

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Klinik und Poliklinik für Neurologie

Prof. Dr. med. Christian Gerloff

**Die postischämische Immunreaktion im Schlaganfall
und die Rolle der Mikroglia als antigenpräsentierende Zellen**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Dörthe Behrens

aus Buchholz i.d.N.

Hamburg 2010

Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 07.09.2011

Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: PD Dr. T. Magnus

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: PD Dr. N. O. Schmidt

Prüfungsausschuss, dritter Gutachter: PD Dr. K. Sydow

IN DANKBARKEIT MEINEN LIEBEN ELTERN

Fragestellung

Der ischämische Schlaganfall ist ein komplexes pathophysiologisches Geschehen, das zum Verlust funktioneller Hirnareale führt. Am Anfang dessen steht die durch Ischämie bedingte Schädigung von Neuronen. Unbestritten ist daher die Wiederherstellung der Durchblutung als die wichtigste therapeutische Maßnahme. Von besonderem Interesse für mögliche Therapien ist jedoch die verzögert einsetzende und länger fortbestehende Entzündung des Gehirns, welche nach der Reperfusionphase initiiert wird.

Die Dynamik der Immunzellinfiltration in der Entzündungsphase sowie die Rolle der Mikroglia als antigenpräsentierende Zellen sind Gegenstand dieser Dissertation und sollen Hinweise auf die Qualität der Immunreaktion im ischämischen Schlaganfall geben.

Im experimentellen murinen Schlaganfallmodell wurde das Einwanderungsverhalten von peripheren Immunzellen sowie die Akkumulationskinetik von Mikroglia *in vivo* analysiert. Besonderem Interesse galt den Mikroglia als hirneigene Zellen mit immunologischen Funktionen. Welche Aufgaben sie im Schlaganfall erfüllen, lässt sich anhand der Expression von Aktivierungsmarkern analysieren. *In vitro*- und *in vivo*-Untersuchungen gaben Antworten auf die Fragen, ob Mikroglia zu kompetenten antigenpräsentierenden Zellen im Schlaganfall aktiviert werden und ob Sauerstoffentzug oder eine Interaktion mit ischämischen Neuronen dazu beitragen.

In Zusammenschau der Immunzellinfiltration und des mikroglialen Aktivierungsstatus wurde abschließend die Qualität der postischämischen Immunreaktion diskutiert – ob die unspezifische Immunantwort oder die adaptive Immunantwort prädisponierend ist oder sogar autoimmunologische Reaktionen vorliegen.

Inhaltsverzeichnis

Fragestellung	4
Inhaltsverzeichnis	5
Einleitung	7
1.1 Der ischämische Schlaganfall.....	7
1.2 Die postischämische Immunreaktion	10
1.3 Mikroglia – Die Immunzellen des Gehirns	17
2 Material	21
2.1 Chemikalien	21
2.2 Antikörper und ELISA-Set.....	23
2.3 Puffer, Lösungen und Zellkulturmedien	25
2.4 Verbrauchsmaterial und Präparierbesteck	27
2.5 Geräte	28
2.6 Software.....	29
3 Methoden	30
3.1 Tierversuch	30
3.1.1 <i>Middle Cerebral Artery Occlusion</i> (MCAO).....	30
3.2 Zellkultur	32
3.2.1 Primäre Zellkultur – Mikroglia und Astrozyten	32
3.2.2 Primäre Zellkultur – Neurone	33
3.2.3 <i>Sandwichkultur</i> – Mikroglia/Astrozyten und Neurone	34
3.2.4 <i>Oxygen Glucose Deprivation</i> (OGD)	35
3.3 Immunologische Methoden.....	36
3.3.1 Immunzytochemie.....	36
3.3.2 Durchflusszytometrie	37
3.3.3 Zytokinbestimmung.....	44
4 Ergebnisse	45
4.1 Die Zeitliche Dynamik im Einwanderungsverhalten immunkompetenter Zellen ins ischämiegeschädigte Gehirn	45
4.1.1 Einwanderung peripherer Immunzellen	45
4.1.2 Akkumulation von Mikroglia	49
4.2 Mikroglialer Aktivierungsstatus im <i>in vivo</i> -Modell des ischämischen Schlaganfalls	51

4.3	Reaktion von Mikroglia auf <i>Oxygen Glucose Deprivation</i> im <i>in vitro-Modell</i> des ischämischen Schlaganfalls	52
4.3.1	Immunzytochemische Darstellung der Gliakultur	52
4.3.2	Mikroglialer Aktivierungsstatus nach OGD	54
4.4	Reaktion von Mikroglia auf <i>Oxygen Glucose Deprivation</i> -gestresste Neurone – <i>Sandwichkultur</i>	55
4.4.1	Glia und Neuronenkultur unter <i>Sandwich</i> -Bedingung.....	55
4.4.2	Mikroglialer Aktivierungsstatus nach Interaktion mit OGD-gestressten Neuronen	56
5	Diskussion	58
5.1	Immuninfiltration – Die Reperfusionphase im ischämischen Schlaganfall	58
5.2	Mikroglia und Schlaganfall – Mediatoren einer adaptiven Immunantwort?	64
5.3	Immunreaktion ja, aber welche?	67
6	Zusammenfassung	70
	Abkürzungsverzeichnis	72
	Literaturverzeichnis	75
	Danksagung	83
	Eidesstattliche Erklärung	84

Einleitung

1.1 Der ischämische Schlaganfall

Der ischämische Schlaganfall zeichnet sich epidemiologisch durch eine hohe Morbidität und Mortalität aus. Die zerebrovaskulären Erkrankungen standen bereits 1990 wie auch 2001 weltweit an zweiter Stelle der Todesursachenstatistik (Lopez et al., 2006). Allein im Jahr 2007 starben 26 911 Personen in Deutschland an einem Schlaganfall. Betroffen waren 9 516 männliche und 17 395 weibliche Personen. Damit belegte der Schlaganfall bei Männern Platz 8 und bei Frauen Platz 4 der Todesursachenstatistik der BRD 2007 (Statistisches Bundesamt, 2009). Darüberhinaus ist er wesentlicher Grund bleibender Behinderung im Alter. So sind derzeit etwa eine Million Bundesbürger von den Folgen eines Schlaganfalls betroffen. Das Erkrankungsalter beträgt im Durchschnitt 70 Jahre bei Männern und 75 Jahre bei Frauen (Kolominsky-Rabas and Heuschmann, 2002). Angesichts der steigenden Lebenserwartung rückt der Schlaganfall in den Mittelpunkt gesundheitsökonomischen sowie wissenschaftlichen Interesses.

Das menschliche Gehirn ist aufgrund seines hohen Energiebedarfs und der Empfindlichkeit gegenüber O₂-Mangel auf eine geregelte Durchblutung und Versorgung mit Glukose und Sauerstoff angewiesen. Trotz seines mit etwa 2 % vergleichsweise geringen Anteils an der Gesamtkörpermasse wird es mit etwa 13 % des Herzminutenvolumens versorgt (Silbernagl, 2003). Wird die Durchblutung und damit Energieversorgung z.B. durch einen Thrombus unterbrochen, kommt es zu einer Kaskade pathophysiologischer Mechanismen und schließlich zum Absterben von Neuronen.

Die Folgen sind abhängig von der Region und dem Ausmaß der Hirnschädigung. Sie umfassen eine Reihe von sensorischen und motorischen Ausfällen, wie z.B. Sensibilitätsstörungen oder Hemiparesen. Durch eine schnelle Versorgung des Patienten und einen frühzeitigen Therapiebeginn ist es zum Teil möglich, größeren Schäden und damit Behinderungen vorzubeugen. Ziel der Therapie ist dabei die Wiederherstellung bzw. Aufrechterhaltung der zerebralen

Durchblutung (Reperfusion). Mittel der Wahl sind antikoagulative sowie thrombolytische Medikamente. Letztere sind durch ein kurzes Zeitfenster von 3-6 Stunden nach Symptombeginn limitiert. Nach Ablauf dieser Zeit stehen derzeit keine nachweislich effektiven medikamentösen Optionen offen. Trotz verbesserter Therapie und Rehabilitation sind viele der Betroffenen im weiteren Verlauf des Lebens auf fremde Hilfe angewiesen.

Ätiologisch lassen sich zwei Arten des Schlaganfalls unterscheiden, die Hirnblutung und der Hirninfarkt, die Minderdurchblutung eines Hirnareals. Bei einer Hirnblutung kommt es z.B. als Folge zu hohem Blutdruck oder eines Traumas zum Einreißen eines Gefäßes und zur Blutung in das umliegende Gewebe. Ursache des Hirninfarkts hingegen ist ein Verschluss eines intra- oder extrazerebralen Gefäßes z.B. durch einen arteriosklerotisch bedingten Thrombus. Ca. 80 % aller Schlaganfälle sind derart hervorgerufene ischämische Hirninfarkte (Koluminsky-Rabas and Heuschmann, 2002).

Der ischämische Schlaganfall kann nach heutiger Auffassung in drei Phasen unterteilt werden: eine früh einsetzende Phase neuronalen Zellsterbens, eine Phase immunologischer Reaktionen und eine Phase der Regeneration und Narbenbildung (Dirnagl et al., 1999). Im betroffenen Hirngebiet bilden sich dabei zwei Areale aus: die Kernregion der Schädigung und das umliegende Gewebe, die *Penumbra* (lat. Halbschatten).

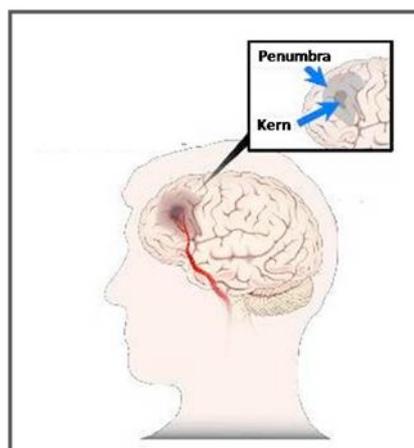


Abbildung 1: Der ischämische Schlaganfall – Kern und Penumbra. Modifiziert nach (*Advanced stroke live support*, Universität Miami, 2004).

In der Kernregion kommt es zu einer Kaskade multipler pathophysiologischer Reaktionen (Dirnagl et al., 1999). Zuerst entsteht durch die verminderte Versorgung mit Glukose und Sauerstoff ein Energiedefizit in den betroffenen Zellen. Dieses führt zum Zusammenbruch des Ionengleichgewichts und des Membranpotentials. Calciumionen (Ca^{2+}) strömen in die Zelle ein. Und der erhöhte Ca^{2+} -Spiegel löst eine Glutamatausschüttung aus. Die Ca^{2+} -Ionen binden und aktivieren Glutamatrezeptoren, wodurch es zu weiterem Einstrom von Ca^{2+} -Ionen und damit zur Glutamat-Exzitotoxizität kommt. Ca^{2+} -Ionen wirken in der Zelle als *second messenger* und aktivieren eine Reihe proteolytischer Enzyme und Lipasen, die Zellbestandteile zerstören. Außerdem aktivieren sie Enzyme wie die Cyclooxygenase, die zur Bildung freier Radikale beitragen. Aktivierte Lipasen und Radikale schädigen die Zellmembran und machen sie durchlässig für Natrium- (Na^+) und Chloridionen (Cl^-). Als Folge kommt es zum Eintritt von Wasser und zum Anschwellen der Zelle. Die beschriebenen Mechanismen führen schließlich zum Zelltod durch Nekrose oder Apoptose (Broughton et al., 2009) und zu einem Hirnödem.

Während die Nekrose als pathologischer Zelltod bezeichnet werden kann, stellt die Apoptose, der programmierte Zelltod, einen physiologischen Prozess dar. Absoluter ATP-Mangel führt in der Kernregion des Schlaganfalls vor allem zur Nekrose, während im leichter betroffenen, umliegenden Gewebe apoptotische Vorgänge im Vordergrund stehen (Ueda and Fujita, 2004). Während also in der Kernregion des Schlaganfalls das nekrotische Zellsterben vorherrscht, sind die Neurone der Penumbra zwar geschädigt, aber noch nicht abgestorben. Vielmehr stellt die Penumbra eine Grenzzone zwischen Zellschädigung und Reparatur dar, deren Übergänge fließend sind (Lo, 2008). Im Vergleich zur Kernregion, dessen Ischämietoleranz wenige Minuten beträgt, zieht sich das therapeutische Fenster zur Rettung der Penumbra über mehrere Stunden.

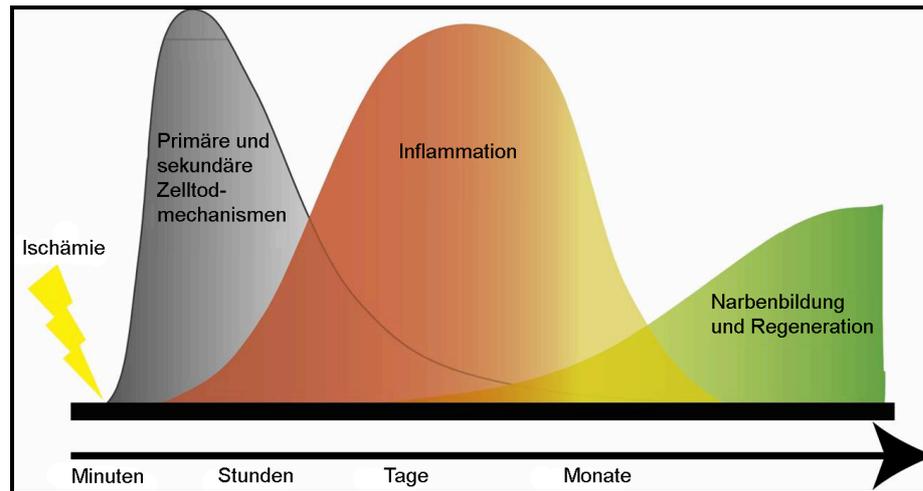


Abbildung 2: Die Phasen des ischämischen Schlaganfalls. Modifiziert nach: (Dirnagl et al., 1999).

Bevor es durch reaktive Gliose, Axonwachstum und Neurogenese (Carmichael, 2008) zur Narbenbildung und Regeneration kommt, entsteht eine postischämische Entzündung im betroffenen Hirnareal, deren Übergänge zu den anderen Phasen nicht klar definiert sind.

1.2 Die postischämische Immunreaktion

Eine Immunreaktion ist im Allgemeinen die Antwort des Körpers auf eine Schädigung seiner Integrität durch Infektionen oder Irritationen. Sie wird in eine unspezifische und eine spezifische Immunantwort unterteilt. Die unspezifische, natürliche Immunantwort ist phylogenetisch älter und stellt eine früh einsetzende und weitestgehend ungerichtete Abwehr dar. Zu ihr zählen z.B. das Komplementsystem oder die Abwehr durch neutrophile Granulozyten. Die spezifische Immunantwort kann hingegen sehr genau und sensitiv spezifische Antigene erkennen und diese gezielt mit großer Effektivität bekämpfen. Hierbei ist es möglich, körpereigene von körperfremden und harmlose von gefährlichen Stoffen zu unterscheiden. Eine besondere und lebenswichtige Funktion ist dabei das Vermeiden von Selbstzerstörung. Dies wird als immunologische Toleranz bezeichnet. Ist dieser Mechanismus gestört, kommt es zu autoimmunologischen Prozessen. Ein zweites wichtiges Merkmal der spezifischen Immunantwort ist die Funktion des immunologischen Gedächtnisses. Dies ermöglicht dem Körper bei wiederholtem Kontakt mit einem Antigen dieses sofort zu erkennen

und zu bekämpfen. Im Mittelpunkt der spezifischen Immunantwort steht die Interaktion zwischen antigenpräsentierenden Zellen (AP-Zellen) und T-Lymphozyten. Ergebnis dessen ist die Aktivierung der T-Lymphozyten als zelluläre sowie die Aktivierung der B-Lymphozyten als humorale Komponente der Immunreaktion (Pezzutto, 2007).

Durch die Blut-Hirn-Schranke ist das Gehirn weitestgehend vor dem Eindringen fremder Substanzen geschützt und daher selten von Immunreaktionen betroffen. Dennoch gibt es auch hier eine Reihe von immunologischen Erkrankungen. Unterschieden werden primär immunologische Erkrankungen des Zentralen Nervensystems (ZNS) von sekundär immunologischen, z.B. als Begleitphänomen einer primär neurodegenerativen Erkrankung. Zu den primär immunologischen Erkrankungen zählen z.B. akute Meningitiden oder die chronische Autoimmunerkrankung Multiple Sklerose (MS). Der ischämische Schlaganfall hingegen gehört zur Gruppe der sekundären immunologischen Erkrankungen.

Zu Beginn des Schlaganfalls stehen die Ischämie und damit das Zellsterben als direkter Schaden im Vordergrund. In der später einsetzenden Reperfusionphase wird das Gewebe, u.a. durch Thrombolyse, wieder rekanalisiert und perfundiert. Trotz wiederhergestellter Versorgung scheint die Reperfusion ebenfalls einen schädigenden Aspekt zu haben. Obwohl der Mechanismus noch nicht eindeutig geklärt ist, spricht einiges dafür, dass der Reperfusionsschaden unter anderem inflammatorischer Genese ist. Diese sogenannte postischämische Entzündung ist ein komplexer Mechanismus, der hinsichtlich des zeitlichen Rahmens, der einzelnen Komponenten und der Bedeutung noch nicht hinreichend erforscht ist. Vor allem die Frage, ob jene inflammatorischen Prozesse eher zu weiterem Schaden oder zur Regeneration beitragen, bleibt zu klären.

Die postischämische Entzündung ist ein Zusammenspiel von molekularbiologischen Mediatoren und Entzündungszellen. Schon während der Ischämiephase kommt es durch Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, wie z.B. *nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NFκB) (Terai et al., 1996), die zur Aktivierung proinflammatorischer Gene führen. Es konnte z.B. gezeigt werden, dass Mäuse, die defizient für die NFκB-Untereinheit p50 sind, kleinere experimentell-induzierte Schlaganfälle haben (Schneider et al., 1999). Die Aktivierung proinflammatorischer Gene

führt z.B. zur Bildung von Chemokinen und einer Hochregulation von Adhäsionsmolekülen (Wang et al., 2007). Diese Moleküle rekrutieren Immunzellen an den Ort der Entzündung. Damit angelockte periphere Immunzellen zum Ort der Inflammation gelangen, müssen sie die Endothelbarriere penetrieren. Hierfür findet eine Interaktion über Adhäsionsmoleküle statt. Für die Diapedese der Leukozyten beispielsweise sind v.a. drei Gruppen von Bedeutung: Selektine, die Immunglobulin-Superfamilie und Integrine (Wild and Bixel, 2006). In einer Studie mit Primaten konnte gezeigt werden, dass Verwendung eines Antikörpers gegen E- und P-Selektine die leukozytäre Infiltration und das Infarktverhalten reduzieren (Mocco et al., 2002). Wichtigstes Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie scheint das *Intercellular adhesion molecule 1* (ICAM-1, CD54) zu sein. Es vermittelt eine stärkere Adhäsion als die Selektine und ermöglicht dadurch die Diapedese der Leukozyten. Mehrere Studien haben gezeigt, dass ICAM-1 beim Schlaganfall hochexprimiert wird und eine Blockade zu einem kleineren Infarktvolumen führt (Connolly et al., 1996).

Chemotaktische Vorgänge und Adhäsionsmechanismen ermöglichen auf diesem Wege einer Reihe von peripheren Immunzellen in das Gewebe einzuwandern. Neben den aus dem Blut stammenden Immunzellen sind die Gehirnzellen selbst von wichtiger Bedeutung für die Entzündungsreaktion und werden im nächsten Kapitel gesondert besprochen.

Etwa 30 min nach dem Schlaganfall sind die Neutrophilen Granulozyten als erste der peripheren Immunzellen in den zerebralen Kapillaren und Venulen sichtbar (Garcia et al., 1994) und wandern etwa 6 h nach dem Schlaganfall in das Gewebe ein (Akopov et al., 1996). Das Ausmaß der Akkumulation korreliert darüberhinaus positiv mit der Infarktgröße und dem neurologischen Defizit (Akopov et al., 1996). Es konnte gezeigt werden, dass Verwendung des antineutrophilen Antikörpers *antineutrophil monoclonal antibody* (RP3) im experimentellen Schlaganfall zu einer geringeren Infiltration Neutrophiler Granulozyten und einem kleineren Infarktvolumen bei geringerem Hirnödem führt (Matsuo et al., 1994). Neutrophile Granulozyten gehören zur unspezifischen Immunantwort und sind in der Lage, Zelltrümmer oder Pathogene zu phagozytieren und zu vernichten. Nach Einwanderung in das Gewebe produzieren sie u.a. die Matrix-Metalloproteinase 9 (MMP-9) (Justicia et al., 2003), die zur Degradierung extrazellulärer Proteine beiträgt. Im Schlaganfall kommt es durch Aktivierung

der MMP-9 zum Abbau von Komponenten der Blut-Hirn-Schranke (Ning et al., 2006, Kelly et al., 2006).

Monozyten, die im Gewebe zu Makrophagen differenzieren, sind weitaus weniger untersucht, scheinen jedoch etwas später als die Granulozyten in das Gewebe einzuwandern. Im experimentellen murinen Schlaganfall konnte gezeigt werden, dass Makrophagen etwa zwei Tage nach dem Schlaganfall in das Gewebe einwandern. Zuvor identifizierte Makrophagen-ähnliche Zellen wurden hingegen als mikroglialen Ursprungs identifiziert (Schilling et al., 2003). Makrophagen gehören ebenfalls zu den Phagozyten und können darüberhinaus Antigene präsentieren. Auf diese Weise können sie mit T-Zellen interagieren und durch deren Zytokine aktiviert werden. Sie selbst produzieren TNF- α , IL-1 und IL-6 und tragen zum spezifischen Zytokinmilieu einer Entzündung bei (Pezzutto, 2007).

Auch über die Rolle der Natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) im Schlaganfall ist eher wenig bekannt. Studien im Tier-Modell der Multiplen Sklerose, der Experimentellen Autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), zeigen kontroverse Ergebnisse. Es konnte z.B. gezeigt werden, dass NK-Zellen über die Produktion von Interferon- γ (IFN- γ) T-Zell-vermittelte autoreaktive Schäden verstärken (Shi et al., 2000). Eine andere Arbeitsgruppe hingegen fand heraus, dass NK-Zellen die T-Zell-vermittelte Autoimmunität regulatorisch bzw. inhibitorisch beeinflussen (Smeltz et al., 1999). NK-Zellen entwickeln sich aus lymphoiden Vorläuferzellen und besitzen die Fähigkeit, fremde Zellen ohne vorherige Aktivierung zu töten. Darüberhinaus erkennen sie veränderte, körpereigene Zellen über eine verminderte Expression von MHC-I-Molekülen. Sie sezernieren Perforine und Granzyme, die die Zielzelle perforieren und proteolytisch abbauen. Außerdem sind sie in der Lage über den FAS-Liganden und den *TNF-related apoptosis inducing ligand* (TRAIL) Apoptose zu induzieren (Pezzutto, 2007).

Eine besondere Stellung nehmen die Natürlichen Killer T-Zellen (NKT-Zellen) ein. NKT-Zellen besitzen gleiche Marker wie NK-Zellen (z.B. NK1.1) und exprimieren zusätzlich einen $\alpha\beta$ -T-Zell-Rezeptor, über den sie eigene und fremde CD1d-gebundene Glykolipide erkennen können (Godfrey and Kronenberg, 2004). Sie scheinen für immunregulatorische Vorgänge wichtig zu sein. Sie steuern über IL-4 oder IFN- γ die Differenzierung von T-Helfer-Zellen in T_H1 oder

T_H2 Zellen. Dadurch können sie fördernd oder unterdrückend auf eine Immunreaktion einwirken. Je nach experimentellem Aufbau konnten sowohl proinflammatorische als auch antiinflammatorische (Miyamoto et al., 2001) Auswirkungen von NKT-Zellen auf den Verlauf einer EAE gezeigt werden (Jahng et al., 2001). Die Bedeutung für den Schlaganfall ist hingegen noch wenig erforscht.

