
Aus der Klinik für Neurologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Dr. h. c. Sven Meuth

Vergleich postischämischer Neuroinflammation zwischen zerebralem Kortex
und Rückenmark

Dissertation

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

vorgelegt von
Robin Alexander Jansen
2021

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Jander

Zweitgutachter: PD Dr. med. Bönner

We are here to add what we can to, not to get what we can from, Life.

Sir William Osler (1849-1919)

Zusammenfassung

Die Inzidenz der Schlaganfälle weltweit wird auf jährlich 15 Millionen geschätzt (WHO, 2012). In Deutschland ereignen sich jährlich ca. 262.000 Schlaganfälle, infolge derer etwa 63.000 Menschen versterben (Heuschmann et al., 2010). Während die akuttherapeutische Lysetherapie und die sekundärprophylaktische Einstellung der kardiovaskulären Risikofaktoren sowie die Sekundärprophylaxe via medikamentöser Thrombozytenaggregationshemmung und oraler Antikoagulation feste Bestandteile einer leitliniengerechten Therapie bei Schlaganfall darstellen, ist die postischämische Immunantwort als Effektor von Reparatur und Schädigung zuletzt in den Fokus neurowissenschaftlicher Grundlagenforschung gerückt. Die im letzten Jahrzehnt erzielten technischen Fortschritte der Antikörpertherapie und die wachsenden Möglichkeiten der Genom-Editierung rücken gezielte Eingriffe in die inflammatorische Antwort in greifbare Nähe. Der Aufklärung der inflammatorischen Vorgänge nach Ischämie kommt somit eine essentielle Bedeutung zu. Kernstück dieser Arbeit stellt die von unserer Arbeitsgruppe etablierte Methode der Induktion vergleichbarer Läsionen in grauer- (Cortex) und weißer Substanz (Rückenmark) via Photothrombose dar. Ein auf dem gleichen Pathomechanismus beruhender Vergleich der postischämischen Immunantwort in grauer und weißer Substanz ist mit den verwendeten Methoden zum jetzigen Zeitpunkt erstmals möglich und kann Hinweise geben, ob die therapeutische Manipulation an differenziell ausgeprägte inflammatorische Antworten in unterschiedlichen ZNS Kompartimenten angepasst werden muss. Zum ersten Mal konnte in einem Vergleichsmodell gezeigt werden, dass die postischämische Immunantwort spinal zu einem größeren Anteil als zerebral auf hämatogen eingewanderten Monozyten/Makrophagen beruht und zerebral zu einem höheren Anteil auf einer mikroglialen Immunantwort. Gleichzeitig ist die resultierende inflammatorische Antwort auf Transkriptomebene nach der Ischämie in beiden Geweben sehr ähnlich sowohl im Hinblick auf Inflammation als auch in Hinblick auf Reparatur. Einen interessanten Unterschied deckte die Transkriptomanalyse auf. Anhand von etablierten Gendatenbanken konnte der Nachweis einer verstärkten

Expression remyelinisierungsspezifischer Gene nach zerebraler Ischämie nachgewiesen werden.

Summary

Based on data supplied by the WHO the number of strokes worldwide is estimated by 15 million a year. Numbers from Germany estimate around 262.000 strokes with around 63.000 deaths a year (Heuschmann et al., 2010). While thrombolysis, control of cardiovascular risk factors and secondary prophylaxis via drug for inhibition of platelet aggregation or anticoagulation are fixed components of guideline-based therapy for stroke, the post-ischemic immune response as an effector of repair and damage has recently gained attention of neuroscientific research. In the past ten years technical advances made in antibody therapy and genome editing are bringing targeted therapy concepts within reach. The exact decryption of postischemic inflammatory processes is a critical part for the identification of new drug targets. The core work of this dissertation is the method of inducing comparable lesions in gray (cortex) and white matter (spinal cord) via photothrombosis. We provide the first comparison of postischemic immune response in white- and gray matter based on the same pathomechanism. For the first time, a valid comparative model was able to show that the spinal post-ischemic immune response is based to a greater extent on hematogenously immigrated monocytes / macrophages and granulocytes than the cerebral post-ischemic immune response. Vice versa the cerebral immune response is dominated by microglial cells. At the same time, the resulting inflammatory response after ischemia is comparable in both tissues at the transcriptome level, both in terms of inflammation and in terms of repair. However, the transcriptome analysis revealed an interesting difference. With the help of established gene databases, evidence of increased expression of myelination-specific genes after cerebral ischemia could be demonstrated.

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent	C3ar1	<i>Complement C3a Receptor 1</i>
°C	Grad Celsius	C4a	<i>Complement C4-A</i>
µl	Mikroliter	C4b	Complement C4-A
µ	Mikrometer	C5ar1	Complement component 5a receptor 1
\bar{x}	Mittelwert	C5ar2	Complement component 5a receptor
Aa.	Arteriae (Plural von Arterie/ latein)	C57BL/6	Mausstamm: C57 black 6
ANOVA	Analysis of variance	C6	Komplementkomponente 6
ATPase	Adenosintriphosphatase	CALR	<i>Calreticulin</i>
ATP	Adenosintriphosphat	Cfb	Komplementfaktor b
Arg1	Arginase-1	Cfp	<i>Complement factor properdi,</i>
Bcl2a	Bcl-2-related proteine	Cfh	<i>Faktor H der Komplementaktivierungsfamilie</i>
C1qa	Komplement C1q-Untereinheit A	CCR2	<i>C-C chemokine receptor type 2</i>
C1qb	Komplement C1q-Untereinheit B	CD	<i>cluster of differentiation</i>
C1qc	Komplement C1q-Untereinheit C	cDNA	<i>complementary DNA</i>
C1ql1:	<i>Complement component 1, q subcomponent-like 1</i>	Cm	Zentimeter
C1ra	<i>Complement component 1, r subcomponent A</i>	Cnp	CNPase-Enzym
C1s1	<i>Complement component 1, s subcomponent</i>	Cntf	<i>Ciliary neurotrophic factor</i>
C3	Komplementkomponente 3	Col1a1	Kollagen Typ I, alpha 1
		Col3a1	Kollagen Typ III, alpha 1
		Col4a1	Kollagen Typ IV, alpha 1

CX3CL1	<i>C-X3-C Motif Chemokine Ligand 1</i>	OPC	<i>Oligodendrocyte precursor cells</i>
Cx3cr1	<i>CX3C chemokine receptor 1</i>	OMG	<i>Oligodendrocyte-myelin glycoprotein Gene,</i>
DAPI	<i>4',6-Diamidin-2-phenylindol-dihydrochlorid</i>	ml	<i>Milliliter</i>
DAMPS	<i>Danger associated molecule patterns</i>	Mobp	<i>Myelin Associated Oligodendrocyte Basic Protein</i>
DGN	<i>Deutsche Gesellschaft für Neurologie</i>	Opalin	<i>Oligodendrocytic myelin paranodal and inner loop protein</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>	Mobp	<i>Myelin Associated Oligodendrocyte Basic Protein</i>
ErbB3	<i>Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 3</i>	mRNA	<i>Messenger-RNA</i>
FSC	<i>Forwardscatter</i>	N	<i>Number</i>
g	<i>Gramm</i>	Na⁺	<i>Natriumion</i>
GAPDH	<i>Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase</i>	Nm	<i>Nanometer</i>
GDF-15	<i>Growth/differentiation factor 15</i>	NS	<i>Nicht signifikant</i>
GFAP	<i>Glial fibrillary acidic protein</i>	OMG	<i>Oligodendrocyte-myelin glycoprotein Gene</i>
Ifng	<i>Interferon Gamma</i>	Opalin	<i>Oligodendrocytic myelin paranodal and inner loop protein</i>
IL1a	<i>Interleukin-1-alpha</i>	Osm	<i>Oncostatin m</i>
IL1b	<i>Interleukin 1 beta</i>	P	<i>Lateinisch probabilitas = Wahrscheinlichkeit</i>
IL6	<i>Interleukin-6</i>	P2ry12	<i>Purinerges Rezeptor „P2Y12“</i>
Lif	<i>LIF Interleukin 6 family cytokine</i>	PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
mg	<i>Milligramm</i>	Pilrb2	<i>Paired immunoglobulin-like type 2 receptor beta-2</i>
Ofml3	<i>Olfactomedin-like 3</i>	Plp1	<i>Proteolipidprotein-1</i>
Omg	<i>Oligodendrocyte-myelin glycoprotein</i>		

qPCR	<i>Quantitative Polymerase chain reaction</i>	VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>	Vgl.	Vergleiche
rpm	<i>Rounds per minute</i>	Vol.	Volumen
Sall1	<i>Sal-like protein 1</i>	WHO	Weltgesundheitsorganisat ion
Slc2a5	<i>Solute Carrier Family 2 Member 5</i>		
Serpina3n	<i>Serine protease inhibitor A3N</i>		
Sox-6/10	<i>SRY-Box Transcription Factor 6/10</i>		
Socs3	<i>Suppressor of cytokine signaling 3</i>		
SSC	Sidescatter		
Stat3	<i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>		
TGF-α	<i>Transforming growth factor alpha</i>		
TGFb/β1	<i>Transforming growth factor beta 1</i>		
Tgm12	<i>Transglutaminase-1</i>		
TMEM112	<i>Transmembrane protein 112</i>		
TMEM119	<i>Transmembrane protein 119</i>		
TNFalpha	Tumornekrosefaktor-alpha		
Tnfa	Tumornekrosefaktor		
Tnfrsf1a	<i>Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily, Member 1A</i>		
UDP	Uridindiphosphat		

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die chemische Reaktion der Photochromose.	14
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Avidin-Biotin-Komplex-Methode.	20
Abbildung 3: Schematische Darstellung eines Durchflusszytometers.	33
Abbildung 4: Schematische Darstellung des Aufbaus eines Genechips nach erfolgreicher Bindung des Fluoreszenzfarbstoffes an die mRNA-cDNA-Paare.	39
Abbildung 5: Versuchsaufbau.	43
Abbildung 6: Nachweis von Myelin in der Immunfluoreszenz.	44
Abbildung 7: Immunhistochemische Färbung des Intermediärfilaments „GFAP“ in braun (3,3-Diaminobenzidin).	45
Abbildung 8: Immunhistochemische Färbung von Kollagen Typ 4 in braun (3,3-Diaminobenzidin).	47
Abbildung 9: Immunhistochemische Färbungen des CD-Antigens 68 (CD68) in braun (3,3-Diaminobenzidin).	49
Abbildung 10: Fluoreszenzbasierte Durchflusszytometrie von Gehirn- und Rückenmarksgewebe am siebten Tag nach Infarkt ereignis.	51
Abbildung 11: Absolute Anzahl gemessener Zelltypen im Zeitverlauf	52
Abbildung 12: Übersicht mikroglia- und monozyten/makrophagenspezifischer Marker aus der realtime quantitativen PCR	54
Abbildung 13: Übersicht spezifisch inflammatorischer Marker in der realtime quantitativen PCR	55
Abbildung 14: Zweidimensionale Darstellung der Hauptkomponentenanalyse aller für die Microarrayanalyse verwendeten Gewebearten.	56
Abbildung 15: Vergleich der Genexpression im zerebralen und spinalen Gewebe via Microarray hinsichtlich etablierter Gendatenbanken exemplarisch an Tag 7.	57
Abbildung 16: Übersicht der Ergebnisse der Transkriptomanalyse für Gene welche für Prozesse der Inflammation kodieren als vielfaches der Kontrolle.	59
Abbildung 17: Übersicht der Ergebnisse der Transkriptomanalyse für Gene welche für Prozesse der Reparatur nach Ischämie kodieren als vielfaches der Kontrolle.	60

- Abbildung 18:** Übersicht der Ergebnisse der Transkriptomanalyse für Gene welche für Prozesse der Phagozytose nach Ischämie kodieren als vielfaches der Kontrolle. 61
- Abbildung 19:** Übersicht der Ergebnisse der Transkriptomanalyse für Gene welche für Remyelinisierungsprozesse kodieren als vielfaches der Kontrolle. 62
- Abbildung 20:** Übersicht der Ergebnisse der Transkriptomanalyse für Gene welche für Remyelinisierungsprozesse kodieren als vielfaches der Kontrolle. 63

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Primärantikörper der Immunhistochemie.	21
Tabelle 2: Herstellerverzeichnis der verwendeten Antikörper.	22
Tabelle 3: Inkubationszeit der Antikörper.	23
Tabelle 4: Verwendete Primer mit Sequenzen.	32
Tabelle 5: Antikörper der fluoreszenzbasierten Durchflusszytometrie mit Hersteller und Farbe.	35

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Summary	III
Abkürzungsverzeichnis	IV
Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	IX
1 Einleitung	1
1.1 <i>Pathophysiologie des ischämischen ZNS Infarkts</i>	2
1.2 <i>Postischämische Inflammation</i>	3
1.2.1 Modelle spinaler- und zerebraler Schädigung in der Literatur	5
1.2.2 Inflammation und Reparatur nach zerebraler Ischämie	6
1.2.3 Inflammation und Reparatur nach spinaler Schädigung	7
1.2.4 Vergleich der postischämischen Invasion von Immunzellen zerebral und spinal	8
1.2.5 Vergleich der postischämischen Zytokinantwort zerebral und spinal	10
1.2.6 Immunologische Therapieansätze	12
1.2.7 Ziele der vorliegenden Arbeit	13
2 Material und Methoden	14
2.0.1 <i>Tierversuchsgenehmigung</i>	14
2.1 <i>Die Photothrombose</i>	14
Überblick	14
Verfahren	14
Protokoll	15
2.2 <i>Histologie</i>	17
2.2.1 Herstellung der Präparate	17
2.2.2 Kresylviolett-färbung	19
2.2.3 Immunhistochemie	19
2.2.4 Immunfluoreszenzfärbung	23
2.2.5 Bildverarbeitung	25
2.4 <i>Real-time quantitative PCR</i>	25
Überblick	25
Verfahren	25
Protokoll	28
2.5 <i>Fluoreszenzbasierte Durchflusszytometrie</i>	32
Überblick	32

Verfahren	32
Protokoll	33
2.6 <i>Knochenmarkchimären</i>	35
Überblick	35
Verfahren	35
Protokoll	36
2.7 <i>DNA-Microarray</i>	37
2.8 <i>Illustrationen</i>	40
2.9 <i>Statistische Auswertung</i>	40
3 Ergebnisse	42
3.1 <i>Vergleichbare Infarktgröße nach Photothrombose des Cortex und des Rückenmarks</i>	42
3.2 <i>Unterschiedliche Anteile weißer Substanz zwischen der Ischämie im Rückenmark und Kortex</i>	43
3.4 <i>Nachweis signifikant höherer Mengen aktivierter Astrozyten nach spinaler Ischämie</i>	44
3.5 <i>Kein signifikante Unterschied in der Menge von synthetisiertem Kollagen in der Infarktnarbe</i>	46
3.3 <i>Nachweis signifikant höherer Mengen phagozytierender Zellen nach spinaler Ischämie</i>	48
3.4 <i>Nachweis unterschiedlicher Mengen aktivierter Mikroglia, hämatogener Monozyten/Makrophagen und neutrophiler Granulozyten nach spinaler und zerebraler Ischämie in der fluoreszenzbasierten Durchflusszytometrie</i>	50
3.5 <i>Die Messung zelltypspezifischer mRNA-Mengen in der real-time quantitativen PCR bestätigen die Ergebnisse der fluoreszenzbasierten Durchflusszytometrie</i>	53
3.6 <i>Ähnliches Expressionsmuster inflammations- und reparaturspezifischer Gene nach Rückenmarks- und Hirninfarkt</i>	54
3.6.1 <i>Microarray: Global unterschiedliche Genexpression im Rückenmark und Gehirn in der Hauptkomponentenanalyse</i>	56
3.7.2 <i>Kein signifikanter Unterschied in der Genexpression etablierter immunologischer Gendatenbanken zwischen beiden Modellen</i>	57
<i>Um einen breiten Vergleich zwischen der Genexpression nach spinaler- und zerebraler Ischämie zu erhalten, wurde die Expression von Genen aus etablierten immunologischen Gendatenbanken miteinander verglichen.</i>	57
3.7.3 <i>Nachweis ähnlicher Genexpressionsmuster für inflammations- reparatur- und phagozytosespezifischer Gene</i>	58
3.7.4 <i>Nachweis unterschiedlicher Genexpressionsmuster für Remyelinisierungsprozesse</i>	62
3.7.5 <i>Nachweis unterschiedlicher Genexpressionsmuster für Astrogliose</i>	63
4. Diskussion	65
4.1 <i>Mikroglia und Remyelinisierung</i>	67
4.2 <i>Der Einfluss hämatogener Monozyten/Makrophagen</i>	69
4.3 <i>Kritische Betrachtung</i>	69
4.4 <i>Ausblick</i>	70
5 Literatur und Quellenverzeichnis	72

6. Danksagung

87

1 Einleitung

Die Inzidenz der Schlaganfälle wird auf weltweit jährlich 15 Millionen geschätzt (WHO, 2012). Im Jahre 2016 rangierte der Schlaganfall in der Liste der 10 häufigsten Todesursachen weltweit mit 5,781 Millionen Todesfällen auf dem zweiten Platz. In Deutschland ereignen sich jährlich ca. 262.000 Schlaganfälle infolge derer etwa 63.000 Menschen versterben (Heuschmann et al., 2010). Der Schlaganfall ist darüberhinaus die häufigste Ursache für eine bleibende Behinderung in Deutschland. Im Jahr 2004 wurden die Kosten der Schlaganfallversorgung für das deutsche Gesundheitssystem auf 7,1 Milliarden Euro geschätzt (Kolominsky-Rabas et al., 2006).

Die Akuttherapie mit gentechnologisch hergestelltem tissue plasminogen activator, die den Thrombus lysiert und die Versorgung des zuvor ischämischen Hirnareals wiederherstellt, ist mittlerweile ein etabliertes Standardverfahren (The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group, 1995). Diese Therapie ist innerhalb des Zeitfensters von 4,5 Stunden nach Beginn der Symptomatik etabliert (Hacke et al., 2008). Die Thrombektomie ist bei großen Gefäßverschlüssen bis zu einem Zeitfenster von 24 Stunden anwendbar und bringt auch nach erfolgreicher i. v. Lysetherapie einen zusätzlichen Nutzen (Campbell et al., 2015; Saver et al., 2015; Berkhemer et al., 2015).

Trotzdem bleiben aufgrund der engen Zeitfenster und einer Überlebensrate von 2/3 der Patienten schätzungsweise 5 Millionen Menschen weltweit jährlich nach einem Schlaganfall dauerhaft behindert (WHO, 2012). Aus diesem Grunde ist die Erforschung einer Therapie jenseits der Akuttherapie von großer Bedeutung. Die Komponente der postischämischen Neuroinflammation als Grundlage weiterer Reparatur und neuroregenerativer Vorgänge ist dabei in den Fokus gerückt. Dabei ist bekannt, dass sich Inflammation in neuronenreicher grauer und myelinreicher weißer Substanz unterscheiden. Während die grundlagenwissenschaftlichen Erkenntnisse im Mäusehirn gewonnen wurden, das überwiegend aus grauer Substanz besteht, ist das menschliche Hirn zu 80 % weiße und 20 % graue Substanz. Weiße Substanz im ZNS findet sich bei der Maus überwiegend im Rückenmark. Ein Vergleich der Neuroinflammation

zwischen spinalem und zerebralem Infarkt soll die Möglichkeiten der Übertragung von Ergebnissen aus der grauen auf die weiße Substanz testen und klären, ob zukünftige immunmodulatorische Therapien die Gewebezusammensetzung berücksichtigen sollten.

1.1 Pathophysiologie des ischämischen ZNS Infarkts

Der Hauptenergieträger des Gehirns ist Glukose. Nur die ständige Versorgung des Gehirns mit Sauerstoff und Glukose über den Blutkreislauf, ermöglicht den reibungslosen Ablauf des Hirnstoffwechsels. Physiologisch werden 100 g Gehirnmasse mit 58 ml Blut pro Minute versorgt. Eine klinische Symptomatik kann dann festgestellt werden, wenn diese Versorgung auf unter 22 ml pro Minute reduziert wird. Irreversible Schäden treten unter Werten von 8-10 ml pro Minute pro 100 g Hirngewebe auf (Heiss, 1992). Als Folge der eingeschränkten Hirnversorgung sistieren ATP-abhängige Stoffwechselforgänge, allen voran der Transport von Natriumionen im Austausch mit Kaliumionen aus der Zelle (Na^+/K^+ -ATPase) und ATP-abhängige Glutamattransporter, welche unter physiologischen Bedingungen den Rücktransport des in den synaptischen Spalt freigesetzten Glutamats ermöglicht. Da dies nicht geschieht, kommt es durch die Akkumulation von Glutamat im synaptischen Spalt zu einer Überaktivierung von Glutamatrezeptoren vom NMDA-Typ. Diese Überaktivierung führt zu einem Einstrom von Kalziumionen nach intrazellulär, zu mitochondrialer Dysfunktion und der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies. Nach dem Prinzip der Osmose gelangt vermehrt Flüssigkeit in den Intrazellularraum betroffener Zellen. Kann die Zelle diesen Flüssigkeitseinstrom nicht mehr standhalten, führt die resultierende Zellschwellung zum Zelltod (Liang et al., 2007). Dieser Zustand wird als „zytotoxisches Hirnödem“ bezeichnet und tritt vornehmlich in den ersten Stunden nach Infarkt ereignis auf. Bricht als Infarktfolge die Blut-Hirn-Schranke zusammen, tritt Flüssigkeit in den Extrazellularraum aus. Dieser Zustand wird als „vasogenes Zellödem“ bezeichnet und ist innerhalb der ersten drei Tage nach Infarkt ereignis beobachtbar (Shotaro et al., 2015).

1.2 Postischämische Inflammation

Die Immunantwort nach ischämischer ZNS Schädigung wird dominiert durch das angeborene Immunsystem, insbesondere durch Aktivierung ortsständiger Zellen, der Mikroglia und hämatogene Invasion von Zellen der myeloiden Zellreihe, überwiegend den Monozyten.

Beide Zellpopulationen wurden historisch in zwei getrennte Gruppen eingeteilt: Sogenannte M1-Makrophagen mit einer pro-inflammatorischen und damit gewebeschädigenden Eigenschaft (beispielsweise mit Expression des Tumornekrosefaktors-alpha und Interleukin-1-beta) und in reparative M2-Makrophagen (beispielsweise mit Expression des Transforming-growth-factors-beta-1 und Interleukin-10), (Arnold et al., 2007). Diese Schablone kategorisiert auch die postischämische Immunantwort. Einer Phase mit überwiegender Inflammation und Gewebeschädigung steht eine Phase der Reperatur und Regeneration gegenüber.

Monozyten nehmen ihren Ursprung im Knochenmark aus myeloiden Vorläuferzellen, welche wiederum aus hämatogenen Stammzellen hervorgehen (Geissmann et al., 2010). Basierend auf den an ihrer Oberfläche exprimierten Rezeptoren können Monozyten in zwei Untergruppen eingeteilt werden: Die erste Gruppe sind Monozyten mit geringer Expression des CCR2-Rezeptors und geringer Expression des Ly6C Proteins an ihrer Oberfläche (Ly6C^{lo}) sowie starker Expression des CX3-Chemokinrezeptors 1 an ihrer Zelloberfläche (Auffray et al., 2007). Dieser Untergruppe wird eine patrollierende, nicht-inflammatorische Rolle zugesprochen. Die zweite Gruppe sind Monozyten mit hoher Expression des Ly6C Proteins an ihrer Oberfläche (Ly6C^{hi}), geringer Expression des CX3-Chemokinrezeptors 1 und hoher Expression des CCR2-Rezeptors (Geissmann et al., 2003). Die Expression des CCR2-Rezeptors ist von essentieller Bedeutung für die Einwanderung von Monozyten in geschädigtes Gewebe (Serbina et al., 2006, Gliem et al., 2016). Der nach Infarkt ereignis gesteigerte Sympathikustonus führt zu einer gesteigerten Freigabe von Ly6C^{hi}-Monozyten aus dem Knochenmark (Courties et al., 2015).

Analog der Dichotomie der Monozyten wurde zunächst eine zeitlich getrennte (sequenzielle) Einwanderung von zunächst CCR2 positiven, inflammatorischen Monozyten und später CCR2 negativen, reparativen Monozyten als Ursprung der

jeweiligen inflammatorischen M1 bzw. reparativen M2 Makrophagen im Herzinfarktmodell postuliert (Nahrendorf et al., 2007). Im Verlauf stellte sich jedoch für Modelle des Herzinfarktes (Nahrendorf et al., 2007), des Muskelschadens (Arnold et al., 2007), der Hautwunde (Lucas et al., 2010) und auch des Hirninfarktes (Gliem et al., 2012) heraus, dass eine Differenzierung von M2-Makrophagen aus früh eingewanderten CCR2 positiven inflammatorischen Monozyten über M1-Makrophagen im Zielgewebe erfolgte (Gliem et al., 2012 und Chu et al., 2015). Nach Rückenmarkläsionen differenzieren ebenfalls die hämatogen eingewanderten Makrophagen überwiegend aus CCR2 positiven Monozyten (Ma et al., 2002). Die Einwanderung der inflammatorischen Monozyten ist also notwendig, damit sich danach reparative Makrophagen aus diesen differenzieren. Im Jahr 2014 erweiterten umfangreiche Transkriptomanalysen die zuvor strikt getrennte M1- und M2-Nomenklatur zu einem breiten Spektrum zwischen M1- und M2-Antwort mit unterschiedlichsten transkriptionellen Antworten auf unterschiedliche Stimuli (Xue et al., 2014).

Die ortsständige Mikroglia war lange nicht von eingewanderten hämatogenen Makrophagen zu unterscheiden. Ursache dieses Problems ist die Eigenschaft von hämatogenen Makrophagen, nach Einwanderung in das ZNS eine runde, stark ramifizierte Morphologie anzunehmen, welche von ortsständiger Mikroglia nicht zu differenzieren ist. Zusätzlich zeigt aktivierte Mikroglia die gleichen Eigenschaften wie hämatogen eingewanderte Makrophagen (Jin et al., 2010). Dieser Umstand macht den immunhistochemischen Nachweis nur einer Zellgruppe, mittels etablierter Marker phagozytierender Zellen (CD68, Iba-1 oder CD11b), unmöglich. Erst die Kombination von Durchflusszytometrie und Knochenmarkschimären erlaubte eine eindeutige Unterscheidung zwischen eingewanderter Makrophagen und ortsständiger Mikroglia (Gliem et al., 2012). Während mikrogliale Zellen eine mittelstarke Expression des Leukozytenmarkers CD45 an ihrer Zelloberfläche zeigen (CD45^{int}), wird CD45 auf der Oberfläche eingewanderter Makrophagen stark exprimiert (CD45^{hi}) (Sedgwick et al., 1991). Die Kombination einer Knochenmarkstransplantation von Wildtypknochenmark (CD45.2) in transgene Mäuse mit CD45.1 Allogen auf der Oberfläche von Leukozyten (CD45.1) und der Durchflusszytometrie, konnte diese Annahme validieren (Gliem et al., 2012).

Der Einsatz von *Microarrays*, molekularbiologischen Untersuchungssystemen, mit der Fähigkeit eine Vielzahl von Genen gleichzeitig zu analysieren, führte auch in der Frage nach Alleinstellungsmerkmalen der Mikroglia zu neuen Erkenntnissen. Im Jahr 2014 wurden 106 Gene identifiziert, welche im Vergleich zu anderen Gliazellen, nur in der Mikroglia exprimiert werden (Butovsky et al., 2014). Aus den identifizierten Genen konnten die Gene welche für P2ry12, TMEM119, Sall1 Ofml3 und Slc2a5 kodieren, als valide Mikroglia marker bestätigt werden (David et al., 2018). Auch für die Mikroglia sind sowohl inflammatorische als auch reparative Eigenschaften beschrieben.

1.2.1 Modelle spinaler- und zerebraler Schädigung in der Literatur

Während die vorliegende Dissertation die spinale und zerebrale Photothrombose und damit ein ischämisches Vergleichsmodell gewählt hat, stammen die Daten der einzigen vergleichbaren Untersuchung aus einem Modell mit mechanischer Schädigung (Schnell et al., 1999). In den nachfolgenden Abschnitten zitierte Publikationen, welche keinen Vergleich anstellten, sondern entweder die Inflammation nach spinaler- oder zerebraler Schädigung betrachteten, verwendeten mechanische Schädigungsmodelle spinal (David et al., 2018; Donnelly et al., 2008; Kigerl et al., 2009; McTigue et al., 2000; Pineau und Lacroix, 2007 und Stirling et al., 2008) sowie zerebral die *transient middle cerebral artery occlusion* (Gelderblom et al., 2009; Hu et al., 2012; Jin et al., 2010 und Liu et al., 1994).

Die Daten der vorliegenden Dissertation stammen aus Untersuchungen von C57BL/6 Mäusen. Drei der nachfolgend zitierten Studien erheben ihre Daten aus Untersuchungen an Ratten (Batchelor et al., 2008; Liu et al., 1999 und Iadecola et al., 1996).

Es herrscht somit nur eine eingeschränkte Übertragbarkeit der bereits publizierten Ergebnisse auf jene der vorliegenden Dissertation und unterstreicht damit den Vergleich der Immunantwort auf der Grundlage eines gleichen Pathomechanismus nach spinaler- und zerebraler Ischämie als Alleinstellungsmerkmal dieser Arbeit.

1.2.2 Inflammation und Reparatur nach zerebraler Ischämie

Die Mikroglia wird innerhalb weniger Minuten nach Infarktereignis aktiviert. Hämatogene Monozyten/Makrophagen können 12 Stunden nach Infarktereignis nachgewiesen werden. Die größte Menge hämatogener Monozyten/Makrophagen kann am dritten Tag nach zerebralem Infarktereignis nachgewiesen werden und nimmt an den darauffolgenden Tagen konstant ab (Jin et al., 2010 und Gelderblom et al., 2009).

