

**Aus der Neurologischen Klinik und Poliklinik**

**(Direktor: Prof. Dr. med. J. Volkmann)**

**der Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**Pathophysiologische Rolle und therapeutische Relevanz von  
Plasmakallikrein beim experimentellen Schlaganfall**

**Inauguraldissertation zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde an  
der medizinischen Fakultät der Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von**

**Stephan Andreas Reymann**

**aus Gießen**

**Referent: Prof. Dr. med. Christoph Kleinschnitz**

**Koreferentin: Prof. Dr. med. Anna-Leena Sirén**

**Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch**

**Tag der mündlichen Prüfung: 30. Juni 2016**

**Der Promovend ist Arzt.**

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1.	Schlaganfall – Begriffsdefinition, Formen, Vorkommen, Bedeutung und Behandlung	1
1.2.	Pathophysiologie der fokalen zerebralen Ischämie	3
1.3.	Plasmakallikrein – Ausgangspunkt des Kallikrein-Kinin-Systems und der intrinsischen Gerinnungskaskade	6
1.4.	Das Kallikrein-Kinin-System	8
1.4.1.	Funktionsweise und physiologische Rolle des Kallikrein-Kinin-Systems	8
1.4.2.	Das Kallikrein-Kinin-System bei der fokalen zerebralen Ischämie	10
1.5.	Die intrinsische Gerinnungskaskade bei der fokalen zerebralen Ischämie	12
1.6.	Plasmakallikrein-Defizienz	13
1.6.1.	Plasmakallikrein-Defizienz beim Menschen	13
1.6.2.	Plasmakallikrein-Defizienz im Tiermodell	14
1.7.	Zielsetzung der Arbeit	15
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>17</b>
2.1.	Versuchstiere	17
2.2.	Modell des Verschlusses der Arteria cerebri media (Middle cerebral artery occlusion = MCAO)	17
2.2.1.	Transienter Verschlusses der Arteria cerebri media (tMCAO)	17
2.2.2.	Permanenter Verschlusses der Arteria cerebri media (pMCAO)	19
2.3.	Neurologische Funktionstests	20
2.3.1.	Bederson Score	20
2.3.2.	Grip Test	20
2.4.	Schlaganfall-MRT-Bildgebung	21
2.5.	Bestimmung der Blutungszeit	22
2.6.	Bestimmung physiologischer Parameter	22
2.6.1.	Invasive hämodynamische Messungen	22
2.6.2.	Blutgasanalyse	23
2.6.3.	Bestimmung der Bradykinin Spiegel im Plasma	23
2.6.4.	Bestimmung von Gerinnungsparametern	23
2.6.5.	Bestimmung der Komplementaktivität	23
2.6.6.	Bestimmung der Thrombozytenzahl	23
2.7.	Präparation der Gehirne	24
2.8.	Bestimmung der Infarktgrößen	25
2.9.	Molekularbiologische Methoden	25
2.9.1.	RNA-Isolierung und Konzentrationsbestimmung	25
2.9.2.	DNA-Isolierung	26
2.9.3.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	26
2.9.4.	DNA-Gelelektrophorese	29
2.9.5.	cDNA-Synthese	30
2.9.6.	Quantitative Echtzeit-PCR (qPCR)	30
2.10.	Immunhistochemie	32
2.10.1.	Herstellung von Gewebeschnitten	32
2.10.2.	Immunlokalisation mit DAB	32
2.10.3.	Indirekte Immunfluoreszenz	33
2.10.4.	Hämatoxylin/Eosin (H&E)-Färbung	34
2.11.	Proteinbiochemische Methoden	34
2.11.1.	Proteinisolation und Konzentrationsbestimmung	34
2.11.2.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	35
2.11.3.	Western Blot	37

2.11.3.1.	Proteintransfer .....	37
2.11.3.2.	Entwicklung.....	38
2.11.3.3.	Entfernen der ECL-Antikörperbindungsstelle.....	39
2.11.3.4.	Auswertung .....	39
<b>2.12.</b>	<b>Evan's Blue Extravasation.....</b>	<b>40</b>
<b>2.13.</b>	<b>Statistische Auswertung.....</b>	<b>40</b>
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>42</b>
3.1.	Aktivierung des Kontakt-Kinin-Systems durch ischämischen Schlaganfall .....	42
3.2.	Plasmakallikrein-Defizienz schützt vor einem ischämischen Schlaganfall .....	44
3.3.	Plasmakallikrein-Defizienz verringert die intrazerebrale Thrombusbildung nach Schlaganfall, ohne die Gefahr von Hirnblutungen zu erhöhen .....	50
3.4.	Plasmakallikrein-Defizienz verringert die Schädigung der Blut-Hirn-Schranke und die Entzündungsreaktion nach Schlaganfall.....	57
3.5.	Die pharmakologische Blockade von Plasmakallikrein schützt vor einem ischämischen Schlaganfall in einem klinisch relevanten Setting .....	64
<b>4.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>71</b>
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick.....</b>	<b>79</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>81</b>
	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>88</b>
	<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>97</b>
	<b>Danksagung</b>	

## Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
ACC	Arteria carotis communis
ACE	Arteria carotis externa
ACI	Arteria carotis interna
ACM	Arteria cerebri media
APS	Ammoniumperoxidsulfat
aPTT	aktivierte partielle Thromboplastinzeit
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BK	Bradykinin
BSA	bovines Serumalbumin
B1R	Bradykininrezeptor 1
B2R	Bradykininrezeptor 2
cDNA	komplementäre DNA
cm	Zentimeter
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAMP	danger associated molecular pattern
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECL	enhanced chemiluminiscence
FXII	Blutgerinnungsfaktor XII
FXIIa	aktivierter Blutgerinnungsfaktor XII
h	Stunde
hKNG	hochmolekulares Kininogen
hPK	humanes Plasmakallikrein
H&E	Hämatoxylin/Eosin
Il-1 $\beta$	Interleukin-1 $\beta$
KNG	Kininogen
KKS	Kallikrein-Kinin-System / Kontakt-Kinin-System
M	molar
mA	Miliampère
MCAO	Verschluss der Arteria cerebri media (Middle cerebral artery occlusion)
mM	milimolar
mg	Miligramm
ml	Mililiter
min	Minute
mm	Milimeter
mRNA	Boten-RNA
kDa	Kilodalton
MRT	Magnetresonanztomographie
o.g.	oben genannt
PaCO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid-Partialdruck
PaO <sub>2</sub>	Sauerstoff-Partialdruck
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PFA	Paraformaldehyd
PK	Plasmakallikrein

$PK^{-/-}$	Plasmakallikrein-defiziente Mäuse
$PK^{+/+}$	Plasmakallikrein-exprimierende Mäuse
pMCAO	permanenter Verschluss der Arteria cerebri media
pre-PK	Plasmaprekallikrein
PVDF	Polyvinylidenfluorid
I/R	Ischämie/Reperfusion
RT	Raumtemperatur
rt-PA	rekombinanter Gewebefibrinolyseaktivator
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
TEMED	Tetramethylethylenediamin
tMCAO	transienter Verschluss der Arteria cerebri media
TGF- $\beta$ 1	Transforming Growth Faktor beta-1
TNF- $\alpha$	Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$
TTC	2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid
U	Umdrehungen
V	Volt
W	Watt
wildtypisch	WT
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
$\mu\text{l}$	Mikroliter
$\alpha$ -PK	Plasmakallikrein-neutralisierender Antikörper

## **1. Einleitung**

### **1.1. Schlaganfall – Begriffsdefinition, Formen, Vorkommen, Bedeutung und Behandlung**

Als Schlaganfall bezeichnet man ein plötzlich eintretendes neurologisches Defizit infolge einer Minderdurchblutung des Gehirns (Ischämie) oder, seltener, auf Grund einer Hirnblutung. Bei der Ischämie kommt es zu einer relativen oder absoluten Minderversorgung des Gewebes mit Sauerstoff und konsekutiv auch mit anderen für das Gehirn lebenswichtigen Stoffen. Auf Grund des Funktionsausfalls der betroffenen Gehirnareale entwickeln sich – je nach Lokalisation – unterschiedliche neurologische Symptome, wie beispielsweise ein motorisches oder sensibles Defizit (z.B. Hemiparese), eine Sprachstörung (Aphasie oder Dysarthrie) oder eine Beeinträchtigung des Sehens (z.B. Doppelbilder oder Hemianopsie) [1]. Auf die seltener vorkommende Hirnblutung (ca. 20% aller Schlaganfälle) wird im Folgenden nicht weiter eingegangen.

Die weitaus häufiger auftretende Unterform ist die fokale zerebrale Ischämie, die etwa 80 % aller Schlaganfälle ausmacht. Dabei kommt es zu einem Verschluss eines oder mehrerer hirnversorgender Gefäße. Die dem Gefäßverschluss zu Grunde liegende Ursache lässt sich nach den sogenannten TOAST-Kriterien (Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment) von Adams et al. aus dem Jahre 1993 einteilen [2]. Diese sind:

- arterio-arterielle Embolien auf dem Boden einer Atherosklerose großer Arterien (Makroangiopathie)
- kardioembolische Ereignisse, beispielsweise auf dem Boden von Vorhofflimmern
- Okklusion kleiner Gefäße (zerebrale Mikroangiopathie)
- Infarkte anderer bestimmter Ursachen (z.B. Gefäßdissektion) und
- Infarkte unbestimmter Ursachen.

Schlaganfälle sind häufig. Gemäß der Global-Burden-of-Disease-Studie aus dem Jahre 2010 sind sie mit etwa 5,9 Millionen Todesfällen weltweit, was einem Gesamtanteil von 11,1 % entspricht, die zweithäufigste Todesursache nach den ischämischen Herzerkrankungen [3]. Darüber hinaus ist der Schlaganfall die Krankheit, die die Lebensqualität einer Bevölkerung – gemessen in sogenannten disability-adjusted life years – am drittstärksten beeinträchtigt – hinter der ischämischen Herzerkrankung und unteren Atemwegsinfektionen [4].

Die umfangreichsten Daten zu Prävalenz und Inzidenz des Schlaganfalles in Deutschland liefert das Erlanger Schlaganfall Register [5]. Legt man dessen Zahlen für 2008 zu Grunde, ereignen sich in Deutschland jährlich etwa 196 000 erstmalige Schlaganfälle, hinzu kommen etwa 66 000 Patienten mit einem sich wiederholenden Schlaganfall [6], d.h. etwa alle 2 Minuten (min) erleidet ein Mensch in Deutschland einen Schlaganfall. Und auch die Beeinträchtigungen nach einem Schlaganfall sind enorm, so weisen ca. 25% der einen erstmaligen Schlaganfall überlebenden Patienten nach 3 Monaten gravierende Einschränkungen der Aktivitäten des täglichen Lebens auf [7] und rund 17 % leiden unter mittelschweren bis schweren Funktionsstörungen [8]. Des Weiteren sind auch die sozioökonomischen Auswirkungen des Krankheitsbildes gravierend, so gehen aktuelle Schätzungen davon aus, dass in den nächsten 20 Jahren ca. 108 Milliarden Euro an direkten Kosten für die Versorgung von Patienten mit erstmaligem ischämischen Schlaganfall anfallen [9].

Leider sind bis heute die medikamentösen Therapieoptionen in der Behandlung des ischämischen Schlaganfalls weiterhin stark limitiert. So ist die seit 1996 zugelassene intravenöse Thrombolyse mit dem rekombinanten Gewebeplastinogenaktivator (rt-PA) innerhalb eines Zeitfensters von 4,5 Stunden (h) nach Beginn der Symptomatik das einzig zugelassene medikamentöse Behandlungsverfahren mit einem nachgewiesenen positiven klinischen Effekt [10, 11]. Rt-PA ist umso effektiver, je früher es angewendet wird [12]. Des Weiteren kommen für eine kleine Gruppe von Patienten mit proximalen Gefäßverschlüssen in der

vorderen Zirkulation innerhalb eines Zeitraums von 6 h mechanische Thrombektomieverfahren zum Einsatz, bei denen im Rahmen einer angiographisch durchgeführten Katheteruntersuchung versucht wird, mittels sog. Stent-Retriever okkludierende Thromben zu entfernen und das Gefäß somit zu rekanalisieren. Die Überlegenheit einer Kombination dieses Verfahrens mit einer intravenösen Lysetherapie gegenüber einer Lysetherapie alleine konnte 2015 in zahlreichen Studien nachgewiesen werden und stellte einen Durchbruch in der Schlaganfallbehandlung dar [13-17]. Zwei nicht-pharmakologische Behandlungsoptionen mit belegtem Nutzen sind die Behandlung auf einer spezialisierten Stroke Unit [18] sowie, bei großen raumfordernden Schlaganfällen im Versorgungsgebiet der Arteria cerebri media (ACM), die chirurgische Hemikraniektomie mit Entfernung der Schädelkalotte [19].

## **1.2. Pathophysiologie der fokalen zerebralen Ischämie**

Der Gewebeschaden nach einer zerebralen Ischämie verläuft in mehreren Phasen. Unterschreitet der zerebrale Blutfluss den zur Erhaltung des Strukturstoffwechsels kritischen Schwellenwert, sterben die betreffenden Neuronen nach wenigen Minuten ab [20], der primäre Hirnschaden entsteht.

In den Gebieten um den Infarktkern steigt aber durch kollaterale Blutversorgung aus Gefäßen, die nicht von der Okklusion betroffen sind, der zerebrale Blutfluss an, so dass in diesen als Penumbra [21, 22] bezeichneten Gebieten unter Umständen zwar die Schwelle des zur Aufrechterhaltung des Funktionsstoffwechsels notwendigen Blutflusses unterschritten ist, die Funktion zwar also zunächst temporär und reversibel erloschen ist, aber der Blutfluss zur Aufrechterhaltung der zellulären Struktur noch ausreicht. Überschreitet der Blutfluss hier wieder den Schwellenwert zum Funktionsstoffwechsel, normalisiert sich die Funktion der Neurone. In diesem Grenzbereich der relativen Ischämietoleranz zwischen den Schwellenwerten des Struktur- und Funktionsstoffwechsels können die Neuronen aber nicht beliebig lange überleben, sondern sterben nach

einer von der Restdurchblutung abhängigen unterschiedlichen Dauer ab, und tragen somit zum Größenwachstum des Infarktes und zum sekundären Hirnschaden bei. Diesen Bereich um den Infarktkern herum, die Penumbra, zu retten, ist also Ziel einer Schlaganfalltherapie.

Die komplexen pathophysiologischen Vorgänge der fokalen zerebralen Ischämie werden an dieser Stelle kurz an Hand eines Schemas von Endres aus dem Jahre 2008 [23] nachgezeichnet:

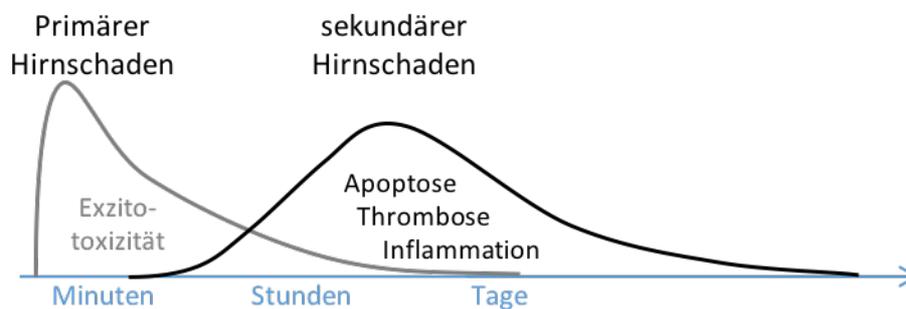


Abbildung 1: Pathophysiologische Vorgänge beim Schlaganfall, modifiziert nach Endres

Die dem primären Hirnschaden zu Grunde liegenden pathophysiologischen Vorgänge lassen sich unter dem Begriff der Exzitotoxizität zusammenfassen: Durch die Sauerstoff- und Glucosedeprivation der Neurone brechen bereits wenige Sekunden nach Einsetzen des anoxischen Reizes die Ionengradienten über die Zellmembran zusammen, ihre Membranen depolarisieren [24]. In Folge einer Aktivierung von Calciumkanälen kommt es zur konsekutiven Freisetzung von exzitatorischem Glutamat, zur Zellschwellung, Ödembildung und Überaktivierung verschiedener Enzymsysteme, unter anderem von Proteasen und Endonukleasen. Es entstehen freie Radikale, die wiederum die Zellmembranen, die DNA und Mitochondrien schädigen, was letztlich zur Nekrose und Apoptose führt. Die Freisetzung von sog. DAMPs (danger associated molecular patterns) leitet die Phase des sekundären Hirnschadens ein, bei der insbesondere inflammatorische und thrombotische Prozesse eine gewichtige Rolle spielen [25]: Sie bewirken eine Aktivierung mikroglialer Zellen sowie eine Makrophageninfiltration

in das Infarktgebiet [26]. Die daraufhin ausgeschütteten proinflammatorische Zytokine wie der Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) oder Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) verstärken die Entzündungsreaktion und bewirken einen Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke (BHS) sowie konsekutiv eine Hirnödementwicklung. Zytokine wie Interleukin-23 bewirken eine Leukozyteninfiltration, in erster Linie von T-Lymphozyten, die ihrerseits die Entzündungsreaktion durch Ausschüttung weiterer proinflammatorischer Zytokine wie Interleukin-17 verstärken. In Folge der Hypoxie werden vermehrt reaktive Sauerstoffspezies produziert und es kommt zu Veränderungen der Scherbeanspruchungen der Blutgefäße und der Hochregulation von Zelladhäsionsmolekülen. Diese Vorgänge triggern die Aktivierung der Blutgerinnungskaskade, des Komplementsystems und die Aktivierung von Thrombozyten [27]. Dies führt zur Fibrinakkumulation und Thrombenbildung in nachgeschalteten kleinen Blutgefäßen und schließlich zu deren Verschluss. Parallel dazu bedingt ein Zusammenbruch der BHS eine Flüssigkeitsextravasation und somit Ödembildung [28-30]. Die inflammatorischen und prothrombotischen Vorgänge in der Pathogenese des Schlaganfalles sind eng miteinander verbunden, was zum Konzept des Schlaganfalles als thromboinflammatorische Krankheit führte [31]. Das Kallikrein-Kinin-System (KKS) und die intrinsische Gerinnungskaskade bilden in besonderer Weise weite Teile inflammatorischer und prothrombotischer Signalwege ab. Beiden gemeinsam sind ihre Ausgangspunkte, nämlich Blutgerinnungsfaktor XII (FXII) [32] und Plasmakallikrein (PK) [33]. Eine Blockade von FXII und PK erscheint daher unter therapeutischen Gesichtspunkten besonders vielversprechend, würde man hiermit doch sowohl die postischämische Entzündung als auch die Thrombose limitieren können – die beiden Hauptmechanismen des sekundären Hirnschadens.

### 1.3. Plasmakallikrein – Ausgangspunkt des Kallikrein-Kinin-Systems und der intrinsischen Gerinnungskaskade

PK, auch bekannt als Fletcher-Faktor, ist eine vorwiegend in der Leber synthetisierte Peptidase, die im Blut fast ausschließlich in ihrer inaktiven Vorstufe (Zymogen) als Plasmaprekallikrein (pre-PK) vorliegt. Pre-PK hat ein molekulares Gewicht von 85 bis 88 kDa und sein weitaus größter Teil, nämlich 75 bis 90%, liegt im Blut gebunden an sein Effektorsubstrat, hochmolekulares Kininogen (hKNG), vor. Der wichtigste physiologische Aktivator von pre-PK ist der aktivierte FXII (Hageman-Faktor), der es durch Abspalten eines Aminosäurepaares in seine aktive Form PK überführt, das dann aus einer leichten und einer schweren Peptidkette besteht [33].

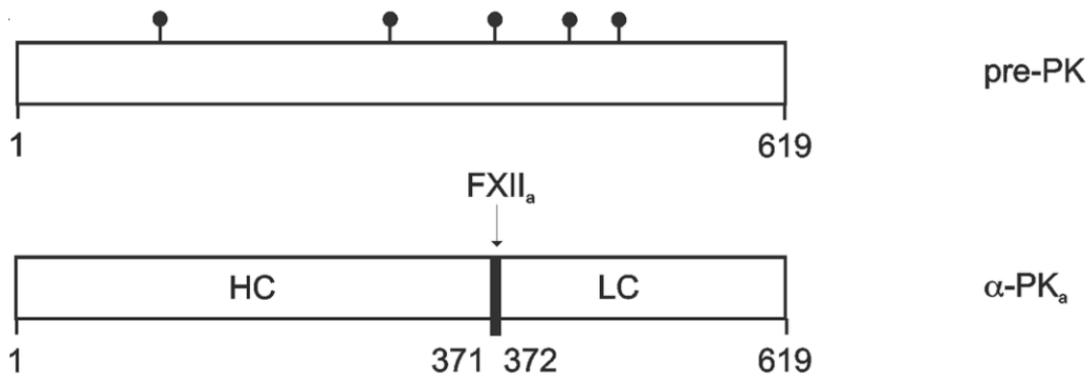


Abbildung 2: Generierung aktiven Plasmakallikreins ( $\alpha$ -PK<sub>a</sub>) aus seiner Vorstufe Plasmaprekallikrein (pre-PK) durch Spaltung durch den aktivierte Blutgerinnungsfaktor XII (FXII<sub>a</sub>) in eine schwere (HC) und eine leichte Kette (LC), modifiziert nach Björkqvist [33]

Auf Grund des Vorhandenseins der Aminosäure Serin als integraler Bestandteil des katalytischen Zentrums lässt es sich zu der Gruppe der Serinproteasen zählen, deren prominenteste Vertreter das Verdauungsenzym Trypsin, der Gerinnungsfaktor Thrombin und das gerinnungshemmende Plasmin sind.

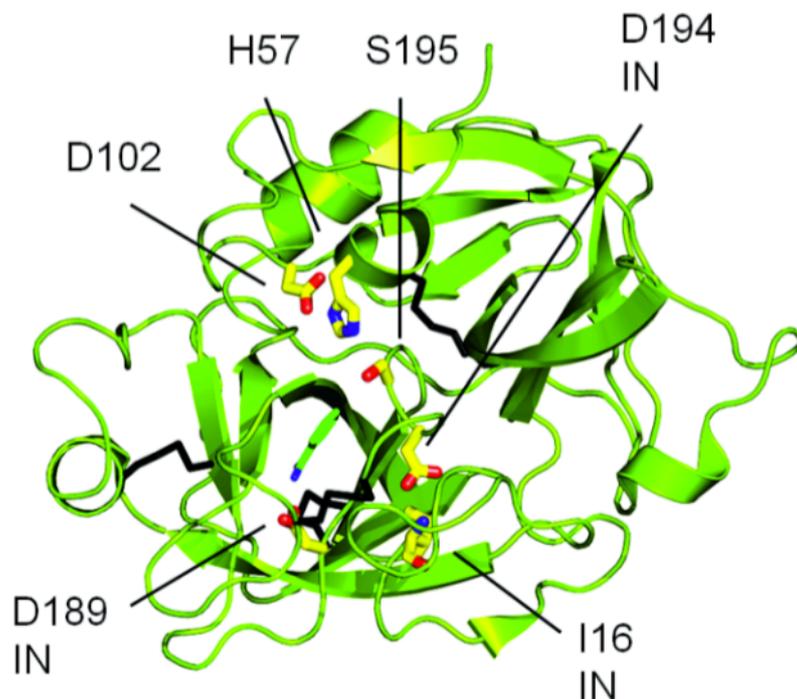


Abbildung 3: Modelldarstellung aktiven Plasmakallikreins mit katalytischem Zentrum (katalytische Triade aus Serin in Position 195 (S195), Aspartat in Position 102 (D102) und Histidin in Position 57 (H57)), nach Pathak [34]

Das aktivierte PK ist physiologischerweise in eine Vielzahl an Signalwegen involviert, zum ersten in den intrinsischen Signalweg der plasmatischen Gerinnung: Es aktiviert in einer Feedback-Schleife weitere FXII-Moleküle, so dass es zu einer Autoamplifikation von aktiviertem FXII und aktivem PK kommt. Zum zweiten spaltet es von dem an ihn gebundenen hKNG das aktive Bradykinin (BK) ab, einen der potentesten Entzündungsmediatoren des menschlichen Organismus überhaupt und Haupteffektor des KKS. Zum dritten ist es am alternativen Weg des Komplementsystems beteiligt, in dem es einen wichtigen Teil, nämlich Faktor B, aktiviert. Aber auch an fibrinolytischen Signalwegen ist es beteiligt, so überführt es viertens nicht nur Plasminogen in das aktive Plasmin, sondern aktiviert in einer weiteren Feedback-Schleife auch den Plasminogenaktivator vom Urokinase-Typ, der wiederum seinerseits ebenfalls Plasmin aktiviert. Letztlich ist es fünftens in das Renin-Angiotensin-System eingebunden, indem es Prorenin in das aktive Renin überführt und hiermit letztlich zu einer Steigerung des Blutdrucks führt [33].

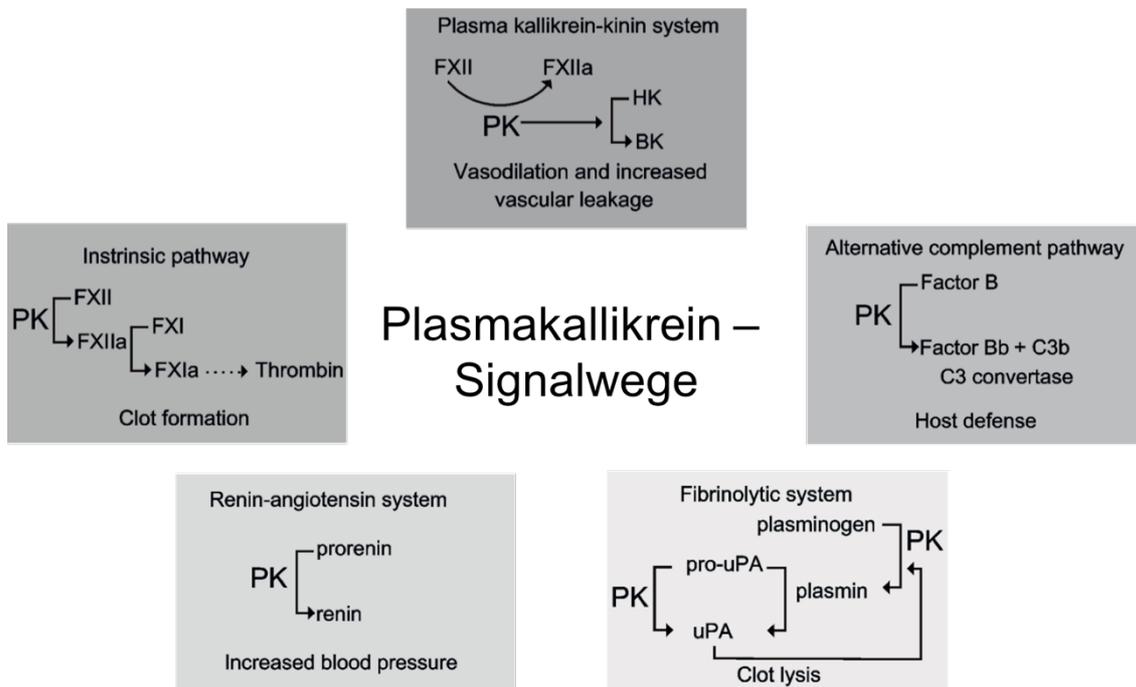


Abbildung 4: Signalwege, an denen Plasmakallikrein beteiligt ist, modifiziert nach Björkqvist [33]

## 1.4. Das Kallikrein-Kinin-System

### 1.4.1. Funktionsweise und physiologische Rolle des Kallikrein-Kinin-Systems

Pionierarbeit auf dem Gebiet der Erforschung des KKS leisteten der Berliner Chirurg Emil Karl Frey und der Münchner Chemiker Heinrich Kraut. Sie nahmen in den 1920er-Jahren die Beobachtung von Abelous et al. aus dem Jahre 1909 wieder auf, dass die intravenöse Injektion von Urin bei Hunden eine Blutdrucksenkung zur Folge hat, und charakterisierten darauf aufbauend ein neues Kreislaufhormon [35-37], das sie in besonders hoher Konzentration aus dem Pankreas gewinnen konnten [38, 39], und daraus abgeleitet Kallikrein nannten. Erst einige Jahre später konnten mit dem zunächst als DK bezeichneten (1937 [40]) Kallidin (1948 [41]) und dem BK (1949 [42]) die beiden Haupteffektoren des Systems beschrieben werden.

Das System gibt es, in etwas unterschiedlicher Ausgestaltungsform, in zwei verschiedenen Kompartimenten des Körpers, zum einen als Gewebskallikrein-Kallidin-System im Gewebe und als Plasmakallikrein-Bradykinin-System im Blutplasma.

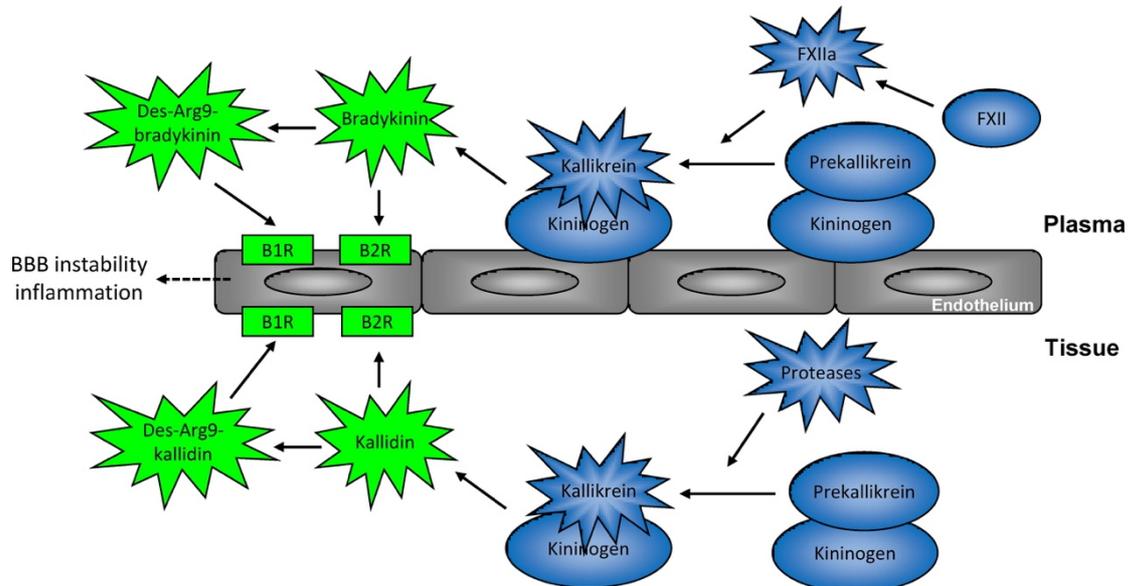


Abbildung 5: Das Kallikrein-Kinin-System [43]

Gemeinsamer Ausgangspunkt beider Systeme ist ein in irgendeiner Form schädigendes Ereignis, beispielsweise eine Ischämie oder ein Trauma, die zum einen zur Freisetzung proteolytischer Enzyme durch Gewebs- und Plasmakallikrein im Allgemeinen, und zur Aktivierung des FXII durch PK im Besonderen führen. Unter den freigesetzten proteolytischen Enzymen befinden sich mit z. B. Trypsin, Thrombin und C1-Esterase auch solche, die im Gewebe das Gewebskallikrein aktivieren, während der aktivierte FXII aus pre-PK das enzymatisch aktive PK abspaltet. Das nun aktivierte Gewebskallikrein spaltet aus seinem Substrat, dem niedermolekularen KNG, die aktive Substanz Kallidin ab, während PK aus hKNG BK abspaltet. Beide Effektoren vermitteln ihre multiplen physiologischen und pathophysiologischen Effekte über die zwei verschiedenen BK-Rezeptoren 1 und 2 (B1R und B2R) [43].

Der B2R wird konstitutiv auf den verschiedensten Zelltypen exprimiert und ist für die zeitlich nicht verzögerten hauptsächlich physiologischen Effekte des KKS verantwortlich. Der B1R wird erst einige Zeit nach einem schädigenden Ereignis exprimiert, induziert vor allem durch proinflammatorische Zytokine wie TNF- $\alpha$  oder Il-1 $\beta$ , die auch beispielsweise auf den Kontakt des Körpers mit bakteriellem Lipopolysaccharid ausgeschüttet werden [44]. Er ist vor allem für die längerfristigen pathophysiologisch relevanteren Effekte der Kinine verantwortlich. Die Effekte der Aktivierung beider Rezeptoren sind sehr ähnlich, nämlich eine Vasodilatation, eine zur Plasmaextravasation und somit zur Ödembildung beitragende Venokonstriktion, eine Schmerzinduktion an sensorischen Neuronen über die Ausschüttung nozizeptiv aktiver Substanzen und die Initiierung inflammatorischer Zellmigrationen [45].

