

Aus der Klinik für Neurologie  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Hans-Peter Hartung

Die Rolle von Osteopontin für die Reparatur der  
Blut-Hirn-Schranke nach experimentellem Hirninfarkt

Dissertation

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

vorgelegt von  
Kristina Späth  
2020

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

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

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Sebastian Jander

Zweitgutachter: Priv.-Doz. Dr. med. Florian Bönner

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Gliem, M., Krammes, K., Liaw, L., Van Rooijen, N., Hartung, H. P. & Jander, S. 2015. Macrophage-derived osteopontin induces reactive astrocyte polarization and promotes re-establishment of the blood brain barrier after ischemic stroke. *Glia*, 63, 2198-207.

## Zusammenfassung

Der ischämische Schlaganfall zeigte in den letzten Jahren durch effektive Therapieverfahren in der Akutsituation eine zunehmend abnehmende Mortalität, ist aber weiterhin eine der häufigsten Todesursachen in Deutschland. Neben akuten Maßnahmen sind bislang keine Therapien etabliert, die die im Anschluss einsetzenden neuroregenerativen Mechanismen inklusive der Narbenbildung modulieren. Die nach einem Hirninfarkt einsetzende Narbenbildung spielt sowohl für die Demarkation der Läsion als auch für den Wiederaufbau der Blut-Hirn-Schranke eine wichtige Rolle.

Osteopontin ist ein Phosphoglykoprotein, welches in verschiedenen physiologischen und pathologischen Mechanismen wichtige Funktionen einnimmt. Nach einem Schlaganfall konnten Osteopontin in verschiedenen Untersuchungen eher protektive Effekte zugeordnet werden. In dieser Arbeit wurde die Rolle von Osteopontin im Rahmen der Narbenbildung und beim Wiederaufbau der Blut-Hirn-Schranke nach experimentellem Hirninfarkt untersucht.

In immunhistochemischen Färbungen in Osteopontin *knock-out* Mäusen zeigten sich die Astrozyten desorganisiert mit verminderter Orientierung der Astrozytenendfüße zur Läsion. Zudem ergab sich in immunhistochemischen Färbungen in den Osteopontin *knock-out* Mäusen eine erhöhte Extravasation von Immunglobulin G als Zeichen einer eingeschränkten Reparatur der Blut-Hirn-Schranke. Dieser Befund wurde durch eine verminderte Expression von Aquaporin-4 Kanälen an den Astrozytenendfüßen, einem wichtigen Bestandteil der Blut-Hirn-Schranke, im Rahmen einer Doppel-Immunfluoreszenzfärbung unterstützt. Darüber hinaus konnte in zwei unabhängigen Modellen mit starker Reduktion der Einwanderung hämatogener Makrophagen erstmalig gezeigt werden, dass Osteopontin überwiegend von Makrophagen und weniger von residenter Mikroglia produziert wird. Die astrozytäre Narbe zeigte sich in diesen Mausmodellen ebenso wie in den Osteopontin-defizienten Mäusen in ihrem Aufbau gestört.

Zusammenfassend konnte somit gezeigt werden, dass Osteopontin von hämatogenen Makrophagen produziert wird und entscheidend an der Ausbildung einer intakten astrozytären Narbe sowie am Wiederaufbau der Blut-Hirn-Schranke nach einem Hirninfarkt beteiligt ist.

## Summary

Ischemic stroke has shown a decreasing mortality by effective treatment in the acute stadium over the last decade, but it is still one of the leading causes of death in Germany. Besides to the acute treatment no therapies have yet been established that modulate the subsequent neuroregenerative mechanisms, including scar formation. After brain infarction the onset of an intact scar tissue plays an important role for the demarcation of the lesion and for rebuilding the blood-brain barrier.

Osteopontin is a phosphoglycoprotein that plays an important role in various physiological and pathological mechanisms. In various studies it was shown that osteopontin was more likely associated with protective effects after stroke. In the present work the role of osteopontin in scar formation and in rebuilding the blood-brain barrier after experimental brain infarction was investigated.

In immunohistochemical stainings of osteopontin knock-out mice the astrocytes were disorganized with reduced orientation of the astrocytic processes towards the infarct core. In addition an increased extravasation of IgG as a sign of an impaired repair of the blood-brain barrier in osteopontin knock-out mice was detected in immunohistochemical stainings. These findings were supported by a decreased aquaporin-4 expression, a main water channel of the blood-brain-barrier, at the astrocytic endfeet in an immunofluorescent staining. Furthermore in two different mouse models with strongly reduced recruitment of hematogenous macrophages it could be shown for the first time that osteopontin is predominantly produced by macrophages than by resident microglia. In both of these mouse models the formation of the astrocytic scar tissue was similarly disturbed as in the osteopontin-deficient mice.

In conclusion it could be shown, that OPN produced by hematogenous macrophages is critically involved in the formation of an intact astrocytic scar tissue and in rebuilding the blood-brain barrier after brain infarction.

## Abkürzungsverzeichnis

-/-	homozygoter <i>knock-out</i>
+/+	homozygoter Wildtyp
<b>AB</b>	<i>Antibody</i>
<b>ABC</b>	Streptavidin-Biotin-Complex
<b>Abk.</b>	Abkürzungen
<b>AQP4</b>	Aquaporin-4
<b>BHS</b>	Blut-Hirn-Schranke
°C	Grad Celsius
<b>CCR2</b>	C-C Chemokin Rezeptor Typ 2
<b>CD</b>	<i>cluster of differentiation</i>
<b>cDNA</b>	<i>complementary desoxyribonucleic acid</i>
<b>CloLip</b>	Clodronat-haltige Liposomen
<b>DAB</b>	3,3'-Diaminobenzidin-Peroxidase
<b>DAPI</b>	4',6-Diamidin-2-phenylindol-dihydrochlorid
<b>DEPC</b>	Diethylpyrocarbonat
<b>DNA</b>	<i>Desoxyribonucleic Acid</i>
<b>fwd</b>	<i>forward</i>
<b>g</b>	Gramm
<b>GAPDH</b>	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
<b>GFAP</b>	saures Gliafaserprotein
<b>Gy</b>	Gray
<b>IgG</b>	Immunglobulin G
<b>h</b>	Stunde
<b>IHC</b>	Immunhistochemie
<b>IL</b>	Interleukin
<b>Mac-3</b>	Makrophagen Antigen-3
<b>min</b>	Minuten
<b>ml</b>	Milliliter
<b>MO/MP</b>	Monozyten/Makrophagen
<b>µg</b>	Mikrogramm
<b>µl</b>	Mikroliter
<b>µm</b>	Mikrometer

<b>μmolar</b>	Mikromolar
<b>mRNA</b>	<i>messenger ribonucleic acid</i>
<b>n</b>	Anzahl der Tiere pro Gruppe
<b>nm</b>	Nanometer
<b>OPN</b>	Osteopontin
<b>PBS</b>	<i>Phosphat buffered saline</i>
<b>%</b>	Prozent
<b>qRT-PCR</b>	quantitative reverse Transkriptase- Polymerase-Kettenreaktion
<b>rev</b>	<i>reverse</i>
<b>RGD</b>	Arginin-Glycin-Asparaginsäure
<b>RNA</b>	<i>Ribonucleic Acid</i>
<b>ROI</b>	<i>region of interest</i>
<b>s</b>	Sekunde
<b>TGF</b>	<i>Transforming growth factor</i>
<b>TNF</b>	Tumor Nekrose Faktor
<b>vWF</b>	von Willebrand-Faktor
<b>WT</b>	Wildtyp
<b>ZNS</b>	zentrales Nervensystem

## **INHALT**

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Pathophysiologie des Hirninfarkts</b>	<b>1</b>
1.1.1	Exzitotoxizität	3
1.1.2	Inflammation	4
1.1.3	Narbenbildung und Regeneration	6
<b>1.2</b>	<b>Astrogliale Narbe</b>	<b>7</b>
<b>1.3</b>	<b>Fibröse Narbe</b>	<b>9</b>
<b>1.4</b>	<b>Osteopontin</b>	<b>10</b>
1.4.1	Vorkommen	11
1.4.2	Funktion	12
1.4.3	Rezeptoren	12
<b>1.5</b>	<b>Ziele der Arbeit</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>14</b>
<b>2.1</b>	<b>Präparateauswahl und -herstellung</b>	<b>14</b>
<b>2.2</b>	<b>Histologische Untersuchungen</b>	<b>15</b>
2.2.1	Anfertigung der Schnittpräparate	15
2.2.2	Vorbereitung der Schnittpräparate	15
2.2.3	Immunhistochemie	16
2.2.4	Doppel-Immunfluoreszenz	19
2.2.5	Bilderstellung und Auswertung	21
<b>2.3</b>	<b>Quantitative reverse Transkriptase-PCR</b>	<b>22</b>
2.3.1	Allgemeine Beschreibung des Verfahrens	22
2.3.2	Aufbereitung der Gewebe	23
2.3.3	RNA Messung	24
2.3.4	Reverse - Transkriptase - Reaktion	25
2.3.5	PCR-Reaktion	25

<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>27</b>
3.1	<b>OPN wird von hämatogenen Makrophagen produziert</b>	<b>27</b>
3.2	<b>Funktion des OPN nach einem Hirninfarkt</b>	<b>29</b>
3.2.1	Inflammatorische Reaktion	31
3.2.2	Astrogliale Reaktion	32
3.2.3	Fibrotischer Umbau und Gefäßneubildung	34
3.3	<b>Astrogliale Reaktion in Makrophagen-defizienten Mäusen</b>	<b>35</b>
3.4	<b>Einfluss von OPN auf die BHS-Reparatur</b>	<b>37</b>
<b>4</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>40</b>
<b>5</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>48</b>

# 1 Einleitung

Der Schlaganfall ist in westlichen Zivilisationen eine der häufigsten Ursachen bleibender neurologischer Behinderung und bedingt eine erhebliche Mortalität (Kunst *et al.*, 2011).

In Deutschland ist der Schlaganfall nach der koronaren Herzkrankheit die zweithäufigste Todesursache, wobei die Mortalitätsrate des Schlaganfalls in den letzten Jahren aufgrund der besseren Behandlung im Akutstadium anhaltend gesunken ist (Busch *et al.*, 2013). Insgesamt werden bis zu drei Viertel aller Schlaganfälle überlebt, sodass im Fokus der weiteren Behandlung dieser Patienten sekundärpräventive und rehabilitative Maßnahmen stehen (Palm *et al.*, 2010, Kunst *et al.*, 2011).

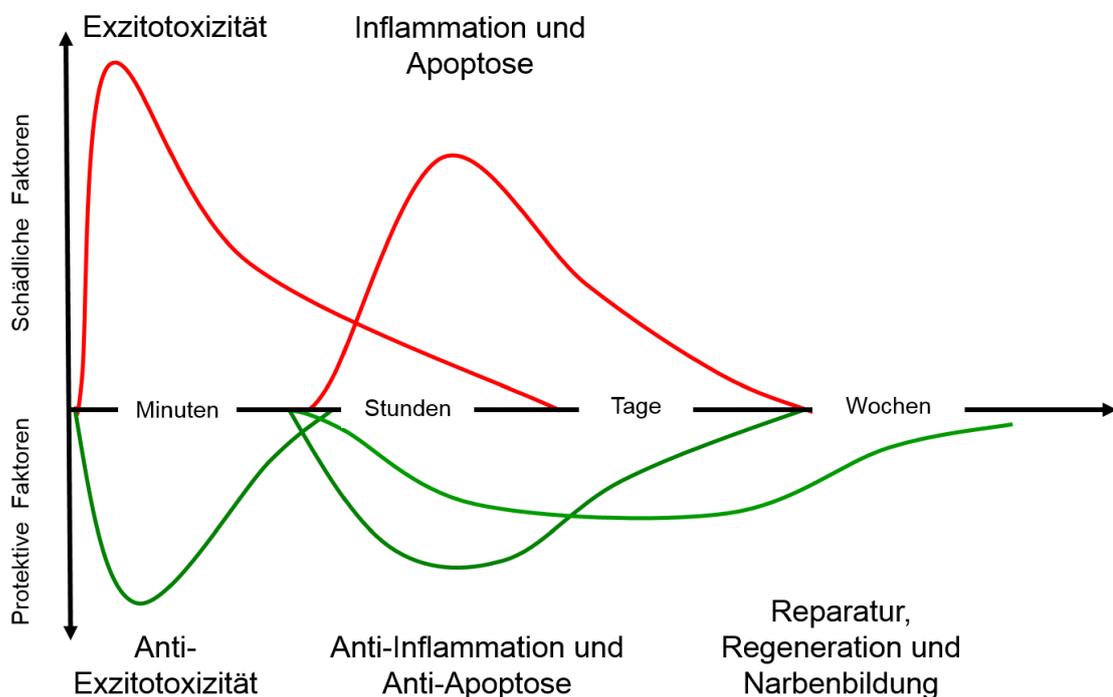
Als akute und kausale Therapie des ischämischen Schlaganfalls ist die Lyse-Therapie mit gentechnologisch hergestelltem *tissue plasminogen activator* etabliert, mit der der Thrombus, der das Gefäß verschließt, wieder aufgelöst werden kann (National Institute of Neurological und Stroke, 1995). Diese Therapie ist allerdings auf die ersten 4,5 Stunden nach Beginn der Symptomatik begrenzt (Lees *et al.*, 2016). Die Thrombektomie mittels Stentretreiver, die bei Patienten mit großen intrakraniellen Gefäßverschlüssen sehr effektiv eingesetzt werden kann, ist auf ein Zeitfenster bis 6 Stunden (Campbell *et al.*, 2015, Goyal *et al.*, 2015), in Einzelfällen bis 24 Stunden (Nogueira *et al.*, 2018), begrenzt. Durch diese zeitliche Limitierung der Akuttherapie und der Überlebensrate von etwa drei Viertel aller Patienten, hat die Entwicklung einer weiteren Therapiesäule außerhalb der Akutphase mit dem Ziel der Stärkung neuroregenerativer Prozesse einen besonderen Stellenwert.

## 1.1 Pathophysiologie des Hirninfarkts

Das Hirngewebe gewinnt seine Energie hauptsächlich aus Sauerstoff und Glukose durch aerobe Glykolyse, wobei das Gewebe auf die ständige Versorgung durch den Blutfluss angewiesen ist (Dirnagl *et al.*, 1999). Eine Unterbrechung des Blutflusses führt somit nach kurzer Zeit zu einem Versagen der Energiegewinnung, zu einem Verlust der Zellfunktionen und schließlich zum Zelltod (Moskowitz *et al.*, 2010). Dieser Zelltod ist am stärksten im

Zentrum der ischämischen Region mit dem niedrigsten Blutfluss ausgeprägt und in der Regel irreversibel (Moskowitz *et al.*, 2010). Um das Zentrum herum, der sogenannten ischämischen Penumbra, findet durch Kollateralgefäße eine Restperfusion statt, sodass der neuronale Zelluntergang verlangsamt und damit bis zu einem gewissen Grad reversibel ist (Astrup *et al.*, 1977). Diese Region versucht man durch die Auflösung/Entfernung des Thrombus mit anschließender Reperfusion zu retten.

Pathophysiologisch ist der Ablauf eines Hirninfarkts durch drei Phasen gekennzeichnet (Abb. 1): eine Phase der akuten hypoxischen und exzitotoxischen Zellschädigung, eine Phase der Inflammation und darauffolgend die Phase der Reparatur und Regeneration (Dirnagl, 2012). Neben den schädlichen Auswirkungen der ersten beiden Phasen, ist jede der Phasen durch gleichzeitig einsetzende Prozesse und Mechanismen gekennzeichnet, die essentiell für den Schutz des umliegenden Gewebes sind und die Grundlage zur Neuroregeneration bilden (Dirnagl, 2012).



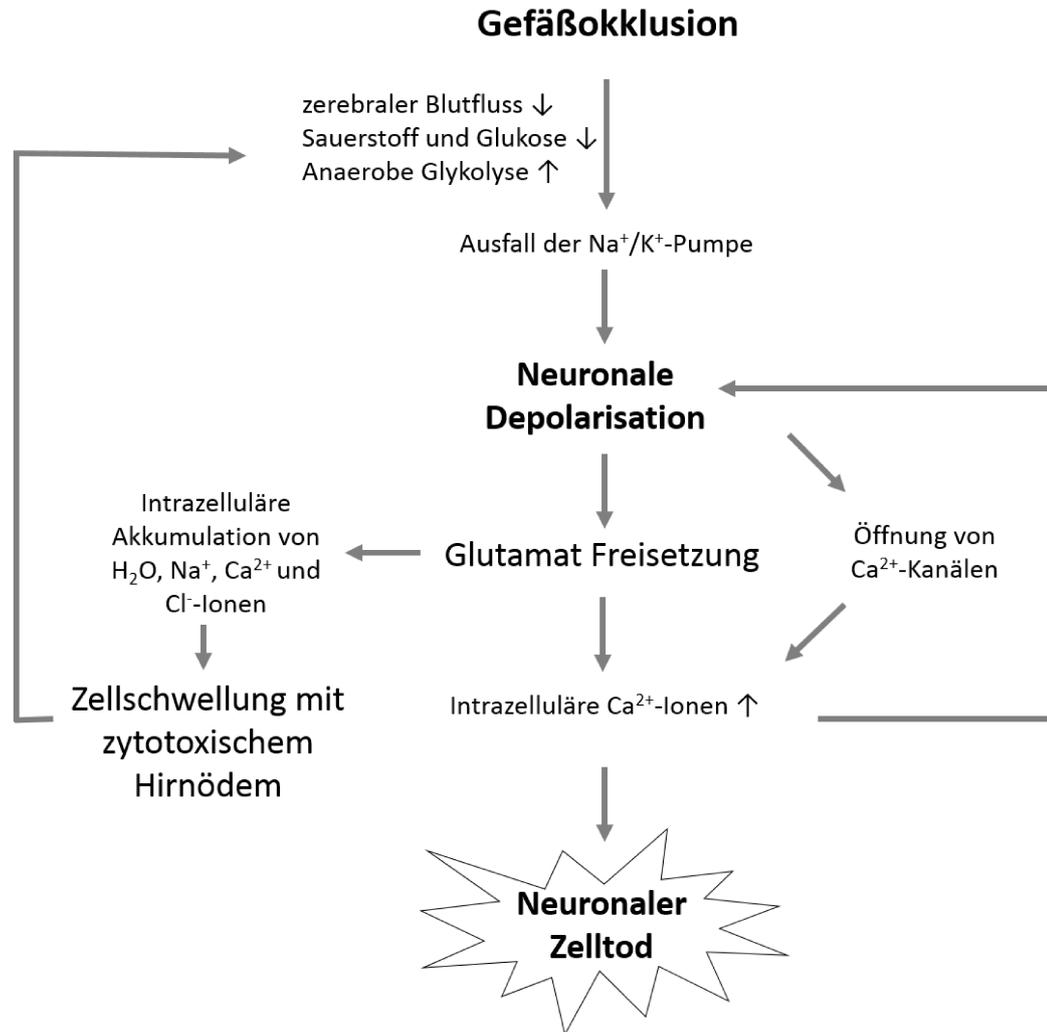
**Abb. 1: Phasen des Hirninfarkts**

Diese Abbildung zeigt die verschiedenen Phasen mit sowohl schädlichen und protektiven Faktoren nach einem Hirninfarkt (modifiziert nach Dirnagl, 2012).

### 1.1.1 Exzitotoxizität

Im Zentrum der ischämischen Region führt die Unterbrechung des Blutflusses zu einem absolutem Sauerstoff- und Glukosemangel und somit zum Untergang von Zellen, da das Hirngewebe seine Energie nahezu ausschließlich durch oxidative Phosphorylierung gewinnt (Dirnagl *et al.*, 1999). Da Neurone am empfindlichsten auf Sauerstoffmangel reagieren, sind diese Zellen vor allem betroffen (Abb. 2). Durch den Infarkt entstehenden ATP-Mangel kann der Ionengradient über der Zellmembran nicht aufrecht erhalten werden, die Neurone und Gliazellen depolarisieren und es kommt zu einer gesteigerten Ausschüttung exzitatorischer Neurotransmitter, wie zum Beispiel Glutamat, in den synaptischen Spalt (Katsura *et al.*, 1994, Moro *et al.*, 2004). Da die Wiederaufnahme von Transmittern ebenfalls ein energieabhängiger Prozess ist, steigt die extrazelluläre Glutamat Konzentration weiter an (Dirnagl *et al.*, 1999). Über Rezeptorbindung führt Glutamat zu einer intrazellulären Akkumulation von Wasser, Natrium-, Calcium- und Chlorid- Ionen und so zu einer Zellschwellung mit Ausprägung eines zytotoxischen Hirnödems (Moro *et al.*, 2004). Dies führt zu einer Steigerung des intrakraniellen Drucks mit vaskulären Kompressionen und damit weiterer Abnahme der Perfusion (Moro *et al.*, 2004).

