

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Klinik und Poliklinik für Neurologie

Direktor: Prof. Dr. med. Christian Gerloff

Reaktionsmuster muriner Mikroglia auf
ischämischen und metabolisch-toxischen
Stress

Ein in vitro Modell zum experimentellen Schlaganfall

Dissertation

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

vorgelegt von:

Lena Charlotte Hoffmann
aus Berlin

Hamburg 2012

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am:
23.05.2013**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:

PD Dr. med. T. Magnus

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in:

PD Dr. med. K.Sydow

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in:

Dr. med. M.Friese

Inhaltsverzeichnis

Ziel der Arbeit	7
1 Einleitung.....	8
1.1 Der ischämische Schlaganfall	8
1.2 Die Penumbra.....	9
1.3 Die Postischämische Inflammation.....	10
1.4 Mikroglia	12
1.4.1 Ursprung und Entwicklung von Mikroglia	12
1.4.2 Mikroglia <i>in vivo</i>	14
1.4.3 Mikroglia im ischämischen Schlaganfall.....	15
1.4.4 Mikroglia – neurodestruktiv und neuroprotektiv.....	17
1.4.5 Mikroglia <i>in vitro</i>	18
1.5 Lokale, metabolische Veränderungen nach zerebraler Ischämie	19
1.5.2 Auswirkungen auf den pH-Wert	21
1.5.1 Auswirkung auf die extrazelluläre K ⁺ -Konzentration.....	22
1.5.3 Auswirkung auf die extrazelluläre Glutamat-Konzentration.....	22
2 Material und Methoden.....	24
2.1 Material.....	24
2.1.1 Geräte	24
2.1.2 Verbrauchsmaterial.....	26
2.1.3 Puffer	28
2.1.4 Antikörper.....	30
2.1.5 Primärkulturen aus C57/Bl6 Mäusen P1	30

2.2	Methoden	31
2.2.1	Mikroglia-Astrozyten-Mischkulturen	31
2.2.2	Isolation von Mikroglia aus Mikroglia-Astrozyten-Mischkulturen	32
2.2.3	Immunzytochemie.....	33
2.2.4	Stimulierung mit Lipopolysaccharid (LPS).....	34
2.2.5	Kombinierter Sauerstoff-Glukose-Entzug (OGD)	34
2.2.6	NO-Assay.....	36
2.2.7	MTT-Assay.....	37
2.2.8	TNF- α -ELISA	38
2.2.9	Statistik	39
3	Ergebnisse	40
3.1	Entwicklung von Mikroglia-Astrozyten-Mischkulturen.....	40
3.2	Mikroglia-kulturen nach Isolation durch Abschütteln.....	42
3.3	Immunzytochemische Färbung von isolierten Mikroglia-kulturen	43
3.4	Mikroglia-aktivierung nach 3 Stunden Stimulation mit LPS.....	45
3.5	Einfluss von pH-Wert und OGD auf die Vitalität von Mikroglia-kulturen.....	46
3.6	Aktivierung von Mikroglia-kulturen gemessen an NO und TNF- α	49
3.7	OGD-spezifische Effekte in NO-Produktion nach einer Stunde.....	52
3.8	OGD-spezifische Effekte in TNF- α -Produktion nach drei Stunden	53
3.9	Aktivierung von Mikroglia-kulturen durch Serumentzug.....	55
4	Diskussion	58
4.1	Modell und Methoden zum Schlaganfall <i>in vitro</i>	58
4.1.1	Das <i>in vitro</i> Modell zum ischämischen Schlaganfall.....	58
4.1.2	Effekte von LPS im <i>in vitro</i> Schlaganfallmodell	59
4.1.3	Methoden und Prozeduren zur Isolierung von Mikroglia-kulturen	60

4.2	Mikrogliale Aktivierung durch OGD.....	62
4.2.1	Alleinige OGD ist kein ausreichender Aktivator für Mikroglia	62
4.2.2	Vergleich von LPS und OGD als Aktivatoren von Mikroglia.....	63
4.3	Mikrogliale Aktivierung durch Azidose.....	64
4.3.1	Azidose vermindert die Aktivierbarkeit von Mikroglia bei gleichzeitiger Stimulation	65
4.3.2	Azidose (pH 6,5) wirkt protektiv bezüglich der Vitalität stimulierter Mikroglia.....	66
4.4	Mikrogliale Aktivierung durch OGD und Kalium.....	67
4.4.1	Periischämisches Kalium bewirkt eine vermehrte NO-Produktion nach einer Stunde und eine vermehrte Produktion von TNF- α nach drei Stunden	67
4.4.2	Erhöhtes NO durch Aktivierung der Ca ²⁺ -abhängigen NADPH-Oxidase.....	67
4.5	Mikrogliale Aktivierung durch OGD und Glutamat	68
4.5.1	Erhöhtes Glutamat bewirkt die vermehrte mikrogliale Produktion von TNF- α	68
4.5.2	Die isolierte Stimulation mit Glutamat induziert die mikrogliale NO-Synthese.....	69
4.6	Mikrogliale Aktivierung durch Serumentzug	70
4.6.1	Verminderte Proteinsynthese nach Serumentzug und OGD bzw. LPS-Stimulierung.....	70
4.6.2	Serumentzug bewirkt zeitabhängig den Zelltod von Mikroglia	71
4.7	Übertragung auf ischämischen Schlaganfall	73
4.7.2	Die NO-Produktion aktivierter Mikroglia hat neuroprotektive und neurodegenerative Effekte.....	73
4.7.3	mikroglialer TNF- α als Mediator einer postischämischen Entzündungsreaktion	75
5	Zusammenfassung.....	77

Anhang	80
Anhang 1: Genehmigung Antrag Nr. 26/07	80
Anhang 2: Teilnahmebescheinigung	82
Alphabetisches Abkürzungsverzeichnis.....	83
Abbildungsverzeichnis	85
Literaturverzeichnis	87
Danksagung	95
Lebenslauf	96
Eidesstattliche Versicherung	98

Ziel der Arbeit

Obwohl dem Immunsystem beim ischämischen Schlaganfall mittlerweile eine maßgebliche Rolle zuerkannt wird, ist relativ wenig über die Interaktion der einzelnen Komponenten bekannt. Beteiligt sind sowohl in das Gehirn einwandernde Immunzellen (Lymphozyten, neutrophile Granulozyten etc.) als auch Mikroglia als ortständige Immunzellen. Die Entwicklung therapeutischer Strategien zur Beeinflussung dieser Immunantwort mit dem Ziel einer Reduktion der sekundären Hirnschädigung nach einem ischämischen Schlaganfall setzt ein besseres Verständnis der Reaktionsmuster der beteiligten Komponenten voraus. Eine Immunmodulation würde im Vergleich zur bisher einzig zugelassenen Therapie – der Thrombolyse – theoretische Vorteile bieten, da mit einem möglichen Zeitfenster der Intervention zwischen mehreren Stunden bis mehreren Tagen nach der Ischämie gerechnet werden kann (siehe Abbildung 1).

Die vorliegende Arbeit konzentriert sich speziell auf die Rolle von Mikroglia, die an der Regulation der Immunantwort im Rahmen der postischämischen Gewebsschädigung maßgeblich beteiligt sind. Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines *in vitro* Modells zur Untersuchung des inflammatorischen Reaktionsmusters von murinen Mikroglia, ausgelöst durch den kombinierten Entzug von Sauerstoff und Glukose (OGD) unter Simulation pathologischer, metabolischer Veränderungen (Azidose, Hyperkaliämie und hoher Glutamatkonzentration).

1 Einleitung

1.1 Der ischämische Schlaganfall

Der ischämische Schlaganfall ist die dritthäufigste Todesursache in den Industrieländern und bedingt außerdem häufig Langzeitmorbidity, Behinderung und Erwerbslosigkeit (European Stroke Organisation 2011). Der Schlaganfall stellt dadurch einen erheblichen Kostenfaktor im Gesundheitssystem dar, wobei in den nächsten Jahren und Jahrzehnten mit einer weiteren Steigerung der Kosten gerechnet wird, vor allem im Bereich der Rehabilitation und post-akuten Betreuung. Aufgrund der demographischen Strukturentwicklung der Bevölkerung in den Industrieländern ist der Schlaganfall aktuell Thema intensiver Forschung und wird auch in Zukunft von großem gesellschaftlichem, wissenschaftlichem und klinischem Interesse sein (Kolominsky-Rabas et al. 2006).

Störungen in der lokalen Perfusion des Gehirns führen zu einer temporären Minderversorgung der betroffenen Areale mit Sauerstoff und Glukose. Im ischämischen Gewebe bewirkt das eine Reihe von Reaktionen, die primär und sekundär den Zelltod von Neuronen und Gliazellen verursachen. Die Reperfusion nach zerebraler Minderdurchblutung kann intensive entzündliche Vorgänge initiieren und unterhalten (Carden und Granger 2000), die durch sekundäre Störungen der zerebralen Mikrozirkulation über oxidativen und nitritiven Stress und über die Infiltration von Entzündungszellen in das Infarktareal zu einer weiteren Schädigung des subletal geschädigten Hirngewebes führen. Man spricht von einer Ischämie-Reperfusionsschädigung (Crack und Taylor 2005), die die Voraussetzungen für die Ausbildung eines postischämischen Inflammationsgeschehens schafft. Derzeit stellt die frühe thrombolytische Rekanalisation des verschlossenen Gefäßes zur Wiederherstellung des Blutflusses die einzig verfügbare therapeutische Option dar (Huang et al. 2006). Die postischämische Inflammation findet Stunden, Tage und Wochen nach dem ischämischen Ereignis statt und wird durch eine Reihe komplizierter, bisher nicht vollständig verstandener Interaktionen zwischen zellulären

und molekularen Komponenten des Immunsystems moduliert. Das Ausmaß der Entzündungsreaktion entscheidet vermutlich mit über das Ausmaß des sekundär entstehenden und bleibenden Gewebeschadens (Madinier et al. 2009; Whiteley et al. 2009).

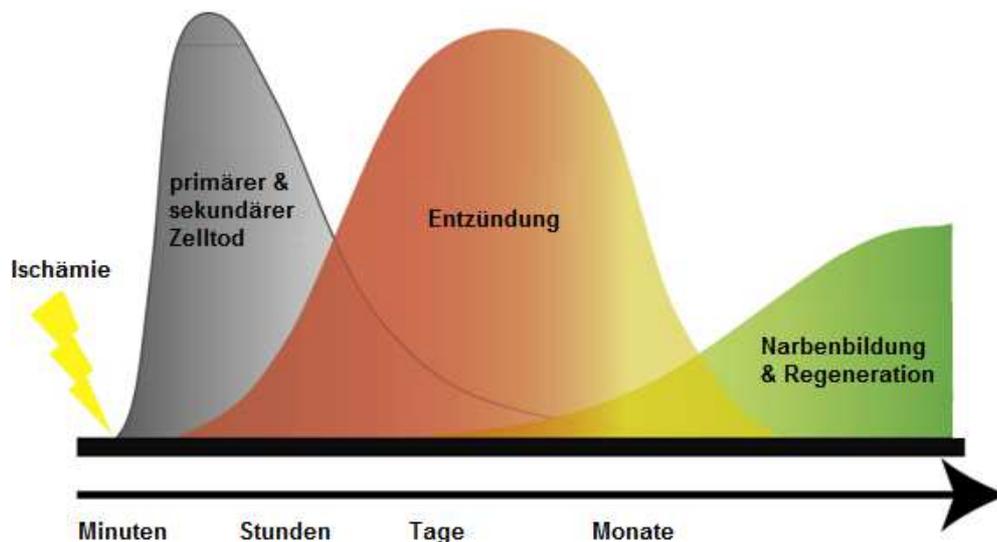


Abb.1: **Hypothetische Darstellung des zeitlichen Ablaufs peri- und postschämischer Ereignisse.** Primäre und sekundäre Zelltodmechanismen finden innerhalb von Minuten und Stunden statt und gehen mit erhöhter Exzitotoxizität und der Entstehung von Depolarisationswellen einher. Im Folgenden kommt es zu einer Entzündungsreaktion, die über Tage bis Wochen andauern kann. Die Regenerationsphase beginnt mit der abklingenden Entzündung. Abbildung modifiziert nach Dirnagl (Dirnagl et al. 1999).

1.2 Die Penumbra

Neben dem Zentrum des betroffenen Gewebes im Gehirn ist auch der randständig gelegene Bereich, die Penumbra, von großer Bedeutung im Schlaganfallgeschehen. Neurone können im Rahmen eines ischämischen Ereignisses auch nicht-letal geschädigt werden, wenn eine Mindestversorgung zum Beispiel über Kollateral-Gefäße aufrecht erhalten wird und somit metabolische Prozesse physiologisch

aufrechterhalten werden können (Morioka et al. 1993; Hossmann 1994; Streit et al. 1999; Kiewert et al. 2009). Die Penumbra kann im Verlauf von Tagen bis Wochen Umgebung für apoptotischen Zellabbau sein, aber auch über postischämische Inflammationsvorgänge in nekrotisches Gewebe übergehen (Zheng et al. 2003). Grund dafür sind zum einen vom Zentrum des Infarktareals ausgehende Depolarisationswellen, die den Sauerstoffbedarf der Penumbra erhöhen, der durch die eingeschränkte Perfusion nicht gedeckt werden kann (Hossmann 1994). Man konnte einen direkten Zusammenhang zwischen Intensität und Dauer der Peri-Infarkt-Depolarisation und Infarktgröße herstellen (Mies et al. 1993). Zum anderen ist die Glutamat-induzierte Exzitotoxizität im Rahmen der sekundären Schädigung der Penumbra von Bedeutung (Dwyer et al. 2008). Ob geschädigte Zellen über den nekrotischen oder apoptotischen Abbau eliminiert werden, hängt größtenteils von Art und Dauer der Schädigung, aber auch von der Art der Zelle und ihrem aktuellen Status im Zellzyklus ab. Der regulierte, apoptotische Zelltod geht nicht mit einer unkontrollierten Ausschüttung intrazellulär gespeicherter Substanzen und Mediatoren einher und hat im Gegensatz zur Nekrose keinen negativen Einfluss auf umliegende Zellen (Leist und Nicotera 1998; Dirnagl et al. 1999).

Zusammenfassend stellt die Penumbra daher ein pathophysiologisch definiertes, variables Hirnareal dar, in dem sich Neurone befinden, die theoretisch noch therapeutischen Interventionen nach zerebraler Ischämie zugänglich sind. Deshalb liegt in der Entwicklung neuroprotektiver Behandlungsstrategien ein besonderer Fokus auf der Beeinflussung der Penumbra (Furlan et al. 1996).

1.3 Die Postischämische Inflammation

Das intrazelluläre Ca^{2+} -abhängige Second-Messenger-System, die Entstehung freier Radikale und die Hypoxie an sich vermitteln die Genexpression von Transkriptionsfaktoren, die die Synthese verschiedener Entzündungsmediatoren bewirken (Dirnagl et al. 1999). Dazu zählen unter anderem die Zytokine Tumornekrose-Faktor- α (TNF- α), Interleukin 1 β (IL-1 β) und Interleukin 6 (IL-6) (Rothwell und Hopkins 1995; Huang et al. 2006). In der Folge werden die

Adhäsionsmoleküle P-Selektin, E-Selektin und das intrazelluläre Adhäsionsmolekül 1 (ICAM-1) auf der Zelloberfläche von Endothelzellen exprimiert, die mit speziellen Oberflächenmolekülen auf zirkulierenden Neutrophilen interagieren (Clark et al. 1995; Huang et al. 2006). Es wird die Bindung der Neutrophilen an das Gefäßendothel ermöglicht, die daraufhin die Endothelschranke überwinden können. Die Zellen infiltrieren das ischämische Hirngewebe und sind dort in der Lage, freie Radikale und proteolytische Enzyme zu produzieren und freizusetzen. Außerdem können sie eine Zytokinausschüttung in benachbarten Zellen bewirken (Chou et al. 2004). Makrophagen, Monozyten und dendritische Zellen folgen den chemotaktischen Reizen der Neutrophilen (Iadecola 1997; Huang et al. 2006) über Chemokine wie Monozyten-chemotaktisches-Protein-1 (MCP-1) und reichern sich im Infarktareal an (Ivacko et al. 1997; Hanisch und Kettenmann 2007). Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung und Infiltration von Mikroglia-Zellen innerhalb eines Tages stattfindet (Schilling et al. 2003). Die Sekretion proinflammatorischer Mediatoren durch dendritische Zellen spielt eine Rolle bei der weiteren Rekrutierung von inflammatorischen Zellen in das ischämische Areal, der Aktivierung von T-Zellen und Zellen der ortständigen Mikroglia und kann damit ebenfalls zu einer irreversiblen Gewebsschädigung führen (Huang et al. 2006; Lai und Todd 2006). Die Infiltration des ischämischen Gewebes durch Immunzellen kann außerdem mit einer Obstruktion von Mikrogefäßen und der Ausbildung eines Ödems einhergehen (Chou et al. 2004). Es folgt der nekrotische Zelltod von Neuronen und Zellen der Astroglia, der in Abhängigkeit von Art, Dauer und Region der zerebralen Ischämie im Zeitraum von Stunden bis Tagen oder Wochen nach dem Schlaganfall auftreten kann (Lipton 1999). Insbesondere neutrophile Granulozyten, Monozyten / Makrophagen, Zellen der ortständigen Mikroglia und auch T-Zellen wurden als wichtiger Teil dieser post-ischämischen Entzündungskaskade identifiziert (Gelderblom et al. 2009).

Allerdings ist die Rolle des Immunsystems, speziell die von Mikroglia-Zellen, in der sekundären Entstehung eines Ischämie-Reperfusionsschadens ambivalent (Hanisch und Kettenmann 2007). Sowohl neuroprotektive als auch neurodestruktive Vorgänge werden von Mikroglia initiiert und in der Folge über Zytokine vermittelt (siehe auch 1.4.4). Auch weitere immunkompetente Zellen, wie beispielsweise regulatorische T-Zellen oder $\gamma\delta$ T-Zellen, beeinflussen die Ausbildung eines Ischämie-Reperfusionsschadens über die Vermittlung anti- und

proinflammatorischer Effekte (Liesz et al. 2009; Shichita et al. 2009). Auch für andere entzündliche Hirnerkrankungen, wie beispielsweise Multiple Sklerose, konnte gezeigt werden, dass die antiinflammatorischen Aspekte einer mikroglialen Immunantwort sich protektiv auf die klinische Manifestation eines Entzündungsgeschehens auswirken. Klinisch relevante, therapeutische Strategien zielen auf die Suppression einer Entzündungsreaktion ab (Napoli und Neumann 2010; van Noort et al. 2011). Deshalb ist die Eindämmung der inflammatorischen Antwort auch nach ischämisch vermitteltem zerebralem Gewebsschaden Ziel der Entwicklung neuer therapeutischer Optionen (Huang et al. 2006; Gelderblom et al. 2009).

1.4 Mikroglia

Die Existenz von weiteren Zellen neben Astroglia und Neuronen im Gehirn wurde bereits 1913 von dem spanischen Mediziner Ramón y Cajal beschrieben, der diese als „drittes Element“ bezeichnete. 1932 gelang es Del Rio Hortega, Mediziner und Histologe am Instituts Ramón y Cajals, die unbekannte Zellpopulation mit einer Silberkarbonat-Färbung darzustellen und zu klassifizieren. Er konnte Mikroglia und Oligodendrozyten erstmals gezielt mikroskopisch sichtbar machen und außerdem Rückschlüsse auf ihren Ursprung ziehen (Jacobson und Rao 2005).

1.4.1 Ursprung und Entwicklung von Mikroglia

Mikroglia-Zellen werden gemeinsam mit Astroglia-Zellen und Oligodendrozyten zu den neuroglialen Zellen gezählt. Sie sind im Hirngewebe strukturgebend und bilden ein Netzwerk, in das die neuronalen Zellen integriert sind. Man geht davon aus, dass Gliazellen, anders als Neurone, nicht direkt an der Informationsvermittlung und –verarbeitung beteiligt sind. Dennoch gibt es im Gehirn 10 – 50-mal mehr Gliazellen als Neurone (Kandel et al. 2000) und Mikroglia-Zellen machen 12% aller Zellen im Gehirn aus (Montero et al. 2009). Im Gegensatz zu Astroglia und Oligodendrozyten,

die auch als Makroglia zusammengefasst werden und vom Ektoderm abstammen, sind Mikroglia-Zellen mesodermaler Herkunft und stellen die gewebetypischen Makrophagen des zentralen Nervensystems (ZNS) dar (Chan et al. 2007). Sie zählen zum monozytären Makrophagen-System (MMS) und tragen zum Teil typische Oberflächenmarker dieser Gruppe, zu der auch andere gewebespezifische Makrophagen und dendritische Zellen zählen. Man geht heute davon aus, dass es mehrere Entwicklungsstufen und Formen von Mikroglia-Zellen gibt, die sich sowohl in ihrer Oberflächencharakteristik, Morphologie und Aktivität als auch in ihrem Ursprung unterscheiden (Rezaie et al. 2005).

Die Besiedelung des Gehirns durch mikrogliale Vorläuferzellen findet offensichtlich schon in der embryonalen und fetalen Entwicklungsphase statt (Davis et al. 1994; Chan et al. 2007). Dabei gibt es Hinweise darauf, dass zwei verschiedenen Populationsmechanismen nebeneinander existieren. Zum einen wandern mesodermale Vorläuferzellen ein, die vermutlich von hämatopoetischen Stammzellen aus dem Dottersack abstammen (Imamura et al. 1990; Kaur et al. 2001). Zum anderen wird eine Übergangsform der Mikroglia-Zellen beschrieben, die aus im Blut zirkulierenden monozytären Vorläufern hervorgeht und in Phänotyp und Morphologie der amöboiden Form im adulten Gehirn ähnelt. Postnatal nimmt ihre Anzahl allerdings stetig ab, während parallel dazu der Anteil an ramifizierten, residenten Mikroglia steigt (Rezaie et al. 2005). Es gibt Anzeichen dafür, dass amöboide Mikroglia-Zellen sich weiter differenzieren können und sich die physiologische Mikroglia-Population aus dieser monozytären Vorläuferzelle entwickelt (Perry et al. 1985; Kaur et al. 2001). Während Mikroglia im gesunden adulten Gehirn nur einen geringen Zellumsatz haben, können unter pathologischen Bedingungen wieder zirkulierende monozytäre Vorläufer aus dem Knochenmark rekrutiert werden und Zellerneuerung bzw. -expansion betreiben (Lassmann und Hickey 1993; Chan et al. 2007).

Es ist bis heute nicht einfach, die Entwicklungsmechanismen und Populationseigenschaften von Mikroglia genau nachzuvollziehen, weswegen sie in der Vergangenheit immer wieder kontrovers diskutiert wurden (Kaur et al. 2001; Chan et al. 2007). Doch auch wenn die exakten Abläufe der Entstehung und Vorläufer noch nicht vollständig verstanden sind, scheint der Zusammenhang zu anderen immunkompetenten Zellen gesichert und man kann von gemeinsamen myeloiden Vorläuferzellen ausgehen (Chan et al. 2007).

1.4.2 Mikroglia *in vivo*

Mikroglia-Zellen sind unter physiologischen Bedingungen gestreckte Zellen mit vielen verzweigten Zellfortsätzen. Bei Stress, zum Beispiel durch Hypoxie, und inflammatorischer Reizung werden sie über verschiedene Mechanismen molekular aktiviert und verändern ihre Morphologie und ihren funktionellen Status (Kreutzberg 1996; Nissl 1894).

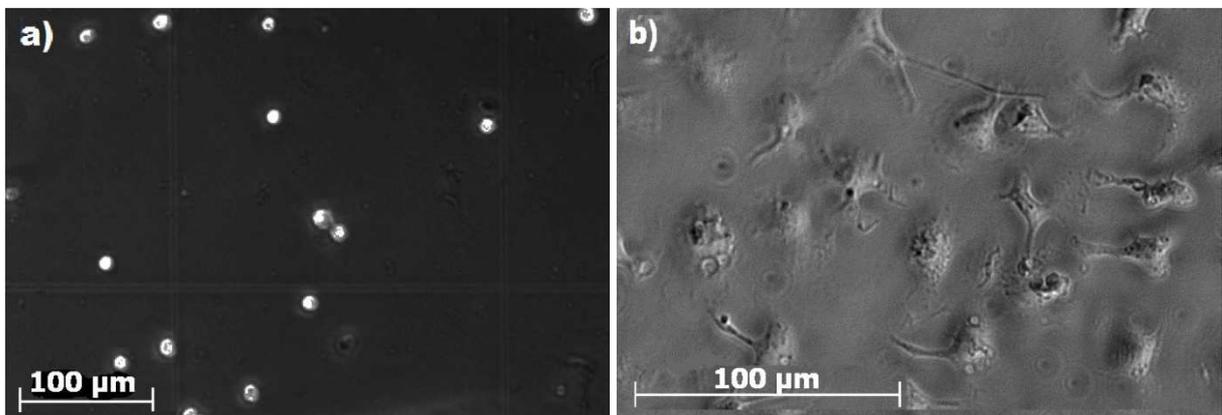


Abb.2: **Lichtmikroskopische Aufnahmen von Mikroglia im Phasenkontrast (days *in vitro* (DIV) 14) in unterschiedlichen Aktivierungszuständen.** a) zeigt aktivierte Mikroglia in 10 x Vergrößerung, in b) sind Mikroglia in inaktivem, ruhendem Zustand in 20 x Vergrößerung gezeigt.

Mikroglia verhalten sich im ZNS fakultativ phagozytotisch und gehen nur nach spezifischer Aktivierung ihrer phago- und pinozytotische Aufgabe nach. Sie unterscheiden sich somit von anderen gewebständigen Makrophagen, die permanent phagozytieren (Streit et al. 1999). Außerdem sind sie mobilisierbar und damit zu Migration in geschädigte Hirnareale befähigt (siehe Abbildung 3). Weiter spielen sie in immunologischen Prozessen eine wichtige Rolle als Antigen-präsentierende Zellen, die über Moleküle des Haupthistokompatibilitätskomplexes II (Major Histocompatibility Complex II (MHC-II)) mit T-Zellen interagieren können (Kandel et al. 2000).