#### 1.4.2. Das Kallikrein-Kinin-System bei der fokalen zerebralen Ischämie

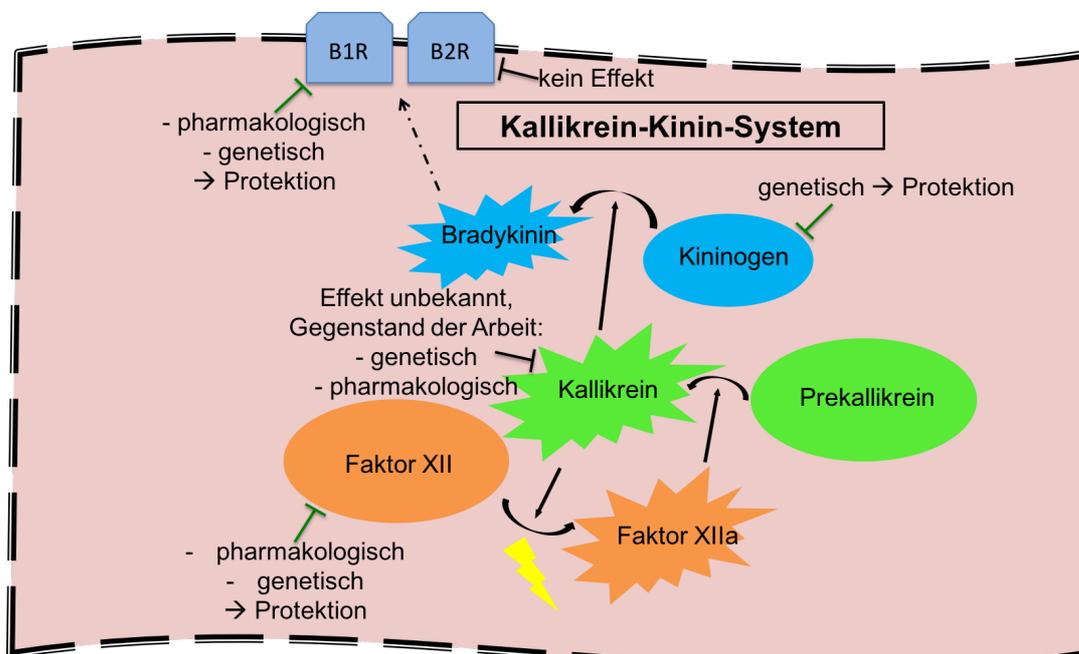


Abbildung 6: Das Kallikrein-Kinin-System beim ischämischen Schlaganfall

Kamiya et al. untersuchten 1993 den Einfluss des Haupteffektors des plasmatischen KKS, BK, auf die postischämische zerebrale Ödembildung. Sie inhibierten bei Ratten BK pharmakologisch und konnten daraufhin eine geringere Hirnödembildung nachweisen [46]. 1997 beschrieben Relton et al. 1997 [47] einen protektiven Effekt durch pharmakologische Blockade des B2R. Der Effekt konnte mit Anatibant, das ebenfalls den B2R inhibiert, repliziert werden [48], und auch die Ergebnisse einer Arbeit aus dem Jahre 2005 mit Mäusen, die für den B2R defizient waren, passten hierzu [49]. Ganz andere Ergebnisse zeigte dann eine 2009 veröffentlichte Arbeit von Austin et al. [50]. Die protektiven Effekte einer B2R-Defizienz konnten nicht repliziert werden, darüber hinaus zeigte sich stattdessen, dass sowohl eine B1R-Defizienz als auch dessen pharmakologische Inhibition protektiv waren: Beide Mausgruppen zeigten kleinere Infarkt volumina nach einstündigem Verschluss der ACM sowie ein funktionell besseres Überleben. Die B1R-Defizienz führte des Weiteren zu einem geringeren Zusammenbruch der BHS, ferner wanderten in das Infarktgebiet weniger inflammatorische Zellen ein.

Eine erst kürzlich erschienene Arbeit von Langhauser et al. [51] beschäftigte sich dann mit der Rolle des hKNGs bzw. mit der seines Effektors, BK, im Schlaganfallmodell: KNG-defiziente Mäuse, d.h. Mäuse, die folglich auch kein BK bilden konnten, waren im Vergleich zu wildtypischen (WT) Tieren in erheblichem Ausmaß nach einer zerebralen Ischämie geschützt. Sie entwickelten kleinere Infarkte, schnitten in Funktionstest besser ab und überlebten den Schlaganfall häufiger. Sie zeigten eine geringere mikrovaskuläre Thrombenbildung, einen geringeren BHS-Schaden und weniger postischämische Inflammation.



zeigte sich in einer Arbeit von Heydenreich et al. [54]. der exogen zugeführte C1-Esterase Inhibitor (C1-Inh) Berinert®, der FXIIa und XIa der intrinsischen Gerinnungskaskade sowie PK hemmt, und somit auch – wie PK – in beide Systeme eingebunden ist. FXI-defiziente Mäuse waren ebenfalls teilweise vor Schlaganfällen geschützt [55].

## **1.6. Plasmakallikrein-Defizienz**

### **1.6.1. Plasmakallikrein-Defizienz beim Menschen**

Interessanterweise existiert beim Menschen eine extrem seltene angeborene, autosomal rezessive Form der schweren PK-Defizienz, die 1965 von Hathaway et al. zum ersten Mal beschrieben wurde [56] und von der weltweit bisher nur rund 80 Fälle bekannt sind [57]. Hathaway hatte eine amerikanische Familie namens Fletcher untersucht und den defizienten Faktor nach ihr entsprechend Fletcher-Faktor genannt. Nachdem sich später herausstellte, dass es sich dabei um pre-PK handelte, werden diese Namen seitdem synonym verwendet. Klinisch zeigen diese Patienten keine spezifischen Eigenschaften oder Symptome, insbesondere keine erhöhte Blutungsneigung. Lediglich die verlängerte aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT), die sich nach ausgiebigem Kontakt der Probe mit Glas (alternative Aktivierung des FXIIs, daher auch Kontakt-Kinin-System (KKS)) prompt normalisiert, geben einen Hinweis auf sie. Daher ist auch ein wesentlich häufigeres Vorkommen in der Bevölkerung durchaus möglich, bleibt aber auf Grund des möglicherweise geringen Krankheitswertes undiagnostiziert [33]. In den letzten Jahren wurde allerdings immer wieder ein prothrombotischer Effekt einer PK-Defizienz diskutiert, da unter den rund 80 in der Literatur beschriebenen Fällen sich auch tatsächlich 9 mit thrombotischen Ereignissen befanden. Bei dieser kleinen Fallzahl ist ein kausaler Zusammenhang mit diesen auch in der Allgemeinbevölkerung sehr häufig auftretenden thrombotischen Krankheiten aber nicht sicher abzuleiten, zumal sechs der 9 betroffenen Patienten weitere thrombotische Risikofaktoren wie Rauchen,

Übergewicht, arterielle Hypertonie, Hypercholesterinämie oder Diabetes mellitus aufwiesen [58].

### **1.6.2. Plasmakallikrein-Defizienz im Tiermodell**

Es gibt bisher zwei Arbeiten, in denen PK-defiziente Mäuse verwendet wurden: Im Jahre 2011 wurde der Einfluss von PK auf die Hyperglykämie-induzierte Größenzunahme einer intrakraniellen Blutung untersucht. Es zeigte sich, dass diese durch PK vermittelt wird [59]. Entsprechend zeigten sowohl PK-defiziente Mäuse als auch Mäuse, bei denen PK mittels eines spezifischen Antikörpers (Anti-PK) blockiert wurde, eine kleinere Hämatomexpansion nach intrazerebraler Blutinjektion.

Ein Jahr später folgte eine Arbeit von Bird et al., in der PK-defiziente Mäuse in verschiedenen Thrombosemodellen untersucht wurden. Diese zeigten peri-prozedural keinerlei Blutungskomplikationen, lediglich die Blutungszeit nach Abtrennen des distalsten Teils der Schwanzspitze (Tail Bleeding Time) war moderat verlängert. Darüber hinaus war, ähnlich wie bei Menschen, die aPTT stark verlängert bei normaler Prothrombin-Zeit. Einen deutlich antithrombotischen protektiven Effekt zeigten die PK-defizienten Tiere in diversen Thrombosemodellen, etwa der Fe<sub>3</sub>Cl-induzierten arteriellen oder venösen Thrombose [60].

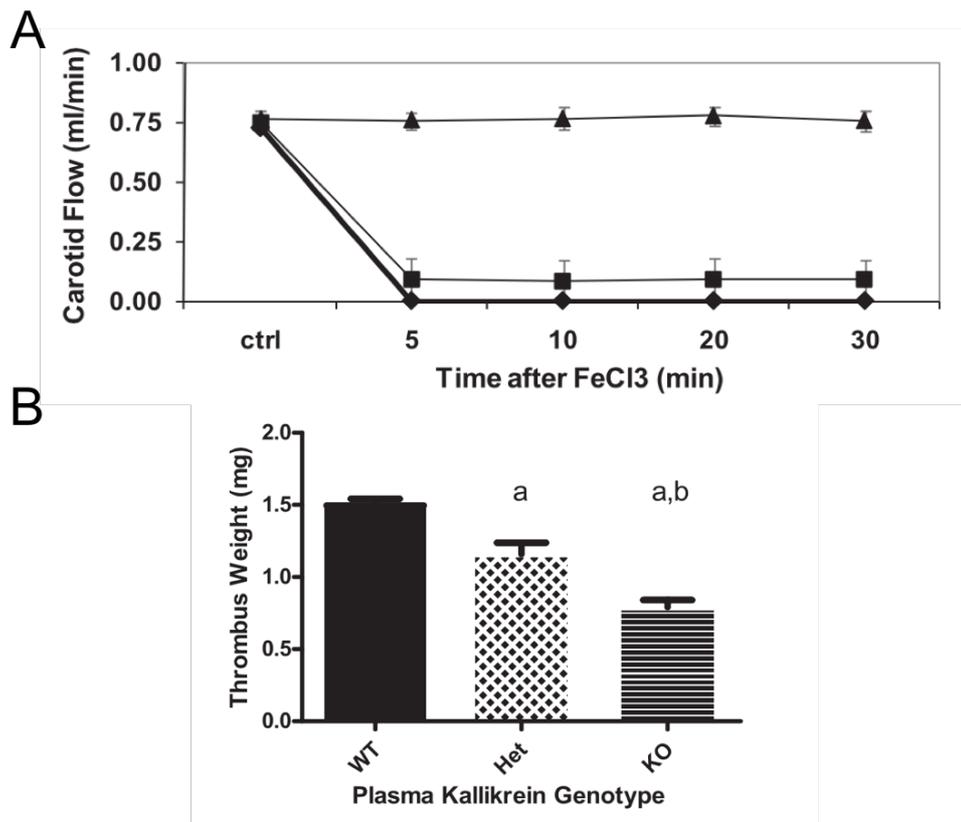


Abbildung 8: (A) Höherer Fluss über der Arteria carotis communis nach arterieller Verletzung mit anschließender Thrombose bei PK-defizienten Mäusen (Dreiecke) im Vergleich zu heterozygoten (Rechtecke) und wildtypischen Mäusen (Rauten). (B) Geringeres Thrombusgewicht nach venöser Thrombose in PK-defizienten (KO) Mäusen im Vergleich zu wildtypischen (WT) und heterozygoten (Het). [60]

Diese Arbeit lieferte somit erste Hinweise auf protektive Effekte einer PK-Defizienz in Bezug auf pathologische thrombotische Ereignisse und unterstreicht eine mögliche Schlüsselrolle von PK bei der Thrombenbildung.

### 1.7. Zielsetzung der Arbeit

Ziele der vorliegenden Arbeit waren zum ersten eine umfassende phänotypische Charakterisierung von PK-defizienten Mäusen ( $Pk^{-/-}$ ) in verschiedenen Mausmodellen der fokalen zerebralen Ischämie. Zum zweiten sollten die dem

Phänotyp zu Grunde liegenden Mechanismen mit den Schwerpunkten Thrombose, Inflammation und Störung der BHS untersucht werden und zum dritten die Wirksamkeit einer spezifischen Blockade von PK in WT Mäusen mit Schlaganfall getestet werden (Translation).

## **2. Material und Methoden**

### **2.1. Versuchstiere**

Sämtliche Versuchstiere wurden in der Tierhaltung der Neurologischen Universitätsklinik oder der Tierhaltung des Zentrums für Experimentelle Molekulare Medizin der Universität Würzburg gemäß den geltenden Tierschutzbestimmungen gehalten und gezüchtet. Die Tierversuche dieser Arbeit wurden in dem Tierversuchsantrag 55.2-2531.01-17/10 von der Regierung von Unterfranken genehmigt. Die erste Generation (4 Weibchen und 2 Männchen) der eingesetzten gentechnisch veränderten Mauslinie K1kb1 (Gen 1798, C57BL6-Hintergrund) wurde heterozygot defizient für PK von der Firma Deltagen im Alter von 4 Wochen erworben, im Alter von 7 bis 9 Wochen untereinander verpaart, und die Nachkommen (F1-Generation) genotypisiert. Die dann für PK homozygot defizienten Tiere sowie wildtypische Geschwistertiere wurden jeweils in o. g. Alter untereinander weiter verpaart, so dass ab der 2. Generation nur noch jeweils homozygote Tiere entstanden. Die Homozygotie wurde in den Folgegenerationen durch spezifische Genotypisierung nachgewiesen. Bei den Versuchen waren die Tiere zwischen 6 und 8 Wochen alt, ferner eingeteilt in männliche und weibliche Tiere.

### **2.2. Modell des Verschlusses der Arteria cerebri media (Middle cerebral artery occlusion = MCAO)**

#### **2.2.1. Transienter Verschlusses der Arteria cerebri media (tMCAO)**

Nach 3-minütiger Narkoseeinleitung mit 5 % Isofluran (Baxter) wurden die Tiere rücklings auf einer autoregulierten Wärmeplatte unter einem Operationsmikroskop (OPMI 6-CFC, Zeiss) fixiert und konstant mit 2 % Isofluran narkotisiert. Die Körpertemperatur wurde während der Operation konstant auf 37 °C gehalten. Nach großflächiger Hautdesinfektion erfolgte ein medianer Hautschnitt am Hals der Maus zwischen Mandibula und Sternum und die Präparation des rechten

Hals-Gefäß-Nervenstranges mit Gabelung der A. carotis communis (ACC) in A. carotis externa (ACE) et interna (ACI). Nach Ligatur der ACC und der ACE erfolgte knapp oberhalb der Ligatur eine Inzision der ACC, durch die ein mit Silikon-beschichteter monofilamentärer Nylon-Faden der Stärke 6.0 (6021, Docol Coop.) eingeführt (Abbildung 9) und bis in die A. communicans anterior vorgeschoben wurde (Abbildung 10). Der Abgang der A. cerebri media dextra wurde somit durch diesen Faden verschlossen, wodurch eine Ischämie in deren Versorgungsgebiet bewirkt wurde [61].

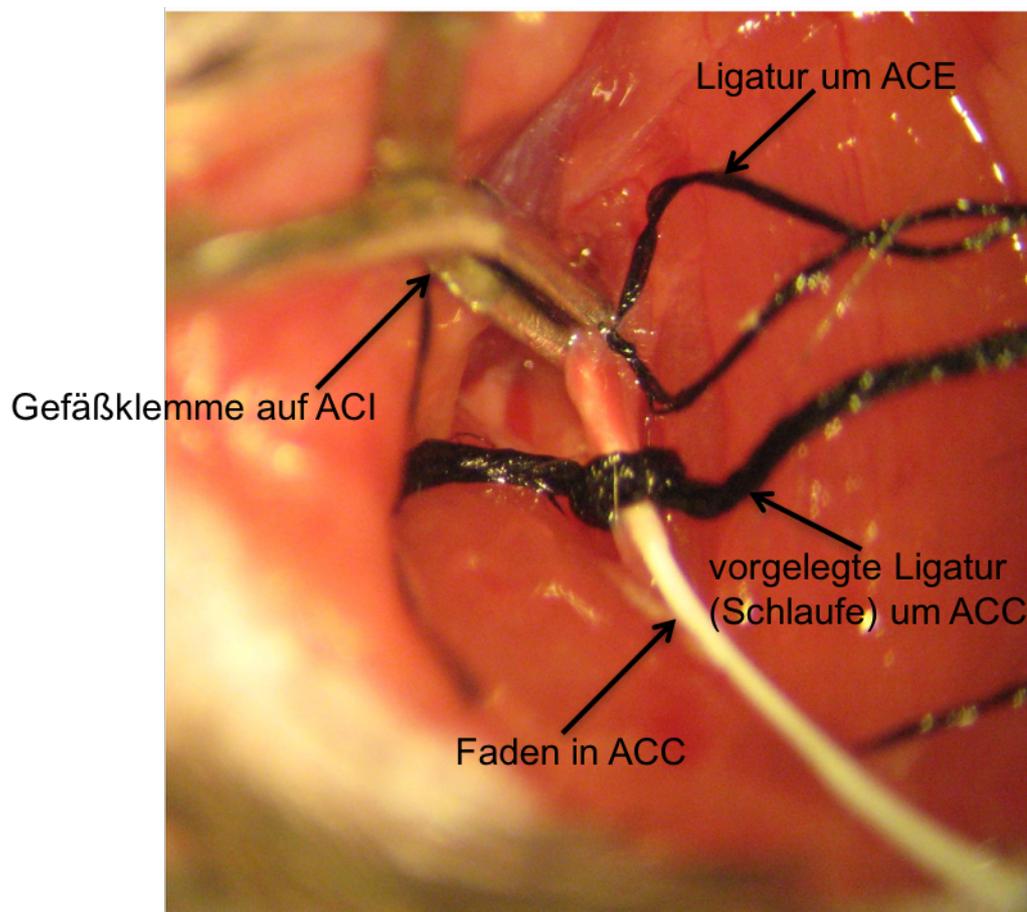


Abbildung 9: OP-Situs, Bild von Dr. Friederike Langhauser

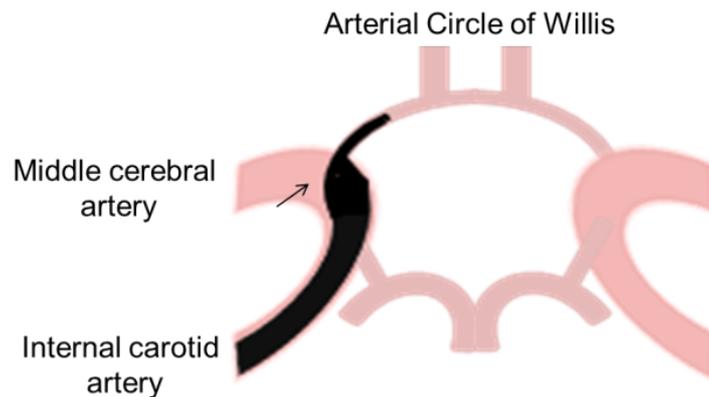


Abbildung 10: schematische Darstellung des Circulus arteriosus willisii mit Verschluss des Abgangs der ACM durch Faden (schwarz, Pfeil)

Die Mäuse wurden nach Induktion der Ischämie und Beendigung des ersten Teils der Operation zum Aufwachen in einen beheizten Käfig verbracht und kurz vor Ablauf der Ischämiezeit (1 h) erneut wie beschrieben anästhesiert und unter dem Mikroskop fixiert. Der Faden wurde gezogen, um die Reperfusion des durch die mittlere Zerebralarterie versorgten Territoriums zu ermöglichen. Anschließend wurde die Wunde mit Einzelknopfnähten verschlossen. Nach erneutem Aufwachen in dem beheizten Käfig wurden sie bis zu den jeweiligen Endpunkten der Experimente in ihren gewohnten Käfigen in einem separaten beheizten Raum gehalten.

### **2.2.2. Permanenter Verschlusses der Arteria cerebri media (pMCAO)**

Beim Modell des permanenten Verschlusses der MCA (permanent MCAO = pMCAO) wurde der erste Operationsschritt analog dem Vorgehen beim Modell der tMCAO durchgeführt (siehe 2.2.1), jedoch wurde die Wunde schon nach dem ersten Operationsschritt endgültig mit Einzelknopfnähten verschlossen, und die Tiere in den beheizten Käfig verbracht. Der zweite Operationsschritt, nämlich das Entfernen des Silikonfilaments, entfiel, so dass keine Reperfusion stattfand.

### 2.3. Neurologische Funktionstests

Nach Ablauf der für die jeweiligen Versuchsbedingungen vorgesehenen Zeiten wurden die Tiere zwei verschiedenen neurologischen Testverfahren unterzogen, um die Beeinträchtigung durch den Schlaganfall funktionell zu beurteilen.

#### 2.3.1. Bederson Score

Mit Hilfe des Bederson Scores [62], bei dem die Tiere auf eine Unterlage gesetzt und ihre Spontanbewegungen beobachtet wurden, erfolgte eine Untersuchung der Tiere hinsichtlich ihres allgemeinen neurologischen Status. Die graduelle Bewertung des Bederson Scores geschieht nach folgenden Kriterien:

- 5 keine Spontanbewegung (stärkst mögliche Beeinträchtigung)
- 4 Drehen um die Longitudinalachse (Circling) und zusätzlich gelegentliches Drehen um die Sagittalachse (Spinning)
- 3 Circling
- 2 Flexion der linken Vorderpfote und zusätzlich verminderter lateraler Stellreflex
- 1 Flexion der linken Vorderpfote
- 0 keine Auffälligkeiten

#### 2.3.2. Grip Test

Der Grip Test [63] diente dazu, um spezifisch die motorische Funktion und die Koordination der Mäuse zu evaluieren. Die Tiere wurden dazu auf einer Holzstange in 30 cm Höhe mit 5 mm Durchmesser abgesetzt und graduell nach folgenden Kriterien bewertet:

- 0 Maus fällt herunter (stärkst mögliche Beeinträchtigung)
- 1 Maus hängt mit einer oder beiden Vorderpfoten am Holzstab
- 2 Maus hängt mit einer oder beiden Vorderpfoten am Holzstab und Bemühungen auf den Holzstab zu klettern
- 3 Maus hängt mit einer oder beiden Vorderpfoten und einer oder beiden Hinterpfoten am Holzstab
- 4 Maus hängt mit beiden Vorder- und Hinterpfoten am Holzstab und schlingt den Schwanz um den Holzstab
- 5 Maus hängt mit beiden Vorder- und Hinterpfoten am Holzstab und schlingt den Schwanz um den Holzstab und gelangt zum Außengestell

#### **2.4. Schlaganfall-MRT-Bildgebung**

Mit Hilfe der seriellen Magnetresonanztomographie (MRT) ist es möglich, die Infarkt volumina sowie eine mögliche Infarktgrößenentwicklung zu mehreren Zeitpunkten am selben Tier zu bestimmen. Mit blutungssensitiven T2-gewichteten Gradienten-Echo-Sequenzen, in denen sich ischämische Areale hyperintens (hell) und Blutungen hypointens (dunkel) darstellen, kann zudem eine sekundäre hämorrhagische Infarkttransformation aufgedeckt werden. MR-tomographische Aufnahmen wurden an den Tagen 1 und 7 nach tMCAO an einem 3 Tesla MRT-Gerät (MAGNETOM Trio, Siemens Healthcare) durchgeführt. Hierfür wurden die Tiere wie oben beschrieben mit Isofluran anästhesiert und auf dem Rücken liegend auf einer Wärmeplatte fixiert. Eine 2-Kanal-Oberflächen-Spule (Rapid Biomedical) wurde für die MRT-Untersuchung über dem Kopf platziert, und die Bilder erstellt. Es wurden verschiedene Sequenzen angefertigt, unter anderem eine koronare T2-gewichtete Sequenz (Schichtdicke 2 mm) und eine blutungssensitive koronare T2-gewichtete Gradienten-Echo-Sequenz (Schichtdicke 1 mm). Die Auswertung erfolgte an einer externen

Arbeitsstation (Leonardo, Siemens Healthcare) und erfolgte verblindet. Die Infarktgrößenbestimmung erfolgte planimetrisch an Hand der T2-gewichteten Gradienten-Echo-Sequenz-Bilder. Die MRT-Experimente erfolgten in Zusammenarbeit mit Dr. György Homola und Virgil Michels (Abteilung für Neuroradiologie, Universitätsklinikum Würzburg).

## **2.5. Bestimmung der Blutungszeit**

Anästhesierten Mäusen (Ketamin/Rompun (Gemisch aus 0,6 ml Ketanest (100 mg/ml), 0,4 ml Xylazin (20 mg/ml) und 4,0 ml NaCl; daraus dann intraperitoneale Injektion von 0,1 ml/10 g Mausgewicht) wurde das distale Schwanzende mit einem Skalpell abgetrennt (2 mm). Alle 20 Sekunden wurden die Blutropfen mit einem Filterpapier (Whatman) aufgefangen, ohne die Wundfläche zu berühren. Sobald die Blutung zum Stillstand gekommen war, wurde die Blutungszeit gemessen. Diese Experimente wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Ina Thielmann (Rudolf Virchow Zentrum für experimentelle Biomedizin, Universität Würzburg) durchgeführt.

## **2.6. Bestimmung physiologischer Parameter**

### **2.6.1. Invasive hämodynamische Messungen**

Um Blutdruck und Herzfrequenz zu bestimmen, wurden die Tiere mittels intraperitonealer Injektion von Ketamin und Rompun narkotisiert und auf einer autoregulierten Wärmeplatte fixiert, um die Körpertemperatur konstant bei 37 °C zu halten. Ein 1,4 Mikro-Tip®-Katheter (Millar Instruments) wurde nach Punktion der A. carotis dextra retrograd in den linken Ventrikel des Herzens vorgeschoben und die Messungen bei 4000 Hertz mit einem MacLab System (AD Instruments) aufgezeichnet und analysiert. Diese Experimente wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Marc Brede (Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie, Universitätsklinikum Würzburg) durchgeführt.

### **2.6.2. Blutgasanalyse**

Mittels Ketamin und Rompun anästhesierte Mäusen wurde transthorakal per Direktpunktion der linke Ventrikel punktiert und 100 µl Blut in eine heparinisierte Spritze abgenommen. Die Partialdrücke von Sauerstoff (PaO<sub>2</sub>), Kohlenstoffdioxid (PaCO<sub>2</sub>) und der pH-Wert wurden an einem ABL 77 Blutgasanalysegerät (Radiometer) bestimmt.

### **2.6.3. Bestimmung der Bradykininspiegel im Plasma**

Plasmaproben von scheinoperierten Mäusen und Mäusen nach einer 60-minütigen tMCAO wurden mit einem Bradykinin EIA Kit (Phoenix Pharmaceuticals Inc.) bestimmt.

### **2.6.4. Bestimmung von Gerinnungsparametern**

Die aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT) wurde nach Standardmethoden an einem BCS® XP System (Siemens Healthcare) bestimmt.

### **2.6.5. Bestimmung der Komplementaktivität**

Zur Detektion des aktivierten Komplementfaktors C5 im Serum und Gehirn wurde ein gegen murinen C5a gerichteter Antikörper aus der Ratte (Klon I52-1486, BD Pharmingen) und ein biotinylierter Sekundärantikörper (Klon I52-278, BD Pharmingen) eingesetzt. Die C5a-Spiegel wurden nach einem enzymgekoppelten Immunassay aus den Standardkurven berechnet. Diese Experimente erfolgten in Zusammenarbeit mit Dr. Kerstin Göbel und Prof. Sven Meuth (Neurologische Klinik, Universitätsklinikum Münster).

### **2.6.6. Bestimmung der Thrombozytenzahl**

Mittels Ketamin und Rompun anästhesierten Mäusen wurde 50 µl Blut aus dem retroorbitalen Venenplexus mittels einer silikonisierten Mikrokapillare entnommen und in einem Gefäß mit 300 µl Heparin in TBS (20 Einheiten/ml, pH 7,3) gesammelt. Die Bestimmung der Thrombozytenzahl und -größe erfolgte mit einem automatischen Sysmex KX-21N Hämatologieanalysator (Sysmex). Diese

Experimente wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Ina Thielmann (Rudolf Virchow Zentrum für experimentelle Biomedizin, Universität Würzburg) durchgeführt.

## **2.7. Präparation der Gehirne**

Nach Einleitung einer tiefen Narkose mit 5 % Isofluran wurden die Mäuse durch Genickbruch getötet. Danach erfolgte eine mediane Kraniotomie nach kaudal, ausgehend von einem Querbruch auf Höhe der Orbita entlang der Sagittalnaht. Nach Wegbrechen des geteilten Schädeldachs erfolgte die Entnahme des Gehirns, einschließlich des Kleinhirns, mit einem Präparationslöffel. Das Gehirn der Maus wurde sodann in eine Matrix zum Schneiden von Mausgehirnen (Harvard Apparatus) überführt und mit Rasierklingen in koronare Scheiben mit einer Dicke von jeweils 2 mm geschnitten. Es wurde von caudal, beginnend knapp oberhalb des Kleinhirndaches nach rostral geschnitten. Die am weitesten rostral befindliche Scheibe wurde verworfen, und die 3 folgenden zunächst in auf Eis gekühltes PBS in Wells überführt. Danach erfolgte der scheibenweise Transfer in Wells mit 2 % 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC, Sigma Aldrich) gelöst in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS, Lösung mit 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl und 12 mM Phosphat) und eine 10-minütige Inkubation bei Raumtemperatur (RT). Durch die Reduktion des Tetrazolium-Kations in Formazan durch Enzyme der Atmungskette erfolgte ein Farbumschlag des farblosen Tetrazoliums in einen rötlichen Farbton, sodass sich vitales Gewebe rötlich färbte. Die so gefärbten Gehirnscheiben wurden mit Hilfe eines Farbscanners (Perfection V500 Photo, Epson) gescannt, um die Infarktgröße danach planimetrisch berechnen zu können. Unmittelbar danach wurden die Scheiben erneut in PBS gewaschen, und direkt weiter prozessiert: Für histologische Analysen wurden die Gewebescheiben in Kryoeinbettformen (TissueTek® Cryomold®, Sakura) mit Einbettmedium für Gefrierschnitte (Tissue Tek® O.C.T™ Compound, Sakura) überführt, in flüssigem Stickstoff vorgekühlt und bei -20 °C gelagert. Für proteinbiochemische oder molekularbiologische Analysen wurden die Scheiben in die Teile Cortex der ischämischen oder der nicht ischämischen Seite und Basalganglien der ischämischen oder der nicht

ischämischen Seite aufgeteilt und in Gefäße (Eppendorf Tubes) überführt. Diese wurden zunächst in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bis zur weiteren Verwendung bei -20 oder -80 °C gelagert.

## 2.8. Bestimmung der Infarktgrößen

Die Vermessung der Infarktvolumina am Computer erfolgte mit dem Programm ImageJ (National Institutes of Health). Die ischämische sowie die nicht ischämische zweidimensionale Fläche einer jeden Gehirnscheibe wurde ausgemessen, das Volumen bei einer bekannten Scheibendicke von 2 mm integrativ berechnet und die einzelnen Volumina zu einem Gesamtvolumen addiert. Mit Hilfe der Formel

$$V_{bereinigt} = V_{isch.} * \left( 1 - \frac{V_{isch.Hem.} - V_{con.Hem.}}{V_{con.Hem.}} \right)$$

erfolgte eine Bereinigung um das in  $V_{isch.}$  enthaltene begleitende Ödem, wobei  $V_{isch.Hem.}$  das Volumen der Hemisphäre mit Infarkt und  $V_{con.Hem.}$  das der Hemisphäre ohne Infarkt darstellt, der Term  $\left( \frac{V_{isch.Hem.} - V_{con.Hem.}}{V_{con.Hem.}} \right)$  also das Ödem in Relation zu der nicht ischämischen Hemisphäre setzt [51].

## 2.9. Molekularbiologische Methoden

### 2.9.1. RNA-Isolierung und Konzentrationsbestimmung

Zunächst wurde das Gewebe nach Zugabe von 1 ml Trizol® (Invitrogen) mit einem Homogenisator (MICCRA D-8, ART) bei 30.000 U/min zerkleinert und anschließend 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 0,2 ml Chloroform (Sigma Aldrich), anschließendem gründlichem Schütteln und erneuter 3-minütiger Inkubation erfolgte eine 5-minütige Zentrifugation mit 12.000 U/min bei 4 °C. Danach wurde die obere, die RNA enthaltende wässrige Phase mit einer Pipette vorsichtig entnommen und in ein neues Tube überführt, sodann wurden 0,5 ml Isopropanol hinzugegeben und mit einem Vortex Mixer gemischt. Nach 10-minütiger Inkubation und anschließender 15-minütiger Zentrifugation bei o.g. Bedingungen wurde der Überstand verworfen und das Sediment durch Zugabe

von 75%igem Ethanol gewaschen. Nach erneuter 5-minütiger Zentrifugation bei o.g. Bedingungen wurde das Sediment über Nacht luftgetrocknet. Am nächsten Tag wurde das Sediment nach Zugabe von 25 µl mit DEPC (Diethylpyrocarbonat)-behandeltem Wasser resuspendiert, und 10 min bei 55 °C unter intermittierendem Schütteln inkubiert. Danach erfolgte die spektrophotometrische Bestimmung der RNA-Konzentration an einem Spektrophotometer (NanoPhotometer® P300, Implen).

