

Aus der Klinik für Anästhesiologie  
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

**Der Einfluss des Angiotensin II Typ 2-Agonisten Compound 21 auf  
den neuronalen Schaden bei der Maus nach traumatischer  
Hirnläsion mittels Controlled Cortical Impact**

Inauguraldissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der Universitätsmedizin  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

Andreas García Bardon

aus

San Bartolomé de Tirajana, Spanien

Mainz, 2013

Tag der Promotion:

10. Dezember 2013



## **Inhaltsverzeichnis**

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>IV</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>VII</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>2 Literaturdiskussion .....</b>	<b>4</b>
<b>2.1 Das Schädel-Hirn-Trauma.....</b>	<b>4</b>
2.1.1 Epidemiologie .....	4
2.1.2 Definition und Einteilung .....	4
2.1.3 Allgemeine Pathophysiologie.....	6
2.1.4 Spezielle Pathophysiologie.....	7
2.1.4.1 Hirndruck.....	7
2.1.4.2 Zerebraler Blutfluss (CBF) .....	8
2.1.4.3 Zerebraler Vasospasmus .....	8
<b>2.2 Das Renin-Angiotensin Aldosteron System (RAAS).....</b>	<b>9</b>
2.2.1 Geschichte .....	9
2.2.2 Physiologie .....	11
<b>2.3 Angiotensin II Typ 2-Rezeptor (AT2).....</b>	<b>13</b>
<b>2.4 Compound 21 (C21).....</b>	<b>14</b>
<b>2.5 Inflammationsmarker .....</b>	<b>15</b>
2.5.1 iNOS (inducible nitric oxide synthase) .....	15
<b>2.6 Zielsetzung .....</b>	<b>16</b>
<b>3 Material und Methodik.....</b>	<b>17</b>
<b>3.1 Materialien .....</b>	<b>17</b>
3.1.1 Geräte .....	17
3.1.2 Chemikalien und Reagenzien.....	18
3.1.3 Verbrauchsmaterialien.....	19
3.1.4 Enzymkits .....	20
3.1.5 Lösungen .....	20
3.1.6 Software.....	20
<b>3.2 Methodik .....</b>	<b>21</b>
3.2.1 Versuchstiere und Gruppeneinteilung .....	21
3.2.2 Versuchsaufbau .....	21
3.2.2.1 Vorversuch: Bestimmung der Linearität der cDNA-Synthese .....	21

3.2.2.2 Hauptversuch .....	22
3.2.3 Blutdruckmessung .....	23
3.2.4 Operation .....	24
3.2.4.1 Narkose .....	24
3.2.4.2 Schädelpräparation .....	25
3.2.4.3 Traumainduktion .....	26
3.2.4.4 Postoperatives Vorgehen .....	26
3.2.5 Neurologische Evaluation .....	36
3.2.6 Histologische Aufarbeitung .....	38
3.2.6.1 Hirnentnahme .....	38
3.2.6.2 Kryoschnitt des Gehirns .....	38
3.2.6.3 Färbung .....	38
3.2.6.4 Lichtmikroskopie .....	39
3.2.7 Molekularbiologie .....	39
3.2.7.1. RNA-Extraktion .....	39
3.2.7.2 Gelelektrophorese .....	40
3.2.7.3 Bestimmung der RNA-Konzentration .....	41
3.2.7.4 Die real-time reverse-transcription Polymerase-Kettenreaktion (real-time RT-PCR)...	41
3.2.7.4.1 cDNA Synthese .....	41
3.2.7.4.2 Primer und Hybridisierungssonden (Probes) .....	41
Zielgen .....	42
Größe .....	42
Oligonukleotidsequenz .....	42
3.2.7.5.2 Externer Standard .....	43
3.2.7.5.3 real-time PCR .....	44
3.2.8 Statistik .....	45
<b>4 Ergebnisse .....</b>	<b>46</b>
<b>4.1 Molekularbiologie .....</b>	<b>46</b>
4.1.1 Linearität der cDNA-Synthese Kits .....	46
4.1.1.1 $\beta$ 2m .....	46
4.1.1.2 PPIA .....	47
4.1.1.3 iNOS .....	48
4.1.1.4 PPIA nativ vs. post Trauma .....	49
4.1.1.5 iNOS nativ vs. post Trauma .....	50
4.1.1.6 IL1 $\beta$ nativ vs. post Trauma .....	51
4.1.1.7 iNOS normalisiert mittels PPIA .....	52
4.1.1.8 IL1 $\beta$ normalisiert mittels PPIA .....	53
4.1.1.9 iNOS Expressionsveränderung .....	54

4.1.1.10 IL1 $\beta$ Expressionsveränderung .....	55
4.1.2 Inflammationsparameter nach CCI .....	56
4.1.2.1 iNOS Expressionsveränderung .....	56
4.1.2.2 IL1 $\beta$ Expressionsveränderung .....	57
<b>4.2 Physiologische Parameter .....</b>	<b>58</b>
4.2.1 Körpergewicht .....	58
4.2.2 Blutdruck .....	59
<b>4.3 Neuroscore .....</b>	<b>61</b>
<b>4.4 Histologie .....</b>	<b>62</b>
<b>5 Diskussion .....</b>	<b>65</b>
<b>5.1 Diskussion der Methodik .....</b>	<b>65</b>
5.1.1 Vorversuch - Bestimmung der optimalen Reversen Trankriptase .....	65
5.1.2 CCI als Model zur Darstellung des Schädel-Hirn-Traumas .....	67
5.1.3 Limitationen dieser Studie .....	70
<b>5.2 Diskussion der Ergebnisse .....</b>	<b>72</b>
5.2.1 Blutdruckmessung .....	72
5.2.2 Neurologische Evaluation .....	74
5.2.3 Histologische Auswertung .....	76
5.2.4 Molekularbiologische Auswertung .....	77
<b>5.3 Schlussfolgerung .....</b>	<b>80</b>
<b>6. Zusammenfassung .....</b>	<b>82</b>
<b>7 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>83</b>
<b>8 Anhang .....</b>	<b>88</b>
8.1 Light-Cycler Protokoll .....	88
8.2 Light-Cycler Programm für PPIA .....	88
8.3 Light-Cycler Programm für iNOS .....	88
8.4 Light-Cycler Programm für IL1 $\beta$ .....	88
8.5 Light-Cycler Programm für $\beta$ 2M .....	89
<b>9 Danksagung .....</b>	<b>90</b>
<b>10 Lebenslauf .....</b>	<b>91</b>

## Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
ACE	angiotensin-converting enzyme (engl.)
ADH	Antidiuretisches Hormon
AIS	abbreviated injury score (engl.)
ARB	Angiotensinrezeptorblocker
AT1	Angiotensin II Typ 1-Rezeptor
AT2	Angiotensin II Typ 2-Rezeptor
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
Aufl.	Auflage
Bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
C21	Compound 21
ca	zirka
Ca <sup>2+</sup>	Calciumion
cAMP	cyclic Adenosinmonophosphate (engl.)
CBF	cerebral blood flow (engl.), zerebraler Blutfluss
CCI	controlled cortical impact (engl.)
cDNA	complementary DNA (engl.)
cGMP	cyclic Guanosimonophosphate (engl.)
cm	Zentimeter

Cp	Crossingpoints
CPP	cerebral perfusion pressure (engl.)
d	Tag
DNA	deoxyribonucleic acid (engl.)
ECCR	European Council for Cardiovascular Research (engl.)
engl.	englisch
eNOS	endothelial nitric oxide synthase (engl.)
ERK	extracellular signal-related kinase (engl.)
et al.	et alia (lat.)
FCC	focal cortical compression (engl.)
Fe	Eisen
FP	fluid percussion (engl.)
xg	Multiplikation mit der Erdbeschleunigung
g	Gramm
GCS	Glasgow Coma Scale
G-Protein	guanine nucleotide-binding protein (engl.)
h	Stunde
HD	High Dose
HVMI	high velocity missile injury (engl.)
HWZ	Halbwertszeit
HZW	Herzzeitvolumen
i.p.	intra peritoneal
ICBV	intracranial blood volume (engl.)
ICP	intracranial pressure (engl.)



IFN	Interferon
IL	Interleukin
iNOS	inducible nitric oxide synthase (engl.)
ISS	injury severity score (engl.)
JG	juxtaglomerulär
K	Kontroll(gruppe)
K <sup>+</sup>	Kaliumion
kD	Kilodalton
kg	Kilogramm
lat.	Latein
LD	Low Dose
MAP	mean arterial pressure (engl.)
MAPK	mitogen-activated protein kinase (engl.)
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
ms	Millisekunden
Na <sup>+</sup>	Natriumion
NaCl	Natriumchlorid
NeuN	neuronal nuclei (engl.)
nm	Nanometer
nNOS	neuronal nitric oxide synthase (engl.)

NO	Stickstoffmonoxid
NOS	nitric oxide synthase (engl.)
NSS	neurological severity score (engl.)
Op	Operation
p	Signifikanzwert
PC	personal computer (engl.)
Pkt.	Punkte
PPIA	Cyclophilin A
RAAS	renin angiotensin aldosterone system (engl.)
RNA	ribonucleic acid (engl.)
RQI	RNA quality indicator (engl.)
RT	reverse transcription (engl.)
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction (engl.)
s	Sekunde
SAH	subarachnoidal haematoma (engl.)
SHT	Schädel-Hirn-Trauma
TBI	traumatic brain injury (engl.)
TNF	Tumornekrosefaktor
v. Chr.	vor Christus
vs.	versus
x	Multiplikation
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

## 1 Einleitung

Das Wort „Trauma“, aus dem Griechischen „τραύμα“ abgeleitet, bedeutet übersetzt Verletzung oder Wunde. Im aktuellen medizinischen Sprachgebrauch wird präzisiert, dass es sich beim Trauma um eine Verletzung durch eine von außen einwirkende physikalische oder chemische Kraft handelt. Noch älteren Ursprungs als die Bezeichnung an sich, ist die Idee einer Therapie dieser Verletzung: Archäologische Funde aus der Steinzeit lassen vermuten, dass schon damals komplexe Eingriffe, wie etwa Schädeltrepanationen, durchgeführt und überlebt wurden und es existieren Anleitungen aus der Zeit um 2800 v. Chr. in denen Wundnähte sowie Techniken zur Trepanation, Reposition und zum Anlegen von Verbänden beschrieben werden. Glücklicherweise hat die Medizin, auch im Bereich der Traumatologie, seitdem unzählige Meilensteine überwunden, wenngleich das Schädel-Hirn-Trauma in Zeiten sinkender Mortalität immer noch zu den weltweit führenden Todesursachen gehört und bei Kindern bis ins frühe Erwachsenenalter hinein sogar die häufigste Todesursache darstellt (1). Die präklinische Primärtherapie polytraumatisierter Patienten mit Schädel-Hirn-Verletzung wurde in den letzten Jahrzehnten stetig verbessert. Zum einen durch den Ausbau eines flächendeckenden notarztgestützten Rettungsdienstes und der Etablierung von Schockräumen und „Traumanetzwerken“ mit definierten Zuständigkeiten und Algorithmen, zum anderen aber auch durch ständige Optimierung der medizinischen Therapie. In ihrer aktuellen Form wurde 2011 die S3 Leitlinie „Polytrauma/Schwerverletzten-Behandlung“ in interdisziplinärer Zusammenarbeit der verschiedenen Fachgesellschaften verabschiedet (2). Darin sind die Eckpunkte einer präklinischen Polytraumaversorgung im Hinblick auf das Schädel-Hirn-Trauma (SHT) klar herausgearbeitet. Hierzu gehören die Aufrechterhaltung einer normalen Homöostase, wie Normoxämie (arterielle Sauerstoffsättigung über 90 % anstreben), Normotension (Verhinderung einer arteriellen Hypotension, der systolische Blutdruck sollte beim Erwachsenen nicht unter 90 mmHg sinken, bzw. permissive Hypertension), Normokapnie (niedrig normale Werte anstreben), Normoglykämie, Normothermie, desweiteren die wiederholte Erfassung des Glasgow Coma Scale (GCS) und der Verzicht auf Gabe von Glukokortikoiden. Zudem werden Maßnahmen bei Hinweis auf erhöhten intrakraniellen Druck empfohlen: Oberkörper-Hochlagerung, achsengerechte Kopfposition, Mannitol, hypertone Kochsalzlösung, moderate Hyperventilation.

Für die weitere stationäre Therapie gibt es allerdings weitaus weniger Empfehlungen zur evidenzbasierten Vorgehensweise. Auch die „Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie“ (3) der Deutschen Gesellschaft für Neurologie und die Leitlinien „Schädel-Hirn-Trauma im Erwachsenenalter“ der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie (4) empfehlen lediglich die Kontrolle und Therapie des erhöhten Hirndruckes. Dies sind Ansätze zur Verminderung einer weiteren Hirnschädigung. Eine protektive medikamentöse Therapie zur Behandlung des Hirnschadens ist zurzeit jedoch nicht bekannt. Dies ist ein zentraler Ansatzpunkt der gegenwärtigen Forschung, denn das klinische Endergebnis (Outcome) von Patienten nach schwerem SHT ist nach wie vor ungünstig. Lediglich 7-27 % der Patienten nach schwerem SHT verlassen das Krankenhaus weitgehend frei von bleibenden Schäden (5). Etwa 30-40 % der Patienten versterben, 2-14 % der Patienten überleben im permanent-vegetativen Zustand (6).

Der primäre Hirnschaden, welcher durch die mechanische Gewalteinwirkung hervorgerufen wird, ist keiner Therapie zugänglich. Der im weiteren Verlauf entstehende sekundäre Hirnschaden ist durch eine effiziente und zielgerichtete Therapie beeinflussbar. Es existieren verschiedene Theorien und Ansatzpunkte, um die noch unklaren zugrunde liegenden molekularbiologischen Mechanismen zu verstehen und damit einem therapeutischen Ansatz zugänglich zu machen. Eine der möglichen Optionen bietet hierbei der Angiotensin II Typ 2-Rezeptor (AT2) des hirneigenen Renin-Angiotensin-Systems (RAAS).

Nach der Entdeckung von organspezifischen Komponenten des RAAS folgten Untersuchungen, die zwei Rezeptoren mit gegensätzlicher Wirkung auch in verschiedenen Organsystemen identifizierten: den Angiotensin II Typ 1 (AT1)- bzw. Typ 2-Rezeptor (AT2). Verschiedene Protein- und Non-Peptid-Agonisten für beide Rezeptoren wurden entwickelt. Ein Durchbruch war die Entwicklung von selektiven AT1-Antagonisten und AT2-Agonisten. Während AT1-Inhibitoren in den Jahren 1990-1999 als neue Antihypertensiva ihren Einzug in die klinische Therapie fanden, wurden sehr bald darauf erste Studien bezüglich deren protektiver Wirkung bei Ischämien und SHT bekannt (8, 51). Bei der Erforschung des AT2 war die Synthese von Compound 21 (C21), einem selektiven AT2-Agonisten ein Meilenstein. Dieses gelang erst im Jahr 2004 (7). In diversen Studien wurde C21 im Rahmen von Myokardischämie und Hirnischämie eine protektive Wirkung zugeschrieben (8). Offen bleibt allerdings unter anderem die Frage, ob eine Stimulation des AT2 auch

eine protektive Wirkung im Hinblick auf den sekundären Hirnschaden nach SHT aufweist.

Die vorliegende Promotionsarbeit geht dieser Fragestellung unter Verwendung des „controlled cortical impact (CCI)“-Schädigungsmodells an der Maus nach. Durch kontrollierte Simulation eines SHT soll dabei die Auswirkung einer AT2-Stimulation mittels C21 auf die neurologische Funktion, den histopathologischen Schaden und die Inflammation quantifiziert werden.

## **2 Literaturdiskussion**

### **2.1 Das Schädel-Hirn-Trauma**

#### 2.1.1 Epidemiologie

Das SHT stellt sowohl als isolierte Entität wie auch im Rahmen von Polytraumata eine der weltweit führenden Todesursachen dar und ist häufig Grund für dauerhafte neurologische und kognitive Defizite. In Deutschland erleiden Schätzungen zufolge pro Jahr etwa 250.000 Patienten ein SHT, unabhängig vom Schweregrad; dies entspricht etwa 300 Patienten pro 100.000 Einwohner und Jahr (1). 60 bis 90 % der Polytraumatisierungen weisen ein schweres SHT auf, und etwa 40 % aller Todesfälle nach einem Unfall sind auf ein SHT zurückzuführen (9). „Bei Kindern und Jugendlichen stellt das schwere SHT den häufigsten Grund für Behinderung dar und verursacht die meisten Todesfälle in dieser Altersgruppe“ (10). Die Mortalität polytraumatisierter Patienten ist sechsfach erhöht bei zusätzlichem Vorliegen eines schweren SHT (11) und bei Polytraumata mit einem durchschnittlichen Injury Severity Score (ISS) von 22,2 Punkten stellt das SHT mit einem Abbreviated Injury Score (AIS)  $\geq 3$  sogar den wesentlichsten Einflussfaktor auf die Letalität dar (12). Während von 1980-1990 Verkehrsunfälle als Ursache für etwa 50 % aller SHT betrachtet wurden, stehen nach einer 2006 durchgeführten prospektiven Studie Freizeitunfälle an erster Stelle, gefolgt von Unfällen im häuslichen Bereich, Verkehrsunfällen und Arbeits- bzw. Schulunfällen. In über 50 % der Unfälle gilt ein Sturz als Ursache des SHT (13).

Beachtet man, dass ein Trauma bei Patienten unter 45 Jahren die häufigste Todesursache ist, wird deutlich, dass neben dem offensichtlichen individuellen Schaden mit all seinen Folgen für den Betroffenen und sein Umfeld auch gewaltige sozioökonomische Verluste mit dem SHT assoziiert werden können.

#### 2.1.2 Definition und Einteilung

Das SHT ist definiert als: „Folge einer Krafteinwirkung auf die als Einheit anzusehende Körperregion Schädel (Weichteile, Knochen) und Gehirn (Hirnhäute, Hirnsubstanz, Gefäße). Betroffen sind in unterschiedlichem Maße immer beide Formationen“ (14).

Es existieren diverse Einteilungen zur Bewertung der Schwere des SHT. Während die früheren Einteilungen in leichtes, moderates oder schweres SHT bzw. die

Gradeinteilung in Abhängigkeit von der Länge der stattgefundenen Bewusstlosigkeit (SHT I°: Bewusstlosigkeit bis 30 min, SHT II°: Bewusstlosigkeit bis 1 h, SHT III°: länger andauernde Bewusstlosigkeit) aufgrund ihrer mangelnden klinischen Relevanz verlassen wurden, konnten auch Einteilungen wie etwa offenes / gedecktes SHT (bezogen auf die Mitverletzung bzw. Penetration der Dura mater) oder die eher abstrakte Gewichtung nach Commotio / Compressio / Contusio cerebri der Komplexität dieser Verletzung nicht gerecht werden.

Auf der Suche nach einem klinisch validen System zur Klassifizierung des SHT, welches sowohl einfach und ohne besonderes Training anwendbar, als auch zuverlässig sein sollte, entwickelten Teasdale und Jennett 1974 den Glasgow Coma Scale (GCS) (15). Dieser Score dient nicht zur absoluten Einteilung des Bewusstseinszustandes, sondern vielmehr der Einordnung bzw. Korrelation der verschiedenen in der klinischen Praxis auffindbaren Formen des gestörten Bewusstseins durch Integration der Parameter Motorik, verbale Reaktion und Augenöffnung anhand eines Punktesystems (Tabelle 2.1.2 A). Dieses Punktesystem erlaubt eine weitgehend untersucherunabhängige Evaluation des polytraumatisierten Patienten sowie eine objektive Verlaufsbeobachtung und hat daher international die meiste Anerkennung gefunden.

Zu bewertende Reaktion	Beobachtete Reaktion	Pkt.
Augenöffnen	Spontan	4
	Auf Aufforderung	3
	Auf Schmerzreiz	2
	Kein Augenöffnen	1
Beste sprachliche Antwort	Voll orientiert, prompt	5
	Unvollständig, orientiert	4
	Verworren	3
	Unverständliche Laute	2
	Keine	1
Beste motorische Reaktion	Gezielt auf Aufforderung	6
	Auf Schmerzreiz gezielte Abwehrreaktion	5
	Auf Schmerzreiz ungezielte Abwehrreaktion	4
	Auf Schmerzreiz Beugesynergismen	3
	Auf Schmerzreiz Streckesynergismen	2
	Keine Bewegung	1

**Tabelle 2.1.2 A:** Glasgow Coma Scale, übersetzt nach Teasdale et al. (15)

Gemäß der GCS gilt eine Punktzahl von 15-13 Punkten als leichtes Schädel-Hirn-Trauma, 12-9 Pkt. entsprechen einem mittlerem und 8-3 Pkt. einem schweren SHT. Drei ist somit die niedrigste, 15 die höchste erreichbare Punktzahl.

### 2.1.3 Allgemeine Pathophysiologie

Bei Betrachtung des SHT wird pathophysiologisch zwischen einem sogenannten primären und einem sekundären Hirnschaden unterschieden (12). Der primäre Hirnschaden stellt dabei die direkte und damit nicht beeinflussbare Folge der Gewalteinwirkung dar und ist charakterisiert durch eine hämorrhagische Parenchymverletzung sowie der Beeinträchtigung von Knochen, Gefäßen und Nervenfasern. Der sekundäre Hirnschaden hingegen entwickelt sich verzögert, ist nicht mechanischen Ursprungs und damit durch entsprechende Therapien vermeidbar oder zumindest in Grenzen zu halten. Ihm liegen zugrunde:

1. extrakranielle Ursachen wie eine arterielle Hypotension oder Hypoxie
2. intrakranielle Ursachen wie raumfordernde Blutungen, diffuse Axonschäden oder Hirnödem mit konsekutiven regionalen und globalen Störungen der zerebralen Minderperfusion, exzitotoxische und zelluläre Dysregulationen

Die dem sekundären Trauma zugrundeliegende Pathophysiologie wird in zwei zeitlich getrennte Phasen unterteilt (16).

Phase eins ist dabei geprägt von den Auswirkungen des vom primären Trauma hervorgerufenen Gewebes Schadens sowie einer gestörten Autoregulation mit Einfluss auf die Hirndurchblutung (CBF) und Metabolismus. Es kommt zur Ausbildung von „ischemia-like patterns“, einem Zustand der Minderperfusion mit konsekutiver Steigerung der anaeroben Glykolyse und damit Bildung von Laktatazidose, Zunahme der Membranpermeabilität und Ödembildung. Aufgrund des Verbrauchs der ATP-Vorräte, ist das Ende dieser ersten Phase von dem Versagen der energieabhängigen  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  geprägt.

Phase zwei ist charakterisiert durch die terminale Membrandepolarisation. Dabei kommt es zu einer massiven Freisetzung von exzitatorischen Neurotransmittern wie Glutamat und Aspartat sowie der Aktivierung von spannungsabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Na}^+$ -Kanälen. Der daraus resultierende  $\text{Na}^+$ - und  $\text{Ca}^{2+}$ - Einstrom in die Zelle führt zur Selbstverdauung der Zelle im Sinne eines katabolen Prozesses. Außerdem aktiviert der  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg Lipidperoxidasen, Proteasen, Phospholipasen und steigert die Konzentration an freien Fettsäuren und freien Radikalen. Durch die Aktivierung von Kaspasen, Translokasen und Endonukleasen kommt es zur strukturellen Veränderung biologischer Membranen und der nukleosomalen DNA. Die



darauffolgende Degradation vaskulärer und zellulärer Strukturen führt schlussendlich zum Zelltod durch Nekrose oder Apoptose.

#### 2.1.4 Spezielle Pathophysiologie

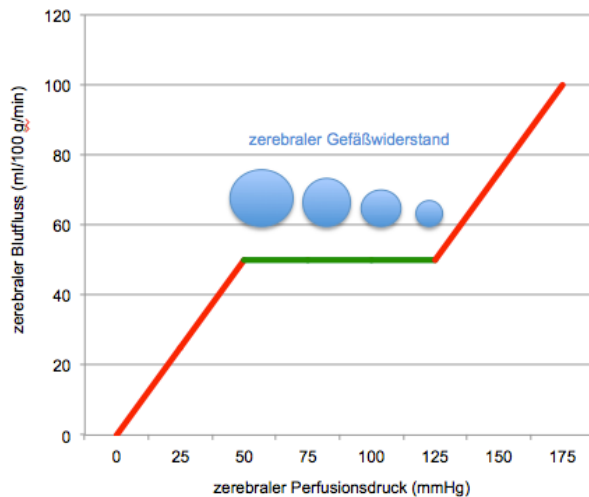
##### *2.1.4.1 Hirndruck*

Gemäß der Monro-Kellie-Doktrin (16) wird das Gehirn als ein aus drei Kompartimenten bestehender Raum beschrieben. Mit 85 % bildet das Hirngewebe den größten Anteil, der Anteil des Blutes bildet je nach Perfusionszustand 3-10 % und die restlichen 5-12 % werden vom Liquor in Anspruch genommen. Da das Kranium einen geschlossenen Raum bildet, wird die Volumenzunahme eines Kompartimentes durch kompensatorische Abnahme der beiden übrigen ausgeglichen, wodurch der intrakranielle Druck (ICP) innerhalb gewisser Grenzen konstant gehalten werden kann. Solange der zentralvenöse Druck niedriger ist als der ICP, errechnet sich der zerebrale Perfusionsdruck anhand folgender Formel:

$$\text{zerebraler Perfusionsdruck (CPP)} = \text{mittlerer arterieller Druck (MAP)} - \text{intrakranieller Druck (ICP)}$$

Innerhalb eines CPP-Bereiches von etwa 50-125 mmHg wird durch entsprechende Änderungen des Gefäßdurchmessers der zerebrale Blutfluss (CBF) konstant gehalten, wie in Abbildung 2.1.4.1 dargestellt (12). Außerhalb dieses CPP-Bereiches ist die Autoregulation jedoch aufgehoben und es kommt zu einer druckpassiven Gefäßdilatation, sodass der ICP der linearen Korrelation zwischen CPP und CBF entspricht. Für den CBF gilt:

$$\text{zerebraler Blutfluss (CBF)} = \text{zerebraler Perfusionsdruck (CPP)} / \text{zerebraler Gefäßwiderstand (CVR)}$$



**Abbildung 2.1.4.1:** Zusammenhang zwischen zerebralem Blutfluss und arteriellem Blutdruck in Zusammenschau mit dem Hirngefäßlumen, frei nach Renner et al. (12)

#### 2.1.4.2 Zerebraler Blutfluss (CBF)

Der zerebrale Blutfluss beträgt etwa 15 % des Herzzeitvolumens (HZV), dies entspricht etwa  $45\text{-}55\text{ ml } 100\text{g}^{-1}\text{ min}^{-1}$ . Nach SHT kommt es häufig zu fokalen oder globalen Ischämieereignissen. Die enge Korrelation zwischen niedrigem CBF und schlechtem neurologischen Endergebnis (18) lässt auf pathophysiologische Ähnlichkeiten zwischen SHT und ischämischem Insult schließen. Während bei einer Apoplexie metabolische Stressfaktoren im Vordergrund stehen, sind bei SHT zusätzlich mechanische Scherkräfte vorhanden, welche zu einer Verletzung von neuronalen Zellkörpern, Astrozyten, Mikroglia und Endothelzellen führen (17). Während bei einem ischämischen Insult die untere CBF Grenze, unterhalb derer es zu irreversiblen Gewebeschäden kommt, bei  $5\text{-}8,5\text{ ml } 100\text{g}^{-1}\text{ min}^{-1}$  liegt, treten diese bei SHT bereits bei einem CBF unterhalb von  $15\text{ ml } 100\text{g}^{-1}\text{ min}^{-1}$  auf (18). Mechanismen, die einen Abfall des CBF und damit die Ischämie beeinflussen, sind zum einen die mechanische Verletzung, aber auch die verminderte bzw. aufgehobene Fähigkeit zur Autoregulation, die inadäquate Stickstoffmonoxid- (NO) Freisetzung sowie die prostaglandinvermittelte Vasokonstriktion.