Die Immunantwort nach zerebraler Ischämie hat sowohl schädigende als auch protektive Eigenschaften (Gliem et al., 2016). Besonderes Augenmerk erhielten in den letzten Jahren die Monozyten, welche zu Makrophagen im infarzierten Gewebe differenzieren (Geissmann et al., 2010). Nach erfolgter Einwanderung in das geschädigte Gewebe differenzieren sich die M1-Makrophagen mit einer inflammatorischen- und damit gewebeschädigenden Eigenschaft (beispielsweise mit Expression des Tumornekrosefaktors-alpha und Interleukin-1-beta) weiter zu reparativen M2-Makrophagen (beispielsweise mit Expression des Transforming-growth-factors-beta-1 und Interleukin-10), (Arnold et al., 2007). Beispielhaft für die protektive Eigenschaft führte in einer Untersuchung von Gliem et al. aus dem Jahre 2012 die Depletion der hämatogenen Makrophagen nach zerebraler Photothrombose zu einer Zunahme von makroskopisch sichtbaren Blutungen, einer verminderten Expression des Transforming-growth-factors-beta 1, und einer Reduktion von Kollagen-4 innerhalb des inneren Infarkttrandgebietes (Gliem et al., 2012). Einen weiteren Hinweis auf eine protektive Eigenschaft hämatogener Makrophagen liefert der Nachweis der Expression von neuroprotektiven Mediatoren wie IGF-1, Oncomodulin, GDF15, VEGF und Angiogenin (Gliem et al., 2016).

Neben der Invasion von Zellen myeloischen Ursprungs trägt zerebral insbesondere die Aktivierung von ortsständigen Immunzellen, der Mikroglia, zur postischämischen Immunantwort bei. Es existieren Belege sowohl schädigender als auch protektiver- Eigenschaften der Mikroglia.

Präklinische Studien zeigten einen protektiven Effekt einer post- oder präischämischen hyperbaren Sauerstofftherapie für geschädigtes zerebrales Gewebe (Liska et al., 2018). Als zugrundeliegender Mechanismus wird die Reduktion der Mikrogliaaktivierung diskutiert (Lim et al., 2013). Auf molekularer

Ebene tritt nach einer zerebralen Ischämie vermehrt ATP und UDP in den Extrazellularraum aus (Melani et al., 2005). ATP besetzt den auf der Zelloberfläche mikroglialer Zellen exprimierten P2X7-Rezeptor, welcher über eine NADPH-Oxidase zu einer Produktion reaktiver Sauerstoffspezies führt (Pocock et al., 2007). Folgt auf die Zellschädigung der Zelluntergang, kommt es zu einer Freisetzung von DAMPS (englisch: *Danger associated molecule patterns*). DAMPS binden an Scavenger- und Toll-like-Rezeptoren auf der Oberfläche mikroglialer Zellen (Iadecola et al., 2011). Werden Toll-like Rezeptoren als Folge einer zerebralen Schädigung aktiviert, schüttet die Mikroglia inflammatorische Mediatoren wie TNF-Alpha, IL-1 und IL-6 aus und aktiviert die induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase (Marsh et al., 2009).

Hinweise auf protektive Eigenschaften der Mikroglia liefern auf der anderen Seite Ergebnisse aus Knock-out-Modellen mit stark reduzierter mikroglialer Zellzahl und stark vergrößerten Infarktarealen (Lalancette-Hebert et al. 2012). Auf molekularer Ebene exprimieren mikrogliale Zellen Neurotransmitterrezeptoren an der Zelloberfläche, welche unter Stimulation die Freigabe von Zytokinen und reaktiven Sauerstoffspezies reduzieren (Iadecola et al., 2011). Auch die Eigenschaft der Mikroglia TGF- β 1 zu produzieren, ein Zytokin mit protektiven Eigenschaften auf infarziertes Gewebe, spricht für eine antiinflammatorische Eigenschaft der Mikroglia (Butovsky et al., 2014).

1.2.3 Inflammation und Reparatur nach spinaler Schädigung

Die bisher publizierten Untersuchungen der Immunantwort nach spinaler Schädigung basieren auf Modellen mechanischer Schädigung und können somit mit den in dieser Arbeit aus rein ischämisch induzierten spinalen Schädigungen nur bedingt verglichen werden.

Die Immunantwort auf eine spinale Schädigung wird ebenfalls durch das angeborene Immunsystem durch Invasion von Zellen der myeloiden Linie und durch die Aktivierung ortsständiger Zellen dominiert (David et al., 2011). Analog zur zerebralen Ischämie erfolgt die früheste Immunantwort innerhalb weniger Stunden, durch aktivierte mikrogliale Zellen, gefolgt von einer Invasion monozytärer Zellen nach 12 Stunden (David et al., 2011). Die Einwanderung

monozytärer Zellen geht einher mit der Einwanderung neutrophiler Zellen (Donnelly et al., 2008).

Die vormals beschriebene historisch verwendete Einteilung in eine gewebeschädigende M1- und eine protektive M2-Antwort existiert, gemessen an den gleichen pro- und antiinflammatorischen Molekülen, ebenfalls im spinalen Infarktmodell (Kigerl et al., 2009).

Im Unterschied zum zerebralen Infarktmodell, für das eine frühe M1-Antwort mit späterer M2-Antwort angenommen wird, konnte in Modellen mit traumatischer spinaler Schädigung eine kurzzeitige frühe M2-, und eine länger anhaltende M1-Antwort nachgewiesen werden (Kigerl et al., 2009, Gliem et al., 2016).

Ergebnisse aus Depletionsmodellen legen nahe, dass hämatogen eingewanderte Monozyten/Makrophagen auf spinal geschädigtes Gewebe einen schädigenden Einfluss haben. Für die Eigenschaft der Mikroglia nach spinaler Schädigung konnte über die Inhibition der Mikroglia via Anwendung von FK506 (Freiname: Tacrolimus) oder Minocyclin der Nachweis eines gewebeschädigenden Einflusses erbracht werden (López-Valez et al., 2005 und Stirling et al., 2004).

Einen entscheidenden Unterschied zwischen spinaler und zerebraler Schädigung zeigten Ergebnisse aus Depletionsmodellen: Die Injektion clodronathaltiger Liposomen führt nach einem, drei und sechs Tagen nach spinaler Schädigung im Tiermodell zu einer Verbesserung der motorischen Rehabilitation der Versuchstiere (Popovich et al., 1999). Diese Ergebnisse werden unterstützt durch tierexperimentelle Studien in denen die phagozytische und sekretorische Funktion mononukleärer Phagozyten durch die Gabe von Chloroquin und Colchicin nach spinaler Ischämie gehemmt wurde (Giulian und Robertson, 1990).

1.2.4 Vergleich der postischämischen Invasion von Immunzellen zerebral und spinal

Wie unter Abschnitt 1.2.1 bereits erläutert, existiert bislang lediglich eine Analyse zum Vergleich der Immunantwort nach zerebraler und spinaler traumatischer Läsion. Diese basiert auf immunhistochemischen und RT-PCR Analysen. Eine

wie in dieser Arbeit vorgenommene Differenzierung zwischen aktivierter Mikroglia und eingewanderten Monozyten/Makrophagen sowie eine breit angelegte Transkriptomanalyse hat nicht stattgefunden (siehe Abschnitt 1.2). Der Nachfolgende Abschnitt soll einen Überblick über bisherigen und nach den jeweiligen Schädigungsmechanismen erhobenen Ergebnisse liefern.

Im Jahre 1999 lieferte die Arbeitsgruppe um Schnell und Kollegen der Universität Zürich den ersten Vergleich der Immunantwort nach gleichgearteter mechanischer Schädigung von Gehirn und Rückenmark (Schnell et al., 1999). Die Arbeitsgruppe zeigt, dass 24 Stunden nach mechanischer zerebraler Schädigung lediglich kleine Mengen neutrophiler Granulozyten nachgewiesen werden können. Nach spinaler Schädigung konnten hingegen doppelt so viele neutrophile Granulozyten (ca. 23 Zellen pro $0,02 \text{ mm}^2$ zerebral zu ca. 46 pro $0,02 \text{ mm}^2$ spinal mit $n = 4$) nachgewiesen werden (Schnell et al., 1999). Ergebnisse aus Untersuchungen von mechanisch geschädigtem spinalem Gewebe welches via fluoreszenzbasierter Durchflusszytometrie untersucht wurde, bestätigten eine massive Infiltration neutrophiler Granulozyten ($2,33 \times 10^9$ pro Liter nach 12 Stunden nach mechanischer Schädigung gegen $0,78 \times 10^9$ pro Liter in nativen Versuchstieren), (Stirling et al., 2008). Auch die Anzahl lymphozytärer Zellen ist nach spinaler Ischämie mehr als doppelt so hoch (zerebral durchschnittlich 50 CD4^+ -T-Lymphozyten gegen durchschnittlich 120 CD4^+ -T-Lymphozyten spinal mit $n = 3$ aus definierten coronalen Gewebeschnitten), (Schnell et al., 1999). Der Vergleich mikroglialer und makrophagozytärer Zellen als eine undifferenzierbare Zellentität erbrachte eine höhere Zellzahl nach zerebraler- als nach spinaler Schädigung (Schnell et al., 1999 und Batchelor et al., 2008), mit durchschnittlich ca. 20 Zellen pro $0,02 \text{ mm}^2$ zerebral zu ca. 9 pro $0,02 \text{ mm}^2$ spinal mit $n = 4$ (Schnell et al., 1999). Schnell und Kollegen konnten bis zwei Tage nach spinalem Trauma eine deutlich höhere Menge aktivierter Astrozyten nachweisen (relative GFAP-Leuchtstärke mit einem maximum der Skala bei 3 mit einem Wert von spinal 1,5 an Tag 1 und 2,5 an Tag 2 gegen einen Skalenwert von zerebral 1 und 1,5 an Tag 2), (Schnell et al., 1999).

Zusammenfassend weisen die o. g. Publikationen auf eine im Vergleich stärkere Immunzellinvasion nach spinaler Läsion hin. Aufgrund der genutzten Techniken

war jedoch eine weitere Zelldifferenzierung z.B. zwischen Monozyten und Mikroglia und eine umfassende Transkriptombeschreibung nicht möglich.

1.2.5 Vergleich der postischämischen Zytokinantwort zerebral und spinal

Auch an dieser Stelle muss, auf die unter Abschnitt 1.2.1 genannten unterschiedlichen Versuchsmodelle hingewiesen werden. Zusammenfassend stammen die Ergebnisse aus mechanischen Schädigungsmodellen spinal (Kigerl et al., 2009; McTigue et al., 2000 und Pineau und Lacroix, 2007) sowie zerebral die *transient middle cerebral artery occlusion* (Liu et al., 1994 und Hu et al., 2012). Eine im nachfolgenden Abschnitt zitierte Arbeit entnimmt ihre Erkenntnisse anders als in dieser Arbeit aus Untersuchungen an C57BL/6 Mäusen aus Untersuchungen an Ratten (Iadecola et al., 1996).

Die Expression inflammatorischer Marker ist ein essentieller Bestandteil der postischämischen Immunantwort (siehe für eine detaillierte Einleitung Abschnitt 1.5.1). Der Tumornekrosefaktor-alpha stellt als inflammatorischer Marker nach zerebraler Ischämie einen seit lange bekannten Bestandteil der Zytokinantwort dar. Untersuchungen aus zerebralen Ischämie-Modellen konnten bereits nach einer Stunde nach Infarkt ereignis einen Anstieg an TNF-alpha-mRNA detektieren, mit einem Höchststand 12 Stunden nach Ischämie und einer Nachweisbarkeit bis über den fünften Tag nach Ischämie hinaus (Liu et al., 1994). In Modellen spinaler Schädigungen konnte bereits am ersten Tag nach Ereignis der Höchststand an gemessener TNF-alpha-mRNA gemessen werden, mit darauffolgender Reduktion der mRNA über 24 Stunden und mit erneuter starker Aufregulation 28 Tage nach Schädigung (Pineau und Lacroix, 2007).

Für die induzierbare Stickstoffmonoxidsynthetase (abgekürzt: iNOS) existieren ebenfalls Daten aus beiden Modellen. In zerebralen Infarktmodellen konnten bereits 12 Stunden nach Ereignis signifikant erhöhte Mengen iNOS-mRNA detektiert werden, die gemessene Menge erreichte ihren Höchststand am ersten Tag nach Infarkt ereignis und zeigte eine konstante Reduktion über die darauffolgenden drei Tage bis auf ihren Ausgangswert (Iadecola et al., 1996). Korrespondierend dazu konnte in Modellen mit spinaler Schädigung bereits nach einem Tag eine erhöhte Expression von iNOS-Genen nachgewiesen werden, anders als in den Untersuchungen aus zerebralen Modellen konnte der

Höchststand etwas verzögert am dritten Tag gemessen werden mit darauffolgendem Rückgang der Genexpression (Kigerl et al., 2009).

Das CD-Antigen 32 als inflammatorischer Marker konnte in signifikant erhöhter Menge erst nach fünf, sieben und mit einem Höchststand nach vierzehn Tagen nach zerebralem Infarktereignis nachgewiesen werden (Hu et al., 2012). In Modellen mit spinaler Schädigung konnte eine signifikant erhöhte Expression des CD32-Gens erst am siebten Tag nachgewiesen werden und erreichte an diesem Tag bereits seinen Höchststand, wobei über den vierzehnten Tag hinaus eine signifikant höhere Genexpression nachgewiesen werden konnte (Kigerl et al., 2009).

Im Nachweis der Expression des CD-Antigens 86 liefert die Literatur einen interessanten Unterschied: Während in zerebralen Infarktmodellen bereits am dritten Tag nach Infarktereignis signifikant erhöhte Mengen CD86-mRNA nachgewiesen werden konnten (Hu et al., 2012), konnte nach spinaler Schädigung erst nach vier Wochen eine signifikant erhöhte CD86-Expression gemessen werden (Kigerl et al., 2009).

Ein weiterer Unterschied ergibt sich in der Betrachtung antiinflammatorischer Marker wie CD206 und TGF- β 1. Nach zerebraler Ischämie konnte vom ersten bis zum siebten Tag nach Ereignis eine signifikant erhöhte Menge CD206-mRNA detektiert werden (Hu et al., 2012). Im spinalen Infarktmodell konnte eine signifikante Erhöhung CD206-Genexpression erst am siebten und vierzehnten Tag nach Ereignis gemessen werden (Kigerl et al., 2009).

Auch in der Expression des *Transforming growth factors- β 1* (abgekürzt: TGF-1) existieren Unterschiede. So konnte nach zerebraler Ischämie vom dritten bis zum vierzehnten Tag nach Ereignis eine signifikant erhöhte mRNA-Menge detektiert werden (Hu et al., 2012). Nach spinaler Schädigung konnte hingegen lediglich am Tag 7 nach Infarktereignis eine signifikant erhöhte mRNA-Menge gemessen werden (McTigue et al., 1999).

Zusammenfassend zeigt sich im Vergleich der Menge inflammatorischer Marker in beiden Modellen eine bis Tag 3 nach Schädigung eintretende frühe inflammatorische Immunantwort (TNF-alpha und iNOS) sowie eine ab Tag 7 nachweisbare inflammatorische Spätantwort (CD32).

Hinsichtlich der nachweisbaren Menge reparaturassoziierter Marker zeigt die bisher publizierte Literatur Unterschiede auf. Während im zerebralen Infarktmodell ab spätestens Tag 3 nach Ischämie signifikant erhöhte Menge reparaturassoziierter Marker nachgewiesen werden konnten (CD86, CD206 und TGF- β 1), konnten die gleicher Marker nach spinaler Schädigung frühestens ab Tag 7 nachgewiesen werden.

So zeigt sich hinsichtlich inflammatorischer Marker eine früh- (bis Tag 3) und eine Spätantwort (ab Tag 7) in beiden Modellen, reparative Marker sind zerebral früher (bis spätestens Tag 3 nach Ereignis) als spinal (ab frühestens Tag 7) nachweisbar.

1.2.6 Immunologische Therapieansätze

Die Aufklärung der exakten immunologischen Vorgänge nach Infarkt ereignis stellen die Grundlage für die Identifikation neuer Angriffspunkte für Therapeutika dar. Die Vielzahl von Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Zellgruppen und der oftmals von zahlreichen Faktoren abhängige schmale Grad zwischen reperaturiver und schädigender Funktion einzelner Zellen, stellt die Wissenschaft vor eine besondere Herausforderung. Notwendig ist ein gutes grundlegendes Verständnis der pathophysiologischen Vorgänge nach Läsionen in unterschiedlichen ZNS Kompartments notwendig.

Die ursprüngliche Idee der Depletion der inflammatorischen Monozyten im Blut als therapeutische Option hat sich als nicht erfolgversprechend herausgestellt, da damit auch der reparative Anteil der inflammatorischen Antwort ausfallen würde. Ziel kann jetzt vielmehr nur noch die Beeinflussung des Makrophagen- und Mikroglia-Phänotyps im Gewebe hin zu reparativen Subpopulationen sein.

Therapeutisch nutzbar scheinen PPAR-Gamma-Rezeptor-Agonisten, welche ein antiinflammatorisches Makrophagenprofil fördern und konsekutiv sekundäre zerebrale Infarktblutungen reduzieren (Gliem et al., 2015). Hinweise auf einen weiteren potentiellen Angriffspunkt einer Immuntherapie auf monozytärer Ebene liefern Ergebnisse, welche eine essenzielle Funktion des nukleären Rezeptors

„Nr4A1“ auf den Erhalt einer reoperativen Makrophagenfunktion nachweisen konnten (Hilgendorf et al., 2014).

Mit dem Ziel die nach zerebralem Infarkt ereignis eintretende Mikrogliaaktivierung (und andere inflammatorische Antworten) zu reduzieren wurde Minocyclin, ein Derivat des Antibiotikums Tetrazyklin, bereits in klinischen Studien getestet. Die sichere Anwendbarkeit in Hinblick auf sekundäre Infarktblutungen, die Kombinierbarkeit mit einer Thrombolyse und ein deutlich gebessertes klinisches Outcome führten zur Durchführung einer multizentrischen randomisierten, doppelverblindeten, Placebo-kontrollierten Studie, welche jedoch im Mai 2013 aufgrund vergeblichen Wirknachweises frühzeitig beendet wurde (Veltkamp et al., 2016).

Schlussendlich verbleibt die Notwendigkeit der genauen Aufklärung von Eigenschaft, Wechselwirkung und der exakten Mechanismen der inflammatorischen Postinfarktantwort, um verbesserte und sichere pharmakologische Angriffspunkte zu identifizieren.

1.2.7 Ziele der vorliegenden Arbeit

Der ischämische Hirninfarkt ist eine häufige Ursache bleibender neurologischer Defizite (Busch et al 2013). Neben den Therapien zur Gefäßrekanalisation in frühen Stadien des Hirninfarktes sind keine Therapien in späteren Stadien des Hirninfarktes etabliert. Die postischämische Inflammation ist ein vielversprechender Ansatzpunkt (Veltkamp et al., 2016). Bislang gibt es nur wenige vergleichende Arbeiten die Unterschiede der Inflammation in grauer und weißer Substanz beschrieben haben.

Ziel der Arbeit war die Charakterisierung der postischämischen Inflammation im zerebralen Kortex (graue Substanz) im Vergleich zur postischämischen Inflammation im Rückenmark (weiße Substanz), um zu klären, ob es ein einheitliches Muster der Inflammation nach ZNS Ischämie existiert oder ob dieses von der zellulären Zusammensetzung des ZNS Areals abhängig ist.

2 Material und Methoden

2.0.1 Tierversuchsgenehmigung

Die Genehmigung von Versuchen an denen in dieser Arbeit verwendeten Wirbeltieren nach Paragraph 8 Absatz 1 des Tierschutzgesetzes in Verbindung mit Paragraph 33 der Tierschutz-Versuchstierverordnung wurde am 12.10.2015 durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen unter dem Aktenzeichen: 84-02.04.2014.A450, erteilt.

2.1 Die Photothrombose

Überblick

Ziel dieser Arbeit war der Vergleich zwischen dem ischämischen zerebralen und spinalen Infarkt.

Verfahren

Alle Infarkte wurden mittels einer photochemischen Thrombose, durch den Xanthenfarbstoff „Bengalrosa“ induziert (Watson et al., 1985).

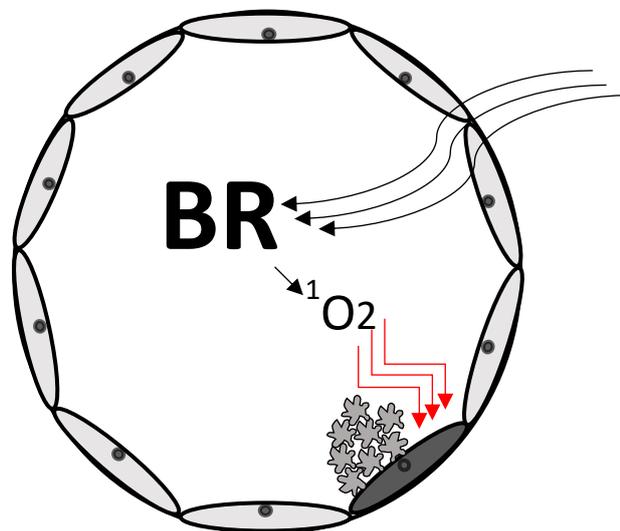


Abbildung 1: Die chemische Reaktion der Photothrombose.

Schematische Darstellung der intravasalen Vorgänge bei photochemischer Thrombose in Anlehnung an eine Abbildung von Karlheinz Herrmann (Herrmann, 1982).

Angeregt über eine Absorption von Lichtenergie geben Xanthenfarbstoffe Sauerstoffradikale frei (Gandin et al., 1983). Sauerstoffradikale sind wirkungsvolle Oxidationsmittel. Die Oxidation von Membranproteinen, Fetten und Arachidonsäurederivaten, führt innerhalb von Gefäßen zu einer Schädigung von Endothelzellen. Die geschädigten Endothelzellen bedingen eine Adhäsion von Thrombozyten (Herrmann, 1983).

Protokoll

Die zerebrale Photothrombose

Für die Operation wurden 6-12 Wochen alte C57BL/6 Mäuse (ZETT, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf, Deutschland) verwendet. Das Gewicht der Mäuse lag zwischen 20 und 25 g. Das Verfahren der zerebralen Photothrombose diente in dieser Arbeit der Induktion eines ischämischen Schlaganfalls im zerebralen Kortex der Maus. Zu Beginn der Operation wurde das Versuchstier gewogen und über eine Atemmaske mittels eines Isofluranverdampfers (Isofluran vapor 19.3, Drägerwerk AG & CO. KGaA, Lübeck, Deutschland), mit Distickstoffmonoxid und Sauerstoff 1:2 sowie 2 Vol.% Isofluran in Narkose versetzt. Die Körpertemperatur der Maus wurde über eine Heizmatte bei 36 Grad Celsius stabilisiert. Über standardisierte Tests wurde die Schmerzempfindlichkeit der Maus überprüft, die Narkose dementsprechend dosiert, und mit der OP begonnen. Im ersten Schritt wurde die Maus in einem stereotaktischen Rahmen fixiert und die Behaarung der Kopfhaut im Operationsgebiet entfernt. Im zweiten Schritt erfolgte die Eröffnung der Kopfhaut mit anschließender Freilegung der Schädelkalotte. Nun wurde ein Marker (Lumcolor, Staedtler Mars GmbH & CO. KG, Nürnberg, Deutschland) in einem Stereotaxiegerät fixiert und der Schnittpunkt der Sutura coronalis und der Sutura sagittalis (Bregma) markiert. Lokalisiert 2 mm dorsal und 2,4 mm rechts lateral des Bregmas wurde eine weitere Markierung platziert. Es erfolgte nun eine intraperitoneale Injektion von 1 mg in PBS-gelöstem Bengalrosa (Rose bengal, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten von Amerika und Dulbecco's Phosphat Buffered Saline, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten von Amerika). Innerhalb einer fünfminütigen Einwirkzeit dieser Substanz wurde auf den zuvor markierten Bereich der Kalotte eine Kaltlichtquelle (KL 1500 LCD, Schott AG, Mainz, Deutschland) platziert. Nach Ablauf dieser Zeit wurde die Kaltlichtquelle für 15 Minuten bei einer

Farbtemperatur von 3200 Kelvin eingeschaltet. Abschließend wurde die Narkose reduziert und die zuvor eröffnete Kopfhaut mit Gewebekleber (Histoacryl, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) verschlossen. In einem letzten Schritt wurde die Narkose vollständig beendet und die Atemmaske entfernt.

Die spinale Photothrombose

In einem ersten Schritt wurde das Versuchstier über einen 2x14 cm langen Zylinder gelegt. Im nächsten Schritt erfolgte die Entfernung des Fells oberhalb der thorakalen und zervikalen Wirbelkörper. Mit einer Pinzette (FD281R, Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland) wurde oberhalb der zervikalen Wirbelkörper die Haut angehoben und mithilfe einer Schere (BC580R, Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland) eingeschnitten. Anschließend erfolgte die Eröffnung der Haut von kranial bis kaudal auf Höhe des 11. Brustwirbelkörpers. Mit Hilfe einer Pinzette (FD281R, Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland) wurde die allgemeine Körperfazie angehoben und eröffnet. Im Folgeschritt wurde der zwischen Rückenmuskulatur und Haut liegende Fettkörper und die versorgende Arterie präparatorisch gesichert. Anschließend wurde mit einem Skalpell (Feather Disposable Scalpel No.10, Feather Safety Razor Co. Ltd, Osaka, Japan) die Rückenmuskulatur auf Höhe des 11. bis 7. Brustwirbelkörpers bis auf die Spitze der processus spinosi eröffnet. Bei korrekter Operation bedurfte dieser Schritt einer minimalen Blutstillung mittels Kompressen (Pur-Zellin, Paul Hartmann AG, Heidenheim an der Benz, Deutschland). Die Identifizierung der Operationshöhe erfolgte anhand der Länge der processus spinosi, so wurde der von kranial nach kaudal betrachtet letzte elongierte processus aufgesucht und nach kranial drei weitere processus abgezählt. Zwischen dem 8. und 9. Brustwirbel erfolgte eine Freipräparation der Rückenmarkshäute, bis auf die pia mater spinalis. Eine blutungsfreie Sicht beendete die Präparation. Die Injektion des photoaktiven Bengalrosas erfolgte nach o.g. Schema. Innerhalb der fünfminütigen Resorptionszeit wurde eine Kaltlichtquelle (KL1500 LCD, Schott AG, Mainz, Deutschland) in ein Stereotaxiegerät gespannt und auf die pia mater spinalis aufgesetzt. Nach abgelaufener Zeit erfolgte eine fünfminütige Bestrahlung des Rückenmarks via Kaltlichtquelle mit einer Farbtemperatur von 3200 Kelvin. Anschließend erfolgte die Markierung der beiden freipräparierten

Wirbelkörper mittels eines wasserfesten Feinmarkers (Lumcolor, Staedtler Mars GmbH & CO. KG, Nürnberg, Deutschland) markiert. Jedes Tier erhielt drei Hautnähte. Eine direkt oberhalb der Läsion, eine kranial und eine kaudal. Nach Abschluss der Operation wurde die Narkose reduziert und beendet.

2.2 Histologie

2.2.1 Herstellung der Präparate

Protokoll

Perfusion

Nach Ablauf definierter Zeitpunkte (Tag 1, 3, 7 und 14 nach OP), wurden die Tiere über eine letale Dosis Isofluran getötet und intrakardial perfundiert. Um dies zu ermöglichen, erfolgte die Eröffnung des Thorax des Versuchstiers. Anschließend wurde mit Hilfe einer Schere (BC060R, Aesculap, Tuttlingen, Deutschland) der linke Ventrikel und das rechte Herzohr eröffnet. Es erfolgte zuerst eine Injektion von 10 ml phosphatgepufferter Salzlösung (Dulbecco's Phosphat Buffered Saline, Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, Vereinigte Staaten von Amerika) und darauffolgend 10 ml Paraformaldehyd (eigene Herstellung) intrakardial. Jene Tiere, welche der zerebralen Photothrombose unterzogen wurden, wurden im Anschluss an die Perfusion dekapitiert. Schließlich wurde der Schädel mittels einer Pinzette (Pinzette BD035, Aesculap, Tuttlingen, Deutschland) abgelöst und das Großhirn samt Kleinhirn freipräpariert. Die Lagerung erfolgte in 15 ml Zylinder (Greiner centrifuge tubes, Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich) in 10 ml Paraformaldehyd. Bei Tieren mit spinaler Schädigung wurde die freipräparierte Wirbelsäule in toto in 10 ml Paraformaldehyd eingelagert.

Freipräparation und Waschschrift

Am Folgetag der Perfusion erfolgte bei den spinal geschädigten Tieren die Freipräparation des Rückenmarks. Diese erfolgte nach einem definierten Schema. Der Teil oberhalb der Läsion wird als „B“, unterhalb der Läsion als „C“ und jener Anteil, welcher die Läsion beinhaltet, mit „A“ bezeichnet. Die Lagerung der Präparate erfolgte innerhalb von Plastikkassetten zwischen zwei 1 x 0,5 cm breiten Filterpapierstreifen. Die Kassetten wurden in, mit 300 ml PBS befüllten,

Erlenmeyerkolben gelagert. Die zerebralen Präparate wurden am gleichen Tag von Paraformaldehyd in PBS überführt. Ihre Lagerung erfolgte ganzheitlich in 15 ml Zylinder (Greiner centrifuge tubes, Greiner Bio-One International GmbH, Kremsmünster, Österreich).

Entwässerung der Präparate

Nach einer Lagerungszeit in phosphatgepufferter Salzlösung erfolgte die Entwässerung der Präparate. Diese erfolgte über 8 Schritte in einer Alkoholreihe. Als erstes wurde die phosphatgepufferte Salzlösung innerhalb der Zylinder und des Erlenmeyerkolbens gegen 70 %-igen Alkohol ausgetauscht. Die Präparate verweilten in dieser Flüssigkeit für vier Stunden. Nach Ablauf dieser Zeit erfolgte ein Wechsel von 70 %-igen Alkohol auf 80 %-igen Alkohol. Nach weiteren vier Stunden wurde der 80 %-ige Alkohol, mit der gleichen Menge 80 %-igen Alkohol erneuert. Nach dem gleichen Schema und Zeitintervallen erfolgte ein Austausch mit zweimal 96 %-igem Alkohol und zweimal 99,5 %-igem Alkohol. Im Anschluss wurden die Präparate für 24 Stunden in Methylbenzoat gelagert. An den darauffolgenden Tagen erfolgte eine Lagerung in täglich erneuertem Paraffin (Surgipath Paraplast, Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland).