### **2.9.2. DNA-Isolierung**

Die DNA-Isolierung erfolgte mit einem Kit nach Angaben des Herstellers (DNeasy Blood & Tissue Kit, Qiagen). Die Gewebeprobe (Ohrstückchen) wurden nach Zugabe von 175 µl Lyse-Puffer und 20 µl Proteinase K über Nacht auf einem Heizblock bei 56 °C inkubiert. Nach erneuter Zugabe von 200 µl Lyse-Puffer und 200 µl Ethanol abs. und jeweiligem gründlichem Durchmischen wurde die auf eine Säule pipettierte Probe 1 min bei RT und 8000 U/min zentrifugiert, sodann erfolgte die Zugabe von 500 µl Waschpuffer und die neuerliche Zentrifugation durch die Säule unter o.g. Bedingungen. Anschließend erfolgte nochmals eine Zugabe von 500 µl Waschpuffer und eine 3-minütige Zentrifugation bei 13.000 U/min. Nach Zugabe von 200 µl Elutionspuffer und 1-minütiger Inkubation wurde die Probe ein letztes Mal bei 8000 U/min zentrifugiert, die nun in der Flüssigkeit befindliche DNA wurde bei 4 °C aufbewahrt.

### **2.9.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Für die PCR zur Genotypisierung der transgenen Tiere wurde das Multiplex PCR Kit der Firma Qiagen verwendet. Für jede Probe wurde jeweils ein Ansatz für die eingefügte Gensequenz (Multiplex) und einer für die endogene Kontrolle vorbereitet. Es wurde folgendes Pipettierschema angewandt:

	Multiplex-Ansatz:	Ansatz für endogene Kontrolle:
10-fach Puffer		2,5 µl
Mg-Cl <sub>2</sub>		2,5 µl
dNTPs		1 µl
oligo 3196	0,1 µl	
oligo 56345		0,1 µl
oligo 56346		0,1 µl
Taq		0,5 µl
DNA		1 µl
H <sub>2</sub> O	17,2 µl	17,3 µl

Sodann erfolgte die eigentliche Amplifikationsreaktion in einem Cycler (Labcycler Basic & Gradient, Sensoquest) mit folgendem Temperatur-Schema:

Denaturierung	94 °C	5 min
34 sich wiederholende Cyclen mit		
Denaturierung	94 °C	5 min
Anlagerung	62 °C	30 sec
Elongation	72 °C	30 sec
Endelongation	72 °C	5 min

Für die PCR zum Nachweis der PK-Defizienz auf Boten-RNA-Ebene (mRNA) wurden spezifische Primer designed. Hierzu wurde folgende komplementäre DNA-Sequenz (cDNA) von PK verwendet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/M58588>):

```

GACCAGAGCGGTTCTTTCCTGAAAATTCCCAAGGACGCCATCCCTATGCCTATGTGCCATTTTCTGCTGGACCT
CGAAACTGTATTGGTCAAAAGTTTGTGTGCATGGAGGAGAAGACCATTCTTGCCTGTATCCTGAGGCAGTTTTG
GGTAGAATCCAACCAGAGAGAGAAGAAGACTCGGCCTGGCTGGAGATTTGATTCTTAGGCCAAATAATGGCATC
TGGATCAAGCTGAAGAGGAGACATGAAGATGACCCCTAACTCCATCCTCAAGCTGTGACTTTATTAATGAAGAT
CATTCCATAGGAAACATGAGAATTGTTCCCATGGATTCTTCTGCAAAGGGACCCATTTTGGAGCCTCCAGCTCT
GTCATCGTGTATATGACTTCTTGAATTGGTAACATATTAAGTAGCTGAACCTGGACTGGGATGTCCGTGGA
CTATATTGACAGGTTAAACAGTTGAAACTGATGCCAGAAACCCAGTGTAACACTGGAGCCAAGCAAAGACCG
CCCTCGGTGCCATATTCAGAGGGCTTGAAGACCATCTTCATGTGAAGACTCCCTCTCCTCCAGAACCACAACG
TGACCATCCTTCCAGGATGATTTTATTCAACCGAGTGGGTATTTTGTTCCTTGTGTTGCTACCGTCTCCTGTGG
GTGTATGACTCAACTGTATAAAAAATACCTTCTTCAGAGGTGGGGATCTAGCTGCCATCTACACCCAGATGCC
AGTACTGTCAGAAGATGTGCACTTTTACCCAGGTGCCTGCTGTTGAGCTTTCTCGCGGTGACTCCACCCAAA
GAGACAAATAAACGGTTTGGTTGCTTCATGAAAGAGAGCATTACAGGGACTTTGCCAAGAATACACCCGGACAG
GGGCCATTTCTGGTCATTTTAAAGCAGTGTGGCCATCAAATAAGTGTGCCACCGAGACATATACAAAGGA
CTTGATATGAGAGGGTCCAACCTTTAATATCTCTAAGACCGACAATATTGAAGAATGCCAGAACTGTGCACAAAT
AATTTTCACTGCCAATTTTACATATGCTACAAGTGCATTTACAGACCAGAGTACCGGAAGAAGTGCCTGCTG
AAGCACAGTGAAGCGGAACACCACCCAGCATAAAGTCAGCGGACAACCTGGTGTCTGGATTCTCACTGAAGT
CCTGTGCGCTTTCGGAGATAGGTTGCCCATGGATATTTCCAGCACTCTGCCTTTCAGACCTGAATGTAAGC
CAGGTCATCACCCTCGATGCCCTTGTGTGTCGCACCATTCGACCTTCCATCCCAACTGCTTTTCTTTCAGTT
CTACACGAATGAATGGGAGACAGAATCACAGAGAAATGTTTGTTCCTTAAAGCGTCTAAAAGTGGAAAGACCAA
GTCCCCCTATTCTCAAGAAAACGCTATATCTGGATATAGTCTCCTCACCTGCAGAAAAACTCGCCCTGAACCC
TGCCATTCCAAAATTTACTCTGGAGTTGACTTTGAAGGGGAAGAAGTGAATGTGACCTTCGTGCAAGGAGCAGA
TGTCTGCCAAGAGACTTGTACAAAGACAATCCGCTGCCAGTTTTTATTACTCCTTACTCCCCAAGACTGCAA
GGAGGAGGGGTGTAATGTTCCTTAAGGTTATCCACAGATGGCTCCCCAACTAGGATCACCTATGGCATGCAG
GGGAGCTCCGGTTATTCTCTGAGATTGTGTAACCTTGTGGACAGCCCTGACTGTACAACAAAAATAATGACCG
TATTGTGGGAGGAACAAACGCTTCTTAGGGGAGTGGCCATGGCAGGTCAGCCTGCAAGTGAAGCTGGTATCT
CAGACCCATTTGTGTGGAGGTCCATCATTGGTCGCCAATGGGTACTGACAGCTGCCCTTGTGATGGAA
TTCCCTATCCAGATGTGTGGCGTATATATGGCGAATTCTTAGTCTGTCCGAGATTACGAAAGAAACGCCCTTCC
TCGAGAATAAAGGAGCTTATTATTCATCAGGAATACAAAGTCTCAGAAGGCAATTATGATATTGCCTTAATAAAG
CTTCAGACGCCCCGTAATTATACTGAATTCAAAAACCAATATGCCTGCCTTCCAAAGCTGACACAAATACAATT
TATACTCACTGTTGGGTGACTGGATGGGGCTACACGAAGGAACAAGGTGAAACGCAAAATATTCTACAAAAGG
CTACTATTCCTTTGGTACCAATGAAGAATGCCAGAAAAATACAGAGATTATGTTATAAACAAGCAGATGATCT
GTGCTGGCTACAAAGAAGGCCGAACAGACGCTTGAAGGGAGATTCCGGTGGCCCCCTTAGTCTGTAAACACA
GTGGACGGTGGCAGTTGGTGGGTATCACCAGCTGGGGTGAAGGCTGCGGCCGCAAGGACCAACCAGGAGTC
TACACCAAGTTTCTGAGTACATGGACTGGATATTGGAGAAGACACAGAGCAGTGATGTAAGAGCTCTGGAGA
CATCTTCAGCCTGAGGAGGCTGGGTACCAAGGAGGAAGAACCAGCTGGCTTTACCACTGCCCTCAAGGCA
AACTAGAGCTCCAGGATTCTCGGCTGTAATAATGTTGATAATGGTGTCTACCTCACATCCGTATCATTGGATTGA
AAATTCAGTGTAGATATAGTTGCTGAAGACAGCGTTTTGCTCAAGTGTGTTTCTGCCTTGAGTCACAGGAGC
TCCAATGGGAGCATTACAAAGATCA

```

Abbildung 11: cDNA-Sequenz von Plasmakallikrein, Erklärung siehe Text

Unterstrichen ist hierbei der bei den PK-defizienten Tieren deletierte Genabschnitt aus Exon 9. Entsprechend wurde ein Primer gewählt, der die deletierte Sequenz beinhaltet, und zwar **5'-GGAGCAGATGTCTGCCAAGAG ACT-3'** (**KLK\_Del\_Seq\_5'**) (gelb markiert), und ein entsprechender komplementärer Primer, und zwar **5'-AAGCAATGGGC AGCTGTGACAGTAC-3'** (**KLK\_intern\_3'**, **antisense**) (grün markiert).

Für die PCR zum Nachweis der PK-Defizienz wurde das RED Taq® ReadyMix™ PCR Reaction Mix von Sigma-Aldrich verwendet.

Für jede Probe wurde jeweils ein Ansatz nach folgendem Schema pipettiert:

12,5 µl Red Taq® Mix  
0,5 µl Primer forward 10 µM  
0,5 µl Primer reverse 10 µM  
2,5 µl cDNA  
9 µl H<sub>2</sub>O

Daraufhin erfolgte die PCR im Cyclyer mit folgendem Temperatur-Schema:

Denaturierung	94 °C	2 min
34 sich wiederholende Cyclen mit		
Denaturierung	94 °C	30 sec
Anlagerung	58 °C	30 sec
Elongation	72 °C	60 sec
Endelongation	72 °C	10 min

#### **2.9.4. DNA-Gelelektrophorese**

Die DNA-Gelelektrophorese der aufbereiteten Proben erfolgte in dem Horizontal-Elektrophorese-System Sub-Cell® GT Cell der Firma Bio-Rad Laboratories GmbH. Hierzu wurde ein 2%iges Agarosegel (4 g Agarose, 200 ml TAE-Puffer (4,84 g Tris, 2 ml 0,5 M EDTA, 1,142 ml Essigsäure, mit Aqua dest. Aufgefüllt auf 1 l, aus 50-fach Stocklösung)) zusammengemischt, und nach 5-minütigem Quellen in einer Mikrowelle bei voller Leistung aufgeköcht, bis die Lösung klar war. Dann wurden 10 µl Midori Green (Biozym) zum Anfärben der DNA hinzugegeben, und das Gel in eine Gelkammer gegossen. Ein Kamm zur Herstellung der Taschen wurde eingesetzt. Nach ca. 30 min war das Gel fest und konnte mit Marker und jeweils 18 µl der Proben beladen werden. Sodann wurde die Elektrophorese bei 400 mA, 120 V und 150 W ((PowerPac®HC High-Current Power Supply, Bio-Rad Laboratories) durchgeführt. Im Anschluss wurde das Gel fotografiert.

### 2.9.5. cDNA-Synthese

Zur Synthese von cDNA wurde das TaqMan Reverse Transcription Reagents Kit von Applied Biosystems genommen. Für jeden Ansatz wurden 1,5 µg RNA in RNase freie PCR-Tubes eingesetzt, und das Volumen mit DEPC-behandeltem Wasser auf 33,9 µl ergänzt. Mit nach folgendem Ansatz für jede Probe hergestelltem Master-Mix

9 µl	10 x Puffer
19,8 µl	MgCl <sub>2</sub>
18 µl	dNTP's
4,5 µl	Random Hexamer
1,8 µl	RNAse Inhibitor
3 µl	Reverse Transkriptase

wurde das Probenvolumen auf insgesamt 90 µl aufgefüllt und sodann gut gemischt. Die cDNA-Synthese erfolgte nach folgendem PCR-Schema in einem Cycler (Labcycler Basic & Gradient, Sensoquest):

25 °C	10 min
42 °C	1 h
95 °C	5 min
4°C	beliebig lange, keine Wiederholungen

### 2.9.6. Quantitative Echtzeit-PCR (qPCR)

Für die qPCR wurde das TaqMan® Universal Master Mix Kit von Roche verwendet. Für jede Probe wurde folgender Ansatz pipettiert und in die Wells einer MicroAmp® Fast 96-Well Reaction Platte (Applied Biosystems) vorgelegt:

- 6,25 µl Taq-Man® Universal Master Mix
- 3,125 µl DEPC-behandeltes Wasser
- 0,625 µl Primer (endogene Kontrolle oder Zielgen)

Die eingesetzten Primer stammten alle von Applied Biosystems.

Tabelle 1: Verwendete Primer für die quantitative Echtzeit-PCR

Primer für Ziel- RNA	Best.nummer	Reporter	Quencer	Bemerkung
GAPDH	Mm00438656_m1	VIC	MGB	Endogene Kontrolle
IL1b	Mm00434228_m1	FAM	MGB	
Tgfb1	Mm00441724_m1	FAM	MGB	
Tnfa	Mm00443258_m1	FAM	MGB	

Daraufhin erfolgte die Zugabe von jeweils 2,5 µl der synthetisierten cDNA (pro Probe und Primer jeweils 3 Wells, aus denen später für die Auswertung der Mittelwert genommen wurde), zur Sicherstellung der Spezifität wurden in jedem Well Negativ-Kontrollen mit DEPC-behandeltem Wasser mit eingebracht.

Nach luftdichtem Verschluss der Platte mit MicroAmp® Clear Adhesive Film (Applied Biosystems) wurde die qPCR in einer StepOnePlus™ von Applied Biosystems mit der dazugehörigen Software nach folgendem PCR-Schema durchgeführt:

50 °C 2 min  
 95 °C 10 min  
 40 Wiederholungen mit  
 95 °C 0,25 min und  
 60 °C 1 min

Zur Auswertung wurde das Programm StepOne™ Software v2.3 verwendet. Die Quantifizierung des cDNA-Gehalts erfolgte jeweils in Relation zu den als endogenen Kontrolle mitgeführten GAPDH-Werten mittels der  $\Delta\Delta C_t$  Methode [64].

## **2.10. Immunhistochemie**

### **2.10.1. Herstellung von Gewebeschnitten**

Die in Einbettmedium für Gefrierschnitte eingebetteten Gehirnscheiben wurden auf die mit einem Tropfen Einbettmedium versehene Einspannvorrichtung eines Gefriermikrotoms (CM1950, Leica Biosystems) gebracht und auf diesem festgefroren. Nach Einspannen, Ausrichten und Anscheiden des Gewebeblocks wurden 10 µm dicke Schnitte angefertigt und auf einen Objektträger abgeklatst. Die weitere Lagerung der Schnitte erfolgte bei -20 °C.

### **2.10.2. Immunlokalisation mit DAB**

Zur Immunlokalisation mit DAB (3,3'-Diaminobenzidin) kommt folgendes Prinzip zur Anwendung: Ein Erstantikörper bindet spezifisch an sein Zielmolekül. Danach bindet ein gegen einen Teil des Erstantikörpers gerichteter Zweitantikörper ebenfalls spezifisch an diesen. Dieser ist an ein Enzym gekoppelt, das in einem weiteren Schritt nach Aktivierung ein Chromogen als Substrat umsetzt, wodurch ein Farbumschlag entsteht. Bei der hier beschriebenen Technik handelt es sich um einen biotinylierten Zweitantikörper. Dieser bildet mit Avidin, an welches über Biomoleküle eine Peroxidase angehängt ist, einen Enzymkomplex, so dass DAB nach Aktivierung der Peroxidase durch Wasserstoffperoxid zu einem bräunlichen Endprodukt oxidiert wird.

Die tiefgefrorenen Schnitte wurden zunächst an der Luft bei RT getrocknet, und dann in einer 4%igen PFA (Paraformaldehyd) Lösung in PBS 15 min lang fixiert. Nach dreimaligem jeweils 5-minütigem Waschen in PBS wurden die Schnitte kurz getrocknet und mit einem PAP Pen umrandet, um die unkontrollierte Ausbreitung der später aufzutragenden Antikörper über den Objektträger zu vermeiden. Nun wurden die Schnitte mit einer Blocklösung mit 5 % bovinem Serumalbumin (BSA), 0,2 % Triton-X 100 in PBS überschichtet und für 45 min bei RT inkubiert, um unspezifische Antikörperbindungen zu vermeiden. Nach Abkippen der Blocklösung erfolgte die Überschichtung mit dem jeweiligen Erstantikörper (rat anti mouse CD11b, MCA711, Serotec bzw. rat anti mouse Ly-6B.2

Alloantigen, MCA771GA, Serotec, Verdünnung: 1:100 in PBS mit 1 % BSA). Danach wurden die Schnitte über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach dreimaligem 5-minütigem Waschen in PBS wurden die Schnitte mit dem biotinylierten Zweitantikörper (goat anti rat, BA-4001, Vector Laboratories, Verdünnung: 1:100 in PBS mit 1 % BSA) überschichtet und für 45 min bei RT inkubiert. Nach erneutem dreimaligem 5-minütigem Waschen erfolgte die Überschichtung mit dem 1:1:98 in PBS verdünnten Peroxidase gekoppelten Avidin-Biotin-Komplex (Vectorstain ABC Kit, Peroxidase Standard PK-4000, Vector Laboratories), welcher zuvor 30 min vorinkubiert worden war. Nach 35-minütiger Inkubation bei RT und erneutem (s.o.) Waschen erfolgte die Entwicklung mit dem DAB-Kit (SK-4100, Vector Laboratories) über eine Inkubationsdauer von 5-10 min, je nach Signalintensität. Danach folgte der Abbruch der Färbereaktion in Aqua destillatum und das Eindeckeln der Objektträger mit Aquatex® (Merck).

Die Auswertung und Quantifikation der Zellen erfolgte unter einem Mikroskop (Eclipse 50i, Nikon). Pro Tier wurden 5 Schnitte im Abstand von jeweils 100 µm ausgezählt, und dann der Mittelwert berechnet.

### **2.10.3. Indirekte Immunfluoreszenz**

Das Prinzip der indirekten Immunfluoreszenz beruht darauf, dass ein mit einem Fluoreszenzfarbstoff versehener Zweitantikörper spezifisch an einen an eine Zielstruktur gebundenen Erstantikörper bindet. Dadurch können mehrere Zielstrukturen gleichzeitig sichtbar gemacht werden (Doppellokalisierung), da Fluorochrome mit unterschiedlichen Wellenlängen verwendet werden können. Diese Fluoreszenzfärbung kann dann unter einem Immunfluoreszenzmikroskop (hier: Eclipse 50i, Nikon) dargestellt werden.

Die tiefgefrorenen Schnitte wurden bei RT kurz getrocknet, mit PAP Pen umrandet, 15 min in 4 % PFA in PBS fixiert, dreimal gewaschen und mit einer Blocklösung mit 5 % BSA und 0,2 % Triton-X 100 in PBS über 1 h hinweg bei RT inkubiert. Nach Abkippen erfolgte die Inkubation mit dem jeweiligen

Erstantikörper (rat anti mouse GPIX, Klon 5678, emfret Analytics bzw. mouse anti mouse CD 31, ab24590, Abcam bzw. mouse anti mouse Occludin, ab31721, Abcam, Verdünnung: 1:100 in PBS mit 1 % BSA) bei 4 °C über Nacht. Nach erneutem (s.o.) Waschen folgte die Inkubation mit dem jeweiligen Zweitantikörper (goat anti mouse AlexaFluor®594, Invitrogen und goat anti rat Dylight 488, Abcam, 1:100 in PBS mit 1% BSA). Zur Darstellung der DNA im Nucleus wurden schließlich noch 10 µl eines Hoechst 33342 Farbstoffes (Sigma Aldrich) in einer Konzentration von 1 ng/ml (in PBS) 10 min vor Ende der Inkubationszeit hinzugefügt. Sodann erfolgte nach nochmaligem (s.o.) Waschen ein Eindeckeln mit Mowiol 4-88 (Sigma Aldrich).

#### **2.10.4. Hämatoxylin/Eosin (H&E)-Färbung**

Die tiefgefrorenen Schnitte wurden bei RT kurz getrocknet und 8 min mit Hämatoxylin gefärbt, mehrmals gewaschen und sodann mit 0,05 % Eosin gefärbt. Darauf erfolgte eine Dehydratation der Schnitte in Ethanollösungen mit den folgenden aufsteigenden Konzentrationen: 3-mal 70 %, 2-mal 96 %, 2-mal 100 %. Schließlich erfolgte eine 2-mal 3-minütige Inkubation in Xylene, und dann das Eindeckeln mit Aquatex® (Merck).

Die Auswertung erfolgte unter einem Mikroskop (Axiophot2, Zeiss) mit einer CCD Kamera (Vistron Systems). Zur Bestimmung des Thromboseindex (10 µm dicke Schnitte) wurde die Zahl der verschlossenen Gefäße in den infarzierten Basalganglien unter 40-facher Vergrößerung (10 µm dicke Schnitte, jeder 10. Schnitt) bestimmt und in Relation gesetzt zu der ausgezählten Gesamtanzahl an Gefäßen [65].

### **2.11. Proteinbiochemische Methoden**

#### **2.11.1. Proteinisolation und Konzentrationsbestimmung**

Die Aufbereitung der Proteinproben erfolgte auf Eis. Den nativ eingefrorenen und bei -20°C gelagerten Proben wurden zunächst jeweils 100µl RIPA-Puffer (25 mM Tris pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 % Nonidet®P40 (Sigma Aldrich)) mit 0,1 % SDS und 4 % Proteinase Inhibitor (Complete Proteinase Inhibitor, Roche)

zugegeben, und diese dann mit einem Homogenisierstäbchen zerrieben. Danach wurden die Proben ca. 15 sec mit intermittierenden Ultraschall-Pulsen (Sonopuls HD 60, Bandelin) bearbeitet, um die Zellen aufzubrechen. Hierauf wurden die Proben bei 13.000 U/min und 4 °C zentrifugiert. Die somit entstandenen Überstände wurden in neue Tubes überführt und das Sediment verworfen. Die Bestimmung der Proteinkonzentration der einzelnen Proben erfolgte in einem Photometer (BioPhotometer®, Eppendorf). Hierzu wurde in spezielle Photometer-Küvetten (Sarstedt) für jede Probe 1 ml einer Lösung aus Bicinchoninsäure (Bicinchoninic Acid Solution, Sigma Aldrich) und Kupfer(II)-Sulfat Lösung im Verhältnis von 50:1 vorgelegt und jeweils 2 µl Probenvolumen hinzugegeben. Durch proteinabhängige Reduktion der 2-wertigen in 1-wertige Kupferionen, die dann mit Bicinchoninsäure reagieren, schlägt die zunächst grünliche Lösung in violette Töne um. Dieser Farbumschlag wurde nach 30-minütiger Inkubation bei 37 °C photometrisch quantifiziert. Durch den Vergleich mit Proben mit bekannter Proteinkonzentration und einer Negativprobe mit DEPC-behandeltem Wasser konnte die entsprechende Konzentration berechnet werden.

### **2.11.2. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Um die aufgereinigten Proteine später im Western Blot sichtbar machen und quantifizieren zu können, mussten diese zunächst einmal ihrer Größe nach aufgetrennt und in eine Form gebracht werden, von der aus man sie später auf einen Membran transferieren konnte. Dazu bedient man sich der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Bei dieser Methode bindet das negativ geladene Natriumdodecylsulfat (SDS) an die Proteine und überdeckt damit die Eigenladung der Proteine. Nach Denaturierung der Proteine durch  $\beta$ -Mercapto-Ethanol trennen sich die Proteine entsprechend ihrer Größe in einem angelegten elektrischen Feld auf.

Hierzu wurde zunächst ein 12%iges Acrylamid Gel als Trenngel hergestellt (Ansatz für ein Gel):

Aqua destillatum	1,65 ml	
Acrylamid 30 %	2 ml	(Rotiphorese® 30, Roth)
1,5 M Tris pH 8,8	1,25 ml	
10 % SDS	0,05 ml	(Natriumdodecylsulfat)
10 % APS	0,05 ml	(Ammoniumperoxidsulfat, Merck)
TEMED	2 µl	(Tetramethylethylenediamin, Sigma Aldrich)

Dieses wurde sodann zwischen zwei zum verwendeten Mini-PROTEAN®Tetra Cell Elektrophorese System (Bio-Rad Laboratories) gehörende in der Einspannvorrichtung eingespannte Glasscheiben gegossen und zum sauberen Abschluss mit etwas Isopropanol überschichtet.

Sodann erfolgte die Herstellung eines 5%igen Acrylamid Sammelgeles (Ansatz für ein Gel):

Aqua destillatum	1,35 ml
Acrylamid 30 %	0,33 ml
1 M Tris pH 6,8	0,25 ml
10 % SDS	0,02 ml
10 % APS	0,02 ml
TEMED	2 µl

Dieses wurde nach Abkippen des überschichteten Isopropanols über das nach 30 min ausgehärtete Sammelgel gegossen. Der abschließende Einsatz eines zum System dazugehörenden Kammes mit 15 Zacken bildete die Taschen. Nach weiteren 30 min war auch das Sammelgel ausgehärtet, der Kamm konnte entfernt werden, die Glasscheiben in die Apparatur für die Gelkammern eingespannt werden und mit den verdünnten aufbereiteten Proteinproben beladen werden. Die Proben waren zuvor mit Aqua destillatum und 2-fach SDS-Probenpuffer (62,5 mM Tris pH 6,8, 3% β- Mercaptoethanol, 8% SDS und 15% Glycerol)

verdünnt und ca. 10 min bei 95 °C inkubiert worden. Pro Spur wurden 10 µg aufgetragen.

Nach Auffüllen der Gelkammer mit Laufpuffer (1 g SDS, 3,03 g Tris, 14,41 g Glycin, aufgefüllt auf 1 Liter mit Aqua destillatum) erfolgte die Gelelektrophorese bei einer konstanten Stromstärke von 80 mA für ca. 1 h 15 min (PowerPac®HC High-Current Power Supply, Bio-Rad Laboratories GmbH).

### **2.11.3. Western Blot**

#### **2.11.3.1. Proteintransfer**

Da der Transfer der in dem Acrylamid- Gel befindlichen Proteine auf eine PVDF (Polyvinylidenfluorid)-Membran halbtrocken, d.h. nach Befeuchtung der Materialien in einer trockenen Blottingkammer, durchgeführt wurde, spricht man bei dieser Methode vom sog. Semi-dry-Western-Blotting.

Hierfür wurde das Gel nach Abschluss der Elektrophorese aus dem System entfernt, die Glasscheiben vorsichtig voneinander getrennt, und das Trenngel nach Abtrennung des darüber befindlichen Sammelgels in ein Gefäß mit Blottingpuffer (14,4 g Glycin, 3,03 g Tris, 200 ml Methanol, aufgefüllt auf 1 l mit Aqua destillatum) überführt und darin geschwenkt. Eine zuvor in Methanol durchfeuchtete PVDF-Membran und zurechtgeschnittene Whatman® Papiere (Whatman) wurden ebenfalls in dem Blottingpuffer geschwenkt und in der Blotting-Kammer wie folgt zusammengesetzt:

Oben	4 Blätter Blotting Papier
	Acrylamid-Gel
	PVDF-Membran
unten	4 Blätter Blotting-Papier

Nach Schließen der Blotting-Kammer durch festes Zuschrauben des Deckels erfolgte der Proteintransfer bei einer Stromstärke von 100 mA/Gel für ca. 90 min.

### 2.11.3.2. Entwicklung

Unmittelbar danach wurde die nun mit den Proteinen beladene PVDF-Membran in einen Blockpuffer (5 g Trockenmilchpulver (Sigma Aldrich) gelöst in 100 ml Waschpuffer (PBS mit 0,05 % Tween)) überführt und darin 30 min bei RT geschwenkt, um freie unspezifische Antikörperbindungsstellen abzusättigen.

Danach erfolgte die Inkubation mit dem in Blockpuffer gelösten Erstantikörper über Nacht bei 4 °C. Am nächsten Tag wurde die PVDF-Membran über 30 min hinweg in Waschpuffer mit mindestens viermaliger Erneuerung der Lösung gewaschen. Sodann erfolgte die Inkubation mit dem Zweitantikörper 1 h lang bei RT. Nach neuerlicher 30-minütiger Waschung in Waschpuffer erfolgte die Entwicklung mit einer ECL (enhanced chemiluminescence)-Lösung (ECL Plus, GE Healthcare). Hierbei katalysiert eine an den Zweitantikörper gebundene Peroxidase eine Redoxreaktion, bei der Licht emittiert wird, womit dann ein Röntgenfilm (medical X-Ray Film Typ Fujifilm Super RX, Fuji) belichtet werden kann. Hierzu wurde jeweils 1 ml der zubereiteten ECL-Lösung auf die Membran gegeben, diese darin ca. 1 min bei RT kontinuierlich schwenkend inkubiert, und dann nach Abtropfen der überschüssigen ECL-Lösung in eine Röntgenkammer überführt. Die Belichtung erfolgte in einer Dunkelkammer, die Belichtungszeiten hingen von der Intensität des Signals ab. Der entwickelte Röntgenfilm wurde eingescannt und später ausgewertet.

Tabelle 2: Verwendete Sekundärantikörper für den Western Blot

Zielstruktur Best.nr.	Klonalität	Spezies Spezies	gg.	Firma	Konz.	Bemerkung
PK (ab1006)	Mono	Rabbit anti mouse		Abcam	1:500	Erstantikörper
KNG (ab1004)	Mono	Mouse anti mouse		Abcam	1:1000	Erstantikörper
Occludin (ab31721)	Poly	Mouse anti mouse		Abcam	1:5000	Erstantikörper
GP I $\beta$ (Klon 3G6)	Mono	Rat anti mouse		emfret Analyti cs	1:500	Erstantikörper

$\beta$ -Aktin (A5441)	Mono	Mouse anti mouse	Sigma	1:250000	Erstantikörper
711-035-152	Poly	Donkey anti rabbit	Jackson	1:10000	Zweitantikörper HRP- konjugiert
715-035-150	Poly	Donkey anti mouse	Jackson	1:10000	Zweitantikörper HRP- konjugiert
712-035-150	Poly	Donkey anti rat	Jackson	1:10000	Zweitantikörper HRP- konjugiert

### 2.11.3.3. Entfernen der ECL-Antikörperbindungsstelle

Um die gemessenen Intensitäten als Korrelate der Proteinmenge untereinander vergleichen zu können, mussten sie in Relation mit den Intensitäten eines anderen Proteins gesetzt werden, das in seiner Menge nicht von den Versuchsbedingungen abhängt, ein sog. Housekeeping-Protein. Hierfür wurde in den durchgeführten Versuchen  $\beta$ -Aktin verwendet. Um die entwickelte PVDF-Membran auf ein zweites Protein untersuchen zu können, muss entweder das komplette gebundene Antikörperkonstrukt entfernt werden, oder aber, wenn es sich wie bei den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen, um sehr unterschiedlich große nachzuweisende Proteine handelt, die somit auf der PVDF-Membran nicht unmittelbar benachbart liegen, zumindest die ECL-Bindungsstelle der am Zweitantikörper hängenden Peroxidase zerstört werden. Dies wurde erreicht, indem man die PVDF-Membran in 15%iger Wasserstoffperoxid-Lösung 30 min bei RT inkubierte. Danach erfolgte die erneute Entwicklung wie oben beschrieben (siehe 2.11.3.2).

### 2.11.3.4. Auswertung

Die densitometrische Auswertung erfolgte mit dem Programm ImageJ (National Institutes of Health). Es wurden die Dichtegradienten der untersuchten Proteine immer in Relation zu Aktin gesetzt.

## **2.12. Evan's Blue Extravasation**

Um das Ausmaß des mit der Ischämie einhergehenden Zusammenbruchs der Blut-Hirn-Schranke quantifizieren zu können, wurden Versuche mit der Tracer-substanz Evan's Blue (Sigma Aldrich) durchgeführt, die nach Bindung an Albumin nur an den Stellen innerhalb des Blutgefäßsystems ins Hirngewebe über-treten kann, an denen die Blut-Hirn-Schranke zusammengebrochen, d.h. durchlässig für Albumin mit einem Molekulargewicht von ca. 66 kDa, ist. Das Ausmaß dieses Übertritts kann schließlich photometrisch bestimmt werden.