#### 2.1.4.3 Zerebraler Vasospasmus

Subarachnoidale Hämatome (SAH) und Vasospasmen sind gewichtige Faktoren, die das neurologische Endergebnis negativ beeinflussen. Die meisten hämodynamisch wirksamen Vasospasmen treten am zweiten Tag nach SHT auf und führen zu einer deutlichen Verminderung des CBF (19). Die Entstehung wird anhand der

chronischen Depolarisation der glatten Gefäßmuskelzellen aufgrund der reduzierten Aktivität der K<sup>+</sup>-Kanäle, der Freisetzung von Endothelin und der verminderten Verfügbarkeit von NO erklärt (17). Einen weiteren Erklärungsansatz bietet die durch freies Oxyhämoglobin vermittelte NO-Abnahme am Endothel mit konsekutiv erhöhter Prävalenz für Vasospasmen (20).

## 2.2 Das Renin-Angiotensin Aldosteron System (RAAS)

### 2.2.1 Geschichte

Bereits 1898 isolierten Tigerstedt und Bergmann eine hitzestabile Substanz aus dem Nierenkortex von Hasen, welche nach intravenöser Applikation in gesunden Versuchstieren zu einem Blutdruckanstieg führte (21). Sie benannten diese Substanz „Renin“.

1898	Tigerstedt/Bergmann: Isolierung von „Renin“
1934	Goldblatt: Etablierung eines experimentellen Bluthochdruckmodells an Hunden (22)
1939	Braun-Menéndez: „Hypertensin“ als Vasopressor (23) Page: „Angiotonin“ als Vasopressor (24) Gemeinsame Umbenennung in Angiotensin (25)
1950	Skeggs: Isolierung von Angiotensin I und Angiotensin II sowie „angiotensin-converting enzyme (ACE)“ (26)
1953	Simpson/Tait: Identifizierung von Aldosteron
1961	Gross/Davis: Zusammenhang zwischen Angiotensin II und Aldosteron

**Tabelle 2.2.1:** Chronologie der RAAS-Erforschung, frei nach Tsukamoto et al. und Atlas et al. (27), (28)

Fast vierzig Jahre später wurde ein experimentelles Bluthochdruckmodell an Hunden durch partielle Konstriktion der Nierenarterie entwickelt (22). Diese beiden bahnbrechenden Erfolge erlaubten erstmals die Herstellung eines Kausalzusammenhangs zwischen der Nierendurchblutung und der Blutdruckregulation (27). 1939 untersuchten Braun-Menéndez et al. die vasokonstriktorisches Eigenschaften des Blutes nach Nierenischämie (23). Dabei stießen sie auf eine andere Effektorsubstanz als das Renin. Sie postulierten, dass durch die Einwirkung von Renin auf Plasmaproteine eine Substanz entsteht, welche die gleichen vasokonstriktorisches Eigenschaften aufweist wie die Substanz in dem aus ischämischen Nieren gewonnenen Blut und bezeichneten diese Substanz als

„Hypertensin“. In weitergehenden Versuchen stellte auch die Arbeitsgruppe von Page et al. fest, dass Renin zwar sehr effektiv wirkte, wenn es direkt in Tiere injiziert wurde, löste man es jedoch in einer Ringerlösung als Träger und injizierte es in Hundeschwänze oder Hasenohren, führte es zu keiner Vasokonstriktion. Sie kamen ebenfalls zu dem Schluss, dass eine proteinähnliche Substanz aus dem Blutplasma oder den roten Blutzellen nötig ist, um das für sich alleine genommene inaktive Renin zu aktivieren. Diesen „Reninaktivator“ nannten sie „Angiotonin“ (29). Erst 1958 erfolgte in einer gemeinsamen Publikation die Umänderung der Nomenklatur in Angiotensin sowie die Bezeichnung des Renin-Substrates in Angiotensinogen (25). Bereits 1953 entdeckten Skeggs et al. während des Versuches Angiotensin zu purifizieren, dass es sich hierbei um zwei Substanzen handelte, welche als Hypertensin I und II bezeichnet wurden (26) und später im Rahmen der Nomenklaturänderung folgerichtig als Angiotensin I und II in die Lehrbücher eingegangen sind. Vervollständigt wurde das Bild 1961 durch Gross et al. bzw. Davis et al. durch Identifizierung und Einordnung des Aldosterons in die RAAS-Kaskade (30).

### 2.2.2 Physiologie

Das Renin-Angiotensin Aldosteron System (RAAS) ist eine kaskadenförmige Abfolge proteolytischer Aktivierungen, welche die Regulation von Blutdruck, extrazellulärem Volumen und Gewebepерfusion sicherstellt.

Wie zum Teil aus dem Namen ableitbar, sind die Komponenten dieses Systems:

- Renin
- Angiotensinogen
- Angiotensin I und Angiotensin II
- Aldosteron

Die Synthese von Renin als Startpunkt dieser Kaskade erfolgt in den juxtaglomerulären (JG) Zellen der afferenten Nierenarterien (28). Dabei wird eine nicht aktive Vorstufe, das Prorenin gebildet. In Sekretvesikeln erfolgt die Proteolyse zum enzymatisch aktiven Renin, welches durch kontrollierte Exozytose in die Blutbahn freigesetzt wird. Allerdings umgeht das Prorenin teilweise diese vesikuläre Umwandlung und wird dann konstitutiv sezerniert, sodass der Plasmaspiegel dieses Prohormons den Reninspiegel übersteigt (30, 31).

Die Reninsekretion wird durch vier sich gegenseitig beeinflussende Faktoren bestimmt:

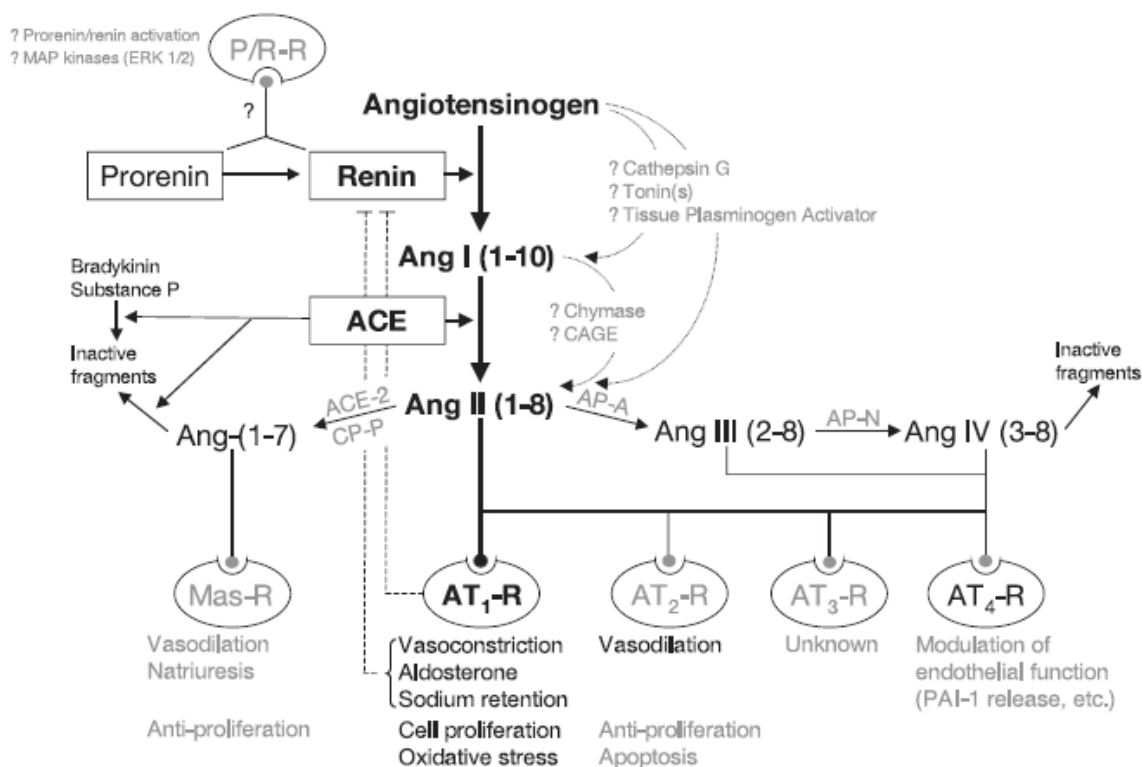
1. dem renalen Perfusionsdruck, gemessen an den afferenten Barorezeptoren
2. der Chloridkonzentration im Bereich der Makula densa Zellen des distalen Nierentubulus
3. dem sympathischen Nervensystem über Stimulation von  $\beta$ 1-Adrenorezeptoren
4. dem negativen Feedback auf die JG-Zellen durch Angiotensin II

Angiotensinogen ist ein 60 kD großes Glykoprotein, welches hauptsächlich in der Leber und im Fettgewebe gebildet wird. Es ist das einzige derzeit bekannte Substrat für Renin. Durch Abspaltung des N-terminalen Peptids, entsteht das biologisch inerte Angiotensin I, welches durch Hydrolisierung mittels Angiotensin I-Konversionsenzym (ACE) um das C-terminale Dipeptid zum Oktapeptid Angiotensin II verkürzt wird. Das ACE ist eine membrangebundene Exopeptidase, welche an den Plasmamembranen,

vor allem von Endothelzellen des vaskulären Systems, den neuroepithelialen Zellen und Epithelzellen des Mikrovillisaumes ubiquitär vorkommt (28).

Angiotensin II ist das vorrangig aktive Produkt des RAAS. Aufgrund seiner geringen Halbwertszeit (HWZ) erfolgt seine Synthese nahe dem Effektorort. Folgende Funktionen werden dem Angiotensin II zugeschrieben:

- Natriumresorption im proximalen Tubulus
- Stimulation der Aldosteronproduktion in der Nebennierenrinde
- Durstgefühl und Salzappetit
- Sekretion von antidiuretischem Hormon (ADH) aus dem Hypophysenhinterlappen
- Kontraktion glatter Gefäßmuskelzellen



**Abbildung 2.2.2:** Schematische Darstellung des RAAS aus Atlas et al. (28)

Diese Funktionen führen zu einer Zunahme des Extrazellulärvolumens und gleichzeitig zu einer Erhöhung des peripheren Gefäßwiderstandes. Die physiologische Funktion des Renin-Angiotensin-Systems ist damit im Wesentlichen die „Erhöhung oder Normalisierung eines erniedrigten Extrazellulärvolumens oder Blutdruckes“ (32). An diesem Regelkreislauf ist hauptsächlich der Angiotensin II Typ

1-Oberflächenrezeptor (AT1) beteiligt. Über eine Stimulation der intermembranären Phospholipase C kommt es hierbei durch Kaliumfreisetzung zu einer Zelldepolarisation. Während dem Angiotensin II Typ 2-Oberflächenrezeptor (AT2) eine neuroprotektive Wirkung zugeschrieben wird (siehe 2.3), ist die Wirkung des Typ 3-Rezeptors noch unbekannt. Der Typ 4-Oberflächenrezeptor wirkt als Mediator der Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-Typ 1-Sekretion.

### **2.3 Angiotensin II Typ 2-Rezeptor (AT2)**

Von zentraler Bedeutung für diese Arbeit ist ein weiteres Zielprotein des Angiotensin II: der Angiotensin II Typ 2-Rezeptor (AT2). Dieser wurde erst 1989 als weiterer Subtyp identifiziert (33). Lange Zeit war nur sehr wenig Wissen über diesen Rezeptor verfügbar. Zwar war bekannt, dass Angiotensin II eine vergleichbare Affinität zu beiden Rezeptoren besitzt, obwohl die Aminosäuresequenz dieser Rezeptoren nur zu 33 % übereinstimmt (34), doch die genaue Funktion blieb lange unklar. Gründe hierfür waren:

1. das viel geringere Vorkommen des AT2 im adulten Organismus im Vergleich zum Foetus unter physiologischen Bedingungen (35)
2. die bis dahin fehlende Möglichkeit einer selektiven AT2-Aktivierung, um die AT2-spezifischen Effekte trotz gleicher Angiotensin II-Affinität herauskristallisieren zu können
3. die Komplexität des AT2: verschiedene Arbeitsgruppen zeigten, dass es sich bei dem Rezeptor zwar um einen G-Protein gekoppelten Transmembranrezeptor handelt, dieser jedoch direkt mit mindestens drei alternativen Signaltransduktionswegen gekoppelt ist (37-39)

Der Transmembranrezeptor ist an keine klassischen second messenger wie cAMP oder Inositolphosphat gekoppelt (7). Allerdings konnte keine Aktivierung von cGMP, Tyrosin- bzw. Serin- / Threoninphosphatasen und der extrazellulären Kinasen ERK1 / ERK2 (p42 / p44<sup>mapk</sup>) mittels AT2 zweifelsfrei nachgewiesen werden.

Seit 1988 ist bekannt, dass es zusätzlich zum „systemischen“ RAAS ein hirnspezifisches RAAS sowie weitere organspezifische RAAS gibt (42, 43). Die dazugehörigen Komponenten, dabei vor allem der AT2, weisen während der fetalen Periode eine sehr hohe Expression auf (36). In den ersten Monaten nach der Geburt, wird die Expression von AT2 jedoch stark reduziert, sodass der Rezeptor unter physiologischen Bedingungen kaum detektiert werden kann (37). Die AT2-

Aktivierung in Neonaten führt zu einer morphologischen Differenzierung und stimuliert die Zellmigration (38). Die Hochregulation dieser Rezeptoren nach ischämischem Hirnschaden im sonst eher AT<sub>2</sub>-armen adulten Hirngewebe lässt auf eine neuroprotektive Wirkung schließen (39).

## 2.4 Compound 21 (C21)

Compound 21 ist ein Derivat des von Hallberg entwickelten nichtselektiven AT<sub>1</sub>-Rezeptor-Agonisten L-162.313. Durch schrittweise Reduktion der para-Imidazopyridingruppe konnte die AT<sub>2</sub> Selektivität weiter gesteigert werden. Während die Compounds 1-4 eine kaum vorhandene Affinität zum AT<sub>1</sub>-Rezeptor zeigen, konnte erst mit Compound 5, später in C21 umbenannt, eine sehr hohe Bindungskraft an den AT<sub>2</sub> nachgewiesen werden. C21 zählt daher als der erste selektive nichtpeptidische AT<sub>2</sub>-Agonist (40). Compound 21 wurde 2004 erstmals synthetisiert und befindet sich seit 2012 in einer klinischen Phase I Studie. Seine Halbwertszeit (HZW) beträgt 4 h in Ratten.

L-162,313  
AT<sub>2</sub>IC<sub>50</sub>=2.0nM  
AT<sub>1</sub>IC<sub>50</sub>=1.1nM  
Agonist(AT<sub>1</sub>/AT<sub>2</sub>)

$\rightleftharpoons$

R<sub>1</sub>=Nitrogen-containing substituent

Compounds 1-7

Compound	R <sub>1</sub>	K <sub>i</sub> <sup>a</sup> (nM)		AT <sub>1</sub> /AT <sub>2</sub>
		AT <sub>2</sub>	AT <sub>1</sub>	
1		7.1	>10,000	>1400
2		3.2	>10,000	>3125
3		4.0	500	125
4		0.5	>10,000	>20,000
5 Compound 21		0.4	>10,000	>25,000
6		70	100	1.4
7		>10,000	>10,000	-

**Abbildung 2.2.2:** Entwicklung von C21, übernommen von Steckelings et al. (40), Auflistung der synthetisierten Compounds einschließlich ihrer Strukturformel und Bindungskoeffizienten für den AT<sub>1</sub> und AT<sub>2</sub>-Rezeptor. C21 besitzt demnach die höchste AT<sub>2</sub>-Selektivität aller Compounds



## 2.5 Inflammationsmarker

### 2.5.1 iNOS (inducible nitric oxide synthase)

Bisher sind drei Stickstoffmonoxid-Synthasen (NOS) bekannt (41):

- inducible (i)NOS
- endothelial (e)NOS
- neuronal (n)NOS

Dabei werden eNOS und nNOS konstitutiv exprimiert, lediglich die iNOS-Expression ist durch immunstimulatorische Induktoren wie Interferon (IFN)- $\gamma$ , Tumornekrosefaktor (TNF)- $\alpha$  und Interleukin (IL)-1 $\beta$  beeinflussbar. Allen gemeinsam ist die Funktion als Katalysator für die Bildung von NO und Citrullin aus L-Arginin und Sauerstoff. Dabei wird Eisen III ( $\text{Fe}^{3+}$ ) zu Eisen II ( $\text{Fe}^{2+}$ ) reduziert. iNOS fungiert sowohl als Vasodilatator wie auch als Zytotoxin und gilt dabei als erster Neurotransmitter in dessen Signaltransduktionsweg ein Gas als Mediator gebildet wird. Die Hauptvorkommen von iNOS befinden sich im Endothel, den glatten Muskelzellen, Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und in der Mikroglia.

30 min nach SHT ist eine massive iNOS Aktivierung in glatten Muskelzellen und Makrophagen nachweisbar (42), die höchste Expression findet nach 6-12 h statt (43). In Verbindung mit gesteigerter Leukozytenmigration, der direkten Schädigung von Oligodendrozyten und den zerebrovaskulären Folgen, gilt iNOS daher als wichtige Komponente bei der Entstehung des sekundären Hirnschadens. Gleichzeitig werden iNOS auch neuroprotektive Eigenschaften zugeschrieben. Eine deutliche Zunahme des oxidativen Stresses bei iNOS knock-out Mäusen wurde nachgewiesen, wenngleich dies auch ohne Wirkung auf die Neuropathologie zu sein scheint (44).

Unabhängig von dessen Wirkung als Mediator und Einfluss auf den sekundären Hirnschaden, scheint iNOS aufgrund des zeitlichen Expressionsverlaufs als Markerprotein nach SHT geeignet, die inflammatorische Immunreaktion zu quantifizieren (52, 53).

### 2.5.3 Interleukin (IL)-1 $\beta$

IL1 $\beta$  wird den Zytokinen der Interleukin-1 Gruppe zugeordnet. Es wird von aktivierten Makrophagen als Proprotein gebildet und mittels Caspase-1 proteolytisch aktiviert. IL1 $\beta$  gilt als wichtiger Mediator inflammatorischer Prozesse (vergl. NCBI Gene Data, Gene ID 3553)

Auch nach SHT ist IL1 $\beta$  ein zentraler Trigger der nachfolgenden Inflammation und führt zu Leukozytenrekrutierung, Beeinträchtigung der Bluthirnschranke, Hirnödem, und zur Freisetzung von weiteren Interleukinen, Prostaglandinen, Histamin, Thromboxan, Chemokinen und Adhäsionsmolekülen (45). Die Expression von IL1 $\beta$  steigt direkt nach SHT und erreicht ein Maximum nach sechs Stunden (46). Nach etwa 24-72 h erreicht die Expression wieder ihren Ursprungswert.

## **2.6 Zielsetzung**

Durch Inhibition von AT1 mittels Candesartan konnte ein neuroprotektiven Effekt an Mäusen 5 bzw. 28 Tage nach SHT gezeigt werden (51, 52). Ein möglicher neuroprotektiver Mechanismus, der auch im Rahmen zerebraler Ischämiestudien diskutiert wird, ist die verstärkte Wirkung von Angiotensin II an AT2. Da über die Inhibition von AT1 eine positive Rückkopplung erzeugt wird, die eine vermehrte Bildung von Angiotensin II zur Folge hat, kommt es zu einer verstärkten Wirkung von Angiotensin II an den vorhandenen, bzw. perikontusional verstärkt exprimierten AT2 (51).

Zur neuroprotektiven Rolle des AT2 nach SHT gibt es bisher keine Daten. Basierend auf tierexperimentellen Studiendaten bei ischämischem Insult, kardialer Ischämie sowie neuronalen Schädigungen, ist das Ziel dieser Studie die Untersuchung der Auswirkung einer AT2-Stimulation auf den Sekundärschaden nach traumatischer Hirnläsion. Auf der Grundlage des „controlled cortical impacts“ (CCI) werden die neuromotorischen, histologischen und inflammatorischen Parameter mit den Ergebnissen einer unbehandelten Kontrollgruppe verglichen. Zur Stimulation des AT2 wird der selektive nichtpeptidische AT2-Agonist C21 verwendet.

In einem Vorversuch werden Normalisierungsstrategien und DNA-Syntheseprotokolle evaluiert, um eine zuverlässige Aussage bezüglich der gemessenen Inflamationsparameter treffen zu können.

### **3 Material und Methodik**

#### **3.1 Materialien**

##### 3.1.1 Geräte

- Gefrierschrank (-80 ° C): Heraeus Sepatech; Osterode, DE
- Autoklav: 2540 ELV, Tuttnauer; Wesel, DE
- Beatmungsgerät: Rodent Ventilator 683, Harvard Apparatus; Holliston, USA
- Blutgasanalysator: 800 basic, Radiometer, Medical ApS; Kopenhagen,DK
- Digitalkamera: Super Fine Camera, CCD Camera, Sony; Tokio, JP
- Elektrische Pipettierhilfe: Pipetus-Akku, Hirschmann Laborgerate; Eberstadt, DE
- Elektrophoresekammern: Easycast, Owl Scientific; Portsmouth NH, USA
- Gefrierschrank: -20° C: Comfort, Liebherr; Ochsenhausen, DE
- Geldokumentationssystem: KODAK-EDAS 120, Eastman Kodak; Rochester NY, USA
- Handbohrer: Minimot 40, ca. 20.000 U/min, Proxxon; Niersbach, DE
- Heizplatte: Hugo Sachs; March-Hugstetten, DE
- Inkubator: IC8000, Draeger; Lübeck, DE
- Kamera: DC 120, Kodak; Stuttgart, DE
- 1 D Image Analysis Software, Kodak Digital Science; USA
- Kryostat: Microm HM 560 Cryo-Star, Thermo Fisher Scientific; Walldorf, DE
- Lichtschutzhaube: Kodak Digital Science, Electrophoresis Documentation and Analysis System, Kodak; USA
- Light-Cycler-System: Light-Cycler 1.2, Light-Cycler Software Version 3.5, Roche; Mannheim, DE
- Magnetrührer: MR 3001, Heidolph; Schwabach, DE
- Mikropipetten: Reference, Research, Eppendorf; Hamburg, DE
- Makroskop: Wild, M420, Leica; Wetzlar, DE
- Objektträger: SuperFrost-Plus, Menzel-Gläser; Braunschweig, DE
- Objektträgerkasten; VWR Microslide Box 100PL, VWR international; Pennsylvania, USA
- Optimas 6.51, Optimas Corporation; Bothell, USA Eismaschine: Ziegler; Isernhagen, DE
- pH-Meter: WTW; Weilheim, DE

- Photometer: GeneQuant RNA/DNA Calculator, Pharmacia Biotech; Freiburg, DE
- Power Supply: Lightning Volt OSP-250 L, Owl Scientific; Portsmouth; USA
- Quarzküvette: Präzisionsküvette aus Quarzglas Suprasil® Schichtdicke 10mm, Zentrum 15mm, Hellma®; Müllheim, DE
- Qubit Fluorometer: Qubit™ Fluorometer 2006, Invitrogen; Karlsruhe, DE
- Thermocycler: Mastercycler Gradient, Eppendorf; Hamburg, DE
- Temperaturmesssonde, rektal: TCAT-2DF Controller; New Jersey, USA
- Tischzentrifugen: Centrifuge 5415C, Eppendorf ; Hamburg, DE
- Mini-Centrifuge C-1200, Labnet; Woodbridge NJ, USA
- Traumamaschine: Schädel-Hirn-Trauma M-3 CCI-Device-Controller, Kopacz; Mainz, DE
- Universal 16R Eppendorf Centrifuge 5804 R; Hamburg, DE
- UV-Transluminator: T2202, Sigma; Taufkirchen, DE
- Vortex: Reax control, Heidolph; Hamburg, DE
- Waage: Ohaus CS200 200g\*0,1g; Aslar, DE,
- Wärmematte: Hugo Sachs; March-Hugstetten, DE
- Mastermill Retsch® MM300; Haan, DE
- Experion™ Automated Electrophoresis System, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, DE
- NanoVue Plus Spectrophotometer, GE Healthcare Life Sciences Europe GmbH, Freiburg, DE

### 3.1.2 Chemikalien und Reagenzien

- Agarose: Sigma-Aldrich; München, DE
- Borsäure: Sigma-Aldrich; München, DE
- Bromphenol Blau: Roth; Karlsruhe; DE
- Desoxynucleotidtriphosphat (dNTP): Applied Biosystems; Weiterstadt, DE
- Diethylpyrocarbonat (DEPC): Sigma-Aldrich; München, DE
- Dimethylsulfoxid (DMSO): Sigma-Aldrich; München, DE
- Einbettmedium: Tissue Tek®, Miles Inc.; Elkhart, USA
- Eisessig / Essigsäure: Sigma-Aldrich; München, DE
- Ethanol: Roth; Karlsruhe, DE
- Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA): Sigma-Aldrich; München, DE

- Glycerol: Sigma-Aldrich; München, DE
- Größenstandard, 50 bp ladder DNA Molecular Weight Marker XIII: Roche Molecular Biochemicals; Mannheim, DE
- Isopropanol: Roth; Karlsruhe, DE
- Kresylviolett (Acetat): Merck; Darmstadt, DE
- NaCl, physiologische Kochsalzlösung: ACS, ISO, Roth; Karlsruhe, DE
- PCR-grade Water: Roche; Mannheim, DE
- Roti® - Histol: Roth; Karlsruhe, DE
- Roti® - Histokitt: Roth; Karlsruhe, DE
- Salzsäure (1N): Merck; Darmstadt, DE
- Sevofluran: Abbott; Wiesbaden, DE
- Stickstoff: Carl Roth GmbH & Co; Karlsruhe, DE
- SYBR<sup>®</sup> Green I: Molecular Probes; Leiden, NL
- Vollelektrolytlösung: Sterofundin® 1/1E, Braun; Melsungen, DE

### 3.1.3 Verbrauchsmaterialien

- Dexpanthenolsalbe: Bepanthen, Roche; Mannheim, DE
- Deckgläser: Menzel GmbH & Co. KG; Braunschweig, DE
- Einweg-Handschuhe: Safe Ex, SafeMed; Zimmerwald, CH
- Einwegpipetten: Falcon, Becton Dickinson; Heidelberg, DE
- EKG-Elektroden: MLA 1203 Needle Electrode (5) 1,5mm Safety Socket, AD instruments; Spechbach, DE
- Gewebekleber: Histoacryl®, Braun; Berlin, DE
- Heparinisierte Kapillaren: Radiometer; Willich, DE
- Light-Cycler Kapillaren: Light-Cycler Capillaries, Roche; Mannheim, DE
- Mikropipettenspitzen: TipOne, Starlab; Ahrensburg, DE
- Nahtmaterial: Prolene 4-0, Ethicon; Piscataway, USA
- Vicryl 3-0, Ethicon; Piscataway, USA
- Objektträger: SuperFrost-Plus, Menzel-Gläser; Braunschweig, DE
- Objektträgerkästen: VWR Microslide Box 100PL, VWR international; Pennsylvania, USA
- Parafilm: Parafilm M, Brand; Wertheim, DE
- PCR-Reaktionsgefäße: Softtubes (0,5 ml), Biozym Scientific; Hess. Oldendorf, DE

- Reaktionsgefäße: Safe-Lock (1,5 ml und 2,0 ml), Eppendorf; Hamburg, DE
- Skalpell: (23 er) Feather Disposable Scalpel, pfm medical; Köln, DE
- Tierfutter: Ssnif; Soest, DE
- Tissue Tek® Miles Inc.; Elkhart, USA

#### 3.1.4 Enzymkits

- Kit 1: Verso cDNA Synthesis Kit, Thermo Scientific GmbH, Schwerte, DE
- Kit 2: SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis Kit, Invitrogen, Life Technologies GmbH, Darmstadt, DE
- Kit 3: Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, DE
- Kit 4: QuantiTect® Reverse Transcription, Qiagen GmbH, Hilden, DE

#### 3.1.5 Lösungen

- DNA-Ladepuffer, 6 x:  
30 ml Glycerol 70 ml Aqua dest.  
1 Spatelspitze Bromphenol Blau mischen, Aliquots bei 4°C lagern
- TBE (Tris-Borat-EDTA):  
108 g Tris Puffer, 5 x:  
55 g Borsäure in 900 ml Aqua dest. auflösen  
40 ml 0,5M EDTA(pH 8,0) dazugeben mit Aqua dest. auf 1l auffüllen
- Kresylviolettlösung, 1 %:  
2 g Kresylviolett (Acetat)  
200 ml destilliertes H<sub>2</sub>O

#### 3.1.6 Software

- FlexPro 6.0, Weisang GmbH, St. Ingbert, DE
- DasyLab 5.0, measX GmbH, Mönchengladbach, DE
- SigmaPlot für Windows Version 11.0, Systat Software, Erkrath, DE

## 3.2 Methodik

### 3.2.1 Versuchstiere und Gruppeneinteilung

Für die Vorversuche wurde im Teil A Hirngewebe von sechs männlichen, nativen Mäusen des Typs C57BL/6N (Charles River Deutschland GmbH; Sulzfeld, DE) verwendet, im Teil B wurde das Hirngewebe von fünf nativen Tieren und fünf 24 h post-CCI-Tieren gleichen Typs verwendet. Dieses Hirngewebe stammte von Kontrolltieren einer kurz zuvor abgeschlossenen Studie der Klinik für Anästhesiologie der Universitätsmedizin Mainz (47) und wurde direkt nach der Entnahme bei -80 °C bis zur Verwendung eingelagert.