Paraffineinbettung

Am letzten Tag der Paraffinlagerung wurden die Präparate in für das Mikrotom (Mikrom HM355S, Mikrom International GmbH, Walldorf, Deutschland) angepasste quadratische Formen eingebettet. Hierfür wurde das Paraffin auf 60 - 62 Grad Celsius erhitzt und in flüssigem Zustand in Silikonformen gegossen. Innerhalb der darauffolgenden Minute wurden die Präparate (Gehirn oder Rückenmark) innerhalb der Form in gleicher Richtung positioniert. Nach Ablauf von 30 Minuten wurden die Blöcke bei 5 Grad Celsius in einem Kühlraum gelagert.

Anfertigung der Präparate

Die angefertigten Paraffinblöcke wurden mit einem Mikrotom (Mikrom HM355S, Mikrom International GmbH, Walldorf, Deutschland) in 7 Mikrometer dicke

Paraffinschnitte geschnitten. Nach kurzer Verweildauer in einem 38 Grad Celsius warmen Streckbad mit destilliertem Wasser, wurden die Schnitte auf Objektträger (Thermo Scientific™ SuperFrost Ultra Plus™ Adhäsionsobjektträger, Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika) aufgebracht.

2.2.2 Kresylviolett färbung

Überblick

Für die anatomische Einordnung der Schnitte wurde der basische Farbstoff Kresylviolett verwendet.

Verfahren

Die Bindung zwischen dem basischen Anilinfarbstoff Kresylviolett und der negativ geladenen RNA ermöglicht die Anfärbung RNA-haltiger Zellorganellen (Nissl, 1894).

Protokoll

Im ersten Schritt wurden die ausgewählten Schnitte zwischen 30 Minuten und einer Stunde in Xylol (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) entparaffiniert. Anschließend durchliefen die Präparate eine absteigende Alkoholreihe (99,5 %, 99,5 %, 90 %, 70 % und 50 %-iger Alkohol für jeweils zwei Minuten). Im Folgeschritt wurden die Präparate für 10 Minuten in filtriertem Kresylviolett inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine aufsteigende Alkoholreihe, in der die Präparate für zwei Sekunden die vormals genannten Alkoholkonzentrationen durchliefen. Abschließend wurden die Präparate zweimal für jeweils fünf Minuten in Roticlear® (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) gebadet und mittels Entellan® (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) eingedeckt.

2.2.3 Immunhistochemie

Überblick

Alle angefertigten Färbungen liegt die Avidin-Biotin-Komplex-Methode zugrunde (Guesdon et al., 1979).

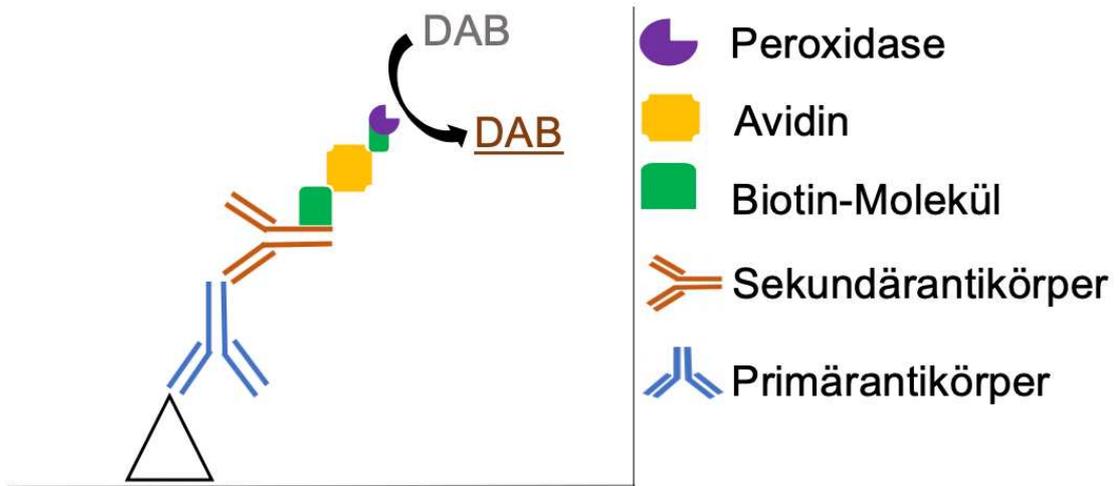


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Avidin-Biotin-Komplex-Methode.

Verfahren

In einem ersten Schritt bindet der Primärantikörper an das Zielantigen an der Zelloberfläche. An diesen bindet in einem zweiten Schritt ein biotinylierter Sekundärantikörper. Das Protein Avidin bildet starke Wechselwirkungen mit bis zu vier Biotin-Molekülen. So ermöglicht die Zugabe von Avidin, eine Kopplung zwischen dem biotinylierten Sekundärantikörper und einer in einem weiteren Schritt zugegebenen biotinylierten Peroxidase. Die Peroxidase oxidiert 3,3'-Diaminobenzidin zu einem braunen Farbstoff. Unspezifische Bindungsstellen für den Sekundärantikörper wurden durch die Zugabe von aus der gleichen Spezies gewonnenem Serum blockiert. Unspezifische Peroxidase-Reaktionen wurden durch die Zugabe von Wasserstoffperoxid verhindert.

Protokoll

Die immunhistochemische Färbung unterteilt sich in zwei Tage. Am ersten Tag wurden die zur Färbung ausgewählten Schnitte, für mindestens eine Stunde in

Xylol entparaffiniert. Im Anschluss erfolgte eine absteigende Alkoholreihe (99,5 %, 99,5 %, 90 %, 70 % und 50 %-iger Alkohol für jeweils zwei Minuten). Der Folgeschritt ist für jede Färbung unterschiedlich. Schnitte, welche gegen das Oberflächenantigen CD68 gefärbt werden sollten, wurden für 7 Minuten in 37 Grad Celsius warmer Protease inkubiert (25 mg Protease gelöst in 60 ml destilliertem Wasser). Für gegen Typ-IV-Kollagen ausgewählte Färbungen wurden für 10 Minuten in einem Citratpuffer erwärmt. Im Falle einer Färbung gegen GFAP (saures Gliafaserprotein) wurde in den gesamten Folgeschritten, anstatt einer phosphatgepufferten Salzlösung (PBS) eine trisgepufferte Salzlösung (TBS) verwendet. In allen Schritten wurden 100 Mikroliter der jeweiligen Substrate pro Präparat aufgetragen. Nach den färbespezifischen Schritten folgte ein fünfminütiger Waschschrift in phosphat- oder trisgepufferter Salzlösung. Für die Ausschaltung unspezifischer Peroxidasen wurde ein Gemisch aus 30 Mikroliter 3 %-igem Wasserstoffperoxid und einem Milliliter tris- oder phosphatgepufferter Salzlösung hergestellt. Jedes Präparat wurde mit Wasserstoffperoxid behandelt und inkubiert für 30 Minuten. Im Folgeschritt wurden die Präparate mit Normalserum für 30 Minuten in einer feuchten Kammer gelagert. Die Auswahl der Normalseren richtete sich nach den gewählten Sekundärantikörpern (siehe Tabelle 1). Der erste Tag endet mit dem aufbringen der spezifischen Primärantikörper (Tabelle 1). Gelagert in einer feuchten Kammer, verweilten die Präparate in einem Kühlraum bei 7 Grad Celsius über Nacht.

<u>Primärantikörper</u>	<u>Verdünnung</u>	<u>Puffer</u>	<u>Sekundärantikörper</u>	<u>Normalserum</u>
CD68	1:500	PBS	Ratte	Hase
GFAP	1:500	TBS	Hase	Ziege
Kollagen IV	1:500	PBS	Ziege	Pferd

Tabelle 1: Primärantikörper der Immunhistochemie.

Angabe aller verwendeten Primärantikörper mit jeweiligem Puffer, Verdünnungsverhältnis, Sekundärantikörper und Normalserum. Abkürzungen: GFAP - (englisch: *Glial fibrillary acidic protein*), CD- (englisch: *Cluster of differentiation*)

<u>Antikörper</u>	<u>Herstellerangabe</u>
CD 68	Monoclonal Antibody Rat Anti Mouse CD68 (MCA1957) AbDSerotec, Kindlington, Großbritannien
GFAP	Polyclonal Anti-GFAP antibody produced in rabbit (G9269) Sigma Aldrich, St- Louis, Vereinigte Staaten von Amerika
Kollagen 4	Polyclonal Collagen Type IV, Bovine/Human (T33134B) Meridian Life Science, Memphis, USA
Anti-Hase	Biotinylated Anti-rabbit IgG (H+L), Made in Goat Vector Laboratories, Burlingame, Vereinigte Staaten von Amerika
Anti-Gans	Biotinylated Anti-goat IgG (H+L), Made in Horse Vector Laboratories, Burlingame, Vereinigte Staaten von Amerika
Anit-Ratte	Biotinylated Anti-rat IgG (H+L), Made in Rabbit Vector Laboratories, Burlingame, USA
Normalserum	Eigene Herstellung

Tabelle 2: Herstellerverzeichnis der verwendeten Antikörper.

Herstellerangaben der jeweilig verwendeten Antikörper. Abkürzungen: GFAP - *Glial fibrillary acidic protein*, CD - *Cluster of differentiation*

Der zweite Tag begann mit einem fünfminütigen Waschschrift in tris- oder phosphatgepufferter Salzlösung. Anschließend wurde der biotinylierte Sekundärantikörper (siehe Tabelle 1) in einem Verhältnis von 1 Mikroliter zu 200 Mikroliter PBS oder TBS hergestellt. Zur gleichen Zeit erfolgte die Herstellung einer Mischung aus 10 Mikroliter Avidin und 10 Mikroliter biotinylierter Peroxidase (Vectastain® Elite® ABC, Vector Laboratories Inc., Burlingame, Vereinigte Staaten von Amerika). Das Gemisch inkubierte anschließend für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Es folgte das Aufbringen der Sekundärantikörper auf die Präparate. Die anschließende Inkubation erfolgte für 30 Minuten in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur. Nach einem erneuten Waschschrift wurde der zuvor hergestellte Avidin-Biotin-Peroxidase Komplex auf die Präparate pipettiert. Die Inkubationszeit betrug abermals 30 Minuten. Im vorletzten Schritt wurde eine Lösung des Farbstoffes 3,3-Diaminobenzidin hergestellt (ImmPACT® DAB, Vectastain® Elite® ABC, Vector Laboratories Inc., Burlingame, Vereinigte Staaten von Amerika). Jede Färbung besitzt eine für sich spezifische Färbezeit

(siehe Tabelle 3). Nach erfolgter Auftragung des Farbstoffes wurde die Färbereaktion durch einen Waschschrift in phosphatgepufferter Salzlösung beendet. Es folgten eine abschließende Alkoholreihe und eine Eindeckung nach vormals beschriebenen Prozedere.

<u>Antikörper</u>	<u>Inkubationszeit zerebral</u>	<u>Inkubationszeit spinal</u>
GFAP	2 Minuten	1 Minute
CD68	3 Minuten	3 Minuten
Kollagen IV	1 Minute	1 Minute

Tabelle 3: Inkubationszeit der Antikörper.

Für jeden verwendeten Antikörper spezifische Inkubationszeiten für 3,3-Diaminobenzidin. Innerhalb dieser Zeit konnte der Sekundärantikörper den Farbstoff umsetzen. Abkürzungen: GFAP: *Glial fibrillary acidic protein*, CD: *Cluster of differentiation*

2.2.4 Immunfluoreszenzfärbung

Überblick

Im Gegensatz zur reinen Immunhistochemie welche das Zielprotein durch den Umsatz eines Farbstoffes für die Durchlichtmikroskopie sichtbar macht, basieren Immunfluoreszenzfärbungen auf der Emission von Photonen durch an das Zielprotein gekoppelte Fluoreszenzfarbstoffe.

Verfahren

Nach erfolgter Bindung des Primärantikörpers an das Zielantigen erfolgt die Bindung des Sekundärantikörpers an den Primärantikörper. Dieser ist mit einem Fluoreszenzfarbstoff (in den nachfolgenden Experimenten mit Alexa Fluor® 488 nm) gekoppelt. Zusätzlich zu der Darstellung der ausgewählten Zielstruktur, erfolgt eine Darstellung aller Zellkerne im Präparat via 4',6-Diamidin-2-phenylindol-dihydrochlorid (DAPI). 4',6-Diamidin-2-phenylindol-dihydrochlorid interkaliert in AT-reiche Regionen (Adenin und Thymin) der DNA und ermöglicht eine Darstellung der Zellkerne.

Protokoll

Am ersten Tag erfolgte eine einstündige Entparaffinierung mit Xylol (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland). Im Anschluss durchliefen die ausgewählten Präparate eine absteigende Alkoholreihe (99,5 %, 99,5 %, 90 %, 70 % und 50 %-iger Alkohol für jeweils zwei Minuten). Die entwässerten Präparate wurden für 10 min in einem Citratpuffer in einer Mikrowelle bei 700W erhitzt und wieder abgekühlt. Anschließend wurden die Präparate für 5 Minuten mit trisgepufferter Salzlösung (TBS) gewaschen und nach kurzer Trocknung mit 100 µl fünfprozentigem Pferdeserum pro Präparat für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde jedem Präparat 100 µl des MBP-Primärantikörpers (in einem Dilutionsverhältnis von 1:250) zugegeben (ANTI-MBP, Bio-Rad Laboratories Inc., Kalifornien, Vereinigte Staaten von Amerika). Der Primärantikörper inkubierte nun über Nacht bei Raumtemperatur.

Am zweiten Tag wurden die Präparate für 5 Minuten in trisgepufferter Salzlösung (TBS) gewaschen. Nach kurzer Trocknung wurde 100 µl biotinylierter Anti-Ratte IgG-Antikörper auf jedes Präparat gegeben und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte ein fünfminütiger Waschschrift mit trisgepufferter Salzlösung. Anschließend wurde jedem Präparat 100 µl des Farbstoffs Alexa Fluor® 488 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten von Amerika) zugegeben. Es folgte ein fünfminütiger Waschschrift in phosphatgepufferter Salzlösung. Anschließend wurden die Präparate für dreimal 10-Minuten in einem eisgekühlten Gemisch aus 200 mg Natriumborhydrid und 200 ml phosphatgepufferter Salzlösung gebadet. Darauffolgend wurden alle Präparate dreimal für eine Minute in phosphatgepufferter Salzlösung gewaschen. Im vorletzten Schritt wurde auf jedes Präparat 100 µl 4',6-Diamidin-2-phenylindol-dihydrochlorid (DAPI) pipettiert und für 7 Minuten inkubiert. Nach kurzem Waschschrift in phosphatgepufferter Salzlösung wurden die Präparate mit dem Eindeckmedium Fluoromount-G® (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten von Amerika) eingedeckt.

2.2.5 Bildverarbeitung

Nach abgeschlossenem Färbeprozess wurden über ein Mikroskop (Zeiss Axioplan 2, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) mit der zugehörigen Kamera und der Software Axiovision 2.0 (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) Aufnahmen der Präparate erstellt. Die Aufnahmen erfolgten in 2,5- und 10-facher Vergrößerung. Die Quantifizierung des gefärbten Anteils der angefertigten Präparate erfolgte über die Software ImageJ in der Version 1.42q (National Institutes of Health, Bethesda, Vereinigte Staaten von Amerika) in von Tag 1-7 500 x 900 Pixel großen Messflächen und am Tag 14 in 500 x 450 Pixel großen Messflächen in der jeweils in der Übersichtsabbildung angegebenen Lokalisation.

2.4 Real-time quantitative PCR

Überblick

Grundlage der Real-time quantitativen Polymerasekettenreaktion, stellt die erstmals durch Mullis und Faloona im Jahre 1987 publizierte Methode der Polymerasekettenreaktion (PCR), zur gezielten Vermehrung von Desoxyribonukleinsäure dar (Mullis und Faloona, 1987). Die Real-time quantitative Reverse Transkriptase-PCR ermöglicht die Quantifizierung der Messenger-RNA (mRNA) ausgewählter Gene. Als Produkt der Transkription entspricht die Menge an mRNA der Genaktivität.

Verfahren

Polymerasekettenreaktion

Zu Beginn wird der zu untersuchende DNA-Abschnitt identifiziert und ein zielsequenzspezifisches Primerpaar ausgewählt (siehe Tabelle 3). Für die Durchführung einer Polymerasekettenreaktion wird eine DNA-Matrize (englisch: *Template*), eine hitzestabile Polymerase, Desoxyribonukleosidtriphosphate und ein Primerpaar benötigt. Der gesamte Reaktionsablauf findet in einem Thermozykler statt. Die Polymerasekettenreaktion verläuft in einem Zyklus mit drei Phasen:

1. Die Denaturierung: Über eine Erhitzung auf 94 Grad Celsius werden die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den beiden Strängen der DNA aufgebrochen. Es entstehen zwei Einzelstränge.
 2. Die Primerhybridisierung: Eine Absenkung der Temperatur zwischen 40 und 60 Grad Celsius ermöglicht die Anlagerung des *forward-Primers* an den Zielstrang und des *reverse-Primers* an den Komplementärstrang.
 3. Die Elongation: Bei einer Temperatur von 72 Grad Celsius beginnt die hitzestabile Polymerase mit der Synthese der Komplementärstränge mittels Desoxyribonukleosidtriphosphate. Startpunkte bilden die im vorherigen Schritt angelagerten Primer. Der Zyklus ist abgeschlossen.
- Der zuvor ausgewählte DNA-Abschnitt wurde verdoppelt. Die Dauer eines Zyklus liegt bei unter fünf Minuten. Der Ablauf mehrerer Zyklen ermöglicht eine exponentielle Vermehrung der ausgewählten DNA-Abschnitte.

Reverse Transkriptase PCR

Die Polymerasekettenreaktion ermöglicht die exponentielle Vermehrung von DNA, nicht aber von RNA. Für eine Vermehrung und anschließende Quantifizierung von Messenger-RNA muss diese zuvor in DNA umgeschrieben werden. Das Enzym Reverse Transkriptase ermöglicht eine Übersetzung von RNA in cDNA (englisch: *Complementary DNA*).

Real-time quantitative PCR

Die Real-time quantitative Polymerasekettenreaktion ermöglicht die Bestimmung einer DNA-Menge während der Polymerasekettenreaktion in Echtzeit (englisch: *Real-time*). Durch die Zugabe von *SYBR-Green*, einem Fluoreszenzfarbstoff welcher in Doppelstrang-DNA interkaliert, lässt sich ein Fluoreszenzsignal detektieren. Die Stärke des Fluoreszenzsignales ist proportional zur DNA-Menge. Die Messung findet in der Elongationsphase statt.

In dieser Arbeit wurde die delta-delta CT-Methode (englisch: *Cycled treshold*) verwendet. Der CT-Wert ist definiert als Zykluszahl, an welcher eine festgelegte Fluoreszenzstärke erreicht wird. Die Vermehrung verläuft zu diesem Zeitpunkt exponentiell. Höhere Ursprungsmengen Doppelstrang-DNA erreichen diesen Schwellenwert früher, niedrigere Mengen später. Anhand eines Referenzgens,

dessen DNA-Menge bei einem bestimmten CT-Wert bekannt ist, können Rückschlüsse auf die Ausgangsmenge der untersuchten DNA gezogen werden. Die Angabe erfolgt als Vielfaches vom Referenzgen.

Isolation der mRNA

Alle verwendeten Gewebeproben wurden direkt nach der Präparation mittels flüssigen Stickstoffs gefroren und bei -80 Grad Celsius gelagert.

Die mRNA-Isolation erfolgte nach der Guanidiumthiocyanat-Phenol-Chloroform-Methode (Chomczynski und Sacchi, 1986).

Die in einem ersten Schritt erfolgte Homogenisierung des Zellmaterials unter Zugabe einer salzhaltigen sauren Lösung aus Guanidiumthiocyanat und Phenol (TRIzol™, Life Technologies, Carlsbad, Vereinigte Staaten von Amerika), birgt vier Funktionen:

1. Der frühzeitige Abbau der mRNA durch Ribonukleasen wird durch die Zugabe von Guanidiumthiocyanat verhindert (Chirgwin et al., 1979).

Als chaotrope Verbindung besitzt Guanidiumthiocyanat die Fähigkeit Wasserstoffbrückenbindungen aufzubrechen und Netzwerke aus Wassermolekülen zu stören. Eine Veränderung im Wassernetzwerk bedingt eine Konformationsänderung (Denaturierung) von Proteinen in wässriger Lösung. Zusätzlich zu dieser Eigenschaft bricht Guanidiumthiocyanat Disulfidbrücken der vorhandenen Ribonukleasen auf. Dies führt zu einem irreversiblen Funktionsverlust (Sela et al., 1956). Beide Vorgänge verlaufen schneller als der mRNA-Abbau durch Ribonukleasen. Das in einem späteren Schritt zugeführte Diethylpyrocarbonat (DEPC), hemmt als Enzyminhibitor ebenfalls vorhandene Ribonukleasen (Fedorcsak und Ehrenberg, 1966).

2. Phenol besitzt eine höhere Dichte als Wasser. Das Zusammentreffen beider Substanzen führt zu einer Ausbildung von zwei Phasen. Einer unteren (phenolhaltigen) und einer oberen (wässrigen) Phase.

Je ähnlicher die Wechselwirkungen der Moleküle zweier Substanzen (Polarität) ist, desto höher ist ihre Löslichkeit. Wasser besitzt eine höhere Polarität als Phenol. In Abhängigkeit ihrer Polarität, gehen alle im Rahmen der Homogenisierung freigesetzten Moleküle, in eine der beiden Phasen über. Nukleinsäuren gehen als polare Moleküle in die wässrige Phase über. Die

übrigen weniger polaren Proteine gehen über in die phenolhaltige Phase. Die Zugabe von Chloroform verstärkt die Separation der phenolhaltigen und wässrigen Phase.

3. Eine Auftrennung von Desoxyribonukleinsäuren und Ribonukleinsäuren wird über einen niedrigen PH-Wert ermöglicht. Freie H⁺-Ionen neutralisieren die negativ geladenen Phosphatreste der Desoxyribonukleinsäuren und reduzieren ihre Polaritäten. Sie richten sich in Richtung der phenolhaltigen Phase aus und bilden eine Interphase. Ribonukleinsäuren hingegen verbleiben in der wässrigen Phase.

4. Nach Entnahme der wässrigen Phase löst die Zugabe von Ethanol eine Reaktion zwischen gelösten Natrium-Ionen und Ribonukleinsäuren aus. Infolge dieser Reaktion verlieren vorhandene Ribonukleinsäuren ihre Wasserlöslichkeit. Sie fällen aus (Niederschlag oder auch *Pellet*). Über eine ähnliche Reaktion verstärkt die Zugabe von Glykogen diesen Vorgang.

Bestimmung der mRNA-Menge

Die exakte Bestimmung der mRNA-Mengen nach mRNA-Isolation erfolgte über eine Spektralphotometrie (NanoDrop™ 1000, PEQLAB Biotechnologie GMBH, Erlangen, Deutschland). Nukleinsäuren absorbieren ultraviolettes Licht.

Ihre maximale Absorption weisen Nukleinsäuren bei 260 Nanometer (nm) auf.

Das Maß für die Abschwächung von elektromagnetischen Wellen durch ein Medium wird durch den Extinktionskoeffizient beschrieben. DNA und RNA besitzen bei 260 nm unterschiedliche Extinktionskoeffizienten (Tataurov et al., 2008). Das Lambert-Beer'sche Gesetz ermöglicht die Bestimmung der Konzentration einer Lösung aus ihrem Extinktionskoeffizient. Die Angabe erfolgt in Nanogramm pro Mikroliter. Als Angabe für die Reinheit der Probe, wird das Verhältnis der Absorption zwischen 260 - und 280 nm (maximale Absorption bei Proteinen) bestimmt.

Protokoll

Isolation der mRNA

Im ersten Schritt wurde das ausgewählte Gewebepräparat unter Zugabe von 700 Mikroliter TRIzol Reagent (TRIzol™, Life Technologies, Carlsbad, Vereinigte

Staaten von Amerika) für 30 Sekunden mittels Homogenisator (Polytron®, Kinematica AG, Luzern, Schweiz) zerkleinert. Nach einer kurzen Abkühlzeit auf Raumtemperatur erfolgte die Zugabe von 200 Mikroliter Chloroform. Die Probe wurde nun zwischen dreißig- und vierzigmal vorsichtig geschüttelt. Abermals erfolgte eine kurze Abkühlzeit auf Raumtemperatur. Im nächsten Schritt wurde die angefertigte Probe für 15 Minuten, bei 4 Grad Celsius und 12000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Nach Abschluss der Zentrifugation lassen sich drei Phasen unterscheiden: Eine obere wässrige Phase, eine Interphase und eine phenolhaltige untere Phase. Die obere (mRNA-haltige) Phase wurde abpipettiert. Zu der neu angefertigten Probe wurden 1,1 Mikroliter Glykogen (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) und 500 Mikroliter Isopropanol zugegeben. Nach kurzem Schütteln erfolgte eine Inkubation bei Raumtemperatur für 15 Minuten. Anschließend wurde die Probe bei 4 Grad Celsius und 12000 Umdrehungen pro Minute für 10 Minuten zentrifugiert. Nach Abschluss der Zentrifugation stellte sich am Boden der Probe ein weißer Niederschlag dar. Dieser enthielt die mRNA. Ein über dem Pellet entstandener Überstand wurde verworfen. Der Probe wurde anschließend ein Milliliter 75 %-iges Ethanol zugegeben. Erneut wurde die Probe für fünf Minuten bei 10000 Umdrehungen pro Minute und 4 Grad Celsius zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet für 20 Minuten unter einem Abzug getrocknet. Es folgte die Zugabe von 31,5 Mikroliter DEPC-behandeltem Wasser (Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, Vereinigte Staaten von Amerika). Im letzten Schritt wurde die Probe für 10 Minuten bei 60 Grad Celsius in einen Thermoblock inkubiert.

Bestimmung der mRNA-Menge

Die Bestimmung der mRNA-Menge erfolgte aus einem Mikroliter der vormals hergestellten Substanz via Spektralphotometrie. Für die Bestimmung der Reinheit wurde das Verhältnis der Absorption bei 260 - zu 280 nm bestimmt. Akzeptiert wurden Werte von minimal 1,7.

Reverse-Transkriptase

Nach Bestimmung der vorhandenen mRNA-Menge pro Mikroliter wurde eine Probenmenge mit einem Mikrogramm mRNA entnommen. Der Probe wurden 9 Mikroliter DEPC-Wasser (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten

von Amerika) sowie 10 Mikroliter eines Primers mit zufälliger Basenfolge (englisch: *Random Primer*) zugegeben (Oligo dt20, Eurofins Genomics Germany GmbH, Ebersberg, Deutschland). Die Primerhybridisierung erfolgte in einem Thermoblock (Trio Thermoblock, Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland) bei 70 Grad Celsius für 10 Minuten, mit anschließendem Abkühlen auf Eis für 5 Minuten. Im Folgeschritt wurde jeder Probe 1 Mikroliter Reverse Transkriptase (SuperScript™ II, Reverse Transcriptase, Life Technologies, Carlsbad, Vereinigte Staaten von Amerika), 4 Mikroliter Puffer (5x-First-Strand Buffer, Life Technologies, Carlsbad, Vereinigte Staaten von Amerika), 2 Mikroliter Dithiothreitol (0,1 M), 1 Mikroliter Ribonukleaseinhibitor (RNasin®, Promega Corporation, Fitchburg, Vereinigte Staaten von Amerika) und 2 Mikroliter 10 mikromolarer Lösung Desoxyribonukleosidtriphosphate (Deoxynucleoside Triphosphate Set, Roche, Roche Diagnostics International AG, Mannheim, Deutschland) beigefügt. Im letzten Schritt durchliefen die Proben in einem Thermoblock (Trio Thermoblock, Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland) vier Temperaturstufen: 5 Minuten bei 37°C, 60 Minuten bei 42°C, 5 Minuten bei 99°C und einer Abkühlungsphase auf 4°C.

Real-time quantitative PCR

Vor Versuchsbeginn konnte die erstellte cDNA einzelner Versuchstiere in Versuchsgruppen (Tag 1, 3, 7, 14) zusammengeführt werden (englisch: *Pooling*). Im ersten Schritt wurde 6,4 Mikroliter nukleasefreies Wasser (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) mit 1,8 Mikroliter *reverse-Primer* und 1,8 Mikroliter *forward-Primer* vermischt (siehe Tabelle 3). Pro Probenbehältnis (englisch: *Well*) auf einer PCR-Platte (MicroAmp® Fast 96-Well Reaction Plate, Applied Biosystems, USA), wurde ein Mikroliter cDNA, 5 Mikroliter der zu Beginn erstellten Primermischung, und 24 Mikroliter SYBR-Green (Power SYBR™ Green PCR Master Mix, Applied Biosystems, Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika) beigefügt. Für die Polymerasekettenreaktion notwendige Desoxyribonukleosidtriphosphate sind Bestandteile im *Power SYBR™ Green PCR Master Mix*. Als Referenzgen wurde Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) verwendet. Die für GAPDH verwendete Primermischung bestand aus 0,3 Mikroliter *forward-* und 1,8 Mikroliter *reverse-*

Primer sowie 7,9 Mikroliter nukleasefreies Wasser (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland).

Die Real-time quantitative PCR erfolgte in einem Vollautomaten (7900HT Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems, Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika). Die Polymerasekettenreaktion verlief in drei Phasen:

Einer Denaturierung bei 95°C, der Primerhybridisierung bei 50°C und der Elongation bei 72°C.

Die Datenerfassung wurde mittels Sequence Detection Systems Software 2.3 (abgekürzt: SDS 2.3) durchgeführt.