1.4.3 Mikroglia im ischämischen Schlaganfall

Die Aktivierung bzw. Proliferation von Mikroglia durch oxidative Spalt- und Abbauprodukte sowie die Interaktion mit geschädigten Neuronen kurze Zeit nach einem ischämischen Ereignis spielt eine wichtige Rolle bei der postischämischen Inflammation im Gehirn. Die Zellen der endogenen Mikroglia stellen postischämisch schon nach kurzer Zeit die dominante Zellpopulation im geschädigten Areal dar und sind über mehrere Wochen bis Monate nach einem ischämischen Schlaganfall vermehrt nachweisbar (Kreutzberg 1996; Lai und Todd 2006). Diese reaktive Mikrogliose ist chronologisch gekennzeichnet durch eine schnelle Aktivierung und Migration gewebständiger Mikroglia-Zellen innerhalb von Stunden nach einem ischämischen Ereignis, die mit einer Hypertrophie der Zellen und der verstärkten Expression von Zytokinen einhergeht. Neben Wachstumsfaktoren wie Transforming growth factor- β (TGF- β) (Klempt et al. 1992) werden auch proinflammatorische Zytokine produziert. Von besonderem Interesse sind in diesem Zusammenhang TNF- α , IL-1 β und IL-6 (Rothwell und Hopkins 1995; Huang et al. 2006). Es folgt die Proliferation von Mikroglia nach wenigen Tagen und die bis zu Wochen andauernde Rekrutierung von residenten Mikroglia-Zellen und zirkulierenden Makrophagen über MHC-Moleküle (Streit et al. 1999; Madinier et al. 2009). Die Mikroglia-Population auf der Seite der Läsion vergrößert sich folglich und kann eine reaktive Leukozyteninfiltration initiieren (Hanisch und Kettenmann 2007).

Die Interaktion zwischen Mikroglia und Neuronen im Rahmen pathologischer Veränderungen in ihrer Umgebung ist für diese Vorgänge von großer Bedeutung, da die neuronalen Signale nach einem Zellschaden die Aktivierung von Gliazellen bewirken. Sie müssen sehr spezifisch sein und exakt verarbeitet werden, um die Unterscheidung zwischen Untergang und Überleben der Zelle sicher zu stellen.

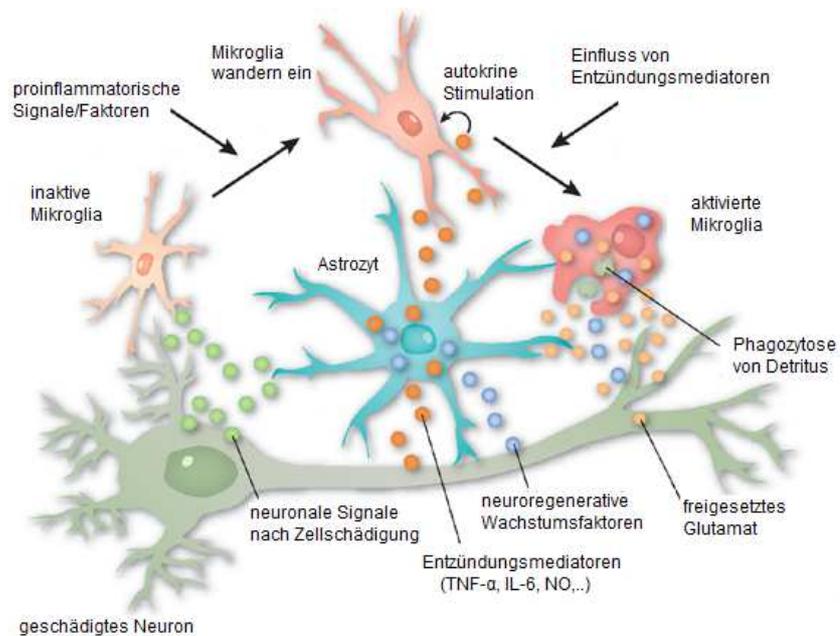


Abb.3: **Interaktion zwischen Mikroglia, Neuronen und Astrozyten unter pathologischen Bedingungen.** Durch die spezifischen Signale geschädigter Neurone werden Mikroglia gezielt rekrutiert und aktiviert. Unter dem Einfluss von Entzündungsmediatoren wie $\text{TNF-}\alpha$ und IL-6 werden weitere Mikroglia mobilisiert und aktiviert und eine Entzündungsreaktion wird aufrecht erhalten. Astrozyten werden zur Sekretion von neurotrophen Faktoren stimuliert und Mikroglia können Phagozytose betreiben, was sich ebenfalls neuroprotektiv auswirkt. Abbildung modifiziert nach Monk und Shaw (Monk und Shaw 2006).

Man geht davon aus, dass auch die räumliche Anordnung von Mikroglia-Zellen um Neuronen eine wichtige Rolle bei der Kommunikation spielt, genau wie die Migration und die Orientierung mikroglialer Fortsätze zu neuronalen Strukturen nach Zellschädigung (Streit et al. 1999; Davalos et al. 2005).

1.4.4 Mikroglia – neurodestruktiv und neuroprotektiv

Die speziellen Eigenschaften und Funktionen von Mikroglia-Zellen im Gehirn können sich unter pathologischen Bedingungen im Rahmen postischämischer Inflammationsvorgänge sowohl neurodestruktiv als auch neuroprotektiv auswirken (Streit et al. 1999; Montero et al. 2009). Das exzitotoxische Verhalten von Mikroglia unter bzw. nach hypoxischen Bedingungen hat neurodegenerativen Charakter und induziert den Untergang von Neuronen. Dabei spielt besonders die Ausschüttung der neurotoxisch wirkenden Substanzen Nitrit Oxid (NO) und Arachidonsäure bzw. ihrer Derivate eine wichtige Rolle. Die entstehenden freien Sauerstoffradikale wirken ebenfalls neurodestruktiv. Die von Mikroglia produzierten proinflammatorischen Zytokine, zu denen auch TNF- α zählt, initiieren und erhalten eine postischämische Entzündungsreaktion, die sich in der Folge ebenfalls neurodegenerativ auswirken kann (Wang et al. 2007; Kaushal und Schlichter 2008). Es wurde eine direkte gegenseitige Beeinflussung zwischen exzitotoxischer Neuronenaktivität und NO-Produktion in geschädigten Zellen beobachtet (Leist und Nicotera 1998). Es gibt aber auch Hinweise darauf, dass aktivierte Mikroglia-Zellen im ischämischen Schlaganfall neuroprotektive bzw. neuroregenerative Effekte vermitteln. Durch ihre phagozytotischen Eigenschaften beseitigen sie schädlichen Zellabfall (Detritus) und können Platz für neue Strukturen schaffen. Ischämisch geschädigte Zellen werden beseitigt, um den durch exzitatorische Substanzen vermittelten weiteren Zelluntergang zu verhindern. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass Mikroglia unter bestimmten pathologischen *in vitro* Bedingungen zur Aufnahme und damit Beseitigung von extrazellulärem Glutamat befähigt sind (Persson et al. 2005; Hanisch und Kettenmann 2007). Über die Produktion und Sezernierung verschiedener Mediatoren unterstützen sie außerdem die Zellregeneration. Zu den neuroregenerativen Mediatoren zählen beispielsweise die Wachstumsfaktoren TGF- β , Plasminogen oder neurotrophe Substanzen, wie Nerve Growth Factor (NFG) und Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) (Montero et al. 2009). Eine besondere Rolle bei den postischämischen neuroplastischen Vorgängen scheint Brain-Derived Neurophic Factor (BDNF) einzunehmen, der ebenfalls von Mikroglia-Zellen produziert wird (Madinier et al. 2009).

1.4.5 Mikroglia *in vitro*

Die *in vitro* Modelle zur Simulation des ischämischen Schlaganfalls bzw. zur Aktivierung von Mikroglia werden immer präziser und versuchen, die interzelluläre Kommunikation so weit wie möglich zu gewährleisten (Kaushal und Schlichter 2008). Viele aus Zellkultur-Experimenten gewonnene Erkenntnisse können bereits auf das *in vivo* Verhalten von Mikroglia unter pathologischen Bedingungen übertragen werden (Streit et al. 1999). Die Zellen für Mikroglia- bzw. Mischkulturen können aus dem Gewebe verschiedener Spezies gewonnen werden. Üblich sind Modelle mit Maus, Ratte oder Kaninchen, seltener Katze oder Ziege. Auch die Kultivierung humaner Zellen ist möglich (Dobrenis 1998). Mikroglia-Zellen unterscheiden sich in Kultur in ihren Adhärenz-Eigenschaften von Astrozyten und Oligodendrozyten. Dieses Merkmal macht man sich bei der Isolation aus Mischkulturen zu Nutze und kann so reine Mikroglia-Kulturen herstellen. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass verschiedene morphologische und funktionelle Formen von Mikroglia auch *in vitro* simultan vorkommen (Dobrenis 1998; Rezaie et al. 2005). Die ramifizierte Form befindet sich in Mischkulturen unter dem konfluenten Astrozytenrasen oder ist darin integriert, während aktivierte, amöboide Mikroglia-Zellen auf der Astrozytenpopulation sitzen (Tanaka et al. 1999). Auch *in vitro* sind aktivierte Mikroglia gegenüber nicht-aktiven Mikroglia vergrößert, ziehen ihre Fortsätze ein und nehmen eine typische amöboide Morphologie an (Kandel et al. 2000). Die metabolische Mikroumgebung, die Dauer der Kultivierung und die Wachstumsbedingungen sind nur einige Faktoren, die über den Aktivierungszustand der Zelle *in vitro* entscheiden. Auch das Migrationsverhalten aktivierter Mikroglia kann unter Kulturbedingungen beobachtet werden (Dobrenis 1998).

In vitro Schlaganfallmodelle, die auf dem kombinierten Entzug von Sauerstoff und Glukose (OGD) an Zellkulturen beruhen, werden immer weiter verfeinert und bieten vielversprechende Aussichten (Kaushal und Schlichter 2008). Viele Erkenntnisse zu den Effekten der Aktivierung von Mikroglia wurden durch Experimente mit *in vitro* Modellen gesammelt (Hanisch und Kettenmann 2007).

1.5 Lokale, metabolische Veränderungen nach zerebraler Ischämie

Lokale Störungen des Blutflusses können hämorrhagischen oder okklusiven Ursprungs sein und beeinträchtigen die Versorgung des Hirngewebes mit Sauerstoff und Glukose (Kandel et al. 2000). Durch das resultierende Energiedefizit wird die Aufrechterhaltung des Na^+ - K^+ -Ionengradienten zwischen intra - und extrazellulärem Milieu durch die Adenosintriphosphat (ATP)-abhängige Na^+ - K^+ -ATPase verhindert. Der verschobene Ionengradient wirkt sich auf das Membranpotenzial ortsständiger Neurone und Gliazellen aus, das daraufhin depolarisiert (Hansen 1985; Jiang und Haddad 1991). Es kommt zur so genannten Exzitotoxizität: Durch die Depolarisation von Neuronen und Astrozyten und folglich die Aktivierung spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle wird Glutamat exzitatorisch in den Extrazellularraum abgegeben und besetzt die ionotropen N-Methyl-D-Aspartat-(NMDA-) und α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolepropionic-Acid- (AMPA-) Glutamatrezeptoren. Diese Rezeptoren sind in aktiviertem Zustand durchlässig für Ca^{2+} -Moleküle. Die Konzentration des sekundären Botenstoffs Ca^{2+} steigt in den Zellen des betroffenen Gewebes daraufhin stark an. Die Signalkaskade mit Ca^{2+} , Phospholipase C und Inositol-1, 4, 5-Trisphosphat (IP_3) als Mediatoren bewirkt den Einstrom von Na^+ und Cl^- in die Zellen des ischämischen Gewebes (Dirnagl et al. 1999; Kiewert et al. 2009). K^+ strömt aus der Zelle aus und reichert sich ebenfalls im Extrazellularraum an, kann aber den passiven Einstrom von H_2O in die ischämischen Zellen nicht ausgleichen (Hansen 1985). Die Zellen schwellen an und es bildet sich ein Ödem aus, wodurch das umliegende Gewebe weiter minderperfundiert wird (Dirnagl et al. 1999). Die erhöhte extrazelluläre K^+ -Konzentration und das exzitatorisch ausgeschüttete Glutamat sind unter anderem auch für die Entstehung von Depolarisationswellen (Periinfarkt-Depolarisierung) in repolarisierten Zellen verantwortlich. Periinfarkt-Depolarisationen finden hauptsächlich im peripheren Infarktgebiet, der Penumbra (siehe 1.2), mit einer Frequenz von bis zu 3 mm pro Minute statt (Hossmann 1996; Doyle et al. 2008). Der Ischämie-vermittelte Ca^{2+} -Anstieg bewirkt außerdem eine Reihe intrazellulärer Vorgänge, die die Aktivierung proteolytischer Enzyme zur Folge haben und so den Abbau zellulärer Strukturen wie Desoxyribonukleinsäure (DNS) und Proteinen und folglich den Zelluntergang bewirken (Lipton 1999). Es entstehen phospholipase-A2- und cyclooxygenaseabhängig freie Sauerstoffradikale, die in der Lage sind, die

Zellmembran zusätzlich zu schädigen. Sie haben zusätzlich direkten Einfluss auf das entstehende Entzündungsgeschehen und den nekrotischen Zelltod in dem betroffenen Gewebe (Yagami et al. 2005; Lai und Todd 2006).

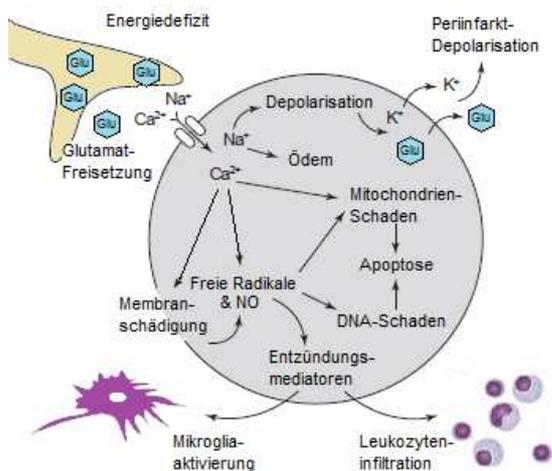


Abb.4: **Darstellung metabolischer Abläufe in der hypoxischen Zelle.** Na⁺ kann über den gestörten Ionengradienten vermehrt in die Zelle gelangen und führt zu ihrer Depolarisation. Glutamat und Ca²⁺ sind von zentraler Bedeutung für die Bildung von freien Radikalen und Entzündungsmediatoren, über die eine Entzündungsreaktion initiiert werden kann. Abbildung modifiziert nach Dirnagl (Dirnagl et al. 1999).

Die metabolischen Veränderungen infolge einer zerebralen Ischämie treten sofort ein und sind später Voraussetzung für die Ausbildung einer Entzündungsreaktion und sekundär Zellschädigung.

Wie sie sich im Hirnparenchym auswirken und welche Veränderungen wichtig für die Entstehung einer postischämischen Hirnschädigung sind, soll im Folgenden geklärt werden. In verschiedenen *in vivo* Experimenten wurden bereits die Konzentrationen relevanter Ionen und Substanzen bei zerebraler Ischämie mit zerebraler Mikrodialyse bzw. Ionensensitiver Mikroelektrode ermittelt (Hansen 1985; Berger et al. 2004; Kiewert et al. 2009). Die Aufmerksamkeit liegt dabei besonders auf den erhöhten Konzentrationen von K⁺ und Glutamat und dem veränderten pH-Wert im Schlaganfall.

1.5.2 Auswirkungen auf den pH-Wert

Der physiologische pH-Wert liegt beim Menschen zwischen 7,37 und 7,43 und wird über die komplizierte Interaktion verschiedener Puffersysteme stabilisiert. Der bedeutendste Puffer ist der Kohlensäure-Bikarbonat-Puffer ($\text{H}_2\text{CO}_3 / \text{HCO}_3^-$ -Puffer), der Protonen (H^+) binden und freisetzen kann. Dies geschieht in Gegenwart des Enzyms Carboanhydrase nach dem folgendem Reaktionsschema (Schmidt et al. 1976):



Unter ischämischen Bedingungen kann der extrazelluläre pH-Wert schon innerhalb kürzester Zeit auf bis zu 6,55 absinken (Martin et al. 1994). Dieser Abfall kommt hauptsächlich durch die vermehrte Produktion von Laktat zustande, das als Nebenprodukt der anaeroben Glykolyse entsteht. Der anaerobe Energiegewinn soll den Ischämie-bedingten ATP-Mangel zeitweise ausgleichen. Die Kapazität des $\text{H}_2\text{CO}_3 / \text{HCO}_3^-$ -Puffers wird durch die entstehenden Säuren jedoch überschritten und CO_2 gelangt aus den Zellen in den Extrazellularraum. Als Folge steigt der CO_2 -Partialdruck (pCO_2) lokal auf Werte bis 120 mmHg an (Nemoto und Frinak 1981; Hansen 1985).

Das Ausmaß dieser metabolischen Azidose hängt unter anderem von der Glukose-Konzentration im Blut zum Zeitpunkt der Ischämie ab, da eine erhöhte Blutglukose mit einem verstärkten Umbau zu Laktat assoziiert ist. Myers und Yamaguchi konnten zeigen, dass eine periischämische Hyperglykämie den pH-Wert drastischer sinken lässt als eine normo- und hypoglykämische Stoffwechsellage, die zu einem geringeren pH-Abfall führt (Ljunggren et al. 1974; Myers und Yamaguchi 1977).

Um eine Aussage über die Auswirkung der Ischämie-bedingten pH-Wert-Veränderungen treffen zu können, muss zwischen intra- und extrazellulärem pH-Wert unterschieden werden. Der extrazelluläre pH-Wert hat Einfluss auf verschiedene metabolische Vorgänge und zelluläre Transporter und Kanäle. Ein niedriger intrazellulärer pH-Wert verstärkt unter anderem die Freisetzung von Ca^{2+} aus den Zellen und eine weitere neuronale Schädigung durch freie Radikale (Martin et al. 1994; Lipton 1999; Doyle et al. 2008).

1.5.1 Auswirkung auf die extrazelluläre K⁺-Konzentration

Durch den Ausfall der ATP-abhängigen Na⁺-K⁺-Pumpe nach Ischämie-bedingtem ATP-Mangel ist der Transport von Kalium in die Zelle gestört und die extrazelluläre K⁺-Konzentration steigt an. Physiologisch liegt die Konzentration im Extrazellularraum beim Menschen bei 4,0 mM (Berger et al. 2004), bei der Maus bei 5,3 mM (Kiewert et al. 2009). In verschiedenen *in vivo* Experimenten wird im Schlaganfall ein Anstieg des extrazellulären K⁺ auf bis zu 100 mM beschrieben (Hansen 1985). Die erhöhte K⁺-Konzentration hat sowohl exzitatorische als auch inhibitorische Effekte auf die Zellen in der Umgebung und ihre Kommunikationsvorgänge und ist außerdem an der postischämischen Hirnschädigung durch Periinfarkt-Depolarisation maßgeblich beteiligt (Hossmann 1996).

1.5.3 Auswirkung auf die extrazelluläre Glutamat-Konzentration

Die exzitatorische Aminosäure Glutamat reichert sich nach der Depolarisation von Neuronen und Zellen der Astroglia im Extrazellularraum an und aktiviert dort die ionotropen NMDA- und AMPA- Glutamatrezeptoren (siehe 1.2). Die Ausschüttung von Glutamat ist eine der ersten Reaktionen des Organismus auf die zerebrale Ischämie. Sie setzt unmittelbar nach dem ischämischen Ereignis ein und hat über primäre und sekundäre Mechanismen enormen Einfluss auf die Pathogenese des Schlaganfalls (Martin et al. 1994; Kiewert et al. 2009). In verschiedenen *in vivo* und *in vitro* Modellen führte der experimentelle Einsatz von Glutamatrezeptor-Antagonisten zu geringeren Infarktvolumina und damit zu einer verbesserten Prognose (Dugan und Choi 1994; Hossmann 1994).

Die physiologische, extrazelluläre Konzentration von Glutamat liegt beim Menschen bei ungefähr 3,9 µmol/l. Die hypoxischen Bedingungen im Schlaganfall bewirken einen Anstieg auf im Mittel 196 µmol/l Glutamat. In der Literatur werden außerdem extreme Werte von bis zu 453 µmol/l beschrieben, die *in vivo* mittels zerebraler Mikrodialyse erhoben wurden (Berger et al. 2004). Dabei werden schon extrazelluläre Konzentrationen von 10 – 20 µM als neurotoxisch gewertet (Leist und

Nicotera 1998). Auch in Tiermodellen wurde ein massiver Anstieg der extrazellulären Glutamatkonzentration beobachtet, in *in vitro* Experimenten fällt der Anstieg dagegen geringer aus (Martin et al. 1994; Leist und Nicotera 1998; Kiewert et al. 2009). Glutamat ist als Neurotransmitter von großer Bedeutung und hat Einfluss auf die intra- und extrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration und darüber hinaus auf die Entstehung von Periinfarkt-Depolarisationen (Hossmann 1996).

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

ELISA-Absorptionsmesser	Sunrise™, Tecan Group Ltd., Schweiz
96-well-Platten-Wascher	Columbus TECAN M8/2R, Tecan Group Ltd., Schweiz
Computersoftware	AxioVision4 Microscope Software, Carl Zeiss AG, Deutschland (Oberkochen) Magellan™ Data Analysis Software, Tecan Group Ltd., Schweiz Microsoft Office Excel 2003, Microsoft Deutschland GmbH, Deutschland (Unterschleißheim) GraphPad Prism 5, GraphPad Software, Inc., USA
Gasbrenner	gasprofi 1, WLD-TEC GmbH, Deutschland (Arenshausen)

Magnetrührer	Model 34532, snijders scientific b.v., Niederlande
Mikroskope	Stemi DV4 (Double Lens Vario, Zoomfaktor 4), Carl Zeiss AG, Deutschland (Oberkochen) mit Auflicht KL200, SCHOTT AG, Deutschland (Mainz)
	Axiovert 40 CFL, Carl Zeiss AG, Deutschland (Oberkochen)
OGD-Kammer	Modular incubator chamber (MIC-101), Billups-Rothenberg Inc., USA
pH-Meter	pH357, WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Deutschland (Weilheim)
Pipetten	Modelle Research®/Reference®, Eppendorf AG, Deutschland (Hamburg)
Rotationsschüttler	Centromat® MT, B Braun Biotech international GmbH, Deutschland (Melsungen)
Vakuumpumpe	Typ N881KN.18, KNF Neuberger, USA
Wärmematte	Mul-T-Pad (TP 22E), Gaymar Industries Inc., USA
Wärmeschrank	Model 3164, Forma Scientific Inc., USA

Wasserbad	Y2K, GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Deutschland (Burgwedel)
	GLS400, Grant, Großbritannien
Werkbank (steril)	SterilGARD Class II Type A/B3, The Baker Company, USA
Zählkammer	Neubauer 0,1mm Kammertiefe, Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Deutschland (Lauda-Königshofen)
Zellkulturschrank	CB 150, BINDER, Deutschland (Tuttlingen)
Zentrifuge	302K, Sigma Laborzentrifugen GmbH, Deutschland (Osterode am Harz)

2.1.2 Verbrauchsmaterial

24-well-Platten	Sarstedt AG & Co, Deutschland (Nümbrecht)
70µm Porenfilter	BD Falcon™ Franklin Lakes, USA
96-well-ELISA-Platten	NUNC MaxiSorp™, eBioscience, USA
96-well-Zellkultur-Platten	Sarstedt AG & Co, Deutschland (Nümbrecht)
Deckgläschen Ø 14mm	Menzel Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG, Deutschland (Braunschweig)

Pasteurpipetten 230mm	VWR International GmbH, Deutschland (Darmstadt)
Petrischalen (bakt.)	Greiner Bio-One GmbH, Deutschland (Frickenhausen)
Pipettenspitzen ohne Filter 1000µl (Typ B), 100µl (Typ A), 10µl (Typ D)	Sarstedt AG & Co, Deutschland (Nümbrecht)
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1 ml, 1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf AG, Deutschland (Hamburg)
Reaktionsgefäße (15ml, 50ml)	BD Falcon™ Franklin Lakes, USA
Serologische Pipetten (5ml, 10ml, 25ml)	BD Falcon™ Franklin Lakes, USA
Spritze <i>Injekt</i> , 20ml	B.Braun Melsungen AG, Deutschland (Melsungen)
Spritzen-Aufsatz-Filter	Rotilabo®, ROTH, Deutschland (Karlsruhe)
Sterilfilter	Millipore, Billerica, USA
Zellkulturflaschen mit Gasaustauschfilter (250ml)	Cellstar®, Greiner Bio-One GmbH, Deutschland (Frickenhausen)

2.1.3 Puffer

N – Kontrolle (pH 7,4)

NaCl	130	mM
KCl	3	mM
HEPES ¹	25	mM
CaCl	1,3	mM
MgCl	1	mM
Glucose	20	mM

N – OGD (pH 7,4)

NaCl	140	mM
KCl	3	mM
HEPES	25	mM
CaCl	1,3	mM
MgCl	1	mM

A - Kontrolle (pH 6,5)

NaCl	130	mM
KCl	3	mM
HEPES	25	mM
CaCl	1,3	mM
MgCl	1	mM
Glucose	20	mM

A - OGD (pH 6,5)

NaCl	140	mM
KCl	3	mM
HEPES	25	mM
CaCl	1,3	mM
MgCl	1	mM

K - Kontrolle (pH 7,4)

NaCl	75	mM
KCl	60	mM
HEPES	25	mM
CaCl	1,3	mM
MgCl	1	mM
Glucose	20	mM

K - OGD (pH 7,4)

NaCl	85	mM
KCl	60	mM
HEPES	25	mM
CaCl	1,3	mM
MgCl	1	mM

G - Kontrolle (pH 7,4)

NaCl	130	mM
KCl	3	mM
HEPES	25	mM
CaCl	1,3	mM
MgCl	1	mM
Glutamat	0,2	mM
Glucose	20	mM

G - OGD (pH 7,4)

NaCl	140	mM
KCl	3	mM
HEPES	25	mM
CaCl	1,3	mM
MgCl	1	mM
Glutamat	0,2	mM

¹ 4-(2-Hydroxyethyl)-Piperazinyl-1-Ethansulfonsäure (Sigma-Aldrich, Deutschland (Steinheim))

Dulbecco's PBS² (1x) ohne Ca²⁺ und Mg²⁺ (1x)

KCl	200	mg/l
KH ₂ PO ₄	200	mg/l
NaCl	8000	mg/l
Na ₂ HPO ₄ (anhydrisch)	1150	mg/l
CaCl ₂ • 2H ₂ O	132	mg/l
MgCl ₂ • 6H ₂ O	100	mg/l

HBSS³ mit Ca²⁺ und Mg²⁺, ohne Phenolrot

CaCl ₂ (anhydrisch)	140	mg/l
MgCl ₂ • 6H ₂ O	100	mg/l
MgSO ₄ • 7H ₂ O	100	mg/l
KCl	400	mg/l
KH ₂ PO ₄	60	mg/l
NaHCO ₃	350	mg/l
NaCl	8000	mg/l
Na ₂ HPO ₄ (anhydrisch)	48	mg/l
D-Glucose	1000	mg/l

MTT⁴ Lysis-Puffer (pH4,7)

DMF ⁵	50	%
SDS ⁶	20	%
80%-ige C ₂ H ₄ O ₂	2,5	%
1N HCl	2,5	%
gelöst in sterilem H ₂ O		

ELISA⁷ Waschpuffer

Tween® 20	0,05	%
gelöst in PBS (1x)		
gelagert bei 2-8°C		

² Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PAA Laboratories GmbH, Österreich)

³ Hank's Balanced Salt Solution (GIBCO® Invitrogen, Deutschland (Karlsruhe))

⁴ 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid (Sigma-Aldrich, Deutschland (Steinheim))

⁵ Dimethylformamid (Sigma-Aldrich, Deutschland (Steinheim))

⁶ Natriumlaurylsulfat (Sigma-Aldrich, Deutschland (Steinheim))

⁷ Enzyme-linked Immunosorbent Assay

ELISA Coating-Puffer (pH 6,5)

Na₂HPO₄ 11,8 g

NaH₂PO₄ 16,2 g

gelöst in 1 l sterilem H₂O

gelagert bei 2-8°C

ELISA Assay Diluent

Dulbecco's PBS (1x)

hitzeinaktiviertes FCS 10 %

2.1.4 Antikörper

anti-GFAP Antikörper (anti-mouse IgG2b)

BD Bioscience, USA

anti-Iba-1 Antikörper (anti-rabbit (polyklonal))

WAKO Pure Chemical
Industries, Japan

Alexa 488 (goat anti rabbit)

Invitrogen GmbH, Deutschland
(Karlsruhe)

Alexa 568 (goat anti mouse)

Invitrogen GmbH, Deutschland
(Karlsruhe)

Mouse TNF- α OptEIA™ ELISA Set

BD Bioscience, USA

2.1.5 Primärkulturen aus C57/Bl6 Mäusen P1

Im Vorfeld der Versuche wurde ein Antrag zu Versuchen an Wirbeltieren zu wissenschaftlichen Zwecken gemäß § 8 TschG gestellt und genehmigt und ein Kurs zum Thema „tierexperimentelles Arbeiten mit der Maus“ absolviert (siehe Anhang 1 und 2).

