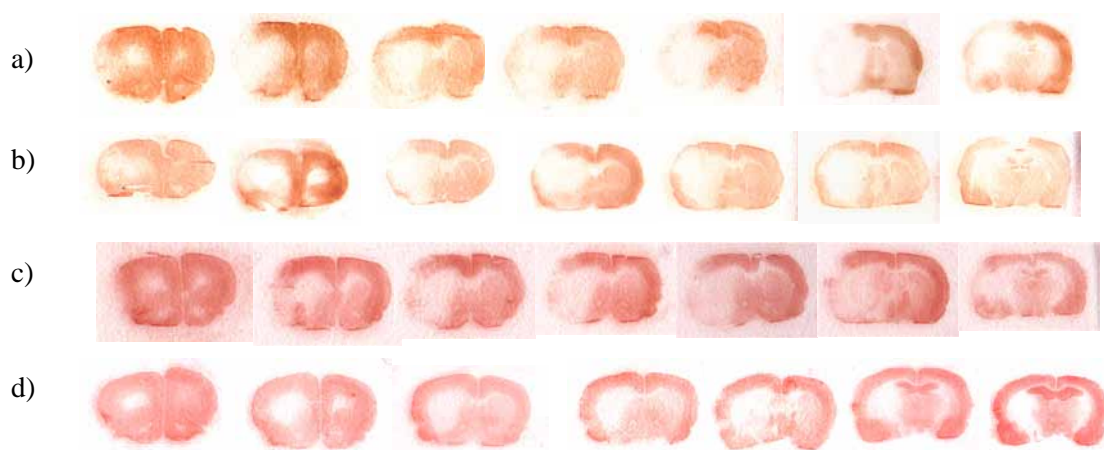


Abbildung 11 zeigt eine MAP-2-Färbung und die MAP-2-Demarkierung im ischämischen Gewebe. Kontrolltiere: a,b. Calpaininhibitor-tiere: c,d. Die Calpaininhibitor-tiere zeigen tendenziell kleinere Infarkte.

4.3 Therapie: Neuroprotektion durch Calpaininhibitor A-558693.

Anhand eines infarktmetrischen Verfahrens wurde die neuroprotektive Wirkung von Calpaininhibitor A-558693 überprüft. Mittels Silberinfarktfärbung (SIS) zeigte das Infarktvolumen bei A-558693-behandelten Tieren einen Trend zu kleineren Infarkten als bei Placebotieren. Der unkorrigierte Infarkt unter Calpaininhibitor war $154 \pm 133 \text{ mm}^3$, der bei den Placebotieren $254 \pm 159 \text{ mm}^3$. Das Ödem unter Calpaininhibitor war $74 \pm 51 \text{ mm}^3$, das Ödem bei den Placebotieren $124 \pm 58 \text{ mm}^3$. Der korrigierte Infarkt unter Calpaininhibitor war $81 \pm 84 \text{ mm}^3$ das der Placebotieren $130 \pm$

102mm³. Wegen großen Standard-Abweichungen waren die Unterschiede zwischen den zwei Gruppen nicht signifikant.

		Infarkt [mm ³]	Ödem [mm ³]	Infarkt,ödem- korrigiert [mm ³]
Calpaininhibitor	Tierzahl	3	3	3
	Mittelwert	154	74	81
	Standardfehler	133	51	84
Placebo	Tierzahl	5	5	5
	Mittelwert	254	124	130
	Standardfehler	159	58	102
P (t-test; zweiseitig)		0,401	0,258	0,518
Mann-Whitney Test		0,180	0,180	0,180

Tabelle 9 zeigt Infarkt, Ödem und ödemkorrigierten Infarkt bei Calpaininhibitor-tieren und Placebotieren. Der Infarkt unter Calpaininhibitor war 154±133 mm³, der bei den Placebotieren 254±159mm³. Das Ödem unter Calpaininhibitor: 74±51mm³, das Ödem bei Placebotieren 124±58mm³. Der ödemkorrigierte Infarkt unter Calpaininhibitor war 81±84 mm³ das der Placebotiere 130±102 mm³. Wegen großen Standardabweichungen waren die Unterschiede zwischen den zwei Gruppen nicht signifikant.

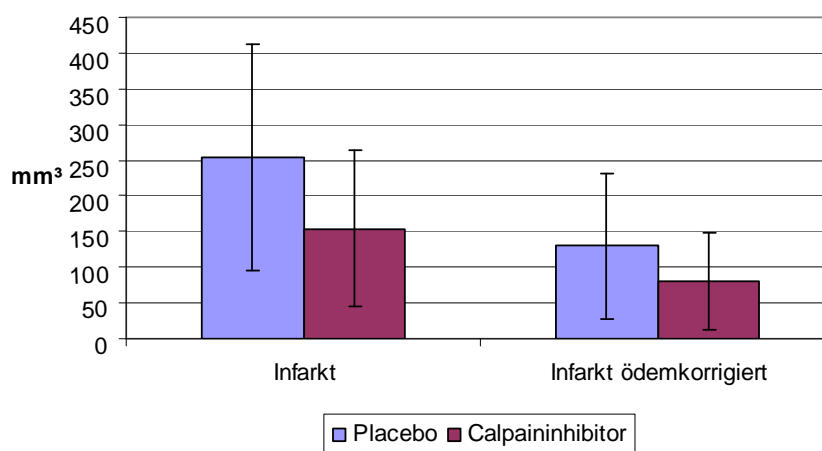


Abbildung 12 zeigt das Infarktvolumen und das ödemkorrigierte Infarktvolumen in mm³ bei Placebotieren und bei Calpaininhibitor-tieren, bei Silberinfarktfärbung. Die volumetrischen Bestimmungen wurden anhand von Kegelschnitten gemacht. Tendenziell waren die Infarkte der Calpaininhibitor-tiere kleiner. Wegen großer Standardabweichung waren die Unterschiede des Infarktvolumens ($p=0,401$) und des ödemkorrigierten Infarktvolumens ($p=0,518$) nicht signifikant.

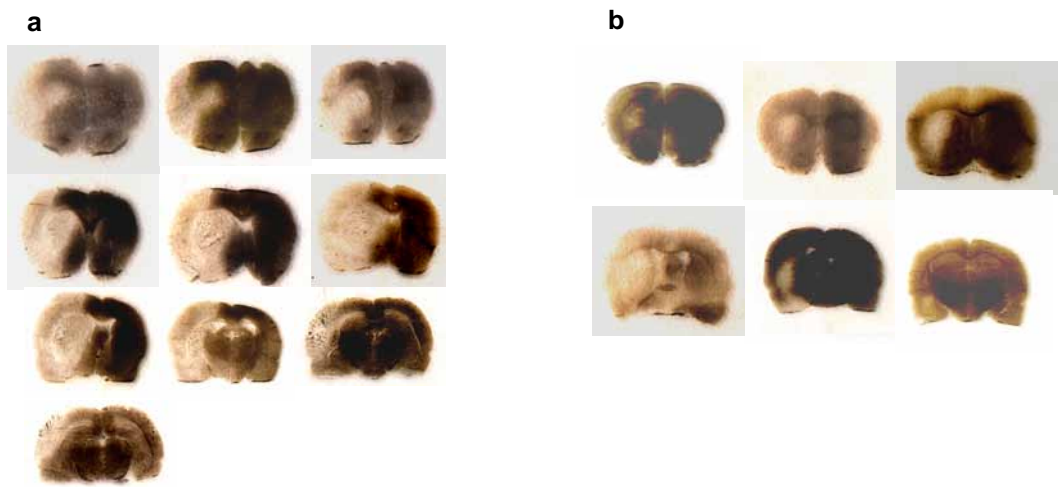


Abbildung 13 zeigt anhand der Silberinfarktgefärbung zehn Schnitte von einem Kontrolltier (a) und sechs Schnitte von einem Calpaininhibitortier (b). Das umschriebene, helle Areal entspricht ischämisches Gewebe. Tendenziell ist das ischämische Areal kleiner bei den Calpaininhibitortieren als bei den Kontrolltieren.

5. Diskussion

5.1. Methode: Der Vergleich von Infarktgrößen durch MAP-2, SIS und MRT.

In dieser Arbeit wurden unterschiedliche Methoden zur volumetrischen Infarktbestimmung verglichen. Alle Methoden wurden nach 3-stündigem Verschluss der Arteria cerebri media und 24-stündiger Reperfusion der Ratte durchgeführt. Die Läsion wurde in aufeinanderfolgenden Gehirnschnitten, durch MAP-2-Demarkierung, Silberinfarktfärbung (SIS) und durch Sequenzen mit T2-gewichteter MRT dargestellt. Für alle Schnitte und Sequenzen konnte das Läsionsvolumen berechnet werden. Alle drei Methoden zeigten ähnliche Läsionsgrößen.

Der zeitliche Ablauf einer Infarktstehung nach Verschluss der Arteria cerebri media mit Reperfusion, ist je nach Spezies, Belastung, Verschlussmethode und der verwendeten Anästhesieart sehr unterschiedlich. Bei Wistarratten hat sich konsequent nach 3-stündigem Verschluss der Arteria cerebri media mit darauffolgender 24-stündiger Reperfusion ein Infarkt entwickelt (Hamann et al.1996, 2002, Pfefferkorn et al.2000, Sievers et al.1994, Schmidt Mayer et al.1994, Liebetrau et al.1999). Deswegen wurde dieses Modell verwendet.

Die etablierten Methoden für eine Infarktdarstellung bei Gehirnschnitten unterscheiden sich in mehreren Hinsichten. Infarktdarstellungen mit konventionellen Methoden wie Hämatoxylin-Eosinfärbung (H&E) oder Toulidinblau zeigen nur einen geringen Kontrast zwischen normalem und geschädigtem Gewebe, vor allem nach kurzer Ischämiedauer. Dieser Kontrast ist geringer als zwischen grauer und weißer Substanz im normalen, nichtischämischen Gehirn. Es ist deswegen schwierig, die Läsion (durch geringere optische Dichte) von der normalen weißen Substanz zu trennen (Swanson et al.1990). Die H&E-Färbung ist jedoch eine häufig verwendete Methode, benötigt aber einen erfahrenen Neuropathologen, um einem frischen Infarkt von anderen Zellen oder Artefakten zu unterscheiden (Osborne et al.1987, Nedergaard et al.1991, Dawson et al.1996). Der geringe Kontrast zwischen der normalen weißen Substanz und dem ischämischen Hirngewebe ist auch ein Problem bei Nitroblautetrazolium (NBT) (Katoaka et al.1989) und 2,3,5-triphenyltetrazoliumhydrochlorid (TTC) (Bartus et al.1995). Die Färbungen mit NBT und TTC funktionieren nur in Anwesenheit von intakten mitochondrialen Enzymen und sind somit abhängig von der Zahl der intakten Mitochondrien. Die geringe Dichte an Mitochondrien in der weißen Substanz führt zu einer blassen Färbung (Borowsky et al.1989) und macht die Differenzierung zwischen

den normalen Strukturen in der weißen Substanz und dem ischämischen Hirngewebe schwierig. Dies gilt vor allem in den ersten Stunden nach Eintritt der Ischämie (Goldlust et al.1996). Ein wesentlicher Nachteil von TTC ist die Tatsache dass die Chemikalien prämortem injiziert werden müssen. Anders als bei kryofixiertem Gewebe, wo das Gewebe gleichzeitig mit verschiedenen Techniken verarbeitet werden kann (Histochemie, Histologie, Molekularbiologie), ist das Gewebe nach TTC-Färbung für spätere histologische Untersuchungen nicht mehr verwendbar. Eine andere Färbung, die Vanadium-Azid-Fuchsin Färbung (VAF) (Victorov et al.2000) färbt azidophile Neurone und stellt infarziertes Gewebe in dicken mit Formaldehyd fixierten Schnitten dar. In dünnen, unfixierten Kryoschnitten kann das Infarktgewebe nicht klar dargestellt werden.

