

Aus dem Institut für Anatomie II  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktorin: Univ.-Prof. Dr. Charlotte von Gall

Der Einfluss einer Bmal1-Defizienz auf die Infarktbildung und strukturelle  
Regeneration nach Photothrombose in männlichen und weiblichen Mäusen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität  
Düsseldorf

vorgelegt von  
Anne Sabine Lembach

2019

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachterin: Univ.-Prof. Dr. von Gall

Zweitgutachter: PD Dr. Albrecht

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Lembach A., Stahr A., Ali A., Ingenwerth M., von Gall C., (2018), Sex-Dependent Effects of Bmal1-Deficiency on Mouse Cerebral Cortex Infarction in Response to Photothrombotic Stroke. *International Journal of Molecular Sciences*. (19) 3124.

## Zusammenfassung

Schlaganfall ist auch heute noch die zweithäufigste Todesursache weltweit. Aktuelle Untersuchungen deuten auf einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten von ischämischen Ereignissen und dem zirkadianen System hin. Eine Deletion des Uhrgens *Bmal1* führt zu einem Verlust zirkadianer Rhythmik in Mäusen.

Diese Arbeit untersuchte die Auswirkungen einer Deletion von *Bmal1* auf die Infarktbildung und strukturelle Regeneration während der subakuten Phase nach Induktion fokaler kortikaler Infarkte mittels Photothrombose (PT). Dabei wurden das Volumen des Infarktkerns und der Glianarbe sowie das Volumen der Mikrogliaaktivierung in männlichen und weiblichen Wildtyp- [*Bmal1*<sup>+/+</sup>] und *Bmal1*-defizienten [*Bmal1*<sup>-/-</sup>] Mäusen 7 Tage (d) und 14 d nach PT untersucht. Zusätzlich wurde die Neubildung von Zellen, insbesondere von Astrozyten und Mikroglia, quantifiziert. Es wurde eine zeitabhängige Abnahme des Infarktvolumens sowie der Mikrogliaaktivierung und Proliferation bei den Gesamtgruppen der *Bmal1*<sup>+/+</sup>- und *Bmal1*<sup>-/-</sup>-Mäuse festgestellt. Das Volumen der Glianarbe war hingegen ausschließlich bei der Gesamtgruppe der *Bmal1*<sup>-/-</sup>-Mäuse 14 d gegenüber 7 d signifikant kleiner. Bei geschlechtsabhängiger Untersuchung wurde eine zeitabhängige Abnahme dieser Volumina ausschließlich bei den weiblichen *Bmal1*<sup>-/-</sup>-Mäusen bestätigt, was auf einen geschlechtsspezifischen Einfluss einer *Bmal1*-Defizienz hinweist. Während das Volumen von Infarktkern, Glianarbe und Mikrogliaaktivierung 7 d nach PT bei den weiblichen *Bmal1*<sup>-/-</sup>-Mäusen im Vergleich zu den männlichen *Bmal1*<sup>-/-</sup>-Mäusen noch signifikant größer war, waren diese 14 d nach PT gleich klein. Zudem waren diese Parameter 14 d nach PT bei den weiblichen *Bmal1*<sup>-/-</sup>-Mäusen im Vergleich zu den *Bmal1*<sup>+/+</sup>-Mäusen signifikant kleiner. Es konnte jedoch kein Einfluss des Geschlechts auf die Proliferation nach fokaler Ischämie festgestellt werden, sodass die hier beobachteten geschlechtsabhängigen Veränderungen am ehesten durch bereits vorhandene und nicht neu gebildete Zellen bedingt zu sein scheinen.

In Zusammenschau mit der aktuellen Datenlage sowie weiterführenden Untersuchungen dieser Arbeitsgruppe, die erhöhte Östrogenkonzentrationen bei weiblichen *Bmal1*<sup>-/-</sup>-Mäusen nachwies, deutet die Gesamtheit der hier erfassten Ergebnisse auf einen positiven und protektiven Einfluss einer *Bmal1*-Defizienz auf die Infarktbildung und strukturelle Regeneration bei weiblichen Mäusen hin.

## Summary

Stroke is still the second most common cause of death worldwide. Current research suggests a link between the occurrence of ischemic events and the circadian system. The deletion of the clock gene *Bmal1* leads to a loss of circadian rhythms in mice.

This work studied the effects of *Bmal1*-deficiency on infarction and structural recovery during the subacute phase after induction of focal cortical infarcts by photothrombosis (PT). Therefore, the volumes of infarct core and glial scar, as well as the volume of microglial activation in male and female wildtype [*Bmal1*<sup>+/+</sup>] and *Bmal1*-deficient [*Bmal1*<sup>-/-</sup>] mice were analyzed 7 days (d) and 14 d after PT. In addition, proliferation, especially of astrocytes and microglia, was quantified. A time-dependent decrease in the volumes of infarct core and microglial activation as well as proliferation in *Bmal1*<sup>+/+</sup>- and *Bmal1*<sup>-/-</sup>-mice was observed. However, the volume of the glial scar was only significantly smaller in *Bmal1*<sup>-/-</sup>-mice 14 d compared to 7 d after PT. When sexes were analyzed separately, a time-dependent decrease in these volumes was only confirmed in female *Bmal1*<sup>-/-</sup>-mice, indicating a gender-specific influence of a *Bmal1*-deficiency. While volumes of infarct core, glial scar and microglial activation were significantly larger in female *Bmal1*<sup>-/-</sup>-mice compared to male *Bmal1*<sup>-/-</sup>-mice 7 d after PT, they were equally reduced 14 d after PT. In addition, these parameters were significantly smaller 14 d after PT in female *Bmal1*<sup>-/-</sup>- mice compared to *Bmal1*<sup>+/+</sup>-mice. A sex-dependent effect on proliferation after focal ischemia was, however, not found, suggesting that the sex-related differences observed in this work are most likely caused by already existing, yet not newly formed cells.

Together with current data and further investigations of this group, confirming increased estrogen levels in female *Bmal1*<sup>-/-</sup>-mice, the present findings suggest a positive and protective effect of *Bmal1*-deficiency on infarction and structural recovery in female mice.

## Abkürzungsverzeichnis

<b>%</b>	Prozent
<b>°C</b>	Grad Celsius
<b>µl</b>	Mikroliter
<b>µm</b>	Mikrometer
<b>ABC</b>	Avidinbiotinkomplex ( <i>avidin-biotin complex</i> )
<b>ATP</b>	Adenosin-5'-Triphosphat
<b>Bmal1</b>	<i>brain and muscle arnt-like protein 1</i>
<b>BrdU</b>	Bromodesoxyuridin
<b>CKI</b>	Caseinkinase
<b>CLOCK</b>	<i>circadian locomotor output cycles kaput</i>
<b>COX-2</b>	Cyclooxygenase-2
<b>Cry1/2</b>	<i>Cryptochrome</i> -Gene cry1, cry2
<b>CSPGs</b>	Chondroitinsulfat-Proteoglykane ( <i>chondroitinsulphate proteoglycans</i> )
<b>d</b>	Tag
<b>DAB</b>	3,3'-Diaminobenzidin
<b>DD</b>	Dauerdunkelheit
<b>dest.</b>	destilliert
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure ( <i>deoxribonucleic acid</i> )
<b>EEC</b>	Europäische Wirtschaftsgemeinschaft ( <i>European Economic Community</i> )
<b>ELISA</b>	enzymgekoppeltes Verfahren ( <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> )
<b>EMP</b>	erythromyeloide Vorläuferzellen ( <i>erythro-myeloid progenitors</i> )
<b>ER<math>\alpha</math></b>	Östrogenrezeptor $\alpha$ ( <i>estrogen receptor <math>\alpha</math></i> )
<b>g</b>	Gramm
<b>GFAP</b>	saures Gliafaserprotein ( <i>glial fibrillary acidic protein</i> )
<b>h</b>	Stunde
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Wasser
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Wasserstoffperoxid
<b>HCl</b>	Hydrochlorid
<b>IBA1</b>	Mikroglia-spezifisches calziumbindendes Protein ( <i>Ionized calcium binding adaptor molecule</i> )
<b>IL</b>	Interleukin

<b>KG</b>	Körpergewicht
<b>kg</b>	Kilogramm
<b>l</b>	Liter
<b>LANUV</b>	Landesamt für Natur, Umwelt, Verbraucherschutz
<b>LD</b>	rhythmischer Licht-Dunkel-Wechsel
<b>MCAO</b>	Verschluss der Arteria cerebri media ( <i>occlusion of the middle cerebral artery</i> )
<b>mg</b>	Milligramm
<b>min</b>	Minute
<b>ml</b>	Milliliter
<b>mM</b>	Millimolar
<b>mm</b>	Millimeter
<b>n</b>	Anzahl
<b>NaCl</b>	Kochsalzlösung
<b>N<sub>2</sub>O</b>	Lachgas
<b>O<sub>2</sub></b>	Sauerstoff
<b>PBS</b>	Phosphat-gepufferte Salzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
<b>PBS-T</b>	Phosphat-gepufferte Salzlösung mit Triton X-100
<b>Per1-3</b>	<i>period</i> -Gene per1, per2 und per3
<b>PFA</b>	Paraformaldehyd
<b>PT</b>	Photothrombose
<b>ROS</b>	Reaktive Sauerstoffspezies ( <i>reactive oxygen species</i> )
<b>S-Phase</b>	Synthesephase
<b>SCN</b>	Nucleus suprachiasmaticus
<b>TBS</b>	Tris-gepufferte Salzlösung ( <i>tris-buffered saline</i> )
<b>TBS-T</b>	Tris-gepufferte Salzlösung mit Triton X-100
<b>Tris</b>	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
<b>x</b>	Mal
<b>ZETT</b>	Zentrale Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgabe
<b>ZNS</b>	zentrales Nervensystem
<b>CK</b>	Zytokin ( <i>cytokine</i> )

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Zirkadianes System</b> .....	<b>1</b>
1.1.1	Aufbau des zirkadianen Systems .....	2
1.1.2	Das molekulare Uhrwerk .....	3
<b>1.2</b>	<b>Bmal1<sup>-/-</sup>-Mausmodell</b> .....	<b>6</b>
<b>1.3</b>	<b>Astrozyten</b> .....	<b>7</b>
1.3.1	Astrozyten unter physiologischen Bedingungen.....	7
1.3.2	Astrozyten unter pathophysiologischen Bedingungen.....	9
<b>1.4</b>	<b>Mikroglia</b> .....	<b>12</b>
1.4.1	Mikroglia unter physiologischen Bedingungen .....	12
1.4.2	Mikroglia unter pathophysiologischen Bedingungen .....	13
<b>1.5</b>	<b>Photothrombose als Ischämiemodell zur Induktion kortikaler Infarkte...</b>	<b>15</b>
<b>1.6</b>	<b>Ziele der Arbeit</b> .....	<b>17</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>19</b>
<b>2.1</b>	<b>Material</b> .....	<b>19</b>
2.1.1	Versuchstiere.....	19
2.1.2	Materialien .....	20
<b>2.2</b>	<b>Methoden</b> .....	<b>22</b>
2.2.1	Versuchsaufbau und Durchführung der Photothrombose .....	22
2.2.2	Injektion von BrdU .....	23
2.2.3	Gewebepräparation .....	24
2.2.4	Lagerung und Anfertigung von Schnittserien .....	25
2.2.5	Kresylviolett-Färbung zur Etablierung der Operationstechnik .....	26
2.2.6	Immunhistochemie zur Darstellung der Photothrombose.....	26
2.2.7	Immunfluoreszenz zur Charakterisierung neu gebildeter Zellen .....	28
2.2.8	Bestimmung der Infarktolumina .....	30
2.2.9	Quantifizierung und Charakterisierung neu gebildeter Zellen.....	31
2.2.10	Statistische Auswertung.....	32

<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>34</b>
<b>3.1</b>	<b>Etablierung der Operationstechnik .....</b>	<b>34</b>
<b>3.2</b>	<b>Analyse der Infarktvolumina nach Photothrombose.....</b>	<b>34</b>
3.2.1	Bestimmung des Infarktvolumens mittels GFAP .....	35
3.2.2	Bestimmung des Volumens der Glianarbe mittels GFAP.....	37
3.2.3	Bestimmung des Volumens der Mikrogliaaktivierung mittels IBA1 .....	39
<b>3.3</b>	<b>Analyse der Proliferation nach Photothrombose .....</b>	<b>41</b>
3.3.1	Quantifizierung BrdU-positiver Zellen .....	42
3.3.2	Quantifizierung BrdU/GFAP-positiver Zellen.....	43
3.3.3	Quantifizierung BrdU/IBA1-positiver Zellen .....	45
3.3.4	Quantifizierung BrdU/Caspase-3-positiver Zellen .....	47
3.3.5	Qualitative Analyse BrdU/NeuN-positiver Zellen.....	49
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>51</b>
<b>4.1</b>	<b>Einfluss von Bmal1 auf die Infarktbildung und strukturelle Regeneration</b>	
	<b>51</b>	
4.1.1	Infarktkern und Glianarbe .....	52
4.1.2	Mikrogliaaktivierung.....	55
4.1.3	BrdU-positive Zellen.....	58
4.1.4	Proliferation von Astrozyten und Mikroglia .....	59
4.1.5	Proliferation von Caspase-3-positiven Zellen und Neuronen .....	61
<b>4.2</b>	<b>Einfluss des Geschlechts auf die Infarktbildung und strukturelle</b>	
	<b>Regeneration .....</b>	<b>62</b>
<b>4.3</b>	<b>Schlussfolgerungen .....</b>	<b>66</b>
<b>5</b>	<b>Literatur- und Quellenverzeichnis.....</b>	<b>68</b>
<b>6</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>84</b>

# 1 Einleitung

Schlaganfall stellt weltweit trotz sinkender Mortalität immer noch eine der häufigsten Todesursachen und die häufigste Ursache bleibender Behinderung dar (1, 2). Neben lebensbedrohlichen Verläufen sind vor allem neurologische Komplikationen wie sekundäre hämorrhagische Infarzierung, das Auftreten von Hirnödemen, Krampfanfällen oder Delirium mögliche Folgen ischämischer Schlaganfälle (1, 3, 4). Auf histomorphologischer Ebene spielt die Ausbildung einer Narbe um das infarzierte Areal im Rahmen eines ischämischen Ereignisses, aber auch nach anderen pathologischen Prozessen wie Infektion, hämorrhagischer oder traumatischer Schädigung des Gehirns eine zentrale Rolle. Während zahlreiche Funktionen dieses Narbengewebes, auch als Glianarbe bezeichnet, bereits gut bekannt sind, wird der Einfluss und die Bedeutung der Glianarbe auf die Regeneration von Neuronen und Rehabilitationsmöglichkeiten nach Verletzungen noch kontrovers diskutiert (5, 6).

Es gibt Hinweise darauf, dass das Auftreten und vor allem das Ausmaß eines ischämischen Infarkts durch das Geschlecht, aber auch durch Störungen des zirkadianen Systems beeinflusst werden (7). Chronodisruption, eine Störung des zirkadianen Systems in Folge von *Jetlag* oder Schichtarbeit, stellt zunehmend eine weitere ernstzunehmende Form von gesundheitsschädigendem Einfluss dar (8-10). Aktuelle Studien deuten darauf hin, dass eine andauernde Belastung durch *Jetlag* längerfristig mit atrophischen Veränderungen des Hippocampus, daraus resultierenden Lerndefiziten und Störungen der Gedächtnisbildung einhergeht (11). Schichtarbeit wiederum ist mit verschiedenen gesundheitlichen Problemen, unter anderem erhöhter Prävalenz von Tumorleiden (12), psychischen Erkrankungen wie Depression (13), aber auch kardiovaskulären Erkrankungen assoziiert (14). Unter physiologischen Bedingungen jedoch gewährleistet das zirkadiane System, umgangssprachlich als „innere Uhr“ bezeichnet, eine optimale Abstimmung der kognitiven und körperlichen Funktionen (15, 16).

## 1.1 Zirkadianes System

Der Begriff „zirkadiane Rhythmik“ setzt sich aus den lateinischen Bezeichnungen für „ungefähr“ *circa* und für „Tag“ *dies* zusammen und wurde 1959 von Franz Halberg, dem Begründer der Chronobiologie, eingeführt (17). Dies umfasst tageszeitliche

Rhythmen, die endogen und damit auch ohne den Einfluss äußerer, periodisch verlaufender Umgebungsreize ablaufen (18, 19). Der wohl bekannteste zirkadiane Rhythmus ist der Schlaf-Wach-Rhythmus. Eine Reihe weiterer physiologischer Prozesse wie die Regulation der Herzfrequenz und Körpertemperatur sowie die Zytokin- und Hormonsekretion, aber auch kognitive Funktionen und Regenerationsprozesse fluktuieren ebenfalls in einer 24 h-Periodik (19-21).

### 1.1.1 Aufbau des zirkadianen Systems

Diese zirkadiane Rhythmik wird in Säugetieren durch endogene Oszillatoren gesteuert, die sich in nahezu allen Geweben finden und hierarchisch aufgebaut sind (Abb. 1) (18).

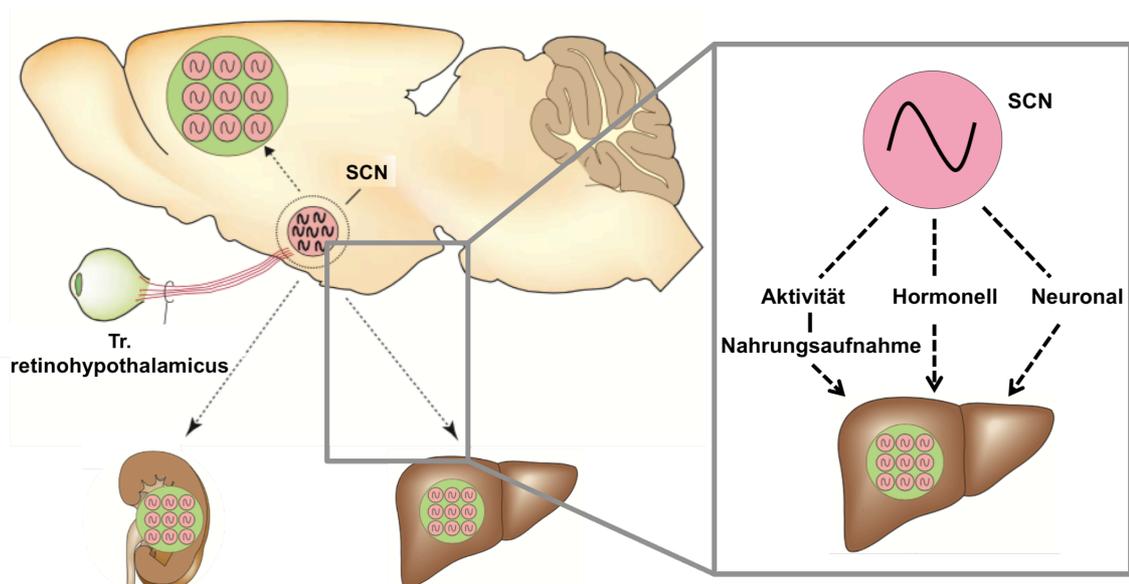


Abb. 1: Schematische Darstellung des hierarchisch strukturierten zirkadianen Systems [modifiziert nach (18)]. Der Nucleus suprachiasmaticus (SCN) ist im anterioren Hypothalamus unmittelbar oberhalb des Chiasma opticums lokalisiert. Lichtimpulse als wichtigste Zeitgeber gelangen über den Tractus retinohypothalamicus vom Auge zum SCN. Der SCN, als übergeordnetes Schrittmacherzentrum, koordiniert die Rhythmik untergeordneter Schrittmacher, unter anderem in anderen Gehirnarealen sowie in peripheren Organen (links). Die Synchronisierung der peripheren Organe erfolgt über endokrine, neuronale und metabolische Signalwege (rechts).

Der Nucleus suprachiasmaticus (SCN) ist der zentrale zirkadiane Schrittmacher, der im anterioren Hypothalamus lokalisiert ist (15). Der SCN besteht aus einer heterogenen Zellpopulation von Astrozyten und Neuronen, von denen die meisten als „Uhrzellen“ eine eigene endogene zirkadiane Rhythmik aufweisen (18, 22, 23). Zudem zeigten *in*

*in vitro* Untersuchungen, dass auch kultivierte Astrozyten unabhängig von Neuronen zirkadiane Oszillationen aufweisen (24). Mit Hilfe von externen Reizen insbesondere dem tageszeitlich-bedingten rhythmischen Wechsel von Licht und Dunkelheit, die direkt über den Tractus retinohypothalamicus zum SCN gelangen, wird der zentrale Schrittmacher auf eine 24 h-Periodik synchronisiert (25). Neben den Veränderungen des Lichts, als wichtigstem „Zeitgeber“, spielen weitere Umwelteinflüsse wie Aktivität, soziale Interaktionen, Temperatur und vor allem Verfügbarkeit von Nahrung eine zentrale Rolle bei der Abstimmung der inneren Uhr (19, 25-27). Der SCN wiederum koordiniert über neuronale, endokrine und metabolische Signalwege die Aktivität untergeordneter zirkadianer Oszillatoren sowohl in anderen Gehirnregionen als auch in peripheren Organen wie Leber, Herz, Lunge und Niere (18, 26). Jeder dieser peripheren Oszillatoren verfügt ebenso wie der SCN auf zellulärer Ebene über ein molekulares Uhrwerk, welches jedoch durch rhythmische Signale aus dem SCN koordiniert und synchronisiert wird (Abb. 1).

### *1.1.2 Das molekulare Uhrwerk*

Auf zellulärer Ebene besteht das molekulare Uhrwerk aus mehreren interagierenden transkriptionellen und translationellen Rückkopplungsschleifen (*feedback loops*) (Abb. 2).

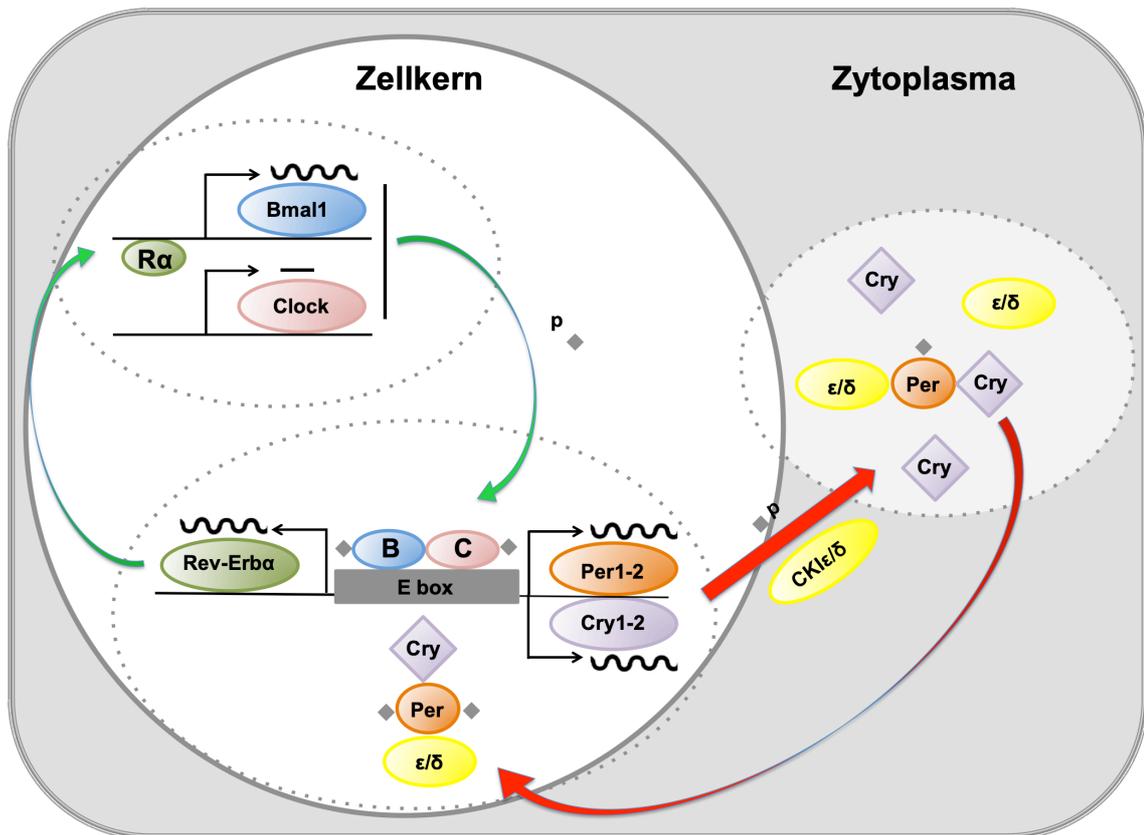


Abb. 2: Schematische Darstellung der molekularen Mechanismen des zirkadianen Systems. Das molekulare Uhrwerk besteht aus verschiedenen interagierenden positiven (grün) und negativen (rot) Rückkopplungsschleifen. Der Heterodimer CLOCK/BMAL1 (Clock - C, rot; BMAL1 – B, blau) aktiviert die Transkription der Per-, Cry- und Rev-Erb $\alpha$ -Gene durch Bindung an die E-box. Steigen die Konzentrationen der Per- (orange) und Cry-Proteine (lila) im Zytoplasma über eine gewisse Schwellenkonzentration, bilden diese einen Komplex mit der Caseinkinase  $\epsilon/\delta$  ( $\epsilon/\delta$ , gelb) und werden posttranslational phosphoryliert (dargestellt durch eine graue Raute). Intranukleär inhibieren sie den Clock/Bmal1-Komplex und bilden dadurch eine negative Rückkopplungsschleife. Zusätzlich führen steigende Konzentrationen von Rev-Erb $\alpha$  (R $\alpha$ , dunkelgrün) über Bindung an eine Promoterregion von Bmal1 zur Hemmung der Transkription von Bmal1. Die Expression von Rev-Erb $\alpha$  wird zudem durch Per- und Cry-Proteine gehemmt, sodass es durch Hemmung der inhibitorischen Wirkung von Rev-Erb $\alpha$  zur erneuten Aktivierung von Bmal1 kommt.

Der positive Arm dieses Systems, die zentralen Aktivatoren, wird durch die Transkriptionsfaktoren Bmal1 (*brain and muscle arnt-like protein 1*, auch als Mop3 oder Arntl bekannt) und Clock (*circadian locomotor output cycles kaput*, auch als Npas2 bekannt) gebildet. Die Proteine Per1, Per2, Per3, Cry1 und Cry2 üben wiederum indirekt durch Suppression der aktivierenden Funktion von Bmal1 und Clock eine inhibitorische Funktion auf die Transkription der Uhrgene aus (13, 16, 23).

Der Heterodimer Clock/Bmal1 aktiviert unter anderem die Transkription der *period-* (*per1-3*) und *cryptochrome*-Gene (*cry1, 2*) durch Bindung an die E-box, einer Bindungsstelle für Transkriptionsfaktoren in der Promoterregion (28). Nach der Translation ins Zytoplasma translozieren die gebildeten Per- und Cry-Proteine bei steigender Konzentration als Dimer zurück in den Zellkern, wo diese indirekt durch Unterdrückung der transkriptionsfördernden Wirkung von Clock/Bmal1 ihre eigene Synthese hemmen (29). Durch diese inhibitorische Wirkung auf Clock/Bmal1 bilden Per und Cry den negativen Arm der zentralen Rückkopplungsschleife der molekularen Uhr. Durch Abnahme der Proteinmenge von Per und Cry kommt es wiederum zu einer Aufhebung ihrer repressiven Wirkung und ein neuer Transkriptionszyklus wird unter Einfluss des Heterodimers Clock/Bmal1 aktiviert (18, 29, 30).

Daneben sind die positiven und negativen Regulationsmechanismen durch eine weitere transkriptionelle Schleife miteinander verbunden (Abb. 2). Der Heterodimer Clock/Bmal1 induziert zusätzlich die Expression des nukleären *orphan* Rezeptors Rev-Erb $\beta$  (15, 20). Dieser unterdrückt durch direkte Bindung in der Bmal1-Promoterregion die Transkription von Bmal1, dessen eigenem Aktivator. Neben indirekter Hemmung ihrer eigenen Transkription unterdrücken die Cry-Proteine auch die Transkription von Rev-Erb $\beta$  (29). Dieser Mechanismus führt durch Unterdrückung der inhibitorischen Wirkung (De-Repression) von Rev-Erb $\beta$  indirekt zur Aktivierung der Transkription von Bmal1 (18, 20). Posttranslationelle Modifikationen durch proteosomale Proteolyse sowie Phosphorylierung mittels Kinasen (Caseinkinase CKI $\alpha$  und CKI $\beta$ ) spielen zusätzlich eine zentrale Rolle bei der Ausbildung und präzisen Aufrechterhaltung einer zirkadianen Rhythmik von annähernd 24 h (18, 23, 26). Dabei scheinen verschiedene Phosphorylierungszustände von Clock, Bmal1, Per1 und Per2 unter anderem von Bedeutung für die transkriptionelle Aktivität des Heterodimers Clock/Bmal1, aber auch für die Translokation von Per1, Clock und Bmal1 in den Zellkern zu sein (18).

Die Gesamtheit dieser Mechanismen, wie in Abb. 2 dargestellt, gewährleistet die genaue Abstimmung der intrazellulären Genexpression mit externen Einflüssen und die Synchronisierung physiologischer Oszillationen in Zellen, Geweben und Organen innerhalb des Körpers (31).

## 1.2 Bmal1<sup>-/-</sup>-Mausmodell

Die spezifische Rolle der Uhrengene wurde durch gezielte genetische Manipulationen insbesondere in der Maus untersucht und beschrieben (15). Bmal1, als zentrale Komponente des molekularen Uhrwerks sowohl im SCN als auch in den untergeordneten Oszillatoren peripherer Organe, ist von wesentlicher Bedeutung für die Erzeugung und Aufrechterhaltung zirkadianer Rhythmik (28, 32). Im Gegensatz zu einer Mutation in den übrigen Uhrengenen führt bereits eine selektive, singuläre Deletion von Bmal1 zu einem sofortigen und vollständigen Verlust zirkadianer Rhythmik in konstanter Dunkelheit (auch als Dauerdunkelheit (DD) bezeichnet) (28). Das homologe Gen Bmal2 (auch als Mop9 oder Arntl2 bekannt), das in geringer Menge im SCN exprimiert ist, scheint in seiner Funktion nicht redundant zu Bmal1 zu sein. Vielmehr gibt es Hinweise darauf, dass die Aktivität von Bmal2 zirkadian von Bmal1 reguliert wird, sodass folglich eine Deletion von Bmal1 zu einem funktionellen Doppelknockout von Bmal1 und Bmal2 führt (33). So zeigen Bmal1-Knockout-Mäuse [Bmal1<sup>-/-</sup>] in DD keine zirkadiane lokomotorische Aktivität (34, 35). Zudem weisen Bmal1-defiziente Mäuse im Gegensatz zu entsprechenden Wildtyp-Mäusen [Bmal1<sup>+/+</sup>] auch unter physiologischem 12 h Licht-/ 12 h Dunkel-Wechsel (LD) reduzierte Aktivitätslevel auf (28).

Mäuse mit einer homozygoten konventionellen Deletion von Bmal1 sind durch ausgeprägte Veränderungen im Phänotyp charakterisiert. Bmal1<sup>-/-</sup>-Mäuse sind infertil (36), haben im Vergleich zu Wildtyp-Tieren sowohl postnatal als auch im adulten Zustand ein reduziertes Körpergewicht (35, 37, 38) und weisen Veränderungen im Metabolismus, wie Störungen im Glukose- (39) und Fettstoffwechsel auf (35). Zudem haben Bmal1-defiziente Mäuse eine verringerte Lebenserwartung und zeigen bereits früh verschiedene Anzeichen vorzeitigen Alterns (38, 40, 41). Neben körperlichen Anzeichen des Alterns wie reduzierter Fett- und Muskelmasse, verlangsamtem Haarwuchs und erhöhten Konzentrationen von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) im Gehirn (38) haben Bmal1<sup>-/-</sup>-Mäuse mit zunehmendem Alter vor allem Defizite bei der Adaptation an neue Umgebungen sowie bei Lernprozessen und der Gedächtnisbildung (42). Zudem haben Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe gezeigt, dass die adulte Neurogenese im Hippokampus von Bmal1<sup>-/-</sup>-Mäusen deutlich verändert ist (43). Darüber hinaus führt eine Deletion von Bmal1 altersabhängig zu einer ausgeprägten

Astroglie, der Aktivierung von Astrozyten, vor allem in Regionen des Cortex, wie sie bei Wildtyp-Mäusen sonst nur im Rahmen von pathologischen Ereignissen auftritt (31).

