

Aus dem Fachbereich Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

betreut am
Zentrum der Neurologie und Neurochirurgie
Klinik für Neurologie
Direktor: Prof. Dr. Helmuth Steinmetz

**Neuronale und gliale Proteine als diagnostische Marker zur
Differenzierung von Hirnblutung und Hirninfarkt**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von
David Malicek

aus Würzburg

Frankfurt am Main, 2019

Dekan:	Prof. Dr. Stefan Zeuzem
Referent:	Prof. Dr. Christian Förch
Korreferent:	Prof. Dr. Karlheinz Plate
Tag der mündlichen Prüfung:	09.06.2020

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	4
Abbildungsverzeichnis	6
Tabellenverzeichnis	7
Abkürzungsverzeichnis	8
1 Einleitung	12
1.1 Das Krankheitsbild „Schlaganfall“.....	12
1.1.1 Definition und epidemiologische Bedeutung.....	12
1.1.2 Subtypen, Ätiologie und Pathophysiologie.....	12
1.1.3 Akutdiagnostik und Akuttherapie.....	15
1.2 Biomarker zur Differenzierung zwischen ischämischen und hämorrhagischen Schlaganfall in der Frühphase.....	16
1.3 Hypothesengestützter und hypothesenfreier Ansatz der Identifizierung neuer Biomarker.....	17
1.4 Struktur und physiologische Funktion der in den ELISA-Tests untersuchten Proteine.....	20
1.4.1 Ubiquitin Carboxyl-terminal Hydrolase L1 (UCH-L1).....	20
1.4.2 Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP).....	21
1.4.3 Phosphorylated Neurofilament-heavy chain (pNf-H).....	21
1.4.4 Myelin Basic Protein (MBP).....	22
1.4.5 Tau.....	22
1.5 Eingesetzte Methoden.....	23
1.5.1 Die ELISA-Technik.....	23
1.5.2 Die Massenspektrometrie.....	23
1.6 Ziel der vorliegenden Arbeit.....	24
2 Materialien und Methoden	26
2.1 Patientenrekrutierung und Probenakquisition.....	26
2.2 Ein- und Ausschlusskriterien.....	26
2.3 Erhebung der klinischen Daten.....	27
2.4 Skalen, Klassifikationen und Formeln zur Erhebung der klinischen Daten.....	28
2.5 Negativkontrollen.....	28
2.6 Verwendete Geräte und Materialien.....	29
2.7 Enzyme Linked Immunosorbent Assays (ELISAs).....	30
2.8 Analyse der Serum-GFAP-Konzentration durch Roche®.....	33

2.9 Massenspektrometrie	33
2.9.1 Probenvorbereitung für die Massenspektrometrie	33
2.9.2 Flüssigchromatographie – Massenspektrometrie (LC-MS)	34
2.10 Statistische Verfahren und grafische Darstellung	34
3 Ergebnisse	37
3.1 Studienpopulation	37
3.2 Vergleich der Biomarkerkonzentrationen in Ischämie- und Blutungsgruppe	40
3.3 Weitere Analysen der UCH-L1- und GFAP-Serumkonzentrationen	44
3.4 Massenspektrometrische Ergebnisse	47
4 Diskussion	58
4.1 Serumkonzentrationen der mittels ELISA-Tests untersuchten Proteine	58
4.1.1 UCH-L1 und GFAP	58
4.1.2 pNf-H, MBP und Tau	60
4.2 UCH-L1- und GFAP-Konzentrationen und klinische Daten	63
4.3 Klinisch-diagnostische Bedeutung von UCH-L1	64
4.4 Massenspektrometrische Ergebnisse	65
4.5 Einschränkungen und Ausblick	83
5 Zusammenfassung	85
6 Abstract	87
7 Literaturverzeichnis	89
8 Anhang	108
9 Danksagung	131
10 Lebenslauf	132
11 Schriftliche Erklärung	133

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: pNf-H-Konzentrationen in der Ischämie- (IS) und Blutungsgruppe (ICH)

Abbildung 2: UCH-L1-Konzentrationen in der Ischämie- (IS) und Blutungsgruppe (ICH)

Abbildung 3: GFAP-Konzentrationen in der Ischämie- (IS) und Blutungsgruppe (ICH)

Abbildung 4: Korrelation mit klinischen Daten

Abbildung 5: Korrelation der Proteinwerte aus den MS-Proben

Abbildung 6: Pearson-Korrelationskoeffizienten zwischen den einzelnen Proben

Abbildung 7: Heatmap

Abbildung 8: Venn-Diagramm

Abbildung 9: Einzelne Proteine aus der Top-Liste mit den meisten Signifikanzunterschieden innerhalb der einzelnen Gruppen

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Material zur Blutentnahme und Geräte

Tabelle 2: ELISA-Kits

Tabelle 3: Software

Tabelle 4: Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 5: Massenspektrometrie

Tabelle 6: Charakteristika der ELISA-Studienpopulation

Tabelle 7: Probenzusammenstellung für die quantitative massenspektrometrische Proteinanalyse

Tabelle 8: Übersicht Proteinkonzentrationen

Tabelle 9: Signifikant unterschiedliche Proteine im Patientenkollektiv und der Kontrollgruppe

Tabelle 10: Signifikant unterschiedliche Proteine in der ICH-Gruppe und der Kontrollgruppe

Tabelle 11: Signifikant unterschiedliche Proteine in der IS-Gruppe und der Kontrollgruppe

Tabelle 12: Signifikant unterschiedliche Proteine in IS- und ICH-Gruppe

Tabelle 13: Top-Liste möglicher Kandidatenproteine

Abkürzungsverzeichnis

ACI	Arteria carotis interna
ACM	Arteria cerebri media
AGC	automatic gain control, automatische Verstärkerregelung
ALP	Actin-associated LIM protein
APCS	Serum Amyloid P Component
ATP	Adenosintriphosphat
B2M	β2-Mikroglobulin
BHS	Blut-Hirnschranke
bzw.	beziehungsweise
Ca ²⁺	Kalzium
CA1	Carboanhydrase 1
CAA	cerebrale Amyloidangiopathie
CBF	cerebraler Blutfluss
CD14	Cluster of differentiation 14-Protein
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CPN	Carboxypeptidase N
CRP	C-reaktives Protein
CT	Computertomographie
cm	Zentimeter
d	Tag
DNA	Deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
DUB	Deubiquitinase
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ERK3	Extracellular-signal Regulated Kinase 3
etc.	et cetera
ETD	Electron Transfer Dissociation
FDR	False Discovery Rate, Falscherkennungsrate
GdmCl	Guanidiniumchlorid
GFAP	Glial Fibrillary Acidic Protein, saures Gliafaserprotein

GP	Glycoprotein
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HDL	High-Density-Lipoprotein
HMWK	High-molecular weight kininogen
HRP	horseradish peroxidase, Meerrettichperoxidase
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
ICB	intracerebrale Blutung
ICH	intracerebral hemorrhage, intracerebrale Blutung
Ig	Immunglobulin
IgM	Immunglobulin M
IS	ischemic stroke, ischämischer Schlaganfall
ITIH3	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3
kDa	Kilo-Dalton
KHK	koronare Herzkrankheit
kV	Kilo-Volt
LBP	Lipopolysaccharide Binding Protein
LC	liquid chromatography, Flüssigchromatographie
LC-MS	Flüssigchromatographie–Massenspektrometrie
LDL	Low-Density-Lipoprotein
LFQ	label-free quantification, markierungsfreie Quantifizierung
LIM	LIM-Domäne, benannt nach den ersten Proteinen, in denen diese Domäne nachgewiesen wurde: <u>L</u> in11, <u>I</u> sl-1, <u>M</u> ec-3
LMNA	Lamin A
m	männlich
MAPT	Mikrotubuli-assoziiertes Protein Tau
MASP-1	Mannose-assoziierte Serin-Protease 1
MBL	Mannose-bindendes Lektin
MBL2	Mannose-bindendes Protein C
MBP	Myelin Basic Protein
MD2	myeloid differentiation factor 2

MHC-I	Major Histocompatibility Complex I, Haupthistokompatibilitätskomplex I
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mRNA	messenger ribonucleic acid, Boten-Ribonukleinsäure
MS	Massenspektrometer, Massenspektrometrie
ms	Millisekunde
MS/MS	Tandem-Massenspektrometrie
m/z-Quotient	Masse-zu-Ladungs-Verhältnis
NIHSS	National Institutes of Health Stroke Scale
n	Anzahl
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NQ	Asparagin/Glutamin
ns	nicht signifikant ($p > 0,05$)
NSE	Neuronenspezifische Enolase
n.d.	nicht durchgeführt
O ₂	Sauerstoff
OCSF	Oxfordshire Community Stroke Project
PACS	Partial Anterior Circulation Stroke
PAMPs	Pathogen-associated molecular patterns
PCA	Principal Component Analysis, Hauptkomponentenanalyse
PDLIM	PDZ and LIM Domain Proteine
PDZ	PDZ-Domäne, benannt nach den ersten Proteinen, in denen diese Domäne nachgewiesen wurde: <u>P</u> SD95, <u>D</u> iscs large, <u>Z</u> onula occludens-1
PF4	Plättchen-Faktor 4
pg	Pikogramm
pNf-H	Phosphorylated Neurofilament-heavy chain

POC	point of care
PON-1	Paraoxonase 1
PZP	Pregnancy Zone Protein
rpm	rounds per minute
rt-PA	recombinant tissue-type plasminogen activator, rekombinanter Gewebespezifischer Plasminogenaktivator
SAB	Subarachnoidalblutung
STEMO	Stroke-Einsatz-Mobil
TACS	Total Anterior Circulation Stroke
TAFI	Thrombin-aktivierter Fibrinolyse-Inhibitor
TBI	Traumatic Brain Injury
TBST	Tris-buffered saline with Tween
TCEP	Tris-Carboxyethylphosphine
TLR4	Toll-like Rezeptor 4
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNF α	Tumornekrosefaktor α
TOAST	Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment
t-PA	tissue-type plasminogen activator, Gewebespezifischer Plasminogen-aktivator
UCH-L1	Ubiquitin Carboxyl-terminale Hydrolase L1
UPS	Ubiquitin-Proteasomen-System
vWF	von-Willebrand-Faktor
w	weiblich
WHO	World Health Organization, Weltgesundheitsorganisation
ZNS	Zentrales Nervensystem
z.T.	zum Teil
μg	Mikrogramm
μm	Mikrometer

1 Einleitung

1.1 Das Krankheitsbild „Schlaganfall“

1.1.1 Definition und epidemiologische Bedeutung

Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) definiert den Schlaganfall als „sich plötzlich entwickelndes klinisches Zeichen einer fokalen oder globalen zerebralen Funktionsstörung mit Symptomen, die 24 Stunden oder länger andauern oder zum Tod führen, wobei von einer vaskulären Ursache auszugehen ist“ (1). Weltweit stellt der Schlaganfall die zweithäufigste Todesursache dar (2) und ist der häufigste Grund für erworbene Behinderung und Abhängigkeit (3). Allein in Deutschland betragen die direkten medizinischen Kosten für die Schlaganfallversorgung im Jahre 2004 etwa 7,1 Milliarden Euro und die Gesamtkosten, die sog. „Lifetime Costs“, für einen einzelnen Patienten über 43.000 Euro (4). Für die Angaben von Inzidenzraten des Schlaganfalls in Deutschland liegen mehrere populationsbasierte Studien vor, von denen die meisten aber nur bestimmte Altersgruppen berücksichtigen. Nach dem Erlanger Schlaganfall-Register, bei dem keine derartige Altersbeschränkung besteht, ist in Deutschland von etwa 196.000 erstmaligen Schlaganfällen pro Jahr auszugehen (4), (5). Da vorrangig ältere Menschen betroffen sind, wird die Relevanz des Schlaganfalls durch den voranschreitenden demographischen Wandel weiter zunehmen. Allein für das Bundesland Hessen ist von 2005 bis 2050 eine Zunahme der Anzahl der Schlaganfallpatienten um etwa 68% prognostiziert worden. Der überwiegende Anteil der Patienten wird dann über 74 Jahre alt sein (6).

1.1.2 Subtypen, Ätiologie und Pathophysiologie

Unter dem Oberbegriff „Schlaganfall“ werden mehrere Entitäten zusammengefasst: In etwa 80% liegt dem Schlaganfall ein Verschluss einer hirnversorgenden Arterie mit nachfolgender zerebraler Ischämie (IS) zugrunde, etwa 15% entfallen auf eine intrazerebrale Blutung (ICH) und 5% werden durch eine Subarachnoidalblutung (SAB) verursacht (7). Im Folgenden soll nur auf die zwei häufigsten Entitäten eingegangen werden: den ischämischen Schlaganfall (IS) und die intrazerebrale Blutung (ICH).

Nach seiner Ätiologie kann der **ischämische Schlaganfall** weiter unterteilt werden. Weit verbreitet ist die so genannte TOAST-Klassifikation, beschrieben von H.P. Adams et al. 1993: Anhand der Pathogenese der Gefäßokklusion werden folgende fünf Subgruppen unterschieden. In Klammern ist die Häufigkeitsverteilung in Deutschland angegeben (7):

- kardiogene Embolie (26%)
- Mikroangiopathie (21%)
- Makroangiopathie (21%)
- unbekannte Ursache (23%)
- andere seltenere Ursachen (4%).

Physiologisch liegt die Hirndurchblutung bei etwa 50 ml/100g Hirngewebe/Minute und wird durch die zerebrale Autoregulation über einen weiten Bereich des arteriellen Mitteldrucks konstant gehalten (8). Sinkt der zerebrale Blutfluss (CBF) unter 10-15 ml/100 g Hirngewebe/Minute kommt es zum Zusammenbruch des Funktions- und Strukturstoffwechsels. Der Bereich dieser irreversibel geschädigten Zellen wird als Infarktkern (Core) bezeichnet. Liegt der CBF zwischen 15 und 25 ml/100 g Hirngewebe/Minute, stellen die Zellen ihren Funktionsstoffwechsel ein, der Strukturstoffwechsel bleibt jedoch erhalten, so dass sie sich nach rechtzeitiger Reperfusion wieder erholen können (9). Dieser Bezirk, der den Infarktkern umgibt, wird Penumbra genannt. Bei fehlender Reperfusion kommt in immer mehr Zellen der Penumbra auch der Strukturstoffwechsel zum Erliegen und der Infarktkern dehnt sich aus. Die irreversible Schädigung der Zellen im Infarktkern beruht auf den veränderten Stoffwechselbedingungen durch die Hypoperfusion. Durch Substratmangel der mitochondrialen Atmungskette kommt es zu einem Abfall der intrazellulären ATP-Konzentration, was letztlich eine als ischämische Kaskade bezeichnete Kettenreaktion nach sich zieht. Durch den Zusammenbruch des Membranpotentials, der Glutamatvermittelten Exzitotoxizität und der Aktivierung proapoptotischer Faktoren kommt es zum zytotoxischen Ödem und fortschreitender struktureller Zellschädigung. Auch im Extrazellulärraum sorgt die Hypoxie für einen Zusammenbruch der strukturellen Integrität. Durch den Zusammenbruch der Bluthirnschranke kommt es zum Einstrom von Serumproteinen und Wasser in den Extrazellulärraum. Dieses vasogene Ödem und

die durch die Freisetzung intrazellulären Materials getriggerten Entzündungsvorgänge sorgen für das Fortschreiten der sekundären Hirnschädigung (10–12).

Auch die **intrazerebrale Blutung** lässt sich aufgrund ihrer Ätiologie weiter klassifizieren. Zum Schlaganfall im engeren Sinne wird nur die spontane intrazerebrale Blutung gezählt. Auf eine Beschreibung der davon abzugrenzenden traumatischen ICB soll an dieser Stelle verzichtet werden. Die weitaus häufigste Ursache einer spontanen intrazerebralen Blutung stellt die hypertensive Massenblutung dar. Durch chronische arterielle Hypertonie ist insbesondere die Gefäßwand von Perforatorarterien durch Lipohyalinose und durch Bildung von Mikroaneurysmen geschädigt und kann spontan rupturieren. Derartige Blutungen finden sich typischerweise („loco typico“) im Bereich von Stammganglien, Thalamus, Kleinhirn und Hirnstamm. Insbesondere bei atypisch lokalisierten Lobärblutungen sollte bei jüngeren Patienten an Gefäßmissbildungen wie die Arteriovenöse Malformation gedacht werden, bei älteren Patienten an eine cerebrale Amyloidangiopathie (CAA), bei der Amyloidablagerungen die Gefäßwand brüchig machen. In allen Altersgruppen treten Antikoagulantien- und Thrombolytika-assoziierte Blutungen auf. Auf die große Anzahl weiterer, seltenerer Ursachen wie Vaskulitiden, Eklampsie oder Tumoreinblutungen soll hier nicht näher eingegangen werden (7).

Das ins Hirnparenchym ausgetretene Blut führt zu einem Anstieg des intrakraniellen Drucks, was konsekutiv eine Verringerung des CBF zur Folge hat (10). Durch das ausgetretene Blut kommt es außerdem zu einer direkten und unmittelbaren mechanischen nekrotischen Schädigung von Hirnzellen. Hämolyse, Blutabbauprodukte, Thrombinbildung und Entzündungsprozesse führen im Verlauf zu einer sekundären Hirnschädigung (13). Durch den Austritt von zellulären Blutbestandteilen und Plasmaproteinen in das Hirnparenchym kommt es bereits kurze Zeit nach der Gefäßruptur zu inflammatorischen Prozessen, die über Freisetzung pro-apoptotischer Mediatoren die Zellschädigung vorantreiben und die Bluthirnschranke angreifen (14). Durch die Entzündungsprozesse kommt es im Bereich um das Hämatom zu einer stärkeren Ausschöpfung der Sauerstoffreserven, was durch die ohnehin schon kompromittierte Blutversorgung schnell zu einer Ischämie führt (13, 15).

Die pathophysiologischen Vorgänge zusammenfassend kommt es beim IS durch ischämische Vorgänge zu einem sich allmählich ausbreitenden, überwiegend apoptotischen Zelltod, wohingegen bei der ICH gleich zu Anfang eine massive nekrotische Zellschädigung stattfindet.

1.1.3 Akutdiagnostik und Akuttherapie

Rein durch ihr klinisches Erscheinungsbild können Hirninfarkt und intrazerebrale Blutung nicht unterschieden werden (16). Da sich aber wesentliche Unterschiede in der Akuttherapie ergeben, ist diese Unterscheidung eine der wichtigsten Aufgaben der Diagnostik in der Notaufnahme. Neben Anamnese, klinisch-neurologischer Untersuchung, Labordiagnostik und Basismonitoring ist bislang vor allem der Befund der zerebralen Bildgebung entscheidend, der leitliniengerecht spätestens 25 Minuten nach Eintreffen vorliegen sollte. In der weithin verfügbaren und schnell durchführbaren kranialen Computertomographie zeigen sich beim ischämischen Schlaganfall meist erst nach zwei bis drei Stunden erste Infarktfrühzeichen, wohingegen die hyperdense akute intrazerebrale Blutung sofort zu sehen ist (17, 18).

Generell besteht die Behandlung eines ischämischen Schlaganfalls in einer Rekanalisationstherapie mittels Lyse oder endovaskulären Verfahren (18), wohingegen bei einer intrazerebralen Blutung die Blutdrucksenkung, die Gabe von Hämostatika bei Antikoagulanzen-assoziierten Blutungen oder neurochirurgische Verfahren im Vordergrund stehen (19). Der entscheidendste Faktor in der Schlaganfallbehandlung ist die Zeit („Time is Brain“). Es ist belegt, dass ein Patient mit ischämischem Schlaganfall umso mehr von einer Lysetherapie profitiert, je schneller diese durchgeführt wird (18, 20, 21), was mittlerweile zum immer mehr propagierten Konzept der „Golden Hour of Stroke“ geführt hat (22). In Berlin ist ein sog. „Stroke-Einsatz-Mobil“ (STEMO) mit mobilem CT und Point-of-Care-Laboranalyse verfügbar, das eine Thrombolyse direkt vor Ort ermöglicht. Ebinger et al. konnten zeigen, dass die Zeit bis zum Lysebeginn bei STEMO-Einsatz um durchschnittlich 25 Minuten gesenkt werden konnte (23). In einer nachfolgenden Studie konnten die Autoren nachweisen, dass die Thrombolyserate an sich und insbesondere die Einhaltung der „Golden Hour of Stroke“ um das sechsfache gesteigert werden konnte, ohne dass es zu einem Anstieg der Mortalität kommt (24).

Ein signifikanter Benefit hinsichtlich des funktionellen Outcomes bei Patienten, die bereits präklinisch lysiert wurden, konnte bislang in mehreren Untersuchungen noch nicht nachgewiesen werden, wenngleich eine Tendenz zu einem verbesserten funktionellen Outcome zu erkennen ist (25, 26). Zudem scheint der präklinische Beginn der Lysetherapie genauso sicher und effektiv zu sein wie innerklinisch (27).

Da Einsatzfahrzeuge mit mobilem CT eindeutig die Ausnahme sind, kann präklinisch bislang keine differenzierte Therapie begonnen werden. Die Maßnahmen in der Prähospitalphase müssen somit auf die Überwachung der Vitalfunktionen und einen raschen Transport beschränkt bleiben. Wäre eine zuverlässige Unterscheidung zwischen IS und ICH bereits präklinisch möglich, könnte bereits hier eine Thrombolyse eingeleitet oder im Falle einer Hirnblutung eine Blutdrucksenkung und Hirndrucktherapie durchgeführt werden, was sich gemäß des „Time is Brain“-Konzeptes positiv auf die Prognose des Patienten auswirken könnte. Neuere Untersuchungen wie die TICH-2-Studie stellen auch erweiterte Behandlungsmöglichkeiten der intracerebralen Blutung beispielsweise mit Tranexamsäure in Aussicht, was jedoch ebenfalls eine sichere Unterscheidung zwischen IS und ICH bedingt (28, 29).

1.2 Biomarker zur Differenzierung zwischen ischämischen und hämorrhagischen Schlaganfall in der Frühphase

Als Biomarker im Allgemeinen wird ein objektiv messbares Merkmal bezeichnet, das als Indikator für biologische oder pathologische Prozesse dient (30). Am häufigsten wird der Begriff allerdings für Moleküle verwendet, die in Körperflüssigkeiten nachgewiesen werden (31). An einen Biomarker zur Differenzierung zwischen ischämischen und hämorrhagischen Schlaganfall in der Akutphase sind mehrere Ansprüche zu stellen: er soll eine hohe Spezifität für das Hirngewebe aufweisen und bereits in der Frühphase einen signifikanten Konzentrationsunterschied zwischen ischämischen und hämorrhagischen Schlaganfall zeigen. Im besten Falle sollte sich eine Korrelation zwischen Konzentration und dem Ausmaß der Schädigung ergeben und der Marker Stabilität im Blut bei leichter biochemischer Nachweisbarkeit aufweisen (32).

Es sind bereits zahlreiche Biomarker zu Diagnose und Prognose eines Schlaganfalls beschrieben worden. Für den expliziten Einsatz zur Differenzierung von ischämischen und hämorrhagischen Schlaganfällen ist die Auswahl allerdings überschaubar: Häufig genannt werden S100B, Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP), Neuron-specific Enolase (NSE), NMDA-Rezeptor und Myelin Basic Protein (MBP) als Marker für gliale und neuronale Zellschädigung. C-reaktives Protein (CRP) und Matrix-Metalloproteinase 9 (MMP-9) als Neuroinflammations-Marker. Von-Willebrand-Faktor (vWF) und D-Dimere als Thrombosemarker sowie ApoC-Lipoproteine (31, 33–36). Für die Kombination mehrerer Biomarker ist eine höhere Sensitivität im Vergleich zu einzelnen Molekülen beschrieben, allerdings zu Lasten der Spezifität (37, 38). Bislang konnte allerdings noch kein Biomarker ausreichend validiert und klinisch etabliert werden. Zudem fehlen oftmals Studien zum Nachweis von Biomarkern bereits in der Frühphase des Schlaganfalls.

Da sichere Zeichen für eine zerebrale Ischämie erst nach etwa zwei bis drei Stunden im CT nachweisbar sind und auch eine deutlich zeitintensivere MRT-Aufnahme in der Frühphase nur eine eingeschränkte Sensitivität zeigt (39), wird bei klinischer Schlaganfallsymptomatik und fehlenden Blutungszeichen im CT zumeist von einem ischämischen Schlaganfall ausgegangen und eine Thrombolysetherapie eingeleitet. Der Einsatz von Biomarkern könnte hier zum einen eine wertvolle Ergänzung der Diagnostik darstellen, um eine unnötige und mit einem erhöhten Blutungsrisiko assoziierte Thrombolyse bei falsch positiv klassifizierten Patienten zu vermeiden. Optimal wäre ein schnell durchführbarer Bluttest, der zum anderen auch eine sichere Unterscheidung von IS und ICH bereits in der Prähospitalphase erlaubt und somit den Beginn der entsprechenden Therapie bereits vor Ort ermöglicht.

1.3 Hypothesengestützter und hypothesenfreier Ansatz der Identifizierung neuer Biomarker

In der vorliegenden Arbeit sollen neue Biomarker zum einen hypothesengestützt, aufgrund der pathophysiologischen Hintergründe bei IS und ICH erfolgen. Wie oben beschrieben kommt es beim IS zu einer Ischämiekaskade, die im Wesentlichen zu

apoptotischem Zelluntergang führt. Demgegenüber steht bei der ICH die unmittelbare mechanische Schädigung mit überwiegend nekrotischem Zelltod und Freisetzung von intrazellulärem Material. Für die vorliegende Arbeit wurden folgende fünf Proteine ausgewählt:

Ubiquitin Carboxyl-terminal Hydrolase L1 (UCH-L1) kommt im Gehirn in wesentlich höheren Konzentrationen vor als in anderen Organen (40), ist intrazellulär lokalisiert und scheint in Apoptosevorgängen involviert zu sein (41–45). Weiterhin sollen Aggregate fehlgefalteter Proteine nach zerebraler Ischämie vermehrt auftreten und mitunter zu einer verstärkten Aktivität des Ubiquitin-Proteasom-Systems führen (42, 46). Erhöhte UCH-L1-Spiegel im Liquor und im Serum sind im Tiermodell 2h nach traumatischer Hirnverletzung (traumatic brain injury, TBI) und 6h nach zerebraler Ischämie nachgewiesen worden (47). Auch beim Menschen konnten erhöhte UCH-L1-Konzentrationen in Liquor und Serum 6 Stunden nach TBI nachgewiesen werden (48–50). Ren et al. konnten 2013 im Rattenmodell nach 3 und 6 Stunden erhöhte UCH-L1-Serumkonzentrationen beim ischämischen Schlaganfall nachweisen, während eine erhöhte Konzentration in der ICH-Gruppe nicht nachweisbar war (51). In einer nachfolgenden Studie konnten erhöhte UCH-L1-Konzentrationen im Vergleich zu gesunden Probanden nachgewiesen werden ohne dass ein signifikanter Unterschied zwischen IS- und ICH-Gruppe bestand (52). Auch Yigit et al. konnten erhöhte UCH-L1-Spiegel bei Schlaganfallpatienten zeigen, wobei die Unterscheidung zwischen IS und ICH nicht Gegenstand der Untersuchung war (53).

Saures Gliafaserprotein (GFAP) ist ein spezifisches Protein für Astrozyten und ebenfalls intrazellulär lokalisiert. Förch et al. wiesen bereits 2006 und in mehreren Folgestudien signifikant höhere GFAP-Werte bei ICH-Patienten im Vergleich zu IS-Patienten nach (54, 55), mit der höchsten Sensitivität innerhalb der ersten 4,5 Stunden nach Symptom-Beginn (56). Eine mögliche Erklärung sei der bei IS langsamere v.a. apoptotische Zelluntergang ohne Freisetzung intrazellulären Materials verglichen mit der bei ICH plötzlichen mechanischen Schädigung des Hirngewebes und der Blut-Hirn-Schranke, verbunden mit Nekrose und Freisetzung von intrazellulärem GFAP. Rozanski et al. konnten 2017 durch die präklinische Analyse von Blutproben im STEM0 erstmals einen spezifischen cut-off-Wert für GFAP ermitteln, wobei eine niedrige Sensitivität für kleine Blutungen auffiel (57).

Neurofilamente sind neuronenspezifische intrazelluläre Proteine. Sowohl in tierexperimentellen Studien als auch in vivo konnten signifikant erhöhte pNf-H-Konzentrationen bei Erkrankungen, die mit einer axonalen Schädigung einhergehen, festgestellt werden. Shaw und Anderson wiesen bei traumatischen Hirnverletzungen in tierexperimentellen Studien signifikant erhöhte pNf-H-Werte im Blut nach (58, 59). Singh et al. konnten einen signifikanten Unterschied der pNf-H-Serumkonzentration zwischen IS-Patienten und Gesunden innerhalb der ersten Woche nach Symptombeginn nachweisen, allerdings keinen signifikanten Unterschied bereits am ersten Tag (60). Sellner et al. konnten demgegenüber zeigen, dass pNf-H bereits innerhalb der ersten sechs Stunden nach Symptombeginn nachweisbar und im Vergleich zu Gesunden signifikant erhöht ist, wobei die Serumproben von 16 IS- und 2 ICH-Patienten untersucht wurden (61). Cai et al. wiesen bei 112 ICH-Patienten signifikant höhere pNf-H-Konzentrationen im Vergleich zu gesunden Probanden nach (62). Eine Arbeit zu pNf-H als Unterscheidungskriterium zwischen IS und ICH existiert bislang jedoch nicht.

Myelin Basic Protein (MBP) wird von Oligodendrozyten produziert, bildet den Hauptbestandteil der axonisolierenden Myelinschicht und ist somit spezifisch für Nervengewebe. Der diagnostische Einsatz ist bisher insbesondere für die Multiple Sklerose etabliert (63, 64). Aber auch für TBI und Schlaganfallpatienten ist ein Nachweis von erhöhten Serumkonzentrationen beschrieben (65–68). Jauch et al. konnten bei IS-Patienten bereits 3 Stunden nach Symptombeginn erhöhte MBP-Konzentrationen nachweisen mit einem kontinuierlichen Anstieg innerhalb der ersten 24 Stunden (69).

Tau wird vorwiegend als Liquor-Marker für neurodegenerative Erkrankungen eingesetzt. Auch bei IS-Patienten ist das intrazellulär gelegene Mikrotubuli-assoziierte Protein Tau zum Teil im Serum nachweisbar. So konnten Bitsch et al. eine erhöhte Serum-Tau-Konzentration bereits wenige Stunden nach Symptombeginn mit einem Maximum nach 3-5 Tagen zeigen (70). Auch Wunderlich et al. beschrieben eine kontinuierliche Zunahme der Tau-Konzentration nach Symptombeginn (71). Weiterhin liegen auch Studien zur Korrelation der Tau-Konzentration im Serum und dem Outcome nach IS und ICH vor, wobei hier die Serumkinetik in der Frühphase nicht Gegenstand der Untersuchungen war (72, 73).

Demgegenüber steht der hypothesenfreie Ansatz der Identifizierung neuer Biomarker. Hierbei soll keine Vorauswahl zu untersuchender Proteine getroffen werden, sondern zunächst ganz allgemein das Serum-Proteom von IS- und ICH-Patienten mittels Massenspektrometrie registriert werden. Anschließend soll jeweils die Gesamtheit der Serumproteine bei IS- und ICH-Patienten miteinander verglichen werden. Konzentrationsunterschiede einzelner Proteine könnten somit ein Hinweis auf potentielle Marker zur Differenzierung zwischen IS und ICH sein, die in weiteren Experimenten evaluiert werden müssen.

1.4 Struktur und physiologische Funktion der in den ELISA-Tests untersuchten Proteine

1.4.1 Ubiquitin Carboxyl-terminal Hydrolase L1 (UCH-L1)

Das Polypeptid Ubiquitin kann enzymatisch kovalent an Proteine gebunden werden, was normalerweise zu einer Degradation des betreffenden Proteins durch das Proteasom führt. Ein Bestandteil des Ubiquitin-Proteasomen-Systems (UPS) bildet die Enzymfamilie der Deubiquitinasen (DUB), zu denen auch die etwa 25 kDa schwere Ubiquitin Carboxy-terminale Hydrolase L1 (UCH-L1), aus historischen Gründen auch als PGP9.5 bezeichnet, gehört (74, 75). Diese können die Ubiquitinmarkierung wieder entfernen, halten so den monomeren Ubiquitin-Pool aufrecht und schützen ubiquitinierte Proteine vor der Degradation im Proteasom, was den Zellen eine rasche Anpassung an physiologische Vorgänge ermöglicht (76). Außerdem scheint UCH-L1 auch eine Rolle in der transkriptionalen Regulation, beim Zellwachstum und der Differenzierung zu spielen (77). Die Besonderheit von UCH-L1 liegt in seiner Funktionsweise: als Monomer bewirkt UCH-L1 eine hydrolytische Spaltung von Ester- und Amidbindungen zwischen Ubiquitin und Proteinen (75). Als Dimer besitzt es aber auch eine Ubiquitin-Ligasefunktion (78) und fungiert weiterhin als Mono-Ubiquitin-Stabilisator (79). UCH-L1 ist mit einem Anteil von etwa 1-2% aller löslichen Proteine eines der am häufigsten im Gehirn vorkommenden Eiweiße und ausschließlich in Neuronen lokalisiert (40, 80, 81).

1.4.2 Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP)

Das saure Gliafaserprotein (GFAP) zählt zur Gruppe der Typ-III-Intermediärfilamente und kommt in hoher Konzentration in Astrozyten vor. In anderen Organen als dem Gehirn kommt es nur in wesentlich geringerer Menge vor. Als Strukturprotein mit einer Molekülmasse von etwa 50 kDa ist es am Erhalt der Zellstruktur und der Zellmotilität beteiligt und scheint auch eine Rolle in der Aufrechterhaltung der Blut-Hirn-Schranke zu spielen (32, 82, 83). Auch in der Interaktion zwischen Neuronen und Astrozyten und der interzellulären Kommunikation scheint GFAP involviert zu sein (84). Es kann an andere Typ-III-Intermediärfilamente wie Vimentin oder Desmin oder Typ-IV-Intermediärfilamente wie Neurofilamente binden (85).

1.4.3 Phosphorylated Neurofilament-heavy chain (pNf-H)

Neurofilamente zählen zu den Typ-IV-Intermediärfilamenten und sind spezifisch für Nervenzellen. Sie helfen den Neuronen ihre asymmetrische Polarität mit Zellkörper und Axon aufrechtzuerhalten, sind in den axonalen Transport und durch ihren Einfluss auf den Axonkaliber in die Weiterleitung elektrischer Nervenimpulse involviert (86). Neurofilamente sind Heteropolymere, die aus leichten, mittleren und schweren Polypeptidketten sowie Internexin alpha aufgebaut sind. Anhand des Molekulargewichts werden die Neurofilamente in Internexin alpha (66 kDa), leichte (70 kDa), mittlere (150 kDa) und schwere (200 kDa) Neurofilament-Ketten eingeteilt. Es sind zahlreiche posttranslationale Modifikationen, insbesondere Phosphorylierungen beschrieben (87). Die Phosphorylierung von NF-H scheint wichtig für die Interaktion mit anderen Elementen des Zytoskeletts zu sein. 80% der Neurofilamente sind stark phosphoryliert und interagieren als sog. „statischer Pool“ mit dem Zytoskelett. Die anderen 20% der weniger phosphorylierten Neurofilamente bilden den „dynamischen Pool“ und scheinen in den axonalen Transport involviert zu sein (86). Die Phosphorylierung scheint die Neurofilamente zudem vor einer Proteolyse zu schützen (88, 89).

1.4.4 Myelin Basic Protein (MBP)

Myelin Basic Protein (MBP) ist einer der zytosolischen Hauptbestandteile von Myelinscheiden im zentralen und peripheren Nervensystem. Im ZNS werden die Myelinscheiden von Oligodendrozyten gebildet. Sie umhüllen die Axone, wirken elektrisch isolierend und ermöglichen so die saltatorische Erregungsleitung. MBP ist ein relativ kleines, stark basisches Protein, das die Bildung von Myelinscheiden mit initiiert und deren Aufbau kontrolliert. Durch elektrostatische Interaktionen und hydrophobe Wechselwirkungen mit Membranlipiden dient MBP außerdem der Aufrechterhaltung der kompakten Myelinstruktur und fungiert als Linker- und Gerüstprotein. Weiterhin scheint MBP auch in die Signaltransduktion von Oligodendrozyten involviert zu sein. Durch Alternatives Splicing der vom sog. Golli (gene of oligodendrocyte lineage)-Genkomplex kodierten mRNA, kommt MBP in mehreren Isoformen mit einer Molekülmasse zwischen 14 kDa und 21,5 kDa vor. Die häufigste Isoform bildet dabei das 18,5 kDa-MBP (90–92).

1.4.5 Tau

Das Mikrotubuli-assoziierte Protein Tau (MAPT) kommt im zentralen und peripheren Nervensystem in großer Menge vor und findet sich nur sporadisch in anderen Organen, z.B. Lunge oder Niere. Innerhalb des ZNS ist es v.a. in den neuronalen Axonen lokalisiert. Durch alternatives Splicing entstehen 6 Haupt-Isoformen zwischen 36,7 und 45,9 kDa mit jeweils drei oder vier Mikrotubuli-Bindungs-Domänen. Es existieren zudem noch weitere Isoformen, die bisher aber kaum untersucht sind. Tau kann neben seiner namensgebenden Fähigkeit zur Bindung an Mikrotubuli und deren Stabilisierung und Regulierung noch mit einer ganzen Reihe weiterer Moleküle interagieren, so dass es in zentrale Vorgänge der Signaltransduktion, Enzymregulation und Zytoskelettorganisation involviert zu sein scheint. Die Aktivität von Tau selbst wird v.a. durch Phosphorylierungen gesteuert (93, 94).

1.5 Eingesetzte Methoden

1.5.1 Die ELISA-Technik

Zum Nachweis einzelner Proteine können so genannte Immunoassays eingesetzt werden. 1971 wurde erstmals ein Immunoassay beschrieben, bei dem ein Reporterenzym zur Detektion eingesetzt wurde, statt des bis dahin verbreiteten Radioimmunoassays, bei dem radioaktive Tracer zum Einsatz kamen (95, 96). Es etablierte sich die Bezeichnung Enzyme-linked Immunosorbent Assay oder kurz ELISA. Einer der häufigsten und auch in der vorliegenden Arbeit eingesetzten ELISA-Typen ist der so genannte Sandwich-ELISA: Ein Capture-Antibody ist an eine feste Phase gekoppelt und bindet spezifisch das nachzuweisende Antigen. Ein Detection-Antibody, der gegen ein anderes Epitop gerichtet ist als der Capture-Antibody, bindet als zweites an das Antigen. Der entstandene Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex führte zur Bezeichnung Sandwich-ELISA. Als nächstes wird ein dritter, mit dem Reporterenzym gekoppelter Antikörper, der gegen den konstanten Teil des Detection-Antibodys gerichtet ist, hinzugegeben. Zuletzt wird ein chromogenes Substrat für das Reporterenzym hinzugefügt. Die nun stattfindende enzymatische Reaktion führt zu einem Farbumschlag, der mittels Absorptionsmessung registriert wird. Mittels Kalibrierungskurve, die durch eine Standardreihe bekannter Konzentrationen erstellt wird, werden die gemessenen Absorptionswerte in Konzentrationen umgerechnet (97).