Die von uns verwendete MAP-2-Immunofärbung ist ein sensitiver, quantifizierbarer Indikator für eine fokale Ischämie (Dawson et al.1996). MAP-2 ist Teil des neuronalen, dendritischen Zytoskeletts. Schon nach einer Stunde mit Verschluss der Arteria cerebri media ist eine MAP-2-Demarkierung feststellbar. Ein Nachteil der MAP-2-Färbung ist die Tatsache, dass nur die graue Substanz gefärbt wird und somit die weiße Substanz sich nicht bewerten lässt. Eine komplett automatisierte Darstellung der Demarkierung durch Computer ist somit durch die gesunde, weiße Substanz erschwert. Jedoch zeigt die MAP-2-Färbung mit deutlichem Kontrast die Infarktgrenze.

Die in unsere Arbeit verwendete Silberinfarktfärbung ist als eine sensitive histologische Methode zu Infarktdarstellung bei Ratten beschrieben (Vogel et al.1999) worden. Schon zwei Stunden nach Verschluss der Arteria cerebri media zeigt sich eine geringere optische Dichte in geschädigtem Hirngewebe als in normalem Hirngewebe, sowohl in der grauen als auch in der weißen Substanz. Die Proteolyse der Neurofibrillen (Fäserchen im Zytoplasma der Nervenzellen und ihrer Fortsätze), die durch das Silber gefärbt werden, setzt wenige Minuten nach Eintritt der Ischämie ein (Yao et al.1995). Es ist nicht geklärt, welche Strukturen genau durch das Silber gefärbt werden; es könnten eine oder mehrere Formen von Neuroglia sein, Perikaryen oder deren Axone und Dendriten oder Blutgefäße. Da sowohl die weiße Substanz als auch die graue Substanz sich bis zum Eintritt der Ischämie optisch dicht darstellen, um danach blass zu erscheinen, könnte es sich um Axone handeln. Die SIS ist eine besonders einfache, schnelle und preiswerte Methode. Die Farbintensität innerhalb und zwischen den Schnitten variiert jedoch stark. Trotzdem ermöglicht SIS durch das

Abblassen des ischämischen Gewebes eine deutliche Trennung gegenüber dem umgebenden Gewebe. Es zeigt sich eine hoch kontrastierte und leicht feststellbare Infarktdemarkierung.

Die Magnetresonanztomographie (MRT) ermöglicht eine in vivo Darstellung von zerebralen Infarkten bei Ratten. Diese Technik ist sehr zuverlässig, allerdings auch sehr teuer und aufwendig. Für die vorliegende Arbeit hatten wir die Möglichkeit, Bilder von Rattenhirnen mit einem 1,5 T MR-Gerät anzufertigen, welches routinemäßig für Menschen verwendet wird. Für die Infarktberechnung ließen sich Bilder mit ausreichender Auflösung anfertigen. Diffusionsgewichtete Sequenzen zeigen frühzeitig eine Signalintensität im MRT und ermöglichen so eine Aussage über spätere T2-Abnormalitäten und Infarkte (Barone et al. 1991, Mintorovitch et al.1991, Johnson et al.1993, Knight et al.1994, Zarow et al.1995, Hall et al.1996). Jedoch haben diffusionsgewichtete Sequenzen eine schwächere Auflösung in allen drei Dimensionen. Nach dreistündigem Verschluss der Arteria cerebri media, gefolgt von 24 Stunden Reperfusion waren alle Infarkte deutlich feststellbar und mit einer viel besseren Auflösung in T2-gewichteten Scans. Ferner zeigte sich eine hohe Korrelation zwischen Läsionen in T2-MRT, postmortem Histologie und MAP-2-Demarkierung (Barone et al.1991, Sevick et al.1990, Ishii et al.1998).

Früher wurde die planimetrische Bestimmung von Läsionsgrößen durch verschiedene Methoden bestimmt: Fotografieren von Gehirnschnitten, Gittersystemen oder Wiegen von Läsionsorten, die von Diagrammen eines repräsentativen Schnitts genommen wurde (Osborne et al.1987). Heute lassen sich aber MRT-Scans leicht mittels Bilderverarbeitungsprogrammen verarbeiten. Die Größe von einem unregelmäßig begrenzten Areal lässt sich routinemäßig bestimmen.

In den meisten Studien wurde das partielle Infarktvolumen zwischen zwei auf ein anderfolgenden Schnitten bestimmt, indem der arithmetische Durchschnitt der beiden Läsionsgrößen mit dem Abstand zwischen den Schnitten multipliziert wurde (Rosen et al.1990, Swanson et al.1994). Jedoch gibt es kein dreidimensionales, geometrisches Modell, bei dem diese Formel hergenommen werden kann. Wir haben die Formel eines Kegelschnitts verwendet, um das partielle Läsionsvolumen zu berechnen. Während des Schneidens des Gehirns haben wir den Abstand zwischen den Schnitten dokumentiert. Somit war es nicht nötig, Schnitte an vordefinierten, von einander gleich weit entfernten Ebenen zu verwenden. Hingegen liegen vordefinierte Ebenen standardisiert im Rattenhirn vor. Bei dieser Methode wird das Ödem und die

Variationen unter den Tieren vernachlässigt und somit das Volumen weniger genau bestimmt. Unsere Methode macht es möglich, bei kleineren Infarkten, später mehrere Schnitte hinzuzufügen, um eine ausreichende Anzahl für die Auswertung der Infarktgröße zu haben. Laut Osborne und Mitarbeiter (1987) sind acht Schnitte ausreichend, um eine genaue Läsionsgröße bestimmen zu können.

Alle unsere Methoden für die Infarktdarstellung zeigen sehr ähnliche Infarktgrößen bei allen Tieren. Das Färbungsmuster bei den zwei postmortem Methoden, MAP-2 und SIS, wurden durch MRT-Volumetrie bestätigt, obwohl das mit der MRT gemessene Volumen tendenziell größer war als das mit postmortem Methoden gemessene Volumen. Overgaard und Mitarbeiter (2000) haben gezeigt, dass eine postmortem Fixation eine deutliche Beeinflussung auf die Infarktgröße bei Ratten hat. Durch das sofortige Einfrieren der unfixierten Gehirne haben wir eine Fixation durch Perfusion oder Eintauchen vermieden und somit eine solche Beeinflussung verhindert. Jedoch ist es während des Schneidens vom Rattengehirn schwer am Kryostat die exakte Schnittdicke einzustellen. Wenn es um die Beurteilung von bestimmten Interventionen einer Infarktgröße geht, hat ein kleiner, systematischer Fehler bei der Volumenberechnung keine Bedeutung, solange die gleiche Methode verwendet wird.

Insgesamt lassen sich Infarktvolumina also durch verschiedene einfache und etablierte Methoden messen. Sowohl SIS als auch MAP-2-Färbungen sind zuverlässige Methoden, um einen Infarkt nach dreistündiger Ischämie und 24-stündiger Reperfusion darzustellen. Jedoch zeigt, bei kürzerer Ischämiedauer ab 3-5 Minuten nach Verschluss der Arteria cerebri media, nur die MAP-2 eine Demarkierung (Vanicky et al.1995) und die MAP-2-Färbung ist beständiger als SIS. Deswegen empfehlen wir die MAP-2 Immunhistochemie als Routineverfahren für volumetrische Bestimmungen. Ein großer Vorteil der Methode, ist die Möglichkeit, 98% der Gehirnschnitte für weitere histologische, immunohistochemische und biochemische Experimente verwenden zu können und somit die Zahl der Tiere zu reduzieren.

5.2. Diagnostik: Calpainaktivierung

Im zweiten Teil dieser Arbeit konnte eine Zunahme der Calpainexpression bei einem gleichzeitigen Verlust an Calpainsubstrat MAP-2 nach drei Stunden Ischämie und 24 Stunden Reperfusion gezeigt werden. Bisher hat keine Arbeit immunhistochemisch eine zunehmende Calpainexpression mit anschließendem Verlust an Calpainsubstrat MAP-2 nach zerebraler Ischämie zeigen können.

Die zunehmende Calpainexpression im ischämischen Gebiet geht einher mit dem Abbau von Calpainsubstrat MAP-2 sowohl in der Placebogruppe als auch in der mit Calpaininhibitor behandelten Gruppe. Die calpainpositiven Zellen wurden zum größten Teil in den Basalganglien, aber auch im Kortex der ischämischen Seite gesehen. Diese Verteilung der μ -Calpain-Expression gleicht der zeitabhängigen Zunahme der m-Calpain-Expression (Liebetrau et al.1999) und μ -Calpain-Expre (Liebetrau et al.2004) bei fokaler, zerebraler Ischämie der Ratte Unser Ergebnis widerspricht jedoch dem Ergebnis dieser Studie, wo mehr calpainpositive Zellen im Kortex als in den Basalganglien gefunden werden konnten. Diese unterschiedliche Calpainexpression ist unklar und erfordert weitere experimentelle Arbeiten.

Unsere Ergebnisse deuten darauf hin, dass auch μ -Calpain neben m-Calpain eine wichtige Rolle bei der sekundären Schädigung nach fokaler, zerebraler Ischämie spielt. Es ist bekannt, dass ein verlängerter calpaininduzierter Abbau von verschiedenen Substraten nach experimenteller, traumatischer Hirnschädigung oder nach fokaler, zerebraler Ischämie in Ratten auftritt (Bartus et al.1995, Pettigrew et al.1996). Die Ergebnisse dieser Arbeit stimmen mit dieser Studie überein. Jedoch hat keine Studie belegt, dass die Zunahme der Calpainexpression mit einer anschließenden Abnahme von Calpainsubstraten im Gehirn nach Ischämie und Reperfusion korreliert. Inzuka und Mitarbeiter (1990) haben eine MAP-2-Reduktion nicht nur in der ipsilateralen Hemisphäre, sondern auch in der kontralateralen Hemisphäre bei fokaler, zerebraler Ischämie festgestellt. Dieses Phänomen könnte durch eine humorale Calpainaktivierung verursacht sein, dessen Aktivierungsmechanismus immer noch ungeklärt ist. Ein solcher Aktivierungsmechanismus könnte die erhöhte Calpainaktivität in der kontralateralen Hemisphäre in dieser Studie erklären. Ein zytoskelettaler Abbau von Proteinen allein beweist nicht einen direkten Zusammenhang mit Calpainaktivität bei neuronaler Schädigung. Der zytoskelettale Abbau von Proteinen kann auch durch andere Proteasen zustande kommen. Unsere Arbeit bestätigt, dass Calpaine beim Abbau vom intrazellulären Matrix bei fokaler, zerebraler Ischämie beteiligt sind.