### 1.3 Astrozyten

Astrozyten (aus dem Griechischen *astro* für Stern und *cyte* für Zelle) sind eine heterogene Gruppe von spezialisierten Gliazellen. Neben Astrozyten und Mikroglia, zählen ebenfalls Oligodendrozyten sowie die Schwannzellen des peripheren Nervensystems zu den Gliazellen (44). Während den Gliazellen (aus dem Griechischen „ $\kappa\lambda\iota\tau\tau\alpha$ “ - *glia* für Leim, Kitt, von klebriger Substanz) lange Zeit eine untergeordnete Rolle als „Kitt-“, Füll- und Stützmaterial im zentralen Nervensystem (ZNS) zugeschrieben wurde (44, 45), ist mittlerweile bekannt, dass beinahe jeder Aspekt, von der Entwicklung und Funktion bis hin zur Erkrankung des Gehirns, erst durch ein Zusammenspiel von Neuronen und Gliazellen gewährleistet wird (5, 46).

#### 1.3.1 Astrozyten unter physiologischen Bedingungen

Astrozyten stellen unter den Gliazellen die häufigste Form im ZNS dar. Anhand ihrer Morphologie werden die Astrozyten dem „kurzstrahligen“ protoplasmatischen oder „langstrahligen“ fibrösen Typ zugeordnet (Abb. 3), die entsprechend in der grauen oder weißen Substanz lokalisiert sind (45, 47-50). Daneben werden zu der Klasse der Astrozyten die Bergmann-Glia des Cerebellums, die Müllerzellen der Retina sowie die Radialglia des Hippokampus, die stammzellähnliche Qualitäten besitzen, gezählt (51).

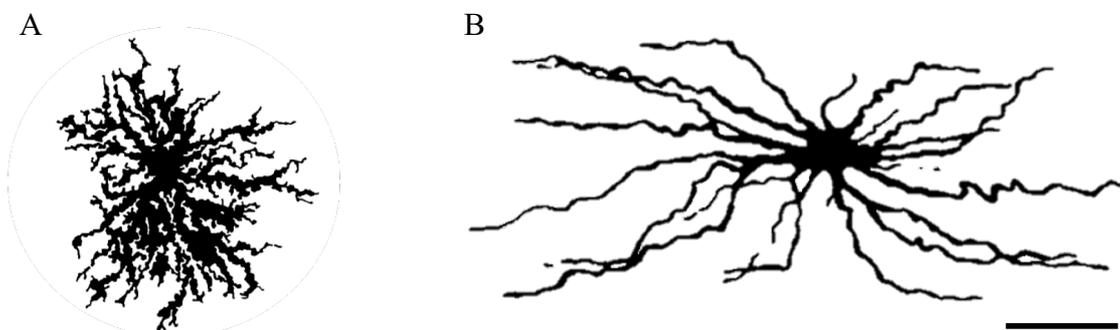


Abb. 3: Schematische Darstellung von Astrozyten vom (A) protoplasmatischen und (B) fibrösen Typ (Maßstab: 50  $\mu\text{m}$ ) [modifiziert nach (49)].

Astrozyten sind gleichmäßig über das gesamte ZNS verteilt und gewährleisten durch die Ausbildung von nicht-überlappenden astrozytären Domänen (*astrocytic domains*) die strukturelle und funktionelle Organisation des Neuropils (52). Während einige Astrozyten mit ihren Fortsätzen Synapsen umhüllen, stehen andere in direktem Kontakt mit intraparenchymalen Blutgefäßen (6). Astrozyten bilden über *gap junctions* im Bereich ihrer Fortsätze ein funktionelles Synzytium (52).

Entsprechend ihrer zentralen Position im ZNS sind Astrozyten an einer Vielzahl komplexer und essentieller Prozesse im ZNS beteiligt (44, 53, 54). Eine der am längsten bekannten Funktionen der Astrozyten ist die Aufrechterhaltung der Homöostase im ZNS, die eine optimale und kontrollierte neuronale Funktion ermöglicht (45). Dabei gewährleisten Astrozyten über verschiedene Transport- und Austauschprozesse konstante Konzentrationen von Ionen, unter anderem von Kalium und Protonen, und sind damit direkt an der Regulation des pH-Werts im ZNS beteiligt (5, 51). Astrozyten dienen den Neuronen durch Bereitstellung von Lactat als Nährstofflieferanten (55) und entfernen zudem durch aktive Aufnahme- und Recyclingmechanismen anfallende Produkte neuronaler Aktivität. In diesem Kontext nehmen Astrozyten nicht nur metabolische Nebenprodukte, sondern auch Neurotransmitter wie Glutamat, GABA und Glycin, die während der synaptischen Übertragung freigesetzt werden, auf (51, 56). Zudem gewährleisten Astrozyten die Isolation des synaptischen Spalts. Weitere wichtige Funktionen der Astrozyten sind deren Beteiligung an der Ausbildung der Bluthirnschranke sowie die Regulation des Blutflusses in Abhängigkeit von der synaptischen Aktivität durch Freisetzung von vasoaktiven Substanzen wie Prostaglandinen, Stickstoffmonoxid oder Arachidonsäure (53, 57).

Während Astrozyten im Gegensatz zu Neuronen nicht die Fähigkeit besitzen Aktionspotenziale zu generieren, reagieren sie jedoch auf neuronale Aktivität auch spontan mit einer Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration (52, 58, 59). Durch die Veränderung ihres Erregungszustands sind Astrozyten über verschiedene, teilweise noch nicht vollständig geklärte Mechanismen in der Lage, Wachstumsfaktoren, aber auch neuroaktive Substanzen, sogenannte Gliotransmitter, freizusetzen (5, 60, 61). Durch Sekretion von Neuropeptiden wie Adenosin-5'-Triphosphat (ATP) und D-Serin (5, 52) sowie dem Neurotransmitter Glutamat (62, 63) regulieren Astrozyten indirekt durch Interaktion mit Neuronen deren synaptische Aktivität und Transmission (58, 59, 64, 65). Zudem weisen neuere Studien darauf hin, dass Astrozyten zirkadian bedingte rhythmische Verhaltensweisen beeinflussen (66,

67). Durch die zirkadian gesteuerte Freisetzung von ATP (67, 68) sind Astrozyten über rhythmische Veränderung der extrazellulären Konzentration von Adenosin indirekt an der Regulation des Schlaf-Wach-Rhythmus beteiligt (69). Darüber hinaus wurde kürzlich *in vitro* und *in vivo* gezeigt, dass Astrozyten aktiv die Synaptogenese kontrollieren. Astrozyten beeinflussen nicht nur die Anzahl, Funktion und Plastizität von Synapsen (46), sondern scheinen auch direkt an der Ausbildung neuer funktionsfähiger Synapsen unter anderem durch die Freisetzung von Thrombospondin beteiligt zu sein (70-72). Zusätzlich gibt es Hinweise darauf, dass einige Astrozyten aus der subventrikulären Zone Stammzellcharakter besitzen und die Neubildung von Neuronen im adulten Gehirn, ähnlich der Radialglia im sich entwickelnden Gehirn, ermöglichen (46, 73, 74).

### *1.3.2 Astrozyten unter pathophysiologischen Bedingungen*

Bei zahlreichen neurologischen Erkrankungen wie Multiple Sklerose, Morbus Alzheimer und Depression wurden pathologische Veränderungen in Astrozyten von morphologischer, vor allem aber auch funktioneller Art beobachtet (6, 53). Astrozyten reagieren auf jede Form von pathologischen Ereignissen im ZNS mit gesteigerter metabolischer Aktivität und gehen von einem ruhenden in einen aktivierten, reaktiven Zustand über (Abb. 4A, B) (51, 53). Dieser Prozess wird auch als reaktive Astrogliose bezeichnet.

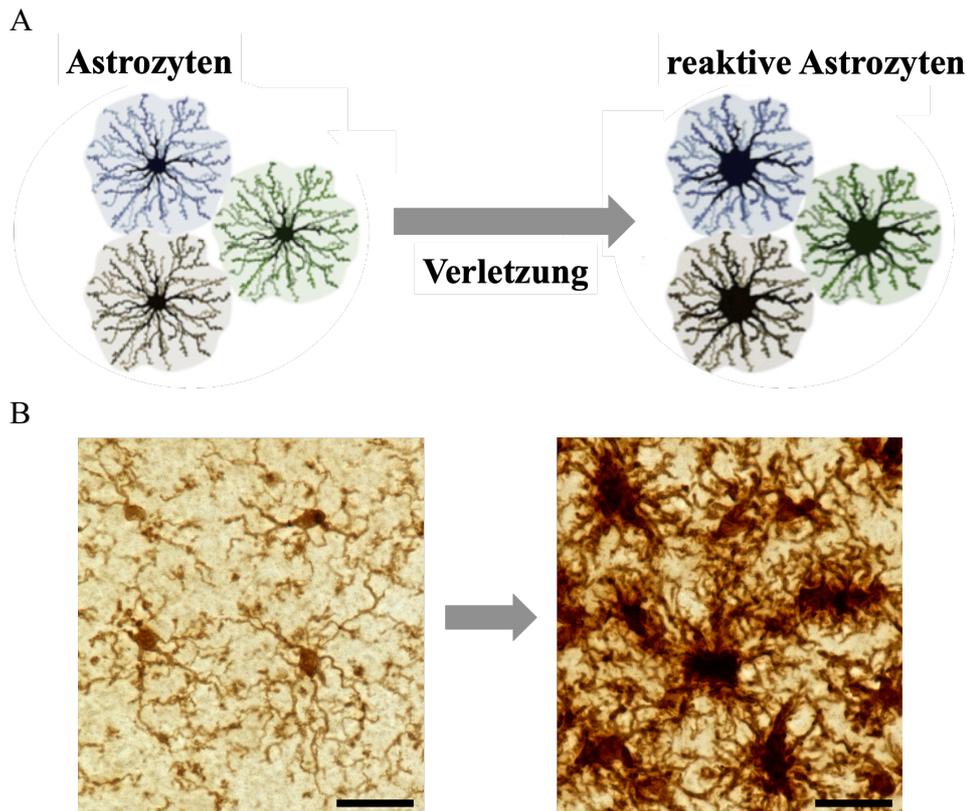


Abb. 4: Nach einer Verletzung gehen ruhende Astrozyten in einen aktivierten, reaktiven Zustand über und weisen eine gesteigerte metabolische Aktivität sowie eine Hochregulation des sauren Gliafaserproteins GFAP (*glial fibrillary acidic protein*) auf. (A) Schematische Darstellung der astrozytären Reaktion nach einer Läsion im ZNS [modifiziert nach (75)]. (B) Immunhistochemische Darstellung mittels GFAP von physiologischen und reaktiven Astrozyten nach Induktion eines kortikalen Infarkts mittels Photothrombose (PT) (100-fache Vergrößerung, Maßstab: 25  $\mu$ m).

Der Prozess der reaktiven Astroglieose ist ein komplexer Abwehrmechanismus in Folge pathologischer Einflüsse auf das ZNS und wurde nicht nur in Tiermodellen sondern auch beim Menschen nach ischämischen Schlaganfall beschrieben (76). Dabei handelt es sich um eine mehrstufige, kontextspezifische Reaktion von Astrozyten auf pathologische Veränderungen im ZNS mit dem Ziel, geschädigtes von intaktem ZNS-Gewebe zu isolieren, die Bluthirn-Schranke zu erhalten und wieder aufzubauen sowie die Aufrechterhaltung und den Neuaufbau neuronaler Verbindungen in den umgebenden Gehirnarealen zu erleichtern (77). Diese komplexe Abwehrreaktion geht mit dem Auftreten unterschiedlicher reaktiver Phänotypen mit neuroprotektiven aber auch neurotoxischen Eigenschaften einher (56, 75).

Reaktive Astrozyten hypertrophieren (Abb. 4A), sind proliferativ aktiv (78) und weisen eine erhöhte Expression von intermediären Filamenten, vor allem dem sauren Gliafaserprotein GFAP (*glial fibrillary acidic protein*, Abb. 4B) (79), Vimentin und

Nestin auf (77, 80-83). Im Rahmen der reaktiven Astrogliose setzen Astrozyten eine Reihe von anti- und proinflammatorischen Mediatoren frei (65, 84-86), die gemeinsam mit den Mikrogliazellen die inflammatorische Abwehrreaktion sowie die Reorganisation des Gewebes nach einer Verletzung steuern (87, 88).

Dabei werden histopathologisch in Abhängigkeit von der Ausprägung und der Nähe zu dem pathologischen Ereignis unterschiedliche Formen von reaktiven Astrozyten unterschieden (6, 53, 79, 80). Astrozyten, die in unmittelbarer Nähe zu dem betroffenen Areal, der sogenannten Peri-Infarktregion (*peri-infarct region*) (89), lokalisiert sind, führen zu einem kompletten Umbau der bestehenden Gewebearchitektur mit Ausbildung einer permanenten und kompakten Glianarbe (53, 77). Dieser Prozess findet zwischen Tag 6 und 14, der subakuten Phase nach einem pathologischen Ereignis wie einem ischämischen Infarkt, statt (90). Die Glianarbe besteht vorwiegend aus reaktiven Astrozyten, Mikroglia sowie extrazellulären Matrixmolekülen (83, 89). Durch die Produktion und Sekretion von extrazellulären Matrixmolekülen wie Chondroitinsulfat-Proteoglykane (CSPGs), die eine wachstumsinhibierende Wirkung ausüben (86), bilden Astrozyten eine Diffusionsbarriere für potenziell schädliche Substanzen und verhindern dadurch initial die Ausbreitung von Neurotoxinen (91). Im Verlauf üben die CSPGs, die zusätzlich in geringem Maße von Oligodendrozyten und meningealen Zellen freigesetzt werden, jedoch eine inhibitorische Wirkung auf das axonale Wachstum aus (81, 86). Dadurch wirken reaktive Astrozyten indirekt hemmend auf das axonale Wachstum und die neuronale Regeneration. Astrozyten, die weiter entfernt von dem Läsionsort lokalisiert sind, weisen dagegen geringere reaktive Veränderungen auf und bewirken keine strukturelle Reorganisation des Gewebes. Durch Freisetzung von Nährstoffen wie Glukose, stimulierenden Wachstumsfaktoren, Zytokinen (CK) und Interleukinen (IL) gewährleisten reaktive Astrozyten distal einer Verletzung vielmehr die Aufrechterhaltung der Homöostase als zentrale Voraussetzung für axonales und neuronales Wachstum sowie der Synaptogenese (77, 84, 85). Durch diese Mechanismen scheinen reaktive Astrozyten von zentraler Bedeutung für die Aufrechterhaltung und Wiederherstellung neuronaler Netzwerke nach einer Verletzung zu sein (87).

Entsprechend dieser ambivalenten Funktion von Astrozyten unter pathologischen Bedingungen ist auch die Rolle der reaktiven Astrogliose *per se* als positiver, förderlicher oder nachteiliger und schädigender Prozess noch nicht vollständig geklärt. Auf der einen Seite schirmt die im Rahmen der reaktiven Astrogliose entstehende Glianarbe während der subakuten Phasen nach einer Läsion den infarzierten oder

geschädigten Bereich gegenüber dem gesunden Gewebe ab (75, 88, 92). Durch diese strukturelle und funktionelle Barriere wird nicht nur die Ausbreitung inflammatorischer Zellen und Mediatoren, sondern auch das Ausmaß der Verletzung lokal begrenzt (93). Auf der anderen Seite verhindert die kompakte Glianarbe jedoch in späteren Stadien axonale und zelluläre Migration. Dadurch stellt die reaktive Astroglie im Verlauf ein Hindernis für axonales Wachstum, neuronale Myelinisierung und folglich der funktionellen Regeneration dar (80, 88, 92).

## 1.4 Mikroglia

Neben den Astrozyten spielen Mikroglia, als weitere spezialisierte Gruppe von Gliazellen, eine entscheidende Rolle bei neuroinflammatorischen und pathologischen Vorgängen im ZNS. Mikroglia bilden das endogene Abwehr- und Immunsystem des Gehirns, das den Schutz des ZNS gegenüber jeder Form von pathogenen Einflüssen gewährleistet (77).

### *1.4.1 Mikroglia unter physiologischen Bedingungen*

Mikroglia sind die ortsgebundenen immunkompetenten Zellen des ZNS und machen ca. 10-20 % der Gliazellen aus (5, 47, 94). Während der Embryogenese wandern erythromyeloide Vorläuferzellen (EMP) aus dem Dottersack in das ZNS, wo sie sich zu den residenten makrophagen-ähnlichen Mikrogliazellen differenzieren (95, 96). Bereits während der frühen Phase der embryonalen Entwicklung gewährleisten Mikroglia die immunologische Überwachung des ZNS und die Ausbildung einer Immuntoleranz gegenüber ZNS-eigenen Antigenen (97). Zudem agieren Mikroglia ab diesem Zeitpunkt unter anderem als *cleaner* durch Entfernung apoptotischer Zellen und anfallenden Zelltrümmern mittels Phagozytose (98). Mikroglia sind sowohl im entwickelnden als auch adulten ZNS durch Elimination fehlerhaft ausgebildeter oder überschüssiger synaptischer Verbindungen zentral an der Ausbildung funktionsfähiger neuronaler Verbindungen sowie der Plastizität und Entwicklung des gesunden ZNS beteiligt (95, 99).

Mikroglia sind unter physiologischen Bedingungen gleichmäßig über das gesamte ZNS verteilt, wobei die Menge und Dichte der vorliegenden Mikroglia lokal stark variabel ist (100). Aktuelle Erkenntnisse deuten darauf hin, dass Mikroglia ähnlich wie auch Astrozyten und periphere Immunzellen eine endogene zirkadiane Rhythmik aufweisen (67, 101, 102). Anhand ihrer morphologischen und funktionellen Eigenschaften werden drei verschiedene Formen von Mikroglia unterschieden (Abb. 5A, B): ruhende Mikroglia, aktivierte und phagozytierende Mikroglia (47). Im physiologischen Zustand besitzen Mikroglia kleine Zellkörper und zahlreiche dünne, stark verzweigte Fortsätze (45, 81). Bereits im gesunden ZNS sind die Fortsätze ruhender Mikroglia aktiv und gewährleisten über zahlreiche Rezeptoren und Erkennungsregionen für Antigene die genaue Überwachung eines spezifischen Areals innerhalb des Gehirns (100). Zudem bewegen sich die residenten immunologischen Zellen des ZNS über ihre Fortsätze dynamisch durch ihr entsprechendes Territorium, verändern dabei abhängig von den lokalen Begebenheiten ihre Morphologie und scannen kontinuierlich durch biochemisches Abtasten (*sensing*) das Parenchym (103, 104). Durch diese Mechanismen können pathologische Veränderungen ihrer Mikroumgebung unmittelbar erkannt und durch Kommunikation mit umgebenden neuronalen und nicht-ZNS-ständigen Immunzellen der Aktivierungsprozess zur Abwehr von Erregern initiiert werden (5). Im Gegensatz zu Neuronen behalten Mikroglia ihre mitotischen Fähigkeiten und sind im adulten Gehirn sowohl unter physiologischen Bedingungen, aber vor allem nach pathologischen Veränderungen, proliferativ aktiv (100).

#### *1.4.2 Mikroglia unter pathophysiologischen Bedingungen*

Mikroglia, ähnlich wie auch Astrozyten (wie in Abschnitt 1.3.2 beschrieben), gehen als Antwort auf diverse schädigende Einflüsse von einem ruhenden und überwachenden in einen aktivierten Zustand über (Abb. 5A, B) (65, 81). Diese Zustandsveränderung, auch als Mikrogliaaktivierung bekannt, ist wie auch der Prozess der reaktiven Astroglie eine vielschichtige, kontextspezifische Abwehrreaktion auf pathologische Veränderungen im ZNS (103, 105).

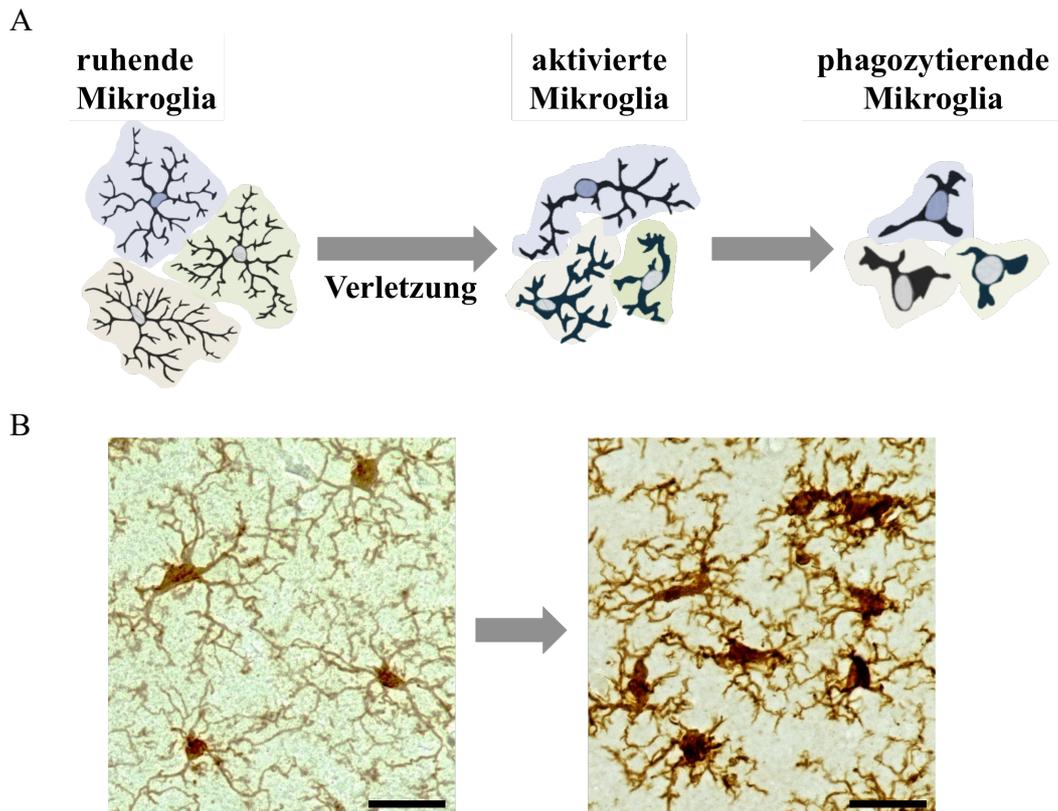


Abb. 5: Nach einer Verletzung gehen ruhende Mikroglia in einen aktivierten und schließlich phagozytierenden Zustand über. (A) Schematische Darstellung der mikroglialen Reaktion nach einer Läsion im ZNS [angelehnt an (100)]. (B) Immunhistochemische Darstellung mit dem Mikroglia-spezifischen calziumbindenden Protein IBA1 (*Ionized calcium binding adaptor molecule*) von physiologischer und aktivierter Mikroglia nach Induktion eines kortikalen Infarkts mittels PT (100-fache Vergrößerung, Maßstab: 25  $\mu\text{m}$ ).

Mikroglia reagieren sehr sensitiv und früh auf jede Form pathologischer Ereignisse (89, 106, 107). Durch Veränderungen des Mikromilieus in Folge einer Verletzung werden membranständige Rezeptoren, unter anderem Toll-Like-Rezeptoren sowie purinerge Rezeptoren (108), stimuliert und Mikroglia aktiviert (100, 109). Durch die Freisetzung von ATP scheinen auch Astrozyten bereits unmittelbar nach einer Schädigung indirekt an dieser raschen und gezielten Abwehrreaktion beteiligt zu sein (77, 83, 103). In diesem Zustand kommt es durch Proliferation und zum Läsionsort gerichteter Migration zu einer raschen Zunahme der Mikrogliazahl (81, 103, 107, 110). Zusätzlich aktivieren und rekrutieren Mikroglia weitere Zelltypen (111), sind phagozytotisch aktiv (93) und durch eine erhöhte Expression des Mikroglia-/Makrophagen-spezifischen Proteins IBA1 (*Ionized calcium binding adaptor molecule*) gekennzeichnet (Abb. 5B) (112).

Ähnlich der kontrovers diskutierten Rolle der reaktiven Astroglieose ist auch die Funktion der aktivierten Mikroglia als *cleaner* oder *killer* nach pathologischen

Ereignissen, wie fokaler Ischämie, noch nicht vollständig geklärt (81). Auf der einen Seite gewährleisten aktivierte Mikroglia als endogene Abwehrzellen des ZNS eine schnelle Erkennung, Abschirmung und Elimination pathogener Faktoren und Erreger (103, 113). Durch diese Mechanismen wird im Zusammenspiel mit Astrozyten eine Läsion lokal begrenzt und somit die Bedingungen für Reparatur und Wiederaufbau von neuronalen Verbindungen geschaffen (65, 100). Auf der anderen Seite kann eine vollständige oder übermäßige Aktivierung von Mikroglia durch Freisetzung von proinflammatorischen CK sowie toxischer ROS ein zytotoxisches, destruktives Milieu schaffen, das wiederum neuroprotektive Effekte reduziert und den Prozess der Neurogenese inhibiert (87, 98, 114).

### 1.5 Photothrombose als Ischämiemodell zur Induktion kortikaler Infarkte

Mit Hilfe transgener Mauslinien wird in zahlreichen Studien der Einfluss, die Funktion und Folgen der Mikrogliaaktivierung sowie der reaktiven Astroglie untersucht (88). Experimentell kann diese mikrogliale und astrozytäre Reaktion durch Induktion fokaler kortikaler Infarkte ausgelöst werden (115, 116). Infolge eines fokalen ischämischen Infarkts kommt es während der akuten post-ischämischen Phase zu lokalem Zelltod, Ödembildung mit konsekutiver Hirnschwellung sowie beginnender Proliferation und Aktivierung von Astrozyten und Mikroglia. Die subakute Phase zwischen Tag 6 und 14 nach Ischämie ist zudem durch zahlreiche strukturelle und funktionelle Regenerationsprozesse gekennzeichnet (90, 117). Dabei kommt es im zeitlichen Verlauf zu einer ausgeprägten Akkumulation von Mikrogliazellen und Astrozyten im Bereich des Infarktkerns (siehe Abschnitt 2.2.8, Abb. 12B) sowie in der Peri-Infarktregion (107, 118). Diese Peri-Infarktregion (*peri-infarct region*), die den Infarktkern unmittelbar umgibt, umfasst das Areal reaktiver Astrozyten (siehe Abschnitt 1.3.2) und aktivierter Mikroglia (siehe Abschnitt 1.4.2) und spielt eine zentrale Rolle bei der Regeneration (89). Zudem kommt es in diesem Bereich während der subakuten Phase nach Ischämie zur Ausbildung einer kompakten Glianarbe, weshalb die Zeitpunkte 7 und 14 Tage (d) nach Photothrombose (PT) als Untersuchungszeitpunkte in der vorliegenden Arbeit ausgewählt wurden.

Die Induktion ischämischer Infarkte kann mittels verschiedener Modelle erfolgen (119-121). Bei der Methode der Photothrombose handelt es sich um ein minimal-invasives

Verfahren, bei dem ein ischämischer Infarkt infolge der Applikation einer lichtsensitiven Substanz durch einen photothrombotischen Verschluss zerebraler Mikrogefäße induziert wird (115, 122-124). Dabei zeichnet sich dieses Ischämiemodell durch eine hohe Reproduzierbarkeit und geringe Variabilität in der Ausprägung der Infarktgröße aus (120). Daneben ist ein anderes, ebenfalls verbreitetes Verfahren zur Auslösung ischämischer Ereignisse das Verfahren der MCAO (*occlusion of medial cerebral artery*), bei der eine temporäre oder permanente Ischämie durch den Verschluss der Arteria cerebri media hervorgerufen wird (125). Dies stellt im Gegensatz zum Modell der Photothrombose jedoch eine chirurgische und bedeutend invasivere Methode dar (126, 127). Zudem ist bei einer mittels MCAO ausgelösten ischämischen Läsion aufgrund abweichender anatomischer Begebenheiten der großen zerebralen Gefäße und Kollateralisationen, vor allem in der Mauslinie C57Bl/6, die Größe und Lokalisation des Infarkts stark variabel (124, 128, 129). Infolge der mittels PT ausgelösten Ischämie kommt es im Gegensatz zur MCAO zu einer ausgeprägten Aktivierung von Astrozyten und Mikroglia sowie Glianarbenbildung (118, 130). Diese zelluläre Reaktion ist mit dem Modell der Photothrombose lokal begrenzt und ermöglicht eine genaue Differenzierung zwischen infarziertem und nicht-infarziertem Hirngewebe (81, 124). Der Bereich der ischämischen Penumbra, ein Areal mit reduziertem Blutfluss und potenziell überlebendigen Zellen, ist im Gegensatz zur Methode der MCAO jedoch kaum ausgeprägt (120, 125, 129, 130). Diese Aspekte sind von zentraler Bedeutung für die detaillierte Analyse von Infarktbildung und zellulären Reaktionen im Bereich des kortikalen Infarkts, sodass die Methode der Photothrombose das geeignete Modell für die in dieser Arbeit zu untersuchenden Aspekte der subakuten Phase nach Ischämie darstellte (115).

## 1.6 Ziele der Arbeit

Verschiedene Untersuchungen weisen auf einen Einfluss von Geschlecht und gestörter zirkadianer Rhythmik auf das Auftreten und Ausmaß ischämischer Ereignisse hin. Das zirkadiane System ermöglicht unter physiologischen Bedingungen die optimale tageszeitliche Abstimmung aller kognitiven und körperlichen Funktionen. Eine Deletion des Uhrgens *Bmal1*, einem der zentralen Transkriptionsaktivatoren des molekularen Uhrwerks, führt zu einer Störung der zirkadianen Rhythmik in Mäusen. Altersabhängig wurde bei *Bmal1*-defizienten [*Bmal1*<sup>-/-</sup>] Mäusen zudem eine gesteigerte astrozytäre Reaktion beschrieben. Die Auswirkungen einer Deletion von *Bmal1* auf die Infarktbildung und strukturelle Regeneration während der subakuten Phase nach Induktion eines kortikalen Infarkts mittels Photothrombose (PT) sollen in der vorliegenden Arbeit bei männlichen und weiblichen *Bmal1*<sup>-/-</sup>- und Wildtyp- [*Bmal1*<sup>+/+</sup>] Mäusen untersucht werden. Als Parameter der Infarktbildung und strukturellen Regeneration dienen das Volumen des Infarktkerns (Infarktvolumen), Volumen der Glianarbe und Mikrogliaaktivierung sowie die Proliferation, vor allem von Astrozyten und Mikroglia. Dabei wurden die folgenden Hypothesen überprüft:

### **1. Eine *Bmal1*-Defizienz beeinflusst das Infarktvolumen sowie Volumen der Glianarbe und Mikrogliaaktivierung nach fokalem kortikalem Infarkt.**

Zur Untersuchung dieser Hypothese werden in der vorliegenden Arbeit fokale kortikale Infarkte mittels PT bei adulten männlichen und weiblichen *Bmal1*<sup>+/+</sup>- und *Bmal1*<sup>-/-</sup>-Mäusen induziert. Der Einfluss einer Deletion von *Bmal1* wird während der subakuten Phase, 7 und 14 Tage (d) nach Induktion der PT, bestimmt.

Die Volumina des Infarktkerns sowie der Glianarbe und Mikroglia in der Peri-Infarktregion werden mittels immunhistochemischer Aufarbeitung untersucht und anschließend quantifiziert. Als Marker für die Darstellung von Astrozyten bzw. Mikroglia dienen GFAP und IBA1.