2.2 Methoden

2.2.1 Mikroglia-Astrozyten-Mischkulturen

Die Mikroglia-Astrozyten-Mischkulturen wurden aus neugeborenen C57/Bl6 Mäusen (postnatal Tag 1-2, (P1-P2)) nach dem modifizierten Protokoll von McCarthy und de Vellis (McCarthy und de Vellis 1980) gewonnen. Dabei wurden die Tiere dekapitiert und das Gehirn nach vorsichtigem Eröffnen der Schädeldecke stumpf entnommen. Unter dem Durchlichtmikroskop wurden in eisgekühlter HBSS mit Ca^{2+} , Mg^{2+} , ohne Phenolrot + 10 mM HEPES die Meningen sorgfältig entfernt und das Cerebellum sowie die Bulbi olfactorii komplett abgetrennt. Die Hemisphären wurden mit einem Skalpell sauber voneinander getrennt und an ihren Innenseiten ebenfalls gründlich von Meningenresten befreit. Nachdem die Hemisphären in zwei etwa gleichgroße Anteile geschnitten wurden, wurden sie gesammelt in HBSS + 10 mM HEPES mithilfe einer serologischen 10 ml Pipette aufgenommen und in ein 15 ml Tube überführt. Die folgenden Präparationsschritte wurden steril unter der reinen Werkbank durchgeführt.

Die Zellen wurden mit ca. 5 ml HBSS + 10 mM HEPES gewaschen und mit 2,5 mg Papain (aus Papaya Latex, ≥ 10 units/mg Protein (Sigma-Aldrich, Deutschland (Steinheim))) und 50 μg Desoxyribonuklease (Grade II (Roche Diagnostics GmbH, Deutschland (Mannheim))) in 5 ml vorgewärmten HBSS + 10 mM HEPES gelöst für 25 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit vorgewärmtem Basal Medium Eagle ohne L-Glutamin (BME, (GIBCO® Invitrogen, Deutschland (Karlsruhe))) + 10% fetales Kälberserum (FCS, Südamerika (GIBCO® Invitrogen, Deutschland (Karlsruhe))) und 0,5% Penicillin/Streptomycin (GIBCO® Invitrogen, Deutschland (Karlsruhe)) gewaschen und in 2 ml BME aufgenommen. Die Zellen wurden durch fünfmaliges Auf- und Abpipettieren durch drei zuvor feuerpolierte Pasteurpipetten absteigender Größe zusätzlich mechanisch vereinzelt und durch einen 70 μm Porenfilter gegeben. 90 μl der isolierten Zellsuspension wurden zur Darstellung der Zellvitalität mit 10 μl 0,4%-igen Trypan-Blau-Lösung (Sigma-Aldrich, Deutschland (Steinheim)) angefärbt und in einer Neubauer-Zählkammer in vier Großquadraten unter dem Durchlichtmikroskop ausgezählt.

Anschließend wurde die Zellsuspension mit BME + 10% FCS + 0,5% Penicillin/Streptomycin entsprechend einer Konzentration von zwei Hemisphären pro 10 ml verdünnt und in 250 ml Zellkulturflaschen mit Gasaustauschfilter mit 15 ml pro Flasche ausplattiert. Diese Verdünnung entspricht einer Zelldichte von ca. 300.000 – 400.000 Zellen pro ml.

Die Mischkulturen wurden über mindestens 14 Tage bei 37°C und 5% CO₂ im Zellkulturschrank inkubiert, wobei regelmäßig alle fünf Tage 3,5 ml des alten Kulturmediums entnommen und durch 5 ml vorgewärmtes BME + 10% FCS + 0,5% Penicillin/Streptomycin ersetzt wurden. Jeweils vor dem Mediumwechsel erfolgte eine mikroskopische Beurteilung der Zellkultur mit Fotodokumentation.

2.2.2 Isolation von Mikroglia aus Mikroglia-Astrozyten-Mischkulturen

Um reine Mikroglia-Kulturen zu isolieren, wurden die Mikroglia-Astrozyten-Mischkulturen an DIV 16 - 18 nach der modifizierten Methode von Frei et al. (Frei et al. 1986) aus dem Mikroglia-Astrozyten-Verband gelöst und in der definierten Konzentration von 200.000 Zellen pro ml in 96-well-Platten ausplattiert. Dazu wurden die Mischkulturen in ihrem Kulturmedium für 20-30 Minuten bei 37°C auf dem Rotationsschüttler bei 600-700 rpm geschüttelt. Zwischenkontrollen erfolgten nach 20 und 25 Minuten unter dem Durchlichtmikroskop. Das Medium wurde direkt im Anschluss mit einer 10 ml serologischen Pipette komplett abgenommen, in zwei 50 ml Reaktionsgefäße überführt und bei 1000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und im 37°C - Wasserbad aufbewahrt, das Zell-Pellet in 1 ml des konditionierten BME resuspendiert. Nach der Färbung mit Trypan-Blau wurde die Zellkonzentration in der Neubauer-Zählkammer in vier Großquadraten ausgezählt, der Mittelwert bestimmt und rechnerisch der Verdünnungsfaktor ermittelt, der die Zellsuspension auf eine Endkonzentration von 200.000 Zellen pro ml brachte. Zum Verdünnen wurde das zuvor abzentrifugierte, Astrozyten-konditionierte Kulturmedium in entsprechendem Volumen zu der Zellsuspension pipettiert. Ausplattiert wurden die Zellen anschließend in 96-well-Zellkultur-Platten mit 100 µl pro Vertiefung, was einer Zelldichte von 20.000 Zellen pro Vertiefung entspricht. 24 Stunden nach dem Abschütteln sollten sich alle

Mikroglia-Zellen wieder gestreckt haben und auf dem Boden der 96-well-Platte verästelt sein, um dann in den OGD-Versuch eingebracht werden zu können.

2.2.3 Immunzytochemie

Um den Nachweis erbringen zu können, dass es sich zum Zeitpunkt nach dem Abschütteln um reine Mikroglia-Kulturen handelte, wurde exemplarisch eine immunzytochemische Färbung angefertigt. Dazu wurden die abgeschüttelten Zellen in der oben beschriebenen Konzentration auf vier runden Deckgläschen (Ø 14 mm) in einer 24-well-Platte ausplattiert. Die Zellen wurden nach 24-stündiger Inkubation gefärbt.

Zunächst wurde der BME-Überstand abgenommen und die Zellen wurden vorsichtig mit 500 µl Dulbecco's PBS (1x) gewaschen. Anschließend wurden die Deckgläschen für 10 Minuten mit je 500 µl eisgekühltem 4% Paraformaldehyd (PFA, (Sigma-Aldrich, Deutschland (Steinheim))) in Dulbecco's PBS (1x) bei Raumtemperatur fixiert. Nach zwei weiteren Waschschritten mit Dulbecco's PBS (1x) wurden die Zwischenräume der 24-well-Platte mit sterilem H₂O geflutet. Die Deckgläschen wurden für eine Stunde mit je 500 µl einer Block-Lösung, zusammengestellt aus 0,2% bovinem Serum-Albumin (BSA, (Carl Roth GmbH + Co.KG, Deutschland (Karlsruhe))), 0,3% Triton x 100 (Fluka® Sigma-Aldrich, Deutschland (Steinheim)) und 10% Pferdeserum (HS, Neuseeland (GIBCO® Invitrogen, Deutschland (Karlsruhe))) zu 25 ml Dulbecco's PBS (1x), bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten drei weitere Waschschrritte mit Dulbecco's PBS (1x), bevor der Erstantikörper auf die Zellen gegeben werden konnte. Die aufgereinigten Antikörper gegen das saure Gliafaserprotein (GFAP) und das ionisierte Kalzium-bindende Adaptermolekül-1 (Iba-1) wurden in einer Verdünnung von 1:500 bzw. 1:250 in 1 ml einer Lösung aus 0,2% BSA und 10% HS zu 25 ml Dulbecco's PBS (1x) aufgenommen. Die Deckgläschen wurden mit je 250 µl der Antikörper-Lösung bedeckt und über Nacht bei 4°C gelagert. Am nächsten Tag wurden die Deckgläschen in drei Waschschrritten mit Dulbecco's PBS (1x) gereinigt. Die nächsten Arbeitsschritte erfolgten in lichtreduzierter Umgebung, um den empfindlichen Fluoreszenz-Antikörper zu schützen. Die Zweitantikörper Alexa 488 und Alexa 568 wurden in einer Konzentration von 1:1000 in 1 ml Dulbecco's PBS (1x) aufgenommen und je 250 µl

davon auf jedes Deckgläschen gegeben. Nach einer zweistündigen Inkubation bei Raumtemperatur und drei darauf folgenden Waschschrritten mit Dulbecco's PBS (1x) wurden die Zellen für 5 Minuten mit 250 µl 4',6-Diamidin-2-Phenylindol (1x) (DAPI, (Merck KGaA, Deutschland (Darmstadt))) mit 5 mg/ml in H₂O gelöst bedeckt. Die Deckgläschen wurden dreimal mit Dulbecco's PBS (1x) gewaschen und mithilfe einer Pinzette umgedreht auf einen mit Fluoromount G (Southern Biotech, USA) benetzten Objektträger transferiert. Auf den getrockneten Objektträger wurden die Deckgläschen einzeln mit farblosem Lack umrandet, um die Zellen vor dem Austrocknen zu schützen. Die Auswertung erfolgte unter dem Fluoreszenzmikroskop und mithilfe des Computerprogrammes Axio-Version 4.

2.2.4 Stimulierung mit Lipopolysaccharid (LPS)

Die reinen Mikroglia-kulturen wurden nach 24 Stunden Inkubation und zwei Waschschrritten mit je 100 µl Dulbecco's PBS (1x) mit LPS (Sigma-Aldrich, Deutschland (Steinheim)) in einer Konzentration von 100 ng/ml in 100 µl BME für 3 Stunden stimuliert. Dabei wurden sie bei 37°C und 5% CO₂ im Zellkulturschrank aufbewahrt. Nach der Inkubation wurden die Mikroglia in zwei Waschschrritten mit Dulbecco's PBS (1x) bereinigt und anschließend das asservierte, astrozytenkonditionierte BME auf die Zellen gegeben. Nach weiteren 24 Stunden wurden der NO-Assay und der MTT-Assay durchgeführt und die Überstände für den TNF-α-ELISA bei -80°C aufbewahrt.

2.2.5 Kombiniertes Sauerstoff-Glukose-Entzug (OGD)

Nach der Inkubation der reinen Mikroglia-Kulturen über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ im Zellkulturschrank wurde der kombinierte Sauerstoff-Glukose-Entzug (OGD) in der dafür vorgesehenen anaeroben OGD-Kammer durchgeführt. Zuvor wurde mikroskopisch sichergestellt, dass die abgeschüttelten Mikroglia-Kulturen angewachsen sind, wobei die Zellstreckung und -verästelung als Indikator diente; es musste keine Kultur ausgeschlossen werden.

Als Vorbereitung auf den Versuchsaufbau wurden OGD- bzw. Kontroll-Puffer zusammengestellt, steril filtriert und bei 4°C gekühlt gelagert. Als Grundlage für die Zusammenstellung der einzelnen Puffersubstanzen dienten die von Hansen durchgeführten Messungen mit einer Ionen-sensitiven Mikroelektrode (ISM) während bzw. kurz nach einem ischämischen Schlaganfall (Hansen 1985). Alle einzelnen Komponenten wurden zuvor in sterilem H₂O angesetzt und auf dem Magnetrührer entsprechend der oben genannten Molaritäten ebenfalls in sterilem H₂O zusammengestellt. Soweit nicht anders beschrieben, wurden die einzelnen Pufferreagenzien von der Firma Merck KGaA (Deutschland (Darmstadt)) bezogen. Die Einstellung des pH-Werts erfolgte mit 1 N Salzsäure (HCl) und 2 M Natronlauge (NaOH) unter Messkontrolle mit einem digitalen pH-Meter, das zuvor mit Standard-pH-Lösungen justiert wurde. Glukose (Fluka® Sigma-Aldrich, Deutschland (Steinheim)) und Glutamat (SERVA Electrophoresis GmbH, Deutschland (Heidelberg)) wurden aufgrund ihrer geringen Haltbarkeit in 2 ml bzw. 1,5 ml Aliquots bei -20°C aufbewahrt und kurz vor Versuchsdurchführung dem entsprechenden OGD- bzw. Kontroll-Puffer in entsprechender Molarität zugegeben. Die OGD-Puffer wurden vor Versuchsdurchführung in benötigter Menge unter der reinen Werkbank abgefüllt und bei 37°C im Wasserbad vorgewärmt. Die glukosefreien Puffer OGD-N, OGD-A, OGD-K und OGD-G wurden außerdem zur Entoxygenierung für 4 Minuten mit 95% Stickstoff und 5% CO₂ äquilibriert. Dazu wurde eine sterile Pasteurpipette über einen Silikonschlauch an die Stickstoff-Gasflasche luftdicht angeschlossen und durch eine zuvor angepasste Öffnung im Deckel eines 15 ml Reaktionsgefäßes gesteckt.

Für die Durchführung des Sauerstoff-Glukose-Entzugs wurde das Kulturmedium über den Zellen abgenommen, zu gleichen Teilen mit frischem BME + 10% FCS + 0,5% Penicillin/Streptomycin verdünnt und bei 37°C im Wasserbad asserviert. Die Zellen wurden zweimal mit 80 µl vorgewärmtem Dulbecco's PBS (1x) und einmal mit 80 µl des entsprechenden OGD- bzw. Kontroll-Puffers gewaschen. Anschließend wurden die Wells mit 100 µl des entsprechenden OGD- bzw. Kontroll-Puffers nach einem festen Pipettierschema befüllt. Die entoxygenierten OGD-Puffer wurden besonders sorgsam pipettiert, um zu vermeiden, dass sich wieder Sauerstoff lösen konnte. Mit jedem der OGD-Puffer OGD-N, OGD-A, OGD-K und OGD-G bzw. der Kontroll-Puffer Kontrolle-N, Kontrolle-A, Kontrolle-K und Kontrolle-G wurden drei Vertiefungen der 96-well-Platte befüllt, um eine Dreifachbestimmung sicherzustellen. Die 96-well-

Zellkultur-Platten mit den Kontroll-Puffern wurden als Kontrolle für den Zeitraum von einer bzw. drei Stunden bei 37°C im Wärmeschrank inkubiert. Die 96-well-Zellkultur-Platten mit den glukosefreien OGD-Puffern wurden in der OGD-Kammer für 10 Minuten mit einem Gasgemisch aus 95% Stickstoff und 5% CO₂ begast und direkt anschließend anaerob bei ebenfalls 37°C im Wärmeschrank für eine bzw. drei Stunden inkubiert. Im Anschluss an die Inkubation wurden die Zellen zweimal mit 80 µl vorgewärmtem Dulbecco's PBS (1x) und einmal mit 80 µl des asservierten Kulturmediums gewaschen. Die Vertiefungen wurden nun wieder mit 100 µl des vorgewärmten, konditionierten Kulturmediums befüllt und für weitere 24 Stunden im Zellkulturschrank inkubiert, bevor die Messungen des NO- und TNF-α-Gehaltes und des mitochondrialen Umsatzes von MTT (siehe 2.2.6, 2.2.7 und 2.2.8) durchgeführt wurden.

2.2.6 NO-Assay

Diese Methode geht auf die Beobachtungen von Peter Griess zurück und quantifiziert den Umbau von L-Arginin zu NO, wobei Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADP⁺) und O₂ reduziert werden (Griess 1863). Sie wurde seit 1863 nur geringfügig modifiziert und stellt trotzdem auch heute noch ein Standardverfahren zur Messung von NO bzw. seinen Derivaten in Überständen und biologischen Flüssigkeiten dar. Untersucht wurden 50 µl Zellüberstand der reinen Mikroglia-Zellkulturen nach kombiniertem Sauerstoff-Glukose-Entzug über die festgelegten Zeiten von einer bzw. drei Stunden und zusätzlich 24-stündiger Inkubation mit Zellkulturmedium bei 37°C und 5% CO₂ im Zellkulturschrank.

Im Vorfeld der Analysen wurden Lösungen von 0,1% Naphthyl Ethylendiamin Dihydrochlorid (Fluka® Sigma-Aldrich, Deutschland (Steinheim)) in sterilem H₂O (Griess A) und 1% Sulfanilamid (Sigma-Aldrich, Deutschland (Steinheim)) in 5% Phosphorsäure (H₃PO₄, (Merck KGaA, Deutschland (Darmstadt))) (Griess B) angesetzt. Eine Stammlösung für den Standard wurde aus 10 mM Natriumnitrit (NaNO₂, (Merck KGaA, Deutschland (Darmstadt))) in sterilem H₂O erstellt. Die Reagenzien wurden lichtgeschützt bei Raumtemperatur aufbewahrt. Das eigentliche Griess-Reagenz wurde kurz vor Versuchsdurchführung hergestellt, indem eine

Lösung aus Griess A und Griess B im Verhältnis 1:1 hergestellt wurde. Mit dem lichtempfindlichen NaNO_2 wurde im Versuchsaufbau eine Standardreihe erstellt, die einen NO-Gehalt von 0 – 40 μM widerspiegelte. Dazu wurde die 10mM NaNO_2 -Lösung zunächst vorverdünnt und dann in einem weiteren Verdünnungsschritt in abfallendem Volumen (20 μl , 12 μl , 6 μl , 3 μl , 2 μl , 1 μl und 0 μl) in eine 96-well-ELISA-Platte pipettiert, mit sterilem H_2O auf 50 μl aufgefüllt und lichtgeschützt abgedeckt. Jeweils 50 μl des Zellüberstandes der vorher im Rahmen des OGD-Versuchs behandelten Zellen wurden nach einem festen Pipettierschema ebenfalls in die 96-well-ELISA-Platte gegeben, genau wie 50 μl reines BME, das später als Referenzgröße dienen sollte. In alle befüllten Vertiefungen wurden zusätzlich 100 μl des zuvor zusammengestellten Griess-Reagenz gegeben. Nach zehnmütiger Inkubation bei Raumtemperatur unter konsequenter Lichtreduktion wurde der Umsatz des Griess-Reagenz photometrisch im ELISA-Absorptionsmesser bei 570 nm gemessen. Als Referenzgröße diente eine 50 μl Mediumkontrolle, die ebenfalls zehn Minuten mit 100 μl Griess-Reagenz inkubiert wurde. Die Datenanalyse wurde mithilfe des entwickelten Standardgraphen bzw. dessen zugehöriger Funktion durchgeführt.

Die andere Hälfte des Zellüberstandes wurde für den geplanten $\text{TNF-}\alpha$ -ELISA (siehe 2.2.7) bei -80°C aufbewahrt. Die Vertiefungen in den 96-well-Zellkulturplatten wurden umgehend mit 100 μl vorgewärmtem BME aufgefüllt; direkt im Anschluss an den NO-Assay wurde die aktuelle Zellzahl mithilfe des MTT-Assays (siehe 2.2.7) bestimmt.

2.2.7 MTT-Assay

Um die Vitalität der Mikroglia nach ein- bzw. dreistündiger OGD zu quantifizieren, wurde unmittelbar nach der NO-Expressionsanalyse mittels Griess-Reagenz ein MTT-Assay durchgeführt. Dieser Zytotoxizitäts-Test stellt durch die mitochondriale Umsetzung von MTT lebende Zellen photometrisch messbar dar (Mosmann 1983).

Die Reagenzien für den MTT-Assay wurden im Vorfeld hergestellt. Das MTT wurde in einer 5 mg/ml Stammlösung in sterilem Dulbecco's PBS (1x) angesetzt, mithilfe einer Spritzenfilters steril filtriert und bei 4°C lichtgeschützt gelagert. Der Lysis-Puffer wurde aus den oben genannten Anteilen zusammengestellt und bei Raumtemperatur

gelagert. SDS wurde entsprechend einer Konzentration von 20% in der Lösung abgewogen (w/v) und unter dem Abzug in einer Lösung aus jeweils 50% DMF und sterilem H₂O gelöst. Während die Lösung auf dem Magnetrührer homogenisiert wurde, wurden die 80%-ige Essigsäure (C₂H₄O₂, (Riedel-de-Haën® Sigma-Aldrich GmbH, Deutschland (Seelze))) und die 1N HCl ergänzt. Der pH-Wert des Puffers wurde mithilfe eines digitalen pH-Meters ermittelt und mit 1N HCl auf einen Wert von pH 4,7 titriert.

Nach dem modifizierten Protokoll von Hansen et al. (Hansen et al. 1989) wurden 25 µl MTT (5 mg/ml Stammlösung) in den aus 100 µl Zellkulturmedium bestehenden Zellüberstand direkt auf die Mikroglia-Kulturen gegeben. Nach zweistündiger Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ im Zellkulturschrank wurde die äquivalente Menge Lysis-Puffer (125 µl) hinzugefügt. Nach einer weiteren Inkubationsphase unter oben genannten Bedingungen über Nacht wurde der MTT-Umsatz photometrisch im ELISA-Absorptionsmesser bei 570 nm Wellenlänge mit einer Referenzwellenlänge von 650 nm direkt aus der 96-well-Zellkulturplatte gemessen. Die Datenanalyse erfolgte graphisch und umfasste die Mittelwert-Analyse unter Einbeziehung der Standardabweichung (SD) und des Standardfehlers (SEM).

2.2.8 TNF-α-ELISA

Die Quantifizierung der TNF-α-Produktion erfolgte mit einem TNF-α-ELISA (OptEIA™ TNF Set mouse, (BD Bioscience, USA)) aus je 25 µl Mediumüberstand. Zur Vorbereitung wurde eine 96-well-ELISA-Platte mit dem TNF-α Erstantikörper in der Verdünnung 1:250 gelöst in ELISA-Coating-Puffer mit 100 µl pro Vertiefung beschichtet. Die Platte wurde abgedeckt bei 4°C über Nacht inkubiert. Nach drei Waschsritten im 96-well-Platten-Wascher mit je 300 µl ELISA-Waschpuffer pro Vertiefung wurde die 96-well-ELISA-Platte zum Blockieren freier Bindungsstellen bei Raumtemperatur für eine Stunde Verdünnungspuffer, bestehend aus Dulbecco's PBS (1x) + 10% FCS (pH 7,5), mit 200 µl pro Vertiefung inkubiert. Das FCS wurde zuvor 30 Minuten bei 65°C hitzeinaktiviert. Es folgten drei weitere Waschsritte mit ELISA-Waschpuffer im 96-well-Platten-Wascher. Für die Erstellung der Standardverdünnungen musste zunächst das bei -80°C gelagerte Standardreagenz (40 ng/ml) auf Raumtemperatur erwärmt werden. Die Verdünnung mit 1:40 in

sterilem H₂O brachte den Standard auf eine Ausgangskonzentration von 1000 pg/ml. Nach gründlichem Mixen wurde eine serielle Verdünnungsreihe in Verdünnungspuffer mit Standardkonzentrationen von 500 pg/ml, 250 pg/ml, 125 pg/ml, 62,5 pg/ml, 31,25 pg/ml, 15,625 pg/ml und 0 pg/ml erstellt. Der Standard und die Mediumüberstände der OGD- bzw. Kontrollzellen wurden mit je 25 µl pro Vertiefung nach einem festen Pipettierschema aufgetragen und die abgedeckte Platte für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde Die Platte im 96-well-Platten-Wascher fünfmal mit 300 µl Waschpuffer pro Vertiefung gewaschen und gründlich abgesaugt. Der Zweitantikörper wurde in einer 1:1000 Verdünnung in Verdünnungspuffer aufgenommen, mit 100 µl pro Reaktionsgefäß aufgetragen und für eine Stunde lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation folgten sieben weitere Waschschrte im 96-well-Platten-Wascher mit je 300 µl pro Vertiefung. Die TBM-Substratlösung (BD OptEIA™ TBM Substrate Reagent Set, (BD Bioscience, USA)) aus gleichen Teilen Tetramethylbenzid (Reagenz A) und Wasserstoffperoxid (Reagenz B) wurde währenddessen erstellt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur erwärmt. Nach gründlicher Mischung wurden 100 µl pro Vertiefung aufgetragen. Die ELISA-Platte wurde für 30 Minuten lichtgeschützt inkubiert. Nachdem 50 µl 1M H₃PO₄ zum Reaktionsstopp zugegeben wurden, konnte die Absorption innerhalb von 30 Minuten photometrisch im Absorptionsmesser bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 570 nm gemessen werden. Die Auswertung erfolgte anhand der erstellten Standardkurve.