Ein zweites Bindeglied unspezifischer und spezifischer Immunität sind die Dendritischen Zellen. Sie können über *Toll-like* Rezeptoren (TLR) z.B. bakterielles Lipopolysaccharid (LPS) als Pathogen erkennen (unspezifische Immunität) und darüberhinaus durch Antigenpräsentation T-Zellen aktivieren (spezifische Immunität) (Schuurhuis et al., 2006). Dendritische Zellen sind myeloiden Ursprungs. Je nach Reifungsmilieu können sie sich aus hämatopoetischen Vorstufen zu interstitiellen, myeloiden oder lymphoiden Dendritischen Zellen entwickeln. Sie kommen in zahlreichen Organen vor, phagozytieren extrazelluläre Bestandteile und präsentieren die jeweiligen Antigene über MHC-Moleküle auf der Zelloberfläche. Ohne Aktivierung durch inflammatorische Moleküle zeigen sie eine hohe phagozytische Aktivität, bei noch geringer MHC-Expression und geringer Antigenpräsentation. Findet jedoch durch Inflammation oder Infektion eine Aktivierung statt, verstärkt und verlängert sich die MHC-abhängige Antigenpräsentation und die Expression kostimulatorischer Moleküle. Die Antigene werden dann T-Zellen präsentiert. Über die Interaktion zwischen Antigenbindendem MHC-Molekül und T-Zell-Rezeptor sowie zwischen kostimulatorischen Molekülen wie CD80 (AP-Zelle) und CD28 (T-Zelle) sowie CD40 (AP-Zelle) und CD40-Ligand (T-Zelle) kommt es zur Aktivierung und Differenzierung der T-Zelle. Dies findet sowohl im Gewebe mit eingewanderten T-Zellen als auch in benachbarten Lymphknoten statt. Dendritische Zellen besitzen aufgrund diverser Chemokinrezeptoren die Fähigkeit, aus dem Gewebe zum nächsten Lymphknoten zu wandern, um dort eine Reihe von Zellen zu aktivieren und zu rekrutieren (Pezzutto, 2007). Während sie auch unter physiologischen Bedingungen in den meisten Organen vorkommen, findet man sie nicht im Parenchym des Gehirns (Karman et al., 2004), jedoch in der Dura mater, den Leptomeningen und im Plexus choroideus (McMenamin, 1999). Anhand des dendritischen Oberflächenmarkers CD11c konnte die zerebrale Infiltration unreifer myeloider Dendritischer Zellen in einem Modell der fokalen kortikalen Is-

chämie gezeigt werden (Reichmann et al., 2002). Die Bedeutung der Dendritischen Zellen im Schlaganfall ist jedoch noch nicht geklärt. Die Entzündungsreaktion im Schlaganfall scheint jedoch hauptsächlich antigenunspezifisch abzuflaufen (Gee et al., 2007). Ob und in welchem Maße eine spezifische Immunantwort auftritt, ist weitestgehend unklar.

Wichtigste Komponente der spezifischen Immunantwort sind die Lymphozyten. Man unterscheidet B- und T-Lymphozyten.

B-Lymphozyten können über den B-Zell-Rezeptor, einem gebundenen Immunglobulin, Antigene erkennen und binden. Haben sie ihr spezifisches Antigen identifiziert, werden sie aktiviert und differenzieren sich zu Plasmazellen. Nun sind sie befähigt, lösliche antigenspezifische Immunglobuline zu sezernieren. Auf diese Weise sind sie Bestandteil der humoralen Immunantwort und tragen zur Opsonisierung und Neutralisierung von Antigenen bei.

Die T-Lymphozyten werden nochmals in zwei Gruppen unterteilt: CD4⁺-T-Helfer-Zellen und CD8⁺, zytotoxische T-Zellen. Erstere erkennen an MHCII gebundene Antigene und differenzieren nach Interaktion mit AP-Zellen je nach Zytokinmilieu zu T-Helfer 1 (TH₁)- oder TH₂-Zellen. Eine wichtige Rolle spielt hierbei IL-12, welches die Produktion von IFN- γ und damit die Bildung von TH₁-Zellen fördert. TH₁-Zellen produzieren selbst IFN- γ und führen über die Aktivierung von Makrophagen und zytotoxischen T-Zellen zu einer ausgeprägten Entzündungsreaktion. TH₂-Zellen hingegen unterstützen durch die Produktion von IL-4 die B-Zell-Aktivierung und damit die humorale Immunität. CD8⁺-T-Zellen erkennen an MHCI gebundene Antigene und sind damit wichtig für die Vernichtung mit Viren befallener Körperzellen. Ob eine T-Zelle nach Interaktion mit einer AP-Zelle aktiviert wird, hängt von der Länge und Stärke der T-Zell-Rezeptorstimulation sowie kostimulatorischer Moleküle ab. Eine kurze und schwache Interaktion führt zur Anergie, während ein starkes T-Zell-Rezeptorsignal bei fehlenden kostimulatorischen Signalen zur Apoptose der Zelle und damit zur Toleranz führt. Nur ein langes und starkes Signal bei zusätzlicher Kostimulation führt letztlich zur Aktivierung der T-Zelle. Diese agieren dann entweder als Effektor- oder als Gedächtniszellen. Wichtigstes kostimulatorisches Signal ist hierbei die Interaktion zwischen CD80 (B7.1, AP-Zelle) und CD28 (T-Zelle). CD40 hingegen ist wichtig für die Interaktion von Makrophagen

mit TH₁-Zellen und B-Zellen mit TH₂-Zellen sowie für die Reifung von Dendritischen Zellen. Interaktion über CD40 führt zu gesteigerter Aktivierung von Makrophagen durch Erhöhung der CD40-Moleküle und TNF-Rezeptoren bzw. zur Plasma- und Gedächtniszellbildung der B-Zellen. Im Umkehrschluss ist damit eine gesteigerte Expression dieser Moleküle Zeichen einer gesteigerten Aktivität der entsprechenden Zelle.

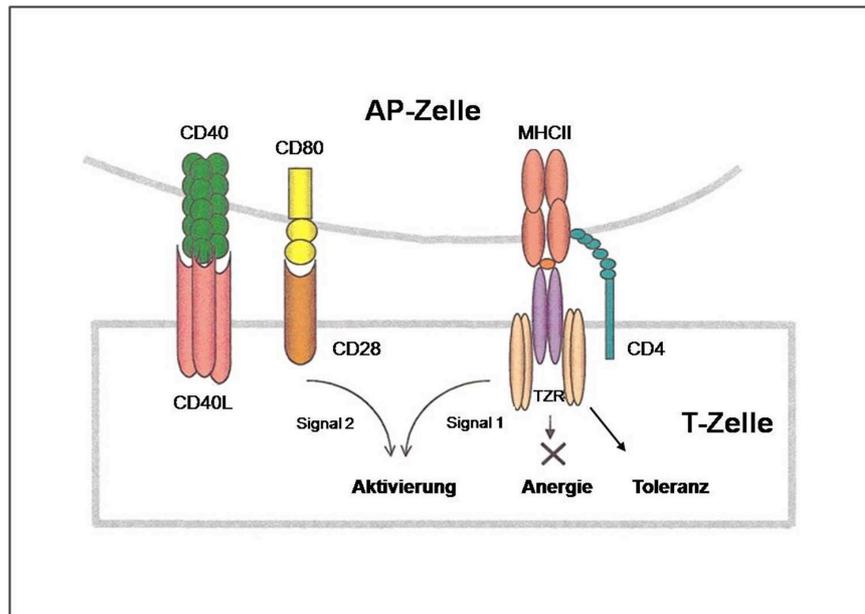


Abbildung 3: Interaktion zwischen AP-Zelle und T-Zelle. Die Aktivierung einer T-Zelle bedarf zweier Signale, der Interaktion zwischen T-Zell-Rezeptor (TZR) und MHCII sowie der Aktivierung kostimulatorischer Moleküle. Fehlen beide Signale reagiert die T-Zelle mit Anergie. Bei alleine vorhandenem TZR-Signal kommt es zur Toleranz der T-Zelle gegenüber dem Antigen. Und sind beide Signale vorhanden, wird die T-Zelle aktiviert. Modifiziert nach: (Dong and Benveniste, 2001).

Eine besondere Stellung in der spezifischen Immunantwort nehmen die regulatorischen T-Lymphozyten (Treg) ein. Sie sind positiv für CD4 und CD25 und exprimieren als einzige Zellen den Transkriptionsfaktor *Forkhead box P3* (FOXP3), anhand dessen sie identifiziert werden können. Tregs produzieren immunmodulatorische bzw. inhibierende Zytokine wie IL-10 und *Transforming growth factor β* (TGF-β) und verhindern überschießende Immunreaktionen (Pezzutto, 2007).

Im experimentellen ischämischen Schlaganfall spielen CD4+ und auch CD8+ T-Lymphozyten eine Rolle. Es konnte gezeigt werden, dass das Fehlen beider

oder jeweils einer Zellgruppe zu kleineren Infarkt volumina und reduziertem neurologischen Defizit führen (Yilmaz et al., 2006a). Die gleiche experimentelle Studie zeigte jedoch keinen Effekt durch B-Lymphozyten auf den ischämischen Schlaganfall. Tregs und Toleranzmechanismen mögen hingegen dafür verantwortlich sein, dass trotz massiven Anfalls zerebraler Antigene und Präsenz immunfähiger Zellen im Schlaganfall keine autoimmunologischen Prozesse stattfinden.

1.3 Mikroglia – Die Immunzellen des Gehirns

Neben peripheren Immunzellen spielen auch die Zellen des ZNS eine wichtige Rolle bei der Entwicklung und Aufrechterhaltung der postischämischen Immunreaktion im Schlaganfall. Es gibt zwei große Gruppen von Hirnzellen: Neurone und Gliazellen.

Wesentliche Aufgabe der Neurone ist die Induktion und Verarbeitung chemischer und elektrischer Signale. Aufgrund ihrer hohen metabolischen Aktivität sind sie sehr anfällig für Sauerstoff- und Substratmangel und unterliegen nekrotischen und apoptotischen Vorgängen im Schlaganfall.

Die Gruppe der Gliazellen umfasst im Wesentlichen Astrozyten, Oligodendrozyten und Mikroglia. Oligodendrozyten bilden die Myelinscheiden im ZNS und sind daher von untergeordneter Bedeutung im Reperfusionsschaden. Astrozyten sind sehr vielseitige Zellen, die vor allem für die Aufrechterhaltung der Homöostase und der Blut-Hirnschranke sowie für die Funktionalität der Neurone von Bedeutung sind. Als Folge einer Ischämie werden sie aktiviert. Es kommt zu einer Hypertrophie, Hyperplasie und zu einer Hochregulation des *glial fibrillary acidic protein* (GFAP) – ein Vorgang, der als reaktive Gliose (Pekny and Nilsson, 2005) bezeichnet wird. Die Gliose trägt sowohl zur Narbenbildung als auch zur Neubildung von Axonen bei. Astrozyten besitzen außerdem die Fähigkeit, Zytokine und Chemokine zu produzieren und MHCII-Moleküle zu exprimieren (Dong and Benveniste, 2001).

Mikroglia gelten aufgrund ihrer phagozytischen Fähigkeiten und ihrer Ähnlichkeiten mit Gewebsmakrophagen als wichtigste Immunzellen im Gehirn. Sie sind myeloiden Ursprungs (Chan et al., 2007), machen etwa 10-20 % der Gliapopulation aus (Soulet and Rivest, 2008) und werden hauptsächlich durch Prolifera-

tion hirnstämmiger Mikroglia nachgebildet (Ajami et al., 2007). Del Rio Hortega beschrieb sie Anfang des 20. Jahrhunderts erstmals als eigene Zellklasse. Im inaktivierten Zustand weisen sie eine verzweigte Morphologie auf und werden daher als *ramified microglia* bezeichnet. Trotzdem sind sie keineswegs ruhend, sondern durchsuchen mit ihren Ästen das Gewebe nach pathologischen Veränderungen (Nimmerjahn et al., 2005). Nach experimentell induziertem Schaden wandern die feinen Fortsätze zum Ort der Verletzung – ein Prozess der durch Adenosintriphosphat (ATP)-Injektion induziert und durch ATP-Hydrolyse inhibiert werden konnte. Dies führte zu der Annahme, dass die ATP-Ausschüttung geschädigter Zellen zu einer raschen mikroglialen Antwort beiträgt (Davalos et al., 2005). Im weiteren Verlauf kann es zur Migration der Mikroglia zum Ort der Schädigung kommen wie z.B. bei der Bildung amyloider Plaques beim Morbus Alzheimer (Meyer-Luehmann et al., 2008).

Wahrgenommene Veränderungen der Gewebshomöostase führen zu morphologischer und funktioneller Adaptation der Mikroglia. Derartige homöostatische Veränderungen können exogenen oder endogenen Ursprungs sein. Zur ersten Gruppe zählen z.B. Infektionen und mikrobielle Strukturen, zur zweiten z.B. tote Zellen, Zytokine, Neurotransmitter-Verschiebungen, Serum-Komponenten oder abnorme Proteinkomplexe. Eine wichtige Rolle spielen bei diesem Prozess *TLRs*, über die Mikroglia eben genannte Stressoren in Form von so genannten *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs) erkennen (Olson and Miller, 2004, Nguyen et al., 2002). Ein anderer Aktivierungsmechanismus erfolgt über das Ausbleiben inaktivierender Faktoren, wie z.B. CD200 auf Neuronen und CD200-Rezeptoren auf Mikroglia (Hoek et al., 2000). *Hoek et al.* konnten unter anderem zeigen, dass Mikroglia in CD200-negativen Mäusen vermehrt Aktivierungsmerkmale aufweisen und zu einer verstärkten Immunantwort in unterschiedlichen ZNS-Erkrankungsmodellen beitragen. Sie zeigten eine abgerundete Morphologie bei erhöhter CD45-Expression.

Die phänotypischen Veränderungen in aktivierten Mikroglia sind je nach Aktivierungsbedingungen unterschiedlich. Die Zellen ziehen ihre Fortsätze zurück, runden sich ab und erhöhen die Expression von Oberflächenmolekülen (CD45, CD11b, CD11c, MHCI, MHCII, CD80, CD40). Expression dieser Oberflächenmoleküle befähigt sie zur Antigenpräsentation und Interaktion mit T-Lymphozyten. MHC-Moleküle binden dabei Antigene und interagieren direkt mit

dem T-Zell-Rezeptor. Diese Interaktion ist ein erstes Aktivierungssignal. Damit eine Aktivierung stattfindet, ist ein zweites Signal über kostimulatorische Moleküle (CD80, CD40) notwendig. Die Mikroglia weisen zum Teil einen ähnlichen Phänotyp wie Dendritische Zellen auf und exprimieren den für Dendritische Zellen typischen Marker CD11c. Die Transformation von Mikroglia zu CD11c-exprimierenden Zellen dendritischen Phänotyps konnte in einem Mausmodell der fokalen kortikalen Ischämie gezeigt werden (Reichmann et al., 2002). Während im Mausmodell der Multiplen Sklerose Mikroglia als AP-Zellen identifiziert wurden (Juedes and Ruddle, 2001), ist ihre Rolle für den Schlaganfall weniger klar. Neben der Antigenpräsentation und Interaktion mit T-Lymphozyten ist die Phagozytose die wohl wichtigste Immunkompetenz von Mikroglia bei neurodegenerativen Erkrankungen (Napoli and Neumann, 2009). Es wurde herausgefunden, dass aktivierte Mikroglia nach experimentellem Schlaganfall im Ischämiegebiet akkumulieren und einen Makrophagen ähnlichen Phänotyp aufweisen (Schilling et al., 2003).

Als immunkompetente Zellen exprimieren sie unterschiedliche Zytokine und Chemokine sowie deren Rezeptoren (Hanisch, 2002). Die am besten untersuchten mikroglialen proinflammatorischen Zytokine beim Schlaganfall sind TNF- α , IL-1 β und IL-6. Diese werden nach dem Schlaganfall vermehrt ausgeschüttet (Offner et al., 2005). Während IL-1 β neurotoxisch wirkt, wurden für TNF- α sowohl neurotoxische als auch neuroprotektive Funktionen beschrieben (Allan and Rothwell, 2001). Die Rolle von IL-6 im Schlaganfall ist noch nicht geklärt. *Suzuki et al.* beschreiben in ihrem Review die Ambivalenz von IL-6 zwischen Neuroprotektion und Inflammation (Suzuki et al., 2008). Ein wichtiges rein antiinflammatorisches Zytokin, das im Schlaganfall von Mikroglia gebildet wird ist TGF- β (Lehrmann et al., 1998).

Die Folgen der mikroglialen Aktivierung können sehr unterschiedlich sein und sind abhängig von den aktivierenden Mechanismen, z.B. dem Zytokinmilieu oder dem Vorhandensein von Pathogenen (Hanisch and Kettenmann, 2007). Mikroglia können potenziell Schäden hervorrufen und vergrößern oder Schäden beseitigen und zur Regeneration beitragen. Negativ wirken sie z.B. über die Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen, reaktiven Sauerstoffspezies oder Stickstoffmonoxiden (Block et al., 2007). Dies kann entweder direkt neurotoxisch sein, z.B. durch Schäden an der Zellmembran, oder aber verstärkend

auf die Entzündungsreaktion wirken. Eine progenerative Funktion wird der Beseitigung von Zelltrümmern durch mikrogliale Phagozytose zugesprochen (Neumann et al., 2009). Sowohl die Phagozytose von Neutrophilen nach einem experimentellen Schlaganfall (Denes et al., 2007) als auch die Phagozytose apoptotischer Zellen (Magnus et al., 2001) scheinen sich protektiv auf die jeweilige Schädigung auszuwirken. Insgesamt gibt es Hinweise für eine progenerative Funktion von Mikroglia im Schlaganfall. So führte eine intravenöse oder intrazerebroventrikuläre Injektion exogener Mikroglia nach einem Schlaganfall in zwei Experimenten zu einer Verringerung ischämischer Läsionen (Kitamura et al., 2004, Imai et al., 2006), während die Ablation proliferierender Mikroglia zu einer Vergrößerung führte (Lalancette-Hebert et al., 2007).

2 Material

2.1 Chemikalien

Acetat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Aceton	Merck, Darmstadt
Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	AppliChem, Darmstadt
Augen- und Nasensalbe	Bepanthen, Bayer, Leverkusen
B27	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Basal Medium Eagle (BME)	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Bovines Serumalbumin (BSA)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
BSA	Roth, Karlsruhe
Buprenorphinhydrochlorid-Injektionslösung	Temgesic, Essex Pharma, München
Collagenase A	Roche, Mannheim
Cytosin-β-D-Arabinofuranosid	Sigma, Taufkirchen
Glutamin	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
4',6-Diamidino-2-phenylindoldi- Hydrochlorid (DAPI)	Merck, Darmstadt
Dimethylformamid	Merck, Darmstadt
Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium (D-MEM)	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Desoxiribonuklease (DNase)	Roche, Mannheim
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe
FACS-Clean	BD Biosciences, Heidelberg
FACS-Rinse	BD Biosciences, Heidelberg
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Fluoromount-G	Southern Biotech, Birmingham, USA
Gentamicin	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe

2 Material

Glukose	Fluka Biochemika, Buchs, Schweiz
Hank`s Balanced Salt Solution (HBSS)	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
4-(2-Hydroxyethyl)-1	
Piperazinethansulfonsäure (HEPES)	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Isofluran (1-Chloro-2,2,2-trifluoroethyl- difluoromethylether)	Abbott, Wiesbaden
Isotone Natriumchloridlösung (99 %) (NaCl)	Braun, Melsungen
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO ₂)	Roth, Karlsruhe
Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt
D(-)Mannitol	Merck, Darmstadt
Methanol	J.T. Baker, Griesheim
3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5- diphenyl-2H-tetrazoliumbromid (MTT)	Merck, Darmstadt
Natriumazid	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck, Darmstadt
Neurobasal Medium	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Normal goat serum (NGS)	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck, Darmstadt
Paraformaldehyd (PFA)	Electron Microscopy Sciences, Hatfield, USA
Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS)	Dulbecco`s, PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Penicillin	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Percoll	GE Healthcare, München
Poly-L-Lysin	Sigma, Taufkirchen

Pferdeserum	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Saccharose	Merck, Darmstadt
1 N Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Sigma, Taufkirchen
Streptomycin	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC)	Sigma, Taufkirchen
Triton X 100	Fluka Biochemika, Buchs, Schweiz
Trypanblau 0,4 %	Sigma, Taufkirchen
Trypsin-Ethylendiamintetraessigsäure (Trypsin-EDTA) (0,05%)	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin (2,5 %)	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe

2.2 Antikörper und ELISA-Set

Die Antikörper wurden über die Firmen eBioscience/Natutec (San Diego, USA/Frankfurt am Main), BD Pharmingen (Heidelberg), Chemicon (Temecula, USA), AbD Serotec (Düsseldorf), Cell Signaling (Danvers, USA), Wako (Neuss), Jackson (Suffolk, UK), Molecular Probes/Invitrogen (Karlsruhe) bezogen.

Zur Zytokinbestimmung wurde ein *mouse IL-6 ELISA-Set* und ein *mouse TNF (mono/mono) ELISA-Set* von BD Biosciences (Heidelberg) benutzt.