### **2. Eine *Bmal1*-Defizienz hat Auswirkungen auf die Proliferation nach fokalem kortikalem Infarkt.**

Zur Untersuchung dieser Hypothese wird der Proliferationsmarkers BrdU bei männlichen und weiblichen *Bmal1*<sup>+/+</sup>- und *Bmal1*<sup>-/-</sup>-Mäusen nach Induktion fokaler kortikaler Infarkte mittels PT eingesetzt. Als Maß der Proliferation wird die Anzahl

neu gebildeter Zellen (BrdU-positiv) in der Peri-Infarktregion zu beiden Zeitpunkten der subakuten Phase, 7 d und 14 d nach PT, nach immunhistochemischer Aufarbeitung bestimmt. Weiterhin werden die in der Peri-Infarktregion neu gebildeten Zellen durch Kolokalisierung mit den entsprechenden Markern für Astrozyten (GFAP), Mikroglia (IBA1), apoptotischen Zellen (Caspase-3) und Neuronen (NeuN) charakterisiert und quantifiziert.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Versuchstiere

Zur Untersuchung der reaktiven Astrogliose in Bezug zum zirkadianen System wurden acht bis zwölf Wochen alte Mäuse mit konventionellem Bmal1-Knockout [Bmal1<sup>-/-</sup>] und entsprechende Wildtyp-Tiere [Bmal1<sup>+/+</sup>] verwendet. Die Durchführung aller Tierversuche erfolgte nach Genehmigung durch das Landesamt für Natur, Umwelt, Verbraucherschutz (LANUV) NRW in der Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftlichen Tierschutzaufgaben (ZETT) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Aktenzeichen 84-02.04.2012.A380; 84-02.04.2014.A314). Alle Versuche wurden in Übereinstimmung mit den EU-Richtlinien (68/609/EEC) durchgeführt. Vor Aufnahme der Versuche erfolgte die Teilnahme am Versuchstierkudkurs in der ZETT der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Heterozygote Mäuse mit einer gezielten Deletion von Bmal1 (Bmal1<sup>+/-</sup>) wurden ursprünglich von *The Jackson Laboratory*, Maine (USA), bereitgestellt. Die in der Versuchsreihe verwendeten Mäuse wurden durch Verpaarung dieser heterozygoten Bmal1<sup>+/-</sup>-Mäuse in der ZETT gezüchtet. Die anschließende Genotypisierung wurde, wie bei Bunger et al. beschrieben, durchgeführt (28). Die Mäuse wurden anschließend unter standardisierten Bedingungen bei einer Raumtemperatur von 20-24 °C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 45-65 % und einem 12 h Licht-/ 12 h Dunkel-Wechsel (LD) gehalten. Während der Versuchsdurchführung wurden die Mäuse separiert in Standardkäfigen gehalten und postoperativ nach Induktion der Photothrombose intensiv betreut. Die operierten Tiere erholten sich nach Induktion eines fokalen kortikalen Infarkts rasch und zeigten im Verlauf keine Anzeichen eines Gewichtsverlusts oder funktioneller Einschränkungen. Die Tiere hatten zu jedem Zeitpunkt freien Zugang zu Futter und Wasser.

## 2.1.2 Materialien

**Tabelle 1: Chemikalien und Reagenzien mit Hersteller**

<b>Chemikalien und Reagenzien</b>	<b>Hersteller</b>
Borsäure	Merck
Bromodesoxyuridin (BrdU)	Roche
Chrom(III)-Kaliumsulfat x 12 H <sub>2</sub> O	Merck
3,3'-Diaminobenzidine Tabletten (DAB)	Sigma-Aldrich
Eisessig (Essigsäure 100 %)	Vector Laboratories
Entellan	Merck
Gelatine	Merck
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30 %	Merck
Isofluran-Actavis (250 ml)	Actavis
Ketamin-Actavis (Ketaminhydrochlorid, 50 mg/ml)	Actavis
Kresylviolett	Merck
2-Methylbutane (Isopentan)	Sigma-Aldrich
Mowiol 4-88	AppliChem
Mowiol 40-88	Aldrich
NaCl 0,9 % isotone Kochsalzlösung (500 ml)	Braun
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	Merck
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck
Natriumacetat	Merck
Normal Goat Serum (S-100)	Vector Laboratories
Paraformaldehyd	Merck
2-Propanol 100 %	VWR Chemicals
Rimadyl ® (Carprofen, 50 mg/ml)	Pfizer
Rompun (Xylazin)	Bayer
Rose bengal	Sigma-Aldrich
Saccharose	Sigma-Aldrich
Tris(hydroxymethyl)aminomethane-Hydrochlorid	Merck
Triton X-100	Amresco
Trizma ® base	Sigma-Aldrich
Vectastain Elite ABC-Kit	Vector Laboratories
o-Xylol	Merck

**Tabelle 2: Antikörper für Immunhistochemie- und Immunfluoreszenzfärbung**

<b>Primärantikörper</b>	<b>Hersteller</b>
Cleaved Caspase-3 (Asp175) (rabbit polyclonal), cat. #9661	Cell Signaling Technology
Anti-GFAP (rabbit polyclonal), cat.# Z0334	Dako Cytomation
Anti-Iba1 (rabbit), cat.# 019-19741	Wako Pure Chemical industries
Anti-NeuN (rabbit polyclonal), cat.# ABN78	Merck Millipore
Anti-BrdU (rat monoclonal), cat.# OBT0030CX	AbD Serotec
<b>Sekundärantikörper</b>	<b>Hersteller</b>
Goat anti-rabbit IgG, AlexaFluor 568, cat.# A-11036	Life technologies
Goat anti-rat IgG, AlexaFluor 488, cat.# A-11006	Life technologies
Goat anti-rabbit IgG biotinylated, cat.# ZA0520	Vector laboratories

**Tabelle 3: Geräte und Verbrauchsmaterialien**

<b>Geräte und Verbrauchsmaterialien</b>	<b>Hersteller</b>
Bepanthen Augen- und Nasensalbe	Bayer
Blende 1,5 mm	Universitätsklinikum Düsseldorf
Cellstar ® 12-Multiwellplatten	Greiner Bio-One
Cellstar ® 24-Multiwellplatten	Greiner Bio-One
Fluoreszenz-Mikroskop BZ-9000 (Biorevo)	Keyence
Kaltlichtquelle (KL1500 LCD)	Schott
Laser-Scanning Mikroskop LSM 510 Meta	Carl-Zeiss
Luxmeter (LM37)	Dostmann
Milli-Q® Direct	Merck Millipore
Starfrost ® Objektträger 76 x 26 mm	Engelbrecht
Schlittenmikrotom (Frigomobil)	Reichert-Jung
Stereotakte ( <i>Digital Stereotaxic Instrument, 51730D</i> )	Stoelting
Vicryl Nahtmaterial (4-0)	Ethicon

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Versuchsaufbau und Durchführung der Photothrombose

Die Tiere wurden mittels einer Inhalationsanästhesie mit Lachgas ( $N_2O$ ) und Isofluran (2,1 l/min 60 %  $N_2O$ ; 0,7 l/min 20 %  $O_2$ ; 2,0 % Isofluran) in Narkose versetzt. Die Bestimmung der Narkosetiefe erfolgte durch den Ausfall des Flexorreflexes (*toe pinch reflex*), bei dem die Zehen eines Hinterbeins fest gekniffen werden. Während der Versuchsdurchführung wurde zur Überwachung der Narkosetiefe kontinuierlich die Atmung der Tiere beobachtet. Um während des Eingriffs eine Auskühlung zu vermeiden, wurden die Tiere auf einer Wärmedecke platziert und während der Belichtung zusätzlich mit einem Zellstoff bedeckt. Vor Operationsbeginn wurden die Augen zum Schutz mit Bepanthen-Salbe (siehe Tabelle 3) behandelt.

Fokale kortikale Infarkte wurden mittels Photothrombose (PT) ausgelöst (115). Zunächst wurden die Mäuse in einem stereotaktischen Apparat fixiert (Abb. 6A).

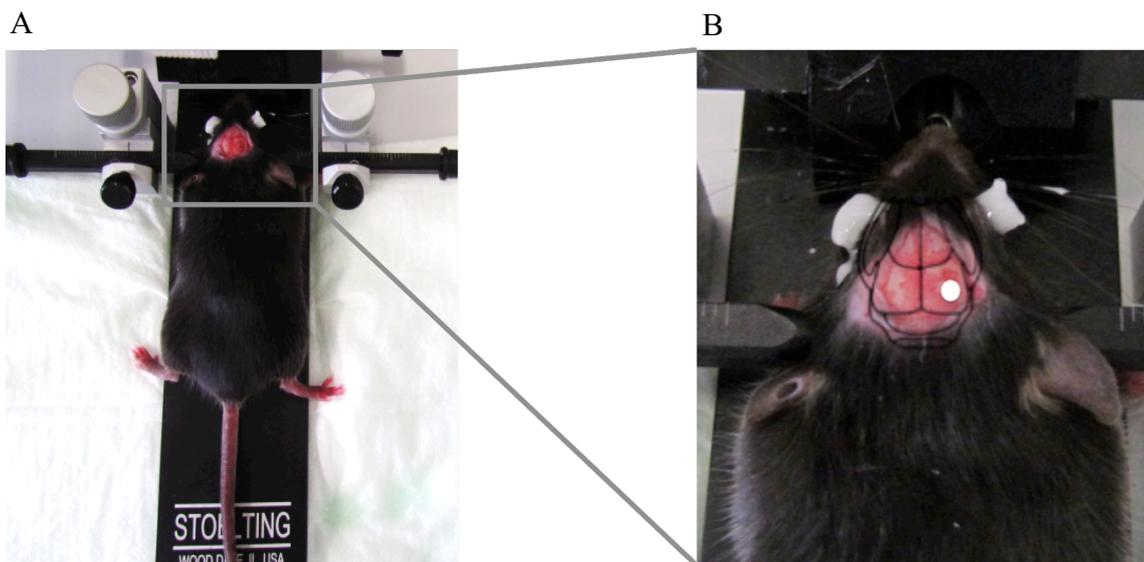


Abb. 6: Darstellung des Versuchsaufbaus. (A) Fixierung einer narkotisierten Maus im stereotaktischen Apparat und (B) exemplarische Projektion des belichteten kortikalen Areals (weißer Punkt) auf die Schädelkalotte.

Nach Entfernung der Haare wurde die Kopfhaut entlang der Medianebene eröffnet. Das Periost wurde vorsichtig mit einem Wattestäbchen von der Schädelkalotte entfernt. Während in einigen Arbeiten eine intraperitoneale Applikationsform zur Verabreichung der photosensitiven Substanz angewendet wurde (116, 122, 124), wurde in der vorliegenden Arbeit, wie 1985 ursprünglich von Watson et al. an Ratten etabliert (115), die Substanz intravenös verabreicht. Nach intravenöser Injektion von Bengal Rosa

(43 mg/kg KG gelöst in 0,9 %-iger Kochsalzlösung) in die Schwanzvene erfolgte die 15-minütige Belichtung des somatosensorischen Kortex. Dabei wurde die Kaltlichtquelle (2 500 Lux) mit einer Blendenöffnung von 1,5 mm direkt auf der Schädelkalotte 2,0 mm dorsal und 2,5 mm lateral von Bregma (- 2,0 mm, 2,5 mm lateral) positioniert (Abb. 6B), um eine Streuung der Strahlung und damit verbundener Variabilität in der Ausprägung der Photothrombose zu vermeiden (124). Dies führt im belichteten Areal zur lokalen Aktivierung der photosensitiven Substanz und Freisetzung von freien Radikalen (123, 130, 131). Als Folge der Endothelreizung kommt es zur Aktivierung der Thrombozytenaggregation und die Gerinnungskaskade führt zum lokalen Verschluss kleiner Gefäße. Durch die selektive Störung des Blutflusses kommt es zur irreversiblen Schädigung des Gewebes und Infarzierung (115, 120, 124). Anschließend wurde die Kopfhaut durch resorbierbares synthetisches Nahtmaterial mittels Einzelknopfnähte verschlossen (siehe Tabelle 3). Entsprechend der Vorgaben des LANUV wurde den Tieren zur Vermeidung von Schmerzen intraoperativ Carprofen (Rimadyl®, 4 mg/kg KG gelöst in 0,9 %-iger Kochsalzlösung) subkutan injiziert und die analgetische Behandlung bei allen Tieren postoperativ an den zwei darauffolgenden Tagen mittels subkutaner Injektion von Carprofen weitergeführt.

### 2.2.2 Injektion von BrdU

BrdU, 5-Brom-2'-desoxyuridin, ist ein Thymidin-Analogon, das während der S-Phase des Zellzyklus in die DNA proliferierender Zellen eingebaut wird (132). Durch intraperitoneale Injektion des Proliferationsmarkers BrdU (100 mg/kg KG gelöst in 0,9 %-iger NaCl-Lösung) werden sich teilende Zellen markiert und somit die Bestimmung neu gebildeter Zellen nach Induktion eines fokalen kortikalen Infarkts ermöglicht. Die Applikation von BrdU erfolgte für die Versuchsreihe 7 d nach PT einmal täglich vom 3. bis 6. postoperativen Tag und für die Versuchsreihe 14 d nach PT einmal täglich vom 8. bis 13. Tag nach Induktion der Photothrombose (Abb. 7).

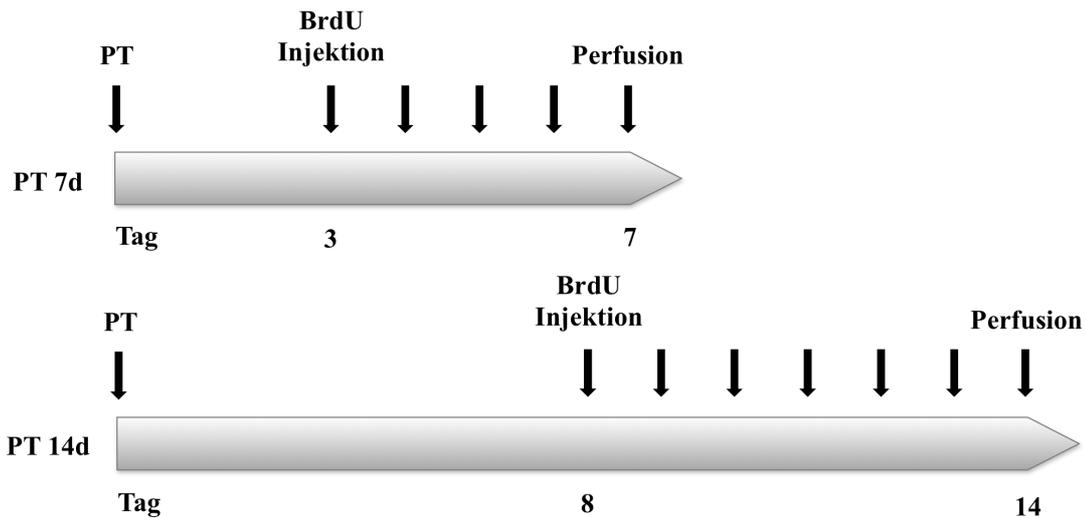


Abb. 7: Schematische Darstellung der konsekutiven BrdU-Injektionen zur Untersuchung der Proliferation neu gebildeter Zellen 7 d und 14 d nach PT.

### 2.2.3 Gewebepräparation

Die Untersuchung der Infarktbildung erfolgte 7 d oder 14 d nach Induktion der Photothrombose, auch als subakute Phase nach Ischämie definiert (117), da es ab diesem Zeitpunkt neben zellulären Regenerationsprozessen auch zur Ausbildung der Glianarbe kommt. Zur Untersuchung der Infarktbildung wurden die Mäuse 7 d oder 14 d nach Induktion der Photothrombose durch eine intraperitoneal applizierte Überdosis des Injektionsnarkotikums Ketamin/Xylazin (Ketamin 100 mg/kg KG, Xylazin 10 mg/kg KG) euthanisiert und unmittelbar im Anschluss perfundiert. Die Perfusion mittels Paraformaldehyd-Lösung (PFA) ermöglicht infolge der Denaturierung von Proteinen einen guten Strukturerehalt des Gewebes und verhindert das Auftreten postmortalen Veränderungen durch autolytische Vorgänge (133). Dazu wurde der Bauchraum zunächst im unteren Drittel und dann v-förmig stumpf bis zum Rippenbogen eröffnet. Nach Freilegung des Herzens wurde über die Herzspitze der linke Ventrikel mit einer Kanüle punktiert. Um die Blutgefäße von zellulären Bestandteilen zu befreien, wurde zunächst mit Hilfe einer Pumpe über den linken Ventrikel und den eröffneten rechten Vorhof des Herzens das Gefäßsystem mit physiologischer Kochsalzlösung (NaCl) für 3 min gespült. Eine erfolgreiche Perfusion zeigte sich durch rasche Entfärbung der Leber. Anschließend erfolgte die eigentliche Fixierung durch 7-minütige Perfusion mit 4 %-PFA-Lösung (siehe Anhang, Tabelle 4).

Nach abgeschlossener Fixierung wurden die Tiere dekapitiert und das Gehirn aus der Schädelhöhle mobilisiert. Dabei wurde der Schädelknochen entlang der Sutura sagittalis sowie lateral eingeschnitten und die Knochenfragmente mit einer Pinzette von dem darunterliegenden Gewebe entfernt. Bei der Präparation des Gehirns wurde bei allen Tieren zunächst die Seite kontralateral der Läsion freigelegt und anschließend vorsichtig die ipsilaterale, infarzierte Seite dargestellt (Abb. 8). Die Dura wurde mit einer scharfen Pinzette von der Oberfläche des Gehirns entfernt, um beim Schneiden Artefakte durch Einreißen zu vermeiden.

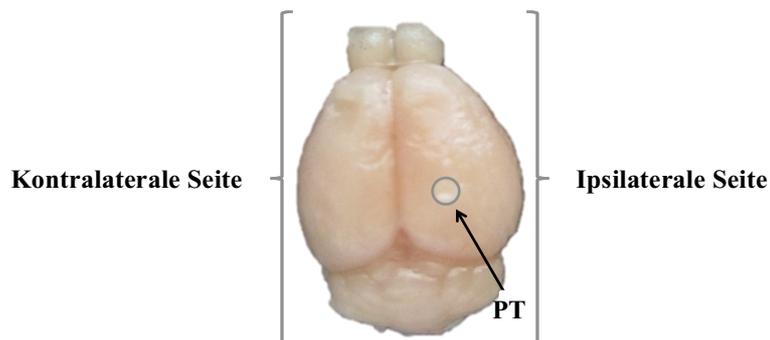


Abb. 8: Exemplarische Darstellung eines präparierten Gehirns mit schematischer Einzeichnung des Infarktareals.

Das entnommene Gewebe wurde im Anschluss an die Entnahme für 24 h bei 4 °C in 4 %-iger PFA-Lösung nachfixiert. Vor dem Einfrieren wurden die Gehirne zur Prävention von Gefrierartefakten für 24 h bei 4 °C in 20 %-iger Saccharose-Lösung (siehe Anhang, Tabelle 4) behandelt (134).

#### 2.2.4 Lagerung und Anfertigung von Schnittserien

Zur Erstellung von Gefrierschnitten für immunhistochemische Untersuchungen wurden die Gehirne *in toto* in 2-Methylbutane bei -30 °C schockgefroren und dann bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert. Von den eingefrorenen Gehirnen wurden anschließend am Schlittenmikrotom koronare Schnittserien mit einer Schnittdicke von 30 µm angefertigt und in Cryoschutz-Solution (siehe Anhang, Tabelle 4) gelagert.

### 2.2.5 Kresylviolett-Färbung zur Etablierung der Operationstechnik

Zur Etablierung der Operationstechnik wurde die Ausprägung der Photothrombose mit einer Kresylviolett-Färbung dargestellt. Mit dieser Färbemethode werden Nissl-Schollen und Zellkerne von Nervenzellen dargestellt (134).

Die Kontrolle der Läsion erfolgte durch Bearbeitung jedes 12. Schnittes, die vor Beginn der Färbung auf adhäsive Objektträger aufgezogen wurden. Die Schnitte wurden zunächst für 8 min bei 60 °C in einer Kresylviolett-Lösung inkubiert (siehe Anhang, Tabelle 4). Nach einer kurzen Spülung mit MilliQ-H<sub>2</sub>O wurden die Schnitte für jeweils 1 min in einer aufsteigenden Alkoholreihe (2 x 70 % Isopropanol, 2 x 90 % Isopropanol, 2 x 100 % Isopropanol; siehe Anhang, Tabelle 4) entwässert. Anschließend erfolgte eine Inkubation in Xylol für weitere 5 min. Die Objektträger wurden feucht mit Entellan (Tabelle 1) eingedeckt. Zur Kontrolle der Operationstechnik im Rahmen der Etablierung wurden die Schnitte im Bereich der PT am Keyence-Mikroskop aufgenommen und untersucht (Abb. 9).

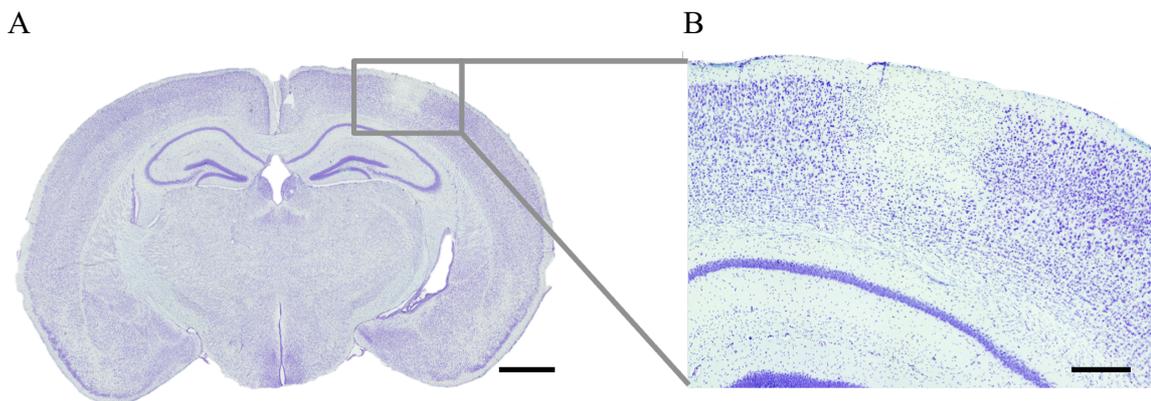


Abb. 9: Exemplarische Darstellung der Infarktausprägung in einem koronaren Schnitt in Kresylviolett-Färbung 7 d nach Induktion der PT in (A) Übersichtsaufnahme (2-fache Vergrößerung, Maßstab: 1 mm) und (B) Detailaufnahme (10-fache Vergrößerung, Maßstab: 300 μm).

### 2.2.6 Immunhistochemie zur Darstellung der Photothrombose

Der Nachweis des Infarktkerns, der Glianarbe und Mikrogliaaktivierung nach Induktion eines kortikalen Infarkts erfolgte immunhistochemisch mit Hilfe spezifischer Antikörper (Tabelle 2). Als Marker für die Identifikation von Astrozyten zur Untersuchung des Infarktkerns und der Glianarbe diente GFAP (Abb. 10A), eines der wichtigsten astroglialen Intermediärfilamente (80). Der Nachweis von aktivierter

Mikroglia erfolgte mittels IBA1 (Abb. 10B), einem für Mikroglia/Makrophagen-spezifischen calziumbindenden Protein (112). Die immunhistochemischen Analysen wurden an Parallelschnitten von 12er Schnittserien durchgeführt.

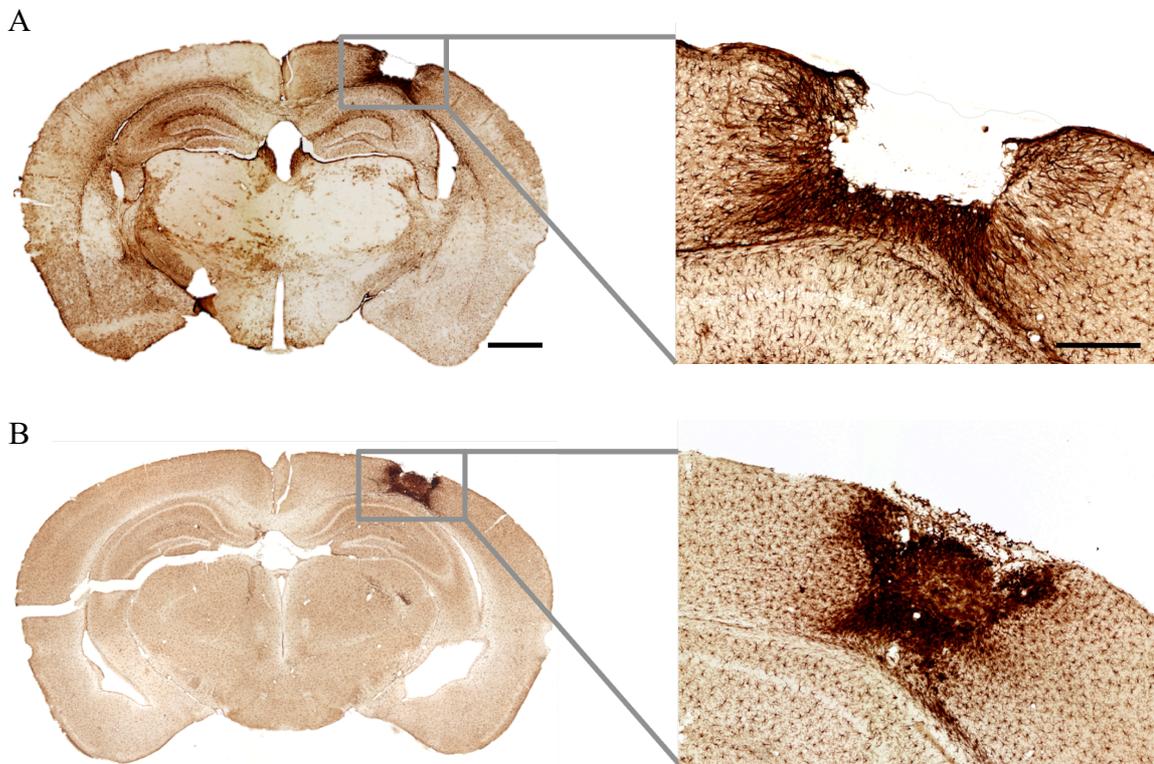


Abb. 10: Repräsentative Mikrofotographien des Infarktareals 14 d nach PT. Immunhistochemische Darstellung von (A) reaktiven Astrozyten mittels GFAP in Übersichts- (2-fache Vergrößerung, Maßstab: 1 mm) und Detailaufnahme (10-fache Vergrößerung, Maßstab: 300  $\mu$ m) sowie (B) aktivierter Mikroglia mittels IBA1.

Die immunhistochemische Aufarbeitung der Schnitte begann mit 6 Waschschritten von je 15 min in einer Lösung aus 1 x PBS und 0,2 % Triton (PBS-T, siehe Anhang, Tabelle 4). Triton X-100 permeabilisiert lipophile Membranen und gewährleistet dadurch die Bindung zwischen intrazellulär lokalisierten Antigenen und den entsprechenden, exogen zugeführten Antikörpern. Nach einer 30-minütigen Inkubation der Schnitte in 0,24 %  $H_2O_2$  (siehe Anhang, Tabelle 4) wurden die Hirnschnitte erneut dreimal für jeweils 15 min mit PBS-T gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte für 60 min in mit 3 % Serum versetztem PBS-T inkubiert, um eine Sättigung unspezifischer Antikörperbindungen und damit eine Reduktion des Hintergrundsignals zu gewährleisten. Das dabei verwendete Serum stammte jeweils aus derselben Spezies, aus der auch der Sekundärantikörper isoliert wurde. Die Schnitte wurden anschließend über Nacht bei 4 °C in PBS-T-Serum mit dem jeweiligen Primärantikörper für GFAP

(1:1500) oder IBA1 (1:500) inkubiert (siehe Tabelle 2). Am zweiten Tag der immunhistochemischen Färbung erfolgten zunächst 3 Waschschrirte von 15 min in PBS-T, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Nach erneuter Behandlung mit 3 % PBS-T-Serum für 15 min wurden die Hirnschnitte für 2 h in PBS-T-Serum mit dem entsprechenden biotinylierten sekundären Antikörper (goat anti-rabbit, 1:500) inkubiert (siehe Tabelle 2). Anschließend wurden die Schnitte erneut in drei Schritten für jeweils 10 min gewaschen. Nach einer 60-minütigen Inkubation mit dem Avidinbiotinkomplex (ABC), einer Methode des indirekten Antigennachweises mit dem Ziel der Signalverstärkung, folgten drei weitere Waschschrirte für je 15 min in PBS-T. Die Darstellung der Antikörperreaktion erfolgte durch eine 10-minütige Inkubation mit dem Farbstoff 3,3'-Diaminobenzidin (DAB). Abschließend wurden die Schnitte in 6 Schritten für jeweils 10 min in PBS-T gewaschen.

Die gefärbten Schnitte wurden aus flüssiger Gelatine (siehe Anhang, Tabelle 4) auf Objektträger aufgezogen und nach dem Trocknen mit Entellan eingedeckt.

### *2.2.7 Immunfluoreszenz zur Charakterisierung neu gebildeter Zellen*

Die Methode der Immunfluoreszenz ermöglicht die gleichzeitige zelluläre und subzelluläre Darstellung verschiedener Antikörper und gewährleistet damit die Charakterisierung neu gebildeter Zellen im Bereich der Photothrombose. Die proliferierenden Zellen wurden mittels eines spezifischen BrdU-Antikörpers dargestellt und durch Kolokalisierung mit Zellmarkern unter anderem für Astrozyten und Mikroglia charakterisiert. Dabei wurden GFAP und IBA1 als Marker für Astrozyten bzw. Mikroglia verwendet. Eine weitere Klassifizierung der neu gebildeten Zellen erfolgte mittels Caspase-3 als Marker für apoptotische Zellen sowie NeuN zur Darstellung von Neuronen (Abb. 11A-D).

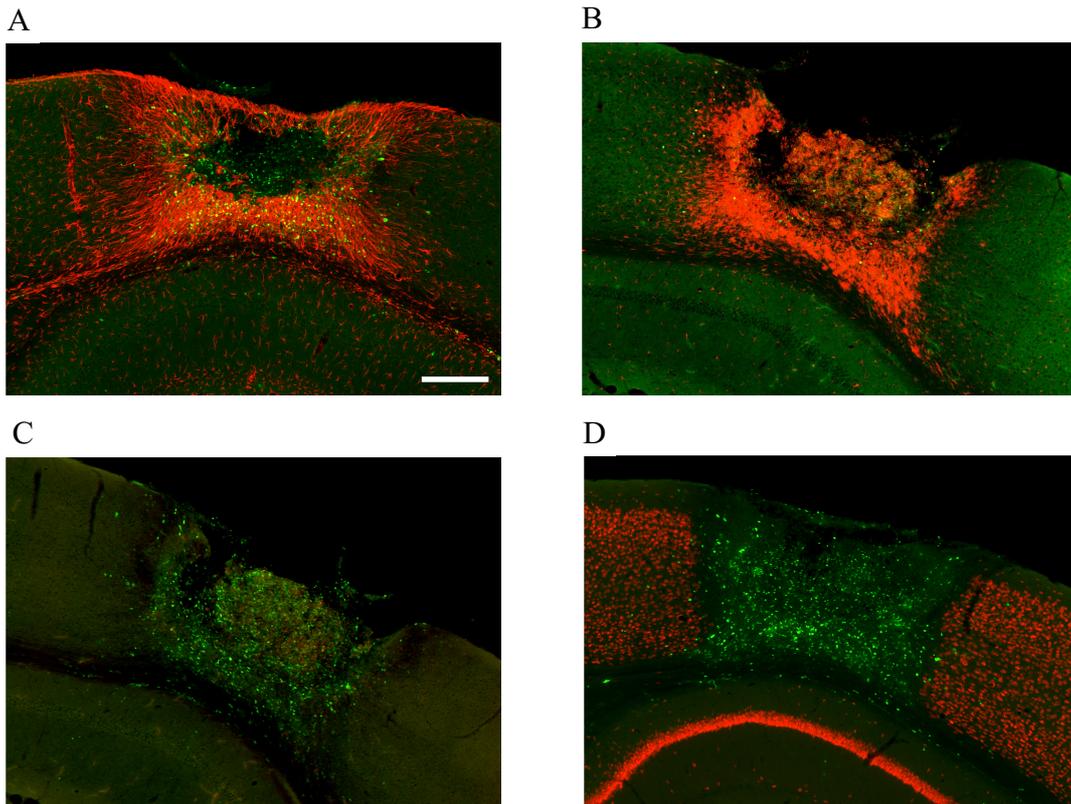


Abb. 11: Kolokalisierung von BrdU-positiven Zellen (grün) und verschiedenen Zellmarkern (10-fache Vergrößerung, Maßstab: 300  $\mu$ m). Kolokalisation von BrdU und (A) GFAP (rot), (B) IBA1 (rot), (C) Caspase-3 (rot) und (D) NeuN (rot).