2.2.9 Statistik

Die statistische Auswertung und Darstellung erfolgte im Programm GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., USA). Ausreißer, die mehr als zwei Standardabweichungen vom Mittelwert abwichen, wurden eliminiert (Barnett und Lewis 1994). Alle Daten wurden mit einseitigem ANOVA und post-hoc-Test (Tukey's) zum Nachweis von Unterschieden innerhalb einer Gruppe analysiert. Ein Ereignis mit der Irrtumswahrscheinlichkeit von <5% (*p<0.05; ** p<0.005; *** p<0.001) wurde dabei als signifikant gewertet. Alle statistischen Ergebnisse in dieser Arbeit sind als Mittelwert mit Standardfehler (SEM) dargestellt.

3 Ergebnisse

3.1 Entwicklung von Mikroglia-Astrozyten-Mischkulturen

Zur Untersuchung der Fragestellung wurden primäre Kulturen aus neugeborenen Mäusen (P1-P2) unter Präparations- und Wachstumsbedingungen angelegt, die eine Mischpopulation aus Astrozyten und Mikroglia hervorbrachten. Um zu beobachten, wie sich die murinen Astrozyten und Mikroglia in Kultur verhalten und welche Inkubationsbedingungen sich positiv auf Wachstum und Überleben der Kulturen auswirken können, wurden die Kulturen über einen Zeitraum von 15 Tagen in regelmäßigen Abständen mikroskopisch beurteilt. Die Fotodokumentation der Astrozyten-Mikroglia-Mischkulturen nach dem Mediumwechsel an DIV 5, 10 und 15 zeigte die verschiedenen Entwicklungsstadien und die unterschiedlichen Wachstumsgeschwindigkeiten der beiden Zellpopulationen (Abbildung 5). So konnte auch abgeschätzt werden, wann eine Isolierung von Mikroglia am effektivsten durchzuführen wäre.

Während Astrozyten ab DIV 8-9 einen Rasen am Boden der Kulturflasche bildeten, saßen Mikroglia der Astrozytenpopulation auf und integrierten sich über ihre verzweigten Zellfortsätze in die Kultur. Es zeigte sich, dass eine konfluente Astrozytenpopulation die Voraussetzung für das verstärkte Wachstum von Mikroglia ab DIV 8-10 war. An DIV 14-16 eigneten sich die Kulturen am besten zur Isolation von Mikroglia. Die Ausbeute an Zellen war in Relation zur Dauer der Prozedur (siehe 2.2.2) und dem Aktivierungsstatus der Zellen nach der Isolierung zu diesem Zeitpunkt am größten.

Es ließen sich pro Kulturflasche mit einer Oberfläche von 75 cm^2 , in der 15 ml Zellsuspension inkubiert wurden, im Durchschnitt 5×10^5 Mikroglia isolieren. Diese konnten anschließend in einer Konzentration von 2×10^5 Zellen pro ml neu ausplattiert werden.

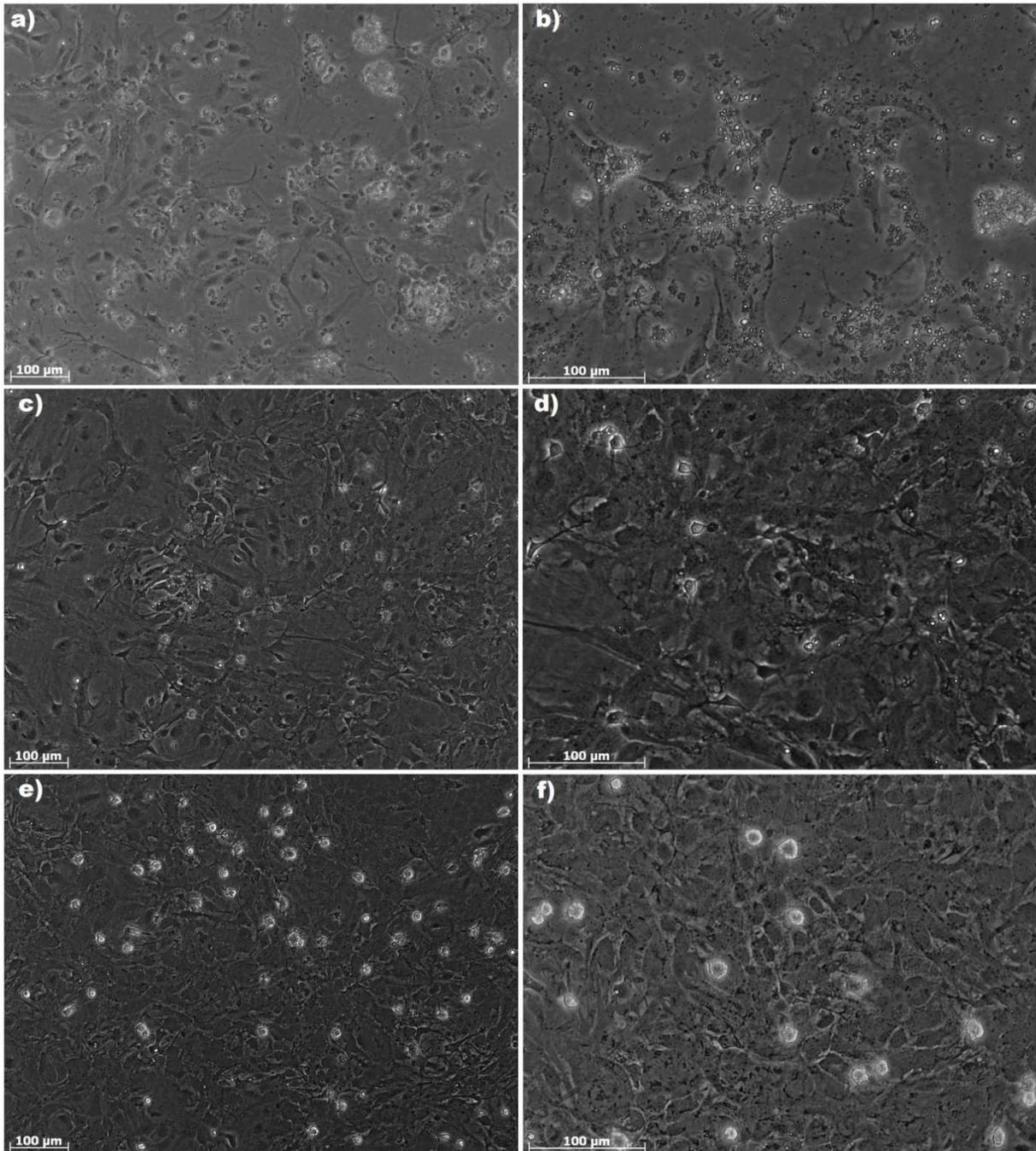


Abb.5: **Phasenkontrastmikroskopie der Entwicklung von Astrozyten-Mikroglia-Mischkulturen**
 a-b) DIV 5 (a: 10x, b: 20x) c-d) DIV 10 (c: 10x, d: 20x), e-f) DIV 15 (e: 10x, f: 20x). Mikroglia
 erscheinen hell und heben sich von dem im Phasenkontrast dunklen Astrozytenrasen ab.
 Sowohl die Population der Mikroglia als auch die der Astrozyten wird im Verlauf von 15 Tagen
 stetig konfluenter, Die Skalierung entspricht 100µm.

Insgesamt konnte man sehen, dass sich die Astrozyten-Mikroglia-Mischkulturen im
 Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ und einem Mediumwechsel an DIV 5, 10 und 15

allesamt gut entwickelten und konfluent darstellten. Die Isolation von Mikroglia durch Abschütteln ließ sich nach diesem Zeitraum an DIV 16-18 am effektivsten durchführen.

3.2 Mikroglia kulturen nach Isolation durch Abschütteln

Die Isolierung von Mikroglia aus Astrozyten-Mikroglia-Mischkulturen durch Abschütteln ist mit mechanischem Stress für die Zellen verbunden. Um sicherzustellen, dass zum Zeitpunkt des Versuchsbeginns alle Kulturen einen identischen Aktivierungsstatus hatten, wurde dieser zunächst unmittelbar während und 12 und 24 Stunden nach der Prozedur überprüft und fotodokumentiert. Die Streckung und Verästelung der Zellfortsätze wurde dabei als Maß für den Grad der Aktivierung herangezogen. Gestreckte und verästelte Fortsätze ließen auf einen inaktiven Zustand der Zellen schließen.

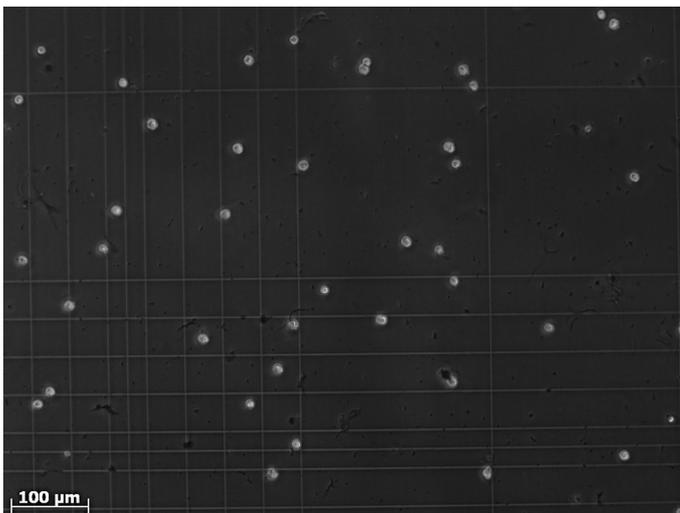


Abb.6:

Isolierte Mikroglia nach Färbung mit Trypan-Blau in der Neubauer-Zählkammer mit 2×10^5 Zellen/ml (10x)
Vitale Zellen stellen sich hell dar, tote Zellen und Detritus werden dunkel angefärbt.

Es zeigte sich, dass sich 24 Stunden nach der Isolierung durch Abschütteln alle untersuchten Mikroglia kulturen wieder in inaktivem Zustand befanden und nach der mikroskopischen Beurteilung keine Kultur aufgrund von noch aktivierten Zellen aus den Experimenten ausgeschlossen werden musste.

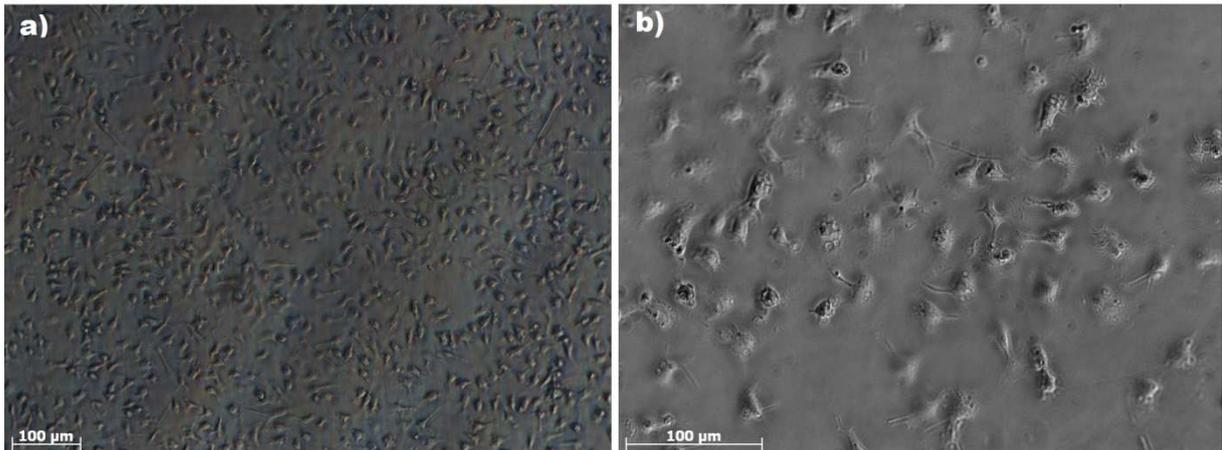


Abb.7: **Mikroglia**kultur mit 2×10^5 Zellen/ml 24 Stunden nach Isolation aus Mischkulturen in a) 10x und b) 20x. Gut erkennbar sind die Streckung der Zellfortsätze und die Verästelung der Zellen untereinander. Die Skalierung entspricht 100µm.

3.3 Immunzytochemische Färbung von isolierten Mikroglia

Um zu zeigen, dass es sich bei den durch Abschütteln isolierten Zellen um Mikroglia handelte, wurde eine immunzytochemische Färbung angefertigt. Außerdem sollte so festgestellt werden, ob durch die Prozedur auch anderes Zellmaterial und Detritus mit abgelöst wurden und in die isolierten und neu ausplattierten Zellkulturen gelangen konnten.

Die Auszählung der gefärbten Zellen in sechs Gesichtsfeldern in 20-facher Vergrößerung zeigte, dass nur sehr wenige GFAP-positive Zellen, also Astrozyten, nachweisbar waren. Die überwiegende Mehrheit der Zellen waren Iba-1-positive, mikrogliale Zellen. Anderes Zellmaterial und Detritus konnten nicht identifiziert werden. Die durch die Methode des Abschüttelns gewonnenen Mikroglia

kulturen standen nach der Isolation demnach mit einer Reinheit von 99,16% zur Verfügung.

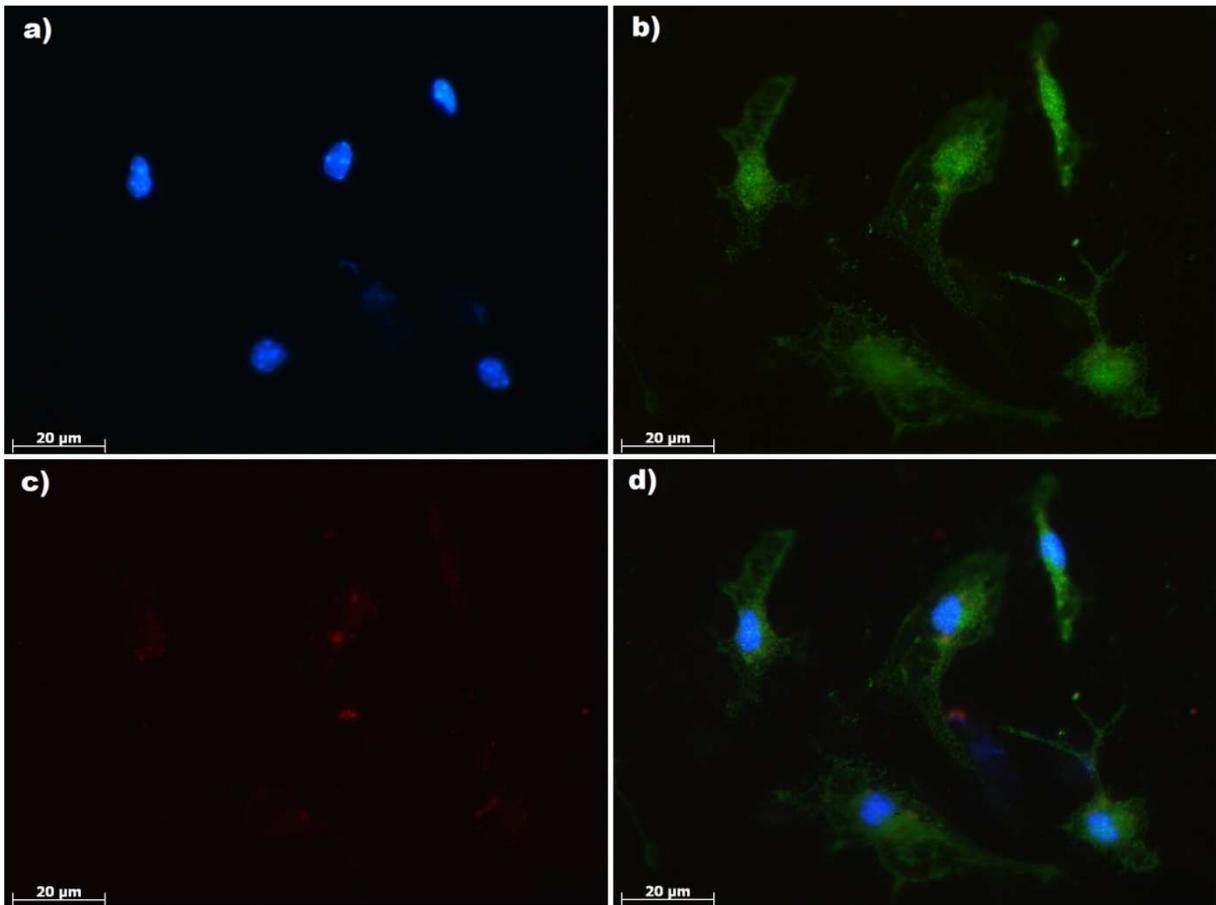


Abb.8: **Immunzytochemische Färbung reiner Mikrogliaulturen 24 Stunden nach Isolierung aus Mischkulturen (63x)**: a) Zellkerne (blau, DAPI), b) Mikroglia (grün, Iba-1), c) Astrozyten (rot, GFAP), d) Überlagerungsaufnahme. Alle vitalen Zellen mit angefärbtem Zellkern stellen sich als Mikroglia dar. Die GFAP+ Signale entstehen durch Rauscheffekte. Die Skalierung entspricht 20µm

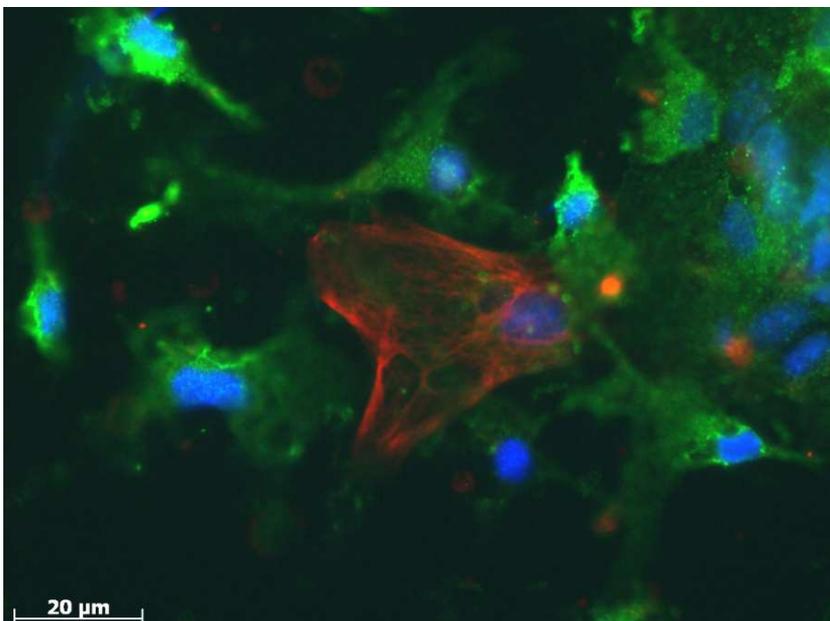


Abb.9:
Immunzytochemische Färbung eines Astrozyten in isolierter Mikrogliaultur (63x): Astrozyten (rot, GFAP), Mikroglia (grün, Iba1), Zellkerne (blau, DAPI). Die Skalierung entspricht 20µm.

3.4 Mikrogliaaktivierung nach 3 Stunden Stimulation mit LPS

Die Stimulation von Mikroglia mit dem bakteriellen Zellwandbestandteil LPS ist ein bewährter Mechanismus zur Immunzell-Aktivierung (siehe 4.1.1). Auch im Rahmen dieser Arbeit wurde die LPS-Stimulation exemplarisch über drei Stunden durchgeführt. Ziel war es, das Ausmaß der Aktivierung von Mikroglia einordnen zu können und eine Referenzgröße zur Intensität der Stimulation durch OGD zu erhalten. Ein gängiger Parameter für die Mikrogliaaktivierung ist die Produktion von Radikalen, insbesondere von NO. Um einen weiteren unabhängigen Parameter für die Aktivierung heranzuziehen, wurde desweiteren die TNF- α -Produktion im Überstand der Mikrogliaulturen quantifiziert. Um Varianzen in der Zelldichte zu berücksichtigen, wurde für den direkten Vergleich die absolute NO- bzw. TNF- α -Produktion auf den jeweiligen MTT-Umsatz als Maß für die jeweilige Gesamtzellmenge normalisiert (NO/MTT, TNF- α /MTT).

Es zeigte sich erwartungsgemäß eine signifikante Steigerung der NO-Produktion von Mikroglia durch die Inkubation mit LPS. Allerdings wurde bereits in diesem Experiment deutlich, dass auch der Entzug von Serum einen relevanten Aktivierungsstimulus für Mikroglia bezogen auf die NO-Produktion darstellt. Dieser Effekt war bezüglich der NO-Produktion sogar deutlich stärker ausgeprägt, als nach der alleinigen Stimulation mit LPS unter den gewählten Bedingungen (Abbildung 10 a)). Ein etwas anderes Bild zeigte sich bei der Analyse der mikroglialen Aktivierung anhand der Messwerte für TNF- α . Hier war die Synthese von TNF- α nach dreistündiger Inkubation mit LPS wesentlich stärker ausgeprägt als nach dreistündiger Aktivierung durch OGD. Dennoch zeigte sich auch hier bereits eine deutliche Aktivierung durch den Serumentzug (Puffer N). Bemerkenswerterweise verminderte allerdings der zusätzliche Entzug von Sauerstoff und Glukose im Rahmen der OGD sowohl mit als auch ohne LPS und auch unter Serumentzug die mikrogliale TNF- α -Synthese (Abbildung 10 b)).

a) NO/MTT nach drei Stunden

b) TNF- α /MTT nach drei Stunden

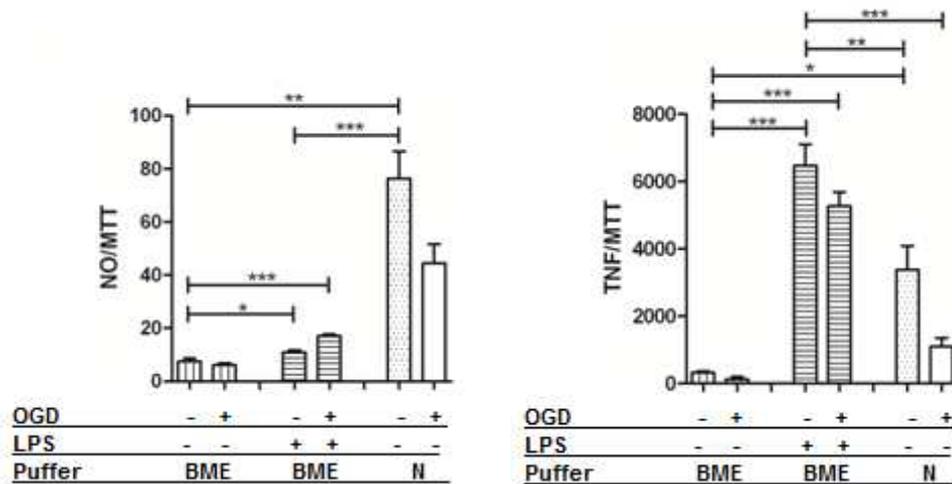


Abb.10: Vergleich der Aktivierung reiner Mikroglia-kulturen in BME (10% FCS), nach LPS-Stimulierung in BME und in Puffer N jeweils mit OGD und ohne OGD (Kontrolle) über drei Stunden bemessen anhand der a) NO-Produktion und b) TNF- α -Produktion normalisiert auf die jeweilige Vitalität der Mikroglia-kultur (MTT-Wert). Serumentzug allein (NO/MTT = 76.3246, n=17) war für die NO-Produktion ein signifikant stärkerer Aktivator als die LPS-Stimulierung in BME (NO/MTT = 10.9832, n = 7), stärker noch als der kombinierte Entzug von Serum, Sauerstoff und Glukose unter physiologischen Bedingungen (NO/MTT = 44.4697, n = 18). Die NO-Produktion nach Stimulierung mit LPS war signifikant gesteigert im Vergleich zur BME-Kontrolle (NO/MTT = 7.4877, n=4). In Bezug auf die Produktion von TNF- α war LPS (TNF/MTT = 6475.88, n = 7) der signifikant potentere Aktivator als Serumentzug (TNF/MTT = 3379.61, n = 10) oder der kombinierte Entzug von Serum, Sauerstoff und Glukose (TNF/MTT = 1097.47, n = 12). Signifikanzen mittels ANOVA bzw. Post-hoc-Test (Tukey's), * p<0.05; ** p<0.005; *** p<0.001.

Insgesamt scheint TNF- α der empfindlichere Parameter in Bezug auf die dreistündige Stimulation durch LPS zu sein, während sich eine zusätzliche Aktivierung durch OGD lediglich in der mikroglialen NO-Produktion unter serumhaltigen Bedingungen zeigt.

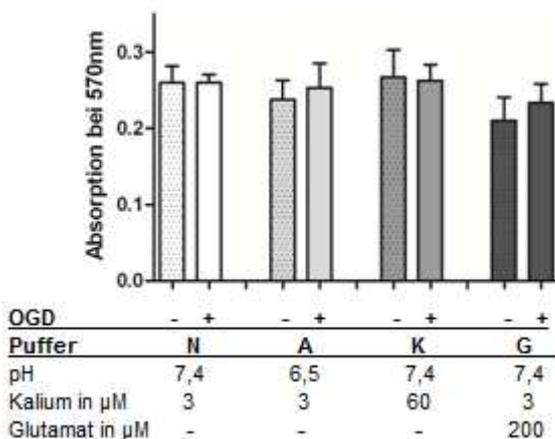
3.5 Einfluss von pH-Wert und OGD auf die Vitalität von Mikroglia-kulturen

Der Einfluss des kombinierten Entzugs von Sauerstoff und Glukose (OGD) und der Inkubation mit physiologischem, saurem, kaliumreichem bzw. glutamatergem Puffer

auf die Vitalität von Mikroglia sollte bestimmt werden, um eine eventuelle Verfälschung der weiteren Messergebnisse durch verminderte Zellzahlen nach OGD auszuschließen. Dazu wurde der Anteil lebender Zellen mittels MTT-Assay in den verschiedenen Puffergruppen ermittelt.