Tabelle 1: Antikörper für die Durchflusszytometrie

Ziel	Fluorochrom	Isotyp	Klon	Firma	Verdünnung
CD4	PE	Ratte IgG2b, k	GK1.5	eBioscience/NatuTec	1:100
CD8	PaBlue	Ratte IgG2a, k	5-3-6.7	eBioscience/NatuTec	1:30
CD11b	FITC	Ratte IgG2b, k	M1/70	eBioscience/NatuTec	1:30
CD11b	PerCP-Cy5.5	Ratte IgG2b, k	M1/70	BD Pharmingen	1:30
CD11b	APC	Ratte IgG2b, k	M1/70	eBioscience/NatuTec	1:30
CD11c	APC	Armenischer Hamster IgG	N418	eBioscience/NatuTec	1:30

2 Material

CD11c	PE-Cy7	Armenischer Hamster IgG	N418	eBioscience/NatuTec	1:10
CD45	APC-Cy7	Ratte IgG2b, k	30-F11	BD Pharmingen	1:10
CD3	PerCP-Cy5.5	Armenischer Hamster IgG1, k	145-2C11	BD Pharmingen	1:20
CD80	PE	Armenischer Hamster IgG	16-10A1	eBioscience/NatuTec	1:10
CD80	FITC	Armenischer Hamster IgG	16-10A1	eBioscience/NatuTec	1:10
NK1.1	PE-Cy7	Maus IgG2a, k	PK136	BD Pharmingen	1:15
CD16/32 (Fc-Block)	Purified	Maus IgG2a, l	93	eBioscience/NatuTec	1:1000
MHCII (b,d,p,k)	FITC	Ratte IgG2b, k	M5/114.1 5.2	eBioscience/NatuTec	1:10
CD40	APC	Ratte IgG2a, k	1C10	eBioscience/NatuTec	1:10

Tabelle 2: Primärantikörper für die Immunzytochemie

Ziel	Isotyp	Klon	Firma	Verdünnung
GFAP	Maus IgG2b	4A11	BD Pharmingen	1:500
Iba1	Kaninchen IgG		Wako	1:200
NG2	Kaninchen		Chemicon	1:500

Tabelle 3: Sekundärantikörper für die Immunzytochemie

Ziel	Fluorochrom	Isotyp	Firma	Verdünnung
Maus	Alexa 488	Ziege IgG	Molecular Probes	1:2000
	Alexa 568			
Kaninchen	Alexa 488	Ziege IgG	Molecular Probes	1:2000
	Alexa 568			

2.3 Puffer, Lösungen und Zellkulturmedien

Tabelle 4: BME + FCS + Pen/Strep

1 x BME Medium	+ 10 % FCS
+ 50 U/ml Penicillin	+ 50 µg/ml Streptomycin

Tabelle 5: HBSS + HEPES

1 x HBSS	+ 10 mM HEPES
----------	---------------

Tabelle 6: Neurobasal + B27 + Glutamin + Penicillin/Streptomycin (+ Cytosin-Arabinosid)

Neurobasal Medium	+ 2 % B27
+ 1 % Glutamin	+ 100 U/ml Penicillin
+ 100 µg/ml Streptomycin	(+ 0,02 % Cytosin β-D-Arabino-furanosid)

Tabelle 7: Neurobasal + B27 + Glutamin + Penicillin/Streptomycin + FCS

Neurobasal Medium	+ 2 % B27
+ 1 % Glutamin	+ 100 U/ml Penicillin
+ 100 µg/ml Streptomycin	+ 10 % FCS

Tabelle 8: Verdaulösung

1 x HBSS	0,25 % Trypsin
----------	----------------

Tabelle 9: Locke`s Medium ohne Glukose (Tang et al., 2007)

154 mM NaCl	5,6 mM KCl
2,3 mM CaCl ₂	1 mM MgCl ₂
3,6 mM NaHCO ₃	5 mM HEPES
pH 7,2	

Tabelle 10: Locke`s Medium mit Glukose (Tang et al., 2007)

154 mM NaCl	5,6 mM KCl
2,3 mM CaCl ₂	1 mM MgCl ₂

2 Material

3,6 mM NaHCO ₃	5 mM HEPES
10 mM Glukose	
pH 7,2	

Tabelle 11: PBS

137 mM NaCl (M = 58,44 g/mol)	2,7 mM KCl (M = 74,56 g/mol)
7,4 mM Na ₂ HPO ₄ (M = 177,99 g/mol)	1,5 mM KH ₂ PO ₄ (M = 136,09 g/mol)
pH 7,4	

Tabelle 12: TTC-Lösung

0,1 M Phosphat-Puffer	5 % Mannitol
2 % TTC	

Tabelle 13: 0,1 M Natrium-Phosphat-Puffer

77,4 ml 1 M Na ₂ HPO ₄	22,6 ml 1 M NaH ₂ PO ₄
900 ml ddH ₂ O	
pH 7,4	

Tabelle 14: FACS-Puffer

0,5 % BSA	0,02% Natriumazid
in 1 x PBS	

Tabelle 15: Erythrozyten-Lyse-Puffer

0,15 M NH ₄ Cl	10 mM KHCO ₂
0,1 mM Na ₂ EDTA	
pH 7,2 – 7,4	

Tabelle 16: 90 % Percoll-Lösung

90 % Percoll	in 10 x PBS
--------------	-------------

2 Material

Tabelle 17: Percoll-Lösung A (78 %)

4,7 ml 90 % Percoll	1,3 ml 1 x PBS
Dichte 1,095 g/ml	

Tabelle 18: Percoll-Lösung B (30 %)

2 ml 90 % Percoll	4 ml D-MEM
Dichte 1,030 g/ml	

Tabelle 19: Lyse-Puffer

50 % Dimethylformamid	20 % SDS
80 % Acetat	2,5 % 1 N HCl
in H ₂ O	
pH 7,4	

Tabelle 20: Blocklösung

10 % NGS	0,2 % BSA
0,3 % Triton X 100	in 1 x PBS

Aceton/Methanol (1/1)

Paraformaldehyd (4 %)

in 1 x PBS

Tabelle 21: Gasgemisch

95 % Stickstoff (N)	5 % Kohlenstoffdioxid (CO ₂)
---------------------	--

2.4 Verbrauchsmaterial und Präparierbesteck

ELISA-Platte (96-well)

Nunc, Wiesbaden

Glas Pasteur Pipetten

VWR, Darmstadt

Glas Deckgläschen

Menzel, Braunschweig

2 Material

Kanüle (Microlance 2)	Becton Dickinson, Heidelberg
Nahtmaterial, Ethilon Nylonfaden, 6-0	Ethicon, Johnson & Johnson, Düsseldorf
Nahtmaterial, Perma-Handseide, 6-0	Ethicon, Johnson & Johnson, Düsseldorf
Objektträger (Superfrost plus)	Menzel, Braunschweig
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe	Integra Bioscience, Fernwald
Schraubverschlussröhrchen	Cellstar, Greiner Bio-One, Frickenhausen
Serologische Plastik Pipetten	Becton Dickinson, Heidelberg
Spritze	Becton Dickinson, Heidelberg
Spritzenkopf	Braun Melsungen AG, Melsungen
Sterilfilter der Ausschlussgrenze 0,22 µm	Millipore Corporation, Billerica, USA
Trucount-Zählröhrchen	Becton Dickinson, Heidelberg
Zellkulturflaschen	Cellstar Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturschalen	Cellstar Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturplatten	Cellstar Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellsieb (40 µm)	BD Biosciences, Heidelberg
Federschere	Fine Science Tools (FST), Heidelberg
Löffelpinzette	Fine Science Tools (FST), Heidelberg
Messer	Fine Science Tools (FST), Heidelberg
Pinzette (mit gebogener Spitze)	Fine Science Tools (FST), Heidelberg
Skalpell	Fine Science Tools (FST), Heidelberg
Standard Pinzette	Fine Science Tools (FST), Heidelberg
Standard Schere	Fine Science Tools (FST), Heidelberg

2.5 Geräte

Auflichtmikroskop, SZSTS	Olympus, Hamburg
Auflichtmikroskop	Zeiss, Jena
BD LSR II-Durchflusszytometer	BD Biosciences, Heidelberg

2 Material

Brutschrank, Biocenter 2001	Tecnomara, Fernwald
Flowmeter	Porter, Hatfield, USA
Glühdraht, Gemini Cautery System	Braintree Scientific, USA
Hirnblock	Braintree Scientific, USA
Inkubatorkammer für OGD	Billups-Rothenberg, Del Mar, USA
Isofluranverdampfer	Völcker, Kaltenkirchen
Kaltlichtquelle, KL200	Schott, Mainz
Kaltlichtquelle, KL 1500	Schott, Mainz
Mikroskop, Axiovert 40 CFL	Zeiss, Oberkochen
Zellzählkammer, Neubauer	Roth, Karlsruhe
Perfusionspumpe, Reglo	Ismatec, Zürich, Schweiz
Sicherheitswerkbank, Steril Gard	
Class II Typ A/B3	Baker Company, Sanford, USA
Wärmematte, T Pump	Gaymar industries, Orchard Park, USA
Zentrifuge, 302K	Sigma, Taufkirchen
Zentrifuge, Multifuge 3 S-R	Heraeus, Hanau
Zentrifuge, Multifuge 3-L	Hereaus, Hanau

2.6 Software

FACS Diva	BD Biosciences, Heidelberg
GraphPad Prism Version 5.00	GraphPad Software, La Jolla, USA
Microsoft Excel	Microsoft
Microsoft Word	Microsoft

3 Methoden

3.1 Tierversuch

Die im folgenden Kapitel dargestellten Tierversuche wurden beim Amt für Gesundheit und Verbraucherschutz, Lebensmittelsicherheit und Veterinärwesen der Freien und Hansestadt Hamburg beantragt und unter der Nummer 26/07 genehmigt.

3.1.1 *Middle Cerebral Artery Occlusion (MCAO)*

Die *Middle Cerebral Artery Occlusion (MCAO)* ist eine Operation, bei der durch transienten Verschluss der *Arteria cerebri media* ein Schlaganfall simuliert wird. Über die *Arteria carotis externa* wurde ein Faden in die *Arteria carotis interna* und von dort zum Abgang der *Arteria cerebri media* geführt, wodurch diese vorübergehend verschlossen wurde.

Für den Versuch wurden ausschließlich Mausböcke der Linie C57BC6 im Alter von 12 bis 14 Wochen und einem Gewicht von 20 bis 25 g verwendet.

Die Maus wurde mit einem Gasgemisch bestehend aus Isofluran (1-3 %) und Sauerstoff (97 %) narkotisiert und auf einer Wärmematte fixiert. Die Analgesie erfolgte prä- und postoperativ im achtstündigen Rhythmus mit 100 µl Buprenorphinhydrochlorid (16,2 µg/ml Buprenorphin). Die Augen wurden mit Bepanthen Augensalbe feucht gehalten und das Fell durch Rasur entfernt.

Nach Eröffnung der Haut über einen 2 cm langen Schnitt und Deviation der Speicheldrüsenlappen erfolgte die Präparation des linken cervikalen Gefäß-Nervenstrangs, bestehend aus *Arteria carotis communis (ACC)*, *Vena jugularis interna* und *Nervus vagus*. Die ACC teilt sich kranial in die *Arteria carotis externa (ACE)* und die *Arteria carotis interna (ACI)*.

Die freiliegende ACC wurde kaudal mit einem temporär gelegten chirurgischen Knoten (Hand-Seide 6-0) verschlossen und damit der antegrade Blutfluss in das OP-Gebiet vorübergehend unterbrochen. Der Rückfluss aus der ACE und der

ACI wurden ebenfalls durch zwei Knoten verhindert. Nahe der Junktion mit der ACE wurde eine lose Schlaufe um die ACE gelegt.

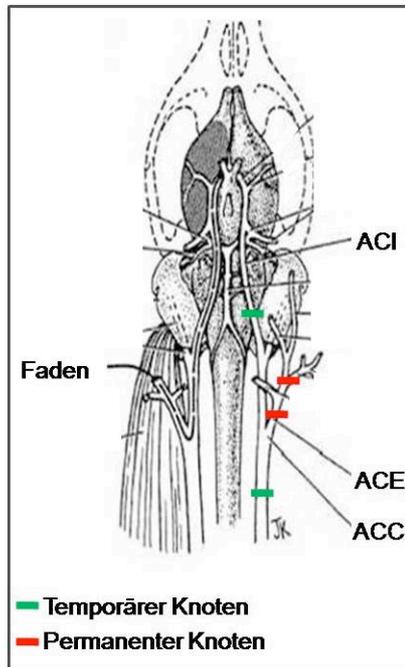


Abbildung 4: Topographie der MCAO-Operation. Fadenführung und Lage der Knoten sind zur Übersicht auf getrennten Seiten dargestellt.

Mit einer Federschere wurde nun ein kleiner Schlitz in die ACE zwischen Knoten und Schlaufe geschnitten. In den Schlitz wurde ein Nylonfaden (Größe 6-0) hinein- und bis zur Junktion vorgeschoben. Der Faden wurde zuvor an einem Ende mit einem Glühdraht auf 23-25 μm geschmolzen. Durch Anziehen der Schlaufe wurde der Rückfluss von Blut verhindert. Die ACE wurde direkt unter dem kranialen Knoten abgetrennt und gerade auf die ACI ausgerichtet. Der Knoten um die ACI wurde gelöst und der Faden 1cm von der ACE aus in die ACI vorgeschoben. Aufgrund zweier Abzweigungen war es möglich, den Faden falsch zu positionieren und damit kein Schlaganfall auszulösen. Lag er richtig, war der Blutfluss im Gebiet der linken *Arteria cerebri media* unterbrochen. Der Faden verblieb dort für eine Stunde. Das Operationsgebiet wurde mit einem in isotone Natriumchloridlösung getauchten Tupfer abgedeckt.

Nach 1 h wurde der Faden aus dem Gefäß entfernt. Um ein zu starkes Bluten zu verhindern, wurde der Faden zuerst nur ein Stück zurückgezogen und der Knoten um die ACI wieder festgezogen. Danach wurde der Faden ganz aus

dem Gefäß entfernt und der Knoten um die ACE festgezogen. Jetzt konnte der Knoten um die ACI wieder geöffnet werden. Zuletzt wurde noch der Knoten um die ACC geöffnet und damit der antegrade Blutfluss wiederhergestellt. Die Drüsenlappen wurden wieder zurückgelegt und die Haut darüber mit einer chirurgischen Naht verschlossen.

Die Tiere wurden zum Aufwachen auf eine Wärmematte in ihren Käfig gelegt und auf eventuelle neurologische Zeichen, wie Kreiseln, beobachtet.

3.2 Zellkultur

3.2.1 Primäre Zellkultur – Mikroglia und Astrozyten

Für die Primärkulturen aus Astrozyten und Mikroglia wurden neugeborene Mäuse der Linie C57BL6, ein oder zwei Tage nach Geburt (*post natal* 1-2, P1-2), verwendet.

Nach der Dekapitation wurde der Schädel sagittal eröffnet und das Gehirn mit einer Löffelpinzette in eisgekühltes HBSS (+ 10 mM HEPES) transferiert. Das Gehirn wurde von den Meningen befreit und die Riechkolben sowie das Kleinhirn entfernt. Die Gehirnhälften wurden zur weiteren Behandlung in eine eisgekühlte Petrieschale mit HBSS (+ 10 mM HEPES) gelegt und in vier kleinere Stücke zerteilt.

Alle weiteren Schritte erfolgten unter einer Sicherheitswerkbank mit laminarem Fluss. Die Gehirne wurden samt HBSS (+ 10 mM HEPES) in 15 ml Röhrchen überführt und der Überstand abgesaugt. Im Anschluss wurden 3 ml Trypsin-EDTA (0,05 %) zugefügt. Es folgte eine Inkubationsphase (10 min, 37 °C, 5 % CO₂). Durch zwei Waschschrte mit BME Medium (+ FCS, + Penicillin/Streptomycin) wurde die Verdauung gestoppt. Die Überstände wurden abgesaugt. Pasteurpipetten wurden in der Flamme eines Bunsenbrenners auf drei Größen poliert und ermöglichten eine schrittweise und schonende Herstellung einer Einzelzellsuspension in BME Medium (+ FCS, + Penicillin/Streptomycin). Die Zellsuspensionen wurden durch ein Zellsieb (Porengröße 40 µm) in ein 50 ml Röhrchen gegeben. Die Zellzahlbestimmung erfolgte in einer Neubauerzählkammer mittels Trypanblau in einer 1:10 Verdünnung. Die Zellzahl ermittelte sich aus folgender Formel:

$$\text{Zellen/ml} = \text{Zellzahl}_{\text{Gro\ss}quadrat} * 10^4 * 10/9$$

Die Zellen wurden in einer Konzentration von 300 000 Zellen/ml bis 500 000 Zellen/ml in Zellkulturflaschen (75 cm², 250 ml) und 6-well-Platten ohne und mit 25 mm Deckgläschen mit BME Medium (+ FCS, + Penicillin/Streptomycin) ausplattiert. Ein Mausgehirn ergab etwa 5×10^4 Zellen.

Die Zellkulturen verblieben 14 Tage (*days in vitro* 14, DIV 14) im Brutschrank (37 °C, 5 % CO₂). Ein Mediumwechsel erfolgte alle 5 bis 6 Tage.

3.2.2 Primäre Zellkultur – Neurone

Für die Primärkultur aus Neuronen wurden 14 Tage alte Mäuseembryonen (Embryonaltag post gestationem, E14) der Linie C57BL6 verwendet.

Das Muttertier wurde mittels Isofluran narkotisiert und mittels zerebraler Dislokation getötet. Die Embryonen wurden aus dem Mutterleib herauspräpariert, in eisgekühltem HBSS (+ 10 mM HEPES) aus der Fruchtblase entnommen und per Scherenschlag dekapitiert. Das Gehirn wurde unter einem Auflichtmikroskop freipräpariert. Die Meningen, die Riechkolben, das Kleinhirn und die Basalganglien wurden entfernt und die Hemisphären in eine neue Schale mit HBSS (+ 10 mM HEPES) überführt.

Die weitere Behandlung erfolgte unter einer Sicherheitswerkbank mit laminarem Fluss. Die Gehirne wurden abzentrifugiert (1 min, 800 rpm, 4 °C). Im Anschluss wurde das Zellpellet in 0,25 % Trypsin in HBSS (+ 10 mM HEPES) inkubiert (20 min, 37 °C, 5 % CO₂). Der Verdau wurde mit 500 µl FCS gestoppt und der Überstand abzentrifugiert (5 min, 800 rpm, 4 °C). Das Zellpellet wurde in 5 ml Neurobasal Medium (+ B27, + Glutamin, + Penicillin/Streptomycin, + FCS) resuspendiert und mit einer 100 µl Pipettenspitze, die auf eine 5 ml Pipette gesteckt wurde, durch achtmaliges rauf- und runterpipettieren vereinzelt. Im Anschluss wurde die Zellsuspension durch ein Zellsieb (Porengröße 40 µm) in ein neues Röhrchen überführt. Die Zellzahlbestimmung erfolgte in einer Neubauerzählkammer mittels Trypanblau in einer 1:10 Verdünnung. Die Zellzahl ermittelte sich aus folgender Formel:

$$\text{Zellen/ml} = \text{Zellzahl}_{\text{Gro\ss}quadrat} * 10^4 * 10/9$$

Ein embryonales Gehirn ergab ca. 3×10^6 Zellen. Die Zellen eines Gehirns wurden auf ein Deckgläschen (25 mm) in einer *6-well*-Platte in 2 ml Neurobasal Medium (+ B27, + Glutamin, + Penicillin/Streptomycin, + FCS) ausplattiert und inkubiert (1 Woche, 37 °C, 5 % CO₂). Nach zwei Tagen wurde das Medium komplett mit Cytosin β -D-Arabinofuranosid enthaltenden Neurobasalmedium (+ B27, + Glutamin, + Penicillin/Streptomycin, + Cytosin β -D-Arabinofuranosid) ersetzt. Cytosin β -D-Arabinofuranosid verhinderte eine weitere Proliferation von Gliazellen in der Kultur. Nach einer Woche wurden die Zellen für die *Sandwichkultur* verwendet.

In der sich anschließenden *Sandwichkultur* wurden die Deckgläschen umgekehrt auf eine Gliakultur gesetzt, sodass die Neurone in unmittelbare Nachbarschaft zu den Mikroglia gebracht werden konnten. Zwischen den Deckgläschen und der Gliakultur wurde durch Paraffinkügelchen ein kleiner Spalt geschaffen, der die Neurone von den Gliazellen trennte. Die für die Neuronenkultur verwendeten Deckgläschen wurden im Backofen sterilisiert (2 h, 200 °C) und nach dem Abkühlen mit den Paraffinkügelchen versehen. Hierfür wurden Paraffinpellets in einem Becherglas auf einer Heizplatte (200 °C) geschmolzen. Danach wurden mit einer 10 μ l Pipette jeweils drei Kügelchen möglichst an den Rand eines Deckgläschen gesetzt. Nach Festwerden des Paraffins konnten die Deckgläschen mit 20 μ g/ml Laminin in Poly-L-Lysin beschichtet werden (24 h, 37 °C, 5 % CO₂). Nach der Inkubation wurden das Laminin und Poly-L-Lysin recycelt und die Deckgläschen mit 1 x PBS gewaschen.

3.2.3 Sandwichkultur – Mikroglia/Astrozyten und Neurone

Um zu untersuchen, ob OGD-gestresste Neurone Mikroglia aktivieren, wurde eine Cokultur aus Mikroglia/Astrozyten und Neuronen gefertigt.

Hierfür wurde eine Gliakultur (siehe Abschnitt 3.2.1) in zwei *6-well*-Platten ausgesät und im Brutschrank inkubiert (2 Wochen, 37 °C, 5 % CO₂). Die Neuronenkultur (siehe Abschnitt 3.2.2) wurde auf 12 mit Paraffinkügelchen versehene Deckgläschen (25 mm) in zwei *6-well*-Platten ausgesät und ebenfalls im Brutschrank inkubiert (1 Woche, 37 °C, 5 % CO₂).

Die Neurone (DIV 7) wurden einer OGD (1 h, 37 °C, 95 % N₂, 5 % CO₂) unterzogen (siehe Abschnitt 3.2.4) und direkt im Anschluss umgekehrt auf die

Mikroglia gesetzt. Das Glia Medium wurde kurz zuvor durch vorgewärmtes Neurobasal Medium (+ B27, + Glutamin, + Penicillin/Streptomycin) ersetzt. Als Kontrolle dienten Neurone, die nicht durch OGD gestresst wurden, sondern stattdessen einen Mediumwechsel zu Locke's Medium mit Glukose erhielten. Diese wurden ebenfalls auf eine *6-well*-Platte mit Mikroglia in Neurobasal Medium (+ B27, + Glutamin, + Penicillin/Streptomycin) gesetzt. Die Cokultur wurde im Brutschrank inkubiert (24 h, 37 °C, 5 % CO₂).

Im Anschluss wurden die Neurone wieder von der Gliakultur entfernt. Danach wurden die Mikroglia durch zweiminütiges mechanisches Schütteln der mit Paraffilm verschlossenen *6-well*-Platten vom Astrozytenrasen getrennt und mittels Durchflusszytometrie analysiert.

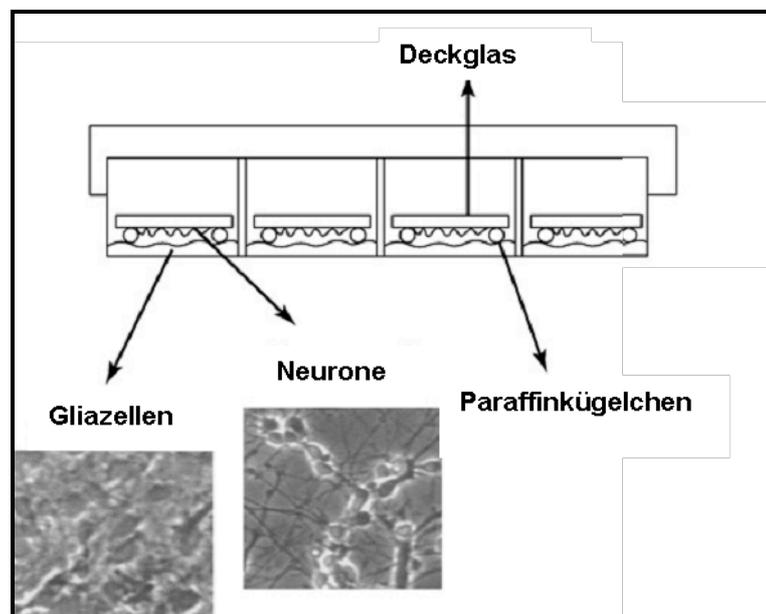


Abbildung 5: Aufbau der *Sandwichkultur*. Modifiziert nach (Viviani, 2006).

3.2.4 Oxygen Glucose Deprivation (OGD)

Um *in vitro* einen ischämischen Schlaganfall zu imitieren, wurden die in Zellkultur gehaltenen Neurone bzw. Astrozyten und Mikroglia einer OGD unterzogen.

Die Neurone (DIV 7) wurden für die OGD in den *6-well*-Platten und die Gliazellen (DIV 14) in den Kulturflaschen (75 cm², 250 ml) belassen. Das Zellkulturmedium wurde komplett ersetzt. Die Glukose wurde durch einen Waschschrift mit einem Glukose freien Medium (Locke's Medium ohne Glukose) entfernt. Und im Anschluss wurden die Zellen mit dem Glukose freien Medium bedeckt

(8 ml pro Kulturflasche, 1,5 ml pro 6-well-Kammer). Die Zellkulturen wurden mit geöffnetem Deckel in eine luftdichtabschließbare Kammer gestellt. Die Kammer wurde mit einem Gasgemisch (95% N₂, 5% CO₂, 8 min) begast und danach luftdicht abgeschlossen. Je nach Versuchsaufbau verblieben die Zellen für unterschiedliche Zeiten im Brutschrank (37 °C, 5% CO₂).

Als Kontrollbedingungen wurden Zellen der gleichen Kultur mit Locke´s Medium mit Glukose unter Raumluft-Sauerstoffbedingungen für die gleiche Zeit im Brutschrank inkubiert (37 °C, 5% CO₂).

Nach der OGD wurde das Locke´s Medium wieder durch das zuvor verwendete Zellmedium (8 ml pro Kulturflasche, 1,5 ml pro 6-well-Platte) ersetzt. 24 Stunden nach Beendigung der OGD wurden die Folgeexperimente durchgeführt.

3.3 Immunologische Methoden

3.3.1 Immunzytochemie

Die Zusammensetzung der Gliakulturen wurde mit Fluoreszenzfarbstoffgekoppelten Antikörpern dargestellt.