1.5.2 Die Massenspektrometrie

Die Massenspektrometrie ist ein äußerst komplexes Verfahren biochemischer Nachweismethoden, das hier nur grob umrissen werden soll.

Proteine werden mit spezifischen Proteasen (z.B. Trypsin) in Peptide gespalten. Die Peptide werden dann in einem Flüssigkeitschromatographen getrennt und massenspektrometrisch analysiert. Die Massenspektrometrie stellt eine empfindliche Methode zur Analyse bzw. Identifizierung auch geringer Proteinmengen dar und beruht letztlich auf der Bestimmung der Molekülmasse chemischer Verbindungen. Die Moleküle werden dafür zunächst ionisiert und anschließend aufgrund ihrer

unterschiedlichen Masse-zu-Ladungs-Verhältnisse (sog. m/z -Quotient) aufgetrennt. Letztlich wird ein individuelles Muster von Peptidfragmenten mit jeweils unterschiedlichen Massen detektiert. Durch einen Vergleich der entsprechenden Massen in Proteindatenbanken können so die jeweiligen Proteine identifiziert werden. Prinzipiell besteht ein Massenspektrometer aus folgenden Bestandteilen: einer Ionenquelle zur Ionisierung der Moleküle, einem Analysator, der die Ionen nach ihrem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis auftrennt und einem Detektor, der die Ionen schließlich erfasst. In der vorliegenden Arbeit kam ein nano-Flüssigkeitschromatograph Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000 und ein Q Exactive Plus System der Firma Thermo Fisher Scientific zum Einsatz. Vorgeschaltet ist hierbei eine nano-Flüssigkeitschromatographie. Das aufgezeichnete Massenspektrum zeigt letztlich zweidimensional die Ionenhäufigkeiten in Abhängigkeit vom Masse-Ladungs-Verhältnis. Durch den Vergleich des individuellen Spektrenmusters mit Spektrenbibliotheken lassen sich die registrierten Massen einzelnen Molekülen zuordnen (97–99).

Für die Identifizierung unbekannter Biomarker in Geweben oder Körperflüssigkeiten, wird oftmals die massenspektrometrische Proteinanalyse verwendet, ohne dass zuvor eine Vorauswahl der zu untersuchenden Proteine getroffen werden muss. Für die vorliegende Arbeit hatte ich die Möglichkeit Serumproben von IS- und ICH-Patienten in der zentralen Proteomics-Einheit im Fachbereich Medizin zu untersuchen. Diese Pilotstudie sollte zunächst Kandidatenproteine herausarbeiten, die in nachfolgenden Studien weiter charakterisiert werden müssen.

1.6 Ziel der vorliegenden Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, Biomarker zur diagnostischen Unterscheidung von Hirninfarkt und intrazerebraler Blutung bei Patienten mit Schlaganfallsymptomen in der Akutphase (innerhalb der ersten 6 Stunden nach Symptombeginn) zu identifizieren. Dabei werden zwei verschiedene Ansätze verfolgt:

- 1) Beim hypothesengetriebenen Ansatz sollen die Serumkonzentrationen der Proteine UCH-L1, GFAP, pNf-H, MBP und Tau auf signifikanten Unterschied zwischen IS- und ICH-Patienten untersucht werden. Diese Proteine wurden aufgrund von Überlegungen zu pathophysiologischen Mechanismen und bereits in der Literatur beschriebenem Potenzial als Biomarker ausgewählt. Die Bestimmung erfolgt mittels kommerziell verfügbaren ELISA-Kits bei Patienten mit proximalen Gefäßverschlüssen und schweren Hirnblutungen als „Prototyp“ des ischämischen Schlaganfalls bzw. der intrazerebrale Blutung.
- 2) Beim hypothesenfreien Ansatz sollen Serumproben mittels Massenspektrometrie analysiert werden, ohne dass eine Vorauswahl an Proteinen getroffen wird. Die Gesamtheit der so ermittelten Proteine soll anschließend mit Hilfe statistischer Verfahren auf signifikante Unterschiede zwischen IS- und ICH-Proben untersucht werden.

2 Materialien und Methoden

2.1 Patientenrekrutierung und Probenakquisition

Die Patientenrekrutierung für die vorliegende Arbeit war an die BE FAST II-Studie angegliedert, eine prospektive multizentrische Studie zur Evaluation von GFAP als Biomarker der akuten intrazerebralen Blutung. Von Mai 2012 bis April 2014 wurden Serumproben von Schlaganfallpatienten gesammelt, die zur Akutbehandlung in die Klinik für Neurologie der Goethe-Universität Frankfurt am Main eingeliefert wurden.

Den Patienten wurde im Rahmen der Routinediagnostik jeweils ein Serumröhrchen (S-Monovette® Serum-Gel, Fa. Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) abgenommen, welches im hauseigenen Labor der Klinik für Neurologie zehn Minuten bei 4000 rpm zentrifugiert wurde (Universal 320R Zentrifuge, Fa. Hettich, Tuttlingen, Deutschland). Das überstehende Blutserum, das nicht für die Routine-Laboruntersuchungen benötigt wurde, wurde in mehrere 0,5 ml-Mikro-Röhrchen (Fa. Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) überführt. Den Serumproben wurde eine fortlaufende dreistellige ID-Nummer zugewiesen. Bis zur weiteren Analyse wurden die Proben bei -80°C in der Klinik für Neurologie gelagert (HERA Freeze Basic, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Studienprotokoll und Datenblatt der BE FAST II-Studie finden sich im Anhang.

2.2 Ein- und Ausschlusskriterien

Die Patientenrekrutierung für die BE FAST II-Studie erfolgte anhand der folgenden Kriterien:

- Der Patient ist mindestens 18 Jahre alt.
- Der Beginn der Symptomatik liegt höchstens 6 Stunden zurück.
- Der NIHSS-Wert liegt bei mindestens 4 Punkten.

Ausschlusskriterien der BE FAST II-Studie waren:

- Der Patient erlitt in den letzten 3 Monaten einen ischämischen Schlaganfall, eine intrazerebrale Blutung oder eine transitorisch ischämische Attacke.
- Anamnestisch ist ein Hirntumor bekannt.

- In den letzten 3 Monaten kam es zu einem Schädel-Hirn-Trauma.
- Der Patient bzw. dessen Angehörige haben ihr Einverständnis nicht gegeben.

Für die vorliegende Arbeit wurden die Patienten zusätzlich zu den aufgeführten Kriterien nach folgenden Gesichtspunkten ausgewählt:

Für die IS-Gruppe:

- Es liegt ein proximaler Gefäßverschluss im Karotis-T, im M1- oder M2-Segment vor oder
- es liegt ein kombinierter Verschluss in der A. carotis interna und der A. cerebri media oder ein kombinierter M1/M2-Verschluss vor.

Für die ICH-Gruppe:

- Das Volumen der intrazerebralen Blutung, errechnet anhand der ABC/2-Formel, beträgt mindestens 50 ml oder
- das Blutungsvolumen beträgt < 50 ml, gleichzeitig liegt der NIHSS-Wert aber bei ≥ 10 oder die Patienten sind intubiert oder komatös.

2.3 Erhebung der klinischen Daten

Die klinischen Daten sind nur den ID-Nummern zugewiesen, ein Rückschluss auf die Identität der Patienten ist nicht möglich. Neben Alter und Geschlecht wurden der NIHSS-Wert, der Symptombeginn und der Zeitpunkt der Blutentnahme dokumentiert. Im weiteren Verlauf wurden bei einer cerebralen Ischämie die Lokalisation nach OCSP und die Genese des Schlaganfalls gemäß TOAST-Klassifikation erhoben. Bei intrazerebralen Blutungen wurde das Blutungsvolumen mithilfe der ABC/2-Formel berechnet. Die ICB-Lokalisation wurde mit typisch (Basalganglien, Thalamus, Kleinhirn oder Hirnstamm) oder atypisch (frontal, temporal, parietal oder occipital) klassifiziert.

2.4 Skalen, Klassifikationen und Formeln zur Erhebung der klinischen Daten

Der klinische Schweregrad der Schlaganfallsymptomatik wurde mittels der National Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS) quantifiziert. Anhand 13 standardisierter Items errechnet sich durch Anamnese und klinisch neurologische Untersuchung ein Wert zwischen 0 und 42 Punkten. Beurteilt werden Vigilanz, Orientierung, Befolgen von Aufforderungen, Okulomotorik, Gesichtsfeldausfälle, faziale Parese, Motorik aller vier Extremitäten, Ataxie, Sensibilität, Aphasie, Dysarthrie und Neglect (100). Zur Erhebung des NIHSS ist die aktive Mitarbeit des Patienten erforderlich, weshalb er bei komatösen oder intubierten Patienten nicht durchgeführt werden kann. Bei diesen Patienten ist ohnehin von einem höhergradigen neurologischen Defizit auszugehen, das aber nicht durch den NIHSS objektivierbar ist.

Für die radiologische Beschreibung von Verschläüssen der A. cerebri media hat sich die anatomische Einteilung in folgende vier Segmente bewährt:

- M1 (Pars sphenoidalis): vom Abgang aus der A. carotis interna bis zur ersten Aufzweigung, parallel zur Ala minor
- M2 (Pars insularis): entlang der Inselregion
- M3 (Pars opercularis): entlang des Operculums
- M4 (Pars terminalis): entlang des Kortex

Die Teilungsstelle der A. carotis interna in die A. cerebri anterior und die A. cerebri media wird als Karotis-T bezeichnet (101).

Zur standardisierten und reliablen Angabe des Blutungsvolumens in einer kranialen Computertomographie wurde die ABC/2-Formel angewandt. Dabei beschreibt A den größten Durchmesser der Blutung, B den größten Durchmesser senkrecht zu A und C die Anzahl der Schichten, in denen die Blutung zu sehen ist, multipliziert mit der Schichtdicke in cm. Das Produkt aus A, B und C wird zuletzt durch 2 dividiert, wodurch sich das Blutungsvolumen in ml errechnet (102).

2.5 Negativkontrollen

In der vorliegenden Arbeit war die Diagnose eines ischämischen Schlaganfalls bzw. einer intrazerebralen Blutung bereits radiologisch gesichert. Retrospektiv erfolgte die

Messung von Proteinen im Serum bei IS- und ICH-Patienten mit der Frage, ob sich die beiden Krankheitsentitäten anhand der Serumkonzentration unterscheiden lassen. Die Arbeit verfolgte hierbei nicht das Ziel mittels der Biomarkerkonzentration die Verdachtsdiagnose eines Schlaganfalls zu verifizieren. Auf eine ausführliche Testung von gesunden Personen wurde daher verzichtet. Als Negativkontrollen wurden Serumproben von zwei gesunden Probanden verwendet. Statistische Berechnungen, die die Negativkontrollen betreffen sind aufgrund des geringen Stichprobenumfangs überwiegend nicht sinnvoll und wurden in der vorliegenden Arbeit daher zumeist nicht durchgeführt.

2.6 Verwendete Geräte und Materialien

Material/Geräte	Hersteller
Vasofix® Safety Venenverweilkatheter	B. Braun AG, Melsungen, Deutschland
S-Monovette® Serum-Gel	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Mikro-Röhrchen 0,5 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Hettich Universal 320R Zentrifuge	Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland
Eppendorf Centrifuge 5415R	Eppendorf AG, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
HERA Freeze Basic Laborkühlschrank	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
REAX 2000 Reagenzglasschüttler	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
MTS 2/4 digital Mikrotiterschüttler	IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
HERA cell 150 Inkubator	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Victor3 1420 Multilabel Counter	Perkin Elmer Inc., Waltham, USA

Tabelle 1: Material zur Blutentnahme und Geräte

ELISA	Hersteller
Neurofilament H (pNf-H)	EnCor Biotechnology Inc., Gainesville, USA
Myelin Basic Protein (MBP)	International Point of Care Inc., Toronto, Canada
Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 (UCH-L1)	USCN Life Science Inc., Wuhan, China
Tau	Cusabio Biotech Co., LTD., Wuhan, China

Tabelle 2: ELISA-Kits

Software	Hersteller
Microsoft Office Excel 2007	Microsoft, Redmond, USA
BiAS für Windows Version 10.12	epsilon-Verlag GbR, Hochheim, Deutschland
GraphPad Prism 8 for Windows	GraphPad Software Inc., San Diego, USA
MaxQuant v1.5.3.30	Max-Planck-Institute of Biochemistry, München, Deutschland
Perseus v.1.5.6.0	Max-Planck-Institute of Biochemistry, München, Deutschland

Tabelle 3: Software

Chemikalien/Reagenzien	Hersteller
1xTBS	100ml 10xTBS, 900ml VE-Wasser, 1ml Tween-20
10xTBS	24,2g Tris, 80g NaCl, ad 1000ml VE-Wasser, pH 7,6 mit HCl
2N H ₂ SO ₄ , CAS-Nr.: 7664-93-9	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA
HCl, CAS-Nr.: 7647-01-0	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA
NaCl, CAS-Nr.: 7647-14-5	Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, USA
Tris Pufferan®, CAS-Nr.: 77-86-1	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Tween-20, CAS-Nr.: 9005-64-5	Appllichem GmbH, Darmstadt, Deutschland

Tabelle 4: Chemikalien und Reagenzien

Massenspektrometrie	Hersteller
Nano LC: Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000	Thermo Fisher Scientific Inc., Dreieich, Deutschland
nano-LC/Q Exactive Plus	Thermo Fisher Scientific Inc., Dreieich, Deutschland

Tabelle 5: Massenspektrometrie

2.7 Enzyme Linked Immunosorbent Assays (ELISAs)

Die vier ELISA-Tests wurden jeweils streng nach den Vorgaben des Herstellers durchgeführt. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Konzentrationsbestimmung mittels Extinktionsmessung erfolgte für alle vier ELISA-Tests gleichermaßen: Mit dem ELISA-Reader (Victor³, Fa. Perkin Elmer, Waltham, USA) wurde die optische Dichte bei 450 nm gemessen. Die Werte der Standardreihe wurden gemittelt und hiervon der Mittelwert der Blanks subtrahiert. Durch Berechnung der

linearen Regression wurde die Kalibrierungskurve erstellt. Durch Interpolation der Messwerte auf die Kallibrationskurve wurden schließlich die Konzentrationen bestimmt. Lag die mittlere Extinktion der Leerwerte oberhalb der mittleren Extinktion der Probenwerte, wurde von einer Konzentration unterhalb der Nachweisgrenze des jeweiligen ELISAs ausgegangen und der Wert ging mit einer Konzentration von 0 ng/ml in die weitere Auswertung ein

EnCor® Neurofilament H

Es wurde zunächst der Dilution Buffer mit TBST, Wasser und Blocking Protein hergestellt. Die Standardreihe wurde gemäß den Vorgaben verdünnt und die Wells nach Pipettierschema befüllt. Die Platte wurde dann für 1 Stunde bei Raumtemperatur auf dem Shaker inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBST wurde der HRP-Detection Antibody hinzugegeben und die Platte erneut für 1 Stunde bei Raumtemperatur auf dem Shaker inkubiert. Anschließend wurde die Platte drei Mal mit TBST gewaschen und der Development Buffer hinzugefügt. Nach erneuter Inkubation für 20 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Shaker wurde die Reaktion mit 2N H₂SO₄ gestoppt und zuletzt die Absorption mit dem ELISA-Reader gemessen.

IPOC® Myelin Basic Protein

Nach Lösung des lyophilisierten MBP-Standard Stocks und der MBP-Controls wurde die Standardreihe gemäß den Vorgaben verdünnt. Die Wells wurden daraufhin nach dem Pipettierschema mit der Standardreihe, den MBP-Controls und den Serumproben befüllt. Die Platte wurde daraufhin für 30 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Shaker inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit der Wash Solution wurde die anti-MBP Detector Solution hinzugefügt und die Platte erneut für 15 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Shaker inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit der Wash Solution wurde HRP-labelled anti-mouse Ig hinzugegeben. Es folgte eine weitere Inkubationsphase für 15 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Shaker, gefolgt von einem dreimaligen Waschvorgang. Anschließend wurde die TMB Chromogen Solution in jedes Well gegeben und die Platte für 10 Minuten bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss auf dem Shaker inkubiert. Nach dem Hinzufügen der Stopping Solution, erfolgte die Absorptionsmessung mit dem ELISA-Reader.

USCN® Ubiquitin C-Terminal Hydrolase L1

Die lyophilisierte Standard-Substanz wurde zunächst mit Standard Diluent in Lösung gebracht. Die Standardreihe wurde gemäß den Vorgaben erstellt. Die Wells wurden nach dem Pipettierschema befüllt. Die Platte wurde daraufhin für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Flüssigkeit aus den Wells entfernt, es erfolgte aber noch kein Waschvorgang. Es wurde der Detection Reagent A hinzugefügt und die Platte für 1 Stunde erneut bei 37°C inkubiert. Nach erneutem Entfernen der Flüssigkeit wurde den Wells Wash Solution hinzugefügt, die Flüssigkeit nach einminütiger Ruhephase entfernt und die Platte ausgeklopft. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Hierauf wurde der Detection Reagent B hinzugegeben und die Platte 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Der oben beschriebene Waschvorgang wurde nun fünfmal durchgeführt. Nach dem Hinzufügen der TMB Substrate Solution wurde die Platte für 20 Minuten unter Lichtausschluss bei 37°C inkubiert. Zuletzt wurde die Stop Solution hinzugefügt und schließlich die Absorption mit dem ELISA-Reader gemessen.

Cusabio® Tau

Standard, Biotin-Antibody, HRP-Avidin und der Wash Buffer wurden gemäß den Angaben verdünnt. Die Standardreihe wurde hergestellt und mit den Serumproben nach Pipettierschema auf die Wells verteilt. Die Platte wurde für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Flüssigkeit aus den Wells entfernt, die Platte jedoch nicht gewaschen. Es wurde der Biotin-Antibody hinzugefügt und die Platte für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Nach Entfernung der Flüssigkeit wurde jedes Well mit Wash Buffer gewaschen, wobei die Waschlösung für 2 Minuten in den Wells verbleiben sollte. Dieser Wasch-Schritt wurde noch zweimal wiederholt und die Platte zuletzt ausgeklopft. Daraufhin wurde HRP-Avidin hinzugegeben und die Platte erneut für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Nach dem Entfernen der Flüssigkeit aus den Wells wurde der oben beschriebene Waschvorgang fünfmal durchgeführt. Es wurde anschließend das TMB Substrate hinzugegeben und die Platte für 20 Minuten bei 37°C unter Lichtausschluss inkubiert. Zuletzt wurde die Stop Solution hinzugefügt und die Absorption mit dem ELISA-Reader gemessen.

2.8 Analyse der Serum-GFAP-Konzentration durch Roche®

Die Analyse der Serum-GFAP-Konzentrationen erfolgte durch Roche Diagnostics, Penzberg, Deutschland mit Hilfe des Elecsys®-Systems. Hierbei handelt es sich um einen Elektrochemilumineszenz-Immunoassay zur in-vitro Quantifizierung von GFAP. Die Serumproben wurden dafür zunächst mit biotin- und rutheniummarkierten monoklonalen GFAP-Antikörpern und anschließend mit Streptavidin-beschichteten magnetischen Mikropartikeln inkubiert. Die Beads wurden daraufhin mit Hilfe eines Magneten an eine Elektrode gekoppelt und die ungebundenen Antikörper ausgewaschen. Zuletzt wurde in Anwesenheit eines Tripropylamin-Puffers Spannung an die Elektrode angelegt und das resultierende Elektrochemilumineszenz-Signal von einem Photomultiplier aufgezeichnet. Die GFAP-Konzentrationen wurden auf der Basis einer Kalibrationskurve kalkuliert (56).

2.9 Massenspektrometrie

2.9.1 Probenvorbereitung für die Massenspektrometrie

Der Gehalt an Serumproteinen wurde mit der Methode von Lowry (1970) bestimmt (103). Je 200 µg Protein wurden bis zu einem Endvolumen von 20 µl mit 6 M Guanidiniumhydrochlorid (GdmCl), 50 mM Tris/HCl, pH 8,5 und 10 mM Tris-Carboxyethylphosphine (TCEP) aufgefüllt und bei 95°C für 5 Minuten denaturiert. Die reduzierten Thiole der Cysteine wurden mit 40 mM Iodoacetamid alkyliert und die Proben mit 25 mM Tris/HCl, pH 8,5, 10% Acetonitril bis zu einer Endkonzentration an 0.6 M GdmCl verdünnt. Die Proteine wurden über Nacht mit 2 µg Trypsin (Promega, Reinheitsgrad für Peptidsequenzierung) bei 37°C verdaut. Der Trypsinverdau wurde durch Ansäuern mit Trifluoressigsäure (finale Konzentration 0,5%) gestoppt. Die so entstandenen tryptischen Peptide wurden über Umkehrphasenchromatographie (Reversed-Phase Chromatography) mit einem C18-Material (3M Empore™ SPE Extraction Disks) gereinigt und in Mikrotiterplatten eingetrocknet (104). Direkt vor der Peptididentifizierung mit Massenspektrometrie wurden die Peptide wieder in 1% Acetonitril und 0,1% Ameisensäure gelöst.

2.9.2 Flüssigchromatographie – Massenspektrometrie (LC-MS)

Die Flüssigchromatographie–Massenspektrometrie (LC-MS) wurde an einem gekoppelten System der Firma Thermo Scientific durchgeführt. Dazu wurde der Flüssigkeitschromatograph (Dionex Ultimate 3000) über eine dafür geeignete Ionenquelle (Nanospray Flex Ion-Source) mit dem Q Exactive Plus Massenspektrometer verbunden. Die Peptide wurden zunächst auf einer Trap-Säule aus C18 Umkehrphasenmaterial aufkonzentriert und dabei von den letzten Spuren an Salzen und Detergentien aufgereinigt. Danach wurde die Trap-Säule in den Nanofluss des Chromatographen umgeschaltet. Die Peptide wurden durch eine kontinuierlich ansteigende Konzentration an organischem Lösungsmittel (4-50% Acetonitril, 0,1% Ameisensäure) über einen Zeitraum von 90 min mit einer Flussrate von 250 nl/min zunächst von der Trap-Säule eluiert und dann auf einer analytischen Säule getrennt. Als analytische Säule wurde eine mit 2,4 µm Reprosil-C18-Harz (Dr. Maisch GmbH) selbst gepackte Picotip-Emitter Tip-Säule (Durchmesser 100 µm, Länge 15 cm, New Objectives) gewählt. Die Peptide wurden dann in der Ionenquelle ionisiert (2,6 kV) und in das Massenspektrometer gesprüht. Die Ionen wurden im vollen Scan-Modus (MS) im Bereich 300 bis 2000 m/z mit einer Auflösung von 70000 und einer automatischen Verstärkerregelung (automatic gain control, AGC) von $3 \cdot 10^6$ Ionen (ioncounts) mit einer maximalen Ioneninjektionszeit von 160 ms gemessen. Nur die mindestens 2-fach positiv geladenen Ionen wurden für eine weitere Fragmentierung (MS/MS) ausgewählt und mit einer Auflösung von 17500, in einem Isolationsfenster von 2 m/z und AGC von 10^5 Ionen (maximale Injektionszeit 150 ms) gemessen. Dabei wurden die MS-Daten im Profil-Mode, also mit vielen Datenpunkten für die Quantifizierung der Peptide und die MS/MS-Daten im Centroid-Modus, also für die Identifizierung mit komprimierten Datenpunkten aufgenommen.

2.10 Statistische Verfahren und grafische Darstellung

Alle statistischen Berechnungen für die ELISA-Tests wurden mit dem Programm BiAS für Windows Version 10.12 durchgeführt.

Bei den mittels ELISA bzw. Roche Elecsys® bestimmten Serumkonzentrationen handelte es sich um quantitativ stetige Merkmale, die rationalskaliert waren. Die Stichproben zum Vergleich der Ischämie- mit der Blutungsgruppe waren voneinander unabhängig. Für die Auswahl weiterer Testverfahren wurde zunächst mittels Shapiro-Wilk-Test überprüft, ob die erhobenen Daten normalverteilt sind. Der Shapiro-Wilk-Test wurde aufgrund seiner hohen Testgüte und der Anwendbarkeit auch bei kleinerem Stichprobenumfang ($n < 30$) ausgewählt. Für die nicht normalverteilten Messdaten wurde anschließend mittels Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test überprüft, ob zwischen der Ischämie- und der Blutungsgruppe ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der jeweiligen Biomarker-Konzentration bestand. Für die normalverteilten Daten kam hierfür der Zweistichproben-t-Test für unabhängige Merkmale zum Einsatz. Für die signifikant unterschiedlichen Messwerte erfolgte eine weitergehende Analyse mittels Pearson-Korrelation für die normalverteilten Merkmale und mittels Spearman-Korrelation für die nicht normalverteilten Merkmale.

Die MS-Daten wurden mit der Software MaxQuant (v1.5.3.30) ausgewertet (105). Die Proteine wurden anhand des humanen Referenzproteoms der UniprotKB Datenbank (Version Juli/2017, 71567 Einzeleinträge) mit einer False Discovery Rate (FDR) $< 1\%$ identifiziert. Als mögliche variable Aminosäurenmodifikationen wurde die Acetylierung am N-Terminus (+42.01), die Deamidierung von NQ (+0.98) und die Oxidation der Seitenkette der Aminosäure Methionin (+15.99) gesucht. Wegen der Thiolalkylierung der Cysteine wurde zusätzlich die Massenaddition der Carbamidomethylierung (+57.02) als feste Modifikation in der Software ausgewählt. Zu den Standardeinstellungen für die Identifizierung wurde in der Software MaxQuant die Option der markierungsfreien Quantifizierung (LFQ) ausgewählt. Die Quantifizierungswerte der identifizierten Proteine (LFQ-Werte) wurden in die Software Perseus (v1.5.6.0) zur weiteren bioinformatischen Auswertung importiert (106). Statistiken, Korrelationen und Heatmaps wurden ebenfalls mit dieser Software erstellt. Das Venn-Diagramm wurde mit dem Online-Webtool von Bioinformatics & Evolutionary Genomics (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>) erstellt. Alle anderen grafischen Darstellungen wurden mit GraphPad Prism 8 für Windows Version 8.0.2 erstellt.

Bei allen Testverfahren wurde ein p-Wert $< 0,05$ als signifikant angesehen (107). Die Signifikanzniveaus in den Grafiken wurden mit ns ($p \geq 0,05$), * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) und *** ($p < 0,001$) gekennzeichnet.

3 Ergebnisse

3.1 Studienpopulation

Für die ELISA-Tests wurden aus dem BE FAST II-Patientenkollektiv anhand der unter 2.2 aufgeführten Einschlusskriterien 72 Patienten ausgewählt. Das Alter der Patienten lag zwischen 19 und 96 Jahren, im Mittel bei 73,2 Jahren. Von den 72 Patienten waren 41 weiblich und 31 männlich. 47 Patienten erlitten einen ischämischen Schlaganfall, 25 Patienten eine intrazerebrale Blutung. Die Zeit zwischen Symptombeginn und Blutentnahme betrug im Mittel 113,6 Minuten mit einem Minimalwert von 11 und einem Maximalwert von 341 Minuten. Im Mittel erfolgte die Blutentnahme bei den Ischämiepatienten nach 108,4 Minuten und bei den Blutungspatienten nach 123,7 Minuten. Der NIHSS-Wert lag bei der gesamten Studienpopulation im Mittel bei 14,9 Punkten mit einem Minimum von 4 und einem Maximum von 27 Punkten. Bei 11 Patienten konnte der NIHSS-Wert nicht erhoben werden, weil die Patienten intubiert oder komatös waren, bei 5 Patienten wurde eine NIHSS-Erhebung bei Aufnahme nicht durchgeführt. Der mittlere NIHSS-Wert in der Ischämie- und in der Blutungsgruppe war mit 14,9 bzw. 15,1 annähernd gleich.

Von den 47 ischämischen Schlaganfällen wurden 37 als PACS klassifiziert, 10 als TACS. Radiologisch wurde der Gefäßverschluss bei 26 Patienten als M1-Verschluss klassifiziert, bei 11 Patienten als M2-Verschluss. Bei 3 Patienten lag ein kombinierter M1/M2-Verschluss vor, bei 4 Patienten ein kombinierter Verschluss der A. carotis interna und der A. cerebri media und bei 2 Patienten ein Karotis-T-Verschluss. Bei einem Patienten war entgegen der eindeutigen Klinik bei Aufnahme CT-angiographisch kein Gefäßverschluss nachweisbar.

Von den 25 Hirnblutungen waren 14 typisch lokalisiert, davon 12 im Bereich der Stammganglien und jeweils 1 Blutung im Kleinhirn und Hirnstamm. 11 Hirnblutungen wurden als atypisch gelegen klassifiziert. Das mittlere Blutungsvolumen lag bei 73,36 ml, mit einem Minimum von 13,70 ml und einem Maximum von 197,04 ml.

Zusammenfassend sind die relevanten klinischen Daten der gesamten ELISA-Studienpopulation in

Tabelle 6 dargestellt:

	Ischämischer Schlaganfall	intrazerebrale Blutung
n	47	25
mittleres Alter (Jahre)	76,4	66,6
Geschlecht (m:w)	21:26	10:15
mittlere Zeit von Symptombeginn bis Blutentnahme (Min)	108,4	123,7
mittlerer NIHSS-Wert	14,9	15,1
OCSF-Klassifikation:		
PACS	37	
TACS	10	
Gefäßverschluss:		
Karotis-T	2	
M1	26	
M2	11	
ACI + ACM	4	
M1/M2	3	
radiologisch nicht nachweisbar	1	
Mittleres Blutungsvolumen (ml)		73,36
Blutungslokalisierung		
typisch		14
atypisch		11

Tabelle 6: Charakteristika der ELISA-Studienpopulation

Da mit dem vorhandenen Patientenserum nicht jeweils alle vier ELISA-Messungen durchgeführt werden konnten, musste die Konzentrationsbestimmung der einzelnen Biomarker in vier Messgruppen erfolgen, die sich hinsichtlich der Merkmale des Patientekollektivs geringfügig unterschieden. Die Studienpopulation für die pNf-H- und MBP-Messung war identisch.

Eine detaillierte Übersicht über die Charakteristika des Patientekollektivs der einzelnen Messgruppen ist zusammenfassend in

Tabelle 8 (s.u.) dargestellt.

Die massenspektrometrischen Untersuchungen wurden in der Abteilung „Funktionelle Proteomics“ im Fachbereich Medizin durchgeführt. Diese Pilotstudie sollte zunächst Kandidatenproteine herausarbeiten, wofür Serumproben von Schlaganfallpatienten

eingesetzt wurden, die im Rahmen der BEFAST-I-Studie Ende des Jahres 2010 bis Anfang des Jahres 2011 asserviert wurden. Neben Serumproben von 3 IS- und 4 ICH-Patienten wurden 2 gesunde Probanden mit eingeschlossen, die als technische Replikate drei- bzw. viermal für die massenspektrometrische Proteinanalyse gemessen wurden. Das Alter der Patienten lag zwischen 42 und 89 Jahren, im Mittel bei 69,7 Jahren. Von den 7 Patienten waren 2 weiblich und 5 männlich. Die Zeit zwischen Symptombeginn und Blutentnahme betrug im Mittel 7 Tage mit einem Minimalwert von 3,5 Stunden und einem Maximalwert von 15 Tagen. Der NIHSS-Wert lag bei der gesamten Studienpopulation im Mittel bei 12 Punkten mit einem Minimum von 4 und einem Maximum von 23 Punkten, wobei 3 Patienten so schwer erkrankt waren, dass sie in der Aufnahmesituation komatös oder intubiert waren und der NIHSS-Wert nicht erhoben werden konnte.

Tabelle 7 zeigt die Probenzusammenstellung, Diagnose, Geschlecht, Alter und NIHSS der Patienten.

Proben-Nr.	Diagnose	Geschlecht	Alter (Jahre)	NIHSS	Protein-gehalt (mg/ml)	Bezeichnung (MS)	Tech-nische Replikate
DM	C (Control)	m	24	-	76.9	C1	3 (A,B,C)
SL	C (Control)	m	27	-	69.5	C2	4 (A,B,C,D)
53	IS	m	75	11	67.2	IS3	1
182	ICH	w	79	n.d.	60.8	ICH4	1
208	ICH	w	59	4	74.0	ICH5	1
209	IS	m	69	10	66.2	IS6	1
246	ICH	m	89	n.d.	62.6	ICH7	1
251	IS	m	42	23	50.6	IS8	1
270	ICH	m	75	n.d.	63.8	ICH9	1

Tabelle 7: Probenzusammenstellung für die quantitative massenspektrometrische Proteinanalyse

3.2 Vergleich der Biomarkerkonzentrationen in Ischämie- und Blutungsgruppe

Die Serumkonzentrationen von pNf-H, MBP, Tau und GFAP waren nicht normalverteilt ($p < 0,05$), für UCH-L1 ließ sich eine Normalverteilung annehmen ($p = 0,053$ für die Ischämie-Gruppe bzw. $p = 0,071$ für die Blutungs-Gruppe). Die Überprüfung auf Signifikanz erfolgte für pNf-H, MBP, Tau und GFAP mittels Mann-Whitney-U-Test und für UCH-L1 mittels Zweistichproben-t-Test für unabhängige Merkmale.

Bei der Messung der Tau-Konzentration konnte nur bei einem der 32 Patienten ein Wert oberhalb der Nachweisgrenze bestimmt werden. Der komatöse Patient hatte eine ausgedehnte Stammganglienblutung (153,60 ml). Die Konzentration von Tau lag bei 33,45 pg/ml.

Bei der Bestimmung der MBP-Konzentration lagen die Werte bei drei der 35 Patienten oberhalb der Nachweisgrenze. Bei zwei ICB-Patienten mit einem Blutungsvolumen von 59,90 ml und einem NIHSS von 27 bzw. einem Blutungsvolumen von 144,00 ml und einem NIHSS von 26 lagen die MBP-Werte bei 0,32 ng/ml bzw. bei 1,08 ng/ml. Bei einem Ischämie-Patienten mit einem M1-Verschluss und einem NIHSS von 17 wurde eine MBP-Konzentration von 0,02 ng/ml bestimmt.

Ein signifikanter Unterschied zwischen Ischämie- und Blutungsgruppe ließ sich für Tau und MBP nicht feststellen ($p = 0,70$ für Tau bzw. $p = 0,52$ für MBP). Weitere statistische Berechnungen wurden daher nicht durchgeführt. Auf die Darstellung weitergehender deskriptiver Daten wird an dieser Stelle verzichtet.

In der pNf-H-Messung lag die Konzentration bei 27 von 35 Patienten (77%) über der Nachweisgrenze. Die minimal messbare Konzentration von pNf-H betrug jeweils 0,02 ng/ml in der Ischämie- und in der Blutungs-Gruppe. Das Maximum lag bei 1,17 ng/ml in der IS-Gruppe bzw. 2,17 in der ICH-Gruppe. Die mediane pNf-H-Konzentration lag bei 0,10 ng/ml bei den Ischämien und 0,19 ng/ml bei den Blutungen. Es ergab sich kein

signifikanter Unterschied zwischen der Ischämie- und Blutungsgruppe ($p = 0,69$). Die Verteilung der pNf-H-Werte ist in Abbildung 1 in Form eines Box-Plots dargestellt.

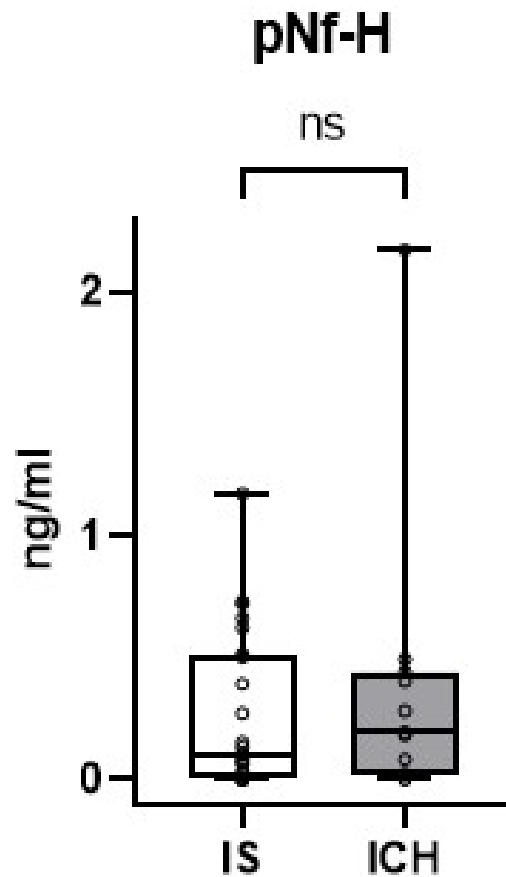


Abbildung 1: pNf-H-Konzentrationen in der Ischämie- (IS) und Blutungsgruppe (ICH)

Die Box wird unten durch das 1. Quartil und oben durch das 3. Quartil begrenzt. Die horizontale Linie dazwischen entspricht dem Median. Die unteren und oberen Whisker stellen jeweils das Minimum und Maximum dar. Es besteht kein signifikanter Unterschied der pNf-H-Serumkonzentration zwischen ICH- und IS-Gruppe ($p > 0,05$)

In der UCH-L1-Messung konnte bei 28 von 29 Patienten (96,6%) ein Wert oberhalb der Nachweisgrenze ermittelt werden. Die niedrigste noch messbare Konzentration lag bei 1,25 ng/ml in der IS-Gruppe bzw. 0,06 ng/ml in der ICH-Gruppe. Der höchste Wert wurde mit 9,63 ng/ml bei den Ischämien bzw. 7,89 ng/ml bei den Blutungen gemessen. Die mediane UCH-L1-Konzentration betrug in der Ischämie-Gruppe 5,71 ng/ml und in der Blutungs-Gruppe 2,37 ng/ml. Insgesamt war die UCH-L1-Serumkonzentration in

der Ischämie-Gruppe signifikant höher als in der Blutungs-Gruppe ($p = 0,005$). Das Ergebnis ist in Abbildung 2 in Form eines Box-Plots dargestellt.