Für die Hauptstudie wurden insgesamt 40 männliche Mäuse des gleichen Stammes, C57BL/6N, verwendet. Die Tiere hatten bei regelmäßigem Tag- / Nachtrhythmus von 12 h, konstanter Luftfeuchtigkeit und Raumtemperatur von 20-23 °C unbegrenzten Zugang zu Trockenfutter und Wasser und wogen 18-20 g. Die Tierversuche wurden durch das Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz unter der Nummer 23177-07/G07-1-021 genehmigt.

Die Tiere wurden per Zufallsgenerator folgenden Versuchsgruppen zugeteilt:

- *A Kontrollgruppe (TC) (n=9):*  
Diese Tiere wurden 15 Minuten nach CCI dekapitiert, es erfolgte keine Medikamentengabe.
- *B High Dose-Gruppe (HD) (n=9):*  
Es erfolgte eine intraperitoneale (i.p.) Gabe von 0,1 mg/kg KG Compound 21.
- *C Low Dose-Gruppe (LD) (n=9):*  
Dieser Gruppe wurden 0,03 mg/kg KG C21 i.p. appliziert.
- *D Vehicle-Gruppe (V) (n=9):*  
0,2 ml 0,9% NaCl wurden i.p. appliziert.
- *E Nativgruppe (N) (n=4):*  
Diese Tiere wurden in Narkose ohne CCI dekapitiert und es erfolgte keine Medikamentengabe

### 3.2.2 Versuchsaufbau

#### 3.2.2.1 Vorversuch: Bestimmung der Linearität der cDNA-Synthese

Die Vorversuche fanden im Jahr 2008 an der Klinik für Anästhesiologie der Universitätsmedizin Mainz statt. Ziel war es, die Linearität der gängigen kommerziell

erhältlichen cDNA-Synthese-Kits für die verwendeten Zielgene ( $\beta$ 2M, PPIA, iNOS, IL1 $\beta$ ) sicherzustellen und das für diese Gene optimale Kit und Versuchsprotokoll zu definieren.

Im Teil A wurde hierzu die RNA der sechs nativen Tiere extrahiert, anschließend wurde der Extraktionserfolg mittels Gelelektrophorese überprüft und es erfolgte eine Konzentrationsbestimmung (3.2.7.3). Die RNA der sechs Mäuse wurde danach gepoolt und eine lineare Verdünnungsreihe erstellt mit den Konzentrationen:

2  $\mu$ g, 1  $\mu$ g, 0,5  $\mu$ g, 0,25  $\mu$ g, 0,125  $\mu$ g, und 0,0625  $\mu$ g.

Danach erfolgte mit jedem der vier Kits eine reverse Transkription (RT) in cDNA sowie eine real-time PCR (Polymerase-Kettenreaktion) zur quantitativen Bestimmung der cDNA für die Zielgene  $\beta$ 2M, Cyclophilin A (PPIA) und iNOS.

Im Teil B ging es darum, die Ergebnisse des ersten Teiles auf einen experimentellen Versuchsaufbau zu übertragen und Normalisierungsstrategien zu entwickeln. Hierzu wurde die DNA der fünf nativen und der fünf post-CCI Mäuse extrahiert und einzeln mit jedem der vier cDNA-Synthese-Kits eine RT durchgeführt. Auch hier wurde dann eine quantitative real-time PCR durchgeführt zur Messung der iNOS-, IL1 $\beta$ - und PPIA-Kopienzahl. Dies entsprach dem Design einer nativen versus (vs.) CCI Studie, welche jedoch bei gleichem Ausgangsmaterial mit jeweils vier verschiedenen cDNA-Synthese-Kits durchgeführt wurde.

### *3.2.2.2 Hauptversuch*

Die Hauptversuche wurden in den Jahren 2009 und 2010 in der Klinik für Anästhesiologie der Universitätsmedizin Mainz durchgeführt.

Sie gliederten sich auf in:

- präoperative Blutdruckmessung
- Induktion des Schädel-Hirn-Traumas mittels „controlled cortical impact“ in Narkose
- postoperative Überwachung mit Blutdruckmessung nach 2 h, 6 h und täglich bis zum 5. Tag nach SHT, zusätzlich zu einer neurologischen Evaluation am Tag 1, 3 und 5 nach SHT
- Dekapitation und histologische Untersuchung mit Hirnvolumetrie anhand Nissl-Färbung.



Je nach Gruppenzuteilung A-D erhielten die Versuchstiere i.p. C21 in den verschiedenen Dosierungen bzw. 0,9% NaCl 30 min nach dem SHT und anschließend einmal täglich für die nächsten fünf Tage. Sowohl während der Narkose als auch zur Blutdruckmessung wurde die Temperatur rektal kontrolliert.

Die einzelnen Versuchsschritte erfolgten durch Personen, die bezüglich Gruppenzuordnung verblindet waren, und alle Operationen (Op) wurden zur Minimierung methodischer Fehler von derselben Person durchgeführt. Die neurologische Evaluation wurde im Team erhoben, um die zeitlichen Abstände des Versuchsprotokolls einhalten zu können. Dies setzte eine genaue Absprache der Evaluationskriterien voraus, um auch hier eine organisationsbedingte Beeinflussung der Parameter zu verhindern.

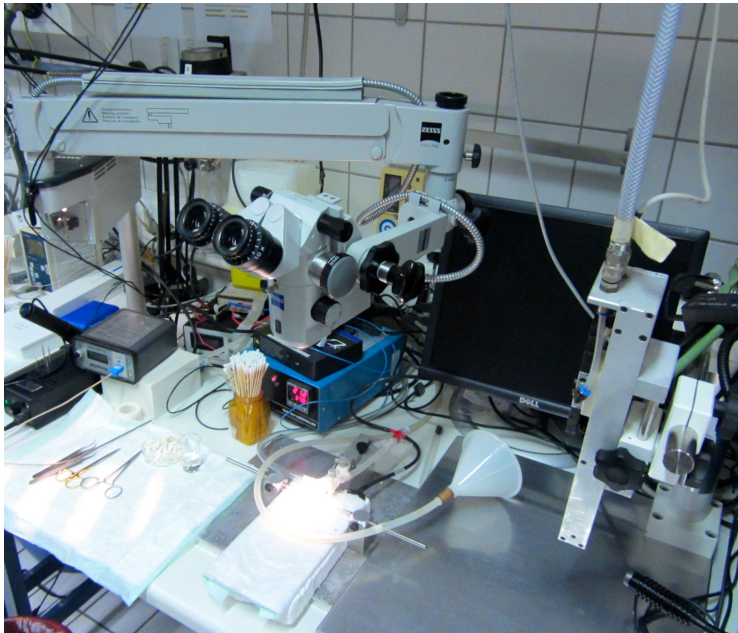
### 3.2.3 Blutdruckmessung

Die Blutdruckmessung erfolgte in einer einseitig offenen Röhre von 12 cm Länge und einem Durchmesser von 3 cm. Nach einer anfänglichen Eingewöhnungszeit ließen sich die Tiere ohne großen Aufwand bzw. ohne Anzeichen von Stress in diese Röhre bringen. Anschließend erfolgte das Anlegen eines pneumatisch füllbaren Ringes über den Schwanz des Tieres, welcher die Funktion einer Blutdruckmanschette übernahm. Distal dieses Ringes erfolgte die Anlage eines Drucksensors, welcher mittels eines piezoelektrischen Kristalles die oszillatorische Blutdruckmessung erlaubte.

Die Manschette wurde nach Anlage und Kontrolle des piezoelektrischen Signals bis auf einen definierten Druck von 240 mmHg aufgepumpt. Anschließend wurde die Luft innerhalb einer Minute gleichmäßig abgelassen. Die Signale des Drucksensors wurden dabei aufgezeichnet, sodass durch die graphische Darstellung der Oszillationen die Bestimmung des systolischen und diastolischen Blutdruckes möglich war. Die Datenerfassung erfolgte über eine an einen PC angeschlossene Analog-Digital-Wandlerkarte mit Hilfe der Datenerfassungssoftware DaisyLab 5.0 , die Auswertung über das Programm FlexPro 6.0.

### 3.2.4 Operation

#### 3.2.4.1 Narkose



**Abbildung 3.2.4.1 A:** Arbeitsplatz mit Operationsmikroskop, Heizplatte, Traumamaschine und Trichter zur Narkoseeinleitung

Vor Beginn der Narkose wurde jedes Tier gewogen. Anschließend erfolgte die Narkoseeinleitung mit Sevofluran. Dazu wurde die Maus unter einen Trichter gesetzt und mit einer Inhalationsanästhetikakonzentration von 3 Vol% für ca. 2 min bedampft. Es erfolgte eine kurze Überprüfung der Narkosetiefe durch Setzen eines Schmerzreizes an der Pfote sowie eine Beurteilung der Atemfunktion, bevor das

Tier in den stereotaktischen Rahmen in Bauchlage eingesetzt wurde. Dieser erlaubte eine exakte Positionierung des Tieres sowie die Narkoseaufrechterhaltung durch weitere Bedampfung mit Sevofluran an der spontan atmenden Maus. Zum



**Abbildung 3.2.4.1 B:** Positionierung der Maus im stereotaktischen Rahmen auf der Heizplatte

Temperaturerhalt lag das Tier dabei auf einer Heizplatte, welche durch Rückkopplung mit einer rektalen Temperatursonde die Körpertemperatur konstant bei ca. 36 °C hielt. Zur Vermeidung von Augenschäden wurden diese mit Bepanthen Augen- und Nasensalbe benetzt.

Eindringtiefe	1,5 mm
Geschwindigkeit	7,5 m/s
Aufpralldauer	200 ms
Durchmesser des Bolzens	3 mm

**Tabelle 3.2.4.3:** Traumaparameter; verwendete Eindringtiefe des Bolzens unter das Duraniveau, sowie Geschwindigkeit und Aufpralldauer zur Induktion eines standardisierten geschlossenen SHT (siehe auch 3.2.4.3 Trauma-induktion)

### 3.2.4.2 Schädelpräparation

Zur besseren Übersicht und Infektionsprophylaxe wurden die Haare über dem Operationsgebiet gekürzt, anschließend erfolgte ein ca. 1 cm langer Hautschnitt



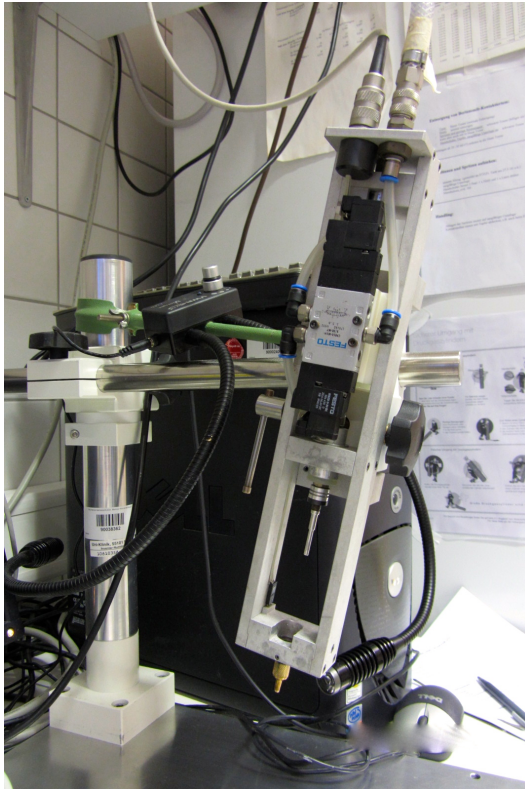
**Abbildung 3.2.4.2:** Schädel-trepanation

entlang der Sutura sagittalis. Nach Lösung und Mobilisierung der Kopfhaut entfernte man das Periost im Bereich der Präparationsstelle. Nun wurde ein halbkreisförmiges Knochenfenster von ca. 0,5 cm Durchmesser gebohrt. Begrenzungen waren frontal die Sutura coronaria dextra und medial die Sutura sagittalis mit ihrem rostral gelegenen Verbindungspunkt, dem Bregma. Während der Trepanation erfolgte

konsequent die Kühlung mit NaCl, um eine Überhitzung des Knochens und damit des darunter angrenzenden Hirngewebes zu verhindern. Anschließend wurde das Knochenfenster nach medial aufgeklappt und es erfolgte eine kurzzeitige Kontrolle der Dura mater. War diese unverletzt, war der nächste Schritt die regelrechte Wiederverschließung des Knochenfensters nach dem Auftragen einer geringen Menge NaCl zum Schutz der Dura vor Austrocknung.

### 3.2.4.3 Traumainduktion

Ohne Zeitverzug erfolgte direkt eine Kontrolle der Traumamaschine. Dazu wurde durch eine dreimalige Testauslösung die Konstanz der Geschwindigkeit von 7,5 m/s sowie die korrekte Einstellung der Eindringtiefe von 1,5 mm und der Aufpralldauer von 200 ms überprüft. Anschließend wurde die Traumamaschine rechts des Versuchstieres angeordnet und über Mikromanipulatoren erfolgte die exakte



**Abbildung 3.2.4.3:** Druckluftgesteuerte Traumamaschine

Histoacrylkleber verschlossen. Anschließend wurde der Hautschnitt mittels Einzelknopfnahm verschlossen.

Positionierung des Traumabolzens im rechten Winkel zum OP-Gebiet. Im nächsten Schritt wurde das Schädelfenster erneut aufgeklappt und der Bolzen vorsichtig auf der Dura mater aufgesetzt, ohne diese zu beschädigen.

Durch die druckluftgesteuerte Aktivierung der Maschine erfolgte nun ein anhand der in Tabelle 3.2.4.3 aufgeführten Parameter standardisiertes stumpfes Trauma auf das Gehirn ohne Duraverletzung, ein sogenannter „controlled cortical impact“ nach dem 1991 von Dixon et al. beschriebenen Model (48).

Nach dem Trauma wurde sofort die Traumamaschine entfernt, das Knochenfenster zurückgeklappt und durch

### 3.2.4.4 Postoperatives Vorgehen

Nach der OP wurde die Sevofluranzufuhr beendet, der Kopf aus dem stereotaktischen Rahmen gelöst und die rektale Temperatursonde entfernt. Es erfolgte eine Gewichtskontrolle, bevor die Maus in Einzelhaltung in einen Inkubator bei 37 °C gebracht wurde.

Die Versuchstiere erhielten 30 min nach Trauma je nach Gruppenzugehörigkeit die Testsubstanz durch intraperitoneale Gabe. Zur Vermeidung einer Hypothermie verblieben die Tiere bis 2 h nach Trauma im Inkubator. Danach erfolgte eine weitere Blutdruckmessung und die Versuchstiere wurden weiterhin in Einzelhaltung bei ausreichendem Futter und Wasserangebot bei einer Raumtemperatur von ca. 20 °C gehalten.

### 3.2.5 Neurologische Evaluation

Die neurologische Evaluation der Tiere erfolgte 24 h nach dem Trauma und wurde anschließend täglich wiederholt. Dabei wurden in einer ruhigen, von visuellen Reizen abgeschirmten Umgebung verschiedene Kriterien bewertet (siehe auch Tabelle 3.2.5):

1. Die Maus wurde in die Mitte eines Ringes von ca. 50 cm Durchmesser und einer Höhe von ca. 1 cm gesetzt. Die Bewertung erfolgte anhand der zum Verlassen des Ringes benötigten Zeit.
2. Das Versuchstier wurde auf eine ebene Fläche gesetzt. Anschließend klatschte der Untersucher laut in die Hände und die Schreck-Reaktion der Maus wurde erfasst.
3. Das generelle Verhalten der Maus wurde analysiert. Kriterien waren dabei das Erkundungsverhalten sowie das Bewegungsmuster.
4. Die Koordination wurde untersucht, indem die Maus eine Strecke von ca. 20 cm in ca. 10 cm Höhe bewältigen musste. Die Breite der Strecke wurde dabei, durch Einsatz drei verschiedener Laufstäbe, nacheinander jeweils von 3 cm auf 1,5 cm und schließlich auf 1 cm reduziert. Die Bewertungspunkte wurden je nach Anzahl der Fehlritte vergeben. Ein weiterer Punkt wurde vergeben, wenn die in die Luft gehobene Maus bei Annäherung an das Brett die Vorderpfoten nicht ausstreckte um eine Stabilisierung zu erreichen.
5. Im letzten Test wurde die Maus zuerst auf einen runden Stock in ca. 10 cm Höhe gesetzt. Die Punktevergabe erfolgte danach, ob sie die Balance auch bei langsamer Drehung des Stockes anpassen konnte und weiterhin alle vier Pfoten Kontakt zur Oberfläche hatten. Dieser Test wurde anschließend durch einen Stock mit quadratischem Durchmesser wiederholt.

	Points	24 h	48 h	3 d	4 d	5 d
<b>1. Exit from circle?</b>						
< 30 sec	0					
For 30 sec	1					
For 60 sec	2					
> 2 min	3					
<b>2. Reflexes</b>						
startle reflex	present	0				
	absent	1				
If the mouse is not moving at all, clap your hands once above the mouse; did it react?						
<b>3. General behavioral deficit?</b>						
seeking behavior	present	0				
	absent	1				
Walk straight	present	0				
	absent	1				
<b>4. Coordination</b>						
beam walking 3 cm	score	0-2				
beam walking 1,5 cm	score	0-2				
beam walking 1 cm	score	0-2				
Criteria: 0 point: normal movement / no impairment 1 point: feet misplacements / unstable movement 2 point: sits down / stops moving on beam						
placing test	present	0				
	absent	1				
front paws reaching when lifted from the ground by tail						
<b>5. Balance</b>						
round stick	score	0-1				
square stick	score	0-1				
criteria: 0 point: Can grip the stick with 4 paws 1 point: turns the stick: can it do that again, or is a paw (hemiparesis) "hanging out"						

**Tabelle 1.2.5:** *Neurological Severity Score; Evaluation der Maus mittels eines Punktesystems zur Einschätzung der Beeinträchtigung der neurologischen Funktion mittels Surrogatparameter*

Zum jedem Messzeitpunkt wurden die Punkte zu einem Gesamtergebnis addiert. Je höher die dabei erreichte Punktzahl ist, desto schwerer ist die Schädigung. Aus diesem Grunde spricht man auch vom „Neurological Severity Score“ (NSS) (49).

## 3.2.6 Histologische Aufarbeitung

### *3.2.6.1 Hirnentnahme*

Am fünften Tag nach dem Trauma wurden die Tiere nach einer hochdosierten Sevofluranexposition (3-4Vol%) von 2 min durch Dislokation und anschließender Durchtrennung der Halswirbelsäule (HWS) und Dekapitation getötet. Es erfolgte die sofortige Hirnentnahme. Dazu wurde das Schädeldach eröffnet und das Gehirn unter Durchtrennung der Hirnnerven und des Zervikalmarks vorsichtig aus der Schädelbasis herausgelöst. Anschließend wurde das Gehirn sofort in pulverisiertes Trockeneis gelegt und zusätzlich mit diesem bedeckt. Nach ca. 1 min wurde das dann schockgefrorene Gehirn mit dem umgebenden Eispulver in Aluminiumfolie eingepackt und zur Unterbringung in einen Kühlschrank bei -80 °C verbracht.

### *3.2.6.2 Kryoschnitt des Gehirns*

Das Gehirn wurde mittels Tissue Tek®, einem bei Raumtemperatur flüssigen Einbettmedium, fixiert und in ein Kryotom bei -19 °C eingespannt. Die rostralen Gehirnanteile wurden mit etwa 30 µm dicken Schnitten bis zum Erreichen einer vorher definierten Nullebene entfernt, wobei diese Schnitte genutzt wurden, um das Messer in der Sagittalebene auszurichten und so eine symmetrische Abbildung beider Hemisphären zu erreichen. Die Nullebene entsprach einem an die Schnittebene „Plate 11“ des Bildatlas „Maps and Guide to Microdissection of the Rat Brain“ (50) angelehnten Bild, welches auch bei der Maus makroskopisch gut erkennbar ist. Anschließend wurde die Schnittdicke auf 10 µm eingestellt und im Abstand von 500 µm wurden die Gehirnschnitte auf jeweils acht verschiedene Objektträger nacheinander übertragen. Insgesamt wurden so 15 Ebenen auf 8 Objektträgern aufgenommen und zur späteren histologischen Auswertung eingefroren. Die fertigen Schnitte wurden in Objektträgerkästen bei -80 °C aufbewahrt.

### *3.2.6.3 Färbung*

Die Färbung zweier Objektträger pro Versuchstier erfolgte mittels Kresylviolettacetat. Dieser basophile Oxazinfarbstoff färbt DNA und RNA, Zellkerne und Nissl-Substanz violett und das Zytoplasma von Ganglien- und Gliazellen schwach blau.

Zur Färbung wurden die Objektträger für 2 min in 70 % Ethanol eingelegt und anschließend für 10 min in Kresylviolett (5 g ad 100 ml 100 % Ethanol).



Anschließend erfolgten jeweils zwei kurze Eintauchvorgänge in bidestilliertem Wasser, 70 % Ethanol und 96 % Ethanol. Die Objektträger wurden danach für 5 min in Roti®-Histol eingelegt und nach einem Reagenzienwechsel erneut für 2 min in Roti®-Histol gegeben. Schließt erfolgte die Einbettung der Präparate mit Deckgläsern und sie wurden bei Raumtemperatur aufbewahrt.

#### *3.2.6.4 Lichtmikroskopie*

Für die Erfassung des Kontusionsvolumens wurden jeweils die gefärbten Objektträger mit der Bezeichnung 1 bzw. 2 digitalmikroskopisch fotografiert und der höherwertigere der beiden begutachteten Gewebeschnitte pro Ebene mittels Optimas vermessen. Als Zellgrenze zwischen gesundem (gefärbt) und geschädigtem Gewebe (aufgehellt) wurden die mittels Kresylviolett-Färbung deutlich dargestellten Neuronen und Gliazellen definiert. Zuerst wurde die Fläche der zum Trauma kontralateralen Seite vermessen, anschließend die ipsilaterale nicht geschädigte Fläche und schließlich die komplette ipsilateralen Seite. Die Läsionsfläche der jeweiligen Gewebeebene entsprach damit der Differenz aus der gesamten ipsilateralen Seite und dem gesunden Gewebe der ipsilateralen Seite. Zur Berechnung des Läsionsvolumens wurde anschließend die Summe der Flächen mit 500 multipliziert, da die Abstände zwischen den einzelnen Schnittebenen 500 µm betragen.

#### 3.2.7 Molekularbiologie

##### *3.2.7.1. RNA-Extraktion*

Das Gewebe für die RNA-Extraktion wurde während der Anfertigung der Kryoschnitte gesammelt. Ab der fünften Ebene (Beginn des histologischen Schadens) wurde das Gewebe des rechten oberen Quadranten gesammelt, in 500 µl Reaktionsgefäße gefüllt und direkt in flüssigem Stickstoff gefroren.

Die Extraktion erfolgte nach einem bereits etablierten Protokoll anhand des RNeasy® Lipid Tissue Mini-Kits:

Jeder Probe wurde zur Denaturierung und Inaktivierung der Proteine 1 ml Qiazol hinzugegeben. Anschließend wurde das Gewebe mit dem Mastermill bei 20 Hertz für 2 min mit Hilfe einer 5 mm großen Stahlkugel zerkleinert. Nach einer 5-minütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur, wurde jede Probe nach Zugabe von 200 µl Chloroform im Vortex gemischt. Es folgte eine erneute 3-minütige Ruhephase, dann



wurde jedes Probengefäß für 15 min bei 4 °C mit 12000 xg zentrifugiert. Bei diesem Vorgang entstanden drei Phasen:

1. eine farblose, wässrige Phase, welche die RNA enthielt,
2. eine schmale, weiße Interphase und eine
3. rote, organische Phase mit proteinhaltigen Sedimenten.

Die wässrige Phase wurde in ein neues 2 ml Tube überführt und die gleiche Menge an 70 % Ethanol zugegeben. Dieses Gemisch konnte nun in eine „mini spin column“, einem zweiteiligen Filtersystem, bestehend aus einer filternden Säule und einem Sammelgefäß, überführt werden. Die „mini spin columns“ wurden danach bei Raumtemperatur bei 8000 xg für 15 s zentrifugiert. Bei diesem Vorgang verblieb die RNA im Filter. Um die RNA zu waschen, wurden daraufhin 350 µl RW1 Buffer auf die Säule pipettiert und diese für 15 s bei 8000 xg zentrifugiert. Nun wurden 80 µl DNase-Mix, bestehend aus 80 µl DNase und 600 µl RDD-Puffer, hinzugegeben und die Proben für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte erneut die Zugabe von 350 µl RW1-Puffer und zweimalig 500 µl RPE-Puffer, wobei die Proben zwischen den einzelnen Schritten jeweils zentrifugiert und der Durchlauf verworfen wurde.

Nach Einpipettieren von 500 µl RPE-Puffer fand der finale Waschgang unter gleichen Bedingungen ebenfalls in der Zentrifuge statt. Es folgte der Trockenvorgang mit erneuter Zugabe von 500 µl RPE-Puffer und einer 2-minütigen Zentrifugation bei 8000 xg. Letztlich erfolgte die Eluation der RNA in ein neues Collection-Tube mit 30 µl RNase freiem Wasser, das exakt auf die Membran der „spin column“ pipettiert wurde, und anschließend erneut eine Zentrifugation. In einem letzten Schritt wurden die Filtersäulen auf neue Collection-Tubes gestellt, 30 µl RNase-freies Wasser auf den Filter pipettiert und während einer 1-minütigen Zentrifugation bei 1000 xg die RNA aus dem Filter herausgewaschen. Nach Bestimmung der RNA-Konzentration wurden die Proben bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

### 3.2.7.2 Gelelektrophorese

Zur Qualitätskontrolle der erhaltenen RNA vor der weiteren Verwendung wurde eine Kapillarelektrophorese mittels Automated Electrophoresis System von Experion™ durchgeführt. In einem von Mikrokanälen durchzogenen Chip wird hierbei in einem automatisierten Verfahren die RNA hinsichtlich ihrer Größe, Reinheit, Qualität und Quantität untersucht. Neben der RNA-Menge wird so auch der RNA quality indicator

(RQI) als Maß für die RNA-Qualität bestimmt. Die Proben und ein vom Hersteller vorgegebener Standard wurden in die Wells des Experion<sup>TM</sup>-Chips pipettiert. Nach Einlegen in das System bewegten sie sich im elektrischen Feld und wurden in einer Trennkapillare entsprechend ihrer Fragmentgröße aufgespalten. Anhand des Fluoreszenzdetektors wurden die einzelnen Fragmente und deren Laufzeiten aufgezeichnet und als gelähnliches Bild dargestellt.

### 3.2.7.3 Bestimmung der RNA-Konzentration

Die RNA-Konzentration wurde durch das Nanovue<sup>®</sup>-Spektrophotometer bestimmt. Anhand von 1 µl RNA wurde hierbei die Konzentration durch Absorptionsmessung bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Der Absorptionsquotient  $A_{260}/A_{280}$  bzw.  $A_{260}/A_{230}$  lag in dem für reine RNA typischen Bereich zwischen 1,9-2,1 bzw. 2,0-2,2.