Vor allem die intrazelluläre Konzentrationserhöhung der Calciumionen setzt darüber hinaus verschiedene zytotoxische Mechanismen in Gang, die letztlich zur Apoptose der Zellen führen (Dirnagl *et al.*, 1999).



**Abb. 2: Exzitotoxizität**

Diese Abbildung zeigt die pathophysiologischen Mechanismen im Rahmen der exzitatorischen Phase nach einem Hirninfarkt (modifiziert nach Gupta und Chauhan, 2011).

### 1.1.2 Inflammation

Durch vermehrten Zelluntergang, freiwerdende Blutproteine wie zum Beispiel Thrombin (Nishino *et al.*, 1993) und Fibrinogen (Ryu *et al.*, 2009) wird innerhalb weniger Stunden eine lokale Entzündungsreaktion initiiert. Diese führt nach der initialen ischämischen Gewebeschädigung zu einer protrahierten Phase der sekundären Neurodegeneration (Dirnagl, 2012). Hierbei werden einerseits residente Mikrogliazellen, also Gewebsmakrophagen, und Astrozyten aktiviert, andererseits aber auch hämatogene Zellen rekrutiert (Kawano *et al.*, 2012).

Die Aktivierung residenter Zellen führt zur Produktion zahlreicher proinflammatorischer Zytokine wie Tumor Nekrose Faktor (TNF) $\alpha$  und Interleukin

(IL)-1 $\beta$  (Zhang *et al.*, 1998, Moskowitz *et al.*, 2010). Durch diese werden Adhäsionsmoleküle an die Endothelzelloberfläche transloziert, die zusammen mit Integrinen die Einwanderung von Leukozyten aus dem Blutstrom ermöglichen (Zhang *et al.*, 1998, Haring *et al.*, 1996, Lindsberg *et al.*, 1996). Nach den zuerst einwandernden neutrophilen Granulozyten folgen Monozyten und nach ein bis zwei Tagen Lymphozyten (Iadecola und Anrather, 2011, Gelderblom *et al.*, 2009). Mikroglia und hämatogene Makrophagen phagozytieren abgestorbene Zellen und halten durch weitere Produktion von Zytokinen die inflammatorische Reaktion aufrecht (Schilling *et al.*, 2003). Gleichzeitig induziert die Phagozytose in den Makrophagen und Gliazellen die Bildung von *Transforming growth factor*- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) und IL-10 (Nathan und Ding, 2010), beides immunregulatorische Zytokine mit sowohl pro-, aber auch antiinflammatorischer und neuroprotektiver Wirkung (Taylor *et al.*, 2006, Iadecola und Anrather, 2011). Shechter *et al.* konnten zeigen, dass eingewanderte Makrophagen nach einem Hirninfarkt durch Sekretion von IL-10 antiinflammatorische Effekte vermitteln (Shechter *et al.*, 2009).

Passend zu der sowohl pro- als auch antiinflammatorischen Funktion der Makrophagen konnte bei genauerer Betrachtung eine weitergehende Differenzierung von Makrophagen und Monozyten, den Vorläuferzellen der Makrophagen, nachgewiesen werden (Geissmann *et al.*, 2003). Beide Zellgruppen zeigten hierbei abhängig von den exprimierten Oberflächenrezeptoren sehr heterogene Funktionen. Geissmann *et al.* konnten diesbezüglich zwei morphologisch sowie funktionell unterschiedliche Monozytensubpopulationen in Mäusen unterscheiden. Sie identifizierten kurzlebige Monozyten mit einer hohen Dichte von Typ 2 C-C Chemokin Rezeptoren (CCR2) und Ly6c Antigen sowie einer geringen Dichte von CX3CR1 Chemokin Rezeptoren, die vor allem im Rahmen entzündlicher Prozesse beobachtet wurden. Im nicht-entzündlich veränderten Milieu fiel dagegen ein konträres Antigenprofil mit einer niedrigen Dichte von CCR2 und Ly6c Antigen sowie einer hohen Dichte von CX3CR1 Rezeptoren der Monozyten auf (Geissmann *et al.*, 2003).

Auch bei den Makrophagen konnten Milieu-spezifische Subpopulationen mit unterschiedlichen Funktionen unterschieden werden. Die Stimulation durch Lipopolysaccharid oder proinflammatorische Zytokine wie Interferon- $\gamma$  induzierte

M1-Typ Makrophagen (Ding *et al.*, 1988). Diese produzieren vor allem proinflammatorische Zytokine, wie z.B. TNF $\alpha$  und IL-1 $\beta$  (Shapouri-Moghaddam *et al.*, 2018). Eine Stimulation mit z. B. IL-4 hingegen bewirkte die Differenzierung in M2-Typ Makrophagen, die über die Produktion von z.B. TGF- $\beta$  und IL-10 (Shapouri-Moghaddam *et al.*, 2018), eine Funktion im Rahmen der Immunregulation und Wundheilung einnehmen (Mosser und Edwards, 2008). Es wird allerdings vermutet, dass M1 und M2-Typ Makrophagen nur die Extremausprägungen eines Kontinuums von Aktivierungszuständen sind (Xue *et al.*, 2014, Mosser und Edwards, 2008). Insgesamt scheinen also verschiedene kontextabhängige Faktoren entscheidend für die unterschiedliche Makrophagendifferenzierung und -funktion zu sein, die den Wechsel einer frühen inflammatorischen Reaktion in ein regeneratives Milieu bedingen. Im Rahmen der Wundheilung beim Hirninfarkt scheinen antiinflammatorisch bzw. reparativ differenzierte Makrophagen vor allem über TGF- $\beta$ 1 entscheidend an der Ausbildung einer funktionsfähigen Narbe beteiligt zu sein (Gliem *et al.*, 2012).

### 1.1.3 Narbenbildung und Regeneration

Die Bildung einer Narbe nach einem Hirninfarkt hat konträre Effekte. Zum einen dient sie der Eindämmung des Schadens mit der inflammatorischen Reaktion, um das umliegende, gesunde Gewebe zu schützen und der Wiederherstellung der Blut-Hirn-Schranke (BHS) (Kawano *et al.*, 2012).

Gleichzeitig bildet die Narbe eine Barriere und verhindert so die Regeneration der Axone. Zusätzlich werden inhibitorische Zytokine freigesetzt, die ebenfalls die Axonregeneration inhibieren (Kawano *et al.*, 2012).

Man unterscheidet bei der gebildeten Narbe zwei verschiedene Anteile. Der eine wird durch reaktive Astrozyten und der andere wahrscheinlich durch meningeale Fibroblasten gebildet (Kawano *et al.*, 2012, Shearer und Fawcett, 2001).

## 1.2 Astrogliale Narbe

Die Reaktion der Astrozyten auf einen Stimulus wie zum Beispiel einen Hirninfarkt oder eine Entzündungsreaktion nennt man reaktive Astroglie. Diese erfordert eine Änderung der Zellinteraktion mit der extrazellulären Matrix und eine Neuorganisation des Zytoskeletts (Ellison *et al.*, 1998).

Im Rahmen der Neuorganisation des Zytoskeletts spielen vor allem die Zentrosome eine entscheidende Rolle. Sie sorgen für die Orientierung des Zellkerns, des Golgi-Apparates und des endoplasmatischen Retikulums und führen so zu einer Zellpolarisation (Peng *et al.*, 2013). Während der Gehirnentwicklung polarisieren Astrozyten, um radiäre Gliazellen zu bilden (Peng *et al.*, 2013). Ein vergleichbarer Prozess zeigt sich auch nach Verletzungen im adulten Gehirn, in dem die Astrozyten polarisieren, um Fortsätze zum Aufbau einer glialen Narbe zu bilden (Peng *et al.*, 2013).

Histomorphologisch findet man innerhalb weniger Stunden nach der Verletzung hypertrophierte Astrozyten mit verdickten Fortsätzen und einer erhöhten Immunreaktivität des sauren Gliafaserproteins (GFAP) als Zeichen der reaktiven Astroglie (Sibson *et al.*, 2008). Hierbei handelt es sich um einen dynamischen, graduierten Prozess mit unterschiedlichen Effekten (Faulkner *et al.*, 2004, Brambilla *et al.*, 2014), abhängig von der Schwere der Verletzung und der hiervon aktivierten Signalkaskaden (Sofroniew, 2009). Zudem zeigte sich in verschiedenen Studien eine Heterogenität der Astroglie abhängig von der geschädigten Region des zentralen Nervensystems (ZNS). Die Extremform dieses Prozesses entspricht der astroglialen Narbenbildung (Sofroniew, 2009).

Während diese kontextabhängige Astroglie im Rahmen einer bakteriellen Infektion eher negative Effekte zeigte, wird nach einem Schlaganfall die Genexpression der Astrozyten in Richtung Protektion und Reparatur hochreguliert (Zamanian *et al.*, 2012), sodass sich auch hier je nach Stimulus pro- oder antiinflammatorische Botenstoffe bzw. erhöhter oder reduzierter oxidativer Stress als Zeichen des konträren Wirkspektrums zeigen.

Nach einem Hirninfarkt formieren sich die aktivierten Astrozyten vor allem um die Verletzung herum und sind nicht im Zentrum der Verletzung selbst zu finden (Kawano *et al.*, 2012). So gelingt nach circa einer Woche die Eindämmung der

Verletzung durch Ausbildung einer glialen Narbe (Mathewson und Berry, 1985, Yoshioka *et al.*, 2010). Pekny *et al.* konnten zeigen, dass in GFAP *knock-out* Mäusen die Bildung der glialen Narbe nach einem Hirninfarkt beeinträchtigt und die Blutungsrate erhöht war (Pekny *et al.*, 1999).

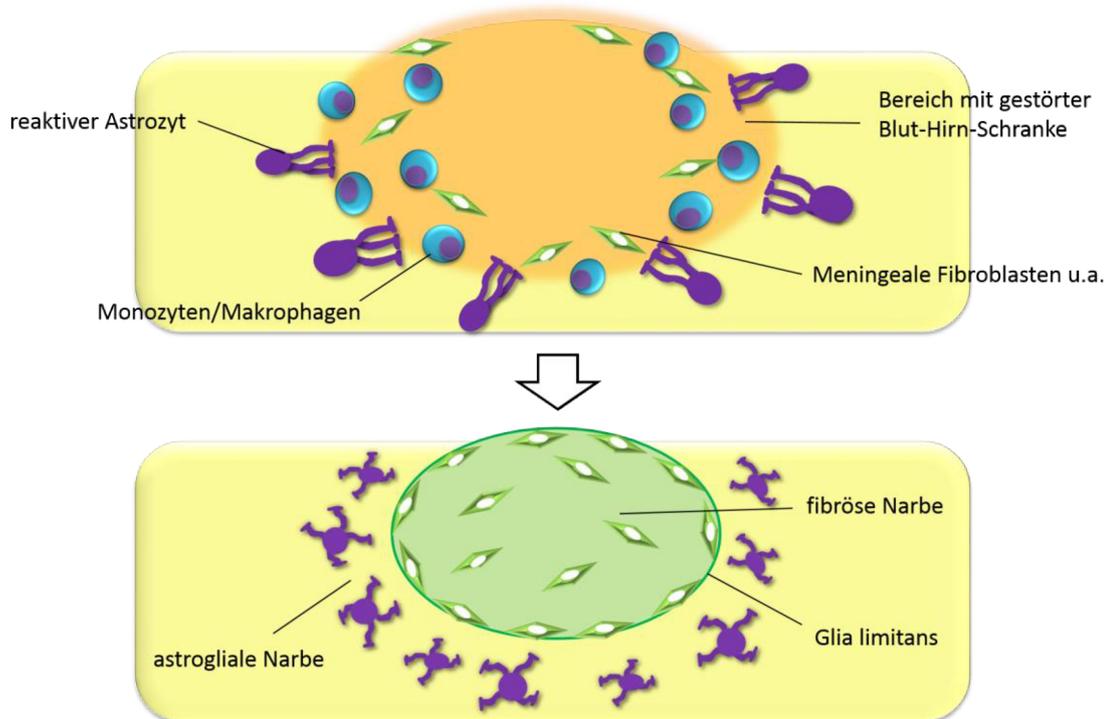
Die Eindämmung des verletzten Areals mit gestörter BHS-Funktion schützt das gesunde Gewebe durch den Erhalt der Homöostase (Kawano *et al.*, 2012, Sofroniew, 2009): Die Neurone werden geschützt, das Einwandern von Leukozyten verhindert und die Reparatur der BHS unterstützt (Faulkner *et al.*, 2004, Bush *et al.*, 1999). Auch in weiteren Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Ablation von reaktiven Astrozyten nach einer ZNS Verletzung zu einer gestörten Narbenbildung und vermehrtem Einsprossen von Nervengewebe in das verletzte Gewebe, Ausbreitung inflammatorischer Zellen sowie vermehrtem interstitiellen Ödem führt (Bush *et al.*, 1999). Faulkner *et al.* konnten ebenfalls zeigen, dass nach Astrozytenablation mehr Makrophagen-ähnliche Zellen zu finden waren, es zu einer Volumenvergrößerung des verletzten Gewebes kam und die Regeneration der BHS beeinträchtigt war (Faulkner *et al.*, 2004), sodass auch in diesen Arbeiten eine protektive und regenerative Rolle der Astrozyten gefolgert wurde.

Gerade das Hirnödem ist eine der Hauptdeterminanten für das klinische *outcome* nach einem Schlaganfall (Dirnagl *et al.*, 1999). Hierbei spielen Astrozyten über den Aufbau der BHS und der Ödemresorption eine entscheidende Rolle (Bush *et al.*, 1999). Im unverletzten Gehirn bilden Astrozyten mit dem Aquaporin-4 Kanal (AQP4) auf den perivaskulären Astrozytenendfüßen einen wichtigen Bestandteil der BHS. In verschiedenen Untersuchungen konnte eine Hochregulation von AQP4 an den Endfüßen der Astrozyten im Rahmen der reaktiven Astroglieose gezeigt werden (Neely *et al.*, 1999, Auguste *et al.*, 2007). Diese Hochregulation war auch im Bereich einer glialen Narbe nachweisbar (Saadoun *et al.*, 2005).

### 1.3 Fibröse Narbe

Nach einer Gehirnverletzung werden weitere Zellen, wie zum Beispiel meningeale Fibroblasten aktiviert und migrieren in das Zentrum der Verletzung (Kawano *et al.*, 2012). Ungefähr am siebten Tag nach der Verletzung erfolgt eine Aktivierung der Fibroblasten, sie proliferieren und sezernieren extrazelluläre Matrixproteine wie Collagen-4, Fibronectin und Laminin (Kawano *et al.*, 2012). Parallel zu dieser Aktivierung ließ sich in PCR-Untersuchungen ein Anstieg des Zytokins TGF- $\beta$ 1 nachweisen, welches eine wichtige Rolle in Fibrosierungsprozessen einnimmt (Ellison *et al.*, 1999). Logan *et al.* konnten in ihren Experimenten zeigen, dass eine Behandlung mit Antikörpern gegen TGF- $\beta$ 1 die Größe der fibrotischen Narbe erheblich reduziert, sodass davon auszugehen ist, dass TGF- $\beta$ 1 eine Schlüsselrolle bei der Aktivierung der Fibroblasten einnimmt (Logan *et al.*, 1994).

Circa 14 Tagen nach einem Hirninfarkt haben die Fibroblasten gemeinsam mit den Astrozyten eine neue Basalmembran, die *Glia limitans*, gebildet (Mathewson und Berry, 1985, Shearer und Fawcett, 2001). So wird auch vom Zentrum der Verletzung her das gesunde Gewebe gegen das verletzte und die eingewanderte Leukozyten abgedichtet (Abb.3).



**Abb. 3: Narbenbildung nach einem Hirninfarkt**

Schematische Darstellung der Ausbildung der astroglialen und fibrösen Narbe nach einem Hirninfarkt. Im Rahmen der Ischämie kommt es zur Störung der Blut-Hirn-Schranke und zur Einwanderung zum Beispiel von Makrophagen und meningealen Fibroblasten in das infarzierte Gewebe. Die Zellen formieren sich dabei vor allem im inneren Randbereich der Läsion und bilden im Verlauf eine fibröse Narbe. Zudem kommt es vor allem im äußeren Randbereich der ischämischen Region zur Aktivierung der umgebenen Astrozyten, die im Verlauf eine astrozytäre Narbe ausbilden. Hierbei entsteht durch beide Narbenanteile gemeinsam eine neue Basalmembran, die *Glia limitans* (modifiziert nach Kawano *et al.*, 2012).

## 1.4 Osteopontin

Osteopontin (OPN) ist ein saures Phosphoglykoprotein von 41 kDa, das ursprünglich in der Knochenmatrix und anschließend in der Niere, Plazenta und Blutgefäßen entdeckt wurde (Wang *et al.*, 1998). Es konnte bei Entzündungen in verschiedenen Organen nachgewiesen werden und hat eine Funktion in einer großen Anzahl physiologischer und pathologischer Mechanismen (Wang *et al.*, 1998). Hierbei spielt es vor allem eine Rolle beim Erhalt und der Rekonfiguration der Gewebeintegrität bei entzündlichen Prozessen (Denhardt *et al.*, 2001).

### 1.4.1 Vorkommen

In Zellkulturen wird OPN vor allem von Entzündungszellen wie Makrophagen, T-Lymphozyten und Natürlichen Killer-Zellen produziert (Denhardt *et al.*, 2001). Darüber hinaus haben verschiedene Untersuchungen gezeigt, dass OPN in glatter Muskulatur, Skelettmuskulatur, Endothelzellen und myokardialen Fibroblasten induzierbar ist (Giachelli *et al.*, 1998). Die Bildung wird überwiegend durch inflammatorische Zytokine wie IL-1, TNF $\alpha$  und Wachstumsfaktoren wie *Platlet - derived growth factor* (Wang *et al.*, 1998, Denhardt *et al.*, 2001) stimuliert.

Im Rahmen pathologischer Prozesse zeigten sich erhöhte OPN-Spiegel bei Autoimmunerkrankungen, arteriosklerotischen Plaques, Myokardverletzungen, renaler tubulärer Fibrose (Wang *et al.*, 1998) und nach einem Hirninfarkt (Ellison *et al.*, 1998, Wang *et al.*, 1998).

Nach einer zerebralen Verletzung konnte OPN erstmals nach 24 Stunden detektiert werden (Ellison *et al.*, 1998). Verschiedene Arbeitsgruppen postulierten anhand einer Kolo-kalisation von OPN und CD68 in Doppelfärbungen, dass OPN nach einem Hirninfarkt vor allem von Läsions-assoziierten Makrophagen gebildet wird (Kury *et al.*, 2005, Denhardt *et al.*, 2001). Eine definitive Aussage darüber, welche Zellart für die OPN-Produktion vornehmlich verantwortlich ist (hämatogene Makrophagen oder residente Mikroglia), ist mittels immun-histochemischer Verfahren jedoch nicht sicher möglich, da bislang keine mikroglia-spezifischen Antikörper verfügbar sind. Eine Möglichkeit zur Differenzierung der beiden Zellarten ist die Verwendung von knochenmarkchimären CCR2<sup>-/-</sup>-Mäusen bzw. Mäusen deren periphere Makrophagen durch Injektion von Clodronat-haltigen Liposomen (CloLip) depletiert wurden (Gliem *et al.*, 2012), da in beiden Fällen die hämatogen einwandernden Monozyten/Makrophagen stark reduziert werden, während ZNS-residente Mikrogliazellen unverändert bleiben.