Die auf Deckgläschen gewachsenen Gliazellen (DIV 14) wurden in den 6-well-Platten gewaschen (1 x 2 min, 1 x PBS) und danach fixiert (10 min, 4 % PFA). Das PFA wurde durch Waschen entfernt (2 x 2 min, 1 x PBS). Die unspezifischen Bindungsstellen wurden mit Blocklösung blockiert (30 min, 10 % NGS, 0,2 % BSA, 0,3 % Triton X 100) und die Zellen gleichzeitig durch Triton X 100 permeabilisiert.

Die Inkubation der Zellen mit dem in Blocklösung verdünnten Primärantikörper erfolgte in einer feuchten Kammer über Nacht bei 4 °C. Als Primärantikörper wurde ein Gemisch aus einem monoklonalen Maus-Anti-*Glial-Fibrillary-Acid-Protein*-IgG-Antikörper (GFAP, 1:500) und einem polyklonalen Kaninchen-Anti-*Ionized-calcium-adaptor-molecule-1*-Antikörper (Iba1, 1:200) verwendet. Auf einem weiteren Deckgläschen wurde ein Gemisch aus dem monoklonalen Maus-Anti-*Glial-Fibrillary-Acid-Protein*-IgG Antikörper (GFAP, 1:500) und einem polyklonalen Kaninchen-Anti-*NG2-Chondroitin-Sulfat-Proteoglykan*-Antikörper (1:500) angewendet.

Nach drei Waschschritten (3 x 5 min, 1 x PBS) wurden die Deckgläschen mit den in Blocklösung verdünnten Sekundärantikörpern inkubiert (1 h, Raumtemperatur, dunkel). Auf beiden Deckgläschen wurde ein Gemisch aus Alexa-488-konjugiertem-Ziegen-Anti-Maus-IgG-Antikörper (1:2000) und einem Alexa-568-konjugiertem-Ziegen-Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper (1:2000) verwendet. Es folgte ein Waschschritt (1 x 2 min, 1x PBS) und eine Inkubationsphase mit 4',6-Diamidino-2-phenylindoldi-Hydrochlorid (DAPI) (5 min, Raumtemperatur, im Dunkeln). Nach dreimaligem Waschen (3 x 5 min, 1 x PBS) wurden die Deckgläschen mit Fluoromount-G-Lösung eingedeckelt, nach dem Trocknen mit Nagellack versiegelt und im Anschluss mikroskopiert.

3.3.2 Durchflusszytometrie

Nach der OGD bzw. der *Sandwichkultur* wurde mittels Durchflusszytometrie der mikrogliale Aktivierungsstatus anhand der Expression von MHCII, CD80 und CD40 analysiert.

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode zur Analyse von Zellen hinsichtlich Quantität, Größe und Granularität sowie spezifischer Muster von Oberflächenantigenen und zytoplasmatischen Proteinen. Mittels eines laminaren Probenstroms werden Zellen einzeln an einem Lasersystem vorbeigeführt. Das vom Laser emittierte monochromatische Licht trifft auf die Zelle und wird je nach Größe und Granularität der Zelle unterschiedlich gestreut. Das Vorwärtsstreu-licht ist ein Maß für die Zellgröße, das Seitwärtsstreu-licht für die Zellgranularität. Ist die Zelle zusätzlich mit einem Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörper markiert, so kommt es beim Auftreffen des Lichts zu einer Anregung des Fluoreszenzfarbstoffs. Dieser emittiert daraufhin Licht einer bestimmten Wellenlänge. Durch ein komplexes System von Spiegeln, Filtern und Detektoren wird das Licht gebündelt, zerlegt und detektiert. Für jeden Farbstoff ist es möglich, ein weitestgehend spezifisches Signal zu erhalten. Werden Zellen mit mehreren Farbstoffen gleichzeitig gekoppelt, kann es jedoch zu unspezifischen, falsch positiven Signalen kommen. Dies ist zu erwarten, wenn das von den jeweiligen Farbstoffen emittierte Licht in einem überlappenden Wellenlängenbereich liegt. Indem man von dem erhaltenen Signal den Anteil des unspezifischen Lichts abzieht, lässt sich dieser Fehler begleichen. Dies wird als Kompensation bezeichnet (Luttmann, 2006).

Das Durchflusszytometer BD LSRII besitzt drei Laser, welche blaues (488 nm), violettes (405 nm) und rotes (633 nm) Licht aussenden. Über *Longpassfilter* gelangt das jeweils längerwellige Licht auf einen der Detektoren und wird in ein elektrisches Signal umgewandelt. Das kürzerwellige Licht wird reflektiert und zum nächst niedrigeren *Longpassfilter* geleitet. Eine Reihe von *Bandpassfiltern*, die jeweils Licht um einen bestimmten Wellenlängenbereich durchlassen, sind den *Longpassfiltern* vorangeschaltet. Die folgende Tabelle zeigt die Zuordnung der Farbstoffe und der Wellenlängen zum jeweiligen Laser.

Tabelle 22: Laser und zugehörige Fluoreszenzfarbstoffe

Laser	Parameter	Wellenlänge
	FSC	
Laser I (blau)	SSC	488 nm
488 nm	FITC	530 nm
	PE	575 nm
	PerCP-Cy5.5	695 nm
	PE-Cy7	780 nm
Laser II (violett)	Pacificblue	450 nm
405 nm	AmCyan	525 nm
Laser III (rot)	APC	660 nm
633 nm	APC-Cy7	780 nm

3.3.2.1 Durchflusszytometrie nach OGD

Mikroglia (siehe Abschnitt 3.2.1) wurden 24 h nach OGD (siehe Abschnitt 3.2.4) bzw. nach der *Sandwichkultur* (siehe Abschnitt 3.2.3) durch zweiminütiges mechanisches Schütteln der Kulturflaschen von dem Astrozytenrasen gelöst. Die nun im Medium schwimmenden Mikroglia wurden in ein 15 ml Röhrchen überführt. Die Zellen wurden zentrifugiert (5 min, 1500 rpm, 4 °C) und das Zellpellet in 100 µl FACS-Puffer gelöst. Zum Blockieren unspezifischer Bindungen wurde jeweils 1 µl eines 1:1000 mit FACS-Puffer vorverdünnten CD16/32-Antikörpers zugefügt und inkubiert (10 min, 4 °C). Von den Zellen wurden je 20 µl auf fünf

96-well-Vertiefungen verteilt und mit folgenden in FACS-Puffer verdünnten Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Antikörpern gefärbt:

- I. CD11b-APC (1:30, 3 µl)
- II. CD11b-FITC (1:30, 3 µl)
- III. CD11b-APC (1:30, 3 µl) und CD80-FITC (1:10, 3 µl)
- IV. CD11b-APC (1:30, 3 µl) und MHCII-FITC (1:10, 3 µl)
- V. CD11b-FITC (1:30, 3 µl) und CD40-APC (1:10, 3 µl)

Es folgte eine Inkubationsphase (1 h, 4 °C, im Dunkeln). Im Anschluss wurde mit 200 µl FACS-Puffer gewaschen und zentrifugiert (5 min, 1500 rpm, 4 °C). Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 400 µl FACS-Puffer gelöst und in ein FACS-Röhrchen pipettiert. Die Zellen wurden im Durchflusszytometer analysiert. Anhand der Färbungen in den Ansätzen I und II konnte die unspezifische Hintergrundfluoreszenz von FITC und APC ermittelt und später von den spezifischen Messungen der Ansätze III bis IV subtrahiert werden.

Als Maß für die Expression der Oberflächenmoleküle diente der Medianwert der Fluoreszenzintensität. Die Werte wurden auf eine Kontrolle normalisiert und damit der *Median Fluorescence Index* (MFI) gebildet. Als Kontrolle dienten Mikroglia, die keiner OGD bzw. *Sandwichkultur* ausgesetzt waren. Die statistische Analyse erfolgte mittels *One sample T-Test*, dargestellt wurden Mittelwert und Standardfehler.

3.3.2.2 Durchflusszytometrie nach MCAO

Die nach MCAO in das Gehirn infiltrierenden Zellen wurden quantitativ und qualitativ zu verschiedenen Zeitpunkten mittels Durchflusszytometrie untersucht.

Das Durchflusszytometer BD LSR II besitzt drei Laser und mehrere Detektoren, die es ermöglichen, sieben Fluoreszenzfarbstoffe gleichzeitig zu messen.

Den Versuchstieren wurde in einer MCAO-Operation (siehe Abschnitt 3.1.1) ein Schlaganfall zugefügt. Zeigten sie nach der MCAO-Operation Anzeichen für einen Schlaganfall, wurden sie in den Versuch aufgenommen. Den Kontrolltieren (*sham*) wurden unter Narkose und Analgesie die Gefäße freipräpariert. Dies passierte jedoch ohne diese zu öffnen und mittels Faden zu verschließen.

Die Mäuse wurden am Ende des Versuches zwischen 0,5 und 7 Tagen nach Reperfusion durch Begasung mit CO₂ in einem Behälter getötet. Nach Freipräparation des Herzens wurden die Mäuse mit 20 ml 1 x PBS über eine Schlauchpumpe transcardial perfundiert, um das Blut aus dem Hirngewebe zu entfernen. Die Perfusionslösung gelang über die linke Herzkammer in den Kreislauf und konnte durch Eröffnen der rechten Herzkammer den Kreislauf wieder verlassen. Der Reperfusionserfolg wurde anhand der Entfärbung der Leber beurteilt. Nach ca. vier Minuten wurde die Perfusion beendet.

Anschließend erfolgte die Präparation und Entnahme des Gehirns. Das Kleinhirn wurde entfernt und die Großhirnhälften in Stücke geteilt und getrennt voneinander in je 5 ml Verdauungslösung gegeben. Es folgte eine dreißigminütige Inkubationsphase bei 37 °C im Wasserbad. Pro Ansatz wurden zwei bis vier Mäuse gepoolt.

Im Anschluss wurden die Gehirne mit einer 10 ml Pipette titriert und durch ein 40 µm Zellsieb gesiebt sowie mit 1 x PBS gewaschen und zentrifugiert (10 min, 1200 rpm, 4 °C). Das Zellpellet wurde mit 5 ml Erylysepuffer resuspendiert und 7 min auf Eis inkubiert. Es folgten erneut ein Wasch- und Zentrifugationsschritt (45 ml 1x PBS, 10 min, 1200 rpm, 4 °C). Im Anschluss wurden die Zellen über einen Percoll-Gradienten aufgereinigt. Hierzu wurde das Zellpellet in 2,5 ml Percoll B gelöst und in ein 15 ml Röhrchen überführt. Die Suspension wurde anschließend vorsichtig mit 2 ml Percoll A unterlegt. Die Röhrchen wurden gewogen und Gewichtsunterschiede mit Percoll B ausgeglichen. Die Aufreinigung erfolgte durch dreißigminütiges Zentrifugieren bei 2500 rpm und 4 °C bei niedrigster Beschleunigung. Die Zellen in der Interphase wurden gesammelt, mit FACS-Puffer gewaschen und zentrifugiert (10 min, 1800 rpm, 4 °C). Der Wasch- und Zentrifugationsschritt wurde 2 x wiederholt (10 min, 1200 rpm, 4 °C). Zum Anfärben der Zellen wurde der Überstand vollständig mit einer Pipette abgezogen und verworfen.

Das Zellpellet wurde in 100 µl FACS-Puffer gelöst. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren wurden 2 µl CD16/32-Antikörper (1:1000) dazugegeben und 10 min inkubiert. Danach wurden 10 µl der Zellen in ein TruCount-Zählröhrchen und jeweils 20 µl in drei Vertiefungen einer 96-well-Platte gegeben. Zu dem Zählröhrchen wurden 80 µl FACS-Puffer und 10 µl eines APC-Cy7

gekoppelten CD45 Antikörpers (1:10) zugefügt. Die Zellen in den *96-wells* wurden mit jeweils 20 µl folgender Antikörpercocktails versehen:

Tabelle 23: Antikörpercocktail I: Zelltyp

CD45-APC-Cy7	1:10
CD11b-FITC	1:30
CD11c-APC	1:30
CD4-PE	1:100
CD8-Pblue	1:30
CD3-PerCP-Cy5.5	1:20
NK1.1-PE-Cy7	1:15

Tabelle 24: Antikörpercocktail II: APC-Aktivierung Kontrolle

CD45-APC-Cy7	1:10
CD11b-PerCP-Cy5.5	1:30
CD11c-PE-Cy7	1:10

Tabelle 25: Antikörpercocktail III: APC-Aktivierung

CD45-APC-Cy7	1:10
CD11b-PerCP-Cy5.5	1:30
CD11c-PE-Cy7	1:10
CD80-PE	1:10
MHCII-FITC	1:10
CD40-APC	1:10

Alle Antikörper wurden in FACS-Puffer verdünnt. Färbecocktail I enthielt Antikörper zur Bestimmung der Zelltypen, Färbecocktail II und III zur Aktivitätsbestimmung von AP-Zellen.

Nach der Inkubation (1 h, 4 °C, dunkel) wurden die Zellen mit 200 µl FACS-Puffer gewaschen und zentrifugiert (5 min, 1500 rpm). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 200 µl FACS-Puffer resuspendiert und in FACS-

Röhrchen übertragen. Zur Messung der Proben wurden alle Ansätze inklusive der Zählröhrchen auf 400 µl mit FACS-Puffer aufgefüllt.

3.3.2.3 *Gating*-Strategie und Zellanalyse

Die Zellinfiltration in das Gehirn wurde an vier Zeitpunkten nach Schlaganfall untersucht und mit *sham* Tieren verglichen. Für *sham*, 0,5, 1 und 3 Tage wurden drei bzw. für 7 Tage zwei voneinander unabhängige Experimente durchgeführt. Pro Experiment wurden je zwei bis vier Mausgehirne gepoolt.

Zu Beginn der Analyse wurde das Gesamtzellinfiltrat einer Gehirnhälfte quantifiziert und anhand unterschiedlicher Zellmarker in die einzelnen Zellgruppen unterteilt (siehe Abbildung 6). Die absolute Zellzahl wurde mit Hilfe der Tru-Count-Zählröhrchen bestimmt. Die Röhrchen enthielten eine bestimmte und bekannte Anzahl von fluoreszierenden *beads*, die bei der Analyse detektiert und gezählt wurden. Anhand des Verhältnisses der ins Gerät aufgenommenen Kügelchen zur Gesamtzahl der Kügelchen konnte man berechnen, wieviel Volumen aus dem Röhrchen gezogen wurde. Die in dem Röhrchen gemessenen Zellen konnten auf das gezogene Volumen bezogen und auf das Gesamtvolumen hochgerechnet werden. Im Anschluss wurde das Gesamtzellinfiltrat anhand der Oberflächenexpression spezifischer Zellmarker in die einzelnen Zellpopulationen unterteilt.

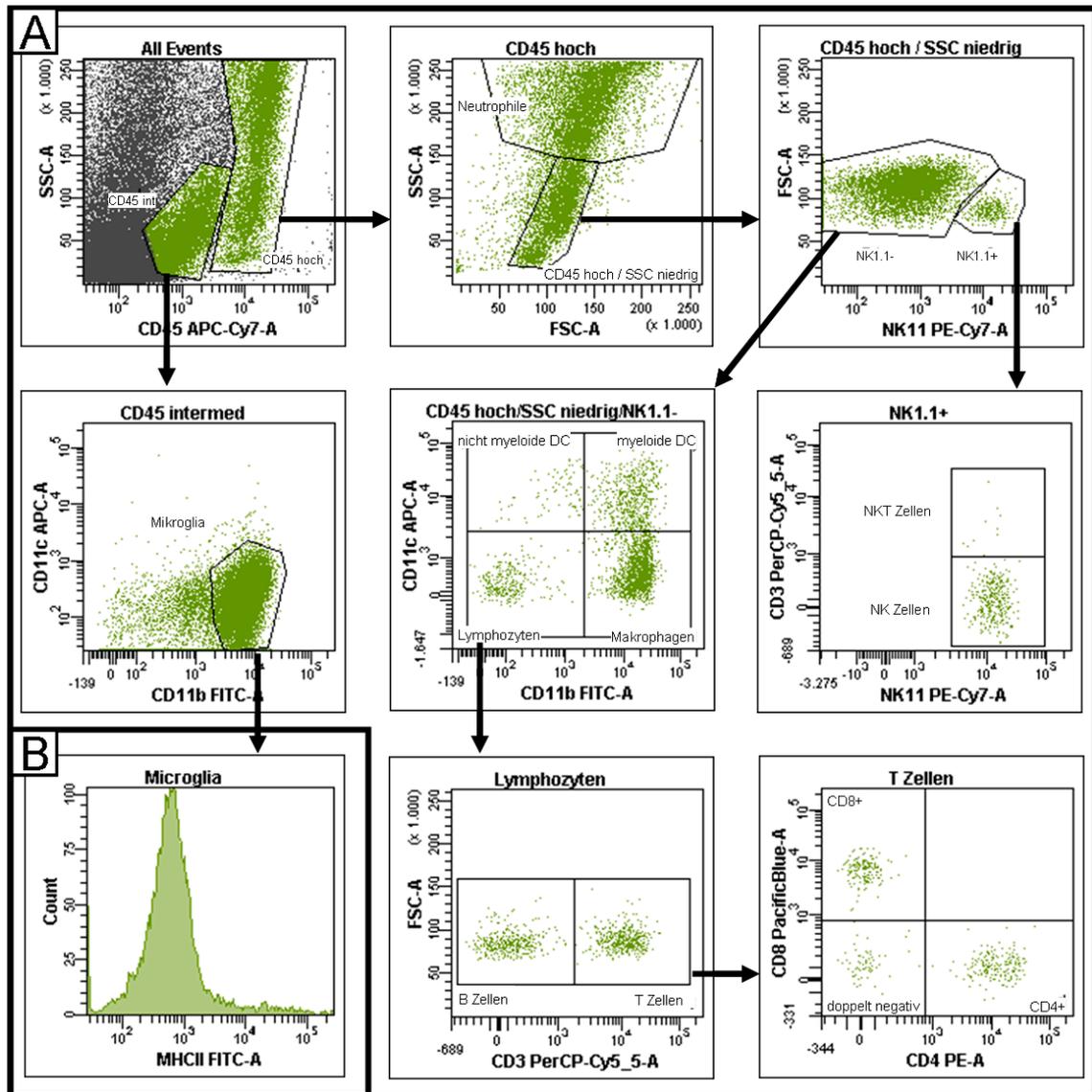


Abbildung 6: Allgemeine Gating-Strategie anhand der unterschiedlichen Expression von Oberflächenmolekülen.

Im ersten *Dot-Blot* wurden alle vom Gerät gemessenen *events* durch den CD45-APC-Cy7-Antikörper und das Seitwärtsstreulicht in CD45 hochexprimierende Zellen, CD45 intermediär exprimierende Zellen und Zelltrümmer getrennt. CD45 ist ein auf Blutzellen ubiquitär vorkommendes Membranprotein, das eine intrazelluläre Tyrosin-Phosphatase Aktivität besitzt. CD45 hochexprimierende Zellen sind somit alle peripheren Immunzellen (Neutrophile Granulozyten, Lymphozyten, Dendritische Zellen, Natürliche Killerzellen und Makrophagen). Auch Mikroglia exprimieren CD45, jedoch in geringerem Ausmaß, und lassen sich auf diese Weise von den anderen Zellen trennen.

Von den CD45 hoch exprimierenden Zellen wurden aufgrund ihrer Granularität und Größe die Neutrophilen Granulozyten separiert.

Mit Hilfe des PE-Cy7 gekoppelten Markers NK1.1 konnten die Natürlichen Killerzellen von den übrigen CD45 hoch exprimierenden Zellen getrennt werden. Die NK-Zellen wurden wiederum in NK-Zellen und NKT-Zellen unterteilt. NKT-Zellen besitzen neben diversen NK-typischen Zellmarkern den für T-Lymphozyten spezifischen T-Zell-Rezeptor, welcher unter anderem aus dem CD3-Molekül gebildet wird.

Die verbliebenden Zellen wurden über die Expressionsmuster von CD11b und CD11c voneinander getrennt. Beide Proteine gehören zur Gruppe der Integrine. Während Myeloide Dendritische Zellen (DC) eine hohe und lymphoide Dendritische Zellen eine niedrige Expressionsrate von CD11b und CD11c besitzen, nehmen Makrophagen eine Mittelstellung ein. Sie exprimieren viel CD11b und wenig CD11c. Lymphozyten exprimieren weder CD11b noch CD11c.

Die Lymphozyten wurden in CD3⁺-T-Lymphozyten und B-Lymphozyten als übrige Population getrennt, die T-Zellen in CD4⁺-T-Helferzellen, CD8⁺-zytotoxische T-Zellen sowie doppelt negative T-Zellen (DN T-Zellen).

Im Anschluss erfolgte die quantitative Auswertung der Zellinfiltration für jede Zellpopulation und jeden einzelnen Zeitpunkt. Die statistische Auswertung erfolgte über die Berechnung von Mittelwerten und Standardfehler und der Erstellung einer *One-way analysis of variance* (ANOVA) und eines *Tukey's Multiple Comparison Tests*. Angaben zur Statistik beziehen sich jeweils auf den Vergleich mit *sham*.

3.3.3 Zytokinbestimmung

Zur Bestimmung der Konzentration von IL-6 und TNF- α wurden ELISA-Sets von BD Biosciences verwendet. Die Durchführung erfolgte gemäß Herstellerprotokoll. Die Detektion beruhte auf dem *Sandwich*-Prinzip. Das Zytokin wurde mit Hilfe eines *capture antibody* und eines *detection antibody* an eine Matrix gebunden und mit enzymvermittelter Farbreaktion quantifiziert. Als Proben dienten die Zellüberstände der *Sandwichkulturen* (siehe Abschnitt 3.2.3), deren Zellen mittels FACS Analyse auf mikrogliale Expression von MHCII, CD80 und CD40 untersucht wurden.

4 Ergebnisse

Die vorliegende Dissertation lässt sich in zwei Themenbereiche untergliedern. Der erste Teil beschreibt die Einwanderungskinetik immunkompetenter Zellen ins ischämiegeschädigte Gehirn. Dieser Teil erfolgte in Zusammenarbeit mit Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Magnus. Insbesondere die MCAO-Operation erfolgte durch andere Mitarbeiter der Arbeitsgruppe. Die Ergebnisse wurden im Mai 2009 in dem Journal *Stroke* veröffentlicht (Gelderblom et al., 2009). Der zweite Teil befasst sich mit der Reaktion von Mikroglia auf OGD.

4.1 Die Zeitliche Dynamik im Einwanderungsverhalten immunkompetenter Zellen ins ischämiegeschädigte Gehirn

Im Verlauf eines ischämischen Schlaganfalls kommt es zur Einwanderung und Ansammlung immunkompetenter Zellen in das Gehirn und zu einem inflammatorischen Reperfusionsschaden. Anhand eines experimentellen Schlaganfallmodells wurde die zeitliche Dynamik der Einwanderung sowie die Quantität und Qualität der eingewanderten Zellen untersucht.

Mit Hilfe des MCAO-Modells (siehe Abschnitt 3.1.1) wurden temporäre Schlaganfälle in der Maus induziert. Die Zellinfiltration der ipsilateralen und kontralateralen Gehirnhälfte wurde quantitativ und qualitativ per Durchflusszytometrie (siehe Abschnitt 3.3.2.2) analysiert und mit *sham*-operierten Mäusen verglichen. Die Messung erfolgte einen halben, einen, drei und sieben Tage nach MCAO-Operation. Die *sham*-Mäuse wurden an Tag drei postoperativ untersucht.

4.1.1 Einwanderung peripherer Immunzellen

Abbildung 7 zeigt das Einwanderungsverhalten der einzelnen Zellpopulationen. Dargestellt ist die absolute Zellzahl pro Hemisphäre und Zeitpunkt. Die hier gezeigten Zellpopulationen waren unter Kontrollbedingungen kaum im Gehirn präsent (*sham*). Sie wanderten jedoch zum Teil in signifikantem Ausmaß nach Schlaganfall in die ipsilaterale Hemisphäre des Gehirns ein. Die höchsten Zell-

zahlen wurden an Tag 3 nach MCAO erreicht. Es zeigte sich keine signifikante Einwanderung in die kontralaterale Hemisphäre. Ein Vergleich der absoluten Zellzahlen an Tag 3 zeigte, dass Neutrophile Granulozyten den größten Teil der Immunzellen ausmachten, gefolgt von Makrophagen und Dendritischen Zellen. Sehr viel geringer war die Infiltration durch Lymphozyten und NK Zellen.