### 3.2.7.4 Die real-time reverse-transcription Polymerase-Kettenreaktion (real-time RT-PCR)

#### 3.2.7.4.1 cDNA Synthese

Die reverse Transkription von RNA in cDNA wurde für die Vorversuche mit vier verschiedenen Synthese-Kits durchgeführt. Zur besseren Übersicht werden die Protokolle im Anhang aufgeführt. Für den Hauptversuch wurde das Verso<sup>TM</sup> cDNA Kit verwendet.

#### 3.2.7.4.2 Primer und Hybridisierungssonden (Probes)

Wie bei der konventionellen PCR, müssen für die DNA-Replikation durch die Polymerase Beginn und Ende der entsprechenden Matrix markiert werden. Dies geschieht durch komplementäre Oligonukleotidsequenzen, sogenannten Primern. Die Primer wurden bereits in Vorversuchen auf Sensitivität und Spezifität getestet. Als Matrix wurde eine exonübergreifende Basenfolge gewählt, um eine potentielle Amplifikation genomischer DNA zu verhindern.

Bei den Probes handelt es sich um Hybridisierungssonden, welche aus jeweils zwei mit Fluoreszenzfarbstoffen versehenen Oligonukleotiden bestehen. Jeweils zwei Probes bilden dabei ein Paar: die am 3'-Ende mit Fluoreszein markierte „Sensorsonde“ und die am 5'-Ende mit Light-Cycler Red640 markierte „Ankersonde“. Beide Sonden binden an den während der Amplifikationszyklen entstehenden Komplementärstrang. Wird nun die Sensorsonde durch einen sprechenden Lichtimpuls angeregt, so sendet sie einen Lichtimpuls mit einer Wellenlänge von 470

nm aus. Dies wiederum führt an der Ankersonde zur Lichtemission mit 640 nm Wellenlänge, welche wiederum vom Light-Cycler während der Replikation gemessen wird. Je mehr DNA-Matrix repliziert wird, desto mehr Sonden können an die passende Sequenz binden; entsprechend proportional zur amplifizierten DNA-Menge steigt die Fluoreszenz an. Auf diese Weise ist eine Echtzeitmessung der gebildeten DNA-Menge möglich, daher die Bezeichnung „real-time“ PCR. Bedingung dafür ist, dass

1. die PCR-Lösung eine größere Anzahl an Sonden enthält als tatsächlich benötigt wird und
2. die freien Sonden kein Licht emittieren, da der Abstand zwischen Sensor- und Ankersonde kleiner als fünf Basenpaaren (Bp) sein muss.

Tabelle 3.2.7.4.2 stellt die für die Versuche verwendeten Primer und Probes dar.

Zielgen	Größe	Oligonukleotidsequenz
PPIA	146 bp	forw: 5'-GCGTCTSCTTCGAGCTGTT-3' rev: 5'-RAAGTCACCACCCTGGCA-3' FL: 5'-GCTCTGAGCACTGGRGAGAAAGGA-FL-3' Cy5: 5'-TTGGCTATAAGGGTTCCTCCTTTCACAG-Phos-3'
IL1 $\beta$	348 bp	forw: 5'-GTGCTGTCCGACCCATATGAG-3' rev: 5'-CAggAAgACAggCTTgTgCTC-3' FL: 5'-TAATgAAAgACggCACACCCACCC-F-3' Cy5: Red-CAgCTggAgAgTgTggATCCCAAAGC-Phos-3'
iNOS	312 bp	forw: 5'-TGTGTCAGCCCTCAGAGT AC-3' rev: 5'-CACTgACACTYCgCACAA-3' FL: 5'gAAgCCCCgCTACTACTCCATC-FL-3' Cy5: 5'- LC Red640-GCTCCTCCCAGGACCACACCC-Phos-3'
$\beta$ 2M	101	forw: 5'-CCGAACATACTGAACTGC-3' rev: 5'-AGAAAGACCAGTCCTTGC-3' FL: 5'-GAAGCCCCGCTACTACTCCATC-FL-3' Cy5: 5'-Red670-AAATCCAAATGCTGAAGAACGGGA-Phos-3'

**Tabelle 3.2.7.4.2:** Primer und Probes für die RT-PCR

### 3.2.7.5.2 Externer Standard

Zur weiteren Datenbearbeitung werden die sogenannten Crossingpoints (Cp) verwendet. Stellt man die Zykluszahl der Fluoreszenz gegenüber, so ist die Gesamtfluoreszenz zu Beginn noch unterhalb der Nachweisgrenze. Nach einigen Zyklen kommt es jedoch zu einem exponentiellen Fluoreszenzanstieg, welcher dann in eine Plateauphase übergeht. Während die Plateauphase durch Substratmangel und nachlassender Aktivität der Polymerase gekennzeichnet ist, herrschen während der exponentiellen Phase für wenige Zyklen optimale Reaktionsbedingungen, sodass während dieser Phase eine korrekte Quantifizierung möglich ist. Der Messwert, bei dem die Fluoreszenz zum ersten Mal die Nachweisgrenze erreicht (Beginn der exponentiellen Phase), ist als Crossingpoint definiert.

Zwischen dem Logarithmus der eingesetzten DNA-Menge und dem Cp besteht eine lineare, umgekehrt proportionale Korrelation. Daher muss eine Standardkurve mit bekannter Ausgangsmenge für jedes Zielgen erstellt werden. Dazu wird

1. die entsprechende Primerkombination und das Zielgen in einer konventionellen PCR vervielfältigt,
2. das PCR-Produkt mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und auf Spezifität überprüft,
3. die gewonnene DNA purifiziert um Polymerasen, Primer und Nucleotide zu entfernen,
4. die Konzentration wird bestimmt, die Kopienzahl anhand der Amplifikatlänge bestimmt und eine Verdünnungsreihe aus sechs Verdünnungsstufen erstellt,

Durch die nun bekannte Ausgangsmenge kann eine Standardkurve durch Auftragen des Logarithmus des Ausgangswertes gegen den Cp erstellt werden und anhand der Geradengleichung für jede unbekannte Probe der Logarithmus der Kopienzahl errechnet werden.

Die entsprechenden Standardkurven wurden im Light-Cycler bereits in Vorversuchen als externer Standard hinterlegt. Außerdem wurde aus jeweils einer Verdünnungsstufe ein Kalibrator als externer Standard aliquotiert und bei -20 °C eingefroren. Für diese Versuche wurden daher bei jeder Light-Cycler-PCR 2 µl dieses Kalibrators mit bekannter DNA-Konzentration dreifach beigelegt. Dieser externe Standard erlaubte damit zusätzlich die Überprüfung des PCR-Ergebnisses hinsichtlich Amplifikationseffizienz und Sensitivität.

### 3.2.7.5.3 real-time PCR

Die real-time PCR wurde durch Light-Cycler durchgeführt. Light-Cycler basieren im Gegensatz zu konventionellen Thermocyclern auf einer Konstruktion aus Glaskapillaren, sodass extrem hohe Heiz- und Kühlraten angewendet werden können. Erst diese schnellen Reaktionszeiten von durchschnittlich 1,5 Zyklen pro Minute und das integrierte Fluorimeter erlauben eine online Detektion durch den Einsatz von Hybridsonden.

Zur Bestimmung der DNA-Kopienzahl wurden alle Proben im Vorversuch dreifach auf ein 96 Well-Plate pipettiert, im Hauptversuch doppelt. Die Reaktion fand gemäß dem Protokoll im Anhang statt.

### 3.2.8 Statistik

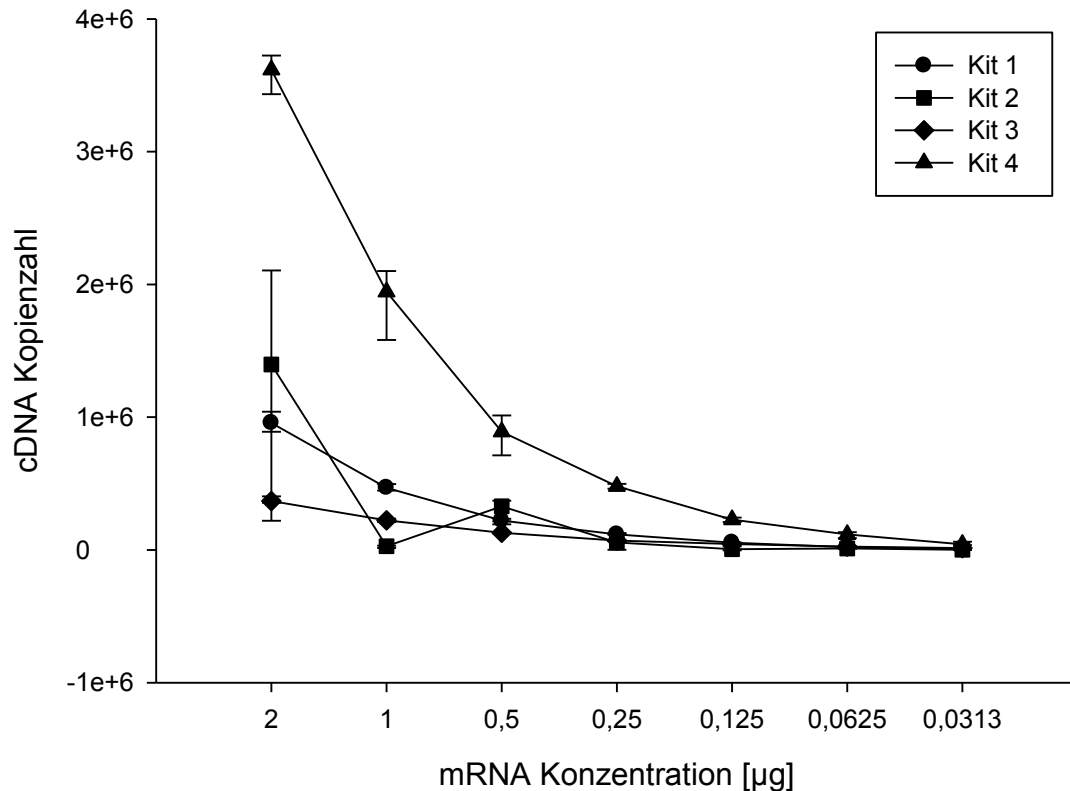
Die statistische Datenverarbeitung sowie die Erstellung der Grafiken erfolgte mittels SigmaPlot für Windows, Version 11. Die Nullhypothese, „kein Unterschied der untersuchten Daten“, wurde mit einer Fehlerwahrscheinlichkeit von unter 5 % abgelehnt. Die Berechnung erfolgte durch Varianzanalysen für unverbundene Stichproben in Form eines paarweisen Vergleiches mittels Wilcoxon Mann Whitney Rangsummentests. Der Signifikanzwert ( $p$ ) wurde dabei mittels Bonferroni-Korrektur gegen multiples Testen adjustiert. Alle Ergebnisse sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung mit entsprechendem Signifikanzwert angegeben. Die Studie ist explorativ und rein deskriptiver Natur, eine Fallzahlbestimmung beruht daher auf der Erfahrung aus ähnlich gearteten Projekten mit gleichen Zielparametern.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Molekularbiologie

#### 4.1.1 Linearität der cDNA-Synthese Kits

##### 4.1.1.1 $\beta 2m$

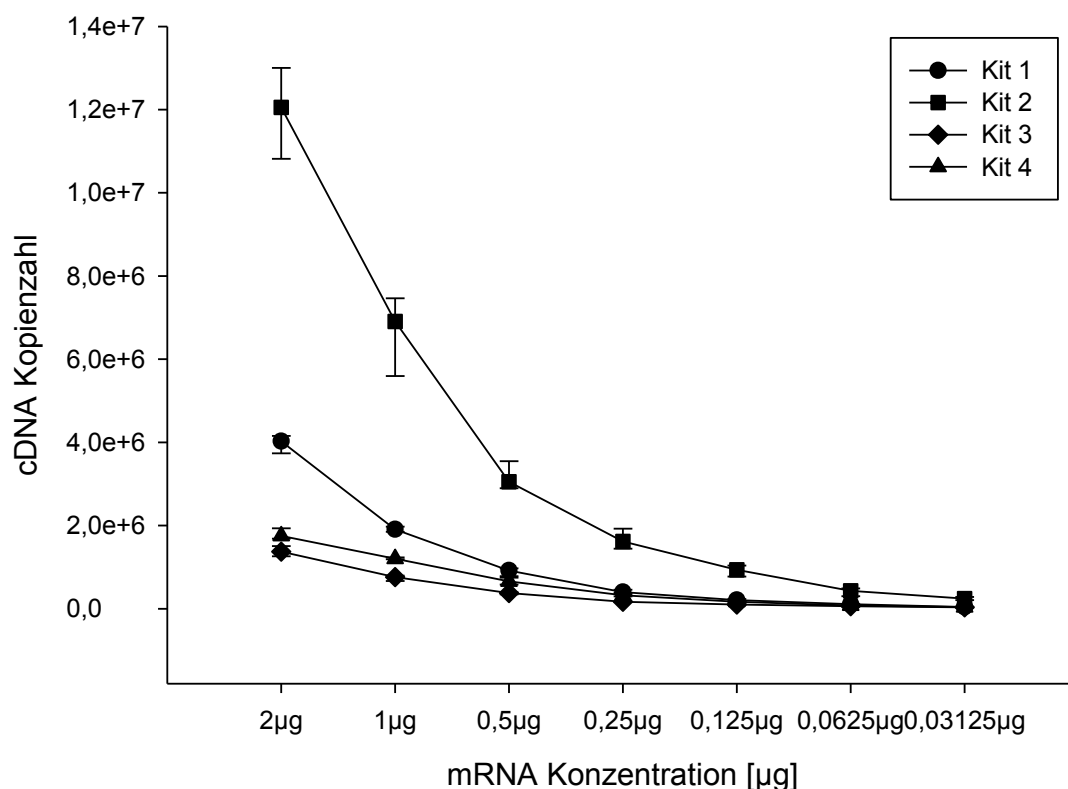


**Abbildung 4.1.1.1:** Vergleich der cDNA Kopienzahl pro Kit für festgelegte mRNA Konzentrationen von  $\beta 2m$ . Die bei den jeweiligen Kits gemessenen cDNA Kopienzahlen für die entsprechende mRNA Konzentration sind als Mittelwert und Standardabweichung dargestellt. Durch Verbindung der einzelnen Messwerte zu einer Kurve wird bei fast allen Kits eine nahezu lineare Korrelation deutlich, mit Ausnahme des bei 1  $\mu\text{g}$  mRNA gemessenen Wertes von Kit 2.

Abbildung 4.1.1.1 stellt die Menge an produzierter cDNA in Abhängigkeit von der verwendeten mRNA Konzentration für das jeweils verwendete Synthesekit dar. Die Kurven haben einen hyperbolischen Verlauf aufgrund der sich jeweils halbierenden Konzentration auf der X-Achse. Bei einer numerischen Darstellung auf der X-Achse zeigen die Kurven einen annähernd linearen Verlauf mit unterschiedlichen Steigungen.

Kit 4 weist eine signifikant höhere cDNA-Produktion auf als die anderen drei Kits, zwischen denen kein relevanter Unterschied besteht. Bei Kit 2 fällt bei einer mRNA Konzentration von 1µg eine cDNA Produktion von nur 23801 (±9053) Kopienzahlen auf. Dies führt zu einer deutlichen Linearitätsabweichung.

#### 4.1.1.2 PPIA



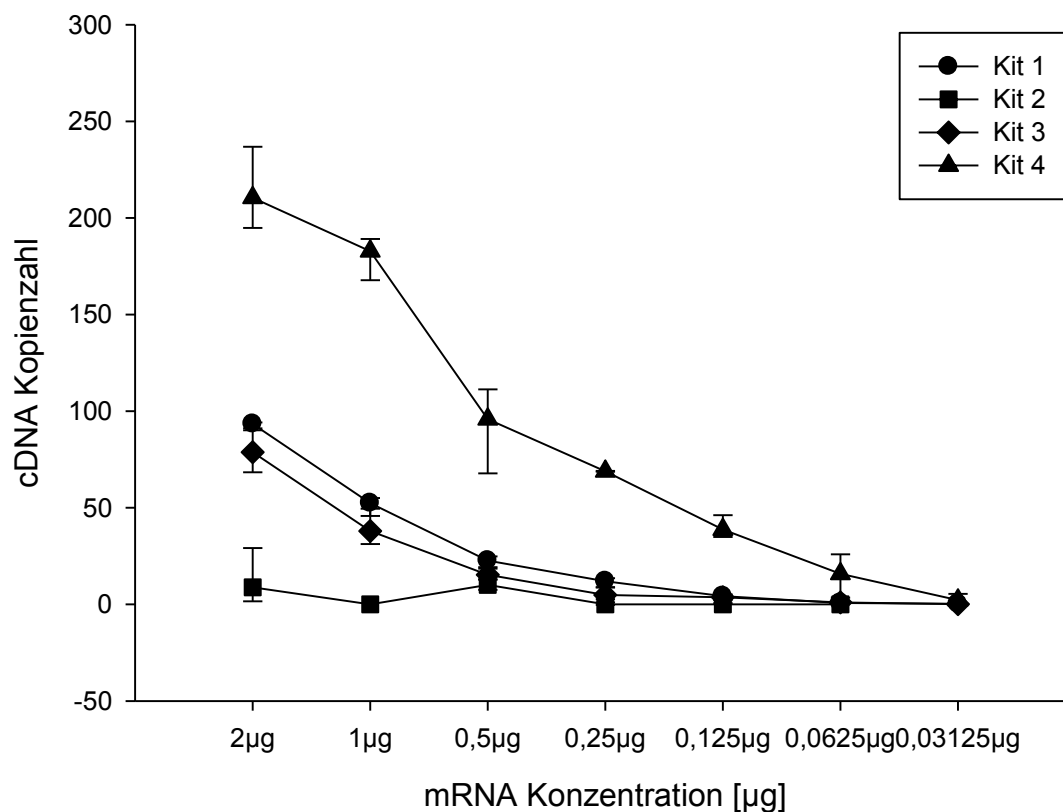
**Abbildung 4.1.1.2:** Vergleich der cDNA Kopienzahl pro Kit für festgelegte mRNA Konzentrationen von PPIA. Die bei den jeweiligen Kits gemessenen cDNA Kopienzahlen für die entsprechende mRNA Konzentration sind als Mittelwert und Standardabweichung dargestellt. Durch Verbindung der einzelnen Messwerte zu einer Kurve wird bei fast allen Kits eine nahezu lineare Korrelation deutlich.

Für PPIA weist Kit 2 für alle mRNA Konzentrationen eine signifikant höhere cDNA Kopienzahl auf gegenüber den restlichen Kits. Besonders bei einer mRNA Konzentration von 2 µg ist die cDNA Kopienzahl bis zu achtfach erhöht gegenüber den übrigen Transkriptasen. Des Weiteren bestehen bei dieser Konzentration auch signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Kits, lediglich die Differenz zwischen Kit 3 und 4 ist nicht signifikant, wie auch bei den restlichen mRNA Konzentrationen. Im Verlauf bleibt die cDNA Kopienzahl bei Kit 2 signifikant höher als bei den übrigen Kits, welche sich nicht relevant von einander unterscheiden. Die



Korrelation zwischen mRNA Konzentration und cDNA Kopienzahl ist innerhalb der einzelnen Kits weitgehend linear.

#### 4.1.1.3 iNOS

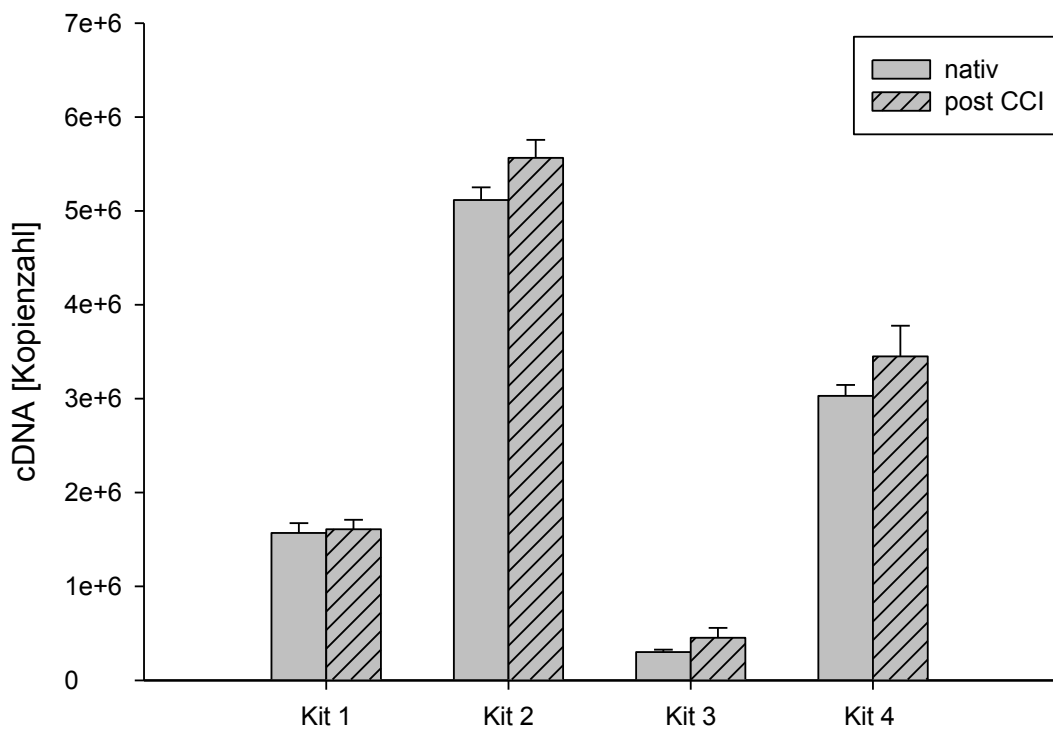


**Abbildung 4.1.1.3:** Vergleich der cDNA Kopienzahl pro Kit für festgelegte mRNA Konzentrationen von iNOS. Die bei den jeweiligen Kits gemessenen cDNA Kopienzahlen für die entsprechende mRNA Konzentration sind als Mittelwert und Standardabweichung dargestellt. Eine lineare Korrelation ist hier nur noch bei starker Extrapolation der Daten vermutbar.

Die synthetisierte cDNA Kopienzahl liegt für iNOS im extrem niedrigen Bereich von unter 250. Eine lineare Korrelation zwischen eingesetzter mRNA Konzentration und der cDNA Kopienzahl ist nur für Kit 1 und 3 nachweisbar.

Signifikante Unterschiede bestehen zwischen Kit 4 und den restlichen Kits im Konzentrationsbereich von 2  $\mu\text{g}$  bis 0,125  $\mu\text{g}$ . Zwischen Kit 1 und 2 bestehen bei 2  $\mu\text{g}$ , 1  $\mu\text{g}$  und 0,25  $\mu\text{g}$  statistisch relevante Differenzen, ebenso für Kit 1 und 3 bei 2  $\mu\text{g}$  bzw. 1  $\mu\text{g}$ .

#### 4.1.1.4 PPIA nativ vs. post Trauma



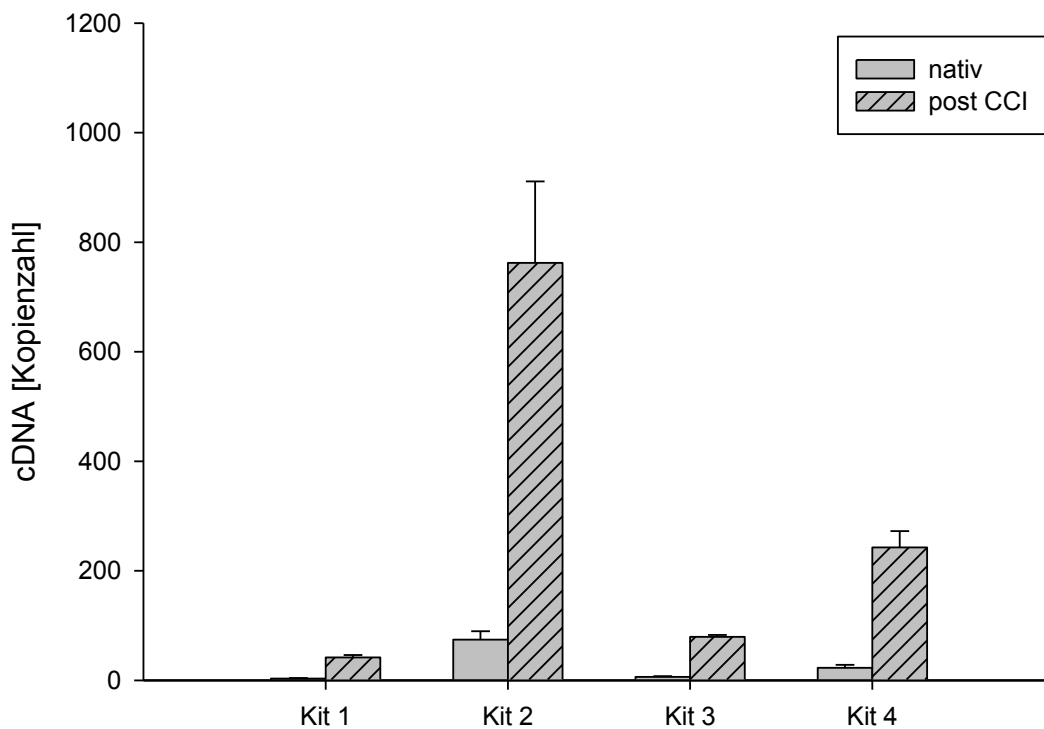
**Abbildung 4.1.1.4:** Vergleich der cDNA-Menge pro Kit für PPIA, jeweils nativ vs. post CCI bei Einsatz gleicher mRNA-Menge. Dargestellt sind Mittelwerte als Säulendiagramme einschließlich Standardabweichung. Die aus allen nativen bzw. traumatisierten Tieren gepoolte mRNA wurde in exakt der gleichen Menge mit dem jeweiligen Kit in cDNA transkribiert und anschließend quantifiziert. Dabei werden deutliche Unterschiede zwischen der Menge an produzierter cDNA zwischen den vier Kits sichtbar.

Abbildung 4.1.1.4 zeigt für jedes der vier verwendeten Kits die jeweils synthetisierte Menge an PPIA-cDNA sowohl für aus nativen Tieren gewonnene Proben als auch aus posttraumatischen Tieren. Für die nativen Proben sind die Unterschiede zwischen den einzelnen Kits signifikant, der größte Unterschied besteht zwischen Kit 2 und 3, mit einer nahezu 17fach größeren cDNA-Produktion im Kit 2.

Ähnliche Ergebnisse liefern die Proben aus posttraumatischen Tieren. Auch hier sind die Differenzen zwischen den Kits statistisch signifikant, der Unterschied zwischen Kit 2 und Kit 3 beträgt Faktor 12.

Vergleicht man innerhalb der jeweiligen Kits die Differenz zwischen nativen und posttraumatischen Tieren, so findet man nur in Kit 2 und 4 einen statistisch signifikanten Unterschied. Bei beiden Kits steigt die cDNA-Menge bei den posttraumatischen Tieren im Vergleich zu den nativen Tieren um den Faktor 1,1.