Es zeigte sich dabei, dass sowohl nach einer Stunde als auch nach drei Stunden OGD keine signifikanten Unterschiede im Vergleich des MTT-Umsatzes, und damit des Überlebens, von Kontrollgruppe zu OGD-Gruppe innerhalb der jeweiligen Puffersubstanz N, A, K oder G bestanden. OGD scheint demnach unter diesen Bedingungen die Vitalität von Mikrogliazellen nicht zu beeinflussen (Abbildung 11 a) und b)).

a) MTT-Assay nach einer Stunde



b) MTT-Assay nach drei Stunden

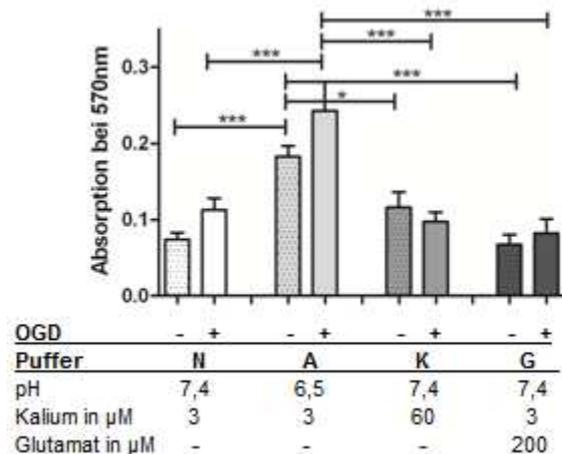


Abb.11: **Absolute Absorption (gemessen bei 570nm) im MTT-Assay nach a) einer Stunde und b) drei Stunden Inkubation in den Puffern N, A, K oder G mit/ohne OGD.**

Nach einer Stunde war in allen Puffersubstanzen kein Einfluss von OGD (Puffer N = 0.26nm, n = 18, Puffer A = 0.2531nm, n = 16, Puffer K = 0.2623nm, n = 14, Puffer G = 0.2333nm, n = 15) auf die Vitalität der Mikroglia im Vergleich zur Kontrollbedingung (Puffer N = 0.2597nm, n = 19, Puffer A = 0.2375nm, n = 17, Puffer K = 0.267nm, n = 15, Puffer G = 0.2103nm, n = 15) erkennbar. Nach drei Stunden wurde eine hochsignifikante Zellzahlverminderung in den Puffersubstanzen mit pH 7,4 ohne OGD (Puffer N = 0.0739nm, n = 18, Puffer K = 0.1159nm, n = 18, Puffer G = 0.0672nm, n = 17) und mit OGD (Puffer N = 0.1124nm, n = 18, Puffer K = 0.0972nm, n = 18, Puffer G = 0.082nm, n = 16) gegenüber Puffer A mit pH 6,5 deutlich, jedoch ebenfalls nicht zwischen OGD (Puffer A = 0.2428nm, n = 15) und Kontrollbedingungen (Puffer A = 0.1825nm, n = 15). Signifikanzen mittels ANOVA bzw. Post-hoc-Test (Tukey's), * p<0.05; ** p<0.005; *** p<0.001.

Desweiteren stellte sich heraus, dass die dreistündige Inkubation unter physiologischen, kaliumreichen bzw. glutamatergen Bedingungen (Puffer N, K und G), die einen physiologischen pH von 7,4 gemeinsam hatten, die Vitalität im Vergleich zur einstündigen Inkubation teilweise signifikant herabsetzte (Abbildung 12). Überraschenderweise schien sich ein pH-Wert von 6,5 positiv auf die Vitalität von Mikroglia auszuwirken, da sich der MTT-Umsatz der mit der sauren Puffersubstanz (Puffer A) inkubierten Zellen nach einer und drei Stunden nicht signifikant voneinander unterschied. Es war dabei allerdings innerhalb des dreistündigen Experiments ein signifikanter Unterschied der Vitalität der Mikroglia in saurem Milieu (Puffer A) zu den Zellen, die in den Puffersubstanzen N, K und G mit pH 7,4 inkubiert wurden, erkennbar. Diese Beobachtung konnte sowohl in der Kontrollgruppe wie auch in der OGD-Gruppe gemacht werden (Abbildung 11 b).

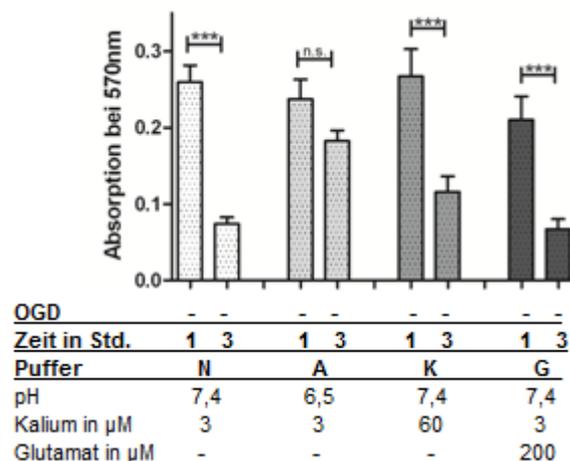


Abb.12: Vergleich der absoluten Absorptionen im MTT-Assay nach einer bzw. drei Stunden

Serumentzug durch die Puffer N, A, K und G. Hochsignifikante Unterschiede in der Zellzahl nach Inkubation mit den Substanzen N, K und G (pH 7,4) wurden deutlich, wohingegen kein signifikanter Unterschied unter sauren Bedingungen (Puffer A) bestand. Signifikanzen mittels ANOVA bzw. Post-hoc-Test (Tukey's), * $p < 0.05$; ** $p < 0.005$; *** $p < 0.001$.

Zusammenfassend konnte man sehen, dass OGD in den durchgeführten Experimenten keinen Einfluss auf die Vitalität von Mikroglia hatte, wohl aber die Dauer der Inkubation und der pH-Wert der verwendeten Puffersubstanz. Eine kürzere Inkubationszeit und saure Bedingungen (Puffer A) wirkten sich positiv auf das Überleben der Zellen nach der Inkubation ohne Serum aus.

3.6 Aktivierung von Mikroglia kulturen gemessen an NO und TNF- α

Um zu untersuchen, ob saure, kaliumreiche oder glutamaterge Bedingungen das Ausmaß der Mikrogliaaktivierung durch den kombinierten Entzug von Sauerstoff und Glukose beeinflussen, wurde die mikrogliale Aktivierung unter entsprechenden Bedingungen mit Hilfe der Parametern NO und TNF- α gemessen. Um Varianzen in der Zelldichte zu berücksichtigen, wurde die relative NO- bzw. TNF- α -Produktion wieder auf den jeweiligen MTT-Umsatz als Maß für die Gesamtmenge an Mikroglia normalisiert (NO/MTT, TNF- α /MTT).

In der Untersuchung zeigte sich nach einer Stunde OGD in Bezug auf die NO-Produktion kein signifikanter Unterschied zwischen Kontrollgruppe und OGD-Gruppe. Dennoch war unter kaliumreichen und glutamatergen Bedingungen (Puffer K und G) tendenziell eine Zunahme der Aktivierung nach OGD zu beobachten (Abbildung 13 a). Deutlicher waren die Messergebnisse allerdings nach dem dreistündigen OGD-Experiment. Hier zeigte sich eine signifikante Abnahme der NO-Produktion nach OGD bei physiologischem pH und physiologischer Kalium- und Glutamatkonzentration (Puffer N). In der Tendenz zeigte sich dies auch für glutamaterge (Puffer G) und weniger deutlich auch für saure Konditionen (Puffer A). Bei zusätzlicher Inkubation mit Kalium (Puffer K) war die Synthese von NO in OGD- und Kontrollgruppe vergleichbar (Abbildung 13 b).

a) relative NO-Produktion nach einer Stunde

b) relative NO-Produktion nach drei Stunden

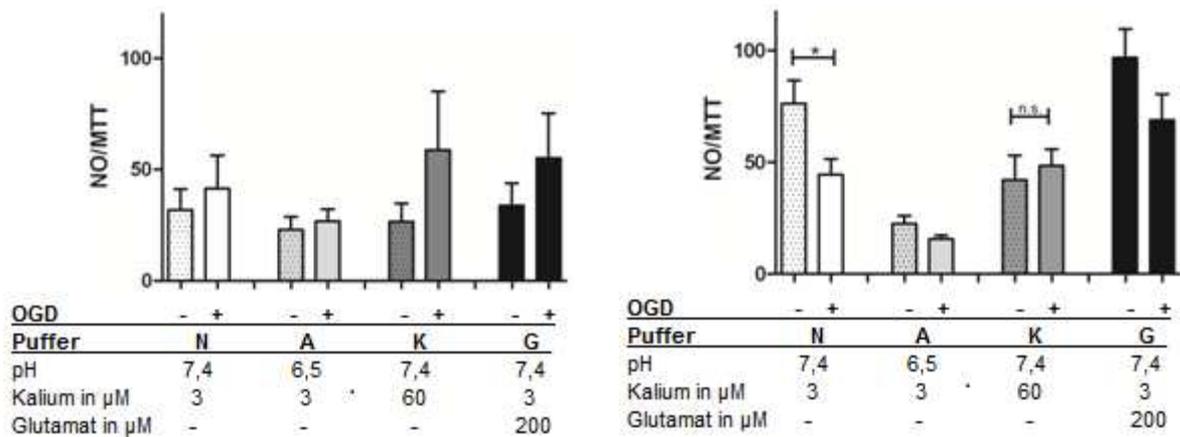


Abb.13: Vergleich von Aktivierung der NO-Produktion (ermittelt im Griess-Assay) bezogen auf die Vitalität der jeweiligen Zellpopulation (bemessen am MTT-Umsatz) nach a) einer bzw. b) drei Stunden Inkubation mit den Puffersubstanzen N, A, K und G mit/ohne OGD.

Nach einer Stunde wurden nach OGD Aktivierungstendenzen in allen Puffersubstanzen N (NO/MTT = 41.5896, n = 16), A (NO/MTT = 26.7738, n = 15), K (NO/MTT = 58.8545, n = 14) und G (NO/MTT = 55.2134, n = 14) erkennbar. Nach drei Stunden zeigte sich eine signifikante Deaktivierung nach zusätzlicher OGD unter physiologischen Bedingungen (NO/MTT = 44.4697, n = 18). Signifikanzen mittels ANOVA bzw. Post-hoc-Test (Tukey's), * p<0.05; ** p<0.005; *** p<0.001.

Bei der Analyse der Mikrogliaaktivierung mittels TNF- α -Konzentration zeigte sich nach einer Stunde OGD in Kombination mit physiologischen, sauren oder kaliumreichen Bedingungen (Puffer N, A und K) keine signifikante Aktivierung im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe. Allerdings wurde eine Aktivierungstendenz unter glutamatergen Bedingungen (Puffer G) ohne einen zusätzlichen Entzug von Sauerstoff und Glukose deutlich (Abbildung 14 a). Nach drei Stunden OGD war, ähnlich wie bei der NO-Produktion, eine signifikant verminderte Produktion von TNF- α unter OGD-Bedingungen bei physiologischen Konzentrationen von Kalium, Glutamat und physiologischem pH (Puffer N) zu beobachten. Bei Änderung des Milieus durch Inkubation mit dem sauren oder glutamatergen Puffer (Puffer A oder G) zeigte sich dieses Muster in geringerem Ausmaß ebenfalls. Kaliumreiche Bedingungen (Puffer K) führten in Kombination mit dreistündiger OGD zu einer tendenziell verstärkten Aktivierung gemessen an der Produktion von TNF- α (Abbildung 14 b).

a) TNF- α -Produktion nach einer Stunde

b) TNF- α -Produktion nach drei Stunden

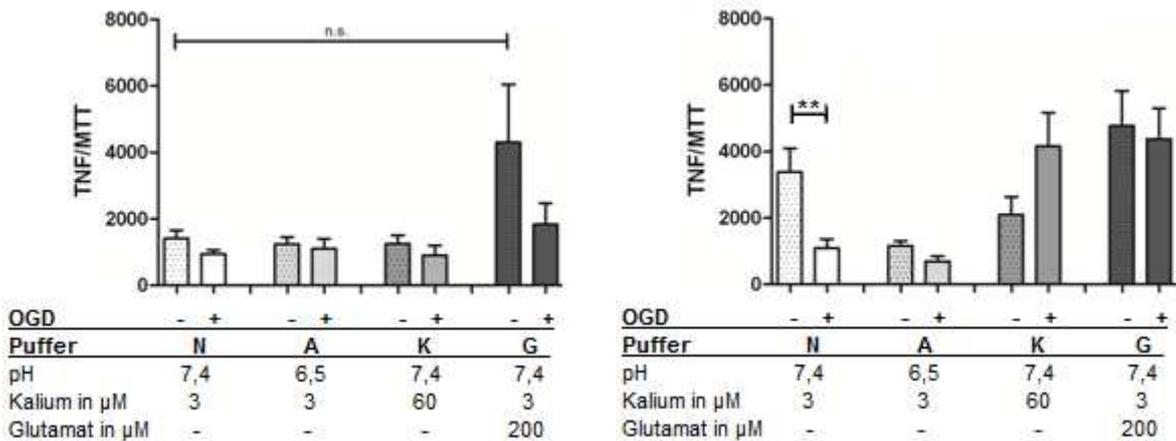


Abb. 14: TNF- α -Produktion normalisiert auf die Vitalität der jeweiligen Zellpopulation (MTT-

Assay), Vergleich von Aktivierungseigenschaften nach a) einer bzw. b) drei Stunden

Inkubation mit den Puffern N, A, K und G mit/ohne OGD. Nach einer Stunde war keine Aktivierung in den Puffersubstanzen N, A und K erkennbar und nach zusätzlicher Stimulierung mit Glutamat nur unter Kontrollbedingungen (TNF/MTT = 4310.9, n = 14). Nach drei Stunden wurde nach OGD eine signifikante Deaktivierung in der Puffersubstanz N (TNF/MTT = 1097.47, n = 12), A (TNF/MTT = 693.206, n = 12) und eine Deaktivierungstendenz in Puffer G (TNF/MTT = 4379.74, n = 12) im Vergleich zur Kontrollpopulation deutlich. Signifikanzen mittels ANOVA und t-Test (ungepaart), * p<0.05; ** p<0.005; *** p<0.001.

Es zeigten sich, parallel zu der Untersuchung der mikroglialen NO-Produktion, TNF- α -Konzentrationen unter glutamatergen Bedingungen, die unabhängig von dem kombinierten Entzug von Sauerstoff und Glukose und gegenüber allen Vergleichsgruppen generell erhöht waren. Die Ergebnisse für eine hohe Kaliumkonzentration im Puffer waren dagegen widersprüchlich. Hier stellte sich eine Zunahme der TNF- α -Produktion, aber Abnahme der NO-Produktion dar.

Insgesamt zeigte sich zum einen, dass OGD unter physiologischen Bedingungen anders als erwartet, nicht zu einer Aktivierung, sondern zeitabhängig tendenziell zu einer Deaktivierung mikroglialer Zellen führte. Zum anderen wurde deutlich, dass die Mikrogliaaktivierung unter unphysiologischen Bedingungen andere Charakteristika aufwies als unter physiologischen Konditionen. So ließen sich Mikroglia in saurem Milieu (Puffer A) nicht mehr durch OGD deaktivieren und glutamaterge Bedingungen führten unabhängig vom Sauerstoff-Glukose-Entzug zu einer Aktivierung.

3.7 OGD-spezifische Effekte in NO-Produktion nach einer Stunde

Zur Untersuchung der spezifischen Effekte von OGD als Stimulus auf die mikrogliale Produktion von NO in Abhängigkeit von der Zeit der Inkubation wurden die Messwerte nach einer Stunde und nach drei Stunden miteinander verglichen. Zuvor wurde die absolute NO-Produktion auf die entsprechende Kontrollgruppe ohne OGD normiert.

Es zeigte sich, dass nach einer Stunde OGD eine spezifische Aktivierungstendenz in allen Puffersubstanzen bestand. In Kombination mit dem glutamatergen Puffer (Puffer G) hatte der kombinierte Entzug von Sauerstoff und Glukose einen signifikanten spezifischen Effekt. Auch unter kaliumreichen Bedingungen (Puffer K) war die NO-Produktion nach OGD tendenziell stärker erhöht, während unter physiologischen und sauren Bedingungen (Puffer N und A) die NO-Produktion weniger stark aktiviert war (Abbildung 15).

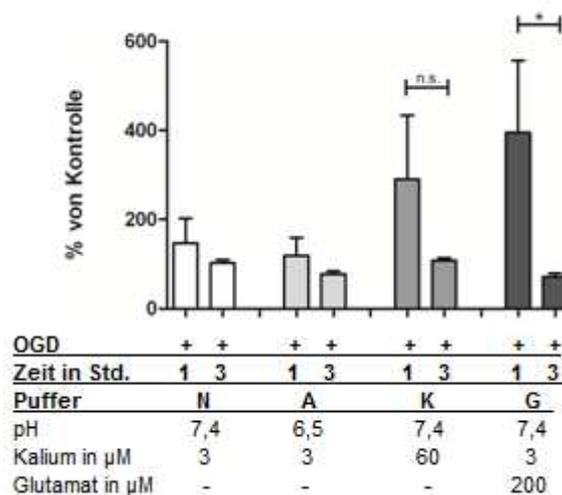


Abb.15: **Absolute NO-Produktion nach einer bzw. drei Stunden OGD normalisiert auf die jeweilige Kontrolle**, angegeben als prozentualer Anteil. Es zeigte sich, dass nach einer Stunde OGD in allen Puffern eine NO-Produktion von über 100% der Kontrollpopulation vorlag, besonders bei paralleler Inkubation mit Glutamat (395.012% der Kontrollpopulation, n = 15) und mit Kalium (290.948% der Kontrollpopulation, n = 14). Im Vergleich war außerdem die NO-Produktion für Mikroglia in Puffer G nach einer Stunde OGD signifikant gegenüber der Produktion nach drei Stunden OGD (71.7604% der Kontrollpopulation, n = 16) erhöht. Nach drei Stunden waren in allen Puffersubstanzen keine OGD-spezifischen Effekte auf die mikrogliale NO-Produktion erkennbar. Signifikanzen mittels ANOVA bzw. Post-hoc-Test (Tukey's), * p<0.05; ** p<0.005; *** p<0.001.

Der einstündige Entzug von Sauerstoff und Glukose schien demnach ein ausreichender Aktivator für die mikrogliale Produktion von NO zu sein, besonders in Zusammenhang mit periischämisch erhöhtem Kalium und Glutamat. Im Vergleich dazu war nach drei Stunden OGD kein OGD-spezifischer Effekt mehr auf die absolute NO-Produktion der Zellen erkennbar (Abbildung 15). Eine erhöhte NO-Produktion nach Aktivierung scheint demnach auf eine frühe mikrogliale Reaktion schließen zu lassen.

3.8 OGD-spezifische Effekte in TNF- α -Produktion nach drei Stunden

Um den OGD-spezifischen Effekt auf die mikrogliale Produktion und Freisetzung von TNF- α zu erkennen, wurden die absoluten TNF- α -Messwerte in Relation zum jeweiligen Kontrollwert gesetzt und anschließend graphisch als prozentualer Anteil der Produktion der Kontrollgruppe dargestellt.

Nach der dreistündigen Inkubation zeigte sich ein stimulierender Effekt auf die mikrogliale Produktion von TNF- α bei gleichzeitig erhöhtem Kalium und Glutamat (Puffer K und G). Im physiologischen und sauren Milieu (Puffer N und A) wurden dagegen keine OGD-spezifischer Effekte in der TNF- α -Synthese sichtbar (Abbildung 16).

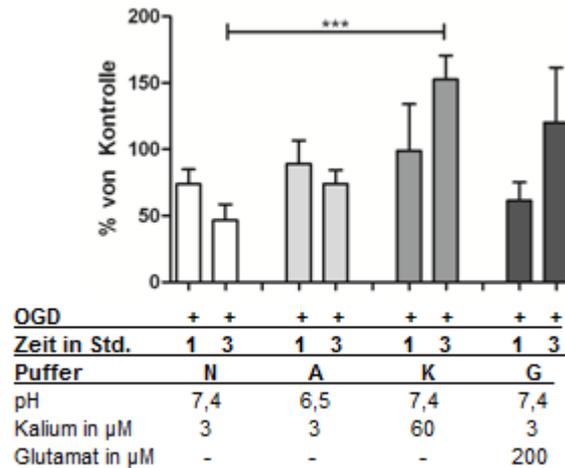


Abb.16: **Absolute TNF- α -Produktion nach einer bzw. drei Stunden OGD normalisiert**

auf die jeweilige Kontrolle (als prozentualer Anteil angegeben). Es zeigte sich eine TNF- α -Produktion von 152,6% der Kontrollpopulation (n = 10) nach drei Stunden OGD und paralleler Inkubation mit kaliumreichen Puffer (Puffer K), die gegenüber der Inkubation mit dem physiologischen Puffer N (46.7312% der Kontrollpopulation, n = 12) hochsignifikant erhöht war. Außerdem wurde eine verstärkte TNF- α -Produktion von 120.213% der Kontrollpopulation (n = 12) nach drei Stunden OGD und gleichzeitiger Inkubation mit Glutamat (Puffer G) deutlich. Nach einer Stunde war keine signifikant vermehrte Synthese von TNF- α messbar. Signifikanzen mittels ANOVA bzw. Post-hoc-Test (Tukey's). * $p < 0.05$; ** $p < 0.005$; *** $p < 0.001$.

Beim Vergleich der normalisierten absoluten TNF- α -Werte nach einer Stunde OGD zeigte sich unter physiologischen und pathologisch veränderten Pufferbedingungen eine tendenziell reduzierte, aber nicht signifikante Aktivierung (Abbildung 16). Der dreistündige Entzug von Sauerstoff und Glukose dahingegen zeigte sich in Kombination mit pathologisch erhöhtem Kalium und Glutamat als potenter Aktivator der mikroglialen TNF- α -Produktion. Eine einstündige OGD stellte demnach im Gegensatz zum Entzug von Sauerstoff und Glukose über drei Stunden offensichtlich keinen ausreichenden Stimulus für die mikrogliale Synthese von TNF- α dar. TNF- α scheint, anders als NO, erst bei längeren Ischämiezeiten sezerniert zu werden.

3.9 Aktivierung von Mikroglia kulturen durch Serumentzug

Die Inkubation mit den Puffersubstanzen N, A, K und G mit und ohne kombinierter OGD ging durch den Austausch des BME Nährmediums über eine oder drei Stunden gleichzeitig mit dem Entzug von FCS einher. Um nun den reinen Einfluss des Serumentzugs zu ermitteln, wurde die NO-Produktion bzw. die TNF- α -Produktion bezogen auf den entsprechenden mikroglialen MTT-Umsatz als Maß für die Aktivierung der Mikroglia eingesetzt. Betrachtet wurden die Werte der Kontrollgruppen unter physiologischen, sauren, kaliumreichen und glutamatergen Bedingungen.

Der Vergleich der jeweiligen Kontrollgruppen untereinander zeigte, dass allein durch den dreistündigen Serumentzug unter physiologischen und glutamatergen Konditionen (Puffer N und G) die Aktivierung der mikroglialen NO-Produktion im Vergleich zum einstündigen Entzug von Serum signifikant potenter war. Auch die Inkubation im kaliumreichen Milieu (Puffer K) über drei Stunden zeigte eine höhere Aktivierungstendenz als die Inkubation über eine Stunde, während unter sauren Bedingungen (Puffer A) kein Einfluss der Inkubationslänge auf die Produktion von NO erkennbar war (Abbildung 17).

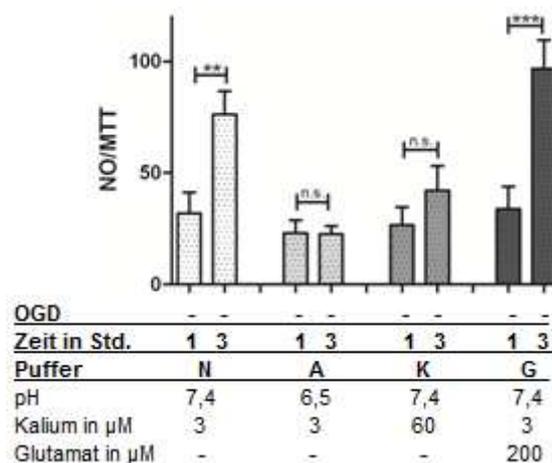


Abb.17: **NO-Produktion der Kontrollen (ohne OGD) der Puffer N, A, K und G normalisiert auf den zugehörigen MTT-Wert nach einer bzw. drei Stunden alleinigem Serumentzug.** Nach drei Stunden Inkubation war unter physiologischen Bedingungen (Puffer N, NO/MTT = 76.3246, n = 17) und bei paralleler Inkubation mit Glutamat (Puffer G, NO/MTT = 96.8661, n = 17) eine signifikant stärkere Aktivierung der mikroglialen NO-Produktion zu erkennen als nach einer Stunde (Puffer N, NO/MTT = 31.8351, n = 18 und Puffer G, NO/MTT = 33.8357, n = 15). Signifikanzen mittels ANOVA bzw. Post-hoc-Test (Tukey's), * p<0.05; ** p<0.005; *** p<0.001.

In Bezug auf die Synthese von TNF- α zeigten sich zu NO parallele Aktivierungstendenzen in den Mikrogliaulturen. Allerdings konnte man auch sehen, dass Glutamat als zusätzlicher Stimulator neben dem Entzug von Serum bereits nach einer Stunde zu einer verstärkten Aktivierung der Produktion von TNF- α führte (Abbildung 18).