### 1.4.2 Funktion

OPN hat zytokin-ähnliche, chemotaktische und pro-adhäsive Eigenschaften und spielt in vielen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen eine wichtige Rolle. Erstmals entdeckt wurde es in seiner Funktion bei der Mineralisation der Knochmatrix und Stimulation der Osteoklasten (Giachelli *et al.*, 1998). In weiteren Studien zeigte sich, dass OPN vor allem in entzündlichen und regenerativen Prozessen wichtige Funktionen einnimmt:

So induziert beispielsweise die intradermale Injektion die Akkumulation von Makrophagen (Giachelli *et al.*, 1998). Zudem konnten Rollo *et al.* zeigen, dass OPN an der Regulation der Makrophagenaktivierung beteiligt ist und über Hemmung der induzierbaren Stickstoffmonoxidsynthase einen wichtigen zytotoxischen Mediator herunterreguliert (Rollo *et al.*, 1996). Des Weiteren konnte OPN von mehreren Arbeitsgruppen als modulierender Faktor im Rahmen der kutanen Narbenbildung identifiziert werden (Mori *et al.*, 2008, Lenga *et al.*, 2008).

Bezüglich der Funktion des OPN beim Hirninfarkt konnte gezeigt werden, dass es in OPN<sup>-/-</sup>-Mäusen zu einer gesteigerten sekundären Neurodegeneration im Bereich des Thalamus kommt (Schroeter *et al.*, 2006, Maetzler *et al.*, 2010). Doyle *et al.* konnten zeigen, dass die nasale Gabe von OPN das Infarktvolumen bei Mäusen um 28% reduziert und folgerten daher einen protektiven Effekt von OPN im Rahmen eines Hirninfarkts (Doyle *et al.*, 2008).

### 1.4.3 Rezeptoren

OPN vermittelt seine Effekte über Interaktionen mit einer Vielzahl von Oberflächenrezeptoren, zu denen verschiedene Integrin Rezeptoren ( $\alpha\beta1$ ,  $\alpha\beta3$ ,  $\alpha\beta5$ ,  $\alpha\beta6$ ,  $\alpha4\beta1$ ,  $\alpha5\beta1$ ,  $\alpha8\beta1$ , sowie  $\alpha9\beta1$ ) und CD44 gehören (Ellison *et al.*, 1998). Hierbei wird die Zelladhäsion vor allem über die Integrin Rezeptoren  $\alpha\beta1$  und  $\alpha\beta5$  vermittelt, während  $\alpha\beta3$  die Zellmigration vermittelt (Ellison *et al.*, 1999). Die Bindung an Integrinrezeptoren erfolgt über eine Arginin-Glycin Asparaginsäure (RGD)-Sequenz (Ellison *et al.*, 1998).

Als weitere Bindungsstelle stehen *cluster of differentiation* (CD)44 Oberflächenmoleküle zur Verfügung, die über einer RGD-unabhängigen Bindung ebenfalls zur Zelladhäsion beiträgt (Weber *et al.*, 1996, Zohar *et al.*, 2000).

## **1.5 Ziele der Arbeit**

In Deutschland ist der ischämische Schlaganfall eine der häufigsten Todesursachen und häufige Ursache bleibender neurologischer Defizite (Busch *et al.*, 2013). Neben verschiedenen Verfahren der frühen Gefäßrekanalisation sind keine kausalen Therapieansätze etabliert, die das Outcome nach einem Schlaganfall verbessern. Daher hat die Erforschung der pathophysiologischen Vorgänge, die im Subakutstadium nach einem ischämischen Schlaganfall einsetzen, weiterhin einen großen Stellenwert für die Entwicklung neuer Therapien.

Ziel dieser Arbeit war es, die zelluläre Quelle und funktionelle Rolle von OPN als einem wichtigen Entzündungsmediator nach einem Hirninfarkt aufzuklären und damit zu einem besseren Verständnis adaptiver Prozesse im Subakutstadium der Läsionspathogenese beizutragen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Präparateauswahl und -herstellung

In dieser Arbeit wurden die Gehirne 20 - 25 g wiegender, 6 bis 12 Wochen alter C57BL/6 Mäuse am sechsten Tag nach experimentellem Hirninfarkt untersucht. Alle zugrundeliegenden Tierversuche waren bereits im Vorfeld dieser Arbeit durch Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Michael Gliem durchgeführt worden (Tierversuchsnummer: AZ 50.05.-230-7/05 (LANUV), G7/05 (ZETT)).

Es wurden hierbei zunächst vergleichend Gehirne von OPN *knock-out*-Mäusen (OPN<sup>-/-</sup>) (Liaw *et al.*, 1998) und den korrespondierenden Wildtyp-Mäusen (OPN<sup>+/+</sup>) untersucht.

Zusätzlich wurden Wildtyp(WT)-Mäuse untersucht, denen CloLip (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) intraperitoneal injiziert worden waren, um selektiv zirkulierende phagozytische Zellen zu depletieren (Gliem *et al.*, 2012). Als Kontrolle dienten hierbei WT-Mäuse, denen Liposomen mit Phosphat gepufferter Kochsalzlösung (*Phosphat buffered saline*, PBS) intraperitoneal injiziert worden waren.

Des Weiteren wurden Knochenmarkchimäre Mäuse (Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA (Gliem *et al.*, 2012, Gliem *et al.*, 2015) untersucht, die nach vollständiger Knochenmarkelimination durch fraktionierte Bestrahlung mit insgesamt 10 Gy ein Spenderknochenmark aus CCR2<sup>-/-</sup>-Mäusen erhielten (CCR2<sup>-/-</sup> -> WT(CD45.1)). Somit wiesen diese Mäuse eine selektive Defizienz von CCR2 auf Zellen auf, die sich aus dem Knochenmark ableiten, während die Expression in ZNS-residenten Zellen auf WT-Niveau blieb. Als Kontrolle dienten Knochenmarkdepletierte CD45.1-positive Mäuse, denen CD45.2-positive Wildtypknochenmarkstammzellen transplantiert worden waren (WT(CD45.2) -> WT(CD45.1)) und damit eine unveränderte Expression von CCR2 auf zirkulierenden Zellen aufwiesen (Gliem *et al.*, 2012, Gliem *et al.*, 2015).

In allen genannten Mäusen wurden, wie bereits zuvor beschrieben, umschriebene Hirninfarkte durch Photothrombose kortikaler Gefäße induziert (Schroeter *et al.*, 2002). Dazu wurde den Mäusen der Farbstoff Bengalrosa intraperitoneal appliziert und ein umschriebenes Hirnareal mittels eines auf die

frei präparierte Schädelkalotte gesetzten Kaltlichtleiters mit Weißlicht beleuchtet. Bengalrosa induziert im Bereich des Lichtkegels eine photochemische Reaktion mit Bildung freier Sauerstoffradikale, die das Endothel schädigen und als Folge zu Thrombosen in den kortikalen Mikrogefäßen führen. Für die histologischen Untersuchungen wurden die Tiere transkardial mit 4%igem Paraformaldehyd perfundiert, die Gehirne entnommen und anschließend in Paraffin eingebettet.

Für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet und die Gehirne nativ entnommen.

## **2.2 Histologische Untersuchungen**

### 2.2.1 Anfertigung der Schnittpräparate

Die Mäusegehirne lagen in Paraffinblöcken eingebettet vor. Aus jedem Paraffinblock wurden mithilfe eines Mikrotoms (Mikrom HM355S, Mikrom International GmbH, Walldorf, Deutschland) ca. 100 µm dicke Gewebeschnitte angefertigt. Anschließend wurden diese in ein 38 °C warmes Wasserbad gegeben und möglichst glatt auf Sialin beschichtete Objektträger (Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda Königshofen, Deutschland) übertragen. Danach wurden die Objektträger über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet.

### 2.2.2 Vorbereitung der Schnittpräparate

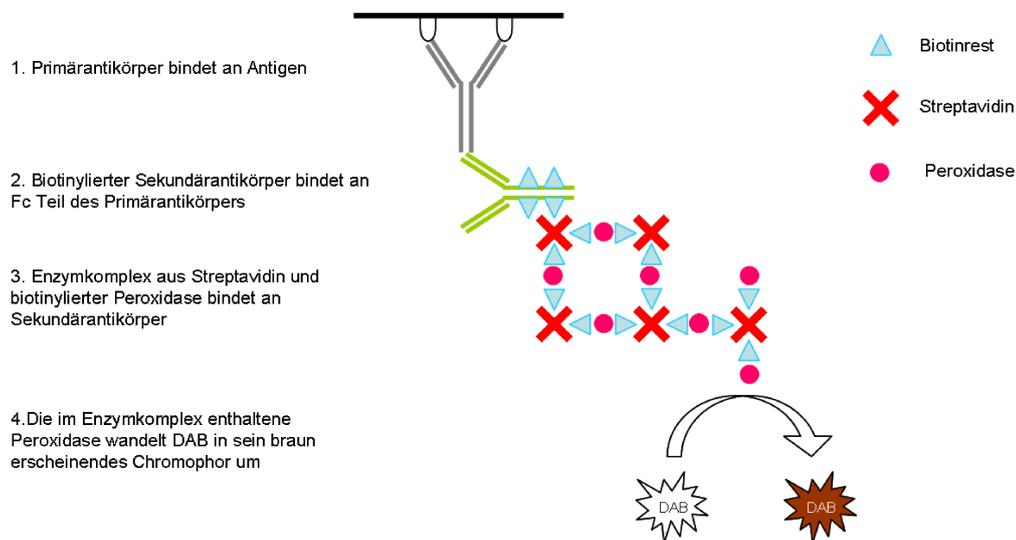
Zunächst wurden die Schnitte zweimal 15 min in 100 % Xylol gegeben, um das Paraffin herauszulösen. Darauf folgte die Rehydrierung der Präparate für jeweils 2 min durch eine absteigende Ethanolverdünnungsreihe (100 %, 100 %, 90 %, 70 %, 50 %) (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland).

### 2.2.3 Immunhistochemie

#### Allgemeine Beschreibung der Färbung

Alle immunhistochemischen Färbungen wurden nach der Streptavidin-Biotin-Complex (ABC)-Methode (Guesdon *et al.*, 1979) durchgeführt (Abb. 4).

Hierbei wird durch Bindung eines Antikörpers an das zu untersuchende Zielantigen über verschiedene Schritte eine farbliche Darstellung dieses Antigens ermöglicht.



**Abb. 4: Immunhistochemische Färbereaktion**

Schematische Darstellung der immunhistochemischen Färbung nach der Streptavidin-Biotin-Komplex-Methode.

Angelehnt an DakoCytomation, Handbuch Immunhistochemische Färbungen (Boenisch, 2003).

**Abk:** DAB: 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid.

#### Färbeprotokoll Immunhistochemie

Nachfolgend wird das Färbeprotokoll der immunhistochemischen Färbungen beschrieben. Die genauen Angaben zu den jeweils verwendeten Materialien liefert Tabelle 1.

Am ersten Tag wurden die Schnitte nach der Entparaffinierung und Rehydrierung für 5 min in ein Puffer-Bad gegeben. Anschließend erfolgte eine 30-minütige Inkubation mit 0,3%iger Wasserstoffperoxid-Lösung zur Inaktivierung

der endogenen Peroxidase. Nach einem weiteren Pufferbad von 5 min erfolgte bei einzelnen Primärantikörpern eine Antigendemaskierung (Tabelle 1). Hierzu wurden die Präparate mit 0,1%iger Proteaselösung (Protease Type XXIV, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) bei 37 °C für 7 min inkubiert und anschließend langsam abgekühlt. Es folgte wieder ein Waschschrift in einem Pufferbad. Im nächsten Schritt wurde Normalserum, dem Herstellungstier der jeweiligen Sekundärantikörper entsprechend, auf die Objektträger gegeben, um unspezifische Bindungen zu blockieren. Nach 30 min wurde der Primärantikörper bzw. PBS im Rahmen der Färbung gegen Immunglobulin G (IgG) hinzugegeben und die Schnitte zur Inkubation über Nacht bei 4 °C gelagert.

Am zweiten Tag wurden die Präparate zunächst für 5 min in ein Pufferbad gegeben. Daraufhin erfolgte eine Inkubation mit dem jeweilig entsprechenden Sekundärantikörper für 30 min. Nach einer kurzen Spülung in einer Pufferlösung erfolgte die Zugabe des Avidin-Biotin-Komplexes (Vectastain® Elite ABC Kit, Vector Laboratories, Burlingame, USA) für 30 min. Zur Färbung wurde anschließend 3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid (DAB) (Sigma Chemie, Deisenhofen, Deutschland) mit 1%iger Wasserstoffperoxidlösung aktiviert und die Schnitte damit für 10 min inkubiert. Abschließend erfolgte die Einbettung der Präparate. Hierzu wurden die Präparate nach einer kurzen Spülung in *aqua dest.* in ein je 2-minütiges Bad in einer aufsteigenden Ethanolverdünnungsreihe (50 %, 70 %, 90 %, 100 %, 100 %) (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) gegeben. Abschließend erfolgte ein 15-minütiges Bad in Roti®Histol (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland). Zur Konservierung wurden je 2 Tropfen Entellan®neu (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) auf die Schnitte gegeben und diese dann unter einem Deckglas (Thermo Fisher Scientific Gerhard Menzel B.V. & Co. KG, Braunschweig, Deutschland) eingebettet.

## Material und Methoden

Primärantikörper	Firma	Spezies/ Klonalität	Verdün- nung	Antigen- demaskierung
CD68	AbDSerotec, Großbritannien	Ratte/ monoklonal	1:1000	keine
vWF	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark	Kaninchen/ polyklonal	1:1000	Protease
Collagen-4	MeridianLifeScience, Memphis USA	Ziege/ polyklonal	1:500	Protease
GFAP	Sigma Aldrich, St- Louis, USA	Kaninchen/ polyklonal	1:500	keine
OPN	R&D Systems, Minneapolis, USA	Ziege/ polyklonal	1:1000	keine
Aquaporin-4	Sigma Aldrich, St- Louis, USA	Kaninchen/ polyklonal	1:100	keine
Mac-3	BD Pharmingen, Franklin Lakes, USA	Ratte/ monoklonal	1:500	keine
Sekundärantikörper	Firma	Spezies	Verdünnung	
Ratte	Vector Laboratories, Burlingame, USA	Kaninchen biotinyliert	1:200	
Ziege	Vector Laboratories, Burlingame, USA	Pferd biotinyliert	1:200	
Kaninchen	Vector Laboratories, Burlingame, USA	Ziege biotinyliert	1:200	
Maus	Vector Laboratories, Burlingame, USA	Ziege biotinyliert	1:200	
Normalseren	Firma	Bezeichnung		
Kaninchen	Vector Laboratories, Burlingame, USA	Normal Rabbit Serum Blocking Solution (S-5000)		
Pferd	Vector Laboratories, Burlingame, USA	Normal Horse Serum Blocking Solution (S-2000)		
Ziege	Vector Laboratories, Burlingame, USA	Normal Goat Serum Blocking Solution (S-1000)		

**Tabelle 1: Materialien der immunhistochemischen Färbungen**

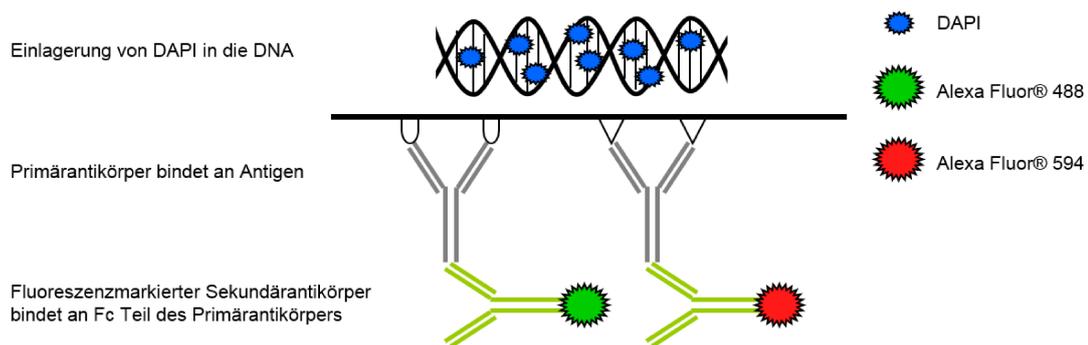
Diese Tabelle zeigt die verwendeten Antikörper mit Herstellerangaben im jeweiligen Verdünnungsverhältnis und die verwendeten Normalseren. Außerdem wird angegeben, ob eine Demaskierung des entsprechenden Antigens nötig war und wie diese erfolgte.

**Abk:** CD: *cluster of differentiation*, vWF: von Willebrand-Faktor, GFAP: saures Gliafaserprotein, OPN: Osteopontin, Mac-3: Makrophagen Antigen-3.

## 2.2.4 Doppel-Immunfluoreszenz

### Allgemeine Beschreibung der Färbung

Bei der Doppel-Immunfluoreszenzfärbung werden die zu untersuchenden Zielantigene mithilfe von zwei Primärantikörpern und jeweils entsprechenden, farblich unterschiedlichen fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern sichtbar gemacht (Abb. 5). Zusätzlich erfolgt eine Darstellung der Zellkerne mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol-dihydrochlorid (DAPI), welches sich in Adenin und Thymin reiche Regionen der DNA einlagert und im kurzwelligen Bereich des sichtbaren Lichtspektrums emittiert (461 nm, blau). So lassen sich anschließend Rückschlüsse auf die zelluläre Lokalisation der zu untersuchenden Antigene ziehen. In den folgenden Experimenten wurden neben DAPI Alexa Fluor® 488 (488 nm, grün) und Alexa Fluor® 594 (594 nm, rot) als Fluoreszenzfarbstoffe verwendet.



**Abb. 5: Doppel-Immunfluoreszenzfärbung**

Diese Abbildung zeigt das Prinzip der Doppel-Immunfluoreszenzfärbung.

**Abk.:** DAPI: 4',6-Diamidin-2-phenylindol-dihydrochlorid, DNA: *Desoxyribonucleic Acid*.

### Färbeprotokoll Immunfluoreszenz

Nach Entparaffinierung und Rehydrierung wurden die Schnitte in ein 5-minütiges PBS-Pufferbad gegeben. Hierauf folgte die Inkubation in einem Normalserum für 30 min (Normal Donkey Serum, Invitrogen AG, Eugene, USA), um unspezifische Bindungen zu blockieren. Anschließend erfolgte die Zugabe von zwei Primärantikörpern mit erneuter Inkubation über Nacht bei 4 °C.

Am nächsten Tag erfolgte zunächst eine Spülung in einem PBS-Pufferbad. Danach wurden die Schnitte für 2 h in einem Gemisch aus zwei gegen die

verwendeten Primärantikörper gerichteten Sekundärantikörper unter Lichtabschluss inkubiert. Es folgte eine kurze Spülung in einem PBS-Pufferbad ebenfalls unter Lichtabschluss. Im nächsten Schritt wurde die Schnitte für 10 min in einer DAPI-Lösung (Sigma Aldrich, St- Louis, USA) inkubiert. Nach einer kurzen Spülung in einem PBS-Pufferbad wurden die Schnitte abschließend mit Flouromount (Fluoromount-G®, SouthernBiotech, Birmingham, USA) eingebettet.

Primärantikörper	
(Verdünnung)	Herstellerangabe
Mac-3 (1:500)	Monoclonal Purified Rat Anti-Mouse Mac-3 (550292), BD Pharmingen, Franklin Lakes, USA
OPN (1:1000)	Mouse OPN Affinity Purified Polyclonal AB, Goat IgG (AF 808), R&D Systems, Minneapolis, USA
CD31 (1:100)	Anti-Mouse CD31 (PECAM-1) Rat Monoclonal Antibody (DIA 310), Dianova, Hamburg, Deutschland
Aquaporin-4 (1:500)	Affinity isolated AQP4 Rabbit Polyclonal Antibody (A5971), Sigma Aldrich, St- Louis, USA
Doublecortin (hDXC) (1:500)	Polyclonal goat anti-human doublecortin Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX
Sekundärantikörper	
(Wellenlänge)	Herstellerangabe
Anti-Ratte (488 nm)	Donkey F(ab') <sub>2</sub> polyclonal Secondary Antibody to Rat IgG - H&L (Alexa Fluor® 488) (A-21208), Invitrogen AG, Eugene, USA
Anti-Ratte (594 nm)	Alexa Fluor® 594 Donkey Anti-Rat IgG (H&L) Invitrogen AG, Eugene, USA
Anti-Ziege (488 nm)	Donkey polyclonal Secondary Antibody to Goat IgG - H&L, (Alexa Fluor® 488), Invitrogen AG, Eugene, USA
Anti-Kaninchen (594 nm)	Donkey polyclonal Secondary Antibody to Rabbit IgG - H&L (Alexa Fluor® 594), Invitrogen AG, Eugene, USA

**Tabelle 2: Materialien der Immunfluoreszenzfärbungen**

Diese Tabelle zeigt die Herstellerangaben der verwendeten Antikörper, deren Dilutionsverhältnis sowie die Wellenlänge des Fluoreszenzfarbstoffs.