#### 4.1.1.5 iNOS nativ vs. post Trauma



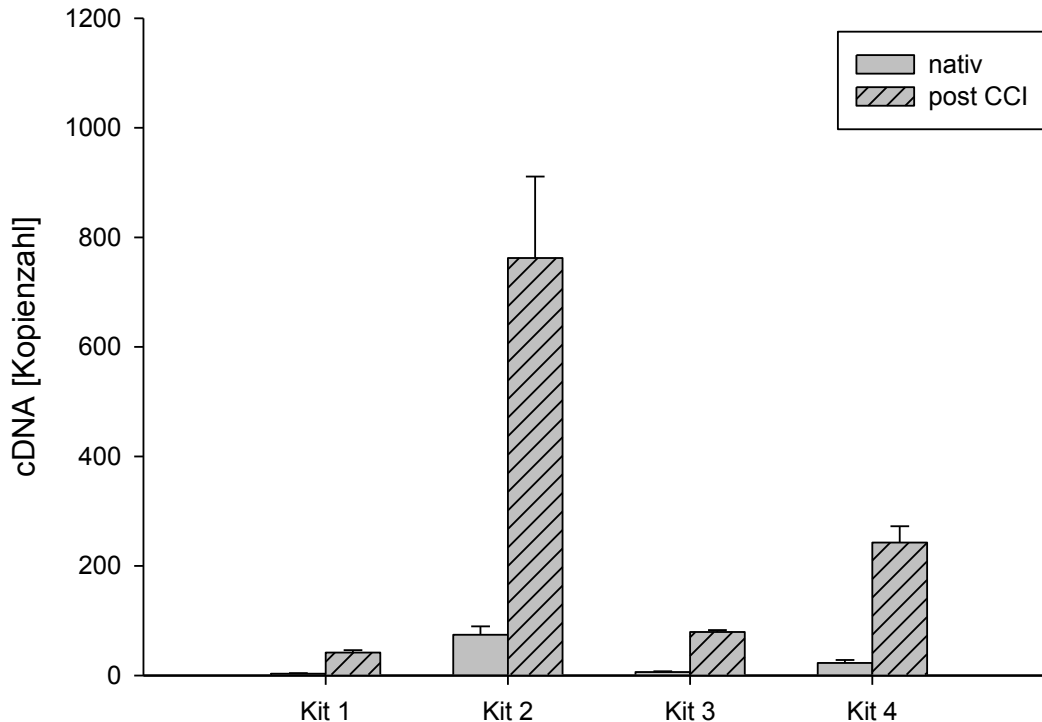
**Abbildung 4.1.1.5:** Vergleich der cDNA-Menge pro Kit für iNOS, jeweils nativ vs. post CCI bei Einsatz gleicher mRNA-Menge. Dargestellt sind Mittelwerte als Säulendiagramme einschließlich Standardabweichung. Die aus allen nativen bzw. traumatisierten Tieren gepoolte mRNA wurde in exakt der gleichen Menge mit dem jeweiligen Kit in cDNA transkribiert und anschließend quantifiziert. Gerade bei iNOS als Vertreter für Proteine mit niedriger Expressionsrate werden deutliche Unterschiede im Vergleich zwischen den 4 Kits sichtbar.

Abbildung 4.1.1.5 zeigt unter den nativen Tieren signifikante Unterschiede zwischen Kit 2 und den restlichen Kits sowie zwischen Kit 4 und den Kits 1 und 3. Kit 2 produziert die 26-fache Menge an cDNA im Vergleich zu Kit 1.

Auch bei den posttraumatischen Tieren sind die Unterschiede zwischen Kit 2 und den restlichen Kits sowie zwischen Kit 4 und den Kits 1 und 3 statistisch relevant. Ebenfalls ist hier die Differenz an produzierter cDNA-Menge zwischen Kit 1 und 2 am größten, und zwar um den Faktor 18.

Im Einzelvergleich der Kits ist jeweils ein signifikanter Unterschied zwischen den nativen und den post CCI Tieren zu sehen. Den größten Unterschied zeigt Kit 1. Hier ist die iNOS cDNA-Kopienzahl 15-fach größer bei den posttraumatischen Tieren im Vergleich zu den nativen Tieren. Bei Kit 2 und 4 beträgt er den Faktor 11, bei Kit 3 den Faktor 13.

#### 4.1.1.6 IL1 $\beta$ nativ vs. post Trauma

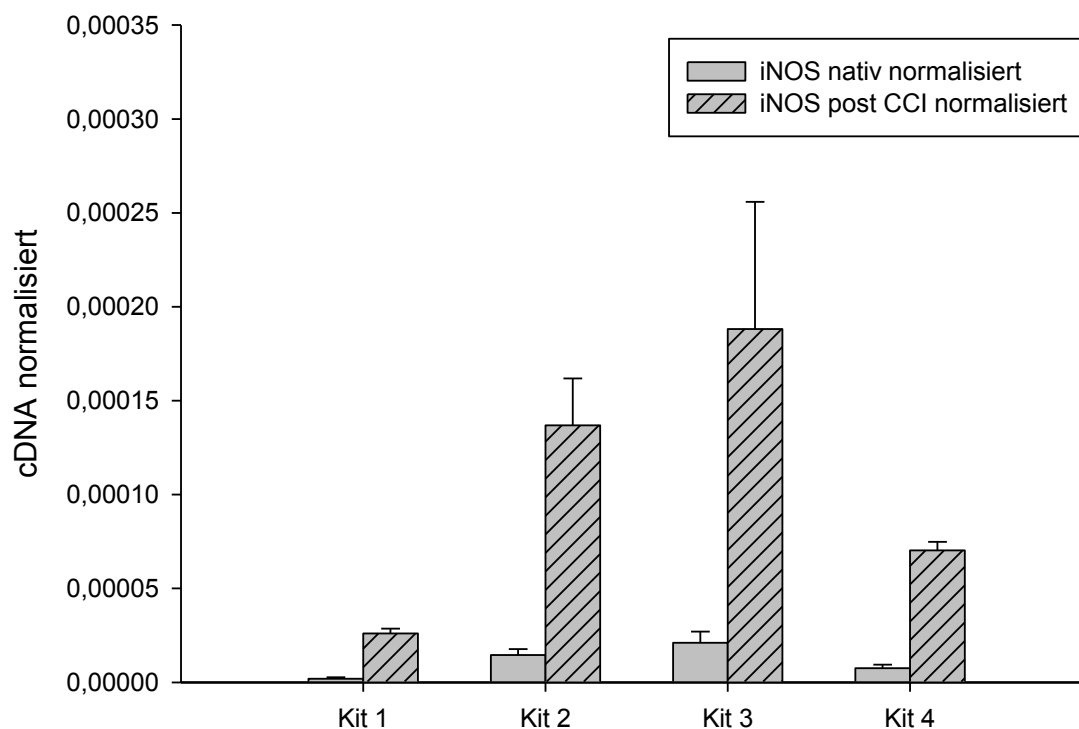


**Abbildung 4.1.1.6:** Vergleich der cDNA-Menge pro Kit für IL1 $\beta$ , jeweils nativ vs. post CCI bei Einsatz gleicher mRNA-Menge. Dargestellt sind Mittelwerte als Säulendiagramme einschließlich Standardabweichung. Die aus allen nativen bzw. traumatisierten Tieren gepoolte mRNA wurde in exakt der gleichen Menge mit dem jeweiligen Kit in cDNA transkribiert und anschließend quantifiziert. Es wird deutlich, dass IL1 $\beta$  deutlich hochreguliert wird, gleichzeitig werden starke Unterschiede zwischen den Kits dargestellt.

Die nativen sowie die post CCI Proben weisen zwischen Kit 2 und den restlichen Kits, zwischen Kit 4 und den Kits 1 und 3 sowie zwischen Kit 1 und 3 statistische Signifikanz auf.

Auch die Differenzen innerhalb der jeweiligen Kits im Vergleich der nativen bzw. posttraumatischen Tiere sind statistisch signifikant. Bei Kit 1 steigt die IL1 $\beta$  cDNA-Kopienzahl um den Faktor 43, bei Kit 2 um Faktor 32, bei Kit 3 um Faktor 47 und bei Kit 4 um den Faktor 43.

#### 4.1.1.7 iNOS normalisiert mittels PPIA



**Abbildung 4.1.1.7:** Vergleich der cDNA-Menge pro Kit für iNOS, jeweils nativ vs. post CCI bei Einsatz gleicher mRNA-Menge und Normalisierung durch PPIA. Dargestellt sind Mittelwerte als Säulendiagramme einschließlich Standardabweichung. Trotz Normalisierung auf die Expression eines nichtregulierten Housekeeping-Genes und Messung der Expression beider Gene mit dem jeweils gleichen Kit kommt es zu sehr unterschiedlichen cDNA Mengen zwischen den jeweiligen Kits.

Abbildung 4.1.1.7 stellt die aus nativen bzw. posttraumatischen Tieren mit den verschiedenen Kits synthetisierte Menge an iNOS cDNA dar, welche durch Division mit dem jeweiligen Wert an PPIA cDNA normalisiert wurde. Statistisch signifikant sind folgende Unterschiede:

Native Proben:

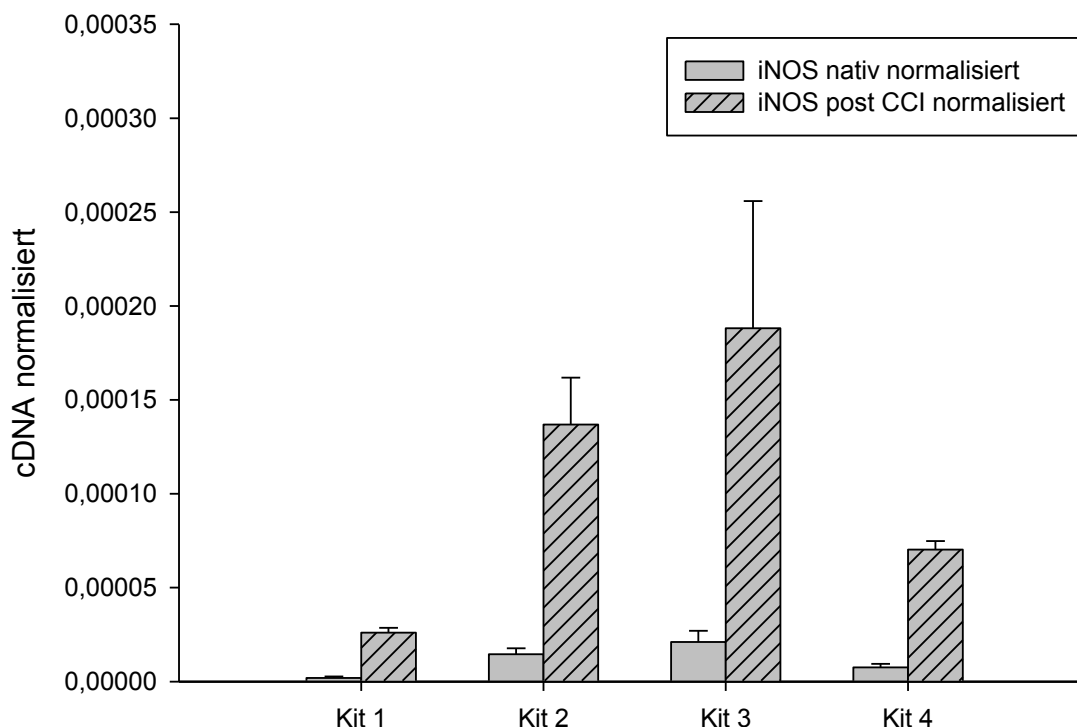
- Kit 3 gegenüber Kit 1 und 4
- Kit 2 gegenüber Kit 1 und 4

Post CCI Proben:

- Kit 3 gegenüber Kit 1 und 4
- Kit 2 gegenüber Kit 1

Vergleicht man für die einzelnen Kits die cDNA-Kopienzahl der nativen Tiere mit den Tieren nach CCI, so sind die Veränderungen bei allen 4 Kits statistisch signifikant. Bei Kit 1 erfolgt eine Zunahme um Faktor 15, bei Kit 2 um Faktor 10, bei Kit 3 um Faktor 9 und bei Kit 4 um Faktor 7.

#### 4.1.1.8 *IL1 $\beta$ normalisiert mittels PPIA*

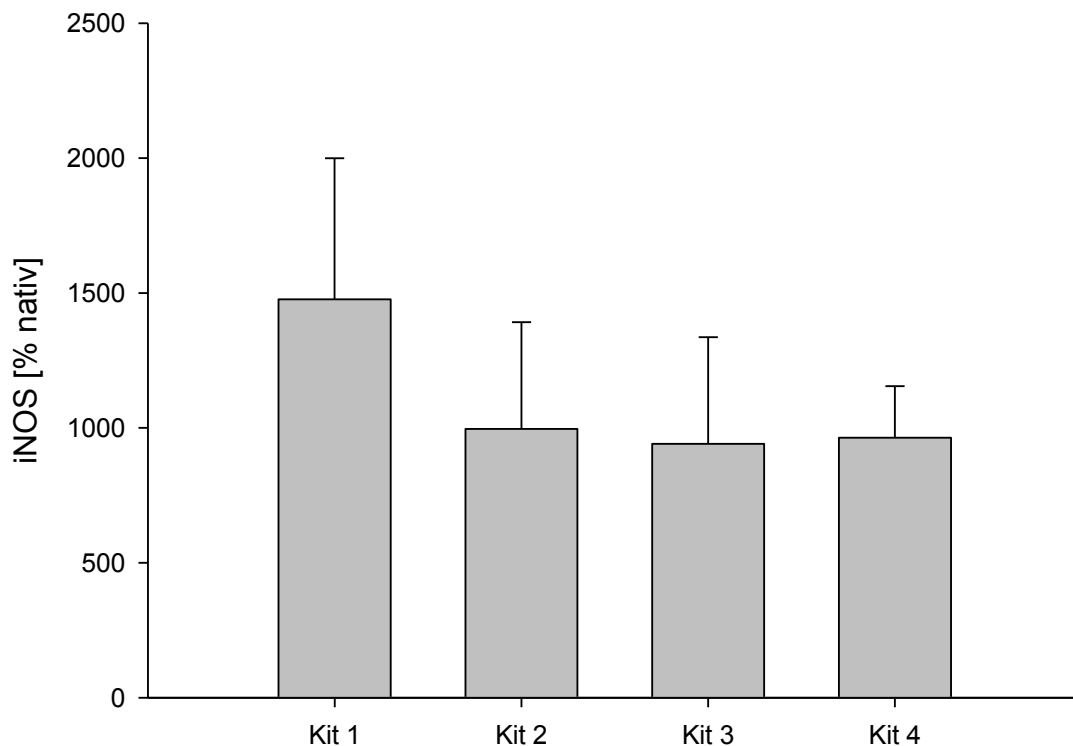


**Abbildung 4.1.1.8:** Vergleich der cDNA-Menge pro Kit für *IL1 $\beta$* , jeweils nativ vs. post CCI bei Einsatz gleicher mRNA-Menge und Normalisierung durch PPIA. Darstellt sind Mittelwerte als Säulendiagramme einschließlich Standardabweichung. Trotz Normalisierung auf die Expression eines nichtregulierten Housekeeping-Genes und Messung der Expression beider Gene mit dem jeweils gleichen Kit kommt es auch bei diesem stark exprimierten Inflammationsenzym zu deutlichen Unterschieden zwischen den Kits.

Abbildung 4.1.1.8 zeigt die gemessene cDNA Produktion von *IL1 $\beta$* , welche ebenfalls mittels PPIA normalisiert wurde. Statistisch relevant ist bei den nativen Proben allein Kit 3 gegenüber den restlichen Kits. Bei den posttraumatischen Tieren ist lediglich Kit 3 gegenüber den Kits 1 und 2 signifikant unterschiedlich.

Bei allen Proben kommt es beim direkten Vergleich der mit demselben Kit gemessenen nativen bzw. posttraumatischen Tiere zu signifikanten Anstiegen der *IL1 $\beta$*  cDNA. Der Anstieg beträgt bei Kit 1 den Faktor 42, bei Kit 2 Faktor 29, bei Kit 3 Faktor 33 und bei Kit 4 Faktor 38.

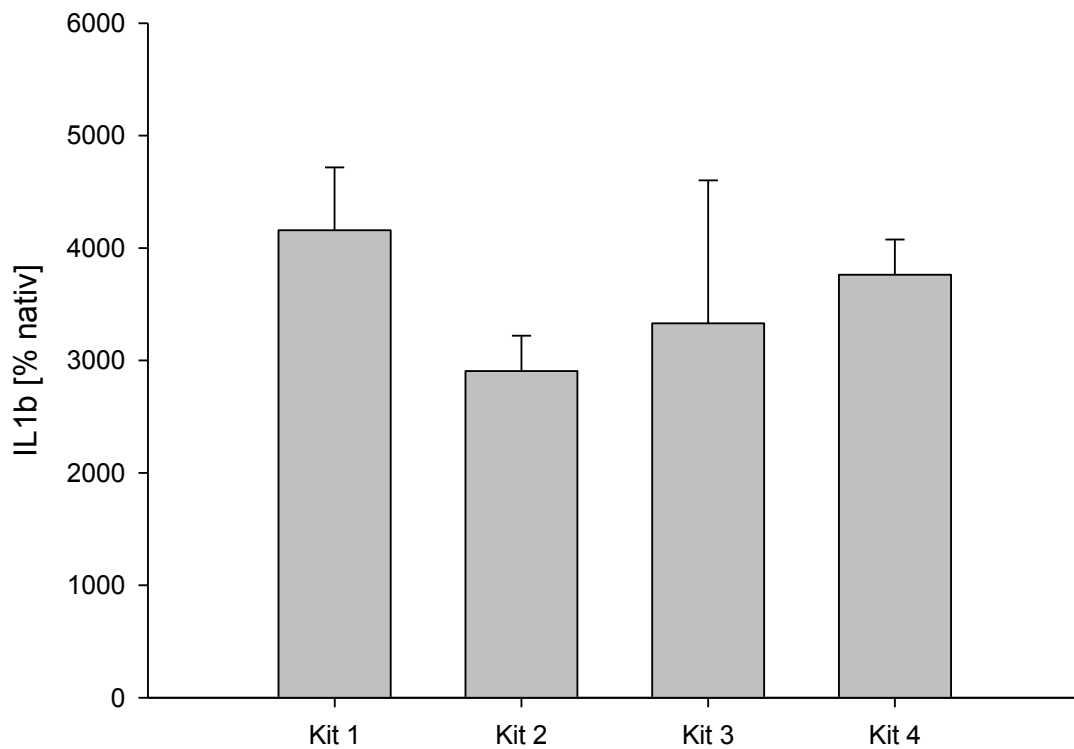
#### 4.1.1.9 iNOS Expressionsveränderung



**Abbildung 4.1.1.9:** Vergleich der cDNA-Menge pro Kit für iNOS bei Einsatz der gleichen mRNA-Menge pro Kit, Normalisierung durch PPIA und Division der Ergebnisse post CCI / nativ x 100. Dargestellt sind Mittelwerte als Säulendiagramme einschließlich Standardabweichung. Bei Normalisierung der gemessenen cDNA-Menge des jeweiligen Kits und anschließender prozentualer Darstellung des Ergebnisses post CCI zum nativen Tier sind die Ergebnisse aller Kits miteinander vergleichbar.

Abbildung 4.1.1.9 stellt die Expressionsveränderung von iNOS für die einzelnen Kits dar. Zur Berechnung wurden die vorher gezeigten normalisierten Werte von iNOS nativ und iNOS post-CCI miteinander dividiert und mit 100 multipliziert. Die Unterschiede zwischen den jeweiligen Kits sind nicht statistisch signifikant.

#### 4.1.1.10 IL1 $\beta$ Expressionsveränderung



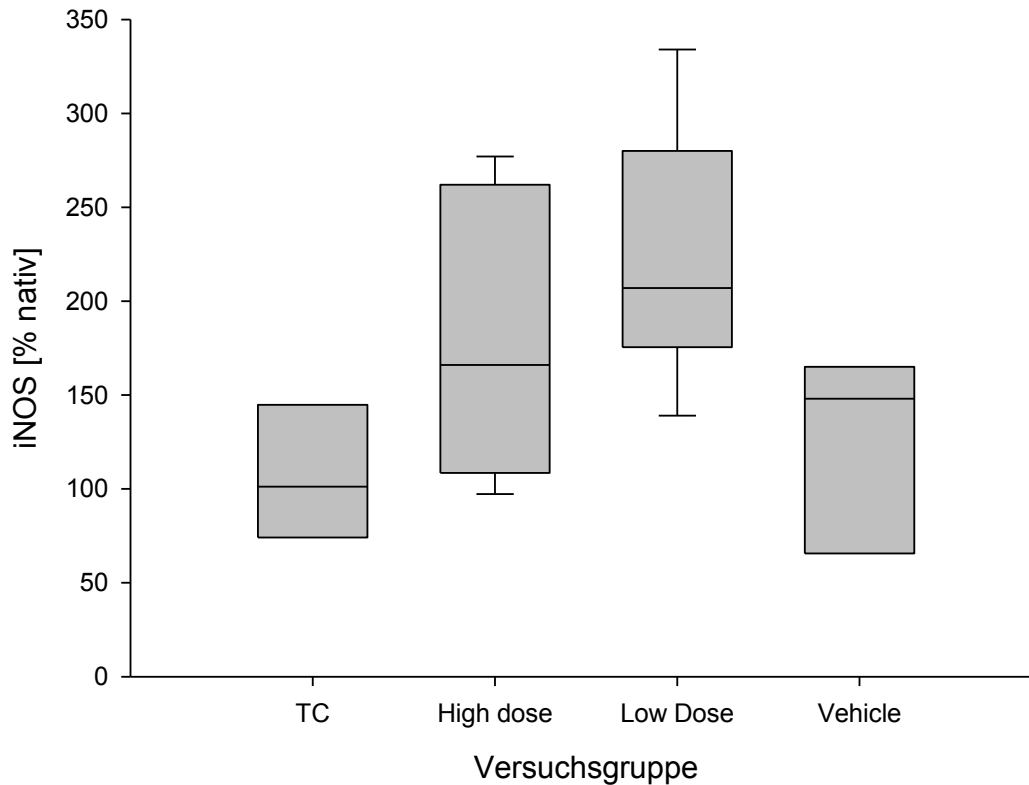
**Abbildung 4.1.1.10:** Vergleich der cDNA-Menge pro Kit für IL1 $\beta$  bei Einsatz der gleichen mRNA-Menge pro Kit, Normalisierung durch PPIA und Division der Ergebnisse post CCI / nativ x 100. Dargestellt sind Mittelwerte als Säulendiagramme einschließlich Standardabweichung. Auch IL1 $\beta$  zeigen in dieser Darstellung die verschiedenen Kits vergleichbare Ergebnisse.

Auch bei IL1 $\beta$  ist die Expressionsveränderung beim Vergleich der vier Kits nicht signifikant.



## 4.1.2 Inflammationsparameter nach CCI

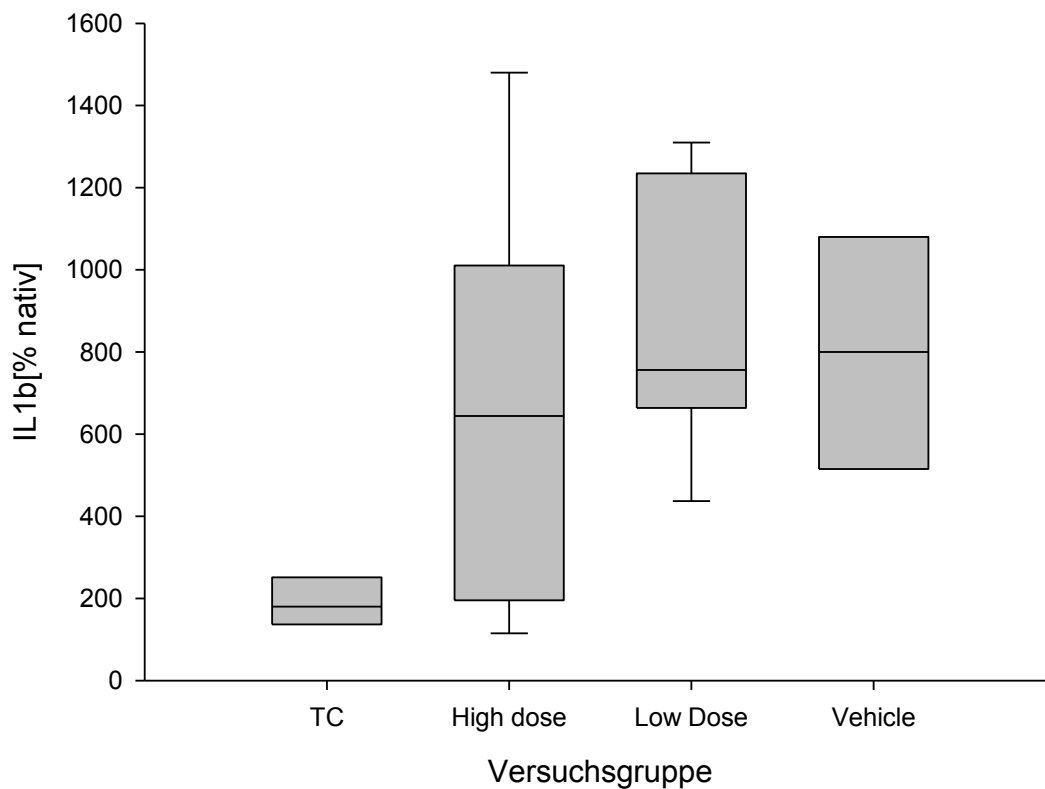
### 4.1.2.1 iNOS Expressionsveränderung



**Abbildung 4.1.2.1:** Vergleich der cDNA-Menge der verschiedenen Versuchsgruppen für iNOS bei Normalisierung durch PPIA und Division der Ergebnisse post CCI / nativ  $\times 100$ . Graphische Darstellung als Boxplot mit Mittelwert, obere und untere Quartile sowie Standardabweichung. Die LD-Gruppe weist eine signifikant höhere Expression als die TC- bzw. die Vehicle-Gruppe ( $p = 0,007$  bzw.  $0,025$ ) auf.

Abbildung 4.1.2.1 stellt die Ergebnisse der molekularbiologischen iNOS-Expressionsmessung als Box-Plots dar. Dabei wurden die absoluten Cp von iNOS gegen die PPIA-Cp normalisiert und das Ergebnis als Prozent der Nativgruppe dargestellt. Die höchste Expressionsrate mit durchschnittlich  $221,11 (\pm 63,86) \%$  weist demnach die Low Dose-Gruppe auf, gefolgt von  $175,92 (\pm 74,37) \%$  in der HD-Gruppe,  $126,49 (\pm 46,20) \%$  in der V-Gruppe und  $115,09 (\pm 49,74) \%$  in der TC-Gruppe. Der Anstieg zwischen der LD- und der TC-Gruppe sowie zwischen der LD- und der V-Gruppe ist statistisch signifikant ( $p = 0,007$  bzw.  $0,025$ ). Zwischen der HD-Gruppe und den restlichen Gruppen besteht kein signifikanter Unterschied.

#### 4.1.2.2 IL1 $\beta$ Expressionsveränderung

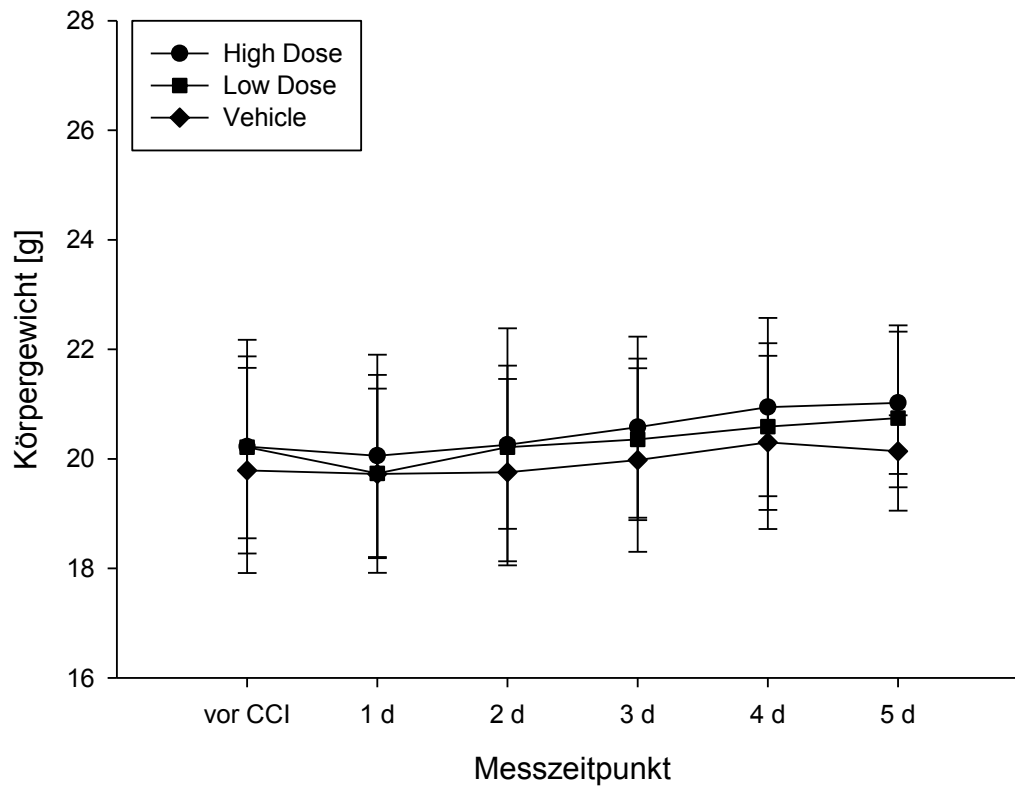


**Abbildung 4.1.2.2:** Vergleich der cDNA-Menge der verschiedenen Versuchsgruppen für IL1 $\beta$  bei Normalisierung durch PPIA und Division der Ergebnisse post CCI / nativ  $\times$  100. Dargestellt als Boxplot mit Mittelwert, obere und untere Quartile sowie Standardabweichung. Die LD-Gruppe weist eine signifikant höhere Expression als die TC- bzw. die Vehicle-Gruppe ( $p = 0,007$  bzw.  $0,025$ ) auf. In allen 3 Versuchsgruppen kommt es zu einer deutlichen Expressionszunahme gegenüber der TC-Gruppe

Abbildung 4.1.2.2 stellt die prozentualen Anstiege der mRNA-Expression für IL1 $\beta$  dar. Auch hier wurde das Zielgen gegen PPIA normalisiert. Die höchste Expressionsrate erreicht auch in diesem die LD-Gruppe mit 879,22 ( $\pm$  310,82) %, gefolgt von der V-Gruppe mit 832,43 ( $\pm$ 367,59) % und der HD-Gruppe mit 673,11 ( $\pm$ 463,12) %. Die niedrigste Expressionsveränderung im Vergleich zu den anderen Versuchsgruppen weist die TC-Gruppe mit 190,00 ( $\pm$ 59.01) % auf ( $p = 0,007$ ). Die LD-Gruppe weist zwar die tendenziell höchste Expressionsrate auf, allerdings sind die Unterschiede zwischen HD-, LD-, und Vehicle-Gruppe statistisch nicht relevant.