Für diese Versuche wurde den Versuchstieren nach erfolgter Reperfusion (tMCAO Modell, siehe oben) 100 µl der in 0,9%iger Kochsalzlösung auf eine Endkonzentration von 2 % verdünnten Tracersubstanz intraperitoneal injiziert. 24 h nach Ischämieinduktion wurden die Gehirne wie oben beschrieben entnommen, in 2 mm dicke Scheiben geschnitten (ohne Kleinhirn), in einer 4%igen PFA-Lösung fixiert und für 20 h bei Dunkelheit und 4 °C inkubiert. Danach wurden die Scheiben in ischämische und nicht ischämische Seite geteilt, und die gesamten jeweiligen Hemisphären in lichtundurchlässige Eppendorf Tubes mit jeweils 500 µl Formamid überführt, in diesen mit einem Skalpell und einer Schere zerkleinert und auf einem Heizblock unter Abdeckung mit Alufolie (zur Vermeidung von Verlust der lichtempfindlichen Substanz) bei 50°C für 24 h inkubiert. Im Anschluss wurden die Tubes 20 min bei 16.000 U/min zentrifugiert, und jeweils 2-mal 50 µl des Überstandes in eine 96 Well Platte überführt. Die Bestimmung der Fluoreszenzintensität erfolgte anschliessend photometrisch bei Wellenlängen von 620 nm (Exzitation) und 680 nm (Emission) (Fluoroskan Ascent Microplate Fluorometer, Thermo Fisher Scientific).

## **2.13. Statistische Auswertung**

Außer den Funktionstests, die als Streudiagramm mit Median angegeben sind, sind alle Ergebnisse als Mittelwert  $\pm$  dem Standardfehler angegeben. Für die statistische Auswertung wurde das GraphPad Prism 5 Software-Paket (GraphPad Software) genutzt. Für den Fall, dass nur zwei Gruppen miteinander

verglichen wurden, wurde der ungepaarte, zweiseitige t-Test verwendet, bei 3 oder mehr Gruppen der einfaktorielle ANOVA mit Post-hoc-Test nach Bonferroni zur p-Wert-Bestimmung. Die Funktionstests wurden mit dem Kruskal-Willis-Test mit Post-hoc-Test nach Dunn zur p-Wert-Bestimmung ausgewertet. Die Überlebenskurven wurden mit dem Log-Rang-Test verglichen. Ein p-Wert  $< 0,05$  wurde als statistisch signifikant angesehen.

### **3. Ergebnisse**

#### **3.1. Aktivierung des Kontakt-Kinin-Systems durch ischämischen Schlaganfall**

Durch Arbeiten der eigenen Arbeitsgruppe konnte bereits gezeigt werden, dass ischämische Schlaganfälle zu einer starken Aktivierung des KKS bzw. dessen Komponenten (KNG/FXII) führen. Da es sich bei PK ebenfalls um einen zentralen Bestandteil des KKS handelt, sollte zuerst untersucht werden, ob auch PK nach zerebraler Ischämie aktiviert wird. Mithilfe eines spezifischen Antikörpers, der sowohl PK als auch dessen Vorläufermolekül pre-PK erkennt, erfolgte der Nachweis von PK bzw. pre-PK in den ischämischen Gehirnbereichen von WT Mäusen und in scheinoperierten Kontrollen im Zeitverlauf im Western Blot. Pre-PK und PK waren in den scheinoperierten Kontrolltieren und in den Gehirnen der operierten Tiere nach 6 h nur schwach nachweisbar – und zwar sowohl auf der Seite der Läsion als auch auf der kontralateralen Seite. Nach 12 h zeigte sich jedoch ein Anstieg von pre-PK und PK in den ipsiläsionalen Gehirnteilen, der bis zum Zeitpunkt 24 h weiter zunahm (Abbildung 12A). Der Anstieg der PK-Spiegel wurde von einem Anstieg von BK im Plasma begleitet (Abbildung 12B, Tabelle 3), und passt zu der vorherigen Beobachtung einer verstärkten Spaltung von KNG durch PK nach tMCAO in Mäusen [51].

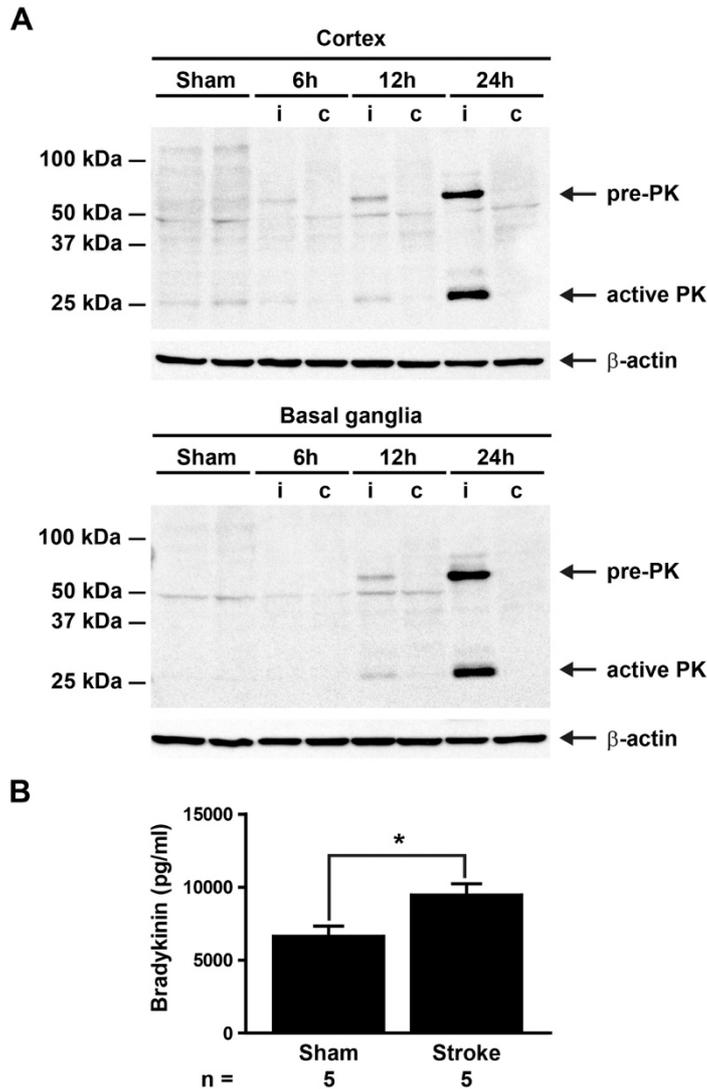


Abbildung 12: Aktivierung des Kontakt-Kinin-Systems durch ischämischen Schlaganfall. (A) Western-Blots aus Cortices (oben) und Basalganglien (unten) von C57BL/6 Mäusen nach 60-minütiger tMCAO oder scheinoperierten Mäusen mit einem Antikörper gegen pre-PK und aktives PK. Die Western-Blots von jeweils drei verschiedenen Tieren wurden unabhängig voneinander wiederholt, als Ladekontrolle diente  $\beta$ -Aktin. Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel. i, ipsiläsionale(r); c, contraläsionale(r) Cortex or Basalganglien. (B) Bestimmung der Bradykininspiegel im Plasma in scheinoperierten C57BL/6 Mäusen und Mäusen an Tag 1 nach 60-minütiger tMCAO durch Enzymimmunoassay (n = 5). \* p < 0.05; unabhängiger Zweistichproben-t-Test, Vergleich mit Kontrollmäusen. Aus Göb, Reymann et al., 2015. doi: 10.1002/ana.24380

Tabelle 3: Bradykininspiegel im Plasma von  $PK^{+/+}$  Mäusen,  $PK^{-/-}$  Mäusen und von mit humanem Plasmakallikrein (hPK) rekonstituierten  $PK^{-/-}$  Mäusen

	$PK^{+/+}$ *	$PK^{-/-}$ *	$PK^{-/-}$ (+hPK) *	p†	n
BK-Spiegel nach Scheinoperation (pg/ml)	6718,0 (± 848,8)	20,24 (± 20,24)	6662,4 (± 588,8)	p < 0,01 † p < 0,05 ‡ p < 0,01 §	3-6/ Gruppe
BK-Spiegel nach Schlaganfall (pg/ml)	9455,6 (± 775,9)	49,7 (± 4,1)	6936,4 (± 992,5)	p < 0,001 † p < 0,05 ‡ p < 0,001 §	5/ Gruppe

\* Mittelwert (± Standardfehler) † für  $PK^{+/+}$  vs.  $PK^{-/-}$ , ‡ für  $PK^{+/+}$  vs.  $PK^{-/-}$  (+hPK), § für  $PK^{-/-}$  vs.  $PK^{-/-}$  (+hPK), einfaktorische Varianzanalyse mit nachfolgendem Bonferroni-Mehrfachvergleichstest, Vergleich mit Kontrolltieren.

### 3.2. Plasmakallikrein-Defizienz schützt vor einem ischämischen Schlaganfall

Nachdem gezeigt werden konnte, dass PK unter ischämischen Bedingungen im Gehirn hochreguliert wird, sollte als nächstes die funktionelle Rolle von PK beim akuten ischämischen Schlaganfall untersucht werden. Dazu wurden PK-defiziente Mäuse ( $PK^{-/-}$ ) durch gezielte Unterbrechung des Exons 9 des murinen *Klkb1*-Gens generiert (Deltagen).

Zunächst wurden 6-8 Wochen alte männliche Tiere einem einstündigen Verschluss der ACM unterzogen, und nach 24 h die Infarktgrößen bestimmt (Abbildung 13). Die Infarktgrößen waren in männlichen  $PK^{-/-}$  Mäusen um mehr als 50 % kleiner als in männlichen  $PK^{+/+}$  Mäusen ( $105,3 \pm 5,6 \text{ mm}^3$  vs.  $49,9 \pm 6,7 \text{ mm}^3$ , p < 0,001, Mortalität 13 % vs. 7 %).

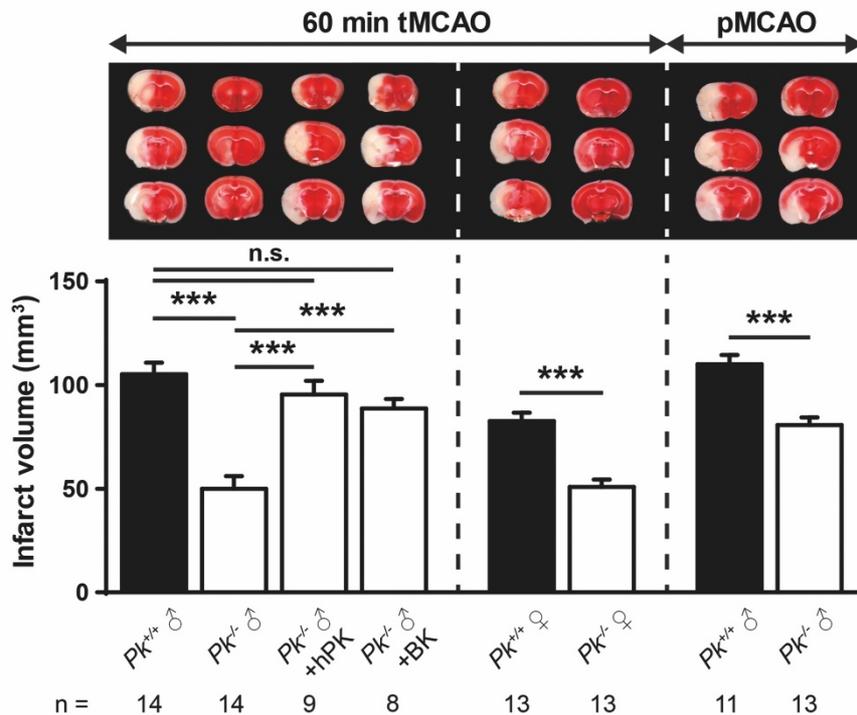


Abbildung 13: Plasmakallikrein-Defizienz schützt vor transientser und permanenter zerebraler Ischämie. (oben) Repräsentative TTC-Färbung dreier korrespondierender koronarer Gehirnschnitte einer 6 Wochen alten männlichen  $Pk^{+/+}$  Maus, einer 6 Wochen alten männlichen  $Pk^{-/-}$  Maus, einer 6 Wochen alten männlichen mit hPK rekonstituierten  $Pk^{-/-}$  Maus, einer 6 Wochen alten mit BK rekontituierten  $Pk^{-/-}$  Maus, einer 6 Wochen alten weiblichen  $Pk^{+/+}$  Maus und einer 6 Wochen alten weiblichen  $Pk^{-/-}$  Maus (von links nach rechts) an Tag 1 nach tMCAO sowie einer 6 Wochen alten männlichen  $Pk^{+/+}$  Maus und einer 6 Wochen alten männlichen  $Pk^{-/-}$  Maus an Tag 1 nach pMCAO. Die infarzierten Areale (weiß) sind unabhängig von Geschlecht oder Reperfusion am kleinsten in den  $Pk^{-/-}$  Mäusen, dies konnte durch Infarktmetrie bestätigt werden (unten) (n = 8-14). \*\*\*  $p < 0,001$ , n.s., nicht signifikant; einfaktorielle Varianzanalyse mit nachfolgendem Bonferroni-Mehrfachvergleichstest, Vergleich mit Kontrollen ( $Pk^{+/+}$  oder  $Pk^{-/-}$  Mäuse). Aus Göb, Reymann et al., 2015. doi: 10.1002/ana.24380

Dies spiegelte sich auch in geringeren neurologischen Defiziten wider (Abbildung 14): Die  $Pk^{-/-}$  Mäuse zeigten sowohl eine bessere neurologische Gesamtfunktion (Bederson Score: Median, 3,0 [3,0, 4,0] vs. 2,0 [2,0, 3,0],  $p < 0,01$ ) als auch eine bessere Motorik und Koordination (Grip Test: Median, 2,0 [0,0, 3,0] vs. 3,0 [3,0, 4,0],  $p < 0,01$ ).

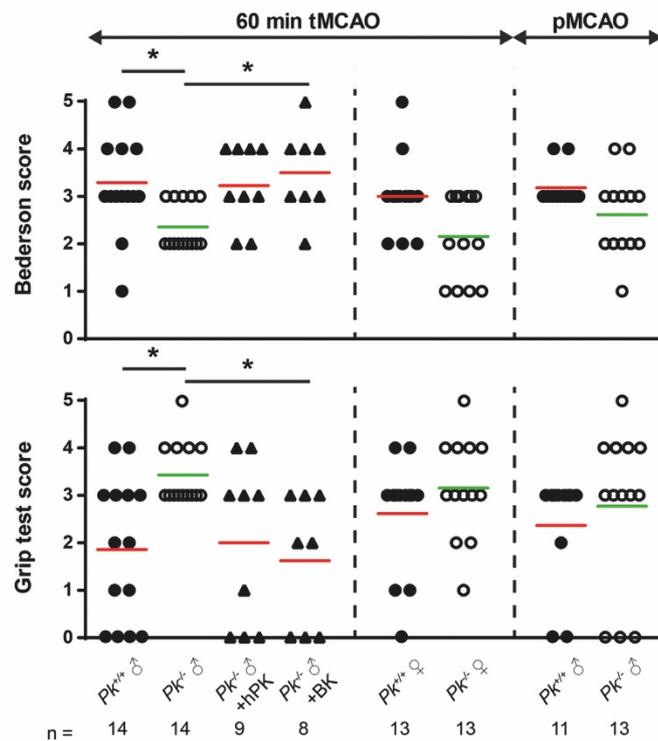


Abbildung 14: Neurologischer Bederson Score (oben) und Grip Test Score (unten) an Tag 1 nach 60-minütiger tMCAO oder pMCAO in den oben gezeigten acht Maus-Gruppen (n = 8-14). \* p < 0,05; Kruskal-Wallis-Test mit nachfolgendem Dunn-Mehrfachvergleichstest, Vergleich mit Kontrollen ( $Pk^{+/+}$  oder  $Pk^{-/-}$  Mäuse). Aus Göb, Reymann et al., 2015. doi: 10.1002/ana.24380

Um zu eruieren, ob der protektive Effekt spezifisch auf die PK-Defizienz zurückzuführen war, rekonstituierten wir männliche  $Pk^{-/-}$  Mäuse mit humanem PK (hPK). Die Injektion von 80  $\mu$ g hPK / Maus unmittelbar vor Ischämieinduktion machte die  $Pk^{-/-}$  Mäuse wieder empfänglich für Schlaganfälle: Die Infarktgrößen der rekonstituierten  $Pk^{-/-}$  Mäuse unterschieden sich von denen der  $Pk^{+/+}$  Mäuse ebensowenig wie die Ergebnisse der Funktionstests (Abbildungen 13 und 14).

$Pk^{-/-}$  Mäuse, die mit hPK rekonstituiert worden waren, waren darüber hinaus wieder in der Lage, KNG in BK zu spalten. In den Gehirnen der mit hPK rekonstituierten  $Pk^{-/-}$  Mäuse ließ sich nach tMCAO nicht nur aktives PK nachweisen (Abbildung 15B), sondern auch natives KNG, was für eine ähnliche enzymatische PK-Aktivität wie in  $Pk^{+/+}$  Mäusen spricht (Abbildung 15A).

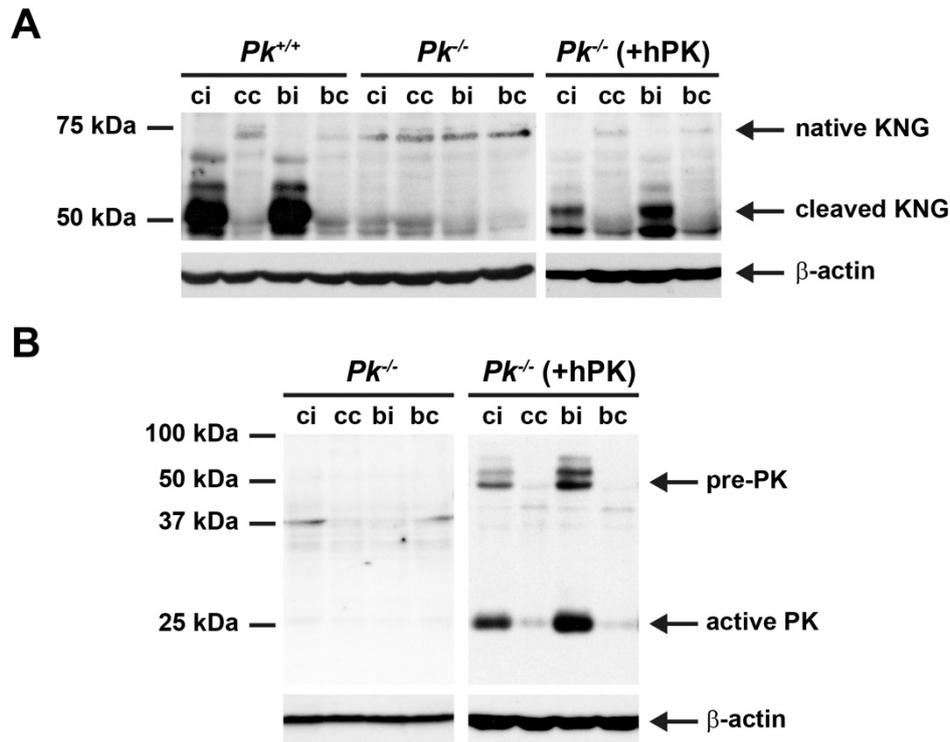


Abbildung 15: Die Blockade von Plasmakallikrein vermindert die Aktivierung des Kontakt-Kinin-Systems nach tMCAO. (A) Western-Blots aus ipsi- und contraläsionalen Cortices oder Basalganglien von *PK*<sup>+/+</sup> Mäusen, *PK*<sup>-/-</sup> Mäusen, und von mit hPK rekonstituierten *PK*<sup>-/-</sup> Mäusen (+hPK) am Tag 1 nach tMCAO mit einem Antikörper gegen KNG. Die Immunoreaktivität gegen natives KNG war in den ischämischen Gehirnen von *PK*<sup>+/+</sup> Mäusen und mit hPK rekonstituierten *PK*<sup>-/-</sup> Mäusen herunterreguliert, aber in *PK*<sup>-/-</sup> Mäusen erhalten. Entsprechend war gespaltenes KNG, das entsteht, wenn natives KNG von PK umgesetzt wird, in den infarzierten Geweben PK-defizienter Mäuse nur schwach nachweisbar. Im Gegensatz dazu wiesen *PK*<sup>+/+</sup> Mäuse und mit hPK rekonstituierte *PK*<sup>-/-</sup> Mäuse hohe Proteinspiegel von gespaltenem KNG in den ischämischen Gehirnbe-  
 reichen auf. (B) Western-Blots aus ipsi- und contraläsionalen Cortices und Basalganglien von *PK*<sup>-/-</sup> Mäusen und mit hPK rekonstituierten *PK*<sup>-/-</sup> Mäusen an Tag 1 nach tMCAO mit einem gegen pre-PK und aktives PK gerichteten Anti-  
 körper. Sowohl pre-PK als auch PK waren in naiven *PK*<sup>-/-</sup> Mäusen nicht nach-  
 weisbar, hingegen konnten sie in den Gehirnen der mit hPK rekonstituierten  
 Mäusen wieder detektiert werden. Die Gehirnproben wurden an Tag 1 nach  
 tMCAO entnommen. Die Western-Blots von jeweils drei verschiedenen Tieren  
 wurden unabhängig voneinander wiederholt. Ladekontrolle mit β-Aktin. Ein  
 repräsentatives Beispiel pro Versuch ist abgebildet. ci, ipsiläsionaler Cortex; cc,  
 contraläsionaler Cortex; bi, ipsiläsionale Basalganglien; bc, contraläsionale  
 Basalganglien. Aus Göb, Reymann et al., 2015. doi: 10.1002/ana.24380

*Pk*<sup>-/-</sup> Mäuse können KNG nicht durch das aktive Enzym PK spalten und somit kein BK freisetzen. Entsprechend wiesen *Pk*<sup>-/-</sup> Mäuse wesentlich geringere BK-Spiegel im Plasma auf als *Pk*<sup>+/+</sup> Mäuse (Tabelle 3), was sich mit den Ergebnissen aus einer anderen PK-defizienten Mauslinie deckt [66]. Um herauszufinden, ob die geringere BK-Bildung tatsächlich ein wesentlicher Faktor ist, der den Schutz vor Schlaganfällen in *Pk*<sup>-/-</sup> Mäusen vermittelt, wurden *Pk*<sup>-/-</sup> Mäuse auch mit rekombinantem BK rekonstituiert. BK hat eine sehr kurze Halbwertszeit im Blut. Um eine möglichst hohe BK-Konzentration im ZNS zu erreichen, wurde BK daher unmittelbar nach der Schlaganfallinduktion und zu Beginn der Reperfusion intrathekal appliziert (100 ng pro Injektion) [51]. Auch die Rekonstitution von BK machte *Pk*<sup>-/-</sup> Mäuse wieder anfällig für Schlaganfälle, und zwar sowohl in Bezug auf die Infarktgrößen als auch auf die funktionellen Defizite (Abbildungen 13 und 14).

Der Verlauf und das Outcome von Schlaganfällen wird vom Geschlecht beeinflusst [67]. Daher wurden auch weibliche 6-8 Wochen alte *Pk*<sup>-/-</sup> Mäuse einer einstündigen tMCAO unterzogen. Auch sie entwickelten, ähnlich wie die Männchen, verglichen mit weiblichen *Pk*<sup>+/+</sup> Mäusen signifikant kleinere Infarkte ( $p < 0.001$ , Mortalität: 19% in *Pk*<sup>+/+</sup> vs. 18% in *Pk*<sup>-/-</sup>, Abbildung 13), während bei den neurologischen Funktionstests nur ein Trend zu einem besseren Ergebnis zu beobachten war ( $p > 0,05$ , Abbildung 14).

Um zu überprüfen, in wieweit der Schutz vor Schlaganfällen in *Pk*<sup>-/-</sup> Mäusen von einer suffizienten Reperfusion abhängt, wurden im Folgenden Versuche im pMCAO Modell durchgeführt. Auch 1 Tag nach pMCAO entwickelten *Pk*<sup>-/-</sup> Mäuse signifikant kleinere Schlaganfälle als die entsprechenden Kontrollen ( $110,1 \pm 4,4 \text{ mm}^3$  in *Pk*<sup>+/+</sup> vs.  $80,69 \pm 3,7 \text{ mm}^3$  in *Pk*<sup>-/-</sup>, Abbildung 13), obwohl das Ausmaß der Infarkt volumenreduktion geringer ausfiel als nach tMCAO. Passend dazu zeigt sich nach pMCAO auch nur ein Trend zu weniger funktionellen Defiziten in Mäusen ohne PK (Bederson Score: Median, 3,0 [3,0, 3,0] vs. 3,0 [2,0, 3,0], Grip Test: Median, 3,0 [2,0, 3,0] vs. 3,0 [1,5, 4,0], jeweils  $p > 0,05$ , Abbildung 14).

Um auszuschließen, dass die PK-Defizienz lediglich zu einer schnelleren, nicht jedoch zu einer nachhaltigen Erholung nach einem Schlaganfall führt, wurden die Mortalität und die neurologischen Funktionen von  $Pk^{-/-}$  Mäusen und  $Pk^{+/+}$  Mäusen über einen längeren Zeitraum nach Schlaganfall beobachtet (Abbildung 16). Vier Tage nach einer einstündigen Okklusion der Arteria cerebri media waren bereits 8 von 14 der  $Pk^{+/+}$  Mäuse gestorben (57,1% Mortalität) und nur 3 der 14 überlebten bis Tag 7 (78,6% Mortalität). Von den 13  $Pk^{-/-}$  Mäusen hingegen überlebten 10 bis zum Tag 4 (23,1% Mortalität) und 8 bis zum Tag 7 (38,5% Mortalität) ( $p = 0,035$ , Abbildung 16A). Entsprechend zeigten die  $Pk^{-/-}$  Mäuse im Vergleich zu den  $Pk^{+/+}$  Mäusen auch geringere neurologische Defizite im Bederson Score über den gesamten Beobachtungszeitraum ( $p < 0,05$  an den Tagen 1, 6 und 7,  $p < 0,01$  an Tag 5, Abbildung 16B).

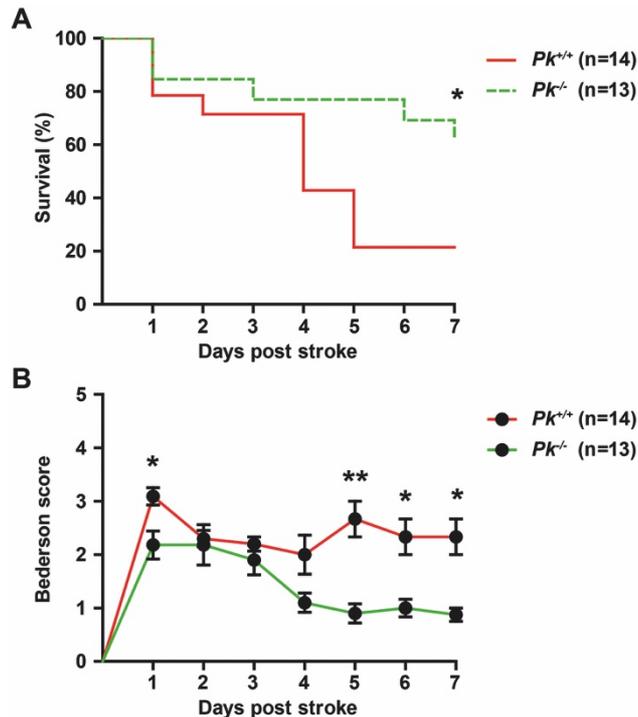


Abbildung 16: Plasmakallikrein-Defizienz führt zu anhaltender Neuroprotektion und steigert die Überlebensrate nach akutem ischämischen Schlaganfall. (A) Überlebenskurve 6-8 Wochen alter männlicher  $PK^{-/-}$  Mäuse und  $PK^{+/+}$  Mäuse von Tag 1 bis 7 nach tMCAO (n = 13-14/Gruppe). \* p = 0,037; Log-Rang-Test. (B) Neurologische Funktionen im Zeitverlauf von Tag 1 bis 7 nach tMCAO, gemessen an Hand des Bederson Scores in 6-8 Wochen alten männlichen  $PK^{-/-}$  Mäusen oder  $PK^{+/+}$  Mäusen (n = 13-14/Gruppe). \* p < 0,05, \*\* p < 0,01; zwei-faktorielle Varianzanalyse mit nachfolgendem Bonferroni-Mehrfachvergleichstest, Vergleich mit  $PK^{+/+}$  Mäusen. Aus Göb, Reymann et al., 2015. doi: 10.1002/ana.24380

### 3.3. Plasmakallikrein-Defizienz verringert die intrazerebrale Thrombusbildung nach Schlaganfall, ohne die Gefahr von Hirnblutungen zu erhöhen

PK kann FXII aktivieren, welcher den Ausgangspunkt des intrinsischen Aktivierungsweges der plasmatischen Gerinnung darstellt. In Modellen von Gefäßwandverletzungen konnte bereits gezeigt werden, dass eine PK-Defizienz die Thrombenbildung reduziert [60, 68]. Daher wurde von uns untersucht, ob eine verringerte intrazerebrale Thrombenbildung für den schlaganfallprotektiven

Phänotyp PK-defizienter Mäuse verantwortlich ist. In Western-Blot-Experimenten mit einem Antikörper gegen den Thrombozytenmarker Glykoprotein Ib $\beta$  (GPIb $\beta$ ) konnte 24 h nach tMCAO bei  $PK^{-/-}$  Mäusen signifikant weniger GPIb $\beta$ , d.h. weniger Thrombozyten, sowohl in den ischämischen Cortices ( $p < 0,01$ ) als auch in den ischämischen Basalganglien ( $p < 0,05$ ) im Vergleich zu  $PK^{+/+}$  Mäusen nachgewiesen werden (Abbildung 17A).

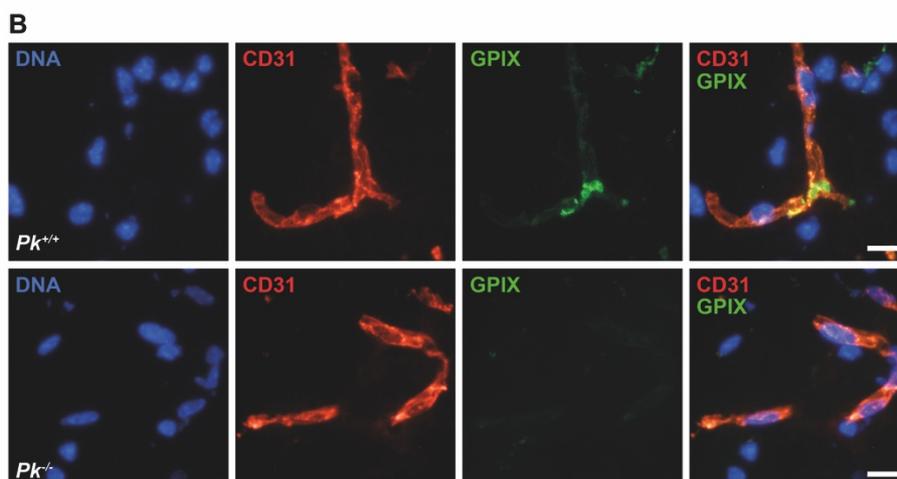
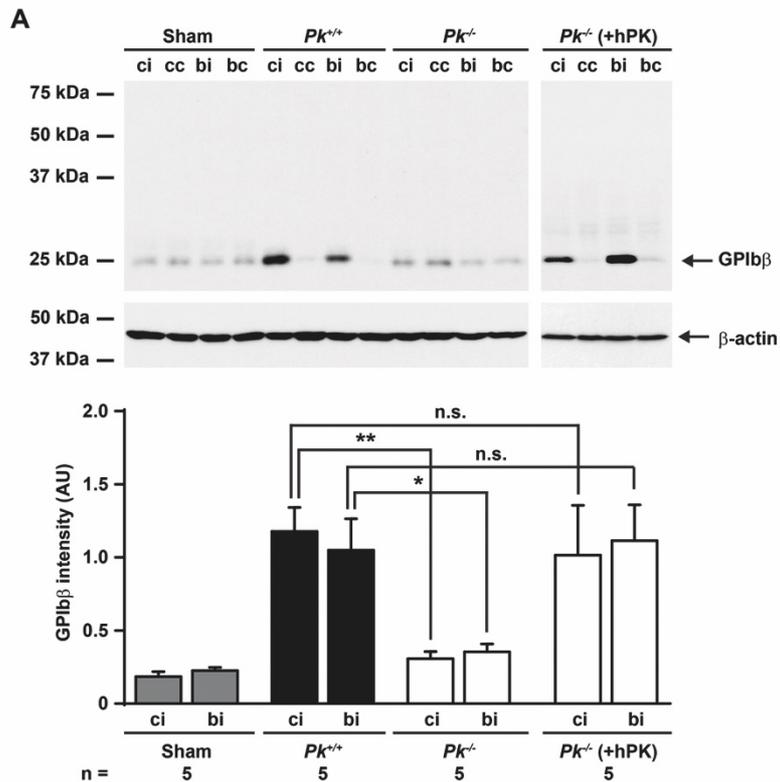


Abbildung 17: Plasmakallikrein-Defizienz verringert die intrazerebrale Thrombose (A, oben) Die Thrombenbildung in den ipsiläsionalen und contraläsionalen Cortices und Basalganglien von scheinoperierten Mäusen,  $PK^{+/+}$  Mäusen,  $PK^{-/-}$  Mäusen und mit hPK rekonstituierten  $PK^{-/-}$  Mäusen wurde 24 h nach tMCAO im Western Blot mit dem Thrombozytenmarker anti-GPIIb/IIIa untersucht. Ein repräsentativer Western Blot ist gezeigt. (A, unten) Densitometrische Quantifizierung ( $n = 5$ ). \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , n.s., nicht signifikant; einfaktorielles Varianzanalyse mit nachfolgendem Bonferroni-Mehrfachvergleichstest, Vergleich mit  $PK^{+/+}$  Mäusen. AU, arbitrary units, willkürliche Einheiten; ci, ipsiläsionaler Cortex; cc, contraläsionaler Cortex; bi, ipsiläsionale Basalganglien; bc, contraläsionale Basalganglien. (B) Immunhistochemische Darstellung der Thrombozyten (anti-GPIIb/IIIa, grün) im Lumen zerebraler Mikrogefäße (dargestellt sind Endothelzellen mit anti-CD31, rot) 24 h nach tMCAO. Hoechst-Färbung (blau) der DNA. Ein repräsentativer Ausschnitt von 3 unabhängigen Experimenten pro Gruppe ist gezeigt. Balken = 20  $\mu\text{m}$ . Aus Göb, Reymann et al., 2015. doi: 10.1002/ana.24380

Entsprechend fanden sich in den ischämischen Gehirnbereichen von  $PK^{+/+}$  Mäusen sowohl in immunhistochemischen (Abbildung 17B) als auch in histologischen Färbungen zahlreiche Thromben innerhalb der Gefäßlumina. Im Vergleich dazu war die Offenheitsrate der kleinen Blutgefäße bei  $PK^{-/-}$  Mäusen signifikant höher als bei  $PK^{+/+}$  Mäusen (Thrombose-Index:  $p < 0,05$ , Abbildung 18).