**Abk:** Mac-3: Makrophagen Antigen-3, OPN: Osteopontin, CD: *cluster of differentiation*, AB: *Antibody*, nm: Nanometer.

### 2.2.5 Bilderstellung und Auswertung

Die gefärbten Schnitte wurden mithilfe des Axioplan 2 Mikroskops und des Axio Vision 2.0 Programms (beides Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) fotografiert. Hierbei wurde jeweils die Randzone des zu untersuchenden Infarktgebietes aufgenommen. Die Analyse der entstandenen Bilder erfolgte mithilfe des Programms Image J 1.42q (National Institutes of Health, USA). Die angefärbten Zellen wurden in den verschiedenen Mausgruppen quantifiziert und miteinander verglichen.

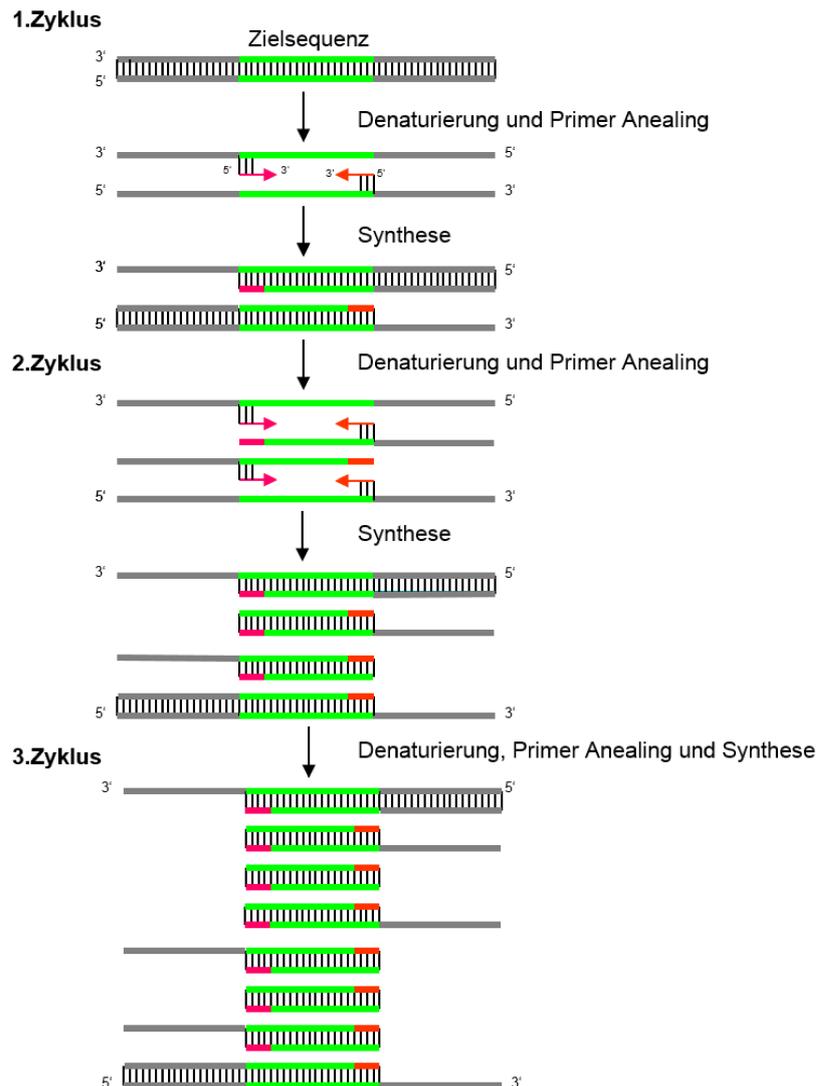
In den Färbungen gegen GFAP wurden die gefärbten Zellen hinsichtlich ihrer Morphologie untersucht. Es wurden zunächst polarisierte von nicht-polarisierten Astrozyten abhängig von ihrer Fortsatzausbildung unterschieden und ausgezählt. Als polarisiert wurden GFAP-positive Astrozyten mit verdickten, zum Infarktgebiet hin orientierten Fortsätzen definiert. Als unpolarisiert wurden GFAP-positive Astrozyten mit unverdickten, ungerichteten Fortsätze definiert. Zusätzlich wurden die Fortsätze per Hand in Image J ausgemessen und durch Vergleich mit dem Maßstab die absolute Länge bestimmt.

Die statistische Auswertung der gewonnenen Daten wurde mithilfe des Programms Prism 5.0 (GraphPad Software, La Jolla, USA) durchgeführt. Dazu diente ein zweiseitiger Student t-Test mit einem 95%igen Konfidenzintervall.

## 2.3 Quantitative reverse-Transkriptase-PCR

### 2.3.1 Allgemeine Beschreibung des Verfahrens

Die Polymerase Kettenreaktion (PCR) ist ein Verfahren zur selektiven Vermehrung einzelner DNA Abschnitte (Mullis und Faloona, 1987). Diese lässt sich in drei Phasen einteilen (Abb. 6).



**Abb. 6: Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion**

Diese Abbildung zeigt eine schematische Darstellung der ersten drei Zyklen einer Polymerase-Kettenreaktion (angelehnt an das Biochemie Praktikumsskript der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf).

Die drei Phasen – Denaturierung, Primer Annealing und Neusynthese – werden zyklisch wiederholt, sodass es zu einer exponentiellen Amplifikation der zu untersuchenden DNA Sequenzen kommt. Das Verfahren der in diesen Experimenten angewandten quantitativen PCR (qPCR oder real-time PCR) ermöglicht zusätzlich zum reinen Nachweis eines Genabschnitts auch eine quantitative Aussage durch Messung des DNA-Gehalts der Probe zum Beispiel durch Zugabe von interkalierenden, fluoreszierenden Farbstoffen, deren Fluoreszenz nach Einlagerung in einen Doppelstrang ansteigt und dieser Anstieg von einem Detektor registriert wird.

Die reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR) ermöglicht außerdem den Nachweis einer Genexpression auf Ebene der Boten-Ribonucleinsäure (*messenger ribonucleic acid*, mRNA). Dabei wird aus den zu untersuchenden Geweben die Gesamt-RNA als Ausgangsmaterial isoliert, die dann mithilfe einer reversen Transkriptase in *complementary* DNA (cDNA) umgeschrieben wird und im Anschluss die oben genannten Phasen einer PCR unter Verwendung genspezifischer Primer durchläuft.

Die qRT-PCR bietet somit die Möglichkeit einer Quantifizierung regulierter Gene durch den Vergleich dieser mit konstitutiv exprimierten Genen. Gemessen wird Hierbei wird die Fluoreszenzstärke der untersuchten cDNA-Sequenz mit einer cDNA-Sequenz sogenannter *house-keeping* Gene verglichen. *House-keeping* Gene kodieren meist für Enzyme des Energiestoffwechsels und werden in relativ konstanten Mengen transkribiert.

### 2.3.2 Aufbereitung der Gewebe

Um die RNA aus den Geweben zu isolieren, wurde die Methode nach Chomczynski und Sacchi angewandt (Chomczynski und Sacchi, 1987). Hierbei wurden 500 µl TrizolReagent (Gibco Life Technologies, Carlsbad, USA) zu den Gewebepräparaten pipettiert und diese dann mithilfe des Homogenisators (Polytron Power Homogenizer PT2100, Kinematica, Luzern, Schweiz) für 30 s homogenisiert. Durch das in TrizolReagent enthaltende Guanidiniumthiocyanat wurden die Zellen lysiert, RNAsen inaktiviert sowie DNA-Moleküle und Proteine in Phenol gelöst.

Im nächsten Schritt erfolgte die Zugabe von je 200 µl Chloroform zu den Proben, die dann nach kurzem Schütteln bei 4 °C für 15 min mit 12000 Umdrehungen zentrifugiert wurden. Nach der Zentrifugation waren 3 Phasen zu unterscheiden: Eine obere, wässrige Phase mit RNA, eine Interphase und eine untere, organische Phase mit DNA. Die obere Phase wurde abpipettiert, die beiden anderen verworfen.

Die RNA wurde aus der wässrigen Phase anschließend durch Zugabe von 500 µl Isopropanol und 1,1 µl Glykogen (Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Deutschland) präzipitiert. Nach 30-minütiger Ruhephase bei Raumtemperatur wurde sie erneut bei 4° C und 12000 Umdrehungen 10 min zentrifugiert, woraufhin die RNA als weißes Pellet präzipitierte. Der flüssige Überstand wurde abgegossen.

Zur Waschung der RNA wurde je 1 ml Ethanol (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) zu den Pellets gegeben und diese für 10 min bei 4 °C mit 10000 Umdrehungen zentrifugiert. Anschließend wurde das Ethanol abpipettiert und die Pellets unter einem Abzug für 20 min getrocknet. Nach dem Trocknen erfolgte die Zugabe von je 30 µl Diethylpyrocarbonat (DEPC)-Wasser (Sigma Chemie, Deisenhofen, Deutschland), das durch kovalente Bindung die Aktivität von RNAsen hemmt. Es folgte eine kurze Zentrifugation für 30 s bei 3000 Umdrehungen. Im nächsten Schritt wurden die Proben für 10 min in einen Thermoblock bei 65 °C inkubiert und danach für 30 min bei -20 °C gelagert.

### 2.3.3 RNA Messung

Die Messung des RNA Gehalts der einzelnen Proben erfolgte mit einem Spektralphotometer (NanoDrop™ 1000, PEQLAB Biotechnologie GMBH, Erlangen, Deutschland). Hierbei wurde die RNA Konzentration aus 1 µl jeder Probe bestimmt. Da Proteine häufig als Verunreinigungen in RNA Proben zu finden sind, berechnete das Gerät automatisch neben der maximalen Absorptionsrate der RNA bei 260 nm auch die maximale Absorptionsrate von Proteinen bei 280 nm. Der Quotient aus diesen beiden Werten (Wert bei 260 nm/Wert bei 280 nm) kann als Maß für die Reinheit einer Probe zur Hilfe genommen werden, wobei Werte größer 1,7 zugelassen wurden.

#### 2.3.4 Reverse-Transkriptase-Reaktion

Für die Herstellung von cDNA wurde zunächst jeweils ein Probenvolumen, welches 1 µg RNA entsprach, mit DEPC-Wasser zu einem Gesamtvolumen von 9 µl aufgefüllt. Anschließend wurden die Proben, nach Beifügung von je 10 µl Primer (Oligo dt20, Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Deutschland), für 10 min bei 70 °C in einen Thermoblock (Trio Thermoblock, Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland) gestellt, um die Sekundärstruktur der RNA aufzuschmelzen. Zur Hybridisierung der Primer wurden die Proben danach für 5 min auf Eis gelegt.

Im nächsten Schritt erfolgte die Zugabe von jeweils 4 µl 5-fach First-strand buffer, 2 µl 0,1 molares Dithiothreitol und 1 µl SuperScript II (SuperScript II™ Reverse Transcriptase, Gibco Life Technologies, Carlsbad, USA), sowie 2 µl 10 µmolare NTP (Desoxynucleotide Triphosphate Set, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) und 1 µl RNAsin® Inhibitor (Promega, Madison, USA).

Abschließend wurden die Proben in einen Thermoblock (Trio Thermoblock, Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland) gegeben und für 5 min bei 37 °C, für 60 min bei 42 °C und für 5 min bei 99 °C inkubiert und danach langsam auf 4 °C abgekühlt. Die nun entstandene cDNA wurde mit jeweils 30 µl *Aqua dest.* verdünnt und bei -20 °C gelagert.

#### 2.3.5 PCR-Reaktion

Als Vorbereitung für die PCR wurden jeweils 1,8 µl des *forward*-Primers und 1,8 µl des *reverse*-Primers (Eurofins Genomics, Ebersberg, Deutschland) in 6,4 µl RNase freies Wasser (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) gegeben. Als *housekeeping* Gen wurde Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) verwendet, wobei hier 0,3 µl *forward*-Primer, 1,8 µl *reverse*-Primer und 7,9 µl RNase freies Wasser vorbereitet wurden. Auf einer PCR Platte (MicroAmp® Fast 96-Well Reaction Plate, Applied Biosystems, USA) wurde nun in jedes Well 1 µl cDNA, 5 µl des Primer-Mix und 24 µl Power SYBR®-Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, USA) pipettiert. Als Kontrolle wurden alle Proben im Doppelansatz bestimmt. Die verwendeten Primer und deren Sequenzen liefert Tabelle 3.

Primer	Sequenz
GAPDH	fwd: AGG TTG TCT CCT GCG ACT T rev: CCA GGA AAT GAG CTT GAC AAA G
OPN	fwd: GTC CCT CGA TGT CAT CCC TG rev: TGA TCA GAG GGC ATG CTC AG
Collagen-4	fwd: TGC CTT ATA GGG ATT CGC GT rev: GCA AAC AGA GGC CAA CGA AG
Interleukin-1 $\beta$	fwd: ACA CTC CTT AGT CCT CGG CCA rev: TGG TTT CTT GTG ACC CTG AGC
TGF- $\beta$ 1	fwd: TGG CTG AAC CAA GGA GAC G rev: GCA GTG AGC GCT GAA TCG A

**Tabelle 3: qRT-PCR-Primer**

Auflistung der verwendeten Primer und deren Bindesequenzen der qRT-PCR

**Abk:** GAPDH: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, OPN: Osteopontin, TGF- $\beta$ 1: *Transforming growth factor- $\beta$ 1*, fwd: *forward*, rev: *reverse*, qRT-PCR: quantitative, reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion.

Die eigentliche PCR-Reaktion erfolgte im 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA). Folgende Einstellungen wurden dazu gewählt: Denaturierung bei 95° C, Hybridisierung der Primer bei 50° C und die Polymerisation der DNA Stränge bei 72° C. Die Anzahl der Zyklen wurde auf 45 festgelegt.

Zur Messung der Fluoreszenzstärke wurde das Programm SDS 2.3 verwendet. Die Real-Time PCR-Daten wurden anhand der  $\Delta\Delta C_t$ -Methode (Livak und Schmittgen, 2001) quantifiziert und die Mittelwerte der verschiedenen Versuchsgruppen mit Prism 5.0 (GraphPad Software, La Jolla, USA) verglichen. Hierzu wurden die jeweils erhobenen Ergebnisse der WT- und *knock-out*-Gruppen mithilfe des zweiseitigen Student t-Tests mit 95%igem Konfidenzintervall verglichen.

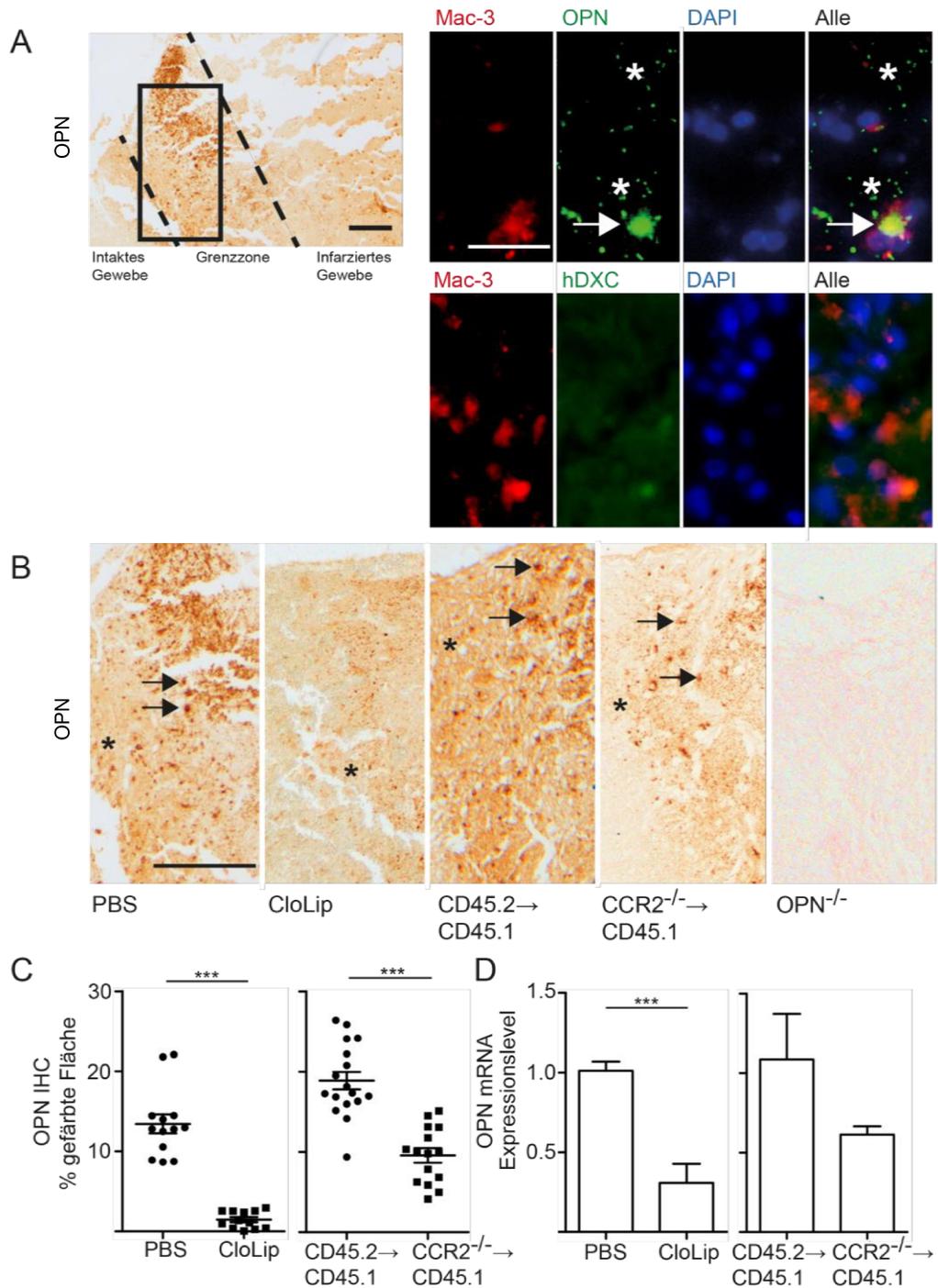
### 3 Ergebnisse

#### 3.1 OPN wird von hämatogenen Makrophagen produziert

OPN konnte mittels immunhistochemischer Färbung in der Infarkttrandzone in WT-Mäusen nachgewiesen werden. Hierbei war neben einem intrazellulären auch ein extrazellulärer Anteil nachweisbar. Beide Komponenten fanden sich ebenfalls in der Fluoreszenzfärbung, wobei die intrazelluläre Komponente mit der Makrophagen Antigen-3 (Mac-3) Färbung kolokalisierte, als Hinweis auf die Expression in Makrophagen (Abb. 7 A, Gliem *et al.*, 2015).

Da sowohl Monozyten/Makrophagen als auch die residente Mikroglia zum Pool phagozytierender Zellen und potentieller OPN Produzenten nach einem Hirninfarkt gehören, wurde der OPN Gehalt in verschiedenen Mausgruppen mit stark reduzierter hämatogener Makrophagenrekrutierung in immunhistochemischen Färbungen sowie durch qRT-PCR Untersuchungen bestimmt. In den dazu verwendeten CloLip-Mäusen wurde eine periphere Makrophagendepletion mittels Injektion von CloLip erreicht, während die ZNS-residente Mikroglia in diesem Modell intakt bleibt. Als Kontrollgruppe wurden WT-Mäuse untersucht, denen PBS-haltige Liposomen injiziert worden waren, wodurch keine Depletion erfolgt (Gliem *et al.*, 2012). Hierbei zeigte sich in den histologischen Untersuchungen eine signifikant verminderte Expression von OPN in den CloLip-Mäusen (Abb. 7 B+C, Gliem *et al.*, 2015). Dieser Unterschied stellte sich auch auf mRNA-Ebene in der qRT-PCR Untersuchung signifikant dar (Abb. 7D, Gliem *et al.*, 2015).