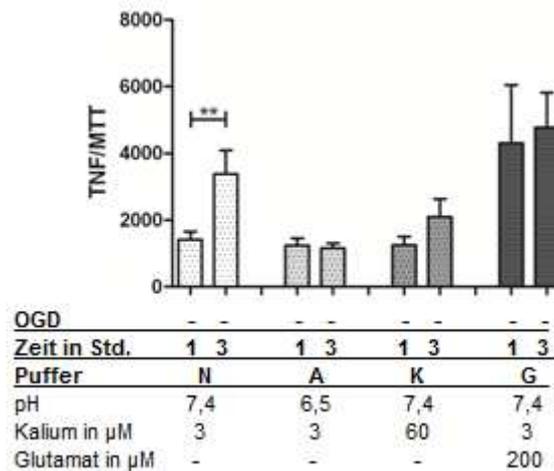


Abb.18: **TNF- α -Produktionen der Kontrollen (ohne OGD) der Puffer N, A, K und G normalisiert auf den zugehörigen MTT-Wert nach einer bzw. drei Stunden alleinigem Serumentzug.** In der Puffersubstanz N war nach drei Stunden (TNF/MTT = 3339.61, n = 10) Inkubation eine signifikant stärkere Aktivierung der mikroglialen TNF- α -Produktion zu erkennen als nach einer Stunde (TNF/MTT = 1419.57, n = 18). Verstärkte Aktivierungstendenzen nach dreistündigem Serumentzug lagen auch bei gleichzeitiger Inkubation mit Kalium (TNF/MTT = 2098.99, n = 13) und Glutamat (TNF/MTT = 4773.86, n = 12) vor. Signifikanzen mittels ANOVA bzw. Post-hoc-Test (Tukey's), * p<0.05; ** p<0.005; *** p<0.001.

Außerdem stellte nach der dreistündigen Inkubation in physiologischem, saurem und glutamatergem Milieu (Puffer N, A und G) der alleinige Serumentzug einen tendenziell stärkeren Aktivierungsmechanismus der mikroglialen NO-Produktion dar als die Kombination von Serumentzug und OGD (Abbildung 13 b). Die Zugabe von Kalium (Puffer K) bewirkte in Kombination mit drei Stunden OGD keine Veränderung in der NO-Produktion im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Kombination von Serumentzug unter physiologischen, kaliumreichen und glutamatergen Bedingungen und OGD über eine Stunde steigerte dagegen die NO-Produktion der Mikrogliaulturen.

Für die TNF- α -Produktion bedeutete die Kombination von Serumentzug und OGD nach einer Stunde keine Veränderung in physiologischer, saurer und kaliumreicher

Umgebung (Puffer N, A und K). Die zusätzliche Inkubation mit Glutamat führte in der Kontrollgruppe zu einer vermehrten TNF- α -Synthese, während nach OGD TNF- α auf dem Niveau der anderen Puffersubstanzen lag (Abbildung 14 a). Im dreistündigen Versuchsaufbau bewirkte der Entzug von Serum, Sauerstoff und Glukose nur im kaliumreichen Puffer (Puffer K) eine gesteigerte TNF- α -Produktion. Unter physiologischen, sauren und glutamatergen Bedingungen (Puffer N, A und G) zeigte sich tendenziell eine verminderte Stimulation nach OGD im Vergleich von Kontrollgruppe und OGD-Gruppe (Abbildung 14 b).

Insgesamt wurde deutlich, dass das Ausmaß der mikroglialen Aktivierung, gemessen an der Produktion von NO und TNF- α , positiv mit der Länge des Serumentzugs korrelierte. Dies galt insbesondere unter physiologischen und glutamatergen Bedingungen, weniger stark auch bei paralleler Stimulation durch pathologisch erhöhtes Kalium. In Bezug auf die Messung von TNF- α führte die Zugabe von Glutamat (Puffer G) sowohl nach einer Stunde wie auch nach drei Stunden zu einer per se erhöhten Freisetzung bereits unter serumfreien Bedingungen. Im Vergleich zu den in BME inkubierten Zellkulturen ohne Serumentzug zeigte sich allerdings, dass die mikroglialen Aktivierungsparameter NO und TNF- α bereits nach einstündiger Inkubation mit serumfreiem Puffer um ein Vielfaches erhöht waren (Abbildung 10 a und b).

4 Diskussion

Ziel meiner vorliegenden Arbeit war die *in vitro* Untersuchung des Aktivierungsmusters muriner Mikrogliazellen durch Sauerstoff-Glukose-Deprivation unter unphysiologischen metabolischen Bedingungen, wie sie im ischämischen Schlaganfall *in vivo* auftreten. Meine Ergebnisse der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente zeigen zum einen, dass sich eine Azidose (pH 6,5) protektiv auf das mikrogliale Überleben auswirkt. Zum anderen konnte ich nachweisen, dass Sauerstoff-Glukose-Entzug unter physiologischen Bedingungen zeitabhängig zu einer relativen Deaktivierung mikroglialer Zellen führt. Allerdings hemmt eine Azidose diesen Effekt und eine glutamaterge Umgebung führt unabhängig vom Sauerstoff-Glukose-Entzug zu einer generellen Steigerung des Aktivierungsniveaus. Wichtig für die Beurteilung zukünftiger Experimente ist, dass das Ausmaß der mikroglialen Aktivierung positiv mit der Länge der Inkubation in serumfreiem Medium korreliert. Allerdings ist auch hier nachzuweisen, dass eine Azidose die Aktivierung durch Serumentzug hemmt.

4.1 Modell und Methoden zum Schlaganfall *in vitro*

4.1.1 Das *in vitro* Modell zum ischämischen Schlaganfall

Diese Arbeit beschäftigte sich mit der postischämischen Entzündung, genauer mit der Rolle aktivierter Mikrogliazellen unter ischämischen Bedingungen und in inflammatorischen Prozessen. Das im Vorfeld der praktischen Versuche entwickelte *in vitro* Modell zum ischämischen Schlaganfall basierte auf der Grundidee, eine Betrachtung von Zellen unabhängig von ihren Zellverbänden und die Beeinflussung verschiedener Parameter zu erlauben. Dazu wurden reine Mikrogliaulturen

verwendet, die vor und nach dem Entzug von Sauerstoff und Glukose in Astrozyten-konditioniertem Nährmedium gehalten wurden. Die Simulation der metabolischen Veränderungen sollte die pathologischen Bedingungen möglichst realistisch darstellen können.

Der Vorteil eines solchen Modells besteht darin, dass man einzelne Parameter variieren und ihren Einfluss isoliert beobachten kann. Es erlaubt außerdem die Beobachtung von Zellpopulationen unabhängig von ihren Zellverbänden und der Beeinflussung der physiologischen Blut-Hirn-Schranke (Whittingham et al. 1984). Die Aktivierung von Mikroglia als Folge eines ischämischen Schlaganfalls oder anderer entzündlicher Pathologien setzt *in vivo* ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Zelltypen und Mediatoren voraus (Huang et al. 2006).

Auch Kauschal und Schlichter (2008) sahen diese Vorteile des OGD-Schlaganfallmodells, nachdem sie zuvor vergleichende OGD-Experimente durchgeführt haben und teilweise unterschiedliche Resultate als vorangegangene Experimente erhielten, die auf der Stimulation der Zellen durch LPS basierten. Im Unterschied zu dem entwickelten Modell dieser Arbeit wurden jedoch in den Modellen von Kauschal und Schlichter bzw. auch von Lai und Todd (2006) Co-Kulturen aus Neuronen und Astrozyten durch OGD stimuliert und anschließend mit Mikroglia-kulturen im Transwell inkubiert. Ein modifiziertes Modell nach der Idee von Kauschal und Schlichter, das auf der indirekten Stimulation der Mikroglia durch OGD-behandelte Neuronen-Astrozyten-Kulturen im Transwell und der zusätzlichen Inkubation mit OGD-Puffern basiert, könnte zukünftig eine methodische Erweiterung der Versuchsreihen darstellen. Durch die isolierte Untersuchung mikroglialer Aktivität, wie sie auch in meiner Arbeit erfolgte, könnte ein weiterer Beitrag zum Verständnis der Rolle dieser Zellpopulation im Entzündungsgeschehen geleistet werden.

4.1.2 Effekte von LPS im *in vitro* Schlaganfallmodell

Die Verwendung von bakteriellem LPS ist ein bekannter und verbreiteter Mechanismus eine Entzündungsreaktion hervorzurufen und die Zellkulturen so *in vitro* zu stimulieren (Nakamura et al. 1999). Dabei werden mikrogliale CD14-Rezeptoren aktiviert, die über Toll-Like-Rezeptor-4 (TLR-4) eine intrazelluläre Signalkaskade in Gang setzten und über Mediatoren wie TNF- α und verschiedene

Interleukine zu einer Aktivierung der Zellen führen. Gleichzeitig führt TNF- α bei der LPS-vermittelten Stimulation autokrin zu einer vermehrten Produktion von CD14 (Nadeau und Rivest 2000; Murphy et al. 2008). In verschiedenen *in vitro* Schlaganfallmodellen, die LPS zur Simulation einsetzten, wurden Aktivitätsparameter bestimmt und dabei unter anderem eine vermehrte mikrogliale NO-Produktion gesehen (Kaushal und Schlichter 2008). Auch die mikrogliale TNF- α -Produktion nach Aktivierung durch LPS war in anderen Experimenten doppelt so hoch ausgeprägt wie nach der Stimulation durch OGD, was die Zuverlässigkeit dieses Aktivierungsmechanismus bestätigt (Chock und Giffard 2005).

Auch in der vorliegenden Arbeit wurde die Stimulation von Mikroglia kulturen mittels LPS durchgeführt und dann als Positivkontrolle für alle angewandten Messmethoden eingesetzt. Dennoch wurde auch im Rahmen meiner Versuche ersichtlich, dass der kombinierte Entzug von Sauerstoff und Glukose das modernere Modell zum Schlaganfall *in vitro* darstellt und der alleinigen Verwendung von Substanzen wie LPS überlegen ist (Hanisch und Kettenmann 2007; Kaushal und Schlichter 2008). Die Pathophysiologie des ischämischen Schlaganfalls auf zellulärer Ebene und die peri- und postischämischen Ereignisse können realistischer simuliert werden, da im Gegensatz zu bakteriellen Noxen die Rolle von Sauerstoff und Glukose bei der Aktivierung von Mikroglia im Mittelpunkt steht, wie es auch *in vivo* der Fall ist (Dwyer et al. 2008). Hinzu kommt, dass weitere Parameter, wie ein veränderter pH-Wert oder verschobene Elektrolytverhältnisse, problemlos in das Modell integriert werden können, da nicht mit Interaktionen zwischen verschiedenen Substanzen zu rechnen ist.

4.1.3 Methoden und Prozeduren zur Isolierung von Mikroglia kulturen

Chock und Giffard (2005) verglichen die Vitalität und Aktivitätsparameter wie TNF- α von mikroglialen Zellkulturen unterschiedlichen Alters, nachdem sie diese über verschiedene Mechanismen wie Serumentzug, OGD und/oder LPS stimuliert haben. Sie sahen sowohl einen vermehrten apoptotischen Zelluntergang wie auch eine höhere Aktivierbarkeit von Mikroglia kulturen, die nach der Isolierung aus Mischkulturen nur über einen kurzen Zeitraum von wenigen Tagen als Monokultur gehalten wurden. Mikroglia kulturen, die über einen längeren Zeitraum von 14 bis 17

Tage isoliert kultiviert wurden, zeigten in den Experimenten von Chock und Giffard eine deutlich geringere Empfindlichkeit gegenüber einer *in vitro* Ischämie. Die Versuche der vorliegenden Arbeit wurden deshalb alle an Mikrogliaulturen durchgeführt, die an DIV 16 bis 18 aus den Mischkulturen isoliert und anschließend für 24 Stunden inkubiert wurden.

Die Präparation kortikaler Mikroglia und Astrozyten nach dem modifizierten Protokoll von McCarthy und de Vellis (1980) brachte beständig wachsende Mischkulturen hervor. Das Abschütteln der Mikroglia an DIV 16 bis 18 gestaltete sich jedoch teilweise schwierig, da sich das an Frei et al. (1986) angelehnte Protokoll zwar im Vergleich zu anderen Methoden, wie beispielsweise die von Saura et al. (2003) beschriebene Trypsinierung, besonders in Hinblick auf die Standardisierung der Zellzahlen, als überlegen erwies, die Ausbeute von Zellen aber sehr variierte. Die Anzahl von Mikroglia aus einer Kulturflasche war von Versuch zu Versuch sehr unterschiedlich, sodass die Gesamtzellmenge einer Kultur teilweise nicht für die Durchführung eines OGD-Versuches ausreichte. Dieses Problem wurde bereits 2007 von Floden und Combs beschrieben, mit dem Hinweis, dass es durch die Methodik zu Unregelmäßigkeiten im Versuchsablauf und der zeitlichen Planung kommen kann. Zusätzlich würde die Standardisierung des Verfahrens dadurch erschwert werden.

Trotzdem zeigte sich, dass alle Mikrogliaulturen 24 Stunden nach der Isolation identische Ausgangsformen für die OGD-Experimente erreichten; die Mehrzahl der Zellen lag in der ramifizierten Form vor, was für einen niedrigen Aktivierungsstatus der Zellen spricht (Giulian und Baker 1986). Auch die exemplarische immunzytochemische Färbung zeigte, dass der Reinheitsgrad der Mikrogliaulturen sich mit der in der Literatur beschriebenen Ausbeute von 95% Mikroglia deckte bzw. mit einem mikroglialen Zellanteil von > 99% sogar darüber lag (Frei et al. 1986; Giulian und Baker 1986).

Um die gesamte zeitliche Versuchsplanung verlässlicher und konstanter zu gestalten und um Verfälschungen der Ergebnisse durch unterschiedlich aggressive Prozeduren zu vermeiden, könnte man in weiteren Versuchen allerdings die Verwendung von Zelllinien erwägen. Eine geeignete Linie wäre beispielsweise die Zelllinie BV-2, die in ihren Eigenschaften den Eigenschaften von isolierten Mikrogliaulturen sehr ähnlich ist und deshalb die Experimente mit aktivierten Mikroglia ermöglicht (Blasi et al. 1990; Bocchini et al. 1992).

4.2 Mikrogliale Aktivierung durch OGD

4.2.1 Alleinige OGD ist kein ausreichender Aktivator für Mikroglia

Anders als bisher angenommen stellte sich der kombinierte Entzug von Sauerstoff und Glukose in den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten nicht als potenter Aktivator von Mikroglia dar. Zwar konnten nach einer Stunde OGD Aktivierungstendenzen für die mikrogliale NO-Produktion nachgewiesen werden, jedoch verblasste dieser Effekt nach drei Stunden OGD und war insgesamt sehr viel geringer ausgeprägt, als zunächst erwartet. Teilweise wurden sogar Deaktivierungstendenzen in Bezug auf die mikrogliale NO-Produktion nach drei Stunden Inkubation in serumfreiem Puffer in Kombination mit OGD sichtbar. Ein Erklärungsansatz hierfür könnte der beobachtete, zeitabhängige Effekt des Serumentzuges auf die Vitalität der Mikrogliaulturen sein (siehe 3.5).

Für die mikrogliale Produktion von TNF- α reichte die direkte Aktivierung durch einstündige OGD nicht aus und auch nach drei Stunden OGD bzw. Serumentzug wurden auch nur verhältnismäßig geringe Effekte deutlich.

Im Gegensatz dazu beobachteten Kauschal und Schlichter, dass die indirekte OGD-Exposition in ihrem *in vitro* Modell sich nicht auf die mikrogliale Produktion von NO auswirkte, während eine erhöhte Konzentration von TNF- α in ihrer Arbeit sehr wohl als OGD-induzierter Effekt beschrieben wurde. Eine Inkubation von nicht-ischämischen Mikroglia mit ischämischen Astrozyten im Transwell-Experiment führte zu einer zeitabhängigen Erhöhung der mikroglialen Produktion von TNF- α (Kauschal und Schlichter 2008). Diese Ergebnisse lassen außerdem den Schluss zu, dass Mikroglia tatsächlich auch durch die Ischämie selbst und nicht ausschließlich durch astrozytär produzierte Mediatoren beeinflusst werden. Chock und Giffard (2005) konnten in ihren Experimenten an mikroglialen Kulturen ebenfalls eine ansteigende Konzentration von TNF- α messen, die positiv mit der Dauer der OGD korrelierte. Insgesamt befanden sich die absoluten Messwerte für NO in der Arbeit von Kauschal und Schlichter im Bereich von 10 – 20 μM , wobei die Messmethodik dort mit den Methoden dieser Arbeit vergleichbar war. Die Zelldichte der in den Experimenten von Kauschal und Schlichter verwendeten Zellkulturen war dabei mit 2 Mio. Zellen pro ml

im Vergleich zu den Kulturen dieser Arbeit allerdings 10-mal höher. Die mittleren Messwerte für die absolute NO-Produktion, die sich im Rahmen dieser Arbeit zwischen 3 und 18 μM bewegten, scheinen vor diesem Hintergrund also vergleichsweise hoch. Dennoch muss der unterschiedliche Mechanismus zur Stimulation in den beiden Experimenten berücksichtigt werden. Prinzipiell kann man nach direkter OGD-Exposition der Mikrogliaulturen, wie es in der vorliegenden Arbeit der Fall war, eine verstärkte Aktivierung im Vergleich zur indirekten Stimulation bei Kauschal und Schlichter erwarten.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Kauschal und Schlichter und parallel zu den Resultaten dieser Arbeit stellten auch Lai und Todd (2008) eine vermehrte mikrogliale Produktion von NO nach OGD-Aktivierung fest. Nach der indirekten Aktivierung durch eine Inkubation mit präkonditioniertem Medium OGD-gestresster Neurone beschrieben sie ebenfalls einen Anstieg von TNF- α , den die allerdings nur nach kurzer OGD für 30 min, nicht aber nach einer Exposition über zwei, vier und sechs Stunden beobachteten. Der späte Anstieg der Konzentration von TNF- α nach drei Stunden direkter OGD und Zugabe von Kalium bzw. Glutamat, wie er in dieser Arbeit gesehen wurde, verhält sich also wiederum entgegengesetzt. Die Ergebnisse der hier durchgeführten Experimente decken sich demnach teilweise mit den Beobachtungen von vorangegangenen Arbeiten, wobei die Folgen einer kurzfristigen OGD-Exposition eine NO-Synthese zu sein scheint und die Stimulierung langfristig eine Produktion von TNF- α bewirkt, welches dann für die Ausbildung einer postischämischen Entzündungsreaktion von Bedeutung ist (siehe 4.7.3).

4.2.2 Vergleich von LPS und OGD als Aktivatoren von Mikroglia

Die Stimulation reiner Mikrogliaulturen mit LPS wirkte sich in den Versuchen dieser Arbeit im Vergleich zur Stimulation durch Serumentzug bzw. OGD in Kombination mit Serumentzug unterschiedlich auf die Produktion und Freisetzung von NO bzw. TNF- α aus. Während nach dreistündiger Stimulation mit LPS die mikrogliale NO-Produktion signifikant geringer ausgeprägt war als nach der Stimulation durch Serumentzug oder kombinierten Entzug von Serum, Sauerstoff und Glukose über drei Stunden, zeigte sich in Bezug auf die Synthese von TNF- α eine signifikante Steigerung der Aktivität der Mikroglia durch LPS (siehe Abbildung 10).

Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen beobachteten Chock und Giffard (2005) eine verglichen mit LPS gesteigerte Aktivierung der TNF- α -Produktion nach OGD. Dabei wurden die Mikrogliaulturen in ihren Experimenten über einen Zeitraum von 24 Stunden mit LPS in einer Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ stimuliert. In den Experimenten dieser Arbeit wurde LPS hingegen lediglich drei Stunden in einer Konzentration von 100 ng/ml eingesetzt, was einer 100-fach geringeren Dosis entspricht. Vergleicht man dennoch die absoluten TNF- α -Messwerte beider Arbeiten miteinander, sind die Konzentrationen von TNF- α in den Experimenten von Chock und Giffard bei vergleichbarem Alter der Zellkulturen und nach der Stimulierung mit LPS um ein Vielfaches niedriger. Auch die dreistündige OGD aus den Experimenten der vorliegenden Arbeit führt im Vergleich zu dem über acht bzw. 18 Stunden dauernden Entzug von Sauerstoff und Glukose bei Chock und Giffard zu einer relativ erhöhten Freisetzung von TNF- α . Des Weiteren stellten sie fest, dass die Aktivierungspotenz von OGD gemessen an der TNF- α -Produktion abhängig ist vom Alter der isolierten Mikrogliaulturen. Die Zellkulturen sind kurz nach der Isolation aus einer Co-Kultur (DIV 2-3) gegenüber einer längerfristigen isolierten Kultivierung (DIV 14-17) gesteigert aktivierbar. Gleiches gilt für die Stimulation der Zellen mit bakteriellem LPS (Chock und Giffard 2005).

Insgesamt sind die Ergebnisse somit vereinbar mit denen der Vorarbeiten. Eine Stimulation mit LPS führt zu einer Aktivierung der mikroglialen Produktion von NO und TNF- α , während OGD tendenziell eher zu einer relativ verminderten Ausschüttung von NO und TNF- α führt, die dennoch ein erhöhtes Aktivitätsniveau gegenüber der Kontrollpopulation bedeutet.

4.3 Mikrogliale Aktivierung durch Azidose

Die Ergebnisse der Experimente lassen den Rückschluss zu, dass eine extrazelluläre Azidose in der Pathophysiologie des ischämischen Schlaganfalls sowohl in Hinblick auf die Vitalität mikroglialer Zellen als auch auf den Grad der Aktivierung eine entscheidende protektive Rolle spielt. Der Serumentzug bewirkte in saurem Milieu unter ischämischen und nicht-ischämischen Bedingungen einen

signifikant geringeren Vitalitätsverlust mikroglialer Zellen als vergleichsweise unter physiologischen, kaliumreichen oder glutamatergen Bedingungen.

4.3.1 Azidose vermindert die Aktivierbarkeit von Mikroglia bei gleichzeitiger Stimulation

In Bezug auf den Aktivierungsstatus von Mikroglia unter OGD und gleichzeitiger Inkubation mit saurem Puffer zeigte sich, dass sowohl die Produktion von NO als auch von TNF- α im Vergleich zu den anderen Puffergruppen reduziert war. Der Aktivierungsstatus der Mikroglia blieb trotz Stimulation konstant niedrig.

Giffard et al. (1990) gelangten in ihren Versuchen mit kortikalen neuronalen Zellkulturen zu einem ähnlichen Ergebnis. Sie beschrieben eine verminderte NMDA-Rezeptor-Aktivität unter parenchymaler Azidose (pH 6,5) und damit eine reduzierte Glutamattoxizität unter pathologischen, ischämischen Bedingungen, wie sie beispielsweise im Schlaganfall vorkommen. Außerdem identifizierten sie eine verminderte reaktive Ca^{2+} -Anreicherung während einer periischämischen extrazellulären Azidose als möglichen weiteren Faktor zur Reduktion von neuronalem Zelluntergang (siehe 1.2). In Übereinstimmung mit anderen Forschungsergebnissen weisen sie allerdings auch darauf hin, dass neuroprotektive Effekte einer periischämischen Azidose nur bei pH-Werten um 6,5 zu beobachten waren, während erheblich niedrigere pH-Werte Zytotoxizität und Zellverlust durch freie Radikale bedeuten würden (Siesjo 1988; Giffard et al. 1990).

Die Effekte von Glutamat auf Mikroglia unter ischämischen Bedingungen werden über metabotrope Glutamatrezeptoren (mGluR) vermittelt. Der protektive Effekt einer experimentellen Blockade von mGluR im Rahmen einer postischämischen Inflammation wurde bereits aufgezeigt (Dirnagl et al. 1999; Kauschal und Schlichter 2008). Ob es zu einer Beeinflussung der mikroglialen Rezeptoraktivität durch Azidose kommt, die sich folglich positiv auf die entstehende Entzündungsreaktion auswirkt, könnte in weiteren Experimenten mit Fokus auf der spezifischen Rezeptoraktivität von mGluR näher untersucht werden. Diese Tatsache würde für die Rolle der Zellen *in vivo* zwar bedeuten, dass die neurodestruktive Eigenschaften der Synthese von Entzündungsmediatoren durch Mikroglia unter sauren Bedingungen nur in geringerem Maße zum Tragen kämen. Da Mikroglia allerdings eine

ambivalente Rolle in der peri- und postischämischen Pathologie spielen, hieße das ebenfalls, dass neuroprotektive Effekte der Mikroglia verblassen würden, sobald sich das hypoxische Gewebe ansäuert. Auch die Produktion antiinflammatorischer Zytokine und von Wachstumsfaktoren könnte in diesem Kontext ein interessantes zukünftiges Projekt darstellen.

4.3.2 Azidose (pH 6,5) wirkt protektiv bezüglich der Vitalität stimulierter Mikroglia

Die Resultate aus den Experimenten dieser Arbeit deuten darauf hin, dass eine periischämische, extrazelluläre Azidose über drei Stunden protektive Eigenschaften in Hinblick auf die Vitalität von durch Serumentzug stimulierten Mikroglia hat. Die Zellzahl der unter sauren Bedingungen (pH 6,5) inkubierten Zellen war vor und nach der Inkubationszeit von drei Stunden annähernd identisch, wohingegen die Inkubation mit physiologischer, kaliumreicher oder glutamaterger Puffersubstanz (pH 7,4) nach drei Stunden einen signifikanten Vitalitätsverlust bewirkte. Dabei verursachte bereits der alleinige Serumentzug auch ohne eine zusätzliche OGD einen relevanten Untergang von Mikroglia.

Giffard et al. veröffentlichten 1990 die Versuchsergebnisse zur Vitalität neuronaler Primärkulturen nach Stimulation durch OGD bzw. Glutamatexposition unter physiologischen (pH 7,4) und sauren Bedingungen (pH 6,4). Sie beobachteten ebenfalls einen signifikanten Vitalitätsverlust der Zellen unter Normbedingungen, während sich Azidose protektiv auf die Vitalität der Zellen (gemessen am LDH-Gehalt im Medium) auswirkte. Auch in Bezug auf die Vitalität der Zellen führen Giffard et al. ihre Beobachtungen auf eine verminderte NMDA-Rezeptor-Aktivität unter parenchymaler Azidose und damit eine verminderte exzitotoxische Aktivität von Glutamat unter ischämischen Bedingungen zurück. Außerdem wird ein Zusammenhang zwischen Zelluntergang und einer Veränderung der Ca^{2+} -Homöostase während einer periischämischen Azidose zugunsten eines verminderten Ca^{2+} -Levels erkannt (siehe 1.2). Auch hinsichtlich der Vitalität von Mikroglia bliebe detaillierter zu klären, welche Rolle der mikrogliale mGluR beim Ischämie- und Glutamat-vermittelten Zelluntergang spielt und ob bzw. wie er eventuell durch Azidose beeinflusst wird.