<u>Primer</u>	<u>Sequenz</u>
GAPDH	Fwd: AGG TTG TCT CCT GCG ACT T Rev: CCA GGA AAT GAG CTT GAC AAA G
Arginase 1	Fwd: CCT GAA GGA ACT GAA AGG AAA G Rev: TTG GCA GAT ATG CAG GGA GT
TGF-1	Fwd: TGG TG AAC CAA GGA GAC G Rev: GCA GTG AGC GCT GAA TCG A
TNFalpha	Fwd: AAT TCG CGT GAC AAG CCT GTA GC Rev: CCT CCA CTT GGT GGT TTG CT
iNOS	Fwd: GGC AGC CTG TGA GAC CTT TG Rev: CGT TTC GGG ATC TGA ATG TGA
CD86	Fwd: GAA GCC GAA TCA GCC TAG Rev: CAG CGT TAC TAT CCC GCT CT
P2RY12	Fwd: AGG GGT TCA GCC AAA GTT CC Rev: GCC ATA GGG TGC TCT CCT TC
SLC2A5	Fwd: TGG TCC CGC AAC TCT TCA TC Rev: CTC TCG GGA AAG AAC GGG AG
CD32	Fwd: CAG GGA CCC TGT AGA TCT GG Rev: CCC CTT CCA GAA ACA CCA
CD206	Fwd: TGG TCA CCG TGG TCC TCC T Rev: AAA TAG GCT GCA ACG CCG
Pilrb2	Fwd: TCA CGA TGC TCC TGG CTA AA Rev: CAT GCA GGG TCA GGT CTT TG

Tabelle 4: Verwendete Primer mit Sequenzen.

Abkürzungen: Fwd.: *Forwardprimer*, Rev.: *Reverseprimer*, GAPDH: Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, TGF-1: Transforming growth factor beta, CD: Cluster of Differentiation, P2RY12: Purinerge Rezeptor P2Y, SLC2A5: Solute Carrier Family 2 Member 5, Pilrb2: Paired immunoglobulin-like type 2 receptor beta-2, TNFalpha: Tumornekrosefaktor-alpha, iNOS: induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase

2.5 Fluoreszenzbasierte Durchflusszytometrie

Überblick

Die in dieser Arbeit verwendete fluoreszenzbasierte Durchflusszytometrie diente im Zusammenspiel mit eigens hergestellten Knochenmarkschimären der Quantifizierung von hämatogen eingewanderten und ortsständigen Monozyten/Makrophagen.

Verfahren

Die fluoreszenzbasierte Durchflusszytometrie erlaubt die Identifikation der Zellgröße, der Zellgranularität und der Oberflächeneigenschaften einzelner Zellen in einer hohen Anzahl und innerhalb kürzester Zeit.

Das verwendete Durchflusszytometer kann vereinfacht auf drei Bauteile reduziert werden: Einem Laser, verschiedenen Filtern und unterschiedlichen Detektoren. Der eingebaute Laser ermöglicht das Aussenden von Licht einer exakt definierten Wellenlänge. Trifft dieses Licht auf eine Zelle im Durchflusszytometer, werden die Lichtstrahlen in zwei Richtungen abgelenkt: Nach vorne, als Maß für die Zellgröße („Vorwärtsstreuung“, englisch: „Forwardscatter“, abgekürzt: „FSC“) und zur Seite, als Maß für die Zellgranularität („Seitwärtsstreuung“, englisch: „Sidescatter“, abgekürzt „SSC“).

Wurden die Zellen vor der Durchflusszytometrie über einen Antikörper mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt, wird dieser durch das Licht des Lasers angeregt und es wird Licht einer exakt definierten Wellenlänge emittiert. Diese kann über unterschiedliche Filter sortiert und über Detektoren gemessen werden kann.

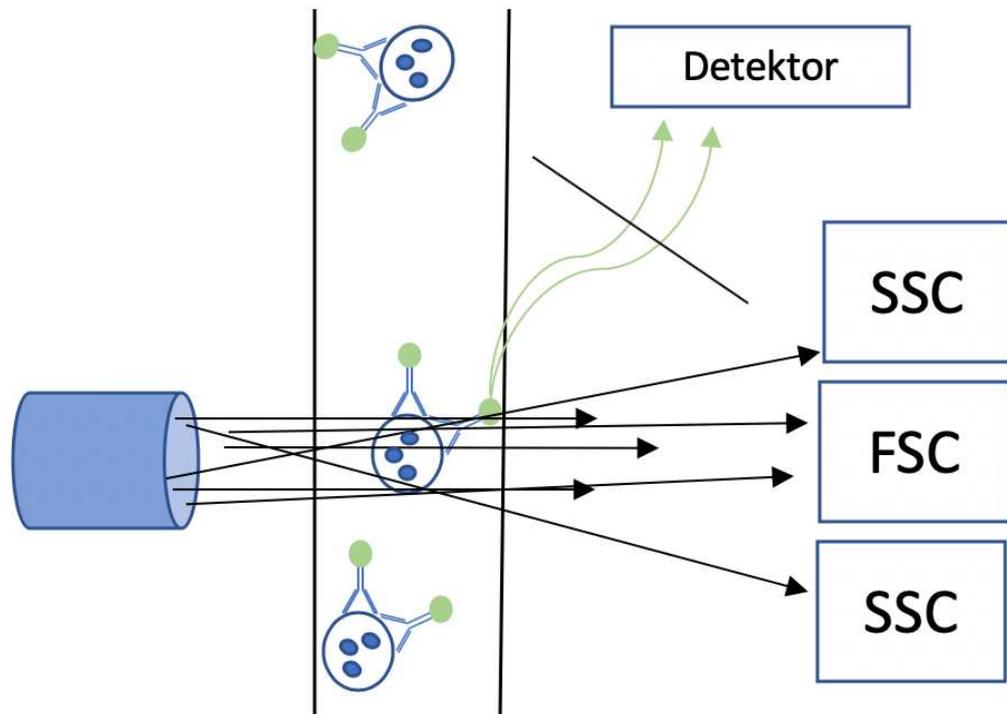


Abbildung 3: Schematische Darstellung eines Durchflusszytometers.

Abkürzungen: „FSC“: Forwardscatter“ und „SSC“: „Sidescatter“.

Protokoll

Die fluoreszenz-basierte Durchflusszytometrie erfolgte in zwei Schritten. Im ersten Schritt erfolgte die Isolation intrazerebraler Leukozyten aus dem Hirn- oder Rückenmarksgewebe: Nach erfolgreicher Gewebepreparation wurde das Gewebe in ein spezielles Medium übertragen, welches aus 0,625 ml „DMEM“ (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten von Amerika) und 10%-igem Kälberserum bestand. Im Anschluss wurde die Suspension unter Verwendung einer Schere homogenisiert. Es folgte ein Verdauungsschritt unter der Zugabe 125 µL Collagenase und Dispase (Collagenase/Dispase®, F. Hoffmann-La Roche AG, Basel, Schweiz) mit anschließender 45-minütiger Bebrütung bei 37 Grad Celsius. Anschließend wurde dem angedauten Homogenisat 5 ml des oben beschriebenen DMEM/Kälberserum-Mediums zugegeben und durch ein Zellsieb (Falcon® 70 µm Cell Strainer, Corning, Inc., New York, Vereinigte Staaten von Amerika) gegossen. Anschließend wurde das Homogenisat für 10 Minuten bei 1200 rpm

zentrifugiert. Der resultierende Überstand wurde verworfen. Unter der Zugabe eines Zentrifugationsmediums (Percoll®, GE Healthcare, Chicago, Vereinigte Staaten von Amerika), verschiedenen Pipettierschritten und nach mehrfacher Zentrifugation (25 Minuten bei 2400 rpm, 15 Minuten bei 1555 rpm und 10 Minuten bei 1200 rpm), resultierte ein Pellet aus isolierten Zellen. Im Anschluss wurden die Zellen via Trypanblau (*Trypan Blue solution*, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten von Amerika) angefärbt und ausgezählt.

Im zweiten Schritt erfolgte die Markierung der isolierten Zellen mit einem fluoreszenzgekoppelten Antikörper: Die zuvor ausgezählten Zellen wurden auf eigens für die fluoreszenzbasierte Durchflusszytometrie hergestellte Röhrchen verteilt (Falcon® 5 ml Polystyrene Round-Bottom, New York, Vereinigte Staaten von Amerika) und mit einer zuvor angefertigten Mischung aus 500 ml phosphatgepufferter Salzlösung (*Dulbecco's Phosphat Buffered Saline*, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten von Amerika), 10 ml fetalem Kälberserum und 500 mg Natriumazid, auf 2 ml pro Röhrchen aufgefüllt. Es folgte eine zehnmünütige Zentrifugation bei 4 Grad Celsius und 1200 rpm. Der entstandene Überstand wurde verworfen und die Zellsuspension mit 25 µl fetalem Kälberserum gemischt. Anschließend folgte eine 15-minütige Inkubationszeit bei 4 Grad Celsius. Im Anschluss werden die Proben mit der o.g. PBS/FCS/NaN₃-Lösung auf 2 ml aufgefüllt. Es folgte eine erneute zehnmünütige Zentrifugation bei 4 Grad Celsius und 1200 rpm. Der gewonnene Überstand wurde verworfen. Im Anschluss wurde den Proben 25 µl des jeweiligen FACS-Antikörpers (siehe Tabelle 5) hinzugegeben. Es folgte eine 30-minütige Inkubationszeit bei 4 Grad Celsius. Anschließend erfolgte die Zugabe von 2 ml der o.g. PBS/FCS/NaN₃-Lösung. Anschließend erfolgte eine erneute zehnmünütige Zentrifugation bei 4 Grad Celsius und 1200 rpm. Der Überstand wurde verworfen. Das Zentrifugat wurde mit 500 µl PBS/FCS/NaN₃-Lösung aufgefüllt.

<u>Antikörper</u>	<u>Farbe</u>	<u>Hersteller</u>
CD11b	Grün	PharMingen, Kalifornien, Vereinigte Staaten von Amerika

Ly6-G	Gelb	PharMingen, Kalifornien, Vereinigte Staaten von Amerika
CD 45.1	Gelb	PharMingen, Kalifornien, Vereinigte Staaten von Amerika
CD45.2	Blau	PharMingen, Kalifornien, Vereinigte Staaten von Amerika

Tabelle 5: Antikörper der fluoreszenzbasierten Durchflusszytometrie mit Hersteller und Farbe.

2.6 Knochenmarkchimären

Überblick

Für eine genaue Differenzierung zwischen dem Einfluss von ortsständiger Mikroglia und nach Infarkt ereignis aus dem Blut eingewanderten Makrophagen wurden in dieser Arbeit Knochenmarkchimären verwendet.

Knochenmarkchimären sind knochenmarktransplantierte Versuchstiere.

Knockout-Mäuse sind genetisch veränderte Versuchstiere, in denen ein definiertes Gen abgeschaltet ist (*knockout*). Ihre Verwendung erlaubt Rückschlüsse auf die Eigenschaften des abgeschalteten Gens innerhalb des Versuchsmodells.

Das vorliegende Modell kombiniert beide Methoden.

Verfahren

Modell

Grundlage dieser Methode ist der Einsatz von zwei unterschiedlichen Tierstämmen: Wildtyp C57BL/6 Mäuse, welche auf Leukozyten das Oberflächenprotein Ptprc^b (CD45.2) exprimieren (ZETT, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf, Deutschland) und ein kongener Stamm mit verändertem Oberflächenprotein Ptprc^a (CD45.1) (B6.SJL-Ptprc^aPepc^b/BoyJ, Jackson Laboratory, Bar Harbor, Vereinigte Staaten von Amerika). Leukozyten der Knockout-Linie tragen das Oberflächenprotein CD45.1.

Im Rahmen einer Knochenmarktransplantation erhalten transgene Versuchstiere (CD 45.1 positiv) Knochenmark von Wildtypen (C45.2 positiv). Dies erlaubt in der fluoreszenzbasierten Durchflusszytometrie anhand des exprimierten Rezeptors die Unterscheidung zwischen aktivierter Mikroglia (CD45.1 positiv) und aktivierten Monozyten/Makrophagen hämatogenen Ursprungs (CD45.2 positiv).

Technik

Die durchgeführte Knochenmarktransplantation gliedert sich in drei Phasen:

In der ersten Phase wird das Knochenmark des Empfängertieres über eine Ganzkörperbestrahlung zerstört (Konditionierungsphase).

In der zweiten Phase erhalten die Versuchstiere eine retrobulbäre Injektion von Knochenmarkzellen des Spendertieres (Transplantationsphase).

In der letzten Phase sind die ursprünglich blutbildenden Zellen zerstört, und das transplantierte Knochenmark hat noch nicht mit der Blutbildung begonnen (Aplasiaphase). In dieser Phase stehen die Versuchstiere, aufgrund einer erhöhten Infektanfälligkeit, unter Antibiotikaschutz.

Die Erfolgskontrolle der Transplantation erfolgt über den Nachweis von Spenderzellen in der Durchflusszytometrie.

Protokoll

Gewinnung von Knochenmarkzellen

Zwecks der Gewinnung von Knochenmarkzellen aus Spendertieren wurden diese über eine Überdosis Isofluran getötet und der Oberschenkel amputiert. Nach einer Eröffnung der Oberschenkelenden mittels Präparationsschere konnte das Knochenmark ausgespült werden.

Die gewonnene Spülflüssigkeit wurde anschließend bei 300 G für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Es resultierte ein Niederschlag aus Knochenmarkzellen.

Konditionierungsphase

Im ersten Schritt erhielten die Versuchstiere eine Injektionsnarkose mit einer Mischung aus Ketanest und Xylazin im Verhältnis 1:4. Die vollständig narkotisierten Versuchstiere wurden anschließend in einer eigens für diesen Zweck hergestellten Vorrichtung fixiert. Die Schädel der Versuchstiere wurden über eine Bleiabdeckung geschützt. Anschließend erfolgte eine

Ganzkörperbestrahlung der Versuchstiere mittels Linearbeschleuniger (Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf, Deutschland). Die verwendete Energiedosis betrug 10,5 Gray.

Transplantationsphase

Im Anschluss an die Konditionierungsphase erfolgte eine Injektion von 100 Mikroliter einer Mischung aus Knochenmarkzellen und phosphatgepufferter Salzlösung (Dulbecco's Phosphat Buffered Saline, Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri, Vereinigte Staaten von Amerika) in den retrobulbären Venenplexus beider Augen. Die Anzahl transplantierte Knochenmarkzellen betrug pro Versuchstier ca. 4×10^6 Zellen.

Aplasiaphase

Die Versuchstiere erhielten nach erfolgter Transplantation eine 14-tägige Antibiotikaprophylaxe mittels Enrofloxacin (Baytril® 2.5%, Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland).

Operation und Gewebeentnahme

Nach dem Ablauf einer Ruhephase von 7 Wochen erfolgte die Induktion einer Ischämie via Photothrombose. Am siebten Tag nach Ischämie wurden die Versuchstiere über eine Überdosis Isofluran eingeschläfert und die Gewebeprobe entnommen.

2.7 DNA-Microarray

Überblick

DNA-Microarrays ermöglichen es festzustellen, ob ein bestimmter Zelltyp bestimmte Gene exprimiert und falls ja, wie stark diese Expression stattfindet. Im Gegensatz zur Real-time quantitativen PCR werden nicht nur gezielt bekannte Gene untersucht, sondern tausende zur gleichen Zeit und ermöglicht es somit neue möglicherweise krankheitsrelevante Gene zu identifizieren. In dieser Arbeit dient die Verwendung eines *DNA-Microarrays* dem Vergleich des Genexpressionsmusters nach spinaler und zerebraler Ischämie.

Verfahren

Die Untersuchung der Genexpression wird ermöglicht durch die gleichzeitige Quantifizierung großer mRNA-Mengen in kürzester Zeit. Als Produkt der Transkription entspricht die Menge an transkribierter mRNA der Genexpression. Ermöglicht wird dies durch die Verwendung eines sogenannten „*Genechips*“. Die technischen Fortschritte der Halbleiterindustrie erlauben die Anordnung tausender unterschiedlicher DNA-Sonden in exakt festgelegter Position in einem Gitternetz auf einem etwa 1,25 mal 1,25 cm großem Stück Glas. Nach erfolgreicher Gewinnung von mRNA aus den zu untersuchenden Zellen, erfolgt eine reverse Transkriptase in cDNA mit anschließender Markierung mit Biotinmolekülen. Nach Zugabe der gewonnenen cDNA auf den *Genechip* erfolgt die Bindung der cDNA-Stücke an ihre komplementären DNA-Sonden. Im darauffolgenden Waschschrift werden die nicht-gebundenen cDNA-Stücke entfernt. Anschließend erfolgt die Markierung der cDNA-DNA-Paare mit einem Fluoreszenzfarbstoff. Als Bindeglied dienen die zuvor an die cDNA gebundenen Biotinmoleküle. Die nun resultierende Lichtintensität korreliert mit der Stärke der Geneexpression. Die Verwendung eines „*Microarray-Scanners*“ ermöglicht die Messung der Lichtintensität und eine Zuordnung im Gitternetz zum jeweiligen Gen (vgl. zu diesem Abschnitt *GeneChip® Microarray Curriculum*, 2005).

Protokoll

Die Schritte der mRNA-Präparation werden im Kapitel 2.4 im Detail erläutert. Die nachfolgenden Schritte erfolgten in Kooperation mit, und durch das biologisch-medizinische Forschungszentrum (BMFZ), im *Genomics & Transcriptomics* Labor der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Im ersten Schritt erfolgte die Bestimmung der Mengen und eine Qualitätskontrolle der gewonnenen mRNA via Kapillarelektrophorese im „*Bioanalyzer 2100*“ (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, Vereinigte Staaten von Amerika) mit dem *Eukaryote-Total-RNA-Pico-Kit* (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, Vereinigte Staaten von Amerika). Mit Hilfe des *GeneChip® Pico Reagent Kits* (Thermo Scientific™, Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika) nach den methodischen Schritten des zugehörigen Handbuchs: *GeneChip® Pico Reagent Kit - Manual Target Preparation for GeneChip® Expression Arrays* mit der

Artikelnummer 703308 in der 4. Version (Thermo Scientific™, Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika) erfolgte die Amplifikation der mRNA, eine anschließende reverse Transkription in cDNA und die Bindung von Biotinmoleküle an die cDNA. Im nächsten Schritt wurde die cDNA für 16 Stunden bei 45 Grad Celsius auf dem *Clariom™ S Mouse Gene Expression Microarray* (Thermo Scientific™, Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika) im *GeneChip™ Hybridization Oven 645* (Thermo Scientific™, Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika) bebrütet. Nach einem Waschschrift in der *GeneChip™ Fluidics Station 450* (Thermo Scientific™, Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika) wurden cDNA-DNA-Paare mittels des Streptavidin-Phycoerythrin-Konjugats (Thermo Scientific™, Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika) angefärbt und im *GeneChip™ Scanner 3000 7G* (Thermo Scientific™, Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika) gemessen.

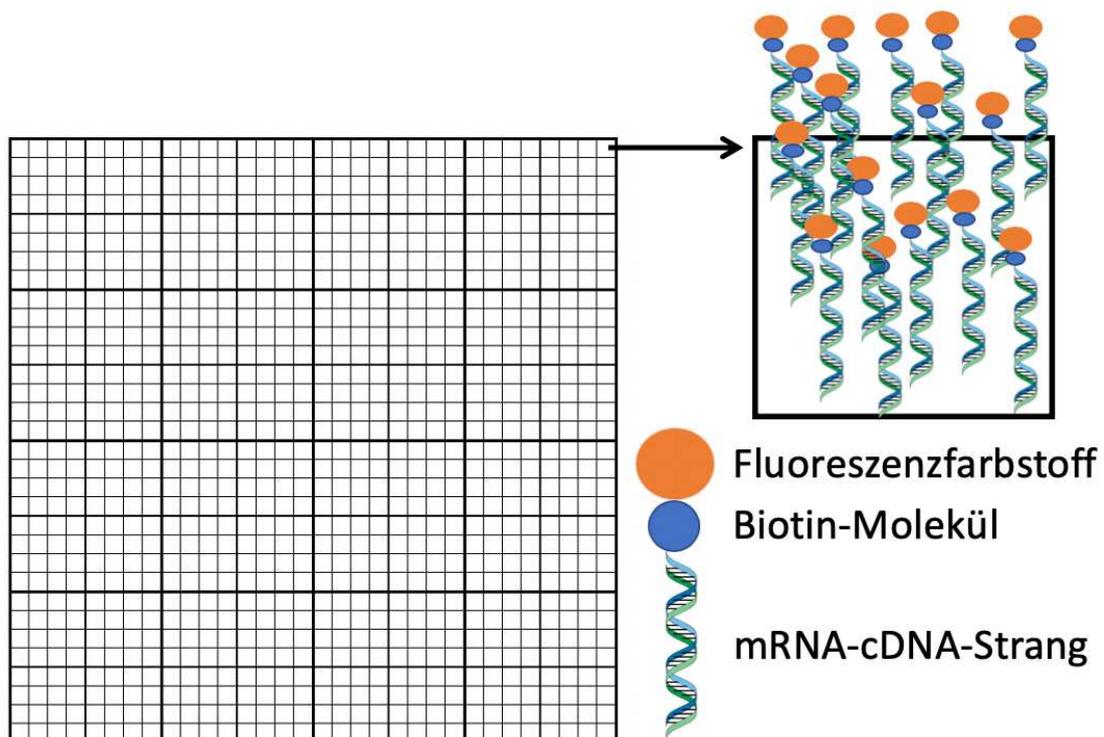


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Aufbaus eines Genechips nach erfolgreicher Bindung des Fluoreszenzfarbstoffes an die mRNA-cDNA-Paare.

2.8 Illustrationen

Alle für diese Arbeit erstellten Illustrationen wurden mit der Software Microsoft PowerPoint in der Version 16.25 erstellt (Microsoft Corporation, Redmond, Vereinigte Staaten von Amerika).

2.9 Statistische Auswertung

Die statistischen Auswertungen der Histologie-, PCR- sowie FACS-Ergebnisse in dieser Arbeit erfolgten mit der Software *GraphPad Prism*® in der Version 5.0 (GraphPad Software, San Diego, Vereinigte Staaten von Amerika). Nach arithmetischer Mittelung erfolgten Gruppenvergleiche über den *Students t-Test* (im Falle der Histologie ein direkter Vergleich zwischen 2 Gruppen), via einfaktorieller Varianzanalyse (englisch: *One-way-Anova*) im Falle der PCR-Ergebnisse (pro Tag ein Vergleich zwischen zwei Gruppen gegen die verwendete Kontrolle, damit über zwei Gruppen) oder der Zweiwegevarianzanalyse (englisch: *Two-way-Anova*) bei der Darstellung der Ergebnisse der FACS-Analyse im Zeitverlauf (mehrere Gruppen).

Die Analyse der Ergebnisse der *DNA-Microarrays* erfolgte mit der GeneSpring GX Software in der Version 12.5 (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, Vereinigte Staaten von Amerika) durch das biologisch-medizinische Forschungszentrum (BMFZ), im *Genomics & Transcriptomics* Labor der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Einen kurzen Überblick über die zugrundeliegenden Methoden liefert der nachfolgende Absatz: Bevor die durch den *Microarray-Scanner* gemessenen Datensätze der beiden Versuchsmodelle miteinander verglichen werden konnten, mussten Variationen in den Datensätzen der beiden Proben reduziert werden. Variationen entstehen beispielsweise durch Unterschiede im Versuchsablauf oder durch geringe Unterschiede in der Probenisolation (vgl. Bolstad et al., 2002). Ermöglicht wurde dies durch die Verwendung eines Normalisierungsalgorithmus (*Genesprings Exon-RMA16-Algorithmus*) nach erfolgter quantiler Normalisierung (Bolstad et al., 2002). Für den Vergleich der Genexpression wurden nur solche Proben verwendet, welche eine vormals definierte Leuchtstärke oberhalb des Hintergrundleuchtens erreicht. Der Vergleich der Genexpression zweier Gene erfolgte über einen *moderated t-Test*, ein für die Microarrayanalyse angepasste

Form des t-Tests (Smyth et al., 2004) die Reduktion der Alphafehler-Kumulierung erfolgte via Bonferroni-Korrektur. Die Angabe der Genexpression erfolgt über eine Z-Score-Standardisierung, welche die Anzahl der Standardabweichung ober- oder unterhalb des errechneten Mittelwerts angibt.

Um die gewonnen Proben hinsichtlich ihrer Vergleichbarkeit und Ähnlichkeit zu prüfen, erfolgte eine sogenannte Hauptkomponentenanalyse (englisch: *Principle component analysis*). Vereinfacht ausgedrückt ermöglicht die Hauptkomponentenanalyse die im Zuge der Microarrayanalyse gewonnen großen Datensätze auf dem Boden mathematischer Algorithmen in zwei Richtungen aufzutrennen, entlang derer der Datensatz seine größten Unterschiede aufweist, die sogenannten „Hauptkomponenten“. Je näher sich die gewonnenen Proben entlang der beiden Hauptkomponenten aneinander befinden, desto größer ist die Ähnlichkeit der Proben (Ringnér, 2008).

Das Signifikanzniveau wurde bei allen durchgeführten Tests auf $p \leq 0,05$ festgelegt.

3 Ergebnisse

3.1 Vergleichbare Infarktgröße nach Photothrombose des Cortex und des Rückenmarks

Basierend auf der bereits publizierten Methode der zerebralen Photothrombose (Gliem et al., 2015) konnten wir die spinale Photothrombose als Vergleichsmodell etablieren. Insbesondere die Beleuchtungszeit nach Gabe von Bengalrosa erwies sich als entscheidender Parameter im Hinblick auf das Überleben und die Infarktgröße bei den Versuchstieren. Basierend auf Messungen der Infaktdurchmesser in Kresylviolett-färbungen an den Tagen 1, 3, 7, und 14 nach Infarkt ereignis führten Beleuchtungszeiten von 15 Minuten kortikal und 5 Minuten spinal zu vergleichbaren Infarktgrößen. Als erster Unterschied fällt bildmorphologisch insbesondere die starke Zellakkumulation innerhalb der spinalen Läsion an Tag 14 ins Auge. Zusätzlich konnte zerebral an Tag 14 nach Infarkt ereignis ein signifikant kleinerer Infaktdurchmesser gemessen werden ($p < 0,05$).

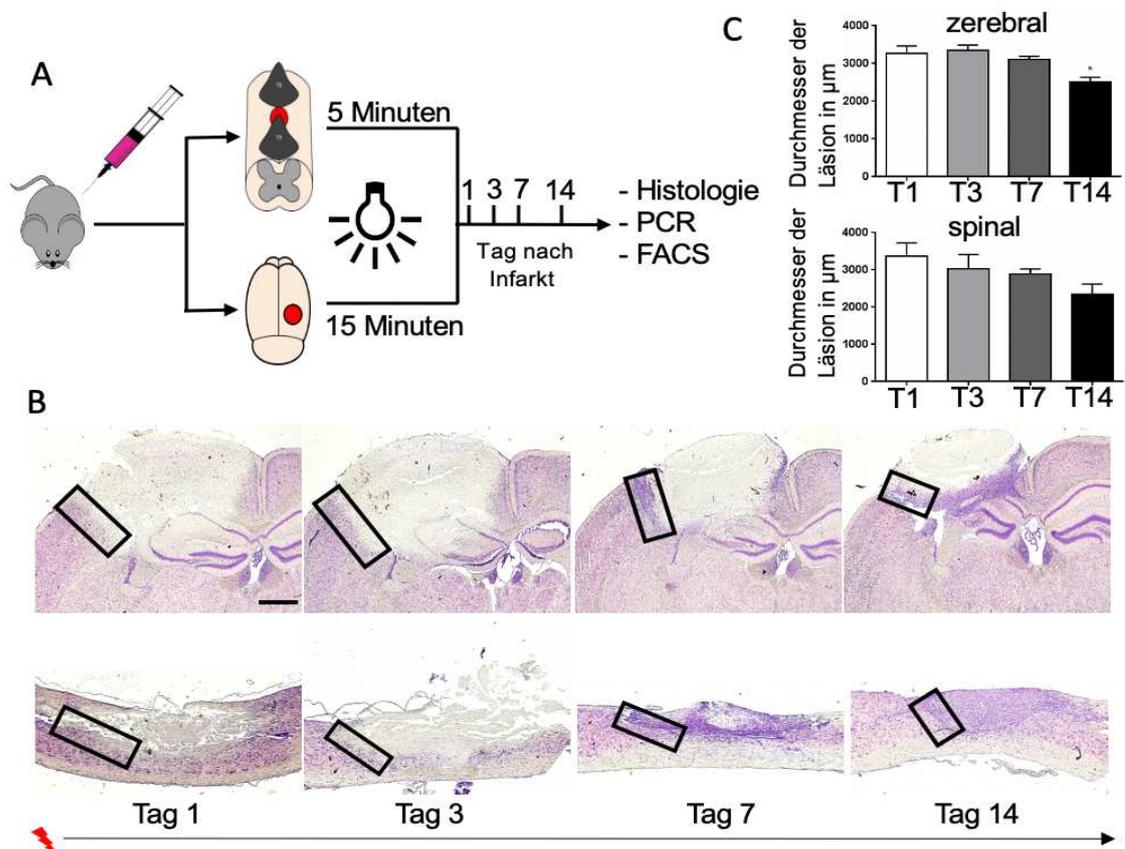


Abbildung 5: Versuchsaufbau.

A: Versuchsprotokoll der zerebralen und spinalen Photothrombose. B: Repräsentative Kresylviolett-färbungen in 25-facher Vergrößerung zerebral (oben) und spinal (unten) von Tag 1 bis 14 nach Infarktereignis (Spalten). Rechtecke: Position der Messflächen in der immunhistochemischen Untersuchung. Skalierungsbalken = 1 mm C: Zerebrale und spinale Infaktdurchmesser mit \pm Standardabweichung und $n = 3 - 6$. * = $p \leq 0,05$ (Einfaktorieller ANOVA mit *Tukey post-hoc* Test), Abkürzungen: T1 - Tag 1 nach Infarktereignis, T3: Tag 3, T7: Tag 7, T14: Tag 14

3.2 Unterschiedliche Anteile weißer Substanz zwischen der Ischämie im Rückenmark und Kortex

Im nächsten Schritt stellten wir uns die Frage in welchem Infarktmodell mehr graue- und in welchem Modell mehr weiße Substanz von der Infarktzone betroffen ist. Im Gegensatz zum zerebralen Infarktmodell befindet sich die spinale Läsion innerhalb der weißen Substanz. In immunhistochemischen Nachweisen des basischen Myelinproteins (abgekürzt: MBP) konnten statistisch signifikant mehr MBP-angefärbte Zellen innerhalb der Infarkttrandzone des spinalen Modells nachgewiesen werden mit spinal $\bar{x} = 2,211$ und zerebral $\bar{x} = 0,108$ ($p \leq 0,001$).