Des Weiteren wurden knochenmarkchimäre CCR2<sup>-/-</sup>->WT(CD45.1)-Mäuse verwendet, in denen die CCR2-abhängige Einwanderung von peripheren Makrophagen ins zentrale Nervensystem stark reduziert wird. Als Kontrolle dienten knochenmarkchimäre WT(CD45.2)->WT(CD45.1)-Mäuse mit normaler Expression von CCR2 (Gliem *et al.*, 2012). Auch hier zeigte sich die OPN-Expression in der immunhistochemischen Analyse in den CCR2<sup>-/-</sup>->WT(CD45.1)-Mäusen signifikant vermindert (Abb. 7 B+C, Gliem *et al.*, 2015). In der qRT-PCR zeigte sich der gleiche Trend (Abb. 7 D, Gliem *et al.*, 2015).



**Abb. 7: Analyse der OPN Expression nach einem Hirninfarkt in Makrophagen-defizienten Mausmodellen**

A: OPN konnte in der Infarkttrandzone in Wildtyp-Mäusen zwischen intaktem und infarziertem Gewebe nachgewiesen werden (Maßstab: 100  $\mu$ m). Es zeigte sich eine Kolokalisation von Mac-3 und intrazellulärem OPN(->) in der Fluoreszenzfärbung. Zusätzlich ließ sich auch extrazelluläres OPN(\*) darstellen. Eine Kontroll-Färbung (hDXC) zeigte keine Färbereaktion (Maßstab: 30  $\mu$ m). B: In Mäusen mit stark reduzierter Makrophagenrekrutierung (CloLip, CCR2 $^{-/-}$  $\rightarrow$ WT(CD45.1)) war intrazelluläres(->) und extrazelluläres(\*) OPN im Vergleich zu

den Kontrollen reduziert. Es zeigte sich keine Färbreaktion in OPN<sup>-/-</sup>-Mäusen (Maßstab: 100µm). C: In der statistischen Auswertung zeigte sich eine signifikante Reduktion der OPN-Färbung in CloLip- und CCR2<sup>-/-</sup>→WT(CD45.1)-Mäusen, so dass hämatogene Makrophagen als Hauptquelle von OPN nach einem Hirninfarkt erscheinen. D: In der qRT-PCR zeigte sich ebenfalls eine Reduktion der OPN mRNA Level in CloLip- und den CCR2<sup>-/-</sup>→WT(CD45.1)-Mäusen.

(A-D: n = 4) Angegeben ist jeweils Mittelwert ± Standardabweichung, \*\*\*=p<0,001 (zweiseitiger Student t-test).

**Abk.:** Mac-3: Makrophagen Antigen-3, OPN: Osteopontin, DAPI: 4',6-Diamidino-2-phenylindol-Dihydrochlorid, PBS: *Phosphate buffered saline*, CloLip: Clodronat-haltige Liposomen, CD: *cluster of differentiation*, CCR2: C-C Chemokin-Rezeptor Typ 2, qRT-PCR: quantitative reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion, -/-: homozygoter *knock-out*, IHC: Immunhistochemie, mRNA: *messenger ribonucleic acid*, µm: Mikrometer, n: Anzahl der Tiere pro Gruppe.

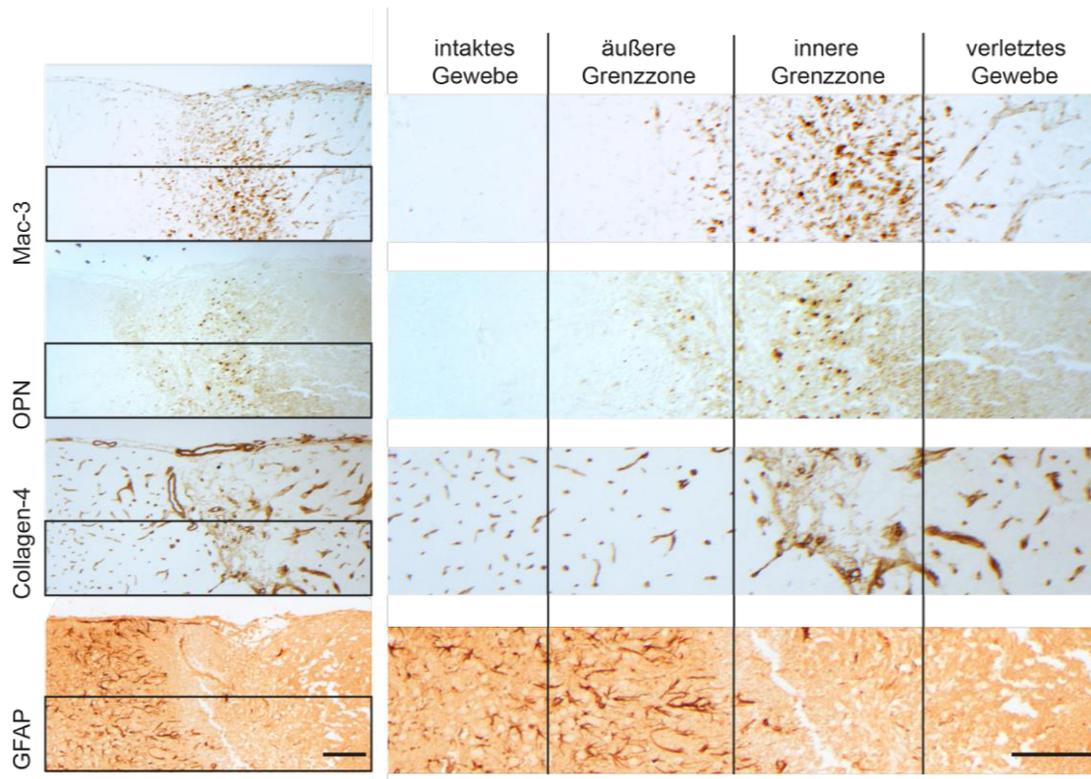
(modifiziert nach Gliem *et al.*, 2015)

Zusammenfassend zeigte sich in Mäusen mit stark reduzierter Rekrutierung von hämatogenen Makrophagen eine deutlich verminderte OPN Expression im Infarkttrandbereich. Hämatogene Makrophagen konnten somit als Hauptquelle lokaler OPN-Produktion nach einem Hirninfarkt identifiziert werden.

### 3.2 Funktion des OPN nach einem Hirninfarkt

In zahlreichen Läsionsparadigmen spielen Makrophagen beim Aufbau von Narbengewebe eine Rolle (Gliem *et al.*, 2012). Da OPN von eingewanderten Makrophagen produziert wird, wurden diese sowie der Aufbau der fibrotischen und astroglialen Narbe in OPN<sup>+/+</sup> und OPN<sup>-/-</sup>-Mäusen vergleichend untersucht. Eine Übersicht des Aufbaus der Narbe anhand unterschiedlicher Färbungen liefert Abb. 8.

Vergleichbar zu vorangegangenen Experimenten (Kury *et al.*, 2005, Denhardt *et al.*, 2001) fand sich eine sehr ähnliche Verteilung von OPN und Mac-3 positiven Monozyten und Makrophagen im inneren Randbereich der Narbe. In diesem Bereich zeigte sich zudem eine gesteigerte Collagen-4 Färbereaktion als Ausdruck der fibrotischen Narbenbildung. Die reaktive Astroglie mit Hochregulation des GFAP war hingegen im äußeren Randbereich der Narbe zu lokalisieren.



**Abb. 8: Aufbau der Narbe nach experimentellem Hirninfarkt**

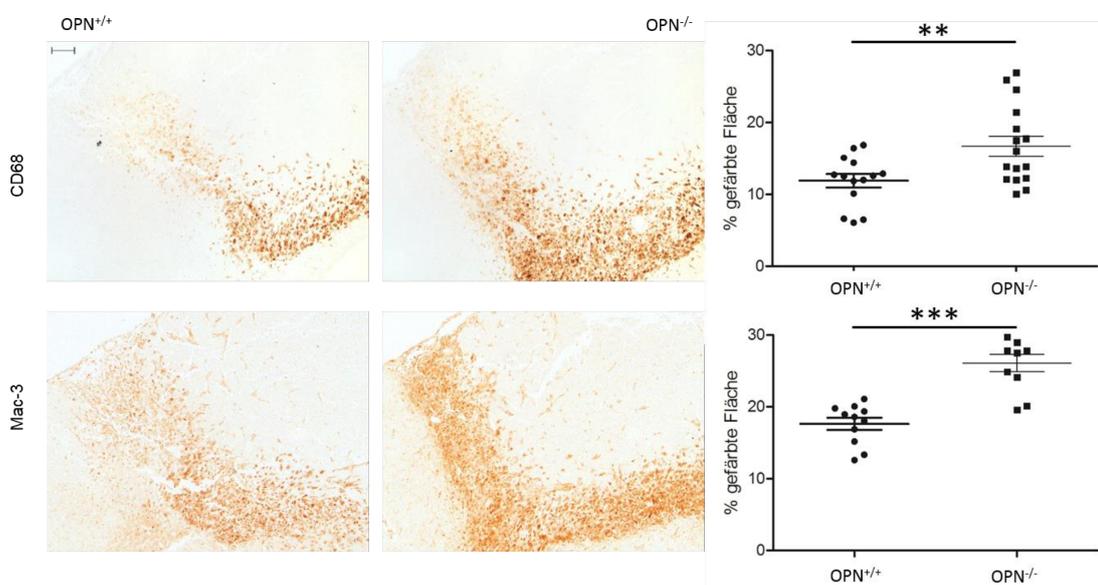
Übersichtsdarstellung der Infarkttrandzone anhand Mac-3-, OPN-, Collagen-4- und GFAP- Färbung. Der nekrotische Läsionskern findet sich in den Bildern jeweils rechts, das angrenzende gesunde Gewebe links. Im Übergangsbereich zeigen sich die charakteristischen Umbauprozesse nach einem Hirninfarkt mit Makrophagen- und Collagen-reicher innerer Randzone, korrespondierend zum fibrösen Anteil der Narbe, sowie einer äußeren Randzone, in der sich die astrogliale Narbe mit verstärkter GFAP Expression ausbildet. Maßstab: 100 µm

**Abk:** Mac-3: Makrophagen Antigen-3, OPN: Osteopontin, GFAP: saures Gliafaserprotein.

(modifiziert nach Gliem *et al.*, 2015)

### 3.2.1 Inflammatorische Reaktion

Zur genaueren Untersuchung der inflammatorischen Reaktion wurden immunhistochemische Färbungen gegen Makrophagen durchgeführt (Abb. 9). Hierzu wurden Mac-3 Antikörper sowie CD68 Antikörper verwendet. In beiden Versuchen zeigte sich in den OPN<sup>-/-</sup>-Mäusen an Tag sechs nach experimentellem Hirninfarkt eine signifikant erhöhte Färbereaktion gegen CD68 und Mac-3, die für eine erhöhte Makrophagenanzahl nach einem Hirninfarkt in den OPN<sup>-/-</sup>-Mäusen spricht.



**Abb. 9: Monozyten/Makrophageninvasion**

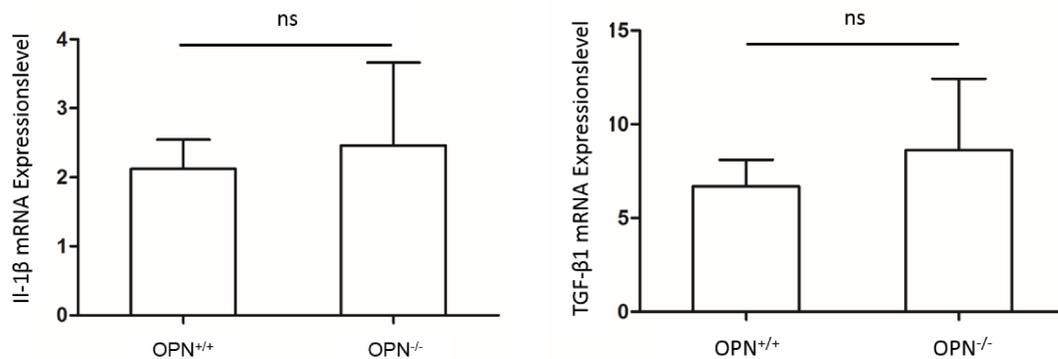
Immunhistochemische Färbungen gegen CD68 und Mac-3 an Tag 6 nach zerebraler Photothrombose sowie deren quantitative Auswertung. In beiden Analysen zeigt sich eine signifikant erhöhte Makrophagendichte in den OPN<sup>-/-</sup>-Mäusen.

n = 4, angegeben ist jeweils Mittelwert ± Standardabweichung, \*\* = p < 0,01, \*\*\* = p < 0,001 (zweiseitiger Student t-test), Maßstab: 100 µm.

**Abk:** CD: *cluster of differentiation*, Mac-3: Makrophagen Antigen-3, OPN: Osteopontin, <sup>+/+</sup>: homozygoter Wildtyp, <sup>-/-</sup>: homozygoter *knock-out*, n: Anzahl der Tiere pro Gruppe.

Um weitergehend die Aktivierungszustände der Makrophagen zu untersuchen wurde eine qRT-PCR Untersuchung der Il-1 $\beta$  und TGF- $\beta$ 1 mRNA Expressionslevel durchgeführt (Abb. 10). Hierbei ergaben sich hinsichtlich der Zytokinexpression keine signifikanten Unterschiede. Insgesamt ist daher also eher von einer verstärkten Makrophagenrekrutierung statt -aktivierung in den

OPN<sup>-/-</sup>-Mäusen auszugehen. Darüber hinaus ergibt sich aus diesen Untersuchungen kein Hinweis auf eine gesteigerte Differenzierung in eine inflammatorische (M1-Makrophagen) oder regenerative (M2-Makrophagen) Subpopulation zwischen WT und OPN-defizienten Mäusen.



**Abb. 10: Zytokinexpression der Makrophagen**

In der qRT-PCR Untersuchung hinsichtlich der mRNA Expression von IL-1β und TGF-β1 konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen OPN<sup>+/+</sup>- und OPN<sup>-/-</sup>-Mäusen festgestellt werden, sodass sich hier keine Hinweise auf eine verstärkte Aktivierung bzw. Subtypendifferenzierung der Makrophagen zwischen OPN<sup>+/+</sup> und OPN<sup>-/-</sup> Mäusen ergeben.

n = 4, angegeben ist jeweils Mittelwert ± Standardabweichung, ns: nicht signifikant (zweiseitiger Student t-test).

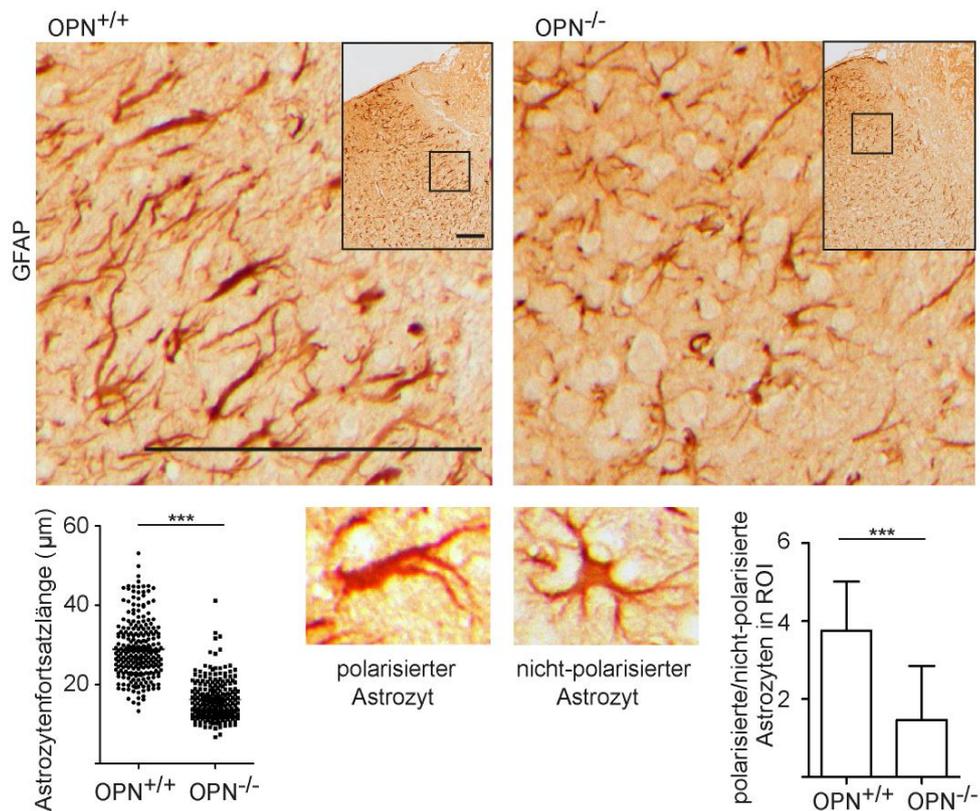
**Abk:** IL-1β: Interleukin-1β, TGF-β1: *transforming growth factor*-β1 mRNA: *messenger ribonucleic acid*, OPN: Osteopontin, +/+ : homozygoter Wildtyp, -/- : homozygoter *knock-out*, n: Anzahl der Tiere pro Gruppe, qRT-PCR: quantitative reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion.

### 3.2.2 Astrogliale Reaktion

Die astrogliale Reaktion nach der Photothrombose wurde mit einer immunhistochemischen Färbung gegen GFAP untersucht. Kennzeichnend für die reaktive Astroglie sind hierbei hypertrophierte Astrozyten mit verdickten Fortsätzen. Mithilfe dieser Färbung wurde die Polarisierung der Astrozyten anhand der Länge der Fortsätze und deren Orientierung in Richtung des Infarktgebietes ausgemessen und bewertet.

Es fanden sich im Infarkttrandbereich der OPN<sup>-/-</sup>-Mäuse signifikant weniger polarisierte Astrozyten. Darüber hinaus hatten diejenigen, die eine Polarisierung zeigten, zudem signifikant kürzere Fortsätze als die polarisierten Astrozyten in den OPN<sup>+/+</sup>-Mäusen. Des Weiteren zeigte sich eine einheitliche Orientierung

der Astrozytenfortsätze in Richtung der ischämischen Region in den OPN<sup>+/+</sup>-Mäusen. In den OPN<sup>-/-</sup>-Mäusen hingegen zeigten sich die Astrozytenfortsätze eher desorientiert ohne Polarität in Richtung Infarktzone (Abb. 11, Gliem *et al.*, 2015). Zusammenfassend zeigte sich in den OPN<sup>-/-</sup>-Mäusen nach einem experimentellen Hirninfarkt durch Photothrombose eine reduzierte reaktive Astrogliose. Somit ist OPN signifikant an der Polarisation der Astrozyten und damit an der Ausbildung und Organisation der astroglialen Narbe beteiligt.



**Abb. 11: Astrogliale Narbenbildung**

GFAP-Färbungen mit quantitativer Analyse der Astrozytenfortsatzlänge und -polarisierung. Hier zeigten sich in den OPN<sup>-/-</sup>-Mäusen signifikant weniger polarisierte Astrozyten, sowie diese mit deutlich kürzeren und geringer zum Infarktgebiet orientierte Astrozytenfortsätzen.

n= 4, angegeben ist jeweils Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung, \*\*\*=p<0,01 (zweiseitiger Student t-test), Maßstab: 100  $\mu$ m.

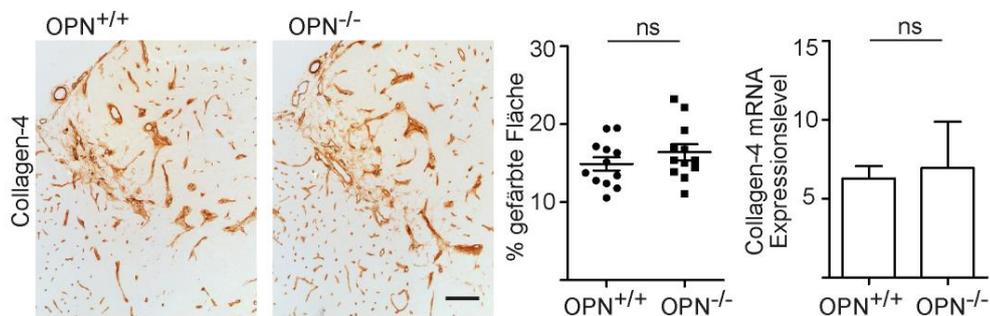
**Abk.:** OPN: Osteopontin, +/+ : homozygoter Wildtyp, -/- : homozygoter *knock-out*, GFAP: saures Gliafaserprotein, ROI: *region of interest*,  $\mu$ m: Mikrometer, n: Anzahl der Tiere pro Gruppe.