## 4.2 Physiologische Parameter

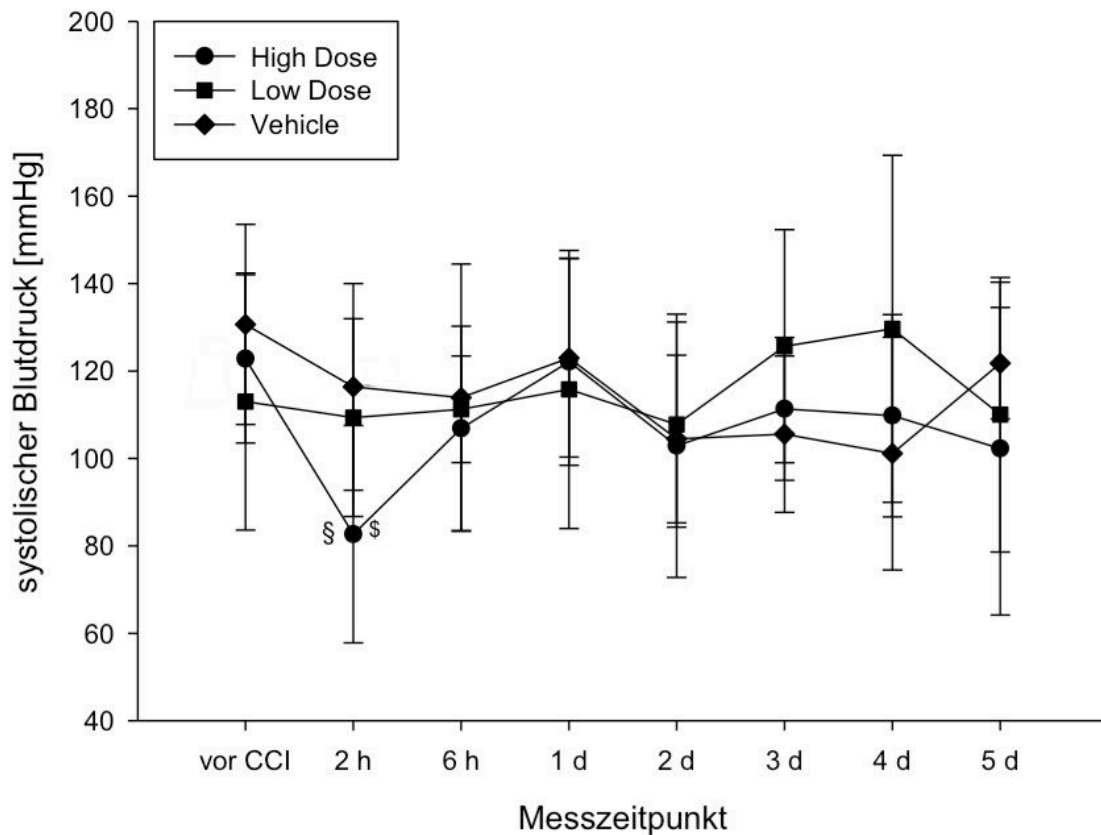
### 4.2.1 Körpergewicht



**Abbildung 4.2.1:** Körpergewicht der einzelnen Versuchsgruppen im Verlauf, gemessen vor CCI und anschließend täglich ab dem ersten postoperativen Tag. Darstellung jeweils als Mittelwert mit zugehöriger Standardabweichung. In allen Gruppen bleibt das Körpergewicht über die gesamte Versuchslaufzeit konstant;  $p > 0,05$ .

Das Körpergewicht blieb während der gesamten Versuchszeit weitgehend stabil bei Mittelwerten von 20,5 ( $\pm 1,7$ ) g in der High Dose-Gruppe, 20,3 ( $\pm 1,5$ ) g in der Low Dose-Gruppe und 19,9 ( $\pm 1,5$ ) g in der Vehicle-Gruppe. Es kam weder innerhalb noch zwischen den Versuchsgruppen zu signifikanten Veränderungen.

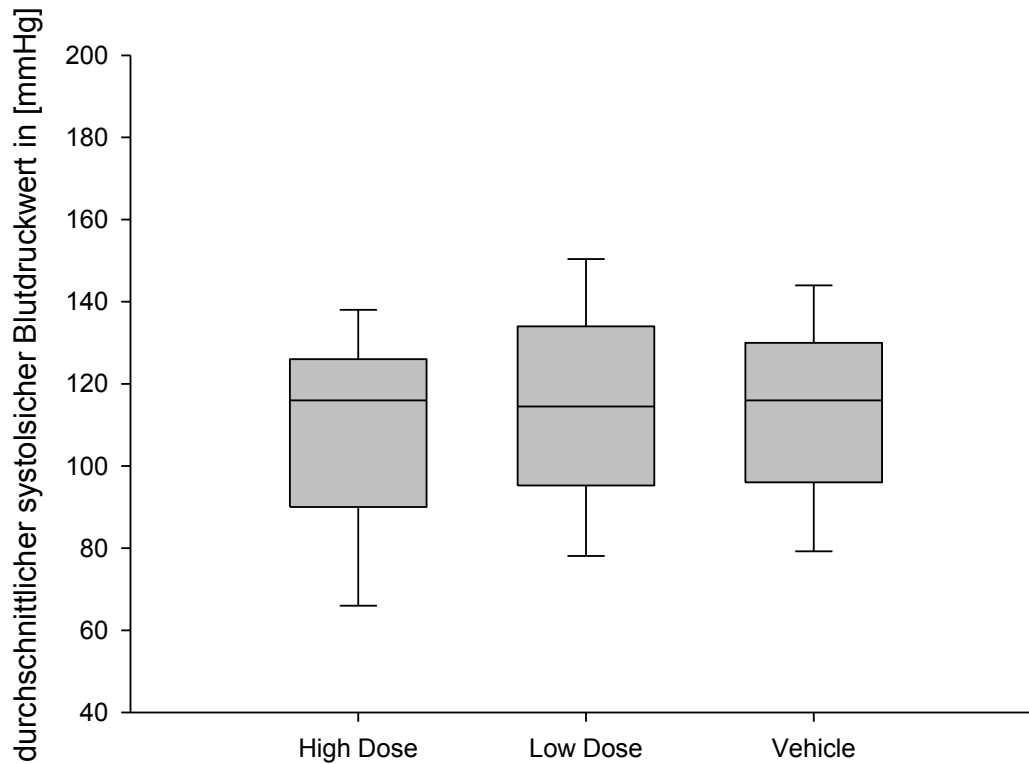
## 4.2.2 Blutdruck



**Abbildung 4.2.2 A:** Systolischer Blutdruck der verschiedenen Versuchsgruppen im zeitlichen Verlauf, gemessen vor CCI, 2 h und 6 h nach CCI sowie täglich ab dem ersten postoperativen Tag. Darstellung jeweils als Mittelwert mit zugehöriger Standardabweichung. Der Blutdruck bleibt in allen Versuchsgruppen weitgehend konstant, mit Ausnahme der 2h nach CCI in der HD-Gruppe gemessenen Werte. Hier kommt es zu einem signifikanten Blutdruckabfall, sowohl verglichen mit dem Blutdruck vor CCI innerhalb der Gruppe (§,  $p = 0,039$ ) als auch im Vergleich zum 2 h nach CCI gemessenen Durchschnittswert der restlichen Versuchsgruppen (§,  $p = 0,012$ ).

Abbildung 4.2.2 A zeigt im zeitlichen Verlauf die gemessenen systolischen Blutdruckwerte. Während es weder in der Low Dose- noch in der Vehicle-Gruppe zu signifikanten Veränderungen des Blutdrucks kommt, stellt sich in der High Dose-Gruppe ein signifikanter Einbruch des Blutdrucks von 122 ( $\pm 19$ ) mmHg, gemessen vor CCI, auf 82 ( $\pm 24$ ) mmHg, gemessen zwei Stunden nach CCI, dar (§). Im weiteren Verlauf kommt es jedoch zu keiner statistisch relevanten Abweichung der gemessenen Blutdruckwerte vom Ausgangswert.

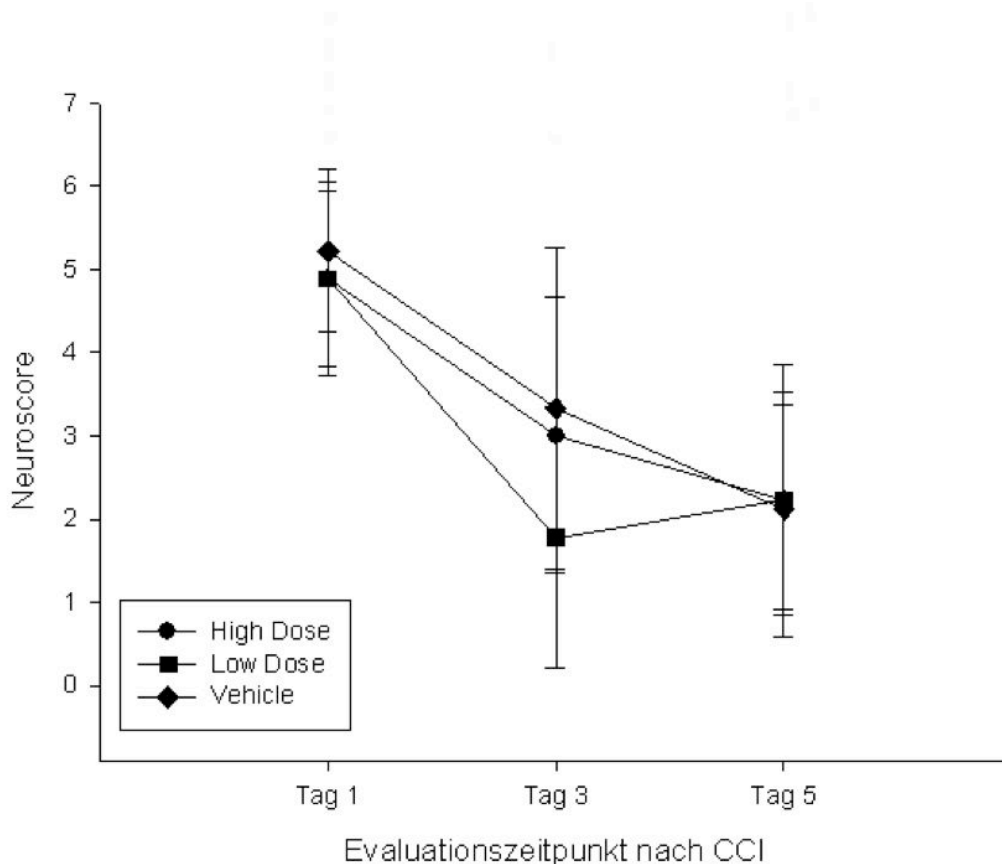
Zwischen den Versuchsgruppen kommt es zwei Stunden nach Durchführung der Op zu einem signifikanten Unterschied zwischen der High Dose- mit 83 ( $\pm 25$ ) mmHg und der Vehicle-Gruppe mit 116 ( $\pm 24$ ) mmHg (§). Im weiteren Vergleich zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den drei Gruppen.



**Abbildung 4.2.2 B:** Durchschnittlicher systolischer Blutdruckwert der drei Versuchsgruppen, gemittelt aus allen 7 Messungen nach CCI pro Tier in den jeweiligen Versuchsgruppen. Dargestellt als Boxplot mit Mittelwert, obere und untere Quartile sowie Standardabweichung. Zwischen den einzelnen Versuchsgruppen ist kein signifikanter Blutdruckunterschied messbar;  $p > 0,05$ .

In Abbildung 4.2.2 B sind die mittleren Blutdruckwerte der verschiedenen Versuchsgruppen dargestellt, gemessen ab der ersten C21-Applikation, welche zwei Stunden nach CCI erfolgten. Diese liegen bei  $107 (\pm 27)$  mmHg in der High Dose-,  $116 (\pm 28)$  mmHg in der Low Dose- und  $115 (\pm 24)$  mmHg in der Vehicle-Gruppe. Die Unterschiede sind statistisch nicht signifikant.

### 4.3 Neuroscore



**Abbildung 4.3:** Neuroscore der verschiedenen Versuchsgruppen im Vergleich, gemessen am 1., 3. und 5. Tag nach CCI. Darstellung jeweils als Mittelwert mit zugehöriger Standardabweichung. Während zwischen den 3 Versuchsgruppe keine signifikanten Unterschiede auftraten, ist innerhalb der einzelnen Gruppen jeweils eine relevante Abnahme der Punktzahl zu verzeichnen; jeweils  $p < 0,05$ .

Die an Tag 1, 3 und 5 nach CCI durchgeführte neurologische Evaluation ist in Abbildung 4.2 dargestellt. Die Y-Achse zeigt die am jeweiligen Messzeitpunkt erreichte Punktzahl.

In allen drei Versuchsgruppen zeigt sich eine neurologische Erholung im zeitlichen Verlauf. Von statistischer Relevanz sind folgende Veränderungen innerhalb der jeweiligen Versuchsgruppe:

1. High Dose-Gruppe:

Zwischen Tag 1 und Tag 3 kommt es zu einer Verringerung der Punktzahl von 4,9 ( $\pm 1,2$ ) Punkten auf 3,0 ( $\pm 1,7$ ) Punkte ( $p = 0,021$ ). Die Verbesserung von Tag 1 auf Tag 5 mit 2,2 ( $\pm 1,3$ ) Punkten ist ebenfalls relevant ( $p = 0,001$ ), während der Vergleich zwischen Tag 3 und Tag 5 nicht signifikant ist.

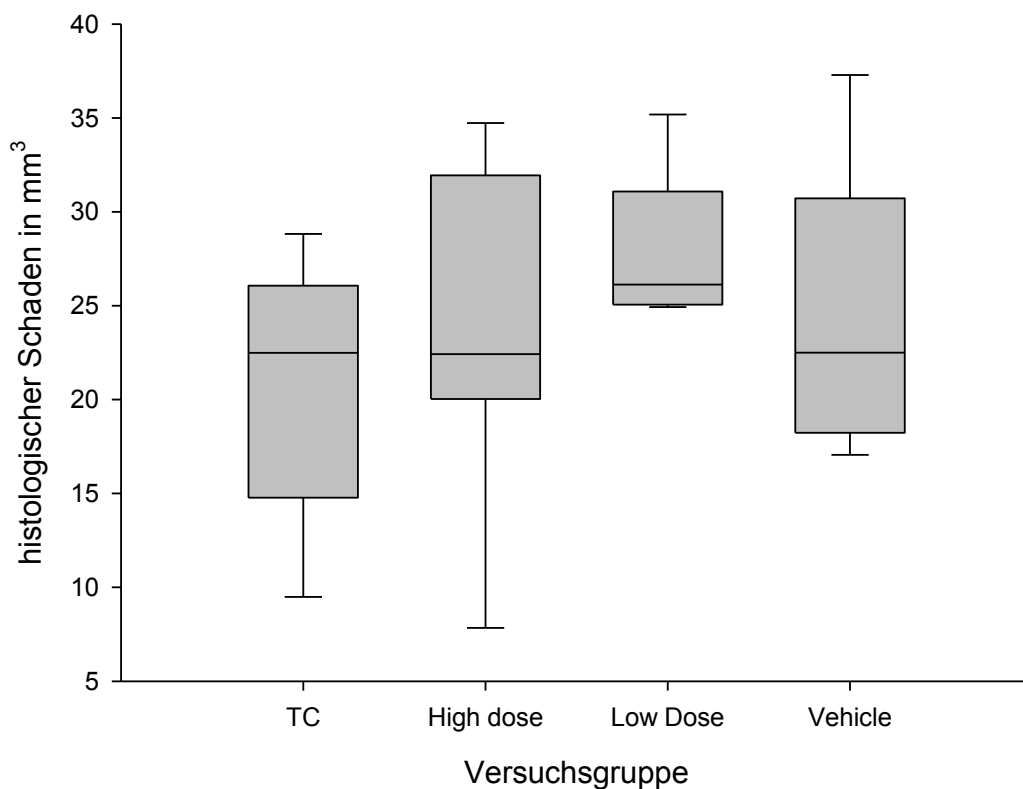
## 2. Low Dose-Gruppe:

Auch hier sind die Veränderungen zwischen Tag 1 und Tag 3 von 4,9 ( $\pm 1,2$ ) Punkten auf 1,8 ( $\pm 1,6$ ) Punkte  $p = < 0,001$ ), sowie die Unterschiede zwischen Tag 1 und Tag 5 mit 2,2 ( $\pm 1,6$ ) Punkten signifikant ( $p = 0,002$ ).

## 3. Vehicle-Gruppe:

Von statistischer Relevanz ist in dieser Versuchsgruppe die Verringerung der Punktzahl von Tag 1 mit 5,2 ( $\pm 1,0$ ) Punkten auf 2,1 ( $\pm 0,4$ ) Punkte an Tag 5 ( $p = 0,002$ ).

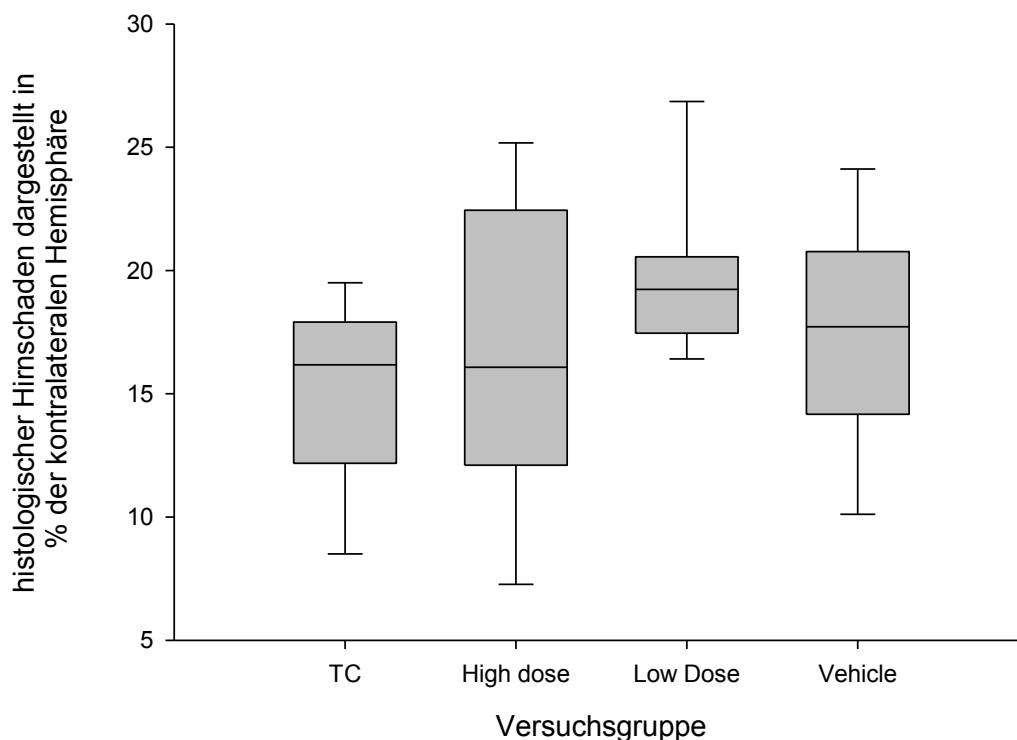
## 4.4 Histologie



**Abbildung 4.4 A:** Histologisch bestimmte Schadensvolumina einzelnen Versuchsgruppen im Vergleich. Dargestellt als Boxplot mit Mittelwert, obere und untere Quartile sowie Standardabweichung. Zwischen den einzelnen Versuchsgruppen ist kein signifikanter Unterschied messbar. Das Schadensvolumen entspricht der jeweiligen Differenz des histologisch bestimmten Gesamtareals der rechten Seite abzüglich des ipsilateralen nichttraumatisierten Bereiches;  $p > 0,05$ .

Aufgrund eines Fehlers bei der histologischen Aufarbeitung der Gehirne, war es bei einem Teil des Gewebes nicht möglich verwertbare Hirnschnitte anzufertigen, sodass für den Hauptversuch nur ein Teil der histologischen Schnitte quantifiziert werden konnte.

Abbildung 4.4 A stellt den histologischen Schaden als Volumen in  $\text{mm}^3$  für die jeweilige Versuchsgruppe dar. Zwischen den einzelnen Versuchsgruppen mit Mittelwerten von  $22,43 (\pm 8,27) \text{ mm}^3$  in der High Dose-,  $26,13 (\pm 3,12) \text{ mm}^3$  in der Low Dose-,  $22,5 (\pm 2,36) \text{ mm}^3$  in der Vehicle- und  $22,49 (\pm 2,15) \text{ mm}^3$  in der Kontrollgruppe besteht kein statistisch signifikanter Unterschied.



**Abbildung 4.4 B:** Vergleich des histologischen Hirnschadens der einzelnen Versuchsgruppen nach Ödemkorrektur mittels Normalisierung des gemessenen Kontusionsvolumens auf die kontralaterale Hemisphäre und Darstellung des prozentualen Anteils. Graphische Aufbereitung als Boxplot mit Mittelwert, obere und untere Quartile sowie Standardabweichung. Zwischen den einzelnen Versuchsgruppen ist kein signifikanter Unterschied messbar;  $p > 0,05$ .

Abbildung 4.4 B stellt den histologischen Schaden nach rechnerischer Korrektur in Bezug auf das entstandene Hirnödem dar. Dazu wird das Kontusionsvolumen auf die kontralaterale Hirnseite normalisiert und prozentual Dargestellt.

Die Kontrollgruppe weist mit einem Hirnschaden von  $15,18 (\pm 3,56) \%$  das geringste Trauma auf, die Unterschiede zu den jeweiligen anderen Versuchsgruppen sind mit



prozentualen Kontusionsvolumina von 16,93 ( $\pm$  6,17) % bei der High Dose-, 19,67 ( $\pm$  3,07) % in der Low Dose- und 17,42 ( $\pm$  4,44) % in der Vehicle-Gruppe statistisch signifikant. Zwischen den letzten drei genannten Gruppen besteht kein signifikanter Unterschied.

## 5 Diskussion

### 5.1 Diskussion der Methodik

#### 5.1.1 Vorversuch - Bestimmung der optimalen Reversen Transkriptase

Seit Einführung der RT-PCR als neue Methode der Genexpressionsanalyse wurde sehr viel Forschungspotential in die Validierung und Optimierung dieses Verfahrens investiert. Gängige Praxis ist die Normalisierung unter Zuhilfenahme eines Housekeeping-Genes, welches als wichtigste Eigenschaft konstitutiv exprimiert sein muss und keinesfalls durch den Versuchsaufbau in seiner Expression beeinflusst werden darf (51). Die Verwendung der gleichen Menge an RNA je Probe, gleichen RT- und Versuchsbedingungen sowie die Normalisierung mittels eines Housekeeping-Genes gelten als Goldstandard einer validen real-time RT-PCR-Messung (52).

Diskutiert wird vor allem die Frage nach angemessenen Housekeeping-Genen (53), (54), da diese eine verlässliche, unveränderliche Größe für eine erfolgreiche Normalisierung bieten müssen. Für diese Studie wurde anhand der bereits als solche identifizierten Gene PPIA und  $\beta$ 2M (55) sowie die nichtkonstitutiv regulierten Inflammationsmarker iNOS und IL1 $\beta$ , die gängige Praxis im Hinblick auf die in der Hauptstudie anzuwendende Normalisierungsstrategie überprüft. Von speziellen Interesse war dabei, ob die Vorgehensweise der Normalisierung mittels Housekeeping-Genen ausreichend ist, um mögliche Effizienzvariationen bei der cDNA-Synthese von verschiedenen Zielgenen mit individuellen Expressionsraten innerhalb der gleichen Probe auszugleichen.

Für PPIA und  $\beta$ 2M, beides Gene mit einer hohen Kopienzahl, konnte für jedes der vier eingesetzten cDNA-Synthese-Kits eine lineare Korrelation zwischen der eingesetzten RNA-Menge und der gemessenen Kopienzahl feststellen. Lediglich Kit 2 wies bei einer mRNA-Konzentration von 1  $\mu$ g eine deutlich verminderte cDNA-Syntheseleistung auf. Ein versuchsbedingter Fehler konnte hierbei ausgeschlossen werden, da das Ergebnis mehrfach reproduzierbar war, für alle Kits die exakt gleiche mRNA in der jeweiligen Verdünnungsstufe eingesetzt wurde und die übrigen Konzentrationen einen absolut linearen Verlauf aufweisen. Die Arbeitsgruppe um Wernicke et al. berichtet ebenfalls von verminderten Syntheseleistungen bei Verdünnungsreihen, was, wie auch in diesem Fall, auf eine inhibitorische

Komponente innerhalb der Reaktion zurückgeführt werden könnte (56). Durch Anwendung der Gelelektrophorese wäre es möglich zu unterscheiden, ob diese Inhibition während der cDNA-Synthese oder der Light-Cycler-Messung stattfand, dies hätte jedoch den Umfang einer Voruntersuchung gesprengt.

Für PPIA zeigte sich dieser Effekt nicht, bei einer etwa zehnfach höheren Kopienzahl. Für iNOS wiesen wir ein deutlich anderes Ergebnis nach: Während die Kits 1 und 3 annähernd gleiche Syntheseleistungen und Linearitäten offenbarten, wies Kit 2 für dieses niedrigexprimierte Gen kaum eine Syntheseleistung auf. Kit 4 zeigte eine viel höhere, wenn auch nicht lineare Korrelation zwischen RNA und cDNA auf.

Es ergab sich nun die Frage, inwiefern sich unterschiedliche Linearitäten und damit Expressionseffektivitäten auf die Hauptstudie auswirken könnten.

Im Teil B des Vorversuches zeigte sich deutlich, dass

1. PPIA nach einem Trauma nur in sehr geringem Umfang hochreguliert wird und sich daher als Gen zur Normalisierung eignet,
2. die Expression sowohl von iNOS als auch von IL1 $\beta$  nach CCI sehr stark gesteigert wird,
3. die Normalisierung von diesen beiden Inflammationsmarkern mittels PPIA je nach eingesetztem Kit zu unterschiedlichen Ergebnissen führt.

Während die ersten beiden Punkte das erwartete Ergebnis widerspiegeln, deutete die extreme Ergebnisinkonstanz nach Normalisierung darauf hin, dass diese Strategie nicht den Effizienzfaktor der jeweiligen RT mit einbezog. Je nachdem welches Kit verwendet wurde, ergaben sich völlig unterschiedliche normalisierte Expressionsraten. Es erscheint daher nur möglich, die Expressionsveränderung in Prozent zu veranschaulichen, denn indem wir die gemessenen und mit einem Housekeeping-Gen normalisierten Werte prozentual zu den ebenso normalisierten Messungen nativer Tiere setzten, konnten wir diesen Faktor weitgehend eliminieren. Für alle vier Kits zeigten sich trotz der vorgenannten Unterschiede nahezu gleiche Veränderungen der Expressionsrate, sodass uns diese Darstellung geeignet schien, um die Ergebnisse der Hauptstudie auszuwerten. Aufgrund dieser Vorstudie entschieden wir uns ebenfalls, für die Hauptstudie Kit 1 zu verwenden. Dieses Kit erreicht nicht nur die höchste Korrelation zwischen der eingesetzten mRNA-Menge

und der synthetisierten cDNA-Menge, sondern es resultieren auch durchweg die niedrigsten Standardabweichungen.