5.3 Therapie: Neuroprotektion durch Calpaininhibitor A-558693

Der Calpaininhibitor A-558693 hatte keinen signifikanten Effekt auf die Infarktgröße oder auf die Reduktion von calpainpositiven Zellen bei intravenöser Gabe 150 Minuten nach Einleitung der dreistündigen Ischämie und anschließende 24-stündige Reperfusion. Jedoch schien der Calpaininhibitor A-558693 tendenziell das Infarktvolumen zu verkleinern, die Zahl calpainpositiver Zellen zu reduzieren und die MAP-2-Demarkierung zu verbessern.

Diese Ergebnisse entsprechen nicht den Ergebnissen mehrerer anderer Studien, die eine Reduktion der Infarktgröße durch Calpaininhibitoren zeigen konnten. Bei Gabe von Calpaininhibitor MDL28170 (30-60mg/kg i.v.) 30 Minuten vor Gefäßokklusion zeigten die Ratten ein signifikant kleineres zerebrales Infarktvolumen (Hong et al.1994). Calpaininhibitor 1 reduziert den neuronalen Schaden in der Hippocampus-Region CA-1 bei globaler Ischämie (Rami et al. 1993). Laut Bartus und Mitarbeiter (1994a, 1994b) kann die Gabe von Calpaininhibitor AK 275 und die intraarterielle Gabe von AK 295 sogar mehrere Stunden nach Verschluss, eine Reduktion des Infarktvolumens von 75% bzw 30% bewirken. Markgraf und Mitarbeiter (1998) haben für die Calpaininhibitorgabe bei fokaler zerebraler Ischämie der Ratte, ein Zeitfenster von 6 Stunden definiert. Innerhalb dieses Zeitraums zeigte der Calpaininhibitor MDL28170 eine ausreichende Reduktion des Infarktvolumens.

Alle diese Studien haben das Infarktvolumen mit der TTC-Methode gemessen. Diese makroskopische Methode erlaubt keine Aussage über Zellschäden auf der mikroskopischen Ebene. Unsere Ergebnisse beruhen im Gegensatz dazu auf einer detaillierteren histologischen Analyse des postischämischen Schadens. Wir haben das Infarktvolumen durch Silberfärbung und durch den Abbau von Calpainsubstrat MAP-2 bestimmen können. Zusätzlich konnten wir eine quantitative Analyse der calpainpositiven Zellen in der ischämischen Hemisphäre durchführen.

Trotz dieser verschiedenen Methoden, eine zerebrale Schädigung zu identifizieren, konnten wir keinen begünstigenden Effekt des Calpaininhibitors zeigen.

Die vorliegenden Daten weisen darauf hin, dass calpaininduzierte Proteolyse eine große Bedeutung bei fokaler zerebraler Ischämie hat. Unser Modell kann zur quantitativen Analyse von verschiedenen Calpaininhibitoren und deren neuroprotektiven Wirkung verwendet werden.

Es mag mehrere Gründe geben, warum keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Infarktgrößen der beiden Gruppen gefunden werden konnten.

Es ist möglich, dass Calpaininhibitor A-558693 keine Wirkung bei der zerebralen Ischämie nach der langen Zeitdauer von drei Stunden Ischämie und 24 Stunden Reperfusion hat. In den bisherigen Studien wurde der Inhibitor kurz vor oder nach Einleitung der Ischämie verabreicht. Hingegen konnte in einer Studie eine signifikante Reduktion der Infarktgröße sogar sechs Stunden nach der Ischämie, durch den Calpaininhibitor MDL28170 gezeigt werden (Markgraf et al. 1998). Die Verfasser dieser Studie hatten ein ähnliches Modell für die fokale, zerebrale Ischämie mit 3 Stunden Ischämie und 21 Stunden Reperfusion hergenommen.

In unserer Arbeit erfolgte die Calpaininhibitorgabe 150 Minuten nach Einleitung der Ischämie. Dies kommt den Gegebenheiten der Realität beim Menschen möglichst nahe. Eine Verabreichung unmittelbar vor oder nach Einleitung der Ischämie könnte effektiver sein, wäre klinisch aber nicht relevant.

Das Zeitfenster für Calpaininhibitor A-558693 ist möglicherweise kürzer als in unseren Versuchen verwendet; zum Beispiel 30 Minuten, 60 Minuten und 90 Minuten nach Einleitung der Ischämie. Im Hinblick darauf können die Methoden unserer Arbeit wie die gewebesparende Infarkt volumetrie, die Darstellung eines Calpainsubstratabbaus und die Zunahme der Calpainexpression in weiteren Experimenten zum Einsatz kommen. Wir haben für die Infarktgrößenbestimmung mehrere Schnitte pro Tier verwendet und volumetrisch ausgewertet. Weiter wäre eine doppelte Färbetechnik mit Calpainantikörper und Antikörpern gegen die Abbauprodukte sinnvoll. Mit einer solchen Technik wäre es möglich, sowohl den Zusammenhang zwischen Calpain und dessen Abbauprodukten, als auch den zeitlichen Ablauf von Calpainzunahme und Abbau des gesuchten Substrats zu erläutern.

Ausserdem ist der Calpaininhibitor A-558693 ein hochpotenter und calpainspezifischer Inhibitor. Im Gegensatz dazu haben ältere Inhibitoren ein breiteres Spektrum und inhibieren auch weitere Proteasen, wie Kathepsin. Es ist möglich dass eine Hemmung von Calpain nicht ausreicht, um die Zunahme der Infarktgröße zu verhindern. Die spezifische Calpaininhibition könnte eine wichtige Rolle bei anderen zerebralen Erkrankungen spielen, wie Schädel-Hirntrauma. Lubisch und seiner Arbeitsgruppe haben einen neuen nicht-peptidischen Calpaininhibitor und seine Derivate im Rattenmodell des experimentellen Schädel-Hirntraumas untersucht. Der Inhibitor zeigt eine potente Wasserlöslichkeit und vor allem eine orale Bioverfügbarkeit. Der Inhibitor reduziert den neuronalen Zelltod um 41% und zeigt eine signifikante

neuroprotektive Wirkung, sogar bei Verabreichung unmittelbar nach Induktion eines Traumas (Lubisch et al.2003).

Eine weitere Ursache für die große Spannweite der Infarktgröße sowohl in der Placebogruppe als auch in der Calpaininhibitorgruppe ist könnte im Tiermodell liegen. Das Tiermodell und eine intraoperative Kontrolle der Ischämietiefe durch Laser-Doppler Fluxmetrie ist eine standardisierte Methode in unserem Labor und Teil früherer Arbeiten (Sporer, Martens et al.1997), welche sich gleichfalls mit der transitorischen fokalen zerebralen Ischämie der Ratte beschäftigt haben. Es wurde immer eine modifizierten Methode der intraluminalen Gefäßokklusion nach Longa und Mitarbeiter (1989) verwendet. Da sich der Abfall der Durchflutung in der ischämischen Region in den verschiedenen früheren Versuchen als konstant erwiesen hat, wurde in unserer Arbeit auf die Laser-Doppler Fluxmetrie verzichtet. Es könnte jedoch sein, dass eine intraoperative Kontrolle der Ischämietiefe in der aktuellen Arbeit trotzdem sinnvoll gewesen wäre.

Da die interindividuellen Unterschiede in den Infarktgrößen in beiden Gruppen sehr hoch sind, wäre eine Erhöhung der Tierzahl aufgrund der großen Streuung wünschenswert gewesen. Dies konnte jedoch aufgrund der eingeschränkten Verfügbarkeit des Calpaininhibitors vom industriellen Partner nicht durchgeführt werden. Es handelt sich somit hier um eine Pilotstudie, die aufgrund von Lieferproblemen bei der Inhibitorherstellung nicht in weiterführende Untersuchungen Eingang fand.

Die Dosierung des Calpaininhibitors A-558693 (initial 10mg/kg Körpergewicht) ist niedriger als die Dosierung anderer Calpaininhibitoren in anderen Studien. Da der Calpaininhibitor A-558693 ein neuer Calpaininhibitor ist, halten wir ein direkter Vergleich mit Inhibitoren anderer Studien nicht für möglich. Die Dosierung erfolgte nach den in-vitro Daten der Fa.Knoll. Wir sehen die Dosierung des Calpaininhibitors A-558693 nicht als ausschlaggebend für die fehlende statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Infarktgrößen der beiden Gruppen.

6. Zusammenfassung

Schlaganfälle sind die dritthäufigste Todesursache und die führende Ursache dauernder Invalidität in den westlichen Industrienationen. Neben den fast ausschließlich allgemeinen Therapiemöglichkeiten eines Schlaganfalls haben sich in den letzten Jahren zwei verschiedene Ansätze in der Akuttherapie herauskristallisiert. Zum einen gibt es den neurovaskulären Ansatz im Sinne einer Wiederherstellung der Durchblutung des betroffenen Gebietes durch z.B. systemische Thrombolyse. Zum anderen gibt es einen neuroprotektiven Ansatz im Sinne einer Protektion des neuronalen und glialen Gewebes. Letztere hat allerdings bislang nicht den Weg in die Klinik gefunden.

Ischämische Infarkte können eine Progredienz aufweisen, die durch Mechanismen wie eine Aktivierung von neutralen Zysteinproteasen (z.B. Calpaine) verursacht werden könnten. Nach ischämischem Hirnschaden kommt es zu einer Störung der Kalziumhomöostase und zu einer Zunahme der intrazellulären Kalziumkonzentration, wodurch die proteolytische Aktivität des μ -Calpains zunimmt. Aktiviertes Calpain greift an vielen Substraten an, unter anderem an zytoskelettalen Proteinen wie Mikrotubulin-assoziiertem Protein 2 (MAP-2).

Eine pharmakologische Hemmung von Calpain könnte zu einer signifikanten Reduktion der Infarktgröße nach fokaler, zerebraler Ischämie führen.