(modifiziert nach Gliem *et al.*, 2015)

### 3.2.3 Fibrotischer Umbau und Gefäßneubildung

Zur Untersuchung fibrotischer Umbauvorgänge und damit verbundenen Gefäßneubildungen wurden immunhistochemische Färbungen gegen Collagen-4 und von Willebrand-Faktor (vWF) in OPN<sup>+/+</sup>- sowie OPN<sup>-/-</sup>-Mäusen am sechsten Tag nach experimentellem Hirninfarkt durchgeführt. Diese wurden um eine qRT-PCR Untersuchung zur Bestimmung des relativen Expressionslevels von Collagen-4 ergänzt.

Sowohl die immunhistochemischen Färbungen gegen Collagen-4 als auch die qRT-PCR erbrachten keine signifikanten Unterschiede zwischen OPN<sup>+/+</sup>-Mäusen und OPN<sup>-/-</sup>-Mäusen (Abb. 12, Gliem *et al.*, 2015).



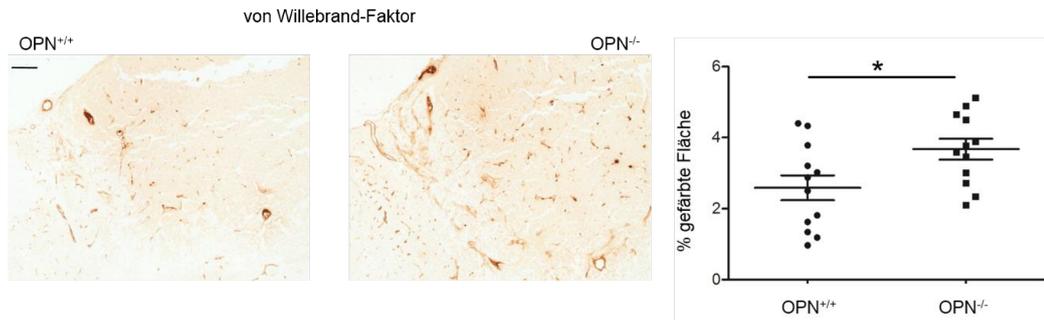
**Abb. 12: Fibröse Narbenbildung**

Immunhistochemische und qRT-PCR-Analysen der Collagen-4 Expression erbrachten keine signifikanten Unterschiede zwischen OPN<sup>+/+</sup> und OPN<sup>-/-</sup>-Mäusen. n = 4, angegeben ist jeweils Mittelwert ± Standardabweichung, ns: nicht signifikant (zweiseitiger Student t-test), Maßstab: 100 µm.

**Abk.:** qRT-PCR: quantitative reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion, OPN: Osteopontin, +/+ : homozygoter Wildtyp, -/- : homozygoter *knock-out*, GFAP: saures Gliafaserprotein, mRNA: *messenger ribonucleic acid*, n: Anzahl der Tiere pro Gruppe.

(modifiziert nach Gliem *et al.*, 2015)

Eine ergänzend durchgeführte immunhistochemische Untersuchung gegen vWF zur Darstellung des Endothels zeigte eine gering signifikante Erhöhung in der Gefäßdichte in der Infarkttrandzone in den OPN<sup>-/-</sup>-Mäusen (Abb. 13).



**Abb. 13: Gefäßneubildung in OPN<sup>-/-</sup>-Mäusen**

Immunhistochemische Färbungen gegen den von Willebrand-Faktor an Tag 6 nach zerebraler Photothrombose sowie deren quantitative Auswertung. Hierbei ergab sich eine leichte Erhöhung in den OPN<sup>-/-</sup>.

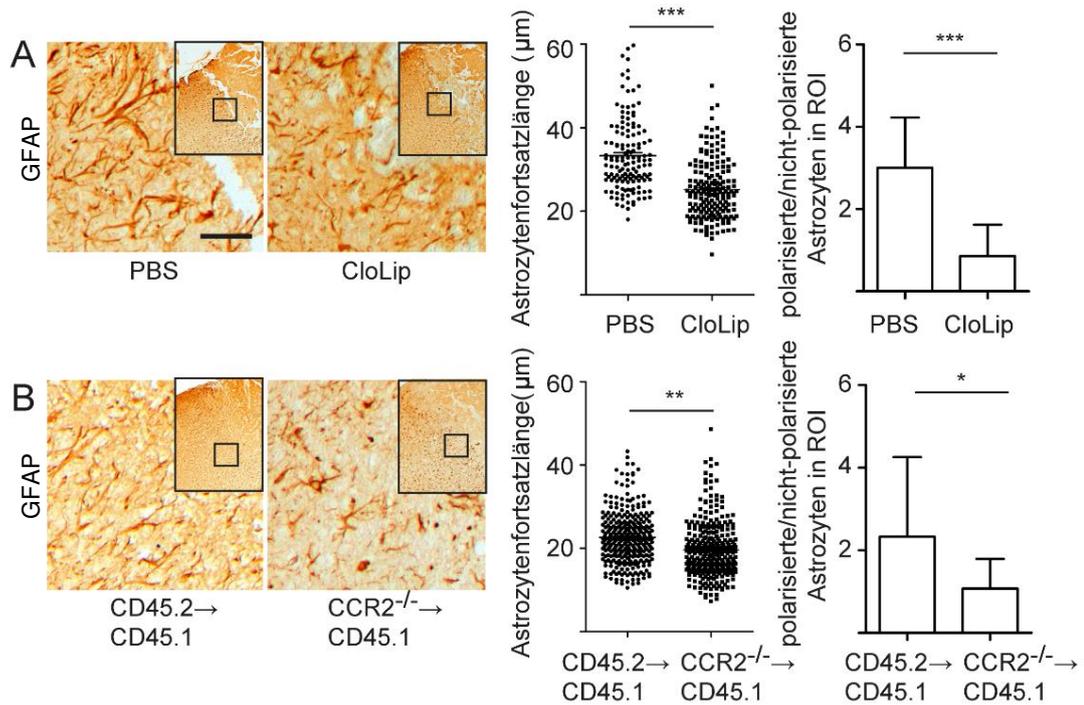
n = 4, angegeben ist jeweils Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung, \* = p < 0,05 (zweiseitiger Student t-test), Maßstab: 100  $\mu$ m

**Abk:** OPN: Osteopontin, <sup>+/+</sup>: homozygoter Wildtyp, <sup>-/-</sup>: homozygoter *knock-out*, n: Anzahl der Tiere pro Gruppe.

Insgesamt zeigt sich, dass OPN keinen wesentlichen Einfluss auf die Ausbildung des fibrösen Anteils der Narbe oder die Gefäßneubildung zu haben scheint.

### 3.3 Astrogliale Reaktion in Makrophagen-defizienten Mäusen

Die oben genannten Experimente legen nahe, dass einwandernde Makrophagen die Hauptquelle für OPN im Infarkttrandbereich sind und dass OPN die Ausbildung der astroglialen, nicht aber der fibrösen Narbe beeinflusst. Zur Bestätigung der Ergebnisse wurde eine Analyse der astroglialen Narbe in Mäusen mit stark reduzierter Makrophagenrekrutierung, also starker Reduktion der OPN Produzenten, durchgeführt. In den dazu durchgeführten GFAP Färbungen zeigten sich auch hier, wie bereits in den OPN<sup>-/-</sup>-Mäusen, sowohl in den CloLip-Mäusen (Abb. 14A, Gliem *et al.*, 2015) als auch in den knochenmarkchimären CCR2<sup>-/-</sup>->WT(CD45.1)-Mäusen (Abb. 14B, Gliem *et al.*, 2015) signifikant weniger polarisierte Astrozyten. Die polarisierten Astrozyten in den Mäusen mit stark reduzierter Makrophagenrekrutierung zeigten darüber hinaus deutlich kürzere und weniger stark zum Infarktgebiet hin polarisierte Astrozytenfortsätze als die in den jeweiligen Kontrollen. Somit wurde die entscheidende Rolle von OPN im Rahmen der Polarisation der Astrozyten und damit an der Ausbildung und Organisation der astroglialen Narbe bestätigt.



**Abb. 14: Astrogliale Reaktion in Makrophagen-defizienten Mausmodellen**

Immunhistochemische Färbungen gegen GFAP und quantitative Auswertung der Polarisierung der Astrozyten sowie der Astrozytenfortsatzlänge in CloLip-Mäusen mit Kontrollen (A) bzw. in CCR2<sup>-/-</sup>→WT(CD45.1)-Mäusen mit Kontrollen (B). In beiden Fällen zeigten sich in den Mäusen mit stark reduzierter Makrophagenrekrutierung signifikant kürzere Astrozytenfortsätze sowie weniger zum Infarktgebiet hin polarisierte Astrozyten im Randbereich der Infarktregion als Hinweis auf eine entscheidende Rolle der einwandernden, OPN produzierenden Makrophagen für die Astrozyten-Polarisierung.

n=4, angegeben ist jeweils Mittelwert ± Standardabweichung, \* = p < 0,05, \*\* = p < 0,01, \*\*\* = p < 0,001 (zweiseitiger Student t-test), Maßstab: 20 µm.

**Abk.:** PBS: *Phosphate buffered saline*, CloLip: Clodronat-haltige Liposomen, CD: *cluster of differentiation*, CCR2: C-C-Chemokin-Rezeptor Typ 2, ROI: *region of interest*, GFAP: saures Gliafaserprotein, <sup>-/-</sup>: *knock-out*, OPN: Osteopontin, µm: Mikrometer.

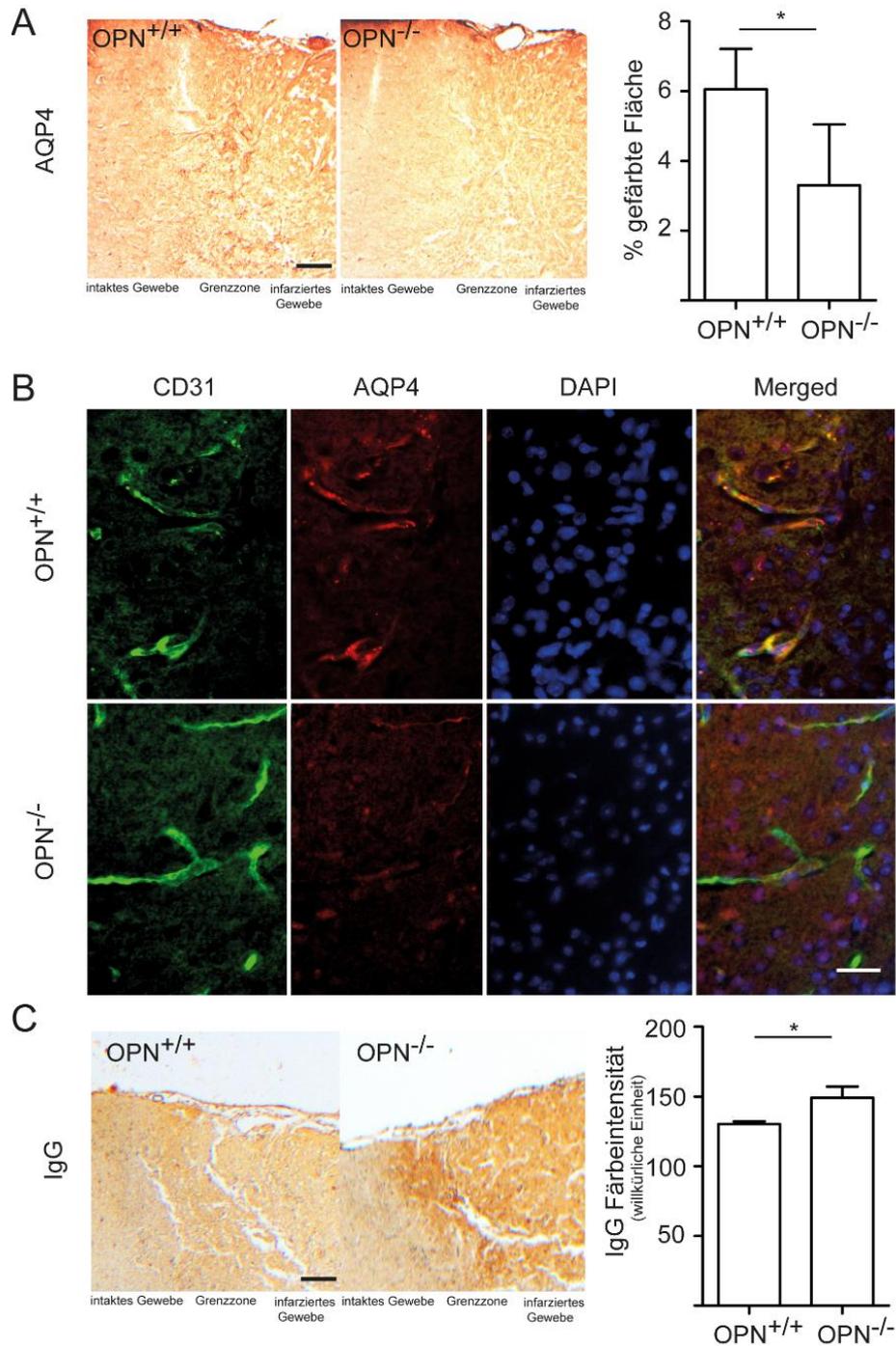
(modifiziert nach Gliem *et al.*, 2015)

### 3.4 Einfluss von OPN auf die BHS-Reparatur

Die Polarisierung der Astrozyten ist Voraussetzung für den Wiederaufbau der BHS durch Interaktion der Astrozytenendfüße mit den neugebildeten Gefäßen in der Infarkttrandzone. Maßgeblich charakterisiert ist diese Kontaktzone durch eine hohe Expression des astroglialen AQP4. Doppel-Immunfluoreszenzfärbungen von AQP4 mit CD31 als Endothelzell-Antigen in OPN<sup>+/+</sup>- und OPN<sup>-/-</sup>-Mäusen zeigten eine signifikant schwächere Färbereaktion des AQP4 in den OPN<sup>-/-</sup>-Mäusen (Abb. 15A, Gliem *et al.*, 2015). Darüber hinaus war die AQP4 und CD31 Expression in OPN<sup>+/+</sup>-Mäusen eng räumlich kolokalisiert, was in den OPN<sup>-/-</sup>-Mäusen wiederum nicht festgestellt werden konnte (Abb. 15B, Gliem *et al.*, 2015).

Des Weiteren zeigte die immunhistochemische Färbung gegen IgG eine Erhöhung in der Infarktzone von OPN<sup>-/-</sup>-Mäusen im Vergleich zu den OPN<sup>+/+</sup>-Mäusen als Hinweis auf eine persistierende BHS-Störung mit anhaltendem Übertritt von Plasmabestandteilen in die Infarktzone (Abb. 15C, Gliem *et al.*, 2015).

Zusammenfassend ergaben die Untersuchungen in OPN<sup>-/-</sup>-Mäusen eine verminderte AQP4 Expression mit gestörtem Astrozyten-Gefäß-Kontakt begleitet von einer anhaltend gesteigerten Permeabilität der BHS.



**Abb. 15: Blut-Hirn-Schranken-Störung in OPN<sup>-/-</sup>-Mäusen**

A: Immunohistochemische Färbungen zeigten eine signifikant reduzierte AQP4 Expression in den OPN<sup>-/-</sup>-Mäusen (Maßstab 100 µm). B: Doppel-Immunfluoreszenzfärbungen gegen CD31, AQP4 und DAPI in OPN<sup>+/+</sup>- und OPN<sup>-/-</sup>-Mäusen wiesen in den OPN<sup>-/-</sup>-Mäusen eine reduzierte AQP4 Expression im Bereich der durch CD31 markierten Blutgefäßen auf (Maßstab 20 µm). C: Immunohistochemische Färbungen gegen IgG ergaben eine signifikant erhöhte Extravasation von IgG in den OPN<sup>-/-</sup>-Mäusen (Maßstab: 100 µm).

## Ergebnisse

---

n = 4, angegeben ist jeweils Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung,  $*=p<0,05$  (zweiseitiger Student t-test).

**Abk.:** AQP4: Aquaporin-4, OPN: Osteopontin, +/-: homozygoter Wildtyp, -/-: homozygoter *knock-out*, CD: *cluster of differentiation*, DAPI: 4',6-Diamidino-2-phenylindol-Dihydrochlorid, IgG: Immunglobulin G,  $\mu\text{m}$ : Mikrometer, n: Anzahl der Tiere pro Gruppe.

(modifiziert nach Gliem *et al.*, 2015)

## 4 Diskussion

Die nach einem ischämischen Schlaganfall subakut einsetzenden pathophysiologischen Mechanismen sind bislang nur unvollständig verstanden. Während mit der Thrombolyse und endovaskulären Thrombektomie wirksame Therapien in der Akutphase etabliert sind (Campbell *et al.*, 2015), gibt es bislang wenige Optionen, um die danach einsetzenden neurodegenerativen und -regenerativen Prozesse günstig zu beeinflussen. Ein die therapeutischen Möglichkeiten erschwerender Aspekt sind die konträren Effekte der nach einem Hirninfarkt einsetzenden Prozesse, die sich sowohl unterstützend als auch hemmend auf die Neuroregeneration auswirken (Kawano *et al.*, 2012). Es kommt zum Beispiel durch die Narbenbildung zur Abgrenzung des ischämischen Bereichs gegen das intakte umliegende Gewebe, um dieses zu schützen, gleichzeitig bildet die Narbe aber auch eine Barriere, die das Auswachsen neuer Nervenfortsätze behindert (Kawano *et al.*, 2012). Daher hat die Erforschung der komplexen Prozesse sekundärer Regeneration und Reparatur einen großen Stellenwert, um die Voraussetzungen für eine gezielte Modulation zu schaffen.

OPN konnte in vielen Studien als wichtiger Mediator von entzündlichen Prozessen und Narbenbildung identifiziert werden (Mori *et al.*, 2008, Lenga *et al.*, 2008). Bezüglich des Hirninfarkts konnte gezeigt werden, dass es in OPN<sup>-/-</sup>-Mäusen zu einer gesteigerten sekundären Neurodegeneration im Bereich des ipsilateralen Thalamus nach einem experimentellem Hirninfarkt kommt (Schroeter *et al.*, 2006), dass die nasale Gabe von OPN nach einem experimentellem Hirninfarkt neuroprotektiv wirkt (Doyle *et al.*, 2008) und dass OPN als Mediator für die Einwanderung von Neuroblasten fungiert (Yan *et al.*, 2009), sodass in diesen Arbeiten eine eher protektive Rolle des OPN postuliert wurde.

In dem ersten Teil der hier beschriebenen Experimente wurde versucht die Quelle des OPN nach experimentellem Hirninfarkt zu ermitteln. In unterschiedlichen Studien wurde bisher mittels immunhistochemischer Doppel-

färbungen gegen OPN und CD68, als unspezifischem Marker für Makrophagen und Mikroglia, über eine Kolo-kalisation dieser beiden Antigene geschlossen, dass CD68-positive Zellen die Hauptproduzenten für OPN sind (Kury *et al.*, 2005, Denhardt *et al.*, 2001). Eine genauere Differenzierung zwischen den nach einem Hirninfarkt eingewanderten Makrophagen und der residenten Mikrogliazellen war allerdings bislang mittels immunhistochemischer Verfahren nicht sicher möglich, da keine mikroglia-spezifischen Antikörper verfügbar waren.

Die oben beschriebenen Experimente mit gezielter Depletion hämatogener Makrophagen bzw. starker Reduktion der CCR2-abhängigen Einwanderung legen nahe, dass vor allem hämatogen rekrutierte Makrophagen die Hauptproduzenten für OPN sind, denn sowohl in den CloLip-Mäusen als auch in den CCR2<sup>-/-</sup>->WT(CD45.1)-Mäusen war eine deutlich verminderte Expression von OPN mRNA und Protein im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen zu finden.