Diese Ergebnisse gelten allerdings nur für die hier verwendeten Kombinationen aus den verschiedenen Kits und den PCR-Komponenten. Idealerweise sollten sowohl für die cDNA-Synthese als auch für die RT-PCR aufeinander abgestimmte Kits des gleichen Herstellers verwendet werden, um eine unerwünschte Interaktion miteinander zu verhindern. Daher ist nicht auszuschließen, dass bei Verwendung anderer Komponenten die gleichen Kits eine andere Syntheseeffizienz gezeigt hätten. Wir gehen jedoch aufgrund der Ergebnisse davon aus, dass auch dieser Effekt durch die beschriebene Normalisierungsstrategie minimiert werden kann.

Dieses Ergebnis zeigt jedoch auch, dass publizierte Daten, welche in Form von absoluten Kopienzahlen oder gegen Housekeeping-Gene normalisiert präsentiert werden, sehr schwer zu interpretieren und vor allem zu vergleichen sind. Die Effizienz der cDNA-Synthese ist für jedes Zielgen individuell verschieden. Durch die dargestellte lineare Effizienz für die verschiedenen mRNA-Konzentrationen ist es jedoch möglich, durch die beschriebene Normalisierungs- und Darstellungsweise miteinander vergleichbare Studienergebnisse zu produzieren.

#### 5.1.2 CCI als Model zur Darstellung des Schädel-Hirn-Traumas

Wie in Abbildung 5.1.2 verdeutlicht, gibt es zahlreiche Modelle zur Erforschung des SHT. Folgt man dem Schema, so bleibt im Bereich eines dynamischen, direkten Traumas bei fixiertem Kopf die Unterscheidung zwischen einem den Schädelknochen nicht penetrierenden Trauma und einem Penetrationstrauma. Modelle für erstere Vorgehensweise sind das „Controlled Concussion“- und das „Weight-Drop“-Modell. Bei diesen Modellen wird ein konstanter bzw. dynamischer Druck auf den geschlossenen Schädelknochen ausgeübt. Diese Modelle haben zwar Anwendung bei der Untersuchung der moderaten Hirnkontusion gefunden, sie sind jedoch wegen ihres Mechanismus eher zur Untersuchung des diffusen und nicht des fokalen Hirnschadens geeignet. Ein weiteres Problem ist die eingeschränkte Reproduzierbarkeit aufgrund der Alteration der mechanischen Kraft sowie die fehlende Vergleichbarkeit mit der Pathologie des SHT (57).

Im Bereich des schädelpenetrierenden Traumas gibt es vier Modelle:

- „Fluid Percussion“ (FP)

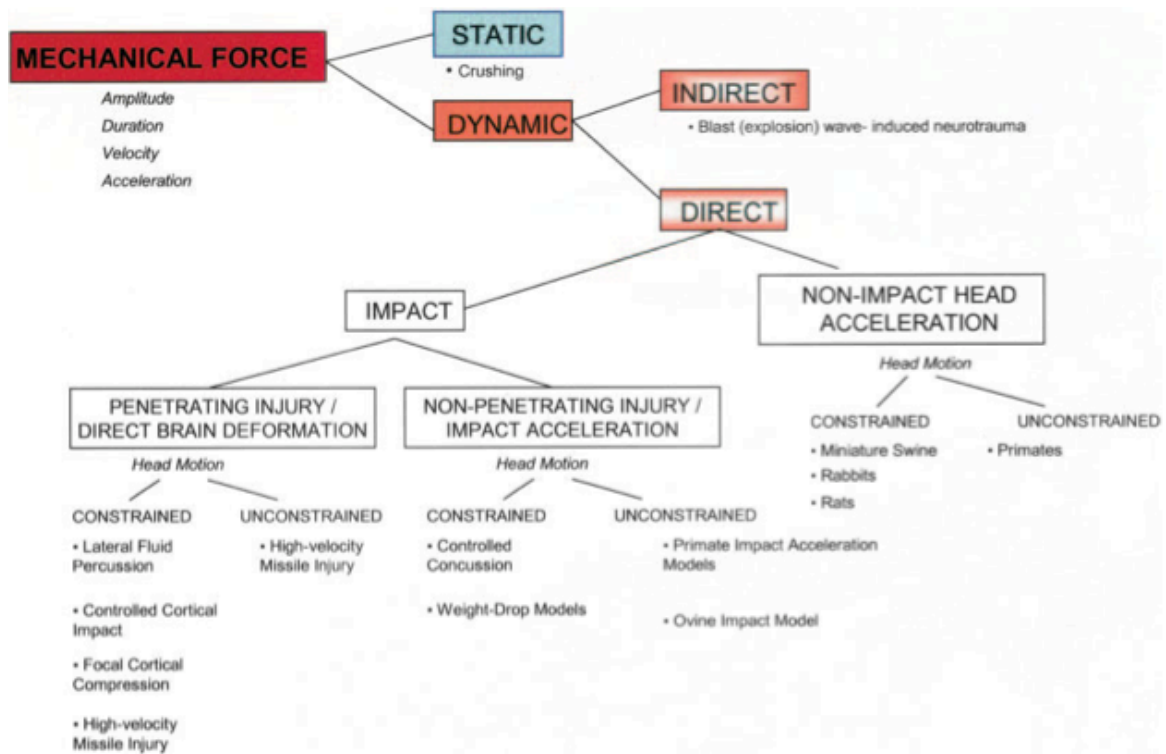
- „Focal Cortical Compression“ (FCC)
- „High-Velocity Missile Injury“ (HVMI)
- CCI

Das FP-Modell basiert auf einer Kraniotomie, welche eine direkte Druckausübung auf die Dura durch Applikation eines definierten Flüssigkeitsvolumens erlaubt. Dieses Modell ist sehr aufwendig und geht mit einer hohen Sterblichkeit einher, welche vor allem der Entwicklung eines neuronalen Lungenödems und der unverhältnismäßig hohen Hirnstammeteiligung bei geringer Hirnrindenkontusion zugeschrieben wird.

FCC-Modelle basieren auf einer stark fokal beschränkten Hirndeformation, wie etwa durch Erzeugung eines Vakuumpulses (58) oder der Injektion von Substanzen wie z.B. Makrophagenaktivatoren (59). Diese Modelle eignen sich allerdings nur zur Untersuchung stark regionaler Hirnschäden, da keine tiefergehenden Traumata erfolgen.

Beim HVMI-Modell handelt es sich um eine durapenetrierende Vorgehensweise, sodass dieses Modell für die Fragestellung dieser Studie ausscheidet.

Methode der Wahl für diese Studie war das CCI-Modell, welches eine sehr genaue Kontrolle der mechanischen Traumakomponenten erlaubt. Durch genaue Einstellung der Einschlaggeschwindigkeit und der Eindringtiefe ist es möglich, ein weitgehend definiertes Trauma im Bereich der Hirnrinde von hoher Reproduzierbarkeit zu erzeugen. Es handelt sich um ein weitverbreitetes Modell, welches die beim SHT beschriebenen Pathophysiologien, wie Hirnödem (60), erhöhter ICP und verminderter CBF (61), sehr gut wiedergibt und damit ein Hirntrauma mit Schädeldeformation und der damit zusammenhängenden Hirnrindenkompression simuliert. Dieses Modell wird besonders häufig zur Untersuchung der komplexen Mechanismen, welche dem neuronalen Zelltod zugrunde liegen und den daraus resultierenden neurologischen Defiziten eingesetzt und hat sich in zahlreichen Studien als probates Mittel zur Erforschung neuer therapeutischer Ansätze zur Behandlung von Hirntraumata durchgesetzt (57).



**Abbildung 5.1.2:** Schematische Darstellung der experimentellen Tiermodelle zu SHT, übernommen von Cernak et al. (57)

Die Reproduzierbarkeit des durch CCI induzierten Traumas wurde in dieser Studie durch Einhaltung eines exakt festgelegten Protokolls sichergestellt. Dazu gehörten die genaue Positionierung im stereotaktischen Rahmen, die Definition von Orientierungspunkten für die Kraniotomie sowie die Festlegung der Traumaparameter Eindringtiefe, -geschwindigkeit und Größe des Schlagbolzens. Als Variationsmöglichkeit blieb die bei jedem Tier neu vorzunehmende Positionierung der Traumamaschine. Durch entsprechende Trainingseinheiten gelang es jedoch beiden Anwendern, ein standardisiertes Trauma von reproduzierbarer und vergleichbarer Größe zu erzeugen. Grundsätzlich handelt es sich bei den Parametern Blutdruck und Neuroscore um nebenbefundliche Parameter, welche nicht die primäre Fragestellung dieser Studie beeinflussen.

Das in der TC-Gruppe induzierte Trauma von durchschnittlich 20 mm<sup>3</sup> deckt sich mit den Beschreibungen aktueller Studien (62) bei gleichen Traumaparametern (Bolzendurchmesser, Geschwindigkeit, Eindringtiefe, Verweildauer, etc.).

### 5.1.3 Limitationen dieser Studie

Die Limitationen dieser Studie ergeben sich hauptsächlich durch den Einsatz einer bisher nur zum Teil erforschten Substanz wie C21. Zentrale Punkte sind dabei die richtige Dosierung und Applikationszeitpunkt, der optimale Verabreichungsweg sowie die Frage nach der Penetrationsfähigkeit der Bluthirnschranke.

Grundlage für das gewählte Applikations- und Dosierungsschema waren die noch nicht veröffentlichten, aber auf dem „15<sup>th</sup> Annual Meeting of the European Council for Cardiovascular Research (ECCR)“ 2010 in Nizza unter dem Vortragstitel „Direct AT2-Receptor Stimulation Improves Survival and Neurological Outcome after Experimental Stroke (MCAO) in Mice“ präsentierten Daten von Schwengel et al. (63) sowie Daten einer Kardioprotektionsstudie (64). Die erstgenannte Studie basiert auf einem Hirnischämiemodell. 45 min nach der Ischämie erfolgt die Verabreichung von C21 in der Dosierung von 0,03 mg/kg KG i.p. Die Gabe wird täglich für 4 Tage wiederholt. Die Studie zeigt unter anderem eine deutliche Verbesserung der Neurologie und der Mortalität bei C21-therapierten Tieren gegenüber den Vehikel-Tieren, ohne Beeinflussung des Blutdrucks. Aufgrund der beschriebenen engen pathomechanistischen Korrelation zwischen Hirnischämie und SHT, entschieden wir uns für das beschriebene Dosierungsregime.

Ein Beweis der Durchgängigkeit von C21 für die Bluthirnschranke steht aus, allerdings geht man nach SHT von einer stark kompromittierten Bluthirnschranke aus (65) sodass wir, auch auf Basis der bisher zu C21 publizierten Studien, von einer Penetration ausgehen. Um einen möglichen dosisabhängigen Effekt auf die Zielparameter nachweisen zu können, implementierten wir die HD-Gruppe in den Versuchsaufbau.

Der intraperitoneale Applikationsweg wurde in diversen Studien gewählt (68, 69) ebenso finden jedoch auch subkutane (66) und intrazerebroventrikuläre (67) Injektionen Anwendung. Bei der oralen Gabe beträgt die Bioverfügbarkeit lediglich 20-30% (7).

Aufgrund der vermuteten Halbwertszeit von 4 h, wird in einzelnen Studien alternativ zur einmaligen Gabe pro Tag eine kontinuierliche Infusion beschrieben (68).

Zur Untermauerung der in der vorliegenden Studie präsentierten Daten bzw. um eine Beeinflussung der Ergebnisse durch diese Studienlimitationen zu verhindern, wären folgende Schritte nötig:

- Durchführung einer Studie mit identischem Aufbau anhand von AT2-knock-out-Mäusen:

Eine Beeinflussung des sekundären Hirnschadens durch AT2 wäre unwahrscheinlich, falls sich auch bei diesen Tieren keine Veränderung des histologischen Schadens nach CCI darstellen ließe.

- Kombination der C21-Gabe mit gleichzeitiger AT2-Blockade, gegebenenfalls unter Wirkung von AT1-Antagonisten.
- Nachweis der Durchgängigkeit von C21 für die Bluthirnschranke und eines konstanten Wirkspiegels.



## 5.2 Diskussion der Ergebnisse

### 5.2.1 Blutdruckmessung

Da der Blutdruck gerade in Bezug auf das sekundäre Trauma und den damit zusammenhängenden beschriebenen Pathomechanismen relevant ist, war eine engmaschige Blutdruckkontrolle essentiell. Zusätzlich war zu Studienbeginn unklar, ob es möglicherweise durch C21 zur einer RAAS-vermittelten Blutdruckbeeinflussung kommt.

Die über fünf Tage gemessenen systolischen Blutdruckwerte unterscheiden sich zwischen den einzelnen Gruppen nicht. Lediglich tendenziell zeigt die HD-Gruppe (0,1 mg/kg KG C21) mit 107 mmHg einen etwas niedrigeren Durchschnittswert als die LD-Gruppe (0,03 mg/kg KG C21) mit 116 mmHg bzw. 115 mmHg in der V-Gruppe (NaCl).

Interessanterweise kommt es in der HD-Gruppe bei dem 2 h nach CCI gemessenen Wert nicht nur zu einem signifikanten Abfall gegenüber der Messung vor der Traumainduktion, auch die Differenz zu den Messwerten der übrigen Versuchsgruppen offenbart eine statistische Signifikanz. Die bisher publizierten Studienergebnisse sind in dieser Hinsicht widersprüchlich: Während die Arbeitsgruppen um Hilliard oder Bosnyak keine MAP-Veränderung unter C21 (69) bzw. eine MAP-Verminderung nur bei gleichzeitiger Kombination mit dem AT1-Antagonisten Candesartan beschreiben (68), stellt die Arbeitsgruppe um Wan, welche ursprünglich C21 synthetisierte, einen geringen MAP-Abfall fest, der durch AT1-Inhibition deutlich verstärkt wurde (7), und auch Gao et al. beschreiben einen C21-abhängigen MAP-Abfall, welcher durch Gabe eines AT2-Antagonisten unterbunden werden konnte (70). Bei genauerer Durchsicht wird deutlich, dass in Studien, bei denen ein Blutdruckabfall festgestellt wurde, Narkosegase verwendet haben (Isoflurane, Sevoflurane), während in Studien von Hilliard und Bosnyak diese eine Barbiturat- bzw. Ketaminnarkose durchführten. Möglicherweise lässt sich daher die in dieser Studie berichtete transiente MAP-Abnahme bei höheren C21-Konzentrationen mit einem noch von der Sevofluran-Narkose beeinflussten Barorezeptorreflex begründen. Nach Abklingen dieses Effektes dominiert der über AT1 vermittelte eher erhöhte vaskuläre Grundtonus, sodass die durch C21 verursachten beschriebenen Effekte, wie etwa eine Dilatation der Mesenterialgefäße

(68) oder die vermehrte renale Durchblutung (71), erst unter AT1-Blockade eine Hypotension hervorrufen.

Die Blutdruckmessung wurde vor Versuchsbeginn mit den Tieren trainiert, um eine spätere Beeinflussung der Ergebnisse durch einen möglicherweise entstandenen Trainingseffekt zu minimieren. Der Kurvenverlauf der gemessenen Werte lässt einen solchen Trainingseffekt nicht vermuten, sodass die dreimalige Trainingsmessung vor Versuchsbeginn den gewünschten Erfolg zu haben scheint.

### 5.2.2 Neurologische Evaluation

Um auch mögliche Unterschiede in zeitlichen Verlauf nach SHT beurteilen zu können, wurden die Versuchstiere täglich neurologisch evaluiert. Durch Anwendung eines standardisierten Tests zu definierten Zeitpunkten ist war möglich die sensorischen und motorischen Defizite zwischen den einzelnen Versuchsgruppen zu quantifizieren und zu vergleichen.

Die neurologische Auswertung zeigt keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen, wenngleich es bei allen Versuchsgruppen zu einer Verbesserung der erreichten Punktzahl über den Beobachtungszeitraum kommt.

Die Beurteilung in Form eines NSS soll die Fähigkeiten der Maus hinsichtlich Motorik, Gleichgewicht und ihrer Reaktion auf Umweltreize quantifizieren. Tsenter et al. zeigten 2008, dass sich der NSS als Vorhersagewert für das neurologische Endergebnis eignet (49). Folgende Zuordnungen zwischen NSS-Punktzahl nach 1 h und der durch Magnetresonanztomographie objektivierte Traumaschwere wurden durch die Arbeitsgruppe korreliert:

NSS nach 1 h (Punktzahl)	Traumaschwere
9 - 10	fataler Hirnschaden
7 - 8	schwerer Hirnschaden
5 - 6	moderater Hirnschaden
< 5	milder Hirnschaden

**Tabelle 5.2.2:** Korrelation zwischen NSS und pathophysiologischem Schaden, modifiziert nach Tsenter et al. (49)

Diese Werte beziehen sich allerdings nur auf den NSS nach 1 h und wurden mit dem „Weight-Drop“-Modell erstellt. Die Frage, ob sich der NSS für eine wiederholte neurologische Evaluation eignet, ist nicht abschließend geklärt. Für diese Studie wies der Test keine ausreichende Sensitivität auf, um mögliche Unterschiede zwischen den Gruppen darzustellen. Trotz gleicher Versuchsbedingungen, vorherigen Trainings mit den Tieren und einer ruhigen Versuchsumgebung, war die Untersuchung sehr störanfällig und schlecht objektivierbar. Ein Beispiel stellt Punkt 1 des NSS dar, bei dem die Zeit gemessen wurde, die eine Maus brauchte, um die Mitte eines Ringes von 50 cm Durchmesser und 1 cm Randhöhe zu verlassen. Hier schien es eher von der Neugier der jeweiligen Maus als vom Trauma abhängig zu sein, ob die Maus überhaupt den Ring verließ, da selbst eine Vielzahl gesunder

Mäuse kaum Anstrengungen unternahmen den Ring zu verlassen. Möglicherweise erhält die Maus zu wenige Stimuli, gezielt eine Aufgabe zu bewältigen, welche dann auch objektiv beurteilt werden könnte.

Eine mögliche Alternative wäre die Kombination verschiedener Verfahren, wie z.B.

- „Morris water maze“-Test, dessen Schwerpunkt auf der Objektivierung kognitiver Defizite liegt (72). Ein gängiger Versuchsaufbau ist die Verwendung eines runden Wasserbeckens mit einer zentralen, unter der Wasseroberfläche liegenden Plattform als Zuflucht für die Tiere. Von vier unterschiedlichen Startpunkten wird jeweils die Zeit gemessen, welche die Maus bis zum Erreichen der Plattform benötigt. Mäuse nach SHT brauchen weitaus länger, um die Plattform zu erreichen (73), was vor allem Schäden der thalamischen Hirnregion zugeschrieben wird.
- „Rotarod“-Test: 1994 vom Hamm et al. entwickelt, stellt dieser Test die motorischen Defizite nach SHT dar (74). Die Tiere werden dazu auf eine sich drehende Walze gesetzt und es wird gemessen, wie lange die Tiere auf dieser Walze zu laufen vermögen. Die Autoren konnten zeigen, dass dieser Test gerade bei mildem Hirnschaden deutlich sensitiver als der „Beam-Balance-“ oder „Beam-Walking-Test“ ist.

Auf der Basis dieser Tests, möglicherweise ergänzt beispielsweise mit dem Beam-Balance-Test, wäre es möglich einen „composite neuroscore“ zusammenzustellen, der umfangreicher, objektiver und genauer Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen darstellen könnte.

### 5.2.3 Histologische Auswertung

Histologisch lässt sich zuverlässig und reproduzierbar das Ausmaß des sekundären Hirnschadens quantifizieren. Zugleich ist eine interne Kontrolle bezüglich des zugefügten primären Traumas möglich, sowie eine rechnerische Korrektur gegen Störfaktoren wie etwa das entstandene Hirnödem.

Die histologische Auswertung konnte bei Betrachtung des absoluten Schadens keinen Unterschied zwischen den einzelnen Versuchsgruppen aufzeigen.

Wie beschrieben erfolgte die histologische Aufarbeitung mittels Kresylviolett. Mikroskopisch konnte dabei in allen Gehirnen die Primärläsion sichtbar gemacht werden, häufig kam es in dieser Region, bedingt durch Hämorrhagie und direkte Gewebeschädigung, zu einer Aufhebung der Hirnrindenkontinuität. Um diese Primärläsion herum konnte die Penumbra durch eine deutlich schwächere neuronale Nissl-Färbung verglichen zum stärker angefärbten nichttraumatisierten Gewebe sichtbar gemacht werden. Es konnten keine Schäden am Cortex außerhalb der Penumbra, am kontralateralen Kortex oder am ipsilateralen Hippokampus festgestellt werden. Das histologische Bild deckte sich daher mit den Literaturbeschreibungen (79, 75).

Da es sich bei der Nissl-Färbung um eine ribosomale Färbung handelt und damit vorwiegend Astrozyten und Neuronen gefärbt werden, ist der Zeitpunkt der histologischen Aufarbeitung ein entscheidender Faktor. Innerhalb der ersten Woche nach Trauma (76) findet eine Reorganisation der Astrozyten statt, mit anschließender Phagozytose nekrotischer und apoptotischer Zellen. Dies bewirkt eine Gewebeschrumpfung und geht mit einer scheinbaren Verkleinerung des Läsionsvolumens einher. Die Aufarbeitung der Gehirne fand wie beschrieben fünf Tage nach CCI statt, sodass zum einen gute histologische Bedingungen gegeben waren, aber auch ein entsprechend großes Sekundärläsionsvolumen entstanden war, um eine mögliche Beeinflussung durch AT2-Stimulation darstellen zu können.

Die Kresylviolett-Färbung ist eine sehr häufig beschriebene Methode zur Darstellung des Kontusionsvolumens (77). Eine genauere Methode ist die immunhistochemische Aufarbeitung durch Markierung von NeuN (Neuronal Nuclei) auf Basis von monoklonalen Antikörpern. NeuN ist ein spezifischer Marker reifer Nervenzellen (78) und erlaubt eine spezifischere Schadensquantifizierung (76). Da sich jedoch sowohl

die Läsionsvolumina mit den Literaturangaben decken, die histologischen Bilder eine deutliche Penumbra zeigen und gleichzeitig innerhalb der Gruppen eine geringe Standardabweichung vorliegt, gehen wir davon aus, dass die Volumenbestimmung für diese Fragestellung ausreichend genau war.

Um die Läsionsvolumina der nach 15 min entnommenen Hirne der TC-Gruppe mit den restlichen Gruppen vergleichen zu können, muss das im zeitlichen Verlauf entstandene Hirnödem (57) kompensiert werden. Dies geschah, wie im Kapitel 4.3 angegeben, durch Division des Läsionsvolumens anhand des Volumens der gesamten kontralateralen Seite. Nach dieser Normalisierung wird deutlich, dass der Sekundärschaden nach fünf Tagen in allen Tieren zunahm, es besteht jedoch kein Unterschied zwischen den jeweiligen Therapiegruppen und der Vehikel-Gruppe.

#### 5.2.4 Molekularbiologische Auswertung

Mit der real-time RT-PCR stand zur Messung der inflammatorischen Reaktion eine zuverlässige und erprobte Methode zur Verfügung, welche sich in der letzten Jahren zum Goldstandard der Genquantifikation entwickelt hat (79).

Clark et al. beschrieben, dass iNOS nach SHT nur in der traumatisierten Hemisphäre und dort vor allem im peritraumatisches Gewebe ansteigt (43). Der Anstieg ist nach 12 h nachweisbar, erreicht nach 48 h seinen Höhepunkt und kehrt nach 7 d auf den ursprünglichen Wert zurück (80). Diese Daten stammen allerdings aus Weigh-Drop-Versuchen bzw. Middle Cerebral Artery Occlusion (MCAO)-Modellen. Timaru-Kast et al. (47) zeigten einen deutlichen iNOS-Anstieg nach CCI, welcher durch Candesartan in einer Dosierung von 0,1 mg/kg KG inhibiert werden konnte, nicht jedoch in höheren Dosierungen von bis zu 1 mg/kg KG. Dieser Effekt wurde von den Autoren als Folge der beobachteten Hypotension und der damit einhergehenden zerebralen Hypoperfusion unter Candesartan-Dosierungen über 0,1 mg / kg KG erklärt. Einen vergleichbaren Effekt konnte die Arbeitsgruppe ebenfalls für IL1 $\beta$  nachweisen. Die Rolle von iNOS im Rahmen des CCI wurde bisher vorwiegend anhand von knock-out Mäusen untersucht (44).

In der aktuellen Studie ist nur ein Anstieg der iNOS mRNA gegenüber der TC-Gruppe in der LD-Gruppe signifikant nachweisbar. Dies lässt auf eine erhöhte iNOS-mRNA-Expression in der LD-Gruppe schließen.

Auch IL1 $\beta$  steigt innerhalb weniger Stunden nach SHT an und es wird eine erhöhte mRNA-Expression bis 6 d nach SHT beschrieben. IL1 $\beta$  weist die höchste Konzentration unter den proinflammatorischen Zytokinen auf (81). Abbildung 4.4.2.2 zeigt einen signifikanten Anstieg der IL1 $\beta$ -Expression aller Versuchsgruppen gegenüber der TC-Gruppe. Auch hier zeigt sich kein statistisch relevanter Unterschied zwischen der HD-, LD-, und Vehicle-Gruppe, tendenziell beobachtet man jedoch bei der LD-Gruppe den höchsten Anstieg. Verglichen mit iNOS, ist die IL1 $\beta$  Expressionsrate in allen Gruppen um ein Vielfaches höher, in Übereinstimmung mit der in der Literatur beschriebenen Expressionsraten.

Für beide gemessenen Inflammationsparameter verdeutlicht diese Studie demnach eine Tendenz für eine gesteigerte IL1 $\beta$ - und iNOS-Expression in der LD-Gruppe. Betrachtet man nur die TC- und die V-Gruppen im Vergleich, so zeigt sich bei iNOS eine tendenzielle Expressionserhöhung, bei IL1 $\beta$  ist die Zunahme auch statistisch signifikant. Damit fiel der iNOS-Anstieg geringer als erwartet aus. Grund hierfür könnte ein anderes Expressionsverhalten als eingangs vermutet sein. Vereinzelt finden sich z.B. Studien, nach denen die Expression bereits 8 h nach SHT verstärkt erfolgt und nach 48 h wieder zu 80 % heruntergefahren wird (82). Auch wenn die iNOS-Erhöhung nach SHT gesichert ist (83), gibt es keine auf beschriebene Weise normalisierten Daten für den zeitlichen Verlauf nach CCI.

Die LD-Gruppe zeigt für beide Inflammationsmarker höhere Werte als die restlichen Versuchsgruppen, während die HD-Gruppe sich nicht signifikant von der Vehikel-Gruppe unterscheidet. Eine mögliche These wäre ein von der C21-Dosierung abhängiger unterschiedlicher Effekt des AT2 auf die Inflammation. Bereits 2002 stellte Wolf in einem Editorial (84) die protektive Rolle von AT2 in Frage. Die Arbeitsgruppe um Ruiz-Ortega publizierte, dass Angiotensin II NF $\kappa$ B, ein proinflammatorisches Zytokin, sowohl über AT1 als auch über AT2 aktiviert (85). Selbst bei AT1 knock-out-Mäusen stieg NF $\kappa$ B unter Angiotensin II-Stimulation an (86). Bei AT2-Antagonisierung konnte allerdings ein NF $\kappa$ B-Abfall verzeichnet werden (87). Sabuhi et al. verglichen den Effekt einer AT2-Stimulation auf normalgewichtige und stark übergewichtige Ratten. Hier stellte sich eine deutliche Zunahme unter anderem der inflammatorischen Markerproteine TNF- $\alpha$ , IL1 $\beta$  und IL6 sowie des oxidativen Stresses bei den adipösen Ratten dar, bei den schlanken Tieren nahmen diese Parameter jedoch ab (88).