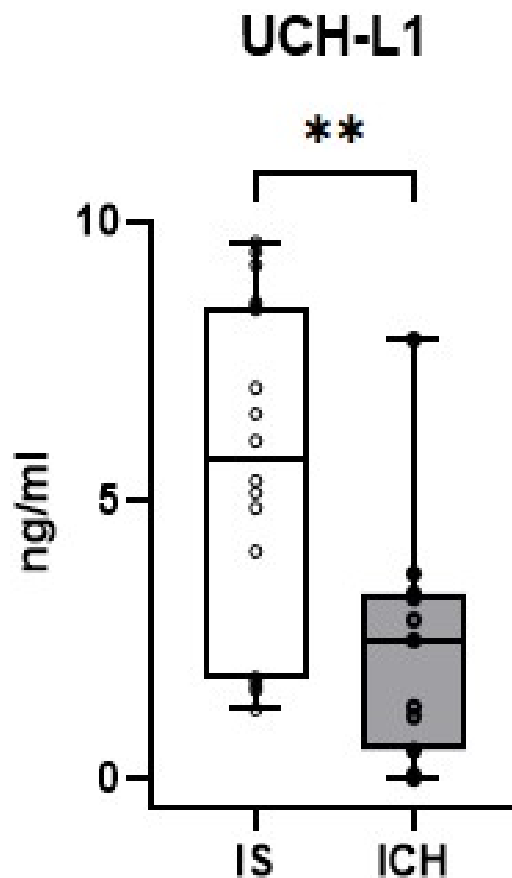


Abbildung 2: UCH-L1-Konzentrationen in der Ischämie- (IS) und Blutungsgruppe (ICH)

Die Box wird unten durch das 1. Quartil und oben durch das 3. Quartil begrenzt. Die horizontale Linie dazwischen entspricht dem Median. Die unteren und oberen Whisker stellen jeweils das Minimum und Maximum dar. Es besteht ein signifikanter Unterschied der UCH-L1-Serumkonzentration zwischen ICH- und IS-Gruppe ($p < 0,01$)

Die GFAP-Messung ergab bei allen 45 Patienten einen Wert oberhalb der Nachweisgrenze. Die niedrigste noch messbare Konzentration lag bei jeweils 0,01 ng/ml in der IS- und ICH-Gruppe. Der höchste Wert wurde mit 9,9 ng/ml bei den Ischämien bzw. 1260,1 ng/ml bei den Blutungen gemessen. Die mediane GFAP-Konzentration betrug in der Ischämie-Gruppe 0,01 ng/ml und in der Blutungs-Gruppe 2,87 ng/ml. Insgesamt war die GFAP-Serumkonzentration in der ICH-Gruppe signifikant

höher als in der IS-Gruppe ($p = 0,00026$). Das Ergebnis ist in Abbildung 3 in Form eines Box-Plots dargestellt.

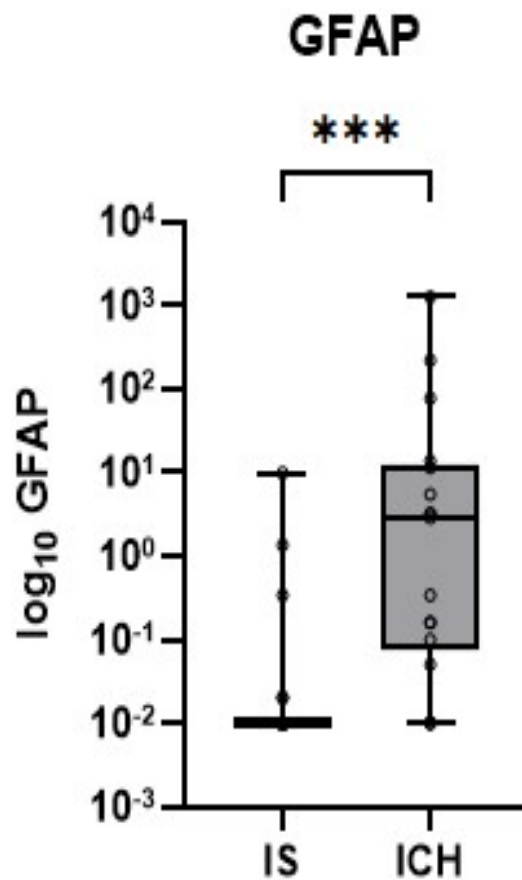


Abbildung 3: GFAP-Konzentrationen in der Ischämie- (IS) und Blutungsgruppe (ICH)

Die y-Achse ist logarithmisch skaliert. Die Box wird unten durch das 1. Quartil und oben durch das 3. Quartil begrenzt. Die horizontale Linie dazwischen entspricht dem Median. Die unteren und oberen Whisker stellen jeweils das Minimum und Maximum dar. Es besteht ein signifikanter Unterschied der GFAP-Serumkonzentration zwischen ICH- und IS-Gruppe ($p < 0,001$)

Eine Gesamtübersicht zu den bestimmten Proteinkonzentrationen in den einzelnen Messgruppen findet sich in

Tabelle 8.

		Tau	MBP	pNf-H	UCH-L1	GFAP
Ischämien	n	21	24	24	18	28
	mittleres Alter (Jahre)	77,8	76,2	76,2	76,6	77,0
	Geschlecht (m:w)	9:12	11:13	11:13	9:9	12:16
	mittlere Zeit (Minuten)	185,9	105,5	105,5	125,4	94,0
	mittlerer NIHSS	12,3	16,3	16,3	13,8	16,3
	OCSF-Klassifikation					
	PACS	17	18	18	16	22
	TACS	4	6	6	2	6
	Gefäßverschluss:					
	Karotis-T	2	0	0	1	1
	M1	13	12	12	11	15
	M2	2	9	9	1	9
	ACI + ACM	2	1	1	3	1
	M1/M2	2	1	1	2	1
nicht nachweisbar	0	1	1	0	1	
Konzentration (Median)	0 pg/ml	0 ng/ml	0,10 ng/ml	5,71 ng/ml	0,01 ng/ml	
Blutungen	n	11	11	11	11	17
	mittleres Alter (Jahre)	66,7	69,6	69,6	62,3	65,9
	Geschlecht (m:w)	6:5	3:8	3:8	6:5	6:11
	mittlere Zeit (Minuten)	184,40	74,5	74,5	159,7	97,4
	mittlerer NIHSS	12,3	18,8	18,8	12,0	15,2
	mittleres ICH-Volumen (ml)	87,02	65,70	65,70	78,89	60,5
	Blutungslokalisierung					
	typisch	8	4	4	8	9
	atypisch	3	7	7	3	8
Konzentration (Median)	0 pg/ml	0 ng/ml	0,19 ng/ml	2,49 ng/ml	2,87 ng/ml	
p-Wert	0,70	0,52	0,69	0,005	0,000026	

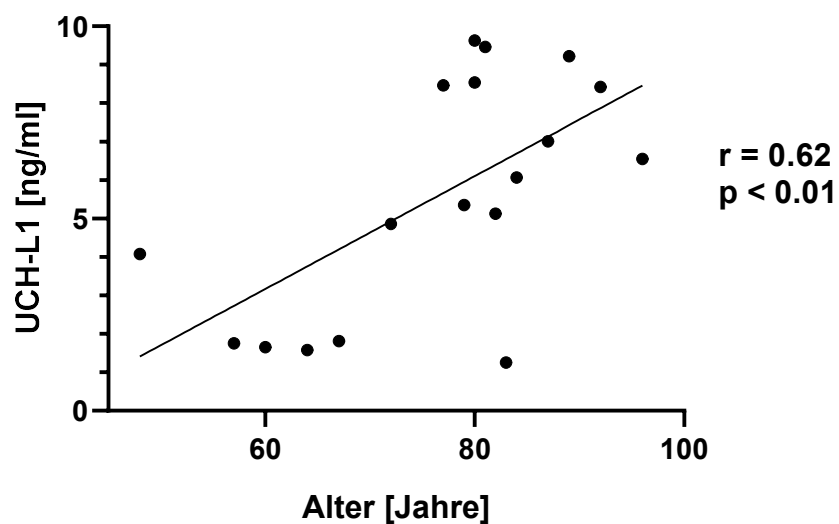
Tabelle 8: Übersicht Proteinkonzentrationen

3.3 Weitere Analysen der UCH-L1- und GFAP-Serumkonzentrationen

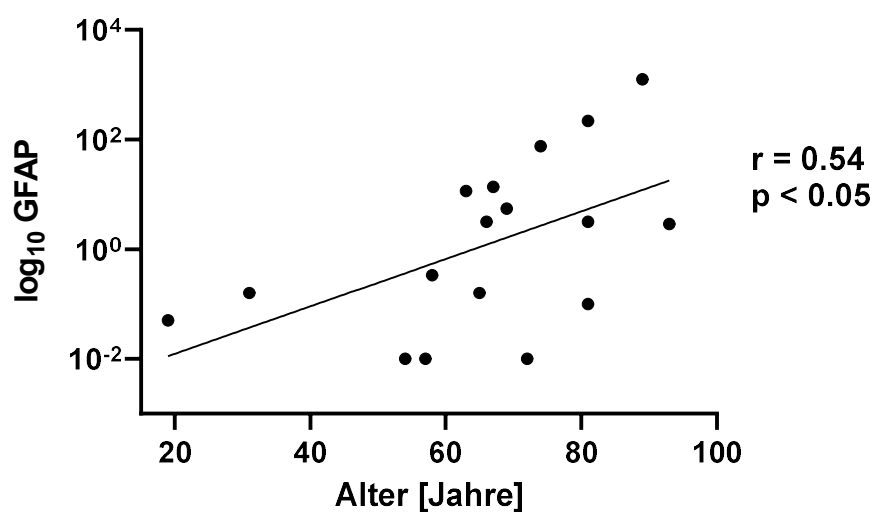
Für UCH-L1 und GFAP ergaben sich signifikante Unterschiede der Serumkonzentrationen in der Ischämie-Gruppe verglichen mit der Blutungsgruppe. Mittels Pearson-Korrelation bei normalverteilten Merkmalen bzw. Spearman-Korrelation bei nicht normalverteilten Merkmalen wurden mögliche Zusammenhänge mit dem Patientenalter, dem NIHSS-Wert, der Zeit zwischen Symptombeginn und Blutentnahme, sowie dem ICB-Volumen überprüft.

Für den Großteil der untersuchten Parameter ergaben sich keine Hinweise auf eine mögliche Beeinflussung der Protein-Serumkonzentrationen. Eine Ausnahme bildet zum einen eine positive Korrelation der UCH-L1-Werte in der IS-Gruppe mit dem Patientenalter ($r = 0,62$, $p = 0,006$). Zum anderen eine positive Korrelation der GFAP-Werte in der ICH-Gruppe ebenfalls mit dem Patientenalter ($r = 0,54$, $p = 0,03$), sowie mit dem NIHSS-Wert ($r = 0,69$, $p = 0,04$) und mit dem ICB-Volumen ($r = 0,60$, $p = 0,01$). Die Korrelationen sind in Abbildung 4 dargestellt.

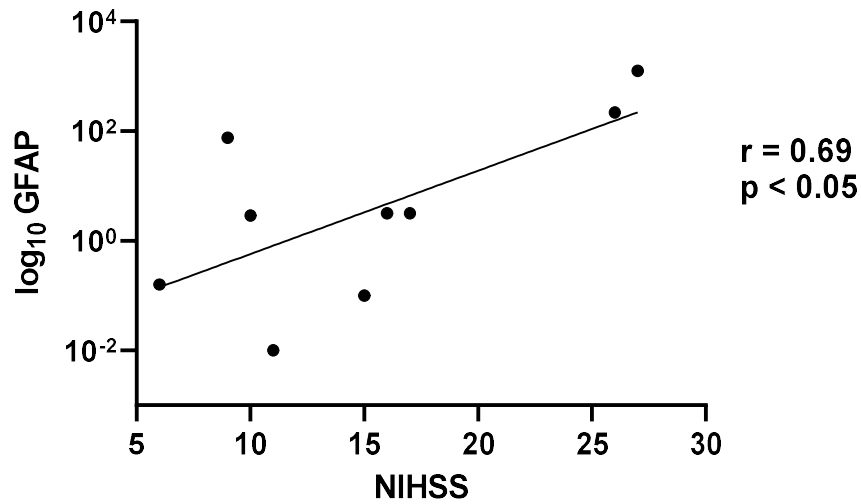
A



B



C



D

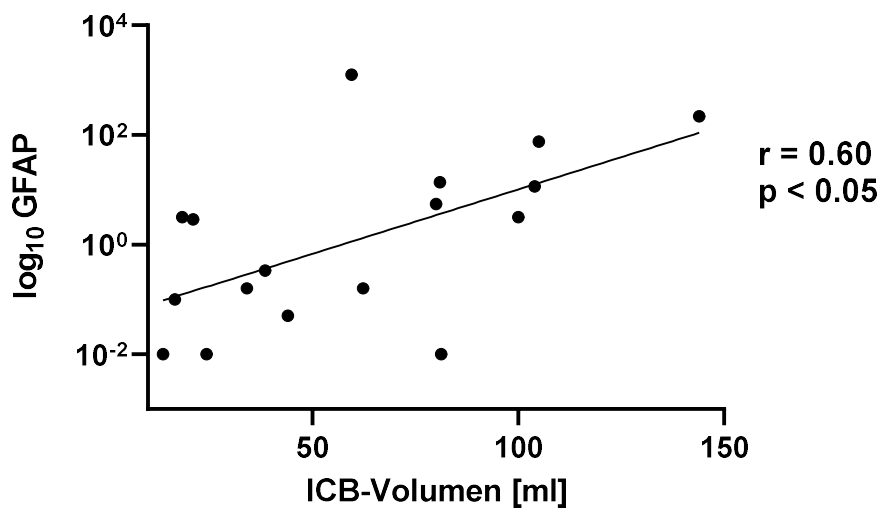


Abbildung 4: Korrelation mit klinischen Daten

Dargestellt sind die Korrelation von A: der UCH-L1-Konzentration in der IS-Gruppe mit dem Patientenalter, B: der GFAP-Konzentration in der ICH-Gruppe mit dem Patientenalter, C: der GFAP-Konzentration in der ICH-Gruppe mit dem NIHSS-Wert und D: der GFAP-Konzentration in der ICH-Gruppe mit dem ICB-Volumen. Die GFAP-Konzentrationen (B-D) sind jeweils in logarithmischer Skala abgebildet.

3.4 Massenspektrometrische Ergebnisse

Die ersten Experimente zur Probenvorbereitung für die Massenspektrometrie wurden mit biochemischen Verfahren durchgeführt, die Serumalbumin und Glykosylierungen an Proteinen reduzierten. Diese Herangehensweise ergab aber deutlich heterogene Ergebnisse zwischen den Proben und wurde daher durch eine vereinfachte Proteinanalytik abgelöst. Wie unter 2.9 beschrieben, wurde zunächst der Proteingehalt bestimmt (siehe

Tabelle 7) und dann 200 µg Gesamtprotein von jedem Patienten und 3 bzw. 4 technische Replikate von den Probanden mit Guanidiniumhydrochlorid denaturiert und mit Trypsin in Peptide verdaut. Die Peptide wurden in einem Massenspektrometer quantifiziert und die Aminosäuresequenz mit der Tandemmassenspektrometrie (MS/MS) ermittelt. Die Spektren wurden wie unter 2.9 und 2.10 beschrieben analysiert und statistisch ausgewertet.

Insgesamt wurden 368 Proteingruppen identifiziert und quantifiziert. Es werden deutlich mehr Proteine im Serum von Menschen erwartet, jedoch sind Proteine mit geringer Menge in solchen Analysen stark unterrepräsentiert. Das größte Problem ist die dynamische Breite der Proteinmengen. Serumalbumin, Immunglobuline und Transportproteine machen einen großen Teil aus und sind in der Peptidanalyse verstärkt vertreten. Aus diesem Grund wurden die tryptischen Peptide zusätzlich mittels Kationenaustauschchromatographie weiter aufgetrennt. Mit der Menge an identifizierten Proteinen ist die Analyse durchaus mit der Literatur vergleichbar und stellt demnach einen guten Startpunkt für eine Pilotstudie zur Identifizierung von Biomarkern in ICH und IS dar (108).

Die Gesamtergebnisse aller Proteine wurden zunächst gegen die aller Proben aufgetragen und somit die Qualität der MS-Analyse geprüft. Da es sich bei allen Proben um menschliches Serum handelte, in dem die gleichen Proteinmengen analysiert wurden, ist anzunehmen, dass sich die Proben nur um wenige Proteinkomponenten unterscheiden. Somit ist eine sehr hohe Korrelation zwischen den Messungen zu erwarten. Abbildung 5 zeigt die Korrelationen der Messungen zwischen den Proben.

Ergebnisse

Jedes Protein wurde zu dem jeweiligen Protein unter den Proben aufgetragen. Gleiche Proteinmengen sammeln sich so als Diagonale und zeigen damit die Ähnlichkeit der Proteinmengen. Die Einfärbung der Korrelationskoeffizienten in Abbildung 6 zeigt sehr deutlich, dass sich die technischen Replikate der gesunden Probanden am stärksten gleichen. Die ermittelten Korrelationskoeffizienten ($> 0,88$) zeigen deutlich, dass die massenspektrometrische Analyse sehr homogene Daten liefert und die Ergebnisse eine sehr gute Qualität haben.

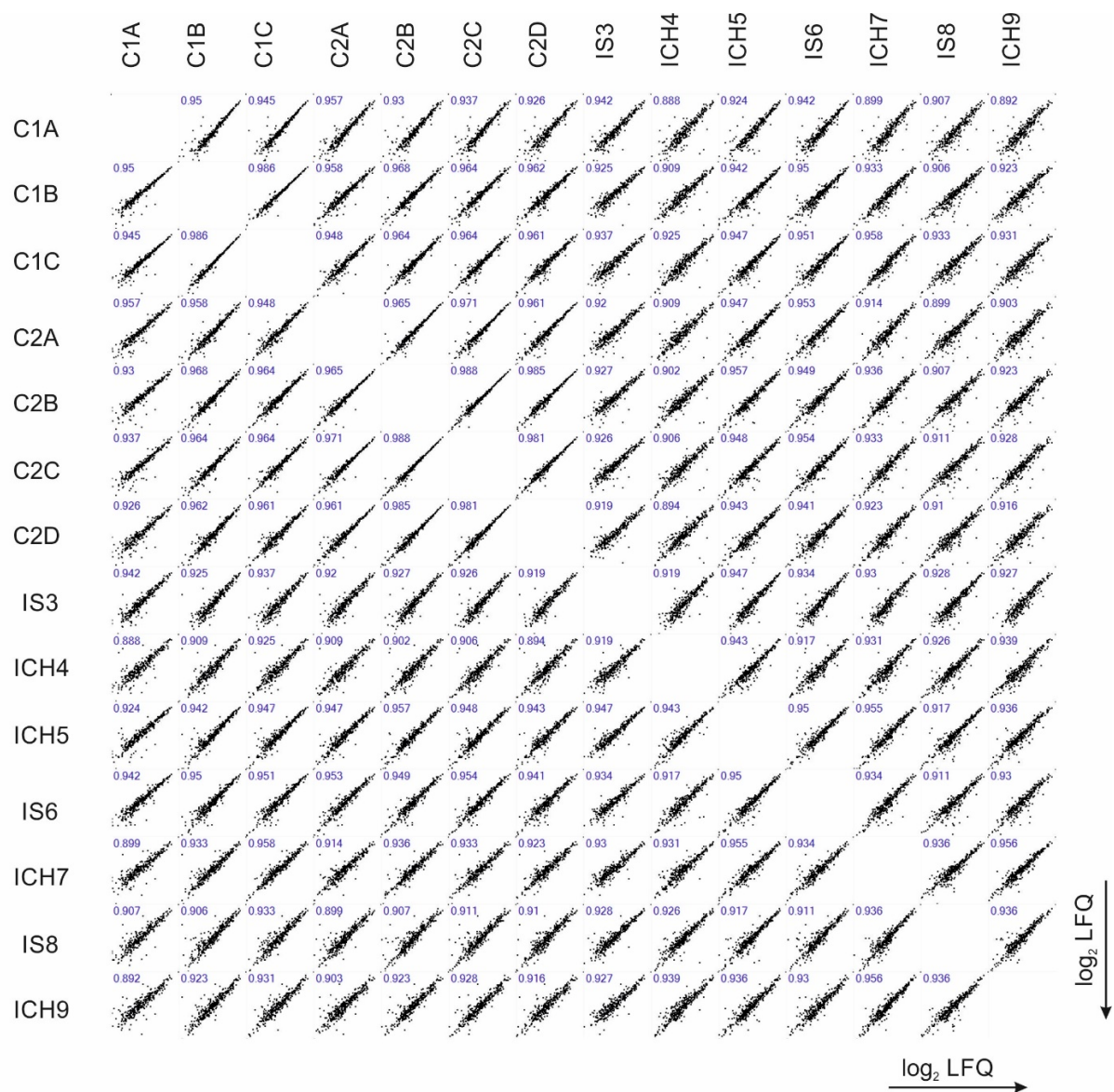


Abbildung 5: Korrelation der Proteinwerte aus den MS-Proben

Ergebnisse

Aufgetragen sind die \log_2 -markierungsfreien Proteinwerte aus der massenspektrometrischen Proteinanalyse. Gleiche Proteinmengen sammeln sich als Diagonale und zeigen damit die Ähnlichkeit der Proteinmengen. Es wird angenommen, dass sich menschliche Seren in ihrer Gesamtheit nicht oder nur geringfügig unterscheiden.

	C1A	C1B	C1C	C2A	C2B	C2C	C2D	IS3	ICH4	ICH5	IS6	ICH7	IS8	ICH9
C1A		0.95	0.94	0.96	0.93	0.94	0.93	0.94	0.89	0.92	0.94	0.90	0.91	0.89
C1B	0.95		0.99	0.96	0.97	0.96	0.96	0.92	0.91	0.94	0.95	0.93	0.91	0.92
C1C	0.94	0.99		0.95	0.96	0.96	0.96	0.94	0.92	0.95	0.95	0.96	0.93	0.93
C2A	0.96	0.96	0.95		0.97	0.97	0.96	0.92	0.91	0.95	0.95	0.91	0.90	0.90
C2B	0.93	0.97	0.96	0.97		0.99	0.99	0.93	0.90	0.96	0.95	0.94	0.91	0.92
C2C	0.94	0.96	0.96	0.97	0.99		0.98	0.93	0.91	0.95	0.95	0.93	0.91	0.93
C2D	0.93	0.96	0.96	0.96	0.99	0.98		0.92	0.89	0.94	0.94	0.92	0.91	0.92
IS3	0.94	0.92	0.94	0.92	0.93	0.93	0.92		0.92	0.95	0.93	0.93	0.93	0.93
ICH4	0.89	0.91	0.92	0.91	0.90	0.91	0.89	0.92		0.94	0.92	0.93	0.93	0.94
ICH5	0.92	0.94	0.95	0.95	0.96	0.95	0.94	0.95	0.94		0.95	0.96	0.92	0.94
IS6	0.94	0.95	0.95	0.95	0.95	0.95	0.94	0.93	0.92	0.95		0.93	0.91	0.93
ICH7	0.90	0.93	0.96	0.91	0.94	0.93	0.92	0.93	0.93	0.96	0.93		0.94	0.96
IS8	0.91	0.91	0.93	0.90	0.91	0.91	0.91	0.93	0.93	0.92	0.91	0.94		0.94
ICH9	0.89	0.92	0.93	0.90	0.92	0.93	0.92	0.93	0.94	0.94	0.93	0.96	0.94	

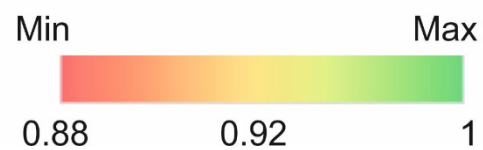


Abbildung 6: Pearson-Korrelationskoeffizienten zwischen den einzelnen Proben

Mit Korrelationskoeffizienten $> 0,88$ lieferte die massenspektrometrische Analyse sehr homogene Daten mit qualitativ hochwertigen Ergebnissen. Die Farbmatrix verdeutlicht, dass die Kontrollen untereinander die stärkste Ähnlichkeit haben. Gegenüber der Kontrollgruppe haben ICH4, ICH7, IS8 und ICH9 die größten Abweichungen. Die Komponenten, die diese Änderungen hervorrufen, werden in weiteren statistischen Untersuchungen dargestellt.

Im Folgenden wurde zunächst die Patientengruppe als Ganzes betrachtet und ohne Differenzierung zwischen IS und ICH mit der Kontrollgruppe hinsichtlich signifikant unterschiedlicher Proteine im Serum-Proteom verglichen. Das Ergebnis dieser Signifikanz-Testung ist in

Abbildung **7** als Heatmap mit hierarchischem Clustering dargestellt. Die einzelnen Proteine mit signifikantem Unterschied zwischen Patientenkollektiv und Kontrollgruppe sind in Tabelle 10 im Anhang aufgeführt.

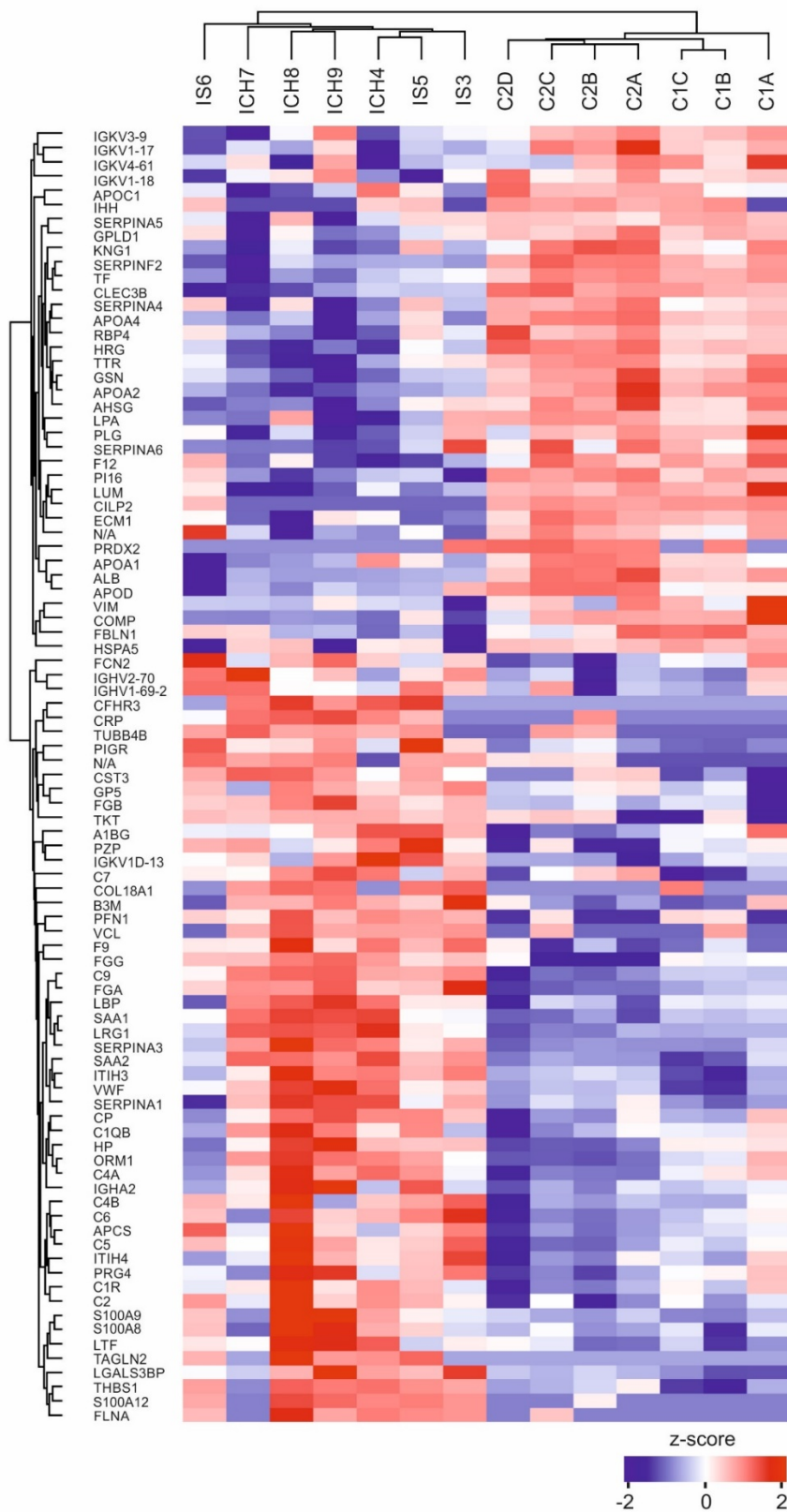


Abbildung 7: Die Heatmap zeigt signifikant unterschiedliche Proteine zwischen der Patienten- und Kontrollgruppe mit hierarchischem Clustering (Distanz: Euclidean)

Um nun die Proteine zu detektieren, die Unterschiede in den verschiedenen Krankheitsentitäten zeigen, wurden die Serumproben der einzelnen Krankheitsbilder zunächst mit der Kontrollgruppe verglichen. Dabei konnten zusätzliche Proteine entdeckt werden, die in der ersten Ergebnistabelle fehlten. Tabelle 11 und Tabelle 12 im Anhang zeigen die jeweils signifikant unterschiedlichen Proteine in ICH- bzw. IS-Gruppe verglichen mit der Kontrollgruppe.

Um innerhalb dieser Arbeit eine Top-Liste potentieller Kandidatenproteine für Biomarker zur Differenzierung von IS und ICH zu erstellen, wurden zunächst aus Tabelle 11 und Tabelle 12 die Proteine herausgefiltert, die mindestens zweifach erhöht waren: Gegenüber der Kontrollgruppe waren dies 43 Proteine, 17 davon fanden sich bei beiden Krankheitsbildern. In den Untergruppen traten aber auch signifikant erhöhte Proteine auf, die in der jeweils anderen Gruppe nicht als signifikant ermittelt wurden. Davon 11 Proteine in der IS- und 15 in ICH-Gruppe. Diese Ergebnisse sind in **Abbildung 8: Venn-Diagramm**

Gegenüber der Kontrollgruppe waren 17 Proteine sowohl in der ICH- als auch in der IS-Gruppe mindestens zweifach erhöht, 11 Proteine nur in der IS-Gruppe und 15 Proteine nur in der ICH-Gruppe.

als Venn Diagramm dargestellt.

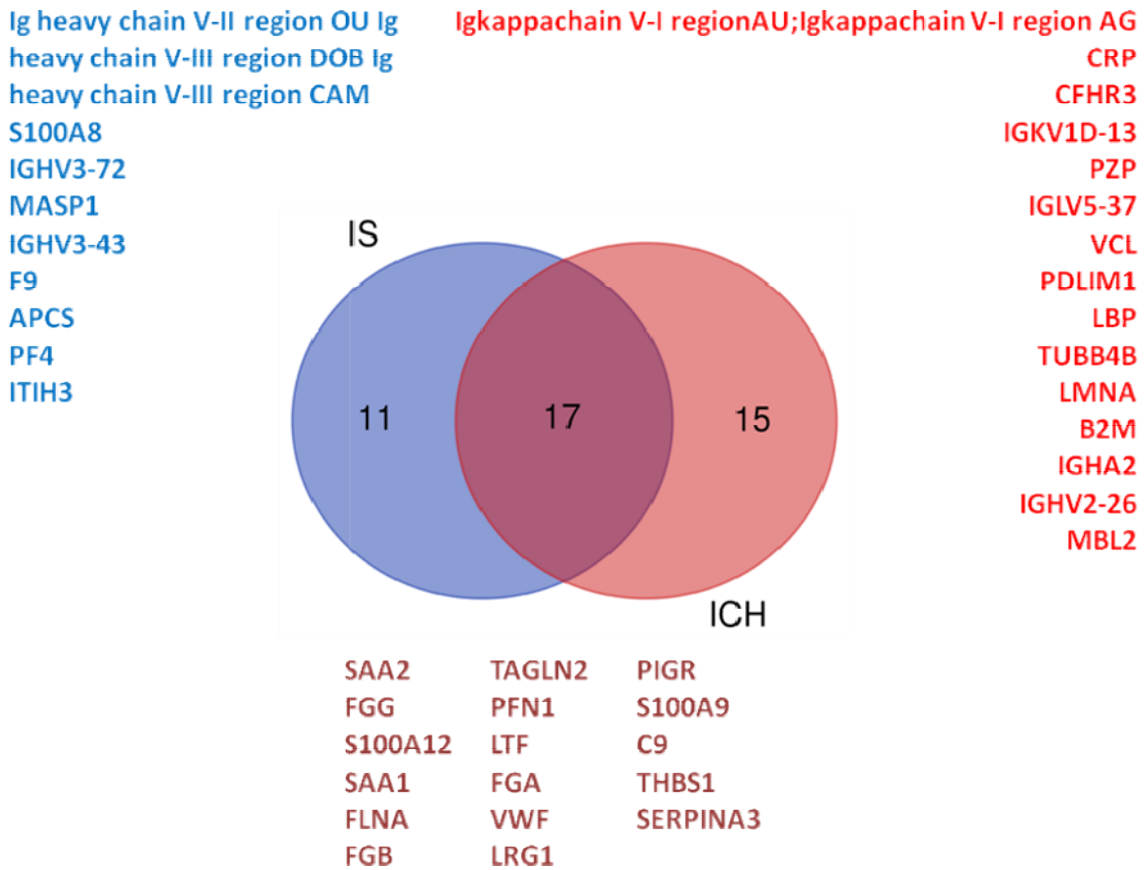


Abbildung 8: Venn-Diagramm

Gegenüber der Kontrollgruppe waren 17 Proteine sowohl in der ICH- als auch in der IS-Gruppe mindestens zweifach erhöht, 11 Proteine nur in der IS-Gruppe und 15 Proteine nur in der ICH-Gruppe.

Zuletzt wurden noch die signifikant unterschiedlichen Proteine zwischen IS- und ICH-Gruppe identifiziert, wie in Tabelle 13 im Anhang dargestellt. Hieraus ergab sich aufgrund der massenspektrometrischen Daten in der vorliegenden Arbeit letztlich eine Top-Liste potentieller Biomarker zur Differenzierung von IS und ICH. Dabei sind jedoch nicht alle Proteine im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant. In Tabelle 9 sind diese Proteine aufgeführt. Am dunkelsten eingefärbt sind Kandidatenproteine aus dem Venn-Diagramm mit mindestens zweifacher Erhöhung zur Kontrollgruppe. In mittlerem Farbton sind die signifikant unterschiedlichen Proteine zwischen IS- und ICH-Gruppe ohne x-fache Abstufung, aber mit gleichzeitiger Signifikanz zur Kontrollgruppe dargestellt. Am hellsten eingefärbt finden sich die nur zwischen IS- und ICH-Gruppe signifikant unterschiedlichen Proteine. Diese Top-Liste enthält insgesamt 42 Proteine.

Dabei handelt es sich bei 20 Proteinen um allgemeine Struktur- und Funktionsproteine wie Myosin-Ketten, Hämoglobin-Untereinheiten und Bestandteile von Immunglobulinen, die aufgrund ihres ubiquitären Vorkommens und ihrer hohen interindividuellen Schwankungen als Biomarker ungeeignet erscheinen. Die verbliebenen 22 Proteine, auf die im Folgenden auch näher eingegangen werden soll, sind in Tabelle 9 **fett und unterstrichen** markiert.

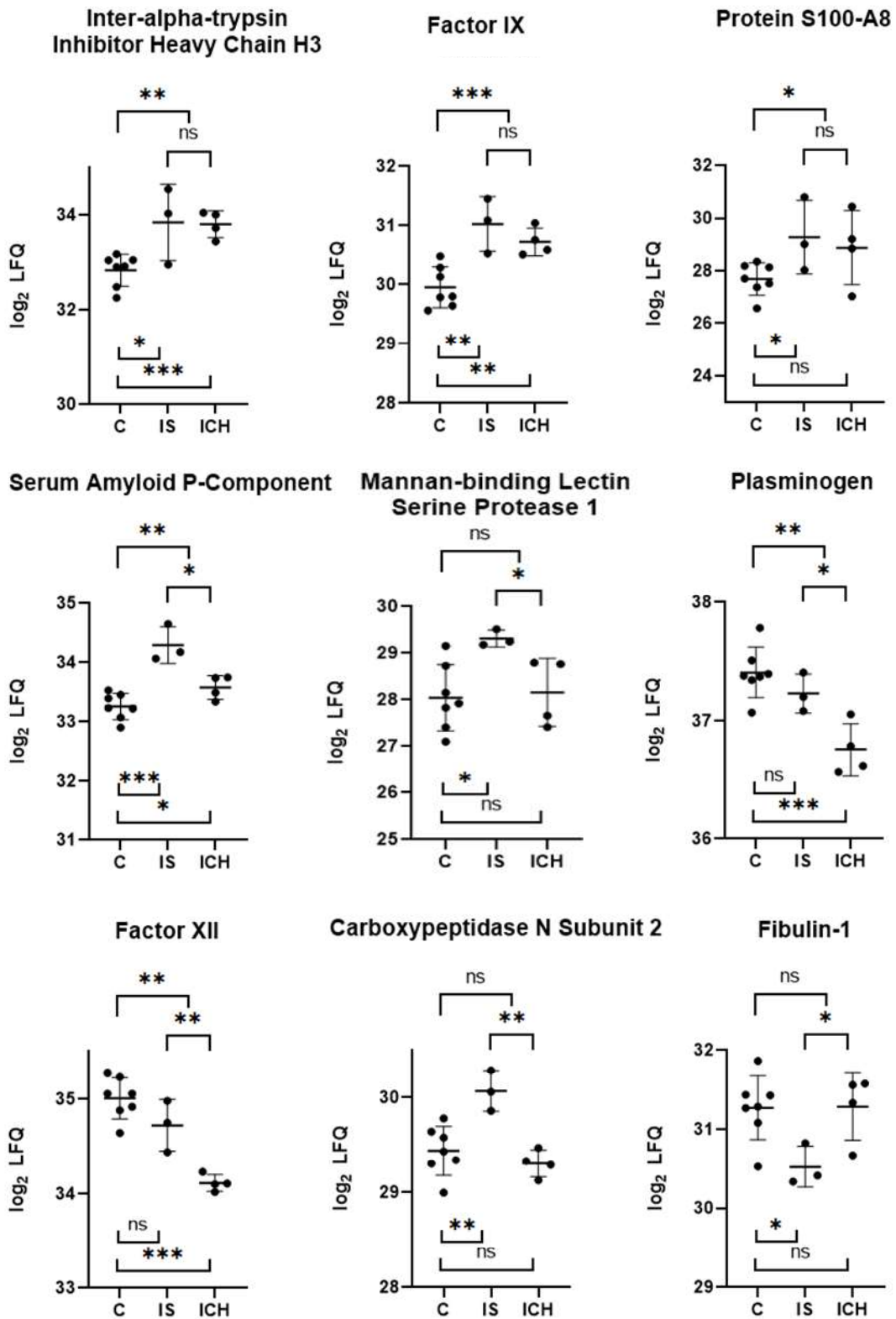
Uniprot Nr.	Protein
Q06033	<u>Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3</u>
A0A0J9YY99;P01768	Ig heavy chain V-III region CAM
P00740	<u>Coagulationfactor IX</u>
P05109	<u>Protein S100-A8</u>
P02743	<u>Serum amyloid P-component</u>
P02776	<u>Platelet factor 4;Platelet factor 4, short form</u>
P48740	<u>Mannan-bindinglectinserineprotease 1</u>
A0A0B4J1Y9	IGHV3-72
P01782	Ig heavy chain V-III region DOB
P01814	Ig heavy chain V-II region OU
A0A0B4J1X8	IGHV3-43
P00747	<u>Plasminogen</u>
P00748	<u>Coagulationfactor XII</u>
P22792	<u>Carboxypeptidase N subunit 2</u>
P04430	Igkappachain V-I region BAN
P04433;A0A0A0MRZ8	Igkappachain V-III region VG
P27169	<u>Serum paraoxonase/arylesterase 1</u>
P69905	Hemoglobinsubunitalpha
P68871	Hemoglobin subunit beta;LVV-hemorphin-7;Spinorphin
P00915;E5RH81;E5RFE7;E5RHP7	<u>Carbonicanhydrase 1</u>

P02042	Hemoglobinsubunitdelta
P08590	Myosin light chain 3
P10916	Myosin regulatory light chain 2, ventricular/cardiac muscle isoform; Myosin regulatory light chain 10
P35579	Myosin-9
P28799	<u>Granulins;Acrogranin;Paragranulin;Granulin-1;Granulin-2;Granulin-3;Granulin-4;Granulin-5;Granulin-6;Granulin-7</u>
P23142	<u>Fibulin-1</u>
P01857	Ig gamma-1 chain C region
P02741	<u>C-reactiveprotein</u>
AOA0B4J2D9	IGKV1D-13
Q02985	Complement factor H-related protein 3
AOA075B6J1	IGLV5-37
P20742	<u>Pregnancyzoneprotein</u>
Q3BDU5;P02545;Q5TCI8	<u>Prelamin-A/C;Lamin-A/C</u>
P18428	<u>Lipopolysaccharide-bindingprotein</u>
P01594;P01593	Igkappachain V-I regionAU;Igkappachain V-I region AG
AOA0B4J1V2	IGHV2-26
P18206	<u>Vinculin</u>
P68371	<u>Tubulin beta-4B chain</u>
P11226	<u>Mannose-bindingprotein C</u>
P01877	Ig alpha-2 chain C region
P61769	<u>Beta-2-microglobulin</u>
O00151	<u>PDZ and LIM domain protein 1</u>

Tabelle 9: Top-Liste möglicher Kandidatenproteine

Um die Top-Liste weiter einzugrenzen wurde diese nun mit den MS-Einzeldaten überprüft. In

Abbildung 9 sind die Proteine aus der Top-Liste abgebildet, die innerhalb der einzelnen Gruppen die meisten Signifikanzunterschiede aufwiesen.