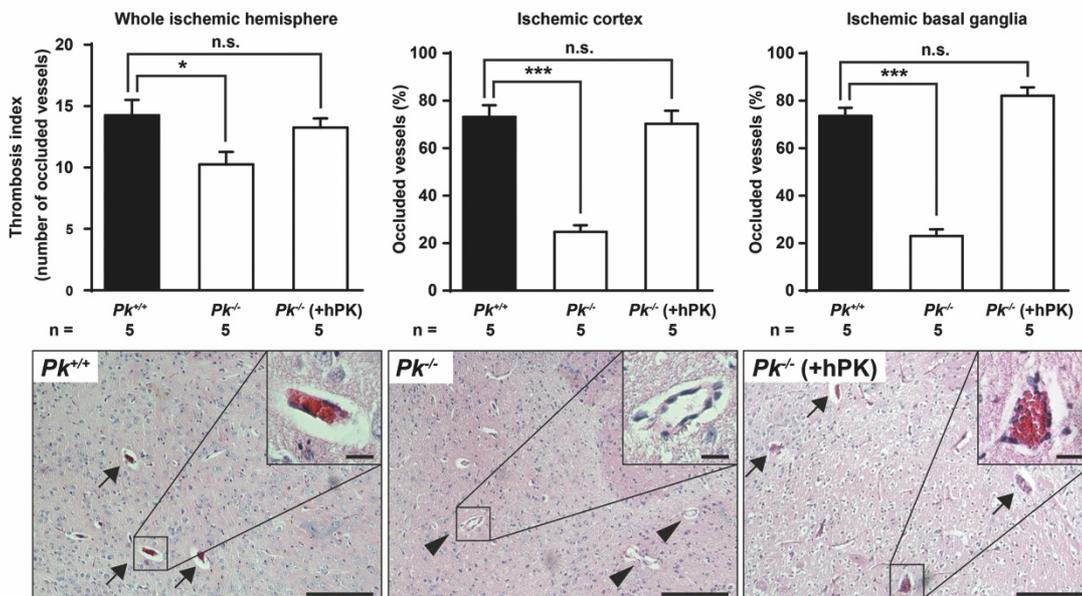


Abbildung 18: Plasmakallikrein-Defizienz verringert die intrazerebrale Thrombose. (oben) Thrombose-Index (links) und Kalkulation des Prozentsatzes verschlossener Gefäße innerhalb der infarzierten Cortices (Mitte) und Basalganglien (rechts) von  $PK^{+/+}$  Mäusen,  $PK^{-/-}$  Mäusen und mit hPK rekonstituierten  $PK^{-/-}$  Mäusen an Tag 1 nach tMCAO (n = 5). \* p < 0,05, \*\*\* p < 0,001, n.s., nicht signifikant; einfaktorische Varianzanalyse mit nachfolgendem Bonferroni-Mehrfachvergleichstest, Vergleich mit  $PK^{+/+}$  Mäusen. (unten) Repräsentative H&E-Färbung thrombosierter Gefäße (Pfeile) der 3 darüber abgebildeten Mausgruppen. Die Pfeilspitzen zeigen auf offene Gefäße, die Pfeile auf verschlossene Gefäße. Balken = 100  $\mu$ m. Aus Göb, Reymann et al., 2015. doi: 10.1002/ana.24380

Um zu untersuchen, ob die geringere Thrombenbildung bei Fehlen von PK zu einer besseren (Re)perfusion nach transientscher Ischämie führt, wurde der zerebrale Blutfluss im Versorgungsgebiet der ACM im Zeitverlauf gemessen (Abbildung 19). Zwischen  $PK^{+/+}$  Mäusen,  $PK^{-/-}$  Mäusen und  $PK^{-/-}$  Mäusen, die mit hPK rekonstituiert worden waren, konnten weder vor der Ischämie (Baseline), noch nach Einführen des die ACM verschließenden Fadens (Ischämie) (Angaben jeweils als Prozentsatz der Ausgangsperfusion: 9% in  $PK^{+/+}$  vs. 23% in  $PK^{-/-}$  vs. 28% in  $PK^{-/-}$  (+hPK), p > 0,05), noch unmittelbar nach Entfernen des Fadens (52% in  $PK^{+/+}$  vs. 54% in  $PK^{-/-}$  vs. 59% in  $PK^{-/-}$  (+hPK), p > 0,05), noch 4 h nach Reperfusion (65% in  $PK^{+/+}$  vs. 71% in  $PK^{-/-}$  vs. 64% in  $PK^{-/-}$  (+hPK), p > 0,05) Unterschiede gefunden werden. 12 h (70% in  $PK^{+/+}$  vs. 84% in  $PK^{-/-}$  vs. 74% in  $PK^{-/-}$  (+hPK), p < 0,05) und 24 h nach Reperfusion (59% in  $PK^{+/+}$  vs. 87% in  $PK^{-/-}$  vs. 63 in  $PK^{-/-}$  (+hPK), p < 0,001) jedoch war der zerebrale Blutfluss in  $PK^{-/-}$  Mäusen signifikant höher als in  $PK^{-/-}$  Mäusen und  $PK^{-/-}$  Mäusen, die mit hPK rekonstituiert worden waren.

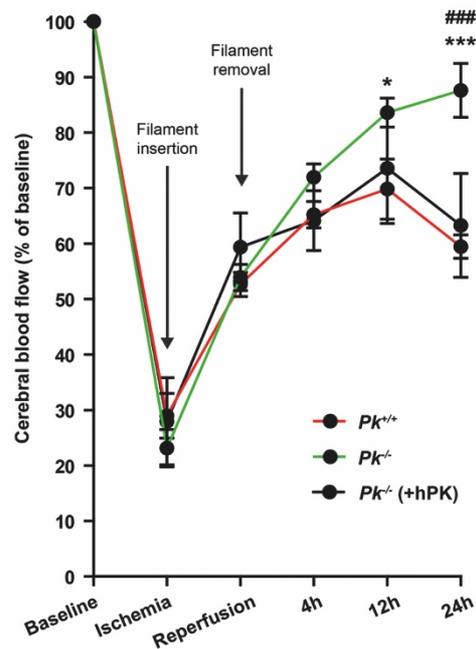


Abbildung 19: Plasmakallikrein-Defizienz verbessert den zerebralen Blutfluss nach Schlaganfall. Erhöhter zerebraler Blutfluss im Versorgungsgebiet der ACM in  $Pk^{-/-}$  Mäusen 12 h und 24 h nach Reperfusion, Vergleich mit  $Pk^{+/+}$  Mäusen und mit hPK rekonstituierten  $Pk^{-/-}$  Mäusen (n = 4). \* p < 0,05, \*\*\* p und ### p < 0,001; zweifaktorielle Varianzanalyse mit nachfolgendem Bonferroni-Mehrfachvergleichstest, Vergleich mit Kontrollen ( $Pk^{+/+}$  Mäuse (\*\*\*) oder  $Pk^{-/-}$  Mäuse (+hPK) (###)). Aus Göb, Reymann et al., 2015. doi: 10.1002/ana.24380

Intrakranielle Blutungen sind die Hauptgefahr bisheriger antithrombotischer Behandlungsansätze. Daher wurde auch die Auswirkung der PK-Defizienz im Hinblick auf die Infarktprogression und das Risiko intrakranieller Blutungen mittels MRT an lebenden Mäusen untersucht (Abbildung 20A). In  $Pk^{-/-}$  Mäusen waren 24 h nach tMCAO die für die Ischämie typischen T2-hyperintensiven Areale in den Gradienten-Echo-Sequenzen signifikant kleiner als in  $Pk^{+/+}$  Mäusen (p < 0,05, Abbildung 20B). Die Infarktgrößen in  $Pk^{-/-}$  Mäusen waren auch nach einer Woche signifikant kleiner als die in  $Pk^{+/+}$  Mäusen (p < 0,05), und sie hatten im Vergleich zu den Messungen an Tag 1 nicht zugenommen, womit ein verzögertes Infarktwachstum ausgeschlossen werden konnte (p > 0,05). Die Läsionen in  $Pk^{-/-}$  Mäusen stellten sich darüber hinaus stets T2-hyperintens dar, was für eine

Ischämie typisch ist, niemals T2-hypointens, was auf eine Einblutung hindeuten würde. Dies bestätigte noch einmal die Beobachtung, dass die PK-Defizienz auch zu späteren Zeitpunkten der Infarktentwicklung das intrazerebrale Blutungsrisiko nicht erhöht. Gestützt wurde diese These dadurch, dass die Bestimmung der Blutungszeit und die Charakterisierung der Thrombozyten keine Unterschiede zwischen  $PK^{-/-}$  Mäusen und  $PK^{+/+}$  Mäusen ergab (Tabelle 4). Einzig die aktivierte partielle Thromboplastinzeit war in den  $PK^{-/-}$  Mäusen verlängert und bestätigte damit die Beobachtungen nach gentechnischer Veränderung des KKS aus anderen Studien [52, 59, 60].

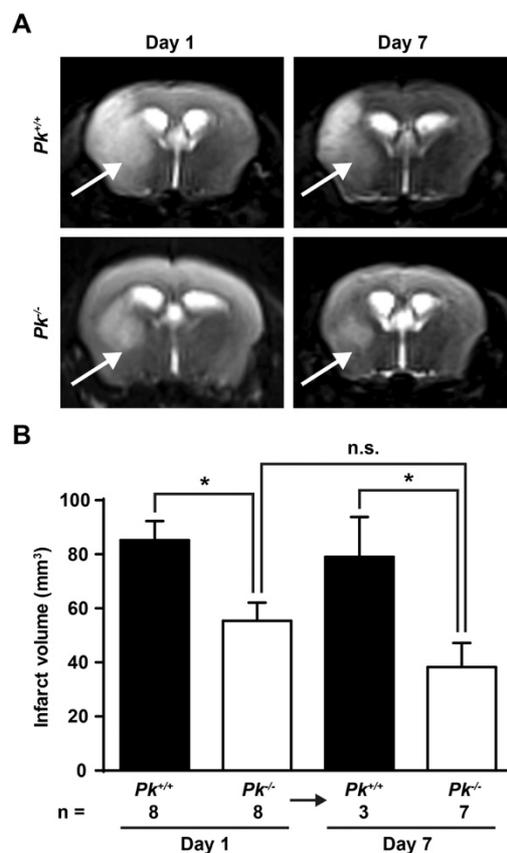


Abbildung 20: Plasmakallikrein-Defizienz verringert die Schlaganfallgröße, ohne das Risiko intrazerebraler Blutungen zu erhöhen. (A) Serielle koronare T2-gewichtete Gradienten-Echo-MR-Bilder zeigen ausgedehnte hyperintense (helle) ischämische Läsionen (weiße Pfeile) in  $PK^{+/+}$  Mäusen an Tag 1 und Tag 7 nach tMCAO, wohingegen die Infarkte in den  $PK^{-/-}$  Mäusen weitgehend auf die Basalganglien begrenzt bleiben. Eine repräsentative Bilderserie pro Gruppe ist gezeigt. (B) MR-basierte Infarktmetrie (n = 3-8). \* p < 0,05, n.s., nicht signi-

fikant; zweifaktorielle Varianzanalyse mit nachfolgendem Bonferroni-Mehrfachvergleichstest, Vergleich mit Kontrollen ( $Pk^{+/+}$  Mäuse; Tag 1 vs. Tag 7). Aus Göb, Reymann et al., 2015. doi: 10.1002/ana.24380

Tabelle 4: Hämostaseologische und physiologische Charakterisierung von  $Pk^{+/+}$  Mäusen und  $Pk^{-/-}$  Mäusen

	$Pk^{+/+}$ *	$Pk^{-/-}$ *	$p$ †	n
aPTT (sec)	29,5 (±1,6)	>150,0	n.a. ‡	5/Gruppe
Blutungszeit der Schwanzspitze (sec)	453,3 (±66,8)	400,0 (±82,6)	$p = 0,32$	12/Gruppe
Thrombozytenzahl ( $\times 10^3/\mu\text{l}$ )	665 (±180,5)	607 (± 171,0)	$p = 0,49$	6/Gruppe
Thrombozytenvolumen (fl)	5,4 (± 0,1)	5,4 (± 0,1)	$p = 0,62$	6/Gruppe
C5a-Spiegel (naiv) Serum (ng/ml) Gehirn (ng/ml)	25,1 (± 4,5) 57,5 (± 0,8)	16,5 (± 0,6) 53,9 (± 0,5)	$p = 0,45$ $p = 0,17$	4/Gruppe 4/Gruppe
C5a-Spiegel (Schlaganfall) Serum (ng/ml) Gehirn (ng/ml), c § Gehirn (ng/ml), i §	30,6 (± 1,2) 262,2 (± 7,2) 451,5 (± 27,6)	24,6 (± 0,7) 253,0 (± 8,0) 456,0 (± 16,9)	$p = 0,12$ $p = 0,77$ $p = 0,96$	6-7/ Gruppe 6-7/ Gruppe 6-7/ Gruppe
mittlerer arterieller Blutdruck (mmHg)	67,1 (± 2,7)	72,7 (± 3,9)	$p = 0,14$	4/Gruppe
Herzfrequenz (bpm)	437,8 (±17,8)	434,1 (± 11,6)	$p = 0,43$	4/Gruppe
PaO <sub>2</sub> (mmHg)	63,7 (± 3,5)	61,3 (± 2,8)	$p = 0,30$	4/Gruppe
PaCO <sub>2</sub> (mmHg)	40,7 (± 3,3)	38,0 (± 4,1)	$p = 0,32$	4/Gruppe
pH	7,32 (± 0,03)	7,33 (± 0,02)	$p = 0,40$	4/Gruppe
PComA-Wert	2,3 (± 0,2)	2,5 (± 0,3)	$p = 0,27$	4/Gruppe

\* Mittelwert (± Standardfehler), † Zwischen den Gruppen wurden außer bei der aPTT (aktivierte partielle Thromboplastinzeit), die bei den  $Pk^{-/-}$  Mäusen deutlich

erhöht war, keine signifikanten Unterschiede gefunden, unabhängiger Zweistichproben-t-Test, Vergleich mit  $Pk^{+/+}$  Mäusen, ‡ n.a. = nicht verwendbar, § c = contraläsional, i = ipsiläsional.

### 3.4. Plasmakallikrein-Defizienz verringert die Schädigung der Blut-Hirn-Schranke und die Entzündungsreaktion nach Schlaganfall

Das KKS ist ein wichtiger Regulator der Gewebsinflammation und der Gefäßdurchlässigkeit nach einem ischämischen Schlaganfall [43]. Von zentraler Bedeutung ist dabei die Abspaltung des proinflammatorischen Peptidhormons BK aus KNG durch aktives PK. Daher wurde das Ausmaß der BHS-Schädigung und der Ödembildung in PK-defizienten Tieren nach fokaler zerebraler Ischämie untersucht. Einen Tag nach tMCAO war in den Gehirnen von  $Pk^{-/-}$  Mäusen eine signifikant geringere Extravasation des Gefäßtracers Evan's Blue nachzuweisen ( $1,2 \pm 0,2 \mu\text{g}$  in  $Pk^{+/+}$  vs.  $0,6 \pm 0,1 \mu\text{g}$  in  $Pk^{-/-}$ ,  $p < 0,05$ , Abbildung 21A). Ähnlich wie bei der Thrombenbildung zeigte sich die geringere Schädigung der Blut-Hirn-Schranke sowohl in den Cortices als auch im Bereich der Basalganglien. Dies legt nahe, dass es sich hierbei um einen mechanistisch relevanten spezifischen Effekt handelte und nicht nur Ausdruck der kleineren Infarkte war. Darüber hinaus war die Evan's Blue-Extravasation in  $Pk^{-/-}$  Mäusen, die zuvor mittels hPK rekonstituiert worden waren, vergleichbar mit der in  $Pk^{+/+}$  Mäusen ( $1,2 \pm 0,2 \mu\text{g}$  in  $Pk^{+/+}$  vs.  $1,1 \pm 0,2 \mu\text{g}$  in  $Pk^{-/-}$  (+hPK),  $p > 0,05$ ).

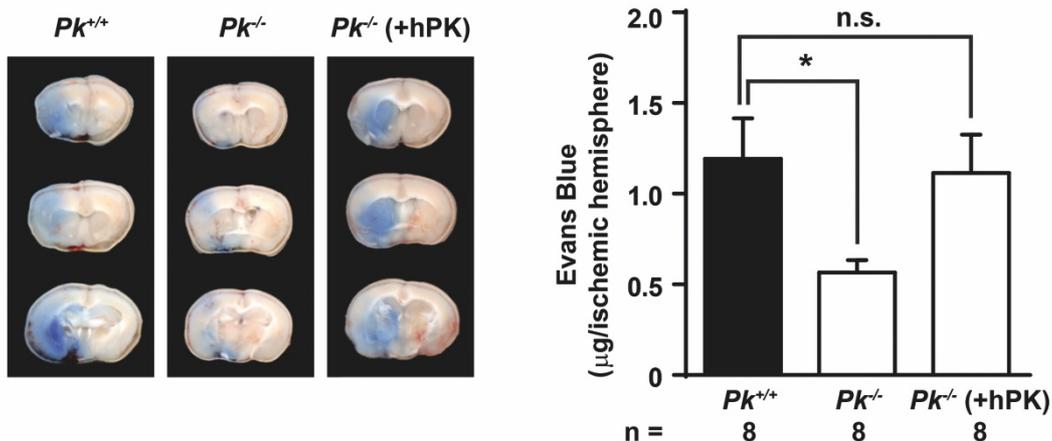


Abbildung 21: Plasmakallikrein-Defizienz stabilisiert die Blut-Hirn-Schranke und verringert die Ödembildung nach tMCAO. (links) Repräsentative koronare Gehirnschnitte einer  $Pk^{+/+}$  Maus, einer  $Pk^{-/-}$  Maus und einer mit hPK rekonstituierten Maus an Tag 1 nach tMCAO nach Injektion der vaskulären Tracersubstanz Evan's Blue. (rechts) Photometrische Messungen der Evan's-Blue-Konzentration im Gehirnparenchym (n = 8). \*  $p < 0,05$ , n.s., nicht signifikant; einfaktorielle Varianzanalyse mit nachfolgendem Bonferroni-Mehrfachvergleichstest, Vergleich mit  $Pk^{+/+}$  Mäusen. Aus Göb, Reymann et al., 2015. doi: 10.1002/ana.24380

Passend zum destabilisierenden Effekt von PK an der BHS konnte in Western Blots in  $Pk^{+/+}$  Mäusen einen Tag nach tMCAO eine signifikante Reduktion des Tight-Junction-Proteins Occludin im Vergleich zu scheinoperierten Mäusen nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu war Occludin in den ischämischen Gehirnen von  $Pk^{-/-}$  Mäusen einen Tag nach tMCAO erhalten (Occludin Immunoreaktivität Cortex:  $p < 0,001$ , Occludin Immunoreaktivität Basalganglien:  $p < 0,05$  in  $Pk^{+/+}$  vs.  $Pk^{-/-}$ , Abbildung 22A). Dieser Effekt konnte durch Rekonstitution mit hPK wieder aufgehoben werden (Cortex, Basalganglien:  $p > 0,05$  in  $Pk^{+/+}$  vs.  $Pk^{-/-}$  (+hPK)). Immunhistochemische Färbungen bestätigten die erhaltene Occludin-Expression an den zerebralen Tight-Junctions in  $Pk^{-/-}$  Mäusen einen Tag nach tMCAO (Abbildung 22B).

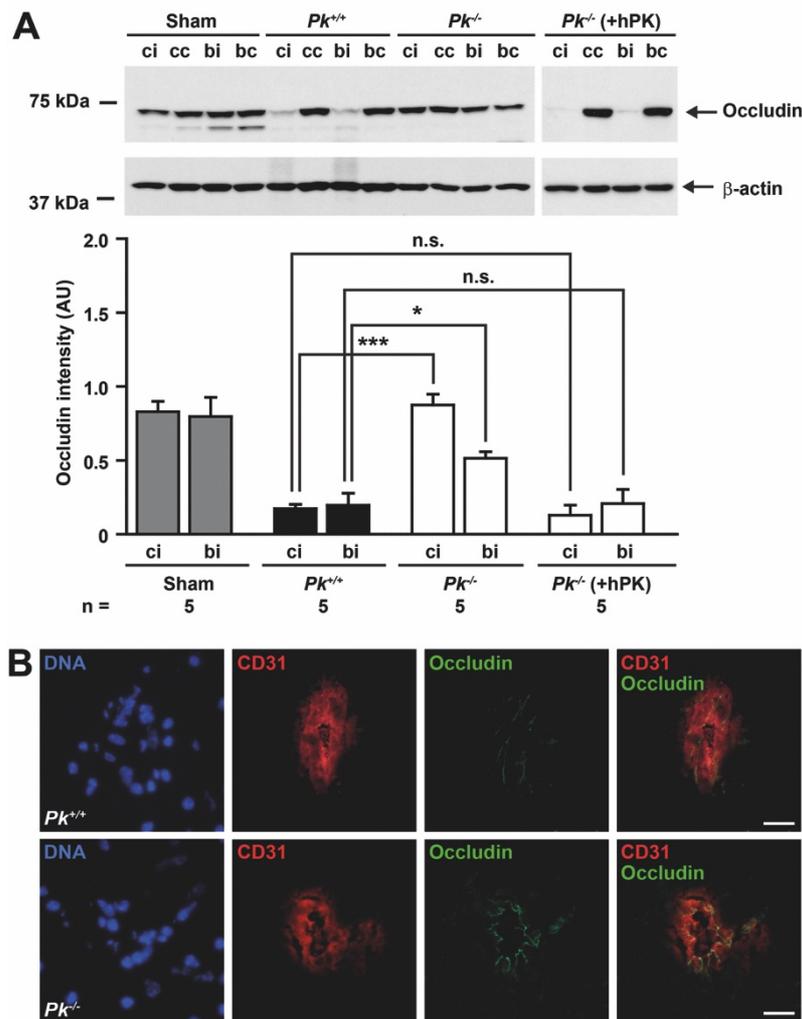


Abbildung 22: Plasmakallikrein-Defizienz stabilisiert die Blut-Hirn-Schranke und verringert die Ödembildung nach tMCAO. (A, oben) Nachweis von Occludin in den ipsiläsionalen und contraläsionalen Cortices (ci or cc) oder den Basalganglien (bi or bc) von *Pk*<sup>+/+</sup> Mäusen, *Pk*<sup>-/-</sup> Mäusen und mit hPK rekonstituierten *Pk*<sup>-/-</sup> Mäusen an Tag 1 nach tMCAO oder Scheinoperation mittels Western Blot. Ein repräsentativer Western Blot ist gezeigt. (A, unten) Densitometrische Quantifizierung (n = 5). \* p < 0,05, \*\*\* p < 0,001, n.s., nicht signifikant; einfaktorielle Varianzanalyse mit nachfolgendem Bonferroni-Mehrfachvergleichstest, Vergleich mit *Pk*<sup>+/+</sup> Mäusen. (B) Immunhistochemische Färbungen bestätigten, dass die Integrität der Tight-Junctions (anti-Occludin, grün) zwischen den zerebralen Endothelzellen (anti-CD31, rot) in *Pk*<sup>+/+</sup> Mäusen im Vergleich zu *Pk*<sup>-/-</sup> Mäusen an Tag 1 nach tMCAO deutlich reduziert war. Hoechst-Färbung (blau) der DNA. Ein repräsentativer Ausschnitt von 3 unabhängigen Experimenten pro Gruppe ist gezeigt. Balken = 20 µm. Aus Göb, Reymann et al., 2015. doi: 10.1002/ana.24380

Um herauszufinden, ob die Stabilisierung der Blut-Hirn-Schranke sich auch auf die Einwanderung inflammatorischer Zellen auswirkt [69], wurde die Anzahl neutrophiler Granulozyten und aktivierter Mikroglia/Makrophagen im Gehirn nach Schlaganfall histologisch quantifiziert (Abbildungen 23 und 24). An Tag 1 nach tMCAO waren signifikant mehr CD11b-positive Mikroglia/Makrophagen (Gesamtzahl CD11b+ Zellen/Schnitt:  $801 \pm 41$  in  $Pk^{+/+}$  vs.  $265 \pm 20$  in  $Pk^{-/-}$ ,  $p < 0,001$ ,  $n = 5$ ) und Neutrophile (Gesamtzahl Ly-6B.2+ Zellen/Schnitt:  $56 \pm 10$  in  $Pk^{+/+}$  vs.  $30 \pm 4$  in  $Pk^{-/-}$ ,  $p < 0,05$ ,  $n = 5$ ) in den Gehirnen von  $Pk^{+/+}$  Mäusen als in denen von  $Pk^{-/-}$  Mäusen nachweisbar. Neben der absoluten Immunzellzahl wurde auch die Dichte (Zellen/mm<sup>2</sup>) der Mikroglia/Makrophagen und der neutrophilen Granulozyten in den ischämischen Cortices und dem Bereich der Basalganglien bestimmt, um einen möglichen Bias aufgrund kleiner Infarkt volumina in  $Pk^{-/-}$  Mäusen auszuschließen. Auch die Dichte-korrelierte Quantifizierung der Mikroglia/Makrophagen (Cortex:  $p < 0,05$ , Basalganglien:  $p > 0,05$ ) und neutrophilen Granulozyten (Cortex:  $p > 0,05$ , Basalganglien:  $p < 0,05$ ) belegte die geringere Einwanderung von Immunzellen in  $Pk^{-/-}$  Mäusen im Vergleich zu  $Pk^{+/+}$  Mäusen. Die Anzahl der Immunzellen in mit humanem Plasmakallikrein rekonstituierten  $Pk^{-/-}$  Mäusen waren wieder ähnlich hoch wie in  $Pk^{+/+}$  Mäusen ( $p > 0,05$ ).

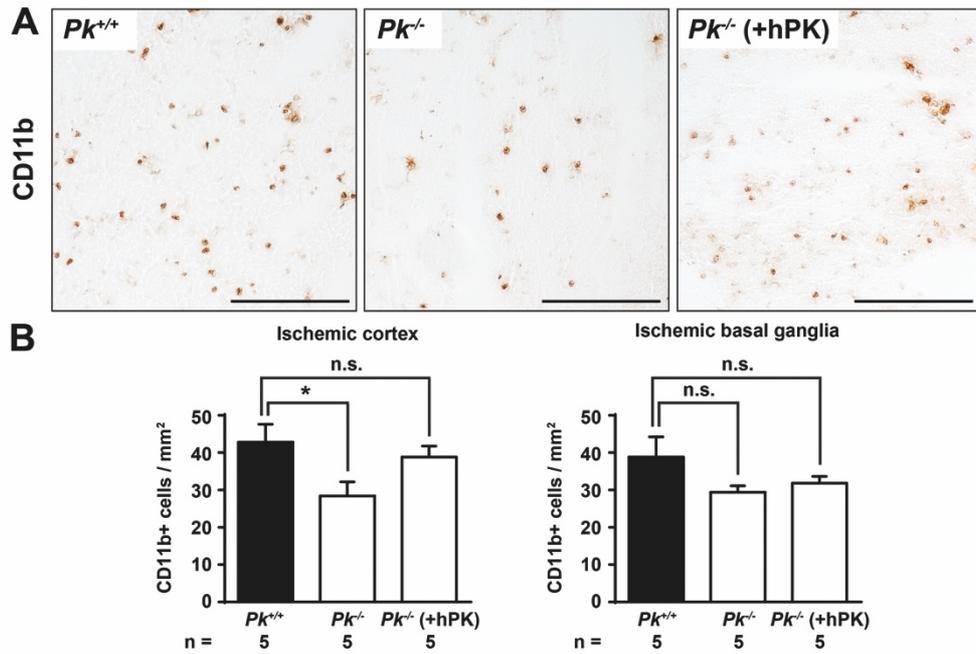


Abbildung 23: Plasmakallikrein-Defizienz schwächt die Inflamationsreaktion nach tMCAO ab. (A) Repräsentative immunhistochemische Färbung gegen CD11b+ Makrophagen/Mikroglia in der ischämischen Hemisphäre von *Pk*<sup>+/+</sup> Mäusen, *Pk*<sup>-/-</sup> Mäusen und mit hPK rekonstituierten *Pk*<sup>-/-</sup> Mäusen. Balken = 100  $\mu$ m. (B) Quantifizierung von CD11b+ Zellen/mm<sup>2</sup> in den infarzierten Cortices oder Basalganglien an Tag 1 nach tMCAO (n = 5). \* p < 0,05, n.s., nicht signifikant; einfaktorielle Varianzanalyse mit nachfolgendem Bonferroni-Mehrfachvergleichstest, Vergleich mit *Pk*<sup>+/+</sup> Mäusen. Aus Göb, Reymann et al., 2015. doi: 10.1002/ana.24380

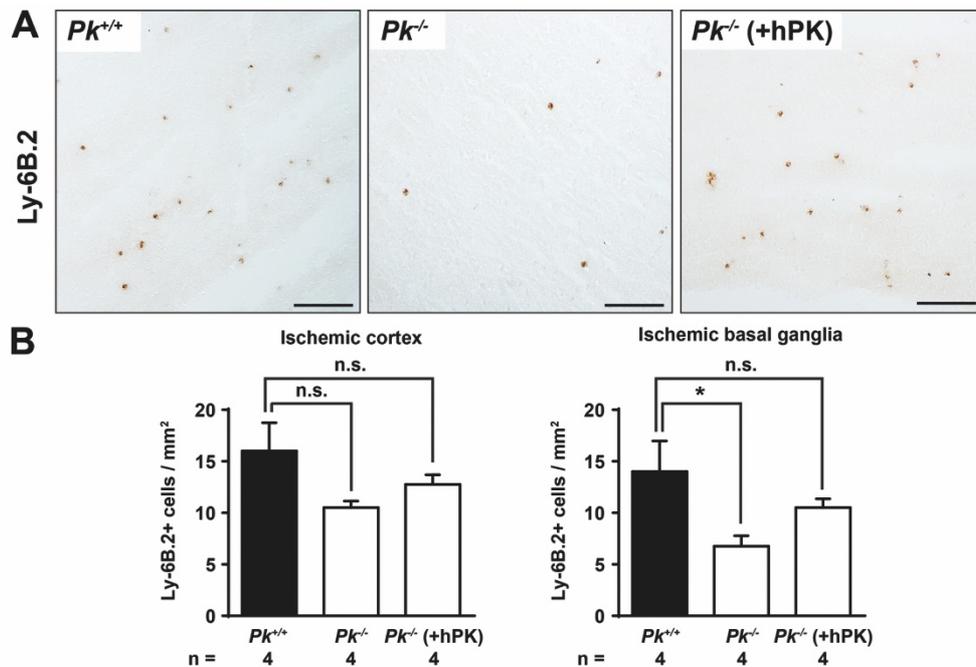


Abbildung 24: Plasmakallikrein-Defizienz schwächt die Inflammationsreaktion nach tMCAO ab. (A) Repräsentative immunhistochemische Färbung gegen Ly-6B.2+ Neutrophile in der ischämischen Hemisphäre von  $PK^{+/+}$  Mäusen,  $PK^{-/-}$  Mäusen und mit hPK rekonstituierten  $PK^{-/-}$  Mäusen. Balken = 100 $\mu$ m. (B) Quantifizierung von Ly-6B.2+ Zellen/mm<sup>2</sup> in den infarzierten Cortices oder Basalganglien an Tag 1 nach tMCAO (n = 5). \* p < 0,05, n.s., nicht signifikant; einfaktorielle Varianzanalyse mit nachfolgendem Bonferroni-Mehrfachvergleichstest, Vergleich mit  $PK^{+/+}$  Mäusen. Aus Göb, Reymann et al., 2015. doi: 10.1002/ana.24380

Darüber hinaus wurden die Genexpressionsprofile verschiedener typischer pro- und antiinflammatorischer Zytokine in den Gehirnen von  $PK^{+/+}$  Mäusen,  $PK^{-/-}$  Mäusen und mit hPK rekonstituierten  $PK^{-/-}$  Mäusen 24 h nach tMCAO verglichen (Abbildung 25). Die Menge der mRNA von Interleukin-1beta (Il-1 $\beta$ ) war in den infarzierten Cortices und den Bereichen der Basalganglien in allen operierten Gruppen höher als in der scheinoperierten Gruppe (p < 0,05). In  $PK^{-/-}$  Mäusen war die Expression von Il-1 $\beta$  jedoch sowohl in den Cortices als auch in dem Bereich der Basalganglien signifikant geringer als in  $PK^{+/+}$  Mäusen (p < 0,05 bei  $PK^{+/+}$  vs.  $PK^{-/-}$ ) oder in  $PK^{-/-}$  Mäusen, die mit hPK rekonstituierten worden waren (p > 0,05 bei  $PK^{+/+}$  vs.  $PK^{-/-}$  (+hPK)). Im Gegensatz dazu unterschieden sich die Transkripte des Tumor Nekrose Faktors alpha (Tnf- $\alpha$ ) mengenmäßig nicht zwischen den Gruppen in beiden Hirngebieten (p > 0,05). Plasmakallikrein scheint also selektiv einzelne proinflammatorische Zytokine zu regulieren. Die Expression des Transforming Growth Faktors beta-1 (TGF- $\beta$ 1), der beim ischämischen Schlaganfall antiinflammatorische Funktionen ausüben kann, war in den Cortices und den Bereichen der Basalganglien in  $PK^{-/-}$  Mäusen höher als in  $PK^{+/+}$  Mäusen und in mit hPK rekonstituierten  $PK^{-/-}$  Mäusen (Cortex: p > 0,05 in  $PK^{+/+}$  vs.  $PK^{-/-}$  und  $PK^{-/-}$  Mäuse (+hPK), p < 0,05 in  $PK^{-/-}$  vs.  $PK^{-/-}$  (+hPK); Basalganglien: p < 0,01 in  $PK^{+/+}$  vs.  $PK^{-/-}$ , p < 0,05 in  $PK^{-/-}$  vs.  $PK^{-/-}$  (+hPK), p > 0,05 in  $PK^{+/+}$  vs.  $PK^{-/-}$  (+hPK)).