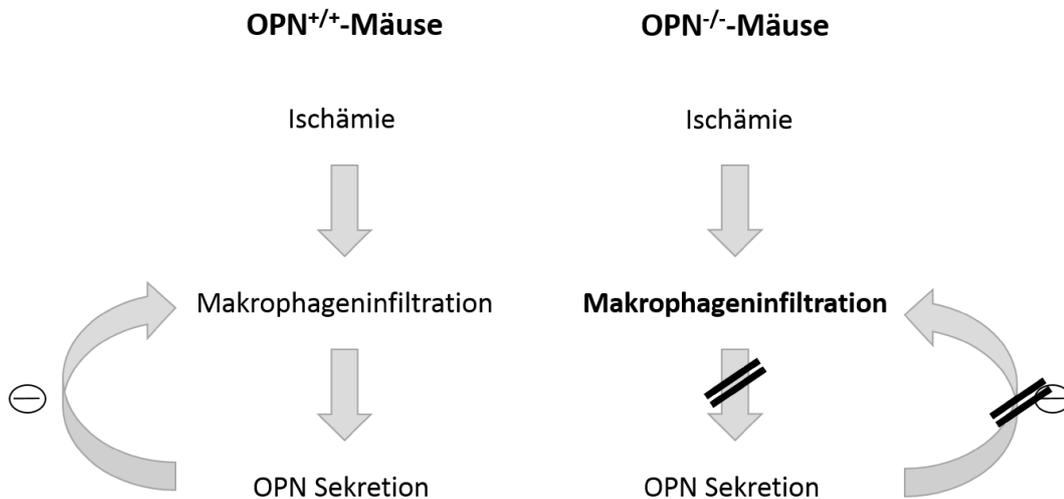
In den weiter durchgeführten Untersuchungen hinsichtlich der Funktion des OPNs nach einem Hirninfarkt wurden zum einen die inflammatorische Reaktion, zum anderen die Ausbildung der astroglialen und fibrösen Narbe genauer betrachtet.

Bezüglich der inflammatorischen Reaktion zeigte sich eine signifikant verstärkte Expression von CD68 und Mac-3 in OPN<sup>-/-</sup>-Mäusen im Vergleich zu den OPN<sup>+/+</sup>-Mäusen, sodass von einer verstärkten Makrophagenreaktion in Abwesenheit von OPN ausgegangen werden kann. Hierbei blieb zunächst unklar, inwieweit dies durch eine quantitativ verstärkte Rekrutierung hämatogener Makrophagen oder durch verstärkte Aktivierung mit Hochregulation der entsprechenden Marker zu erklären war. Eine Analyse der mRNA Expression von IL-1 $\beta$  und TGF- $\beta$ 1 hatte keine signifikanten Unterschiede zwischen OPN<sup>+/+</sup>- und OPN<sup>-/-</sup>-Mäusen im Sinne einer verstärkten Aktivierung der Makrophagen ergeben. Aus vorhergehenden Untersuchungen ist bekannt, dass Makrophagen sich abhängig verschiedener Stimuli in Subgruppen mit eher proinflammatorischer (M1-Typ) oder immunregulativer (M2-Typ) Funktion differenzieren (Ding *et al.*, 1988). Hierbei wird vor allem IL-1 $\beta$  von M1-Typ-Makrophagen und TGF- $\beta$ 1 von M2-Typ-Makrophagen sezerniert (Shapouri-

Moghaddam *et al.*, 2018). Bei nicht nachweisbarem Unterschied in der mRNA Expression zwischen  $Il-1\beta$  und  $TGF-\beta 1$  ließ sich somit keine verstärkte Aktivierung einer Subpopulation zwischen  $OPN^{+/+}$ - und  $OPN^{-/-}$ -Mäusen unterscheiden, sodass insgesamt eher von einer verstärkten Rekrutierung auszugehen ist.

Somit könnte die verstärkte Makrophagenrekrutierung in  $OPN^{-/-}$ -Mäusen auf einen OPN-abhängigen Feedback-Mechanismus hinweisen (Abb. 16), wobei die Regulation der Makrophageneinwanderung in den OPN-defizienten Mäusen gestört ist.

Weiterhin konnte in immunhistochemischen Färbungen gegen IgG eine gesteigerte Permeabilität der BHS in den  $OPN^{-/-}$ -Mäusen nachgewiesen werden. In Hinblick auf diese Ergebnisse ist auch dies als mögliche Ursache einer verstärkten Makrophagenrekrutierung in Abwesenheit von OPN zu diskutieren. Weitere Untersuchungen des Rekrutierungs- und Aktivierungsverhaltens von hämatogenen Makrophagen in  $OPN^{-/-}$ -Mäusen sind zur Aufklärung dieses Befundes erforderlich.



**Abb. 16: Einfluss von OPN auf Makrophagen**

Die nach einem Hirninfarkt einwandernden Makrophagen sezernieren OPN, welches möglicherweise im Rahmen eines negativen Feedbackmechanismus die Makrophageneinwanderung reguliert.

**Abk:** OPN: Osteopontin,  $^{+/+}$ : Wildtyp,  $^{-/-}$ : *knock-out*,  $\ominus$ : Hemmung.

Bezüglich der Ausbildung der fibrösen Narbe ließ sich anhand einer Collagen-4 Färbung kein Unterschied zwischen OPN-defizienten und WT-Mäusen feststellen. Ebenso zeigten sich in den qRT-PCR-Untersuchungen hinsichtlich der Expressionslevel von Collagen-4 sowie Collagen-1 und Collagen-3 - als weitere Marker der Fibroseausbildung - keine signifikanten Unterschiede zwischen OPN<sup>+/+</sup>- und OPN<sup>-/-</sup>-Mäusen. Darüber hinaus hatte eine qRT-PCR-Untersuchung der Expressionslevel von TGF- $\beta$ 1, welches in vorherigen Untersuchungen als entscheidender Faktor in der Ausbildung der fibrösen Narbe identifiziert wurde (Gliem *et al.*, 2012), ebenfalls keinen Unterschied zwischen OPN-defizienten Mäuse und deren Kontrollen ergeben. Hinsichtlich der Gefäßneubildung hatte sich in einer Färbung gegen vWF eine leichte Erhöhung in den OPN<sup>-/-</sup>-Mäusen ergeben. Insgesamt scheint OPN allerdings keinen entscheidenden Einfluss auf die Ausbildung der fibrösen Narbe zu haben.

Um den Einfluss von OPN auf die Ausbildung der astrozytären Narbe zu untersuchen, wurden Färbungen gegen den Astrozytenmarker GFAP durchgeführt. Dieser zeigt bei der reaktiven Astrogliose typische Veränderungen mit hypertrophierten Astrozyten mit verdickten Fortsätzen (Sibson *et al.*, 2008). In den dargestellten Experimenten zeigten OPN<sup>-/-</sup>-Mäuse im Vergleich zur Kontrolle signifikant weniger polarisierte Astrozyten und diese mit kürzeren und weniger stark polarisierte Astrozytenfortsätzen. Somit konnte gezeigt werden, dass OPN einen wichtigen Mediator im Rahmen der adäquaten Astrozytenstimulation und -polarisation darstellt.

In Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen konnte bereits festgestellt werden, dass OPN eine dosisabhängige Stimulation der Migration von C6 Astrogliomzellen, also Zellen mit astrozytischen Eigenschaften, und humanen Astrozyten induziert (Wang *et al.*, 1998). Ellison *et al.* sahen zudem bereits, dass die Astrozytenfortsätze vor allem in OPN-reicher Umgebung  $\alpha\beta$ 3 Integrinrezeptoren exprimierten (Ellison *et al.*, 1998). Sie folgerten daraus, dass OPN als Integrinligand die Fortsatzbildung stimuliert. Weitere Hinweise auf die Notwendigkeit funktionsfähiger Integrinrezeptoren zur Astrozytenpolarisation zeigten Peng *et al.* in ihren Untersuchungen auf:  $\beta$ <sub>1</sub> Integrin<sup>-/-</sup>-Astrozyten

konnten keine Fortsätze in Richtung der Wunde bilden und wanderten stattdessen in die Wunde ein, weshalb kein abdichtender Randsaum gebildet wurde (Peng *et al.*, 2013). Zudem fiel auf, dass  $\beta_1$  Integrin<sup>-/-</sup>-Astrozyten desorientiert waren und ihre Polarität zur Wunde verloren hatten (Peng *et al.*, 2013), ähnlich wie in unseren Befunden in den OPN-defizienten Mäusen. Insgesamt ist somit eine OPN-abhängige Stimulation der Astrozytenpolarisation über Integrinrezeptoren zu postulieren, wobei weitere Untersuchungen zur Bestätigung benötigt werden.

Auch in den GFAP Färbungen der CloLip- und CCR2<sup>-/-</sup>->WT(CD45.1)-Mäuse, in denen die Rekrutierung von hämatogenen Makrophagen stark reduziert worden war, zeigten sich durch die verminderten OPN Produzenten deutlich verkürzte und desorientiertere Fortsätze, so dass auch hier die entscheidende Rolle der Makrophageneinwanderung mit Produktion von OPN zur Bildung der astroglialen Narbe nach einem Hirninfarkt deutlich wird.

Gliem *et al.* konnten in früheren Experimenten zeigen, dass Makrophagen eine wichtige Funktion im Rahmen der Ausbildung der fibrösen Narbe einnehmen (Gliem *et al.*, 2012). Dementsprechend stellen hämatogene Makrophagen eine wichtige reparative Zellpopulation dar, die sowohl die Ausbildung einer effektiven fibrösen als auch der astroglialen Narbe stimuliert.

Um die Auswirkung der gestörten astrozytären Reaktion genauer zu untersuchen, wurden immunhistochemische Färbungen gegen IgG als Indikator einer Plasmaprotein-Extravasation über die BHS hinweg durchgeführt. Hier zeigte sich eine erhöhte Extravasation von IgG im Läsionsbereich der OPN<sup>-/-</sup>-Mäusen als Hinweis auf eine anhaltende Permeabilitäts-erhöhung der BHS. Bereits Bush *et al.* zeigten in ihren Studien bezüglich der Durchlässigkeit der BHS, dass nach Astrozyten-Ablation eine erhöhte Anzahl inflammatorischer Zellen im Bereich der zerebralen Läsion zu finden war (Bush *et al.*, 1999). Dies wurde ebenfalls als Folge einer erhöhten BHS-Permeabilität interpretiert (Bush *et al.*, 1999).

Astrozyten kommt eine wesentliche Rolle beim Aufbau der BHS und damit auch für den Erhalt der Homöostase und der Ödemresorption zu (Bush *et al.*, 1999). Der hierbei dominante Wassertransporter an den Astrozytenfortsätzen mit

Kontakt zu den Blutgefäßen ist unter physiologischen Bedingungen AQP4 (Arcienega *et al.*, 2010, Nagelhus *et al.*, 1998, Nielsen *et al.*, 1997, Neely *et al.*, 1999), weswegen diesem Kanal eine wichtige Funktion in der zerebralen Wasserregulation zugeordnet wird (Arcienega *et al.*, 2010). Daher wurde zur weiteren Betrachtung der Auswirkung der gestörten Bildung der astroglialen Narbe Färbungen gegen AQP4 durchgeführt.

In den immunhistochemischen Färbungen gegen AQP4 zeigte sich, dass parallel zur gestörten Ausbildung der Astrozytenfortsätze in OPN<sup>-/-</sup>-Mäusen eine signifikante Reduktion der AQP4 Kanälen an den Endfüßen der Astrozyten zu verzeichnen war. In einer Doppelimmunfluoreszenzfärbung wurde diese verminderte Expression vor allem an CD31 markierten Blutgefäßen bestätigt.

Unter pathologischen Bedingungen, die zu einer reaktiven Astrogliose führen, fiel in vorhergehenden Untersuchungen eine Hochregulation von AQP4 an den Endfüßen der Astrozyten auf (Neely *et al.*, 1999, Auguste *et al.*, 2007). Darüber hinaus zeigte sich nach einer Verletzung zudem eine Hochregulation im Bereich der glialen Narbe (Saadoun *et al.*, 2005). Auch Frydenlund *et al.* konnten zeigen, dass im Randbereich einer ischämischen Kortexläsion nach experimentellem Hirninfarkt die Expression der AQP4-Kanäle hochreguliert wurde (Frydenlund *et al.*, 2006). Im Zentrum der ischämischen Region zeigte sich hingegen eine verminderte Expression (Frydenlund *et al.*, 2006). Im Kontext dieser Vorbefunde legen die hier beschriebenen Experimente nahe, dass von Makrophagen produziertes OPN zur Ausbildung einer funktionsfähigen astroglialen Narbe unverzichtbar ist und dass hierfür die OPN-induzierte Polarisierung der Astrozytenendfüße mit Hochregulation des AQP4 eine kritische Rolle spielt.

Zur Funktion des AQP4-Kanals beim Hirninfarkt zeigten frühere Untersuchungen unterschiedliche Effekte:

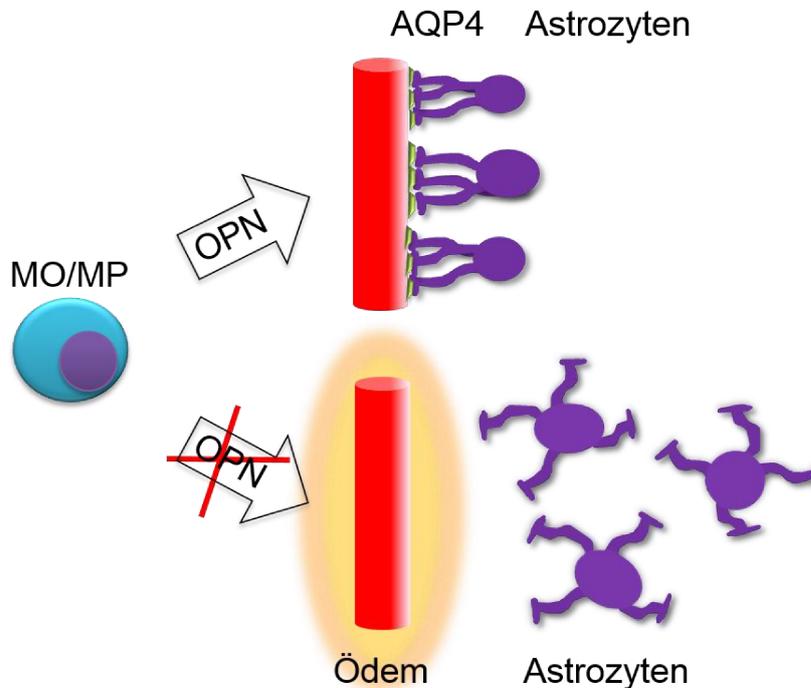
Die Deletion von AQP4 reduzierte einerseits das frühe, zytotoxische Ödem nach einem Hirninfarkt und verbesserte hierdurch das Überleben (Manley *et al.*, 2000). Für das vasogene Ödem, welches sich verzögert ca. 6 - 8 Stunden nach einem Hirninfarkt entwickelt und sein Maximum an Tag 3 erreicht, war hingegen nach einer AQP4-Deletion eine verminderte Ödemresorption und ein

schlechteres klinisches *outcome* der AQP4-defizienten Mäuse zu beobachten (Papadopoulos *et al.*, 2004).

Die hier beschriebenen Experimente beziehen sich primär auf den 6. Tag nach dem Infarkt. In weiteren Untersuchungen am 3. Tag nach experimentellem Hirninfarkt zeigte sich auch in OPN<sup>+/+</sup>-Mäusen noch keine Astrozytenpolarisation und die Extravasation von IgG war im Vergleich zu den OPN-defizienten Mäusen ähnlich (Gliem *et al.*, 2015). Dementsprechend konnte gezeigt werden, dass die OPN-abhängige Astrozytenpolarisation vor allem Einfluss auf die vasogene Ödembildung zwischen Tag 3 und 6 nimmt. Ein Hinweis auf eine verringerte Gefäßdichte als weitere mögliche Ursache einer schlechteren Ödemresorption in den OPN<sup>-/-</sup>-Mäusen hatte sich im Rahmen einer Färbung gegen den vWF nicht ergeben. Insgesamt kann daher auch hier in Zusammenschau der vorherigen Experimente eine eher protektive Rolle von OPN vermutet werden.

## Schlussfolgerung

Insgesamt ergeben sich aus den oben genannten Experimenten verschiedene neue Aspekte zur Funktion von OPN nach einem experimentellen Hirninfarkt, die in Abb. 17 schematisch zusammengefasst dargestellt werden.



### Abb. 17: Zusammenfassung

Diese Abbildung gibt einen Überblick über die in diesen Experimenten ermittelten Funktionen von OPN nach einem Hirninfarkt. OPN, welches von hämatogenen Makrophagen sezerniert wird, ist entscheidend an der Astrozytenpolarisation und Ausbildung der astrozytären Narbe beteiligt. In  $OPN^{-/-}$ -Mäusen konnte aufgrund der gestörten astrozytären Narbenbildung eine verminderte AQP4 Expression mit gesteigerter Permeabilität der BHS nachgewiesen werden.

**Abk:** MO/MP: Monozyten/Makrophagen, OPN: Osteopontin, AQP4: Aquaporin-4, BHS: Blut-Hirn-Schranke,  $-/-$ : homozygoter *knock-out*.

Es konnte gezeigt werden, dass OPN nach experimentellem Hirninfarkt zur Astrozytenpolarisation und damit zum Aufbau der astrozytären Narbe mit Wiederherstellung der BHS benötigt wird.

Zudem konnten erstmalig eingewanderte, hämatogene Makrophagen als Hauptproduzenten für OPN identifiziert werden, die damit den Aufbau der glialen Narbe beeinflussen.

## 5 Literaturverzeichnis

- ARCIENEGA, II, BRUNET, J. F., BLOCH, J. & BADAUT, J. 2010. Cell locations for AQP1, AQP4 and 9 in the non-human primate brain. *Neuroscience*, 167, 1103-14.
- ASTRUP, J., SYMON, L., BRANSTON, N. M. & LASSEN, N. A. 1977. Cortical evoked potential and extracellular K<sup>+</sup> and H<sup>+</sup> at critical levels of brain ischemia. *Stroke*, 8, 51-7.
- AUGUSTE, K. I., JIN, S., UCHIDA, K., YAN, D., MANLEY, G. T., PAPADOPOULOS, M. C. & VERKMAN, A. S. 2007. Greatly impaired migration of implanted aquaporin-4-deficient astroglial cells in mouse brain toward a site of injury. *FASEB J*, 21, 108-16.
- BOENISCH, T. 2003. *Handbuch Immunhistochemische Färbemethoden*, DakoCytomation.
- BRAMBILLA, R., MORTON, P. D., ASHBAUGH, J. J., KARMALLY, S., LAMBERTSEN, K. L. & BETHEA, J. R. 2014. Astrocytes play a key role in EAE pathophysiology by orchestrating in the CNS the inflammatory response of resident and peripheral immune cells and by suppressing remyelination. *Glia*, 62, 452-67.
- BUSCH, M. A., SCHIENKIEWITZ, A., NOWOSSADECK, E. & GOSSWALD, A. 2013. [Prevalence of stroke in adults aged 40 to 79 years in Germany: results of the German Health Interview and Examination Survey for Adults (DEGS1)]. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*, 56, 656-60.
- BUSH, T. G., PUVANACHANDRA, N., HORNER, C. H., POLITO, A., OSTENFELD, T., SVENDSEN, C. N., MUCKE, L., JOHNSON, M. H. & SOFRONIEW, M. V. 1999. Leukocyte infiltration, neuronal degeneration, and neurite outgrowth after ablation of scar-forming, reactive astrocytes in adult transgenic mice. *Neuron*, 23, 297-308.
- CAMPBELL, B. C., MITCHELL, P. J., KLEINIG, T. J., DEWEY, H. M., CHURILOV, L., YASSI, N., YAN, B., DOWLING, R. J., PARSONS, M. W., OXLEY, T. J., WU, T. Y., BROOKS, M., SIMPSON, M. A., MITEFF, F., LEVI, C. R., KRAUSE, M., HARRINGTON, T. J., FAULDER, K. C., STEINFORT,

- B. S., PRIGLINGER, M., ANG, T., SCROOP, R., BARBER, P. A., MCGUINNESS, B., WIJERATNE, T., PHAN, T. G., CHONG, W., CHANDRA, R. V., BLADIN, C. F., BADVE, M., RICE, H., DE VILLIERS, L., MA, H., DESMOND, P. M., DONNAN, G. A., DAVIS, S. M. & INVESTIGATORS, E.-I. 2015. Endovascular therapy for ischemic stroke with perfusion-imaging selection. *N Engl J Med*, 372, 1009-18.
- CHOMCZYNSKI, P. & SACCHI, N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 162, 156-9.
- DENHARDT, D. T., NODA, M., O'REGAN, A. W., PAVLIN, D. & BERMAN, J. S. 2001. Osteopontin as a means to cope with environmental insults: regulation of inflammation, tissue remodeling, and cell survival. *J Clin Invest*, 107, 1055-61.
- DING, A. H., NATHAN, C. F. & STUEHR, D. J. 1988. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J Immunol*, 141, 2407-12.
- DIRNAGL, U. 2012. Pathobiology of injury after stroke: the neurovascular unit and beyond. *Ann N Y Acad Sci*, 1268, 21-5.
- DIRNAGL, U., IADECOLA, C. & MOSKOWITZ, M. A. 1999. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci*, 22, 391-7.
- DOYLE, K. P., YANG, T., LESSOV, N. S., CIESIELSKI, T. M., STEVENS, S. L., SIMON, R. P., KING, J. S. & STENZEL-POORE, M. P. 2008. Nasal administration of osteopontin peptide mimetics confers neuroprotection in stroke. *J Cereb Blood Flow Metab*, 28, 1235-48.
- ELLISON, J. A., BARONE, F. C. & FEUERSTEIN, G. Z. 1999. Matrix remodeling after stroke. De novo expression of matrix proteins and integrin receptors. *Ann N Y Acad Sci*, 890, 204-22.
- ELLISON, J. A., VELIER, J. J., SPERA, P., JONAK, Z. L., WANG, X., BARONE, F. C. & FEUERSTEIN, G. Z. 1998. Osteopontin and its integrin receptor alpha(v)beta3 are upregulated during formation of the glial scar after focal stroke. *Stroke*, 29, 1698-706; discussion 1707.