Der gleichzeitige Nachweis von BrdU und einem der oben genannten Antikörper erfolgte an jedem 12. Schnitt. Nach 6 Waschschritten für jeweils 15 min in 1 x TBS wurden die Schnitte in 2 N HCl bei 37 °C für 30 min inkubiert (siehe Anhang, Tabelle 4). Das in die DNA integrierte BrdU wurde dabei durch die säurebedingte Denaturierung für die Antikörperbindungen zugänglich gemacht. Anschließend wurden die Schnitte für 10 min in 0,1 M Borsäure (siehe Anhang, Tabelle 4) überführt und zweimal für jeweils 15 min in TBS gespült. Die Blockierung unspezifischer Bindungen erfolgte mit 3 % Serum versetztem TBS-T 0,1 %. Die Inkubation der Gewebeschnitte erfolgte über Nacht bei 4 °C in mit primärem Antikörper verdünnten TBS-T-Serum. Folgende primäre Antikörper (siehe Tabelle 2) wurden in Kombination verwendet:

1. *rat* anti-BrdU (1:500) und *rabbit* anti-GFAP (1:1000)
2. *rat* anti-BrdU (1:500) und *rabbit* anti-IBA1 (1:1000)
3. *rat* anti-BrdU (1:500) und *rabbit* anti-NeuN (1:500)
4. *rat* anti-BrdU (1:500) und *rabbit* anti-Caspase-3 (1:500)

Am folgenden Tag wurden die Schnitte zunächst dreimal in TBS gewaschen bevor sie für 30 min in TBS-T-Serum inkubiert wurden. Anschließend erfolgte unter Ausschluss von Licht die Inkubation der Proben mit den Fluoreszenz-gekoppelten sekundären Antikörpern (siehe Tabelle 2). Die Zweitantikörperlösung bestand aus Alexa-Fluor 488 *goat anti-rat* (1:500) und Alexa-Fluor 568 *goat anti-rabbit* (1:500) in TBS-T-Serum. Die darauffolgenden sechs Waschschrte in TBS-T wurden ebenfalls im Dunkeln durchgeführt.

Die Gewebeschnitte wurden lichtgeschützt aus flüssiger Gelatine aufgezogen und abschließend nach dem Trocknen zur Gewährleistung der Fluoreszenzstabilität mit Mowiol eingedeckt (siehe Anhang, Tabelle 4).

### 2.2.8 Bestimmung der Infarktvolumina

Die Infarktvolumina wurden 7 d und 14 d nach Induktion der PT bei männlichen und weiblichen Bmal1<sup>+/+</sup>- und Bmal1<sup>-/-</sup>-Mäusen (n = 4-6) bestimmt. Die Schnitte wurden am Keyence-Mikroskop digitalisiert und anschließend mithilfe der Bildanalysesoftware ImageJ ausgewertet. Mit Hilfe des Freihandwerkzeugs wurden zum einen anhand der GFAP-Immunreaktion sowohl der Infarktkern als auch die Glianarbe (Abb. 12A-C) und zum anderen anhand der IBA1-Immunreaktion die Region der Mikrogliaaktivierung (Abb. 12D) in der Peri-Infarktregion umfahren und anschließend die Flächen ermittelt. Um die entsprechenden Volumina zu erhalten, wurden die jeweiligen Flächen mit der Schnittdicke (30 µm) und der Anzahl der Schnitte pro Serie multipliziert.

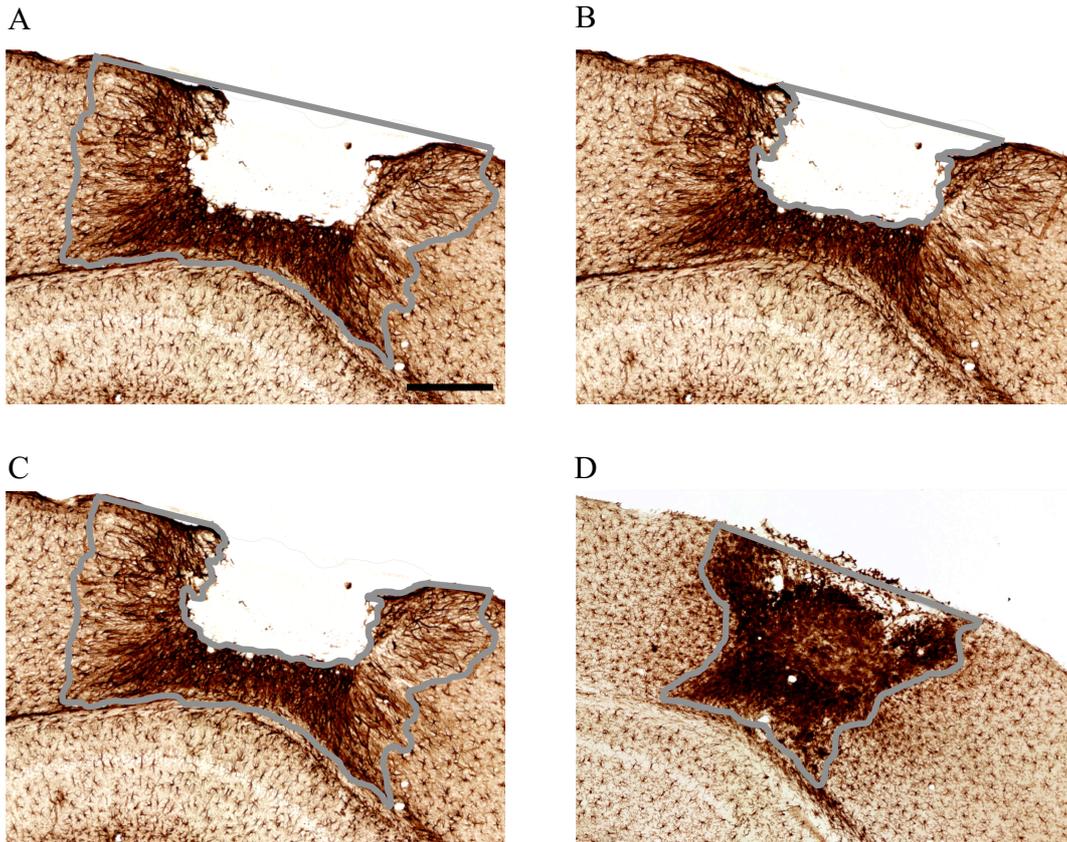


Abb. 12: Exemplarische Darstellung der Flächenermittlung anhand der GFAP- (A-C) und IBA1-Immunreaktion (D). (A) Infarktareal (10-fache Vergrößerung, Maßstab: 300  $\mu\text{m}$ ), (B) Infarktkern, (C) Glianarbe, (D) Region der Mikrogliaaktivierung.

### 2.2.9 Quantifizierung und Charakterisierung neu gebildeter Zellen

Die neu gebildeten Zellen wurden in der Peri-Infarktregion charakterisiert und quantifiziert. Die immunhistochemische Aufarbeitung der zu analysierenden Schnitte erfolgte sowohl 7 d als auch 14 d nach PT wie in Abschnitt 2.2.6 beschrieben bei jeweils 3 männlichen und weiblichen  $\text{Bmal1}^{+/+}$ - und  $\text{Bmal1}^{-/-}$ -Mäusen ( $n=3$ ). Es wurden Bildstapel am Laser-Scanning-Mikroskop LSM 510 Meta von der Infarktregion aufgenommen. Die Gesamtzahl der BrdU-positiven Zellen wurde in einem festgelegten Volumen der Peri-Infarktregion, am Übergang vom Infarktkern zur Glianarbe, ermittelt (Abb. 13).

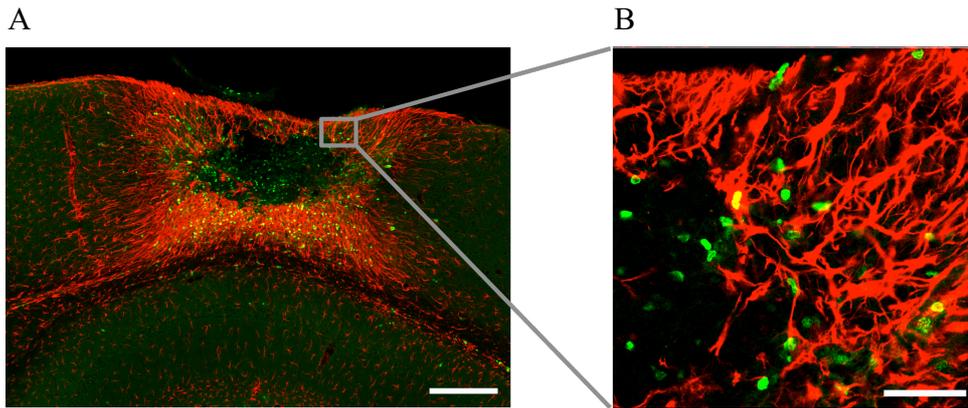


Abb. 13: (A) Exemplarische Darstellung der Photothrombose (10-fache Vergrößerung, Maßstab: 300  $\mu\text{m}$ ) und (B) des untersuchten Areals der Peri-Infarktregion am Übergang von Infarktkern zu Glianarbe (40-fache Vergrößerung, Maßstab: 50  $\mu\text{m}$ ).

Zur Charakterisierung der neu proliferierten Zellen wurden im definierten Bereich die Zellen gezählt, die eine Kolo-kalisation von BrdU und dem entsprechenden Zelltypmarker für Astrozyten (GFAP), Mikroglia (IBA1), apoptotischen Zellen (Caspase-3) oder Neuronen (NeuN) aufwiesen (Abb. 14).

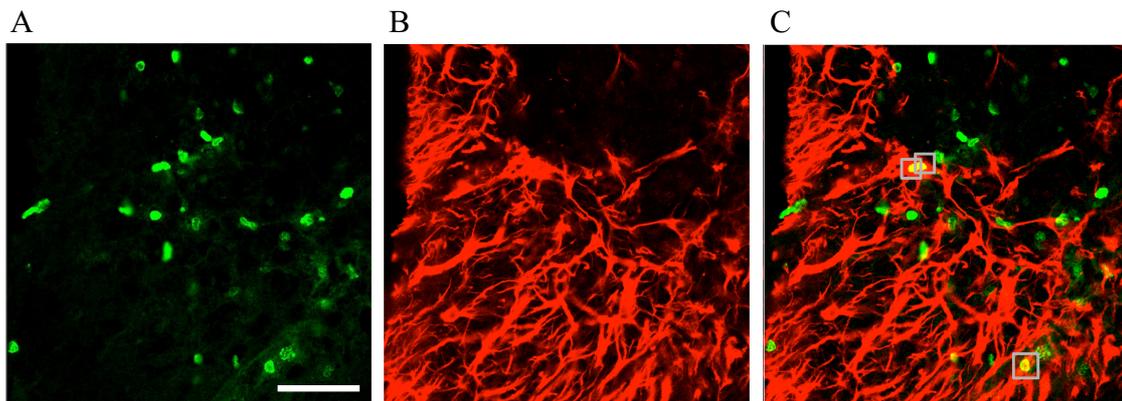


Abb. 14: Exemplarische Darstellung der Charakterisierung proliferierender Zellen am Beispiel von Astrozyten. (A) BrdU-Immunreaktion im Zellkern (40-fache Vergrößerung, Maßstab: 50  $\mu\text{m}$ ), (B) GFAP-Immunreaktion im Zytoplasma, (C) Überlagerung (*Overlay*) der BrdU- und GFAP-Immunreaktion. Als neu proliferierte Astrozyten wurden nur solche Zellen gewertet, bei denen eindeutig eine gleichzeitige Immunreaktion von BrdU und GFAP festgestellt werden konnte (Kästchen).

### 2.2.10 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung aller Daten erfolgte mithilfe der Statistiksoftware GraphPad Prism (Graphpad Software, Inc.). Da eine Gruppengröße von 4-6 Mäusen

nicht ausreicht, um Aussagen über eine Normalverteilung der Volumenparameter in den Gruppen treffen zu können, wurden in der vorliegenden Arbeit die verschiedenen Variablen paarweise mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests, einem nicht-parametrischen statistischen Verfahren, verglichen. Die Werte wurden stets als arithmetische Mittelwerte (MW) angegeben und graphisch zusammen dargestellt. Bei einem p-Wert  $\leq 0,05$  wurde von signifikanten Unterschieden ausgegangen.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Etablierung der Operationstechnik

Um den Einfluss einer Bmal1-Defizienz auf die Infarktbildung und strukturelle Regeneration zu untersuchen, wurden ischämische Infarkte mittels Photothrombose (PT) ausgelöst. In einer ersten Versuchsreihe wurde die Methode der Photothrombose etabliert, um minimal-invasiv die Induktion reproduzierbarer fokaler kortikaler Infarkte bei den Tieren zu gewährleisten.

Zur optimalen Untersuchung und Quantifizierung des Infarktareals wurden initial die verschiedenen Operationsparameter wie Narkosetiefe, Beleuchtungsstärke der Kaltlichtquelle sowie Blendeneinstellung experimentell etabliert. Dabei musste die Beleuchtungsstärke der Kaltlichtquelle einerseits ausreichend stark gewählt werden, um analysierbare, messbare Infarkte auszulösen, andererseits jedoch nicht zu stark, um eine Schädigung des Corpus callosum und damit eine zelluläre Reaktion der kontralateralen Hemisphäre auszulösen. Während bei einer Beleuchtungsstärke von 2 000 Lux die Größe des Infarktareals noch klein und oberflächlich war (Abb. 15A), zeigte sich bei 2 500 Lux 7 und 14 Tage (d) nach Induktion der PT eine kompakte Glianarbe sowie ein evaluierbarer Infarktkern (Abb. 15B). Daher wurde zur Durchführung der nachfolgenden Experimente eine Beleuchtungsstärke von 2 500 Lux gewählt.

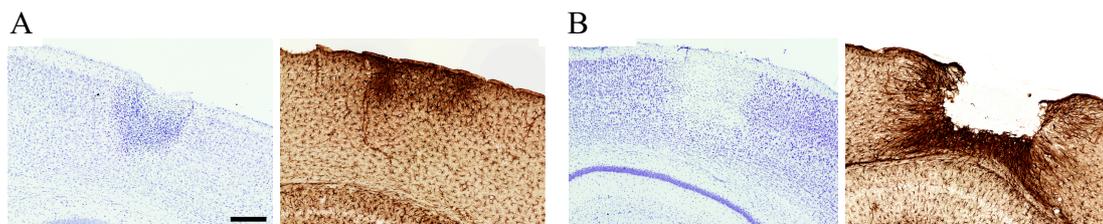


Abb. 15: Darstellung der Infarktausprägung anhand der Kresylviolett- und GFAP-Immunreaktion 14 Tage (d) nach Induktion der PT im Rahmen der Etablierung mit einer Beleuchtungsstärke von (A) 2 000 Lux (10-fache Vergrößerung, Maßstab: 300  $\mu$ m) und (B) 2 500 Lux.

### 3.2 Analyse der Infarktvolumina nach Photothrombose

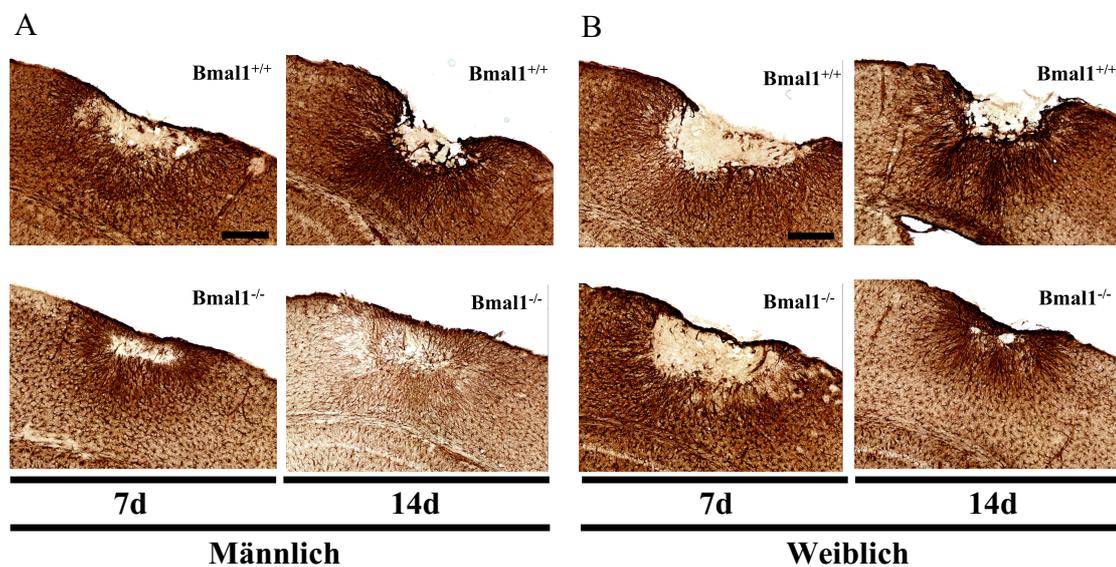
Der Effekt einer Deletion von Bmal1 auf die Infarktbildung und strukturelle Regeneration wurde anhand der Volumina des Infarktkerns sowie der Glianarbe und Mikrogliaaktivierung in der Peri-Infarktregion infolge eines fokalen kortikalen Infarkts

mittels PT untersucht. Um den Einfluss von Bmal1 auf das Infarktvolumen und die Ausbildung der Glianarbe zu analysieren, wurden, wie in Abschnitt 2.2.6 beschrieben, immunhistochemische Färbungen 7 d und 14 d nach Induktion der PT bei männlichen und weiblichen Wildtyp- [Bmal1<sup>+/+</sup>] und Bmal1-defizienten [Bmal1<sup>-/-</sup>] Mäusen (n = 4-6) durchgeführt.

### 3.2.1 Bestimmung des Infarktvolumens mittels GFAP

Der Einfluss einer Deletion von Bmal1 auf das Volumen des Infarktkerns, auch als Infarktvolumen definiert, wurde 7 d und 14 d nach Induktion der Photothrombose nach immunhistochemischer Aufarbeitung der Schnitte mit dem für Astrozyten spezifischen Marker GFAP untersucht. Die Bestimmung des Infarktvolumens erfolgte wie in Abschnitt 2.2.8 beispielhaft dargestellt und beschrieben.

Qualitativ zeigte sich im zeitlichen Verlauf eine strukturelle Veränderung des infarzierten Areals sowohl bei männlichen (Abb. 16A) als auch weiblichen Mäusen (Abb. 16B).



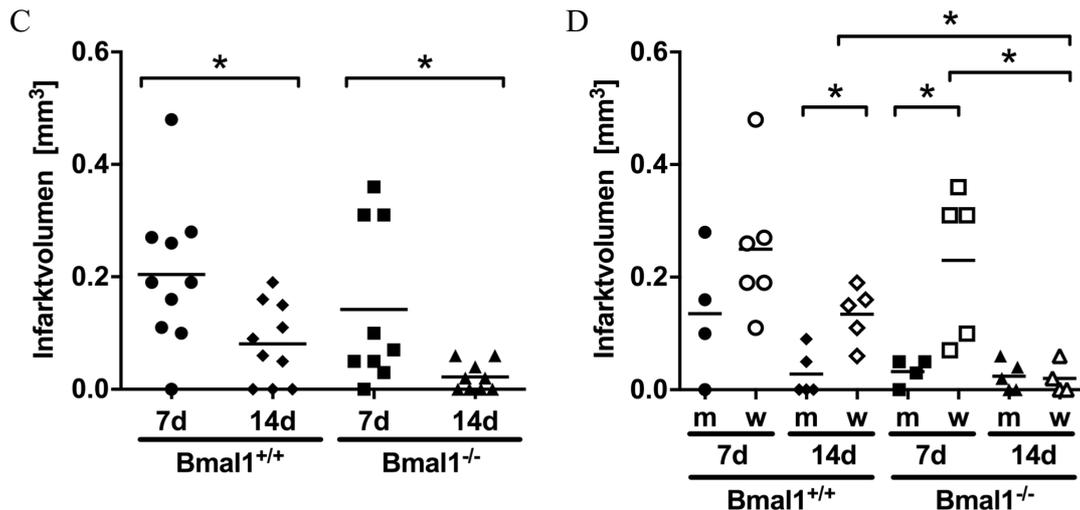


Abb. 16: (A, B) Repräsentative Mikrofotographien der GFAP-Immunreaktion bei männlichen und weiblichen Mäusen nach den unterschiedlichen Genotypen 7 d und 14 d nach Induktion der Photothrombose (10-fache Vergrößerung, Maßstab: 300  $\mu$ m). (C) Analyse des Infarkt volumens (Volumen des Infarktkerns) [ $\text{mm}^3$ ] 7 d und 14 d nach Induktion der PT in der Gesamtgruppe der Wildtyp [ $\text{Bmal1}^{+/+}$ ] und  $\text{Bmal1}$ -defizienten [ $\text{Bmal1}^{-/-}$ ] Mäuse ( $n = 9-10$ ). (D) Geschlechtsabhängige Analyse des Infarkt volumens [ $\text{mm}^3$ ] bei männlichen und weiblichen  $\text{Bmal1}^{+/+}$ - und  $\text{Bmal1}^{-/-}$ -Mäusen 7 d und 14 d nach PT ( $n = 4-6$ ). Paarweiser Vergleich mittels Mann-Whitney-U-Test, Mittelwert (MW), \*  $p \leq 0,05$ .

### 3.2.1.1 Einfluss des Zeitfaktors auf das Infarktvolumen

Bei den Gesamtgruppen der  $\text{Bmal1}^{+/+}$ - und  $\text{Bmal1}^{-/-}$ -Mäuse war das Infarktvolumen 14 d nach PT signifikant geringer als nach 7 d (Abb. 16C). Bei geschlechtsabhängiger Betrachtung und damit verbundener Reduktion des Stichprobenumfangs bestätigte sich ein zeitabhängig geringeres Infarktvolumen jedoch ausschließlich bei den weiblichen  $\text{Bmal1}^{-/-}$ -Mäusen (Abb. 16D). Bei den anderen Untersuchungsgruppen wurde diese Veränderung hingegen nicht nachgewiesen.

### 3.2.1.2 Einfluss einer $\text{Bmal1}$ -Defizienz auf das Infarktvolumen

Um den Einfluss einer Deletion von  $\text{Bmal1}$  auf das Infarktvolumen zu ermitteln, wurden  $\text{Bmal1}^{+/+}$ - und  $\text{Bmal1}^{-/-}$ -Mäuse gruppenspezifisch miteinander verglichen. Beim Vergleich der Gesamtgruppen von  $\text{Bmal1}^{+/+}$ - mit  $\text{Bmal1}^{-/-}$ -Mäusen wurde sowohl 7 d als auch 14 d nach PT kein Unterschied im Infarktvolumen festgestellt (Abb. 16C). Gleichermäßen war auch bei geschlechtsabhängiger Betrachtung das Infarktvolumen bei den männlichen  $\text{Bmal1}^{+/+}$ - mit  $\text{Bmal1}^{-/-}$ -Mäusen 7 d und 14 d nach PT gleich.

Ausschließlich bei den weiblichen Bmal1<sup>-/-</sup>-Mäusen wurde zum Zeitpunkt 14 d nach Induktion der PT im Vergleich zu den weiblichen Bmal1<sup>+/+</sup>-Mäusen ein geringeres Infarktvolume nachgewiesen (Abb. 16D).

### 3.2.1.3 Einfluss des Geschlechts auf das Infarktvolume

In einem weiteren Schritt wurde der Einfluss des Geschlechts auf das Infarktvolume analysiert (Abb. 16D). Während zum Zeitpunkt 7 d nach Induktion der PT kein Unterschied im Volume des Infarktkerns zwischen männlichen und weiblichen Bmal1<sup>+/+</sup>-Mäusen nachgewiesen wurde, war das Infarktvolume 14 d nach PT bei den weiblichen Bmal1<sup>+/+</sup>-Mäusen signifikant größer als bei den männlichen Bmal1<sup>+/+</sup>-Mäusen. Zudem wurde bei den weiblichen Bmal1<sup>-/-</sup>-Mäusen 7 d nach PT ein signifikant größeres Infarktvolume im Vergleich zu den männlichen Bmal1<sup>-/-</sup>-Mäusen festgestellt. 14 d nach Induktion der PT war das Infarktvolume jedoch bei weiblichen und männlichen Bmal1<sup>-/-</sup>-Mäusen gleichermaßen gering.

### 3.2.2 Bestimmung des Volumens der Glianarbe mittels GFAP

Als weiterer Parameter der Infarktbildung und strukturellen Regeneration wurde das Volume der Glianarbe ebenfalls 7 d und 14 d nach Induktion der kortikalen Infarkte bei männlichen und weiblichen Bmal1<sup>+/+</sup>- und Bmal1<sup>-/-</sup>- Mäusen anhand der immunhistochemischen Färbung mittels GFAP bestimmt.

Qualitativ wurde im zeitlichen Verlauf von 7 d zu 14 d nach PT sowohl bei den männlichen (Abb. 16A) als auch weiblichen Bmal1<sup>+/+</sup>-Mäusen (Abb. 16B) die Ausbildung einer kompakten Glianarbe beobachtet.

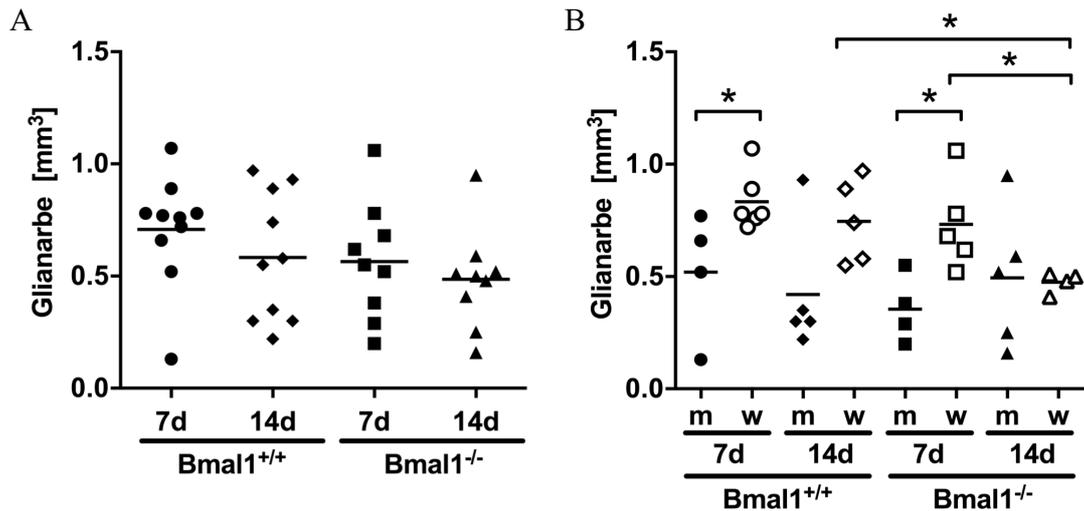


Abb. 17: (A) Analyse des Volumens der Glianarbe [mm<sup>3</sup>] 7 d und 14 d nach Induktion der PT bei den Gesamtgruppen der Bmal1<sup>+/+</sup>- und Bmal1<sup>-/-</sup>-Mäuse (n = 9-10). (B) Geschlechtsabhängige Analyse des Volumens der Glianarbe [mm<sup>3</sup>] bei männlichen und weiblichen Bmal1<sup>+/+</sup>- und Bmal1<sup>-/-</sup>-Mäusen 7 d und 14 d nach PT (n = 4-6). Paarweiser Vergleich mittels Mann-Whitney-U-Test, MW, \* p < 0,05.

### 3.2.2.1 Einfluss des Zeitfaktors auf das Volumen der Glianarbe

Bei den Gesamtgruppen von Bmal1<sup>+/+</sup>- und Bmal1<sup>-/-</sup>-Mäusen war das Volumen der Glianarbe 7 d und 14 d nach PT gleich groß (Abb. 17A). Bei geschlechtsabhängiger Betrachtung wurde ausschließlich bei den weiblichen Bmal1<sup>-/-</sup>-Mäusen 14 d nach PT ein signifikant kleineres Volumen der Glianarbe im Vergleich zu 7 d festgestellt. Bei den entsprechenden weiblichen Bmal1<sup>+/+</sup>-Mäusen und männlichen Untersuchungsgruppen wurde jedoch keine zeitabhängige Veränderung beobachtet (Abb. 17B).

### 3.2.2.2 Einfluss einer Bmal1-Defizienz auf das Volumen der Glianarbe

Um den Effekt einer Bmal1-Deletion auf die Ausbildung der Glianarbe zu erfassen, wurden Bmal1<sup>+/+</sup>- und Bmal1<sup>-/-</sup>-Tiere beider Geschlechter parallel untersucht und verglichen. Das Volumen der Glianarbe beim Vergleich der Gesamtgruppen von Bmal1<sup>+/+</sup>- und Bmal1<sup>-/-</sup>-Mäusen war sowohl 7 d als auch 14 d nach PT gleich groß (Abb. 17A). Wie auch bei der geschlechtsabhängigen Untersuchung des Infarkt volumens, wurde ausschließlich 14 d nach Induktion der PT bei weiblichen Bmal1<sup>-/-</sup>-Mäusen im Vergleich zu den weiblichen Bmal1<sup>+/+</sup>-Mäusen ein signifikant geringeres Volumen der Glianarbe bestätigt (Abb. 17B). Bei den männlichen

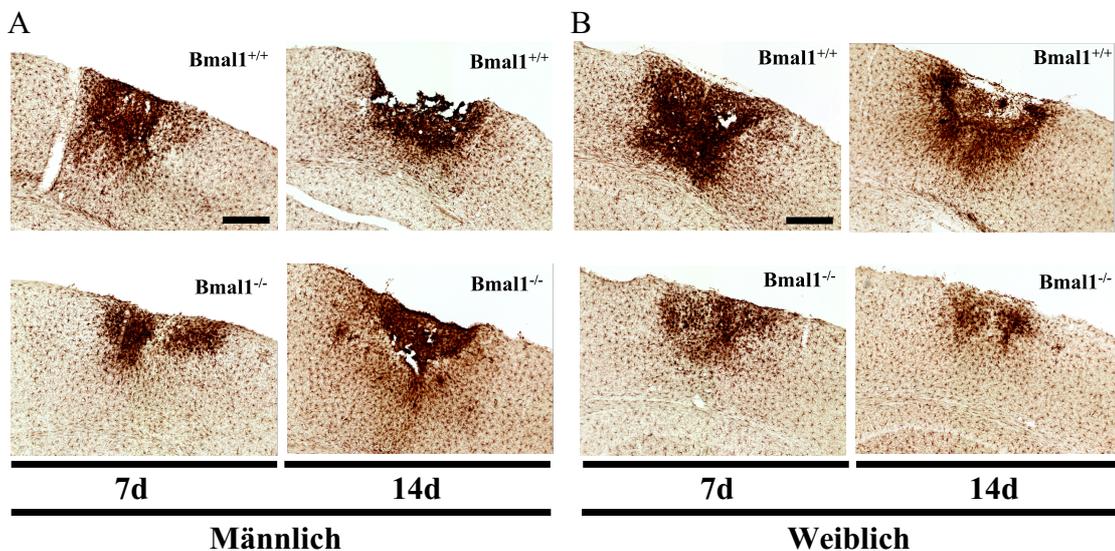
Untersuchungsgruppen wurde hingegen keine Veränderung im Volumen der Glianarbe in Abhängigkeit vom Genotyp festgestellt.