Diese Arbeit basiert sich auf das Modell der transienten fokalen zerebralen Ischämie der Ratte. Die transiente fokale zerebrale Ischämie wurde bei männlichen Wistarratten am Fadenmodell durch eine intraluminale Gefäßokklusion der Arteria cerebri media verursacht. Alle Tiere unterlagen einer dreistündigen Ischämie und einer anschließenden Reperfusion über 24 Stunden.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden verschiedene Methoden verglichen, die für eine volumetrische Infarktbestimmung interessant sind: die immunhistochemische MAP-2-Färbung, die Silberinfarktfärbung (SIS) und die T2-gewichtete Magnetresonanztomographie (MRT). Zusätzlich wurde ein gewebesparendes, infarktvolumetrisches Verfahren entwickelt.

Für den ersten Teil der Arbeit, den Methodenvergleich, wurde die Läsion bei drei Tieren direkt nach der Reperfusion durch MRT dargestellt, um später bei der MAP-2 Färbung und der Silberinfarktfärbung (SIS) verwendet zu werden. Der Vergleich zwischen MAP-2 Demarkierung, SIS und der T2-gewichteten MRT zeigte, dass die

Areale des zerstörten Gewebe in den drei unabhängigen Methoden, sich überlappen, jedoch die MRT leicht größere Areale zeigte. Die MAP-2-Immunoreaktivität war in dem zerstörten Gewebe reduziert (MAP-2-Demarkierung), die SIS zeigte auch einen Verlust an Farbintensität in dem zerstörten Gewebe und die Läsion zeigte sich hyperintens in der T2-gewichteten MRT.

Im zweiten Teil dieser Arbeit konnte die Calpainaktivierung dargestellt werden: Zum einen durch die immunohistochemische Expression von μ -Calpain in der Calpainfärbung und zum anderen durch den Abbau des Calpainsubstrats MAP-2 in der MAP-2-Färbung.

Im dritten Teil dieser Arbeit haben wir die neuroprotektive Wirkung von Calpaininhibitor A-558693, einem neuen Piperidine-Karboxamid Abkömmling, bei systemischer Gabe 150 Minuten nach Eintritt der Ischämie anhand Infarktvolumetrie überprüft.

Für den zweiten und dritten Teil der Arbeit, die immunhistochemische Darstellung von Calpainen und dem Calpainsubstrat MAP-2 und die Wirkung von Calpaininhibitor A-558693 gab es zwei Versuchsgruppen. Fünf Tiere wurden mit Placebo behandelt und sechs Tiere bekamen Calpaininhibitor A-558693. Das Gewebe wurde mit einem Kryostat in 10 μ m koronaren Schnitten geschnitten. Die μ -Calpainpositiven Zellen wurden immunhistochemisch, mittels eines polyklonalen Kaninchen μ -Calpain-Antikörper, kombiniert mit der Peroxidasentechnik, in der ischämischen und nicht-ischämischen Hemisphäre dargestellt.

Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied der calpainpositiven Zellen in der ischämischen Hemisphäre gegenüber der nicht-ischämischen Hemisphäre, sowohl in den Basalganglien als auch im Kortex. Dieser signifikante Unterschied zeigte sich sowohl bei den Calpaininhibitortieren, als auch bei den Kontrolltieren.

Die immunhistochemische μ -Calpainfärbung zeigte eine Reduktion der calpainpositiven Zellen zwischen ischämischen Basalganglien der mit A-558693 behandelten Tieren zu jenen der mit Placebo behandelten Tieren, die aber nicht signifikant war. RISC (relative intensity of staining coefficient) war in den Basalganglien 0,22 +/- 0,09 bei den mit Calpaininhibitor behandelten Tieren und 0,34 +/- 0,10 bei den Kontrolltieren ($p=0,06$, n.s).

Die kortikalen Regionen zeigten weniger calpainpositive Zellen nach Gabe des Calpain-inhibitors A-558693. Die Differenz aus dem Anteil calpainpositiver Zellen im ischämischen und nicht-ischämischen Kortex, bei den mit A-558693 behandelten

Tieren war 29,8% +/-13,8%, bei den Kontrolltieren 50,1% +/-18,1%. Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen war auch hier ($p=0,3$) nicht signifikant.

Der Verlust an Calpainsubstrat MAP-2 wurde durch monoklonale Maus-Antikörper gegen MAP-2 als MAP-2-Demarkierung im zerstörten Gewebe dargestellt. Es konnten Trends zu kleineren Infarkten unter den Calpaininhibitor A-558693 gezeigt werden. (Infarkt bei Inhibitortieren: 24,1 +/- 15,7mm², Infarkt bei Kontrolltieren 37,6 +/- 12,1mm² ($p=0,17$), Infarktanteile an der gesamten Hemisphäre bei Inhibitortieren: 39 +/- 19%, bei Kontrolltieren 55 +/- 13% ($p=0,27$).

Im dritten Teil der Arbeit konnte anhand von immunhistochemischer Infarktvolumetrie ein Trend zu kleineren Infarkten unter Calpaininhibitor A-558693 als bei Kontrolltieren gezeigt werden. Der unkorrigierte Infarkt unter Calpaininhibitor war 154 +/- 133mm³, der bei den Kontrolltieren 254 +/- 159mm³, das Ödem unter Calpaininhibitor 74 +/- 51mm³, das Ödem der Kontrolltieren 124 +/- 58mm³. Wegen der großen Standardabweichungen waren die Unterschiede zwischen den zwei Gruppen nicht signifikant.

Die vorliegende Arbeit zeigt eine hohe Korrelation zwischen Läsionen in T2-MRT, postmortem Histologie und MAP-2-Demarkierung. Die MAP-2-Volumetrie ist eine preiswerte, einfache und zuverlässige Alternative zur MRT, welche 98% der Gehirnschnitte für weitere Experimente zulässt und somit eine Reduktion an Forschungstieren ermöglicht.

Die vorliegende Arbeit zeigt dass der Calpaininhibitor A-558693 keine signifikante Wirkung auf die Infarktgröße oder die Reduktion calpainpositiver Zellen nach dreistündiger Ischämie und 24-stündiger Reperfusion hat, obwohl der Calpaininhibitor A-558693 tendenziell das Infarktvolumen zu verkleinern, die Zahl calpainpositiver Zellen zu reduzieren und die MAP-2-Färbung zu verbessern scheint.

7. Literaturverzeichnis

Alexa, A., Tompa, P., Baki, A., Vereb, G. and Friedrich, P. (1996) Mutual protection of microtubule-associated protein 2 (MAP2) and cyclic AMP-dependent protein kinase II against μ -calpain. *J Neurosci Res.* 44: 438-445

Alexa, A., Bozoky, Z., Farkas, A., Tompa, P., Friedrich, P. (2004) Contribution of distinct structural elements to activation of calpain by Ca^{2+} ions. *J.Biol.Chem.* 279:2018-26

Ankarcrona, M., Dybukt, J.M., Bonfoco, E., Zhivotovsky, B., Orrenius, S., Lipton, S.A., Nicotera, P. (1995) Glutamate-induced neuronal death: A succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron* 15: 961-973

Arai, A., Vanderlish, P., Kseeler, M., Lee, K., Lynch, L. (1991) A brief period of hypoxia causes proteolysis of cytoskeletal proteins in hippocampal slices. *Brain Res.* 555: 276-280

Arlinghaus, L., Mehdi, S., Lee, K.S. (1991) Improved posthypoxic recovery with a membrane-permeable calpain inhibitor. *Eur. J. Pharmacol.* 209: 123-125

Arthur, J.S., Crawford, C. (1996) Investigation of the interaction of m-calpain with phospholipids: calpain-phospholipid interaction. *Biochim.Biophys.Acta.*1293: 201-206

Avendano, C., Roda, J.M., Carceller, F., Diez-Tejedor, E. (1995) Morphometric study of focal cerebral ischemia in rats: a stereological evaluation. *Brain Res.* 673: 83-92

Azuma, M., Shearer, T.R. (1992) Involvement of calpain in diamid-induced cataract in cultered lenses. *FEBSLett.* 307: 313-317

Bano, D., Young, KW., Guerin, CJ., Lefevre, R., Rothwell, NJ., Naldini, L., Rizzuto, R., Carafoli, E., Nicotera, P. (2005) Cleavage of the plasma membrane $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ exchanger in excitotoxicity. *Cell* 120: 275-85

Barnoy, S., Zipser, Y., Glaser, T., Grimber, Y., Kosower, N.S. (1999) Association of calpain (Ca²⁺)-dependent thiol protease) with its endogenous inhibitor calpastatin in myoblasts. *J.Cell Biochem.* 74:522-531

Barone, F.C., Clark, R.K., Feuerstein, G., Lenkinski, R.E. and Sarkar, S.K. (1991) Quantitative comparison of magnetic resonance imaging (MRI) and histologic analyses of focal ischemic damage in the rat. *Brain Res.Bull.*, 26: 285-291

Bartus, R. T. (1990) Drugs to treat age-related neurodegenerative problems. The final frontier of medical science? *J. Am.Geriatr. Soc.* 38, 680-695

-
- Bartus, R.T., Baker, K.L., Heiser, A.D., Sawyer, S.D., Dean, R.L., Elliott, P.J., Straub, J.A.** (1994a) Postischemic Administration of AK275, a calpain inhibitor, provides substantial protection against focal ischemic brain damage. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 14: 537-544
- 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., Powers, J.** (1994b) Calpain inhibitor AK295 protects neurons from focal brain ischemia: Effects of postocclusion intra arterial administration. *Stroke* 25: 2265-2270
- Bartus, R. T., Dean, R. L., Cavanaugh, K., Eveleth, D., Carriero, D. L. and Lynch, G.** (1995a) Time-related neuronal changes following middle cerebral artery occlusion: implications for therapeutic intervention and the role of calpain. *J.Cereb. Blood Flow Metab.* 15: 969-979
- Bartus, R. T., Elliott, P. J., Hayward, N. J., Dean, R. L., Harbeson, S., Straub, J. A., Li, Z. and Powers, J. C.**(1995b) Calpain as a novel target for treating acute neurodegenerative disorders. *Neurol Res.* 17: 249-258
- Beckerle, M.C., Burridge, K., Demartino, G.N., Croall, D.E.** (1987) Colocalization of calcium-dependent protease Ii and one of its substrates at sites of cell adhesion. *Cell* 51: 569-577
- Bernhardt, R., Matus, A.** (1984) Light and electron microscopic studies of the distribution of MAP-2 in rat brain. A difference between dendritic and axonal cytoskeletons. *J. Comp. Neurol.* 226: 203-221
- Borowsky, I.W., Collins, R.C.** (1989) Metabolic anatomy of brain: a comparison of regional capillary density, glucose metabolism, and enzyme activities. *J. Comp.Neurol.* 288: 401-413
- Branca, D.**(2004) Calpain-related diseases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 322 : 1098-104
- Brugg, B., Matus, A.** (1991) Phosphorylation determines the binding of microtubule-associated protein 2 (MAP-2) to microtubules in living cells. *J. Cell. Biol.* 114: 735-743
- Bryan-RM, J., Cherian, L. and Robertson, C.** (1995) Regional cerebral blood flow after controlled cortical impact injury in rats. *Anesth. Analg.* 80: 687-695
- Buddle, M., Eberhardt, E., Ciminello, L.H., Levin, T., Wing, T., DiPasquale, K., Raley-Susman, K.M** (2003) Microtubule-associated protein 2 (MAP2) associates with the NMDA receptor and is spatially redistributed within rat hippocampal neurons after oxygen-glucose deprivation. *Brain Res.*18:978:38-50
- Busch, W.A., Stomer, M.H., Goll, D.E., Suzuki, A.** (1972) Calcium specific removal of z-lines from rabbit skeletal muscle. *J. Cell. Biol.* 52: 367-381