4.4 Mikrogliale Aktivierung durch OGD und Kalium

4.4.1 Periischämisches Kalium bewirkt eine vermehrte NO-Produktion nach einer Stunde und eine vermehrte Produktion von TNF- α nach drei Stunden

Die Ergebnisse der Bestimmung der NO-Produktion zeigen, dass Kalium in Kombination mit dem einstündigen, kombinierten Entzug von Sauerstoff und Glukose eine tendenzielle Aktivierung der Mikroglia bewirkt, isoliert allerdings keine Aktivierung herbeiführt. Nach der dreistündigen Stimulierung mit Kalium zeigten sich vergleichbare NO-Konzentrationen in OGD- und Kontrollgruppe, was bedeutet, dass Kalium allein als Aktivator ebenso potent ist wie in Kombination mit OGD bzw. die zusätzliche OGD keinen weiteren Einfluss auf die Aktivität von Mikroglia hat. Im Gegensatz dazu bewirkt die Stimulierung mit kaliumreichen Puffer über drei Stunden nur in Kombination mit OGD einen Anstieg der TNF- α -Konzentration.

Diese Erkenntnisse stimmen mit *in vitro*-Beobachtungen überein, die an Astrozyten-Mikroglia-Mischkulturen und an mit Mikroglia angereicherten Mischkulturen gemacht wurden (Chang et al. 2000). Bereits die Zugabe von 20mM Kalium bei gleichzeitiger Stimulation durch die Zugabe von LPS bewirkte dort einen Anstieg der glialen Produktion von NO und TNF- α .

4.4.2 Erhöhtes NO durch Aktivierung der Ca²⁺-abhängigen NADPH-Oxidase

Neben seiner Funktion als Aktivator der Produktion von NO und TNF- α im Rahmen der postischämischen Entzündungsreaktion scheint Kalium *in vivo* eine zentrale Rolle in der Entstehung eines Ischämie-Reperfusionsschadens zuzukommen. Es kann unter Reoxygenierung einen erhöhten Ca²⁺-Einstrom bewirken und scheint so unter anderem in den Aktivierungsprozess der NADPH-Oxidase durch Ca²⁺ involviert zu sein. Die NADPH-Oxidase ist bei der Entstehung von NO von entscheidender Bedeutung (siehe 2.2.6). Des Weiteren führte die experimentelle Blockade von K⁺-Kanälen während der Simulation eines Ischämie-Reperfusionsschadens in vorangegangenen Untersuchungen zur reduzierten mikroglialen Aktivierung und zur

verminderten Freisetzung oxidativ-schädigender Metabolite (Spranger et al. 1998). Periischämisch erhöhtes Kalium trägt außerdem bekanntermaßen zur Entstehung von Periinfarkt-Depolarisationen der Penumbra bei, wobei auch mikrogliale Zellen depolarisieren und aktiviert werden (Hossmann 1996; Streit et al. 1999; Doyle et al. 2008).

4.5 Mikrogliale Aktivierung durch OGD und Glutamat

In den Experimenten dieser Arbeit wurde deutlich, dass Glutamat sowohl in Bezug auf die mikrogliale Produktion von TNF- α als in geringerem Maße auch für die NO-Produktion einen ausreichend potenten Stimulus darstellt. Dabei wirkt sich ein zusätzlicher Entzug von Sauerstoff und Glukose eher deaktivierend auf die Synthese der Mediatoren aus,

4.5.1 Erhöhtes Glutamat bewirkt die vermehrte mikrogliale Produktion von TNF- α

Ein Zusammenhang zwischen der peri- und postischämischen Konzentration von Glutamat, der daraus resultierenden, reaktiven Mikrogliose und vermehrten Ca²⁺-Freisetzung und der vermehrten Produktion von TNF- α ist bereits nachgewiesen worden (Dirnagl et al. 1999; Huang et al. 2006). Kauschal und Schlichter (2008) konnten in ihrem *in vitro* Modell durch die direkte Aktivierung von mGLuR ebenfalls zeigen, dass ein periischämischer Anstieg von exzitotoxischem Glutamat eine vermehrte TNF- α -Produktion bewirkt. Diese Beobachtung deckt sich mit den Erkenntnissen der vorliegenden Arbeit, nach denen eine periischämische Glutamatexposition besonders nach drei Stunden eine tendenziell gesteigerte Aktivierung der mikroglialen TNF- α -Produktion bewirkt. Bereits nach einer Stunde stellt die alleinige Stimulierung mit Glutamat ohne zusätzlichen Entzug von Sauerstoff und Glukose einen ausreichenden Aktivierungsmechanismus reiner Mikrogliaulturen zur Synthese und Ausschüttung von TNF- α dar (siehe 3.7). Diese

Ergebnisse lassen den Rückschluss zu, dass der isolierte Effekt von Glutamat auf die Produktion von TNF- α größer ist, als der isolierte Einfluss von OGD oder der kombinierte Effekt von OGD und Glutamat. Diese Tatsache würde bedeuten, dass der Anstieg von proinflammatorisch wirkendem TNF- α auf der ischämiebedingten Freisetzung von Glutamat beruht und kein bzw. nicht nur ein direkter Effekt des Sauerstoffdefizits ist.

TNF- α hat bekanntermaßen Einfluss auf den neuronalen und astrozytären Zelluntergang im Gewebe, worin unter anderem die direkte klinische Korrelation von TNF- α und dem Infarkt volumen begründet liegt (Huang et al. 2006; Doyle et al. 2008). In Experimenten, in denen der Glutamatrezeptor durch Antagonisten blockiert wurde, konnte eine Neuroprotektion bewirkt und somit der schädigende Einfluss von aktivierten Glutamatrezeptoren bzw. TNF- α im ischämischen Schlaganfall nachgewiesen werden (Bruno et al. 2001).

4.5.2 Die isolierte Stimulation mit Glutamat induziert die mikrogliale NO-Synthese

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass der einstündige Entzug von Sauerstoff und Glukose besonders in Zusammenhang mit periischämisch erhöhtem Glutamat zu einer vermehrten mikroglialen Produktion von NO führt. Im Vergleich dazu zeigte eine dreistündige Stimulierung mit Glutamat keine OGD-spezifischen Effekte mehr, wohl aber eine durch Glutamat allein bedingte Steigerung der NO-Produktion.

In vorangegangenen Experimenten wurde bereits gezeigt, dass periischämisch ansteigendes Glutamat mit erhöhten Konzentrationen von NO in Verbindung steht. Dabei wird die Produktion von NO im ischämischen Schlaganfall vermutlich unter anderem durch die exzitotoxische Wirkung von Glutamat moduliert, da eine experimentelle Blockade von Glutamatrezeptoren im Schlaganfallmodell eine verminderte Synthese von NO bewirkte (Lin et al. 1996; Iadecola 1997). Dugan et al. beschrieben 1994 einen Zusammenhang zwischen durch erhöhtes Glutamat freigesetztem Kalzium (siehe 1.5) und der Synthese von NO. Mikroglia synthetisieren NO über die induzierbare Nitrit Oxid Synthase (iNOS), welche zur Aktivierung einen Kalzium/Calmodulin-Komplex binden muss. Im Gegensatz dazu sagen Kauschal und Schlichter (2008) allerdings, dass eine direkte Aktivierung der mGluR lediglich Effekte auf die mikrogliale Produktion von TNF- α , nicht aber von NO hat. Dennoch

zeigen die Resultate der vorliegenden Arbeit, dass OGD in Bezug auf die mikrogliale Produktion von NO zwar nach dreistündiger Stimulation keine spezifischen Effekte mehr aufweist, aber als kurzfristiger Aktivator tendenziell wirksam ist. Glutamat allein hingegen ist auch nach längerer Inkubation über drei Stunden ein potenter Aktivierungsmechanismus für die NO-Produktion. Welche Rolle ein direkter Aktivierungsmechanismus über mGluR dabei spielt oder ob es alternative Wege für die glutamatvermittelten Effekte gibt, die die gegensätzlichen Beobachtungen erklären könnten, könnte in ergänzenden Experimenten mit entsprechender Fragestellung detaillierter geklärt werden.

4.6 Mikrogliale Aktivierung durch Serumentzug

Fetales Kälberserum (FCS) wird in der primären Zellkultur standardmäßig als Wachstumszusatz für Nährmedien verschiedener Zellarten genutzt und spielt auch bei der Arbeit mit glialen Zellen eine wichtige Rolle. Es liefert Proteine, Hormone und essentielle Aminosäuren. Außerdem sind in FCS zusätzliche anorganische Salze und Puffersysteme enthalten, die den physiologischen pH-Wert herstellen und regulieren können (Boxberger 2006).

4.6.1 Verminderte Proteinsynthese nach Serumentzug und OGD bzw. LPS-Stimulierung

Die Produktion von TNF- α ist in allen Puffersubstanzen nach einer Stunde OGD im Vergleich zur Kontrolle vermindert und auch nach drei Stunden OGD sieht man eine reduzierte Synthese von TNF- α und NO unter physiologischen und sauren Bedingungen. Der Serumentzug allein erweist sich also im Gegensatz zum kombinierten Entzug von Serum, Sauerstoff und Glukose teilweise als stärkerer Aktivator der mikroglialen TNF- α - und NO-Produktion.

In Bezug auf die Vitalität von Mikroglia wurden protektive Eigenschaften einer zusätzlichen Stimulation mit LPS neben dem alleinigen Serumentzug bereits beschrieben. Bei paralleler Glukosedeprivation wurde ein verbessertes Überleben der mit LPS stimulierten Mikrogliaulturen allerdings nicht beobachtet (Yenari und Giffard 2001). Geht man aber davon aus, dass ein zusätzlicher Aktivator zum Serumentzug, wie zum Beispiel der Zusatz von LPS oder eine OGD, positiven Einfluss auf die Vitalität der Zellen hat, könnte auch ein verminderter Aktivierungsgrad damit in Zusammenhang stehen. In den Experimenten dieser Arbeit hatte der gleichzeitige Entzug von Serum, Sauerstoff und Glukose zwar keinen Einfluss auf die Vitalität der Mikroglia (siehe Abbildung 11), wohl aber auf die Aktivierung der Zellen und die damit verbundene Produktion von TNF- α und NO. Eine mögliche Erklärung für die verminderte Freisetzung von Proteinen und Metaboliten wie TNF- α und NO nach OGD könnte die reduzierte bzw. fehlende Bereitstellung von Energie für die Synthese in Form von Glukose sein. Einen ähnlichen Erklärungsansatz haben auch Yenari und Giffard (2001) für die Ergebnisse ihrer Experimente mit Mikrogliaulturen. Mikroglia benötigen metabolische Substrate für die Produktion von Proteinen, die ihnen in Abwesenheit von Glukose und außerdem durch den Entzug von Serum im Medium nicht oder nur in geringerem Maße zur Verfügung stehen.

Diese Daten sind für zukünftige Projekte insofern wichtig, dass sich zeigte, dass bereits bei der Planung unbedingt der Effekt des Serumentzuges berücksichtigt werden muss.

4.6.2 Serumentzug bewirkt zeitabhängig den Zelltod von Mikroglia

Die Resultate der Vitalitätsmessungen in den Experimenten dieser Arbeit, die mittels MTT-Assay durchgeführt wurden, zeigen einen zeitabhängigen Zusammenhang zwischen dem Entzug von Serum und Zelluntergang von Mikroglia. Je länger die Zellkulturen mit den serumfreien Puffersubstanzen inkubiert wurden, desto mehr mikroglialer Zelluntergang war anschließend nachweisbar. Lediglich unter zusätzlich sauren Konditionen wurde der apoptotische Zelltod der Mikroglia reduziert (siehe 3.5 und 4.3.2).

Der Einfluss des Entzugs von Serum auf die Vitalität im Sinne einer gesteigerten Apoptose von mikroglialen Zellen wurde bereits in früheren Arbeiten beschrieben (Yenari und Giffard 2001). Auch in der Veröffentlichung von Koyama et al. (2000) wurde der Untergang der von Ratten stammenden mikroglialen Zellen durch den zuvor herbeigeführten Serumentzug erklärt und zusätzlich eine direkte Korrelation zwischen Inkubationslänge und Zelluntergang hergestellt. Demnach scheint hauptsächlich der Entzug von Nähr- und Wachstumsfaktoren aus dem Serum für den vermehrten Zelluntergang verantwortlich zu sein. Des Weiteren scheint die Zelldichte der Mikrogliaulturen Einfluss auf die Wirkung des Serumentzugs zu haben. So stellten Koyama et al. fest, dass sich eine Zelldichte von über 2000 Zellen pro mm^2 positiv auf das Überleben von Mikroglia bei Entzug von Serum auswirkt. Dieser Effekt wird auf auto- und parakrine Mechanismen von aktivierten mikroglialen Zellen zurückgeführt, die durch Zytokine wie unter anderem $\text{TNF-}\alpha$ vermittelt werden. Sie scheinen die Zellen in ihrem aktivierten Status vor apoptotischem Untergang schützen. Dabei wird die autonome Aktivierung der Zellen mit den erhöhten Stress einer dichten Kultivierung erklärt. In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimenten an murinen Mikroglia wurden 20.000 Zellen auf einer Fläche von $3,5 \text{ mm}^2$ ausplattiert, was einer Zelldichte von fast 6000 Zellen pro mm^2 entspricht. Die dabei gesehenen Effekte des Serumentzugs standen durch diese Zelldichte, angelehnt an die Ergebnisse von Koyama et al., bereits positiv unter dem positiven Einfluss der zellulären Aktivierung. Demnach müsste sich der Effekt des Serumentzugs bei einer geringeren Zelldichte noch deutlicher darstellen. Der potenziell destruktive Einfluss auf mikrogliale Zellen zeigt sich allerdings bereits hier (siehe 3.5).

Der Serumentzug steht in den Experimenten dieser Arbeit eher aus methodischen Gründen im Vordergrund. *In vivo* spielt der Entzug von Serum eine untergeordnete Rolle, da die Zellen auch unter physiologischen Bedingungen von Liquor, faktisch serumfreiem Medium, umgeben sind.

4.7 Übertragung auf ischämischen Schlaganfall

Die zentrale Rolle einer postischämische Entzündungsreaktion im Rahmen des ischämischen Schlaganfalls wurde in vielen vorangegangenen Arbeiten beschrieben (Huang et al. 2006). Sie findet Stunden, Tage und Wochen nach dem ischämischen Ereignis statt und wird durch eine Reihe komplizierter, bisher nicht vollständig verstandener Interaktionen zwischen zellulären und molekularen Komponenten des Immunsystems moduliert. Das Ausmaß der Entzündungsreaktion entscheidet vermutlich maßgeblich über das klinische Outcome (Madinier et al. 2009; Whiteley et al. 2009).

Die in das entwickelte *in vitro* Schlaganfallmodell integrierten Variablen wurden aufgrund von *in vivo* Untersuchungen gewählt und bemessen, nach denen es periischämisch zu einem Abfall des pH-Wertes und einem Anstieg der extrazellulären Konzentrationen von Kalium bzw. Glutamat kommt (Berger et al. 2004). Offensichtlich scheint eine Azidose unter ischämischen Bedingungen vordergründig protektive Eigenschaften zu besitzen und das Überleben und den Aktivierungsstatus mikroglialer Zellen positiv zu beeinflussen, während Kalium und Glutamat im Schlaganfall ambivalente Effekte vermitteln. Im Endeffekt scheinen jedoch alle Aktivierungsmechanismen direkt oder indirekt eine erhöhte peri- oder postischämische Aktivität von Glutamat zu bewirken. Folglich steht auch die Produktion von Zytokinen wie NO und TNF- α im Mittelpunkt der postischämischen Reaktion, die dann allerdings sowohl anti- als auch proinflammatorische Attribute vermitteln.

4.7.2 Die NO-Produktion aktivierter Mikroglia hat neuroprotektive und neurodegenerative Effekte

Im Mittelpunkt der Messungen im Rahmen der Experimente dieser Arbeit stand NO, das Ca²⁺-abhängig aus L-Arginin von der NOS produziert wird. Die erhöhten Konzentrationen von NO nach einer zerebralen Ischämie werden sowohl durch eine vermehrte Expression als auch durch eine verstärkte Aktivität der NOS erklärt. Es

existieren verschiedene Isoformen der NOS; Neurone können über die neuronale NOS (nNOS) NO synthetisieren, immunologische Zellen, wie beispielsweise Mikroglia, über die iNOS und auch endotheliale Zellen sind über die endotheliale NOS (eNOS) zur Synthese befähigt. Die vermehrte Ausschüttung von NO wird vermutlich unter anderem durch die exzitotoxische Glutamataktivität moduliert, da eine experimentelle Blockade von NMDA Rezeptoren eine verminderte NO-Synthese bewirkt (Lin et al. 1996; Iadecola 1997). NO ist per se neurotoxisch und kann zusätzlich über die Reaktion mit freien Sauerstoffradikalen Peroxynitrit bilden, das ebenfalls eine hohe neurotoxische Potenz hat (Beckman et al. 1990). Somit kann NO direkt und indirekt DNS-schädigend wirken und gleichzeitig die Synthese von DNS behindern und den nekrotischen oder apoptotischen Zelltod provozieren. NO verstärkt seine neurotoxischen Effekte außerdem über die Stimulation zur vermehrten Ausschüttung der exzitatorischen Neurotransmitter (Bonfoco et al. 1995; Iadecola 1997). Gleichzeitig wird durch die NO-Produktion endothelialer Zellen und die folgende Synthese zyklischen Guanosin-3',5'-Monophosphats (cGMP) *in vivo* eine Vasodilatation bewirkt, die die Mikrozirkulation verbessern und dadurch das Perfusionsdefizit vermindern kann (Moncada et al. 1991; Huang et al. 1994). Zudem inhibiert NO die Thrombozyten- und Leukozytenaggregation und ist so in der Lage, mikrovaskuläre Verschlüsse zu verhindern. Es kann außerdem den schädlichen Ca^{2+} -Einstrom über NMDA-Rezeptoren unter ischämischen Bedingungen verringern, der generell zu einer Verschlechterung der peri- und post-ischämischen Situation führt (siehe 1.5) (Iadecola 1997). NO scheint sich im ischämischen Schlaganfall durch seine vielseitigen Eigenschaften also einerseits nachteilig auf das hypoxische Hirngewebe auszuwirken, kann aber andererseits auch positive Effekte auf die unterschiedliche Zellen und ihre Regeneration haben.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass der einstündige Entzug von Sauerstoff und Glukose besonders in Zusammenhang mit periischämisch erhöhtem Kalium und Glutamat zu einer vermehrten Produktion von NO durch Mikroglia führt. Im Vergleich dazu zeigt eine dreistündige Stimulierung keine OGD-spezifischer Effekte mehr. Eine erhöhte NO-Produktion nach Aktivierung scheint demnach auf eine frühe mikrogliale Reaktion schließen zu lassen. Diese Erkenntnis stimmt mit den Beobachtungen anderer Arbeitsgruppen überein und lässt sich vermutlich dadurch erklären, dass die zur NO-Synthese benötigten Substrate nach dieser frühen Phase bereits aufgebraucht sind (Iadecola 1997).

Bezüglich der ambivalenten Rolle von Mikroglia im ischämischen Schlaganfall lässt sich folgern, dass Mikroglia initial eher protektiv wirken wollen, indem sie vasodilatatorisch wirksames NO freisetzen. Die Perfusion des minderperfundierten Hirnareals wird wieder erhöht. Bei längerer Ischämiedauer verblasst der Effekt der mikroglialen NO-Produktion und es steht eher eine proinflammatorischen Wirkung von TNF- α im Vordergrund (siehe 4.7.3).

4.7.3 mikroglialer TNF- α als Mediator einer postischämischen Entzündungsreaktion

TNF- α zählt zu den proinflammatorischen Zytokinen und wird neben IL-1 und IL-6 von hypoxisch gestressten Neuronen und Astrozyten, hauptsächlich jedoch von Mikroglia, innerhalb weniger Stunden produziert (Lai und Todd 2006). Es hat *in vivo* eine zentrale Bedeutung im Ischämie-Reperfusionsschaden, im postischämischen Entzündungsgeschehen und im regenerativen Umbau (Remodelling) bzw. der Narbenbildung im betroffenen Gewebe (Feuerstein et al. 1994; Lipton 1999; Streit et al. 1999; Huang et al. 2006). TNF- α ist in der Lage, die Produktion weiterer Entzündungsmediatoren zu induzieren und stimuliert die Proliferation und chemotaktische Einwanderung neutrophiler Granulozyten. Die leukozytäre Migration wird durch die TNF- α -induzierte Sekretion endothelialer Adhäsionsmoleküle ermöglicht (Feuerstein et al. 1994). Außerdem führt die TNF- α Expression zu einer pathologisch erhöhten Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke und hat somit ebenfalls Einfluss auf die Infiltration von Entzündungszellen in das Infarktareal (Huang et al. 2006). Zudem steigt nach der Stimulation durch TNF- α *in vivo* die Expression von Akute-Phase-Proteinen wie C-reaktives-Protein in der Leber, die hämatogen auch für das systemische Entzündungsgeschehen bedeutsam werden können (Nakase et al. 2008). Da *in vivo* eine direkte Korrelation zwischen TNF- α -Produktion und Infarktvolume bzw. klinischem Outcome gesehen wird, stellt dieses Zytokin in der postischämischen Pathologie einen prognostischen Faktor und damit auch ein wichtiges Ziel experimenteller therapeutischer Interventionen dar (Zaremba et al. 2001; Huang et al. 2006).

Der durch Sauerstoff-Glukose-Entzug experimentell ausgelöste oxidative Stress an Mikroglia kulturen in Kombination mit dem vorübergehenden Serumentzug ist die Voraussetzung für die Veränderungen auf Ebene der Transmitter und somit auch

Basis für die Beobachtungen in dieser Arbeit. Die zentrale Bedeutung von TNF- α im postischämischen Entzündungsgeschehen *in vivo* konnte bereits in zahlreichen Experimenten an Zellkulturen bestätigt werden, weswegen dieses Zytokin auch in vielen *in vitro* Modellen eine wichtige Komponente darstellt (Barone und Parsons 2000). Zum einen stellt die Messung von TNF- α eine Möglichkeit zur Überprüfung bzw. Quantifizierung des Aktivierungszustands neuronaler und glialer Zellen in Kultur dar. Zum anderen ist wegen der physiologischen Eigenschaften von TNF- α *in vivo* generell auch eine direkte Stimulation von Zellen mit dieser Substanz *in vitro* möglich. Trotz allem sind das spezifische Verhalten der beiden TNF- α -Rezeptoren TNF-R I und TNF-R II nach der Bindung von TNF- α und die Einzelheiten der Rezeptor-vermittelten Signalkaskade noch nicht vollkommen verstanden. Es scheint, als würden sich die Rezeptoren nach Bindung ihres Liganden TNF- α unterschiedlich verhalten und damit unterschiedliche Effekte auf das ischämische Gewebe haben, die sich dann neurodegenerativ, aber interessanterweise zu gewissen Anteilen auch neuroprotektiv auswirken können (Fontaine et al. 2002).

5 Zusammenfassung

Der ischämische Schlaganfall stellt im aktuellen und zukünftigen Gesundheitssystem weltweit einen erheblichen Kostenfaktor dar und ist unter anderem deshalb Gegenstand intensiver klinischer und experimenteller Forschung. Speziell der Einfluss des postischämischen Entzündungsgeschehens erlangte in den vergangenen Jahren eine zunehmende Bedeutung und trug maßgeblich zum Verständnis der Pathophysiologie der Erkrankung bei. Im Rahmen dieser Arbeit galt es die Frage zu klären, welche Pathophysiologie des experimentellen ischämischen Schlaganfalls sich auf betroffene mikrogliale Zellen in welchem Ausmaß destruktiv oder auch protektiv auswirken kann.

Um den Einfluss von periischämisch erhöhtem Kalium und Glutamat, einem verminderten pH und dem Entzug von Serum zu sehen, wurden Primärkulturen aus murinen Mikroglia hergestellt und einem experimentellen Schlaganfall durch den kombinierten Entzug von Sauerstoff und Glukose (OGD) unterzogen. Die Primärkulturen wurden über 14-16 Tage bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert, bevor mikrogliale Zellen durch Abschütteln (siehe 2.2.2) isoliert und für weitere 24 Stunden in konditioniertem Medium gehalten wurden.

Es wurden zwei Zeitintervalle über eine und drei Stunden Inkubation mit/ohne OGD betrachtet. Dabei wurden die Vitalität und die Aktivierung der mikroglialen Zellen als Maß für den Effekt des Schlaganfalls gewählt. Als Positivkontrolle wurde eine Kultur mit LPS stimuliert, als Negativkontrolle wurden nicht-stimulierte Zellen in BME eingesetzt. Die Vitalität der Mikroglia wurde 24 Stunden nach Ende der Inkubation mit/ohne OGD mittels MTT-Assay (siehe 2.2.7) bestimmt. Zur Objektivierung des Aktivierungsgrads der Zellen wurde zum einen NO im Mediumüberstand mittels Griess-Assay (siehe 2.2.6) bestimmt und zum anderen ein TNF- α -ELISA (siehe 2.2.8) ebenfalls im Mediumüberstand durchgeführt.

Es wurde gezeigt, dass eine alleinige OGD unter den gewählten Bedingungen in den Experimenten keinen signifikanten Einfluss auf die Vitalität der Mikroglia hatte. Die Dauer der Inkubation mit den serumfreien Puffern und der pH-Wert der verwendeten Puffersubstanz zeigten jedoch einen relevanten Effekt; eine kürzere Inkubationszeit und zusätzlich saure Bedingungen wirkten sich positiv auf die Vitalität der Zellen aus.

Im Hinblick auf die Aktivierungspotenz führte die OGD unter physiologischen Bedingungen anders als erwartet zur relativen Deaktivierung mikroglialer Zellen. Unter unphysiologischen Bedingungen wies die Mikrogliaaktivierung hingegen andere Charakteristika auf. So waren Mikroglia in saurem Milieu unempfindlich gegenüber einer OGD und glutamaterge Bedingungen führten unabhängig vom Sauerstoff-Glukose-Entzug zu einer generellen Aktivierung.