### 3.2.2.3 Einfluss des Geschlechts auf das Volumen der Glianarbe

Um den Einfluss des Geschlechts auf das Volumen der Glianarbe zu bestimmen, wurden weibliche und männliche Mäuse beider Genotypen zum Zeitpunkt 7 d und 14 d nach Induktion der Photothrombose untersucht und gegenübergestellt (Abb. 17B). Das Volumen der Glianarbe war 7 d nach PT bei den weiblichen  $Bmal1^{+/+}$ -Mäusen im Vergleich zu den männlichen  $Bmal1^{+/+}$ -Mäusen signifikant größer. Auch bei den weiblichen  $Bmal1^{-/-}$ -Mäusen wurde zum Zeitpunkt 7 d nach PT ein signifikant größeres Volumen der Glianarbe gegenüber den männlichen  $Bmal1^{-/-}$ -Mäusen nachgewiesen. 14 d nach PT wurde jedoch kein Unterschied in dem Volumen der Glianarbe zwischen weiblichen und männlichen  $Bmal1^{+/+}$ - und  $Bmal1^{-/-}$ -Mäusen detektiert.

### 3.2.3 Bestimmung des Volumens der Mikrogliaaktivierung mittels IBA1

Das Volumen der Mikrogliaaktivierung wurde 7 d und 14 d nach Induktion der Photothrombose bei männlichen und weiblichen  $Bmal1^{+/+}$ - und  $Bmal1^{-/-}$ -Mäusen untersucht (Abb. 18A, B). Die Analyse der Mikrogliaaktivierung wurde anhand der mit dem mikroglialen Marker IBA1 immunhistochemisch aufgearbeiteten Gewebeschnitte (siehe Abschnitt 2.2.6) durchgeführt.



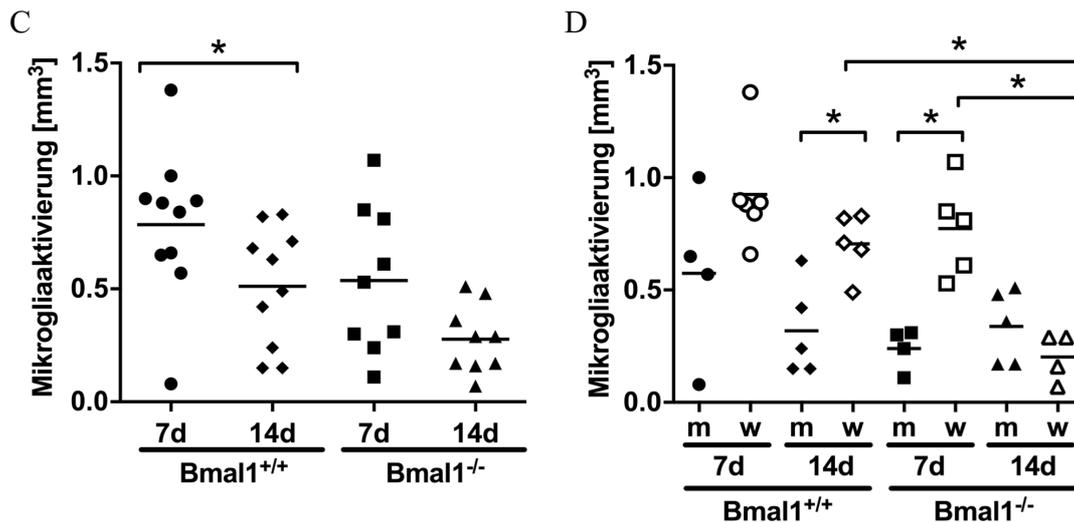


Abb. 18: (A, B) Repräsentative Mikrofotographien der IBA1-Immunreaktion bei männlichen und weiblichen Tieren nach den unterschiedlichen Genotypen 7 d und 14 d nach Induktion der Photothrombose (10-fache Vergrößerung, Maßstab: 300  $\mu\text{m}$ ). (C) Analyse des Volumens der Mikrogliaaktivierung [ $\text{mm}^3$ ] 7 d und 14 d nach Induktion der PT in der Gesamtgruppe der Bmal1<sup>+/+</sup>- und Bmal1<sup>-/-</sup>-Mäuse (n = 9-10). (D) Geschlechtsabhängige Analyse des Volumens der Mikrogliaaktivierung [ $\text{mm}^3$ ] bei männlichen und weiblichen Bmal1<sup>+/+</sup>- und Bmal1<sup>-/-</sup>-Mäusen 7 d und 14 d nach PT (n = 4-6). Paarweiser Vergleich mittels Mann-Whitney-U-Test, MW, \* p  $\leq$  0,05.

### 3.2.3.1 Einfluss des Zeitfaktors auf das Volumen der Mikrogliaaktivierung

14 d nach Induktion der PT war das Volumen der Mikrogliaaktivierung bei der Gesamtgruppe der Bmal1<sup>+/+</sup>-Mäuse signifikant geringer als 7 d nach PT (Abb. 18C). Bei der Gesamtgruppe der Bmal1<sup>-/-</sup>-Mäuse war das Volumen der Mikrogliaaktivierung 7 d und 14 d nach PT jedoch gleich groß. Bei geschlechtsabhängiger Untersuchung wurde ebenfalls, wie beim Volumen des Infarktkerns und der Glianarbe, ausschließlich bei den weiblichen Bmal1<sup>-/-</sup>-Mäuse ein zeitabhängig geringeres Volumen der Mikroglia detektiert (Abb. 18D).

### 3.2.3.2 Einfluss einer Bmal1-Defizienz auf das Volumen der Mikrogliaaktivierung

Der Einfluss einer Deletion von Bmal1 auf das Volumen der Mikrogliaaktivierung wurde 7 d und 14 d nach Induktion der Photothrombose bei männlichen und weiblichen Bmal1-defizienten Mäusen im Vergleich zu den korrespondierenden Kontrollgruppen bestimmt. Wie auch bei der Untersuchung des Infarktvolumens, war das Volumen der

Mikrogliaaktivierung 7 d und 14 d nach PT bei den Gesamtgruppen der Bmal1<sup>+/+</sup>- und Bmal1<sup>-/-</sup>-Mäuse gleich groß (Abb. 18C). Bei geschlechtsabhängiger Betrachtung wurde ebenfalls parallel zum Infarktvolume ausschließlich bei den weiblichen Bmal1<sup>-/-</sup>-Mäusen 14 d nach Induktion der PT ein signifikant kleineres Volume der Mikrogliaaktivierung gegenüber den weiblichen Bmal1<sup>+/+</sup>-Mäusen festgestellt (Abb. 18D). Bei den anderen Untersuchungsgruppen wurde bei geschlechtsabhängiger Analyse jedoch keine Veränderung im Volume der Mikrogliaaktivierung in Abhängigkeit vom Genotyp nachgewiesen.

### 3.2.3.3 Einfluss des Geschlechts auf das Volume der Mikrogliaaktivierung

Weiterhin wurde der geschlechtsabhängige Effekt auf das Volume der Mikrogliaaktivierung bei männlichen und weiblichen Bmal1<sup>+/+</sup>- und Bmal1<sup>-/-</sup>- Mäusen zu beiden Zeitpunkten nach PT untersucht (Abb. 18D). Kongruent zum Infarktvolume war auch das Volume der Mikrogliaaktivierung 14 d nach PT bei den weiblichen Bmal1<sup>+/+</sup>-Mäusen im Vergleich zu den männlichen Bmal1<sup>+/+</sup>-Mäusen signifikant größer. Gleichmaßen wurde auch bei den weiblichen Bmal1<sup>-/-</sup>-Mäusen im Vergleich zu den männlichen Bmal1<sup>-/-</sup>-Mäusen 7 d nach PT neben einem größeren Infarktvolume ein signifikant größeres Volume der Mikrogliaaktivierung bestätigt. Bei den weiblichen und männlichen Bmal1<sup>-/-</sup>-Mäusen war das Volume der Mikrogliaaktivierung 14 d nach PT jedoch gleich.

## 3.3 Analyse der Proliferation nach Photothrombose

In einer weiteren Versuchsreihe wurde bei jeweils sechs Tieren pro Gesamtgruppe bzw. geschlechtsabhängig bei jeweils drei Tieren pro Untergruppe der Einfluss einer Deletion von Bmal1 und des Geschlechts auf die Neubildung von Zellen untersucht. Als weiterer Parameter der strukturellen Regeneration wurde anschließend mittels Koloalisierung verschiedener Antikörper der Phänotyp der proliferierenden Zellen bestimmt. Die Quantifizierung neu gebildeter Zellen erfolgte 7 d und 14 d nach Induktion der PT. Als Proliferationsmarker diente BrdU, das während des Zellzyklus in neu gebildete Zellen integriert wird. Durch gleichzeitige immunhistochemische Darstellung von BrdU-positiven Zellen mit astrozytären (GFAP, Abb. 11A),

mikroglialen (IBA1, Abb. 11B), apoptotischen (Caspase-3, Abb. 11C) oder neuronalen (NeuN, Abb. 11D) Zellen erfolgte die Bestimmung der proliferierenden Zellen in der Peri-Infarktregion.

### 3.3.1 Quantifizierung BrdU-positiver Zellen

Um den Einfluss einer Deletion von Bmal1 auf die Proliferation nach Induktion einer Photothrombose zu untersuchen, wurde den Tieren (n = 3) wie in Abschnitt 2.2.2 beschrieben der Proliferationsmarker BrdU mittels intraperitonealer Injektion appliziert. Die Bestimmung der absoluten Zahl neu gebildeter Zellen erfolgte nach immunhistochemischer Aufarbeitung 7 d und 14 d nach PT und Auszählung aller BrdU-positiven Zellen in einem definierten Areal der Peri-Infarktregion, am Übergang von Glianarbe zu Infarktkern (Abb. 13).

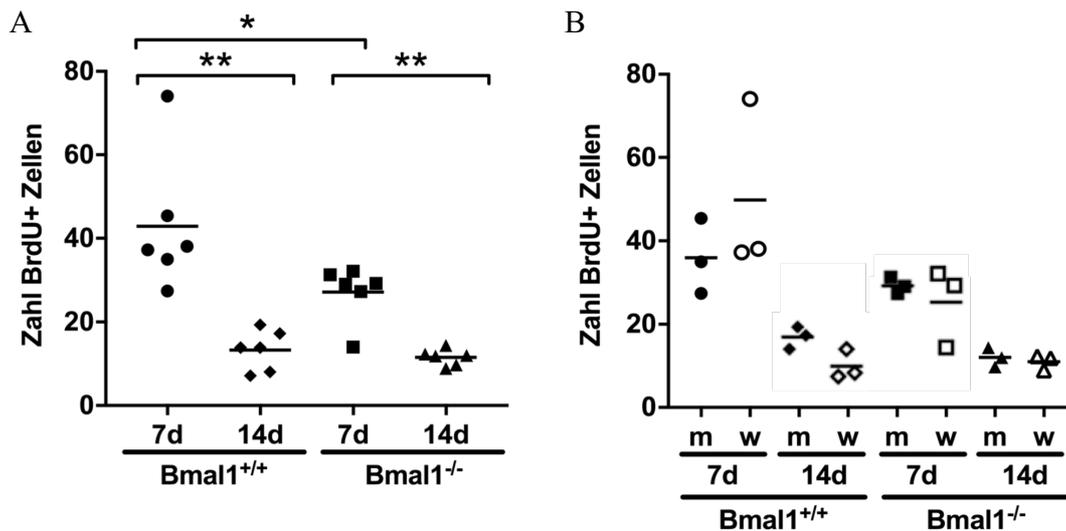


Abb. 19: (A) Analyse der Anzahl BrdU-positiver Zellen 7 d und 14 d nach Induktion der PT in der Gesamtgruppe der Bmal1<sup>+/+</sup>- und Bmal1<sup>-/-</sup>-Mäuse (n = 6). (B) Geschlechtsabhängige Analyse der Anzahl BrdU-positiver Zellen bei männlichen und weiblichen Bmal1<sup>+/+</sup>- und Bmal1<sup>-/-</sup>-Mäusen 7 d und 14 d nach PT (n = 3). Paarweiser Vergleich mittels Mann-Whitney-U-Test, MW, \* p < 0,05, \*\* p < 0,01.

#### 3.3.1.1 Einfluss des Zeitfaktors auf die Anzahl BrdU-positiver Zellen

Die Anzahl neu gebildeter Zellen innerhalb des definierten Areals der Peri-Infarktregion war 14 d nach PT im Vergleich zu 7 d bei den Gesamtgruppen von Bmal1<sup>+/+</sup>- und Bmal1<sup>-/-</sup>-Mäusen signifikant geringer (Abb. 19A). Diese zeitabhängige

Veränderung konnte jedoch bei geschlechtsabhängiger Untersuchung und damit verbundener Reduktion des Stichprobenumfangs nicht bestätigt werden (Abb. 19B).

### 3.3.1.2 Einfluss der Bmal1-Defizienz auf die Anzahl BrdU-positiver Zellen

Um den Einfluss von Bmal1 auf die postischämische Proliferation zu bestimmen, wurde die Zahl BrdU-positiver Zellen 7 d und 14 d nach Induktion der kortikalen Infarkte am Übergang von Infarktkern zur Glianarbe bei Bmal1<sup>+/+</sup>-Mäusen und Bmal1<sup>-/-</sup>-Mäusen verglichen. Zum Zeitpunkt 7 d nach PT war die Anzahl neu gebildeter Zellen in der Gesamtgruppe der Bmal1<sup>-/-</sup>-Mäuse signifikant kleiner als bei den Bmal1<sup>+/+</sup>-Mäusen (Abb. 19A). 14 d nach PT war die Anzahl BrdU-positiver Zellen zwischen der Gesamtgruppe der Bmal1<sup>+/+</sup>- und Bmal1<sup>-/-</sup>-Mäuse jedoch gleich. Bei geschlechtsabhängiger Aufteilung waren ebenfalls keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Untersuchungsgruppen der Bmal1<sup>+/+</sup>- und Bmal1<sup>-/-</sup>-Mäuse nachzuweisen (Abb. 19B).

### 3.3.1.3 Einfluss des Geschlechts auf die Anzahl BrdU-positiver Zellen

Es konnte kein geschlechtsabhängiger Effekt auf die Neubildung von Zellen in der Peri-Infarktregion festgestellt werden (Abb. 19B).

## 3.3.2 Quantifizierung BrdU/GFAP-positiver Zellen

Um eine Phänotypisierung der neu gebildeten Zellen in der Peri-Infarktregion nach PT zu gewährleisten, wurde mittels immunhistochemischer Aufarbeitung, wie in Abschnitt 2.2.7 beschrieben, unter anderem die Kolokalisierung von BrdU und GFAP als astrozytärem Marker analysiert und die Anzahl BrdU/GFAP-positiver Zellen im Übergang von Glianarbe zu Infarktkern bestimmt (exemplarisch, Abb. 20A-C).

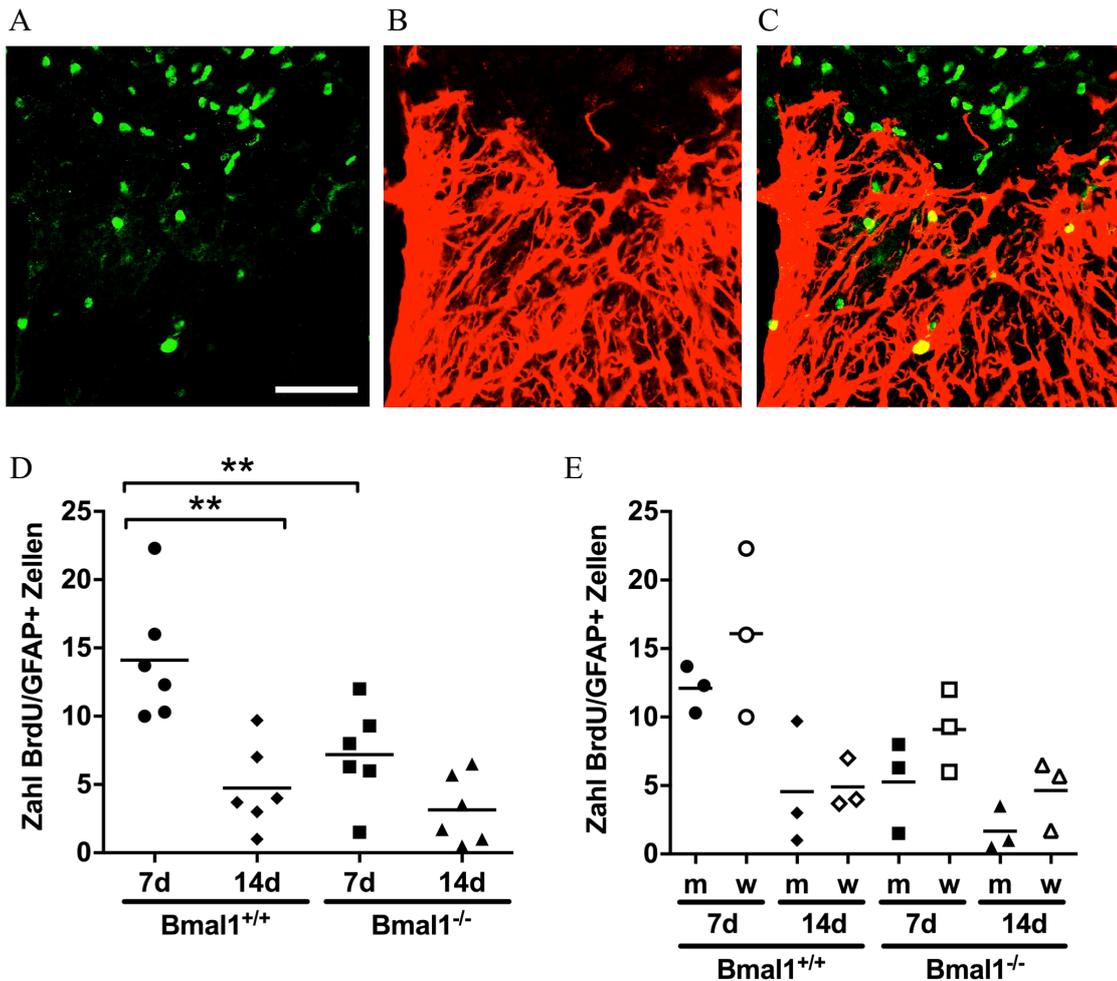


Abb. 20: Darstellung von (A) BrdU-positiven Zellen (40-fache Vergrößerung, Maßstab: 50  $\mu$ m) mit dem Marker für (B) reaktive Astrozyten GFAP und (C) deren Kolokalisierung durch *Overlay*. (D) Analyse der Anzahl BrdU/GFAP-positiver Zellen 7 d und 14 d nach Induktion der PT bei den Gesamtgruppen der  $Bmal1^{+/+}$ - und  $Bmal1^{-/-}$ -Mäuse (n = 6). (E) Geschlechtsabhängige Analyse der Anzahl BrdU/GFAP-positiver Zellen bei männlichen und weiblichen  $Bmal1^{+/+}$ - und  $Bmal1^{-/-}$ -Mäusen 7 d und 14 d nach PT (n = 3). Paarweiser Vergleich mittels Mann-Whitney-U-Test, MW, \*\* p  $\leq$  0,01.

### 3.3.2.1 Einfluss des Zeitfaktors auf die Anzahl BrdU/GFAP-positiver Zellen

14 d nach PT war die Anzahl proliferierender Astrozyten bei der Gesamtgruppe der  $Bmal1^{+/+}$ -Mäuse signifikant geringer als nach 7 d (Abb. 20D). Bei der Gesamtgruppe der  $Bmal1^{-/-}$ -Mäuse und geschlechtsabhängiger Untersuchung wurde diese zeitabhängige Veränderung jedoch nicht festgestellt (Abb. 20E).

### 3.3.2.2 Einfluss der Bmal1-Defizienz auf die Anzahl BrdU/GFAP-positiver Zellen

Um den Einfluss einer Deletion von Bmal1 auf die Proliferation von Astrozyten zu untersuchen, wurde 7 d und 14 d nach Induktion der Photothrombose die Anzahl kolokalisierter BrdU/GFAP-positiver Zellen zwischen Bmal1-defizienten und entsprechenden Wildtypmäusen verglichen. Bei der Gesamtgruppe der Bmal1<sup>-/-</sup>-Mäuse wurde zum Zeitpunkt 7 d nach PT eine signifikant geringere Anzahl neu gebildeter Astrozyten als bei den Bmal1<sup>+/+</sup>-Mäusen festgestellt. 14 d nach PT war die Anzahl BrdU/GFAP-positiver Zellen bei den Gesamtgruppen der Bmal1<sup>-/-</sup>- und Bmal1<sup>+/+</sup>-Mäuse gleich (Abb. 20D). Auch bei geschlechtsabhängiger Analyse wurde kein Unterschied in der Anzahl BrdU/GFAP-positiver Zellen zwischen Bmal1<sup>-/-</sup>- und Bmal1<sup>+/+</sup>-Mäusen detektiert (Abb. 20E).

### 3.3.2.3 Einfluss des Geschlechts auf die Anzahl BrdU/GFAP-positiver Zellen

Es konnte keine geschlechtsabhängige Veränderung in der Anzahl neu gebildeter Astrozyten in der Peri-Infarktregion zwischen männlichen und weiblichen Mäusen beobachtet werden (Abb. 20E).

### *3.3.3 Quantifizierung BrdU/IBA1-positiver Zellen*

Eine genauere Analyse der zellulären Reaktion nach PT erfolgte neben dem Nachweis neu gebildeter Astrozyten zusätzlich durch immunhistochemische Färbung mit dem für Mikroglia spezifischen Marker IBA1 und BrdU (exemplarisch Abb. 21A-C).



### 3.3.3.2 Einfluss der Bmal1-Defizienz auf die Anzahl BrdU/IBA1-positiver Zellen

Der Effekt von Bmal1 auf die Bildung von Mikroglia nach Induktion kortikaler Infarkte wurde zu beiden Zeitpunkten untersucht. Es wurde keine Veränderung in der Anzahl BrdU/IBA1-positiver Zellen zwischen den Gesamtgruppen der Bmal1<sup>+/+</sup>- und Bmal1<sup>-/-</sup>-Mäuse festgestellt (Abb. 21D). Gleichmaßen war auch die Anzahl BrdU/IBA1-positiver Zellen bei geschlechtsabhängiger Analyse zwischen Bmal1<sup>+/+</sup>- und Bmal1<sup>-/-</sup>-Mäusen gleich (Abb. 21E).

### 3.3.3.3 Einfluss des Geschlechts auf die Zahl BrdU/IBA1-positiver Zellen

Es wurde kein geschlechtsabhängiger Einfluss auf die Anzahl neu gebildeter Mikroglia nach photothrombotischem Infarkt zwischen weiblichen und männlichen Bmal1<sup>+/+</sup>- und Bmal1<sup>-/-</sup>-Mäusen nachgewiesen (Abb. 21E).

### 3.3.4 Quantifizierung BrdU/Caspase-3-positiver Zellen

In einem weiteren Schritt wurde im Rahmen der Phänotypisierung neu gebildeter Zellen in der Peri-Infarktregion nach PT die Zahl BrdU/Caspase-3-positiver Zellen bestimmt (exemplarisch, Abb. 22A-C). Qualitativ zeigte sich eine starke apoptotische Aktivität im Bereich des Infarktkerns (Abb. 11C). Im Übergang von Infarktkern zu Glianarbe, dem für die Auswertung definierten Areal, war die Ausprägung apoptotischer Zellen jedoch deutlich reduziert.

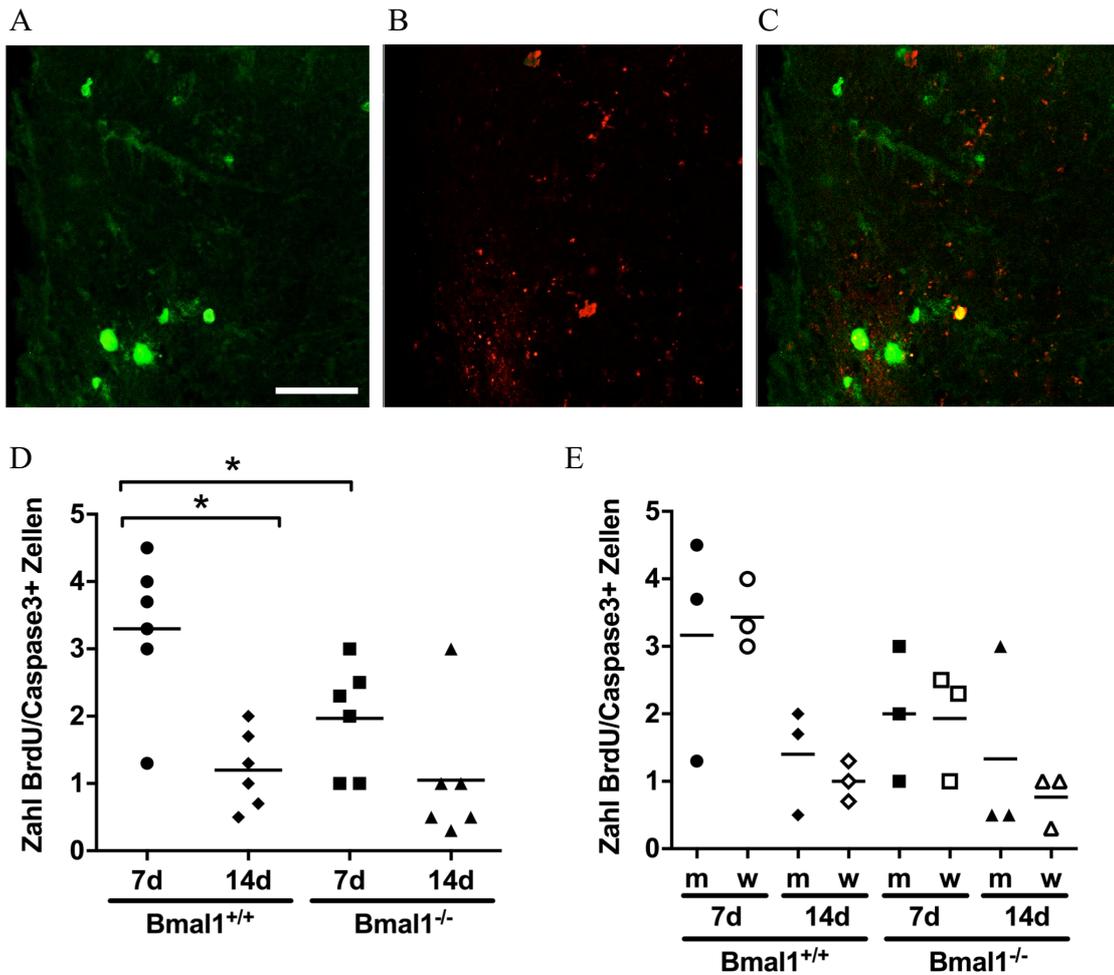


Abb. 22: Darstellung von (A) BrdU-positiven Zellen (40-fache Vergrößerung, Maßstab: 50  $\mu$ m) mit (B) dem für apoptotische Zellen spezifischen Marker Caspase-3 und deren Kolokalisierung durch *Overlay*. (D) Analyse der Anzahl BrdU/Caspase-3-positiver Zellen 7 d und 14 d nach Induktion der PT bei den Gesamtgruppen der Bmal1<sup>+/+</sup>- und Bmal1<sup>-/-</sup>-Mäuse (n = 6). (E) Geschlechtsabhängige Analyse der Anzahl BrdU/Caspase-3-positiver Zellen bei männlichen und weiblichen Bmal1<sup>+/+</sup>- und Bmal1<sup>-/-</sup>-Mäusen 7 d und 14 d nach PT (n = 3). Paarweiser Vergleich mittels Mann-Whitney-U-Test, MW, \* p  $\leq$  0,05.

### 3.3.4.1 Einfluss des Zeitfaktors auf die Anzahl BrdU/Caspase-3-positiver Zellen

Bei der Gesamtgruppe der Bmal1<sup>+/+</sup>-Mäuse wurde 14 d nach PT im Vergleich zu 7 d eine signifikant geringere Zahl BrdU/Caspase-3-positiver Zellen nachgewiesen (Abb. 22D). Bei der Gesamtgruppe der Bmal1<sup>-/-</sup>-Mäuse und geschlechtsabhängiger Untersuchung war die Zahl BrdU/Caspase-3-positiver Zellen 7 d und 14 d nach PT jedoch gleich (Abb. 22E).

#### 3.3.4.2 Einfluss der Bmal1-Defizienz auf die Zahl BrdU/Caspase-3-positiver Zellen

Die Zahl BrdU/Caspase-3-positiver Zellen war bei der Gesamtgruppe der Bmal1<sup>-/-</sup>-Mäuse 7 d nach Induktion der PT im Vergleich zu der Gesamtgruppe der Bmal1<sup>+/+</sup>-Mäuse signifikant verringert (Abb. 22D). Zum Zeitpunkt 14 d nach PT wurde diese Veränderung zwischen den Gesamtgruppen der Bmal1<sup>-/-</sup>- und Bmal1<sup>+/+</sup>-Mäuse jedoch nicht mehr nachgewiesen. Gleichmaßen war auch bei geschlechtsabhängiger Analyse kein Unterschied in der Anzahl BrdU/Caspase-3-positiver Zellen zwischen männlichen und weiblichen Bmal1<sup>+/+</sup>- und Bmal1<sup>-/-</sup>-Mäusen zu erkennen (Abb. 22E).

#### 3.3.4.3 Einfluss des Geschlechts auf die Anzahl BrdU/Caspase-3-positiver Zellen

Wie bei den bereits beschriebenen Zelltypen konnte auch bei der Anzahl BrdU/Caspase-3-positiver Zellen keine geschlechtsabhängige Veränderung zwischen männlichen und weiblichen Bmal1<sup>-/-</sup>- und Bmal1<sup>+/+</sup>-Mäusen festgestellt werden (Abb. 22E).

#### *3.3.5 Qualitative Analyse BrdU/NeuN-positiver Zellen*

Abschließend erfolgte der gleichzeitige Nachweis von Neuronen (NeuN) und BrdU-positiven Zellen (exemplarisch Abb. 23A-C). Bereits bei qualitativer, fluoreszenzmikroskopischer Analyse konnte zu keinem der beiden Zeitpunkte unabhängig von einer Deletion von Bmal1 eine Kolo-kalisierung BrdU- und NeuN-positiver Zellen detektiert werden. Eine statistische Auswertung wurde aufgrund dessen nicht durchgeführt.

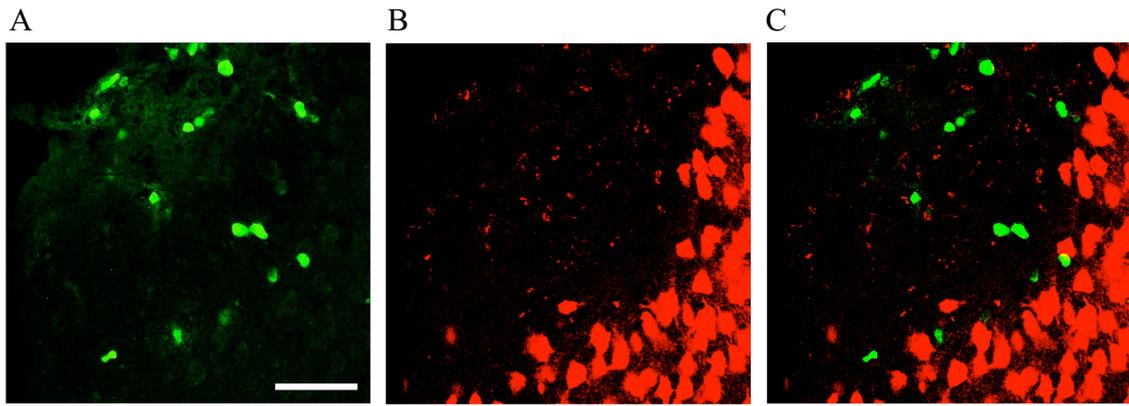


Abb. 23: Darstellung von (A) BrdU-positiven Zellen (40-fache Vergrößerung, Maßstab: 50  $\mu\text{m}$ ) und (B) Neuronen mittels NeuN und (C) deren Kolokalisierung mittels *Overlay*.