- FAULKNER, J. R., HERRMANN, J. E., WOO, M. J., TANSEY, K. E., DOAN, N. B. & SOFRONIEW, M. V. 2004. Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury. *J Neurosci*, 24, 2143-55.
- FRYDENLUND, D. S., BHARDWAJ, A., OTSUKA, T., MYLONAKOU, M. N., YASUMURA, T., DAVIDSON, K. G., ZEYNALOV, E., SKARE, O., LAAKE, P., HAUG, F. M., RASH, J. E., AGRE, P., OTTERSEN, O. P. & AMIRY-MOGHADDAM, M. 2006. Temporary loss of perivascular aquaporin-4 in neocortex after transient middle cerebral artery occlusion in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 13532-6.
- GEISSMANN, F., JUNG, S. & LITTMAN, D. R. 2003. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity*, 19, 71-82.
- GELDERBLUM, M., LEYPOLDT, F., STEINBACH, K., BEHRENS, D., CHOE, C. U., SILER, D. A., ARUMUGAM, T. V., ORTHEY, E., GERLOFF, C., TOLOSA, E. & MAGNUS, T. 2009. Temporal and spatial dynamics of cerebral immune cell accumulation in stroke. *Stroke*, 40, 1849-57.
- GIACHELLI, C. M., LOMBARDI, D., JOHNSON, R. J., MURRY, C. E. & ALMEIDA, M. 1998. Evidence for a role of osteopontin in macrophage infiltration in response to pathological stimuli in vivo. *Am J Pathol*, 152, 353-8.
- GLIEM, M., KRAMMES, K., LIAW, L., VAN ROOIJEN, N., HARTUNG, H. P. & JANDER, S. 2015. Macrophage-derived osteopontin induces reactive astrocyte polarization and promotes re-establishment of the blood brain barrier after ischemic stroke. *Glia*, 63, 2198-207.
- GLIEM, M., MAUSBERG, A. K., LEE, J. I., SIMIANTONAKIS, I., VAN ROOIJEN, N., HARTUNG, H. P. & JANDER, S. 2012. Macrophages prevent hemorrhagic infarct transformation in murine stroke models. *Ann Neurol*, 71, 743-52.
- GOYAL, M., DEMCHUK, A. M., MENON, B. K., EESA, M., REMPEL, J. L., THORNTON, J., ROY, D., JOVIN, T. G., WILLINSKY, R. A., SAPKOTA, B. L., DOWLATSHAHI, D., FREI, D. F., KAMAL, N. R., MONTANERA, W. J., POPPE, A. Y., RYCKBORST, K. J., SILVER, F. L., SHUAIB, A., TAMPIERI, D., WILLIAMS, D., BANG, O. Y., BAXTER, B. W., BURNS, P. A., CHOE, H.,

- HEO, J. H., HOLMSTEDT, C. A., JANKOWITZ, B., KELLY, M., LINARES, G., MANDZIA, J. L., SHANKAR, J., SOHN, S. I., SWARTZ, R. H., BARBER, P. A., COUTTS, S. B., SMITH, E. E., MORRISH, W. F., WEILL, A., SUBRAMANIAM, S., MITHA, A. P., WONG, J. H., LOWERISON, M. W., SAJOBI, T. T., HILL, M. D. & INVESTIGATORS, E. T. 2015. Randomized assessment of rapid endovascular treatment of ischemic stroke. *N Engl J Med*, 372, 1019-30.
- GUESDON, J. L., TERNYNCK, T. & AVRAMEAS, S. 1979. The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. *J Histochem Cytochem*, 27, 1131-9.
- GUPTA, Y. K. & CHAUHAN, A. 2011. Potential of immunosuppressive agents in cerebral ischaemia. *Indian J Med Res*, 133, 15-26.
- HARING, H. P., BERG, E. L., TSURUSHITA, N., TAGAYA, M. & DEL ZOPPO, G. J. 1996. E-selectin appears in nonischemic tissue during experimental focal cerebral ischemia. *Stroke*, 27, 1386-91; discussion 1391-2.
- IADECOLA, C. & ANRATHER, J. 2011. The immunology of stroke: from mechanisms to translation. *Nat Med*, 17, 796-808.
- KATSURA, K., KRISTIAN, T. & SIESJO, B. K. 1994. Energy metabolism, ion homeostasis, and cell damage in the brain. *Biochem Soc Trans*, 22, 991-6.
- KAWANO, H., KIMURA-KURODA, J., KOMUTA, Y., YOSHIOKA, N., LI, H. P., KAWAMURA, K., LI, Y. & RAISMAN, G. 2012. Role of the lesion scar in the response to damage and repair of the central nervous system. *Cell Tissue Res*, 349, 169-80.
- KUNST, A. E., AMIRI, M. & JANSSEN, F. 2011. The decline in stroke mortality: exploration of future trends in 7 Western European countries. *Stroke*, 42, 2126-30.
- KURY, P., ZICKLER, P., STOLL, G., HARTUNG, H. P. & JANDER, S. 2005. Osteopontin, a macrophage-derived matricellular glycoprotein, inhibits axon outgrowth. *FASEB J*, 19, 398-400.
- LEES, K. R., EMBERSON, J., BLACKWELL, L., BLUHMKI, E., DAVIS, S. M., DONNAN, G. A., GROTTA, J. C., KASTE, M., VON KUMMER, R., LANSBERG, M. G., LINDLEY, R. I., LYDEN, P., MURRAY, G. D., SANDERCOCK, P. A., TONI, D., TOYODA, K., WARDLAW, J. M.,

- WHITELEY, W. N., BAIGENT, C., HACKE, W., HOWARD, G. & STROKE THROMBOLYSIS TRIALISTS' COLLABORATORS, G. 2016. Effects of Alteplase for Acute Stroke on the Distribution of Functional Outcomes: A Pooled Analysis of 9 Trials. *Stroke*, 47, 2373-9.
- LENGA, Y., KOH, A., PERERA, A. S., MCCULLOCH, C. A., SODEK, J. & ZOHAR, R. 2008. Osteopontin expression is required for myofibroblast differentiation. *Circ Res*, 102, 319-27.
- LIAW, L., BIRK, D. E., BALLAS, C. B., WHITSITT, J. S., DAVIDSON, J. M. & HOGAN, B. L. 1998. Altered wound healing in mice lacking a functional osteopontin gene (spp1). *J Clin Invest*, 101, 1468-78.
- LINDSBERG, P. J., CARPEN, O., PAETAU, A., KARJALAINEN-LINDSBERG, M. L. & KASTE, M. 1996. Endothelial ICAM-1 expression associated with inflammatory cell response in human ischemic stroke. *Circulation*, 94, 939-45.
- LIVAK, K. J. & SCHMITTGEN, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25, 402-8.
- LOGAN, A., BERRY, M., GONZALEZ, A. M., FRAUTSCHY, S. A., SPORN, M. B. & BAIRD, A. 1994. Effects of transforming growth factor beta 1 on scar production in the injured central nervous system of the rat. *Eur J Neurosci*, 6, 355-63.
- MAETZLER, W., BERG, D., FUNKE, C., SANDMANN, F., STUNITZ, H., MAETZLER, C. & NITSCH, C. 2010. Progressive secondary neurodegeneration and microcalcification co-occur in osteopontin-deficient mice. *Am J Pathol*, 177, 829-39.
- MANLEY, G. T., FUJIMURA, M., MA, T., NOSHITA, N., FILIZ, F., BOLLEN, A. W., CHAN, P. & VERKMAN, A. S. 2000. Aquaporin-4 deletion in mice reduces brain edema after acute water intoxication and ischemic stroke. *Nat Med*, 6, 159-63.
- MATHEWSON, A. J. & BERRY, M. 1985. Observations on the astrocyte response to a cerebral stab wound in adult rats. *Brain Res*, 327, 61-9.

- MORI, R., SHAW, T. J. & MARTIN, P. 2008. Molecular mechanisms linking wound inflammation and fibrosis: knockdown of osteopontin leads to rapid repair and reduced scarring. *J Exp Med*, 205, 43-51.
- MORO, M. A., CARDENAS, A., HURTADO, O., LEZA, J. C. & LIZASOAIN, I. 2004. Role of nitric oxide after brain ischaemia. *Cell Calcium*, 36, 265-75.
- MOSKOWITZ, M. A., LO, E. H. & IADECOLA, C. 2010. The science of stroke: mechanisms in search of treatments. *Neuron*, 67, 181-98.
- MOSSER, D. M. & EDWARDS, J. P. 2008. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol*, 8, 958-69.
- MULLIS, K. B. & FALOONA, F. A. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*, 155, 335-50.
- NAGELHUS, E. A., VERUKI, M. L., TORP, R., HAUG, F. M., LAAKE, J. H., NIELSEN, S., AGRE, P. & OTTERSEN, O. P. 1998. Aquaporin-4 water channel protein in the rat retina and optic nerve: polarized expression in Muller cells and fibrous astrocytes. *J Neurosci*, 18, 2506-19.
- NATHAN, C. & DING, A. 2010. Nonresolving inflammation. *Cell*, 140, 871-82.
- NATIONAL INSTITUTE OF NEUROLOGICAL, D. & STROKE RT, P. A. S. S. G. 1995. Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. *N Engl J Med*, 333, 1581-7.
- NEELY, J. D., CHRISTENSEN, B. M., NIELSEN, S. & AGRE, P. 1999. Heterotetrameric composition of aquaporin-4 water channels. *Biochemistry*, 38, 11156-63.
- NIELSEN, S., NAGELHUS, E. A., AMIRY-MOGHADDAM, M., BOURQUE, C., AGRE, P. & OTTERSEN, O. P. 1997. Specialized membrane domains for water transport in glial cells: high-resolution immunogold cytochemistry of aquaporin-4 in rat brain. *J Neurosci*, 17, 171-80.
- NISHINO, A., SUZUKI, M., OHTANI, H., MOTOHASHI, O., UMEZAWA, K., NAGURA, H. & YOSHIMOTO, T. 1993. Thrombin may contribute to the pathophysiology of central nervous system injury. *J Neurotrauma*, 10, 167-79.
- NOGUEIRA, R. G., JADHAV, A. P., HAUSSEN, D. C., BONAFE, A., BUDZIK, R. F., BHUVA, P., YAVAGAL, D. R., RIBO, M., COGNARD, C., HANEL, R. A., SILA, C. A., HASSAN, A. E., MILLAN, M., LEVY, E. I., MITCHELL, P.,

- CHEN, M., ENGLISH, J. D., SHAH, Q. A., SILVER, F. L., PEREIRA, V. M., MEHTA, B. P., BAXTER, B. W., ABRAHAM, M. G., CARDONA, P., VEZNEDAROGLU, E., HELLINGER, F. R., FENG, L., KIRMANI, J. F., LOPES, D. K., JANKOWITZ, B. T., FRANKEL, M. R., COSTALAT, V., VORA, N. A., YOO, A. J., MALIK, A. M., FURLAN, A. J., RUBIERA, M., AGHAEBRAHIM, A., OLIVOT, J.-M., TEKLE, W. G., SHIELDS, R., GRAVES, T., LEWIS, R. J., SMITH, W. S., LIEBESKIND, D. S., SAVER, J. L. & JOVIN, T. G. 2018. Thrombectomy 6 to 24 Hours after Stroke with a Mismatch between Deficit and Infarct. *New England Journal of Medicine*, 378, 11-21.
- PALM, F., URBANEK, C., ROSE, S., BUGGLE, F., BODE, B., HENNERICI, M. G., SCHMIEDER, K., INSELMANN, G., REITER, R., FLEISCHER, R., PIPLACK, K. O., SAFER, A., BECHER, H. & GRAU, A. J. 2010. Stroke Incidence and Survival in Ludwigshafen am Rhein, Germany: the Ludwigshafen Stroke Study (LuSSt). *Stroke*, 41, 1865-70.
- PAPADOPOULOS, M. C., MANLEY, G. T., KRISHNA, S. & VERKMAN, A. S. 2004. Aquaporin-4 facilitates reabsorption of excess fluid in vasogenic brain edema. *FASEB J*, 18, 1291-3.
- PEKNY, M., JOHANSSON, C. B., ELIASSON, C., STAKEBERG, J., WALLEN, A., PERLMANN, T., LENDAHL, U., BETSHOLTZ, C., BERTHOLD, C. H. & FRISEN, J. 1999. Abnormal reaction to central nervous system injury in mice lacking glial fibrillary acidic protein and vimentin. *J Cell Biol*, 145, 503-14.
- PENG, H., ONG, Y. M., SHAH, W. A., HOLLAND, P. C. & CARBONETTO, S. 2013. Integrins regulate centrosome integrity and astrocyte polarization following a wound. *Dev Neurobiol*, 73, 333-53.
- ROLLO, E. E., LASKIN, D. L. & DENHARDT, D. T. 1996. Osteopontin inhibits nitric oxide production and cytotoxicity by activated RAW264.7 macrophages. *J Leukoc Biol*, 60, 397-404.
- RYU, J. K., DAVALOS, D. & AKASSOGLU, K. 2009. Fibrinogen signal transduction in the nervous system. *J Thromb Haemost*, 7 Suppl 1, 151-4.
- SAADOUN, S., PAPADOPOULOS, M. C., WATANABE, H., YAN, D., MANLEY, G. T. & VERKMAN, A. S. 2005. Involvement of aquaporin-4 in astroglial cell migration and glial scar formation. *J Cell Sci*, 118, 5691-8.

- SCHILLING, M., BESSELMANN, M., LEONHARD, C., MUELLER, M., RINGELSTEIN, E. B. & KIEFER, R. 2003. Microglial activation precedes and predominates over macrophage infiltration in transient focal cerebral ischemia: a study in green fluorescent protein transgenic bone marrow chimeric mice. *Exp Neurol*, 183, 25-33.
- SCHROETER, M., JANDER, S. & STOLL, G. 2002. Non-invasive induction of focal cerebral ischemia in mice by photothrombosis of cortical microvessels: characterization of inflammatory responses. *J Neurosci Methods*, 117, 43-9.
- SCHROETER, M., ZICKLER, P., DENHARDT, D. T., HARTUNG, H. P. & JANDER, S. 2006. Increased thalamic neurodegeneration following ischaemic cortical stroke in osteopontin-deficient mice. *Brain*, 129, 1426-37.
- SHAPOURI-MOGHADDAM, A., MOHAMMADIAN, S., VAZINI, H., TAGHADOSI, M., ESMAEILI, S. A., MARDANI, F., SEIFI, B., MOHAMMADI, A., AFSHARI, J. T. & SAHEBKAR, A. 2018. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J Cell Physiol*, 233, 6425-6440.
- SHEARER, M. C. & FAWCETT, J. W. 2001. The astrocyte/meningeal cell interface--a barrier to successful nerve regeneration? *Cell Tissue Res*, 305, 267-73.
- SHECHTER, R., LONDON, A., VAROL, C., RAPOSO, C., CUSIMANO, M., YOVEL, G., ROLLS, A., MACK, M., PLUCHINO, S., MARTINO, G., JUNG, S. & SCHWARTZ, M. 2009. Infiltrating blood-derived macrophages are vital cells playing an anti-inflammatory role in recovery from spinal cord injury in mice. *PLoS Med*, 6, e1000113.
- SIBSON, N. R., LOWE, J. P., BLAMIRE, A. M., MARTIN, M. J., OBRENOVITCH, T. P. & ANTHONY, D. C. 2008. Acute astrocyte activation in brain detected by MRI: new insights into T(1) hypointensity. *J Cereb Blood Flow Metab*, 28, 621-32.
- SOFRONIEW, M. V. 2009. Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci*, 32, 638-47.
- TAYLOR, A., VERHAGEN, J., BLASER, K., AKDIS, M. & AKDIS, C. A. 2006. Mechanisms of immune suppression by interleukin-10 and transforming growth factor-beta: the role of T regulatory cells. *Immunology*, 117, 433-42.

- WANG, X., LOUDEN, C., YUE, T. L., ELLISON, J. A., BARONE, F. C., SOLLEVELD, H. A. & FEUERSTEIN, G. Z. 1998. Delayed expression of osteopontin after focal stroke in the rat. *J Neurosci*, 18, 2075-83.
- WEBER, G. F., ASHKAR, S., GLIMCHER, M. J. & CANTOR, H. 1996. Receptor-ligand interaction between CD44 and osteopontin (Eta-1). *Science*, 271, 509-12.
- XUE, J., SCHMIDT, S. V., SANDER, J., DRAFFEHN, A., KREBS, W., QUESTER, I., DE NARDO, D., GOHEL, T. D., EMDE, M., SCHMIDLEITHNER, L., GANESAN, H., NINO-CASTRO, A., MALLMANN, M. R., LABZIN, L., THEIS, H., KRAUT, M., BEYER, M., LATZ, E., FREEMAN, T. C., ULAS, T. & SCHULTZE, J. L. 2014. Transcriptome-based network analysis reveals a spectrum model of human macrophage activation. *Immunity*, 40, 274-88.
- YAN, Y. P., LANG, B. T., VEMUGANTI, R. & DEMPSEY, R. J. 2009. Osteopontin is a mediator of the lateral migration of neuroblasts from the subventricular zone after focal cerebral ischemia. *Neurochem Int*, 55, 826-32.
- YOSHIOKA, N., HISANAGA, S. & KAWANO, H. 2010. Suppression of fibrotic scar formation promotes axonal regeneration without disturbing blood-brain barrier repair and withdrawal of leukocytes after traumatic brain injury. *J Comp Neurol*, 518, 3867-81.
- ZAMANIAN, J. L., XU, L., FOO, L. C., NOURI, N., ZHOU, L., GIFFARD, R. G. & BARRES, B. A. 2012. Genomic analysis of reactive astrogliosis. *J Neurosci*, 32, 6391-410.
- ZHANG, Z., CHOPP, M., GOUSSEV, A. & POWERS, C. 1998. Cerebral vessels express interleukin 1beta after focal cerebral ischemia. *Brain Res*, 784, 210-7.
- ZOHAR, R., SUZUKI, N., SUZUKI, K., ARORA, P., GLOGAUER, M., MCCULLOCH, C. A. & SODEK, J. 2000. Intracellular osteopontin is an integral component of the CD44-ERM complex involved in cell migration. *J Cell Physiol*, 184, 118-30.

## Danksagung

---

Zum guten Schluss möchte ich mich bei denjenigen bedanken, ohne die diese Arbeit niemals zustande gekommen wäre:

Meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. med. Sebastian Jander für die Überlassung des Themas, die stetige, freundliche und unkomplizierte Betreuung und die zahlreichen Korrekturen.

Meinem Betreuer Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Michael Gliem für die tatkräftige Unterstützung, die vielen Korrekturen, die schnelle Hilfe in allen Fragen und die entspannte Zusammenarbeit. Es hat Spaß gemacht!

Ein ganz besonderer Dank geht an Frau Birgit Blumenkamp, die immer Zeit und Geduld für mich hatte. Darüber hinaus danke ich ihr für ihre tollen Versuchsprotokolle und das perfekt organisierte Labor.

Vergessen möchte ich auch auf keinen Fall das gesamte Team des neurologischen Labors, wo ich immer wann nötig Unterstützung fand.

Dem *GLIA* Journal für die unkomplizierte Überlassung der bereits veröffentlichten Abbildungen.

Und natürlich meiner Familie, insbesondere meinem Mann, für die Korrekturen, die Unterstützung und die Motivation, diese Arbeit zu beenden.

---