Tabelle 26: Absolute Zellzahlen in der ipsilateralen Hemisphäre an Tag 3 im Vergleich zu *sham*. Signifikante Änderungen sind hervorgehoben.

	<i>Sham</i>	Tag 3
Neutrophile Granulozyten	727	65 808
NK-Zellen	665	486
NKT-Zellen	60	804
Makrophagen	1339	29 825
T-Lymphozyten	532	1453
B-Lymphozyten	847	1553
CD8+-T-Lymphozyten	279	551
CD4+-T-Lymphozyten	207	667
doppelt negative T-Lymphozyten	45	229
myeloide Dendritische Zellen	545	11 839
nicht myeloide Dendritische Zellen	45	1148

Die Anzahl der Neutrophilen Granulozyten (Abbildung 7A) zeigte an Tag 0,5 und 1 nach Schlaganfall keine signifikante Änderung. Erst an Tag 3 lag ein signifikanter Anstieg der Neutrophilen in die vom Schlaganfall betroffene Hemisphäre vor. An Tag 7 hatte die Zahl wieder abgenommen.

Die Anzahl der NK-Zellen (Abbildung 7B weiß) blieb nach experimentell induziertem Schlaganfall weitestgehend konstant.

Die den NK-Zellen verwandten NKT-Zellen (Abbildung 7B schwarz) zeigten an Tag 3 nach Schlaganfall eine signifikante Erhöhung der Zellzahl, die sich zu Tag 7 wieder verringerte.

Die Anzahl der Makrophagen (Abbildung 7C) stieg nach Schlaganfall stetig an. Bereits an Tag 1 zeigte sich eine signifikante Erhöhung (22590 Zellen ipsilateral). An Tag 3 war die maximale Zellzahl beobachtbar, bei deutlicher Reduktion bis zu Tag 7.

T-Lymphozyten (Abbildung 7D schwarz) zeigten an Tag 3 eine signifikante Erhöhung ihrer Zellzahl.

B-Lymphozyten (Abbildung 7D weiß) waren zu keinem Zeitpunkt signifikant erhöht.

Auch die CD8⁺-T-Lymphozyten (Abbildung 7E weiß) waren nach Schlaganfall nicht signifikant erhöht. Die CD4⁺-T-Lymphozyten (Abbildung 7E grau) waren hingegen an Tag 3 signifikant vermehrt. Die doppelt negativen T-Lymphozyten (Abbildung 7E schwarz) zeigten sowohl an Tag 1 als auch an Tag 3 einen signifikanten Anstieg ihrer Zellzahl.

Die Dendritischen Zellen (Abbildung 7E) wurden unterschieden in myeloide Dendritische Zellen (weiß) und nicht myeloide Dendritische Zellen (schwarz). Beide Zellpopulationen waren bereits an Tag 1 nach Schlaganfall in das Gehirn eingewandert und waren an Tag 3 signifikant erhöht. An Tag 7 war ihre Zellzahl wieder reduziert.

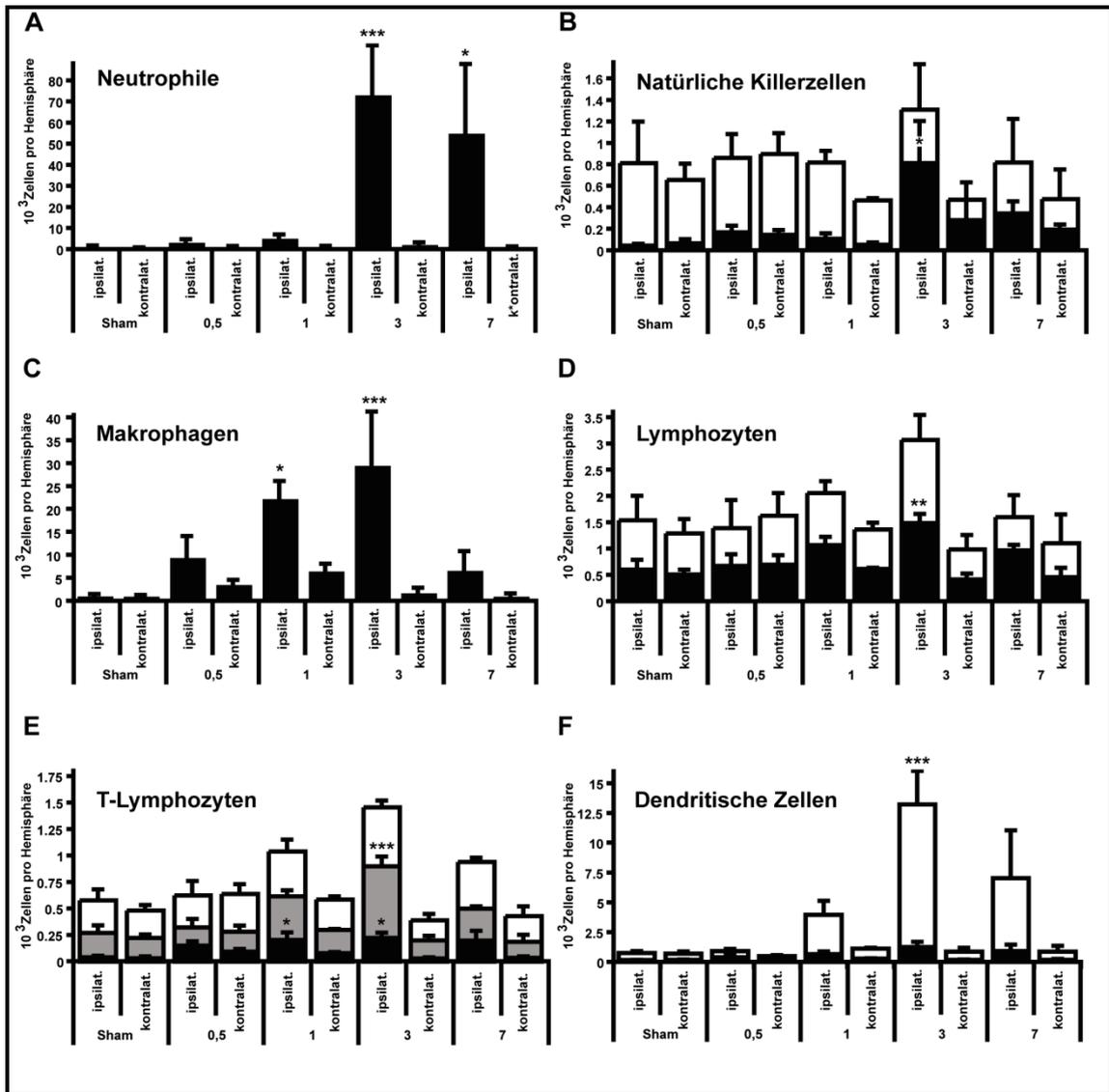


Abbildung 7: Einwanderungskinetik peripherer Immunzellen nach MCAO. Dargestellt ist die absolute Zellzahl pro Maus, Hemisphäre und Zeitpunkt. **A** Neutrophile Granulozyten. **B** Natürliche Killerzellen; weiß: NK-Zellen; schwarz: NKT-Zellen. **C** Makrophagen. **D** Lymphozyten; weiß: B-Lymphozyten; schwarz: T-Lymphozyten. **E** T-Lymphozyten; weiß: CD8+; grau: CD4+; schwarz: DN. **F** Dendritische Zellen; weiß: myeloid; schwarz: nicht-myeloid. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$. $n = 3$ für sham, 0,5 d, 1 d, 3 d und $n = 2$ für 7 d.

Abbildung 8 zeigt die Einwanderungskinetik von Makrophagen und Neutrophilen Granulozyten im direkten Vergleich. Die Makrophagen zeigten eine deutlich frühere Infiltration in die ipsilaterale Hemisphäre und dadurch eine signifikant höhere Zellzahl an Tag 1. Die Neutrophilen hingegen erreichten höhere maximale Zellzahlen an Tag 3.

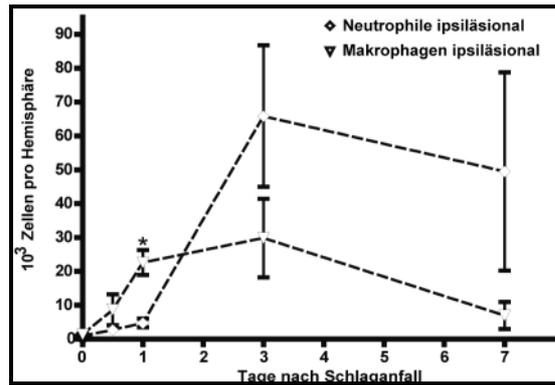


Abbildung 8: Ipsilaterale Einwanderung von Neutrophilen Granulozyten und Makrophagen im Vergleich. Dargestellt sind die absoluten Zellzahlen von Makrophagen und Neutrophilen Granulozyten in der ipsilateralen Hemisphäre. * $p \leq 0,05$. $n = 3$ für *sham*, 0,5 d, 1 d, 3 d und $n = 2$ für 7 d.

4.1.2 Akkumulation von Mikroglia

Abbildung 9 zeigt die Akkumulationskinetik von Mikroglia nach MCAO. Mikroglia sind als Bestandteil der Gliazellen physiologisch im Gehirn vorhanden und stellen somit die mengenmäßig größte Fraktion der untersuchten Zelltypen unter Normalkondition dar. Nach experimentell induziertem Schlaganfall stieg die Zahl der Mikroglia in der ipsilateralen Hemisphäre signifikant an. Der maximale Wert wurde an Tag 1 beobachtet – danach nahm die Zellzahl bis zu Tag 7 kontinuierlich ab.

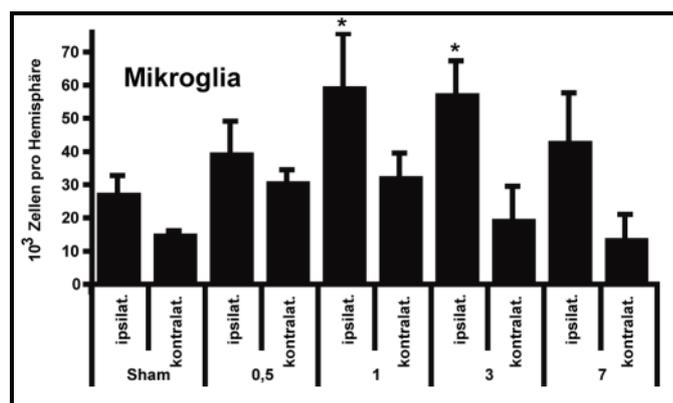


Abbildung 9: Akkumulationskinetik von Mikroglia nach MCAO. Dargestellt ist die absolute Zellzahl von Mikroglia pro Hemisphäre und Zeitpunkt. * $p \leq 0,05$. $n = 3$ für *sham*, 0,5 d, 1 d, 3 d und $n = 2$ für 7 d.

Abbildung 10 zeigt die prozentuale Verteilung von Mikroglia (weiß), Neutrophilen Granulozyten (grau) und übrigen Zellen (schwarz) über die Zeit. Unter Kon-

trollbedingungen bildeten die Mikroglia mit ca. 80 % den größten Anteil der untersuchten Zellen im Gehirn. Im weiteren Verlauf nahm die Anzahl der peripheren Immunzellen im Gehirn zu. An Tag 3 und 7 nach Schlaganfall dominierten die Neutrophilen Granulozyten als stärkste Gruppe in der ipsilateralen Hemisphäre. Die Anzahl der Mikroglia nahm prozentual ab.

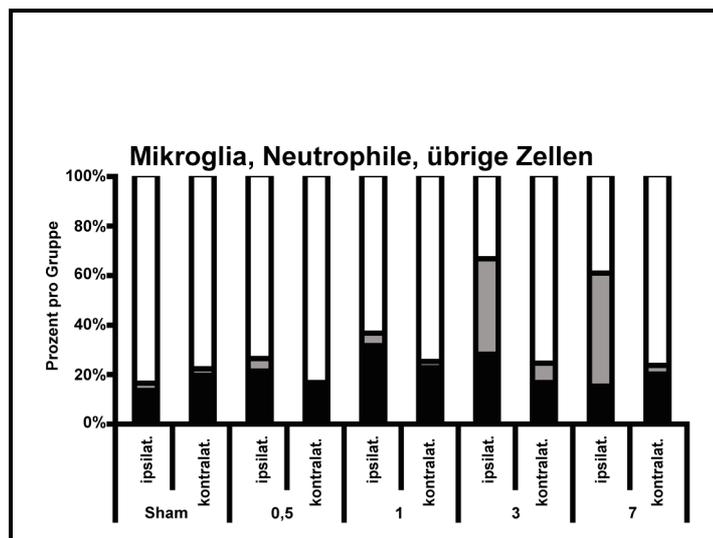


Abbildung 10: Anteil einzelner Zellgruppen am Immuninfiltrat nach MCAO. Dargestellt ist der prozentuale Anteil von Mikroglia, Neutrophilen Granulozyten und übrigen Zellen am Gesamt-Immuninfiltrat. Weiß: Mikroglia; grau: Neutrophile Granulozyten; schwarz: übrige Zellen (Makrophagen, Dendritische Zellen, Lymphozyten, NK- und NKT- Zellen).

4.2 Mikroglialer Aktivierungsstatus im *in vivo*-Modell des ischämischen Schlaganfalls

Nach MCAO (siehe Abschnitt 3.1.1) wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Aktivierungsstatus von Mikroglia beurteilt. Hierfür wurden die Oberflächenmoleküle (MHCII, CD80, CD40) mit Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern markiert, durchflusszytometrisch detektiert (siehe Abschnitt 3.3.2.2) und der Medianwert der Fluoreszenzintensität gebildet. Von den jeweiligen Werten wurde die unspezifische Hintergrundfluoreszenz subtrahiert.

Abbildung 6B zeigt exemplarisch die Oberflächenexpression von MHCII auf Mikroglia. Diese wurde anhand der Fluoreszenzintensität des mit FITC-gekoppelten anti-MHCII-Antikörpers in der Durchflusszytometrie dargestellt.

In Abbildung 11 ist die Oberflächenexpression von CD80, MHCII und CD40 in der ipsilateralen Hemisphäre nach MCAO als Median der Fluoreszenzintensität dargestellt. Abgebildet sind Mittelwert und Standardfehler drei voneinander unabhängiger Experimente. Die mikrogliale Expression von CD80, MHCII und CD40 zeigte nach MCAO keine signifikante Änderung. Auffällig ist jedoch die Erhöhung von CD80 an Tag 3 nach MCAO.

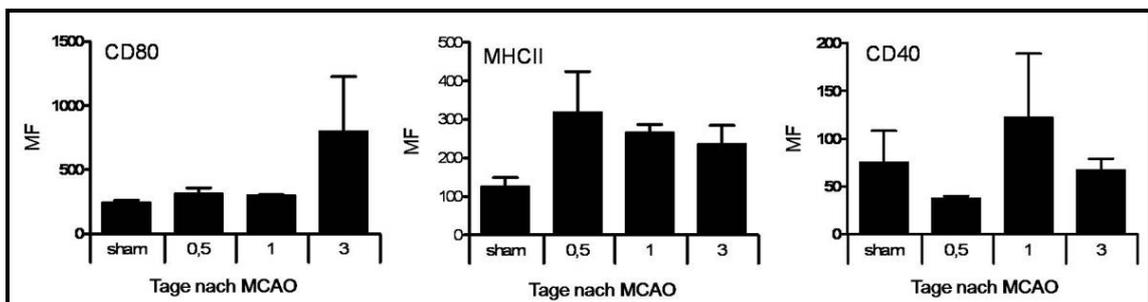


Abbildung 11: Expression von Oberflächenmolekülen auf Mikroglia nach MCAO. Dargestellt ist der Medianwert der Fluoreszenzintensität (MF) von CD80, MHCII und CD40 als Mittelwert und Standardfehler. Die Werte beziehen sich jeweils auf die ipsilaterale Seite. n = 3.

4.3 Reaktion von Mikroglia auf *Oxygen Glucose Deprivation* im *in vitro*-Modell des ischämischen Schlaganfalls

Zur mikroglialen Aktivierungsanalyse *in vitro* wurde eine primäre gliale Zellkultur (siehe Abschnitt 3.2.1) hergestellt und die Auswirkungen einer OGD (siehe Abschnitt 3.2.4) auf die Expression kostimulatorischer Moleküle untersucht.

4.3.1 Immunzytochemische Darstellung der Gliakultur

Die Gliakultur wurde immunzytochemisch (siehe Abschnitt 3.3) dargestellt. Der blau fluoreszierende Farbstoff DAPI zeigte die DNA aller Zellkerne. Die Kultur bestand hauptsächlich aus GFAP-positiven Astrozyten und Iba1-positiven Mikroglia (Abbildung 12). GFAP ist der Hauptbestandteil glialer Filamente differenzierter Astrozyten und Iba1 ein Calcium-bindendes Protein in Mikroglia und Makrophagen. Vereinzelt konnten auch NG2 positive Zellen detektiert werden (Abbildung 13). Das Chondroitin-Sulfat-Proteoglykan NG2 ist ein integrales Membranprotein oligodendrozytischer Vorläuferzellen.

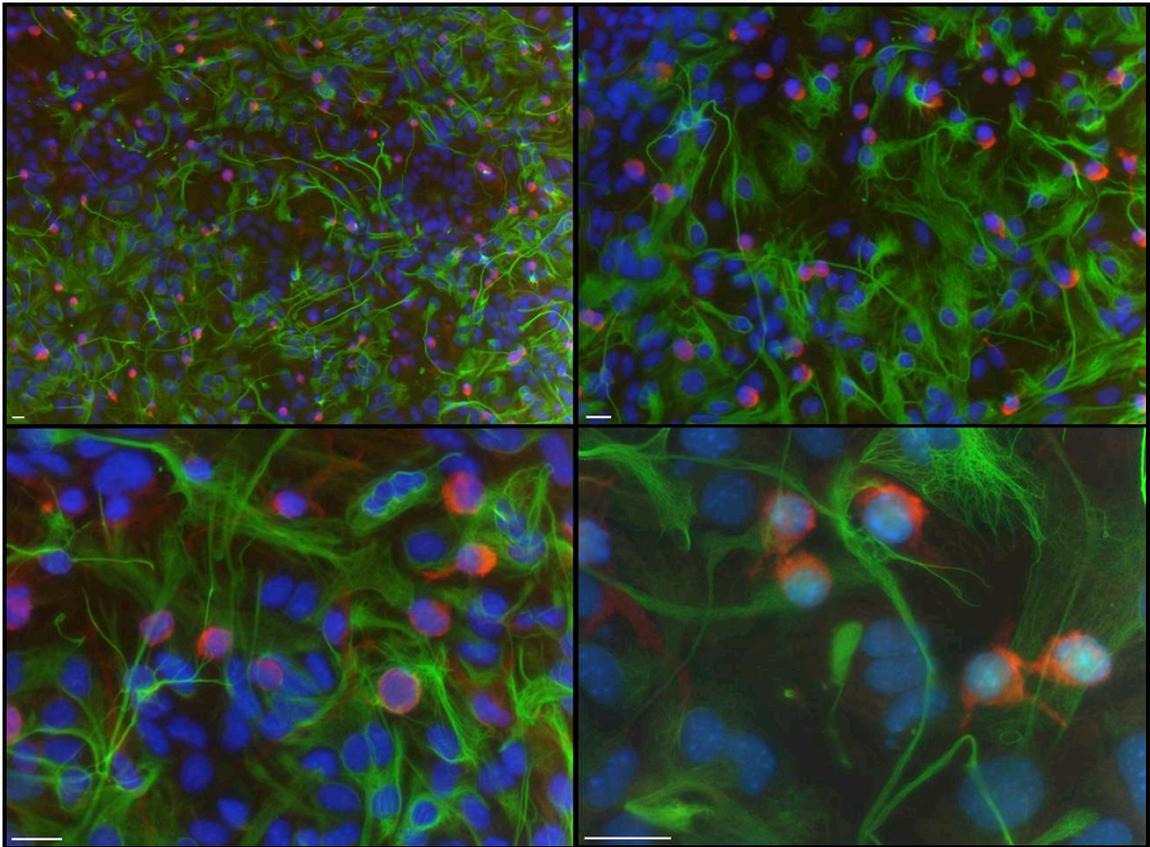


Abbildung 12: Primäre Gliakultur – Nachweis von Astrozyten und Mikroglia. Immunzytochemisches Bild einer Gliakultur (DIV 14). Dargestellt sind GFAP-positive Astrozyten (grün) und Iba1-positive Mikroglia (rot) sowie deren Zellkerne (DAPI, blau). Messbalken: 20 µm.

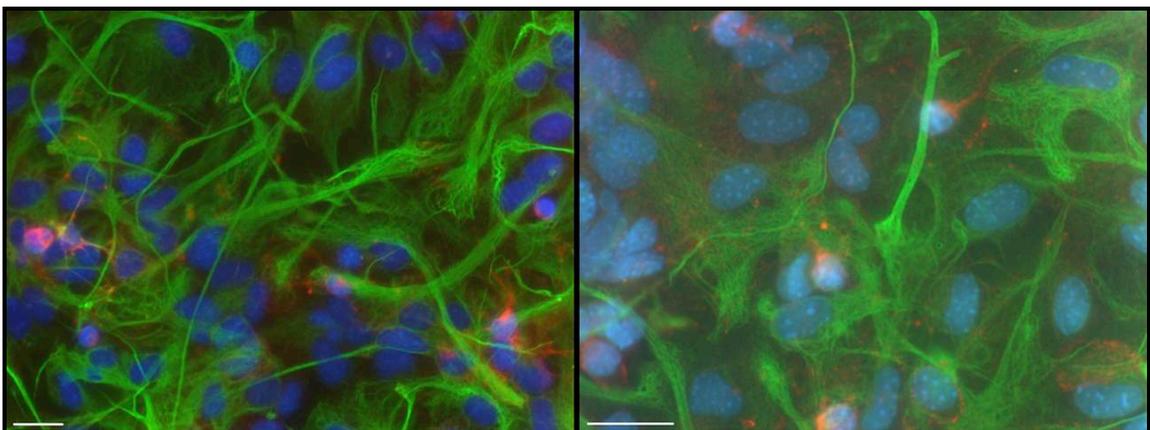


Abbildung 13: Primäre Gliakultur – Nachweis von Astrozyten und Vorläufer-Oligodendrozyten. Immunzytochemische Analyse einer Gliakultur (DIV 14). Dargestellt sind GFAP-positive Astrozyten (grün) und NG2-positive oligodendrozytische Vorläuferzellen (rot) sowie deren Zellkerne (DAPI, blau). Messbalken: 20 µm.

4.3.2 Mikroglialer Aktivierungsstatus nach OGD

Gliakulturen (DIV 14) wurden mit OGD (0,5 h, 3 h, 6 h, 9 h) (siehe Abschnitt 3.2.4) behandelt und im Anschluss nach 24 h durchflusszytometrisch auf die Expression von Oberflächenmolekülen (CD80, MHCII, CD40) (siehe Abschnitt 3.3.2.1) untersucht.

Abbildung 14 zeigt den *Median Fluorescence Index* (MFI) von CD80, MHCII und CD40. Dieser entspricht dem Medianwert der Fluoreszenzintensität, normiert auf die jeweilige Kontrolle. Dargestellt wurden Mittelwert und Standardfehler drei bzw. vier voneinander unabhängiger Experimente.

Bei keiner der OGD-Zeitspannen kam es zu einer signifikanten Änderung der Expressionsmenge der untersuchten mikroglialen Oberflächenmoleküle im Vergleich zur Kontrolle.