Während es nach Induktion der Photothrombose zur Proliferation von Astrozyten, Mikroglia und in geringerem Maße apoptotischer Zellen im definierten Areal kam, konnte keine Proliferation von Neuronen im Bereich der PT nachgewiesen werden.

## 4 Diskussion

Störungen der „inneren Uhr“ können physische und psychische Erkrankungen wie kardiovaskuläre Erkrankungen, Tumorleiden aber auch Gedächtnisstörungen und Depression verursachen (8-14). Es gibt Hinweise darauf, dass eine Chronodisruption, eine Störung der „inneren Uhr“, infolge von veränderten Licht- und Dunkelbedingungen ähnlich der Schichtarbeit einen negativen, jedoch geschlechtsspezifischen Einfluss auf die strukturelle und funktionelle Regeneration nach ischämischem Schlaganfall hat (7, 888135). Das zirkadiane System gewährleistet unter physiologischen Bedingungen hingegen die genaue Synchronisierung zahlreicher physiologischer und kognitiver Prozesse im Organismus (16). Das komplexe Zusammenspiel interagierender positiver und negativer transkriptioneller und translationeller Rückkopplungsschleifen (*feedback loops*) ermöglicht die zeitlich optimierte Abstimmung des molekularen Uhrwerks auf einen Rhythmus von annähernd 24 Stunden (h) (23, 26). *Bmal1* (*brain and muscle arntl-like protein 1*) ist einer der wichtigsten Transkriptionsaktivatoren der molekularen Uhr und direkt an der Rhythmogenese beteiligt (13). Eine konventionelle Deletion des Uhrgens *Bmal1* führt in Mäusen zu einem vollständigen Verlust zirkadianer Rhythmik (28). Darüber hinaus ist der Alterungsprozess *Bmal1*-defizienter [*Bmal1*<sup>-/-</sup>] Mäuse deutlich beschleunigt (35-40, 136, 137) und *Bmal1*<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigen bereits früh verschiedene Anzeichen vorzeitiger Neurodegeneration (31). Die Bedeutung eines intakten molekularen Uhrwerks für die Infarktbildung und strukturelle Regeneration nach ischämischem Infarkt wurde bislang noch nicht untersucht. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe transgener Mäuse der Einfluss einer *Bmal1*-Defizienz auf die Infarktbildung und strukturellen Regeneration nach Induktion kortikaler Infarkte mittels Photothrombose (PT) untersucht. Dafür wurden das Volumen von Infarktkern, Glianarbe und Mikrogliaaktivierung sowie die Proliferation nach PT bei männlichen und weiblichen *Bmal1*<sup>+/+</sup>-Mäusen und *Bmal1*<sup>-/-</sup>-Mäusen analysiert.

### 4.1 Einfluss von *Bmal1* auf die Infarktbildung und strukturelle Regeneration

In Folge einer zerebralen Ischämie kommt es in dem betroffenen Areal zu einer ausgeprägten und kontextspezifischen Immunantwort (91). Um diese Reaktion in ihrer

Komplexität und Bedeutung etwas besser zu verstehen, wurden in der vorliegenden Arbeit neben dem Infarktvolumen auch das Volumen der Glianarbe und Mikrogliaaktivierung nach PT untersucht. Die Experimente wurden an männlichen und weiblichen  $Bmal1^{+/+}$ - und  $Bmal1^{-/-}$ -Mäusen durchgeführt, die als Gesamtgruppen und zusätzlich geschlechtsabhängig in Untergruppen separat analysiert wurden.

#### *4.1.1 Infarktkern und Glianarbe*

Der Einfluss einer Deletion von  $Bmal1$  auf das Volumen des Infarktkerns, hier als Infarktvolumen definiert, und Volumen der Glianarbe wurde durch immunhistochemische Aufarbeitung mittels des astrozytären Markers GFAP 7 d und 14 d nach Induktion der Photothrombose bei männlichen und weiblichen  $Bmal1^{+/+}$ - und  $Bmal1^{-/-}$ -Mäusen ( $n = 4-6$ ) untersucht (siehe Abschnitt 2.2.8, Abb. 12B, C).

Dabei zeigte sich sowohl bei der Gesamtgruppe der  $Bmal1^{+/+}$ - als auch  $Bmal1^{-/-}$ -Mäuse 14 d im Vergleich zu 7 d nach Induktion der PT eine signifikante Reduktion im Volumen des Infarktkerns. Dies steht im Einklang mit Befunden aus der aktuellen Literatur. Eine zeitabhängige Verkleinerung der Läsion während der subakuten Phase nach ischämischem Infarkt wurde sowohl bei Untersuchungen an Mäusen (90) aber auch Ratten nachgewiesen (138, 139). Ähnlich konnte mithilfe von magnetresonanztomographischen Untersuchungen bei Patienten gezeigt werden, dass die Infarktgröße ischämischer Insulte zeitabhängig abnimmt (140-142). Nach Aufteilung der Gesamtgruppen von  $Bmal1^{+/+}$ - und  $Bmal1^{-/-}$ -Mäuse in geschlechtsabhängige Untergruppen wurde eine signifikante zeitabhängige Veränderung im Infarktvolumen jedoch ausschließlich bei den weiblichen  $Bmal1^{-/-}$ -Mäusen bestätigt. Obwohl dieser Trend bei den männlichen und weiblichen Wildtyp-Mäusen qualitativ ebenfalls beobachtet wurde, wurde keine statistische Signifikanz erreicht.

In der vorliegenden Arbeit konnte zum Zeitpunkt 7 d nach Induktion der PT bei allen Mäusen unabhängig von Genotyp oder Geschlecht eine gesteigerte Astroglieose in der Peri-Infarktregion lichtmikroskopisch beobachtet werden, die sich im weiteren Verlauf bis 14 d nach PT in ihrer Struktur verdichtete und organisierte (siehe Abschnitt 3.2.1, Abb. 16A, B). Eine kompakte Glianarbe, wie sie zum Zeitpunkt 14 d nach PT erwartet wurde, zeigte sich jedoch ausschließlich bei den weiblichen und männlichen Wildtyp-Mäusen. Die Ausbildung einer sichtbaren kompakten Glianarbe schien im Gegensatz

dazu bei den Bmal1<sup>-/-</sup>-Mäusen histomorphologisch beeinträchtigt zu sein. Diese dynamische Entwicklung der reaktiven Astroglieose infolge eines fokalen Infarkts mittels PT wurde qualitativ ebenfalls von Haupt et al. bei männlichen Ratten beschrieben (143). Cervós-Navarro und Lafuente konnten bereits 1991 bei Ratten zeigen, dass 4-5 d nach einer traumatischen Hirnschädigung eine beginnende Glianarbe und 20 d nach dem schädigenden Ereignis eine kompakte Struktur nachzuweisen ist (82). Gleichermäßen wiesen Schroeter et al. 6 d nach Induktion eines fokalen kortikalen Infarkts mittels PT bei männlichen Ratten eine lokalisierte astrozytäre Reaktion um das Infarktareal nach, die sich 14 d nach PT zu einem kompakten Band, der sogenannten Glianarbe, organisiert (144). Eine quantitative Untersuchung des Volumens der Glianarbe, wie hier durchgeführt, ist jedoch in diesen Arbeiten nicht erfolgt. Bei den Gesamtgruppen der Bmal1<sup>+/+</sup>- und Bmal1<sup>-/-</sup>-Mäuse wurde 14 d im Vergleich zu 7 d nach Induktion der PT keine signifikante Veränderung im Volumen der Glianarbe detektiert. Folglich scheint eine zeitabhängige Reduktion des Infarktvolumens nicht mit einer zeitabhängigen Veränderung des Volumens der Glianarbe einherzugehen. Dies steht im Einklang mit Untersuchungen von Li et al. an Mäusen (90). Während in der akuten Phase nach Ischämie (bis Tag 4 nach PT) ein Maximum der GFAP-Immunreaktivität nachgewiesen wurde, konnte im Zeitraum 6 d bis 14 d nach PT, der subakuten Phase nach Ischämie, gleichermaßen keine signifikante Veränderung in der GFAP-Immunreaktivität festgestellt werden. Im Gegensatz dazu beschrieben Schroeter et al. qualitativ eine Zunahme des kompakten Bandes aus reaktiven Astrozyten in der Peri-Infarktregion von 6 d zu 14 d nach PT (144). Diese Inkongruenz der in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse und den bisherigen Literaturbefunden kann jedoch am ehesten durch eine uneinheitliche Definition und Untersuchung des Infarktareals und der Peri-Infarktregion begründet werden. Während in der vorliegenden Arbeit die zeitlich bedingte Ausprägung des Infarktkerns und der Glianarbe nicht nur morphologisch sondern auch quantitativ differenziert analysiert wurden, erfolgte unter anderem bei den oben beschriebenen Untersuchungen an Mäusen aber auch Patienten ausschließlich eine Untersuchung der Läsion als Ganzes, jedoch keine Differenzierung zwischen nekrotischem Infarktkern und der umgebenden Glianarbe.

Nach geschlechtsabhängiger Aufteilung der Gesamtgruppen von Bmal1<sup>+/+</sup>- und Bmal1<sup>-/-</sup>-Mäusen wurde ebenfalls ausschließlich bei den weiblichen Bmal1-defizienten Mäusen ein signifikant geringeres Volumen der Glianarbe 14 d gegenüber 7 d nach PT

nachgewiesen. Somit wurde ausschließlich bei den weiblichen Bmal1-defizienten Mäusen eine zeitabhängige Veränderung in der Ausprägung der Glianarbe und des Infarktkerns bestätigt. Dies deutet auf einen geschlechtsabhängigen Einfluss von Bmal1 auf die Infarktbildung und strukturelle Regeneration nach Ischämie bei weiblichen Mäusen.

Ein wesentlicher Aspekt dieser Arbeit war die Untersuchung eines Einflusses von Bmal1 auf das Infarktvolumen und Volumen der Glianarbe nach fokaler Ischämie. Zwischen den Gesamtgruppen von Bmal1<sup>+/+</sup>- und Bmal1<sup>-/-</sup>-Mäusen wurden keine Unterschiede in den Volumina des Infarktkerns oder der Glianarbe detektiert. Bei geschlechtsabhängigen Untersuchungen wurde hingegen ausschließlich 14 d nach PT ein signifikant kleineres Volumen von Infarktkern und Glianarbe bei den weiblichen Bmal1<sup>-/-</sup>-Mäusen im Vergleich zu den entsprechenden Bmal1<sup>+/+</sup>-Mäusen festgestellt. Bei den anderen Untersuchungsgruppen und Zeitpunkten nach Induktion des kortikalen Infarkts zeigte sich das Volumen des Infarktkerns oder der Glianarbe unabhängig von einer Expression von Bmal1. Demgegenüber konnten verschiedene Untersuchungen einen engen Zusammenhang zwischen dem zirkadianen System und dem Auftreten sowie der Ausprägung ischämischer oder traumatischer Infarkte im ZNS nachweisen (145, 146). Beker et al. konnten in diesem Kontext im Gegensatz zu den hier erbrachten Ergebnissen einen Zusammenhang zwischen erhöhten Bmal1-Konzentrationen, verringertem Infarktvolumen, neuronalem Überleben und verbesserter funktioneller Regeneration nach MCAO in Mäusen nachweisen (147). Diese Diskrepanz zwischen den Ergebnissen dieser Arbeit und bereits vorhandenen Literaturbefunden kann einerseits durch die Wahl des Versuchsaufbaus und Infarktmodells erklärt werden. So wiesen Cotrina et al. erhebliche Unterschiede in der astrozytären und mikroglialen Reaktion nach fokaler Ischämie bei Mäusen mittels MCAO im Vergleich zu der zellulären Reaktion nach PT zu frühen postischämischen Zeitpunkten nach (148). Dies könnte neben den bereits erwähnten Unterschieden der beiden Infarktmodelle (siehe Abschnitt 1.5) ein wesentlicher Grund für die Abweichung der hier erhaltenen Ergebnisse zu den aktuellen Literaturbefunden sein. Andererseits erfolgte die Durchführung der Untersuchungen von Beker et al. ausschließlich an adulten männlichen Mäusen. Weibliche Tiere, wie in die vorliegende Arbeit mit eingeschlossen, wurden im Gegensatz dazu nicht untersucht. Aufgrund des hier detektierten geschlechtsspezifischen Einflusses muss ein direkter Vergleich mit den aufgeführten Untersuchungen folglich kritisch betrachtet werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass eine Deletion von Bmal1 alleine trotz veränderter Morphologie der ruhenden Astrozyten die Ausbildung der Glianarbe nach Induktion eines fokalen kortikalen Infarkts mittels PT nicht beeinflusst. Vielmehr scheint die Ausbildung des Infarkts und der Glianarbe ausschließlich bei weiblichen Tieren zum Zeitpunkt 14 d verändert zu sein. Weitere Untersuchungen dieser Arbeit bestätigen einen geschlechtsabhängigen Effekt von Bmal1 auf die Infarktbildung und strukturelle Regeneration nach Photothrombose bei Mäusen (siehe Abschnitt 4.2).

#### *4.1.2 Mikrogliaaktivierung*

Neben dem Prozess der reaktiven Astroglie und Glianarbenbildung stellt die Mikrogliaaktivierung einen wesentlichen Aspekt postischämischer Prozesse im ZNS dar (118). Dennoch ist die genaue Bedeutung der Mikrogliaaktivierung für die funktionelle und strukturelle Regeneration während der subakuten Phase nach Ischämie noch nicht vollständig geklärt. Einerseits konnte mittels transgener Mausmodelle gezeigt werden, dass eine Inhibierung der astrozytären Reaktion infolge eines ischämischen Infarkts mit einer gesteigerten Infiltration von Mikroglia, größerer Infarktausprägung und vermehrten funktionellen Defiziten einhergeht (149, 150). Andererseits weisen Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen auf eine neuroprotektive Rolle von Mikroglia nach Induktion einer fokalen Ischämie mittels MCAO bei Mäusen hin (151-153). Das Ausmaß der Mikrogliaaktivierung als weiterer Parameter der strukturellen Regeneration nach PT wurde mithilfe des mikroglialen Markers IBA1 immunhistochemisch bei männlichen und weiblichen Bmal1<sup>+/+</sup>- und Bmal1<sup>-/-</sup>-Mäusen (n = 4-6) untersucht (siehe Abschnitt 2.2.8, Abb. 12D).

14 d im Vergleich zu 7 d nach Induktion der PT war das Volumen der Mikrogliaaktivierung bei der Gesamtgruppe der Bmal1<sup>+/+</sup>-Mäuse signifikant geringer, was kongruent zu einer zeitabhängigen Abnahme des Infarktvolumens ist. Dies deutet auf eine enge zeitliche und funktionelle Assoziation der Infarktbildung und Mikrogliaaktivierung als Parameter der strukturellen Regeneration hin. Gleichermäßen wurde bei weiblichen Ratten während der subakuten Phase nach Rückenmarksschädigung eine kontinuierliche Reduktion der Mikrogliazahl nachgewiesen (154). Während in der vorliegenden Arbeit jedoch das Volumen der IBA1-Immunreaktivität als Maß für die Mikrogliaaktivierung bestimmt wurde, wurde

im Gegensatz dazu in der Arbeitsgruppe um Tian die Zahl der Mikrogliazellen in verschiedenen Arealen ausgewertet. Auch Nowicka et al. beschrieben eine zeitlich bedingte Abnahme der mikroglialen Reaktion im Infarktgebiet infolge eines fokalen kortikalen Infarkts mittels PT bei männlichen Ratten (138). Dabei wurde jedoch das Ausmaß der Mikrogliaaktivierung zwischen Zeitpunkten der akuten und subakuten Phase, wie 4 d und 7 d nach PT, mit späteren Zeitpunkten der chronischen Phase 28 d und 60 d nach Ischämie ausschließlich qualitativ untersucht. Eine quantitative Analyse der Mikrogliaaktivierung, wie in dieser Arbeit zu den Zeitpunkten 7 d und 14 d erfolgt, wurde jedoch nicht durchgeführt. Bei geschlechtsabhängiger Untersuchung wurde kongruent zu einer zeitabhängigen Abnahme des Infarktvolumens ausschließlich bei den weiblichen *Bmal1*<sup>-/-</sup>-Mäusen 14 d nach PT ein signifikant kleineres Volumen der Mikrogliaaktivierung beobachtet. Diese zeitlich bedingte Veränderung konnte jedoch bei den anderen geschlechtsspezifischen Untergruppen nicht bestätigt werden.

Es gibt zahlreiche Hinweise darauf, dass sowohl die astrozytäre, aber vor allem auch mikrogliale Reaktion zirkadian reguliert sind (34, 155, 156). Untersuchungen von Fonken et al. an Mäusen stellten einen Zusammenhang zwischen einer Störung der zirkadianen Rhythmik und einer verstärkten inflammatorischen Reaktion im ZNS fest (135). Zudem weisen Ergebnisse verschiedener Forschungsgruppen auf einen Zusammenhang zwischen dem Zeitpunkt eines pathologischen Ereignisses, dem Ausmaß der Inflammationsreaktion im ZNS und vor allem einer tageszeitlich-bedingten Empfindlichkeit zerebralen Gewebes auf eine Ischämie hin (102). So zeigten Untersuchungen von Weil et al., dass eine globale zerebrale Ischämie während der Lichtphase bei den betroffenen Mäusen im Vergleich zu den Kontrollgruppen zu einem verstärkten Untergang von Neuronen, einer gesteigerter Mikrogliaaktivierung und Zytokinproduktion führte. Zudem waren die funktionelle Regeneration und Überleben nach globaler zerebraler Ischämie wesentlich durch den Zeitpunkt der Durchführung beeinflusst (157). Diese Arbeiten bestätigen einen Zusammenhang zwischen dem zirkadianen System und der Fähigkeit eines Organismus mit Schädigungen und Verletzungen umzugehen. Zahlreiche Untersuchungen deuten darauf hin, dass diese Immunantwort im Gehirn vor allem durch Mikroglia vermittelt wird (102, 135, 156). Während *Bmal1*-defiziente Tiere bereits unter physiologischen Bedingungen morphologische Anzeichen einer reaktiven Astroglie aufzeigen, scheint die mikrogliale Reaktion nach einer Deletion von *Bmal1* im gesunden adulten Tier trotz erhöhter Konzentration proinflammatorischer Zytokine nur gering gesteigert zu

sein (31). Beim Vergleich der Gesamtgruppen von Bmal1<sup>+/+</sup>- und Bmal1<sup>-/-</sup>-Mäusen wurden keine Unterschiede im Volumen der Mikrogliaaktivierung festgestellt. Bei geschlechtsabhängigen Untersuchungen zeigte sich kongruent zum Einfluss einer Deletion von Bmal1 auf das Infarktvolume und die Glianarbe bei den weiblichen Bmal1<sup>-/-</sup>-Mäusen 14 d nach PT ein signifikant kleineres Volumen der Mikrogliaaktivierung im Vergleich zu den weiblichen Bmal1<sup>+/+</sup>-Mäusen. Im Gegensatz zu den hier erlangten Ergebnissen weisen verschiedene Arbeiten an transgenen Mäusen auf einen antiinflammatorischen Effekt von Bmal1 hin (158, 159). Der antiinflammatorische Effekt von Bmal1, der in diesen Untersuchungen jedoch ausschließlich in peripheren Organen nach Sepsis nachgewiesen wurde, konnte in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Vielmehr scheint eine Bmal1-Defizienz ausschließlich bei weiblichen Mäusen zum späteren Zeitpunkt der subakuten Phase nach Ischämie die Infarktbildung und Mikrogliaaktivierung zu beeinflussen. Dies unterstützt die Vermutung, dass weniger Bmal1 die strukturelle Regeneration nach fokaler Ischämie beeinflusst, sondern vielmehr ein geschlechtsabhängiger Effekt bei den weiblichen Bmal1-defizienten Mäusen die hier erfassten Veränderungen bewirkt haben könnte (siehe Abschnitt 4.2).

Daneben könnte eine weitere Ursache für die Abweichung der vorliegenden Ergebnisse mit der aktuellen Literaturlage die durch das Landesamt für Natur, Umwelt, Verbraucherschutz NRW (LANUV) geforderte post-operative Verabreichung des Analgetikums Carprofen (Rimadyl®) sein. Dabei handelt es sich um einen selektiven Hemmstoff der Cyclooxygenase-2 (COX-2) und besitzt neben der hier erwünschten analgetischen Wirkung eine ausgeprägte antiinflammatorische Wirkung (160). Die Arbeitsgruppe um Hish konnte nachweisen, dass die Applikation von Carprofen (5 mg/kg KG) im Rahmen einer venösen Thrombose mit der Ausbildung eines kleineren Thrombus 48 h postinterventionell einhergeht (161). Ob auch die Ausbildung des thrombotischen Materials als Ursache der fokalen Ischämie bei dem Modell der Photothrombose beeinflusst ist, ist derzeit noch nicht bekannt, kann jedoch als limitierender Faktor in dieser Untersuchung angenommen werden. Zudem wurde gezeigt, dass die postoperative Therapie mit Carprofen im Vergleich zu nicht behandelten Tieren zu einer geringeren Konzentration des proinflammatorischen Zytokins Interleukin-6 (IL-6) sowie einer geringeren Zahl von Neutrophilen und Makrophagen im Bereich des Thrombus führte (161). Gleichermäßen wiesen Thau-Zuchman et al. einen Zusammenhang zwischen der postoperative Verabreichung von

Carprofen (5 mg/kg KG) infolge einer traumatischen Hirnschädigung und einem verringerten Anstieg der Mikrogliazahl im geschädigten Areal nach (160). Entsprechend dieser Untersuchungen ist von einem modulierenden Einfluss der Substanz auf die Mikrogliaaktivierung nach fokaler Ischämie auszugehen. Da die postoperative Schmerztherapie mittels Carprofen hier jedoch bei allen Tieren gleichermaßen durchgeführt wurde, sind Rückschlüsse auf den Einfluss einer Deletion von *Bmal1* auf die mikrogliale Reaktion infolge einer PT trotzdem möglich.

#### 4.1.3 *BrdU-positive Zellen*

Infolge eines ischämischen Ereignisses kommt es zu einer ausgeprägten Proliferation unter anderem von Astrozyten und Mikroglia im betroffenen Areal. Diese neu gebildeten Zellen sind wesentlich an den strukturellen Veränderungen der Peri-Infarktregion während der subakuten Phase beteiligt (81). Bei männlichen und weiblichen *Bmal1*<sup>+/+</sup>- und *Bmal1*<sup>-/-</sup>-Mäusen (n = 3) wurde die Neubildung von Zellen in der Peri-Infarktregion mittels intraperitonealer Applikation des Proliferationsmarkers BrdU (siehe Abschnitt 2.2.2, Abb. 7) und anschließender Immunhistochemie untersucht.

Die Anzahl BrdU-positiver Zellen im untersuchten Areal war 14 d gegenüber 7 d nach Induktion der PT in der Gesamtgruppe der *Bmal1*<sup>+/+</sup>-Mäuse signifikant vermindert. Auch bei der Gesamtgruppe der *Bmal1*<sup>-/-</sup>-Mäuse wurde eine entsprechende zeitabhängige Abnahme der Proliferation im Infarktgebiet bestätigt. Eine Abnahme der Proliferation in der Peri-Infarktregion während der subakuten Phase war zu erwarten und wurde gleichermaßen von Li et al. bei männlichen Mäusen nachgewiesen (90).

Bei der Untersuchung des Einflusses einer *Bmal1*-Defizienz auf die Proliferation infolge einer PT war die Anzahl BrdU-positiver Zellen 7 d nach PT bei der Gesamtgruppe der *Bmal1*<sup>-/-</sup>-Mäusen signifikant geringer als bei den *Bmal1*<sup>+/+</sup>-Mäusen. Dies steht im Einklang mit früheren Beobachtungen unserer Arbeitsgruppe bezüglich einer verminderten Proliferation von neuronalen Stamm-/Progenitorzellen bei männlichen *Bmal1*-defizienten Mäusen (43). Zudem weisen auch Untersuchungen von Kondratov et al. auf eine verminderte Proliferationsfähigkeit bei *Bmal1*<sup>-/-</sup>-Mäusen hin. Sie konnten mit zunehmendem Alter ein reduziertes Haarwachstum als Zeichen einer verringerten Proliferationsfähigkeit bei *Bmal1*-defizienten Mäusen im Vergleich zu

entsprechenden Wildtyp-Tieren nachweisen (38). Vergleichbare Ergebnisse bezogen auf das Haarwachstum nach dem operativen Eingriff wurde auch bei den hier untersuchten Mäusen beobachtet (Daten nicht gezeigt, unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe).

Nach Aufteilung der Gesamtgruppen in geschlechtsspezifische Untergruppen wurden bei der Untersuchung der Anzahl BrdU-positiver Zellen hingegen keine zeitabhängigen Unterschiede oder Unterschiede zwischen  $Bmal1^{-/-}$ - und  $Bmal1^{+/+}$ -Mäusen festgestellt. Dies kann am ehesten auf eine zu große Varianz der Gruppengröße ( $n = 3$ ) zurückgeführt werden. Weiterhin könnte auch die postoperative Verabreichung von Carprofen die Proliferation nach PT in den einzelnen Untergruppen beeinflusst haben. Neben der bereits erwähnten analgetischen und antiinflammatorischen Wirkung des selektiven COX-2-Hemmers, konnten Thau-Zuchman et al. bei männlichen Mäusen einen neuroprotektiven Effekt von Carprofen nachweisen (160). Untersuchungen dieser Arbeitsgruppe zeigten, dass die Verabreichung von Carprofen über einen Zeitraum von 7 d nach einer traumatischen Hirnschädigung zu einem signifikanten Anstieg der BrdU-positiven Zellen im Bereich der Läsion führte (160). Diese Ergebnisse deuten auf einen positiven Effekt des COX-2-Hemmers auf die Teilungsfähigkeit der Zellen in Folge eines schädigenden Einflusses hin. Während in dieser Studie jedoch der Effekt von Carprofen lediglich bei männlichen Mäusen untersucht wurde, wurden in die vorliegende Arbeit beide Geschlechter eingeschlossen. Der Einfluss einer antiinflammatorischen und neuroprotektiven Wirkung von Carprofen bei weiblichen Tieren ist bis *dato* jedoch noch nicht beschrieben. Folglich müssen die in dieser Untersuchung vorgelegten Ergebnisse aufgrund der Verabreichung von Carprofen bezüglich der Proliferation von Zellen im Infarktreal im Vergleich mit der aktuellen Datenlage kritisch betrachtet werden. Um daraus resultierende Störfaktoren auf die hier untersuchten zellulären Reaktionen nach einem ischämischen Infarkt auszuschließen, sollten weiterführende Versuche ohne Verabreichung der antiinflammatorischen Substanz Carprofen durchgeführt und die Effekte kritisch betrachtet werden.

#### 4.1.4 Proliferation von Astrozyten und Mikroglia

Um den Einfluss einer Deletion von  $Bmal1$  auf die neu gebildeten Zellen in der Peri-Infarktregion genauer zu untersuchen, wurden diese in einem weiteren Schritt

durch Koloalisierung mit astrozytären (GFAP) oder mikroglialen (IBA1) Markern näher charakterisiert (siehe Abschnitt 2.2.7, Abb. 11A, B).

14 d nach PT im Vergleich zu 7 d wurde ausschließlich bei der Gesamtgruppe der  $Bmal1^{+/+}$ -Mäuse eine signifikant kleinere Anzahl der BrdU/GFAP-positiven und somit der neu gebildeten Astrozyten festgestellt. Gleichmaßen beschrieben auch Li et al. eine zeitabhängige Abnahme der Proliferation von Astrozyten während der subakuten Phase nach PT (90). Bei der Analyse der BrdU/IBA1-positiven Zellen zeigte sich ebenfalls 14 d gegenüber 7 d nach PT eine signifikant geringere Anzahl proliferierender Mikrogliazellen bei den Gesamtgruppen der  $Bmal1^{+/+}$ - und auch  $Bmal1^{-/-}$ -Mäuse, was ebenfalls im Einklang mit Untersuchungen von Li et al. steht. Dabei wurde jedoch der stärkste Rückgang der Mikroglia proliferation bereits während der akuten postischämischen Phase beobachtet (90). In der Arbeit von Tian et al. konnte gezeigt werden, dass die Hemmung der Proliferation von Mikroglia die Ausprägung der Astroglie und Bildung einer Gliazarbe nach Rückenmarksverletzung bei Ratten stark beeinträchtigt (154). Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die Proliferation von Mikroglia auch nach ischämischen Infarkt wichtig für die Aktivierung von Astrozyten und eng mit dieser verbunden ist. Bei geschlechtsabhängiger Analyse konnten diese zeitabhängigen Veränderungen am ehesten aufgrund eines zu geringen Stichprobenumfangs jedoch nicht bestätigt werden.

Die Anzahl BrdU/GFAP-positiver Zellen in Abhängigkeit von einer Deletion von  $Bmal1$  war, wie auch die Anzahl BrdU-positiver Zellen, ausschließlich 7 d nach PT bei der Gesamtgruppe der  $Bmal1^{-/-}$ -Mäuse signifikant geringer als bei der Gesamtgruppe der  $Bmal1^{+/+}$ -Mäuse. Die Anzahl BrdU/IBA1-positiver Zellen zwischen den Gesamtgruppen und geschlechtsspezifischen Untergruppen der  $Bmal1^{-/-}$ - und  $Bmal1^{+/+}$ -Mäuse war jedoch gleich. Dies zeigt, dass die Proliferation von Astrozyten während der frühen subakuten Phase nach fokaler Ischämie bei den  $Bmal1$ -defizienten Mäusen beeinträchtigt zu sein scheint. Andererseits scheint eine Deletion von  $Bmal1$  hingegen keinen Einfluss auf die Proliferation von Mikroglia nach PT zu haben. In Zusammenschau deutet dies darauf hin, dass weniger die Proliferation von Astrozyten oder Mikroglia, sondern vielmehr die Aktivierung bereits vorhandener ortsständiger Zellen die hier erhaltenen Ergebnisse bezüglich der Infarktbildung und strukturellen Regeneration bedingen.

#### 4.1.5 Proliferation von Caspase-3-positiven Zellen und Neuronen

In einem letzten Schritt wurden durch Kollokalisierung von BrdU mit Caspase-3, als Marker apoptotischer Zellen, und NeuN, als Marker von Neuronen, die neu gebildeten Zellen weiter untersucht und charakterisiert (siehe Abschnitt 2.2.7 Abb. 11C, D).

Untersuchungen verschiedener Arbeitsgruppen weisen auf eine zentrale Rolle Caspase-abhängiger Signalwege in der Initiierung von apoptotischem Zelltod nach fokaler Ischämie hin (162-165). Der Nachweis von Caspase-3, einer intrazellulären Protease, die zentral an der Spaltung von DNA beteiligt ist, ist ein verbreiteter Marker zur immunhistochemischen Darstellung von apoptotischen Zellen (162). Infolge eines ischämischen Infarkts mittels MCAO kommt es zu einer räumlichen Umverteilung apoptotischer, Caspase-3-positiver Zellen. Während innerhalb der ersten 3 d nach MCAO apoptotische Zellen vorwiegend in der Penumbra und weniger im Infarktkern nachzuweisen sind, wurden 7 d nach MCAO Caspase-3-positive Zellen durch Barreto et al. hauptsächlich im Infarktkern nachgewiesen (166). Gleichmaßen wurde während der subakuten Phase nach PT in der vorliegenden Arbeit qualitativ eine starke apoptotische Aktivität im Bereich des Infarktkerns beobachtet. Im quantitativ ausgewerteten Areal der Peri-Infarktregion, am Übergang von Infarktkern zu Glianarbe, war die Ausprägung Caspase-3-positiver Zellen jedoch deutlich geringer. Dennoch wurde 14 d nach PT bei der Gesamtgruppe der *Bmal1*<sup>+/+</sup>-Mäuse ebenfalls eine signifikant geringere Anzahl BrdU/Caspase-3-positiver Zellen festgestellt. Es wurde jedoch keine Veränderung in der Anzahl BrdU/Caspase-3-positiver Zellen zwischen *Bmal1*<sup>-/-</sup>- und *Bmal1*<sup>+/+</sup>-Mäusen beobachtet.