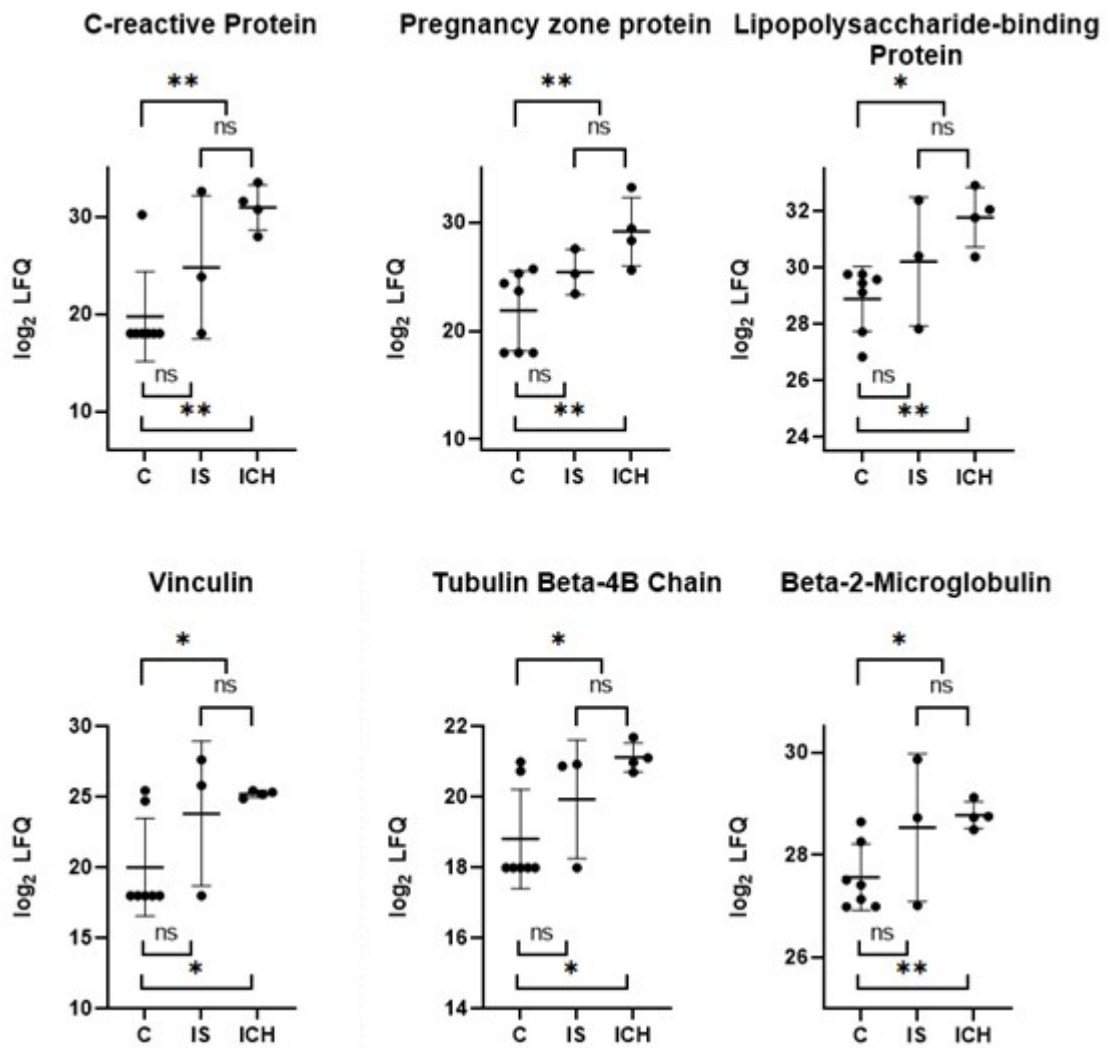


Abbildung 9: Einzelne Proteine aus der Top-Liste mit den meisten Signifikanzunterschieden innerhalb der einzelnen Gruppen. Die y-Achse ist logarithmisch skaliert. Die Scatter Plots zeigen die einzelnen Messwerte mit Mittelwert und Standardabweichung. Oberhalb der Scatter Plots sind die Unterschiede zwischen IS- und ICH-Gruppe bzw. zwischen Patienten- und Kontrollgruppe (C) aufgetragen. Unterhalb des Scatter Plotts finden sich die Unterschiede zwischen IS- und Kontrollgruppe, sowie zwischen ICH- und Kontrollgruppe

4 Diskussion

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Frage, ob mittels Serum-Biomarkern bereits in der Frühphase zwischen ischämischen und hämorrhagischen Schlaganfällen differenziert werden kann. Eine solche Unterscheidung ist aus therapeutischen Gründen zwingend erforderlich. Hinsichtlich des Patienten-Outcomes ist eine möglichst kurze Zeitspanne zwischen Auftreten der Schlaganfallsymptomatik und Therapiebeginn von Bedeutung (18, 20, 21). Neben der bislang als Goldstandard geltenden computertomographischen Diagnostik wäre hierfür auch eine Testung von Serumproben denkbar.

Zur Identifizierung solcher diagnostischer Biomarker wurden in der vorliegenden Arbeit bestimmte Proteine aufgrund von pathophysiologischen Überlegungen und in der Literatur bereits beschriebenen Erkenntnissen ausgewählt und im vorliegenden Patientenkollektiv durch ELISA-Tests untersucht. Die Auswahl der Biomarker lässt sich rational begründen, da zum einen bereits Hinweise bestehen, dass das jeweilige Protein als brauchbarer Biomarker fungieren könnte. Zum anderen ist pathophysiologisch nachvollziehbar, weshalb das jeweilige Protein von untergehenden Neuronen freigesetzt und im Serum detektierbar wird. Natürlich besteht durch diese Vorselektion der Nachteil, dass andere, möglicherweise besser geeignete Proteine, nicht getestet und somit übersehen werden.

An dieser Stelle setzt der hypothesenfreie Ansatz in der vorliegenden Arbeit an: mittels massenspektrometrischer Verfahren sollte das gesamte Serum-Proteom von Schlaganfall-Patienten hinsichtlich signifikanter Konzentrationsunterschiede von Serumproteinen bei Blutungs- und Ischämiepatienten untersucht werden, ohne dass zuvor eine Vorauswahl getroffen wurde.

4.1 Serumkonzentrationen der mittels ELISA-Tests untersuchten Proteine

4.1.1 UCH-L1 und GFAP

Bei der Analyse der ELISA-Messdaten konnte UCH-L1 in fast allen Proben nachgewiesen werden, wobei bei ischämischen Schlaganfällen signifikant höhere

Konzentrationen vorlagen als bei intrazerebralen Blutungen ($p = 0,005$). GFAP war in allen Proben nachweisbar und war bei hämorrhagischen Schlaganfällen signifikant höher konzentriert als bei ischämischen Schlaganfällen ($p < 0,00005$).

Beim Hirninfarkt kommt es durch die ischämische Kaskade infolge der Hypoperfusion letztlich zum Zusammenbruch des Membranpotenzials mit glutamatvermittelter Exzitotoxizität sowie apoptotischen Vorgängen. Welche Rolle das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) und insbesondere UCH-L1 beim ischämischen Schlaganfall genau spielt ist derzeit noch nicht abschließend geklärt (76). Das UPS scheint in Ischämie-Toleranz-Vorgänge involviert zu sein (109). Ob UCH-L1 als Teil des UPS pro- oder antiapoptotisch wirkt, wird derzeit kontrovers diskutiert (41, 44, 76). Von vielen Autoren wird eine Upregulation von UCH-L1 infolge einer Ischämie angenommen (44, 76, 110), obgleich es auch Hinweise für ein gegensätzliches Verhalten gibt (111). Aggregate fehlgefalteter Proteine sollen nach einer zerebralen Ischämie vermehrt auftreten und mitunter zu einer verstärkten Aktivität des Ubiquitin-Proteasom-Systems führen (42, 46). Daneben führt die Übererregung von NMDA-Rezeptoren im Sinne der Exzitotoxizität zu einer Downregulation des Ubiquitin-Proteasom-Systems, was den neuronalen Zelltod begünstigen soll (76). Eine wesentliche Ausnahme hierzu bildet UCH-L1, das durch die Exzitotoxizität nicht beeinflusst wird (112). Eine NMDA-Rezeptor-Aktivierung im Allgemeinen führt zu einer erhöhten UCH-L1-Aktivität. Die hierdurch erhöhte Konzentration von freiem monomeren Ubiquitin scheint in die Vorgänge der synaptischen Plastizität und des Remodelings involviert zu sein (113).

Eine mögliche Erklärung für die beim ischämischen Schlaganfall signifikant höheren UCH-L1-Konzentrationen könnten also zum einen die hier pathophysiologisch zugrunde liegenden Apoptosevorgänge sein, die wie bereits beschrieben eine Upregulation von UCH-L1 bedingen. Zum anderen sind Neurone wesentlich sensibler für eine Hypoxie als Gliazellen. Gliazellen bilden zudem mit einem Verhältnis von 10:1 den weitaus größeren Anteil an ZNS-Zellen im Vergleich zu Neuronen (114). Eine Ischämie führt somit zu einer vorwiegenden Schädigung von Neuronen mit entsprechender Freisetzung neuronaler Proteine wie UCH-L1. Beim hämorrhagischen Schlaganfall, dem vor allem eine unmittelbare mechanische Zellschädigung mit Nekrosevorgängen zugrunde liegt, kommt es dagegen eher zu einer unspezifischen Destruktion des Hirngewebes mit einer dominierenden Schädigung der zehnmal

häufiger vorkommenden glialen Zellen und dementsprechender Freisetzung glialer Proteine wie GFAP. Weiterhin sind histopathologische Nekrosezeichen beim ischämischen Schlaganfall erst ca. 6-12 Stunden nach Symptombeginn feststellbar. Die Freisetzung von GFAP erfolgt beim ischämischen Schlaganfall dementsprechend verzögert (115) und erhöhte Plasmaspiegel sind erstmals ca. 12-24 h nach Auftreten des Gefäßverschlusses zu beobachten (116). Demgegenüber steht die unmittelbare mechanische Schädigung durch eine intrazerebrale Blutung mit rascher GFAP-Freisetzung ins Blut (32, 116). Sowohl für UCH-L1 als auch für GFAP sind keine Transporter bekannt, die ein Erscheinen des jeweiligen Proteins im Extrazellulärraum bzw. im Blutserum erklären würden (47, 115). Die Nachweisbarkeit von UCH-L1 bzw. GFAP im Serum dürfte somit auf eine Zelledestruktion zurückzuführen sein (117).

Zusammenfassend scheint es pathophysiologisch angemessen erklärbar zu sein, dass es beim ischämischen Schlaganfall mit dominierenden apoptotischen Vorgängen in Neuronen zu höheren UCH-L1-Konzentrationen kommt, wohingegen bei der intrazerebralen Blutung mit diffuser nekrotischer Zelledestruktion vor allem der Gliazellen erhöhte GFAP-Konzentrationen nachweisbar sind.

4.1.2 pNf-H, MBP und Tau

Die pNf-H-Konzentrationen lagen beim Großteil der Proben oberhalb der Nachweisgrenze, zeigten aber keinen signifikanten Unterschied zwischen IS- und ICH-Gruppe ($p = 0,69$). Die MBP- und Tau-Konzentrationen lagen weitestgehend unterhalb der Nachweisgrenze.

Bidmon et al. konnten zeigen, dass kortikale Infarkte im Tiermodell eine Reduktion des pNf-H-Gehalts in der Perinfarktzone verursachen (118). Ein ischämischer Schlaganfall beim Menschen soll außerdem die pNf-H-Bildung in den Perikaryen geschädigter Neurone induzieren (119). pNf-H soll beim Hirninfarkt also einerseits vermehrt gebildet werden, scheint aber im Infarktbereich insgesamt vermindert zu sein. Möglicherweise liegt dem eine pNf-H-Freisetzung ins Blut zugrunde. Mehrere Studien belegen, dass pNf-H nach einem ischämischen Schlaganfall, einer intrazerebralen Blutung oder einer traumatischen Hirnverletzung sowohl im Tiermodell als auch in vivo im Blut nachweisbar und signifikant höher konzentriert ist als bei Gesunden bzw. in

Kontrollproben (58, 59, 61, 62). Zumeist steigen die pNf-H-Werte im Verlauf weiter an und erreichen nach wenigen Tagen einen Peak (58, 59). Es gibt auch Hinweise dafür, dass pNf-H bereits in der Frühphase erhöht ist (61, 62, 120). Auch ist eine positive Korrelation zwischen dem Schädigungsmaß und der pNf-H-Konzentration beschrieben (59, 62). All diese Studien untersuchten allerdings nur jeweils eine Krankheitsentität ohne einen Vergleich zwischen IS- und ICH-Patienten. Martínez-Morillo et al. konnten 2014 mittels massenspektrometrischer Verfahren erstmals signifikant höhere Konzentrationen der Neurofilamentform M im Liquor von Patienten mit Hirnblutungen im Vergleich zu ischämischen Schlaganfällen nachweisen (121). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass pNf-H bereits in der Frühphase in der Mehrzahl der untersuchten Serumproben nachweisbar ist, aber (noch?) kein signifikanter Unterschied zwischen der IS- und ICH-Gruppe besteht. Dies bestätigt zwar die Hypothese, dass ein pNf-H-Nachweis im Serum schon früh eine axonale Schädigung anzeigt (63, 119). Es scheint aber hinsichtlich der Freisetzungskinetik von pNf-H keine spezifischen Unterschiede zwischen einer primär axonalen Schädigung durch eine direkte mechanische Alteration bei ICH und einer sekundär axonalen Schädigung durch eine neuronale Ischämie zu geben.

Der Nachweis von Myelin Basic Protein (MBP) in Serum und Liquor steht insbesondere im Zusammenhang mit der Diagnostik der multiplen Sklerose (63, 64). Aber auch beim ischämischen Schlaganfall ist nach Zusammenbruch der Blut-Hirnschranke MBP im Liquor nachweisbar (122–125). Hill et al. konnten zeigen, dass MBP auch im Serum von Schlaganfallpatienten detektierbar ist (68) und im Rahmen weiterer Evaluierung der Stroke recombinant tissue plasminogen activator Stroke Study durch Jauch et al. konnte MBP bereits in den ersten 24 h nach Symptomonset bei ischämischen Schlaganfällen im Serum nachgewiesen werden (69). Auch bei traumatischen Hirnverletzungen (TBI) scheint MBP im Serum nachweisbar zu sein (65, 126). Eine neuere Studie konnte mittels massenspektrometrischer Verfahren erstmals eine signifikant höhere MBP-Konzentration im Liquor bei intrazerebraler Blutung im Vergleich zu ischämischen Schlaganfällen zeigen (121). Entgegen der oben beschriebenen Erkenntnisse lagen die MBP-Konzentrationen in der vorliegenden Arbeit bei den meisten Proben unterhalb der Nachweisgrenze und es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen IS- und ICH-Gruppe ($p = 0,52$). Zu einem ähnlichen

Ergebnis kommen auch Cen et al. (127). Eine mögliche Erklärung hierfür könnte zum einen die Tatsache sein, dass in der vorliegenden Arbeit nur Patienten mit weit proximalen Gefäßverschlüssen ausgewählt wurden, die zu kortikalen Defekten führten. Es scheinen jedoch subkortikale Infarkte aufgrund des höheren Myelingehalts zumindest im Liquor signifikant höhere MBP-Konzentrationen zu verursachen als kortikale Infarkte (125). Zum anderen scheint es bereits früh zu einer MBP-Degradation zu kommen (120). Zugrundeliegen könnte dieser Tatsache die stattfindende Immunreaktion im Rahmen eines Schlaganfalls mit Bildung von Autoantikörpern u.a. gegen MBP (128–133). MBP wird nach einem Schlaganfall im Verlauf auch in peripheren Immunorganen nachweisbar, was wiederum eher für einen Transport über die Blutbahn sprechen würde (134). Weiterhin sind in der Akutphase Matrixmetalloproteinasen (MMPs) hochreguliert, von denen bekannt ist, dass sie MBP abbauen (135–137). In der anschließenden Regenerationsphase findet in der Perinfarktzone eine axonale Wiederaussprossung statt, die eng mit einer Remyelinisierung verbunden ist, wodurch es auch erst verzögert zu erhöhten peripheren MBP-Konzentrationen im Serum kommen könnte (138). Die bereits beschriebene Nachweisbarkeit von MBP in der Schlaganfallfrühphase konnte in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden.

Das Mikrotubuli-assoziierte Protein Tau wird als diagnostischer Marker vor allem bei neurodegenerativen Erkrankungen wie M. Alzheimer eingesetzt (139). Physiologisch ist Tau sehr spezifisch für Neuronen (140), fördert die Zusammenlagerung von Tubulin zu Mikrotubuli (141) und scheint eine Rolle in der Stabilisierung des neuronalen Zytoskeletts und im axonalen Transport zu spielen. Nach einem ischämischen Schlaganfall reichert sich Tau in den geschädigten Neuronen an und wird im Liquor nachweisbar (123, 124, 142). Durch eine Schädigung der Blut-Hirnschranke wird Tau auch im Serum nachweisbar (143). Aus bisher noch nicht geklärten Gründen ist Tau jedoch nur bei etwa 30-40% der Schlaganfallpatienten nachweisbar und steigt im Verlauf weiter an (70–72). Einige Autoren beschreiben zudem eine Korrelation mit dem Infarktvolume (70, 71). Weiterhin scheinen Patienten, bei denen Tau im Serum nachgewiesen werden konnte, ein schwereres neurologisches Defizit durch den Schlaganfall erlitten zu haben und zeigen ein schlechteres Outcome (71, 73). Eine weitere Rolle scheint der Schweregrad der Blut-Hirnschranken-Schädigung zu spielen.

Bielewicz et al. konnten zeigen, dass Schlaganfallpatienten, bei denen Tau im Serum nachgewiesen werden konnte, gleichzeitig signifikant höhere S100B-Konzentrationen (als Marker für eine BHS-Destruktion) aufwiesen (72). Schließlich scheint auch der Phosphorylierungsgrad des Tau-Proteins eine wesentliche Rolle zu spielen (144). Eine Phosphorylierung an spezifischer Stelle verringert die Affinität von Tau zu Mikrotubuli, begünstigt deren Depolymerisation und führt so zu einer Destabilisierung des neuronalen Zytoskeletts und einer Hemmung des neuronalen Transports und zieht letztlich apoptotische Vorgänge nach sich (145). In der vorliegenden Arbeit lag die Tau-Konzentration nur bei einem Patienten oberhalb der Nachweisgrenze. Dies könnte zum einen der Tatsache geschuldet sein, dass Tau in der Frühphase noch zu niedrig konzentriert ist und erst im Verlauf ansteigt. Daneben ist generell beschrieben, dass Tau im Serum von Schlaganfallpatienten nur in etwa 30-40% nachweisbar ist. Weiterhin ist auch eine rasche Degradation von Tau nach IS beschrieben, was zusätzlich eine Abhängigkeit vom Schweregrad der BHS-Schädigung denkbar macht (120). Tau könnte dementsprechend in der Frühphase nur bei ausreichend starker BHS-Destruktion nachweisbar sein. Demgegenüber steht die kontinuierliche Zunahme der Serum-Taukonzentration innerhalb von mehreren Tagen nach Symptombeginn, was jedoch auch durch eine zunehmende BHS-Schädigung erklärbar wäre.

4.2 UCH-L1- und GFAP-Konzentrationen und klinische Daten

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass bei ischämischen Schlaganfällen eine positive Korrelation zwischen dem Patientenalter und der UCH-L1-Konzentration besteht ($r = 0,62$, $p < 0,01$). Hierbei muss allerdings beachtet werden, dass sich in der IS-Gruppe signifikant ältere Patienten befanden als in der ICH-Gruppe ($p < 0,05$). Vor diesem Hintergrund muss durch weitere Studien evaluiert werden, inwiefern das Patientenalter einen Einfluss auf die UCH-L1-Konzentration hat. Im ungünstigsten Falle beruht der signifikante Konzentrationsunterschied von UCH-L1 zwischen IS- und ICH-Gruppe nur darauf, dass sich in der IS-Gruppe ältere Patienten befanden. Sollte sich der Einfluss des Patientenalters auf die UCH-L1-Konzentration bestätigen, stellt dies auch ein Problem für die Anwendung in der Point-of-Care-

Testung und generell für die Sensitivität und Spezifität dar. Ältere Patienten könnten durch höhere UCH-L1-Werte aufgrund ihres Alters als Falsch-Positiv und jüngere Patienten als Falsch-Negativ getestet werden. Es sind in jedem Fall weitere Untersuchungen an einem großen Patientenkollektiv notwendig um derartige Einflussfaktoren zu evaluieren.

Weiterhin konnte bei intrazerebralen Blutungen ebenfalls eine positive Korrelation zwischen GFAP-Konzentration und Alter der Patienten festgestellt werden ($r = 0,54$, $p < 0,05$). Auch besteht in der ICH-Gruppe eine positive Korrelation der GFAP-Werte mit dem NIHSS ($r = 0,69$, $p < 0,05$) sowie dem Blutungsvolumen ($r = 0,60$, $p < 0,05$). Dieser Zusammenhang erscheint pathophysiologisch einleuchtend. Eine starke Gewebeschädigung durch ein hohes Blutungsvolumen bedingt eine hohe GFAP-Freisetzung und führt zu einer starken Symptomausprägung mit entsprechend hohem NIHSS. Dieses Ergebnis bestätigt die bereits in Vorgängerstudien gemachten Beobachtungen zum Zusammenhang von NIHSS, Blutungsvolumen und GFAP-Konzentration (54, 56, 116).

4.3 Klinisch-diagnostische Bedeutung von UCH-L1

Mit der Ubiquitin Carboxyl-Terminal Hydrolase L1 konnte in der vorliegenden Arbeit ein neuronales Protein identifiziert werden, das bei einem ischämischen Schlaganfall signifikant erhöhte Serumwerte im Vergleich zu intrazerebralen Blutungen zeigt. Den Goldstandard in der Differenzierung von Hirninfarkt und intrazerebraler Blutung, die sich klinisch nicht unterscheiden lassen, bildet die kraniale Computertomographie. Eine derartige Diagnostik ist bislang jedoch fast ausschließlich im Krankenhaus möglich. Vereinzelt sind mobile CTs im Einsatz, die eine zeitnahe Diagnostik und gegebenenfalls auch Lysetherapie ermöglichen. Untersuchungen zu einem derartigen „Stroke-Einsatz-Mobil“ in Berlin konnten einen Zeitvorteil von durchschnittlich 25 Minuten belegen (23). Gemäß des „Time-is-Brain“-Konzepts profitieren Patienten mit einem ischämischen Schlaganfall umso mehr von einer Lysetherapie je früher die Diagnose gestellt und die entsprechende Behandlung eingeleitet wird (18, 20, 21). Prähospital ließe sich ein „Bluttest“, ähnlich des Troponin-Schnelltests bei der Verdachtsdiagnose

eines Myokardinfarkts, wesentlich einfacher und vor allem kostengünstiger implementieren als der Einsatz mobiler Computertomographen um einen solchen Zeitvorteil zu gewinnen. Ein derartiger Test könnte bestimmte Serummarker nachweisen, die nur bei einer Hirnblutung (z.B. GFAP) oder nur bei einer Ischämie erhöht sind (z.B. UCH-L1). Leider konnte bisher noch kein Biomarker identifiziert werden, der alleine eine ausreichende Sensitivität und Spezifität für eine sichere Diagnose besitzt, wie dies z.B. für den „Herzinfarkt-Marker“ Troponin T oder den „Herzinsuffizienz-Marker“ NT-proBNP der Fall ist (146–148). In der Literatur wurde bereits beschrieben, dass eine Kombination mehrerer Biomarker die Sensitivität erhöhen kann (37, 38). UCH-L1 kann somit die Reihe von Biomarkern zur Differenzierung von ischämischen und hämorrhagischen Schlaganfall sinnvoll ergänzen. Insbesondere UCH-L1 als neuronales Protein, das bei einem Hirninfarkt erhöhte Serumspiegel aufweist und GFAP als glialem Marker, der bei Hirnblutungen erhöht ist, könnten eine vielversprechende Kombination im Sinne eines diagnostischen Paares sein, die eine weitere Erforschung wert ist.

4.4 Massenspektrometrische Ergebnisse

Wie oben beschrieben ließ sich mittels massenspektrometrischer Verfahren eine Top-Liste potentieller Biomarker zur Differenzierung von IS und ICH bestehend aus 22 Proteinen erstellen.

Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3 (ITIH3) ist ein Bestandteil der Inter-alpha-trypsin Inhibitoren. Diese Familie plasmatischer Proteine fungiert als Protease-Inhibitor und scheint an inflammatorischen Vorgängen sowie der Aktivierung und Degranulierung von Thrombozyten beteiligt zu sein (149). Chen et al. konnten in einer tierexperimentellen Studie zeigen, dass sich ITIH3 im Blut von Ratten im Ischämie-Reperfusion-Modell nachweisen lässt (150). Weitere Studien zu ITIH3 in Zusammenhang mit Schlaganfällen scheinen zum aktuellen Zeitpunkt nicht vorzuliegen. In dieser Arbeit konnten jeweils signifikant höhere ITIH3-Konzentrationen

in der IS-Gruppe ($p < 0,05$) und in der ICH-Gruppe ($p < 0,001$) im Vergleich zur Kontroll-Gruppe nachgewiesen werden.

Der Gerinnungsfaktor IX oder Christmas-Faktor ist eine Vitamin-K-abhängige plasmatische Serin-Protease, die zusammen mit Faktor VIII den sog. Tenase-Komplex bildet. Dieser Komplex ist für die Aktivierung von Faktor X wichtig, der letztlich die gemeinsame Endstrecke der Blutgerinnung aktiviert. Auch bei ischämischen Schlaganfällen spielt das Hämostase-System eine zentrale Rolle. Im Rahmen der Ischämie kommt es zur Stase der intravaskulären Blutsäule, was eine überschießende Aktivierung der Gerinnungskaskade auslöst, die durch die eintretende Hypoxie noch verstärkt wird. Eine erhöhte Aktivität der verschiedenen Gerinnungsfaktoren ist somit nicht verwunderlich. So konnten Heikal et al. eine erhöhte Aktivität von Faktor IX bei etwa jedem fünften Patienten mit ischämischen Schlaganfall nachweisen (151). Und auch eine tierexperimentelle Studie von Toomey et al. konnte zeigen, dass eine Hemmung von Faktor IX innerhalb von vier Stunden nach Induktion eines Schlaganfalls im Tiermodell das Infarktvolume und das Ausmaß des neurologischen Defizits im Vergleich zu t-PA signifikant reduzieren kann (152). Aber auch der umgekehrte Fall, nämlich niedrige Faktor IX-Spiegel scheinen mit einem erhöhten Risiko für eine intrazerebrale Blutung assoziiert zu sein (153). In der vorliegenden Arbeit konnten diese Ergebnisse weiter untermauert werden. So zeigten sich in der IS- und in der ICH-Gruppe signifikant (p jeweils $< 0,01$) höhere Faktor IX-Konzentrationen im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Protein S100-A8 zählt zur Familie der Kalziumbindenden S100-Proteine und kommt in hoher Konzentration in neutrophilen Granulozyten und Monozyten vor. S100-A8 scheint auch im Rahmen von cerebralen Ischämien in Inflammationsprozesse involviert zu sein. Es wird vor allem aus aktivierten Mikrogliazellen in der Perinfarkt-Zone freigesetzt und bewirkt eine weitere Leukozyten-Rekrutierung und eine Aktivierung des Komplement-Systems. S100-A8 ist auf mRNA- und Proteinebene bereits früh nach einer ischämischen Läsion erhöht und scheint die Neuroinflammation und die Ausdehnung des Ischämie-Reperfusionsschadens voranzutreiben. Eine Überexpression von S100-A8 scheint nur in den ersten drei Tagen nach

Symptombeginn nachweisbar zu sein, so dass die Aktivierung residenter Mikroglia eine frühe Reaktion des Hirngewebes auf eine Infarzierung zu sein scheint (154, 155). Auch in der vorliegenden Arbeit war ein signifikant ($p < 0,05$) höherer S100-A8-Spiegel bei Patienten mit Hirnischämie im Vergleich zu gesunden Probanden nachweisbar. In der ICH-Gruppe verglichen mit der Kontrollgruppe und auch zwischen ICH- und IS-Gruppe fanden sich keine signifikanten Unterschiede.

Serum Amyloid P Component (APCS) zählt wie das C-reaktive Protein (CRP) zu den Pentraxinen, einer Familie von Glycoproteinen mit pentamerer Struktur und calciumabhängiger Ligandenbindung. APCS scheint an apoptotische Zellen zu binden und in den Chromatinabbau involviert zu sein, trägt zur Amyloidfibrillenbildung bei und wirkt selbst direkt toxisch auf zerebrale Neurone (156–158). Eine neuere Proteomics-Studie von Li et al. untersuchte das Serum-Proteom von ICH-Patienten und gesunden Probanden, wobei sich eine deutlich höhere Konzentration von APCS bei den ICH-Patienten nachweisen ließ. Die Autoren weisen in ihrer Studie darauf hin, dass einer intrazerebralen Blutung auch eine zerebrale Amyloidangiopathie zugrunde liegen kann, was sich in einer Überexpression von APCS im Blut nachweisen lassen könnte, womit ggf. eine ätiologische Zuordnung mittels Biomarker möglich wäre (159). APCS war in der vorliegenden Arbeit sowohl bei der Gesamtheit der Schlaganfallpatienten ($p < 0,01$) wie auch in der IS-Gruppe ($p < 0,001$) und in der ICH-Gruppe ($p < 0,05$) in signifikant höherer Konzentration nachweisbar als bei den gesunden Probanden. Zudem war APCS bei den IS-Patienten im Vergleich zu den ICH-Patienten signifikant ($p < 0,05$) erhöht.

Plättchen-Faktor 4 (PF4) wird im Rahmen der Thrombozytenaggregation aus Blutplättchen freigesetzt und hat über die Hemmung der Antithrombin-III-Wirkung prokoagulatorische Eigenschaften. Daneben wirkt es durch Chemotaxis auch proinflammatorisch. Da es sich bei einem ischämischen Hirninfarkt um ein thromboinflammatorisches Krankheitsbild handelt, könnte man davon ausgehen, dass ein erhöhter PF4-Wert zu finden ist. Zu diesem Ergebnis kommen auch İlhan et al. (160). Zusätzlich konnten Tombul et al. auch eine positive Korrelation zwischen der Höhe des PF4-Spiegels und dem Ausmaß des neurologischen Defizits zeigen (161).

Daneben kommen andere Autoren zu dem Ergebnis, dass es bei embolischen Infarkten nur zu einer leichten nicht-signifikanten PF4-Erhöhung bei IS kommt und eine nur geringfügig erhöhte Thrombozytenaktivität keine Aktivierung des Gerinnungssystems auslösen könne. Die Autoren stellten somit die Hypothese auf, dass es bei embolischen Schlaganfällen eher durch sog. Stase-bedingte Thromben zu einer Aktivierung des Gerinnungssystems kommt (162). Wiederum andere Autoren konnten erniedrigte PF4-Werte bei Schlaganfall-Patienten nachweisen (163). In der vorliegenden Arbeit war ein signifikanter Unterschied lediglich zwischen IS-Gruppe und Kontrollgruppe nachweisbar ($p < 0,05$).

Die Mannose-assoziierte Serin-Protease 1 (MASP-1) spielt eine entscheidende Rolle in der Lectin-vermittelten Komplement-Aktivierung. Durch Bindung des Mannose-bindenden Lektins (MBL) an Oberflächen-Polysaccharide pathogener Keime oder auch an Glycosilierungsmuster auf apoptotischen, nekrotischen und ischämischen Zellen werden die Mannose-assoziierten Serin-Proteasen 1-3 aktiviert, die wiederum über eine kaskadenartige Aktivierung der verschiedenen Komplementfaktoren letztlich zu mehreren immunologischen Reaktionen führen. Neben Chemotaxis und Auslösung inflammatorischer Reaktionen führt der sog. Membranangriffskomplex durch eine Porenbildung in der bakteriellen Zellmembran zu einer Zellyse (164, 165). Zudem scheint es zwischen dem Komplementsystem und dem Gerinnungssystem zahlreiche Interaktionen zu geben. MASP-1 setzt Bradykinin aus hochmolekularem Kininogen (High-molecular weight kininogen, HMWK) frei und kann im Komplex mit MBL ähnlich wie Thrombin – wenn auch mit geringerer katalytischer Effizienz – Fibrinogen und Faktor XIII unabhängig von Thrombin spalten. Eine MASP-1-Aktivierung scheint neben der Beteiligung am Komplementsystem, auch zu einer Fibrin-Clot-Bildung und zu einer Aktivierung von Thrombin und Thrombozyten zu führen. Daneben soll MASP-1 aber auch mit Thrombin-aktivierten Fibrinolyse-Inhibitoren (TAFI) interagieren, was letztlich zu einer verlängerten Fibrinolyse führen soll. Umgekehrt scheinen aber auch aktivierte Thrombozyten und Fibrin MASP-1 zu aktivieren. In vitro kann rekombinantes MASP-1 eine Prothrombin-abhängige Thrombusformation in menschlichem Plasma induzieren. MASP-1 als Bestandteil des Komplementsystems scheint also auch an thromboembolischen Prozessen beteiligt zu sein (165–167). Zahlreiche Studien

konnten belegen, dass das Komplementsystem eine wichtige Rolle in der Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen sowie bei Ischämie-Reperfusionsschäden spielt. Eine Studie von La Bonte et al. konnte zeigen, dass MASP-1 essentiell für die obstruktive Thrombosierung im Mausmodell der arteriellen Verletzung ist (165). Bei der Untersuchung von MASP-1 in Zusammenhang mit kardiovaskulären Erkrankungen konnten Frauenknecht et al. die höchsten Plasmaspiegel bei Myokardinfarkten und die niedrigsten Plasmaspiegel bei ischämischen Schlaganfällen nachweisen (168). Tsakanova et al. kamen zu dem Ergebnis, dass die Aktivität von MASP-1 im Plasma von IS-Patienten signifikant höher als bei Gesunden ist (169). Zusammen mit den Ergebnissen von Zhang et al., die eine Komplementaktivierung nach Myokardinfarkt mit Verbrauch von MASP-2 nachweisen konnten (170), dürften die erniedrigten Plasmaspiegel von MASP-1 durch eine gesteigerte Aktivität des Komplement- und Gerinnungssystems bei Schlaganfallpatienten mit Verbrauch von Komplementfaktoren zu erklären sein. In der vorliegenden Arbeit konnten signifikant ($p < 0,05$) höhere MASP-1-Konzentrationen in der IS-Gruppe als in der Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Zudem bestand ein signifikanter ($p < 0,05$) Unterschied zwischen IS- und ICH-Patienten, wobei sich höhere Konzentrationen in der IS-Gruppe fanden. Die Lectin-abhängige Komplementaktivierung scheint sowohl durch geschädigte Zellen im Rahmen von Ischämie und Nekrose als auch durch Veränderungen im Gerinnungssystem beeinflusst zu sein.