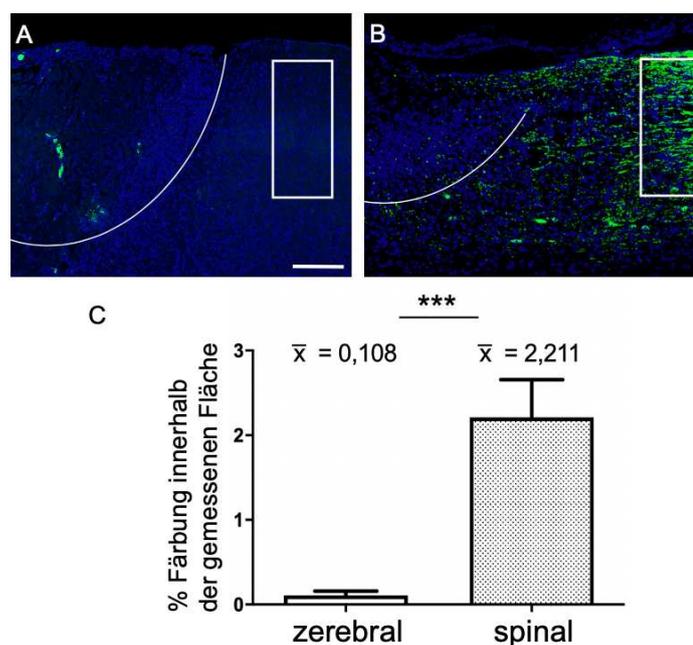


Abbildung 6: Nachweis von Myelin in der Immunfluoreszenz.

Immunfluoreszenzfärbung von basischem Myelinprotein (MBP) in grün (Alexa Fluor® 488) und Zellkernen in dunkelblau (4',6-Diamidin-2-phenylindol-dihydrochlorid) A-B: 100x Vergrößerung der zerebralen Randzone (A) und der spinalen Randzone (B). C: Vergleich des Anteils von MBP-Färbung in der jeweils unter A und B gekennzeichneten Messfläche in % mit signifikant mehr Färbung spinal (n=9) als zerebral (n=10) mit \pm Standardabweichung. Skalierungsbalken = 100 μ m, *** = $p \leq 0.001$ (*students t-test*)

3.4 Nachweis signifikant höherer Mengen aktivierter Astrozyten nach spinaler Ischämie

Um die Menge aktivierter Astrozyten und somit das Ausmaß der glialen Narbenbildung in der Infarkttrandzone zu bestimmen, wurde das Intermediärfilament „GFAP“ (englisch: *Glial fibrillary acidic protein*), immunhistochemisch angefärbt. Am ersten Tag nach Infarkt ereignis lag der gemessene Anteil angefärbter Zellen in der Messfläche unter einem Prozent. Es ergab sich im Vergleich beider Modelle kein signifikanter Unterschied (mit $\bar{x} = 0,348$ % zerebral zu $\bar{x} = 0,5458$ % spinal). Am dritten Tag nach Infarkt ereignis konnten spinal ($\bar{x} = 3,634$ %) statistisch signifikant mehr GFAP⁺-Zellen als zerebral ($\bar{x} = 1,710$ %) gemessen werden ($p \leq 0,05$). Am siebten Tag vergrößerte sich die gemessene Menge angefärbter Zellen nach Infarkt ereignis mit spinal ($\bar{x} = 16,26$ %) mehr als zerebral ($\bar{x} = 3,685$ %). Dieser Unterschied war statistisch signifikant ($p \leq 0,001$). Am vierzehnten Tag nach Infarkt ereignis konnte ein Rückgang im Anteil angefärbter Zellen gemessen werden, mit statistisch signifikant mehr gemessenen Zellen spinal ($\bar{x} = 9,171$ %) als zerebral ($\bar{x} = 1,494$ % und $p \leq 0,01$).

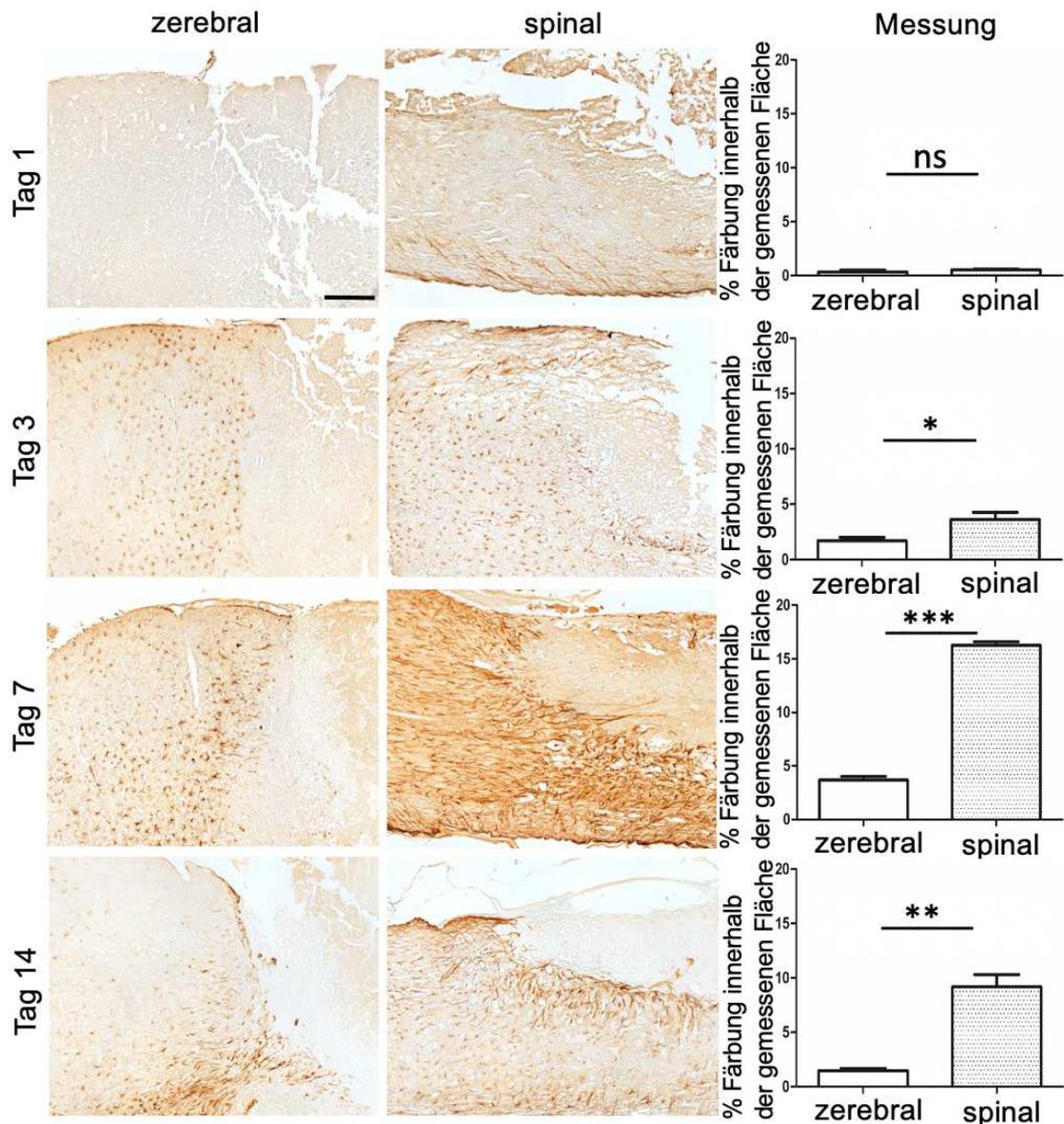


Abbildung 7: Immunhistochemische Färbung des Intermediärfilaments „GFAP“ in braun (3,3-Diaminobenzidin).

Jede Reihe repräsentiert einen Zeitpunkt nach induzierter Ischämie (Tag 1, 3, 7 und 14) mit repräsentativer Abbildung zerebral (links), spinal (rechts) in 100x Vergrößerung und der dazugehörigen Messung des Anteils an Färbung in den in Abbildung 5 dargestellten Messflächen in exakt gleicher anatomischer Lage in Prozent mit zerebral (weiß) und spinal (grau) und $n = 4-5$ ($n = 3$ zerebral an Tag 14) mit \pm Standardabweichung. Skalierungsbalken = 100 μm . Abkürzungen: ns = nicht signifikant, * = signifikanter Unterschied mit $p < 0.05$, ** = $p \leq 0,01$ und *** $p \leq 0,001$ (*students t-test*).

3.5 Kein signifikante Unterschied in der Menge von synthetisiertem Kollagen in der Infarktnarbe

Neben der glialen entsteht auch eine fibröse, kollagenhaltige Narbe. Ein wichtiger Bestandteil der Narbe und der Basalmembran ist Kollagen Typ 4. Um die Menge synthetisiertes Kollagen Typ 4 nach spinaler und zerebraler Ischämie zu vergleichen wurde dies immunhistochemisch angefärbt und quantifiziert.

Insgesamt zeigte sich über den gesamten Untersuchungszeitraum zu keinem Zeitpunkt ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen spinaler und zerebraler Ischämie. Am ersten Tag nach Infarkt ereignis lag der arithmetische Mittelwert des angefärbten Kollagenanteils bei zerebral 2,504 % im Vergleich zu spinal mit 2,877 %. Dieser Unterschied war statistisch nicht signifikant. Am dritten Tag nach Infarkt ereignis, konnte im Vergleich zum spinalen Modell zerebral ein mehr als doppelt so hoher Anteil gemessen werden. Spinal lag der gemessene Anteil bei 1,521 %, während im zerebralen Modell ein Anteil von 3,435 % gemessen wurde. Dieser Unterschied war statistisch nicht signifikant. Am siebten Tag nach Infarkt ereignis konnte ein arithmetischer Mittelwert von zerebral 6,191 %, zu spinal 5,486 % gemessen werden. Der gemessene Unterschied war statistisch nicht signifikant. Auch am Tag 14 nach Infarkt ereignis zeigte sich kein signifikant messbarer Unterschied ($p = 0,6431$). Die arithmetischen Mittelwerte lagen bei einem Anteil von spinal 11,13 % zu zerebral 12,36 % angefärbter Kollagenbestandteile. Während die gemessene Menge keinen Nachweis quantitativer Unterschiede erbringen konnte, erscheint die räumliche Organisation der Kollagenfibrillen nach spinaler Ischämie deutlich gesteigert in Länge und Vernetzung.

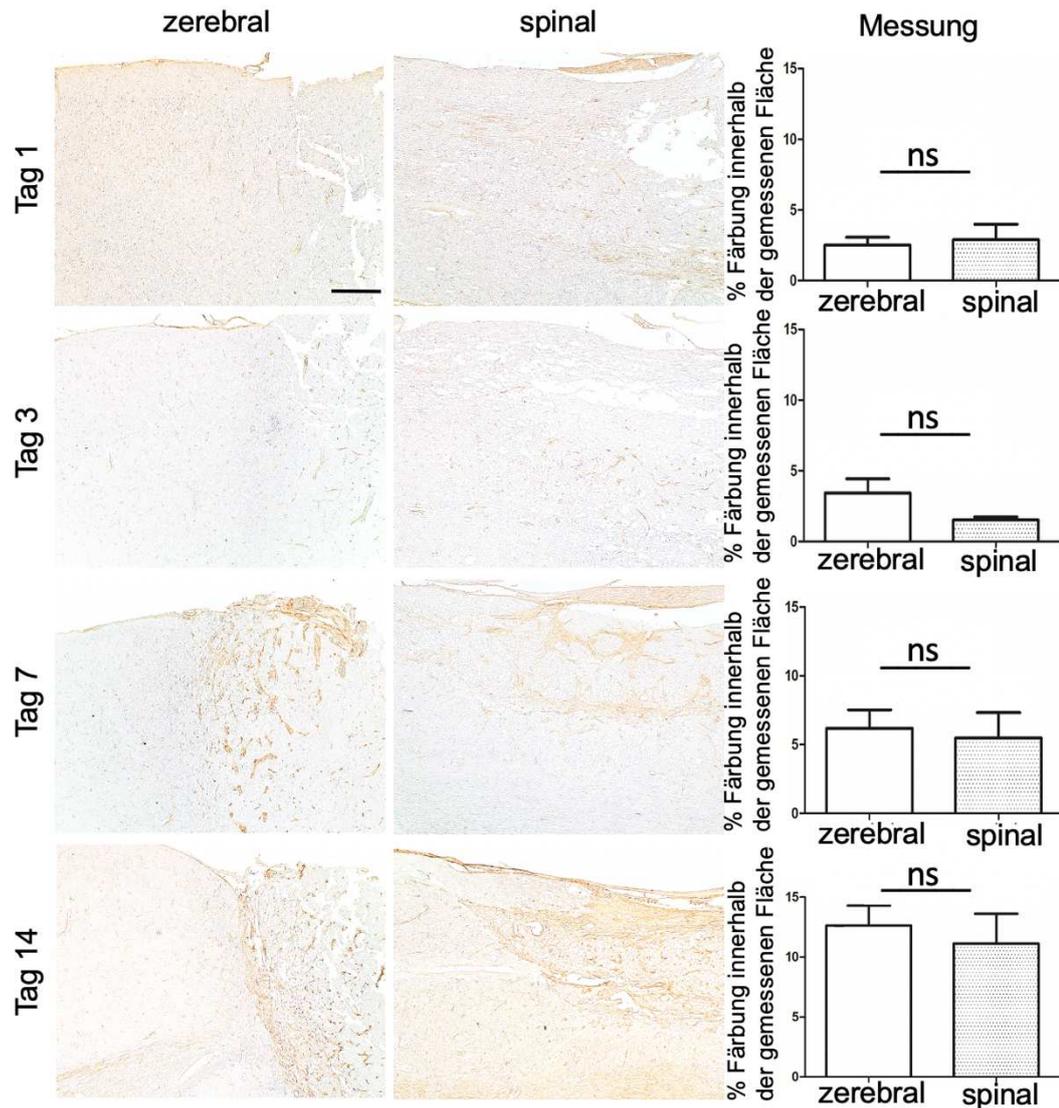


Abbildung 8: Immunhistochemische Färbung von Kollagen Typ 4 in braun (3,3-Diaminobenzidin).

Jede Reihe repräsentiert einen Zeitpunkt nach induzierter Ischämie (Tag 1, 3, 7 und 14) mit repräsentativer Abbildung zerebral (links), spinal (rechts) in 100x Vergrößerung und der dazugehörigen Messung des Anteils an Färbung in den in Abbildung 5 dargestellten Messflächen in exakt gleicher anatomischer Lage in Prozent mit zerebral (weiß) und spinal (grau) und $n = 4-5$ und $n = 3$ zerebral an Tag 14 mit \pm Standardabweichung. Skalierungsbalken = 100 μm . Abkürzungen: Ns = nicht signifikant (*students t-test*).

3.3 Nachweis signifikant höherer Mengen phagozytierender Zellen nach spinaler Ischämie

Um die Menge an vorhandenen phagozytierenden Zellen im Infarkttrandgebiet zu bestimmen, wurde das murine Analogon „*Macrosialin*“ des auf der Zelloberfläche von phagozytierenden humanen Zellen exprimierte Antigen „*CD68*“ immunhistochemisch nachgewiesen. Am ersten Tag nach Infarktereignis lag der Anteil gefärbter Zellen in beiden Modellen unter 1 %, ohne statistisch signifikanten Unterschied. Am dritten Tag nach Infarktereignis überstieg der spinal gemessene Anteil angefärbter Zellen ($\bar{x} = 5,846$ %), den kortikal gemessenen Anteil ($\bar{x} = 1,489$ %) um mehr als 4 %. Der gemessene Unterschied war statistisch signifikant ($p < 0,05$). Sieben Tage nach Infarktereignis konnte in der Infarkttrandzone spinal ($\bar{x} = 15,52$ %) ein höherer Anteil *Macrosialin*-positiver Zellen als zerebral ($\bar{x} = 8,919$ %) nachgewiesen werden. Dieser Unterschied war statistisch signifikant ($p < 0,05$). Nach Ablauf von vierzehn Tagen konnte, im arithmetischen Mittel, spinal ein mehr als dreifach so hoher Anteil angefärbter Zellen nachgewiesen werden (mit $\bar{x} = 34,35$ % spinal zu $\bar{x} = 11,17$ % zerebral). Auch dieser Unterschied zeigte statistische Signifikanz ($p \leq 0,05$).

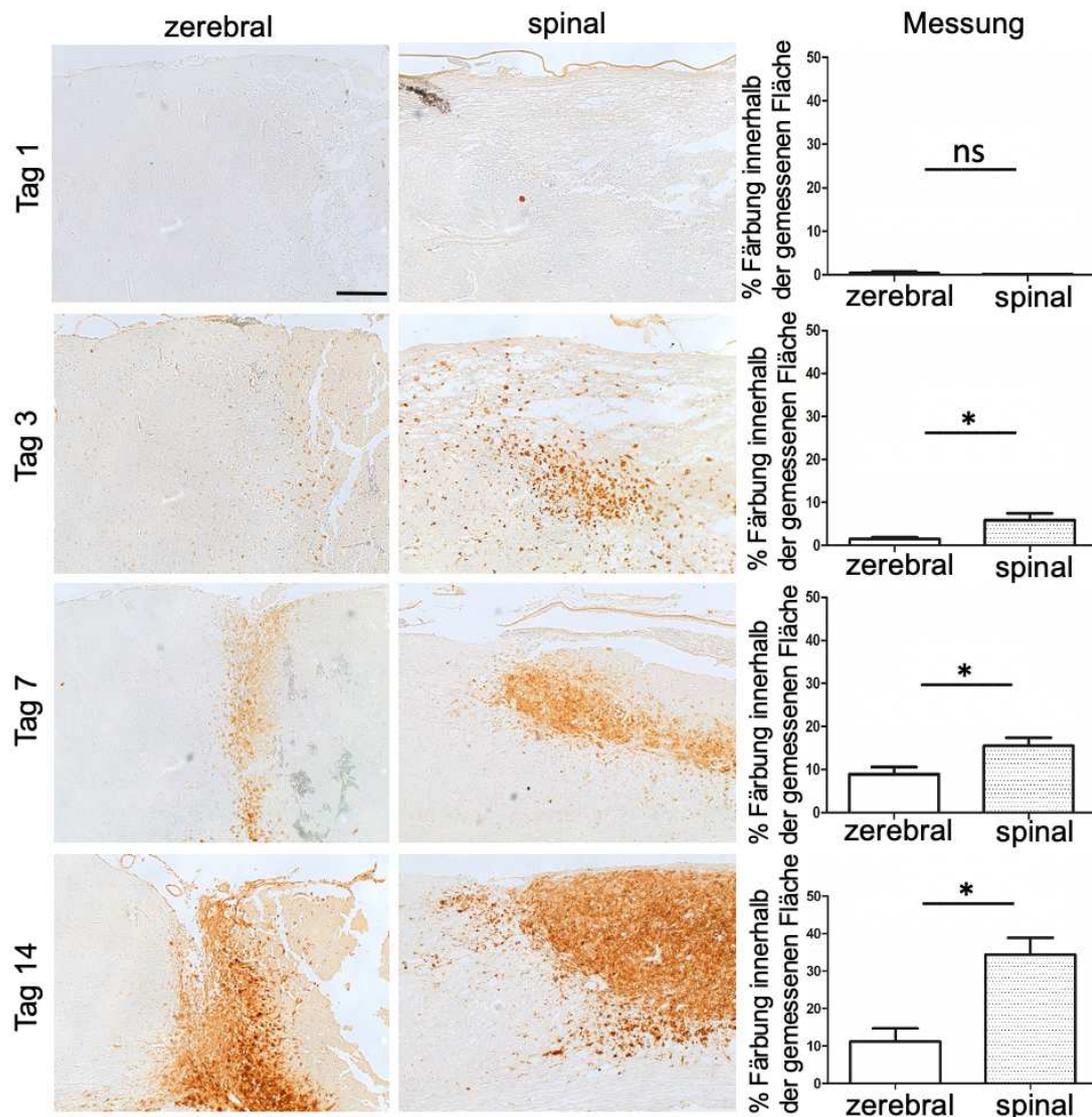


Abbildung 9: Immunhistochemische Färbungen des CD-Antigens 68 (CD68) in braun (3,3-Diaminobenzidin).

Jede Reihe repräsentiert einen Zeitpunkt nach induzierter Ischämie (Tag 1, 3, 7 und 14) mit repräsentativer Abbildung zerebral (links), spinal (rechts) in 100x Vergrößerung und der dazugehörigen Messung des Anteils an Färbung in den in Abbildung 5 dargestellten Messflächen in gleicher anatomischer Lage in Prozent mit zerebral (weiß) und spinal (grau) und $n = 4-5$ ($n = 3$ zerebral an Tag 14) mit \pm Standardabweichung. Skalierungsbalken = 100 μm . Abkürzungen: ns = nicht signifikant, * = signifikanter Unterschied mit $p < 0.05$ (*students t-test*).

3.4 Nachweis unterschiedlicher Mengen aktivierter Mikroglia, hämatogener Monozyten/Makrophagen und neutrophiler Granulozyten nach spinaler und zerebraler Ischämie in der fluoreszenzbasierten Durchflusszytometrie

Nachdem die Anzahl phagozytierender Zellen im obigen Abschnitten im Zeitverlauf immunhistochemisch verglichen wurde, beschäftigten wir uns im nächsten Schritt mit der Differenzierung zwischen hämatogen eingewanderten Monozyten/Makrophagen und Mikroglia sowie ihrer Quantifizierung am siebten Tag nach spinaler- und zerebraler Ischämie.

Die Verwendung von Knochenmarkschimären (mit transplantiertem CD45.2 Knochenmark in allogene CD45.1 Mäuse) erlaubt eine Unterscheidung zwischen Mikroglia (CD45.1 positiv) und Monozyten/Makrophagen hämatogenen Ursprungs (CD45.2 positiv) in der Durchflusszytometrie. Zusätzlich erfolgte eine Quantifizierung neutrophiler Granulozyten (CD11b+Ly6g+) und CD11b negativer Zellen, überwiegend Lymphozyten (CD11b-CD45.2+). Abbildung 10 zeigt die verwendete Gatingstrategie (Abbildung 10A) und exemplarisch die gewonnenen Ergebnisse am siebten Tag nach Ischämie (Abbildung 10B).

Hier zeigte sich an Tag 7 nach Infarktereignis eine erhöhte Menge aktivierter Mikroglia zerebral im Vergleich zu spinal (Abbildung 10B, erste Spalte, oben). Im spinalen Modell konnte hingegen eine höhere Menge aktivierter Monozyten/Makrophagen hämatogenen Ursprungs nachgewiesen werden (Abbildung 10B, erste Spalte, unten).

Nebenbefundlich konnte im spinalen Infarktmodell eine erhöhte Menge neutrophiler Granulozyten nachgewiesen werden (Abbildung 10B, zweite Spalte, unten). In der Anzahl der übrigen CD11b negativen Zellen, überwiegend Lymphozyten, konnte kein Unterschied detektiert werden (Abbildung 10B, dritte Spalte).

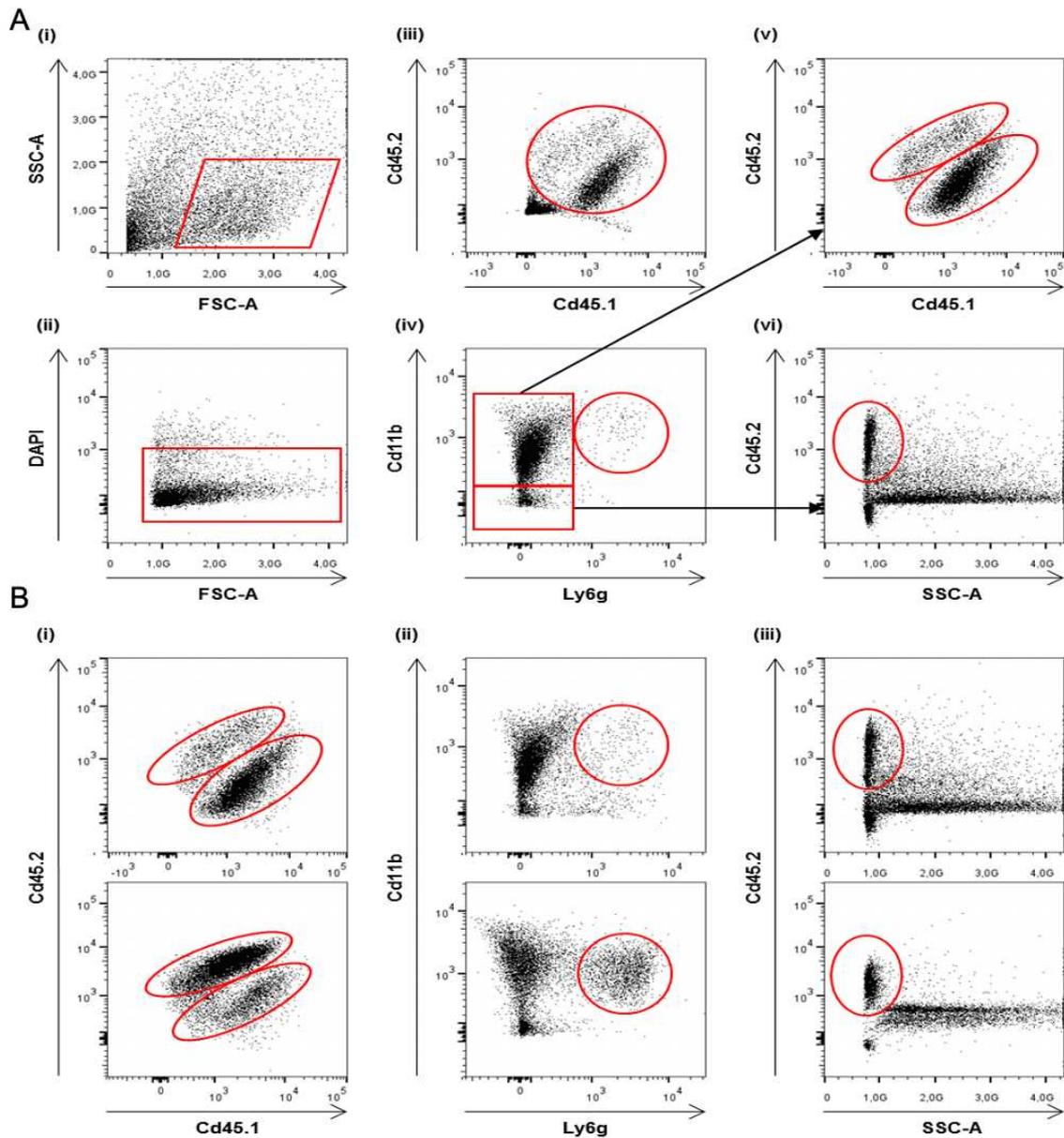


Abbildung 10: Fluoreszenzbasierte Durchflusszytometrie von Gehirn- und Rückenmarksgewebe am siebten Tag nach Infarkt ereignis.

A: Verwendete Gateingstrategie. aus dem Gehirn (obere Reihe) und Rückenmark (untere Reihe). Mikroglia wurde identifiziert als CD11b⁺, Ly6g⁻ und CD45.1⁺, Monozyten/Makrophagen als CD11b⁺, Ly6g⁻ und CD45.2⁺, neutrophile Granulozyten als CD11b⁺ und Ly6g⁺ und CD11b negative Zellen als CD11b⁻ und CD45.2⁺. B: Repräsentative Darstellung der Ergebnisse mit erhöhter Menge aktivierter Mikroglia zerebral im Vergleich zu spinal (Abbildung 10B, erste Spalte, oben), höherer Menge aktivierter Monozyten/Makrophagen hämatogenen Ursprungs (Abbildung 10B, erste Spalte, unten) und keinem Unterschied in der Anzahl der CD11b negativer Zellen (Abbildung 10B, dritte Spalte). Abkürzungen:

CD: *Cluster of differentiation*, Ly6g: *Lymphocyte antigen 6 complex locus G6D*, SSC: *Sidescatter*, FSC: *Forwardscatter*, DAPI: *4',6-Diamidin-2-phenylindol-dihydrochlorid*.

Nachfolgend erfolgte eine Zeitreihenuntersuchung der absoluten Zellzahl pro Milligramm Infarktgewebe (an Tag 1, 3, 7 und Tag 14 nach Ischämie; Abbildung 11). In der Anzahl monozytärer und makrophagozytärer Zellen konnte nach spinaler Ischämie über den gesamten Untersuchungszeitraum eine signifikant erhöhte Zellzahl gemessen werden. Gleiches gilt für die Anzahl neutrophiler- und CD11b-er Zellen (überwiegend Lymphozyten). Nach zerebraler Ischämie war hingegen die Anzahl mikroglialer Zellen über den gesamten Untersuchungszeitraum signifikant höher als spinal.