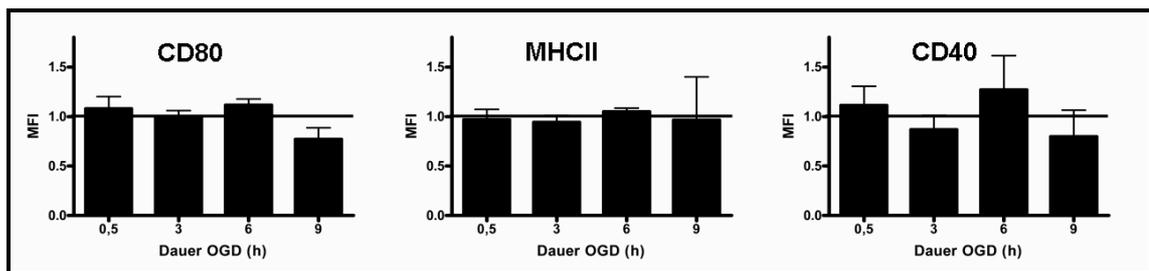


Abbildung 14: Expression kostimulatorischer Oberflächenmoleküle. Dargestellt ist der MFI von CD80, MHCII und CD40 auf Mikroglia nach OGD als Mittelwert mit Standardfehler. n = 3 für 0,5 h und 9 h; n = 4 für 3 h und 6 h.

4.4 Reaktion von Mikroglia auf *Oxygen Glucose Deprivation*-gestresste Neurone – *Sandwichkultur*

Im letzten Teil mikroglialer Aktivierungsanalyse wurde eine *Sandwichkultur* (siehe Abschnitt 3.2.3) aus Gliazellen und Neuronen konzipiert. Dies ermöglichte die Untersuchung mikroglialer Oberflächenmoleküle (CD80, MHCII und CD40) und proinflammatorischer Zytokine (TNF- α , IL-6) nach Interaktion mit OGD-gestressten Neuronen.

4.4.1 Glia und Neuronenkultur unter *Sandwich*-Bedingung

Mikroskopische Phasenkontrastbilder der *Sandwichkultur* zeigen die Zusammensetzung und die Morphologie der Zellen.

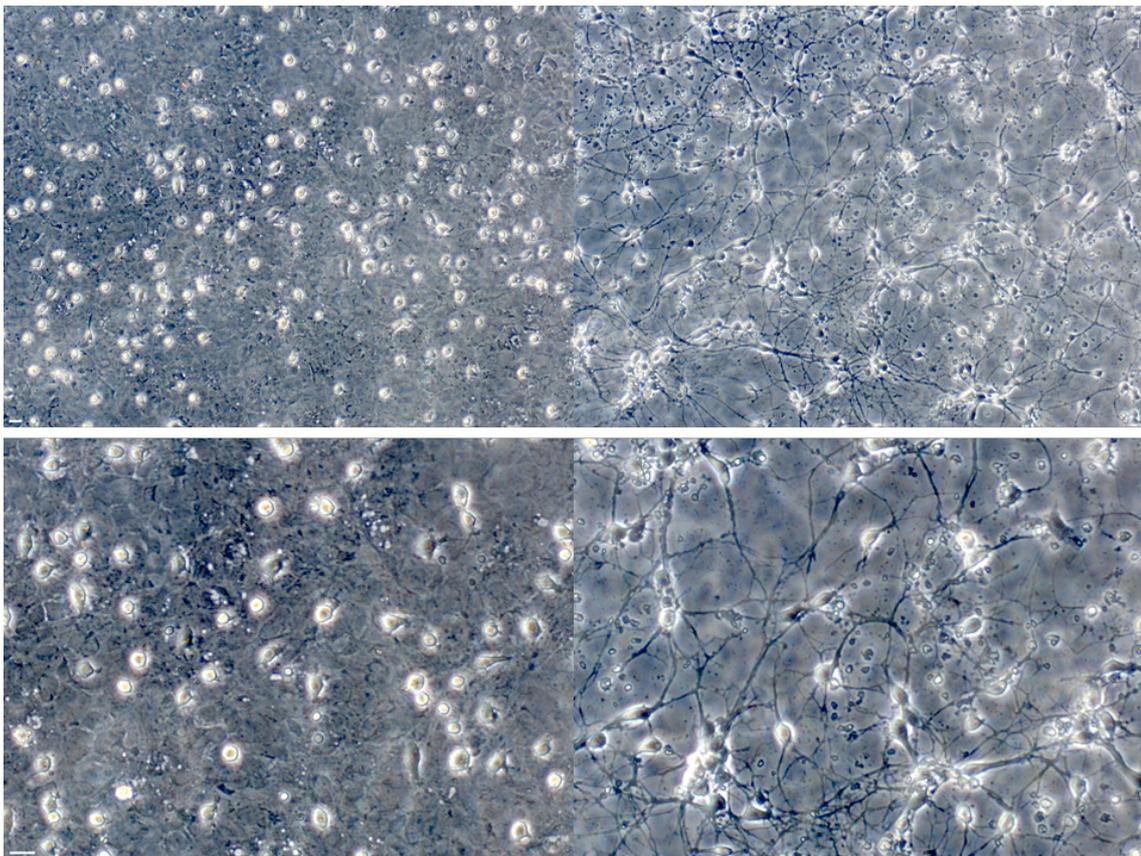


Abbildung 15: Mikroglia und Neurone in der *Sandwichkultur*. Das jeweils linke Bild zeigt die Gliazellen, das rechte die Neurone. Die Mikroglia weisen eine abgerundete Morphologie auf und liegen dem Astrozytenrasen auf. Die Neurone bilden ein verzweigtes Netz aus Dendriten und Axonen. Messbalken: 20 μm .

4.4.2 Mikroglialer Aktivierungsstatus nach Interaktion mit OGD-gestressten Neuronen

Neurone (DIV 7) wurden einer einstündigen OGD unterzogen und im Anschluss auf eine Gliakultur gesetzt. 24 h später wurden die Neurone entfernt, die Mikroglia von den Astrozyten getrennt und auf Aktivierung untersucht. Als Kontrolle dienten Neurone, die keiner OGD unterzogen wurden.

4.4.2.1 Expression kostimulatorischer Oberflächenmoleküle

Die mikrogliale Expression von CD80, MHCII und CD40 wurde mittels Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern analysiert und der MFI gebildet. Dargestellt wurden Mittelwert und Standardfehler über fünf von einander unabhängigen Experimenten.

Die mikrogliale Expression von CD80 und CD40 ist nach Interaktion mit OGD-gestressten Neuronen signifikant reduziert.

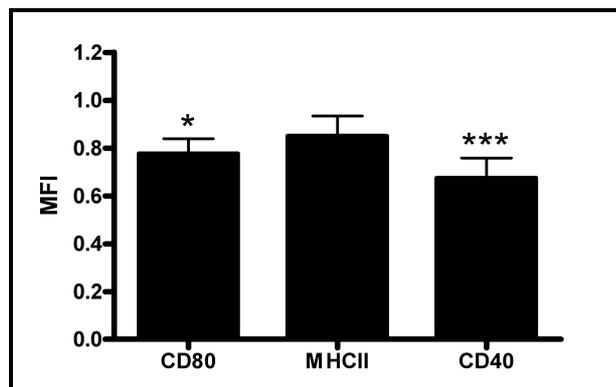


Abbildung 16: Expression kostimulatorischer Oberflächenmoleküle. Dargestellt ist der MFI von CD80, MHCII und CD40 auf Mikroglia nach Interaktion mit OGD-gestressten Neuronen als Mittelwert mit Standardfehler. * $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,001$. $n = 5$.

4.4.2.2 Bildung proinflammatorischer Zytokine

Parallel zur Untersuchung der Oberflächenmoleküle wurde das Medium der *Sandwichkultur* mittels ELISA auf TNF- α und IL-6 untersucht. Einstündige OGD der Neurone führte zu keiner signifikanten Änderung der TNF- α - und IL-6-Konzentration im Überstand der *Sandwichkultur* im Vergleich zur Kontrolle.

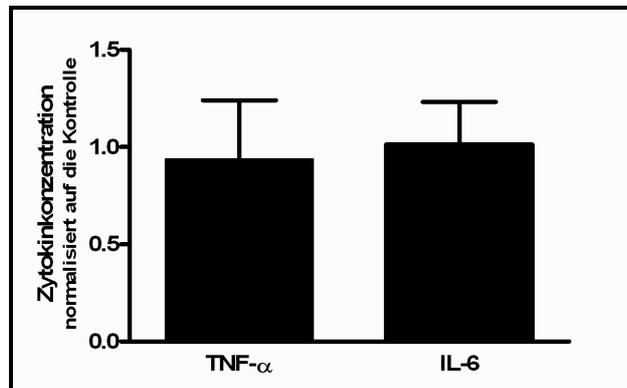


Abbildung 17: TNF- α - und IL-6 in der *Sandwichkultur*. Dargestellt ist die im ELISA gemessene Konzentration von TNF- α - und IL-6 im Überstand der *Sandwichkultur*. Die Zytokin-Konzentrationen wurden auf die jeweilige Kontrolle normalisiert. Es fand sich keine signifikante Änderung der Konzentrationen unter der Behandlung mit OGD im Vergleich zur Kontroll-Kultur.

5 Diskussion

5.1 Immuninfiltration – Die Reperfusionphase im ischämischen Schlaganfall

Das Gehirn besteht im Wesentlichen aus zwei Zellpopulationen, den Neuronen und den Gliazellen. Im menschlichen Gehirn kommen auf 100 Milliarden Neurone ca. 1 Billion Gliazellen (Faktor 1:10) (Schünke, 2006). Während die Neurone für die Signalverarbeitung zuständig sind, besteht die Bedeutung der Gliazellen in der Aufrechterhaltung des besonderen intrakraniellen Milieus. Aufgrund des nach außen durch die Bluthirnschranke relativ abgeschlossenen Raums findet man im Vergleich zu anderen Organen kaum periphere Immunzellen. Unter bestimmten pathologischen Voraussetzungen, wie im ischämischen Schlaganfall, können jedoch periphere Immunzellen das Gehirn infiltrieren und zusammen mit Gliazellen im geschädigten Areal akkumulieren, sodass im Verlauf eine komplexe Immunreaktion entsteht. Um die immunologische Bedeutung der Reperfusionphase für den Schlaganfall zu verstehen, ist die Kenntnis über die Zusammensetzung und die zeitliche Abfolge der Immunzellinfiltration in Zusammenschau mit immunologischen Zellqualitäten wichtig.

Makrophagen und Mikroglia sind die ersten immunologisch wichtigen Zellpopulationen, die nach ischämischen Schlaganfall im Gehirn akkumulieren. Einen Tag nach MCAO fanden sich bereits signifikant erhöhte Zellzahlen beider Populationen in der ipsilateralen Hemisphäre. Mengenmäßig am stärksten vertreten waren zu diesem Zeitpunkt die Mikroglia. Dies deckt sich mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, die ebenfalls eine frühe Akkumulation von Mikroglia ab einem Tag nach fokaler Ischämie beobachtet haben (Schilling et al., 2003, Denes et al., 2007). Mikroglia sind im Gegensatz zu peripheren Immunzellen bereits unter physiologischen Bedingungen in großer Zahl im Gehirn präsent und erfüllen wichtige Funktionen in der frühen Phase einer Immunreaktion. Ihre Fortsätze sind in ständiger Bewegung, auf der Suche nach pathologischen Ereignissen im Gehirn. Werden diese ATP-getriggert wahrgenommen, richten sich die Fortsätze dorthin aus (Davalos et al., 2005). Kommt es zu größeren Schäden, akkumulieren die Zellen im Gebiet der Läsion und beginnen mit der Phagozyto-

se, einer wichtigen immunologischen Funktion. Durch mikrogliale Phagozytose werden z.B. abgestorbene Zellen in der Hirnentwicklung (Ashwell, 1990), amyloide Plaques beim Morbus Alzheimer (Simard et al., 2006) und nekrotisches Gewebe bei der fokalen Ischämie beseitigt (Schroeter et al., 1997). Darüberhinaus gibt es Arbeiten zur mikroglialen Phagozytose apoptotischer Neurone in der Penumbra (Ito et al.) und zur Phagozytose Neutrophiler Granulozyten nach MCAO (Denes et al., 2007, Neumann et al., 2008) – beide mit dem Ergebnis eines neuroprotektiven Charakters von Mikroglia. Dennoch könne die Phagozytose als beginnende Immunreaktion je nach Rezeptorrepertoire pro- oder antiinflammatorisch ausfallen (Neumann et al., 2009). So führe die Phagozytose apoptotischer Zellen zur Produktion antiinflammatorischer Zytokine, die Phagozytose von Bakterien hingegen zur Produktion proinflammatorischer Zytokine. Die Bildung von Zytokinen ist neben der Phagozytose eine zweite immunologische Qualität von Makrophagen und Mikroglia. Erhöhte Zytokinspiegel (z.B. TNF- α , IL-6, MCP-1) konnten nach experimentell-induziertem Schlaganfall sowohl im Gehirn als auch peripher gemessen werden (Offner et al., 2005). Das so geschaffene Zytokinmilieu lockt im Verlauf andere Immunzellen wie Neutrophile Granulozyten an. Die phagozytierten Antigene werden darüberhinaus auf der Zelloberfläche präsentiert. Hierdurch erlangen Makrophagen und Mikroglia die Fähigkeit mit anderen Immunzellen zu interagieren und gehören damit zur Gruppe der antigenpräsentierenden Zellen – eine dritte immunologische Qualität von Mikroglia und Makrophagen. Abschließend bleibt in diesem Sinne festzuhalten, dass die frühe Infiltration von Mikroglia und Makrophagen wichtig ist, damit sie in ihrer Funktion als Phagozyten zeitnah Zelltrümmer beseitigen und durch Zytokinproduktion und eventuell durch Antigenpräsentation eine spezifische Immunreaktion einleiten.

Es konnte gezeigt werden, dass eine signifikante Infiltration von Neutrophilen Granulozyten erst an Tag 3 nach Schlaganfall beginnt und sich bis Tag 7 fortsetzt. Damit folgten sie zeitlich versetzt den Makrophagen und Mikroglia. Mengemäßig bildeten sie dann jedoch die Majorität. Ihre Zahl überstieg zu diesem Zeitpunkt sogar die der hirneigenen Mikroglia. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen einer anderen Arbeitsgruppe, die ebenfalls eine spätere Infiltration von Neutrophilen beobachten konnte (Denes et al., 2007). Andere Arbeiten hingegen beschreiben eine frühe Infiltration von Neutrophilen als erste

Zellgruppe nach Schlaganfall (Garcia et al., 1994, Barone et al., 1992, Schilling et al., 2003, Lyons et al., 2000). Neutrophilen Granulozyten sind wie Makrophagen und Mikroglia Akteure der unspezifischen Immunantwort. Auch sie sind in der Lage zu phagozytieren und können zudem effektiv Mikroorganismen abtöten. Ihre immunologische Bedeutung liegt daher vor allem in einer frühen Antwort auf bakterielle Infektionen. Zwar handelt es sich beim Schlaganfall nicht um eine infektiöse Erkrankung, aber man hat beobachtet, dass die Akkumulation von Neutrophilen bei Patienten mit einem Schlaganfall positiv mit der Größe des Infarkts und dem neurologischen Defizit korreliert (Akopov et al., 1996).

Eine weitere immunologisch wichtige Zellpopulation sind die Dendritischen Zellen. Auch diese wanderten nach MCAO in sehr deutlichem Ausmaß in die ipsilaterale Hemisphäre ein. Die stärkste Akkumulation fand sich ebenfalls an Tag 3 nach MCAO. Untersuchungen einer anderen Arbeitsgruppe zeigten eine Akkumulation von Dendritischen Zellen in der ipsilateralen Hemisphäre nach photochemisch induzierter, kortikaler Ischämie, die an Tag 1 begann und eine mehrwöchige Persistenz hatte (Reichmann et al., 2002). Dendritische Zellen sind professionelle antigenpräsentierende Zellen und besitzen die Fähigkeit, naive T-Lymphozyten zu aktivieren. Sie fungieren als Bindeglied der natürlichen und der adaptiven Immunantwort und sind wichtige Regulatoren der Immunantwort. Sie spielen vermutlich auch im Schlaganfall eine bedeutende Rolle bei der Entscheidung über Immunaktivierung oder Immuntoleranz.

Lymphozyten als Bestandteil der adaptiven Immunantwort wanderten in moderatem Ausmaß nach MCAO in das Gehirn ein. An Tag 3 waren die T-Lymphozyten signifikant erhöht. Insbesondere handelte es sich hierbei um eine Zunahme von CD4+-T-Zellen. Diese besitzen je nach Differenzierungstyp (TH₁, TH₂, TH₁₇, Treg) sehr variable immunologische Funktionen, insbesondere regulatorischer Art. Im Gehirn wurde diese Zellgruppe vornehmlich in der Multiplen Sklerose untersucht, wo sie von entscheidender Bedeutung im Balanceakt zwischen Immunreaktion und Toleranz ist (Dittel, 2008). Neben den CD4+-T-Zellen konnten die doppelt negativen T-Zellen sowohl an Tag 1 als auch an Tag 3 leicht erhöht nachgewiesen werden. Diese Zellen besitzen weder CD4 noch CD8 und sind vermutlich ebenfalls für regulatorische Vorgänge von Bedeutung. Sie wurden z.B. vermehrt bei Patienten mit systemischen Lupus Erythematosus gefunden. Dort zeigten sie Interaktionen mit B-Zellen, was zur Autoantikörper-

produktion beitrug (Sieling et al., 2000). Eine andere Arbeitsgruppe konnte sie in vermehrten Ausmaß bei Patienten mit der Autoimmunerkrankung Morbus Behcet nachweisen (Ling et al., 2007). Die Bedeutung der Lymphozyten für den Schlaganfall ist weniger klar. Jedoch gibt es Untersuchungen, die bei fehlenden CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen im Schlaganfall ein kleineres Infarktvolumen und geringeres neurologisches Defizit gezeigt haben (Yilmaz et al., 2006a). Dies spricht für eine schädigende Wirkung dieser Zellgruppe im Schlaganfall. Neuere Untersuchungen geben Hinweise, dass es sich dabei jedoch nicht um adaptive, antigenabhängige T-Zell-Interaktionen handelt. Für adaptive T-Zell-Interaktionen sind intakte T-Zell-Rezeptoren und kostimulatorische Moleküle notwendig. In den Untersuchungen zeigten jedoch die Mäuse mit transgenen T-Zell-Rezeptoren oder mutierten kostimulatorischen Molekülen gleiche Infarktvolumina wie Wildtypmäuse während T-Zell-defiziente Mäusen ein kleineres Infarktvolumen nach MCAO hatten (Kleinschnitz et al.). T-Lymphozyten spielten zwar eine Rolle für das Infarktvolumen, nicht jedoch die für adaptive Immunreaktionen notwendigen Oberflächenmoleküle.

Ebenfalls interessant erscheint die Funktion von Treg's im Schlaganfall. Untersuchungen einer anderen Arbeitsgruppe haben eine Erhöhung des Anteils von Treg's im peripheren Blut bei Patienten mit Schlaganfall gezeigt (Yan et al., 2009). Treg's erfüllen vermutlich neuroprotektive Funktionen. So wurde herausgefunden, dass die Depletion von Treg's im MCAO-Modell zu einer vermehrten Aktivierung von Mikroglia und T-Zellen mit gesteigerter Zytokinproduktion führt und eine Vergrößerung des neurologischen Schadens bewirkt. Dieser Effekt konnte wiederum durch eine IL-10 Substitution aufgehoben werden, was die Bedeutung dieses Zytokins für die Treg-vermittelte Neuroprotektion verdeutlicht (Liesz et al., 2009).

B-Zellen zeigten keine signifikante Änderung der Zellzahl nach MCAO. Dies bestätigt sich in MCAO-Experimenten einer anderen Arbeitsgruppe. Dort hatte die Depletion von B-Zellen keinen Effekt auf das Infarktvolumen. Auch die Substitution von B-Zellen in transgene B- und T-Zell defiziente Mäuse, die nach MCAO ein kleineres Infarktvolumen zeigten, blieb ohne Auswirkungen (Kleinschnitz et al.). B-Zellen sind die Hauptakteure der humoralen Immunantwort. Sie erkennen über den B-Zell-Rezeptor das für sie spezifische Antigen und werden über die Interaktion mit antigenpräsentierenden Zellen aktiviert. Durch

die Bildung spezifischer Immunglobuline werden die Antigene neutralisiert und opsonisiert. Dadurch werden die Pathogene für das Immunsystem sichtbar gemacht und können im Folgenden beseitigt werden. Damit liegt die zentrale Bedeutung der B-Zellen in der Abwehr körperfremder Antigene, wie z.B. beim Vorliegen bakterieller Infektionen. Da dies im Schlaganfall vorrangig keine Rolle spielt, ist die Abwesenheit der B-Zellen nach MCAO plausibel.

Im Gegensatz zu den regulatorisch wichtigen Zellen der adaptiven Immunantwort gab es in der Gruppe der Effektor-Immunzellen keine signifikanten Änderungen der Zellzahlen. Weder CD8⁺-T-Zellen noch NK-Zellen waren nach MCAO signifikant erhöht. CD8⁺ T-Zellen erkennen intrazelluläre Pathogene wie Viren oder entartete Körperzellen über fremde, MHC-I-gebundene Antigene. Es kommt zu einer Zerstörung der betroffenen Körperzelle durch die T-Zelle. Entzieht sich die Zelle jedoch durch Herunterregulation ihrer MHC-I-Moleküle der CD8⁺-T-Zell-Abwehr, wird sie von NK-Zellen aufgespürt. Diese registrieren die verminderte MHC-I-Dichte auf der Zelle und töten diese ab. Eine eher geringe Relevanz von CD8⁺-T-Zellen und NK-Zellen für den Schlaganfall ist nachvollziehbar, da zumeist weder intrazelluläre Erreger noch entartete Zellen im Schlaganfall anfallen. Im Gegensatz dazu konnte jedoch die Arbeitsgruppe um Yilmaz einen Einfluss von CD8⁺-T-Zellen auf den Reperfusionsschaden nach MCAO feststellen. Mäuse ohne CD8⁺-T-Zellen hatten nach MCAO signifikant kleinere Infarkt volumina (Yilmaz et al., 2006b).

In unserem Modell signifikant erhöht waren hingegen die NKT-Zellen. Diese zeigten eine deutlich erhöhte Zahl an Tag 3 nach MCAO. Im Gegensatz zu den Effektorzellen, NK-Zellen und CD8⁺-T-Zellen, besitzen sie v.a. immunregulatorische Fähigkeiten. Je nach Zytokinmuster fördern sie eine TH₁- und damit proinflammatorische, oder eine TH₂- und damit antiinflammatorische Antwort (Godfrey and Kronenberg, 2004). Ihre genaue immunologische Bedeutung für den Schlaganfall ist jedoch noch nicht geklärt.

Insgesamt decken sich die oben dargestellten Ergebnisse weitestgehend mit bereits 2001 veröffentlichten Ergebnissen einer anderen Arbeitsgruppe. Deren Arbeit befasst sich ebenfalls mit der Immuninfiltration von Mikroglia, Makrophagen, Neutrophilen und T-Zellen nach MCAO mittels FACS-Analyse (Stevens et al., 2002). Sie beschreibt auch eine frühe Akkumulation aktivierter Mikroglia und

Makrophagen ab 18 h nach MCAO, mit einem Peak bei 48 h. Es folgt ebenfalls die Infiltration von Neutrophilen ab 48 h und die im Vergleich sehr kleine, jedoch signifikante Ansammlung von T-Zellen ab 72 h nach MCAO. Sie unterscheiden jedoch in ihrer Untersuchung nicht zwischen aktivierten Mikroglia und Makrophagen, wohingegen wir Mikroglia als CD45 intermediär und Makrophagen als CD45 hoch exprimierende Zellen klassifizierten. Die Abgrenzung beider Populationen ohne einen für Mikroglia spezifischen Antikörper war jedoch nicht immer eindeutig zu ziehen – ein methodisch zu optimierender Aspekt.