Das plasmatische Protein Plasminogen stellt die Vorstufe der Serinprotease Plasmin dar, deren Hauptaufgabe in der Spaltung von Fibrin in Fibrinspaltprodukte besteht. Dieser als Fibrinolyse bezeichnete Vorgang führt zur Auflösung fibrinreicher Thromben und steht in einem empfindlichen Gleichgewicht zur Hämostase. Daneben sind jedoch auch eine Beteiligung am Abbau von Matrixproteinen und Zellbarrieren sowie an der Zellmigration beschrieben (171). Plasminogen wird durch sogenannte Plasminogenaktivatoren in Plasmin umgewandelt. Der wichtigste körpereigene Aktivator ist der aus verletzten Endothelzellen freigesetzte tissue-type plasminogen activator (t-PA), der auch rekombinant hergestellt wird (recombinant tissue-type plasminogen activator, rt-PA) und zur pharmakologischen Thrombolyse, z.B. beim ischämischen Schlaganfall zum Einsatz kommt. Da es im Rahmen von ischämischen und

hämorrhagischen Schlaganfällen zu einer Störung der Hämostase und zu einer Aktivierung des fibrinolytischen Systems kommt, liegt die Vermutung nahe, dass es zu veränderten Plasminogenspiegeln im Blut von Schlaganfallpatienten kommen könnte. Pathophysiologisch kommt es sowohl bei ICH wie auch bei IS zu einer Aktivierung des Gerinnungs- und Fibrinolysesystems. Bei der Ischämie mit dem Ziel den Thrombus aufzulösen, womit eher die Fibrinolyse mit Verbrauch von Plasminogen im Vordergrund stehen dürfte. Bei der Hirnblutung eher mit Fokus auf die Blutgerinnung zur Eindämmung der Blutung, wobei es konsekutiv auch immer zu einer Mit-Aktivierung der Fibrinolyse kommt. Möglicherweise führt die durch das intrazerebrale Hämatom ausgelöste Fibrinolyseaktivierung zu einem stärkeren Plasminogenverbrauch und somit zu niedrigeren Plasminogenspiegeln bei der Blutung im Vergleich zur Ischämie (172). Neben der Beteiligung im Hämostase-/Fibrinolyseystem scheint Plasminogen u.a. durch Modulation von NMDA-Rezeptoren zu einer Zunahme der intrazellulären Calciumkonzentration zu führen (173). Durch einen solchen Calciumkonzentrationsanstieg infolge von NMDA-Rezeptoraktivierung sollen der Plasminogenaktivator tPA und Plasmin zu neuronalem Zelltod im Rahmen der Exzitotoxizität führen (174–176). Daneben scheint Plasminogen auch eine Rolle in der sekundären Hirnverletzung nach ICH zu spielen. In einem tierexperimentellen Versuch konnten Fujimoto et al. zeigen, dass eine erhöhte Plasminogenkonzentration zu einer verstärkten Neurotoxizität von Thrombin führt (177). Niedrige Plasminogenspiegel nach einem Schlaganfall scheinen mit einem schlechteren Outcome assoziiert zu sein. So führen höhere Plasminogenspiegel zu einer schnelleren Auflösung von Thromben in Cerebralarterien, zu einer verringerten MMP-9-Expression und zu einer verminderten Zerstörung der Blut-Hirn-Schranke (178). Bei Untersuchungen zur Plasminogenaktivität konnten Petersen et al. eine signifikant niedrigere Aktivität bei Patienten mit akut ischämischen Schlaganfall als bei gesunden Probanden zeigen. Die Autoren postulieren eine Begünstigung eines ischämischen Schlaganfalls durch verminderte fibrinolytische Aktivität im Blut, die zu stabileren Thrombozytenaggregaten an der Gefäßintima und so zum Fortschreiten atherosklerotischer Läsionen führen kann. Die verringerte Plasminogenaktivität scheint allerdings eher eine Rolle in der Pathogenese atherothrombotischer Schlaganfälle auf längere Sicht zu spielen und kann möglicherweise als Risikofaktor fungieren, dürfte in der Akutphase aber wohl eher von

untergeordneter Bedeutung sein (179). In der massenspektrometrischen Analyse in der vorliegenden Arbeit zeigten sich signifikant niedrigere Plasminogenspiegel bei den Patienten im Vergleich zu den Kontrollen ($p < 0,01$), wobei in der ICH-Gruppe ein signifikant niedrigeres Plasminogen-Niveau nachgewiesen werden konnte als in der IS-Gruppe ($p < 0,05$).

Der Gerinnungsfaktor XII, auch Hagemann-Faktor genannt, ist eine Serin-Protease aus der Gruppe der plasmatischen Gerinnungsfaktoren. Faktor XII wird in vivo durch die Freisetzung von Polyphosphaten aus aktivierten Thrombozyten in seine aktive Form Faktor XIIa überführt (180). Faktor XIIa aktiviert neben dem Gerinnungsfaktor XI auch das Kinin–Kallikrein-System, das wiederum die Aktivierung von Plasminogen, Carboxypeptidasen, sowie die Bildung von Bradykinin und Angiotensin vermittelt (181). Pathophysiologisch wird der ischämische Schlaganfall auch als eine „thromboinflammatorische Erkrankung“ beschrieben. Die Aktivierung des Kinin-Kallikrein-Systems durch Faktor XII und durch Freisetzung proinflammatorischer Zytokine aus Thrombozyten, sowie die Rekrutierung immunologischer Zellen durch Glykoproteinrezeptoren, schaffen dabei die Verbindung von Blutgerinnung und Inflammation (182, 183). Tierexperimentelle Studien belegen die essentielle Bedeutung von Faktor XII für die Pathophysiologie der ischämischen Hirnschädigung. Faktor XII-defiziente Mäuse zeigen ähnlich wie Patienten mit Faktor XII-Mangel eine gestörte Bildung und Stabilisierung von Thromben. Weiterhin führt die vollständige Abwesenheit ebenso wie die pharmakologische Inhibition von Faktor XIIa zu deutlich geringerem Infarktausmaß und signifikant besserem funktionellem Outcome, wohingegen eine artifizielle Zufuhr von Faktor XII bei knock-out-Tieren die Empfindlichkeit für einen ischämischen Hirnschaden vollständig wiederherstellt (184–187). Demgegenüber gibt es jedoch auch Hinweise, dass Faktor XII bei inflammatorischen Prozessen herunterreguliert ist (188). In der Literatur sind sowohl erhöhte wie auch erniedrigte Faktor XII-Spiegel nach Schlaganfällen beschrieben. So konnten Johansson et al. zeigen, dass ein erhöhter Faktor XII-Spiegel mit einem erhöhten Risiko für hämorrhagische Schlaganfälle einhergeht (189). Kraft et al. beschrieben dagegen signifikant erniedrigte Faktor XII-Plasmaspiegel bei Patienten mit akuten zerebrovaskulären Erkrankungen im Vergleich zu chronischen

zerebrovaskulären Erkrankungen, jedoch erst ab dem dritten Tag nach Beginn der Symptomatik. Einen signifikanten Unterschied zu gesunden Probanden konnte die Arbeitsgruppe nicht zeigen (190). In der vorliegenden Arbeit konnten signifikant niedrigere Faktor XII-Konzentrationen bei den Patienten im Vergleich zu den gesunden Probanden ($p < 0,01$) nachgewiesen werden, wobei sich in der IS-Gruppe signifikant höhere Faktor XII-Konzentrationen zeigten als in der ICH-Gruppe ($p < 0,01$). Erniedrigte Faktor XII-Spiegel nach einem Schlaganfall könnten zum einen als körpereigene Antwort zur Verringerung des Infarkt-Ausmaßes interpretiert werden. Zum anderen ist aber auch ein Verbrauch im Rahmen der Thromboinflammation und Gerinnungsaktivierung denkbar.

Die Carboxypeptidase N (CPN) zählt zu der Familie der Zink-Metalloproteinasen. Carboxypeptidasen hydrolisieren die Peptidbindungen am Carboxy-terminalen Ende von Proteinen. Carboxypeptidase N wird in der Leber synthetisiert und ins Blut sezerniert, wo das Enzym in relativ hohen Konzentrationen vorkommt. Strukturell stellt die Carboxypeptidase N ein Tetramer aus zwei katalytischen kleinen Untereinheiten (CPN1) und zwei regulatorischen großen Untereinheiten (CPN2) dar. Funktionell kommt es durch Carboxypeptidasen zu einer Abspaltung vorwiegend der Aminosäuren Lysin und Arginin vom C-terminalen Proteinende. Zielstrukturen von CPN sind insbesondere Bradykinin und Anaphylatoxine (C3a, C4a und C5a) (191, 192). Daneben vermag CPN durch die Abspaltung C-terminaler Lysine von Zelloberflächen deren Bindungskapazität für Plasminogen zu reduzieren. CPN selbst wird aber auch durch Plasmin, der aktiven Form des Plasminogens, im Sinne eines negativen Feedback-Mechanismus aktiviert, was letztlich zu einer verstärkten antifibrinolytischen Aktivität führt. Dies scheint jedoch erst bei relativ hohen Plasmin-Spiegeln der Fall zu sein (193–196). CPN wurde auch als Bestandteil von Fibrin-Clots nachgewiesen, wo es möglicherweise eine Rolle als Fibrinolyse-Inhibitor spielen könnte. Es ließ sich eine spezifische Bindung an Fibrinogen und Fibrin nachweisen, ohne dass eine andere Plasmakomponente hierfür notwendig ist (197, 197). Durch diese Beteiligung der Carboxypeptidase N an Vorgängen im Gerinnungssystem und an inflammatorischen Prozessen wird es für die Pathophysiologie von Schlaganfällen interessant. Bei ischämischen Prozessen in Folge einer Gerinnelbildung kommt es neben

prokoagulatorischen Vorgängen immer auch zur Aktivierung der Fibrinolyse und konsekutiv der Antifibrinolyse im Sinne von Feedback-Schleifen. Neben Plasminogenaktivator-Inhibitoren spielen auch Thrombin-aktivierte Fibrinolyse-Inhibitoren (TAFI) eine Rolle in der Antifibrinolyse. Die Carboxypeptidase N gehört zu der gleichen Familie der Zink-Metalloproteinasen wie TAFI (197) und dürfte in Folge dessen auch bei ischämischen Schlaganfällen vermehrt im Blut nachweisbar sein. Zudem konnte CPN auch direkt im Gerinnsel selbst nachgewiesen werden. Im Rahmen von Myokardinfarkten, deren Pathophysiologie im weitesten Sinne vergleichbar mit ischämischen Schlaganfällen ist, konnten ebenfalls erhöhte CPN-Serumspiegel nachgewiesen werden (198, 199). Auch in der vorliegenden Arbeit zeigten Patienten mit ischämischen Schlaganfall signifikant höhere Werte für CPN2 gegenüber gesunden Probanden und Patienten mit hämorrhagischen Schlaganfall (jeweils $p < 0,01$). Hinsichtlich der genauen Freisetzungskinetik und weshalb nur die Konzentration der CPN2-Untereinheit einen signifikanten Unterschied aufweist, sind noch weitere Untersuchungen nötig.

Paraoxonase 1 (PON-1) ist eine Calcium-abhängige, High-Density-Lipoprotein (HDL) assoziierte Esterase, die die Hydrolyse zahlreicher Substrate katalysiert. Neben der Detoxifizierung von Organophosphaten wirkt PON-1 insbesondere durch die Metabolisierung oxidierter Lipide anti-inflammatorisch und anti-atherosklerotisch (200). Neben der Gefäßokklusion durch einen Embolus werden ischämische Schlaganfälle auch durch atherosklerotische Veränderungen an großen und kleinen hirnversorgenden Arterien verursacht. Vor dem Akutereignis steht für gewöhnlich die sich über Jahre entwickelnde Atherosklerose, verbunden mit Inflammation, Fetteinlagerungen und Lipidperoxidation in der Gefäßwand und der Aktivierung antioxidativer Systeme. Vor dem Hintergrund atherosklerotischer Veränderungen führt meist eine akute Plaqueruptur zu einem zerebralen Gefäßverschluss. In der Folge kommt es zu oxidativem Stress und Bildung freier Radikale, die letztlich zur strukturellen Hirnschädigung führen. Durch die Beschädigung der Blut-Hirn-Schranke kommt es zusätzlich zu einer Exposition mit Plasma-Lipoproteinen, was sich in erhöhten Konzentrationen von oxidiertem Low-Density-Lipoproteinen (LDL) widerspiegelt (201). Auch Nervenzellen selbst enthalten große Mengen an mehrfach

ungesättigten Fettsäuren, die durch freie Radikale leicht angreifbar sind. Die anfallenden oxidierten Lipide und auch die freien Radikale selbst scheinen zur Inaktivierung antioxidativer Enzyme wie PON-1 zu führen. Daneben können reaktive Sauerstoffspezies auch strukturelle Änderungen an HDL verursachen, die wiederum eine Beeinflussung der assoziierten Paraoxonase-1 zur Folge haben können (201–208). In der Literatur finden sich zahlreiche Studien die den angenommenen Pathomechanismus durch den Nachweis verringerter PON-1-Spiegeln im Serum von Patienten mit ischämischem Schlaganfall untermauern (201, 203–209). So konnten Ferretti et al. eine negative Korrelation zwischen PON-1-Aktivität bei Schlaganfallpatienten und Serumspiegeln von Lipidperoxiden und der Schwere der klinischen Symptomatik zeigen (201). Die Serum-PON-1-Aktivität scheint auch Einfluss auf das neurologische Outcome nach einem ischämischen Schlaganfall zu haben (210). Schließlich sollen Genpolymorphismen, die zu veränderter PON-1-Aktivität führen, mit einem erhöhten Schlaganfallrisiko assoziiert sein (208, 211, 212). In der vorliegenden Arbeit ließ sich kein signifikanter Unterschied der PON1-Konzentration zwischen Patienten und gesunden Probanden nachweisen. Lediglich in der IS-Gruppe war PON1 signifikant ($p < 0,05$) höher konzentriert als in der ICH-Gruppe, anders als es aufgrund der verfügbaren Literatur zu erwarten gewesen wäre.

Die Carboanhydrase 1 (CA1) ist eine der 14 Isoformen der Carboanhydrasen, die die Umwandlung von Kohlenstoffdioxid und Wasser in Hydrogencarbonat und einem Proton katalysieren. Das Zink-abhängige Enzym kommt hauptsächlich im Zytosol von Erythrozyten vor. Das aus dem Gewebe in die Erythrozyten aufgenommene CO_2 wird zu Hydrogencarbonat umgesetzt, das im sog. Hamburger-Shift aus den Erythrozyten heraus transportiert wird. Die erhöhte intrazelluläre Protonenkonzentration senkt nun den pH-Wert in den roten Blutkörperchen, was zusammen mit der erhöhten CO_2^- Konzentration im Gewebe eine Rechtsverschiebung der Sauerstoffbindungskurve und somit eine erleichterte O_2 -Abgabe bewirkt. Im Rahmen einer intrazerebralen Blutung kommt es zur Lyse von Erythrozyten im Bereich des Hämatoms, wodurch u.a. Eisen aus Hämoglobin und Carboanhydrase 1 freigesetzt werden und eine zunehmende Gewebeschädigung durch Ödembildung und neuronalem Zelltod verursachen (213). Extrazelluläre CA1 soll daneben mittels Aktivierung des Kinin-Kallikrein-Systems eine

Zerstörung der Blut-Hirn-Schranke begünstigen. CA1 scheint daneben auch Einfluss auf den postsynaptischen Calcium-Influx zu haben, was in Zusammenhang mit der Exzitotoxizität eine mögliche Erklärung für neuronalen Zelluntergang darstellen könnte. Eine experimentelle Injektion von CA1 ins Hirngewebe führt zu Hirnödemen, Mikroglia-Aktivierung und neuronalem Zelltod. Azetazolamid, ein Carboanhydrase-Hemmer, vermag wiederum diese Effekte zu reduzieren (214). Erhöhte Serumkonzentrationen von CA1 in Zusammenhang mit ischämischen oder hämorrhagischen Schlaganfällen scheinen zum aktuellen Zeitpunkt nicht in der Literatur beschrieben zu sein. In der vorliegenden Arbeit konnte ein signifikanter ($p < 0,01$) Unterschied zwischen IS- und ICH-Gruppe festgestellt werden, wobei die CA1-Konzentration in der IS-Gruppe höher lag als in der ICH-Gruppe. Gegenüber gesunden Probanden fanden sich jedoch keine signifikanten Unterschiede.

Granuline stellen eine Familie glykosilierter Proteine dar, die vom gemeinsamen Vorläuferprotein Progranulin abstammen und deren biochemische Struktur und Funktion Gemeinsamkeiten mit epidermalen Wachstumsfaktoren besitzen. Durch die Proteolyse des Vorläuferproteins können die einzelnen Granuline A bis G entstehen, die untereinander geringfügige Strukturunterschiede aufweisen. Welche Bedeutung diese strukturellen Unterschiede hinsichtlich der biologischen Funktion haben, ist bislang noch nicht abschließend geklärt. Granuline werden prinzipiell im gesamten Organismus exprimiert, kommen jedoch überwiegend in Epithelien und hämatopoetischen Stammzellen vor. Im zentralen Nervensystem finden sich Granuline ausschließlich in Neuronen und Mikroglia. Die verschiedenen Granuline scheinen auf unterschiedliche Zelltypen jeweils unterschiedliche Wirkung zu haben und können inhibitorisch oder mitogen wirken. Auf Neurone ist eine neurotrophe und antiapoptotische Wirkung, v.a. für Granulin E beschrieben. Neben dieser Beteiligung an der Regulation des Zellwachstums sollen Granuline auch an Entzündungsprozessen beteiligt sein. Progranulin scheint durch Inhibition des TNF α -Signalweges antiinflammatorische Wirkung zu haben, wohingegen für Granulin A und B eine proinflammatorische Wirkung angenommen wird. Im Gehirn scheint eine erhöhte Granulinexpression zur Mikrogliaaktivierung zu führen und ist insbesondere für neurodegenerative Erkrankungen beschrieben (215–217). In der akuten Phase der

zerebralen Ischämie kommt es zur raschen Freisetzung proinflammatorischer Faktoren, die in der Folge zur Infiltration von Entzündungszellen, allen voran neutrophiler Granulozyten, führen. Xie et al. konnten in einer prospektiven Kohortenstudie signifikant höhere Progranulin-Werte im Serum von Patienten mit ischämischen Schlaganfall im Vergleich zu gesunden Probanden nachweisen. Aufgrund der geschilderten antiinflammatorischen Wirkungen von Progranulin scheint es pathophysiologisch erklärbar, dass es bei akuter Hirnischämie zu einer vermehrten Expression von Progranulin als neuroprotektiven Faktor kommt (218). In tierexperimentellen Arbeiten konnten Kanazawa et al. und Tao et al. eine verstärkte Progranulin-Expression in Mikroglia innerhalb des ischämischen Kerns, in überlebenden Neuronen und in Endothelzellen der ischämischen Penumbra zeigen. Wohingegen die Progranulin-Expression in Neuronen innerhalb des ischämischen Kerns erniedrigt war. Weiterhin konnten sie eine Neuroprotektion durch Abschwächung der Neuroinflammation und der Bluthirnschrankenstörung nachweisen. Die Arbeitsgruppe um Kanazawa konnte zusätzlich zeigen, dass die intravenöse Zufuhr von rekombinanten Progranulin zu einer Reduktion des Infarktolumens, des Hirnödems, der hämorrhagischen Transformation und zu einer Verbesserung neurologischer Defizite führt (219–221). Im Hirngewebe von Mäusen 24h nach Ischämie und Reperfusion konnten Egashira et al. einen signifikant niedrigeren Progranulin-Gehalt im Vergleich zu Kontrollen nachweisen. Eine mögliche Annahme ist, dass Progranulin die Neutrophilenaktivierung durch proinflammatorische Mediatoren zunächst hemmt. Mit zunehmender Konzentration proinflammatorischer Faktoren werden jedoch auch Enzyme, wie u.a. die neutrophile Elastase, aktiviert, die Progranulin zu Granulinen abbauen, welche wiederum eine proinflammatorische Wirkung aufweisen (222). In der vorliegenden Arbeit konnten signifikant ($p < 0,05$) höhere Progranulin-Konzentrationen bei Patienten mit Hirnblutung verglichen mit ischämischen Schlaganfällen nachgewiesen werden, ohne signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe.

Fibulin 1 ist ein Glycoprotein der extrazellulären Matrix und kommt insbesondere in der Basalmembran, elastischen Bindegeweben und in der Gefäßwand vor, außerdem findet es sich als lösliches Plasmaprotein (223, 224). Fibulin 1 scheint außerdem eine

Rolle im Hämostase-System zu spielen: Fibulin 1 kann an Fibrinogen binden und wird dann in neugebildete Fibringerinnsel eingebaut (224, 225). Es unterstützt außerdem die Thrombozytenaggregation, indem das nach einer vaskulären Verletzung freiliegende Fibulin 1 mit dem Plasma-Fibrinogen interagiert und eine Fibrinogenbrücke zu einem Thrombozyten-Integrin bildet und zur Entstehung eines Plättchenpfropfes führt. Argraves et al. konnten Fibulin 1 als Bestandteil atherosklerotischer Läsionen in Koronargefäßen nachweisen, wobei das Ablagerungsmuster von Fibulin 1 in atherosklerotischen Plaques dem von Fibrinogen ähnelt. Die Autoren postulierten, dass das im Blut zirkulierende Fibulin 1 in die atherosklerotischen Läsionen eindringt und es somit zu erniedrigten Serumspiegeln kommt. Damit übereinstimmend fanden sich signifikant niedrigere Serumkonzentrationen von Fibulin 1 bei Patienten mit instabiler Angina pectoris und akutem Myokardinfarkt im Vergleich zu Kontrollprobanden (226). Bislang ist kein Zusammenhang zwischen Fibulin 1 und Schlaganfällen beschrieben. Xu et al. beschreiben in einer tierexperimentellen Arbeit zu akuten Rückenmarkverletzungen bei Ratten eine erhöhte Fibulin 1 Expression in spinalen Neuronen und Mikroglia fünf Tage nach dem Trauma. Weiterhin konnten die Autoren eine Kolo-kalisation von Fibulin 1 und Caspase 3 in Neuronen, sowie eine Hemmung des ERK3-Signalwegs zeigen, was die Beteiligung von Fibulin 1 an apoptotischen Vorgängen nahelegt. Die Autoren nehmen an, dass nach einer traumatischen Rückenmarkverletzung Fibulin 1 in reaktiven Mikroglia gebildet wird (227). In der vorliegenden Arbeit war Fibulin 1 in der IS-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant ($p < 0,05$) erniedrigt, ebenso wie gegenüber der ICH-Gruppe (jeweils $p < 0,05$). Nach der Studie von Argraves et al. scheint Fibulin 1 Bestandteil atherosklerotischer Läsionen im Gefäßendothel zu sein (226). Der Fibulinverbrauch würde die niedrigere Serumkonzentration im Vergleich zu gesunden Probanden erklären. Die Zerstörung von Blutgefäßen mit Freisetzung von vaskulären Strukturproteinen als Ursache einer intrazerebralen Blutung könnte die erhöhte Serumkonzentration von Fibulin 1 bei ICH-Patienten im Unterschied zu IS-Patienten erklären. Ebenso eine Aktivierung von Mikroglia durch die Freisetzung von Blutbestandteilen, auch wenn der hämorrhagische Schlaganfall pathophysiologisch nicht ganz mit einer traumatischen Rückenmarkläsion vergleichbar ist (227).

Das C-reaktive Protein (CRP) ist ein Glycoprotein hepatischen Ursprungs und zählt wie Serum Amyloid P Component (APCS) zur Familie der Pentraxine. Es dient durch Oponierung von Pathogenen der Aktivierung des Komplementsystems. Als sog. Akute-Phase-Protein findet es breite Anwendung beim laborchemischen Nachweis von akuten und chronischen Entzündungsreaktionen (228). Auch bei der Diagnostik von Schlaganfällen wurde die Anwendung von CRP beschrieben (229–232). Roudbary et al. konnten sogar signifikant höhere CRP-Konzentrationen bei IS-Patienten im Vergleich zu ICH-Patienten nachweisen und beschrieben einen möglichen Nutzen zur Differenzierung von IS und ICH (233). Zudem scheint der CRP-Wert eine Aussage hinsichtlich der Prognose bei Schlaganfallpatienten zu ermöglichen (234–236). In der vorliegenden Arbeit ließen sich in der Patientengruppe signifikant ($p < 0,01$) höhere CRP-Werte gegenüber der Kontrollgruppe nachweisen. Ebenso bestand ein signifikanter Unterschied ($p < 0,01$) zwischen ICH- und Kontrollgruppe, jedoch nicht zwischen IS- und ICH-Gruppe.

Für das Pregnancy Zone Protein (PZP) scheint zum aktuellen Zeitpunkt noch kein Zusammenhang mit Schlaganfällen beschrieben zu sein. PZP ist zum einen, wie der Name vermuten lässt, während Schwangerschaften, aber auch bei inflammatorischen Erkrankungen in erhöhter Konzentration im Serum nachweisbar (237). Auch bei Alzheimer-Patienten ist ein erhöhter PZP-Gehalt im Serum aber auch in den Mikrogliazellen, die mit senilen Plaques assoziiert sind, nachweisbar (238). In vivo sind auch Interaktionen von PZP mit den Matrix-Metalloproteasen 2 und 9 beschrieben, die an der Zerstörung der Blut-Hirn-Schranke im Rahmen von Schlaganfällen beteiligt sind (239). In der vorliegenden Arbeit waren signifikant ($p < 0,01$) höhere PZP-Konzentrationen im Serum von Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe nachweisbar, wobei auch ein signifikanter ($p < 0,01$) Unterschied zwischen ICH- und Kontrollgruppe bestand.

Lamine bilden als Typ-V-Intermediärfilamente die sog. Kernlamina, die der inneren Kernmembran eukaryontischer Zellen von innen anliegt. Die Kernlamina wirkt zum einen stabilisierend auf die Kernmembran, ist aber auch in die DNA-Replikation, Zelldifferenzierung und Apoptose involviert. Durch alternatives Splicing kommen die

Isoformen Lamin A und C zustande. Daneben existieren verschiedene Isoformen von Lamin B (240). Gewisse LMNA-Genmutationen, die sog. Laminopathien verursachen, führen zu deutlichen atherosklerotischen Veränderungen (241). In der Literatur ist zum aktuellen Zeitpunkt weder ein Einfluss von Atherosklerose auf Lamine, noch ein Zusammenhang zwischen Lamin-Isoformen im Serum und Schlaganfällen beschrieben. In der vorliegenden Arbeit konnten signifikant ($p < 0,05$) höhere Lamin A/C-Konzentrationen bei Patienten mit hämorrhagischen Schlaganfall im Vergleich zu gesunden Probanden nachgewiesen werden.

Das Lipopolysaccharide Binding Protein (LBP) ist ein Akute Phase Protein, das durch die Oponisierung von Lipopolysacchariden gramnegativer Bakterien über die Oberflächenproteine CD14, TLR4 und MD2 in der Aktivierung von Monozyten und Makrophagen eine Rolle spielt (242). Li et al. konnten in einer MS-basierten Proteomics-Studie bei ICH-Patienten erhöhte LBP-Spiegel nachweisen. Die Autoren sehen dies im Rahmen einer generellen Inflammationsreaktion als Folge der intrazerebralen Blutung (159). Auch scheinen erhöhte LBP-Level insbesondere bei Patienten mit Infektionen nach einem akuten Schlaganfall aufzutreten (243). Zudem sollen Patienten mit erhöhten LBP-Werten ein erhöhtes Mortalitäts- und Delirrisiko nach ischämischen Schlaganfall aufweisen (244). Worthmann et al. konnten erhöhte LBP-Konzentrationen bereits innerhalb der ersten sechs Stunden nach Symptombeginn unabhängig vom späteren Auftreten einer Infektion nachweisen und sahen diese LBP-Erhöhung als direkte Reaktion auf die Infarzierung (245). In der vorliegenden Arbeit konnten bei Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden signifikant ($p < 0,05$) höhere LBP-Spiegel nachgewiesen werden, wobei auch in der ICH-Gruppe ein signifikanter ($p < 0,01$) Unterschied zur Kontrollgruppe bestand.

Das Strukturprotein Vinculin ist an der Ausbildung von Adhäsionsverbindungen beteiligt. Diese Verbindungen kommen vor allem zwischen Epithelzellen als Zell-Zell-Kontakte (sog. Adherens Junctions) aber auch als Zell-Matrix-Kontakte (sog. fokale Adhäsionen) vor. Vinculin fungiert dabei als Ankerprotein, das Aktinfilamente mit den transmembranen Cadherinen oder Integrinen verbindet. Adherens Junctions scheinen auch am Aufbau der Blut-Hirn-Schranke beteiligt zu sein. Bei einer zerebralen Ischämie

scheint es im Rahmen der Neuroinflammation, die u.a. durch Interleukin-1 vermittelt wird, zu einer Aktivierung von Endothelzellen zu kommen. Dies führt neben einer Überexpression auch zu einer Umverteilung von Proteinen der Extrazellulärmatrix (wie etwa Vinculin) und scheint Auswirkungen auf die Durchlässigkeit der Blut-Hirnschranke zu haben (246, 247). Neben seiner Funktion als Strukturprotein soll Vinculin auch in Apoptosevorgänge involviert sein (248). Zum aktuellen Zeitpunkt scheint die Vinculin-Serumkonzentration bei Schlaganfall-Patienten noch nicht untersucht worden zu sein. In der vorliegenden Arbeit konnten bei Schlaganfallpatienten signifikant ($p < 0,05$) höhere Vinculin-Konzentrationen im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen werden, wobei in den Untergruppen nur für ICH ein signifikanter ($p < 0,05$) Unterschied gegenüber der Kontrollgruppe gefunden werden konnte.

Mikrotubuli sind dynamische Proteine, die neben Zellstabilisierung und Zelldifferenzierung essentielle Funktionen bei Zellteilung und intrazellulärem Transport ausüben. Durch Bindung und Hydrolyse von GTP findet die Polymerisation und Depolymerisation von Mikrotubuli statt. Mikrotubuli von Eukaryonten bestehen vor allem aus α - und β -Tubulinen, wobei β -Tubuline wiederum in neun verschiedenen Isoformen vorkommen, die z.T. eine hohe Gewebespezifität zeigen (249, 250). β -Tubulin 4 zeigt eine hohe Gewebespezifität für Hirngewebe (251). Ein Zusammenhang zu Schlaganfällen scheint zum aktuellen Zeitpunkt nicht beschrieben zu sein. In der vorliegenden Arbeit konnte β -Tubulin 4B in signifikant ($p < 0,05$) höheren Konzentrationen in der Patientengruppe gegenüber der Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Und auch die ICH-Patienten zeigten im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant ($p < 0,05$) höhere Konzentrationen.

Das Mannose-binding protein C (MBL2) gehört zur Superfamilie der Lektine, die eine zentrale Rolle bei der angeborenen Immunantwort spielen. Lektine erkennen sog. Pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) auf Mikroorganismen, was letztlich zur Lektin-vermittelten Aktivierung des Komplementsystems führt (252). Bei dieser Lektin-vermittelten Komplementaktivierung spielen Mannose-assoziierte Serinproteasen (MASP) eine wichtige Rolle (s. auch MASP-1). Neben der Erkennung pathogener Organismen kann MBL2 auch an apoptotische Zellen binden und so deren

Aufnahme in Phagozyten vermitteln (253). Zu einer solchen Aktivierung des Komplementsystems kommt es auch nach einer akuten Hirnschädigung wie etwa im Rahmen eines Schlaganfalls (254), was letztlich zur Ausdehnung des Infarktareals führen soll (255). In einer tierexperimentellen Studie konnten Cervera et al. zeigen, dass MBL2-Knockout-Mäuse signifikant kleinere Infarktareale und ein besseres funktionelles Outcome verglichen mit den Wildtyp-Mäusen aufweisen (256). Die Proteine des Lektin-Weges scheinen über eine Thrombinaktivierung eine Thrombenbildung zu induzieren und so die Ischämie-Reperfusionsschädigung zu verschlimmern. Insbesondere MASP-1 führt zu einem Fibrin-Clotting und der MBL-MASP-Komplex selbst besitzt Thrombin-ähnliche Eigenschaften (257). Ducruet et al. konnten in einer tierexperimentellen Studie zeigen, dass die Komplementaktivierung letztlich auf einer Bindung von MBL und IgM an ischämische Endotheloberflächen beruht (258). Song et al. konnten wiederum bei einer Subgruppe mit Diabetes mellitus Typ 2 innerhalb eines Patientenkollektivs mit ischämischen Schlaganfall nachweisen, dass ein erhöhter MBL2-Serumspiegel mit einem schlechteren Outcome verbunden ist (259). In der vorliegenden Arbeit ließen sich lediglich signifikant ($p < 0,05$) höhere MBL2-Werte in der ICH-Gruppe verglichen mit der Kontrollgruppe nachweisen.

β 2-Mikroglobulin (B2M) ist ein Bestandteil des Major Histocompatibility Complex I (MHC-I), das auf allen kernhaltigen Zellen und auf Thrombozyten exprimiert wird und der Antigenpräsentation dient. Membrangebundenes B2M kann jedoch auch sezerniert und z.B. in Blut oder Liquor nachgewiesen werden. In seiner löslichen Form kann β 2-Mikroglobulin zu β -Fibrillen aggregieren und Amyloid-Ablagerung bilden. Als Laborparameter ist es zur Diagnostik und Therapiekontrolle von lymphoproliferativen Erkrankungen etabliert (260), scheint aber auch bei ischämischen Prozessen in erhöhter Konzentration nachweisbar zu sein (261). Insbesondere atherosklerotische Erkrankungen wie die koronare Herzkrankheit und die arterielle Verschlusskrankheit sollen mit B2M assoziiert sein. Unklar ist dabei jedoch, ob B2M nur ein Entzündungsmarker ist oder einen direkten pathogenen Effekt hat. β 2-Mikroglobulin wirkt apoptotisch bzw. nekrotisch auf Tumorzellen und möglicherweise auch auf nicht mutierte, gesunde Zellen (260). Bereits vor 40 Jahren konnten erhöhte B2M-Konzentrationen im Liquor von Schlaganfallpatienten nachgewiesen werden, was im

Zusammenhang mit der inflammatorischen Reaktion auf ischämische Prozesse gesehen wurde (262, 263). Prentice et al. konnten einen Zusammenhang zwischen B2M und Schlaganfall- bzw. KHK-Risiko bei postmenopausalen Frauen nachweisen (264). Rist et al. konnten diese Ergebnisse bestätigen aber auch weiter eingrenzen und zeigen, dass B2M insb. bei ischämischen Schlaganfällen atherothrombotischen, nicht aber kardioembolischen Ursprungs in erhöhter Konzentration vorkommt, was die Autoren auf den Einfluss der Atherosklerose auf β 2-Mikroglobulin zurückführten (265). In der vorliegenden Arbeit konnten bei Schlaganfallpatienten signifikant ($p < 0,05$) höhere B2M-Konzentrationen im Vergleich zur Kontrollgruppe gefunden werden, wobei nur in der ICH-Gruppe ein signifikanter ($p < 0,01$) Unterschied zur Kontrollgruppe bestand.

Die Familie der PDZ and LIM Domain Proteine (PDLIM) besteht aus sechs Isoformen (PDLIM1-5 und PDLIM7), deren gemeinsames Strukturmerkmal der Aufbau aus einer N-terminalen PDZ-Domäne und einer variablen Anzahl an C-terminalen LIM-Domänen ist. Je nach Aufbau unterscheidet man die Subfamilie der Enigmaproteine mit drei C-terminalen LIM-Domänen (PDLIM5 und 7) und die ALP-Proteine (PDLIM1, 2, 3, 4) mit nur einer C-terminalen LIM-Domäne. Proteine mit PDZ-Domäne sind an der Aufrechterhaltung der Zellpolarität und –morphologie, sowie dem Transport und der Aktivität von Membranproteinen beteiligt. Proteine mit LIM-Domäne vermitteln die Regulierung von Aktinstruktur und –dynamik, der Zelladhäsion und sind an der Ausbildung neuronaler Netzwerke und der Signaltransduktion beteiligt. PDLIM1 ist ein zytoplasmatisches Protein, das v.a. über α -Actinin mit dem Zytoskelett verbunden ist (266, 267). Daneben scheint PDLIM1 eine wesentliche Rolle bei der Aktivierung des Aktinzytoskeletts von Endothelzellen zu sog. Stressfasern durch inflammatorische, atherogene oder hämostatische Stimuli zu spielen. Auch an der Aktivierung von Thrombozyten, die u.a. auf einer Neuorganisation der Aktinfilamente beruht, ist PDLIM1 beteiligt (268). Interessanterweise scheint PDLIM1 ein negativer Regulator des Glykoprotein VI-Signalwegs in Thrombozyten zu sein. Glycoprotein VI (GP-VI) wird ausschließlich auf Thrombozyten exprimiert und vermittelt die Anheftung an freies Kollagen, was letztlich essentiell für die Thrombozytenaktivierung ist. In humanen Blutplättchen bildet PDLIM1 über die PDZ-Domäne eine Brücke zwischen Stressfasern

und α -Actinin 1 und verbindet die membranständige Calcium-ATPase 4b mit dem Aktinzytoskelett. PDLIM1 scheint zu verhindern, dass es im intakten Gefäßsystem durch GP-VI zur unerwünschten Thrombozytenaktivierung kommt. Durch Änderung der Calciumhomöostase scheint dieser Mechanismus aufgehoben zu werden: Durch einen initialen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration kommt es zur Aktivierung von Calpain, das PDLIM1 abbaut und so den GP VI-Signalweg freischaltet. Gupta et al. konnten zeigen, dass ein Knockout von PDLIM1 im Mausmodell zu überschießender okklusiver Thrombusbildung nach Gefäßverletzung führt (269, 270). In der vorliegenden Arbeit konnten in der ICH-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant ($p < 0,05$) höhere PDLIM1-Konzentrationen nachgewiesen werden.

4.5 Einschränkungen und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte in einem hypothesen-getriebenen Ansatz innerhalb einer kleinen Studienpopulation mit den jeweiligen „Prototypen“ des hämorrhagischen und ischämischen Schlaganfalls UCH-L1 als vielversprechender Serum-Biomarker identifiziert werden, der in der Frühphase bei ischämischen Schlaganfällen signifikant höhere Serumkonzentrationen zeigte als bei hämorrhagischen Schlaganfällen.

Bei dem untersuchten Patientenkollektiv handelte es sich um eine relativ kleine Testgruppe: Für die UCH-L1-ELISA-Testung wurden 18 Ischämie- und 12 Blutungsproben untersucht. Für die untersuchten Proben wurde weiterhin eine Vorauswahl bezüglich Blutungsvolumen (mind. 50 ml oder hoher NIHSS bzw. intubiert/komatös) und Verschlusslokalisation (Karotis-T, M1- oder M2-Verschluss) getroffen. Es wurden somit nur die „Prototypen“ der intrazerebralen Blutung bzw. des ischämischen Schlaganfalls mit großer Gewebeschädigung analysiert. Desweiteren wurde auf die Einbeziehung von Negativproben weitestgehend verzichtet, da die Diagnose eines ischämischen Schlaganfalls bzw. einer intrazerebralen Blutung bereits radiologisch gesichert war. Das zentrale Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Proteinkonzentrationen in den Serumproben hinsichtlich eines signifikanten Unterschieds zwischen beiden Krankheitsentitäten und nicht die Verifizierung einer klinischen Verdachtsdiagnose. Somit besteht auch keine Kenntnis

der „Basalspiegel“ von UCH-L1 bei gesunden Personen. Die UCH-L1-ELISA-Messungen müssen an einem größeren Patientenkollektiv wiederholt werden, das auch kleinere Hirnblutungen und distalere Gefäßverschlüsse mit dementsprechend geringerem Gewebeuntergang beinhaltet. Desweiteren muss auch die UCH-L1-Freisetzungskinetik durch Konzentrationsbestimmung im Zeitverlauf evaluiert werden.