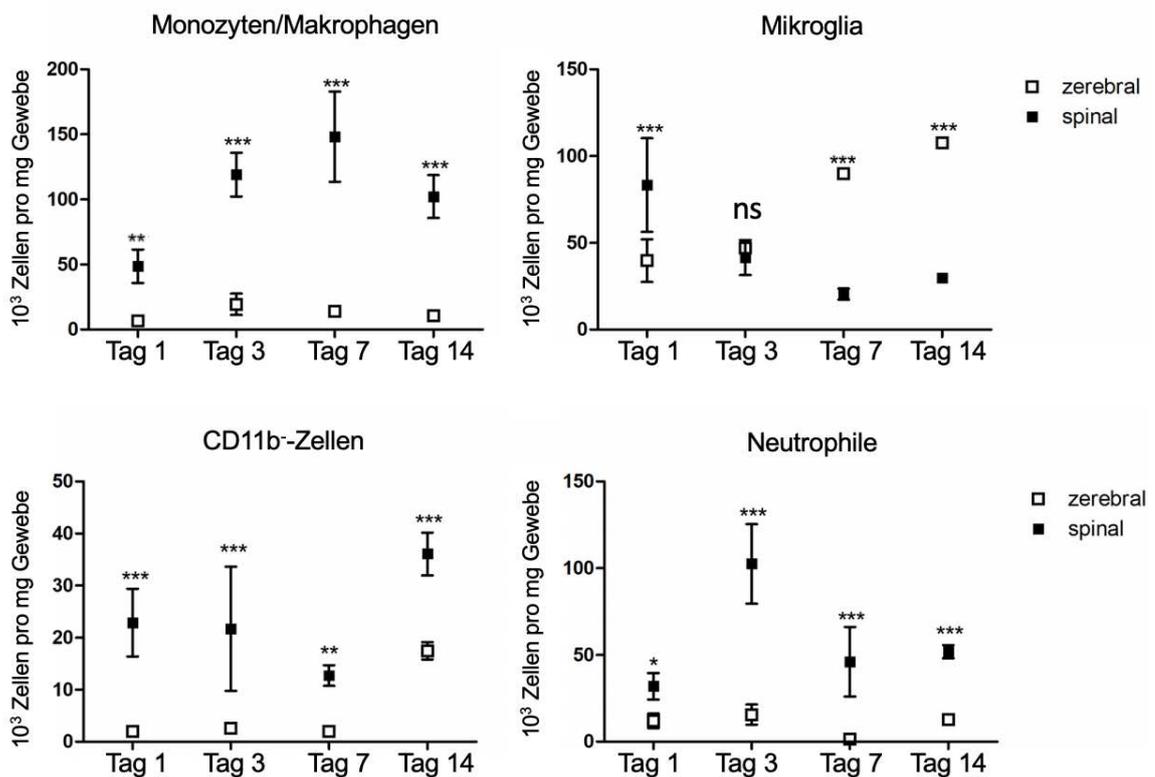


Abbildung 11: Absolute Anzahl gemessener Zelltypen im Zeitverlauf

Absolute Anzahl gemessener Zelltypen in tausend Zellen pro Milligramm spinalem Infarktgewebe (schwarze Kästen) und zerebralem Infarktgewebe weiße Kästen). Statistik: Zweiweg-Varianzanalyse (englisch: *Two-way analysis of variance*), Abkürzungen: ** = $p \leq 0.01$, *** = $p \leq 0.001$, ns = nicht signifikant

3.5 Die Messung zelltypspezifischer mRNA-Mengen in der real-time quantitativen PCR bestätigen die Ergebnisse der fluoreszenzbasierten Durchflusszytometrie

Im nächsten Schritt verglichen wir die Ergebnisse aus der fluoreszenzbasierten Durchflusszytometrie mit dem Zeitverlauf der Expression von monozyten- und makrophagenspezifischen Genen via Real-time quantitativer PCR um die durchflusszytometrisch gemessenen Ergebnisse zu verifizieren.

Für den ersten Vergleich wurde mikroglia-spezifische mRNA ausgewählt, welche die Aminosäuresequenz für den purinergen Rezeptor „P2Y12“ kodiert (Abbildung 12A). Korrespondierend zu Abbildung 10A konnte im zerebralen Infarktmodell bis Tag 7 zerebral eine statistisch signifikant höhere Menge P2Y12-mRNA als spinal detektiert werden. Entgegen den Messungen aus der fluoreszenzbasierten Durchflusszytometrie konnte am Tag 14 nach Infarktereignis kein statistisch signifikanter Unterschied in der Expression mikroglia-spezifischer P2Y12-mRNA detektiert werden. Vergleicht man die detektierten mRNA-Mengen mit denen des endogenen Kontrollgens, so imponiert insbesondere die an Tag 1 gemessene Herabregulation der Genexpression. Abbildung 12B zeigt die gemessenen Mengen mikroglia-spezifischer mRNA, welche die Aminosäuresequenz für den *Solute Carrier Family 2 Member 5* (abgekürzt: Slc2a5) kodiert. Über den gesamten Zeitverlauf konnte nach zerebraler Ischämie eine statistisch signifikant höhere Menge Slc2a5-mRNA als spinal nachgewiesen werden. Ausgeprägter als bei der Messung von P2Y12-mRNA konnte insbesondere im spinalen Infarktmodell eine Herabregulation der Genexpression von Tag 1 - 14 gemessen werden. Im nächsten Schritt wurden mRNA-Mengen betrachtet, welche nur in hämatogenen Monozyten/Makrophagen exprimiert werden. Zu diesen zählen das Enzym Arginase-1 (abgekürzt: Arg1) und der *Paired immunoglobulin-like type 2 receptor beta-2* (abgekürzt: Pilrb2). In der gemessenen Menge Arg1-mRNA imponiert insbesondere die signifikant erhöht gemessene Menge an Tag 3 nach spinaler Ischämie mit dem 162-fachen des zerebralen Kontrollgens ($p \leq 0,0001$). In der gemessenen Menge Pilrb2-mRNA konnte zusätzlich eine signifikant erhöhte Menge mRNA an Tag 1 spinal zu zerebral detektiert werden.

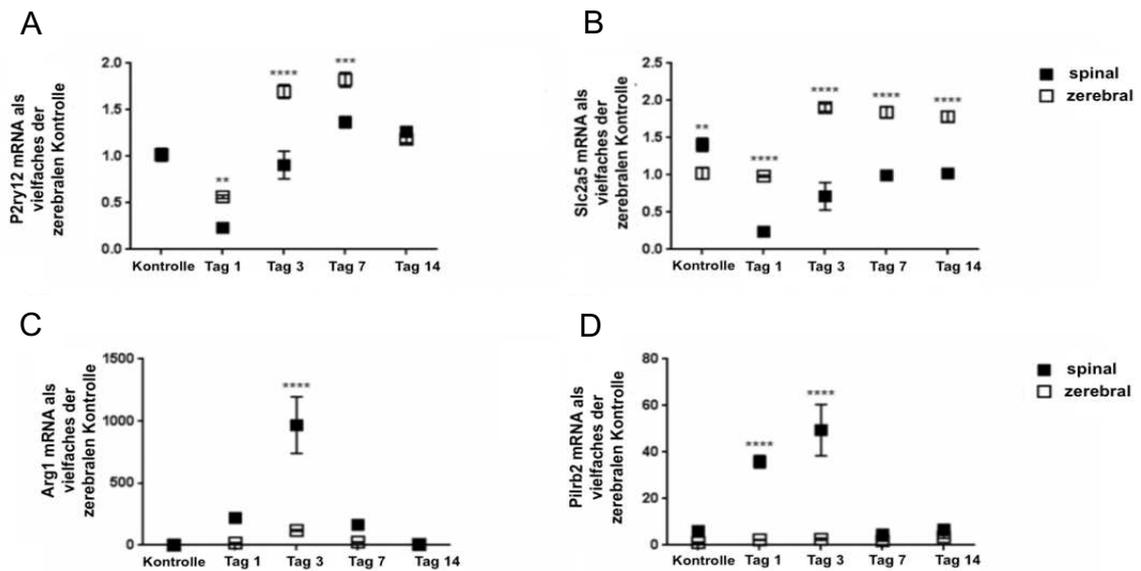


Abbildung 12: Übersicht mikrogli- und monozyten/makrophagenspezifischer Marker aus der realtime quantitativen PCR

A-D: Expression von spezifischer mRNA als Vielfaches der zerebralen Kontrolle in der Real-time quantitativen PCR. Angaben als vielfaches der zerebralen Kontrolle (native Tiere) mit +- Standardabweichung und n = 5-6. Statistik: Zweiweg-Varianzanalyse (englisch: *Two-way analysis of variance*), ** = $p \leq 0.01$, *** = $p \leq 0.001$, **** = $p \leq 0.0001$. Abkürzungen: CD: *Cluster of differentiation*, P2ry12: Purinerge Rezeptor „P2Y12“, Slc2a5: *Solute Carrier Family 2 Member 5*, Arg1: Arginase-1, Pilrb2: *Paired immunoglobulin-like type 2 receptor beta-2*

3.6 Ähnliches Expressionsmuster inflammations- und reparaturspezifischer Gene nach Rückenmarks- und Hirninfarkt

Um die inflammatorische Antwort nach Aktivierung der Mikroglia und erfolgter Einwanderung hämatogener Monozyten/Makrophagen genauer zu untersuchen, führten wir real-time quantitative PCRs spezifischer mRNA-Sequenzen durch. Betrachtet man die gemessenen mRNA-Mengen welche für typisch inflammatorische Marker wie z. B. *TNF-Alpha*, die induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS) und für die CD-Antigene 32 und 86 kodieren, so fällt insbesondere die verstärkte Expression im spinalen Infarktmodell ins Auge, welches bereits in der nativen Kontrollpopulation nachgewiesen werden konnte. Das Muster der Regulation im Zeitverlauf ist jedoch ähnlich. Spezifische mRNA, welche die Aminosäuresequenzen reparaturassoziierter Proteine wie

den *Transforming growth factor- β 1* (TGF1) oder das CD-Antigen 206 kodieren, konnten ebenfalls in größerer Menge im spinalen Infarktmodell nachgewiesen werden. Der zeitliche Verlauf von Herauf- und Herabregulation der Gene ist im Vergleich beider Infarktmodelle nahezu identisch (Abbildung 12 E-F).

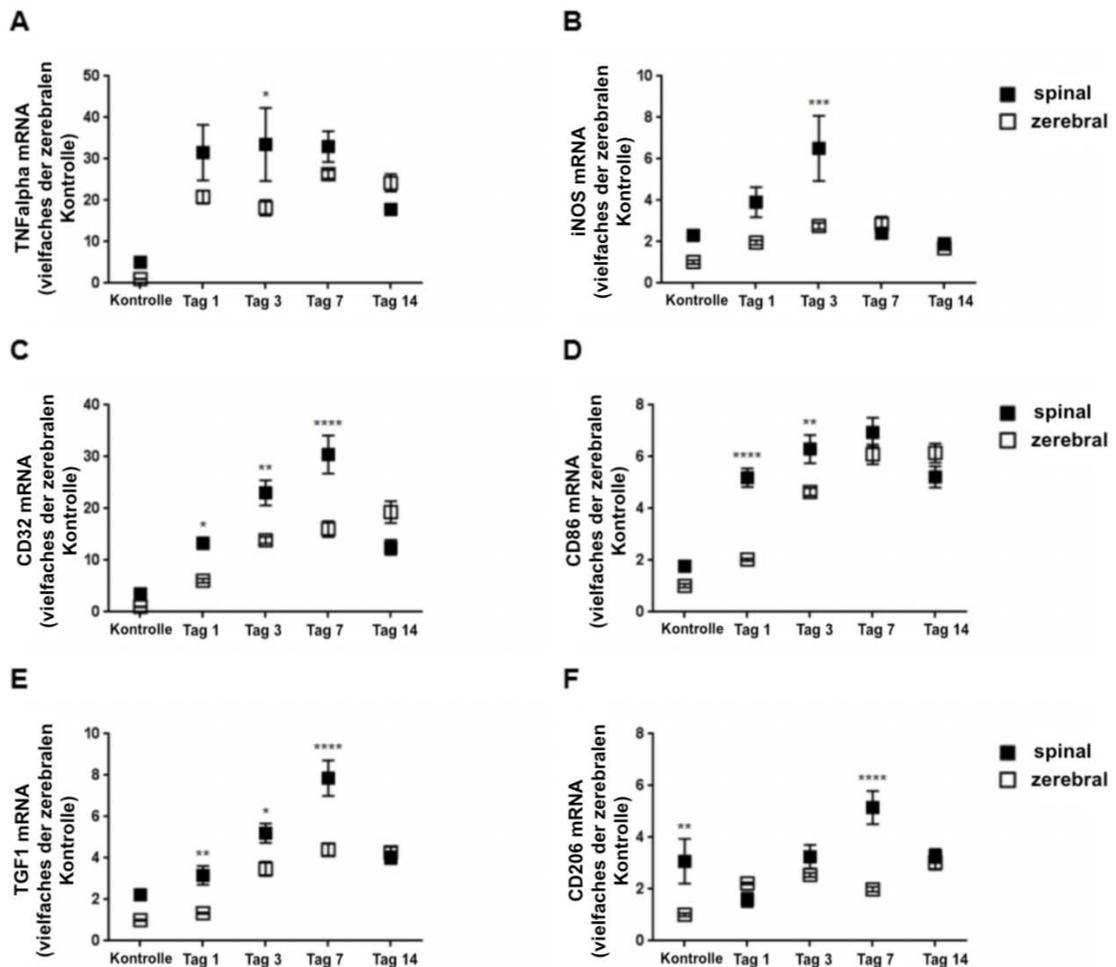


Abbildung 13: Übersicht spezifisch inflammatorischer Marker in der realtime quantitativen PCR

A-F: Expression von spezifischer mRNA als Vielfaches der zerebralen Kontrolle in der Real-time quantitativen PCR. Angaben als vielfaches der zerebralen Kontrolle (native Tiere) mit +/- Standardabweichung und n = 5-6. Statistik: Zweiweg-Varianzanalyse (englisch: *Two-way analysis of variance*), ** = $p \leq 0.01$, *** = $p \leq 0.001$, **** = $p \leq 0.0001$. Abkürzungen: CD: *Cluster of differentiation*, TNFalpha: Tumornekrosefaktor-alpha, iNOS: induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase, TGF1: *Transforming growth factor beta 1*

3.6.1 Microarray: Global unterschiedliche Genexpression im Rückenmark und Gehirn in der Hauptkomponentenanalyse

Als Kontrolle für die Homogenität der für die Microarrayanalyse verwendeten Gewebeproben und um die verwendeten Gewebegruppen auf ihre Ähnlichkeit hinsichtlich der Genexpression zu überprüfen, erfolgte eine Hauptkomponentenanalyse (siehe Abschnitt 2.9 im Methodenteil).

Zwischen den verwendeten Gewebearten existierten im Hinblick auf die errechneten Hauptkomponenten keine Überschneidungen (farbige Kreise in Abbildung 14). Innerhalb gleicher Gewebegruppen sind Unterschiede der Gewebeproben jedoch gering (farbige Kästen innerhalb der Kreise in Abbildung 14). Damit konnte neben der Unterschiedlichkeit der verglichenen Gewebegruppen (spinal und zerebral) auch die Reinheit der untersuchten Gewebe innerhalb ihrer Gruppe gezeigt werden.

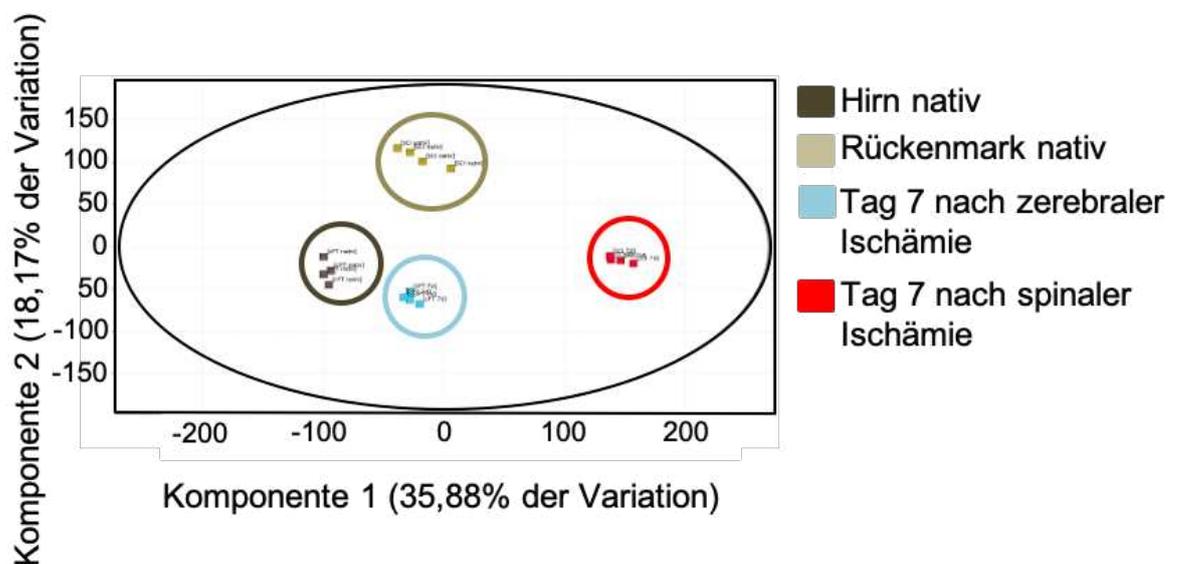


Abbildung 14: Zweidimensionale Darstellung der Hauptkomponentenanalyse aller für die Microarrayanalyse verwendeten Gewebearten.

Aufgeteilt zwischen der Hauptkomponente 1 welche 35,88% der Variation zwischen den Proben abdeckt und Hauptkomponente 2 mit 18,17% der Variation. Braun eingekreist ist Hirngewebe nativer Tiere, in grün Rückenmarksgewebe nativer Tiere, in blau Hirngewebe am siebten Tag nach Ischämie und in rot Rückenmarksgewebe am siebten Tag nach Ischämie.

3.7.2 Kein signifikanter Unterschied in der Genexpression etablierter immunologischer Gendatenbanken zwischen beiden Modellen

Um einen breiten Vergleich zwischen der Genexpression nach spinaler- und zerebraler Ischämie zu erhalten, wurde die Expression von Genen aus etablierten immunologischen Gendatenbanken miteinander verglichen.

In der Untersuchung der Genexpression von Genen aus etablierten immunologischen Gendatenbanken zeigte sich im Vergleich zerebral zu spinal kein Unterschied im Hinblick auf eine Herauf- oder Herabregulation. Bei heraufregulierten Genen imponiert eine stärkere Heraufregulation im spinalen Infarktgewebe und im Falle der Herabregulation spezifischer Gene für Zelltod und Morbidität eine stärkere Herabregulation im zerebralen Infarktgewebe. Die Analyse der fünfzig am stärksten regulierten Gene zeigte eine über 90%-ige Übereinstimmung zwischen zerebraler und spinaler Ischämie.

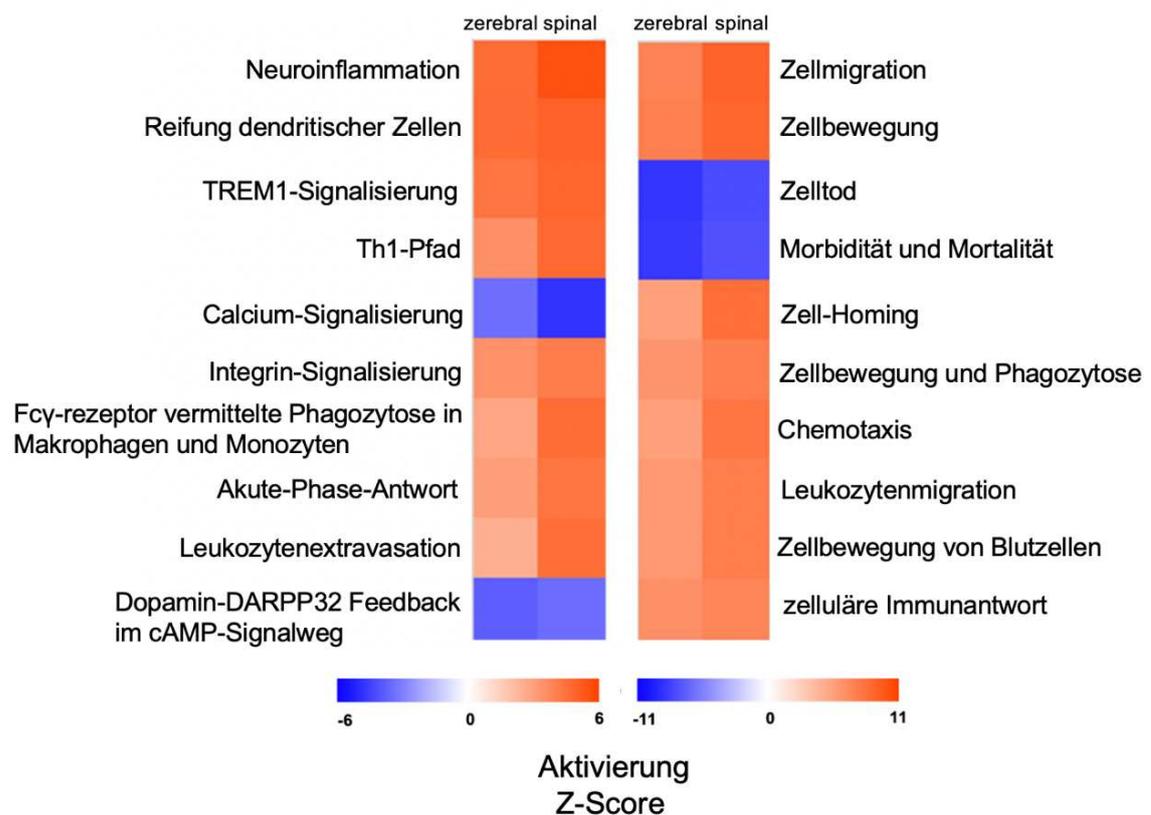


Abbildung 15: Vergleich der Genexpression im zerebralen und spinalen Gewebe via Microarray hinsichtlich etablierter Gendatenbanken exemplarisch an Tag 7.

Die Angabe der Genexpression erfolgt über eine Z-Score-Standardisierung als Anzahl der Standardabweichung über- oder unterhalb des Mittelwerts der Genexpression.

3.7.3 Nachweis ähnlicher Genexpressionsmuster für inflammations-reparatur- und phagozytosespezifischer Gene

Nachdem der im vorherigen Abschnitt der Nachweis einer Übereinstimmung in der Genexpression etablierter Gendatenbanken nach zerebraler- und spinaler Ischämie erbracht wurde, betrachteten wir die Expression einzelner Gene welche für Inflammation, Reparatur und Phagozytose kodieren. Die Auswahl der untersuchten Gene erfolgte anhand bereits publizierter Untersuchungen (Davies et al., 2019).

Im Vergleich der Expression etablierter inflammationspezifischer Gene zeigt sich qualitativ ein ähnliches Expressionsmuster.

Quantitativ erscheint die Genexpression nach spinalem Infarkt häufig stärker zu sein.

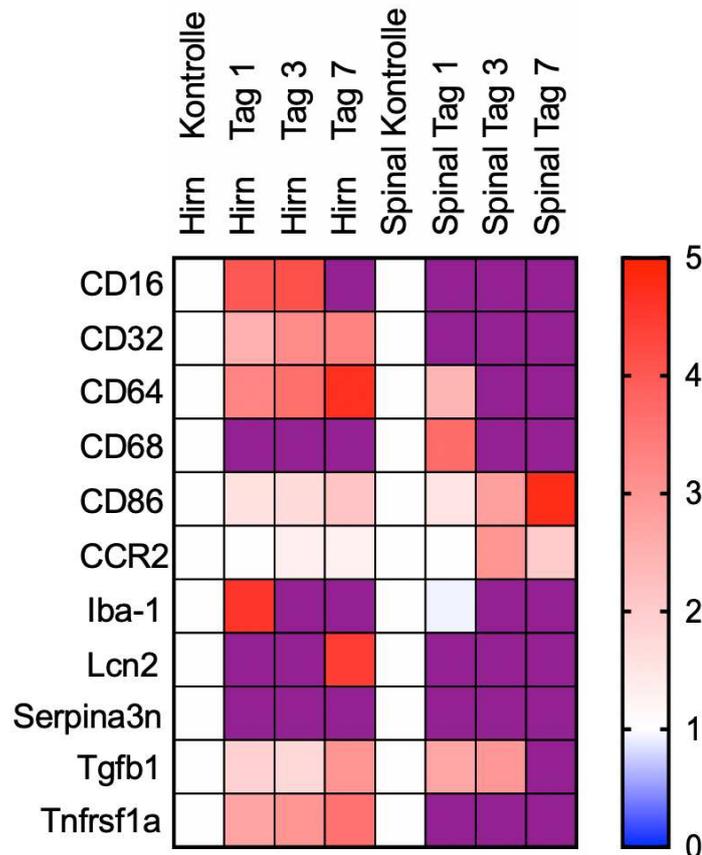


Abbildung 16: Übersicht der Ergebnisse der Transkriptomanalyse für Gene welche für Prozesse der Inflammation kodieren als vielfaches der Kontrolle. Auch im Vergleich reparaturspezifischer Gene zeigt sich ein vergleichbares Genexpressionsmuster, ebenfalls mit geringgradig stärkerer Expression nach spinaler Ischämie. Abkürzungen: CD: *Cluster of differentiation*, CCR2: *C-C chemokine receptor type 2*, Iba-1: *Allograft inflammatory factor 1*, Lcn2: *Lipocalin-2*, Serpina3n: *Serine protease inhibitor A3N*, Tgfb1: *Transforming growth factor beta 1*, Tnfrsf1a: *Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily, Member 1A*

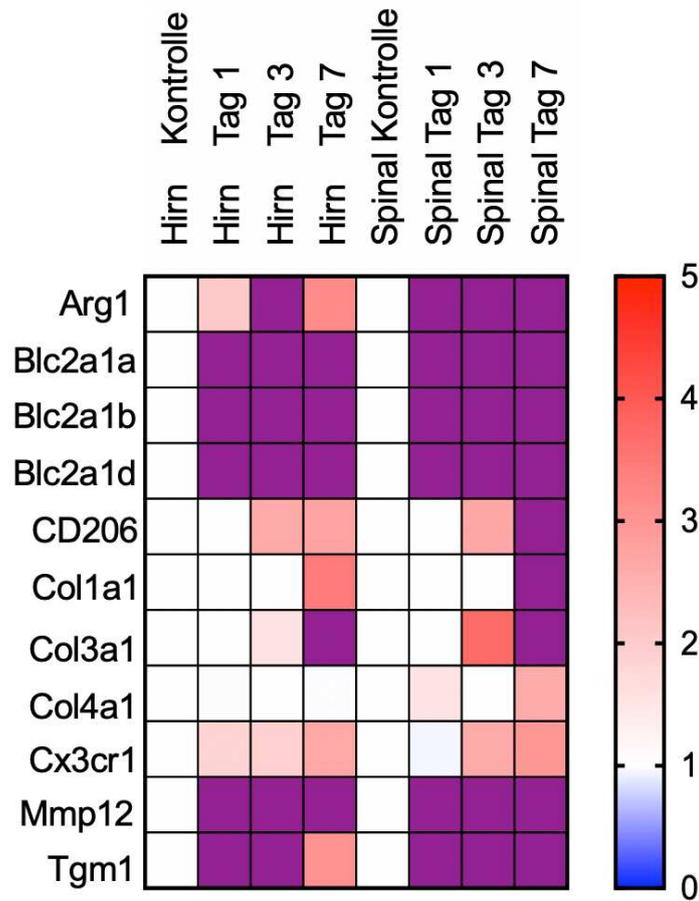


Abbildung 17: Übersicht der Ergebnisse der Transkriptomanalyse für Gene welche für Prozesse der Reparatur nach Ischämie kodieren als vielfaches der Kontrolle.

Abkürzungen: Arg1: Arginase-1, Blc2a: *Bcl-2-related protein*, CD: *Cluster of differentiation*, Col1a1: Kollagen Typ I, alpha 1, Col3a1: Kollagen Typ III, alpha 1, Col4a1: Kollagen Typ IV, alpha 1, Cx3cr1: CX3C chemokine receptor 1, Mmp12: Matrix metalloproteinase-12, Tgm12: Transglutaminase-1

Der Vergleich der Expression phagozytosespezifischer Gene belegt ein ebenfalls ähnliches Genexpressionsmuster. Einzig die Expression des Cfh-Gens fällt nach spinaler Ischämie stärker als zerebral aus.

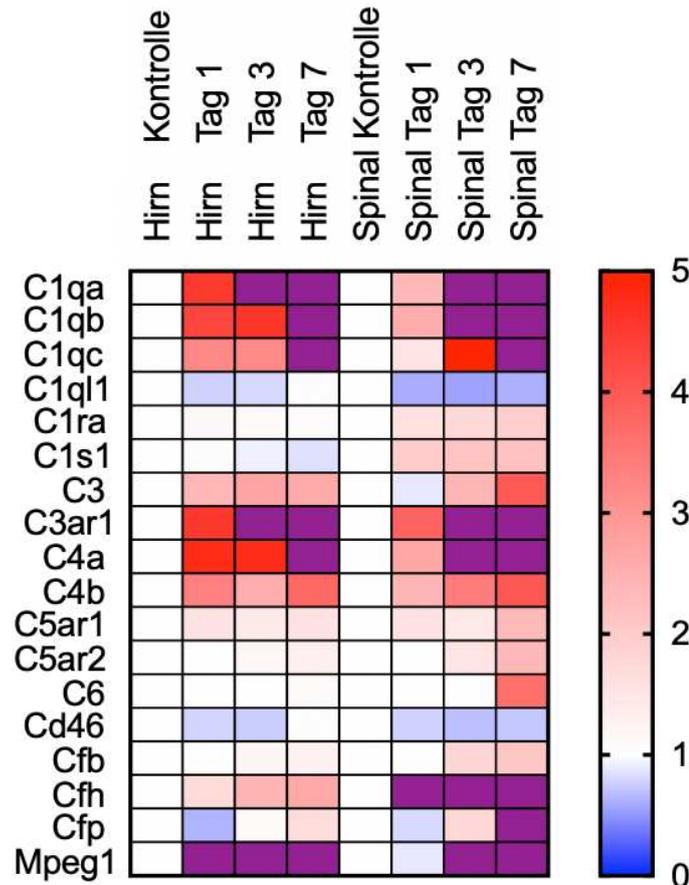


Abbildung 18: Übersicht der Ergebnisse der Transkriptomanalyse für Gene welche für Prozesse der Phagozytose nach Ischämie kodieren als vielfaches der Kontrolle.