-
- Carragher, N.O., Fonseca, B.D., Frame, M.C.** (2004) Calpain activity is generally elevated during transformation but has oncogene-specific biological function. *Neoplasia* 6:53-73
- Cheung, J.Y., Bonventre, J.V., Malis, C.D., Leaf, A.** (1986) Calcium and ischemic injury. *N Engl. J. Med.* 314: 1670- 1676
- Choi, D. W.** (1988) Calcium-mediated neurotoxicity: relationship to specific channel types and role in ischemic damage. *Trends Neurosci.* 11, 465-469
- Choi, D. W.** (1988) Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* 1: 623-634
- Choi, D.W.** (1996) *Current Opinion Neurobiol.* 6: 667-672
- Chopp, M., Li, Y.** (1996) Apoptosis in focal cerebral ischemia. *Acta Neurochir. Suppl. (Wien)* 66: 21-26
- Claudio, E., Segade, F., Wrobel, K., Ramos, S., Bravo, R. and Lazo, P. S.** (1996) Molecular mechanisms of TNF α cytotoxicity: activation of NF-kappaB and nuclear translocation. *Exp. Cell Res.* 224: 63-71
- Coolican, S.A., Haiech, J., and Hathaway, D.R.** (1986) The role of subunit autolysis in activation of smooth muscle Ca²⁺-dependent proteases. *J.Biol.Chem.* 261: 4170- 4176
- Croall, D. E., DeMartino, G. N.** (1991) Calcium-activated neutral protease (calpain) system: structure, function, and regulation. *Physiol. Rev.* 71: 813-847
- Croall, D.E., Demartino,G.N.** (1984) Comparison of Ca²⁺-dependent proteinases from bovine heart. *Biochim. Biophys. Acta* 788: 348-355
- Czogalla, A., Sikorski, A.F.** (2005) Spectrin and calpain: a target and a sniper in the pathology of neuronal cell. *Cell Mol.Life Sci.* 62:1913-24
- Dawson, D.A. and Hallenbeck, J.M.** (1996) Acute focal ischemia-induced alterations in MAP2 immunostaining: description of temporal changes and utilization as a marker for volumetric assessment of acute brain injury. *J.Cereb.Blood Flow Metab.* 16: 170-174
- Dear, T.N., Meier, N.T., Hunn, M., Boehm, T.** (2000) Gene structure, chromosomal localization, and expression pattern of capn12, a new member of the calpain large subunit gene family. *Genomics* 68: 152-160
- del Zoppo, GJ.** (1994) Microvascular changes during cerebral ischemia and reperfusion. *Cerebrovasc. Brain Metab. Rev.* 6:47-96

-
- del Zoppo GJ.** (1997) Microvascular responses to cerebral ischemia/inflammation. *Ann. N Y Acad. Sci.* 823:132-147
- Demartino, G.N., Huff, C.A., Croall, D.E.** (1986) Autoproteolysis of the small subunit of calcium-dependent protease II activates and regulates protease activity. *J. Biol. Chem.* 26: 12047- 12052
- Dietrich, W.D.** (1998) Neurobiology of stroke. *Int. Rev. Neurobiol* 42:55-101
- Dirnagl, U., Iadecola, C., Moskowitz, M.A.** (1999) Pathobiology of ischemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci.* 22:391-397
- Duncan, R.R., Shipston, M.J., Chow, R.H.** (2000) Double C2 protein. A review. *Biochemie.* 82: 421-426
- Elce, J. S., Hegadorn, C. and Arthur, J. C.** (1997) Autolysis, Ca²⁺ requirement, and heterodimer stability in m-calpain. *J. Biol. Chem.* 272: 11268-11275
- Franco, S.J., Huttenlocher, A.** (2005) Regulating cell migration: calpains make the cut. *J. Cell Sci.* 118: 3829-38
- Friedrich, P.** (2004) The intriguing Ca²⁺ requirement of Calpain activation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 323: 1131-1133
- Fryer, H.J., Knox, R.J., Strittmatter, S.M, Kalb, R.G.** (1999) Excitotoxic death of a subset of embryonic rat motor neurons in vitro. *J. Neurochem.* 72: 500-513
- Garcia, J. H., Liu, K. F., Ye, Z. R. and Gutierrez, J. A.** (1997) Incomplete infarct and delayed neuronal death after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke* 28: 2303-2309
- Garcia, M., Bondada, V., Geddes, J.W.** (2005) Mitochondrial localization of mu-Calpain. *Biochem Biophys. Res. Commun.* 338 (2): 1241-1247
- Glading, A., Lauffenburger, Wells, A.** (2002) Cutting to the chase:calpain proteases in cell motility. *Trends Cell Biol.* 12:46-54
- Goll, D.E., Thompson, V.F., Taylor, R. G., Zalewska, T.** (1992) Is calpain activity regulated by membranes and autolysis or by calcium and calpastatin? *BioEssays* 14: 549-556

-
- Goldlust, E.J., Paczynski, R.P., He, Y.Y., Hsu, C.Y., Goldberg, M.P.** (1996) Automated measurement of infarct size with scanned images of triphenyltetrazoliumchloride-stained rat brains. *Stroke* 27:1657-1662
- Gonen, H., Shkedy, D., Barnoy, S., Kosower, N. S., Ciechanover, A.** (1997) On the involvement of calpains in the degradation of the tumor suppressor protein p53. *FEBS Lett.* 406:17-22
- Graybill, T.L., Dolle, R.E., Osifo, I.K., Schmidt, S.J., Gregory, J.S., Harris, A.L., Miller, M.S.** (1995) Inhibition of human erythrocyte calpain I by novel quinolinecarboxamides. *Bioorg. Med.Chem. Lett.* 5: 387-392
- Guroff, G. J.** (1964) A neural calcium-activated proteinase from the soluble fraction of rat brain. *J. Biol.Chem.* 239:149-155
- Guttmann, R.P., Elce, J.S., Bell, P.D., Isbell, J.C., Johnson, G.V.** (1997) Oxidation inhibits substrate proteolysis by calpain I but not autolysis. *J.Biol.Chem.* 272: 2005-2012
- Hall, W.L., Benveniste, H., Hedlund, L.W. and Johnson, G.A.** (1996) A new in vivo method for quantitative analysis of stroke lesions using diffusion-weighted magnetic resonance microscopy. *Neuroimage* 3: 158-166
- Halpain, S., Greengard, P.** (1990). Activation of NMDA receptors induces rapid dephosphorylation of the cytoskeletal protein MAP-2. *Neuron* 5: 237-246
- Hamann, G.F., Okada, Y., Fitridge, R., del Zoppo, G.J.** (1995) Microvascular basal lamina antigens disappear during cerebral ischemia and reperfusion. *Stroke.* 26:2120-2126
- Hamann, G.F., Okada, Y., del Zoppo, G.J.** (1996) Hemorrhagic transformation and microvascular integrity during focal cerebral ischemia/reperfusion. *J Cereb Blood Flow Metab.* 16:1373-1378
- Hamann, G.F., Liebetrau, M., Martens, H., Burggraf, D., Kloss, C., Bültemeier, G., Wunderlich, N., Jäger, G., Pfefferkorn, T.** (2002) Microvascular basal lamina injury after experimental focal cerebral ischemia and reperfusion in the rat. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 22:526-533
- Hanada, K., Tamai, M., Morimoto, S., Yamagishi, M., Ohmura, S., Sawada, J., Tanaka, I.** (1978). Study on thiol protease inhibitors. Part I. Isolation and Characterisation of E64, a new thiol protease inhibitor. *Agric.Biol. Chem.*42: 523-528
- Hata, S., Sorimachi, H., Nakagawa, K., Mäda, T., Abe, K., Suzuki, K.** (2001) Domain of m-calpain is a Ca²⁺-dependent cystein protease. *FEBS Lett.* 501:111-114
- Hatfield, R.H., Mendelow, A.D., Perry, R.H., Alvarez, S.L.M., Modha, P.** (1991)

-
- Triphenyltetrazoliumchloride (TTC) as a marker for ischemic changes in rat brain following permanent middle cerebral artery occlusion. *Neuropathol.Appl.Neurobiol.* 17: 61-67
- Hossmann, K.A.** (1996). Periinfarct depolarisation. *Cerebrovascular Brainmetab. Rev.* 8: 195-208
- Hong, S. C., Goto, Y., Lanzino, G., Soleau, S., Kassell, N. F., Lee, K. S.** (1994) Neuroprotection with a calpain inhibitor in a model of focal cerebral ischemia. *Stroke* 25: 663-669
- Huang, Y., Wang, K.K.** (2001) The calpain family and human disease. *Trends Mol. Med.* 7: 355-362
- Huber, E., Vlasny, D., Jeckel, S., Stubenrauch, F., Iftner, T.** (2004) Gene profiling of cottontail rabbit papillomavirus-induced carcinomas identifies upregulated genes directly involved in stroma invasion as shown by small interfering RNA-mediated gene silencing. *J.Virol.* 78: 7478-7489
- Huston, R.B., Krebs E.G.** (1968) Activation of skeletal muscle phosphorylase kinase by Ca^{2+} . II Identification of the kinase activating factor as a proteolytic enzyme. *Biochem.* 7: 2116-2122
- Imajoh,** (1995). *J. Biochem.* 99: 1281-1284
- Imajoh, S., Kawasaki, H., Kisaragi, M., Mukai, M., Sugita, H., Suzuki, K.** (1984) A 107-kda inhibitor for calcium-activated neutral protease (CANP): purification from the human liver. *Biomed. Res.* 5:481-488.
- Inomata.** (1995). *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 171: 625-632
- Inuzuka, T., Tamura, A., Sato, S., Kirino, T., Yanagisawa, K., Toyoshima, I., Miyatake, T.** (1990) Changes in the concentrations of cerebral proteins following occlusion of the middle cerebral artery in rats. *Stroke.* 21: 917-922
- Ishii, H., Arai, T., Morikawa, S., Inubushi, T., Tooyama, I., Kimura, H. and Mori** (1998) Evaluation of focal cerebral ischemia in rats by magnetic resonance imaging and immunohistochemical analyses. *J.Cereb.Blood Flow Metab.* 18: 931-934
- Joly, J.C., Flynn, G., Purich, D.L.** (1989) The microtubule-binding fragment of microtubule-associated protein-2: Location of the protease-accessible site and identification of an assembly-promoting peptide. *J.Cell. Biol.* 109: 2289-2294
- Johnson, G.V.W., Ltersky, J.M., Jope, R.S.** (1991) Degradation of microtubule-associated protein 2 and brain spectrin by calpain: A comparative study. *J Neurochem.* 56: 1630-1638
- Johnson, G.A., Benveniste, H., Black, R.D., Hedlund, L.W., Maronpot, R.R., Smith, B.R.** (1993) Histology by magnetic resonance microscopy. *Magn.Reson.Q.* 9: 1-30