In der hier vorliegenden Studie wurde die mRNA als Expressionsmarker für die beiden inflammatorischen Proteine gemessen. Für eine genauere Untersuchung bzw. Beurteilung der tatsächlichen Konzentrationen der Proteine müsste eine Proteinanalyse durchgeführt werden, um eine tatsächliche Korrelation zwischen Proteinmenge und mRNA-Konzentration herzustellen (89).



### 5.3 Schlussfolgerung

Eine Beeinflussung des neuronalen Schadens durch AT2-Stimulation konnten wir in dieser Studie nicht nachweisen. Weder neurologische noch histologische Parameter deuten auf eine neuroprotektive Wirkung von AT2 hin. Eine Beeinflussung durch unterschiedliche Blutdruckwerte konnte ausgeschlossen werden.

Auf molekularbiologischer Ebene scheint die Dosis von 0,03 mg/kg KG C21 eine proinflammatorische Reaktion zu generieren, die höhere Dosierung von 0,1 mg/kg KG erzeugt diesen Effekt jedoch nicht. Diese Daten unterstützen damit eine Reihe von Veröffentlichungen, die den alleinigen neuroprotektiven Effekt von AT2 in Frage stellen. AT2 scheint, sowohl kontextabhängig als auch durch den jeweiligen Stimulationsweg beeinflusst, verschiedenste und bisher nicht erforschte Eigenschaften zu besitzen. Ebenso ist die Interaktion der beiden Rezeptoren AT1 und AT2 unter sich noch völlig unklar.

Allerdings gilt es die dem AT2 zugeschriebene Rolle zu überdenken. Während der mittels AT1-Inhibition nachgewiesene neuroprotektive Effekt fast ausschließlich über die vermutete akzentuierte Wirkung von Angiotensin II auf den AT2 erklärt wird (50), konnte ein direkter protektiver Effekt der AT2-Aktivierung bisher nur bei kardialer Ischämie (64) und Rückenmarksläsionen (90) nachgewiesen werden. Bei einer Dosierung von 0,3 mg/kg KG pro Tag konnte nach Verschluss der linken Koronararterie sowohl ein kardioprotektiver Effekt als auch ein Rückgang der systemischen Inflammation nachgewiesen werden (67). Bei gleicher Dosierung wurde auch nach Laminektomie und direkter Rückenmarkskompression eine verminderte Inflammation nach 24 h nachgewiesen (91). Lee et al. zeigten jedoch an einem Hirnischämiemodell mittels Okklusion der Arteria cerebri media eine neuroprotektive Wirkung an Zellkulturen mittels des AT2-Agonisten CGP42112, welche sich jedoch bei Einsatz des hochselektiven C21 nicht reproduzieren ließ (91). Ein weiterer Weg die mögliche Rolle einer AT2-Stimulation zu untersuchen, ist der Einsatz von AT2-defizienten knock-out-Mäusen. In einer Folgestudie der vorliegenden Arbeit wurde dies an Mäusen des gleichen Typs durch Anwendung des gleichen CCI-Modelles evaluiert. Im Falle einer neuroprotektiven AT2-Wirkung wäre hierbei ein deutlich größerer sekundärer Hirnschaden bei den AT2-knock-out-Mäusen im Vergleich zu den nativen Tieren zu erwarten gewesen, jedoch zeigen erste Ergebnisse auch in dieser Folgestudie keine signifikanten Unterschiede welche

auf die Rolle von AT2 beim SHT schließen lassen könnten. Es bleibt unklar auf welche Weise eine AT1-Inhibition ihre neuroprotektive Wirkung entfaltet, auf Basis dieser Ergebnisse scheint jedoch der oftmals beschriebene Wirkmechanismus über vermehrte AT2-Stimulation unwahrscheinlich.

## **6. Zusammenfassung**

Die Beeinflussung des sekundären Hirnschadens nach SHT ist Hauptansatzpunkt der klinischen Therapie. Gleichzeitig sind die zugrunde liegenden Mechanismen zum Großteil unklar und Gegenstand aktueller Forschung. In verschiedenen Studien scheint sich das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System als Teil der Pathophysiologie bei der Entstehung des sekundären Hirnschadens und der neuronalen Inflammation nach SHT herauszukristallisieren. Der Fokus richtet sich mitunter auf den AT2-Rezeptor, dessen protektive Wirkung in verschiedensten Ischämie modellen und Geweben gezeigt werden konnte.

In der vorliegenden Promotionsarbeit wurde erstmalig die Wirkung einer AT2-Stimulation auf histologische, inflammatorische und neuromotorische Parameter nach CCI untersucht. Eine neuroprotektive Wirkung der AT2-Stimulation konnte dabei nicht nachgewiesen werden. Es kam weder zu einer Beeinflussung histologischer noch neuromotorischer Parameter, allerdings scheint der AT2-Agonist C21 bei einer Dosierung von 0,03 mg/kg KG zu einer Stimulation der inflammatorischen Reaktion zu führen.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Donaubaue B, Pfeifer F, Wrigge H. Ersttherapie polytraumatisierter Patienten mit Schädel-Hirn-Verletzung. *Notfallmedizin up2date*. 2012;7(02):145-57.
2. Bernhard M, Matthes G, Kanz K-G, Waydhas C, Fischbacher M, Fischer M, et al. S3-Leitlinie Polytrauma/Schwerverletztenversorgung. *Notfallmedizin up2date*. 2011;6(04):e1-e31.
3. Neurologie DGf. Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie; 4. überarbeitete Auflage 2008, S. 654 ff, ISBN 978-3-13-132414-6; Georg Thieme Verlag Stuttgart. 2010:1-8.
4. Neurochirurgie DGf. Schädel-Hirn-Trauma im Erwachsenenalter. 2010:1-17.
5. Masson F, Thicoipe M, Aye P, Mokni T, Senjean P, Schmitt V, et al. Epidemiology of severe brain injuries: a prospective population-based study. *The Journal of trauma*. 2001;51(3):481-9.
6. Kampfl A, Schmutzhard E, Franz G, Pfausler B, Haring HP, Ulmer H, et al. Prediction of recovery from post-traumatic vegetative state with cerebral magnetic-resonance imaging. *Lancet*. 1998;351(9118):1763-7.
7. Wan Y, Wallinder C, Plouffe B, Beaudry H, Mahalingam AK, Wu X, et al. Design, synthesis, and biological evaluation of the first selective nonpeptide AT2 receptor agonist. *Journal of medicinal chemistry*. 2004;47(24):5995-6008.
8. Steckelings UM, Paulis L, Namsolleck P, Unger T. AT2 receptor agonists: hypertension and beyond. *Current opinion in nephrology and hypertension*. 2012;21(2):142-6.
9. Madler J, Werdan, Siegrist, Pajonk. Das NAW-Buch, Akutmedizin der ersten 24 Stunden.2008.
10. Engelhard K, Müller-Forell W, Werner C. Therapy of head trauma. *Der Anaesthesist*. 2008;57(12):1219-31.
11. Singbartl G, Cunitz G. Pathophysiologic principles, emergency medical aspects and anesthesiologic measures in severe brain trauma. *Der Anaesthesist*. 1987;36(7):321-32.
12. Renner C, Meixensberger J. Schädel-Hirn-Trauma. *Notfallmedizin up2date*. 2007;2(2):121-37.
13. Rickels E, Wild K, Wenzlaff P. Treatment of traumatic brain injury in Germany. *Der Unfallchirurg*. 2011;114(5):417-23.
14. Roche Lexikon Medizin: Urban & Schwarzenberg; 2003. 1880 p.
15. Teasdale G, Jennett B. Assessment of coma and impaired consciousness. A practical scale. *The Lancet*. 1974;2(7872):81-4.
16. Werner C, Engelhard K. Pathophysiology of traumatic brain injury. *British Journal of Anaesthesia*. 2007;99(1):4-9.
17. Monro A. Observations on the Structure and Functions of the Nervous System. 1783.
18. Bouma GJ, Muizelaar JP, Stringer WA, Choi SC, Fatouros P, Young HF. Ultra-early evaluation of regional cerebral blood flow in severely head-injured patients using xenon-enhanced computerized tomography. *Journal of neurosurgery*. 1992;77(3):360-8.
19. Cunningham AS, Salvador R, Coles JP, Chatfield DA, Bradley PG, Johnston AJ, et al. Physiological thresholds for irreversible tissue damage in contusional regions following traumatic brain injury. *Brain*. 2005;128(Pt 8):1931-42.
20. Oertel M, Boscardin WJ, Obrist WD, Glenn TC, McArthur DL, Gravori T, et al. Posttraumatic vasospasm: the epidemiology, severity, and time course of an underestimated phenomenon: a prospective study performed in 299 patients. *Journal of neurosurgery*. 2005;103(5):812-24.
21. Wang D, Pikhova B, Solomon SB, Cortes-Puch I, Kern SJ, Sun J, et al. In vivo reduction of cell-free methemoglobin to oxyhemoglobin results in vasoconstriction in canines. *Transfusion*. 2013. Epub 2013/03/16.

22. Piepho RW. Overview of the angiotensin-converting-enzyme inhibitors. *American journal of health-system pharmacy : AJHP : official journal of the American Society of Health-System Pharmacists*. 2000;57 Suppl 1:S3-7.
23. Goldblatt H, Lynch J, Hanzal RF, Summerville WW. Studies on Experimental Hypertension : I. The Production of Persistent Elevation of Systolic Blood Pressure by Means of Renal Ischemia. *The Journal of experimental medicine*. 1934;59(3):347-79. Epub 1934/02/28.
24. Braun-Menendez E, Fasciolo JC, Leloir LF, Munoz JM. The substance causing renal hypertension. *The Journal of physiology*. 1940;98(3):283-98. Epub 1940/07/24.
25. Page IH, Helmer OM. A Crystalline Pressor Substance (Angiotonin) Resulting from the Reaction between Renin and Renin-Activator. *The Journal of experimental medicine*. 1940;71(1):29-42. Epub 1940/01/01.
26. Braun-Menendez E, Page IH. Suggested Revision of Nomenclature--Angiotensin. *Science*. 1958;127(3292):242. Epub 1958/01/31.
27. Skeggs LT, Jr., Marsh WH, Kahn JR, Shumway NP. The existence of two forms of hypertensin. *The Journal of experimental medicine*. 1954;99(3):275-82. Epub 1954/03/01.
28. Tsukamoto O, Kitakaze M. It is Time to Reconsider the Cardiovascular Protection Afforded by RAAS Blockade - Overview of RAAS Systems. *Cardiovascular Drugs and Therapy*. 2011.
29. Atlas SA. The renin-angiotensin aldosterone system: pathophysiological role and pharmacologic inhibition. *Journal of managed care pharmacy : JMCP*. 2007;13(8 Suppl B):9-20. Epub 2007/11/22.
30. Page IH, Helmer OM. Angiotonin-Activator, Renin- and Angiotonin-Inhibitor, and the Mechanism of Angiotonin Tachyphylaxis in Normal, Hypertensive, and Nephrectomized Animals. *The Journal of experimental medicine*. 1940;71(4):495-519. Epub 1940/03/31.
31. Gross F, Schmidt H. Aldosterone overdose in the rabbit. *Acta endocrinologica*. 1958;28(4):467-78. Epub 1958/08/01.
32. Schmidt D, Forssmann WG, Taugner R. Juxtaglomerular granules of the newborn rat kidney. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*. 1972;331(3):226-32. Epub 1972/01/01.
33. Schmidt T, Lang. *Physiologie des Menschen*: Springer; 2000.
34. Chiu AT, Herblin WF, McCall DE, Ardecky RJ, Carini DJ, Duncia JV, et al. Identification of angiotensin II receptor subtypes. *Biochem Biophys Res Commun*. 1989;165(1):196-203. Epub 1989/11/30.
35. Nakajima M, Mukoyama M, Pratt RE, Horiuchi M, Dzau VJ. Cloning of cDNA and analysis of the gene for mouse angiotensin II type 2 receptor. *Biochemical and biophysical research communications*. 1993;197(2):393-9.
36. Bottari SP, de Gasparo M, Steckelings UM, Levens NR. Angiotensin II receptor subtypes: characterization, signalling mechanisms, and possible physiological implications. *Frontiers in neuroendocrinology*. 1993;14(2):123-71.
37. Steckelings UM, Larhed M, Hallberg A, Widdop RE, Jones ES, Wallinder C, et al. Non-peptide AT2-receptor agonists. *Current Opinion in Pharmacology*. 2011;11(2):187-92.
38. Wruck CJ, Funke-Kaiser H, Pufe T, Kusserow H, Menk M, Sclafani AP, et al. Regulation of transport of the angiotensin AT2 receptor by a novel membrane-associated Golgi protein. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2005;25(1):57-64. Epub 2004/11/13.
39. Funke-Kaiser H, Reinemund J, Steckelings UM, Unger T. Adapter proteins and promoter regulation of the angiotensin AT2 receptor -- implications for cardiac pathophysiology. *Journal of Renin-Angiotensin-Aldosterone System*. 2010;11(1):7-17.
40. Gendron L, Payet MD, Gallo-Payet N. The angiotensin type 2 receptor of angiotensin II and neuronal differentiation: from observations to mechanisms. *J Mol Endocrinol*. 2003;31(3):359-72. Epub 2003/12/11.
41. Unger T, Dahlof B. Compound 21, the first orally active, selective agonist of the angiotensin type 2 receptor (AT2): implications for AT2 receptor research and

- therapeutic potential. *Journal of the renin-angiotensin-aldosterone system : JRAAS*. 2010;11(1):75-7. Epub 2009/10/29.
42. Côté F, Do TH, Laflamme L, Gallo JM, Gallo-Payet N. Activation of the AT(2) receptor of angiotensin II induces neurite outgrowth and cell migration in microexplant cultures of the cerebellum. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274(44):31686-92.
  43. Makino I, Shibata K, Ohgami Y, Fujiwara M, Furukawa T. Transient upregulation of the AT2 receptor mRNA level after global ischemia in the rat brain. *Neuropeptides*. 1996;30(6):596-601.
  44. Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *The Biochemical journal*. 2001;357(Pt 3):593-615.
  45. Yakovlev AG, Faden AI. Sequential expression of c-fos protooncogene, TNF-alpha, and dynorphin genes in spinal cord following experimental traumatic injury. *Molecular and chemical neuropathology / sponsored by the International Society for Neurochemistry and the World Federation of Neurology and research groups on neurochemistry and cerebrospinal fluid*. 1994;23(2-3):179-90. Epub 1994/10/01.
  46. Clark RS, Kochanek PM, Schwarz MA, Schiding JK, Turner DS, Chen M, et al. Inducible nitric oxide synthase expression in cerebrovascular smooth muscle and neutrophils after traumatic brain injury in immature rats. *Pediatric research*. 1996;39(5):784-90.
  47. Bayir H, Kagan VE, Borisenko GG, Tyurina YY, Janesko KL, Vagni VA, et al. Enhanced oxidative stress in iNOS-deficient mice after traumatic brain injury: support for a neuroprotective role of iNOS. *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2005;25(6):673-84.
  48. Hopkins SJ, Rothwell NJ. Cytokines and the nervous system. I: Expression and recognition. *Trends in neurosciences*. 1995;18(2):83-8.
  49. Ciallella JR, Ikonovic MD, Paljug WR, Wilbur YI, Dixon CE, Kochanek PM, et al. Changes in expression of amyloid precursor protein and interleukin-1beta after experimental traumatic brain injury in rats. *Journal of Neurotrauma*. 2002;19(12):1555-67.
  50. Timaru-Kast R, Wyszkon S, Luh C, Schaible E-V, Lehmann F, Merk P, et al. Delayed inhibition of angiotensin II receptor type 1 reduces secondary brain damage and improves functional recovery after experimental brain trauma. *Critical Care Medicine*. 2012;40(3):935-44.
  51. Dixon CE, Clifton GL, Lighthall JW, Yaghai AA, Hayes RL. A controlled cortical impact model of traumatic brain injury in the rat. *Journal of neuroscience methods*. 1991;39(3):253-62.
  52. Tsenter J, Beni-Adani L, Assaf Y, Alexandrovich AG, Trembovler V, Shohami E. Dynamic changes in the recovery after traumatic brain injury in mice: effect of injury severity on T2-weighted MRI abnormalities, and motor and cognitive functions. *Journal of Neurotrauma*. 2008;25(4):324-33.
  53. Palkovits M, Brownstein MJ. *Maps and Guide to Microdissection of the Rat Brain*: McGraw-Hill Companies; 1988 Feb 01. 262 p.
  54. Guenin S, Mauriat Mel, Pelloux J, Van Wuytswinkel O, Bellini C, Gutierrez L. Normalization of qRT-PCR data: the necessity of adopting a systematic, experimental conditions-specific, validation of references. *Journal of experimental botany*. 2009;60(2):487-93.
  55. Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes and immunity*. 2005;6(4):279-84.
  56. Dheda K, Huggett JF, Chang JS, Kim LU, Bustin SA, Johnson MA, et al. The implications of using an inappropriate reference gene for real-time reverse transcription PCR data normalization. *Analytical biochemistry*. 2005;344(1):141-3.
  57. Andersen CL, Jensen JL, Ørntoft TF. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer research*. 2004;64(15):5245-50.

58. Thal SC, Wyschkon S, Pieter D, Engelhard K, Werner C. Selection of Endogenous Control Genes for Normalization of Gene Expression Analysis after Experimental Brain Trauma in Mice. *Journal of Neurotrauma*. 2008;25(7):785-94.
59. Wernicke C, Franke P, Radke L, Berge S, Frohme M. Qualitätsmanagement in der RT-qPCR. *Biospektrum*. 2012;18(1):42-5.
60. Cernak I. Animal models of head trauma. *NeuroRx : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*. 2005;2(3):410-22.
61. Shreiber DI, Bain AC, Ross DT, Smith DH, Gennarelli TA, McIntosh TK, et al. Experimental investigation of cerebral contusion: histopathological and immunohistochemical evaluation of dynamic cortical deformation. *Journal of neuropathology and experimental neurology*. 1999;58(2):153-64.
62. Fitch MT, Doller C, Combs CK, Landreth GE, Silver J. Cellular and molecular mechanisms of glial scarring and progressive cavitation: in vivo and in vitro analysis of inflammation-induced secondary injury after CNS trauma. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1999;19(19):8182-98.
63. Başkaya MK, Rao AM, Doğan A, Donaldson D, Dempsey RJ. The biphasic opening of the blood-brain barrier in the cortex and hippocampus after traumatic brain injury in rats. *Neuroscience letters*. 1997;226(1):33-6.
64. Cherian L, Robertson CS, Contant CF, Bryan RM. Lateral cortical impact injury in rats: cerebrovascular effects of varying depth of cortical deformation and impact velocity. *Journal of Neurotrauma*. 1994;11(5):573-85.
65. Thal SC, Heinemann M, Luh C, Pieter D, Werner C, Engelhard K. Pioglitazone Reduces Secondary Brain Damage after Experimental Brain Trauma by PPAR- $\gamma$ -Independent Mechanisms. *Journal of Neurotrauma*. 2011;28(6):983-93.
66. Abstracts From the 15th Annual Meeting of the European Council for Cardiovascular Research (ECCR). *Hypertension*. 2010;56(6):1160-80.
67. Kaschina E, Grzesiak A, Li J, Foryst-Ludwig A, Timm M, Rompe F, et al. Angiotensin II type 2 receptor stimulation: a novel option of therapeutic interference with the renin-angiotensin system in myocardial infarction? *Circulation*. 2008;118(24):2523-32. Epub 2008/11/26.
68. Yu F, Wang Z, Tanaka M, Chiu CT, Leeds P, Zhang Y, et al. Posttrauma cotreatment with lithium and valproate: reduction of lesion volume, attenuation of blood-brain barrier disruption, and improvement in motor coordination in mice with traumatic brain injury. *J Neurosurg*. 2013. Epub 2013/07/16.
69. Rompe F, Artuc M, Hallberg A, Alterman M, Stroder K, Thone-Reineke C, et al. Direct angiotensin II type 2 receptor stimulation acts anti-inflammatory through epoxyeicosatrienoic acid and inhibition of nuclear factor kappaB. *Hypertension*. 2010;55(4):924-31. Epub 2010/02/17.
70. Watanabe K, Taniguchi M, Miyoshi M, Shimizu H, Imoto T, Sato K, et al. Effects of central injection of angiotensin-converting-enzyme inhibitor and angiotensin type 1 receptor antagonist on the brain NF-kappaB and AP-1 activities of rats given LPS. *Peptides*. 2006;27(6):1538-46. Epub 2005/12/17.
71. Bosnyak S, Welungoda IK, Hallberg A, Alterman M, Widdop RE, Jones ES. Stimulation of angiotensin AT2 receptors by the non-peptide agonist, Compound 21, evokes vasodepressor effects in conscious spontaneously hypertensive rats. *British journal of pharmacology*. 2010;159(3):709-16.
72. Hilliard LM, Denton KM. The angiotensin type 2 receptor weighs in on obesity: a promising therapeutic target? *Hypertension research : official journal of the Japanese Society of Hypertension*. 2012;35(6):582-4. Epub 2012/02/18.
73. Gao L, Zucker IH. AT2 receptor signaling and sympathetic regulation. *Curr Opin Pharmacol*. 2011;11(2):124-30. Epub 2010/12/17.
74. Hilliard LM, Jones ES, Steckelings UM, Unger T, Widdop RE, Denton KM. Sex-specific influence of angiotensin type 2 receptor stimulation on renal function: a novel therapeutic target for hypertension. *Hypertension*. 2012;59(2):409-14. Epub 2011/12/14.

75. Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *Journal of neuroscience methods*. 1984;11(1):47-60.
76. Chauhan NB, Gatto R, Chauhan MB. Neuroanatomical correlation of behavioral deficits in the CCI model of TBI. *Journal of neuroscience methods*. 2010;190(1):1-9.
77. Hamm RJ, Pike BR, O'Connell DM, Lyeth BG, Jenkins LW. The rotarod test: an evaluation of its effectiveness in assessing motor deficits following traumatic brain injury. *Journal of Neurotrauma*. 1994;11(2):187-96.
78. Dunn-Meynell AA, Levin BE. Histological markers of neuronal, axonal and astrocytic changes after lateral rigid impact traumatic brain injury. *Brain research*. 1997;761(1):25-41.
79. Jongen-Rêlo AL, Feldon J. ScienceDirect.com - Physiology & Behavior - Specific neuronal protein: A new tool for histological evaluation of excitotoxic lesions. *Physiology & behavior*. 2002.
80. Chen S. Time course of cellular pathology after controlled cortical impact injury. *Experimental Neurology*. 2003;182(1):87-102.
81. Mullen RJ, Buck CR, Smith AM. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development*. 1992;116(1):201-11. Epub 1992/09/01.
82. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*. 2001;29(9):e45.
83. Iadecola C, Zhang F, Xu S, Casey R, Ross ME. Inducible nitric oxide synthase gene expression in brain following cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1995;15(3):378-84. Epub 1995/05/01.
84. Holmin S, Schalling M, Höjeberg B, Nordqvist AC, Skeftruna AK, Mathiesen T. Delayed cytokine expression in rat brain following experimental contusion. *Journal of neurosurgery*. 1997;86(3):493-504.
85. Petrov T, Underwood BD, Braun B, Alousi SS, Rafols JA. Upregulation of iNOS expression and phosphorylation of eIF-2alpha are paralleled by suppression of protein synthesis in rat hypothalamus in a closed head trauma model. *Journal of Neurotrauma*. 2001;18(8):799-812.
86. Dalgard CL, Cole JT, Kean WS, Lucky JJ, Sukumar G, McMullen DC, et al. The cytokine temporal profile in rat cortex after controlled cortical impact. *Frontiers in molecular neuroscience*. 2012;5:6.
87. Wolf G. The road not taken: role of angiotensin II type 2 receptor in pathophysiology. *Nephrology Dialysis Transplantation*. 2002;17(2):195-8.
88. Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Rupérez M, König S. Angiotensin II activates nuclear transcription factor  $\kappa$ B through AT1 and AT2 in vascular smooth muscle cells molecular mechanisms. *Circulation*. 2000.
89. Ortega MR, Lorenzo O, Rupérez M. Angiotensin II activates nuclear transcription factor- $\kappa$ B in aorta of normal rats and in vascular smooth muscle cells of AT1 knockout mice. *Nephrology Dialysis*. 2001.
90. Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Rupérez M, Blanco J. Systemic infusion of angiotensin II into normal rats activates nuclear factor- $\kappa$ B and AP-1 in the kidney: role of AT1 and AT2 receptors. *The American journal of Pathology*. 2001.
91. Sabuhi R, Ali Q, Asghar M, Al-Zamily NR, Hussain T. Role of the angiotensin II AT2 receptor in inflammation and oxidative stress: opposing effects in lean and obese Zucker rats. *American journal of physiology Renal physiology*. 2011;300(3):F700-6. Epub 2011/01/07.
92. Greenbaum D, Colangelo C, Williams K, Gerstein M. Comparing protein abundance and mRNA expression levels on a genomic scale. *Genome Biology*. 2003;4(9):117.
93. Namsolleck P, Boato F, Schwengel K, Paulis L, Matho KS, Geurts N, et al. AT2-receptor stimulation enhances axonal plasticity after spinal cord injury by upregulating BDNF expression. *Neurobiology of disease*. 2012.
94. Lee S, Brait VH, Arumugam TV, Evans MA, Kim HA, Widdop RE, et al. Neuroprotective effect of an angiotensin receptor type 2 agonist following cerebral ischemia in vitro and in vivo. *Experimental translational stroke medicine*. 2012;4(1):16.



## 8 Anhang

### 8.1 Light-Cycler Protokoll

0,25 µl	Primer F
0,25 µl	Primer R
0,5 µl	Probe Fluoreszein (Sensorsonde)
0,5 µl	Probe Red640 (Ankersonde)
2,0 µl	Mastermix (bestehend aus FastStart Taq Polymerase + PCR-Puffer + dNTP-Mix + MgCl <sub>2</sub> ), 5 fach konzentriert
4,5 µl	H <sub>2</sub> O
1 µl	cDNA

### 8.2 Light-Cycler Programm für PPIA

Bezeichnung	Temperatur [°C]	Zeit	Anzahl der Zyklen
Präinkubation	95	3 min	1
Denaturierung	95	10 sek	1
Annealing	55	10 sek	50
Extension	72	15 sek	1
Denaturierung	95	1 min	1
Annealing	40	1 min	1
Melting	95 °C; Anstieg = 0,1 °C / sek bis Temperatur erreicht		
Kühlung	40	30 sek	1

Tabelle 8.2: Light-Cycler Programm für PPIA

### 8.3 Light-Cycler Programm für iNOS

Bezeichnung	Temperatur [°C]	Zeit	Anzahl der Zyklen
Präinkubation	95	10 min	1
Denaturierung	95	10 sek	1
Annealing	55	20 sek	45
Extension	72	30 sek	1
Denaturierung	95	1 min	1
Annealing	40	1 min	1
Melting	95 °C; Anstieg = 0,1 °C / sek bis Temperatur erreicht		
Kühlung	40	30 sek	1

Tabelle 8.3: Light-Cycler Programm für iNOS

### 8.4 Light-Cycler Programm für IL1β

Bezeichnung	Temperatur [°C]	Zeit	Anzahl der Zyklen
Präinkubation	95	10 min	1
Denaturierung	95	20 sek	1
Annealing	55	30 sek	50
Extension	72	30 sek	1
Denaturierung	95	1 min	1
Annealing	40	1 min	1
Melting	95 °C; Anstieg = 0,1 °C / sek bis Temperatur erreicht		

Kühlung	40	30 sek	1
---------	----	--------	---

**Tabelle 8.4:** *Light-Cycler Programm für iNOS*

### 8.5 Light-Cycler Programm für $\beta$ 2M

Bezeichnung	Temperatur [°C]	Zeit	Anzahl der Zyklen
Präinkubation	95	10 min	1
Denaturierung	95	10 sek	1
Annealing	55	20 sek	45
Extension	72	15 sek	1
Denaturierung	95	1 min	1
Annealing	40	1 min	1
Melting	95 °C; Anstieg = 0,1 °C / sek bis Temperatur erreicht		
Kühlung	40	30 sek	1

**Tabelle 8.1.1:** *Light-Cycler Programm für iNOS*