Abkürzungen: C1qa: Komplement C1q-Unterkomponente Untereinheit A, C1qb: Komplement C1q-Unterkomponente Untereinheit B, C1qc: Komplement C1q-Unterkomponente Untereinheit C, C1ql1: *Complement component 1, q subcomponent-like 1*, C1ra: *Complement component 1, r subcomponent A*, C1s1: *Complement component 1, s subcomponent*, C3: Komplementkomponente 3, C3ar1: *Complement C3a Receptor 1*, C4a: *Complement C4-A*, C4b: *Complement C4-A*, C5ar1: *Complement component 5a receptor 1*, C5ar2: *Complement component 5a receptor 2*, C6: Komplementkomponente 6, Cd: *Cluster of differentiation*, Cfb: Komplementfaktor b, Cfh: Faktor H der Komplementaktivierungsfamilie, Cfp: *Complement factor properdin*, Mpeg1: *Macrophage Expressed 1 Gene*

3.7.4 Nachweis unterschiedlicher Genexpressionsmuster für Remyelinisierungsprozesse

Während die in den vorherigen Abschnitten Ergebnisse der Transkriptomanalyse die Gemeinsamkeiten nach spinaler- und zerebraler Ischämie aufzeigen, existieren bei der Expression remyelinisierungs- und astrogliosespezifischer Gene Unterschiede. Die Auswahl der untersuchten Gene erfolgte anhand bereits publizierter Untersuchungen (Fernández-Castañeda et al., 2020 und Hagemeyer et al., 2017).

Abweichend von der Analyse der oben genannten Pathways und Zellfunktionen zeigte die Untersuchung von Genen welche im Zuge eines Remyelinisierungsprozesses exprimiert werden eine Heraufregulation im zerebralen und eine Herabregulation im spinalen Infarktmodell.

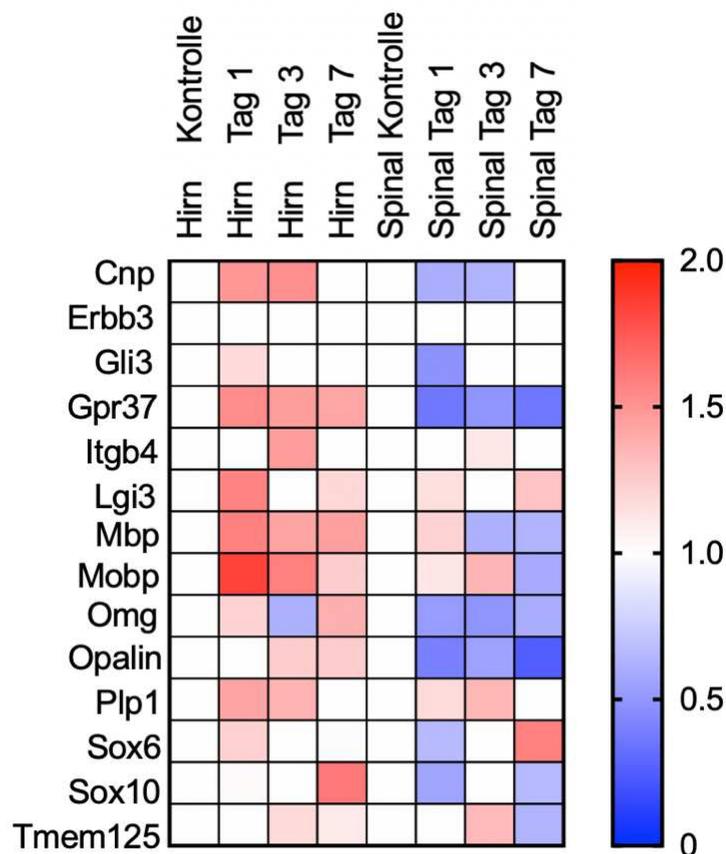


Abbildung 19: Übersicht der Ergebnisse der Transkriptomanalyse für Gene welche für Remyelinisierungsprozesse kodieren als vielfaches der Kontrolle.

Heraufregulation der Gene ins rote Farbspektrum und Herabregulation ins blaue Farbspektrum. Abkürzungen: Cnp: CNPase, Erbb3: *Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 3*, Gli3: *GLI family zinc finger 3*, Gpr37: *Probable G-protein coupled*

receptor 37, *Itgb4*: *Integrin Subunit Beta 4*, *MBP*: Myelin-basisches Protein, *Mobp*: *Myelin associated oligodendrocyte basic protein*, *Omg*: *Oligodendrocyte-myelin glycoprotein Gene*, *Opalin*: *Oligodendrocytic myelin paranodal and inner loop protein*, *Plp1*: *Proteolipidprotein-1*, *Sox6*: *SRY-Box Transcription Factor 6*, *Sox10*: *SRY-Box Transcription Factor 10*, *TMEM 125*: *Transmembrane protein 125*

3.7.5 Nachweis unterschiedlicher Genexpressionsmuster für Astrogliose

Um die aus Abschnitt 3.4. immunhistochemisch erhobenen Ergebnisse der Astrogliose auf Genomebene zu verifizieren, erfolgte der Vergleich von Genen welche basierend auf einer Veröffentlichung von Ito und Kollegen aus dem Jahre 2019 für astrogliosespezifische Gene kodieren via Transkriptomanalyse (Ito et al., 2019).

Entgegen den Ergebnissen aus Abschnitt 3.4 konnte nach zerebraler Ischämie eine stärkere Expression von GFAP nachgewiesen werden (Abbildung 20).

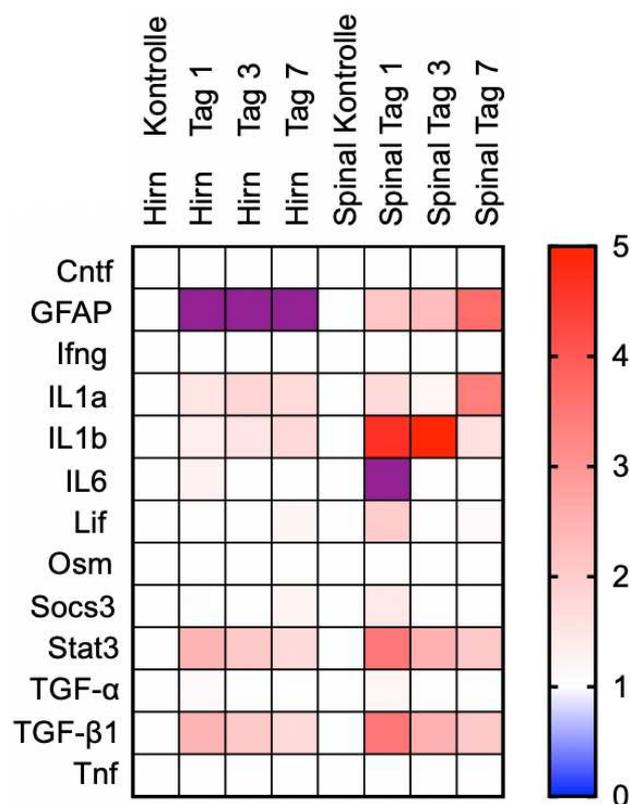


Abbildung 20: Übersicht der Ergebnisse der Transkriptomanalyse für Gene welche für Remyelinisierungsprozesse kodieren als vielfaches der Kontrolle.

Heraufregulation der Gene ins rote Farbspektrum und Herabregulation ins blaue Farbspektrum. Abkürzungen: Cntf: *Ciliary neurotrophic factor*, GFAP: *Glial fibrillary acidic protein*, Ifng: Interferon Gamma, IL1a: Interleukin-1-alpha, IL1b: Interleukin 1 beta, IL6: Interleukin-6, Lif: *LIF Interleukin 6 family cytokine*, Osm: Oncostatin m, Socs3: *Suppressor of cytokine signaling 3*, Stat3: *Signal transducer and activator of transcription 3*, TGF- α : *Transforming growth factor alpha*, TGF β 1: *Transforming growth factor beta 1*, Tnf: Tumornekrosefaktor

4. Diskussion

Nach einer ZNS-Schädigung setzen unterschiedliche pathophysiologische Prozesse ein, die bislang nur unvollständig verstanden sind. Die inflammatorische Antwort, hauptsächlich getragen durch ortsständige Makrophagen, die Mikroglia, und hämatogen eingewanderte Makrophagen ist eine wichtige Komponente in der subakuten Phase nach einer ZNS Läsion. Neben einer inflammatorischen und weiter destruktiven Aktivität sind auch reparative und neuroregenerative Eigenschaften der inflammatorischen Antwort in den Fokus gerückt. Das vollständige Verständnis der postischämischen Immunantwort ist der Schlüssel für das Verständnis von Erfolg und Versagen der postischämischen Reparaturmechanismen. Während die technischen Fortschritte der Antikörpertherapie und die wachsenden Möglichkeiten der Genom-Editierung gezielte Eingriffe in die inflammatorische Antwort in greifbare Nähe rücken, kommt der Aufklärung der inflammatorischen Vorgänge nach Ischämie eine essentielle Bedeutung zu. Die vorliegende Arbeit leistet einen Beitrag für die Aufklärung von Gemeinsamkeiten und Unterschiede der Neuroinflammation zwischen zerebralem und spinalem Insult. Da sich das Rückenmark überwiegend aus myelinisierten Axonen zusammensetzt (weiße Substanz), der zerebrale Kortex jedoch mit vielen Nervenzellen und weniger Myelinscheiden die graue Substanz darstellt, ist der hier angestellte Vergleich auch ein guter Ausgangspunkt für die Untersuchung der unterschiedlichen Charakteristika der Neuroinflammation und Reparatur in grauer und weißer Substanz.

Kernstück dieser Arbeit stellt die von unserer Arbeitsgruppe etablierte Methode der Induktion vergleichbarer Läsionen in grauer- (Cortex) und weißer Substanz (Rückenmark) via Photothrombose dar. Ein auf dem gleichen Pathomechanismus beruhender Vergleich der postischämischen Immunantwort in grauer- und weißer Substanz ist mit den verwendeten Methoden erstmals möglich. Wir konnten in dem Vergleichsmodell erstmals zeigen, dass bei gleichem Schädigungsmechanismus die postischämische Immunantwort spinal zu einem größeren Anteil als zerebral auf hämatogen eingewanderte Monozyten/Makrophagen und Granulozyten beruht und zerebral zu einem

höheren Anteil auf einer mikroglialen Immunantwort (siehe Abschnitt 3.4). Gleichzeitig ist die resultierende inflammatorische Antwort nach der Ischämie in beiden Geweben auf Transkriptomebene sehr ähnlich, sowohl im Hinblick auf Inflammation als auch in Hinblick auf Reparatur. Dass die Grundlage dieser Erkenntnis die Verwendung des gleichen Pathomechanismus (Photothrombose) für den Vergleich von essentieller Bedeutung ist, zeigt der Vergleich mit der bisher publizierten Literatur. Während die vorliegende Arbeit im Zeitverlauf nach Ischämie ein sehr ähnliches Expressionsmuster bei etablierten inflammatorischen Markern nachweist, konnten im Vergleich zwischen spinalen mechanischen Schädigungsmodellen und zerebralen Ischämie-Modellen unterschiedliche Expressionsmuster ermittelt werden. Dies gilt für den Tumornekrosefaktor-alpha, das CD-Antigen 32, 86 und 206 sowie für den *Transforming growth factors-β 1* (Liu et al., 1994; Pineau und Lacroix, 2007; Hu et al., 2012; Kigerl et al., 2009 und McTigue et al., 1999). Eine interessante Ausnahme stellt die induzierbare Stickstoffmonoxidsynthetase (iNOS) dar, die in dieser Arbeit quantifizierten Mengen iNOS-mRNA zeigen sowohl nach spinaler Photothrombose als auch nach spinaler mechanischer Schädigung ihren Höchststand am dritten Tag nach Ereignis (Kigerl et al., 2009).

Im Jahre 1999 lieferte die Arbeitsgruppe um Schnell und Kollegen der Universität Zürich den ersten Vergleich der Immunantwort nach gleichgearteter Schädigung von Gehirn und Rückenmark (Schnell et al., 1999). Ebenso wie in dieser Arbeit konnte der Nachweis einer stärkeren Invasion neutrophiler Granulozyten und Lymphozyten nach spinaler Schädigung erbracht werden (Schnell et al., 1999 und Abbildung 10, B, ii und Abbildung 11). Auch die Menge aktivierter astrozytärer Zellen ist im direkten Vergleich beider Modelle sowohl in dieser Arbeit als auch bei Schnell und Kollegen nach spinaler Schädigung signifikant höher (Schnell et al., 1999 und Abbildung 7 und 20).

Interessanterweise deckte die Transkriptomanalyse eine höhere Expression von Genen, die mit Myelinisierung assoziiert sind, nach Ischämie des zerebralen Kortex im Vergleich zur spinalen Ischämie auf.

Einen ähnlichen Befund konnte Chang et al. (Chang et al., 2012) in Hirngewebe von 22 an Multipler Sklerose verstorbenen Menschen erheben. Die Remyelinisierungsaktivität der Oligodendrozyten war in der grauen Substanz

stärker als in weißer Substanz. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Ergebnissen aus der Microarrayanalyse in dieser Arbeit, mit einer gemessenen Heraufregulation myelinisierungsspezifischer Gene nach zerebraler Ischämie und einer Herabregulation nach spinalem Infarkt ereignis (siehe 3.7.4). Eine mögliche Erklärung ist die erhöhte Astrozytenaktivität und die stärkere Expression von extrazellulären Matrixproteinen in Läsionen in der weißen Substanz (siehe Abschnitt 3.4) beides Faktoren die bekanntermaßen die Remyelinisierung behindern. Interessanterweise zeigte sich auf mRNA-Ebene eine stärkere Heraufregulation von GFAP zerebral als spinal (siehe 3.7.5). Diese Differenz zwischen mRNA und Proteinebene ist nicht abschließend geklärt.

Eine andere Erklärung für die unterschiedliche Regulation myelinisierungsspezifischer Gene könnte auch die FACS-analytisch von uns festgestellte unterschiedliche Anzahl monozytärer und mikroglialer Zellen sein.

4.1 Mikroglia und Remyelinisierung

Die Mikroglia sind die ortsständigen Makrophagen des zentralen Nervensystems. Im Falle einer Zellschädigung wie beispielsweise nach ischämischem Ereignis wird sie aktiviert und besitzt schädigende Eigenschaften (beispielsweise durch die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies über die NADPH-Oxidase 1 und 2 (Ma et al., 2017), die Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen wie TNF-alpha. Korrespondierend konnten bei reduzierter Mikrogliaaktivität kleinere Infarkte gemessen werden (Sun et al., 2015).

Die für die postischämische Remyelinisierung entscheidenden Zellpopulationen sind Oligodendrozyten (die myelinproduzierenden Zellen des zentralen Nervensystems) und oligodendrozytäre Vorläuferzellen (englisch: *Oligodendrocyte progenitor cells*, abgekürzt: OPC's). In der Literatur finden zahlreiche Nachweise einer Interaktion zwischen Mikroglia und Oligodendrozyten. Die stoffwechselaktiven Oligodendrozyten und OPC's reagieren empfindlich auf die zuvor beschriebene mikrogliale inflammatorische Immunantwort. Exemplarisch konnte nach intrazerebraler Injektion von Lipopolysacchariden eine im Tiermodell gemessene hohe Konzentration inflammatorischer Zytokine und Chemokine (insbesondere TNF-alpha, IL1-beta und IL-6) auf aktivierte Mikroglia/Makrophagen zurückgeführt werden,

einhergehend mit einer verminderten Myelinisierung (Pang et al., 2002). Der Tumornekrosefaktor- α induziert mit anderen proinflammatorischen Zytokinen (wie Interferon- γ oder IL-1 β) die induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (abgekürzt: iNOS), welche via L-Arginin Stickstoffmonoxid (eine reaktive Sauerstoffspezies) produziert. Die Expression der iNOS durch Mikroglia und die damit einhergehende Produktion von Stickstoffmonoxid steht im direkten Zusammenhang mit einem oligodendrozytären Zelltod (Merrill et al., 1993). In der hier vorliegenden Arbeit konnte via real-time quantitativer PCR eine stärkere Expression der induzierbaren Stickstoffmonoxidsynthase spinal als zerebral bis drei Tage nach Infarkt ereignis gemessen werden (mit signifikant höherer Expression an Tag 3). Ab Tag 7 nach Infarkt ereignis glich sich der gemessene mRNA-Anteil an. Diese Ergebnisse decken sich mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen welche mit immunhistochemischen Nachweisen (Iadecola et al., 1996) und Transkriptomanalysen (Kigerl et al., 2009) die postischämische Immunantwort untersuchten. Interessanterweise ist die Mikroglia neben Astrozyten nicht die einzige Zellpopulation welche iNOS exprimiert. Merrill et al., konnten 1997 zeigen, dass auch Oligodendrozyten iNOS exprimieren und gibt damit einen Hinweis auf die hohe Komplexität der postischämischen Immunantwort.

Auf der anderen Seite sind auch protektive Eigenschaften der Mikroglia beschrieben worden, korrespondierend mit größeren Infarkten bei reduzierter Mikroglia proliferation (Lalancette-Hebert et al., 2012, Jayaraj et al., 2019).

So konnten Olah et al. 2012 im Zeitverlauf zwischen via Cuprizone induzierter toxischer Demyelinisierung und anschließender Remyelinisierung in einer Microarrayanalyse die Expression mikroglialer Gene detektieren, welche die Remyelinisierung fördern. Die detektierten Gene kodieren zum einen für die Phagozytosefunktion der Mikroglia (beispielsweise Lrp1, Calr, CD14, Itgb2) und zum anderen für Proteine welche die Rekrutierung von OPC's und die trophische Versorgung von Oligodendrozyten gewährleisten (Cxcl10, Cxcl13, Igf1 und Tgfb1). Somit konnte neben der zuvor charakterisierten inflammatorisch-schädigenden Eigenschaft auf Oligodendrozyten und ihren Vorläuferzellen, der Nachweis eines für die Remyelinisierung protektiven Mikroglia profils erbracht

werden. Unter der Vorstellung einer Bedeutung der stärkeren Mikroglia-Präsenz nach zerebraler Ischämie für die höhere Expression von Myelinisierungsgenen könnte der Aspekt einer myelinisierungsfördernden Mikroglia eine übergeordnete Rolle spielen.

Weitere Versuche mit Mikroglia-Depletion werden in dieser Hinsicht Aufschluss geben.

4.2 Der Einfluss hämatogener Monozyten/Makrophagen

Auch nach einer Ischämie hämatogen eingewanderte Makrophagen sind in letzter Zeit als wesentliche Faktoren der Reparatur nach einer zerebralen Ischämie identifiziert worden. So konnten Gliem et al., 2012 in einem Modell mit via Clodronat induzierter Depletion hämatogener Monozyten/Makrophagen eine signifikant erhöhte Menge intrazerebraler Hämorrhagie nachweisen (Gliem et al., 2012) und somit die Bedeutung der hämatogen einwandernden Makrophagen für den Wiederaufbau der Blut-Hirn-Schranke belegen. Als möglicher Mechanismus konnte die Sekretion von Osteopontin durch hämatogene Monozyten/Makrophagen und eine damit einhergehende Polarisierung astrozytärer Zellausläufer mit einer konsekutiv reparierten Bluthirnschranke identifiziert werden (Gliem et al., 2015). Hämatogene Makrophagen scheinen also einen bedeutenden Beitrag zum Aufbau der glialen und fibrösen Narbe beizutragen. Während die fibröse Narbe einen inhibierenden Einfluss auf Remyelinisierungsprozesse zeigt (Yahn et al., 2020), tragen aktivierte Astrozyten zur Proliferation und zum Überleben von Oligodendrozyten bei (Li et al., 2016).

4.3. Kritische Betrachtung

Wie im Methodikteil erläutert besteht ein Unterschied zwischen den beiden Infarktmodellen im unumgänglich zeitlich höheren Arbeitsaufwand für die spinale Intervention, einhergehend mit einer längeren inhalativen Narkose via Isofluran. Von Relevanz für die erhobenen Ergebnisse kann dieser Umstand insofern sein, als dass eine Arbeitsgruppe aus China nach Isofluranprekonditionierung neuroprotektive Eigenschaften feststellen konnten, ausgelöst durch eine supprimierte mikrogliale Aktivierung nach Ischämie (Meiyan et al., 2015). Zukünftige Untersuchungen sollten diesen Umstand berücksichtigen und

beispielsweise intravenöse oder intraperitoneale Anästhesieverfahren in Erwägung ziehen.

Letztlich handelt es sich in dieser Arbeit um den breiten Vergleich verschiedener Messungen von mRNA, Zelltypen und exprimierten Genen zwischen zerebraler und spinaler Ischämie. Um die genauen Interaktionen zwischen Zelltypen und deren Genexpressionsmuster zu gewährleisten, sind gezielte Knock-Out-Versuche mit noch gezielteren Transkriptomanalysen von Notwendigkeit.

4.4 Ausblick

Die vorliegende Arbeit erbringt den Nachweis einer zerebral Mikroglia-dominierten und spinal Makrophagen- und Granulozyten-dominierten, letztendlich auf Transkriptomebene jedoch weitgehend ähnlichen postischämischen Inflammation im zerebralen Kortex und im Rückenmark. Dieser Befund wird unterstützt von der klinischen Praxis, die in der Behandlung eines zerebralen und spinalen Herdes einer entzündlichen Erkrankung keinen Unterschied macht. Dennoch gibt es Teilaspekte (s. Myelinisierung), die auf dem Gebiet der Regeneration einer differenzierteren Betrachtung bedürfen. Untersuchungen auf dem Feld der Remyelinisierung werden an diese Arbeit angeschlossen.

Schlussendlich ergibt sich die Frage, ob die postischämische Immunantwort suffizient medikamentös beeinflusst werden kann, um Einfluss auf die unterschiedliche Remyelinisierungskapazität zu nehmen. Auf experimenteller Ebene führte die Gabe von Pioglitazon (einem PPAR γ -Rezeptor-Agonist) in Abhängigkeit von vorhanden knochenmarkstämmigen Monozyten/Makrophagen zu einer signifikant geringeren Menge sekundärer intrazerebraler Hämorrhagien nach Infarkt ereignis (Gliem et al., 2015). Aus einem Tiermodell existieren Daten aus Großbritannien für den Einsatz eines Pan-Chemokinhinhibitor mit dem Namen „NR58-3.14.3“, unter dessen Einsatz nach zerebraler Ischämie um mehr als fünfzig Prozent kleinere Infarktdurchmesser gemessen wurden (Beech et al., 2001). Weitere Untersuchungen zu diesem Reagent stehen aus. Auf der Ebene von klinischen Studien erhielt insbesondere Minocyclin große Aufmerksamkeit, welches die mikrogliale Zellantwort inhibiert. Während zwei offene

placebokontrollierte Phase zwei Studien die Sicherheit und Effektivität hinsichtlich eines besseren klinischen Outcomes von Minocyclin nachweisen konnten (Srivastava et al., 2012 und Lampl et al., 2012), zeigte eine Metaanalyse von Kohler et al., 2013 keine Effektivität für einen verbessertes klinisches Outcome. Genaue Betrachtungen der medikamentösen Therapien auf die Transkription myelinisierungsspezifischer Gene fehlen und müssen durch zukünftige Arbeiten nachgeliefert werden.

Schlussendlich verbleibt die Identifikation relevanter therapeutischer Angriffspunkte Aufgabe zukünftiger Grundlagenarbeiten aus der experimentellen Neurowissenschaft.

5 Literatur und Quellenverzeichnis

Abdul-Majid, K. B., et al. (2002). "Fc receptors are critical for autoimmune inflammatory damage to the central nervous system in experimental autoimmune encephalomyelitis." Scandinavian journal of immunology **55**(1): 70-81.

Ajami, B., et al. (2011). "Infiltrating monocytes trigger EAE progression, but do not contribute to the resident microglia pool." Nat Neurosci **14**(9): 1142-1149.

Amiri-Nikpour, M. R., et al. (2015). "An open-label evaluator-blinded clinical study of minocycline neuroprotection in ischemic stroke: gender-dependent effect." Acta Neurol Scand **131**(1): 45-50.

Anania, J. C., et al. (2019). "The human FcγRII (CD32) family of leukocyte FcR in health and disease." Front Immunol **10**: 464.

Aquino, D. A., et al. (1988). "Glial fibrillary acidic protein increases in the spinal cord of Lewis rats with acute experimental autoimmune encephalomyelitis." J Neurochem **51**(4): 1085-1096.

Arnett, H. A., et al. (2001). "TNFα promotes proliferation of oligodendrocyte progenitors and remyelination." Nat Neurosci **4**(11): 1116-1122.

Arnold, L., et al. (2007). "Inflammatory monocytes recruited after skeletal muscle injury switch into antiinflammatory macrophages to support myogenesis." J Exp Med **204**(5): 1057-1069.

Bangham, A. D. and R. W. Horne (1964). "Negative staining of phospholipids and their modification by surface-active agents as observed in the electron microscope." J Mol Biol **8**: 660-668.

Banisadr, G., et al. (2002). "Distribution, cellular localization and functional role of CCR2 chemokine receptors in adult rat brain." J Neurochem **81**.

Batchelor, P. E., et al. (2008). "Comparison of inflammation in the brain and spinal cord following mechanical injury." J Neurotrauma **25**(10): 1217-1225.

Bauer, J., et al. (1995). "The role of macrophages, perivascular cells, and microglial cells in the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis." Glia **15**(4): 437-446.

Baumgarth, N. and M. Roederer (2000). "A practical approach to multicolor flow cytometry for immunophenotyping." J Immunol Methods **243**.

Beech, J. S., et al. (2001). "Neuroprotection in ischemia–reperfusion injury: an antiinflammatory approach using a novel broad-spectrum chemokine inhibitor." Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism **21**(6): 683-689.

- Bellver-Landete, V., et al. (2019). "Microglia are an essential component of the neuroprotective scar that forms after spinal cord injury." Nat Commun **10**(1): 518.
- Bennett, M. L., et al. (2016). "New tools for studying microglia in the mouse and human CNS." Proc Natl Acad Sci **113**.
- Berkhemer, O. A., et al. (2015). "A randomized trial of intraarterial treatment for acute ischemic stroke." N Engl J Med **372**: 11-20.
- Berkhemer, O. A., et al. (2015). "A randomized trial of intraarterial treatment for acute ischemic stroke." N Engl J Med **372**: 11-20.
- Biburger, M., et al. (2011). "Monocyte subsets responsible for immunoglobulin G-dependent effector functions in vivo." Immunity **35**(6): 932-944.
- Boddeke, E. W. G. M., et al. (1999). "Cultured rat microglia express functional β -chemokine receptors." J Neuroimmunol **98**.
- Bolstad, B. M., et al. (2003). "A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias." Bioinformatics **19**(2): 185-193.
- Bowman, R. L., et al. (2016). "Macrophage ontogeny underlies differences in tumor-specific education in brain malignancies." Cell Rep **17**.
- Brahmachari, S., et al. (2006). "Induction of Glial Fibrillary Acidic Protein Expression in Astrocytes by Nitric Oxide." The Journal of Neuroscience **26**(18): 4930-4939.
- Brandenburg, S., et al. (2016). "Resident microglia rather than peripheral macrophages promote vascularization in brain tumors and are source of alternative pro-angiogenic factors." Acta Neuropathol **131**.
- Butovsky, O., et al. (2014). "Identification of a unique TGF-beta-dependent molecular and functional signature in microglia." Nat Neurosci **17**(1): 131-143.
- Cardona, A. E., et al. (2006). "Isolation of murine microglial cells for RNA analysis or flow cytometry." Nat Protoc **1**.
- Cardona, A. E., et al. (2006). "Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor." Nat Neurosci **9**(7): 917-924.
- Campbell, B. C., et al. (2015). "Endovascular therapy for ischemic stroke with perfusion-imaging selection." New England Journal of Medicine **372**(11): 1009-1018.
- Chang, A., et al. (2012). "Cortical remyelination: a new target for repair therapies in multiple sclerosis." Ann Neurol **72**(6): 918-926.
- Chao, C. C., et al. (1995). "Interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha synergistically mediate neurotoxicity: involvement of nitric oxide and of N-methyl-D-aspartate receptors." Brain Behav Immun **9**(4): 355-365.

- Chen, Y., et al. (2014). "Targeting microglial activation in stroke therapy: pharmacological tools and gender effects." Current medicinal chemistry **21**(19): 2146-2155.
- Chen, Z., et al. (2017). "Cellular and molecular identity of tumor-associated macrophages in glioblastoma." Cancer Res **77**.
- Chirgwin, J. M., et al. (1979). "Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease." Biochemistry **18**(24): 5294-5299.
- Chistiakov, D. A., et al. (2017). "CD68/macrosialin: not just a histochemical marker." Lab Invest **97**(1): 4-13.
- Chiu, I. M., et al. (2013). "A neurodegeneration-specific gene-expression signature of acutely isolated microglia from an amyotrophic lateral sclerosis mouse model." Cell Rep **4**.
- Chu, H. X., et al. (2015). "Evidence that Ly6Chi monocytes are protective in acute ischemic stroke by promoting M2 macrophage polarization." Stroke **46**(7): 1929-1937.
- Courties, G., et al. (2015). "Ischemic stroke activates hematopoietic bone marrow stem cells." Circ Res **116**(3): 407-417.
- Cox, J. and M. Mann (2008). "MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification." Nat Biotechnol **26**.
- Davalos, D., et al. (2005). "ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo." Nat Neurosci **8**(6): 752-758.
- David, S. and A. Kroner (2011). "Repertoire of microglial and macrophage responses after spinal cord injury." Nature Reviews Neuroscience **12**(7): 388.
- David, S., et al. (2018). "Myeloid cell responses after spinal cord injury." J Neuroimmunol **321**: 97-108.
- Davies, C. L., et al. (2019). "Myeloid cell and transcriptome signatures associated with inflammation resolution in a model of self-limiting acute brain inflammation." Front Immunol **10**: 1048.
- De Godoy, I., et al. (1996). "Elevated TNF-alpha production by peripheral blood monocytes of weight-losing COPD patients." American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine **153**(2): 633-637.
- Deshmane, S. L., et al. (2009). "Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview." J Interferon Cytokine Res **29**(6): 313-326.
- Dewar, D., et al. (2003). "Oligodendrocytes and ischemic brain injury." Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism **23**(3): 263-274.