Während es nach Induktion eines kortikalen Infarkts zur Proliferation reaktiver Astrozyten, Mikroglia und in geringerem Ausmaß apoptotischer Zellen kam, konnten in der vorliegenden Arbeit keine BrdU/NeuN-positiven Zellen beobachtet werden. Dies war zu erwarten und wird durch vorausgegangene Untersuchungen an Mäusen bestätigt (90, 167). Auch Haupt et al. konnten keine BrdU/NeuN-positiven Zellen infolge eines photothrombotischen Infarkts bei Ratten nachweisen (143). Es gibt vielmehr Hinweise darauf, dass Ependymzellen infolge eines ischämischen Infarkts aktiviert werden und Neuroblasten sowie Gliazellen bilden. Die neu gebildeten Neuroblasten besitzen die Fähigkeit im Verlauf mehrerer Monate aus der subventrikulären Zone in die ischämischen Areale zu migrieren und sich dort zu funktionellen Neuronen zu differenzieren (168, 169).

## 4.2 Einfluss des Geschlechts auf die Infarktbildung und strukturelle Regeneration

Neben dem Einfluss des Zeitfaktors und einer Bmal1-Defizienz, wurde weiterhin der Einfluss des Geschlechts auf die untersuchten Parameter der Infarktbildung und strukturellen Regeneration in die vorliegende Arbeit miteingeschlossen. Aktuelle Studien deuten auf einen Zusammenhang zwischen dem Ausmaß ischämischer Infarkte, dem Geschlecht und einer Störung des zirkadianen Systems hin (7).

Bei den männlichen und weiblichen Bmal1<sup>+/+</sup>-Mäusen war die Variabilität im Infarktvolumen 7 d nach PT sehr hoch, während 14 d nach PT bei der Gesamtgruppe der männlichen Wildtyp-Mäuse nur noch sehr kleine Infarktkerne detektiert wurden. Folglich scheinen 7 d nach ischämischer Läsion bei den männlichen und weiblichen Bmal1<sup>+/+</sup>-Mäusen am ehesten individuelle Unterschiede die Infarktbildung zu beeinflussen, welche 14 d nach PT jedoch nicht mehr zum Tragen kommen. Zudem war der Infarktkern 14 d nach PT bei den weiblichen Bmal1<sup>+/+</sup>-Mäusen signifikant größer als bei den entsprechenden männlichen Bmal1<sup>+/+</sup>-Mäusen. Demgegenüber wiesen Manwani et al. zum Zeitpunkt 3 d nach MCAO ein signifikant kleineres Infarktvolumen bei weiblichen Mäusen im Vergleich zu männlichen Mäusen nach (170). Zusammen mit den hier erlangten Ergebnissen deutet dies darauf hin, dass bei den Wildtyp-Tieren das weibliche Geschlecht einerseits während der akuten postischämischen Phase einen positiven Einfluss auf die Infarktentwicklung zu haben scheint, andererseits während der subakuten Phase nach ischämischem Infarkt mit einer verzögerten strukturellen Regeneration einhergeht.

Bei den männlichen Bmal1<sup>-/-</sup>-Mäusen war das Volumen des Infarktkerns bereits 7 d nach PT sehr klein und zeigt, dass bei diesen Tieren die strukturelle Regeneration mit Reduktion des Infarktvolumens bereits innerhalb von 7 d fortgeschritten ist. Zudem wurde kein Unterschied im Infarktvolumen zwischen männlichen Bmal1<sup>+/+</sup>- und Bmal1<sup>-/-</sup>-Mäusen festgestellt, sodass eine Deletion von Bmal1 zumindest bei den männlichen Mäusen keinen Einfluss auf die Infarktbildung und strukturelle Regeneration während der subakuten Phase nach ischämischem Infarkt zu haben scheint. Im Gegensatz dazu wurde bei den weiblichen Bmal1<sup>-/-</sup>-Mäusen 7 d nach PT ein signifikant größeres Infarktvolumen als bei den entsprechenden männlichen Mäusen detektiert. Dies lässt darauf schließen, dass auch bei Bmal1-defizienten Mäusen das weibliche Geschlecht mit einer verzögerten strukturellen Regeneration in der frühen

subakuten Phase einhergeht. Erstaunlicherweise war der Infarktkern 14 d nach PT bei allen weiblichen  $Bmal1^{-/-}$ -Mäusen so klein wie bei den entsprechenden männlichen Tieren und signifikant kleiner als bei den weiblichen  $Bmal1^{+/+}$ -Mäusen. Untersuchungen von Okada et al. konnten mit Hilfe von genveränderten Tieren zeigen, dass ein reduziertes Infarktareal mit einem verbesserten funktionellen *Outcome* einherging (150). Folglich kann in Zusammenschau mit den hier erhaltenen Ergebnissen daraus geschlossen werden, dass eine Störung der zirkadianen Rhythmik durch Deletion von  $Bmal1$  ausschließlich in weiblichen Mäusen einen protektiven Effekt auf die Infarktbildung und strukturelle Regeneration während der späten subakuten Phase nach Ischämie hat.

Ein geschlechtsabhängiger Effekt auf die Ausbildung der Glianarbe wurde nur zum Zeitpunkt 7 d nach PT nachgewiesen. Dabei war die Glianarbe bei den weiblichen  $Bmal1^{+/+}$ - und  $Bmal1^{-/-}$ -Mäusen signifikant größer als bei den entsprechenden männlichen Mäusen. Es wurde vielfach gezeigt, dass eine Unterdrückung der reaktiven Astroglie und Glianarbenbildung mit einer größeren Läsion und ausgeprägteren Gewebeverlusten einhergeht (75). Zudem konnte mittels verschiedener transgener Mausmodelle nachgewiesen werden, dass eine Störung in der Ausbildung der Glianarbe zu einer Zunahme der Läsion (149, 171), einem vermehrten Untergang von Neuronen im betroffenen Areal (172, 173), gesteigerter Demyelinisierung (150, 173) und funktionellen Ausfällen (149, 173-175) nach fokalen traumatischen oder ischämischen Ereignissen führt. Entsprechend kann davon ausgegangen werden, dass eine größere Glianarbe bei den weiblichen Mäusen während der subakuten Phase nach Ischämie protektiv wirkt und damit einen positiven Effekt auf die strukturelle Regeneration hat. Auffälligerweise war jedoch das Volumen der Glianarbe kongruent zum Infarktvolumen und der Mikrogliaaktivierung (s. unten) zum Zeitpunkt 14 d nach PT bei den weiblichen  $Bmal1^{-/-}$ -Mäusen sehr klein. Während diese zeitabhängige Reduktion von 7 d zu 14 d nach PT widersprüchlich erscheinen mag, bestätigt dies jedoch gleichermaßen den protektiven Effekt einer  $Bmal1$ -Deletion bei weiblichen Mäusen nach fokaler Ischämie. Untersuchungen zeigen, dass die Glianarbe im zeitlichen Verlauf das axonale Wachstum, die neuronale und funktionelle Regeneration verhindert (81, 86, 176). Folglich kann auch zum Zeitpunkt 14 d nach PT aufgrund einer signifikant kleineren Glianarbe bei weiblichen  $Bmal1^{-/-}$ -Mäusen gegenüber den weiblichen  $Bmal1^{+/+}$ -Mäusen von einem positiven Effekt auf die strukturelle Regeneration ausgegangen werden. Entsprechend scheint weniger eine Deletion von  $Bmal1$  alleine, als vielmehr die

Kombination einer Bmal1-Defizienz mit dem weiblichen Geschlecht die Ausbildung der Glianarbe nach fokaler Ischämie positiv zu beeinflussen, was bis *dato* in der Literatur noch nicht beschrieben wurde.

Kongruent zum Volumen des Infarktkerns war das Volumen der Mikrogliaaktivierung bei den weiblichen Bmal1<sup>+/+</sup>-Mäusen tendenziell 7 d nach PT, jedoch 14 d nach PT statistisch signifikant größer als bei den männlichen Bmal1<sup>+/+</sup>-Mäusen. Gleichmaßen war auch das Volumen der Mikrogliaaktivierung 7 d nach PT, wie auch das Infarktvolumen, bei den weiblichen Bmal1<sup>-/-</sup>-Mäusen signifikant größer als bei den männlichen Bmal1<sup>-/-</sup>-Mäusen. Entgegen der Erwartung wurde dieser Trend zum Zeitpunkt 14 d nach PT zwischen männlichen und weiblichen Bmal1<sup>-/-</sup>-Mäusen nicht bestätigt. Das Volumen der Mikrogliaaktivierung war 14 d nach PT bei den weiblichen Bmal1<sup>-/-</sup>-Mäusen vielmehr signifikant kleiner als 7 d nach PT und auch signifikant kleiner als bei den weiblichen Bmal1<sup>+/+</sup>-Mäusen. Aktuelle Untersuchungen bestätigen einen Einfluss von Geschlecht auf die Zahl und Morphologie von Mikroglia (177). Während einer frühen Mikrogliaaktivierung neuroprotektive Funktionen zugesprochen werden, scheint eine übermäßige oder lang anhaltende Mikrogliaaktivierung nach ischämischer Schädigung jedoch negative Effekte auf die strukturelle und funktionelle Regeneration zu haben (178). Folglich scheint auch in Bezug auf diesen Parameter das weibliche Geschlecht, vor allem bei den Bmal1-defizienten Mäusen, durch eine initial starke Mikrogliaaktivierung und im Verlauf der subakuten Phase signifikant reduzierte Mikrogliaaktivierung die Infarktbildung und strukturelle Regeneration positiv zu beeinflussen.

Ein geschlechtsabhängiger Einfluss auf die postischämische Proliferation in der Peri-Infarktregion konnte hingegen nicht nachgewiesen werden, sodass die hier erfassten Veränderungen weniger auf neu gebildete Zellen, sondern vielmehr auf die Aktivierung und Migration bereits vorhandener Zellen zurückzuführen sind.

Die Gesamtheit der in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse deutet auf einen geschlechtsabhängigen Einfluss einer Bmal1-Defizienz auf die Infarktbildung und strukturelle Regeneration nach Induktion eines fokalen kortikalen Infarkts bei weiblichen Mäusen hin und könnte am ehesten durch Bmal1-abhängige Veränderungen des Östrogenlevels in den weiblichen Bmal1-defizienten Tieren erklärt werden. Die neuroprotektive Wirkung von Östrogen wurde mithilfe von experimentellen Schlaganfall-Modellen an Tieren in den letzten Jahren intensiv untersucht (179-182). Dabei zeigten sich weibliche Mäuse resistenter gegenüber ischämischer Schädigung als

männliche Mäuse (170, 183). Dieser protektive Effekt von Östrogen konnte einerseits durch Ovariectomie rückgängig, andererseits durch Östrogen-Substitution wiederhergestellt werden (170, 184). Dubal und Wise zeigten, dass bereits geringe Dosen substituierten Östrogens erhebliche protektive Einflüsse auf das ZNS weiblicher Ratten nach ischämischen Infarkten mittels MCAO haben und das Ausmaß der ischämischen Schädigung um fast 50% reduziert (185). Dieser Effekt von Östrogen konnte gleichermaßen auch bei männlichen Ratten nach MCAO bestätigt werden (186). Zudem gibt es Hinweise darauf, dass Östrogen mit Signalwegen, die die antiinflammatorische Immunantwort steuern, interagiert und eine antiinflammatorische Wirkung nach Ischämie auf das Gehirn ausübt (187-189). Li et al. konnten darüber hinaus nachweisen, dass auch funktionelle Defizite nach fokaler Ischämie mittels MCAO unter Substitution von Östrogen bei Mäusen wesentlich geringer und rascher rückläufig waren (190). Die genauen Mechanismen, worüber das weibliche Sexualhormon Östrogen eine neuroprotektive Wirkung ausübt, sind jedoch noch nicht vollständig geklärt. Ein wesentlicher Aspekt über den die protektive Wirkung von Östrogen vermittelt wird, scheint der Östrogenrezeptor- $\alpha$  (ER $\alpha$ ) zu sein, da Östrogen in ER $\alpha$ -Knockout-Mäusen nach permanenter Ischämie keine neuroprotektive Wirkung ausübt (191). Zudem zeigten Untersuchungen von Blurton-Jones und Tuszynski an Primaten, dass es infolge einer traumatischen Hirnschädigung zu einer Hochregulation von ER $\alpha$  in Astrozyten kommt und könnte damit einer der möglichen Mechanismen sein, über den Östrogen neuroprotektiv nach traumatischer aber auch, wie in der vorliegenden Arbeit, ischämischer Schädigung wirkt (192). Daneben deuten *in vitro* Untersuchungen von Liu et al. darauf hin, dass neben der astrozytären Funktion auch die Mikrogliaaktivierung durch Östrogen über Aktivierung von ER $\alpha$  und ER $\beta$  gehemmt wird (193). Versuche von Perez-Alvarez et al. an männlichen Ratten nach permanenter MCAO bestätigen diese Ergebnisse. Eine postoperative Therapie mit Östrogen alleine, aber auch in Kombination mit Progesteron geht mit einer signifikant verringerten Ausprägung der reaktiven Astroglie und Mikrogliaaktivierung im Infarktareal einher (194, 195). Weiterführende Untersuchungen dieser Arbeitsgruppe bestätigten höhere basale Östrogenkonzentrationen bei weiblichen Bmal1-defizienten Mäusen (196). Folglich scheint eine Bmal1-Deletion als Ursache der Chronodisruption einen positiven Einfluss auf die Östradiolproduktion zu haben und wirkt dadurch indirekt neuroprotektiv bei weiblichen Bmal1<sup>-/-</sup>-Mäusen. Der Zusammenhang zwischen

zirkadianer Rhythmik, Geschlecht und Reproduktion wird durch verschiedene Untersuchungen bestätigt (36, 197). Auch beim Menschen scheint eine gestörte zirkadiane Rhythmik einen Einfluss auf die weibliche Sexualhormonproduktion zu haben. So wurde bei Krankenschwestern in Schichtarbeit eine negative Korrelation zwischen der Expression von Uhrengenen, vor allem *Bmal1*, *Clock*, *Cry1* und *Cry2* sowie der Konzentration von  $17\beta$ -Östradiol, einer aktiven Form von Östrogen, festgestellt (10). Zudem weisen *Bmal1*<sup>-/-</sup>-Mäuse im Vergleich zu *Bmal1*<sup>+/+</sup>-Mäusen kleinere Eierstöcke und meist einen sehr unregelmäßigen Zyklus auf. Eine homozygote Deletion von *Bmal1* bei weiblichen Mäusen geht außerdem mit der Unfähigkeit einher, eine Schwangerschaft auszutragen (136). Während bei weiblichen *Bmal1*<sup>-/-</sup>-Mäusen signifikant geringere Progesteronlevel nachgewiesen wurden (37), ist bis *dato* eine Bestimmung der Östrogenkonzentrationen, wie in weiterführenden Untersuchungen dieser Arbeitsgruppe erfolgt (196), in der Literatur noch nicht beschrieben. Interessanterweise wiesen Shimba et al. erhöhte Cholesterinkonzentrationen bei *Bmal1*<sup>-/-</sup>-Mäusen im Vergleich zu Kontrollmäusen infolge einer hochkalorischen Nahrungszufuhr nach (35). Die Biosynthese von Östrogen erfolgt über zahlreiche Schritte ausgehend von Cholesterin (182, 198), sodass ein veränderter Cholesterinmetabolismus ursächlich für die erhöhten Östradiolwerte bei *Bmal1*<sup>-/-</sup>-Mäusen sein könnte und Grundlage nachfolgender Untersuchungen darstellen sollte.

### 4.3 Schlussfolgerungen

In der vorliegenden Arbeit wurde entgegen der Erwartung kein direkter Einfluss von *Bmal1* auf das Infarktverhalten, die Gliazellenbildung, Mikrogliaaktivierung oder Proliferation als Parameter der Infarktbildung und strukturellen Regeneration nach PT beobachtet. Vielmehr verdeutlichen die Ergebnisse dieser Arbeit geschlechtsabhängige Unterschiede und einen geschlechtsspezifischen Einfluss einer *Bmal1*-Defizienz auf das Volumen des Infarktkerns, der Gliazellenbildung und Mikrogliaaktivierung während der subakuten Phase nach Ischämie bei weiblichen Mäusen. Da jedoch kein geschlechtsabhängiger Effekt auf die Proliferation nach PT festgestellt wurde, sind die hier beobachteten Veränderungen am ehesten durch eine unterschiedliche geschlechtsabhängige Aktivierung oder Migration bereits vorhandener Zellen bedingt. In Zusammenschau mit der aktuellen Datenlage sowie weiterführenden Untersuchungen

dieser Arbeitsgruppe, die erhöhte Östrogenkonzentrationen bei weiblichen Bmal1-defizienten Mäusen nachwies, scheint eine Deletion von Bmal1 bei weiblichen Mäusen einen positiven Einfluss auf die Infarktbildung und strukturelle Regeneration nach PT zu haben (196). Aktuelle Untersuchungen zeigen jedoch, dass neben Östrogen auch weitere hormonelle und genetische Faktoren einen Einfluss auf das Zusammenspiel von Geschlecht und zirkadianer Rhythmik haben (199, 200), die die hier erhaltenen Ergebnisse zudem beeinflusst haben könnten. Die Relevanz hormoneller, vorwiegend östrogenbedingter, aber auch weiterer geschlechtsspezifischer Einflüsse auf die Infarktbildung und strukturelle Regeneration nach PT wurde in dieser Arbeit nicht untersucht, sollte jedoch zur Klärung der hier erlangten Ergebnisse in weiterführenden Studien separat untersucht werden.

Die vollständige Bedeutung der in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse ist jedoch noch nicht endgültig geklärt. Untersuchungen von Okada et al. konnten mit Hilfe von genveränderten Tieren zeigen, dass ein reduziertes Infarktareal mit einer verbesserten funktionellen Regeneration einherging (150). Während die Ergebnisse dieser Arbeit auf einen protektiven Effekt einer Bmal1-Defizienz bei den weiblichen Mäusen hindeuten, sollten zur endgültigen Klärung der hier erfassten Veränderungen funktionelle Versuche wie z.B. *Cylinder/rearing-task* oder der *Grid-walking-Test* in Zukunft durchgeführt werden (129, 201, 202). Mithilfe dieser Tests könnten anhand der motorischen Fähigkeiten nach Induktion einer PT bei den Bmal1-defizienten Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen in Kombination mit den hier präsentierten Ergebnissen weitere Rückschlüsse über die positive oder negative Bedeutung der Glianarbe und der postischämischen zellulären Reaktionen gezogen werden.

Tiermodelle zur Untersuchung von ischämischen Ereignissen werden jedoch wahrscheinlich nie die volle Komplexität des menschlichen Erkrankungsbildes abbilden und vor allem nicht die große Heterogenität der Schlaganfallpopulation erfassen können. Sowohl das Alter, der Läsionsort als auch das Ausmaß von ischämischen Schlaganfällen sind beim Menschen interindividuell stark variabel und nicht vorhersehbar. Entsprechend sind trotz der dazugewonnenen Erkenntnisse dieser Arbeit, auch die hier aufgeführten Ergebnisse aufgrund dieser Aspekte limitiert und werden eine Eins-zu-Eins-Übertragung auf den Menschen nicht zulassen.

## 5 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Balami JS, Chen RL, Grunwald IQ, Buchan AM. Neurological complications of acute ischaemic stroke. *Lancet Neurol.* 2011;10(4):357-71.
2. Khaw KT. Epidemiology of stroke. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 1996;61(4):333-8.
3. Petrea RE, Beiser AS, Seshadri S, Kelly-Hayes M, Kase CS, Wolf PA. Gender differences in stroke incidence and poststroke disability in the Framingham heart study. *Stroke.* 2009;40(4):1032-7.
4. Weimar C, Roth MP, Zillessen G, Glahn J, Wimmer ML, Busse O, et al. Complications following acute ischemic stroke. *Eur Neurol.* 2002;48(3):133-40.
5. Barres BA. The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease. *Neuron.* 2008;60(3):430-40.
6. Allaman I, Belanger M, Magistretti PJ. Astrocyte-neuron metabolic relationships: for better and for worse. *Trends Neurosci.* 2011;34(2):76-87.
7. Earnest DJ, Neuendorff N, Coffman J, Selvamani A, Sohrabji F. Sex Differences in the Impact of Shift Work Schedules on Pathological Outcomes in an Animal Model of Ischemic Stroke. *Endocrinology.* 2016;157(7):2836-43.
8. Winget CM, DeRoshia CW, Markley CL, Holley DC. A review of human physiological and performance changes associated with desynchronization of biological rhythms. *Aviat Space Environ Med.* 1984;55(12):1085-96.
9. Cho K, Ennaceur A, Cole JC, Suh CK. Chronic jet lag produces cognitive deficits. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience.* 2000;20(6):RC66.
10. Bracci M, Manzella N, Copertaro A, Staffolani S, Strafella E, Barbaresi M, et al. Rotating-shift nurses after a day off: peripheral clock gene expression, urinary melatonin, and serum 17-beta-estradiol levels. *Scand J Work Environ Health.* 2014;40(3):295-304.
11. Cho K. Chronic 'jet lag' produces temporal lobe atrophy and spatial cognitive deficits. *Nature neuroscience.* 2001;4(6):567-8.
12. Bonde JP, Hansen J, Kolstad HA, Mikkelsen S, Olsen JH, Blask DE, et al. Work at night and breast cancer--report on evidence-based options for preventive actions. *Scand J Work Environ Health.* 2012;38(4):380-90.
13. Bunney WE, Bunney BG. Molecular clock genes in man and lower animals: possible implications for circadian abnormalities in depression. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology.* 2000;22(4):335-45.

14. Nicoletti C, Muller C, Hayashi C, Nakaseko M, Tobita I, Laubli T. Circadian rhythm of heart rate and physical activity in nurses during day and night shifts. *European journal of applied physiology*. 2015.
15. Vitaterna MH, Pinto LH, Turek FW. Chapter 30 - Molecular Genetic Basis for Mammalian Circadian Rhythms. In: Dement MHKRC, editor. *Principles and Practice of Sleep Medicine (Fourth Edition)*. Philadelphia: W.B. Saunders; 2005. p. 363-74.
16. Bollinger T, Schibler U. Circadian rhythms - from genes to physiology and disease. *Swiss Med Wkly*. 2014;144:w13984.
17. Halberg F, Halberg E, Barnum C, Bittner J, Withrow R. Photoperiodism and related phenomena in plants and animals. *AAAS 1959*. 1959.
18. Reppert SM, Weaver DR. Coordination of circadian timing in mammals. *Nature*. 2002;418(6901):935-41.
19. Aschoff J. CIRCADIAN RHYTHMS IN MAN. *Science (New York, NY)*. 1965;148(3676):1427-32.
20. Albrecht U, Eichele G. The mammalian circadian clock. *Current opinion in genetics & development*. 2003;13(3):271-7.
21. Dibner C, Schibler U. Circadian timing of metabolism in animal models and humans. *J Intern Med*. 2015;277(5):513-27.
22. Yamaguchi S, Isejima H, Matsuo T, Okura R, Yagita K, Kobayashi M, et al. Synchronization of cellular clocks in the suprachiasmatic nucleus. *Science (New York, NY)*. 2003;302(5649):1408-12.
23. Reppert SM, Weaver DR. Molecular analysis of mammalian circadian rhythms. *Annu Rev Physiol*. 2001;63:647-76.
24. Prolo LM, Takahashi JS, Herzog ED. Circadian rhythm generation and entrainment in astrocytes. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2005;25(2):404-8.
25. Dibner C, Schibler U, Albrecht U. The mammalian circadian timing system: organization and coordination of central and peripheral clocks. *Annu Rev Physiol*. 2010;72:517-49.
26. Albrecht U. Timing to perfection: the biology of central and peripheral circadian clocks. *Neuron*. 2012;74(2):246-60.
27. Fonken LK, Nelson RJ. The effects of light at night on circadian clocks and metabolism. *Endocr Rev*. 2014;35(4):648-70.

28. Bunger MK, Wilsbacher LD, Moran SM, Clendenin C, Radcliffe LA, Hogenesch JB, et al. Mop3 is an essential component of the master circadian pacemaker in mammals. *Cell*. 2000;103(7):1009-17.
29. Kume K, Zylka MJ, Sriram S, Shearman LP, Weaver DR, Jin X, et al. mCRY1 and mCRY2 are essential components of the negative limb of the circadian clock feedback loop. *Cell*. 1999;98(2):193-205.
30. Shearman LP, Sriram S, Weaver DR, Maywood ES, Chaves I, Zheng B, et al. Interacting molecular loops in the mammalian circadian clock. *Science* (New York, NY). 2000;288(5468):1013-9.
31. Musiek ES, Lim MM, Yang G, Bauer AQ, Qi L, Lee Y, et al. Circadian clock proteins regulate neuronal redox homeostasis and neurodegeneration. *The Journal of clinical investigation*. 2013;123(12):5389-400.
32. Ruan GX, Gamble KL, Risner ML, Young LA, McMahon DG. Divergent roles of clock genes in retinal and suprachiasmatic nucleus circadian oscillators. *PLoS One*. 2012;7(6):e38985.
33. Shi S, Hida A, McGuinness OP, Wasserman DH, Yamazaki S, Johnson CH. Circadian clock gene *Bmal1* is not essential; functional replacement with its paralog, *Bmal2*. *Curr Biol*. 2010;20(4):316-21.
34. Pfeiffer M, Muller CM, Mordel J, Meissl H, Ansari N, Deller T, et al. The mammalian molecular clockwork controls rhythmic expression of its own input pathway components. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2009;29(19):6114-23.
35. Shimba S, Ogawa T, Hitosugi S, Ichihashi Y, Nakadaira Y, Kobayashi M, et al. Deficient of a clock gene, brain and muscle Arnt-like protein-1 (BMAL1), induces dyslipidemia and ectopic fat formation. *PLoS One*. 2011;6(9):e25231.
36. Kennaway DJ. The role of circadian rhythmicity in reproduction. *Hum Reprod Update*. 2005;11(1):91-101.
37. Boden MJ, Varcoe TJ, Voultzios A, Kennaway DJ. Reproductive biology of female *Bmal1* null mice. *Reproduction*. 2010;139(6):1077-90.
38. Kondratov RV, Kondratova AA, Gorbacheva VY, Vykhovanets OV, Antoch MP. Early aging and age-related pathologies in mice deficient in BMAL1, the core component of the circadian clock. *Genes Dev*. 2006;20(14):1868-73.
39. Rudic RD, McNamara P, Curtis AM, Boston RC, Panda S, Hogenesch JB, et al. BMAL1 and CLOCK, two essential components of the circadian clock, are involved in glucose homeostasis. *PLoS Biol*. 2004;2(11):e377.
40. Bunger MK, Walisser JA, Sullivan R, Manley PA, Moran SM, Kalscheur VL, et al. Progressive arthropathy in mice with a targeted disruption of the *Mop3/Bmal-1* locus. *Genesis*. 2005;41(3):122-32.

41. Chang L, Xiong W, Zhao X, Fan Y, Guo Y, Garcia-Barrio M, et al. Bmal1 in Perivascular Adipose Tissue Regulates Resting-Phase Blood Pressure Through Transcriptional Regulation of Angiotensinogen. *Circulation*. 2018;138(1):67-79.
42. Kondratova AA, Dubrovsky YV, Antoch MP, Kondratov RV. Circadian clock proteins control adaptation to novel environment and memory formation. *Aging (Albany NY)*. 2010;2(5):285-97.
43. Ali AA, Schwarz-Herzke B, Stahr A, Prozorovski T, Aktas O, von Gall C. Premature aging of the hippocampal neurogenic niche in adult Bmal1-deficient mice. *Aging (Albany NY)*. 2015;7(6):435-49.
44. Verkhratsky A, Butt A. Introduction to Glia. *Glial Neurobiology*: John Wiley & Sons, Ltd; 2007. p. 1-12.
45. Somjen GG. Nervenkitz: notes on the history of the concept of neuroglia. *Glia*. 1988;1(1):2-9.
46. Barres BA. What is a glial cell? *Glia*. 2003;43(1):4-5.
47. Verkhratsky A, Butt A. Morphology of Glial Cells. *Glial Neurobiology*: John Wiley & Sons, Ltd; 2007. p. 21-8.
48. Parpura V, Heneka MT, Montana V, Oliet SH, Schousboe A, Haydon PG, et al. Glial cells in (patho)physiology. *Journal of neurochemistry*. 2012;121(1):4-27.
49. Reichenbach A, Siegel A, Senitz D, Smith TG, Jr. A comparative fractal analysis of various mammalian astroglial cell types. *Neuroimage*. 1992;1(1):69-77.
50. Panickar KS, Norenberg MD. Astrocytes in cerebral ischemic injury: morphological and general considerations. *Glia*. 2005;50(4):287-98.
51. Kimelberg HK. Functions of mature mammalian astrocytes: a current view. *Neuroscientist*. 2010;16(1):79-106.
52. Nedergaard M, Ransom B, Goldman SA. New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. *Trends Neurosci*. 2003;26(10):523-30.
53. Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol*. 2010;119(1):7-35.
54. Verkhratsky A, Butt A. Astrocytes. *Glial Neurobiology*: John Wiley & Sons, Ltd; 2007. p. 93-123.
55. Magistretti PJ. Neuron-glia metabolic coupling and plasticity. *J Exp Biol*. 2006;209(Pt 12):2304-11.
56. Verkhratsky A, Nedergaard M, Hertz L. Why are Astrocytes Important? *Neurochem Res*. 2014.

57. Verkhratsky A, Butt A. General Physiology of Glial Cells. *Glial Neurobiology*: John Wiley & Sons, Ltd; 2007. p. 39-81.
58. Araque A, Parpura V, Sanzgiri RP, Haydon PG. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. *Trends Neurosci.* 1999;22(5):208-15.
59. Vesce S, Bezzi P, Volterra A. The active role of astrocytes in synaptic transmission. *Cell Mol Life Sci.* 1999;56(11-12):991-1000.
60. Bergersen LH, Gundersen V. Morphological evidence for vesicular glutamate release from astrocytes. *Neuroscience.* 2009;158(1):260-5.
61. Wenker I. An active role for astrocytes in synaptic plasticity? *J Neurophysiol.* 2010;104(3):1216-8.
62. Malarkey EB, Parpura V. Mechanisms of glutamate release from astrocytes. *Neurochem Int.* 2008;52(1-2):142-54.
63. Parpura V, Basarsky TA, Liu F, Jęftinija K, Jęftinija S, Haydon PG. Glutamate-mediated astrocyte-neuron signalling. *Nature.* 1994;369(6483):744-7.
64. Amiri M, Bahrami F, Janahmadi M. Functional contributions of astrocytes in synchronization of a neuronal network model. *J Theor Biol.* 2012;292:60-70.
65. Belanger M, Magistretti PJ. The role of astroglia in neuroprotection. *Dialogues Clin Neurosci.* 2009;11(3):281-95.
66. Ng FS, Tangredi MM, Jackson FR. Glial cells physiologically modulate clock neurons and circadian behavior in a calcium-dependent manner. *Curr Biol.* 2011;21(8):625-34.
67. Jackson FR, Ng FS, Sengupta S, You S, Huang Y. Glial cell regulation of rhythmic behavior. *Methods Enzymol.* 2015;552:45-73.
68. Marpegan L, Swannstrom AE, Chung K, Simon T, Haydon PG, Khan SK, et al. Circadian regulation of ATP release in astrocytes. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience.* 2011;31(23):8342-50.
69. Halassa MM, Florian C, Fellin T, Munoz JR, Lee SY, Abel T, et al. Astrocytic modulation of sleep homeostasis and cognitive consequences of sleep loss. *Neuron.* 2009;61(2):213-9.
70. Ullian EM, Sapperstein SK, Christopherson KS, Barres BA. Control of synapse number by glia. *Science (New York, NY).* 2001;291(5504):657-61.
71. Ullian EM, Christopherson KS, Barres BA. Role for glia in synaptogenesis. *Glia.* 2004;47(3):209-16.