Kampfl, A., Posmantur, R. M., Zhao, X., Schmutzhard, E., Clifton, G. L., Hayes, R. L. (1997) Mechanisms of calpain proteolysis following traumatic brain injury: implications for pathology and therapy: a review and update. *J Neurotrauma* 14: 121-134

Kapprell, H.P., Goll, D.E. (1989) Effect of Ca^{2+} on binding of the calpains to calpastatin. *J Biol Chem.* 264: 17888-17896

Katayama, Y., Kawamata, T., Tamura, T., Hovda, D. A., Becker, D. P. and Tsubokawa, T. (1991) Calcium-dependent glutamate release concomitant with massive potassium flux during cerebral ischemia in vivo. *Brain Res.* 558: 136-140

Kawasaki, H., Emori, Y., Imajoh-Ohmi, S. (1989) Identification and characterization of inhibitory sequences in four repeating domains of the endogenous inhibitor for Ca^{2+} -dependent protease. *J Biochem.* 106: 274-281

Kindler, S., Schulz, B., Goedert, M., Garner, C.C. (1990) Molecular structure of microtubule-associated protein 2b and 2c from rat brain. *J. Biol. Chem.* 265: 19679-19684

Kirsch, J.R., Helfär, M.A., Lange, D.G. (1992) Evidence for free radical mechanism of brain injury resulting from ischemia/ reperfusion-induced events. *J. Neurotrauma* 9 Suppl.1:157-163

Kitagawa, K., Matsumoto, M., Niinobe, M., Mikoshiba, K., Hata, R., Veda, H., Handa, N., Fukunaga, R., Isaka, Y., Kimura, K., Kamada, T. (1989) Microtubule-associated protein 2 as a sensitive marker for cerebral ischemic damage-immunohistochemical investigation of dendritic damage. *Neuroscience.* 31:401- 411

Knight, R.A., Dereski, M.O., Helpert, J.A., Ordidge, R.J. and Chopp, M. (1994) Magnetic resonance imaging assessment of evolving focal cerebral ischemia. Comparison with histopathology in rats. *Stroke:* 25: 1252-1261

Kloss, C., Thomassen, N., Fesl, G., Martens, H., Yousri, T., Hamann, G., Tissue-saving infarct volumetry using histochemistry validated by MRI in rat focal ischemia (2002) *Neurological Research* 24: 708-13

Kochanek, P.M., Hallenbeck, J.M. (1992) Polymorphonuclear leukocytes and monocytes/macrophage in the pathogenesis of cerebral ischemia and stroke. *Stroke.* 23: 1367-1379

Kuwaki, T., Satoh, H., Ono, T., Shibayama, F., Yamashita, T. and Nishimura, T. (1989) Nifedipine attenuates ischemic degradation of gerbil brain cytoskeletal proteins. *Stroke.* 20: 78-83

-
- Kyhse, A. J.** (1984) Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods*. 10: 203-209
- Lämmler, U. K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227:680-685
- Lauterbur, P.C.** (1973) Image formation by induced local interactions: examples employing nuclear magnetic resonance. *Nature*. 242: 190-191
- Lee, K., Frank, S., Vanderklish, P., Arai, A., Lynch, G.** (1991) Inhibition of proteolysis protects hippocampal neurons from ischemia. *Proc. Nat. Acad. Sci USA*. 88:7233-7237
- Lee, Y.C., Wolff, J.** (1984) Calmodulin binds to both microtubule-associated protein 2 and tau proteins. *J.Biol. Chem*. 259: 1226-1230
- Lemasters, J.J., Diguseppi, J., Nieminen, A.L., Herman, B.** (1987) Blebbing, free calcium and mitochondrial membrane potential preceding cell death in hepatocytes. *Nature (Lond)*. 325: 78-81
- Lewis, S.A., Wang, D., Cowan, N.** (1988) Microtubule-associated-protein MAP2 shares a microtubule-binding motif with tau protein. *Science*. 242: 936-939
- Li, H., Buchanan, A.M.** (1993) Treatment with an AMPA antagonist 12 hours following severe normothermic forebrain ischemia prevents CA1 neuronal injury. *J. Cereb. Blood Flow Meta*. 13: 933-939
- Li, Z., Patil, G.S., Golubski, Z.E., Hori, H., Tehrani, K., Foreman, J.E., Eveleth, D.D., Bartus, R.T., Powers, J.C.** (1993) Peptide a-keto ester, a-keto amide, a-keto acid inhibitors of calpains and other cysteine proteases. *J. Med. Chem*. 36: 3472-3480
- Liebetrau, M., Staufer, B., Auerswald, E. A., Zimmermann, C., Pfefferkorn, T. and Hamann, G. F.** (1998) Intracellular calpain activation in experimental focal cerebral ischemia/reperfusion. *Stroke* 29: 378
- Liebetrau, M., Staufer, B., Auerswald, E.A., Gabrijelcic-Geiger, D., Fritz, H., Zimmermann, C., Pfefferkorn, T. and Hamann, G.F.** (1999) Increased intracellular calpain detection in experimental focal cerebral ischemia. *NeuroReport*. 10: 529-534
- M. Liebetrau, K.H.Martens, N.Thomassen, D. Gabrijelcic-Geiger, W.Lubisc and G.F.Hamann** (2005) Calpain inhibitor A-558693 in experimental focal cerebral ischemia in rats. *Neurol. Res*. 27: 466-70

-
- Lin, G., Chattopadhyay, D., Maki, M., K. K., Carson, M., Jin, L., Yuen, P., Takano, E., Hatanaka, M., Delucas, L. J. and Narayana, S.V.L.** (1997) Crystal structure of calcium bound domain VI of calpain at 1.9. Å resolution and its role in enzyme assembly, regulation and inhibitor binding. *Nat. Struct. Biol.* 4:539-547
- Lipton, S.A., Rosenberg, P.A.** (1994) Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N Engl. J. Med.* 330: 613-622
- Liu, Z. Q., Kunimatsu, M., Yang, J. P., Ozaki, Y., Sasaki, M. and Okamoto, T.** (1996) Proteolytic processing of nuclear factor kappa B by calpain in vitro. *FEBS Lett.* 385: 109-113
- Longa, E.Z., Weinstein, P.R., Carlson, S. and Cummins, R.** (1989) Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke.* 20: 84-91
- Lubisch, W., Beckenbach, E., Bopp, S., Hofmann, H-P., Kartal, A., Kästel, C., Lindner, T., Tetz-Garrecht, M., Reeb, J., Regner, F., Vierling, M., Möller, A.** (2003) Benzoylalanine-Derived Ketoamides Carrying Vinylbenzyl amino Residues: Discovery of Potent Water-Soluble Calpain Inhibitors with Oral Bioavailability. *J.Med.Chem.* 46: 2404 -2412
- Markgraf, C. G., Velayo, N. L., Johnson, M. P., McCarty, D. R., Medhi, S., Koehl, J. R., Chmielewski, P. A. and Linnik, M. D.** (1998) Six-hour window of opportunity for calpain inhibition in focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* 20: 152-158
- Marchal, G., Young, A.R., Baron, J.C.** (1999) Early postischemic hyperperfusion pathophysiologic insights from positron emission tomography. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 19:467-482
- Mehdi, S., Angelastro M.R., Wiesman, J.S.** (1988) Inhibition of the proteolysis of rat erythrocyte membrane proteins by a synthetic inhibitor of calpain. *Biochem.Biophys.Res. Commun.* 158:432-435
- Meldrum, B., Garthwaite, J.** (1990) Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease. *J Trends Pharmacol. Sci.* 11: 379-87
- Mellgren, R.L.** (1987) Calcium-dependent proteases, an enzyme system active at cellular membranes. *FASEB J.* 1:110-115
- Mellgren, R.L., Murachi, T.** (1990) Intracellular calcium dep. proteolysis. Boca Raton: CRC Press. 1-288
- Mintorovitch, J., Moseley, M.E., Chileuitt, L., Shimizu, H., Cohen, Y. and Weinstein, P.R.** (1991) Comparison of diffusion- and T2-weighted MRI for the early detection of cerebral ischemia and reperfusion in rats. *Magn.Reson.Med.* 18: 39-50

-
- Miayazawa, T., Bonnekoh, P., Hossmann, K.A.** (1993) Temperature effect on immunostaining of microtubule-associated protein-2 and synaptophysin after 30 minutes of forebrain ischemia in rat. *Acta neuropathol.* 85: 526-532
- Molinari, M., Anagli, J., Carafoli, E.** (1994) Ca^{2+} -activates neutral protease is active in the erythrocyte membrane in its nonautolyzed 80-kDa form. *J.Biol.Chem.* 269: 27992-27995
- Nakagawa, K., Masumoto, H., Sorimachi, H., Suzuki, K.** (2001) Dissociation of m-calpain subunits occurs after autolysis of the N-terminus of the catalytic subunit, and is not required for activation. *J.Biochem.* 130: 605-611.
- Nedergaard, M.** (1987) Neuronal injury in the infarct border: a neuropathological study in the rat. *Acta Neuropathol.* 73: 267-274
- Neumar, R. W., Hagle, S. M., DeGracia, D. J., Krause, G. S. and White, B. C.** (1996) Brain μ -calpain autolysis during global cerebral ischemia. *J Neurochem.* 66: 421-424
- Nishihara, H., Nakagawa, Y., Ishikawa, H., Ohba, M., Shimizu, K., Nakamura, T.** (2001) Matrix vesicles and media vesicles as nonclassical pathways for the secretion of m-Calpain form MC3T3-E1 cell. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 285: 845-853
- Nixon, R. A., Saito, K. I., Grynspan, F., Griffin, W. R., Katayama, S., Honda, T., Mohan, P. S., Shea, T. B. and Beermann, M.** (1994) Calcium-activated neutral proteinase (calpain) system in aging and Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci.* 747: 77-91
- Ohno, S., Emori, Y., Imajoh, S., Kawasaki, H., Kisaragi, M., Suzuki, K.** (1984) Protease and a calcium-binding protein? *Nature (Lond).* 312: 566-570
- Ong, W. Y., Garey, L. J. and Tan, K. K.** (1997) An immunocytochemical study of calpain II in the hippocampus of rats injected with kainate. *Exp Brain Res.* 113: 117-129
- Osborne, K.A., Shigeno, T., Balarsky, A.M., Ford, I., McCulloch, J., Teasdale, G.M. and Graham, D.I.** (1987) Quantitative assessment of early brain damage in a rat model of focal cerebral ischämia. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry.* 50: 402-410
- Oswald, K., Andine, P., Hagberg, H., Nilsson, E., Karlsson, J.O.** (1991). Calpain and Calpastatin in cerebral ischemia, *Neuroscience Abstr.* 17:185
- Overgaard, K. and Meden, P.** (2000) Influence of different fixation procedures on the quantification of infarction and oedema in a rat model of stroke. *Neuropathol.* 26: 243-250