- Dimitrijevic, O. B., et al. (2007). "Absence of the chemokine receptor CCR2 protects against cerebral ischemia/reperfusion injury in mice." Stroke **38**(4): 1345-1353.
- Donnelly, D. J. and P. G. Popovich (2008). "Inflammation and its role in neuroprotection, axonal regeneration and functional recovery after spinal cord injury." Exp Neurol **209**(2): 378-388.
- Duffield, J. S., et al. (2005). "Selective depletion of macrophages reveals distinct, opposing roles during liver injury and repair." J Clin Invest **115**(1): 56-65.
- Dugue, R., et al. (2017). "Roles of pro-and anti-inflammatory cytokines in traumatic brain injury and acute ischemic stroke." Mechanisms of neuroinflammation. London: IntechOpen: 211-261.
- Eng, L. F. (1985). "Glial fibrillary acidic protein (GFAP): the major protein of glial intermediate filaments in differentiated astrocytes." Journal of Neuroimmunology **8**: 203-214.
- Fedorcsák, I. E., L. (1966). "Effects of Diethyl Polycarbonate and Methyl Methanesulfonate on Nucleic Acids and Nucleases " Acta Chemica Scandinavica **20**: 107-112.
- Fernández-Castañeda, A., et al. (2020). "The active contribution of OPCs to neuroinflammation is mediated by LRP1." Acta neuropathologica **139**(2): 365-382.
- Ford, A. L., et al. (1995). "Normal adult ramified microglia separated from other central nervous system macrophages by flow cytometric sorting: phenotypic differences defined and direct ex vivo antigen presentation to myelin basic protein-reactive CD4+ T cells compared." J Immunol **154**.
- Galloway, D. A., et al. (2019). "Phagocytosis in the Brain: Homeostasis and Disease." Front Immunol **10**: 790.
- Gandin, E., et al. (1983). "QUANTUM YIELD OF SINGLET OXYGEN PRODUCTION BY XANTHENE DERIVATIVES." Photochemistry and Photobiology **37**(3): 271-278.
- Gautier, E. L., et al. (2012). "Gene-expression profiles and transcriptional regulatory pathways that underlie the identity and diversity of mouse tissue macrophages." Nat Immunol **13**.
- Geissmann, F., et al. (2003). "Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties." Immunity **19**(1): 71-82.
- Geissmann, F., et al. (2010). "Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells." Science **327**(5966): 656-661.

Gelderblom, M., et al. (2009). "Temporal and spatial dynamics of cerebral immune cell accumulation in stroke." *Stroke* **40**(5): 1849-1857.

Ginhoux, F., et al. (2010). "Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages." *Science* **330**(6005): 841-845.

Giulian, D., et al. (1988). "Interleukin-1 injected into mammalian brain stimulates astrogliosis and neovascularization." *The Journal of Neuroscience* **8**(7): 2485-2490.

Giulian, D. and C. Robertson (1990). "Inhibition of mononuclear phagocytes reduces ischemic injury in the spinal cord." *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society* **27**(1): 33-42.

Gliem, M., et al. (2012). "Macrophages prevent hemorrhagic infarct transformation in murine stroke models." *Ann Neurol* **71**(6): 743-752.

Gliem, M., et al. (2015). "Hyperglycemia and PPARgamma Antagonistically Influence Macrophage Polarization and Infarct Healing After Ischemic Stroke." *Stroke* **46**(10): 2935-2942.

Gliem, M., et al. (2015). "Macrophage-derived osteopontin induces reactive astrocyte polarization and promotes re-establishment of the blood brain barrier after ischemic stroke." *Glia* **63**(12): 2198-2207.

Gliem, M., et al. (2016). "Protective features of peripheral monocytes/macrophages in stroke." *Biochim Biophys Acta* **1862**(3): 329-338.

Gomez Perdiguero, E., et al. (2013). "Development and homeostasis of "resident" myeloid cells: the case of the microglia." *Glia* **61**.

Govindan, R., et al. (2012). "Genomic landscape of non-small cell lung cancer in smokers and never-smokers." *Cell* **150**.

Greenhalgh, A. D., et al. (2016). "Arginase-1 is expressed exclusively by infiltrating myeloid cells in CNS injury and disease." *Brain Behav Immun* **56**: 61-67.

Gregoriadis, G. (1988). "Liposomes as a drug delivery system: optimization studies." *Adv Exp Med Biol* **238**: 151-159.

Grishagin, I. V. (2015). "Automatic cell counting with ImageJ." *Anal Biochem* **473**: 63-65.

Grotendorst, G. R., et al. (1989). "Production of transforming growth factor beta by human peripheral blood monocytes and neutrophils." *Journal of cellular physiology* **140**(2): 396-402.

Guesdon, J. L., et al. (1979). "The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques." Journal of Histochemistry & Cytochemistry **27**(8): 1131-1139.

Haage, V., et al. (2019). "Comprehensive gene expression meta-analysis identifies signature genes that distinguish microglia from peripheral monocytes/macrophages in health and glioma." Acta Neuropathologica Communications **7**(1): 20.

Hacke, W., et al. (2008). "Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke." New England Journal of Medicine **359**(13): 1317-1329.

Hambardzumyan, D., et al. (2009). "Modeling adult gliomas using RCAS/t-va technology." Transl Oncol **2**.

Heiss, W. D. (1992). "Experimental evidence of ischemic thresholds and functional recovery." Stroke **23**(11): 1668-1672.

Henrich-Noack, P., et al. (1996). "TGF-beta 1 protects hippocampal neurons against degeneration caused by transient global ischemia. Dose-response relationship and potential neuroprotective mechanisms." Stroke **27**(9): 1609-1614; discussion 1615.

Herrmann, K. S. (1983). "Platelet aggregation induced in the hamster cheek pouch by a photochemical process with excited fluorescein isothiocyanate-dextran." Microvasc Res **26**(2): 238-249.

Heuschmann, P. U., et al. (2010). "Schlaganfallhäufigkeit und versorgung von schlaganfallpatienten in deutschland." Aktuelle Neurologie **37**(07): 333-340.

Hewett, S. J., et al. (1994). "Selective potentiation of NMDA-induced neuronal injury following induction of astrocytic iNOS." Neuron **13**(2): 487-494.

Hickman, S. E., et al. (2013). "The microglial sensome revealed by direct RNA sequencing." Nat Neurosci **16**.

Hilgendorf, I., et al. (2014). "Ly-6Chigh monocytes depend on Nr4a1 to balance both inflammatory and reparative phases in the infarcted myocardium." Circ Res **114**(10): 1611-1622.

Hirbec, H., et al. (2018). "The microglial reaction signature revealed by RNAseq from individual mice." Glia **66**.

Holness, C. and D. Simmons (1993). "Molecular cloning of CD68, a human macrophage marker related to lysosomal glycoproteins." Blood **81**(6): 1607-1613.

Holness CL, da Silva RP, Fawcett J, Gordon S, Simmons DL. (1993). Macrosialin, a mouse macrophage-restricted glycoprotein, is a member of the lamp/lgp family. J Biol Chem. .

Hristovska, I. and O. Pascual (2015). "Deciphering Resting Microglial Morphology and Process Motility from a Synaptic Prospect." Front Integr Neurosci **9**: 73.

Hu, X., et al. (2012). "Microglia/macrophage polarization dynamics reveal novel mechanism of injury expansion after focal cerebral ischemia." Stroke **43**(11): 3063-3070

Hughes, P. M., et al. (2002). "Monocyte chemoattractant protein-1 deficiency is protective in a murine stroke model." J Cereb Blood Flow Metab **22**(3): 308-317.
Iadecola, C. and J. Anrather (2011). "The immunology of stroke: from mechanisms to translation." Nat Med **17**(7): 796-808.

Imai, T., et al. (1997). "Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX3CR1, which mediates both leukocyte migration and adhesion." Cell **91**.

Ito, M., et al. (2019). "Brain regulatory T cells suppress astrogliosis and potentiate neurological recovery." Nature **565**(7738): 246-250.

Jayaraj, R. L., et al. (2019). "Neuroinflammation: friend and foe for ischemic stroke." J Neuroinflammation **16**(1): 142.

Jeong, H.-K., et al. (2013). "Brain inflammation and microglia: facts and misconceptions." Exp Neurobiol **22**(2): 59-67.

Jeong, H. K., et al. (2013). "Brain inflammation and microglia: facts and misconceptions." Exp Neurobiol **22**(2): 59-67.

Jin, R., et al. (2010). "Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: role of inflammatory cells." J Leukoc Biol **87**(5): 779-789.

Jordão, M. J. C., et al. (2019). "Single-cell profiling identifies myeloid cell subsets with distinct fates during neuroinflammation." Science **363**(6425): eaat7554.

Jung, S., et al. (2000). "Analysis of Fractalkine receptor CX3CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion." Mol Cell Biol **20**.

Kakuda, D. K., et al. (1999). "CAT2-mediated L-arginine transport and nitric oxide production in activated macrophages." Biochem J **340** (Pt 2): 549-553.

Kanashova, T., et al. (2015). "Differential proteomic analysis of mouse macrophages exposed to adsorbate-loaded heavy fuel oil derived combustion particles using an automated sample-preparation workflow aerosols and health." Anal Bioanal Chem **407**.

Káradóttir, R., et al. (2005). "NMDA receptors are expressed in oligodendrocytes and activated in ischaemia." Nature **438**(7071): 1162-1166.

- Keren-Shaul, H., et al. (2017). "A unique microglia type associated with restricting development of Alzheimer's disease." Cell **169**.
- Khare, P., et al. (2018). "Myelin oligodendrocyte glycoprotein-specific antibodies from multiple sclerosis patients exacerbate disease in a humanized mouse model." Journal of Autoimmunity **86**: 104-115.
- Kigerl, K. A., et al. (2009). "Identification of two distinct macrophage subsets with divergent effects causing either neurotoxicity or regeneration in the injured mouse spinal cord." J Neurosci **29**(43): 13435-13444.
- Kim, J. Y., et al. (2016). "Inflammation after Ischemic Stroke: The Role of Leukocytes and Glial Cells." Exp Neurobiol **25**(5): 241-251.
- Kohler, E., et al. (2013). "Intravenous minocycline in acute stroke: a randomized, controlled pilot study and meta-analysis." Stroke **44**(9): 2493-2499.
- Kolominsky-Rabas, P. L., et al. (2006). "Lifetime cost of ischemic stroke in Germany: results and national projections from a population-based stroke registry: the Erlangen Stroke Project." Stroke **37**(5): 1179-1183.
- Konishi, H., et al. (2017). "Siglec-H is a microglia-specific marker that discriminates microglia from CNS-associated macrophages and CNS-infiltrating monocytes." Glia **65**.
- Lalancette-Hebert, M., et al. (2012). "Galectin-3 is required for resident microglia activation and proliferation in response to ischemic injury." J Neurosci **32**(30): 10383-10395.
- Lambertsen, K. L., et al. (2019). "Post-stroke inflammation-target or tool for therapy?" Acta Neuropathol **137**(5): 693-714.
- Lampl, Y., et al. (2007). "Minocycline treatment in acute stroke: an open-label, evaluator-blinded study." Neurology **69**(14): 1404-1410.
- Landsman, L., et al. (2009). "CX3CR1 is required for monocyte homeostasis and atherogenesis by promoting cell survival." Blood **113**(4): 963-972.
- Lee, P. Y., et al. (2013). "Ly6 family proteins in neutrophil biology." J Leukoc Biol **94**(4): 585-594.
- Lee, Y., et al. (2014). "Therapeutically targeting neuroinflammation and microglia after acute ischemic stroke." Biomed Res Int **2014**: 297241.
- Li, J., et al. (2008). "Tumor necrosis factor α mediates lipopolysaccharide-induced microglial toxicity to developing oligodendrocytes when astrocytes are present." Journal of Neuroscience **28**(20): 5321-5330.
- Li, J., et al. (2016). "Astrocytes in oligodendrocyte lineage development and white matter pathology." Frontiers in cellular neuroscience **10**: 119.

- Liang, D., et al. (2007). "Cytotoxic edema: mechanisms of pathological cell swelling." Neurosurg Focus **22**(5): E2.
- Licinio, J., et al. (1999). "Brain iNOS: current understanding and clinical implications." Mol Med Today **5**(5): 225-232.
- Liedtke, W., et al. (1996). "GFAP Is Necessary for the Integrity of CNS White Matter Architecture and Long-Term Maintenance of Myelination." Neuron **17**(4): 607-615.
- Lim, S. W., et al. (2013). "Microglial activation induced by traumatic brain injury is suppressed by postinjury treatment with hyperbaric oxygen therapy." J Surg Res **184**(2): 1076-1084.
- Liska, G. M., et al. (2018). "A Dual Role for Hyperbaric Oxygen in Stroke Neuroprotection: Preconditioning of the Brain and Stem Cells." Cond Med **1**(4): 151-166.
- Liu, T., et al. (1994). "Tumor necrosis factor-alpha expression in ischemic neurons." Stroke **25**(7): 1481-1488.
- Lu, H., et al. (2011). "Macrophages recruited via CCR2 produce insulin-like growth factor-1 to repair acute skeletal muscle injury." Faseb j **25**(1): 358-369.
- Lucas, T., et al. (2010). "Differential roles of macrophages in diverse phases of skin repair." J Immunol **184**(7): 3964-3977.
- Ma, M. W., et al. (2017). "NADPH oxidase in brain injury and neurodegenerative disorders." Molecular neurodegeneration **12**(1): 7.
- Malone, K., et al. (2019). "Immunomodulatory therapeutic strategies in stroke." Frontiers in pharmacology **10**: 630.
- Mardis, E. R., et al. (2009). "Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome." N Engl J Med **361**.
- Marques, C. P., et al. (2008). "Microglia are the major cellular source of inducible nitric oxide synthase during experimental herpes encephalitis." J Neurovirol **14**(3): 229-238.
- Marsh, B. J., et al. (2009). "Toll-like receptor signaling in endogenous neuroprotection and stroke." Neuroscience **158**(3): 1007-1020.
- Matsumoto, S., et al. (2003). "The temporal profile of the reaction of microglia, astrocytes, and macrophages in the delayed onset paraplegia after transient spinal cord ischemia in rabbits." Anesth Analg **96**(6): 1777-1784, table of contents.
- Mawhinney, L. A., et al. (2012). "Differential detection and distribution of microglial and hematogenous macrophage populations in the injured spinal cord

of lys-EGFP-ki transgenic mice." Journal of Neuropathology & Experimental Neurology **71**(3): 180-197.

McKinnon, R. D., et al. (1993). "A role for TGF-beta in oligodendrocyte differentiation." The Journal of cell biology **121**(6): 1397-1407.

McTigue, D. M., et al. (2000). "Localization of transforming growth factor- β 1 and receptor mRNA after experimental spinal cord injury." Exp Neurol **163**(1): 220-230.

Melani, A., et al. (2005). "ATP extracellular concentrations are increased in the rat striatum during in vivo ischemia." Neurochem Int **47**(6): 442-448.

Meller, R., et al. (2005). "Neuroprotection by Osteopontin in Stroke." Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism **25**(2): 217-225.

Merrill, J., et al. (1993). "Microglial cell cytotoxicity of oligodendrocytes is mediated through nitric oxide." The Journal of Immunology **151**(4): 2132-2141.

Merrill, J. E., et al. (1997). "Inducible nitric oxide synthase and nitric oxide production by oligodendrocytes." Journal of neuroscience research **48**(4): 372-384.

Michinaga, S. and Y. Koyama (2015). "Pathogenesis of brain edema and investigation into anti-edema drugs." International journal of molecular sciences **16**(5): 9949-9975.

Middeldorp, J. and E. M. Hol (2011). "GFAP in health and disease." Prog Neurobiol **93**(3): 421-443.

Mildner, A., et al. (2007). "Microglia in the adult brain arise from Ly-6ChiCCR2+ monocytes only under defined host conditions." Nat Neurosci **10**(12): 1544-1553.
Mirabelli-Badenier, M., et al. (2011). "CC and CXC chemokines are pivotal mediators of cerebral injury in ischaemic stroke." Thrombosis and haemostasis **105**(03): 409-420.

Moore, C. S., et al. (2015). "P2Y12 expression and function in alternatively activated human microglia." Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm **2**(2): e80.

Müller, A., et al. (2015). "Resident microglia, and not peripheral macrophages, are the main source of brain tumor mononuclear cells." Int J Cancer **137**.

Mullis, K. B. and F. A. Faloona (1987). "Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction." Methods Enzymol **155**: 335-350.

Nahrendorf, M., et al. (2007). "The healing myocardium sequentially mobilizes two monocyte subsets with divergent and complementary functions." J Exp Med **204**(12): 3037-3047.

Nicholson, B., et al. (2001). "Sustained nitric oxide production in macrophages requires the arginine transporter CAT2." J Biol Chem **276**(19): 15881-15885.

- Nissl, F. (1894). "Ueber eine neue Untersuchungsmethode des Centralorgans zur Feststellung der Localisation der Nervenzellen." Neurologisches Centralblatt **13**: 507-508.
- Novy, J., et al. (2006). "Spinal cord ischemia: clinical and imaging patterns, pathogenesis, and outcomes in 27 patients." Archives of neurology **63**(8): 1113-1120.
- Odegaard, J. I., et al. (2007). "Macrophage-specific PPAR γ controls alternative activation and improves insulin resistance." Nature **447**(7148): 1116.
- Ogawa, K., et al. (1989). "Distribution of collagen type IV in brain tumors: an immunohistochemical study." J Neurooncol **7**(4): 357-366.
- Olah, M., et al. (2012). "Identification of a microglia phenotype supportive of remyelination." Glia **60**(2): 306-321.
- Pang, Y., et al. (2003). "Disturbance of oligodendrocyte development, hypomyelination and white matter injury in the neonatal rat brain after intracerebral injection of lipopolysaccharide." Developmental Brain Research **140**(2): 205-214.
- Peferoen, L., et al. (2014). "Oligodendrocyte-microglia cross-talk in the central nervous system." Immunology **141**(3): 302-313.
- Pekny, M. and M. Pekna (2004). "Astrocyte intermediate filaments in CNS pathologies and regeneration." The Journal of Pathology **204**(4): 428-437.
- Pineau, I. and S. Lacroix (2007). "Proinflammatory cytokine synthesis in the injured mouse spinal cord: multiphasic expression pattern and identification of the cell types involved." Journal of Comparative Neurology **500**(2): 267-285.
- Piotr Chomczynski, N. S. (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." Analytical Biochemistry **162**(1): 156-159.
- Pocock, J. M. and H. Kettenmann (2007). "Neurotransmitter receptors on microglia." Trends Neurosci **30**(10): 527-535.
- Polfliet, M. M., et al. (2001). "A method for the selective depletion of perivascular and meningeal macrophages in the central nervous system." J Neuroimmunol **116**(2): 188-195.
- Pong, W. W., et al. (2013). "F11R is a novel monocyte prognostic biomarker for malignant glioma." PLoS One **8**.
- Popovich, P. G., et al. (1999). "Depletion of hematogenous macrophages promotes partial hindlimb recovery and neuroanatomical repair after experimental spinal cord injury." Exp Neurol **158**(2): 351-365.

- Prehn, J. H., et al. (1993). "Transforming growth factor- β 1 prevents glutamate neurotoxicity in rat neocortical cultures and protects mouse neocortex from ischemic injury in vivo." Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism **13**(3): 521-525.
- Prinz, M., et al. (2017). "Ontogeny and homeostasis of CNS myeloid cells." Nat Immunol **18**.
- Qureshi, A. I., et al. (2017). "A Population-Based Study of the Incidence of Acute Spinal Cord Infarction." J Vasc Interv Neurol **9**(4): 44-48.
- Rahman, M., et al. (2014). "The β -hydroxybutyrate receptor HCA 2 activates a neuroprotective subset of macrophages." Nat Commun **5**(1): 1-11.
- Ransohoff, R. M. and A. E. Cardona (2010). "The myeloid cells of the central nervous system parenchyma." Nature **468**(7321): 253-262.
- Rappsilber, J., et al. (2007). "Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips." Nat Protoc **2**.
- Renno, T., et al. (1995). "TNF-alpha expression by resident microglia and infiltrating leukocytes in the central nervous system of mice with experimental allergic encephalomyelitis. Regulation by Th1 cytokines." J Immunol **154**(2): 944-953.
- Ringnér, M. (2008). "What is principal component analysis?" Nature biotechnology **26**(3): 303-304.
- Roberts, A., et al. (2011). "Identification of novel transcripts in annotated genomes using RNA-seq." Bioinformatics **27**.
- Rubin, P., et al. (1994). "Disruption of the blood-brain barrier as the primary effect of CNS irradiation." Radiother Oncol **31**(1): 51-60.
- Sacco, R. L., et al. (2013). "An updated definition of stroke for the 21st century: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association." Stroke **44**(7): 2064-2089.
- Sandson, T. A. and J. H. Friedman (1989). "Spinal cord infarction. Report of 8 cases and review of the literature." Medicine (Baltimore) **68**(5): 282-292.
- Saver, J. L., et al. (2015). "Stent-retriever thrombectomy after intravenous t-PA vs. t-PA alone in stroke." New England Journal of Medicine **372**(24): 2285-2295.
- Schmidt-Pogoda, A., et al. (2019). "Immunology of stroke: from animal models to clinical trials." Ther Adv Neurol Disord **12**: 1756286419830862.

- Schnell, L., et al. (1999). "Acute inflammatory responses to mechanical lesions in the CNS: differences between brain and spinal cord." Eur J Neurosci **11**(10): 3648-3658.
- Sedgwick, J. D., et al. (1991). "Isolation and direct characterization of resident microglial cells from the normal and inflamed central nervous system." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(16): 7438-7442.
- Seidenwurm, D. (2008). "Myelopathy." American Journal of Neuroradiology **29**(5): 1032-1034.
- Sela, M., et al. (1957). "The correlation of ribonuclease activity with specific aspects of tertiary structure." Biochim Biophys Acta **26**(3): 502-512.
- Serbina, N. V. and E. G. Pamer (2006). "Monocyte emigration from bone marrow during bacterial infection requires signals mediated by chemokine receptor CCR2." Nat Immunol **7**(3): 311-317.
- Shechter, R., et al. (2013). "Recruitment of beneficial M2 macrophages to injured spinal cord is orchestrated by remote brain choroid plexus." Immunity **38**(3): 555-569.
- Shevchenko, A., et al. (2007). "In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes." Nat Protoc **1**.
- Singh, K., et al. (2016). "The L-Arginine Transporter Solute Carrier Family 7 Member 2 Mediates the Immunopathogenesis of Attaching and Effacing Bacteria." PLoS Pathog **12**(10): e1005984.
- Smith, P. D., et al. (2013). "Preservation of motor function after spinal cord ischemia and reperfusion injury through microglial inhibition." Ann Thorac Surg **95**(5): 1647-1653.
- Smyth, G. K. (2004). "Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments." Stat Appl Genet Mol Biol **3**: Article3.
- Solga, A. C., et al. (2015). "RNA sequencing of tumor-associated microglia reveals Ccl5 as a stromal chemokine critical for Neurofibromatosis-1 glioma growth." Neoplasia **17**.
- Spangenberg, E. E., et al. (2016). "Eliminating microglia in Alzheimer's mice prevents neuronal loss without modulating amyloid-beta pathology." Brain **139**(Pt 4): 1265-1281.
- Stirling, D. P. and V. W. Yong (2008). "Dynamics of the inflammatory response after murine spinal cord injury revealed by flow cytometry." Journal of neuroscience research **86**(9): 1944-1958.
- Srivastava, M. P., et al. (2012). "Efficacy of minocycline in acute ischemic stroke: a single-blinded, placebo-controlled trial." Neurology India **60**(1): 23.

Su, D. and N. Van Rooijen (1989). "The role of macrophages in the immunoadjuvant action of liposomes: effects of elimination of splenic macrophages on the immune response against intravenously injected liposome-associated albumin antigen." Immunology **66**(3): 466-470.

Sun, M., et al. (2015). "Isoflurane preconditioning provides neuroprotection against stroke by regulating the expression of the TLR4 signalling pathway to alleviate microglial activation." Scientific Reports **5**: 11445.

Tataurov, A. V., et al. (2008). "Predicting ultraviolet spectrum of single stranded and double stranded deoxyribonucleic acids." Biophys Chem **133**(1-3): 66-70.

Tator, C. H. and I. Koyanagi (1997). "Vascular mechanisms in the pathophysiology of human spinal cord injury." Journal of neurosurgery **86**(3): 483-492.

Taylor, R. A., et al. (2017). "TGF-beta1 modulates microglial phenotype and promotes recovery after intracerebral hemorrhage." J Clin Invest **127**(1): 280-292.

The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group, 1995 "Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke." New England Journal of Medicine **333**(24): 1581-1588.

Tobinick, E., et al. (2014). "Immediate neurological recovery following perispinal etanercept years after brain injury." Clinical drug investigation **34**(5): 361-366.

Trapnell, C., et al. (2009). "TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq." Bioinformatics **25**.

Trapnell, C., et al. (2013). "Differential analysis of gene regulation at transcript resolution with RNA-seq." Nat Biotechnol **31**.

Tunstall-Pedoe, H. (1988). "The World Health Organization MONICA Project (monitoring trends and determinants in cardiovascular disease): a major international collaboration. WHO MONICA Project Principal Investigators." J Clin Epidemiol **41**(2): 105-114.

van Amerongen, M. J., et al. (2007). "Macrophage depletion impairs wound healing and increases left ventricular remodeling after myocardial injury in mice." Am J Pathol **170**(3): 818-829.

Van Rooijen, N. (1989). "The liposome-mediated macrophage 'suicide' technique." J Immunol Methods **124**(1): 1-6..

Van Rooijen, N. and A. Sanders (1994). "Liposome mediated depletion of macrophages: mechanism of action, preparation of liposomes and applications." J Immunol Methods **174**(1-2): 83-93.

- van Rooijen, N. and R. van Nieuwmegen (1980). "Liposomes in immunology: evidence that their adjuvant effect results from surface exposition of the antigens." Cell Immunol **49**(2): 402-407.
- Veltkamp, R. and D. Gill (2016). "Clinical Trials of Immunomodulation in Ischemic Stroke." Neurotherapeutics **13**(4): 791-800.
- Vuong, S. M., et al. (2016). "Vascular Diseases of the Spinal Cord: Infarction, Hemorrhage, and Venous Congestive Myelopathy." Semin Ultrasound CT MR **37**(5): 466-481.
- Watson, B. D., et al. (1985). "Induction of reproducible brain infarction by photochemically initiated thrombosis." Ann Neurol **17**(5): 497-504.
- Weidauer, S., et al. (2002). "Spinal cord infarction: MR imaging and clinical features in 16 cases." Neuroradiology **44**(10): 851-857.
- Wiessner, C., et al. (1993). "Expression of transforming growth factor- β 1 and interleukin-1 β mRNA in rat brain following transient forebrain ischemia." Acta neuropathologica **86**(5): 439-446.
- Wolf, S. A., et al. (2017). "Microglia in physiology and disease." Annu Rev Physiol **79**.
- Xie, Q. W., et al. (1992). "Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages." Science **256**(5054): 225-228.
- Xiong, X. Y., et al. (2016). "Functions and mechanisms of microglia/macrophages in neuroinflammation and neurogenesis after stroke." Prog Neurobiol **142**: 23-44.
- Xue, J., et al. (2014). "Transcriptome-based network analysis reveals a spectrum model of human macrophage activation." Immunity **40**(2): 274-288.
- Yahn, S. L., et al. (2020). "Fibrotic scar after experimental autoimmune encephalomyelitis inhibits oligodendrocyte differentiation." Neurobiology of Disease **134**: 104674.
- Yona, S., et al. (2013). "Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis." Immunity **38**.
- Zhang, D., et al. (2010). "Astroglia in CNS Pathologies: Is There A Role for Microglia?" Molecular Neurobiology **41**(2 %@ 1559-1182): 232-241.
- Zhang, J., et al. (2007). "Expression of CCR2 in both resident and bone marrow-derived microglia plays a critical role in neuropathic pain." J Neurosci **27**.
- Zhang, Y., et al. (2014). "An RNA-sequencing transcriptome and splicing database of glia, neurons, and vascular cells of the cerebral cortex." J Neurosci **34**.

6. Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Dr. hc. Sven Meuth für die Möglichkeit meine Promotion im neurochemischen Labor des Universitätsklinikums Düsseldorf anfertigen zu dürfen.

Herrn Prof. Dr. med. Jander danke ich gleichermaßen mir die Möglichkeit geboten zu haben meine Promotion unter seiner Obhut durchzuführen.

Herrn PD Dr. med. Gliem danke ich für die hervorragende Betreuung, das Vertrauen und die wertvollen Ratschläge während der gesamten Promotion.

Herrn Dr. rer. nat. Pavic danke ich für die herausragende Zusammenarbeit, die Einarbeitung in das wissenschaftliche Handwerk und für seine enorme Expertise hinsichtlich der Experimente ohne die diese Arbeit niemals zustande gekommen wäre.

Ein besonderer Dank geht an Birgit Blumenkamp, welche mir den Einstieg in die Laborarbeit ermöglicht hat und trotz immenser Arbeitsbelastung zu jedem Wochentag und Uhrzeit für Fragen zur Verfügung stand. Vielen Dank.

In tiefster Verbundenheit möchte ich an dieser Stelle meiner Familie danken. An erster Stelle danke ich meiner Mutter Frau Dipl. Ing. Birgit Jansen und meinen Großeltern Herbert und Helga Happel, welche schon in frühesten Kindheit meine Interessen gefördert haben und auch in Zeiten größter Not immer an mich geglaubt haben und mich auf meinem Weg unterstützt haben. Ohne Euch wäre ich heute nicht hier. Ein besonderer Dank geht an dieser Stelle an meinen Bruder Eric, vielen Dank für deine Unterstützung, die aufmunternden Worte und gemeinsamen Gespräche. Einen weiteren Dank möchte ich an meinen Onkel Herrn Prof. Dr. Klaus Jansen aussprechen, welcher mich seit früher Kindheit in der Idee inspiriert hat wissenschaftlich zu arbeiten. Schlussendlich danke ich meiner Freundin Charlotte und ihren Eltern Frau Ursula Daniels und Herrn Dr. rer. nat. Jörg Daniels für das Verständnis und die immerwährende Unterstützung.