Abschließend findet sich in Abbildung 18 eine Zusammenfassung der zeitlichen Dynamik der Immunzellinfiltration nach MCAO. Quantitativ stark vertreten waren vor allem die Zellen der unspezifischen Immunantwort; auffällig war die den Mikroglia und Makrophagen nachgestellte Infiltration der Neutrophilen Granulozyten. Die Zellen der adaptiven Immunantwort wanderten dagegen in moderatem Ausmaß ein. Hier spielen anscheinend die regulatorisch wichtigen Zellen, wie Dendritische Zellen, CD4⁺-T-Zellen und NKT-Zellen, eine größere Rolle als die eigentlichen Effektor-Immunzellen und die humorale Immunität.

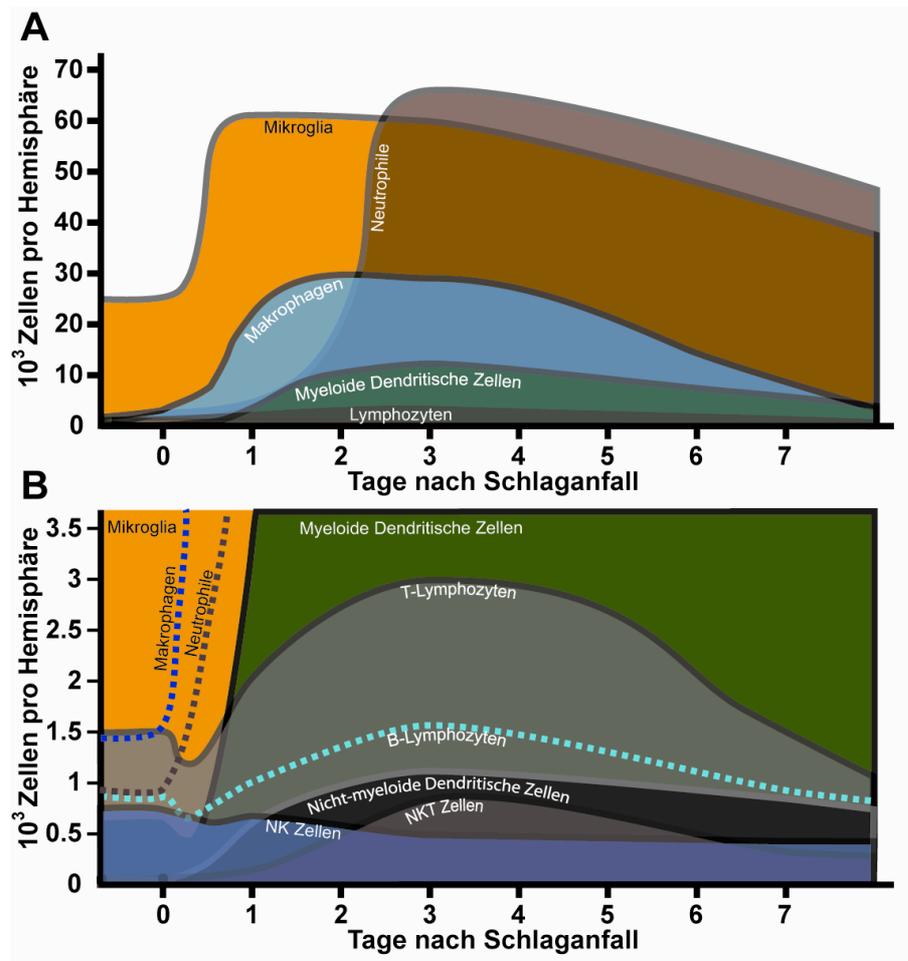


Abbildung 18: Schematische Darstellung der Einwanderungskinetik von Immunzellen nach MCAO. Dargestellt sind die absoluten Zellzahlen der einzelnen Populationen in der ipsilateralen Hemisphäre zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach MCAO. Am stärksten vertreten waren die Zellen der unspezifischen Immunantwort. In geringerem Ausmaß wanderten die regulatorisch wichtigen Zellen ein. Effektor-Immunzellen zeigten keine signifikante Einwanderungskinetik.

5.2 Mikroglia und Schlaganfall – Mediatoren einer adaptiven Immunantwort?

Mikroglia sind immunfähige Zellen der Gliapopulation im Gehirn und machen etwa 10-20 % derer aus (Soulet and Rivest, 2008). Sie besitzen die Fähigkeit über Zellfortsätze die Umgebung nach Störungen zu durchsuchen, um im Falle dessen mit der Beseitigung einer solchen zu beginnen. Dazu stehen ihnen hauptsächlich drei Möglichkeiten zur Verfügung: Phagozytose, Zytokinproduktion und Antigenpräsentation. Wie und in welchem Ausmaß diese stattfinden,

hängt jedoch von der Aktivierung der Mikroglia ab und soll im weiteren diskutiert werden.

Anhand der Oberflächenexpression von MHCII, CD80 und CD40 wurde die Fähigkeit zur Antigenpräsentation von Mikroglia in unterschiedlichen experimentellen Settings für den ischämischen Schlaganfall untersucht.

Nach MCAO-Operation im *in vivo*-Modell kam es zu keiner signifikanten Änderung der Anzahl von MHCII, CD80 und CD40 auf Mikroglia. Dies legt die Vermutung nahe, dass Mikroglia nicht zu kompetenten, voll aktivierten antigenpräsentierenden Zellen heranreifen und in diesem Sinne nicht zu einer adaptiven Immunantwort im Schlaganfall beitragen. Es spricht jedoch generell vieles dafür, dass Mikroglia nach Aktivierung die Fähigkeit besitzen, als antigenpräsentierende Zellen die T-Helfer-Zellantwort zu beeinflussen (Aloisi, 2001). Sie tragen wie Makrophagen, Dendritische Zellen und B-Lymphozyten die hierfür erforderlichen MHCII-Moleküle auf ihrer Oberfläche und exprimieren kostimulatorische Moleküle (CD80, CD40) (Ponomarev et al., 2005). Von Dendritischen Zellen weiß man, dass diese Moleküle hochreguliert werden, falls es zu einer Reifung bzw. Aktivierung der Zellen kommt (Schuurhuis et al., 2006). Nehmen sie z.B. über TLR einen pathogenen Stimulus wahr, sind sie in der Lage, spezifische T-Helferprofile zu aktivieren (Sporri and Reis e Sousa, 2005). Dieser Prozess findet statt, wenn eine spezifische T-Helferzelle ihr Antigen in dem MHCII-Molekül der antigenpräsentierenden Zelle erkennt, genug Antigenmoleküle über MHCII präsentiert werden und gleichzeitig eine Kostimulation stattfindet. Anders als im Schlaganfall scheinen Mikroglia im EAE-Modell wichtige antigenpräsentierende Zellen zu sein. Es konnte gezeigt werden, dass sie dort über einen mehrstufigen Reifungsprozess aktiviert werden, was sich in einer Heraufregulation von MHCII, CD86 und CD40 sowie einer Proliferationsminderung zeigt. Von besonderer Bedeutung für diesen Prozess scheint in der EAE die antigenabhängige Interaktion mit enzephalitogenen T-Zellen über CD40 zu sein (Ponomarev et al., 2006). Diese durch ein Selbstantigen geprägten T-Zellen und deren Aktivierung sind vermutlich ein entscheidendes Kriterium für die Entstehung adaptiver autoimmunologischer Prozesse in der EAE bzw. der Multiplen Sklerose im Gegensatz zum Schlaganfall.

Auch im OGD-Modell auf Zellkulturebene fand sich keine Änderung der Expression von MHCII, CD80 und CD40 auf Mikroglia. Sauerstoffentzug alleine scheint demnach kein effektiver Aktivierungsstimulus zur Antigenpräsentation zu sein. Mikroglia lassen sich jedoch auch *in vitro* aktivieren, z.B. durch die Zugabe von LPS, einem bakteriellen Endotoxin (Monje et al., 2003). Eine andere Arbeitsgruppe hat gezeigt, dass die Interaktion mit TH₁-Zellen oder die Zugabe von IFN- γ oder GM-CSF zu einer Aktivierung von Mikroglia *in vitro* führt, gemessen an der Expression von Oberflächenmolekülen oder dem T-Zellaktivierungspotential (Aloisi et al., 2000).

Während durch Sauerstoffentzug kein Effekt zu beobachten war, zeigte sich in der *Sandwichkultur* eine Abnahme von CD80 und CD40 auf Mikroglia bei konstantem MHCII. In diesem experimentellen Setting wurden Neurone durch Sauerstoffentzug gestresst und mit Mikroglia kokultiviert. Hierdurch wurde ein ischämischer Schlaganfall nachgebildet, der sich durch einen hypoxischen Schaden von Neuronen in der Kernregion und einer nachfolgenden Akkumulation von Mikroglia aus der Peripherie auszeichnet. Die Abnahme der kostimulatorischen Moleküle in diesem Experiment spricht wie auch beim MCAO-Modell gegen das Vorhandensein adaptiver Immunmechanismen durch Mikroglia im Schlaganfall. Welche Mechanismen der verminderten CD40- und CD80-Expression zugrundeliegen und welche Rolle ischämische Neurone dafür spielen, ist ein interessanter Ansatz für weitere Untersuchungen. In einer Studie im EAE-Modell wurde z.B. die Beobachtung gemacht, dass es neben voll aktivierten Mikroglia (hohes MHCII, CD86 und CD40) eine intermediär aktivierte Population mit erhöhtem MHCII und niedrigem CD86 und CD40 gibt. Diese wurde von den Autoren als ruhende Mikroglia mit *bystander activation* klassifiziert (Ponomarev et al., 2005). In Zellkulturversuchen konnte außerdem gezeigt werden, dass eine durch GM-CSF stimulierte mikrogliale Expression von CD40 und CD86 durch Zugabe von IL-4, IL-10, IL-11, TGF- β und *nerve growth factor* (NGF) herunterreguliert wird (Wei and Jonakait, 1999). Sowohl TGF- β als auch NGF werden von Neuronen produziert und als *off-signals* für Mikroglia beschrieben (Biber et al., 2007) – ein möglicher Grund der niedrigen CD80- und CD40-Expression in der OGD-behandelten *Sandwichkultur*. Ein weiteres von Biber beschriebenes neuronales *off-signal* ist CD200. CD200-*knock-out*-Mäuse zeigen z.B. eine vermehrte mikrogliale Aktivierung im EAE-Modell (Hoek et al.,

2000). Als *On-signal* für Mikroglia nennt Biber die Freisetzung von ATP und Uridindiphosphat (UDP) von geschädigten Neuronen, die zu mikroglialer Migration und Phagozytose führen (Koizumi et al., 2007, Davalos et al., 2005). Es gibt somit eine Reihe von Interaktionsmöglichkeiten zwischen Neuronen und Mikroglia und damit sicherlich vielfältige Möglichkeiten, die mikrogliale Aktivierung zu beeinflussen.

Gleichzeitige Zytokinbestimmungen im *Sandwichkultur*-Zellüberstand zeigten keine Änderung von IL-6 und TNF- α , zwei wichtigen proinflammatorischen Zytokinen. In anderen experimentellen Schlaganfallmodellen wurden hingegen sowohl im Gehirn als auch in der Peripherie erhöhte Zytokinspiegel, u.a. TNF- α und IL-6, gefunden (Offner et al., 2005). Mikroglia scheinen gemeinsam mit Makrophagen nach experimentell-induziertem Schlaganfall in der Maus die wichtigste Quelle für TNF- α zu sein (Gregersen et al., 2000). Ergebnisse einer anderen Arbeitsgruppe, die ebenfalls eine Cokultur aus Mikroglia und OGD-gestressten Neuronen konzipiert hat, zeigten eine Aktivierung der Mikroglia (Kaushal and Schlichter, 2008). Dies erfolgte über eine Glutamat-Ausschüttung von OGD-gestressten Neuronen und eine Aktivierung des NF κ B-Signalweges in Mikroglia. Die Folgen waren eine vermehrte TNF- α -Ausschüttung und eine nachfolgende Schädigung gesunder Neurone.

Ob adaptive Immunreaktionen oder gar autoimmunologische Phänomene trotz scheinbar mangelnder Antigenpräsentation im Schlaganfall dennoch stattfinden, soll im nächsten Abschnitt diskutiert werden.

5.3 Immunreaktion ja, aber welche?

Es konnte gezeigt werden, dass es nach experimentell-induziertem Schlaganfall zur Einwanderung und Akkumulation diverser peripherer und hirneigener Immunzellen kommt. Die einzelnen Zellgruppen unterschieden sich untereinander sowohl in der Quantität als auch hinsichtlich des Zeitfensters ihrer Infiltration. Stark vertreten waren vor allem Zellen der unspezifische Immunantwort. Aber auch regulatorisch wichtige Zellen wie Dendritische Zellen, CD4⁺-T-Zellen und NKT-Zellen zeigten, im Gegensatz zu zytotoxischen Effektorimmunzellen, signifikante Einwanderungsprofile.

Deutlich war auch die frühe und ausgeprägte Akkumulation von Mikroglia als hirneigene Immunzellen. Untersuchungen hinsichtlich ihres Aktivierungsstatus und der damit verbundenen immunologischen Bedeutung sprechen insgesamt eher für die These, dass Mikroglia im Schlaganfall nicht im Sinne antigenpräsentierender Zellen zu einer adaptiven Immunantwort beitragen. Es scheint im Gegenteil sogar Mechanismen zu geben, die eine Entzündung im Schlaganfall verhindern bzw. zytoprotektiv wirken. Die Herunterregulation von kostimulatorischen Molekülen auf Mikroglia könnte ein solcher Mechanismus sein. Interessant sind auch gleiche Untersuchungen zu Dendritischen Zellen, die eine isolierte Expressionserhöhung von MHCII ohne CD80 und CD40 gezeigt haben (Gelderblom et al., 2009). Ähnliche Beobachtungen lassen sich in einer Studie zur photochemisch induzierten, kortikalen Ischämie finden. Die in dieser Studie untersuchten Dendritischen Zellen wiesen einen unreifen Phänotyp (MHCII+, CD40-, CD80+, CD86+/-) auf und waren damit ebenfalls nicht zur Antigenpräsentation fähig (Reichmann et al., 2002). Insgesamt sprechen die Ergebnisse gegen das Vorhandensein adaptiver Immunreaktionen im Schlaganfall, da weder Mikroglia noch Dendritische Zellen zu reifen antigenpräsentierenden Zellen aktiviert werden. Eine andere Arbeitsgruppe konnte z.B. zeigen, dass Mikroglia nach OGD vermehrt TGF- β produzieren und damit ischämiebedingtes Zellsterben von Mikroglia, Astrozyten und Neuronen reduzieren (Lu et al., 2005).

Diese Aspekte scheinen insbesondere interessant, bedenkt man das Ausbleiben autoimmunologischer Erkrankungen trotz der Fülle verschiedener Antigene und einwandernder Immunzellen im Schlaganfall. Durch den Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke treffen sowohl T-Zellen als auch Dendritische Zellen auf eine Vielzahl von Antigenen. Und nicht nur an Multipler Sklerose erkrankte sondern auch gesunde Personen besitzen in ihrem Lymphozytenpool autoreaktive, myelinspezifische T-Zellen (Burns et al., 1983). Warum kommt es also nicht zu adaptiven, TH₁-vermittelten Immunreaktionen bzw. autoreaktiven Prozessen? Welche Mechanismen letztendlich zur Entwicklung von Autoimmunität im Gehirn führen ist nicht abschließend geklärt. Diskutiert wird jedoch die Theorie, dass virale Infektionen über *molecular mimicry* eine Aktivierung von myelinspezifischen T-Zellen herbeiführen, die dann das Gehirn infiltrieren und eine MS auslösen (Wucherpfennig and Strominger, 1995). Myelinspezifische T-Zellen können jedoch ebenso im Schlaganfall das Gehirn infiltrieren und damit auf ihr

spezifisches Antigen treffen und myelinpräsentierende Dendritische Zellen können das Gehirn verlassen und das spezifische Antigen im Lymphknoten den T-Zellen präsentieren. Und doch ist die postischämische Entzündungsreaktion meist limitiert, folgt ihrer physiologischen Funktion und repariert, ohne eine überschießende Immunreaktion oder gar Autoreaktivität zu entwickeln. Möglicherweise fehlt ein infektiöser Stimulus, z.B. LPS, um eine zellvermittelte adaptive Immunantwort auszulösen (Gee et al., 2007). Von Bedeutung sind in diesem Zusammenhang sicherlich auch regulatorische Vorgänge wie ein Repertoire an spezifischen Zytokinen und Kostimulatorischen Molekülen. Außerdem verfügt der Organismus über Toleranzmechanismen. Schon vor mehr als zehn Jahren konnte gezeigt werden, dass Toleranz gegenüber Myelinbestandteilen induziert werden kann und zu kleineren Infarktolumina nach MCAO führt (Becker et al., 1997). Verantwortlich hierfür scheinen Tregs zu sein. Hier eröffnen sich nicht nur ein spannendes Forschungsgebiet sondern auch neue therapeutische Optionen.

Das Überwiegen von Zellen der Natürlichen Immunantwort nach MCAO und die mangelnde Fähigkeit von Mikroglia und Dendritischen Zellen zur Antigenpräsentation sind zwei wichtige, experimentell-gewonnene Hinweise für die Qualität der postischämischen Immunreaktion. In diesem Sinne ergibt sich für mich die These, dass unspezifische Immunreaktionen wie z.B. Phagozytose im Schlaganfall überwiegen und adaptive oder gar autoimmunologische Reaktionen unwahrscheinlich sind.

6 Zusammenfassung

Der ischämische Schlaganfall gehört zu den Haupttodesursachen in der westlichen Welt. Häufig ist er die Ursache bleibender Behinderung und Pflegebedürftigkeit im Alter. Dies sind sicher zwei wichtige Gründe, die Therapien zu optimieren. Neben der früh einsetzenden Ischämiephase bietet die Reperfusion neue therapeutische Optionen, insbesondere aufgrund des späteren und längeren Zeitfensters.

Ziel dieser Dissertation war, die Zellinfiltration der Reperusionsphase zu charakterisieren und die Aktivierung der Mikroglia als antigenpräsentierende Zellen zu untersuchen.

Hierfür wurde mit Hilfe des MCAO-Modells ein ischämischer Schlaganfall in der Maus nachgebildet. Das geschädigte Gehirn wurde im zeitlichen Verlauf hinsichtlich des Entzündungsinfiltrats durchflusszytometrisch untersucht. Messungen der kostimulatorischen Moleküle CD80, CD40 sowie MHCII ermöglichten eine Aussage über die mikrogliale Bedeutung im Schlaganfall, die durch Untersuchungen nach *Oxygen Glucose Deprivation* und Cokultur mit OGD-gestressten Neuronen ergänzt wurde.

Die postischämische Immuninfiltration war durch eine frühe Akkumulation von Mikroglia und Makrophagen und einer darauf folgenden massiven Einwanderung von Neutrophilen Granulozyten gekennzeichnet. Die dominante Antwort der natürlichen Abwehr wurde begleitet von geringerem aber auch deutlich signifikantem Einwandern Dendritischer Zellen, CD4+-T-Zellen und NKT-Zellen – Zellen mit immunregulatorischen Fähigkeiten. Mikrogliales MHCII sowie die kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD40 waren weder im MCAO-Modell noch nach OGD in ihrer Expressionsstärke verändert. Die Behandlung mit OGD-gestressten Neuronen führte zu einer verminderten Expression von CD80 und CD40 auf Mikroglia.

Insgesamt sprechen die Ergebnisse gegen ein Vorliegen adaptiver Immunreaktionen. Diese sind im ischämischen Schlaganfall aufgrund von Antigenfülle und Zellrepertoire zwar möglich, scheinen jedoch aufgrund mangelnder Antigenpräsentation unwahrscheinlich. Ob Adaptive Immunreaktionen stattfinden, hängt

jedoch noch von weitaus mehr Faktoren ab und bleibt zu klären – ebenso wie die Rolle der Mikroglia bei diesem Prozess.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACC	<i>Arteria carotis communis</i>
ACE	<i>Arteria carotis externa</i>
ACI	<i>Arteria carotis interna</i>
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
AP-Zellen	Antigenpräsentierende Zellen
ATP	Adenosintriphosphat
BME	Basal Medium Eagle
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	Beziehungsweise
C°	Grad Celsius
ca.	Circa
CA ²⁺	Calcium
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
cm	Zentimeter
ddH ₂ O	<i>Doubled distilled water</i>
DIV	<i>Days in vitro</i>
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindoldi-Hydrochlorid
DC	<i>Dendritic Cells</i>
D-MEM	Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium
Dnase	Desoxyribonuklease
DN T-Zellen	Doppelt negative Zellen
EAE	Experimentelle Autoimmune Enzephalomyelitis
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzym linked immunosorbent assay</i>
FCS	Fetales Kälberserum

Abkürzungsverzeichnis

FOXP3	<i>Forkhead box P3</i>
g	Gramm
GFAP	<i>Glial fibrillary acidic protein</i>
h	Stunde
HBSS	Hank`s Balanced Salt Solution
ICAM-1	<i>Inter-Cellular Adhesion Molecule 1</i>
Ig	Immunglobulin
IL-1 α	Interleukin 1 alpha
IFN- γ	Interferon gamma
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar
MCP-1	<i>Monocyte chemotactic protein 1</i>
MF	<i>Median Fluorescence</i>
MFI	<i>Median Fluorescence Index</i>
MHCII	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
mM	Millimolar
ml	Milliliter
MMP	Matrix Metallo Proteinase
MTT	3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
μ g	Mikrogramm
μ m	Mikrometer
N	Stoffmenge
NF κ B	<i>Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NGF	<i>Nerve growth factor</i>
NGS	<i>Normal goat serum</i>
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NKT-Zellen	Natürliche Killer T-Zellen

Abkürzungsverzeichnis

OGD	<i>Oxygen Glucose Deprivation</i>
PAMPs	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
pH	$-\log[\text{H}^+]$
PBS	Phosphat gepufferte Salzsäure
RP3	<i>Antineutrophil monoclonal antibody</i>
SDS	<i>Sodiumdodecylsulfat</i>
TGF- β	<i>Transforming growth factor beta</i>
TH	T-Helfer
TLR	<i>Toll like receptor</i>
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor alpha</i>
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis inducing ligand</i>
Treg	regulatorische T-Zelle
TTC	2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid
TZR	T-Zell-Rezeptor
U	<i>Units</i>
UDP	Uridindiphosphat
z.B.	Zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

Literaturverzeichnis

- AJAMI, B., BENNETT, J. L., KRIEGER, C., TETZLAFF, W. & ROSSI, F. M. V. (2007) Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. *Nat Neurosci*, 10, 1538-1543.
- AKOPOV, S. E., SIMONIAN, N. A. & GRIGORIAN, G. S. (1996) Dynamics of Polymorphonuclear Leukocyte Accumulation in Acute Cerebral Infarction and Their Correlation With Brain Tissue Damage. *Stroke*, 27, 1739-1743.
- ALLAN, S. M. & ROTHWELL, N. J. (2001) Cytokines and acute neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci*, 2, 734-744.
- ALOISI, F. (2001) Immune function of microglia. *Glia*, 36, 165-179.
- ALOISI, F., DE SIMONE, R., COLUMBA-CABEZAS, S., PENNA, G. & ADO-RINI, L. (2000) Functional Maturation of Adult Mouse Resting Microglia into an APC Is Promoted by Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor and Interaction with Th1 Cells. *J Immunol*, 164, 1705-1712.
- ASHWELL, K. (1990) Microglia and cell death in the developing mouse cerebellum. *Developmental Brain Research*, 55, 219-230.
- BARONE, F., SCHMIDT, D., HILLEGASS, L., PRICE, W., WHITE, R., FEUERSTEIN, G., CLARK, R., LEE, E., GRISWOLD, D. & SARAU, H. (1992) Reperfusion increases neutrophils and leukotriene B4 receptor binding in rat focal ischemia. *Stroke*, 23, 1337-1347.
- BECKER, K. J., MCCARRON, R. M., RUETZLER, C., LABAN, O., STERNBERG, E., FLANDERS, K. C. & HALLENBECK, J. M. (1997) Immunologic tolerance to myelin basic protein decreases stroke size after transient focal cerebral ischemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, 10873-10878.
- BIBER, K., NEUMANN, H., INOUE, K. & BODDEKE, H. W. G. M. (2007) Neuronal 'On' and 'Off' signals control microglia. *Trends in Neurosciences*, 30, 596-602.
- BLOCK, M. L., ZECCA, L. & HONG, J.-S. (2007) Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nat Rev Neurosci*, 8, 57-69.
- BROUGHTON, B. R. S. P., REUTENS, D. C. M. D. & SOBEY, C. G. P. (2009) Apoptotic Mechanisms After Cerebral Ischemia. *Stroke*, 40, e331-e339.
- BURNS, J., ROSENZWEIG, A., ZWEIMAN, B. & LISAK, R. P. (1983) Isolation of myelin basic protein-reactive T-cell lines from normal human blood. *Cellular Immunology*, 81, 435-440.
- CARMICHAEL, S. T. (2008) Themes and Strategies for Studying the Biology of Stroke Recovery in the Poststroke Epoch. *Stroke*, 39, 1380-1388.
- CHAN, W. Y., KOHSAKA, S. & REZAEI, P. (2007) The origin and cell lineage of microglia--New concepts. *Brain Research Reviews*, 53, 344-354.