Auch im hypothesenfreien Ansatz wurde mittels massenspektrometrischer Verfahren nur ein sehr kleines Patientenkollektiv untersucht. Drei Serumproben stammten von Patienten, die einen ischämischen Schlaganfall erlitten haben und vier Serumproben von Patienten mit intrazerebraler Blutung. Auch bei dieser Studienpopulation handelte es sich um eine eher heterogene Gruppe mit ungleicher Verteilung von Geschlecht, Alter, NIHSS-Wert und Zeit zwischen Symptombeginn und Blutentnahme. Die massenspektrometrische Analyse in der vorliegenden Arbeit ist somit als Pilotprojekt zu verstehen, mit dem hypothesenfrei Proteine identifiziert werden sollten, die als mögliche Biomarker fungieren könnten. Es sind unbedingt weitere Untersuchungen an größeren Patientengruppen notwendig, um die gefundenen Proteine weiter zu charakterisieren und Erkenntnisse hinsichtlich ihrer Freisetzungskinetik zu gewinnen. Zudem müssen zur Verifizierung der massenspektrometrisch identifizierten Proteine weitere Nachweismethoden wie ELISA-Test oder Western Blots durchgeführt werden.

5 Zusammenfassung

Einleitung In ihrer klinischen Symptomatik lassen sich der ischämische Schlaganfall (IS) und die intrazerebrale Blutung (ICH) nicht sicher unterscheiden. Hinsichtlich der Akuttherapie, die eine möglichst schnelle Wiederherstellung der zerebralen Sauerstoffversorgung („time is brain“) zum Ziel hat, ist diese Differenzierung jedoch essentiell. Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist der Nachweis serologischer Biomarker in der Frühphase des Schlaganfalls zur Differenzierung zwischen IS und ICH. Hypothesengestützt wurden aufgrund pathophysiologischer Überlegungen hierfür die ZNS-spezifischen Proteine GFAP, UCH-L1, pNf-H, MBP und Tau untersucht. In einem hypothesenfreien Ansatz wurden Serumproben von Schlaganfallpatienten massenspektrometrisch analysiert.

Material und Methoden Die Patientenrekrutierung für die vorliegende Arbeit erfolgte im Rahmen der prospektiven, multizentrischen BE FAST II-Studie zur Evaluation von GFAP als Biomarker der akuten ICH. Von Mai 2012 bis April 2014 wurden Serumproben von Patienten mit akuter Schlaganfallsymptomatik in der Klinik für Neurologie der Goethe-Universität Frankfurt am Main gesammelt. Mittels kommerziell verfügbaren ELISA-Kits wurden die Serumkonzentrationen der Proteine UCH-L1, pNf-H, MBP und Tau bestimmt. Die Analyse der GFAP-Serumkonzentration erfolgte durch Roche Diagnostics mit Hilfe des Elecsys®-Systems, einem Elektrochemilumineszenz-Immunoassay. Für die Massenspektrometrie wurden Serumproben aus der BE FAST-I-Studie, die von Ende des Jahres 2010 bis Anfang des Jahres 2011 asserviert wurden, eingesetzt. Die massenspektrometrischen Untersuchungen wurden in der Abteilung „Funktionelle Proteomics“ im Fachbereich Medizin der Goethe-Universität Frankfurt am Main durchgeführt.

Ergebnisse Tau und MBP ließen sich in den meisten Serumproben nicht nachweisen. In der pNf-H-Messung lag die Konzentration bei 27 von 35 Patienten oberhalb der Nachweisgrenze, wobei sich kein signifikanter Unterschied zwischen IS und ICH ergab ($p = 0,69$). UCH-L1 ließ sich bei 28 von 29 Patienten nachweisen. In der IS-Gruppe war

eine signifikant ($p = 0,005$) höhere UCH-L1-Konzentration nachweisbar (Median 5,71 ng/ml) als in der ICH-Gruppe (Median 2,37 ng/ml). GFAP war bei allen 45 Patienten nachweisbar mit signifikant ($p < 0,00005$) höherer Konzentration in der ICH-Gruppe (Median 2,87 ng/ml) verglichen mit der IS-Gruppe (Median 0,01 ng/ml). Zudem fand sich eine positive Korrelation der UCH-L1-Werte in der IS-Gruppe mit dem Patientenalter ($r = 0,62$, $p = 0,01$), sowie eine positive Korrelation der GFAP-Werte in der ICH-Gruppe mit dem Patientenalter ($r = 0,54$, $p = 0,03$), dem NIHSS-Wert ($r = 0,69$, $p = 0,04$) und mit dem ICB-Volumen ($r = 0,60$, $p = 0,01$). In der massenspektrometrischen Analyse ließ sich eine Top Liste aus 22 Proteinen erstellen, die jeweils signifikante Unterschiede zwischen IS und ICH aufweisen.

Diskussion Die Rolle des Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) und insbesondere von UCH-L1 beim IS ist bislang noch nicht abschließend geklärt. Nach einer zerebralen Ischämie ist jedoch eine Upregulation von UCH-L1 beschrieben, u.a. durch eine verstärkte UPS-Aktivität durch Aggregate fehlgefalteter Proteine. Daneben reagieren Neurone sensibler auf eine Hypoxie als Gliazellen mit einer dominierenden Freisetzung neuronaler Proteine wie UCH-L1. Bei ICH kommt es dagegen eher zu einer unspezifischen Destruktion des Hirngewebes mit vorwiegender glialer Schädigung und rascher Freisetzung glialer Proteine wie GFAP. Mit UCH-L1 und GFAP konnten zwei Proteine als erfolgsversprechende Kandidaten zur Differenzierung zwischen IS und ICH in der Frühphase identifiziert werden. Zur weiteren Validierung sind Untersuchungen an einer großen Population notwendig, die auch kleinere Infarkte und Hirnblutungen einschließt. Auch der Einfluss epidemiologischer und klinischer Faktoren wie z.B. dem Patientenalter muss weiter evaluiert werden.

Die mittels Massenspektrometrie erstellte Top Liste aus 22 Proteinen enthält vielversprechende Biomarker-Kandidaten, die signifikante Unterschiede zwischen IS und ICH aufweisen und ebenso an einem großen Patientenkollektiv weiter untersucht werden müssen.

6 Abstract

Introduction Ischemic stroke (IS) and intracerebral hemorrhage (ICH) cannot be reliably distinguished based on their clinical presentation only. With regard to acute therapy, which aims at fast restoration of the cerebral oxygen supply ("time is brain"), this differentiation is essential. The aim of this work is the detection of serological biomarkers in the early phase of stroke for differentiation between IS and ICH. For pathophysiological reasons CNS-specific proteins GFAP, UCH-L1, pNf-H, MBP and Tau were chosen. In a hypothesis-free approach, serum samples from stroke patients were analyzed by mass spectrometry.

Materials and methods The patient recruitment for this work occurred within the prospective, multicentric BE FAST II study on the evaluation of GFAP as a biomarker of acute ICH. From May 2012 to April 2014 serum samples from patients with acute stroke symptoms were collected in the Department of Neurology at the Goethe University Frankfurt am Main. The serum concentrations of UCH-L1, pNf-H, MBP and tau were determined by commercially available ELISA kits. Analysis of GFAP serum concentration was performed by Roche Diagnostics using the Elecsys® system, an electrochemiluminescence immunoassay. For mass spectrometry, serum samples from the BE FAST-I study, which were conserved from the end of 2010 until the beginning of 2011, were used. Mass spectrometry have been performed in the Functional proteomics group in the Faculty of Medicine of the Goethe University Frankfurt am Main.

Results Tau and MBP were undetectable in most serum samples. In the pNf-H measurement, the concentration in 27 of 35 patients was above the detection limit, with no significant difference between IS and ICH ($p = 0.69$). UCH-L1 was detected in 28 out of 29 patients. In the IS group a significant ($p = 0.005$) higher UCH-L1 concentration was detectable (median 5.71 ng/ml) than in the ICH group (median 2.37 ng/ml). GFAP was detectable in all 45 patients with significant ($p < 0.00005$) higher concentration in the ICH group (median 2.87 ng/ml) compared to the IS group (median 0.01 ng/ml). In addition, a positive correlation of the UCH-L1 values were found in the

IS group with the patient age ($r = 0.62$, $p = 0.01$) and also a positive correlation of the GFAP values in the ICH group with the patient age ($r = 0.54$, $p = 0.03$), the NIHSS value ($r = 0.69$, $p = 0.04$) and the ICB volume ($r = 0.60$, $p = 0.01$). In the mass spectrometric analysis, a top list of 22 proteins with significant differences between IS and ICH was created.

Discussion The role of the ubiquitin-proteasome system (UPS) and in particular of UCH-L1 in IS has not been clarified yet. However, after cerebral ischemia, upregulation of UCH-L1 has been described by increased UPS activity by aggregates of misfolded proteins. In addition, neurons are more sensitive to hypoxia than glial cells with a dominant release of neuronal proteins such as UCH-L1. In ICH, however, nonspecific destruction of the brain tissue with predominant glial damage and rapid release of glial proteins such as GFAP occurs. With UCH-L1 and GFAP, two proteins could be identified as promising candidates for differentiation between IS and ICH in the early phase. Further validation requires studies on a large population that also includes minor infarcts and cerebral hemorrhage. Also the influence of epidemiological and clinical factors such as e.g. the patient's age must be further evaluated. The mass spectrometry top list of 22 proteins contains promising biomarker candidates that show significant differences between IS and ICH and need further study on a large patient population.

7 Literaturverzeichnis

1. Hatano S. Experience from a multicentre stroke register: A preliminary report. *Bull World Health Organ* 1976; 54(5):541–53.
2. World Health Organization. Top 10 causes of death. Available from: URL: http://www.who.int/gho/mortality_burden_disease/causes_death/top_10/en/.
3. Lopez AD, Mathers CD, Ezzati M, Jamison DT, Murray CJL. Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: Systematic analysis of population health data. *Lancet* 2006; 367(9524):1747–57.
4. Kolominsky-Rabas PL, Heuschmann PU, Marschall D, Emmert M, Baltzer N, Neundörfer B 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 [cited 2018 Sep 28]; 37(5):1179–83.
5. Kolominsky-Rabas PL, Sarti C, Heuschmann PU, Graf C, Siemonsen S, Neundoerfer B et al. A Prospective Community-Based Study of Stroke in Germany—The Erlangen Stroke Project (ESPro). *Stroke* 1998 [cited 2018 Sep 28]; 29(12):2501–6.
6. Foerch C, Misselwitz B, Sitzer M, Steinmetz H, Neumann-Haefelin T. The projected burden of stroke in the German federal state of Hesse up to the year 2050. *Dtsch Arztebl Int* 2008 [cited 2018 Sep 28]; 105(26):467–73.
7. Eschenfelder CC, Zeller JA, Stingele R. Schlaganfall: Ursachen und Klassifikation. *Hamostaseologie* 2006; 26(4):298–308.
8. Hossmann KA. Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia. *Ann Neurol* 1994; 36(4):557–65.
9. Fisher M, Bastan B. Identifying and utilizing the ischemic penumbra. *Neurology* 2012; 79(13 Suppl 1):S79-85.
10. Deb P, Sharma S, Hassan KM. Pathophysiologic mechanisms of acute ischemic stroke: An overview with emphasis on therapeutic significance beyond thrombolysis. *Pathophysiology* 2010 [cited 2018 Sep 28]; 17(3):197–218.
11. Frizzell JP. Acute stroke: Pathophysiology, diagnosis, and treatment. *AACN Clin Issues* 2005; 16(4):421-40; quiz 597-8.
12. Yenari MA. Pathophysiology of acute ischemic stroke. *Cleve Clin J Med* 2004; 71 Suppl 1:S25-7.
13. Elijovich L, Patel PV, Hemphill JC. Intracerebral hemorrhage. *Semin Neurol* 2008; 28(5):657–67.
14. Ziai WC. Hematology and inflammatory signaling of intracerebral hemorrhage. *Stroke* 2013; 44(6 Suppl 1):S74-8.
15. Tao C, Hu X, Li H, You C. White Matter Injury after Intracerebral Hemorrhage: Pathophysiology and Therapeutic Strategies. *Front Hum Neurosci* 2017; 11:422.

16. Weir CJ, Murray GD, Adams FG, Muir KW, Grosset DG, Lees KR. Poor accuracy of stroke scoring systems for differential clinical diagnosis of intracranial haemorrhage and infarction. *Lancet* 1994; 344(8928):999–1002.
17. Hennerici M. G., Kern R. et al. S1-Leitlinie Diagnostik akuter zerebrovaskulärer Erkrankungen. Deutsche Gesellschaft für Neurologie, Hrsg. Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie [cited 2018 Sep 28]; 2017.
18. Veltkamp R. Akuttherapie des ischämischen Schlaganfalls. Deutsche Gesellschaft für Neurologie, Hrsg. Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie 2012 [cited 2018 Sep 28].
19. Steiner T. Intrazerebrale Blutungen. Deutsche Gesellschaft für Neurologie, Hrsg. Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie 2012 [cited 2018 Sep 28].
20. Wardlaw JM, Murray V, Berge E, del Zoppo G, Sandercock P, Lindley RL et al. Recombinant tissue plasminogen activator for acute ischaemic stroke: An updated systematic review and meta-analysis. *The Lancet* 2012; 379(9834):2364–72.
21. Saver JL, Fonarow GC, Smith EE, Reeves MJ, Grau-Sepulveda MV, Pan W et al. Time to treatment with intravenous tissue plasminogen activator and outcome from acute ischemic stroke. *JAMA* 2013; 309(23):2480–8.
22. Advani R, Naess H, Kurz MW. The golden hour of acute ischemic stroke. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med* 2017; 25(1):54.
23. Ebinger M, Winter B, Wendt M, Weber JE, Waldschmidt C, Rozanski M et al. Effect of the use of ambulance-based thrombolysis on time to thrombolysis in acute ischemic stroke: A randomized clinical trial. *JAMA* 2014; 311(16):1622–31.
24. Ebinger M, Kunz A, Wendt M, Rozanski M, Winter B, Waldschmidt C et al. Effects of golden hour thrombolysis: A Prehospital Acute Neurological Treatment and Optimization of Medical Care in Stroke (PHANTOM-S) substudy. *JAMA Neurol* 2015; 72(1):25–30.
25. Kunz A, Ebinger M, Geisler F, Rozanski M, Waldschmidt C, Weber JE et al. Functional outcomes of pre-hospital thrombolysis in a mobile stroke treatment unit compared with conventional care: An observational registry study. *Lancet Neurol* 2016; 15(10):1035–43.
26. Nolte CH, Ebinger M, Scheitz JF, Kunz A, Erdur H, Geisler F et al. Effects of Prehospital Thrombolysis in Stroke Patients With Prestroke Dependency. *Stroke* 2018; 49(3):646–51.
27. Tsivgoulis G, Geisler F, Katsanos AH, Kőrv J, Kunz A, Mikulik R et al. Ultraearly Intravenous Thrombolysis for Acute Ischemic Stroke in Mobile Stroke Unit and Hospital Settings: A Comparative Analysis. *Stroke* 2018.
28. Sprigg N, Flaherty K, Appleton JP, Al-Shahi Salman R, Bereczki D, Beridze M et al. Tranexamic acid for hyperacute primary IntraCerebral Haemorrhage (TICH-2): An international randomised, placebo-controlled, phase 3 superiority trial. *Lancet* 2018; 391(10135):2107–15.
29. Huang B, Xu Q, Ye R, Xu J. Influence of tranexamic acid on cerebral hemorrhage: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Clin Neurol Neurosurg* 2018; 171:174–8.

30. Atkinson AJ. Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther* 2001; 69(3):89–95.
31. Whiteley W, Tian Y, Jickling GC. Blood biomarkers in stroke: Research and clinical practice. *Int J Stroke* 2012; 7(5):435–9.
32. Foerch C, Pfeilschifter W, Zeiner P, Brunkhorst R. Saures Gliafaserprotein beim Patienten mit akuten Schlaganfallsymptomen: Diagnostischer Marker einer Hirnblutung. *Nervenarzt* 2014; 85(8):982–9.
33. Kim SJ, Moon GJ, Bang OY. Biomarkers for stroke. *J Stroke* 2013; 15(1):27–37.
34. Foerch C, Montaner J, Furie KL, Ning MM, Lo EH. Invited article: Searching for oracles? Blood biomarkers in acute stroke. *Neurology* 2009; 73(5):393–9.
35. Kernagis DN, Laskowitz DT. Evolving role of biomarkers in acute cerebrovascular disease. *Ann Neurol* 2012; 71(3):289–303.
36. Jickling GC, Sharp FR. Blood biomarkers of ischemic stroke. *Neurotherapeutics* 2011; 8(3):349–60.
37. Reynolds MA, Kirchick HJ, Dahlen JR, Anderberg JM, McPherson PH, Nakamura KK et al. Early biomarkers of stroke. *Clin Chem* 2003; 49(10):1733–9.
38. Laskowitz DT, Kasner SE, Saver J, Remmel KS, Jauch EC. Clinical usefulness of a biomarker-based diagnostic test for acute stroke: The Biomarker Rapid Assessment in Ischemic Injury (BRAIN) study. *Stroke* 2009; 40(1):77–85.
39. Chalela JA, Kidwell CS, Nentwich LM, Luby M, Butman JA, Demchuk AM et al. Magnetic resonance imaging and computed tomography in emergency assessment of patients with suspected acute stroke: A prospective comparison. *The Lancet* 2007; 369(9558):293–8.
40. Jackson P, Thompson RJ. The demonstration of new human brain-specific proteins by high-resolution two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *J Neurol Sci* 1981; 49(3):429–38.
41. Harada T, Harada C, Wang Y-L, Osaka H, Amanai K, Tanaka K et al. Role of ubiquitin carboxy terminal hydrolase-L1 in neural cell apoptosis induced by ischemic retinal injury in vivo. *Am J Pathol* 2004; 164(1):59–64.
42. Hu BR, Janelidze S, Ginsberg MD, Busto R, Perez-Pinzon M, Sick TJ et al. Protein aggregation after focal brain ischemia and reperfusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 2001; 21(7):865–75.
43. Kim DA, Jeon YK, Nam MJ. Galangin induces apoptosis in gastric cancer cells via regulation of ubiquitin carboxy-terminal hydrolase isozyme L1 and glutathione S-transferase P. *Food Chem Toxicol* 2012; 50(3-4):684–8.
44. Shen H, Sikorska M, Leblanc J, Walker PR, Liu QY. Oxidative stress regulated expression of ubiquitin Carboxyl-terminal Hydrolase-L1: Role in cell survival. *Apoptosis* 2006; 11(6):1049–59.
45. Wang W-J, Li Q-Q, Xu J-D, Cao X-X, Li H-X, Tang F et al. Over-expression of ubiquitin carboxy terminal hydrolase-L1 induces apoptosis in breast cancer cells. *Int J Oncol* 2008; 33(5):1037–45.

46. Ge P, Luo Y, Liu CL, Hu B. Protein aggregation and proteasome dysfunction after brain ischemia. *Stroke* 2007; 38(12):3230–6.
47. Liu MC, Akinyi L, Scharf D, Mo J, Lerner SF, Muller U et al. Ubiquitin C-terminal hydrolase-L1 as a biomarker for ischemic and traumatic brain injury in rats. *Eur J Neurosci* 2010; 31(4):722–32.
48. Papa L, Akinyi L, Liu MC, Pineda JA, Tepas JJ, Oli MW et al. Ubiquitin C-terminal hydrolase is a novel biomarker in humans for severe traumatic brain injury. *Crit Care Med* 2010; 38(1):138–44.
49. Mondello S, Linnet A, Buki A, Robicsek S, Gabrielli A, Tepas J et al. Clinical utility of serum levels of ubiquitin C-terminal hydrolase as a biomarker for severe traumatic brain injury. *Neurosurgery* 2012; 70(3):666–75.
50. Siman R, Toraskar N, Dang A, McNeil E, McGarvey M, Plaum J et al. A panel of neuron-enriched proteins as markers for traumatic brain injury in humans. *J Neurotrauma* 2009; 26(11):1867–77.
51. Ren C, Zoltewicz S, Guingab-Cagmat J, Anagli J, Gao M, Hafeez A et al. Different expression of ubiquitin C-terminal hydrolase-L1 and α II-spectrin in ischemic and hemorrhagic stroke: Potential biomarkers in diagnosis. *Brain Res* 2013; 1540:84–91.
52. Ren C, Kobeissy F, Alawieh A, Li N, Li N, Zibara K et al. Assessment of Serum UCH-L1 and GFAP in Acute Stroke Patients. *Sci Rep* 2016; 6:24588.
53. Yigit I, Atescelik M, Yilmaz M, Goktekin MC, Gurger M, Ilhan N. Investigation of UCH-L1 levels in ischemic stroke, intracranial hemorrhage and metabolic disorder induced impaired consciousness. *Am J Emerg Med* 2017; 35(12):1895–8.
54. Foerch C, Curdt I, Yan B, Dvorak F, Hermans M, Berkefeld J et al. Serum glial fibrillary acidic protein as a biomarker for intracerebral haemorrhage in patients with acute stroke. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2006; 77(2):181–4.
55. Luger S, Witsch J, Dietz A, Hamann GF, Minnerup J, Schneider H et al. Glial Fibrillary Acidic Protein Serum Levels Distinguish between Intracerebral Hemorrhage and Cerebral Ischemia in the Early Phase of Stroke. *Clin Chem* 2017; 63(1):377–85.
56. Foerch C, Niessner M, Back T, Bauerle M, Marchis GM de, Ferbert A et al. Diagnostic accuracy of plasma glial fibrillary acidic protein for differentiating intracerebral hemorrhage and cerebral ischemia in patients with symptoms of acute stroke. *Clin Chem* 2012; 58(1):237–45.
57. Rozanski M, Waldschmidt C, Kunz A, Grittner U, Ebinger M, Wendt M et al. Glial Fibrillary Acidic Protein for Prehospital Diagnosis of Intracerebral Hemorrhage. *Cerebrovasc Dis* 2017; 43(1-2):76–81.
58. Shaw G, Yang C, Ellis R, Anderson K, Parker Mickle J, Scheff S et al. Hyperphosphorylated neurofilament NF-H is a serum biomarker of axonal injury. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 336(4):1268–77.
59. Anderson KJ, Scheff SW, Miller KM, Roberts KN, Gilmer LK, Yang C et al. The phosphorylated axonal form of the neurofilament subunit NF-H (pNF-H) as a blood biomarker of traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 2008; 25(9):1079–85.

60. Singh P, Yan J, Hull R, Read S, O'Sullivan J, Henderson RD et al. Levels of phosphorylated axonal neurofilament subunit H (pNfH) are increased in acute ischemic stroke. *J Neurol Sci* 2011; 304(1-2):117–21.
61. Sellner J, Patel A, Dassan P, Brown MM, Petzold A. Hyperacute detection of neurofilament heavy chain in serum following stroke: A transient sign. *Neurochem Res* 2011; 36(12):2287–91.
62. Cai J-Y, Lu C, Chen M-H, Ba H-J, Chen X-D, Lin J-H et al. Predictive value of phosphorylated axonal neurofilament subunit H for clinical outcome in patients with acute intracerebral hemorrhage. *Clin Chim Acta* 2013; 424:182–6.
63. Warren KG, Catz I. The relationship between levels of cerebrospinal fluid myelin basic protein and IgG measurements in patients with multiple sclerosis. *Ann Neurol* 1985; 17(5):475–80.
64. Chamczuk AJ, Ursell M, O'Connor P, Jackowski G, Moscarello MA. A rapid ELISA-based serum assay for myelin basic protein in multiple sclerosis. *J Immunol Methods* 2002; 262(1-2):21–7.
65. Yamazaki Y, Yada K, Morii S, Kitahara T, Ohwada T. Diagnostic significance of serum neuron-specific enolase and myelin basic protein assay in patients with acute head injury. *Surg Neurol* 1995; 43(3):267-70; discussion 270-1.
66. Wang KKW, Ottens AK, Liu MC, Lewis SB, Meegan C, Oli MW et al. Proteomic identification of biomarkers of traumatic brain injury. *Expert Rev Proteomics* 2005; 2(4):603–14.
67. Berger RP, Beers SR, Richichi R, Wiesman D, Adelson PD. Serum biomarker concentrations and outcome after pediatric traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 2007; 24(12):1793–801.
68. Hill MD, Jackowski G, Bayer N, Lawrence M, Jaeschke R. Biochemical markers in acute ischemic stroke. *CMAJ* 2000; 162(8):1139–40.
69. Jauch EC, Lindsell C, Broderick J, Fagan SC, Tilley BC, Levine SR. Association of serial biochemical markers with acute ischemic stroke: The National Institute of Neurological Disorders and Stroke recombinant tissue plasminogen activator Stroke Study. *Stroke* 2006; 37(10):2508–13.
70. Bitsch A, Horn C, Kemmling Y, Seipelt M, Hellenbrand U, Stiefel M et al. Serum tau protein level as a marker of axonal damage in acute ischemic stroke. *Eur Neurol* 2002; 47(1):45–51.
71. Wunderlich MT, Lins H, Skalej M, Wallesch C-W, Goertler M. Neuron-specific enolase and tau protein as neurobiochemical markers of neuronal damage are related to early clinical course and long-term outcome in acute ischemic stroke. *Clin Neurol Neurosurg* 2006; 108(6):558–63.
72. Bielewicz J, Kurzepa J, Czekajska-Chehab E, Stelmasiak Z, Bartosik-Psujek H. Does serum Tau protein predict the outcome of patients with ischemic stroke? *J Mol Neurosci* 2011; 43(3):241–5.
73. Hu H-T, Xiao F, Yan Y-Q, Wen S-Q, Zhang L. The prognostic value of serum tau in patients with intracerebral hemorrhage. *Clin Biochem* 2012; 45(16-17):1320–4.

Literaturverzeichnis

74. Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 1998; 67:425–79.
75. Wilkinson KD, Lee KM, Deshpande S, Duerksen-Hughes P, Boss JM, Pohl J. The neuron-specific protein PGP 9.5 is a ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase. *Science* 1989; 246(4930):670–3.
76. Caldeira MV, Salazar IL, Curcio M, Canzoniero LMT, Duarte CB. Role of the ubiquitin-proteasome system in brain ischemia: Friend or foe? *Prog Neurobiol* 2014; 112:50–69.
77. Fang Y, Fu D, Shen X-Z. The potential role of ubiquitin c-terminal hydrolases in oncogenesis. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1806(1):1–6.
78. Liu Y, Fallon L, Lashuel HA, Liu Z, Lansbury PT. The UCH-L1 gene encodes two opposing enzymatic activities that affect alpha-synuclein degradation and Parkinson's disease susceptibility. *Cell* 2002; 111(2):209–18.
79. Osaka H, Wang Y-L, Takada K, Takizawa S, Setsuie R, Li H et al. Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 binds to and stabilizes monoubiquitin in neuron. *Hum Mol Genet* 2003; 12(16):1945–58.
80. Day INM, Thompson RJ. UCHL1 (PGP 9.5): Neuronal biomarker and ubiquitin system protein. *Prog Neurobiol* 2010; 90(3):327–62.
81. Wilson PO, Barber PC, Hamid QA, Power BF, Dhillon AP, Rode J et al. The immunolocalization of protein gene product 9.5 using rabbit polyclonal and mouse monoclonal antibodies. *Br J Exp Pathol* 1988; 69(1):91–104.
82. Eng LF, Ghirnikar RS, Lee YL. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochem Res* 2000; 25(9-10):1439–51.
83. Liedtke W, Edelmann W, Bieri PL, Chiu FC, Cowan NJ, Kucherlapati R et al. GFAP is necessary for the integrity of CNS white matter architecture and long-term maintenance of myelination. *Neuron* 1996; 17(4):607–15.
84. Weinstein DE, Shelanski ML, Liem RK. Suppression by antisense mRNA demonstrates a requirement for the glial fibrillary acidic protein in the formation of stable astrocytic processes in response to neurons. *J Cell Biol* 1991; 112(6):1205–13.
85. Reeves SA, Helman LJ, Allison A, Israel MA. Molecular cloning and primary structure of human glial fibrillary acidic protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86(13):5178–82.
86. Petzold A. Neurofilament phosphoforms: Surrogate markers for axonal injury, degeneration and loss. *J Neurol Sci* 2005; 233(1-2):183–98.
87. Yuan A, Rao MV, Veeranna, Nixon RA. Neurofilaments at a glance. *J Cell Sci* 2012; 125(Pt 14):3257–63.
88. Goldstein ME, Sternberger NH, Sternberger LA. Phosphorylation protects neurofilaments against proteolysis. *J Neuroimmunol* 1987; 14(2):149–60.
89. Pant HC. Dephosphorylation of neurofilament proteins enhances their susceptibility to degradation by calpain. *Biochem J* 1988; 256(2):665–8.
90. Kursula P. Structural properties of proteins specific to the myelin sheath. *Amino Acids* 2008; 34(2):175–85.

91. Aggarwal S, Yurlova L, Simons M. Central nervous system myelin: Structure, synthesis and assembly. *Trends Cell Biol* 2011; 21(10):585–93.
92. Harauz G, Ladizhansky V, Boggs JM. Structural polymorphism and multifunctionality of myelin basic protein. *Biochemistry* 2009; 48(34):8094–104.
93. Morris M, Maeda S, Vossel K, Mucke L. The many faces of tau. *Neuron* 2011; 70(3):410–26.
94. Mandelkow E-M, Mandelkow E. Biochemistry and cell biology of tau protein in neurofibrillary degeneration. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012; 2(7):a006247.
95. Engvall E, Perlmann P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 1971; 8(9):871–4.
96. van Weemen BK, Schuurs AHWM. Immunoassay using antigen-enzyme conjugates. *FEBS Lett* 1971; 15(3):232–6.
97. Munk K, Abröhl C, editors. *Biochemie, Zellbiologie: [fit für den Bachelor]*. Stuttgart: Thieme; 2008. (Taschenlehrbuch Biologie).
98. Lefkovits I. Proteomik. *Z Herz- Thorax- Gefäßchir* 2008; 22(1):7–15.
99. Hesse M, Meier H, Zeeh B, Bienz S, Bigler L, Fox T. *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie. 9., überarbeitete und erweiterte Auflage*. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag; 2016. Available from: URL: <https://www.thieme.de/de/thieme-chemistry/monografien-spektroskopische-methoden-58440.htm>.
100. Brott T, Adams HP, Olinger CP, Marler JR, Barsan WG, Biller J et al. Measurements of acute cerebral infarction: A clinical examination scale. *Stroke* 1989; 20(7):864–70.
101. Linn J, Wiesmann M, Brückmann H. *Atlas Klinische Neuroradiologie des Gehirns*. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2011. Available from: URL: <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-540-89569-5>.
102. Kothari RU, Brott T, Broderick JP, Barsan WG, Sauerbeck LR, Zuccarello M et al. The ABCs of measuring intracerebral hemorrhage volumes. *Stroke* 1996; 27(8):1304–5.
103. LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL, RANDALL RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193(1):265–75.
104. Rappsilber J, Mann M, Ishihama Y. Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. *Nat Protoc* 2007; 2(8):1896–906.
105. Cox J, Mann M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat Biotechnol* 2008; 26(12):1367–72.
106. Tyanova S, Temu T, Sinitcyn P, Carlson A, Hein MY, Geiger T et al. The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nat Methods* 2016; 13(9):731–40.
107. Sachs L, Hedderich J. *Angewandte Statistik: Methodensammlung mit R : mit 180 Tabellen. 12, vollst. neu bearb. Aufl.* Berlin, Heidelberg: Springer; 2006. Available from: URL: <http://dx.doi.org/10.1007/978-3-540-32161-3>.

108. Zhang R, Barker L, Pinchev D, Marshall J, Rasamoeliso M, Smith C et al. Mining biomarkers in human sera using proteomic tools. *Proteomics* 2004; 4(1):244–56.
109. Meller R. The role of the ubiquitin proteasome system in ischemia and ischemic tolerance. *Neuroscientist* 2009; 15(3):243–60.
110. Peng Z, Li J, Li Y, Yang X, Feng S, Han S et al. Downregulation of miR-181b in mouse brain following ischemic stroke induces neuroprotection against ischemic injury through targeting heat shock protein A5 and ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isozyme L1. *J Neurosci Res* 2013; 91(10):1349–62.
111. Koh P-O. Proteomic analysis of focal cerebral ischemic injury in male rats. *J Vet Med Sci* 2010; 72(2):181–5.
112. Caldeira MV, Curcio M, Leal G, Salazar IL, Mele M, Santos ARA et al. Excitotoxic stimulation downregulates the ubiquitin-proteasome system through activation of NMDA receptors in cultured hippocampal neurons. *Biochim Biophys Acta* 2013; 1832(1):263–74.
113. Cartier AE, Djakovic SN, Salehi A, Wilson SM, Masliah E, Patrick GN. Regulation of synaptic structure by ubiquitin C-terminal hydrolase L1. *J Neurosci* 2009; 29(24):7857–68.
114. Mondello S, Papa L, Buki A, Bullock MR, Czeiter E, Tortella FC et al. Neuronal and glial markers are differently associated with computed tomography findings and outcome in patients with severe traumatic brain injury: A case control study. *Crit Care* 2011; 15(3):R156.
115. Brunkhorst R, Pfeilschifter W, Foerch C. Astroglial proteins as diagnostic markers of acute intracerebral hemorrhage-pathophysiological background and clinical findings. *Transl Stroke Res* 2010; 1(4):246–51.
116. Dvorak F, Haberer I, Sitzler M, Foerch C. Characterisation of the diagnostic window of serum glial fibrillary acidic protein for the differentiation of intracerebral haemorrhage and ischaemic stroke. *Cerebrovasc Dis* 2009; 27(1):37–41.
117. Blyth BJ, Farahvar A, He H, Nayak A, Yang C, Shaw G et al. Elevated serum ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 is associated with abnormal blood-brain barrier function after traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 2011; 28(12):2453–62.
118. Bidmon HJ, Jancsik V, Schleicher A, Hagemann G, Witte OW, Woodhams P et al. Structural alterations and changes in cytoskeletal proteins and proteoglycans after focal cortical ischemia. *Neuroscience* 1998; 82(2):397–420.
119. Hedreen JC, Koliatsos VE. Phosphorylated neurofilaments in neuronal perikarya and dendrites in human brain following axonal damage. *J Neuropathol Exp Neurol* 1994; 53(6):663–71.
120. Lian T, Qu D, Zhao X, Yu L, Gao B. Identification of Site-Specific Stroke Biomarker Candidates by Laser Capture Microdissection and Labeled Reference Peptide. *Int J Mol Sci* 2015; 16(6):13427–41.
121. Martínez-Morillo E, García Hernández P, Begcevic I, Kosanam H, Prieto García B, Alvarez Menéndez FV et al. Identification of novel biomarkers of brain damage in

- patients with hemorrhagic stroke by integrating bioinformatics and mass spectrometry-based proteomics. *J Proteome Res* 2014; 13(2):969–81.
122. Matias-Guiu J, Martinez-Vazquez J, Ruibal A, Colomer R, Boada M, Codina A. Myelin basic protein and creatine kinase BB isoenzyme as CSF markers of intracranial tumors and stroke. *Acta Neurol Scand* 1986; 73(5):461–5.
123. Strand T, Alling C, Karlsson B, Karlsson I, Winblad B. Brain and plasma proteins in spinal fluid as markers for brain damage and severity of stroke. *Stroke* 1984; 15(1):138–44.
124. Hjalmarsson C, Bjerke M, Andersson B, Blennow K, Zetterberg H, Aberg ND et al. Neuronal and glia-related biomarkers in cerebrospinal fluid of patients with acute ischemic stroke. *J Cent Nerv Syst Dis* 2014; 6:51–8.
125. Brouns R, Vil B de, Cras P, Surgeloose D de, Mariën P, Deyn PP de. Neurobiochemical markers of brain damage in cerebrospinal fluid of acute ischemic stroke patients. *Clin Chem* 2010; 56(3):451–8.
126. Thomas DG, Palfreyman JW, Ratcliffe JG. Serum-myelin-basic-protein assay in diagnosis and prognosis of patients with head injury. *Lancet* 1978; 1(8056):113–5.
127. Can S, Akdur O, Yildirim A, Adam G, Cakir DU, Karaman HIO. Myelin basic protein and ischemia modified albumin levels in acute ischemic stroke cases. *Pak J Med Sci* 2015; 31(5):1110–4.
128. Urra X, Miró F, Chamorro A, Planas AM. Antigen-specific immune reactions to ischemic stroke. *Front Cell Neurosci* 2014; 8:278.
129. Iadecola C, Anrather J. The immunology of stroke: From mechanisms to translation. *Nat Med* 2011; 17(7):796–808.
130. Becker KJ, Kindrick DL, Lester MP, Shea C, Ye Z-C. Sensitization to brain antigens after stroke is augmented by lipopolysaccharide. *J Cereb Blood Flow Metab* 2005; 25(12):1634–44.
131. Zierath D, Thullbery M, Hadwin J, Gee JM, Savos A, Kalil A et al. CNS immune responses following experimental stroke. *Neurocrit Care* 2010; 12(2):274–84.
132. Shibata D, Cain K, Tanzi P, Zierath D, Becker K. Myelin basic protein autoantibodies, white matter disease and stroke outcome. *J Neuroimmunol* 2012; 252(1-2):106–12.
133. Becker KJ, McCarron RM, Ruetzler C, Laban O, Sternberg E, Flanders KC et al. Immunologic tolerance to myelin basic protein decreases stroke size after transient focal cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94(20):10873–8.
134. Planas AM, Gómez-Choco M, Urra X, Gorina R, Caballero M, Chamorro Á. Brain-derived antigens in lymphoid tissue of patients with acute stroke. *J Immunol* 2012; 188(5):2156–63.
135. Rosenzweig S, Carmichael ST. The axon-glia unit in white matter stroke: Mechanisms of damage and recovery. *Brain Res* 2015; 1623:123–34.