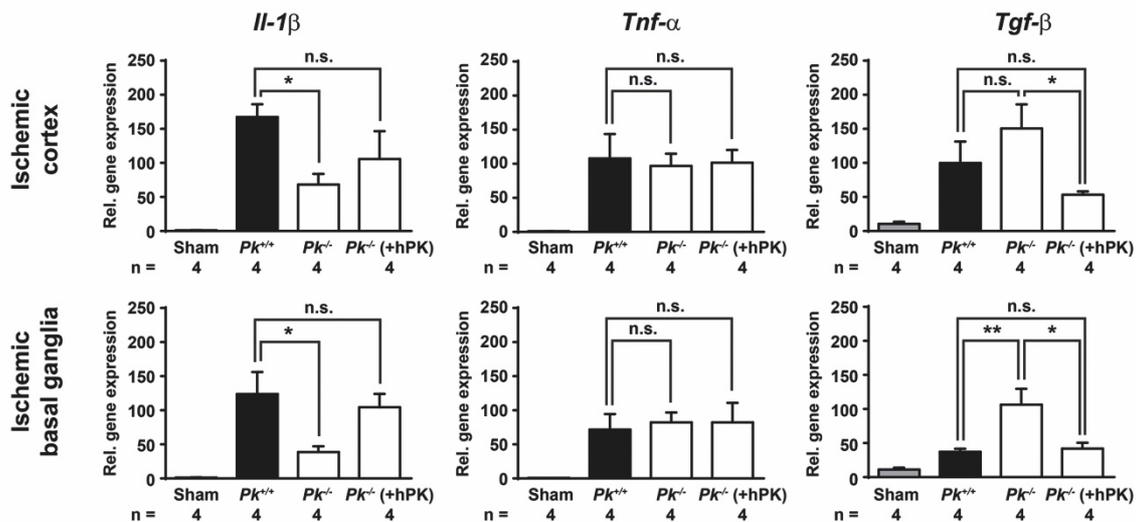


Abbildung 25: Plasmakallikrein-Defizienz schwächt die Inflammationsreaktion nach tMCAO ab. Relative Genexpression von Interleukin-1 $\beta$  (Il-1 $\beta$ ), Tumor Nekrose Faktor alpha (TNF- $\alpha$ ), und Transforming Growth Faktor beta-1 (TGF- $\beta$ 1) in den ischämischen Cortices (oben) und Basalganglien (unten) von *Pk*<sup>+/+</sup> Mäusen, *Pk*<sup>-/-</sup> Mäusen und mit hPK rekonstituierten *Pk*<sup>-/-</sup> 24 h nach tMCAO oder Scheinoperation (n = 4). \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, n.s., nicht signifikant; einfaktorielles Varianzanalyse mit nachfolgendem Bonferroni-Mehrfachvergleichstest, Vergleich mit Kontrollen (*Pk*<sup>+/+</sup> Mäusen oder *Pk*<sup>-/-</sup> Mäusen). Aus Göb, Reymann et al., 2015. doi: 10.1002/ana.24380

PK ist auch Ausgangspunkt des alternativen Aktivierungsweges des Komplementsystems [33]. Die Aktivierung bestimmter Bestandteile des Komplementsystems kann den Verlauf eines ischämischen Schlaganfalls im Tiermodell beeinflussen [70]. Daher haben wir auch die C5a-Spiegel im Serum und den Gehirnen von *Pk*<sup>+/+</sup> und *Pk*<sup>-/-</sup> Mäusen gemessen, und zwar sowohl in naiven Tieren als auch in Tieren nach einem Schlaganfall. Es zeigten sich jedoch keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen. Dies bedeutet, dass die Aktivierung des alternativen Weges der Komplementkaskade bei *Pk*<sup>-/-</sup> Mäusen auf anderen Wegen stattfinden muss (Tabelle 4).

### **3.5. Die pharmakologische Blockade von Plasmakallikrein schützt vor einem ischämischen Schlaganfall in einem klinisch relevanten Setting**

Die Untersuchungen an PK-defizienten Mäusen sprechen für eine pathophysiologische Rolle von PK beim ischämischen Schlaganfall. Um zu untersuchen, ob sich die Erkenntnisse aus Experimenten mit PK-defizienten Mäusen in einen möglichen therapeutischen Ansatz übertragen lassen, wurde die Wirksamkeit eines PK-neutralisierenden Antikörpers ( $\alpha$ -PK) untersucht. Von diesem konnte in einem zerebralen Blutungsmodell bereits gezeigt werden, dass er die Aktivität von murinem Plasmakallikrein effektiv unterdrücken kann [59].

Die intravenöse Gabe von  $\alpha$ -PK (10  $\mu$ g) 1 h nach Ischämieinduktion führte zu einer signifikanten Verkleinerung der Infarktvolumina ( $89,6 \pm 6,4$  mm<sup>3</sup> in der Kontrollgruppe vs.  $51,1 \pm 2,8$  mm<sup>3</sup> in der mit  $\alpha$ -PK behandelten Gruppe,  $p < 0,001$ ) und verringerte die neurologischen Defizite (Bederson Score: Median, 3,0 [2,0, 3,0] in der Kontrollgruppe vs. 2,0 [1,0, 3,0] in der mit  $\alpha$ -PK behandelten Gruppe,  $p > 0,05$ , Grip Test Score: Median, 3,0 [2,75, 4,0] in der Kontrollgruppe vs. 4,0 [4,0, 5,0] in der mit  $\alpha$ -PK behandelten Gruppe,  $p < 0,01$ , Abbildung 26B) im Vergleich zu Kontrolltieren an Tag 1 nach tMCAO.

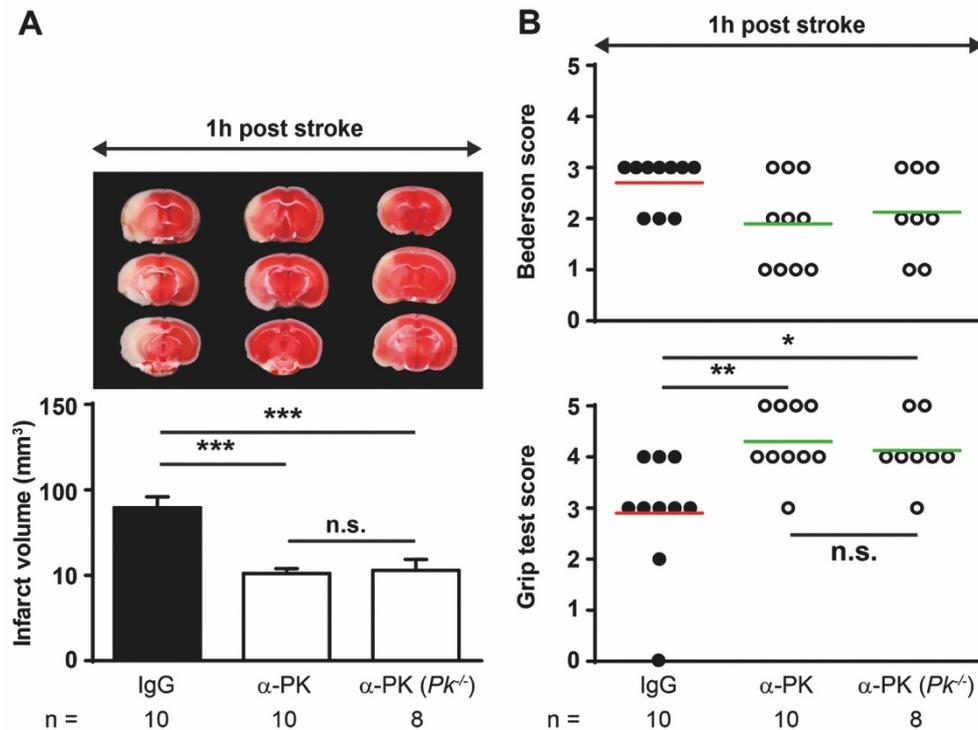


Abbildung 26: Die pharmakologische Blockade von Plasmakallikrein verbessert das Schlaganfall-Outcome in einem klinisch relevanten Setting. (A, oben) Repräsentative TTC-Färbung von drei korrespondierenden koronaren Gehirnschnitten von einer 6 Wochen alten männlichen C57BL/6 Maus nach Behandlung mit 10 µg Kontroll-IgG, einer 6 Wochen alten männlichen Maus nach Behandlung mit 10 µg eines gegen PK gerichteten Antikörpers (α-PK) 1 h nach Schlaganfallinduktion und einer 6 Wochen alten männlichen *Plk*<sup>-/-</sup> Maus nach Behandlung mit 10 µg α-PK 1 h nach Schlaganfallinduktion. Die Gehirne wurden an Tag 1 nach tMCAO entnommen. (A, unten) Infarktgrößen an Tag 1 nach tMCAO (n = 8-10). \*\*\* p < 0,001, n.s. nicht signifikant; einfaktorielles Varianzanalyse mit nachfolgendem Bonferroni-Mehrfachvergleichstest, Vergleich mit Kontrollen (C57BL/6 nach Behandlung mit IgG oder α-PK). (B) Neurologischer Bederson Score (oben) und Grip Test Score (unten) an Tag 1 nach tMCAO in den drei darüber abgebildeten Mausgruppen (n = 8-10). \* p < 0,05, \*\* p < 0,01; Kruskal-Wallis-Test mit nachfolgendem Dunn-Mehrfachvergleichstest, Vergleich mit Kontrollen (C57BL/6 Mäuse nach Behandlung mit IgG oder α-PK). Aus Göb, Reymann et al., 2015. doi: 10.1002/ana.24380

Des Weiteren wurden die neurologischen Defizite und die Mortalität der mit α-PK behandelten Mäuse und von Kontrolltieren über einen längeren Zeitraum nach zerebraler Ischämie beobachtet. Sieben Tage nach 60-minütiger tMCAO waren

9 von 13 der Kontrollmäuse (69,2% Mortalität) gestorben, während 9 von 13 der mit  $\alpha$ -PK behandelten Mäuse bis Tag 7 überlebten (30,7% Mortalität).

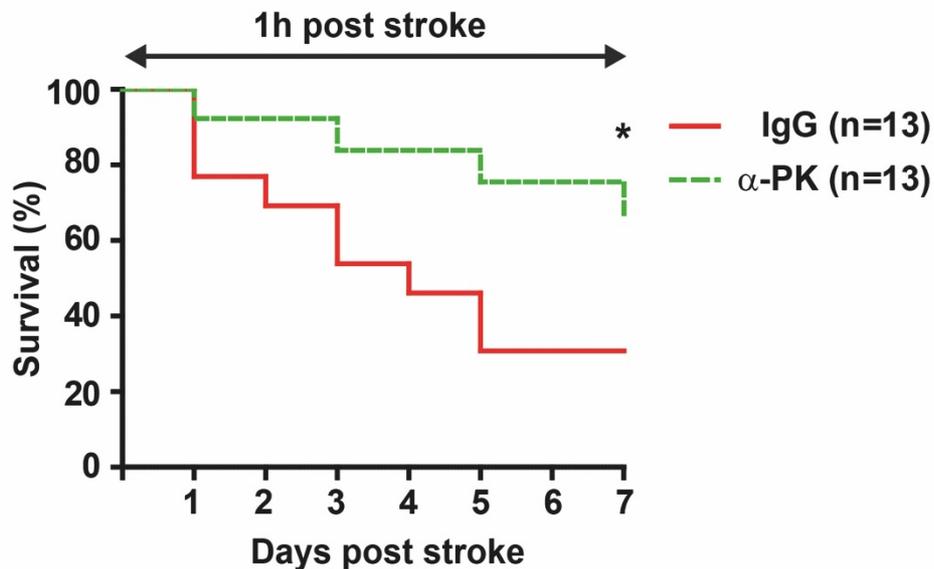


Abbildung 27: Die pharmakologische Blockade von Plasmakallikrein senkt die Mortalität nach Schlaganfall. Überlebenskurve 6 Wochen alter männlicher C57BL/6 Mäuse nach Behandlung mit 10  $\mu$ g Kontroll-IgG oder 10  $\mu$ g  $\alpha$ -PK 1 h nach Schlaganfallinduktion (n = 13/Gruppe). \* p = 0,048; Log-Rang-Test. Aus Göb, Reymann et al., 2015. doi: 10.1002/ana.24380

Dazu passend zeigten die mit  $\alpha$ -PK behandelten Mäuse signifikant weniger neurologische Defizite als die Kontrolltiere über den gesamten Beobachtungszeitraum bis Tag 7 (Abbildung 28).

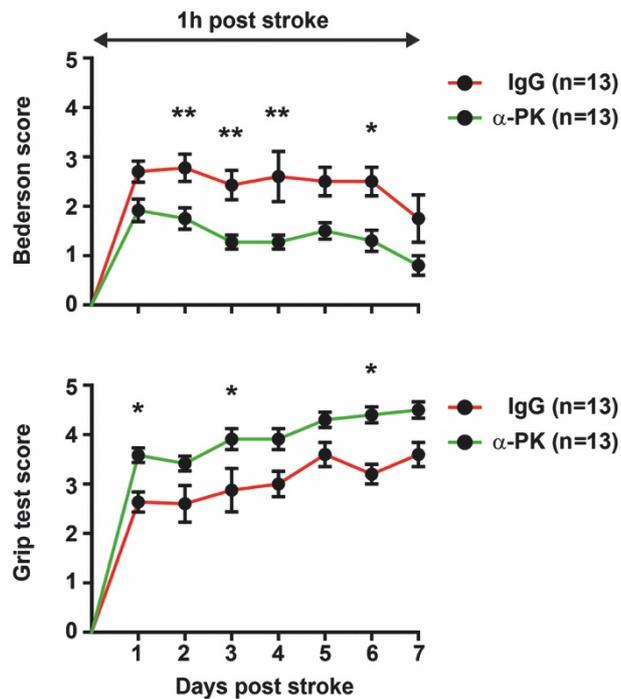


Abbildung 28: Die pharmakologische Blockade von Plasmakallikrein verbessert nachhaltig das Schlaganfall-Outcome. (oben) Neurologischer Bederson Score (oben) und Grip Test Score (unten) im Zeitverlauf bei 6 Wochen alten männlichen C57BL/6 Mäusen nach Behandlung mit 10 µg Kontroll-IgG oder 10 µg α-PK 1 h nach Schlaganfallinduktion (n = 13/Gruppe). \* p < 0,05, \*\* p < 0,01; zweifaktorielle Varianzanalyse mit nachfolgendem Bonferroni-Mehrfachvergleichstest. Aus Göb, Reymann et al., 2015. doi: 10.1002/ana.24380

Die Tatsache, dass eine Behandlung mit α-PK Antikörpern das Schlaganfall-Outcome in *PK*<sup>-/-</sup> Mäusen nicht weiter verbessern konnte (p > 0,05, Mortalität: 0%), schloss unspezifische Antikörper-Effekte aus (Abbildung 26).

Wie erwartet, verhinderte die Behandlung mit α-PK die physiologische Umwandlung nativen Kininogens in gespaltenes Kininogen nach einem Schlaganfall (Abbildung 29).

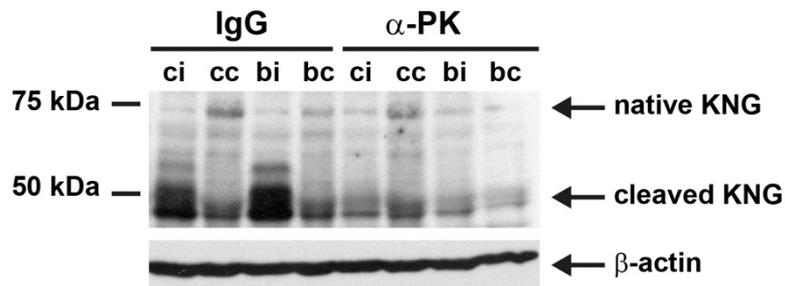


Abbildung 29: Die pharmakologische Blockade von Plasmakallikrein vermindert die Aktivierung des Kontakt-Kinin-Systems nach tMCAO. Western-Blot gegen KNG aus den ipsi- und contraläsionalen Cortices oder Basalganglien von C57BL/6 Mäusen, die 1 h nach Schlaganfallinduktion entweder mit Kontroll-IgG oder  $\alpha$ -PK behandelt worden waren. Die Gehirnproben wurden an Tag 1 nach tMCAO entnommen. Passend zu den Ergebnissen in  $Pk^{-/-}$  Mäusen reduzierte die pharmakologische Blockade von PK in ähnlichem Ausmaß die Menge an gespaltenem KNG in den infarzierten Gehirnen. Die Western-Blots von jeweils drei verschiedenen Tieren wurden unabhängig voneinander wiederholt. Ladekontrolle mit  $\beta$ -Aktin. Ein repräsentatives Beispiel pro Versuch ist abgebildet. ci, ipsiläsionaler Cortex; cc, contraläsionaler Cortex; bi, ipsiläsionale Basalganglien; bc, contraläsionale Basalganglien. Aus Göb, Reymann et al., 2015. doi: 10.1002/ana.24380

Die Wirksamkeit des PK-spezifischen Antikörpers wurde auch in einem erweiterten Zeitfenster (3 h nach Ischämieinduktion) untersucht (Abbildung 30). Auch die spätere Behandlung mit  $\alpha$ -PK führte zu einer Reduktion der Infarkt-volumina ( $90,1 \pm 4,6 \text{ mm}^3$  in der Kontrollgruppe vs.  $68,0 \pm 7,1 \text{ mm}^3$  in der mit  $\alpha$ -PK behandelten Gruppe,  $p < 0,05$ ; Mortalität: 9% in der Kontrollgruppe vs. 18% in der mit  $\alpha$ -PK behandelten Gruppe) und einer Verbesserung der Funktionstests am Tag 1 nach tMCAO (Bederson score: Median, 3,0 [2,0, 3,25] in der Kontrollgruppe vs. 3,0 [1,0, 3,0] in der mit  $\alpha$ -PK behandelten Gruppe,  $p > 0,05$ , Grip Test Score: Median, 2,5 [2,0, 3,0] in der Kontrollgruppe vs. 4,0 [2,75, 4,0] in der mit  $\alpha$ -PK behandelten Gruppe,  $p < 0,05$ ), allerdings in einem geringeren Ausmaß verglichen mit der Behandlung innerhalb des 1-h-Zeitfensters.

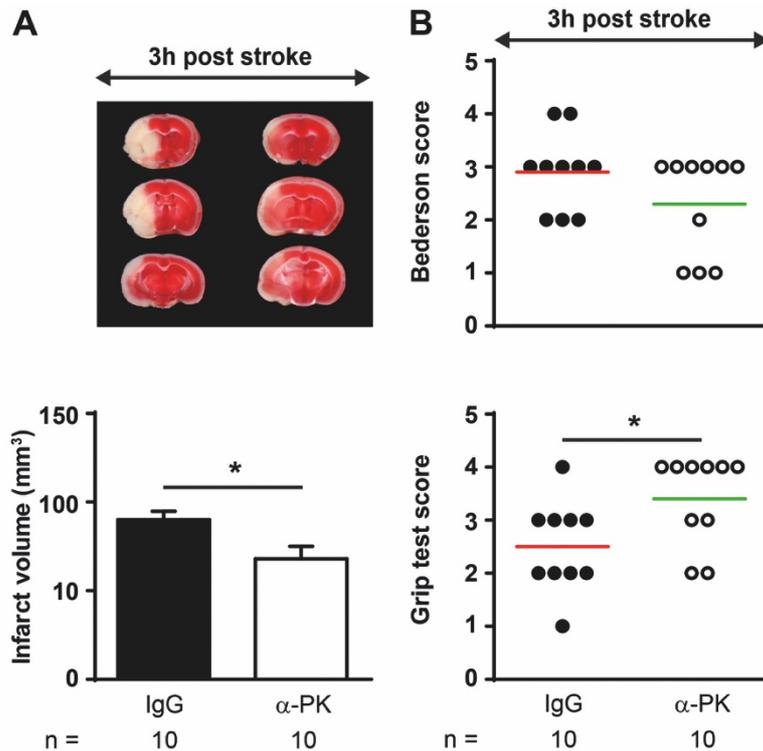


Abbildung 30: Die pharmakologische Blockade von Plasmakallikrein verbessert das Schlaganfall-Outcome in einem klinisch relevantem Setting. (A, oben) Repräsentative TTC-Färbung von drei zueinander gehörenden koronaren Gehirnschnitten von einer 6 Wochen alten männlichen C57BL/6 Maus nach Behandlung mit 10 µg Kontroll-IgG und einer 6 Wochen alten männlichen C57BL/6 Maus nach Behandlung mit 10 µg α-PK 3 h nach Schlaganfallinduktion. Die Gehirne wurden an Tag 1 nach tMCAO entnommen. (A, unten) Infarktgrößen an Tag 1 nach tMCAO (n = 8-10). \*\*\* p < 0,001, n.s. nicht signifikant; einfaktorielle Varianzanalyse mit nachfolgendem Bonferroni-Mehrfachvergleichstest, Vergleich mit Kontrollen (C57BL/6 nach Behandlung mit IgG oder α-PK). (B) Neurologischer Bederson Score (oben) und Grip Test Score (unten) an Tag 1 nach tMCAO in den zwei daneben abgebildeten Mausgruppen (n = 8-10). \* p < 0,05, \*\* p < 0,01; Kruskal-Wallis-Test mit nachfolgendem Dunn-Mehrfachvergleichstest, Vergleich mit Kontrollen (C57BL/6 Mäuse nach Behandlung mit IgG oder α-PK). Aus Göb, Reymann et al., 2015. doi: 10.1002/ana.24380

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen in *Pk*<sup>-/-</sup> Mäusen reduzierte die α-PK Behandlung in WT Mäusen die intrazerebrale Thrombenbildung (GPIIbβ Immunoreaktivität Cortex: p > 0,05, GPIIbβ Immunoreaktivität Basalganglien: p < 0,001 in der Kontrollgruppe vs. in der mit α-PK behandelten Gruppe, Abbildung

31) und den Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke (Occludin Immunoreaktivität Cortex:  $p < 0,01$ , Occludin Immunoreaktivität Basalganglien:  $p > 0,05$  in der Kontrollgruppe vs. in der mit  $\alpha$ -PK behandelten Gruppe, Abbildung 31) an Tag 1 nach tMCAO.

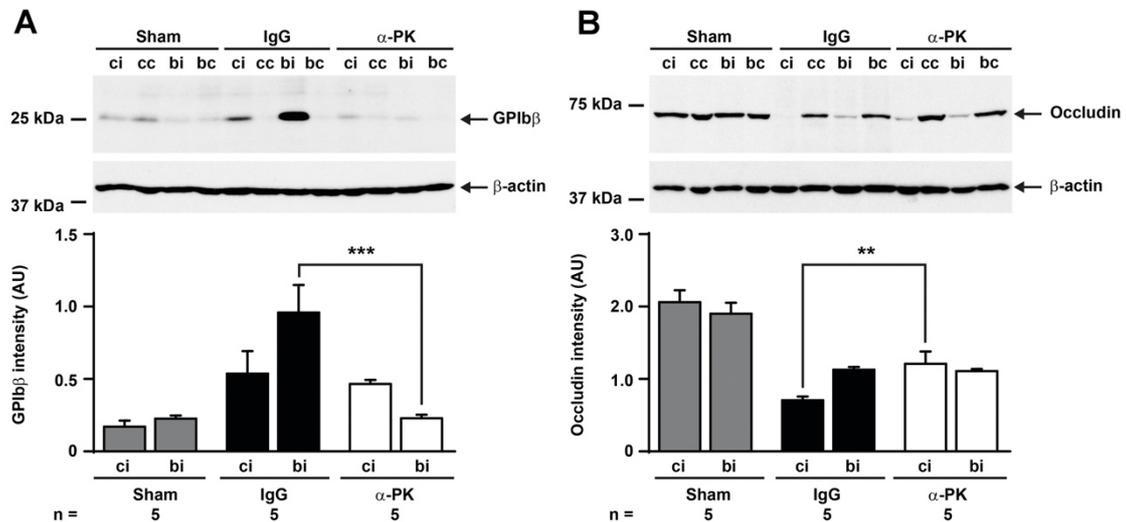


Abbildung 31: Die pharmakologische Blockade von Plasmakallikrein reduziert die Thrombusbildung und die Schädigung der Blut-Hirn-Schranke. (A, oben) Thrombenbildung in den ipsiläsionalen und contraläsionalen Cortices und Basalganglien von scheinoperierten Mäusen, C57BL/6 Mäusen nach Behandlung mit 10  $\mu$ g Kontroll-IgG und C57BL/6 Mäusen nach Behandlung mit 10  $\mu$ g  $\alpha$ -PK. Die Thrombusbildung wurde 24 h nach tMCAO mittels Western Blot gegen den Thrombozytenmarker anti-GPIIb/3 untersucht. Ein repräsentativer Western Blot ist gezeigt. (A, unten) Densitometrische Quantifizierung ( $n = 5$ ). \*\*\*  $p < 0,001$ ; einfaktorische Varianzanalyse mit nachfolgendem Bonferroni-Mehrfachvergleichstest, Vergleich mit Mäusen nach Behandlung mit IgG. (B, oben) Nachweis von Occludin in den ipsiläsionalen und contraläsionalen Cortices (ci or cc) oder Basalganglien (bi or bc) von scheinoperierten Mäusen, C57BL/6 Mäusen nach Behandlung mit 10  $\mu$ g Kontroll-IgG und C57BL/6 Mäusen nach Behandlung mit 10  $\mu$ g  $\alpha$ -PK 24 h nach tMCAO mittels Western Blot. Ein repräsentativer Western Blot ist gezeigt. (B, unten) Densitometrische Quantifizierung ( $n = 5$ ). \*\*  $p < 0,01$ ; einfaktorische Varianzanalyse mit nachfolgendem Bonferroni-Mehrfachvergleichstest, Vergleich mit Mäusen nach Behandlung mit IgG. AU, arbitrary units, willkürliche Einheiten; ci, ipsiläsionaler Cortex; cc, contraläsionaler Cortex; bi, ipsiläsionale Basalganglien; bc, contraläsionale Basalganglien. Aus Göb, Reymann et al., 2015. doi: 10.1002/ana.24380

#### 4. Diskussion

Die vorliegende Arbeit konnte erstmals belegen, dass PK eine zentrale Rolle in der Pathophysiologie des ischämischen Schlaganfalls spielt. PK-defiziente Mäuse entwickelten nach transientser fokaler zerebraler Ischämie kleinere Infarkte und ein besseres funktionelles Outcome im Vergleich zu WT Tieren. Der Schutz war auch zu späteren Zeitpunkten (bis Tag 7) nach Schlaganfall noch nachweisbar, ebenso wie nach permanenter Ischämie. Unter klinischen Gesichtspunkten interessant ist die Tatsache, dass auch eine pharmakologische Hemmung von PK mittels eines PK-spezifischen Antikörpers die Schlaganfallsschwere in Mäusen verringern konnte, und zwar selbst dann, wenn der Inhibitor mit einer zeitlichen Verzögerung von bis zu 3 Stunden nach Ischämie verabreicht wurde (therapeutischer Ansatz). Im Hinblick auf die zu Grunde liegenden Mechanismen konnten wir zeigen, dass die Hemmung von PK an verschiedenen Ebenen der Schlaganfallpathophysiologie ansetzt: so war die lokale postischämische Entzündungsreaktion im Gehirn abgeschwächt und es fand sich eine verminderte Thrombusbildung (Reduktion der Thrombo-Inflammation). Darüber hinaus wurde der Zusammenbruch der BHS abgemildert.

Die Ergebnisse der Arbeit unterstreichen die zentrale Rolle des KKS beim ischämischen Schlaganfall [71, 72]. In Übereinstimmung mit Kleinschnitz et al. [52] und Langhauser et al. [51] konnten wir die Aktivierung dieses Systems im ischämischen Gehirn bestätigen: In den infarzierten Hirnarealen wildtypischer Tiere fand sich sowohl ein höherer Anteil an KNG, aus dem BK gespalten wird, als auch an PK, das diese Spaltung bewirkt. Die Ergebnisse stehen im Einklang mit Arbeiten zu anderen Mitgliedern des KKS. So zeigten *Kng*<sup>-/-</sup> Mäuse [51] im selben Schlaganfallmodell ebenfalls kleinere Infarkte und ein besseres funktionelles Outcome. Da im Gegensatz zu PK bisher jedoch kein spezifischer KNG-Inhibitor zur Verfügung steht, ist dieses Target unter therapeutischen Gesichtspunkten derzeit nur eingeschränkt attraktiv.

Frühere Arbeiten haben bereits die pathophysiologische Rolle des KKS in Ischämie-/ Reperusionsmodellen (I/R) anderer Organe untersucht. So konnte beispielsweise bei Modellen der Myokardischämie ein Schutz durch BK-Rezeptor-Blockade erreicht werden [73]. Die Stimulation von BK-Rezeptoren dagegen wirkt sich in intestinalen [74] und renalen [75] I/R-Modellen schädlich auf das Auskommen der Tiere aus. In der vorliegenden Arbeit wurde nun erstmals die Rolle des PK als integraler Bestandteil des KKS in einem I/R-Schadensmodell des Gehirns adressiert. Auch hier zeigte sich, dass die genetische oder pharmakologische Blockade von PK die Folgen des I/R-Schadens abschwächen kann. Überraschenderweise waren PK-defiziente Mäuse aber auch nach permanenter zerebraler Ischämie (Belassen des Fadens in der ACM) vor Schlaganfällen geschützt, wenn auch in einem geringeren Ausmaß im Vergleich zur transienten Ischämie. Dieser Effekt konnte in Studien, in denen im gleichen Modell *Kng<sup>-/-</sup>* [51] oder *FXII<sup>-/-</sup>* Mäuse [52] eingesetzt wurden, nicht beobachtet werden. Somit liefern die Ergebnisse einen Hinweis darauf, dass spezifisch PK nicht nur im Rahmen der Reperfusion, in dem es zu einer starken Aktivierung des Endothels, massiver mikrovaskulärer Thrombenbildung und einer Entzündungsreaktion [31, 76] kommt, eine wichtige funktionelle Rolle spielt, sondern auch bei fehlender Wiederöffnung des verschlossenen Gefäßes. Obwohl die diesem protektiven Effekt nach permanenter Ischämie zu Grunde liegenden Mechanismen noch nicht im Detail aufgeklärt sind, ist die Beobachtung aus klinischer Sicht durchaus relevant, da viele Schlaganfallpatienten eine permanente Ischämie erleiden. Die spontane Rekanalisationsrate thrombotisch verschlossener Hirngefäße liegt bei nur rund 24%, die Rekanalisationsrate nach Behandlung mit rt-PA bei rund 46% [77-79].