-
- Perrin, B.J., Huttenlocher, A.** (2002) Calpain. *Int.J.Biochem. Cell Biol.* 34: 722-725
- Peters, T.** (1986) Calcium in physiological and pathological cell function. *Eur Neurol* 25:27-44
- Pettigrew, L. C., Holtz, M. L., Craddock, S. D., Minger, S. L., Hall, N. and Geddes, J. W.** (1996) Microtubular proteolysis in focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 16: 1189-1202
- Pfefferkorn, T., Stauer, B., Liebetrau, M., Bültmeier, G., Vosko, M.R., Zimmermann, C., Hamann, G.F.** (2000) Plasminogen activation in focal cerebral ischemia and reperfusion..*J.Cereb.Blood Flow Metab.* 20:337-342
- Philipson, K.D., Nicoll, D.A.** (2000) Sodium-calcium exchange: a molecular perspective. *Annu Rev Physiol.* 62: 111-133
- Pontremoli, S., Salamino, F., Sparatore, B.** (1985) Following association to the membrane, human erythrocyte pro calpain is converted and released as fully active calpain. *Biochim Biophys Acta.* 831:27-40
- Posner, A., Rase, K. J., Hajimohammadreza, I., Yuen, P.W., Wang. K.K.W.** (1995) Aurintricarboxylic acid is an inhibitor of calpain I und II. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 36: 291-299
- Rami, A., Krigelstein, J.** (1993) Protecitive effects of calpain inhibitors against neuronal damage caused by cytotoxic hypoxia in vitro and ischemia in vivo. *Brain Res.* 609: 67-70
- Reynolds, I.J.,** (1999) Mitochondrial membrane potential and the permeability transition in excitotoxicity. *Ann. N Y Acad.Sci.* 893:33-4|
- Rizo, J., Sudhof, T.C.** (1998) C2-Domains, structure and function of a universal Ca²⁺-binding domain. *J. Biol.Chem.* 273: 15879-15882
- Rosen, G.D. and Harry, J.D.** (1990) Brain volume estimation from serial section measurements: a comparison of methodologies. *J.Neurosci.Methods.* 35: 115-124
- Rosenberg, G.A., Navratil, M., Barone, F., Feuerstein, G.** (1996) Proteolytic cascade enzymes increase in focal cerebral ischemia in rat. *J Cereb Blood Flow Metab.* 16:360-366
- Rothmann, SM., Olney, JW.** (1995) Excitotoxicity and the NMDA receptor – still lethal after eight years. *Trends Neurosci.* 18: 57-58

-
- Saatman, K. E., Bozyczko, C. D., Marcy, V., Siman, R. and McIntosh, T. K.** (1996) Prolonged calpain-mediated spectrin breakdown occurs regionally following experimental brain injury in the rat. *J Neuropathol Exp Neurol.* 55, 850-860
- Saido, T.C., Nagao, S., Shiramine, M.** (1994a). Distinct kinetics of subunit autolysis in mammalian m-calpain activation. *FEBS Lett.* 346:263-267
- Saido, T. C., Sorimachi, H. and Suzuki, K.** (1994b) Calpain: new perspectives in molecular diversity and physiological-pathological involvement. *FASEB J.* 8: 814-822
- Saido, TC., Nagao, S., Shiramine, M., Tsukaguchi, M., Sorimachi, H., Murofushi, H., Tsuchiya, T., Ito, H., Suzuki, K.** (1992). Autolytic transition of μ -calpain upon activation as resolved by antibodies distinguishing between the pre-and post-autolysis forms. *J.Biochem.* 111: 81-86
- Saito, K., Elce, J.S., Hamos, J.E. and Nixon, R.A.** (1993). Widespread activation of calcium-activated neutral proteinase (calpain) in the brain in Alzheimer disease: A potential molecular basis for neuronal degeneration. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 90: 2628-2632
- Sasaki, T., Kishi, M., Saito, M., Tanaka, T., Higuchi, N., Kominami, E., Katunuma, N., Murachi, T.** (1990). Inhibitory effect of di- and tripeptidyl aldehydes on calpains and cathepsins. *J Enz. Inhib. E.* 195-201
- Sasaki, M., Kunimatsu, M., Ozaki, Y., Liu, Z. Q., Uehara, F., Onizuka, K., Nishino, H., Yang, J. Okamoto, T.** (1997) Selective neuronal cell death induced by activation of μ -calpain under conditions of ischemia/reperfusion. *Medical aspects of proteases and protease inhibitors* N.Katunuma Et Al.(Eds.) IOS Press 43
- Sato, K., Kawashima, S.** (2001). Calpain Function in the Modulation of Signal Transduction Molecules. *Biol. Chem.*, 382: 743-751
- Schinder, A.F., Olson, E.C., Spitzer, N.C., Montal, M.** (1996) Mitochondrial dysfunction is a primary event in glutamate neurotoxicity. *J. Neuroscience* 16:6125-6133
- Schollmeyer, J.E.** (1988). Calpain II involvement in mitosis. *Science Wash. DC* 240: 911-913
- Sevick, R.J., Kucharczyk, J., Mintorovitch, J., Moseley, M.E., Derugin, N. and Norman, D.** (1990) Diffusion-weighted MR imaging and T2-weighted MR imaging in acute cerebral ischemia: comparison and correlation with histopathology. *Acta Neurochirurgica - Supplementum*, 51: 210-212
- Selman, W. R., Ricci, A. J., Crumrine, R. C., LaManna, J. C., Ratcheson, R. A. and Lust, W. D.** (1990) The evolution of focal ischemic damage: A metabolic analysis. *Metab Brain Dis* 5: 33-44

Seubert, P., Lee, K. and Lynch, G. (1989) Ischemia triggers NMDA receptor-linked cytoskeletal proteolysis in hippocampus. *Brain Res.* 492: 366-370

Seubert, P. and Lynch, G. (1990) Plasticity to pathology: Brain calpains as modifiers of synaptic structure. Mellgren, R.L., Murachi, T., Eds, *Intracellular Calcium Dependent Proteolysis*, Boca Raton: CRC Press 55-74

Shimohama, S., Suenaga, T., Araki, W., Yamaoaka, Y., Shimizu, K. and Kimura, J. (1991) Presence of calpain II immunoreactivity in senile plaques in Alzheimer's disease. *Brain Res.* 558, 105-108

Sies, H., (1986). Biochemistry of oxidative stress. *Angew Chem. Int Ed. Engl.* 25: 1058-1071

Siesjö, B.K. (1989). *Cerebrovascular Brain Met. Rev.* 1: 165-211

Siesjö, B. K. and Bengtsson, F. (1989). Calcium fluxes, calcium antagonists, and calcium-related pathology in brain ischemia, hypoglycemia, and spreading depression: a unifying hypothesis. *J Cereb Blood Flow Metab.* 9, 127-140

Siman, R., Card, J. P. and Davis, L. G. (1990). Proteolytic processing of beta-amyloid precursor by calpain I. *J Neurosci* 10, 2400-2411

Siman, R. and Noszek, J. C. (1988). Excitatory amino acids activate calpain I and induce structural protein breakdown in vivo. *Neuron.* 1, 279-287

Sorimachi, H., Kinbara, K., Kimura, S., Takahashi, M., Ishiura, S., Sasagawa, N., Sorimachi, N., Shimada, H., Tagawa, K., Maruyama, K., Suzuki, K. (1995a). Muscle-specific calpain, p94, responsible for limb girdle muscular dystrophy type 2A, associates with connectin through IS2, a p94-specific sequence. *J. Biol. Chem.* 270:31158-31162

Sorimachi, H., Tsukahara, T., Okada-Ban, M., Sugita, H., Ishiura, S. And Suzuki, K. (1995b). Identification of a third ubiquitous calpain species - chicken muscle expresses four distinct calpains. *Biochim. Biophys. Acta*, 1261: 381-393

Sorimachi, H., Saido, T.C., Suzuki, K. (1994). New era of calpain research. Discovery of tissue-specific calpain. *FEBS Lett.* 343: 1-5

Sorimachi, H., Amano, S., Ishiura, S., Suzuki, K. (1996) Primary sequences of rat μ -calpain large and small subunits are, respectively, moderately and highly similar to those of human. *Biochim. Biophys. Acta.* 1309: 37-41

-
- Sorimachi, H., Ishiura, S., Suzuki, K.** (1997) Structure and physiological function of calpains. *Biochem J.* 328: 721-732
- Sorimachi, H.** (2000) Structure and function of calpain and its homologues. *Seikagaku.* 72: 1297-1315
- Sorimachi, H., Ono, Y., Suzuki, K.** (2000) Molecular analysis of p94 and its application to diagnosis of limb girdle muscular dystrophy type 2A
- Sorimachi, H., Suzuki, K.** (2001) The structure of calpain. *J. Biochem.* 129: 653-664
- Sporer, B., Martens, K.H., Koedel, U., Haberl R.L.** (1997) L-Arginine-induced regional cerebral blood flow increase is abolished after transient focal cerebral ischemia in the rat
- Squier, M. K., Miller, A. C., Malkinson, A. M. and Cohen, J. J.** (1994) Calpain activation in apoptosis., *J Cell Physiol.* 159: 229-237
- Suzuki, K., Tsuji, S., Ishiura, S., Kimura, Z., Kubota, S., Imahori, K.** (1981) Limited autolysis of Ca²⁺-activated neural protease (CANP) changes its sensitivity to Ca²⁺ ions. *J.Biochem. (Tokyo)* 90:275-278
- Suzuki, K.** (1983) Reaction of calcium-activated neutral protease (CANP) with an epoxysuccinyl derivative (E64c) an iodacetic acid. *J.Biochem.* 93: 1305-1312
- Suzuki, K., Imajoh, S., Emori, Y., Kawasaki, H., Minami, Y., Ohno, S.** (1987) Calcium-activated neutral protease and its endogenous inhibitor. Activation at the cell membrane and biological function. *FEBS Lett.*220: 271-277
- Suzuki, K.** (1987) Calcium activated neutral protease: Domain structure and activity regulation. *Trends Biochem.Sci.*12:103-105
- Suzuki, K.** (1991) Nomenclature of calcium-dependent proteinase. *Biomed. Biochem. Acta* 50: 483-484
- Suzuki, K., Sorimachi, H., Yoshizawa, T., Kinbara, K. and Ishiura, S.** (1995) Calpain: novel family members, activation, and physiologic function. *Biol. Chem. Hoppe Seyler.* 376:523-529
- Suzuki, K., Sorimachi, H.** (1998) A novel aspect of calpain activation. *FEBS Lett.* 433: 1-4
- Suzuki, K., Hata, S., Kawabata, Y., Sorimachi, H.** (2004) Structure, activation and biology of calpain. *Diabetes.* 53: 8-12
- Swanson, R.A., Sharp, F.R.** (1994) Infarct measurement meth.. *J.Cereb.Blood Flow Metab.* 14: 697-698