136. Walker EJ, Rosenberg GA. Divergent role for MMP-2 in myelin breakdown and oligodendrocyte death following transient global ischemia. *J Neurosci Res* 2010; 88(4):764–73.
137. Chandler S, Coates R, Gearing A, Lury J, Wells G, Bone E. Matrix metalloproteinases degrade myelin basic protein. *Neurosci Lett* 1995; 201(3):223–6.
138. Ueno Y, Chopp M, Zhang L, Buller B, Liu Z, Lehman NL et al. Axonal outgrowth and dendritic plasticity in the cortical peri-infarct area after experimental stroke. *Stroke* 2012; 43(8):2221–8.
139. Vandermeeren M, Mercken M, Vanmechelen E, Six J, van de Voorde A, Martin JJ et al. Detection of tau proteins in normal and Alzheimer's disease cerebrospinal fluid with a sensitive sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. *J Neurochem* 1993; 61(5):1828–34.
140. Binder LI, Frankfurter A, Rebhun LI. The distribution of tau in the mammalian central nervous system. *J Cell Biol* 1985; 101(4):1371–8.
141. Weingarten MD, Lockwood AH, Hwo SY, Kirschner MW. A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1975; 72(5):1858–62.
142. Irving EA, Nicoll J, Graham DI, Dewar D. Increased tau immunoreactivity in oligodendrocytes following human stroke and head injury. *Neurosci Lett* 1996; 213(3):189–92.
143. Kurzepa J, Bielewicz J, Grabarska A, Stelmasiak Z, Stryjecka-Zimmer M, Bartosik-Psujek H. Matrix metalloproteinase-9 contributes to the increase of tau protein in serum during acute ischemic stroke. *J Clin Neurosci* 2010; 17(8):997–9.
144. Zheng G-Q, Wang X-M, Wang Y, Wang X-T. Tau as a potential novel therapeutic target in ischemic stroke. *J Cell Biochem* 2010; 109(1):26–9.
145. Pei L, Wang S, Jin H, Bi L, Wei N, Yan H et al. A Novel Mechanism of Spine Damages in Stroke via DAPK1 and Tau. *Cereb Cortex* 2015; 25(11):4559–71.
146. Katus H. Enzyme linked immuno assay of cardiac troponin T for the detection of acute myocardial infarction in patients. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 1989; 21(12):1349–53.
147. Katus H, Ziegler A, Ekinci O, Giannitsis E, Stough WG, Achenbach S et al. Early diagnosis of acute coronary syndrome. *Eur Heart J* 2017; 38(41):3049–55.
148. DOWNIE PF, TALWAR S, SQUIRE IB, DAVIES JE, BARNETT DB, NG LL. Assessment of the stability of N-terminal pro-brain natriuretic peptide in vitro: Implications for assessment of left ventricular dysfunction. *Clin. Sci.* 1999; 97(3):255–8.
149. Zhuo L, Hascall VC, Kimata K. Inter-alpha-trypsin inhibitor, a covalent protein-glycosaminoglycan-protein complex. *J Biol Chem* 2004; 279(37):38079–82.
150. Chen R, Vendrell I, Chen CPC, Cash D, O'Toole KG, Williams SA et al. Proteomic analysis of rat plasma following transient focal cerebral ischemia. *Biomark Med* 2011; 5(6):837–46.

151. Heikal NM, Murphy KK, Crist RA, Wilson AR, Rodgers GM, Smock KJ. Elevated factor IX activity is associated with an increased odds ratio for both arterial and venous thrombotic events. *Am J Clin Pathol* 2013; 140(5):680–5.
152. Toomey JR, Valocik RE, Koster PF, Gabriel MA, McVey M, Hart TK et al. Inhibition of factor IX(a) is protective in a rat model of thromboembolic stroke. *Stroke* 2002; 33(2):578–85.
153. Zakai NA, Olson NC, Judd SE, Kleindorfer DO, Kissela BM, Howard G et al. Haemostasis biomarkers and risk of intracerebral haemorrhage in the REasons for Geographic and Racial Differences in Stroke Study. *Thromb Haemost* 2017; 117(9):1808–15.
154. Sun P, Li Q, Zhang Q, Xu L, Han J-Y. Upregulated expression of S100A8 in mice brain after focal cerebral ischemia reperfusion. *World J Emerg Med* 2013; 4(3):210–4.
155. Postler E, Lehr A, Schluesener H, Meyermann R. Expression of the S-100 proteins MRP-8 and -14 in ischemic brain lesions. *Glia* 1997; 19(1):27–34.
156. Mantzouranis EC, Dowton SB, Whitehead AS, Edge MD, Bruns GA, Colten HR. Human serum amyloid P component. cDNA isolation, complete sequence of pre-serum amyloid P component, and localization of the gene to chromosome 1. *J Biol Chem* 1985; 260(12):7752–6.
157. Hutchinson WL, Hohenester E, Pepys MB. Human serum amyloid P component is a single uncomplexed pentamer in whole serum. *Mol Med* 2000; 6(6):482–93.
158. Al-Shawi R, Tennent GA, Millar DJ, Richard-Londt A, Brandner S, Werring DJ et al. Pharmacological removal of serum amyloid P component from intracerebral plaques and cerebrovascular A β amyloid deposits in vivo. *Open Biol* 2016; 6(2):150202.
159. Li G-C, Zhang L, Yu M, Jia H, Tian T, Wang J et al. Identification of novel biomarker and therapeutic target candidates for acute intracerebral hemorrhage by quantitative plasma proteomics. *Clin Proteomics* 2017; 14:14.
160. İlhan D, Ozbabalik D, Gulcan E, Ozdemir O, Gülbaçs Z. Evaluation of platelet activation, coagulation, and fibrinolytic activation in patients with symptomatic lacunar stroke. *Neurologist* 2010; 16(3):188–91.
161. Tombul T, Atbas C, Anlar O. Hemostatic markers and platelet aggregation factors as predictive markers for type of stroke and neurological disability following cerebral infarction. *J Clin Neurosci* 2005; 12(4):429–34.
162. Nagao T, Hamamoto M, Kanda A, Tsuganesawa T, Ueda M, Kobayashi K et al. Platelet activation is not involved in acceleration of the coagulation system in acute cardioembolic stroke with nonvalvular atrial fibrillation. *Stroke* 1995; 26(8):1365–8.
163. O'Brien JR, Etherington MD, Pashley M. Intra-platelet platelet factor 4 (IP.PF4) and the heparin-mobilisable pool of PF4 in health and atherosclerosis. *Thromb Haemost* 1984; 51(3):354–7.
164. Sarma JV, Ward PA. The complement system. *Cell Tissue Res* 2011; 343(1):227–35.
165. La Bonte LR, Pavlov VI, Tan YS, Takahashi K, Takahashi M, Banda NK et al. Mannose-binding lectin-associated serine protease-1 is a significant contributor to

- coagulation in a murine model of occlusive thrombosis. *J Immunol* 2012; 188(2):885–91.
166. Hess K, Ajjan R, Phoenix F, Dobó J, Gál P, Schroeder V. Effects of MASP-1 of the complement system on activation of coagulation factors and plasma clot formation. *PLoS ONE* 2012; 7(4):e35690.
167. Kozarcanin H, Lood C, Munthe-Fog L, Sandholm K, Hamad OA, Bengtsson AA et al. The lectin complement pathway serine proteases (MASPs) represent a possible crossroad between the coagulation and complement systems in thromboinflammation. *J Thromb Haemost* 2016; 14(3):531–45.
168. Frauenknecht V, Thiel S, Storm L, Meier N, Arnold M, Schmid J-P et al. Plasma levels of mannan-binding lectin (MBL)-associated serine proteases (MASPs) and MBL-associated protein in cardio- and cerebrovascular diseases. *Clin Exp Immunol* 2013; 173(1):112–20.
169. Tsakanova G, Stepanyan A, Nahapetyan K, Sim RB, Arakelyan A, Boyajyan A. Serine proteases of the complement lectin pathway and their genetic variations in ischaemic stroke. *J Clin Pathol* 2018; 71(2):141–7.
170. Zhang M, Hou YJ, Cavusoglu E, Lee DC, Steffensen R, Yang L et al. MASP-2 activation is involved in ischemia-related necrotic myocardial injury in humans. *Int J Cardiol* 2013; 166(2):499–504.
171. Castellino FJ, Ploplis VA. Structure and function of the plasminogen/plasmin system. *Thromb Haemost* 2005; 93(4):647–54.
172. Fisher MJ. Brain regulation of thrombosis and hemostasis: From theory to practice. *Stroke* 2013; 44(11):3275–85.
173. Inoue K, Koizumi S, Nakajima K, Hamanoue M, Kohsaka S. Modulatory effect of plasminogen on NMDA-induced increase in intracellular free calcium concentration in rat cultured hippocampal neurons. *Neurosci Lett* 1994; 179(1-2):87–90.
174. Siao C-J, Tsirka SE. Tissue plasminogen activator mediates microglial activation via its finger domain through annexin II. *J Neurosci* 2002; 22(9):3352–8.
175. Tsirka SE. Tissue plasminogen activator as a modulator of neuronal survival and function. *Biochem Soc Trans* 2002; 30(2):222–5.
176. Parathath SR, Parathath S, Tsirka SE. Nitric oxide mediates neurodegeneration and breakdown of the blood-brain barrier in tPA-dependent excitotoxic injury in mice. *J Cell Sci* 2006; 119(Pt 2):339–49.
177. Fujimoto S, Katsuki H, Ohnishi M, Takagi M, Kume T, Akaike A. Plasminogen potentiates thrombin cytotoxicity and contributes to pathology of intracerebral hemorrhage in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 2008; 28(3):506–15.
178. Singh S, Houg AK, Wang D, Reed GL. Physiologic variations in blood plasminogen levels affect outcomes after acute cerebral thromboembolism in mice: A pathophysiologic role for microvascular thrombosis. *J Thromb Haemost* 2016; 14(9):1822–32.

179. Petersen NH, Schmied AB, Zeller JA, Plendl H, Deuschl G, Zunker P. Lp(a) lipoprotein and plasminogen activity in patients with different etiology of ischemic stroke. *Cerebrovasc Dis* 2007; 23(2-3):188–93.
180. Müller F, Mutch NJ, Schenk WA, Smith SA, Esterl L, Spronk HM et al. Platelet polyphosphates are proinflammatory and procoagulant mediators in vivo. *Cell* 2009; 139(6):1143–56.
181. Renné T, Schmaier AH, Nickel KF, Blombäck M, Maas C. In vivo roles of factor XII. *Blood* 2012; 120(22):4296–303.
182. Nieswandt B, Kleinschnitz C, Stoll G. Ischaemic stroke: A thrombo-inflammatory disease? *J Physiol (Lond)* 2011; 589(17):4115–23.
183. Meyer SF de, Denorme F, Langhauser F, Geuss E, Fluri F, Kleinschnitz C. Thromboinflammation in Stroke Brain Damage. *Stroke* 2016; 47(4):1165–72.
184. Pham M, Stoll G, Nieswandt B, Bendszus M, Kleinschnitz C. Blood coagulation factor XII--a neglected player in stroke pathophysiology. *J Mol Med* 2012; 90(2):119–26.
185. Krupka J, May F, Weimer T, Pragst I, Kleinschnitz C, Stoll G et al. The Coagulation Factor XIIa Inhibitor rHA-Infestin-4 Improves Outcome after Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury in Rats. *PLoS ONE* 2016; 11(1):e0146783.
186. Stoll G, Kleinschnitz C, Nieswandt B. Molecular mechanisms of thrombus formation in ischemic stroke: Novel insights and targets for treatment. *Blood* 2008; 112(9):3555–62.
187. Pham M, Kleinschnitz C, Helluy X, Bartsch AJ, Austinat M, Behr VC et al. Enhanced cortical reperfusion protects coagulation factor XII-deficient mice from ischemic stroke as revealed by high-field MRI. *Neuroimage* 2010; 49(4):2907–14.
188. Citarella F, Felici A, Brouwer M, Wagstaff J, Fantoni A, Hack CE. Interleukin-6 downregulates factor XII production by human hepatoma cell line (HepG2). *Blood* 1997; 90(4):1501–7.
189. Johansson K, Jansson J-H, Johansson L, Bylesjö I, Nilsson TK, Eliasson M et al. Factor XII as a Risk Marker for Hemorrhagic Stroke: A Prospective Cohort Study. *Cerebrovasc Dis Extra* 2017; 7(1):84–94.
190. Kraft P, Drechsler C, Gunreben I, Heuschmann PU, Kleinschnitz C. Regulation of blood coagulation factors XI and XII in patients with acute and chronic cerebrovascular disease: A case-control study. *Cerebrovasc Dis* 2014; 38(5):337–43.
191. Skidgel RA, Erdös EG. Structure and function of human plasma carboxypeptidase N, the anaphylatoxin inactivator. *Int Immunopharmacol* 2007; 7(14):1888–99.
192. Matthews KW, Mueller-Ortiz SL, Wetsel RA. Carboxypeptidase N: A pleiotropic regulator of inflammation. *Mol Immunol* 2004; 40(11):785–93.
193. Quagraine MO, Tan F, Tamei H, Erdös EG, Skidgel RA. Plasmin alters the activity and quaternary structure of human plasma carboxypeptidase N. *Biochem J* 2005; 388(Pt 1):81–91.

Literaturverzeichnis

194. Herren T, Swaisgood C, Plow EF. Regulation of plasminogen receptors. *Front Biosci* 2003; 8:d1-8.
195. Redlitz A, Tan AK, Eaton DL, Plow EF. Plasma carboxypeptidases as regulators of the plasminogen system. *J Clin Invest* 1995; 96(5):2534–8.
196. Walker JB, Binette TM, Mackova M, Lambkin GR, Mitchell L, Bajzar L. Proteolytic cleavage of carboxypeptidase N markedly increases its antifibrinolytic activity. *J Thromb Haemost* 2008; 6(5):848–55.
197. Talens S, Lebbink JHG, Malfliet JJMC, Demmers JAA, Uitte de Willige S, Leebeek FWG et al. Binding of carboxypeptidase N to fibrinogen and fibrin. *Biochem Biophys Res Commun* 2012; 427(2):421–5.
198. Schweisfurth H. Carboxypeptidase N. *Dtsch Med Wochenschr* 1984; 109(33):1254–8.
199. Zaninotto M, Altinier S, Lachin M, Plebani M. Carboxypeptidase N and creatine kinase-MB isoforms in acute myocardial infarction. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 1997; 35(4):291–5.
200. Furlong CE, Suzuki SM, Stevens RC, Marsillach J, Richter RJ, Jarvik GP et al. Human PON1, a biomarker of risk of disease and exposure. *Chem Biol Interact* 2010; 187(1-3):355–61.
201. Ferretti G, Bacchetti T, Masciangelo S, Nanetti L, Mazzanti L, Silvestrini M et al. Lipid peroxidation in stroke patients. *Clin Chem Lab Med* 2008; 46(1):113–7.
202. Chan PH. Role of oxidants in ischemic brain damage. *Stroke* 1996; 27(6):1124–9.
203. Kim NS, Kang K, Cha MH, Kang B-J, Moon J, Kang BK et al. Decreased paraoxonase-1 activity is a risk factor for ischemic stroke in Koreans. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 364(1):157–62.
204. Gokdemir MT, Karakilcik AZ, Gokdemir GS. Prognostic importance of paraoxonase, arylesterase and mean platelet volume efficiency in acute ischaemic stroke. *J Pak Med Assoc* 2017; 67(11):1679–83.
205. Chawhan SS, Mogarekar MR, Wagh RV, Das RR, Pramanik SS, Sonune SM et al. Relation of Paraoxonase1, Arylesterase and Lipid Profile in Ischemic Stroke Patients. *J Clin Diagn Res* 2015; 9(11):BC01-3.
206. Walsh KB, Hart K, Roll S, Sperling M, Unruh D, Davidson WS et al. Apolipoprotein A-I and Paraoxonase-1 Are Potential Blood Biomarkers for Ischemic Stroke Diagnosis. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 2016; 25(6):1360–5.
207. Kotur-Stevuljevic J, Bogavac-Stanojevic N, Jelic-Ivanovic Z, Stefanovic A, Gojkovic T, Joksic J et al. Oxidative stress and paraoxonase 1 status in acute ischemic stroke patients. *Atherosclerosis* 2015; 241(1):192–8.
208. Aydin M, Gencer M, Cetinkaya Y, Ozkok E, Ozbek Z, Kilic G et al. PON1 55/192 polymorphism, oxidative stress, type, prognosis and severity of stroke. *IUBMB Life* 2006; 58(3):165–72.

209. Abdullah A, Ssefer V, Ertugrul U, Osman E, Esref A, Ugur CM et al. Evaluation of serum oxidant/antioxidant balance in patients with acute stroke. *J Pak Med Assoc* 2013; 63(5):590–3.
210. Michalak S, Kazmierski R, Hellmann A, Wysocka E, Kocalkowska-Adamczewska D, Wencel-Warot A et al. Serum paraoxonase/arylesterase activity affects outcome in ischemic stroke patients. *Cerebrovasc Dis* 2011; 32(2):124–32.
211. Ranade K, Kirchgessner TG, Iakoubova OA, Devlin JJ, DelMonte T, Vishnupad P et al. Evaluation of the paraoxonases as candidate genes for stroke: Gln192Arg polymorphism in the paraoxonase 1 gene is associated with increased risk of stroke. *Stroke* 2005; 36(11):2346–50.
212. Rodríguez-Esparragón F, López-Fernández JC, Buset-Ríos N, García-Bello MA, Hernández-Velazquez E, Cappiello L et al. Paraoxonase 1 and 2 gene variants and the ischemic stroke risk in Gran Canaria population: An association study and meta-analysis. *Int J Neurosci* 2017; 127(3):191–8.
213. Keep RF, Hua Y, Xi G. Intracerebral haemorrhage: Mechanisms of injury and therapeutic targets. *Lancet Neurol* 2012; 11(8):720–31.
214. Guo F, Hua Y, Wang J, Keep RF, Xi G. Inhibition of carbonic anhydrase reduces brain injury after intracerebral hemorrhage. *Transl Stroke Res* 2012; 3(1):130–7.
215. Kleinberger G, Capell A, Haass C, van Broeckhoven C. Mechanisms of granulin deficiency: Lessons from cellular and animal models. *Mol Neurobiol* 2013; 47(1):337–60.
216. Kao AW, McKay A, Singh PP, Brunet A, Huang EJ. Progranulin, lysosomal regulation and neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurosci* 2017; 18(6):325–33.
217. Eriksen JL, Mackenzie IRA. Progranulin: Normal function and role in neurodegeneration. *J Neurochem* 2008; 104(2):287–97.
218. Xie S, Lu L, Liu L, Bi G, Zheng L. Progranulin and short-term outcome in patients with acute ischaemic stroke. *Eur J Neurol* 2016; 23(3):648–55.
219. Kanazawa M, Kawamura K, Takahashi T, Miura M, Tanaka Y, Koyama M et al. Multiple therapeutic effects of progranulin on experimental acute ischaemic stroke. *Brain* 2015; 138(Pt 7):1932–48.
220. Tao J, Ji F, Wang F, Liu B, Zhu Y. Neuroprotective effects of progranulin in ischemic mice. *Brain Res* 2012; 1436:130–6.
221. Kanazawa M, Takahashi T, Nishizawa M, Shimohata T. Therapeutic Strategies to Attenuate Hemorrhagic Transformation After Tissue Plasminogen Activator Treatment for Acute Ischemic Stroke. *J Atheroscler Thromb* 2017; 24(3):240–53.
222. Egashira Y, Suzuki Y, Azuma Y, Takagi T, Mishiro K, Sugitani S et al. The growth factor progranulin attenuates neuronal injury induced by cerebral ischemia-reperfusion through the suppression of neutrophil recruitment. *J Neuroinflammation* 2013; 10:105.
223. Kobayashi N, Kostka G, Garbe JHO, Keene DR, Bächinger HP, Hanisch F-G et al. A comparative analysis of the fibulin protein family. Biochemical characterization, binding interactions, and tissue localization. *J Biol Chem* 2007; 282(16):11805–16.

224. Godyna S, Diaz-Ricart M, Argraves WS. Fibulin-1 mediates platelet adhesion via a bridge of fibrinogen. *Blood* 1996; 88(7):2569–77.
225. Tran H, Tanaka A, Litvinovich SV, Medved LV, Haudenschild CC, Argraves WS. The interaction of fibulin-1 with fibrinogen. A potential role in hemostasis and thrombosis. *J Biol Chem* 1995; 270(33):19458–64.
226. Argraves WS, Tanaka A, Smith EP, Twal WO, Argraves KM, Fan D et al. Fibulin-1 and fibrinogen in human atherosclerotic lesions. *Histochem Cell Biol* 2009; 132(5):559–65.
227. Xu G, Cui Y, Wang L, Zhang J, Shen A, Li W et al. Temporospacial expression of fibulin-1 after acute spinal cord injury in rats. *J Spinal Cord Med* 2015; 38(6):709–16.
228. Thompson D, Pepys MB, Wood SP. The physiological structure of human C-reactive protein and its complex with phosphocholine. *Structure* 1999; 7(2):169–77.
229. Laskowitz DT, Blessing R, Floyd J, White WD, Lynch JR. Panel of biomarkers predicts stroke. *Ann N Y Acad Sci* 2005; 1053:30.
230. Eikelboom JW, Hankey GJ, Baker RI, McQuillan A, Thom J, Staton J et al. C-reactive protein in ischemic stroke and its etiologic subtypes. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 2003; 12(2):74–81.
231. Terruzzi A, Valente L, Mariani R, Moschini L, Camerlingo M. C-reactive protein and aetiological subtypes of cerebral infarction. *Neurol Sci* 2008; 29(4):245–9.
232. Smith CJ, Emsley HCA, Vail A, Georgiou RF, Rothwell NJ, Tyrrell PJ et al. Variability of the systemic acute phase response after ischemic stroke. *J Neurol Sci* 2006; 251(1-2):77–81.
233. Roudbary SA, Saadat F, Forghanparast K, Sohrabnejad R. Serum C-reactive protein level as a biomarker for differentiation of ischemic from hemorrhagic stroke. *Acta Med Iran* 2011; 49(3):149–52.
234. Montaner J, Fernandez-Cadenas I, Molina CA, Ribó M, Huertas R, Rosell A et al. Poststroke C-reactive protein is a powerful prognostic tool among candidates for thrombolysis. *Stroke* 2006; 37(5):1205–10.
235. Arikanoglu A, Yucel Y, Acar A, Cevik MU, Akil E, Varol S. The relationship of the mean platelet volume and C-reactive protein levels with mortality in ischemic stroke patients. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2013; 17(13):1774–7.
236. Ghabaee M, Zandieh A, Mohebbsi S, Fakhri M, Sadeghian H, Divani F et al. Predictive ability of C-reactive protein for early mortality after ischemic stroke: Comparison with NIHSS score. *Acta Neurol Belg* 2014; 114(1):41–5.
237. Wyatt AR, Cater JH, Ranson M. PZP and PAI-2: Structurally-diverse, functionally similar pregnancy proteins? *Int J Biochem Cell Biol* 2016; 79:113–7.
238. Nijholt DAT, Ijsselstijn L, van der Weiden MM, Zheng P-P, Sillevius Smitt PAE, Koudstaal PJ et al. Pregnancy Zone Protein is Increased in the Alzheimer's Disease Brain and Associates with Senile Plaques. *J Alzheimers Dis* 2015; 46(1):227–38.

239. Arbeláez LF, Bergmann U, Tuuttila A, Shanbhag VP, Stigbrand T. Interaction of matrix metalloproteinases-2 and -9 with pregnancy zone protein and alpha2-macroglobulin. *Arch Biochem Biophys* 1997; 347(1):62–8.
240. Gruenbaum Y, Wilson KL, Harel A, Goldberg M, Cohen M. Review: Nuclear lamins-structural proteins with fundamental functions. *J Struct Biol* 2000; 129(2-3):313–23.
241. Al-Shali KZ, Hegele RA. Laminopathies and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24(9):1591–5.
242. Muta T, Takeshige K. Essential roles of CD14 and lipopolysaccharide-binding protein for activation of toll-like receptor (TLR)2 as well as TLR4 Reconstitution of TLR2- and TLR4-activation by distinguishable ligands in LPS preparations. *Eur J Biochem* 2001; 268(16):4580–9.
243. Wartenberg KE, Stoll A, Funk A, Meyer A, Schmidt JM, Berrouschot J. Infection after acute ischemic stroke: Risk factors, biomarkers, and outcome. *Stroke Res Treat* 2011; 2011:830614.
244. Klimiec E, Pasinska P, Kowalska K, Pera J, Slowik A, Dziedzic T. The association between plasma endotoxin, endotoxin pathway proteins and outcome after ischemic stroke. *Atherosclerosis* 2018; 269:138–43.
245. Worthmann H, Tryc AB, Dirks M, Schuppner R, Brand K, Klawonn F et al. Lipopolysaccharide binding protein, interleukin-10, interleukin-6 and C-reactive protein blood levels in acute ischemic stroke patients with post-stroke infection. *J Neuroinflammation* 2015; 12:13.
246. Summers L, Kangwantas K, Rodriguez-Grande B, Denes A, Penny J, Kielty C et al. Activation of brain endothelial cells by interleukin-1 is regulated by the extracellular matrix after acute brain injury. *Mol Cell Neurosci* 2013; 57:93–103.
247. Bolton SJ, Anthony DC, Perry VH. Loss of the tight junction proteins occludin and zonula occludens-1 from cerebral vascular endothelium during neutrophil-induced blood-brain barrier breakdown in vivo. *Neuroscience* 1998; 86(4):1245–57.
248. Coll JL, Ben-Ze'ev A, Ezzell RM, Rodríguez Fernández JL, Baribault H, Oshima RG et al. Targeted disruption of vinculin genes in F9 and embryonic stem cells changes cell morphology, adhesion, and locomotion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995; 92(20):9161–5.
249. Luscan R, Mechaussier S, Paul A, Tian G, Gérard X, Defoort-Dellhemmes S et al. Mutations in TUBB4B Cause a Distinctive Sensorineural Disease. *Am J Hum Genet* 2017; 101(6):1006–12.
250. Gadadhar S, Bodakuntla S, Natarajan K, Janke C. The tubulin code at a glance. *J Cell Sci* 2017; 130(8):1347–53.
251. Leandro-García LJ, Leskelä S, Landa I, Montero-Conde C, López-Jiménez E, Letón R et al. Tumoral and tissue-specific expression of the major human beta-tubulin isoforms. *Cytoskeleton (Hoboken)* 2010; 67(4):214–23.
252. Carroll MC, Holers VM. Innate autoimmunity. *Adv Immunol* 2005; 86:137–57.
253. Ogden CA, deCathelineau A, Hoffmann PR, Bratton D, Ghebrehiwet B, Fadok VA et al. C1q and mannose binding lectin engagement of cell surface calreticulin and CD91

- initiates macropinocytosis and uptake of apoptotic cells. *J Exp Med* 2001; 194(6):781–95.
254. Mocco J, Wilson DA, Komotar RJ, Sughrue ME, Coates K, Sacco RL et al. Alterations in plasma complement levels after human ischemic stroke. *Neurosurgery* 2006; 59(1):28-33; discussion 28-33.
255. Atkinson C, Zhu H, Qiao F, Varela JC, Yu J, Song H et al. Complement-dependent P-selectin expression and injury following ischemic stroke. *J Immunol* 2006; 177(10):7266–74.
256. Cervera A, Planas AM, Justicia C, Urra X, Jensenius JC, Torres F et al. Genetically-defined deficiency of mannose-binding lectin is associated with protection after experimental stroke in mice and outcome in human stroke. *PLoS ONE* 2010; 5(2):e8433.
257. La Rosa X de, Cervera A, Kristoffersen AK, Valdés CP, Varma HM, Justicia C et al. Mannose-binding lectin promotes local microvascular thrombosis after transient brain ischemia in mice. *Stroke* 2014; 45(5):1453–9.
258. Ducruet AF, Sosunov SA, Zacharia BE, Gorski J, Yeh ML, Derosa P et al. The Neuroprotective Effect of Genetic Mannose-binding Lectin Deficiency is not Sustained in the Sub-acute Phase of Stroke. *Transl Stroke Res* 2011; 2(4):588–99.
259. Song F-Y, Wu M-H, Zhu L-H, Zhang Z-Q, Qi Q-D, Lou C-L. Elevated Serum Mannose-Binding Lectin Levels Are Associated with Poor Outcome After Acute Ischemic Stroke in Patients with Type 2 Diabetes. *Mol Neurobiol* 2015; 52(3):1330–40.
260. Amighi J, Hoke M, Mlekusch W, Schlager O, Exner M, Haumer M et al. Beta 2 microglobulin and the risk for cardiovascular events in patients with asymptomatic carotid atherosclerosis. *Stroke* 2011; 42(7):1826–33.
261. Wilson AM, Kimura E, Harada RK, Nair N, Narasimhan B, Meng X-Y et al. Beta2-microglobulin as a biomarker in peripheral arterial disease: Proteomic profiling and clinical studies. *Circulation* 2007; 116(12):1396–403.
262. Tenhunen R, Iivanainen M, Kovanen J. Cerebrospinal fluid beta 2-microglobulin in neurological disorders. *Acta Neurol Scand* 1978; 58(6):366–73.
263. Terent A, Hällgren R, Venge P, Bergström K. Lactoferrin, lysozyme, and beta 2-microglobulin in cerebrospinal fluid. Elevated levels in patients with acute cerebrovascular lesions as indices of inflammation. *Stroke* 1981; 12(1):40–6.
264. Prentice RL, Zhao S, Johnson M, Aragaki A, Hsia J, Jackson RD et al. Proteomic risk markers for coronary heart disease and stroke: Validation and mediation of randomized trial hormone therapy effects on these diseases. *Genome Med* 2013; 5(12):112.
265. Rist PM, Jiménez MC, Rexrode KM. Prospective association between β 2-microglobulin levels and ischemic stroke risk among women. *Neurology* 2017; 88(23):2176–82.
266. Kotaka M, Ngai SM, Garcia-Barcelo M, Tsui SK, Fung KP, Lee CY et al. Characterization of the human 36-kDa carboxyl terminal LIM domain protein (hCLIM1). *J Cell Biochem* 1999; 72(2):279–85.

Literaturverzeichnis

267. Zheng M, Cheng H, Banerjee I, Chen J. ALP/Enigma PDZ-LIM domain proteins in the heart. *J Mol Cell Biol* 2010; 2(2):96–102.
268. Bauer K, Kratzer M, Otte M, Quintana KL de, Hagmann J, Arnold GJ et al. Human CLP36, a PDZ-domain and LIM-domain protein, binds to alpha-actinin-1 and associates with actin filaments and stress fibers in activated platelets and endothelial cells. *Blood* 2000; 96(13):4236–45.
269. Gupta S, Braun A, Morowski M, Premisler T, Bender M, Nagy Z et al. CLP36 is a negative regulator of glycoprotein VI signaling in platelets. *Circ Res* 2012; 111(11):1410–20.
270. Li Y-J, Zhu H-X, Zhang D, Li H-C, Ma P, Huang L-Y. Novel endogenous negative modulators of platelet function as potential anti-thrombotic targets. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2017; 21(13):3146–58.

8 Anhang

**Klinikum der
Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main**

**Zentrum der Neurologie und Neurochirurgie
Klinik für Neurologie**
Direktor: Prof. Dr. med. H. Steinmetz

Schleusenweg 2-16
60528 Frankfurt am Main
Tel: (069) 6301 4406
Fax: (069) 6301 4498
Email: foerch@em.uni-frankfurt.de

Frankfurt am Main, den 01.04.2012

Studienprotokoll

**Prospektive multizentrische Evaluation von GFAP als
Biomarker der akuten intrazerebralen Blutung**

(BE FAST II)

Version 1 vom 01.04.2012

1. Leiter der Studie

Priv.-Doz. Dr. med. Christian Förch
Oberarzt
Klinik für Neurologie
Klinikum der Johann Wolfgang Goethe- Universität
Schleusenweg 2-16
60528 Frankfurt am Main
Tel.: 069-6301-7468
Fax.: 069-6301-4498
Email: foerch@em.uni-frankfurt.de

Datum / Unterschrift

2. Hintergrund

Gegenwärtig stellt der Schlaganfall nach dem Myokardinfarkt und den malignen Erkrankungen die dritthäufigste Todesursache in den westlichen Industrienationen dar und zählt zu den am häufigsten zur dauerhaften Invalidität führenden Krankheiten.

Die häufigste Form des Schlaganfalls (etwa 80-90% der Fälle) ist die **zerebrale Ischämie**. Durch den Verschluss einer hirnersorgenden Arterie kommt es zu einer Minderperfusion im abhängigen Gefäßterritorium. Sauerstoff- und Substratmangel führen zum Verlust von Funktion und struktureller Integrität der Hirnzellen und letztlich zur Ausbildung eines ischämischen Infarktes. Ursache des Verschlusses ist meist eine Thrombembolie (Kardioembolie, arterio-arterielle Embolie). Für etwa 10-15% aller Schlaganfälle sind **intrazerebrale Blutungen** verantwortlich. Hierbei steht die Ruptur einer hirnersorgenden Arterie im Mittelpunkt, wodurch es zum Austritt von Blut in das Hirnparenchym kommt.[1] Hauptrisikofaktor für eine intrazerebrale Blutung ist die arterielle Hypertonie, aber auch Gefäßfehlbildungen wie arteriovenöse Malformationen oder eine Amyloidangiopathie können Ursachen sein.

Es ist leicht vorstellbar, dass diese pathophysiologisch sehr unterschiedlichen Typen des Schlaganfalles auch unterschiedliche therapeutische Vorgehensweisen in der Akutphase nach sich ziehen. Im Falle einer **zerebralen Ischämie** kann innerhalb der ersten 4.5 Stunden nach Symptombeginn eine intravenöse Thrombolysetherapie mit r-tPA durchgeführt werden, die die Rekanalisation der verschlossenen Hirnarterie zum Ziel hat. In großen randomisierten und placebokontrollierten Studien konnte gezeigt werden, dass die Thrombolysetherapie die Langzeitbehinderung von Schlaganfallpatienten signifikant reduziert.[2, 3] Die Lysebehandlung ist umso effektiver, je früher sie nach Beginn des Schlaganfalles appliziert wird. Im Falle einer **intrazerebralen Blutung** hingegen ist die Thrombolysetherapie streng kontraindiziert, da es hierdurch mutmaßlich zu einer Vergrößerung des Blutvolumens im Gehirn kommen würde. Bei einer Hirnblutung wird eine im Vergleich zur zerebralen Ischämie aggressivere Senkung des Blutdruckes empfohlen.[4] In ausgewählten Fällen, z.B. bei antikoagulierten Patienten, stellt auch die Applikation gerinnungsaktivierender Substanzen

Anhang

(PPSB, rekombinanter Faktor VII) ein sinnvolles therapeutisches Vorgehen in der Akutphase dar.[5]

Vor Einleitung spezifischer **therapeutischer Maßnahmen** bei Schlaganfallpatienten ist daher die Unterscheidung zwischen der zerebralen Ischämie und der intrazerebralen Blutung unumgänglich.[6] Gegenwärtig erfolgt diese nach Einlieferung des Patienten in ein Krankenhaus mittels einer zerebralen Bildgebung (Computertomographie, Kernspintomographie). In der Prähospitalphase ist ein differenziertes Patientenmanagement aus diesem Grund derzeit nicht etabliert. Ein Schnelltest (point-of-care-Test, Teststreifen) zur raschen Differenzierung zwischen einer zerebralen Ischämie und einer intrazerebralen Blutung mittels Biomarkern könnte die Behandlung eines akuten Schlaganfallpatienten hingegen schon in der Prähospitalphase ermöglichen, wodurch kostbare Zeit eingespart werden würde („time is brain“). Die rasche Diagnosestellung würde mutmaßlich auch die notärztliche Zuweisung eines akuten Schlaganfallpatienten dahingehend optimieren, dass Patienten mit einer intrazerebralen Blutung bevorzugt in Zentren mit Intensivkapazität und neurochirurgischer Interventionsmöglichkeit eingeliefert werden könnten, während Patienten mit einer zerebralen Ischämie einer spezialisierten Einheit („stroke unit“) mit Erfahrung in der Thrombolysebehandlung zugeführt werden könnten. Letztlich könnte auch die Prozessierung des akuten Schlaganfallpatienten innerhalb der Klinik optimiert werden (z.B. Auswahl des gewünschten bildgebenden Verfahrens: CT bei Blutung, MRT bei Ischämie).

GFAP (Glial fibrillary acidic protein) ist ein hoch hirnspezifisches Protein, das fast ausschließlich in Astrozyten vorkommt und dort essentieller Bestandteil des Zytoskelettes ist. Im Falle einer intrazerebralen Blutung wird es sehr schnell ins Serum freigesetzt, mutmaßlich aufgrund der raschen Destruktion glialer Zellen und der Blut-Hirn-Schranke. Es besteht eine Korrelation zwischen dem Volumen der Hirnblutung und den GFAP-Serumkonzentrationen. Im Falle einer zerebralen Ischämie hingegen ist GFAP in der Frühphase (d.h. innerhalb der ersten 6 h) nicht nachweisbar. Erst im weiteren Verlauf finden sich erhöhte Serumkonzentrationen. Die Destruktion der Zellen und der Blut-Hirn-Schranke verläuft im Falle einer zerebralen Ischämie langsamer als bei einer Hirnblutung.[7] Aus diesen Überlegungen öffnet sich ein diagnostisches Fenster, innerhalb dessen mittels GFAP eine Blutung von einer zerebralen Ischämie unterschieden werden kann. Mittlerweile sind mehrere prospektive, teils multizentrische Studien veröffentlicht, die vielfach höhere GFAP Serumkonzentrationen bei Patienten mit Hirnblutungen im Vergleich zu Patienten mit zerebralen Ischämien belegen. Die Sensitivität für die Diagnose einer intrazerebralen Blutung lag in Pilotstudien zwischen 0.79 und 0.84, die Spezifität zwischen 0.96 und 0.98.[8] Es bestand eine enge Korrelation zwischen dem Blutvolumen und der gemessenen GFAP Serumkonzentration. Nachfolgende Studien haben die Kinetik der GFAP-Freisetzung ins Plasma bei Patienten mit zerebraler Ischämie und intrazerebraler Blutung näher untersucht und die Befunde bestätigt.[9] Kürzlich wurde eine erste multizentrische Studie publiziert, in die prospektiv 205 Patienten eingeschlossen wurden mit mittelgradigen und schweren Schlaganfallsyndromen innerhalb von 4.5 h nach Symptombeginn.[10] GFAP wurde mit einem neu entwickelten Prototyp Assay der Fa. Roche Diagnostics gemessen. Die GFAP Serumspiegel zeigten sich mit 1.91 µg/l in der Gruppe der Patienten mit intrazerebralen Blutungen deutlich erhöht im Vergleich zu den Patienten mit ischämischem Hirninfarkt (0.08 µg/l). Die Sensitivität und die Spezifität für die Differenzierung einer Hirnblutung von einer zerebralen Ischämie betragen für einen „cut-off“ von 0.29 µg/l 0.84 bzw. 0.96.

3. Ziel der Arbeit

Anhang

Im Rahmen der vorliegenden prospektiven Untersuchung sollen Sensitivität, Spezifität sowie positiver und negativer prädiktiver Wert von GFAP an einem Kollektiv von 600 Patienten mit akuten Schlaganfallsymptomen im Hinblick auf die Differenzierung zwischen einer intrazerebralen Blutung und einer zerebralen Ischämie innerhalb des 6 h Zeitfensters validiert werden. Die bisherige Datenbasis ist in Bezug auf die intrazerebralen Blutungen, die in Deutschland mit 10-15% aller Schlaganfälle eher selten vorkommen, noch recht spärlich. Vor Initiierung einer zulassungsrelevanten Multicenter-Studie sind daher weitere Validierungsschritte vonnöten.