Studien unserer [50-54] und weiterer Arbeitsgruppen [31, 69] aus den letzten Jahren haben gezeigt, dass es sich beim ischämischen Schlaganfall nicht nur um eine rein thrombotische bzw. thrombembolische Erkrankung handelt, sondern dass auch Entzündungsprozesse ganz entscheidend an der Schlaganfallentstehung und -ausbreitung beteiligt sind. Diese werden eingeleitet durch die

Aktivierung von DAMPs [80], woraufhin zunächst mikrogliale Zellen und Makrophagen in das Infarktgebiet einwandern und proinflammatorische Zytokine wie TNF- $\alpha$ , Il-1 $\beta$ , Il-17 und Il-23 ausschütten und somit die Einwanderung neutrophiler Granulozyten und Lymphozyten [26] und einen Zusammenbruch der BHS bewirken [28-30, 81].

Ein sehr potenter Mediator der lokalen Entzündungsreaktion nach zerebraler Ischämie ist das proinflammatorische Peptidhormon BK, das Endprodukt des KKS. Wir konnten zeigen, dass die Blockade des induzierbaren B1R, nicht jedoch des konstitutiv exprimierten B2R, Mäuse vor zerebraler Ischämie schützt [50]. In der vorliegenden Arbeit waren die BK-Spiegel im Blut PK-defizienter Tiere nach Schlaganfall signifikant geringer als in WT Tieren, was auf einen antiinflammatorischen Phänotyp hindeutete. Dieser Effekt war nach der Rekonstitution von *Pk*<sup>-/-</sup> Mäusen mit exogenem PK voll reversibel. Tatsächlich war die Invasion neutrophiler Granulozyten in das ischämische Gehirn nach Blockade von PK signifikant abgeschwächt und es fanden sich weniger aktivierte Mikrogliazellen/Makrophagen. Von beiden Zelltypen ist bekannt, dass sie den ischämischen Gewebeschaden im Gehirn nach Schlaganfall insbesondere in der Akutphase verstärken [69]. Passend zu einer verringerten zellulären Entzündungsreaktion war auch die Genexpression von Il-1 $\beta$  im Gehirn schlaganfallgeschädigter *Pk*<sup>-/-</sup> Mäuse vermindert. Man weiß, dass Il-1 $\beta$  als typisches proinflammatorisches Zytokin das Ausmaß eines Schlaganfalls verstärken kann [82]. Seine therapeutische Beeinflussung zeigte in verschiedenen experimentellen Schlaganfallstudien protektive Effekte [83, 84], und es wird diskutiert, Il-1 $\beta$ -Rezeptorantagonisten auch in klinischen Studien an Schlaganfallpatienten zu testen [85]. Im Gegensatz zu Il-1 $\beta$  war die Expression eines anderen proinflammatorischen Zytokins, TNF- $\alpha$ , in *Pk*<sup>-/-</sup> Mäusen nach Schlaganfall im Vergleich zu WT Tieren nicht verändert. Das deutet darauf hin, dass PK selektiv die Expression bestimmter Zytokine regelt. Ob das auf direktem Weg, oder über die verminderte Invasion der o.g. Immunzellen erfolgt, ist derzeit noch offen. Interes-

santerweise kam es in den Gehirnen PK-defizienter Tiere nach einem Schlaganfall zudem zu einer Hochregulation von TGF- $\beta$ 1, dem eine protektive Rolle nach zerebraler Ischämie zugeschrieben wird [86].

Die Verminderung der lokalen Entzündungsreaktion in  $Pk^{-/-}$  Mäusen nach Schlaganfall könnte auch zu einer Stabilisierung der BHS in diesen Tieren beigetragen haben. So weiß man beispielsweise, dass neutrophile Granulozyten durch die Freisetzung degradierender Enzyme die BHS destabilisieren können [69]. Auch proinflammatorische Zytokine oder das BK tragen zu einer Schädigung der BHS nach Schlaganfall bei [51]. Dazu passt, dass wir als strukturelles Korrelat der BHS-Stabilisierung nach Blockade von PK einen verringerten Abbau des Tight-Junction-Proteins Occludin im ischämischen Gehirn finden konnten.

Einen ähnlich starken antiinflammatorischen Effekt nach I/R des Gehirns konnten wir auch nach Blockade anderer Mitglieder des KKS finden, beispielsweise von KNG [51] oder FXII (unveröffentlicht). Im Hinblick auf eine potenzielle therapeutische Anwendung muss man jedoch kritisch anmerken, dass Entzündungsprozesse nach Schlaganfall per se nicht immer schädigend wirken, sondern in Abhängigkeit vom zeitlichen Verlauf auch protektive bzw. regenerative Funktion haben [69]. Darüber hinaus kommt es nach Schlaganfällen bereits endogen zu einer transienten Immunsuppression [87]. Eine weitere Verstärkung dieser Vorgänge, beispielsweise durch exogene antientzündliche Strategien könnte daher ggf. zu einer erhöhten Infektanfälligkeit mit entsprechenden Komplikationen führen. In diesem Zusammenhang muss auch erwähnt werden, dass das KKS ein wichtiger Bestandteil der innate Immunabwehr ist, in dem es das Komplementsystem aktiviert und die Bildung antimikrobiell wirksamer Peptide verstärkt [33]. Allerdings waren die von uns gemessenen Serum-Komplementspiegel in  $Pk^{-/-}$  und  $Pk^{+/+}$  Mäusen nicht unterschiedlich.

Neben einer stark verminderten Entzündungsreaktion war auch die Thrombusbildung in den in unserer Arbeit verwendeten  $Pk^{-/-}$  Mäusen nach fokaler zerebraler Ischämie im Vergleich zu  $Pk^{+/+}$  Mäusen stark reduziert. Diese Beobachtung stützt die von uns unlängst formulierte Hypothese, dass es sich beim ischämischen Schlaganfall weder um eine rein thrombotische, noch um eine rein inflammatorische Erkrankung handelt, sondern dass das Zusammenspiel von Thrombose und Entzündung an der neurovaskulären Einheit für das sekundäre Infarktwachstum von zentraler Bedeutung ist [31]. Die Ergebnisse passen auch zu einer anderen, von Bird et al. beschriebenen  $Pk^{-/-}$  Mauslinie [60]. Diese Tiere entwickelten in verschiedenen in vivo Thrombosemodellen (verschiedene  $FeCl_3$ -Modelle der Vena cava und ACC) weniger arterielle und venöse Thromben. Auch das Herunterregulieren der PK-mRNA-Expression mittels spezifischer Antisenseoligonukleotide führte in diesen Modellen zu einer geringeren Thrombusbildung [68]. Die Verringerung der Thrombusbildung ging in unserer Arbeit auch mit einer Verbesserung des lokalen zerebralen Blutflusses nach Schlaganfall in  $Pk^{-/-}$  Mäusen einher. Im Sinne des Konzepts der Thromboinflammation könnte dazu aber zusätzlich auch eine verminderte Interaktion von Immunzellen (z.B. neutrophilen Granulozyten) mit Bestandteilen des Blutgerinnungssystems (z.B. Thrombozyten) und zerebralen Endothelzellen beigetragen haben [31, 88-90]. Von dieser Interaktion weiß man, dass sie die mikrovaskuläre Dysfunktion nach Schlaganfall verstärkt.

Interessanterweise führte die genetische bzw. pharmakologische Blockade von PK zwar zu einer verminderten Thrombusbildung nach fokaler zerebraler Ischämie, das intrazerebrale Blutungsrisiko wurde dadurch jedoch nicht erhöht. Unter therapeutischen Gesichtspunkten ist diese Beobachtung hoch interessant, da intrazerebrale Blutungskomplikationen die gefürchtetste Komplikation jedweder antithrombotischen Therapie, z.B. mit Heparin oder oralen Antikoagulantien, darstellen [91]. Dazu passt, dass die Blutungszeit in  $Pk^{-/-}$  Tieren nicht verlängert war. In der hämostaseologischen Charakterisierung der Tiere fand sich lediglich eine deutlich verlängerte aPTT, wie sie auch von Liu und Kollegen

nach PK-Blockade beschrieben wurde [59]. Darüber hinaus ist bekannt, dass Menschen mit angeborener PK-Defizienz ebenfalls eine Verlängerung der aPTT aufweisen, jedoch keinen offensichtlichen Blutungsphänotyp haben [56, 92].

Der Grund, weshalb *PK*<sup>-/-</sup> Tiere weniger Thromben nach Gefäßschädigung bilden, liegt vermutlich an einer reduzierten Aktivierung des FXII in diesen Tieren [68]. FXII ist der Ausgangspunkt sowohl des KKS als auch der intrinsischen plasmatischen Blutgerinnung [33]. Ähnlich wie PK-defiziente Tiere entwickelten auch FXII-defiziente Tiere weniger intrazerebrale Thromben und eine abgeschwächte Entzündungsreaktion nach einem ischämischen Schlaganfall, ohne jedoch eine erhöhte Blutungsneigung zu zeigen [52]. Gleiches traf für WT Mäuse zu, die mit dem spezifischen FXIIa-Inhibitor rHA-Infestin-4 behandelt wurden [53]. Diese Arbeiten unterstreichen, dass das KKS und die intrinsische plasmatische Blutgerinnung zentrale Faktoren der Schlaganfallpathogenese darstellen und eine gezielte Blockade dieser Systeme das ultimative Ziel einer „blutungsfreien“ oder zumindest sehr blutungsarmen Antithrombose möglich machen könnte [91].

Neben der verminderten Aktivierung von FXII kommen weitere potenzielle Mechanismen in Betracht, die dem antithrombotischen Phänotyp nach Blockade von PK zugrunde liegen könnten. Qian et al. konnten z.B. zeigen, dass in Abwesenheit von PK weniger funktionell aktives Thrombin gebildet wird [93]. Des Weiteren wurde in einer *in-vitro*-Studie mit humanen embryonalen Nierenzellen gezeigt, dass PK den Protease-aktivierten Rezeptor 1 aktiviert, dem eine Rolle bei der Thrombozytenaktivierung im Rahmen atherosklerotischer Vorgänge zugeschrieben wird [94].

Im Gegensatz zum ischämischen Schlaganfall könnte PK beim hämorrhagischen Schlaganfall eine andere Rolle spielen. Liu et al. [59] fanden, dass die unter Hyperglykämie beobachtete Hämatom-Expansion nach einer intrakraniellen Blutung durch PK vermittelt wird, was den in unserer Arbeit beschriebenen

prothrombotischen Effekten widersprechen würde. Die diesem Effekt zu Grunde liegende Thrombozytenaggregationshemmung nach Kontakt mit Kollagen trat allerdings ausschließlich unter Hyperglykämie auf, während dies unter normoglykämischen Bedingungen – wie in der vorliegenden Arbeit – nicht beobachtet werden konnte. Da jedoch bei rund 50 % aller Patienten mit ischämischem Schlaganfall-Patienten in der Akutsituation eine Hyperglykämie besteht [95] und da Einblutungen in das infarzierte Gewebe häufig vorkommen – sei es spontan [96] oder im Rahmen einer thrombolytischen Therapie [97] – sind die Ergebnisse vor einer eventuellen Translation in die Klinik kritisch zu berücksichtigen. Darüber hinaus ist zu bedenken, dass PK nicht nur prothrombotisch wirkt, sondern auch die endogene Fibrinolyse verstärken kann, indem es zum einen Plasminogen sowohl direkt als auch über den Plasminogenaktivator vom Urokinase-Typ aktiviert [33, 98].

In der vorliegenden Arbeit haben wir einen hochspezifischen Antikörper gegen PK eingesetzt, um die PK-Aktivität in WT Mäusen zu blockieren [59]. Das bisher in anderen Studien als PK-Inhibitor eingesetzte Aprotinin hingegen blockiert PK nicht spezifisch und lieferte teils widersprüchliche Ergebnisse [43]. Der C1-Inh ist der physiologische Hauptinhibitor von PK, und seine exogene Applikation schützt Mäuse vor einem I/R-Schaden des Gehirns [54, 99]; ähnlich wie Aprotinin ist aber auch C1-Inh nicht spezifisch für PK und beeinflusst andere Bestandteile des KKS, so zum Beispiel den Faktor XII oder das Komplement-System. Im Gegensatz dazu ist Ecallantide (DX-88) ein spezifischer PK-Inhibitor, der bereits für die Behandlung des hereditären Angioödems zugelassen ist. Storini und Kollegen haben Ecallantide in einem Modell der milden fokalen zerebralen Ischämie (30 min tMCAO) in der Maus untersucht [100]. Passend zu unseren Ergebnissen konnte Ecallantide die Infarktgröße verringern und das funktionelle Outcome verbessern. Allerdings ging der protektive Effekt verloren, wenn Ecallantide später als 30 Minuten nach Beginn der Ischämie verabreicht wurde. In einem Modell der permanenten zerebralen Ischämie war es komplett unwirksam, sodass die klinische Relevanz fragwürdig erscheint. Mechanistische Studien zu

Ecallantide im Schlaganfallmodell, z.B. in Bezug auf die Thrombusbildung oder die Inflammationsreaktion wurden von Storini et al. nicht durchgeführt [100]. Die Tatsache, dass der von uns verwendete anti-PK Antikörper bis zu 3 Stunden nach Schlaganfallinduktion noch wirksam war, ohne gleichzeitig das intrazerebrale Blutungsrisiko zu erhöhen, ist vielversprechend und das translationale Potenzial einer Blockade des KKS sollte in weiterführenden Studien untersucht werden. Dabei ist jedoch immer zu bedenken, dass gerade im Feld der experimentellen Schlaganfallforschung der sog. Translational Roadblock besonders eklatant ist und eine Übertragbarkeit von Ergebnissen aus dem Tierversuch in das Humansystem oft nur eingeschränkt möglich ist [23, 101].

## 5. Zusammenfassung und Ausblick

Die Rolle thromboinflammatorischer Vorgänge in der Pathogenese des ischämischen Schlaganfalls ist in den letzten Jahren immer mehr in den wissenschaftlichen Fokus gerückt. Plasmakallikrein (PK) spaltet von hochmolekularem Kininogen (KNG) Bradykinin (BK) ab und ist dadurch Ausgangspunkt des proinflammatorischen Kallikrein-Kinin-Systems (KKS). Zum anderen kann es den Gerinnungsfaktor XII (FXII) aktivieren, den Ausgangspunkt der intrinsischen Gerinnungskaskade. Es initiiert also sowohl inflammatorische als auch thrombotische Vorgänge. Daher wurde in dieser Arbeit der Effekt einer Blockade PKs in einem Mausmodell der fokalen zerebralen Ischämie untersucht – und zwar sowohl durch genetische Depletion als auch durch pharmakologische Blockade. Beide Ansätze brachten einen nachhaltigen protektiven Effekt in Bezug auf Infarktgrößen und funktionelles Outcome, ohne die Blutungsgefahr zu erhöhen.

Da die Blockade von PK mechanistisch vor allem zentrale pathophysiologische Vorgänge beim ischämischen Schlaganfall inhibiert, nämlich Ödembildung, intrazerebrale Thrombosen und Entzündungsreaktionen, kann man PK bzw. das gesamte KKS aus klinischer Sicht als hervorragendes Target betrachten. Es sind bereits verschiedene pharmakologische KKS-Inhibitoren verfügbar. DX-2930, ein neuer monoklonarer PK-spezifischer Antikörper von DYAX Corp., aktuell in klinischen Studien befindlich für die Indikation Hereditäres Angioödem, wird derzeit in unserer Arbeitsgruppe im tMCAO-Modell untersucht. Von Infestin-4, einem spezifischen FXII-Inhibitor, der zuerst aus dem Mitteldarm der blutsaugenden Wanze *Triatoma infestans* gewonnen wurde, gibt es bereits vielversprechende Daten als Heparin-Ersatz in einem Schweinemodell der extrakorporalen Zirkulation. KNG oder BK sind hingegen als Target momentan weniger geeignet, zum einen sind derzeit keine pharmakologischen BK-Inhibitoren verfügbar, zum anderen ist die physiologische Rolle des verbleibenden KNG-Proteins nach der Abspaltung von BK nicht geklärt. Eine KKS-Inhibition wäre auch als Ergänzung zur Lyse-/ Rekanalisations-Therapie denkbar, immer-

hin führt die KKS-Blockade nicht zu einer erhöhten Blutungsneigung. Die Wiederöffnung des verschlossenen Gefäßes ist zwar oberstes Ziel einer Schlaganfallakutbehandlung, aber gleichzeitig ist die Abschwächung der zentralen pathophysiologischen Vorgänge Thrombose, Entzündung und Ödembildung wünschenswert, um die Behandlungseffektivität zu erhöhen. Hierfür gibt es mittlerweile zahlreiche vielversprechende Daten aus tierexperimentellen Schlaganfallstudien. Darüber hinaus erscheint eine KKS-Inhibition auch bei permanenter Ischämie attraktiv und könnte somit auch Patienten helfen, bei denen eine Rekanalisation misslingt oder wegen des überschrittenen Zeitfensters nicht möglich ist.

Inwieweit sich diese Ergebnisse jedoch in die klinische Situation übertragen lassen, und eine pharmakologische Inhibition PKs bzw. des KKS auch beim Menschen im Rahmen der Schlaganfallbehandlung angewandt werden könnte, muss in weiteren Studien untersucht werden.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Rathore, S.S., et al., *Characterization of incident stroke signs and symptoms: findings from the atherosclerosis risk in communities study*. Stroke, 2002. **33**(11): p. 2718-21.
2. Adams, H.P., Jr., et al., *Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment*. Stroke, 1993. **24**(1): p. 35-41.
3. Lozano, R., et al., *Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010*. Lancet, 2012. **380**(9859): p. 2095-128.
4. Murray, C.J., et al., *Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010*. Lancet, 2012. **380**(9859): p. 2197-223.
5. Kolominsky-Rabas, P.L., et al., *A prospective community-based study of stroke in Germany--the Erlangen Stroke Project (ESPro): incidence and case fatality at 1, 3, and 12 months*. Stroke, 1998. **29**(12): p. 2501-6.
6. Heuschmann, P., et al., *Schlaganfallhäufigkeit und Versorgung von Schlaganfallpatienten in Deutschland*. Akt Neurol, 2010. **37**: p. 333-340.
7. Ward, A., et al., *Care needs and economic consequences after acute ischemic stroke: the Erlangen Stroke Project*. Eur J Neurol, 2005. **12**(4): p. 264-7.
8. Schneider, K., et al., *Situation of life and care in patients with a stroke*. Nervenheilkunde, 2009. **28**(3): p. 114-+.
9. Kolominsky-Rabas, P.L., et al., *Lifetime cost of ischemic stroke in Germany: results and national projections from a population-based stroke registry: the Erlangen Stroke Project*. Stroke, 2006. **37**(5): p. 1179-83.
10. Hacke, W., et al., *Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke*. N Engl J Med, 2008. **359**(13): p. 1317-29.
11. *Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group*. N Engl J Med, 1995. **333**(24): p. 1581-7.
12. Hacke, W., et al., *Association of outcome with early stroke treatment: pooled analysis of ATLANTIS, ECASS, and NINDS rt-PA stroke trials*. Lancet, 2004. **363**(9411): p. 768-74.
13. Berkhemer, O.A., et al., *A Randomized Trial of Intraarterial Treatment for Acute Ischemic Stroke*. New England Journal of Medicine, 2015. **372**(1): p. 11-20.
14. Molina, C.A., et al., *REVASCAT: a randomized trial of revascularization with SOLITAIRE FR® device vs. best medical therapy in the treatment of acute stroke due to anterior circulation large vessel occlusion presenting*

- within eight-hours of symptom onset.* International Journal of Stroke, 2015. **10**(4): p. 619-626.
15. Saver, J.L., et al., *Stent-Retriever Thrombectomy after Intravenous t-PA vs. t-PA Alone in Stroke.* New England Journal of Medicine, 2015. **372**(24): p. 2285-2295.
  16. Goyal, M., et al., *Randomized Assessment of Rapid Endovascular Treatment of Ischemic Stroke.* New England Journal of Medicine, 2015. **372**(11): p. 1019-1030.
  17. Campbell, B.C.V., et al., *Endovascular Therapy for Ischemic Stroke with Perfusion-Imaging Selection.* New England Journal of Medicine, 2015. **372**(11): p. 1009-1018.
  18. Trialists' Collaboration, S.U., *Organised inpatient (stroke unit) care for stroke.* Cochrane database of systematic reviews, 2013(4).
  19. Agarwalla, P.K., C.J. Stapleton, and C.S. Ogilvy, *Craniectomy in Acute Ischemic Stroke.* Neurosurgery, 2014. **74**: p. S151-S162.
  20. Jones, T.H., et al., *Thresholds of focal cerebral ischemia in awake monkeys.* J Neurosurg, 1981. **54**(6): p. 773-82.
  21. Heiss, W.D., *Flow thresholds of functional and morphological damage of brain tissue.* Stroke, 1983. **14**(3): p. 329-31.
  22. Heiss, W.D., *The ischemic penumbra: how does tissue injury evolve?* Annals of the New York Academy of Sciences, 2012. **1268**(1): p. 26-34.
  23. Endres, M., et al., *Improving outcome after stroke: overcoming the translational roadblock.* Cerebrovascular Diseases, 2008. **25**(3): p. 268-278.
  24. Martin, R.L., H.G. Lloyd, and A.I. Cowan, *The early events of oxygen and glucose deprivation: setting the scene for neuronal death?* Trends Neurosci, 1994. **17**(6): p. 251-7.
  25. Shichita, T., M. Ito, and A. Yoshimura, *Post-ischemic inflammation regulates neural damage and protection.* Front Cell Neurosci, 2014. **8**: p. 319.
  26. Gelderblom, M., et al., *Temporal and spatial dynamics of cerebral immune cell accumulation in stroke.* Stroke, 2009. **40**(5): p. 1849-1857.
  27. Iadecola, C. and J. Anrather, *The immunology of stroke: from mechanisms to translation.* Nat Med, 2011. **17**(7): p. 796-808.
  28. del Zoppo, G.J., *Virchow's triad: the vascular basis of cerebral injury.* Rev Neurol Dis, 2008. **5 Suppl 1**: p. S12-21.
  29. del Zoppo, G.J., Y. Izawa, and B.T. Hawkins, *Hemostasis and alterations of the central nervous system.* Semin Thromb Hemost, 2013. **39**(8): p. 856-75.
  30. del Zoppo, G.J. and T. Mabuchi, *Cerebral microvessel responses to focal ischemia.* J Cereb Blood Flow Metab, 2003. **23**(8): p. 879-94.
  31. Nieswandt, B., C. Kleinschnitz, and G. Stoll, *Ischaemic stroke: a thrombo-inflammatory disease?* J Physiol, 2011. **589**(Pt 17): p. 4115-23.
  32. Renné, T., et al., *In vivo roles of factor XII.* Blood, 2012. **120**(22): p. 4296-4303.

33. Björkqvist, J., A. Jämsä, and T. Renné, *Plasma kallikrein: the bradykinin-producing enzyme*. *Thromb Haemost*, 2013. **110**(3).
34. Pathak, M., et al., *Structure of plasma and tissue kallikreins*. *Thromb Haemost*, 2013. **109**(6).
35. Frey, E.K. and H. Kraut, *Über einen von der Niere ausgeschiedenen, die Herztätigkeit anregenden Stoff*. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie*, 1926. **157**(1-3): p. 32-61.
36. Kraut, H., E. Frey, and E. Bauer, *Über ein neues Kreislaufhormon. II. Mitteilung*. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie*, 1928. **175**(3-4): p. 97-114.
37. Frey, E.K. and H. Kraut, *Ein neues Kreislaufhormon und seine Wirkung*. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 1928. **133**(1): p. 1-56.
38. Kraut, H., E. Frey, and E. Werle, *Der Nachweis eines Kreislaufhormons in der Pankreasdrüse. (IV. Mitteilung über dieses Kreislaufhormon.)*. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie*, 1930. **189**(3-4): p. 97-106.
39. Frey, E., H. Kraut, and F. Schultz, *Über eine neue innersekretorische Funktion des Pankreas*. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 1930. **158**(1): p. 334-347.
40. Werle, E., W. Götze, and A. Keppler, *Über die Wirkung des Kallikreins auf den isolierten Darm und über eine neue darmkontrahierende Substanz*. *Biochem Z*, 1937. **289**: p. 217-233.
41. Werle, E. and U. Berek, *Zur Kenntnis des Kallikreins*. *Angew. Chem. A*, 1948. **60**: p. 53.
42. ROCHA E SILVA, M., W.T. BERALDO, and G. ROSENFELD, *Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor released from plasma globulin by snake venoms and by trypsin*. *Am J Physiol*, 1949. **156**(2): p. 261-73.
43. Albert-Weissenberger, C., A.L. Siren, and C. Kleinschnitz, *Ischemic stroke and traumatic brain injury: the role of the kallikrein-kinin system*. *Prog Neurobiol*, 2013. **101-102**: p. 65-82.
44. Passos, G.F., et al., *Kinin B1 receptor up-regulation after lipopolysaccharide administration: role of proinflammatory cytokines and neutrophil influx*. *The Journal of Immunology*, 2004. **172**(3): p. 1839-1847.
45. Regoli, D., et al., *B1 and B2 kinin receptors in various species*. *Immunopharmacology*, 1997. **36**(2-3): p. 143-147.
46. Kamiya, T., et al., *The role of bradykinin in mediating ischemic brain edema in rats*. *Stroke*, 1993. **24**(4): p. 571-5; discussion 575-6.
47. Relton, J.K., et al., *CP-0597, a Selective Bradykinin B2 Receptor Antagonist, Inhibits Brain Injury in a Rat Model of Reversible Middle Cerebral Artery Occlusion*. *Stroke*, 1997. **28**(7): p. 1430-1436.
48. Zausinger, S., et al., *Effects of LF 16-0687 Ms, a bradykinin B2 receptor antagonist, on brain edema formation and tissue damage in a rat model*

- of temporary focal cerebral ischemia*. Brain research, 2002. **950**(1): p. 268-278.
49. Gröger, M., et al., *Release of bradykinin and expression of kinin B2 receptors in the brain: role for cell death and brain edema formation after focal cerebral ischemia in mice*. Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism, 2005. **25**(8): p. 978-989.
  50. Austinat, M., et al., *Blockade of bradykinin receptor B1 but not bradykinin receptor B2 provides protection from cerebral infarction and brain edema*. Stroke, 2009. **40**(1): p. 285-93.
  51. Langhauser, F., et al., *Kininogen deficiency protects from ischemic neurodegeneration in mice by reducing thrombosis, blood-brain barrier damage, and inflammation*. Blood, 2012. **120**(19): p. 4082-92.
  52. Kleinschnitz, C., et al., *Targeting coagulation factor XII provides protection from pathological thrombosis in cerebral ischemia without interfering with hemostasis*. J Exp Med, 2006. **203**(3): p. 513-8.
  53. Hagedorn, I., et al., *Factor XIIa inhibitor recombinant human albumin Infestin-4 abolishes occlusive arterial thrombus formation without affecting bleeding*. Circulation, 2010. **121**(13): p. 1510-7.
  54. Heydenreich, N., et al., *C1-inhibitor protects from brain ischemia-reperfusion injury by combined antiinflammatory and antithrombotic mechanisms*. Stroke, 2012. **43**(9): p. 2457-67.
  55. Renne, T., et al., *Factor XI deficiency in animal models*. J Thromb Haemost, 2009. **7 Suppl 1**: p. 79-83.
  56. Hathaway, W.E., L.P. Belhasen, and H.S. Hathaway, *Evidence for a new plasma thromboplastin factor. I. Case report, coagulation studies and physicochemical properties*. Blood, 1965. **26**(5): p. 521-32.
  57. Girolami, A., et al., *Congenital prekallikrein deficiency*. Expert Rev Hematol, 2010. **3**(6): p. 685-95.
  58. Girolami, A., et al., *Thrombotic events in patients with congenital prekallikrein deficiency: a critical evaluation of all reported cases*. Acta Haematol, 2010. **123**(4): p. 210-4.
  59. Liu, J., et al., *Hyperglycemia-induced cerebral hematoma expansion is mediated by plasma kallikrein*. Nat Med, 2011. **17**(2): p. 206-10.
  60. Bird, J.E., et al., *Effects of plasma kallikrein deficiency on haemostasis and thrombosis in mice: murine ortholog of the Fletcher trait*. Thromb Haemost, 2012. **107**(6): p. 1141-50.
  61. Gob, E., et al., *Blocking of plasma kallikrein ameliorates stroke by reducing thromboinflammation*. Ann Neurol, 2015. **77**(5): p. 784-803.
  62. Bederson, J.B., et al., *Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination*. Stroke, 1986. **17**(3): p. 472-476.
  63. Moran, P.M., et al., *Age-related learning deficits in transgenic mice expressing the 751-amino acid isoform of human beta-amyloid precursor protein*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1995. **92**(12): p. 5341-5345.

64. Winer, J., et al., *Development and Validation of Real-Time Quantitative Reverse Transcriptase–Polymerase Chain Reaction for Monitoring Gene Expression in Cardiac Myocytes in Vitro*. *Analytical biochemistry*, 1999. **270**(1): p. 41-49.
65. Schuhmann, M.K., et al., *CD28 superagonist-mediated boost of regulatory T cells increases thrombo-inflammation and ischemic neurodegeneration during the acute phase of experimental stroke*. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 2014.
66. Schmaier, A.H., *Physiologic activities of the contact activation system*. *Thrombosis research*, 2014. **133**: p. S41-S44.
67. Roy-O'Reilly, M. and L.D. McCullough, *Sex differences in stroke: the contribution of coagulation*. *Experimental neurology*, 2014.
68. Revenko, A.S., et al., *Selective depletion of plasma prekallikrein or coagulation factor XII inhibits thrombosis in mice without increased risk of bleeding*. *Blood*, 2011. **118**(19): p. 5302-11.
69. Magnus, T., H. Wiendl, and C. Kleinschnitz, *Immune mechanisms of stroke*. *Curr Opin Neurol*, 2012. **25**(3): p. 334-40.
70. Ten, V.S., et al., *Complement component c1q mediates mitochondria-driven oxidative stress in neonatal hypoxic–ischemic brain injury*. *The Journal of Neuroscience*, 2010. **30**(6): p. 2077-2087.
71. Wagner, S., et al., *Activation of the tissue kallikrein-kinin system in stroke*. *J Neurol Sci*, 2002. **202**(1-2): p. 75-6.
72. Siegerink, B., et al., *Intrinsic coagulation activation and the risk of arterial thrombosis in young women: results from the Risk of Arterial Thrombosis in relation to Oral contraceptives (RATIO) case-control study*. *Circulation*, 2010. **122**(18): p. 1854-61.
73. Lagneux, C., et al., *Detrimental implication of B1 receptors in myocardial ischemia: evidence from pharmacological blockade and gene knockout mice*. *Int Immunopharmacol*, 2002. **2**(6): p. 815-22.
74. Souza, D.G., et al., *Role of bradykinin B2 and B1 receptors in the local, remote, and systemic inflammatory responses that follow intestinal ischemia and reperfusion injury*. *J Immunol*, 2004. **172**(4): p. 2542-8.
75. Wang, P.H., et al., *Influence of bradykinin B1 and B2 receptors in the immune response triggered by renal ischemia-reperfusion injury*. *Int Immunopharmacol*, 2006. **6**(13-14): p. 1960-5.
76. White, B.C., et al., *Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury*. *J Neurol Sci*, 2000. **179**(S 1-2): p. 1-33.
77. Rha, J.H. and J.L. Saver, *The impact of recanalization on ischemic stroke outcome: a meta-analysis*. *Stroke*, 2007. **38**(3): p. 967-73.
78. Neumann-Haefelin, T., et al., *Effect of incomplete (spontaneous and postthrombolytic) recanalization after middle cerebral artery occlusion: a magnetic resonance imaging study*. *Stroke*, 2004. **35**(1): p. 109-14.
79. Zanette, E.M., et al., *Spontaneous middle cerebral artery reperfusion in ischemic stroke. A follow-up study with transcranial Doppler*. *Stroke*, 1995. **26**(3): p. 430-3.