-
- Takagaki, Y., Itoh, Y., Aoki, Y., Ukai, Y., Yoshikuni, Y. and Kimura, K.** (1997) Inhibition of ischemia-induced fodrin breakdown by a novel phenylpyrimidine derivative NS-7: an implication for its neuroprotective action in rats with middle cerebral artery occlusion. *J. Neurochem.* 68, 2507-2513
- Takai, Y., Yamamoto, M., Inoue, M., Kishimoto, A., Nishizuka, Y.** (1977) A proenzyme of cyclic nucleotide-independent protein kinase and its activation by calcium-dependent neutral protease from rat-liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 77: 542-550
- Tamai, J., Matsumoto, K., Omura, S.** (1986) In vitro and in vivo inhibition of cysteineproteinases by ESI, a new analog of E64. *Pharmacobiodyn.* 9: 672-677
- Tomimoto, C., Yanagihara, T.** (1992) Immunoelectron microscopic study of tubulin and microtubule-associated proteins after transient cerebral ischemia in gerbils. *Acta Neuropathol.* 84: 394-399
- Tompa, P., Emori, Y., Sorimachi, H., Suzuki, K., Friedrich, P.** (2001) Domain III of calpain is a Ca²⁺-regulated phospholipid-binding domain. *Biochem. Biophys Res. Commun.* 280:1333-1339
- Touzani, O., Young, A.R., Derlon, J.M., Baron, J.C., MacKenzie, E.T.** (1997) Progressive impairment of brain oxidative metabolism reversed by reperfusion following middle cerebral artery occlusion in anesthetized baboons. *Brain Res.* 767:17-25
- Tullio, R.D., Passalacqua, M., Averna, M., Salamino, F., Melloni, E., Pontremoli, S.** (1999) Changes in intracellular localization of calpastatin during calpain activation. *Biochem.J.* 343: 467-472
- Valentino, K., Newcomb, R., Gadbois, T., Singh, T., Bowersox, S., Bitner, S., Justice, B.A., Tamashiro, D., Hoffman, B.B., Ciaranello, R., Milianich, G., Ramachandran, J.** (1993) A selective N-type calcium channel antagonist protects against neuronal loss after global cerebral ischemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 7894-7897
- Vanderklish, P.W., Bahr, B.A.** (2000) The pathogenic activation of calpain: a marker and mediator of cellular toxicity and disease states. *Int.J.Exp.Pathol.* 81:323-339
- Vanicky, I., Balchen, T. and Diemer, N.H.** (1995) Alterations in MAP2 immunostainability after prolonged complete brain ischemia in the rat. *NeuroReport*, 7: 161-164
- Victorov, I.V., Prass, K. and Dirnagl, U.** (2000) Improved selective, simple, and contrast staining of acidophilic neurons with vanadium acid fuchsin. *Brain Res., Brain Research Protocols.* 5: 135-139
- Vogel, J., Möbius, C. and Kuschinsky, W.** (1999) Early delineation of ischemic tissue in rat brain cryosections by high-contrast staining. *Stroke*, 30: 1134-1140

-
- Wang, K. K. and Yuen, P. W.** (1994) Calpain inhibition: an overview of its therapeutic potential. *Trends Pharmacol Sci.* 15: 412-419
- Wang, Y., Klijn, J.G., Zhang, Y., Sieuwerts, A.M., Look, M.P., Yang, F., Talantov, D., Timmermans, M., Meijer-van Gelder, M.E., Yu, J.** (2005) Gene-expression profiles to predict distant metastasis of lymph-node-negative primary breast cancer. *Lancet* 365: 671-679
- Ward, M.W., Rego, A.C., Frenguelli, B.G., Nicholls, D.G.** (2000) Mitochondrial membrane potential and glutamate excitotoxicity in cultured cerebellar granule cells. *J. Neurosci.* 20: 7208-7219
- Watanabe, N., Vande Woude, G.F., Ikawa, Y., and Sagata, N.** (1989) Specific proteolysis of the c-mos protooncogene product by calpain on fertilization of *Xenopus* eggs. *Nature (Lond)* 342: 505-511
- Wendt, A., Thompson, V.F., Goll, D.E.** (2004) Interaction of calpastatin with calpain: a review. *Biol. Chem.* 385: 465-472
- White, B.C., Sullivan, J.M., De Gracia, D.J., O'Neil, B.J., Neumar, R.W., Grossman, L.I., Rafols, J.A., Krause, G.S.** (2000) Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury. *Stroke* 31: 1-33
- Xu, L., Deng, X.** (2004) Tobacco-specific nitrosamine 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone induces phosphorylation of μ - and m -calpain in association with increased secretion, cell migration, and invasion. *J. Biol. Chem.* 279: 53683-53690
- Yang, L. S. and Ksiezak, R. H.** (1995) Calpain-induced proteolysis of normal human tau and tau associated with paired helical filaments. *Eur J Biochem.* 233: 9-17
- Yao, H., Ginsberg, M.D., Eveleigh, D.D., LaManna, J.C., Watson, B.D., Alonso, O.F., Loo, J.Y., Foreman, J.H., Busto, R.** (1995) Local cerebral glucose utilization and cytoskeletal proteolysis as indices of evolving focal ischemic injury in core and penumbra. *J Cereb Blood Flow Metab.* 15: 398-408
- Yoshizawa, T., Sorimachi, H., Tomioka, S., Ishiura, S., Suzuki, K.** (1995) A catalytic subunit of calpain possesses full proteolytic activity. *FEBS Lett.* 358: 101-103
- Young, A.R., Touzani, O., Derlon, J.-M., Sette, G., MacKenzie, E.T., Baron, J.C.** (1997) Early reperfusion in the anesthetized baboon reduces brain damage following middle cerebral artery occlusion - a quantitative analysis of infarction volume. *Stroke* 28: 632-637
- Zarow, G.J., Graham, S.H., Mintorovitch, J., Chen, J., Yang, G., Weinstein, P.R.** (1995) Diffusion-weighted magnetic resonance imaging during brief focal cerebral ischemia and early reperfusion: evolution of delayed infarction in rats. *Neurol. Res.* 17: 449-454

Zatz, M., Starling, A. (2005) Calpains and disease. *New Engl. J. Med.* 352: 2413-2423

Zhang, W., Lane, R. D., Mellgren, R. L. (1996) The major calpain isozymes are long-lived proteins. Design of an antisense strategy for calpain depletion in cultured cells. *J. Biol. Chem.* 271: 18825-18830

Zimmermann, U.J., Schläpfer, W.W. (1991) Two-stage autolysis of the catalytic subunit initiates activation of calpain I. *Biochim. Biophys. Acta.* 1078: 192-198

Zivin, J. A., Choi, D. W. (1991) Stroke therapy. *Sci Am.* 265: 56-63

8. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Gerhard F.Hamann für die Überlassung des Themas und für das große Interesse am Fortgang der Arbeit.

Ebenso danken möchte ich Herrn Dr.med. Dr.h.c.Thomas Brandt, der es mir ermöglichte meine Forschungstätigkeit in der Neurologischen Klinik Universität München durchzuführen.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. Martin Liebetrau für seine jederzeit hilfreiche und freundliche Betreuung während jeder Phase der Entstehung der Arbeit.

Für seine langdauernde Arbeit am Rattenmodell und seine hilfreiche Betreuung während der experimentellen Phase der Arbeit möchte ich mich beim Herrn Dr. Helge Martens bedanken.

Bei Herrn Dr.Christian. Kloss möchte ich mich für seine geduldige Unterstützung und wichtige Hilfe bei Durchführung der digitalen und radiologischen Auswertung bedanken.

Für die gründliche Einarbeitung im Labor und für ihre fortwährend geduldige und freundliche Hilfe während meiner Zeit im Labor möchte ich mich bei Frau Gundula Bültemeier bedanken.

Bei Herrn Dr.Yousri möchte ich mich für die Bereitstellung des MRT-Geräts sowie für seine unverzichtbare Hilfe bei der Durchführung der Kernspin-Aufnahmen bedanken.

Meinen Eltern möchte ich für die Geduld und Unterstützung in allen Lebenslagen meine besondere Dankbarkeit ausdrücken.

9. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Nora Thomassen
 Geburtsdatum: 09.10.1977
 Geburtsort: Bodö/Norwegen
 Familienstand: Ledig

Berufliche Tätigkeiten

10/2004- Assistenzärztin in der Inneren Abteilung II, Krankenhaus Dritter Orden.
 04/2004-10/2004 Ärztin im Praktikum in der Inneren Abteilung II, Krankenhaus Dritter Orden
 07/2003-02/2004 Ärztin im Praktikum in der Medizinischen Klinik-Innenstadt, Klinikum der
 Universität München

Ausbildung

2003 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
 2002 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
 2000 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
 1998 Ärztliche Vorprüfung
 1996 – 2003 Studium der Humanmedizin an der LMU München
 1996 Abitur in Bergen Handelsgymnasium, Bergen, Norwegen

Praktika

11/2002 - 03/2003 Städtisches Krankenhaus Harlaching
 Neurologische Abteilung
 09/2002 - 11/2002 Royal Melbourne Hospital, Melbourne, Australien
 Chirurgie in der Abteilung der Plastischen Chirurgie
 08/2002 - 09/2002 Kreiskrankenhaus Starnberg, Starnberg
 Chirurgische Klinik
 06/2002 - 08/2002 Universitätsklinikum Haukeland Sykehus, Bergen
 Innere Medizin in der Abteilung der Gastroenterologie
 04/2002 - 06/2002 Krankenhaus München Schwabing, München
 Innere Medizin in der Abteilung der Hämatologie-Onkologie

Publikationen

C. Kloss, **N.Thomassen**, G.Fesl, H.Martens, T.Yousri, G.Hamann
*Tissue-saving infarct volumetry using histochemistry validated by MRI in rat focal
 Ischemia.* Neurol Res. 2002 Oct; 24:708-13

M. Liebetrau, K.H.Martens, **N.Thomassen**, D. Gabrijelcic-Geiger, W.Lubisch,
 A.Möller, and G.F.Hamann (2005)*Calpain inhibitor A-558693 in experimental
 focal cerebral ischemia in rats.* Neurol. Res. 27: 466-70