72. Christopherson KS, Ullian EM, Stokes CC, Mallowney CE, Hell JW, Agah A, et al. Thrombospondins are astrocyte-secreted proteins that promote CNS synaptogenesis. *Cell*. 2005;120(3):421-33.
73. Barres BA. A new role for glia: generation of neurons! *Cell*. 1999;97(6):667-70.
74. Barres BA, Barde Y. Neuronal and glial cell biology. *Curr Opin Neurobiol*. 2000;10(5):642-8.
75. Sofroniew MV. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci*. 2009;32(12):638-47.
76. Huang L, Wu ZB, Zhuge Q, Zheng W, Shao B, Wang B, et al. Glial scar formation occurs in the human brain after ischemic stroke. *Int J Med Sci*. 2014;11(4):344-8.
77. Verkhratsky A, Butt A. *General Pathophysiology of Glia. Glial Neurobiology: John Wiley & Sons, Ltd; 2007. p. 153-65.*
78. Buffo A, Rite I, Tripathi P, Lepier A, Colak D, Horn AP, et al. Origin and progeny of reactive gliosis: A source of multipotent cells in the injured brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(9):3581-6.
79. Wagner DC, Scheibe J, Glocke I, Weise G, Deten A, Boltze J, et al. Object-based analysis of astroglial reaction and astrocyte subtype morphology after ischemic brain injury. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 2013;73(1):79-87.
80. Ridet JL, Malhotra SK, Privat A, Gage FH. Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. *Trends Neurosci*. 1997;20(12):570-7.
81. Fawcett JW, Asher RA. The glial scar and central nervous system repair. *Brain Res Bull*. 1999;49(6):377-91.
82. Cervos-Navarro J, Lafuente JV. Traumatic brain injuries: structural changes. *J Neurol Sci*. 1991;103 Suppl:S3-14.
83. Cekanaviciute E, Buckwalter MS. Astrocytes: Integrative Regulators of Neuroinflammation in Stroke and Other Neurological Diseases. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*. 2016;13(4):685-701.
84. Farina C, Aloisi F, Meinl E. Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends Immunol*. 2007;28(3):138-45.
85. John GR, Lee SC, Brosnan CF. Cytokines: powerful regulators of glial cell activation. *Neuroscientist*. 2003;9(1):10-22.
86. Silver J, Miller JH. Regeneration beyond the glial scar. *Nat Rev Neurosci*. 2004;5(2):146-56.

87. Buffo A, Rolando C, Ceruti S. Astrocytes in the damaged brain: molecular and cellular insights into their reactive response and healing potential. *Biochem Pharmacol.* 2010;79(2):77-89.
88. Pekny M, Wilhelmsson U, Pekna M. The dual role of astrocyte activation and reactive gliosis. *Neurosci Lett.* 2014;565:30-8.
89. Sims NR, Yew WP. Reactive astrogliosis in stroke: Contributions of astrocytes to recovery of neurological function. *Neurochem Int.* 2017.
90. Li H, Zhang N, Lin HY, Yu Y, Cai QY, Ma L, et al. Histological, cellular and behavioral assessments of stroke outcomes after photothrombosis-induced ischemia in adult mice. *BMC Neurosci.* 2014;15:58.
91. Rolls A, Shechter R, Schwartz M. The bright side of the glial scar in CNS repair. *Nat Rev Neurosci.* 2009;10(3):235-41.
92. Sofroniew MV. Reactive astrocytes in neural repair and protection. *Neuroscientist.* 2005;11(5):400-7.
93. Burda JE, Sofroniew MV. Reactive gliosis and the multicellular response to CNS damage and disease. *Neuron.* 2014;81(2):229-48.
94. Loane DJ, Kumar A. Microglia in the TBI brain: The good, the bad, and the dysregulated. *Exp Neurol.* 2016;275 Pt 3:316-27.
95. Crotti A, Ransohoff RM. Microglial Physiology and Pathophysiology: Insights from Genome-wide Transcriptional Profiling. *Immunity.* 2016;44(3):505-15.
96. Ginhoux F, Guilliams M. Tissue-Resident Macrophage Ontogeny and Homeostasis. *Immunity.* 2016;44(3):439-49.
97. Verkhratsky A, Butt A. Glial Development. *Glial Neurobiology: John Wiley & Sons, Ltd; 2007.* p. 29-38.
98. Kempermann G, Neumann H. *Neuroscience. Microglia: the enemy within? Science (New York, NY).* 2003;302(5651):1689-90.
99. Salter MW, Beggs S. Sublime microglia: expanding roles for the guardians of the CNS. *Cell.* 2014;158(1):15-24.
100. Soulet D, Rivest S. Microglia. *Curr Biol.* 2008;18(12):R506-8.
101. Hayashi Y, Koyanagi S, Kusunose N, Okada R, Wu Z, Tozaki-Saitoh H, et al. The intrinsic microglial molecular clock controls synaptic strength via the circadian expression of cathepsin S. *Sci Rep.* 2013;3:2744.
102. Fonken LK, Frank MG, Kitt MM, Barrientos RM, Watkins LR, Maier SF. Microglia inflammatory responses are controlled by an intrinsic circadian clock. *Brain Behav Immun.* 2015;45:171-9.

103. Hanisch UK, Kettenmann H. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nature neuroscience*. 2007;10(11):1387-94.
104. Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science (New York, NY)*. 2005;308(5726):1314-8.
105. Kreutzberg GW. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci*. 1996;19(8):312-8.
106. Allan SM, Rothwell NJ. Inflammation in central nervous system injury. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2003;358(1438):1669-77.
107. Schroeter M, Jander S, Witte OW, Stoll G. Heterogeneity of the microglial response in photochemically induced focal ischemia of the rat cerebral cortex. *Neuroscience*. 1999;89(4):1367-77.
108. Davalos D, Grutzendler J, Yang G, Kim JV, Zuo Y, Jung S, et al. ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nature neuroscience*. 2005;8(6):752-8.
109. Olson JK, Miller SD. Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs. *J Immunol*. 2004;173(6):3916-24.
110. Lyons SA, Pastor A, Ohlemeyer C, Kann O, Wiegand F, Prass K, et al. Distinct physiologic properties of microglia and blood-borne cells in rat brain slices after permanent middle cerebral artery occlusion. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2000;20(11):1537-49.
111. Jin R, Yang G, Li G. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: role of inflammatory cells. *Journal of leukocyte biology*. 2010;87(5):779-89.
112. Ohsawa K, Imai Y, Sasaki Y, Kohsaka S. Microglia/macrophage-specific protein Iba1 binds to fimbrin and enhances its actin-bundling activity. *Journal of neurochemistry*. 2004;88(4):844-56.
113. Magnus T, Chan A, Grauer O, Toyka KV, Gold R. Microglial phagocytosis of apoptotic inflammatory T cells leads to down-regulation of microglial immune activation. *J Immunol*. 2001;167(9):5004-10.
114. Hausler KG, Prinz M, Nolte C, Weber JR, Schumann RR, Kettenmann H, et al. Interferon-gamma differentially modulates the release of cytokines and chemokines in lipopolysaccharide- and pneumococcal cell wall-stimulated mouse microglia and macrophages. *Eur J Neurosci*. 2002;16(11):2113-22.
115. Watson BD, Dietrich WD, Busto R, Wachtel MS, Ginsberg MD. Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis. *Ann Neurol*. 1985;17(5):497-504.

116. Labat-gest V, Tomasi S. Photothrombotic ischemia: a minimally invasive and reproducible photochemical cortical lesion model for mouse stroke studies. *Journal of visualized experiments : JoVE*. 2013(76).
117. Nordin N, Xie SQ, Wunsche B. Assessment of movement quality in robot-assisted upper limb rehabilitation after stroke: a review. *J Neuroeng Rehabil*. 2014;11:137.
118. Verkhratsky A, Butt A. *Glia and Diseases of the Nervous System. Glial Neurobiology*: John Wiley & Sons, Ltd; 2007. p. 167-96.
119. Traystman RJ. Animal models of focal and global cerebral ischemia. *ILAR journal / National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources*. 2003;44(2):85-95.
120. Sommer CJ. Ischemic stroke: experimental models and reality. *Acta Neuropathol*. 2017;133(2):245-61.
121. Durukan A, Tatlisumak T. Acute ischemic stroke: overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia. *Pharmacol Biochem Behav*. 2007;87(1):179-97.
122. Lee JK, Park MS, Kim YS, Moon KS, Joo SP, Kim TS, et al. Photochemically induced cerebral ischemia in a mouse model. *Surg Neurol*. 2007;67(6):620-5; discussion 5.
123. Dietrich WD, Watson BD, Busto R, Ginsberg MD, Bethea JR. Photochemically induced cerebral infarction. I. Early microvascular alterations. *Acta Neuropathol*. 1987;72(4):315-25.
124. Schroeter M, Jander S, Stoll G. Non-invasive induction of focal cerebral ischemia in mice by photothrombosis of cortical microvessels: characterization of inflammatory responses. *Journal of neuroscience methods*. 2002;117(1):43-9.
125. Carmichael ST. Rodent models of focal stroke: size, mechanism, and purpose. *NeuroRx*. 2005;2(3):396-409.
126. Roof RL, Schielke GP, Ren X, Hall ED. A comparison of long-term functional outcome after 2 middle cerebral artery occlusion models in rats. *Stroke*. 2001;32(11):2648-57.
127. Belayev L, Alonso OF, Busto R, Zhao W, Ginsberg MD. Middle cerebral artery occlusion in the rat by intraluminal suture. Neurological and pathological evaluation of an improved model. *Stroke*. 1996;27(9):1616-22; discussion 23.
128. Barone FC, Knudsen DJ, Nelson AH, Feuerstein GZ, Willette RN. Mouse strain differences in susceptibility to cerebral ischemia are related to cerebral vascular anatomy. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 1993;13(4):683-92.

129. Kleim JA, Boychuk JA, Adkins DL. Rat models of upper extremity impairment in stroke. *ILAR journal / National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources*. 2007;48(4):374-84.
130. Uzdensky AB. Photothrombotic Stroke as a Model of Ischemic Stroke. *Transl Stroke Res*. 2017.
131. Demyanenko SV, Panchenko SN, Uzdensky AB. Expression of neuronal and signaling proteins in penumbra around a photothrombotic infarction core in rat cerebral cortex. *Biochemistry Biokhimiia*. 2015;80(6):790-9.
132. Nowakowski RS, Lewin SB, Miller MW. Bromodeoxyuridine immunohistochemical determination of the lengths of the cell cycle and the DNA-synthetic phase for an anatomically defined population. *Journal of neurocytology*. 1989;18(3):311-8.
133. Smit JW, Meijer CJ, Decary F, Feltkamp-Vroom TM. Paraformaldehyde fixation in immunofluorescence and immunoelectron microscopy. Preservation of tissue and cell surface membrane antigens. *J Immunol Methods*. 1974;6(1-2):93-8.
134. Mulisch M, Welsch U, Romeis B. Romeis Mikroskopische Technik. 19. Auflage ed2015. XVIII, 603 Seiten p.
135. Fonken LK, Weil ZM, Nelson RJ. Mice exposed to dim light at night exaggerate inflammatory responses to lipopolysaccharide. *Brain Behav Immun*. 2013;34:159-63.
136. Kennaway DJ, Boden MJ, Varcoe TJ. Circadian rhythms and fertility. *Mol Cell Endocrinol*. 2012;349(1):56-61.
137. Hemmeryckx B, Van Hove CE, Franssen P, Emmerechts J, Kauskot A, Bult H, et al. Progression of the prothrombotic state in aging Bmal1-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31(11):2552-9.
138. Nowicka D, Rogozinska K, Aleksy M, Witte OW, Skangiel-Kramska J. Spatiotemporal dynamics of astroglial and microglial responses after photothrombotic stroke in the rat brain. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 2008;68(2):155-68.
139. Shanina EV, Redecker C, Reinecke S, Schallert T, Witte OW. Long-term effects of sequential cortical infarcts on scar size, brain volume and cognitive function. *Behavioural brain research*. 2005;158(1):69-77.
140. Fitzek S, Fitzek C, Urban PP, Marx J, Hopf HC, Stoeter P. Time course of lesion development in patients with acute brain stem infarction and correlation with NIHSS score. *European journal of radiology*. 2001;39(3):180-5.

141. Lansberg MG, O'Brien MW, Tong DC, Moseley ME, Albers GW. Evolution of cerebral infarct volume assessed by diffusion-weighted magnetic resonance imaging. *Archives of neurology*. 2001;58(4):613-7.
142. Schwamm LH, Koroshetz WJ, Sorensen AG, Wang B, Copen WA, Budzik R, et al. Time course of lesion development in patients with acute stroke: serial diffusion- and hemodynamic-weighted magnetic resonance imaging. *Stroke*. 1998;29(11):2268-76.
143. Haupt C, Witte OW, Frahm C. Up-regulation of Connexin43 in the glial scar following photothrombotic ischemic injury. *Mol Cell Neurosci*. 2007;35(1):89-99.
144. Schroeter M, Schiene K, Kraemer M, Hagemann G, Weigel H, Eysel UT, et al. Astroglial responses in photochemically induced focal ischemia of the rat cortex. *Exp Brain Res*. 1995;106(1):1-6.
145. Westgate EJ, Cheng Y, Reilly DF, Price TS, Walisser JA, Bradfield CA, et al. Genetic components of the circadian clock regulate thrombogenesis in vivo. *Circulation*. 2008;117(16):2087-95.
146. Krityakiarana W, Sompup K, Jongkamonwiwat N, Mukda S, Pinilla FG, Govitrapong P, et al. Effects of melatonin on severe crush spinal cord injury-induced reactive astrocyte and scar formation. *J Neurosci Res*. 2016;94(12):1451-9.
147. Beker MC, Caglayan B, Yalcin E, Caglayan AB, Turkseven S, Gurel B, et al. Time-of-Day Dependent Neuronal Injury After Ischemic Stroke: Implication of Circadian Clock Transcriptional Factor Bmal1 and Survival Kinase AKT. *Mol Neurobiol*. 2017.
148. Cotrina ML, Lou N, Tome-Garcia J, Goldman J, Nedergaard M. Direct comparison of microglial dynamics and inflammatory profile in photothrombotic and arterial occlusion evoked stroke. *Neuroscience*. 2017;343:483-94.
149. Herrmann JE, Imura T, Song B, Qi J, Ao Y, Nguyen TK, et al. STAT3 is a critical regulator of astrogliosis and scar formation after spinal cord injury. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2008;28(28):7231-43.
150. Okada S, Nakamura M, Katoh H, Miyao T, Shimazaki T, Ishii K, et al. Conditional ablation of Stat3 or Socs3 discloses a dual role for reactive astrocytes after spinal cord injury. *Nat Med*. 2006;12(7):829-34.
151. Lalancette-Hebert M, Gowing G, Simard A, Weng YC, Kriz J. Selective ablation of proliferating microglial cells exacerbates ischemic injury in the brain. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2007;27(10):2596-605.

152. Imai F, Suzuki H, Oda J, Ninomiya T, Ono K, Sano H, et al. Neuroprotective effect of exogenous microglia in global brain ischemia. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2007;27(3):488-500.
153. Jin WN, Shi SX, Li Z, Li M, Wood K, Gonzales RJ, et al. Depletion of microglia exacerbates postischemic inflammation and brain injury. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2017;271678x17694185.
154. Tian DS, Dong Q, Pan DJ, He Y, Yu ZY, Xie MJ, et al. Attenuation of astrogliosis by suppressing of microglial proliferation with the cell cycle inhibitor olomoucine in rat spinal cord injury model. *Brain Res*. 2007;1154:206-14.
155. Curtis AM, Bellet MM, Sassone-Corsi P, O'Neill LA. Circadian clock proteins and immunity. *Immunity*. 2014;40(2):178-86.
156. Curtis AM, Fagundes CT, Yang G, Palsson-McDermott EM, Wochal P, McGettrick AF, et al. Circadian control of innate immunity in macrophages by miR-155 targeting Bmal1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(23):7231-6.
157. Weil ZM, Karelina K, Su AJ, Barker JM, Norman GJ, Zhang N, et al. Time-of-day determines neuronal damage and mortality after cardiac arrest. *Neurobiol Dis*. 2009;36(2):352-60.
158. Gibbs JE, Blaikley J, Beesley S, Matthews L, Simpson KD, Boyce SH, et al. The nuclear receptor REV-ERB $\alpha$  mediates circadian regulation of innate immunity through selective regulation of inflammatory cytokines. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(2):582-7.
159. Castanon-Cervantes O, Wu M, Ehlen JC, Paul K, Gamble KL, Johnson RL, et al. Dysregulation of inflammatory responses by chronic circadian disruption. *J Immunol*. 2010;185(10):5796-805.
160. Thau-Zuchman O, Shohami E, Alexandrovich AG, Trembovler V, Leker RR. The anti-inflammatory drug carprofen improves long-term outcome and induces gliogenesis after traumatic brain injury. *Journal of neurotrauma*. 2012;29(2):375-84.
161. Hish GA, Jr., Diaz JA, Hawley AE, Myers DD, Jr., Lester PA. Effects of analgesic use on inflammation and hematology in a murine model of venous thrombosis. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS*. 2014;53(5):485-93.
162. Ferrer I, Planas AM. Signaling of cell death and cell survival following focal cerebral ischemia: life and death struggle in the penumbra. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2003;62(4):329-39.

163. Yamashima T. Ca<sup>2+</sup>-dependent proteases in ischemic neuronal death: a conserved 'calpain-cathepsin cascade' from nematodes to primates. *Cell calcium*. 2004;36(3-4):285-93.
164. Ferrer I, Friguls B, Dalfo E, Justicia C, Planas AM. Caspase-dependent and caspase-independent signalling of apoptosis in the penumbra following middle cerebral artery occlusion in the adult rat. *Neuropathology and applied neurobiology*. 2003;29(5):472-81.
165. Chan PH. Mitochondria and neuronal death/survival signaling pathways in cerebral ischemia. *Neurochem Res*. 2004;29(11):1943-9.
166. Barreto GE, Sun X, Xu L, Giffard RG. Astrocyte proliferation following stroke in the mouse depends on distance from the infarct. *PLoS One*. 2011;6(11):e27881.
167. Shimada IS, LeComte MD, Granger JC, Quinlan NJ, Spees JL. Self-renewal and differentiation of reactive astrocyte-derived neural stem/progenitor cells isolated from the cortical peri-infarct area after stroke. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2012;32(23):7926-40.
168. Carlen M, Meletis K, Goritz C, Darsalia V, Evergren E, Tanigaki K, et al. Forebrain ependymal cells are Notch-dependent and generate neuroblasts and astrocytes after stroke. *Nature neuroscience*. 2009;12(3):259-67.
169. Ohab JJ, Carmichael ST. Poststroke neurogenesis: emerging principles of migration and localization of immature neurons. *Neuroscientist*. 2008;14(4):369-80.
170. Manwani B, Bentivegna K, Benashski SE, Venna VR, Xu Y, Arnold AP, et al. Sex differences in ischemic stroke sensitivity are influenced by gonadal hormones, not by sex chromosome complement. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2015;35(2):221-9.
171. Li L, Lundkvist A, Andersson D, Wilhelmsson U, Nagai N, Pardo AC, et al. Protective role of reactive astrocytes in brain ischemia. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2008;28(3):468-81.
172. Bush TG, Puvanachandra N, Horner CH, Polito A, Ostefeld T, Svendsen CN, et al. Leukocyte infiltration, neuronal degeneration, and neurite outgrowth after ablation of scar-forming, reactive astrocytes in adult transgenic mice. *Neuron*. 1999;23(2):297-308.
173. Faulkner JR, Herrmann JE, Woo MJ, Tansey KE, Doan NB, Sofroniew MV. Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2004;24(9):2143-55.

174. Liu Z, Li Y, Cui Y, Roberts C, Lu M, Wilhelmsson U, et al. Beneficial effects of gfap/vimentin reactive astrocytes for axonal remodeling and motor behavioral recovery in mice after stroke. *Glia*. 2014.
175. Hayakawa K, Nakano T, Irie K, Higuchi S, Fujioka M, Orito K, et al. Inhibition of reactive astrocytes with fluorocitrate retards neurovascular remodeling and recovery after focal cerebral ischemia in mice. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2010;30(4):871-82.
176. Hill JJ, Jin K, Mao XO, Xie L, Greenberg DA. Intracerebral chondroitinase ABC and heparan sulfate proteoglycan glypican improve outcome from chronic stroke in rats. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(23):9155-60.
177. Lenz KM, McCarthy MM. A starring role for microglia in brain sex differences. *Neuroscientist*. 2015;21(3):306-21.
178. Wimmer I, Zrzavy T, Lassmann H. Neuroinflammatory responses in experimental and human stroke lesions. *Journal of neuroimmunology*. 2018;323:10-8.
179. Wilson ME. Stroke: Understanding the Differences between Males and Females. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*. 2013;465(5):595-600.
180. Ritzel RM, Capozzi LA, McCullough LD. Sex, stroke, and inflammation: the potential for estrogen-mediated immunoprotection in stroke. *Horm Behav*. 2013;63(2):238-53.
181. Liu F, McCullough LD. Interactions between Age, Sex, and Hormones in Experimental Ischemic Stroke. *Neurochem Int*. 2012;61(8):1255-65.
182. Engler-Chiurazzi EB, Brown CM, Povroznik JM, Simpkins JW. Estrogens as neuroprotectants: Estrogenic actions in the context of cognitive aging and brain injury. *Progress in neurobiology*. 2016.
183. Broughton BR, Brait VH, Kim HA, Lee S, Chu HX, Gardiner-Mann CV, et al. Sex-dependent effects of G protein-coupled estrogen receptor activity on outcome after ischemic stroke. *Stroke*. 2014;45(3):835-41.
184. McCullough LD, Hurn PD. Estrogen and ischemic neuroprotection: an integrated view. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2003;14(5):228-35.
185. Dubal DB, Wise PM. Neuroprotective effects of estradiol in middle-aged female rats. *Endocrinology*. 2001;142(1):43-8.
186. Stoop W, De Geyter D, Verachtert S, Brouwers S, Verdood P, De Keyser J, et al. Post-stroke treatment with 17beta-estradiol exerts neuroprotective effects in both normotensive and hypertensive rats. *Neuroscience*. 2017;348:335-45.

187. Nadkarni S, McArthur S. Oestrogen and immunomodulation: new mechanisms that impact on peripheral and central immunity. *Curr Opin Pharmacol.* 2013;13(4):576-81.
188. Petrone AB, Simpkins JW, Barr TL. 17 $\beta$ -Estradiol and Inflammation: Implications for Ischemic Stroke. *Aging and Disease.* 2014;5(5):340-5.
189. Wu SY, Chen YW, Tsai SF, Wu SN, Shih YH, Jiang-Shieh YF, et al. Estrogen ameliorates microglial activation by inhibiting the Kir2.1 inward-rectifier K(+) channel. *Sci Rep.* 2016;6:22864.
190. Li X, Blizzard KK, Zeng Z, DeVries AC, Hurn PD, McCullough LD. Chronic behavioral testing after focal ischemia in the mouse: functional recovery and the effects of gender. *Exp Neurol.* 2004;187(1):94-104.
191. Dubal DB, Zhu H, Yu J, Rau SW, Shughrue PJ, Merchenthaler I, et al. Estrogen receptor alpha, not beta, is a critical link in estradiol-mediated protection against brain injury. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(4):1952-7.
192. Blurton-Jones M, Tuszynski MH. Reactive astrocytes express estrogen receptors in the injured primate brain. *The Journal of comparative neurology.* 2001;433(1):115-23.
193. Liu X, Fan XL, Zhao Y, Luo GR, Li XP, Li R, et al. Estrogen provides neuroprotection against activated microglia-induced dopaminergic neuronal injury through both estrogen receptor-alpha and estrogen receptor-beta in microglia. *J Neurosci Res.* 2005;81(5):653-65.
194. Perez-Alvarez MJ, Mateos L, Alonso A, Wandosell F. Estradiol and Progesterone Administration After pMCAO Stimulates the Neurological Recovery and Reduces the Detrimental Effect of Ischemia Mainly in Hippocampus. *Mol Neurobiol.* 2015;52(3):1690-703.
195. Perez-Alvarez MJ, Maza Mdel C, Anton M, Ordonez L, Wandosell F. Post-ischemic estradiol treatment reduced glial response and triggers distinct cortical and hippocampal signaling in a rat model of cerebral ischemia. *Journal of neuroinflammation.* 2012;9:157.
196. Lembach A, Stahr A, Ali A, Ingenwerth M, von Gall C. Sex-Dependent Effects of Bmal1-Deficiency on Mouse Cerebral Cortex Infarction in Response to Photothrombotic Stroke. *International Journal of Molecular Sciences.* 2018;19(10):3124.
197. Nakamura TJ, Sellix MT, Kudo T, Nakao N, Yoshimura T, Ebihara S, et al. Influence of the estrous cycle on clock gene expression in reproductive tissues: effects of fluctuating ovarian steroid hormone levels. *Steroids.* 2010;75(3):203-12.
198. Monteiro R, Teixeira D, Calhau C. Estrogen Signaling in Metabolic Inflammation. *Mediators Inflamm.* 2014;2014.

199. Bailey M, Silver R. Sex differences in circadian timing systems: implications for disease. *Frontiers in neuroendocrinology*. 2014;35(1):111-39.
200. Yan L, Silver R. Neuroendocrine underpinnings of sex differences in circadian timing systems. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2016;160:118-26.
201. Clarkson AN, Lopez-Valdes HE, Overman JJ, Charles AC, Brennan KC, Thomas Carmichael S. Multimodal examination of structural and functional remapping in the mouse photothrombotic stroke model. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 2013;33(5):716-23.
202. Clarkson AN, Huang BS, Macisaac SE, Mody I, Carmichael ST. Reducing excessive GABA-mediated tonic inhibition promotes functional recovery after stroke. *Nature*. 2010;468(7321):305-9.

## 6 Anhang

Tabelle 4: Puffer und Lösungen

<b>Puffer und Lösungen</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Borsäure	0,6183 g Borsäure ⇒ in 100 ml Milli-Q H <sub>2</sub> O lösen
Cryoschutz-Lösung	620 mg Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O 2,18 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> wasserfrei 18 g NaCl 600 g Saccharose 20 g Polyvinyl pyrrolidone 600 ml Ethylenglycol ⇒ auf 2 l Milli-Q H <sub>2</sub> O auffüllen
70 % Isopropanol	70 ml 100 % Isopropanol (2-Propanol) 30 ml Milli-Q H <sub>2</sub> O
90 % Isopropanol	90 ml 100 % Isopropanol (2-Propanol) 10 ml Milli-Q H <sub>2</sub> O
Gelatine	1 g Gelatine 0,1 g Chrom(III)-Kaliumsulfat x 12 H <sub>2</sub> O ⇒ in 200 ml Milli-Q H <sub>2</sub> O bei 40°C lösen
Kresylviolett	300 ml Milli-Q H <sub>2</sub> O 1,6326 g Na-Acetat wasserfrei 2,88 ml Eisessig 100 mg Kresylviolett ⇒ bei 60 °C für ca. 15 min auflösen und filtrieren
Mowiol	10 g Mowiol (4-88) 10 g Mowiol (40-88) ⇒ in 220 ml 1 x PBS über Nacht lösen ⇒ 110 ml Glycerin zugeben und über Nacht lösen ⇒ 300 mg DABCO für 16 h lösen
10 x PBS (pH 7,4)	28,8 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 4,0 g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 4,00 g KCl 164 g NaCl ⇒ auf 2 l Milli-Q H <sub>2</sub> O auffüllen
1 x PBS-Waschpuffer	100 ml 10 x PBS

	900 ml Milli-Q H <sub>2</sub> O
1 x PBS-0,2 % Triton	1000 ml 1x PBS 2 ml Triton X-100
PBS-T-Serum 3 %	100 ml PBS-T 0,2 % 3 ml Normal Goat-Serum
4 % PFA (pH 7,4)	40 g Paraformaldehyd ⇒ in 300 ml 1 x PBS pH 7,4 bei 60 °C lösen ⇒ 90 µl 5 N NaOH ⇒ auf 1000 ml mit 1 x PBS auffüllen
20 % Saccharose	100 g Saccharose ⇒ auf 500 ml mit 1 x PBS auffüllen
10 x TBS (pH 7,4)	264,4 g Tris-HCl 28,8 g Tris-Base 180 g NaCl ⇒ in 1710 ml Milli-Q H <sub>2</sub> O lösen
1 x TBS-Waschpuffer	100 ml 10 x TBS 900 ml Milli-Q H <sub>2</sub> O
1 x TBS-0,1 % Triton	100 ml 10 x TBS 900 ml Milli-Q H <sub>2</sub> O 1 ml Triton X-100
TBS-T-Serum 3 %	100 ml TBS-T 0,1 % 3 ml Normal Goat-Serum

## **Danksagung**

Diese Arbeit wäre ohne die Unterstützung und das Mitwirken einiger Menschen nicht zustande gekommen. Deshalb möchte ich mich an dieser Stelle bei all denjenigen bedanken, die mich während dieser Zeit technisch, aber vor allem auch moralisch unterstützt und motiviert haben.

An erster Stelle gilt mein Dank Frau Univ.-Prof. von Gall, die mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit durchzuführen und mich während der gesamten Bearbeitungsphase meiner Dissertation wissenschaftlich und methodisch unterstützt hat. Für die hilfreichen Anregungen und zielführenden Diskussionen bei der Erstellung dieser Arbeit möchte ich mich herzlich bedanken.

Daneben gebührt mein Dank vor allem Frau Dr. Stahr, deren Ideen und Vorarbeiten diese Arbeit erst möglich machten und die mir während dieser gesamten Zeit als Betreuerin und Freundin zur Seite stand. Für die anhaltende fachliche und moralische Unterstützung kann ich nicht genug danken. Weiterhin möchte ich mich bei Dr. Ingenwerth, Dr. Ali, Herrn Faßbender, Frau Lammersen, Frau Hallenberger und Frau Bellert für die Anleitung und zahlreichen Hilfestellungen im Labor während dieser 5 Jahre bedanken. Mein Dank gilt gleichermaßen Frau Tundo, die mir ebenfalls mit Ideen, Diskussionen sowie aufbauenden Worten von Anfang an zur Seite stand. Zudem danke ich Frau Keller für die schnelle Hilfe und exzellente Beratung bezüglich statistischer Fragestellungen.

Ebenfalls möchte ich mich bei meinen Freunden vorwiegend Anni, Aline, Susi und Eva für eine unvergessliche gemeinsame Studienzeit bedanken. Ich danke Euch vor allem aber auch für jedes offene Ohr, jede Schulter, an die ich mich anlehnen konnte und für jedes aufmunternde Wort während der Bearbeitungsphase meiner Doktorarbeit.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, bedanken, die dieses Studium und damit diese Arbeit erst ermöglicht haben. Ich danke Euch für das Durchhaltevermögen, das auch Ihr die letzten 8 Jahre meines Studiums aufgebracht habt. Und ich danke Euch für den Glauben und das Vertrauen, das Ihr immer in mich hattet, auch wenn ich es selber mal nicht hatte. Ich danke Euch für die Begleitung auf jedem meiner Schritte, die mich nach Abu Dhabi, Toulouse und Düsseldorf, aber vor allem zum Arztsein gebracht haben. Eure Begeisterung und Freude an Euren Berufen sind mir jeden Tag ein Vorbild und auch dafür danke ich Euch!