- CONNOLLY, E. S., WINFREE, C. J., SPRINGER, T. A., NAKA, Y., LIAO, H., YAN, S. D., STERN, D. M., SOLOMON, R. A., GUTIERREZ-RAMOS, J. C. & PINSKY, D. J. (1996) Cerebral protection in homozygous null ICAM-1 mice after middle cerebral artery occlusion. Role of neutrophil adhesion in the pathogenesis of stroke. *The Journal of Clinical Investigation*, 97, 209-216.
- DAVALOS, D., GRUTZENDLER, J., YANG, G., KIM, J. V., ZUO, Y., JUNG, S., LITTMAN, D. R., DUSTIN, M. L. & GAN, W.-B. (2005) ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neurosci*, 8, 752-758.
- DENES, A., VIDYASAGAR, R., FENG, J., NARVAINEN, J., MCCOLL, B. W., KAUPPINEN, R. A. & ALLAN, S. M. (2007) Proliferating resident microglia after focal cerebral ischaemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab*, 27, 1941-1953.
- DIRNAGL, U., IADECOLA, C. & MOSKOWITZ, M. A. (1999) Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends in Neurosciences*, 22, 391-397.
- DITTEL, B. N. (2008) CD4 T cells: Balancing the coming and going of autoimmune-mediated inflammation in the CNS. *Brain, Behavior, and Immunity*, 22, 421-430.
- DONG, Y. & BENVENISTE, E. N. (2001) Immune function of astrocytes. *Glia*, 36, 180-190.
- GARCIA, J., LIU, K., YOSHIDA, Y., LIAN, J., CHEN, S. & DEL ZOPPO, G. (1994) Influx of leukocytes and platelets in an evolving brain infarct (Wistar rat). *Am J Pathol*, 144, 188-199.
- GEE, J. M. B. S., KALIL, A. B. S., SHEA, C. B. S. & BECKER, K. J. M. D. (2007) Lymphocytes: Potential Mediators of Postischemic Injury and Neuroprotection. *Stroke*, 38(2, Part 2) Supplement, 783-788.
- GELDERBLUM, M., LEYPOLDT, F., STEINBACH, K., BEHRENS, D., CHOE, C.-U., SILER, D. A., ARUMUGAM, T. V., ORTHEY, E., GERLOFF, C., TOLOSA, E. & MAGNUS, T. (2009) Temporal and Spatial Dynamics of Cerebral Immune Cell Accumulation in Stroke. *Stroke*, 40, 1849-1857.
- GODFREY, D. I. & KRONENBERG, M. (2004) Going both ways: Immune regulation via CD1d-dependent NKT cells. *The Journal of Clinical Investigation*, 114, 1379-1388.
- GREGERSEN, R., LAMBERTSEN, K. & FINSEN, B. (2000) Microglia and Macrophages Are the Major Source of Tumor Necrosis Factor in Permanent Middle Cerebral Artery Occlusion in Mice. *J Cereb Blood Flow Metab*, 20, 53-65.
- HANISCH, U.-K. (2002) Microglia as a source and target of cytokines. *Glia*, 40, 140-155.
- HANISCH, U.-K. & KETTENMANN, H. (2007) Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci*, 10, 1387-1394.

- HOEK, R. M., RUULS, S. R., MURPHY, C. A., WRIGHT, G. J., GODDARD, R., ZURAWSKI, S. M., BLOM, B., HOMOLA, M. E., STREIT, W. J., BROWN, M. H., BARCLAY, A. N. & SEDGWICK, J. D. (2000) Down-Regulation of the Macrophage Lineage Through Interaction with OX2 (CD200). *Science*, 290, 1768-1771.
- IMAI, F., SUZUKI, H., ODA, J., NINOMIYA, T., ONO, K., SANO, H. & SAWADA, M. (2006) Neuroprotective effect of exogenous microglia in global brain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*, 27, 488-500.
- ITO, U. M. D. P. F., NAGASAO, J. D. V. M., KAWAKAMI, E. B. S. & OYANAGI, K. M. D. P. Fate of Disseminated Dead Neurons in the Cortical Ischemic Penumbra: Ultrastructure Indicating a Novel Scavenger Mechanism of Microglia and Astrocytes.
- JAHNG, A. W., MARICIC, I., PEDERSEN, B., BURDIN, N., NAIDENKO, O., KRONENBERG, M., KOEZUKA, Y. & KUMAR, V. (2001) Activation of Natural Killer T Cells Potentiates or Prevents Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J. Exp. Med.*, 194, 1789-1799.
- JUEDES, A. E. & RUDDLE, N. H. (2001) Resident and Infiltrating Central Nervous System APCs Regulate the Emergence and Resolution of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J Immunol*, 166, 5168-5175.
- JUSTICIA, C., PANES, J., SOLE, S., CERVERA, A., DEULOFEU, R., CHAMORRO, A. & PLANAS, A. M. (2003) Neutrophil Infiltration Increases Matrix Metalloproteinase-9 in the Ischemic Brain after Occlusion/Reperfusion of the Middle Cerebral Artery in Rats. *J Cereb Blood Flow Metab*, 23, 1430-1440.
- KARMAN, J., LING, C., SANDOR, M. & FABRY, Z. (2004) Dendritic cells in the initiation of immune responses against central nervous system-derived antigens. *Immunology Letters*, 92, 107-115.
- KAUSHAL, V. & SCHLICHTER, L. C. (2008) Mechanisms of Microglia-Mediated Neurotoxicity in a New Model of the Stroke Penumbra. *J. Neurosci.*, 28, 2221-2230.
- KELLY, M. A., SHUAIB, A. & TODD, K. G. (2006) Matrix metalloproteinase activation and blood-brain barrier breakdown following thrombolysis. *Experimental Neurology*, 200, 38-49.
- KITAMURA, Y., TAKATA, K., INDEN, M., TSUCHIYA, D., YANAGISAWA, D., NAKATA, J. & TANIGUCHI, T. (2004) Intracerebroventricular Injection of Microglia Protects Against Focal Brain Ischemia. *Journal of Pharmacological Sciences*, 94, 203-206.
- KLEINSCHNITZ, C., SCHWAB, N., KRAFT, P., HAGEDORN, I., DREYKLUFT, A., SCHWARZ, T., AUSTINAT, M., NIESWANDT, B., WIENDL, H. & STOLL, G. Early detrimental T-cell effects in experimental cerebral ischemia are neither related to adaptive immunity nor thrombus formation. *Blood*, 115, 3835-3842.
- KOIZUMI, S., SHIGEMOTO-MOGAMI, Y., NASU-TADA, K., SHINOZAKI, Y., OHSAWA, K., TSUDA, M., JOSHI, B. V., JACOBSON, K. A., KOHSAKA, S. & INOUE, K. (2007) UDP acting at P2Y6 receptors is a mediator of microglial phagocytosis. *Nature*, 446, 1091-1095.

- KOLOMINSKY-RABAS, P. L. & HEUSCHMANN, P. U. (2002) Inzidenz, Ätiologie und Langzeitprognose des Schlaganfalls. *Incidence, Etiology and Long-Term Prognosis of Stroke*, 70, 657-662.
- LALANCETTE-HEBERT, M., GOWING, G., SIMARD, A., WENG, Y. C. & KRIZ, J. (2007) Selective Ablation of Proliferating Microglial Cells Exacerbates Ischemic Injury in the Brain. *J. Neurosci.*, 27, 2596-2605.
- LEHRMANN, E., KIEFER, R., CHRISTENSEN, T., TOYKA, K. V., ZIMMER, J., DIEMER, N. H., HARTUNG, H.-P. & FINSEN, B. (1998) Microglia and macrophages are major sources of locally produced transforming growth factor- β after transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Glia*, 24, 437-448.
- LIESZ, A., SURI-PAYER, E., VELTKAMP, C., DOERR, H., SOMMER, C., RIVEST, S., GIESE, T. & VELTKAMP, R. (2009) Regulatory T cells are key cerebroprotective immunomodulators in acute experimental stroke. *Nat Med*, 15, 192-199.
- LING, E., SHUBINSKY, G. & PRESS, J. (2007) Increased proportion of CD3+CD4-CD8- double-negative T cells in peripheral blood of children with Behcet's disease. *Autoimmunity Reviews*, 6, 237-240.
- LO, E. H. (2008) A new penumbra: transitioning from injury into repair after stroke. *Nat Med*, 14, 497-500.
- LOPEZ, A. D., MATHERS, C. D., EZZATI, M., JAMISON, D. T. & MURRAY, C. J. L. (2006) Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data. *The Lancet*, 367, 1747-1757.
- LU, Y.-Z., LIN, C.-H., CHENG, F.-C. & HSUEH, C.-M. (2005) Molecular mechanisms responsible for microglia-derived protection of Sprague-Dawley rat brain cells during in vitro ischemia. *Neuroscience Letters*, 373, 159-164.
- LUTTMANN, W. (Ed.) (2006) *Der Experimentator: Immunologie*, München, Elsevier, Spektrum Akad. Verl.
- LYONS, S. A., PASTOR, A., OHLEMEYER, C., KANN, O., WIEGAND, F., PRASS, K., KNAPP, F., KETTENMANN, H. & DIRNAGL, U. (2000) Distinct Physiologic Properties of Microglia and Blood-Borne Cells in Rat Brain Slices After Permanent Middle Cerebral Artery Occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab*, 20, 1537-1549.
- MAGNUS, T., CHAN, A., GRAUER, O., TOYKA, K. V. & GOLD, R. (2001) Microglial Phagocytosis of Apoptotic Inflammatory T Cells Leads to Down-Regulation of Microglial Immune Activation. *J Immunol*, 167, 5004-5010.
- MATSUO, Y., ONODERA, H., SHIGA, Y., NAKAMURA, M., NINOMIYA, M., KIHARA, T. & KOGURE, K. (1994) Correlation between myeloperoxidase-quantified neutrophil accumulation and ischemic brain injury in the rat. Effects of neutrophil depletion. *Stroke*, 25, 1469-1475.
- MCMENAMIN, P. G. (1999) Distribution and phenotype of dendritic cells and resident tissue macrophages in the dura mater, leptomeninges, and choroid plexus of the rat brain as demonstrated in wholemount preparations. *The Journal of Comparative Neurology*, 405, 553-562.

- MEYER-LUEHMANN, M., SPIRES-JONES, T. L., PRADA, C., GARCIA-ALLOZA, M., DE CALIGNON, A., ROZKALNE, A., KOENIGSKNECHT-TALBOO, J., HOLTZMAN, D. M., BACSKAI, B. J. & HYMAN, B. T. (2008) Rapid appearance and local toxicity of amyloid- β plaques in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nature*, 451, 720-724.
- MIYAMOTO, K., MIYAKE, S. & YAMAMURA, T. (2001) A synthetic glycolipid prevents autoimmune encephalomyelitis by inducing TH2 bias of natural killer T cells. *Nature*, 413, 531-534.
- MOCCO, J., CHOUDHRI, T., HUANG, J., HARFELDT, E., EFROS, L., KLINGBEIL, C., VEXLER, V., HALL, W., ZHANG, Y., MACK, W., POPILSKIS, S., PINSKY, D. J. & CONNOLLY, E. S., JR (2002) HuEP5C7 as a Humanized Monoclonal Anti-E/P-Selectin Neurovascular Protective Strategy in a Blinded Placebo-Controlled Trial of Nonhuman Primate Stroke. *Circ Res*, 91, 907-914.
- MONJE, M. L., TODA, H. & PALMER, T. D. (2003) Inflammatory Blockade Restores Adult Hippocampal Neurogenesis. *Science*, 302, 1760-1765.
- NAPOLI, I. & NEUMANN, H. (2009) Microglial clearance function in health and disease. *Neuroscience*, 158, 1030-1038.
- NEUMANN, H., KOTTER, M. R. & FRANKLIN, R. J. M. (2009) Debris clearance by microglia: an essential link between degeneration and regeneration. *Brain*, 132, 288-295.
- NEUMANN, J., SAUERZWEIG, S., RONICKE, R., GUNZER, F., DINKEL, K., ULLRICH, O., GUNZER, M. & REYMANN, K. G. (2008) Microglia Cells Protect Neurons by Direct Engulfment of Invading Neutrophil Granulocytes: A New Mechanism of CNS Immune Privilege. *J. Neurosci.*, 28, 5965-5975.
- NGUYEN, M. D., JULIEN, J.-P. & RIVEST, S. (2002) Innate immunity: the missing link in neuroprotection and neurodegeneration? *Nat Rev Neurosci*, 3, 216-227.
- NIMMERJAHN, A., KIRCHHOFF, F. & HELMCHEN, F. (2005) Resting Microglial Cells Are Highly Dynamic Surveillants of Brain Parenchyma in Vivo. *Science*, 308, 1314-1318.
- NING, M., FURIE, K. L., KOROSHETZ, W. J., LEE, H., BARRON, M., LEDERER, M., WANG, X., ZHU, M., SORENSEN, A. G., LO, E. H. & KELLY, P. J. (2006) Association between tPA therapy and raised early matrix metalloproteinase-9 in acute stroke. *Neurology*, 66, 1550-1555.
- OFFNER, H., SUBRAMANIAN, S., PARKER, S. M., AFENTOULIS, M. E., VANDENBARK, A. A. & HURN, P. D. (2005) Experimental stroke induces massive, rapid activation of the peripheral immune system. *J Cereb Blood Flow Metab*, 26, 654-665.
- OLSON, J. K. & MILLER, S. D. (2004) Microglia Initiate Central Nervous System Innate and Adaptive Immune Responses through Multiple TLRs. *J Immunol*, 173, 3916-3924.
- PEKNY, M. & NILSSON, M. (2005) Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia*, 50, 427-434.

- PEZZUTTO, A., ULRICHS, T., BURMESTER G. (Ed.) (2007) *Taschenatlas der Immunologie: Grundlagen, Labor, Klinik*, Stuttgart, Thieme.
- PONOMAREV, E. D., SHRIVER, L. P. & DITTEL, B. N. (2006) CD40 Expression by Microglial Cells Is Required for Their Completion of a Two-Step Activation Process during Central Nervous System Autoimmune Inflammation. *J Immunol*, 176, 1402-1410.
- PONOMAREV, E. D., SHRIVER, L. P., MARESZ, K. & DITTEL, B. N. (2005) Microglial cell activation and proliferation precedes the onset of CNS autoimmunity. *Journal of Neuroscience Research*, 81, 374-389.
- REICHMANN, G., SCHROETER, M., JANDER, S. & FISCHER, H.-G. (2002) Dendritic cells and dendritic-like microglia in focal cortical ischemia of the mouse brain. *Journal of Neuroimmunology*, 129, 125-132.
- SCHILLING, M., BESSELMANN, M., LEONHARD, C., MUELLER, M., RINGELSTEIN, E. B. & KIEFER, R. (2003) Microglial activation precedes and predominates over macrophage infiltration in transient focal cerebral ischemia: a study in green fluorescent protein transgenic bone marrow chimeric mice. *Experimental Neurology*, 183, 25-33.
- SCHNEIDER, A., MARTIN-VILLALBA, A., WEIH, F., VOGEL, J., WIRTH, T. & SCHWANINGER, M. (1999) NF- κ B is activated and promotes cell death in focal cerebral ischemia. *Nat Med*, 5, 554-559.
- SCHROETER, M., JANDER, S., HUITINGA, I., WITTE, O. W., STOLL, G. & DIETRICH, W. D. (1997) Phagocytic Response in Photochemically Induced Infarction of Rat Cerebral Cortex: The Role of Resident Microglia. *Stroke*, 28, 382-386.
- SCHÜNKE, M., E. SCHULTE, U. SCHUMACHER (Ed.) (2006) *Kopf und Neuroanatomie*, Stuttgart, Thieme.
- SCHUURHUIS, D. H., FU, N., OSSENDORP, F. & MELIEF, C. J. M. (2006) Ins and Outs of Dendritic Cells. *International Archives of Allergy and Immunology*, 140, 53-72.
- SHI, F.-D., WANG, H.-B., LI, H., HONG, S., TANIGUCHI, M., LINK, H., KAER, L. V. & LJUNGGREN, H.-G. (2000) Natural killer cells determine the outcome of B cell-mediated autoimmunity. *Nat Immunol*, 1, 245-251.
- SIELING, P. A., PORCELLI, S. A., DUONG, B. T., SPADA, F., BLOOM, B. R., DIAMOND, B. & HAHN, B. H. (2000) Human Double-Negative T Cells in Systemic Lupus Erythematosus Provide Help for IgG and Are Restricted by CD1c. *J Immunol*, 165, 5338-5344.
- SILBERNAGL, S., A. DESPOPOULOS (Ed.) (2003) *Taschenatlas der Physiologie*, Stuttgart, Thieme.
- SIMARD, A. R., SOULET, D., GOWING, G., JULIEN, J.-P. & RIVEST, S. (2006) Bone Marrow-Derived Microglia Play a Critical Role in Restricting Senile Plaque Formation in Alzheimer's Disease. *Neuron*, 49, 489-502.
- SMELTZ, R. B., WOLF, N. A. & SWANBORG, R. H. (1999) Inhibition of Autoimmune T Cell Responses in the DA Rat by Bone Marrow-Derived NK Cells In Vitro: Implications for Autoimmunity. *J Immunol*, 163, 1390-1397.
- SOULET, D. & RIVEST, S. (2008) Microglia. *Current Biology*, 18, R506-R508.

- SPORRI, R. & REIS E SOUSA, C. (2005) Inflammatory mediators are insufficient for full dendritic cell activation and promote expansion of CD4+ T cell populations lacking helper function. *Nat Immunol*, 6, 163-170.
- STATISTISCHES BUNDESAMT (Ed.) (2009) *Statistisches Jahrbuch 2009 für die Bundesrepublik Deutschland*, Wiesbaden, Statistisches Bundesamt.
- STEVENS, S. L., BAO, J., HOLLIS, J., LESSOV, N. S., CLARK, W. M. & STENZEL-POORE, M. P. (2002) The use of flow cytometry to evaluate temporal changes in inflammatory cells following focal cerebral ischemia in mice. *Brain Research*, 932, 110-119.
- SUZUKI, S., TANAKA, K. & SUZUKI, N. (2008) Ambivalent aspects of interleukin-6 in cerebral ischemia: inflammatory versus neurotrophic aspects. *J Cereb Blood Flow Metab*, 29, 464-479.
- TANG, S.-C., ARUMUGAM, T. V., CUTLER, R. G., JO, D.-G., MAGNUS, T., CHAN, S. L., MUGHAL, M. R., TELLJOHANN, R. S., NASSAR, M., OUYANG, X., CALDERAN, A., RUZZA, P., GUIOTTO, A. & MATTSON, M. P. (2007) Neuroprotective actions of a histidine analogue in models of ischemic stroke. *Journal of Neurochemistry*, 101, 729-736.
- TERAI, K., MATSUO, A., MCGEER, E. G. & MCGEER, P. L. (1996) Enhancement of immunoreactivity for NF- κ B in human cerebral infarctions. *Brain Research*, 739, 343-349.
- UEDA, H. & FUJITA, R. (2004) Cell Death Mode Switch from Necrosis to Apoptosis in Brain. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 27, 950-955.
- VIVIANI, B. (2006) Preparation and Coculture of Neurons and Glial Cells. *Current Protocols in Cell Biology*, 2 (2.7).
- WANG, Q., TANG, X. N. & YENARI, M. A. (2007) The inflammatory response in stroke. *Journal of Neuroimmunology*, 184, 53-68.
- WEI, R. & JONAKAIT, G. M. (1999) Neurotrophins and the anti-inflammatory agents interleukin-4 (IL-4), IL-10, IL-11 and transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) down-regulate T cell costimulatory molecules B7 and CD40 on cultured rat microglia. *Journal of Neuroimmunology*, 95, 8-18.
- WILD, M. K. & BIXEL, M. G. (2006) Leukocyte \times endothelial cell interactions. *FEBS Journal*, 273, 4375-4376.
- WUCHERPFENNIG, K. W. & STROMINGER, J. L. (1995) Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: Viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. *Cell*, 80, 695-705.
- YAN, J., GREER, J. M., ETHERINGTON, K., CADIGAN, G. P., CAVANAGH, H., HENDERSON, R. D., O'SULLIVAN, J. D., PANDIAN, J. D., READ, S. J. & MCCOMBE, P. A. (2009) Immune activation in the peripheral blood of patients with acute ischemic stroke. *Journal of Neuroimmunology*, 206, 112-117.
- YILMAZ, G., ARUMUGAM, T. V., STOKES, K. Y. & GRANGER, D. N. (2006a) Role of T Lymphocytes and Interferon- γ in Ischemic Stroke. *Circulation*, 113, 2105-2112.

YILMAZ, G. M. D., ARUMUGAM, T. V. P., STOKES, K. Y. P. & GRANGER, D. N. P. (2006b) Role of T Lymphocytes and Interferon-[gamma] in Ischemic Stroke. *Circulation*, 113, 2105-2112.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich besonders Tim Magnus und dessen Arbeitsgruppe für die Möglichkeit dieser Dissertation und die gute theoretische und praktische Betreuung danken.

Insbesondere danke ich Ellen Orthey für die Einführung in die Laborarbeit, die täglichen kleinen Hilfestellungen und natürlich vor allem für die Durchführung der zahlreichen MCAO-Operationen.

Kerstin Lardong gilt ein liebes Dankeschön für die gemeinsame Laborzeit, viele anregende Gespräche und die Korrektur dieser Arbeit.

Chi-un Choe, Mathias Gelderblom und Jan Lewerenz danke ich für die Anleitungen in der Zellkultur und die große Bereitschaft, theoretische Probleme mit mir zu besprechen und zu lösen.

Ein großes Dankeschön gilt Frank Leypoldt für die gute Betreuung und Unterstützung vor allem bei den FACS-Analysen, FACS-Auswertungen, bei der graphischen Umsetzung der Ergebnisse sowie für die Korrekturvorschläge der Dissertationsschrift.

Daneben möchte ich mich bei den Mitarbeitern des INIMS/ZMNH und Prof. Roland Martin für die Mitbenutzung des FACS-Gerätes und der Laboreinrichtung sowie für alle Hilfestellungen bedanken. Ein besonderes Dankeschön gilt hier Karin Steinbach, die mich gelehrt hat, wie man Mäuse perfundiert und wie ein FACS-Gerät funktioniert und bedient wird, und die jederzeit großes Interesse an meiner Arbeit gezeigt hat.

Danken möchte ich auch dem UKE und den Verantwortlichen und Betreuern des UKE-Graduiertenkollegs „Entzündung und Regeneration“ für die finanzielle und theoretische Förderung.

Abschließend bleibt ein großes Dankeschön an Meike Schweisfurth für die sehr sorgfältige Korrektur von Rechtschreibung und Grammatik.

.

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Dörthe Behrens