4. Studiendesign

Die prospektive Evaluation der diagnostischen Wertigkeit von GFAP soll im Rahmen einer *multizentrischen Studie* erfolgen, die an verschiedenen neurologischen Kliniken mit „stroke units“ in Deutschland durchgeführt wird.

Teilnehmende Zentren sind:

- Neurologie Uni Frankfurt (Prof. Dr. H. Steinmetz)
- Neurologie Klinikum Herford (Prof. Dr. M. Sitzer)
-

Die Studie wurde unter Beachtung der international etablierten STARD-Kriterien für diagnostische Studien (www.stard-statement.org) konzipiert.

5. Anzahl der Patienten

600 (davon ca. 70 Patienten mit Hirnblutungen)

6. Zeitrahmen

Beginn: 01.06.2012

Dauer: 6 Monate

7. Ein- und Ausschlusskriterien

a) Einschlusskriterien

- Alter \geq 18 Jahre
- Symptombeginn $<$ 6 h.
- Nachweis eines akut aufgetretenen und bei Aufnahme persistierenden neurologischen Ausfallssyndroms mit einem Schweregrad auf der NIHSS von mindestens 4 Punkten

b) Ausschlusskriterien

- Schlaganfallereignis (TIA, Ischämie, intrazerebrale Blutung) in den letzten drei Monaten
- Bekannter Hirntumor in der Anamnese
- Schädel-Hirn-Trauma in den letzten drei Monaten
- Fehlendes Einverständnis des Patienten bzw. der Angehörigen

8. Zielgrößen

- Als **Hauptzielgröße** wird die diagnostische Genauigkeit definiert, mit der anhand der GFAP Serumkonzentration eine intrazerebrale Blutung von einer zerebralen Ischämie

Anhang

unterschieden werden kann. Mittels einer ROC-Analyse sollen aus den Serumkonzentrationen die diagnostischen Kennzahlen (Sensitivität, Spezifität, positiver und negativer prädiktiver Wert) für die Differenzierung zwischen einer zerebralen Ischämie und einer intrazerebralen Blutung berechnet werden.

- **Referenzstandard:** Als Referenzstandard wird die nach abgeschlossener klinischer Evaluation unter Beachtung sämtlicher klinischer und zusatzdiagnostischer Befunde gestellte Diagnose („Entlassdiagnose“) herangezogen. Diese soll kategorisiert werden in „zerebrale Ischämie“ (alle Patienten mit Hirninfarkt [I63] oder transitorisch ischämischer Attacke [G45]), „intrazerebrale Blutung“ (I61) und „stroke mimics“ (alle anderen Diagnosen).
- Die Messung der **GFAP-Plasmakonzentrationen** erfolgt nach Abschluss der Rekrutierungsphase und nach abgeschlossener Erhebung aller klinischen Daten durch Roche Diagnostics.

9. Praktisches Vorgehen:

- Prospektive Evaluation aller unter dem Verdacht auf einen Schlaganfall eingewiesenen Patienten im jeweiligen Zentrum hinsichtlich der Erfüllung der o.g. Einschlusskriterien.
- Aufklärung und Einholen des Einverständnisses zur Studienteilnahme. Falls eine schwere neurologische Beeinträchtigung vorliegt, die die Aufklärung des Patienten in der Akutsituation unmöglich macht, können die Reste des im Rahmen der Routineversorgung bei Aufnahme gewonnenen Blutes für die GFAP Messung asserviert und der Patienten bzw. der gesetzliche Vertreter zu einem späteren Zeitpunkt über die Studie aufgeklärt werden. Für den Fall dass der Patient bzw. der gesetzliche Vertreter die Teilnahme an der Studie dann ablehnt, muss die asservierte Probe verworfen werden.
- Asservation von 2 ml Serum bei Aufnahme des Patienten (bevorzugt aus Restblut des im Rahmen der Routinediagnostik gewonnenen Blutes). Zentrifugation entsprechend der Standards des Labors. Abpipettieren von jeweils etwa 500 µl Serum in zwei Eppendorf-Tubes. Tieffrieren der Plasmaproben bei <-25° C (Gefäße zum Asservieren des Serums werden gestellt). Die Gesamtzeit zwischen Blutabnahme und Einfrieren des Serums darf 6 h nicht überschreiten.
- Ausfüllen des Dokumentationsbogens (s. Anhang) und Pseudonymisierung nach Einwilligung des Patienten.
- Der Probentransport sowie die verblindete Bestimmung der Serumkonzentrationen der oben genannten Biomarker wird zentral organisiert werden.

10. Ethik

- Das vorliegende Ethik-Votum der Ethikkommission Frankfurt soll incl. dieses Studienprotokolls und den zugehörigen Informations- und Einwilligungsbögen den lokalen Ethikkommissionen zur Begutachtung vorgelegt werden.
- **Pseudonymisierung:** Die Patientendaten werden durch Verwendung fortlaufender Zahlen verschlüsselt. Die im Rahmen der Studie erhobenen Daten werden entsprechend der ärztlichen Schweigepflicht vertraulich behandelt. Der Datenschutz

Anhang

ist vor, während und nach der Behandlung gewährleistet. Bei Veröffentlichungen werden die Daten grundsätzlich anonymisiert.

11. Besondere Risiken

- Bevorzugt soll Restblut aus der im Rahmen der Routinediagnostik gewonnenen Blutprobe verwendet werden. In diesem Falle sind keine zusätzlichen Blutabnahmen oder anderweitige diagnostische oder therapeutische Schritte ausschließlich zum Zwecke der Studie vonnöten. Risiken bestehen für die teilnehmenden Patienten daher nicht.
- Falls die Verwendung von Restblut nicht möglich ist, kann eine Blutabnahme auch eigens zum Zwecke der Studie erfolgen. In diesem Falle bestehen die üblichen Risiken der Blutentnahmen.

12. Kompensation

Die teilnehmenden Kliniken erhalten eine finanzielle Kompensation von 150 Euro pro eingeschlossenem Patienten (Blutprobe und ausgefülltes zweiseitiges Dokumentationsblatt, s. Anhang).

13. Literatur

- [1] Qureshi AI, Tuhim S, Broderick JP, Batjer HH, Hondo H, Hanley DF. Spontaneous intracerebral hemorrhage. *N Engl J Med.* 2001 May 10;344(19):1450-60.
- [2] 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 Dec 14;333(24):1581-7.
- [3] Hacke W, Kaste M, Bluhmki E, Brozman M, Davalos A, Guidetti D, et al. Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. *N Engl J Med.* 2008 Sep 25;359(13):1317-29.
- [4] Anderson CS, Huang Y, Wang JG, Arima H, Neal B, Peng B, et al. Intensive blood pressure reduction in acute cerebral haemorrhage trial (INTERACT): a randomised pilot trial. *Lancet Neurol.* 2008 May;7(5):391-9.
- [5] Aguilar MI, Hart RG, Kase CS, Freeman WD, Hoeben BJ, Garcia RC, et al. Treatment of warfarin-associated intracerebral hemorrhage: literature review and expert opinion. *Mayo Clinic proceedings.* 2007 Jan;82(1):82-92.
- [6] Adams HP, Jr., del Zoppo G, Alberts MJ, Bhatt DL, Brass L, Furlan A, et al. Guidelines for the early management of adults with ischemic stroke: a guideline from the American Heart Association/American Stroke Association Stroke Council, Clinical Cardiology Council, Cardiovascular Radiology and Intervention Council, and the Atherosclerotic Peripheral Vascular Disease and Quality of Care Outcomes in Research Interdisciplinary Working Groups: the American Academy of Neurology affirms the value of this guideline as an educational tool for neurologists. *Stroke.* 2007 May;38(5):1655-711.
- [7] Brunkhorst RP, W; Foerch, C. Astroglial Proteins as Diagnostic Markers of Acute Intracerebral Hemorrhage—Pathophysiological Background and Clinical Findings. *Transl Stroke Res.* 2010;1:246–51.
- [8] Foerch C, Curdt I, Yan B, Dvorak F, Hermans M, Berkefeld J, et al. Serum glial fibrillary acidic protein as a biomarker for intracerebral haemorrhage in patients with acute stroke. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2006 Feb;77(2):181-4.

Anhang

- [9] Dvorak F, Haberer I, Sitzer M, Foerch C. Characterisation of the diagnostic window of serum glial fibrillary acidic protein for the differentiation of intracerebral haemorrhage and ischaemic stroke. *Cerebrovasc Dis.* 2009;27(1):37-41.
- [10] Foerch C, Niessner M, Back T, Bauerle M, De Marchis GM, Ferbert A, et al. Diagnostic accuracy of plasma glial fibrillary acidic protein for differentiating intracerebral hemorrhage and cerebral ischemia in patients with symptoms of acute stroke. *Clin Chem.* 2012 Jan;58(1):237-45.

BE FAST II

Datenblatt

Klinik ID _____

Patienten ID _____

Datum _____

Einschlusskriterien

- Alter \geq 18 Jahre ja / nein
Symptombeginn < 6 h ja / nein
NIHSS \geq 4 Punkte ja / nein

Ausschlusskriterien

- Schlaganfall (TIA, Ischämie, Blutung) in den letzten 3 Monaten ja / nein
Bekannter Hirntumor in der Anamnese ja / nein
Schädel-Hirn-Trauma in den letzten 3 Monaten ja / nein
(incl. Sturz auf den Kopf bei Symptombeginn)

Klinische Angaben

- Alter (Jahre) _____
Geschlecht (m/w) _____
NIHSS bei Aufnahme _____
Hemiparese ja / nein
Kortikale Zeichen (Aphasie, Neglect, Hemianopsie, „Herdblick“) ja / nein

BE FAST II

Symptombeginn [Datum / Uhrzeit] _____ / _____

Blutabnahme [Datum / Uhrzeit] _____ / _____

Erste Bildgebung [Datum / Uhrzeit] _____ / _____

Bei Klinikaufnahme : Kreatinin-Wert (mg/dl) _____

CRP – Wert (mg/dl) _____

INR-Wert _____

Vorerkrankungen

Arterielle Hypertonie ja / nein

Diabetes mellitus ja / nein

Hypercholesterinämie ja / nein

Nikotinabusus ja / nein

Koronare Herzkrankheit (KHK) ja / nein

Tumorerkrankung ja / nein

Aktuelle Medikation

Warfarin/Marcumar ja / nein

Plättchenhemmer (ASS, Clopidogrel) ja / nein

BE FAST II

Entlass-Diagnose: (ICD 10) _____

• **Hirninfarkt**

ja / nein

- Symptombdauer \geq 24 h Symptombdauer < 24 h
- Thrombolysetherapie

Klinische (OCSP) Klassifikation

- LACS (« lacunar syndrome », lakunärer Infarkt vordere Zirkulation)
- PACS (« partial anterior circulation syndrome », Teilinfarkt vordere Zirkulation)
- TACS (« total anterior circulation syndrome », großer Territorialinfarkt vordere Zirkulation)
- POCS (« posterior circulation syndrome », hintere Zirkulation)

TOAST – Klassifikation

- kardioembolisch atherothrombotisch
- lakunär andere / unbekannt
- unbekannt

• **Intrazerebrale Blutung (ICB)**

ja / nein

Volumen (A*B*C/2 Formel): _____ ml Ventrikel - Einbruch

- | | | |
|--|--|-------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> Typische Lokalisation: | <input type="checkbox"/> Thalamus | <input type="checkbox"/> Hirnstamm |
| | <input type="checkbox"/> Stammganglien | <input type="checkbox"/> zerebellär |
| <input type="checkbox"/> Atypische Lokalisation: | <input type="checkbox"/> frontal | <input type="checkbox"/> parietal |
| | <input type="checkbox"/> temporal | <input type="checkbox"/> okzipital |

• **“stroke mimic“** _____

ja / nein

Studienarzt: _____

Name in Druckbuchstaben

Unterschrift

Anhang

Uniprot Nr.	Protein	Gen	Peptide	T-Test P_C	Fold change P_C
P0DJI9	Serum amyloid A-2 protein	SAA2	12	0.000024	2836.68
P02741	C-reactiveprotein	CRP	7	0.008745	383.38
P80511	Protein S100-A12; Calcitermin	S100A12	1	0.000543	205.18
P02679	Fibrinogen gammachain	FGG	13	0.002002	183.50
P21333	Filamin-A	FLNA	7	0.001944	147.21
Q02985	Complement factor H-related protein 3	CFHR3	9	0.002695	110.10
P01814	Ig heavy chain V-II region OU	Ig heavy chain V-II region OU	3	0.017908	98.51
AOA0B4J2D9	IGKV1D-13	IGKV1D-13	2	0.005300	69.74
P20742	Pregnancyzoneprot ein	PZP	28	0.009566	51.44
P37802	Transgelin-2	TAGLN2	6	0.006080	47.15
P02675	Fibrinogen betachain	FGB	23	0.002908	45.62
I3L3D5	Profilin-1	PFN1	2	0.002900	43.52
P0DJI8	Serum amyloid A-1 protein	SAA1	13	0.000317	40.98
P39060	Collagen alpha- 1(XVIII) chain; Endostatin	COL18A1	3	0.029421	25.81
P18206	Vinculin	VCL	2	0.021920	24.19
P40197	Plateletglycoprotein V	GP5	7	0.043100	8.90
P02788	Lactotransferrin	LTF	14	0.004250	7.57
P29401	Transketolase	TKT	1	0.022078	7.24
P01742	Ig heavy chain V-I region EU	IGHV1-69-2	3	0.044783	6.11
P02671	Fibrinogen alphachain	FGA	28	0.000009	5.38
P18428	Lipopolysaccharide- bindingprotein	LBP	9	0.015455	4.65
P04275	von Willebrand factor	VWF	49	0.000311	3.91
AOA0J9YY99;P017 68	Ig heavy chain V-III region CAM	Ig heavy chain V-III region CAM	7	0.014175	3.87
P01833	Polymericimmunogl obulinreceptor	PIGR	7	0.001510	3.73

Anhang

P68371	Tubulin beta-4B chain	TUBB4B	2	0.024156	3.48
P06702	Protein S100-A9	S100A9	12	0.009616	3.44
P02750	Leucine-rich alpha-2-glycoprotein	LRG1	21	0.000301	3.13
P07996	Thrombospondin-1	THBS1	22	0.001501	2.93
P05109	Protein S100-A8	S100A8	4	0.028036	2.56
P02748	Complement component C9	C9	28	0.000017	2.53
P01011	Alpha-1-antichymotrypsin	SERPINA3	39	0.000306	2.26
P61769	Beta-2-microglobulin	B2M	3	0.018391	2.15
Q06033	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3	ITIH3	36	0.001062	1.98
Q08380	Galectin-3-binding protein	LGALS3BP	10	0.001090	1.92
P01877	Ig alpha-2 chain C region	IGHA2	23	0.033121	1.91
P00740	Coagulation factor IX	F9	9	0.000463	1.86
A0A0G2JPRO	C4A	C4A	127	0.023345	1.76
P02763	Alpha-1-acid glycoprotein 1	ORM1	20	0.009391	1.68
P00738	Haptoglobin	HP	50	0.024135	1.63
A0A0G2JL69		C2	28	0.002872	1.59
P0C0L5	Complement C4-B; C4a anaphylatoxin	C4B	129	0.004467	1.58
Q92954	Proteoglycan 4	PRG4	13	0.044010	1.58
P01031	Complement C5	C5	57	0.001045	1.56
P01034	Cystatin-C	CST3	7	0.003395	1.55
P02743	Serum amyloid P-component	APCS	12	0.005848	1.55
Q15485	Ficolin-2	FCN2	6	0.033109	1.43
P10643	Complement component C7	C7	34	0.028087	1.39
P13671	Complement component C6	C6	44	0.004189	1.39
P00450	Ceruloplasmin	CP	88	0.013661	1.39
P00736	Complement C1r subcomponent	C1R	33	0.022865	1.36
B7ZKJ8	ITIH4	ITIH4	61	0.026909	1.35
P01009	Alpha-1-antitrypsin	SERPINA1	65	0.021255	1.33
P02746	Complement C1q subcomponent subunit B	C1QB	10	0.045013	1.29

Anhang

P04217	Alpha-1B-glycoprotein	A1BG	26	0.041890	1.28
P00747	Plasminogen	PLG	78	0.008583	-1.37
P08185	Corticosteroid-bindingglobulin	SERPINA6	7	0.015578	-1.38
P01825	Ig heavy chain V-II region NEWM	IGHV4-61	4	0.043170	-1.42
P01042	Kininogen-1; Bradykinin	KNG1	40	0.003082	-1.43
P02647	Apolipoprotein A-I	APOA1	66	0.016569	-1.48
P02768	Serum albumin	ALB	149	0.000029	-1.49
P02787	Serotransferrin	TF	108	0.000175	-1.54
P00748	Coagulationfactor XII	F12	19	0.001972	-1.55
P51884	Lumican	LUM	13	0.000171	-1.56
P02654	Apolipoprotein C-I	APOC1	7	0.034831	-1.57
P08697	Alpha-2-antiplasmin	SERPINF2	22	0.000007	-1.60
A0A0G2JRQ6	A0A0G2JRQ6	A0A0G2JRQ6	1	0.046496	-1.65
P29622	Kallistatin	SERPINA4	14	0.022338	-1.65
P08670	Vimentin	VIM	15	0.025616	-1.70
P80108	Phosphatidylinositol-glycan-specific phospholipase D	GPLD1	18	0.013947	-1.72
P01599	Igkappachain V-I region Gal	Igkappachain V-I region Gal	4	0.002854	-1.75
P05090	Apolipoprotein D	APOD	13	0.005518	-1.81
P02765	Alpha-2-HS-glycoprotein	AHSG	16	0.000787	-1.86
P02753	Retinol-bindingprotein 4	RBP4	14	0.006264	-1.90
P02652	Apolipoprotein A-II	APOA2	16	0.000001	-1.99
P05452	Tetranectin	CLEC3B	16	0.000004	-2.06
P02766	Transthyretin	TTR	16	0.001400	-2.07
P04196	Histidine-richglycoprotein	HRG	26	0.000027	-2.07
Q16610	Extracellularmatrixprotein 1	ECM1	21	0.001701	-2.25
P06396	Gelsolin	GSN	57	0.000040	-2.28
P80748	Iglambdachain V-III region LOI	IGLV3-9	2	0.016704	-2.29
P49747	Cartilageoligomeric matrixprotein	COMP	7	0.000356	-2.30
B1AHL2	Fibulin-1	FBLN1	14	0.013412	-2.35
P06727	Apolipoprotein A-IV	APOA4	66	0.000269	-2.76
A0A0C4DH31	IGHV1-18	IGHV1-18	4	0.048325	-2.86
Q6UXB8	Peptidaseinhibitor	PI16	6	0.000290	-3.15

Anhang

	16				
P08519	Apolipoprotein(a)	LPA	40	0.007817	-3.54
P11021	78 kDagluco- regulatedprotein	HSPA5	5	0.021679	-7.88
Q14623	Indian hedgehogprotein	IHH	1	0.046108	-8.46
P05154	Plasma serineproteaseinhib itor	SERPINA5;SER PINA3	4	0.047241	-9.77
P32119	Peroxiredoxin- 2;Peroxiredoxin-1	PRDX2;PRDX1	2	0.031485	-22.24
Q8IUL8	Cartilage intermediate layerprotein 2	CILP2	1	0.000012	-134.63

Tabelle 10: Signifikant unterschiedliche Proteine im Patientenkollektiv und der Kontrollgruppe

Uniprot Nr.	Protein	Gen	Peptide	T-Test ICH_C	Fold change ICH_C
P0DJI9	Serum amyloid A-2 protein	SAA2	12	0.00003	6486.58
P02741	C-reactiveprotein	CRP	7	0.00153	2383.01
Q02985	Complement factor H- related protein 3	CFHR3	9	0.00000	576.65
A0A0B4J2D9	IGKV1D-13	IGKV1D-13	2	0.00092	367.89
P02679	Fibrinogen gammachain	FGG	13	0.01556	191.14
P20742	Pregnancyzoneprotein	PZP	28	0.00911	155.22
P80511	Protein S100-A12; Calcitermin	S100A12	1	0.01004	108.10
P0DJI8	Serum amyloid A-1 protein	SAA1	13	0.00023	70.29
P21333	Filamin-A	FLNA	7	0.02341	61.67
A0A075B6J1	IGLV5-37	IGLV5-37	1	0.03338	57.81
P02675	Fibrinogen betachain	FGB	23	0.01990	47.33
P37802	Transgelin-2	TAGLN2	6	0.00279	37.23
P18206	Vinculin	VCL	2	0.01689	36.64
I3L3D5	Profilin-1	PFN1	2	0.02320	35.54

Anhang

O00151	PDZ and LIM domain protein 1	PDLIM1	5	0.01914	7.57
P18428	Lipopolysaccharide-bindingprotein	LBP	9	0.00261	7.41
P02788	Lactotransferrin	LTF	14	0.01559	7.33
P68371	Tubulin beta-4B chain	TUBB4B	2	0.01192	4.94
P02671	Fibrinogen alphachain	FGA	28	0.00009	4.93
P04275	von Willebrand factor	VWF	49	0.00095	4.30
P02750	Leucine-rich alpha-2-glycoprotein	LRG1	21	0.00006	3.95
P01833	Polymericimmunoglobulinreceptor	PIGR	7	0.00844	3.93
P06702	Protein S100-A9	S100A9	12	0.02873	3.07
P02545	Prelamin-A/C;Lamin-A/C	LMNA	4	0.04171	2.82
P02748	Complementcomponent C9	C9	28	0.00013	2.64
P07996	Thrombospondin-1	THBS1	22	0.02076	2.61
P61769	Beta-2-microglobulin	B2M	3	0.00657	2.31
P01011	Alpha-1-antichymotrypsin	SERPINA3	39	0.00003	2.28
P01594;P01593	Igkappachain V-I regionAU;Igkappachain V-I region AG	Igkappachain V-I regionAU;Igkappachain V-I region AG	3	0.03382	2.24
P01877	Ig alpha-2 chain C region	IGHA2	23	0.02021	2.18
AOA0B4J1V2	IGHV2-26	IGHV2-26	3	0.02628	2.12
P11226	Mannose-bindingprotein C	MBL2	3	0.01195	2.05
Q06033	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3	ITI3	36	0.00089	1.96
AOA0G2JPRO	C4A	C4A	127	0.01247	1.96
Q08380	Galectin-3-binding protein	LGALS3BP	10	0.00529	1.94
P02763	Alpha-1-acid glycoprotein 1	ORM1	20	0.00213	1.91
P00738	Haptoglobin	HP	50	0.01780	1.76
P00740	Coagulationfactor IX	F9	9	0.00366	1.70
P01034	Cystatin-C	CST3	7	0.01644	1.57
P00450	Ceruloplasmin	CP	88	0.01025	1.49

Anhang

AOA0G2JL69		C2	28	0.01451	1.46
P01009	Alpha-1-antitrypsin	SERPINA1	65	0.00259	1.41
P01031	Complement C5	C5	57	0.01110	1.39
P02746	Complement C1q subcomponent subunit B	C1QB	10	0.02246	1.37
P0C0L5	Complement C4-B; C4a anaphylatoxin	C4B	129	0.03788	1.34
P00736	Complement C1r subcomponent	C1R	33	0.02576	1.34
P00746	Complementfactor D	CFD	5	0.03276	1.33
P13671	Complementcomponent C6	C6	44	0.04777	1.26
P02743	Serum amyloid P-component	APCS	12	0.04049	1.25
P02768	Serum albumin	ALB	149	0.00005	-1.42
P01042	Kininogen-1; Bradykinin	KNG1	40	0.01172	-1.49
P08185	Corticosteroid-bindingglobulin	SERPINA6	7	0.00162	-1.51
P00747	Plasminogen	PLG	78	0.00092	-1.57
A0A0G2JRQ6	A0A0G2JRQ6	A0A0G2JRQ6	1	0.00290	-1.59
P51884	Lumican	LUM	13	0.00027	-1.61
P02787	Serotransferrin	TF	108	0.00076	-1.63
P08697	Alpha-2-antiplasmin	SERPINF2	22	0.00009	-1.64
P01599	Igkappachain V-I region Gal	Igkappachain V-I region Gal	4	0.02826	-1.67
P05090	Apolipoprotein D	APOD	13	0.00255	-1.68
P04433	Igkappachain V-III region VG	IGKV3D-11	7	0.03409	-1.72
P00742	Coagulation factor X;Factor X light chain;Factor X heavy chain;Activated factor Xa heavy chain	F10	7	0.01621	-1.72
O75882	Attractin	ATRN	14	0.00633	-1.74
P04070	Vitamin K-dependent protein C;Vitamin K-dependent protein C light chain;Vitamin K-dependent protein C heavy chain;Activation	PROC	7	0.03845	-1.74

Anhang

peptide					
Q96KN2	Beta-Ala-His dipeptidase	CNDP1	9	0.01932	-1.79
O95445	Apolipoprotein M	APOM	7	0.03485	-1.83
P00748	Coagulationfactor XII	F12	19	0.00003	-1.86
A0A0B4J1X5	IGHV3-74;IGHV3OR16-13	IGHV3-74	8	0.03967	-1.91
P05452	Tetranectin	CLEC3B	16	0.00005	-1.95
Q16610	Extracellularmatrixprote in 1	ECM1	21	0.00322	-1.95
A0A075B6R9	IGKV2D-24	IGKV2D-24	5	0.04272	-1.96
P02765	Alpha-2-HS-glycoprotein	AHSG	16	0.00200	-1.97
P06310;	Igkappachain V-II region RPMI 6410	IGKV2D-30	4	0.02311	-1.99
P02652	Apolipoprotein A-II	APOA2	16	0.00001	-2.02
P29622	Kallistatin	SERPINA4	14	0.00763	-2.05
B1AHL2	Fibulin-1	FBLN1	14	0.01945	-2.07
P35858	Insulin-like growth factor-binding protein complex acid labile subunit	IGFALS	24	0.02663	-2.09
P49747	Cartilageoligomericmatrixprotein	COMP	7	0.00743	-2.12
P04196	Histidine-richglycoprotein	HRG	26	0.00017	-2.14
P01614	Igkappachain V-II region Cum	IGKV2-40	6	0.04420	-2.18
P02753	Retinol-bindingprotein 4	RBP4	14	0.00844	-2.19
P80108	Phosphatidylinositol-glycan-specific phospholipase D	GPLD1	18	0.00196	-2.25
P17936	Insulin-like growth factor-binding protein 3	IGFBP3	5	0.01136	-2.27
P02766	Transthyretin	TTR	16	0.00150	-2.29
P80748	Iglambdachain V-III region LOI	IGLV3-9	2	0.03917	-2.48
P06396	Gelsolin	GSN	57	0.00019	-2.50
O75015	Low affinity immunoglobulin gamma Fc region receptor III-B	FCGR3B	6	0.01442	-2.52
A0A0B4J1Y9	IGHV3-72	IGHV3-72	8	0.03011	-2.60
Q6UXB8	Peptidaseinhibitor 16	PI16	6	0.00001	-2.77

Anhang

P06727	Apolipoprotein A-IV	APOA4	66	0.00239	-2.98
H3BQ34	Pyruvatekinase;Pyruvat ekinas PKM	PKM	2	0.04277	-4.30
P08519	Apolipoprotein(a)	LPA	40	0.00004	-6.50
P05154	Plasma serineproteaseinhibitor	SERPINA5;SE RPINA3	4	0.01005	-35.39
P32119	Peroxiredoxin- 2;Peroxiredoxin-1	PRDX2;PRDX 1	2	0.01911	-48.58
Q8IUL8	Cartilage intermediate layerprotein 2	CILP2	1	0.00000	-264.59

Tabelle 11: Signifikant unterschiedliche Proteine in der ICH-Gruppe und der Kontrollgruppe

Uniprot Nr.	Protein	Gen	Peptide	T-test IS_C	Fold change IS_C
P0DJI9	Serum amyloid A-2 protein	SAA2	12	0.002842	941.61
P80511	Protein S100-A12; Calcitermin	S100A12	1	0.000158	482.16
P21333	Filamin-A	FLNA	7	0.001498	469.60
P01814	Ig heavy chain V-II region OU	Ig heavy chain V-II region OU	3	0.012284	400.66
P02679	Fibrinogen gammachain	FGG	13	0.032889	173.78
P37802	Transgelin-2	TAGLN2	6	0.024087	64.60
I3L3D5	Profilin-1	PFN1	2	0.030771	57.01
P02675	Fibrinogen betachain	FGB	23	0.035460	43.43
P0DJI8	Serum amyloid A-1 protein	SAA1	13	0.009705	19.96
P01782	Ig heavy chain V-III region DOB	Ig heavy chain V-III region DOB	6	0.034288	9.05
P02788	Lactotransferrin	LTF	14	0.014991	7.90
P02671	Fibrinogen alphachain	FGA	28	0.000447	6.05
A0A0J9YY99;	Ig heavy chain V-III	Ig heavy	7	0.018711	4.17

Anhang

P01768	region CAM	chain V-III region CAM			
P06702	Protein S100-A9	S100A9	12	0.008580	4.01
P01833	Polymericimmunoglobulin receptor	PIGR	7	0.002251	3.48
P04275	von Willebrand factor	VWF	49	0.005772	3.45
P07996	Thrombospondin-1	THBS1	22	0.002161	3.42
P05109	Protein S100-A8	S100A8	4	0.030953	3.00
AOA0B4J1Y9	IGHV3-72	IGHV3-72	8	0.021075	2.62
P48740	Mannan-binding lectin serine protease 1;Mannan-binding lectin serine protease 1 heavy chain;Mannan-binding lectin serine protease 1 light chain	MASP1	5	0.018647	2.41
P02748	Complementcomponent C9	C9	28	0.002483	2.40
P02750	Leucine-rich alpha-2- glycoprotein	LRG1	21	0.010155	2.30
AOA0B4J1X8	IGHV3-43	IGHV3-43	4	0.030315	2.27
P01011	Alpha-1- antichymotrypsin	SERPINA3	39	0.009792	2.23
P00740	Coagulationfactor IX	F9	9	0.003542	2.10
P02743	Serum amyloid P- component	APCS	12	0.000292	2.05
P02776	Platelet factor 4;Platelet factor 4, short form	PF4	7	0.010635	2.03
Q06033	Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain H3	ITI3	36	0.019036	2.01
P55056	Apolipoprotein C-IV	APOC4	5	0.040362	1.98
P0C0L5	Complement C4-B; C4a anaphylatoxin	C4B	129	0.001282	1.97
AOA0B4J1U7	IGHV6-1	IGHV6-1	4	0.015571	1.94
Q08380	Galectin-3-binding protein	LGALS3BP	10	0.003009	1.91
Q92954	Proteoglycan 4	PRG4	13	0.031080	1.86
P09486;F5G Y03	SPARC	SPARC	8	0.014229	1.85
P01031	Complement C5	C5	57	0.002044	1.82
AOA0G2JL69		C2	28	0.011293	1.77

Anhang

P04430	Igkappachain V-I region BAN	Igkappachain V-I region BAN	1	0.009111	1.68
Q13790	Apolipoprotein F	APOF	6	0.026147	1.66
Q15485	Ficolin-2	FCN2	6	0.046261	1.61
P04003	C4b-binding protein alpha chain	C4BPA	42	0.009297	1.59
P13671	Complement component C6	C6	44	0.001652	1.58
P15169	Carboxypeptidase N catalytic chain	CPN1	11	0.036402	1.56
P22792	Carboxypeptidase N subunit 2	CPN2	10	0.006194	1.55
P01034	Cystatin-C	CST3	7	0.042394	1.53
AOA075B6P5 ;P01615	Igkappachain V-II region FR	IGKV2D-28	4	0.002188	1.51
G3XAM2	Complement factor I	CFI	26	0.027395	1.50
P01024	Complement C3	C3	188	0.028434	1.44
P08571	Monocyte differentiation antigen CD14	CD14	7	0.010816	1.42
P00751	Complement factor B	CFB	87	0.049099	1.40
P05155	Plasma protease C1 inhibitor	SERPING1	31	0.049389	1.25
P80108	Phosphatidylinositol-glycan-specific phospholipase D	GPLD1	18	0.032582	-1.20
P0CG04	Immunoglobulin lambda-like polypeptide 5; Ig lambda-1 chain C regions	IGLL5; IGLC1	16	0.043077	-1.27
P01834	Igkappachain C region	IGKC	19	0.023662	-1.35
P01042	Kininogen-1; Bradykinin	KNG1	40	0.016823	-1.36
AOA0A0MS07	Ig gamma-1 chain C region	IGHG1	37	0.001184	-1.40
P02787	Serotransferrin	TF	108	0.000170	-1.43
P51884	Lumican	LUM	13	0.006074	-1.48
P14151	L-selectin	SELL	5	0.046102	-1.50
P01825	Ig heavy chain V-II region NEWM	IGHV4-61	4	0.041792	-1.53
P08697	Alpha-2-antiplasmin	SERPINF2	22	0.000119	-1.54
P02753	Retinol-binding protein 4	RBP4	14	0.020447	-1.58

Anhang

P02768	Serum albumin	ALB	149	0.000885	-1.59
P02656	Apolipoprotein C-III	APOC3	10	0.000576	-1.60
A0A075B6K4	IGLV3-10	IGLV3-10	5	0.045999	-1.66
P23142	Fibulin-1	FBLN1	16	0.020301	-1.68
P30530	Receptor protein-tyrosine kinase;Tyrosine-protein kinase receptor UFO	AXL	2	0.010008	-1.70
P02654	Apolipoprotein C-I	APOC1	7	0.003488	-1.72
P02765	Alpha-2-HS-glycoprotein	AHSG	16	0.010719	-1.73
A0A075B7D8	IGHV3OR15-7	IGHV3OR15-7	5	0.021175	-1.81
P01876	Ig alpha-1 chain C region	IGHA1	29	0.025901	-1.81
P02766	Transthyretin	TTR	16	0.014466	-1.81
P01599	Igkappachain V-I region Gal	Igkappachain V-I region Gal	4	0.004503	-1.86
P02647	Apolipoprotein A-I	APOA1	66	0.002857	-1.86
P04432;P01597	Ig kappa chain V-I region Daudi;Ig kappa chain V-I region DEE	Ig kappa chain V-I region Daudi;Ig kappa chain V-I region DEE	2	0.041404	-1.90
P02652	Apolipoprotein A-II	APOA2	16	0.000350	-1.95
P05090	Apolipoprotein D	APOD	13	0.035308	-1.99
P04196	Histidine-richglycoprotein	HRG	26	0.000805	-1.99
P06396	Gelsolin	GSN	57	0.001067	-2.01
P80748	Iglambdachain V-III region LOI	IGLV3-9	2	0.008381	-2.07
P11597	Cholesterylestertransfer protein	CETP	1	0.004852	-2.08
P08670	Vimentin	VIM	15	0.038404	-2.12
P05452	Tetranectin	CLEC3B	16	0.000063	-2.23
P06727	Apolipoprotein A-IV	APOA4	66	0.000113	-2.50
P49747	Cartilageoligomericmatrixprotein	COMP	7	0.003095	-2.56

Anhang

Q16610	Extracellulärmatrrixprote in 1	ECM1	21	0.003818	-2.70
Q09666	Neuroblast differentiation-associated protein AHNAK	AHNAK	2	0.020403	-2.76
B1AHL2	Fibulin-1	FBLN1	14	0.041899	-2.79
Q6UXB8	Peptidaseinhibitor 16	PI16	6	0.004393	-3.75
P11021	78 kDaglucose-regulatedprotein	HSPA5	5	0.009703	-17.43
P36980	Complement factor H-related protein 2	CFHR2	9	0.047393	-24.13
P12111	Collagen alpha-3(VI) chain	COL6A3	1	0.040705	-25.97
Q8IUL8	Cartilage intermediate layerprotein 2	CILP2	1	0.003125	-54.69

Tabelle 12: Signifikant unterschiedliche Proteine in der IS-Gruppe und der Kontrollgruppe

Uniprot Nr.	Protein	Gen	Peptide	T-test ICH_IS	Fold change ICH_IS
P08590	Myosin light chain 3	MYL3	3	0.000003	66.63
P10916	Myosin regulatory light chain 2, ventricular/cardiac muscle isoform;Myosin regulatory light chain 10	MYL2;MYL10	4	0.000002	41.74
P35579	Myosin-9	MYH9	7	0.047758	11.38
P01594;P01593	Igkappachain V-I regionAU;Igkappachain V-I region AG	Igkappachain V-I regionAU;Igkappachain V-I region AG	3	0.016600	2.96
P23142	Fibulin-1	FBLN1	16	0.042941	1.70
P01857	Ig gamma-1 chain C region	IGHG1	37	0.010454	1.59
P28799	Granulins	GRN	1	0.048806	1.47
P00747	Plasminogen	PLG	78	0.026337	-1.39
P00748	Coagulationfactor XII	F12	19	0.007977	-1.52

Anhang

P27169	Serum paraoxonase/arylesterase 1	PON1	17	0.036158	-1.56
P02743	Serum amyloid P-component	APCS	12	0.013262	-1.64
P22792	Carboxypeptidase N subunit 2	CPN2	10	0.002240	-1.70
P04430	Igkappachain V-I region BAN	Igkappachain V-I region BAN	1	0.014411	-1.78
P69905	Hemoglobinsubunitalpha	HBA1;HBA2	14	0.020431	-1.79
P68871	Hemoglobin subunit beta;LVV-hemorphin-7;Spinorphin	HBB	19	0.001696	-1.88
P04433;A0A0A0MRZ8	Igkappachain V-III region VG	IGKV3D-11	7	0.021189	-2.08
P00915;E5RH81;E5RFE7;E5RHP7	Carbonicanhydrase 1	CA1	5	0.002775	-2.20
P48740	Mannan-bindinglectinserineprotease 1	MASP1	5	0.046516	-2.23
P02042	Hemoglobinsubunitdelta	HBD	12	0.008945	-2.26
A0A0B4J1Y9	IGHV3-72	IGHV3-72	8	0.015234	-6.82
P01782	Ig heavy chain V-III region DOB	Ig heavy chain V-III region DOB	6	0.034040	-6.91

Tabelle 13: Signifikant unterschiedliche Proteine in IS- und ICH-Gruppe

9 Danksagung

10 Lebenslauf

11 Schriftliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

Neuronale und gliale Proteine als diagnostische Marker zur Differenzierung von Hirnblutung und Hirninfarkt

in der Klinik für Neurologie unter Betreuung und Anleitung von Prof. Dr. Christian Förch mit Unterstützung durch Dr. Sebastian Luger ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Darüber hinaus versichere ich, nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht. Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

Gelnhausen, 05.09.2019

(Ort, Datum)

(Unterschrift)