80. Gelderblom, M., et al., *Danger signals in stroke*. Ageing Res Rev, 2015. **24**(Pt A): p. 77-82.
81. Dirnagl, U., C. Iadecola, and M.A. Moskowitz, *Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view*. Trends Neurosci, 1999. **22**(9): p. 391-7.
82. Allan, S.M., P.J. Tyrrell, and N.J. Rothwell, *Interleukin-1 and neuronal injury*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(8): p. 629-40.
83. Yang, G.Y., et al., *Attenuation of temporary focal cerebral ischemic injury in the mouse following transfection with interleukin-1 receptor antagonist*. Brain Res Mol Brain Res, 1999. **72**(2): p. 129-37.
84. Banwell, V., E.S. Sena, and M.R. Macleod, *Systematic Review and Stratified Meta-analysis of the Efficacy of Interleukin-1 Receptor Antagonist in Animal Models of Stroke*. Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases, 2009. **18**(4): p. 269-276.
85. Parry-Jones, A., et al., *Interleukin-1 receptor antagonist in animal models of stroke: a fair summing up?*, in *J Stroke Cerebrovasc Dis*. 2010: United States. p. 512-3.
86. Gross, C.E., et al., *Transforming growth factor-beta 1 reduces infarct size after experimental cerebral ischemia in a rabbit model*. Stroke, 1993. **24**(4): p. 558-62.
87. Dirnagl, U., et al., *Stroke-induced immunodepression: experimental evidence and clinical relevance*. Stroke, 2007. **38**(2 Suppl): p. 770-3.
88. Kleinschnitz, C., et al., *Targeting platelets in acute experimental stroke: impact of glycoprotein Ib, VI, and IIb/IIIa blockade on infarct size, functional outcome, and intracranial bleeding*. Circulation, 2007. **115**(17): p. 2323-30.
89. Kleinschnitz, C., et al., *Deficiency of von Willebrand factor protects mice from ischemic stroke*. Blood, 2009. **113**(15): p. 3600-3603.
90. Stoll, G., C. Kleinschnitz, and B. Nieswandt, *The role of glycoprotein Ibalpha and von Willebrand factor interaction in stroke development*. Hamostaseologie, 2010. **30**(3): p. 136.
91. Kraft, P., S.F. De Meyer, and C. Kleinschnitz, *Next-generation antithrombotics in ischemic stroke: preclinical perspective on 'bleeding-free antithrombosis'*. J Cereb Blood Flow Metab, 2012. **32**(10): p. 1831-40.
92. Acar, K., et al., *Isolated prolonged activated partial thromboplastin time in an asymptomatic patient: Fletcher factor deficiency*, in *Thromb Res*. 2006: United States. p. 765-6.
93. Qian, Y., et al., *Molecular mechanism underlines heparin-induced thrombocytopenia and thrombosis*. Prog Mol Biol Transl Sci, 2010. **93**: p. 395-421.
94. Abdallah, R.T., et al., *Plasma kallikrein promotes epidermal growth factor receptor transactivation and signaling in vascular smooth muscle through direct activation of protease-activated receptors*. J Biol Chem, 2010. **285**(45): p. 35206-15.
95. Scott, J.F., et al., *Prevalence of admission hyperglycaemia across clinical subtypes of acute stroke*. Lancet, 1999. **353**(9150): p. 376-7.

96. Alvarez-Sabin, J., et al., *Factors influencing haemorrhagic transformation in ischaemic stroke*. *Lancet Neurol*, 2013. **12**(7): p. 689-705.
97. Bruno, A., et al., *Admission glucose level and clinical outcomes in the NINDS rt-PA Stroke Trial*. *Neurology*, 2002. **59**(5): p. 669-74.
98. Portelli, M.A., et al., *Genome-wide protein QTL mapping identifies human plasma kallikrein as a post-translational regulator of serum uPAR levels*. *Faseb j*, 2014. **28**(2): p. 923-34.
99. Gesuete, R., et al., *Recombinant C1 inhibitor in brain ischemic injury*. *Ann Neurol*, 2009. **66**(3): p. 332-42.
100. Storini, C., et al., *Selective inhibition of plasma kallikrein protects brain from reperfusion injury*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2006. **318**(2): p. 849-54.
101. Dirnagl, U. and M.R. Macleod, *Stroke research at a road block: the streets from adversity should be paved with meta-analysis and good laboratory practice*. *British journal of pharmacology*, 2009. **157**(7): p. 1154-1156.

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Pathophysiologische Vorgänge beim Schlaganfall, modifiziert nach Endres .....	4
Abbildung 2: Generierung aktiven Plasmakallikreins ( $\alpha$ -PK <sub>a</sub> ) aus seiner Vorstufe Plasmaprekallikrein (pre-PK) durch Spaltung durch den aktivierten Blutgerinnungsfaktor XII (FXII <sub>a</sub> ) in eine schwere (HC) und eine leichte Kette (LC), modifiziert nach Björkqvist [33].....	6
Abbildung 3: Modelldarstellung aktiven Plasmakallikreins mit katalytischem Zentrum (katalytische Triade aus Serin in Position 195 (S195), Aspartat in Position 102 (D102) und Histidin in Position 57 (H57)), nach Pathak [34] .....	7
Abbildung 4: Signalwege, an denen Plasmakallikrein beteiligt ist, modifiziert nach Björkqvist [33] .....	8
Abbildung 5: Das Kallikrein-Kinin-System [43] .....	9
Abbildung 6: Das Kallikrein-Kinin-System beim ischämischen Schlaganfall .....	10
Abbildung 7: Die intrinsische Gerinnungskaskade beim ischämischen Schlaganfall. Ausgangspunkt ist der von Kallikrein aktivierte FXII, der wiederum FXI aktiviert, und dieser dann FIX. Schließlich kommt es über die Aktivierung weiterer Faktoren (nicht gezeigt) zur Thrombenbildung. ....	12
Abbildung 8: (A) Höherer Fluss über der Arteria carotis communis nach arterieller Verletzung mit anschließender Thrombose bei PK-defizienten Mäusen (Dreiecke) im Vergleich zu heterozygoten (Rechtecke) und wildtypischen Mäusen (Rauten). (B) Geringeres Thrombusgewicht nach venöser Thrombose in PK-defizienten (KO) Mäusen im Vergleich zu wildtypischen (WT) und heterozygoten (Het). [60] .....	15
Abbildung 9: OP-Situs, Bild von Dr. Friederike Langhauser .....	18
Abbildung 10: schematische Darstellung des Circulus arteriosus willisii mit Verschluss des Abgangs der ACM durch Faden (schwarz, Pfeil).....	19
Abbildung 11: cDNA-Sequenz von Plasmakallikrein, Erklärung siehe Text.....	28

Abbildung 12: Aktivierung des Kontakt-Kinin-Systems durch ischämischen Schlaganfall. (A) Western-Blots aus Cortices (oben) und Basalganglien (unten) von C57BL/6 Mäusen nach 60-minütiger tMCAO oder scheinoperierten Mäusen mit einem Antikörper gegen pre-PK und aktives PK. Die Western-Blots von jeweils drei verschiedenen Tieren wurden unabhängig voneinander wiederholt, als Ladekontrolle diente  $\beta$ -Aktin. Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel. i, ipsiläsionale(r); c, contraläsionale(r) Cortex or Basalganglien. (B) Bestimmung der Bradykininspiegel im Plasma in scheinoperierten C57BL/6 Mäusen und Mäusen an Tag 1 nach 60-minütiger tMCAO durch Enzymimmunoassay (n = 5). \* p < 0.05; unabhängiger Zweistichproben-t-Test, Vergleich mit Kontrollmäusen. Aus Göb, Reymann et al., 2015. doi: 10.1002/ana.24380 .....43

Abbildung 13: Plasmakallikrein-Defizienz schützt vor transienter und permanenter zerebraler Ischämie. (oben) Repräsentative TTC-Färbung dreier korrespondierender koronarer Gehirnschnitte einer 6 Wochen alten männlichen  $PK^{+/+}$  Maus, einer 6 Wochen alten männlichen  $PK^{-/-}$  Maus, einer 6 Wochen alten männlichen mit hPK rekonstituierten  $PK^{-/-}$  Maus, einer 6 Wochen alten mit BK rekonstituierten  $PK^{-/-}$  Maus, einer 6 Wochen alten weiblichen  $PK^{+/+}$  Maus und einer 6 Wochen alten weiblichen  $PK^{-/-}$  Maus (von links nach rechts) an Tag 1 nach tMCAO sowie einer 6 Wochen alten männlichen  $PK^{+/+}$  Maus und einer 6 Wochen alten männlichen  $PK^{-/-}$  Maus an Tag 1 nach pMCAO. Die infarzierten Areale (weiß) sind unabhängig von Geschlecht oder Reperfusion am kleinsten in den  $PK^{-/-}$  Mäusen, dies konnte durch Infarktmetrie bestätigt werden (unten) (n = 8-14). \*\*\* p < 0,001, n.s., nicht signifikant; einfaktorielle Varianzanalyse mit nachfolgendem Bonferroni-Mehrfachvergleichstest, Vergleich mit Kontrollen ( $PK^{+/+}$  oder  $PK^{-/-}$  Mäuse). Aus Göb, Reymann et al., 2015. doi: 10.1002/ana.24380 .....45

Abbildung 14: Neurologischer Bederson Score (oben) und Grip Test Score (unten) an Tag 1 nach 60-minütiger tMCAO oder pMCAO in den oben gezeigten acht Maus-Gruppen (n = 8-14). \* p < 0,05; Kruskal-Wallis-Test mit nachfolgendem Dunn-Mehrfachvergleichstest, Vergleich mit Kontrollen ( $PK^{+/+}$  oder  $PK^{-/-}$  Mäuse). Aus Göb, Reymann et al., 2015. doi: 10.1002/ana.24380 ...46

Abbildung 15: Die Blockade von Plasmakallikrein vermindert die Aktivierung des Kontakt-Kinin-Systems nach tMCAO. (A) Western-Blots aus ipsi- und contraläsionalen Cortices oder Basalganglien von  $Pk^{+/+}$  Mäusen,  $Pk^{-/-}$  Mäusen, und von mit hPK rekonstituierten  $Pk^{-/-}$  Mäusen (+hPK) am Tag 1 nach tMCAO mit einem Antikörper gegen KNG. Die Immunoreaktivität gegen natives KNG war in den ischämischen Gehirnen von  $Pk^{+/+}$  Mäusen und mit hPK rekonstituierten  $Pk^{-/-}$  Mäusen herunterreguliert, aber in  $Pk^{-/-}$  Mäusen erhalten. Entsprechend war gespaltenes KNG, das entsteht, wenn natives KNG von PK umgesetzt wird, in den infarzierten Geweben PK-defizienter Mäuse nur schwach nachweisbar. Im Gegensatz dazu wiesen  $Pk^{+/+}$  Mäuse und mit hPK rekonstituierte  $Pk^{-/-}$  Mäuse hohe Proteinspiegel von gespaltenem KNG in den ischämischen Gehirnbereichen auf. (B) Western-Blots aus ipsi- und contraläsionalen Cortices und Basalganglien von  $Pk^{-/-}$  Mäusen und mit hPK rekonstituierten  $Pk^{-/-}$  Mäusen an Tag 1 nach tMCAO mit einem gegen pre-PK und aktives PK gerichteten Antikörper. Sowohl pre-PK als auch PK waren in naïven  $Pk^{-/-}$  Mäusen nicht nachweisbar, hingegen konnten sie in den Gehirnen der mit hPK rekonstituierten Mäusen wieder detektiert werden. Die Gehirnproben wurden an Tag 1 nach tMCAO entnommen. Die Western-Blots von jeweils drei verschiedenen Tieren wurden unabhängig voneinander wiederholt. Ladekontrolle mit  $\beta$ -Aktin. Ein repräsentatives Beispiel pro Versuch ist abgebildet. ci, ipsiläsionaler Cortex; cc, contraläsionaler Cortex; bi, ipsiläsionale Basalganglien; bc, contraläsionale Basalganglien. Aus Göb, Reymann et al., 2015. doi: 10.1002/ana.24380 .....47

Abbildung 16: Plasmakallikrein-Defizienz führt zu anhaltender Neuroprotektion und steigert die Überlebensrate nach akutem ischämischem Schlaganfall. (A) Überlebenskurve 6-8 Wochen alter männlicher  $Pk^{-/-}$  Mäuse und  $Pk^{+/+}$  Mäuse von Tag 1 bis 7 nach tMCAO (n = 13-14/Gruppe). \* p = 0,037; Log-Rang-Test. (B) Neurologische Funktionen im Zeitverlauf von Tag 1 bis 7 nach tMCAO, gemessen an Hand des Bederson Scores in 6-8 Wochen alten männlichen  $Pk^{-/-}$  Mäusen oder  $Pk^{+/+}$  Mäusen (n = 13-14/Gruppe). \* p < 0,05, \*\* p < 0,01; zweifaktorielle Varianzanalyse mit nachfolgendem Bonferroni-

Mehrfachvergleichstest, Vergleich mit  $Pk^{+/+}$  Mäusen. Aus Göb, Reymann et al., 2015. doi: 10.1002/ana.24380..... 50

Abbildung 17: Plasmakallikrein-Defizienz verringert die intrazerebrale Thrombose (A, oben) Die Thrombenbildung in den ipsiläsionalen und contraläsionalen Cortices und Basalganglien von scheinoperierten Mäusen,  $Pk^{+/+}$  Mäusen,  $Pk^{-/-}$  Mäusen und mit hPK rekonstituierten  $Pk^{-/-}$  Mäusen wurde 24 h nach tMCAO im Western Blot mit dem Thrombozytenmarker anti-GPIIb $\beta$  untersucht. Ein repräsentativer Western Blot ist gezeigt. (A, unten)

Densitometrische Quantifizierung (n = 5). \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, n.s., nicht signifikant; einfaktorielle Varianzanalyse mit nachfolgendem Bonferroni-

Mehrfachvergleichstest, Vergleich mit  $Pk^{+/+}$  Mäusen. AU, arbitrary units, willkürliche Einheiten; ci, ipsiläsionaler Cortex; cc contraläsionaler Cortex; bi, ipsiläsionale Basalganglien; bc, contraläsionale Basalganglien. (B)

Immunhistochemische Darstellung der Thrombozyten (anti-GPIX, grün) im Lumen zerebraler Mikrogefäße (dargestellt sind Endothelzellen mit anti-CD31, rot) 24 h nach tMCAO. Hoechst-Färbung (blau) der DNA. Ein repräsentativer Ausschnitt von 3 unabhängigen Experimenten pro Gruppe ist gezeigt. Balken = 20  $\mu$ m. Aus Göb, Reymann et al., 2015. doi: 10.1002/ana.24380 ..... 52

Abbildung 18: Plasmakallikrein-Defizienz verringert die intrazerebrale Thrombose. (oben) Thrombose-Index (links) und Kalkulation des Prozentsatzes verschlossener Gefäße innerhalb der infarzierten Cortices (Mitte) und Basalganglien (rechts) von  $Pk^{+/+}$  Mäusen,  $Pk^{-/-}$  Mäusen und mit hPK rekonstituierten  $Pk^{-/-}$  Mäusen an Tag 1 nach tMCAO (n = 5). \* p < 0,05, \*\*\* p <

0,001, n.s., nicht signifikant; einfaktorielle Varianzanalyse mit nachfolgendem Bonferroni-Mehrfachvergleichstest, Vergleich mit  $Pk^{+/+}$  Mäusen. (unten)

Repräsentative H&E-Färbung thrombosierter Gefäße (Pfeile) der 3 darüber abgebildeten Mausgruppen. Die Pfeilspitzen zeigen auf offene Gefäße, die Pfeile auf verschlossene Gefäße. Balken = 100  $\mu$ m. Aus Göb, Reymann et al., 2015. doi: 10.1002/ana.24380..... 53

Abbildung 19: Plasmakallikrein-Defizienz verbessert den zerebralen Blutfluss nach Schlaganfall. Erhöhter zerebraler Blutfluss im Versorgungsgebiet der ACM

in  $Pk^{-/-}$  Mäusen 12 h und 24 h nach Reperfusion, Vergleich mit  $Pk^{+/+}$  Mäusen und mit hPK rekonstituierten  $Pk^{-/-}$  Mäusen (n = 4). \* p < 0,05, \*\*\* p und ### p < 0,001; zweifaktorielle Varianzanalyse mit nachfolgendem Bonferroni-Mehrfachvergleichstest, Vergleich mit Kontrollen ( $Pk^{+/+}$  Mäuse (\*\*\*) oder  $Pk^{-/-}$  Mäuse (+hPK) (###)). Aus Göb, Reymann et al., 2015. doi: 10.1002/ana.24380 .....54

Abbildung 20: Plasmakallikrein-Defizienz verringert die Schlaganfallgröße, ohne das Risiko intrazerebraler Blutungen zu erhöhen. (A) Serielle koronare T2-gewichtete Gradienten-Echo-MR-Bilder zeigen ausgedehnte hyperintense (helle) ischämische Läsionen (weiße Pfeile) in  $Pk^{+/+}$  Mäusen an Tag 1 und Tag 7 nach tMCAO, wohingegen die Infarkte in den  $Pk^{-/-}$  Mäusen weitgehend auf die Basalganglien begrenzt bleiben. Eine repräsentative Bilderserie pro Gruppe ist gezeigt. (B) MR-basierte Infarktvolumetrie (n = 3-8). \* p < 0,05, n.s., nicht signifikant; zweifaktorielle Varianzanalyse mit nachfolgendem Bonferroni-Mehrfachvergleichstest, Vergleich mit Kontrollen ( $Pk^{+/+}$  Mäuse; Tag 1 vs. Tag 7). Aus Göb, Reymann et al., 2015. doi: 10.1002/ana.24380 .....55

Abbildung 21: Plasmakallikrein-Defizienz stabilisiert die Blut-Hirn-Schranke und verringert die Ödembildung nach tMCAO. (links) Repräsentative koronare Gehirnschnitte einer  $Pk^{+/+}$  Maus, einer  $Pk^{-/-}$  Maus und einer mit hPK rekonstituierten Maus an Tag 1 nach tMCAO nach Injektion der vaskulären Tracersubstanz Evan's Blue. (rechts) Photometrische Messungen der Evan's-Blue-Konzentration im Gehirnparenchym (n = 8). \* p < 0,05, n.s., nicht signifikant; einfaktorielle Varianzanalyse mit nachfolgendem Bonferroni-Mehrfachvergleichstest, Vergleich mit  $Pk^{+/+}$  Mäusen. Aus Göb, Reymann et al., 2015. doi: 10.1002/ana.24380.....58

Abbildung 22: Plasmakallikrein-Defizienz stabilisiert die Blut-Hirn-Schranke und verringert die Ödembildung nach tMCAO. (A, oben) Nachweis von Occludin in den ipsiläsionalen und contraläsionalen Cortices (ci or cc) oder den Basalganglien (bi or bc) von  $Pk^{+/+}$  Mäusen,  $Pk^{-/-}$  Mäusen und mit hPK rekonstituierten  $Pk^{-/-}$  Mäusen an Tag 1 nach tMCAO oder Scheinoperation mittels Western Blot. Ein repräsentativer Western Blot ist gezeigt. (A, unten)

Densitometrische Quantifizierung (n = 5). \* p < 0,05, \*\*\* p < 0,001, n.s., nicht signifikant; einfaktorielle Varianzanalyse mit nachfolgendem Bonferroni-Mehrfachvergleichstest, Vergleich mit *Pk<sup>+/+</sup>* Mäusen. (B) Immunhistochemische Färbungen bestätigten, dass die Integrität der Tight-Junctions (anti-Occludin, grün) zwischen den zerebralen Endothelzellen (anti-CD31, rot) in *Pk<sup>+/+</sup>* Mäusen im Vergleich zu *Pk<sup>-/-</sup>* Mäusen an Tag 1 nach tMCAO deutlich reduziert war. Hoechst-Färbung (blau) der DNA. Ein repräsentativer Ausschnitt von 3 unabhängigen Experimenten pro Gruppe ist gezeigt. Balken = 20 µm. Aus Göb, Reymann et al., 2015. doi: 10.1002/ana.24380 ..... 59

Abbildung 23: Plasmakallikrein-Defizienz schwächt die Inflammationsreaktion nach tMCAO ab. (A) Repräsentative immunhistochemische Färbung gegen CD11b+ Makrophagen/Mikroglia in der ischämischen Hemisphäre von *Pk<sup>+/+</sup>* Mäusen, *Pk<sup>-/-</sup>* Mäusen und mit hPK rekonstituierten *Pk<sup>-/-</sup>* Mäusen. Balken = 100 µm. (B) Quantifizierung von CD11b+ Zellen/mm<sup>2</sup> in den infarzierten Cortices oder Basalganglien an Tag 1 nach tMCAO (n = 5). \* p < 0,05, n.s., nicht signifikant; einfaktorielle Varianzanalyse mit nachfolgendem Bonferroni-Mehrfachvergleichstest, Vergleich mit *Pk<sup>+/+</sup>* Mäusen. Aus Göb, Reymann et al., 2015. doi: 10.1002/ana.24380 ..... 61

Abbildung 24: Plasmakallikrein-Defizienz schwächt die Inflammationsreaktion nach tMCAO ab. (A) Repräsentative immunhistochemische Färbung gegen Ly-6B.2+ Neutrophile in der ischämischen Hemisphäre von *Pk<sup>+/+</sup>* Mäusen, *Pk<sup>-/-</sup>* Mäusen und mit hPK rekonstituierten *Pk<sup>-/-</sup>* Mäusen. Balken = 100µm. (B) Quantifizierung von Ly-6B.2+ Zellen/mm<sup>2</sup> in den infarzierten Cortices oder Basalganglien an Tag 1 nach tMCAO (n = 5). \* p < 0,05, n.s., nicht signifikant; einfaktorielle Varianzanalyse mit nachfolgendem Bonferroni-Mehrfachvergleichstest, Vergleich mit *Pk<sup>+/+</sup>* Mäusen. Aus Göb, Reymann et al., 2015. doi: 10.1002/ana.24380 ..... 62

Abbildung 25: Plasmakallikrein-Defizienz schwächt die Inflammationsreaktion nach tMCAO ab. Relative Genexpression von Interleukin-1β (Il-1β), Tumor Nekrose Faktor alpha (TNF-α), und Transforming Growth Faktor beta-1 (TGF-β1) in den ischämischen Cortices (oben) und Basalganglien (unten) von *Pk<sup>+/+</sup>*

Mäusen,  $Pk^{-/-}$  Mäusen und mit hPK rekonstituierten  $Pk^{-/-}$  24 h nach tMCAO oder Scheinoperation (n = 4). \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, n.s., nicht signifikant; einfaktorielle Varianzanalyse mit nachfolgendem Bonferroni-Mehrfachvergleichstest, Vergleich mit Kontrollen ( $Pk^{+/+}$  Mäusen oder  $Pk^{-/-}$  Mäusen). Aus Göb, Reymann et al., 2015. doi: 10.1002/ana.24380 ..... 63

Abbildung 26: Die pharmakologische Blockade von Plasmakallikrein verbessert das Schlaganfall-Outcome in einem klinisch relevanten Setting. (A, oben) Repräsentative TTC-Färbung von drei korrespondierenden koronaren Gehirnschnitten von einer 6 Wochen alten männlichen C57BL/6 Maus nach Behandlung mit 10 µg Kontroll-IgG, einer 6 Wochen alten männlichen Maus nach Behandlung mit 10 µg eines gegen PK gerichteten Antikörpers ( $\alpha$ -PK) 1 h nach Schlaganfallinduktion und einer 6 Wochen alten männlichen  $Pk^{-/-}$  Maus nach Behandlung mit 10 µg  $\alpha$ -PK 1 h nach Schlaganfallinduktion. Die Gehirne wurden an Tag 1 nach tMCAO entnommen. (A, unten) Infarktgrößen an Tag 1 nach tMCAO (n = 8-10). \*\*\* p < 0,001, n.s. nicht signifikant; einfaktorielle Varianzanalyse mit nachfolgendem Bonferroni-Mehrfachvergleichstest, Vergleich mit Kontrollen (C57BL/6 nach Behandlung mit IgG oder  $\alpha$ -PK). (B) Neurologischer Bederson Score (oben) und Grip Test Score (unten) an Tag 1 nach tMCAO in den drei darüber abgebildeten Mausgruppen (n = 8-10). \* p < 0,05, \*\* p < 0,01; Kruskal-Wallis-Test mit nachfolgendem Dunn-Mehrfachvergleichstest, Vergleich mit Kontrollen (C57BL/6 Mäuse nach Behandlung mit IgG oder  $\alpha$ -PK). Aus Göb, Reymann et al., 2015. doi: 10.1002/ana.24380 ..... 65

Abbildung 27: Die pharmakologische Blockade von Plasmakallikrein senkt die Mortalität nach Schlaganfall. Überlebenskurve 6 Wochen alter männlicher C57BL/6 Mäuse nach Behandlung mit 10 µg Kontroll-IgG oder 10 µg  $\alpha$ -PK 1 h nach Schlaganfallinduktion (n = 13/Gruppe). \* p = 0,048; Log-Rang-Test. Aus Göb, Reymann et al., 2015. doi: 10.1002/ana.24380 ..... 66

Abbildung 28: Die pharmakologische Blockade von Plasmakallikrein verbessert nachhaltig das Schlaganfall-Outcome. (oben) Neurologischer Bederson Score (oben) und Grip Test Score (unten) im Zeitverlauf bei 6 Wochen alten

männlichen C57BL/6 Mäusen nach Behandlung mit 10 µg Kontroll-IgG oder 10 µg α-PK 1 h nach Schlaganfallinduktion (n = 13/Gruppe). \* p < 0,05, \*\* p < 0,01; zweifaktorielle Varianzanalyse mit nachfolgendem Bonferroni-

Mehrfachvergleichstest. Aus Göb, Reymann et al., 2015. doi:

10.1002/ana.24380 .....67

Abbildung 29: Die pharmakologische Blockade von Plasmakallikrein vermindert die Aktivierung des Kontakt-Kinin-Systems nach tMCAO. Western-Blot gegen KNG aus den ipsi- und contraläsionalen Cortices oder Basalganglien von C57BL/6 Mäusen, die 1 h nach Schlaganfallinduktion entweder mit Kontroll-IgG oder α-PK behandelt worden waren. Die Gehirnproben wurden an Tag 1 nach tMCAO entnommen. Passend zu den Ergebnissen in *PK<sup>-/-</sup>* Mäusen reduzierte die pharmakologische Blockade von PK in ähnlichem Ausmaß die Menge an gespaltenem KNG in den infarzierten Gehirnen. Die Western-Blots von jeweils drei verschiedenen Tieren wurden unabhängig voneinander wiederholt.

Ladekontrolle mit β-Aktin. Ein repräsentatives Beispiel pro Versuch ist abgebildet. ci, ipsiläsionaler Cortex; cc, contraläsionaler Cortex; bi, ipsiläsionale Basalganglien; bc, contraläsionale Basalganglien. Aus Göb, Reymann et al., 2015. doi: 10.1002/ana.24380.....68

Abbildung 30: Die pharmakologische Blockade von Plasmakallikrein verbessert das Schlaganfall-Outcome in einem klinisch relevantem Setting. (A, oben) Repräsentative TTC-Färbung von drei zueinander gehörenden koronaren Gehirnschnitten von einer 6 Wochen alten männlichen C57BL/6 Maus nach Behandlung mit 10 µg Kontroll-IgG und einer 6 Wochen alten männlichen C57BL/6 Maus nach Behandlung mit 10 µg α-PK 3 h nach Schlaganfallinduktion. Die Gehirne wurden an Tag 1 nach tMCAO entnommen. (A, unten) Infarktgrößen an Tag 1 nach tMCAO (n = 8-10). \*\*\* p < 0,001, n.s. nicht signifikant; einfaktorielle Varianzanalyse mit nachfolgendem Bonferroni-Mehrfachvergleichstest, Vergleich mit Kontrollen (C57BL/6 nach Behandlung mit IgG oder α-PK). (B) Neurologischer Bederson Score (oben) und Grip Test Score (unten) an Tag 1 nach tMCAO in den zwei daneben abgebildeten Mausgruppen (n = 8-10). \* p < 0,05, \*\* p < 0,01; Kruskal-Wallis-Test mit

nachfolgendem Dunn-Mehrfachvergleichstest, Vergleich mit Kontrollen (C57BL/6 Mäuse nach Behandlung mit IgG oder $\alpha$ -PK). Aus Göb, Reymann et al., 2015. doi: 10.1002/ana.24380 .....	69
Abbildung 31: Die pharmakologische Blockade von Plasmakallikrein reduziert die Thrombusbildung und die Schädigung der Blut-Hirn-Schranke. (A, oben) Thrombenbildung in den ipsiläsionalen und contraläsionalen Cortices und Basalganglien von scheinoperierten Mäusen, C57BL/6 Mäusen nach Behandlung mit 10 $\mu$ g Kontroll-IgG und C57BL/6 Mäusen nach Behandlung mit 10 $\mu$ g $\alpha$ -PK. Die Thrombusbildung wurde 24 h nach tMCAO mittels Western Blot gegen den Thrombozytenmarker anti-GPIIb $\beta$ untersucht. Ein repräsentativer Western Blot ist gezeigt. (A, unten) Densitometrische Quantifizierung (n = 5). *** p < 0,001; einfaktorielle Varianzanalyse mit nachfolgendem Bonferroni-Mehrfachvergleichstest, Vergleich mit Mäusen nach Behandlung mit IgG. (B, oben) Nachweis von Occludin in den ipsiläsionalen und contraläsionalen Cortices (ci or cc) oder Basalganglien (bi or bc) von scheinoperierten Mäusen, C57BL/6 Mäusen nach Behandlung mit 10 $\mu$ g Kontroll-IgG und C57BL/6 Mäusen nach Behandlung mit 10 $\mu$ g $\alpha$ -PK 24 h nach tMCAO mittels Western Blot. Ein repräsentativer Western Blot ist gezeigt. (B, unten) Densitometrische Quantifizierung (n = 5). ** p < 0.01; einfaktorielle Varianzanalyse mit nachfolgendem Bonferroni-Mehrfachvergleichstest, Vergleich mit Mäusen nach Behandlung mit IgG. AU, arbitrary units, willkürliche Einheiten; ci, ipsiläsionaler Cortex; cc contraläsionaler Cortex; bi, ipsiläsionale Basalganglien; bc, contraläsionale Basalganglien. Aus Göb, Reymann et al., 2015. doi: 10.1002/ana.24380 .....	70

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Primer für die quantitative Echtzeit-PCR.....	31
Tabelle 2: Verwendete Senkundärantikörper für den Western Blot .....	38
Tabelle 3: Bradykininspiegel im Plasma von $Pk^{+/+}$ Mäusen, $Pk^{-/-}$ Mäusen und von mit humanem Plasmakallikrein (hPK) rekonstituierten $Pk^{-/-}$ Mäusen.....	44
Tabelle 4: Hämostaseologische und physiologische Charakterisierung von $Pk^{+/+}$ Mäusen und $Pk^{-/-}$ Mäusen .....	56

Teile der Doktorarbeit sind bereits in die Publikation

Gob, Eva; Reymann, Stephan; Langhauser, Friederike; Schuhmann, Michael K; Kraft, Peter; Thielmann, Ina; Gobel, Kerstin; Brede, Marc; Homola, Gyorgy; Solymosi, Laszlo; Stoll, Guido; Geis, Christian; Meuth, Sven G; Nieswandt, Bernhard; Kleinschnitz, Christoph. *Blocking of plasma kallikrein ameliorates stroke by reducing thromboinflammation*. Ann Neurol, 2015. 77(5): p. 784-803. doi: 10.1002/ana.24380

eingeflossen.

## Danksagung

Hier möchte ich nun allen danken, die das Gelingen dieser Arbeit ermöglicht haben. Besonders danke ich

Herrn Prof. Dr. Christoph Kleinschnitz für das Angebot, in seiner Arbeitsgruppe zu promovieren, die Überlassung des spannenden Dissertationsthemas und die doktorväterliche Betreuung. Vielen Dank auch für die Möglichkeit und engagierte Unterstützung, an verschiedenen Kongressen teilzunehmen und Ergebnisse der Arbeit dort zu präsentieren.

Frau Dr. Eva Geuß für die Betreuung im Labor, bei der Auswertung und beim Schreiben der Arbeit. Vielen Dank für Deine Unterstützung und Dein immer offenes Ohr bei Fragen und Problemen aller Art.

Frau Dr. Friederike Langhauser, Herrn PD Dr. Peter Kraft, Frau Dr. Christiane Albert-Weißberger, Frau Dr. Stine Mencl und Herrn Dr. Michael Schuhmann für die Hilfsbereitschaft bei kleineren und größeren Fragen im Labor.

Herrn Prof. Dr. Guido Stoll für die Möglichkeit, in seinen Laboren zu arbeiten.

Andrea, Danny, Mellie, Sabrina, Babsi, Gaby und Susi, vielen Dank für Eure Unterstützung und schnelle Hilfe bei Fragen und Problemen rund um Färben, Schneiden, Scoren, Pipettieren und und und.

Frau Hauck für die Unterstützung bei bürokratischen Hürden.

Meinen Freunden für so manches aufbauende motivierende Wort.

Meinen Eltern und meinem Bruder Christoph: Ihr seid immer für mich da, vielen Dank für alles. Vielen Dank auch meinen Schwiegereltern Harald und Anne-Rose.

Und vor allem meiner Frau Margarethe. Immer wieder hast Du mich nach so manchem Rückschlag in Zusammenhang mit der Doktorarbeit in Deiner unnachahmlichen Art und Weise aufgebaut und mich zum Weitermachen motiviert. Vielen Dank.