Für die mikrogliale Produktion von NO erwies sich ein einstündiger Entzug von Sauerstoff, Glukose und Serum als hinreichender Aktivator, wohingegen nach drei Stunden OGD kein spezifischer Effekt mehr auf die absolute NO-Produktion der Zellen erkennbar war. Eine erhöhte mikrogliale NO-Produktion scheint demnach eine frühe Reaktion auf Ischämie zu sein.

TNF- α stellte sich als Parameter einer späten Mikrogliaaktivierung durch OGD bei zusätzlich erhöhtem Kalium oder Glutamat dar. Die einstündige OGD reichte im Gegensatz zum Entzug von Sauerstoff und Glukose über drei Stunden unter sämtlichen Bedingungen als Stimulus für die mikrogliale Synthese von TNF- α nicht aus.

Insgesamt wurde in den Experimenten deutlich, dass das Ausmaß der mikroglialen Aktivierung ebenfalls positiv mit der Länge der Inkubation in serumfreiem Puffer und weniger relevant mit dem Entzug von Sauerstoff und Glukose korrelierte. Dies gilt insbesondere unter physiologischen und glutamatergen Bedingungen, weniger stark auch in kaliumreichem Milieu. Bei gleichzeitiger Azidose (pH 6,5) wurde unabhängig von der Dauer des Serumentzugs keine Aktivierung bei Mikroglia bewirkt.

In der Pathophysiologie des ischämischen Schlaganfalls spielt die extrazelluläre Azidose sowohl in Hinblick auf die Vitalität mikroglialer Zellen als auch auf den Grad der Aktivierung eine entscheidende protektive Rolle. Der Entzug von Serum zeigte in saurem Milieu unter ischämischen und nicht-ischämischen Bedingungen einen signifikant geringeren destruktiven Einfluss auf die Vitalität mikroglialer Zellen als unter physiologischen, kaliumreichen oder glutamatergen Bedingungen. Auch der pathologische Effekt von Glutamat konnte in den Experimenten dieser Arbeit gezeigt werden.

Insgesamt konnten in dieser Arbeit das spezifische Reaktionsmuster der mikroglialen Aktivierung unter ischämischen und reaktiv-metabolisch veränderten Bedingungen charakterisiert werden. Die Ergebnisse zeigen, dass Untersuchungen

zur mikroglialen Reaktion auf Ischämie zukünftig zur Vermeidung verfälschter Ergebnisse insbesondere auch die Zusammensetzung des pathologisch veränderten Extrazellulärmediums mit berücksichtigen und simulieren sollten.

Anhang 1: Genehmigung Antrag Nr. 26/07



Freie und Hansestadt Hamburg Behörde für Soziales, Familie, Gesundheit und Verbraucherschutz

BSG Billstraße 80, D – 20539 Hamburg

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
**Herrn Dr. med. Tim Magnus/
Herrn Dr. med. F. Leipoldt**
Forschungslabor Neurologie
Campus Forschung
Martinistr. 52

20246 Hamburg

Amt für Gesundheit und Verbraucherschutz
Lebensmittelsicherheit und Veterinärwesen

Billstraße 80
D - 20539 Hamburg
Telefon 040-428-37-2088
Telefax 040-428-37-3597

Ansprechpartner Herr Dr. Christian von Wenzlawowicz
Zimmer 7.07
E-Mail Christian.Wenzlawowicz@bsg.hamburg.de
Gz: G 21307/591-00.33

23. Mai 2007-msi

Nachrichtlich: Dres. Haemisch, Tiemann, Budack
- G 21300-

Nr. 26/07
(bei Rückfragen bitte angeben)

Genehmigung zur Durchführung von Versuchen an Wirbeltieren

- Ihr Antrag vom 06.02.07, eingegangen am 05.03.07, unsere Rückfragen vom 29.03., 27.04.07
- Ihre Antworten vom 01.04. und 01.05.07

Sehr geehrter Herr Dr. Magnus,
sehr geehrter Herr Dr. Leyoldt,

aufgrund § 8 des Tierschutzgesetzes in der Fassung der Bekanntmachung vom 18. Mai 2006 (BGBl. I S. 1206) wird Ihnen hiermit unter dem Vorbehalt des jederzeitigen Widerrufs und der nachträglichen Aufnahme von Auflagen die Genehmigung zur Durchführung des nachstehenden Versuchsvorhabens erteilt:

„Bedeutung des zellulären Immunsystems beim ischämischen Schlaganfall“

Leiter des Versuchsvorhabens:	Dr. med. T. Magnus
Stellvertretender Leiter:	Dr. med. M. Gelderblom
Anzahl und Art der Versuchstiere:	256 Mäuse
Diese Genehmigung gilt bis zum:	31.05.2010

Der Wechsel des Leiters des Versuchsvorhabens oder seines Stellvertreters ist unverzüglich anzudeuten (§ 8 Abs. 4 Satz 2 TierSchG).

Bei der Durchführung der Versuchsvorhaben sind die Bestimmungen des Tierschutzgesetzes, insbesondere die §§ 9 und 9 a zu beachten.

Gebühren

Diese Genehmigung ist nach der Gebührenordnung für das öffentliche Gesundheitswesen in der jeweils gültigen Fassung gebührenpflichtig. Ein Gebührenbescheid wird mit gesonderter Post übersandt.

Rechtsbehelfsbelehrung

Gegen diesen Bescheid kann innerhalb eines Monats nach Bekanntgabe Widerspruch erhoben werden. Der Widerspruch ist bei der im Briefkopf angegebenen Behörde schriftlich oder zur Niederschrift einzulegen.

Mit freundlichen Grüßen


Dr. von Wenzlawowicz

Anhang 2: Teilnahmebescheinigung



Universitätsklinikum
Hamburg-Eppendorf

Versuchstierhaltung
Dr. rer. nat. A. Haemisch

Martinstraße 52
20246 Hamburg
Telefon: (040) 42803-4466
Telefax: (040) 42803-3079
haemisch@uke.uni-hamburg.de
www.uke.uni-hamburg.de

Teilnahmebescheinigung

Frau Lena Hoffmann hat am 29.7.2009 an einem eintägigen Kurs über

Tierexperimentelles Arbeiten mit der Maus

teilgenommen. Der Kurs wurde veranstaltet von der Versuchstierhaltung des UKE unter Leitung von Dr. rer. nat. Haemisch und Dr. med. vet. Tiemann. Behandelt wurden folgende Themen:

- A. Tierschutzrechtliche Voraussetzungen für tierexperimentelles Arbeiten
- B. Biologie, Haltungsformen und Zuchtverfahren bei Labormäusen
- C. Handling und Applikationsmethoden (ip, sc, iv, po)
- D. Methoden der Blutentnahme (retro-bulbär, mandibulär)
- E. Narkoseverfahren (CO₂/O₂, Ketamin/Rompun)
- F. Tierschutzgerechtes Töten (Kohlendioxid, cervikale Dislokation), Sektion
- G. Belastungsminderung bei Tieren im Versuch
- H. Organisation und Betrieb einer Versuchstierhaltung

Zu den Themen C-F wurden praktische Übungen durchgeführt. Die Hälfte der achtstündigen Kursdauer entfiel auf die praktischen Übungen.

Hamburg, den 29.7.2009

Dr. med. vet. B. Tiemann

Alphabetisches Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AMPA	α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolepropionic Acid
ATP	Adenosintriphosphat
BDNF	Brain-Derived Neurophic Factor
bFGF	Basic Fibroblast Growth Factor
BME	Basal Medium Eagle
BSA	bovine serum albumin (bovines Serum-Albumin)
$C_2H_4O_2$	Essigsäure
CaCl	Kalziumchlorid
cGMP	zyklisches Guanosin-3',5'-Monophosphat
DAPI	4',6-Diamidin-2-Phenylindol
DIV	days <i>in vitro</i> (Tage <i>in vitro</i>)
DMF	Dimethylformamid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
eNOS	endotheliale Nitrit Oxid Synthase
FCS	fetale calf serum (fetales Kälberserum)
GFAP	glial fibrillary acidic protein (saures Gliafaserprotein)
H_3PO_4	Phosphorsäure
HBSS	Hank's Buffered Salt Solution
HCl	Salzsäure
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-Piperazinyl-1-Ethansulfonsäure
HS	Horseserum (Pferdeserum)
Iba-1	ionized calcium binding adaptor molecule 1 (ionisiertes Kalzium-bindendes Adaptermolekül 1)
ICAM-1	intracellular adhaesion molecule 1 (intrazelluläres Adhäsionsmolekül 1)
IL- 1 β	Interleukin-1 β
IL-6	Interleukin-6
iNOS	induzierbare Nitrit Oxid Synthase

IP ₃	Inositol-1,4,5-Trisphosphat
ISM	Ionen-sensitiven Mikroelektrode
KCl	Kaliumchlorid
LPS	Lipopolysaccharid
MCP-1	monocyte chemotactic proteine 1 (Monozyten- chemotaktisches Protein 1)
MHC	Major Histocompatibility Complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
MgCl	Magnesiumchlorid
MMS	monozytäres Makrophagen System
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid
n	Anzahl der Versuche
Na ₂ HPO ₄	Di-Natriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NADP ⁺	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NaH ₂ PO ₄	Natriumdihydrogenphosphat
NaOH	Natronlauge
NFG	Nerve Growth Factor
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
nNOS	neuronale Nitrit Oxid Synthase
NO	Nitrit Oxid
NOS	Nitrit Oxid Synthase
OGD	Oxygen-Glucose-Deprivation (Sauerstoff-Glukose-Entzug)
P1-P2	postnatal Tag 1/2
PBS	Phosphate Buffered Saline
PFA	Paraformaldehyd
SD	Standard Deviation (Standardabweichung)
SDS	sodium dodecyl sulfate (Natriumlaurylsulfat)
SEM	Standard Error of the Mean (Standardfehler)
TBM	Tetramethylbenzidin
TGF-β	Transforming Growth Factor-β
TNF-α	Tumornekrose-Faktor-α
Tween® 20	Polyoxyethylen(20)-Sorbitan-Monolaurat
ZNS	zentrales Nervensystem

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Hypothetische Darstellung des zeitlichen Ablaufs peri- und postischämischer Ereignisse
- Abbildung 2 : Lichtmikroskopische Aufnahmen von Mikroglia im Phasenkontrast (*days in vitro* (DIV) 14) in unterschiedlichen Aktivierungszuständen
- Abbildung 3: Interaktion zwischen Mikroglia, Neuronen und Astrozyten unter pathologischen Bedingungen
- Abbildung 4: Darstellung metabolischer Abläufe in der hypoxischen Zelle
- Abbildung 5: Phasenkontrastmikroskopie der Entwicklung von Astrozyten-Mikroglia-Mischkulturen
- Abbildung 6: Isolierte Mikroglia nach Färbung mit Trypan-Blau in der Neubauer-Zählkammer mit 2×10^5 Zellen/ml (10x)
- Abbildung 7: Mikrogliakultur mit 2×10^5 Zellen/ml 24 Stunden nach Isolation aus Mischkulturen
- Abbildung 8: Immunzytochemische Färbung reiner Mikrogliaulturen 24 Stunden nach Isolierung aus Mischkulturen (63x)
- Abbildung 9: Immunzytochemische Färbung eines Astrozyten in isolierter Mikrogliakultur (63x)
- Abbildung 10: Vergleich der Aktivierung reiner Mikrogliaulturen in BME (10% FCS), nach LPS-Stimulierung in BME und in Puffer N jeweils mit OGD und ohne OGD (Kontrolle) über drei Stunden bemessen anhand der a) NO-Produktion und b) TNF- α -Produktion normalisiert auf die jeweilige Vitalität der Mikrogliakultur (MTT-Wert)
- Abbildung 11: Absolute Absorption im MTT-Assay nach a) einer Stunde und b) drei Stunden Inkubation in den Puffern N, A, K oder G mit/ohne OGD
- Abbildung 12: Vergleich der absoluten Absorptionen im MTT-Assay nach einer bzw. drei Stunden Serumentzug durch die Puffer N, A, K und G

- Abbildung 13: Vergleich von Aktivierung der NO-Produktion bezogen auf die Vitalität der jeweiligen Zellpopulation nach a) einer bzw. b) drei Stunden Inkubation mit den Puffersubstanzen N, A, K und G mit/ohne OGD
- Abbildung 14: TNF- α -Produktion normalisiert auf die Vitalität der jeweiligen Zellpopulation, Vergleich von Aktivierungseigenschaften nach a) einer bzw. b) drei Stunden Inkubation mit den Puffern N, A, K und G mit/ohne OGD
- Abbildung 15: Absolute NO-Produktion nach einer bzw. drei Stunden OGD normalisiert auf die jeweilige Kontrolle
- Abbildung 16: Absolute TNF- α -Produktion nach einer bzw. drei Stunden OGD normalisiert auf die jeweilige Kontrolle (als prozentualer Anteil angegeben)
- Abbildung 17: NO-Produktion der Kontrollen (ohne OGD) der Puffer N, A, K und G normalisiert auf den zugehörigen MTT-Wert nach einer bzw. drei Stunden alleinigem Serumentzug
- Abbildung 18: TNF- α -Produktionen der Kontrollen (ohne OGD) der Puffer N, A, K und G normalisiert auf den zugehörigen MTT-Wert nach einer bzw. drei Stunden alleinigem Serumentzug

Literaturverzeichnis

- Barnett, V., Lewis, T. (1994): Outliers in Statistical Data, 3. Auflage, Chichester, New York, John Wiley & Sons
- Barone, F. C. und Parsons, A. A. (2000): "Therapeutic potential of anti-inflammatory drugs in focal stroke", Expert Opin Investig Drugs **9**(10): 2281-306
- Beckman, J. S., Beckman, T.W, Chen, J., Marshall, P. A., Freeman, B. A. (1990): "Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide", Proc Natl Acad Sci U S A **87**(4): 1620-4
- Berger, C., Dohmen, C., Maurer, M. H., Graf, R., Schwab, S. (2004): "Cerebral microdialysis in stroke", Nervenarzt **75**(2): 113-23
- Blasi, E., Barluzzi, R., Bocchini, V., Mazzolla, R., Bistoni, F. (1990): "Immortalization of murine microglial cells by a v-raf/v-myc carrying retrovirus", J Neuroimmunol **27**(2-3): 229-37
- Bocchini, V., Mazzolla, R., Barluzzi, R., Blasi, E., Sick, P., Kettenmann, H. (1992): "An immortalized cell line expresses properties of activated microglial cells", J Neurosci Res **31**(4): 616-21
- Bonfoco, E., Krainc, D., Ankarcrona, M., Nicotera, P., Lipton, S. A. (1995): "Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures", Proc Natl Acad Sci U S A **92**(16): 7162-6
- Boxberger, H. J., Ed. (2006): Leitfaden für die Zell- und Gewebekultur: Einführung in Grundlagen und Techniken, Weinheim, Wiley-VCH
- Bruno, V., Battaglia G., Copani, A., D'Onofrio, M., Di Iorio, P., De Blasi, A., Melchiorri, D., Flor, P. J., Nicoletti, F. (2001): "Metabotropic glutamate receptor subtypes as targets for neuroprotective drugs", J Cereb Blood Flow Metab **21**(9): 1013-33
- Carden, D. L. und Granger, D. N. (2000): "Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury", J Pathol **190**(3): 255-66
- Chan, W. Y., Kohsaka, S., Rezaie, P. (2007): "The origin and cell lineage of microglia: new concepts", Brain Res Rev **53**(2): 344-54
- Chang, R. C., Hudson, P. M., Wilson, B. C., Liu, B., Abel, H., Hong, J. S. (2000): "High concentrations of extracellular potassium enhance bacterial endotoxin lipopolysaccharide-induced neurotoxicity in glia-neuron mixed cultures", Neuroscience **97** (4): 757-64

- Chock, V. Y. und Giffard, R. G. (2005): "Development of neonatal murine microglia in vitro: changes in response to lipopolysaccharide and ischemia-like injury", *Pediatr Res* **57**(4): 475-80
- Chou, W. H., Choi, D.S., Zhang, H., Mu, D., McMahon, T., Kharazia, V. N., Lowell, C. A., Ferriero, D. M., Messing, R. O. (2004): "Neutrophil protein kinase Cdelta as a mediator of stroke-reperfusion injury", *J Clin Invest* **114**(1): 49-56
- Clark, E. T., Desai T. R., Hynes, K. L., Gewertz, B. L. (1995): "Endothelial cell response to hypoxia-reoxygenation is mediated by IL-1", *J Surg Res* **58**(6): 675-81
- Crack, P. J. und Taylor J.M. (2005): "Reactive oxygen species and the modulation of stroke", *Free Radic Biol Med* **38**(11): 1433-44
- 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**(6): 752-8
- Davis, E. J., Foster, T.D., Thomas, W. E. (1994): "Cellular forms and functions of brain microglia", *Brain Res Bull* **34**(1): 73-8
- Dirnagl, U., Iadecola, C., Moskowitz, M. A. (1999): "Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view", *Trends Neurosci* **22**(9): 391-7
- Dobrenis, K. (1998): "Microglia in cell culture and in transplantation therapy for central nervous system disease", *Methods* **16**(3): 320-44
- Doyle, K. P., Simon, R. P., Stenzel-Poore, M. P. (2008): "Mechanisms of ischemic brain damage", *Neuropharmacology* **55**(3): 310-8
- Dugan, L. L. und Choi, D. W. (1994): "Excitotoxicity, free radicals, and cell membrane changes", *Ann Neurol* **35 Suppl**: S17-21
- Dwyer, T. A., Earl, D. E., Wang, L. (2008): "The utility of a new in vitro model of the stroke penumbra", *J Neurosci* **28**(26): 6537-8
- European Stroke Organisation (2011): "Stroke Facts", Schweiz (Basel), [online im Internet] "http://www.eso-stroke.org/stroke_facts.php?cid=5" [Stand 21.12.2011, 12:41]
- Feuerstein, G. Z., Liu, T., Barone, F. C. (1994): "Cytokines, inflammation, and brain injury: role of tumor necrosis factor-alpha", *Cerebrovasc Brain Metab Rev* **6**(4): 341-60
- Floden, A. M. und Combs, C. K. (2007): "Microglia repetitively isolated from in vitro mixed glial cultures retain their initial phenotype", *J Neurosci Methods* **164**(2): 218-24

- Fontaine, V., Mohand-Said, S., Hanoteau, N., Fuchs, C., Pfizenmaier, K., Eisel, U. (2002): "Neurodegenerative and neuroprotective effects of tumor Necrosis factor (TNF) in retinal ischemia: opposite roles of TNF receptor 1 and TNF receptor 2", J Neurosci **22**(7): RC216
- Frei, K., Bodmer, S., Schwerdel, C., Fontana, A. (1986): "Astrocyte-derived interleukin 3 as a growth factor for microglia cells and peritoneal macrophages", J Immunol **137**(11): 3521-7
- Furlan, M., Marchal, G., Viader, F., Derlon, J. M., Baron, J. C. (1996): "Spontaneous neurological recovery after stroke and the fate of the ischemic penumbra", Ann Neurol **40**(2): 216-26
- Gelderblom, M., Leyboldt, 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**(5): 1849-57
- Giffard, R. G., Monyer, H., Christine, C. W., Choi, D. W. (1990): "Acidosis reduces NMDA receptor activation, glutamate neurotoxicity, and oxygen-glucose deprivation neuronal injury in cortical cultures", Brain Res **506**(2): 339-42
- Giulian, D. und Baker, T. J. (1986): "Characterization of ameboid microglia isolated from developing mammalian brain", J Neurosci **6**(8): 2163-78
- Griess, P. (1863): "On a New Class of Compounds in Which Nitrogen Is Substituted for Hydrogen", Proceedings of the Royal Society of London **13**: 375-384
- Hanisch, U. K. und Kettenmann, H. (2007): "Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain", Nat Neurosci **10**(11): 1387-94
- Hansen, A. J. (1985): "Effect of anoxia on ion distribution in the brain", Physiol Rev **65**(1): 101-48
- Hansen, M. B., Nielsen, S. E., Berg, K. (1989): "Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill", J Immunol Methods **119**(2): 203-10
- Hossmann, K. A. (1994): "Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia", Ann Neurol **36**(4): 557-65
- Hossmann, K. A. (1996): "Periinfarct depolarizations", Cerebrovasc Brain Metab Rev **8**(3): 195-208
- Huang, J., Upadhyay, U.M., Tamargo, R. J. (2006): "Inflammation in stroke and focal cerebral ischemia", Surg Neurol **66**(3): 232-45
- Huang, Z., Huang, P. L., Panahian, N., Dalkara, T., Fishman, M. C., Moskowitz, M. A. (1994): "Effects of cerebral ischemia in mice deficient in neuronal nitric oxide synthase", Science **265**(5180): 1883-5

- Iadecola, C. (1997): "Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury", Trends Neurosci **20**(3): 132-9
- Imamura, K., Ito, M., Suzumura, A., Asai, J., Takahashi, A. (1990): "Generation and characterization of monoclonal antibodies against rat microglia and ontogenic distribution of positive cells", Lab Invest **63**(6): 853-61
- Ivacko, J., Szaflarski, J., Malinak, C., Flory, C., Warren, J. S., Silverstein, F. S. (1997): "Hypoxic-ischemic injury induces monocyte chemoattractant protein-1 expression in neonatal rat brain", J Cereb Blood Flow Metab **17**(7): 759-70
- Jacobson, M. und Rao, M.S. (2005): Developmental neurobiology, New York, Kluwer Academic/Plenum
- Jiang, C. und Haddad, G. G. (1991): "Effect of anoxia on intracellular and extracellular potassium activity in hypoglossal neurons in vitro", J Neurophysiol **66**(1): 103-11
- Kandel, E. R., Schwartz, J. H., Jessell, Thomas M. (2000): Principles of neural science. New York, McGraw-Hill, Health Professions Division
- Kaur, C., Hao, A. J., Wu, C. H., Ling, E. A. (2001): "Origin of microglia", Microsc Res Tech **54**(1): 2-9
- Kaushal, V. und Schlichter, L. C. (2008): "Mechanisms of microglia-mediated neurotoxicity in a new model of the stroke penumbra", J Neurosci **28**(9): 2221-30
- Kiewert, C., Mdzinarishvili, A., Hartmann, J., Bickel, U., Klein, J. (2009): "Metabolic and transmitter changes in core and penumbra after middle cerebral artery occlusion in mice", Brain Res. (2009), doi:10.1016/j.brainres.2009.11.068
- Klempt, N. D., Sirimanne, E., Gunn, A. J., Klempt, M., Singh, K., Williams, C., Gluckman, P. D. (1992): "Hypoxia-ischemia induces transforming growth factor beta 1 mRNA in the infant rat brain", Brain Res Mol Brain Res **13**(1-2): 93-101
- Kolominsky-Rabas, P. L., Heuschmann, P. U., Marschall, D., Emmert, M., Baltzer, N., Neundorfer, B., Schoffski, O., Krobot, K. J. (2006): "Lifetime cost of ischemic stroke in Germany: results and national projections from a population-based stroke registry: the Erlangen Stroke Project", Stroke **37**(5): 1179-83
- Koyama, Y., Kimura, Y., Yoshioka, Y., Wakamatsu, D., Kozaki, R., Hashimoto, H., Matsuda, T., Baba, A. (2000): "Serum-deprivation induces cell death of rat cultured microglia accompanied with expression of Bax protein", Jpn J Pharmacol **83**(4): 351-4
- Kreutzberg, G. W. (1996): "Microglia: a sensor for pathological events in the CNS", Trends Neurosci **19**(8): 312-8

- Lai, A. Y. und Todd, K.G. (2006): "Microglia in cerebral ischemia: molecular actions and interactions", Can J Physiol Pharmacol **84**(1): 49-59
- Lai, A. Y. und Todd, K. G. (2008): "Differential regulation of trophic and proinflammatory microglial effectors is dependent on severity of neuronal injury", Glia **56**(3): 259-70
- Lassmann, H. und Hickey, W. F. (1993): "Radiation bone marrow chimeras as a tool to study microglia turnover in normal brain and inflammation", Clin Neuropathol **12**(5): 284-5
- Leist, M. und Nicotera, P. (1998): "Apoptosis, excitotoxicity, and neuropathology", Exp Cell Res **239**(2): 183-201
- 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**(2): 192-9
- Lin, S. Z., Chiou, A. L., Wang, Y. (1996): "Ketamine antagonizes nitric oxide release from cerebral cortex after middle cerebral artery ligation in rats", Stroke **27**(4): 747-52
- Lipton, P. (1999): "Ischemic cell death in brain neurons", Physiol Rev **79**(4): 1431-568
- Ljunggren, B., Norberg, K., Siesjo, B. K. (1974): "Influence of tissue acidosis upon restitution of brain energy metabolism following total ischemia", Brain Res **77**(2): 173-86
- Madinier, A., Bertrand, N., Mossiat, C., Prigent-Tessier, A., Beley, A., Marie, C., Garnier, P. (2009): "Microglial involvement in neuroplastic changes following focal brain ischemia in rats", PLoS One **4**(12): e8101
- Martin, R. L., Lloyd, H. G., Cowan, A. I. (1994): "The early events of oxygen and glucose deprivation: setting the scene for neuronal death?", Trends Neurosci **17**(6): 251-7
- McCarthy, K. D. und de Vellis, J. (1980): "Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue", J Cell Biol **85**(3): 890-902
- Mies, G., Iijima, T., Hossmann, K. A. (1993): "Correlation between peri-infarct DC shifts and ischaemic neuronal damage in rat", Neuroreport **4**(6): 709-11
- Moncada, S., Palmer, R. M., Higgs, E. A. (1991): "Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology", Pharmacol Rev **43**(2): 109-42
- Monk, P. N. und Shaw, P. J. (2006): "ALS: life and death in a bad neighborhood", Nat Med **12**(8): 885-7

- Montero, M., Gonzalez, B., Zimmer, J. (2009): "Immunotoxic depletion of microglia in mouse hippocampal slice cultures enhances ischemia-like neurodegeneration", Brain Res **1291**: 140-52
- Morioka, T., Kalehua, A. N., Streit, W. J. (1993): "Characterization of microglial reaction after middle cerebral artery occlusion in rat brain", J Comp Neurol **327**(1): 123-32
- Mosmann, T. (1983): "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays", J Immunol Methods **65**(1-2): 55-63
- Murphy, K. P., Travers, P., Walport, M., Janeway, C. (2008): Janeway's immunobiology, New York, Garland Science
- Myers, R. E. und Yamaguchi, S. (1977): "Nervous system effects of cardiac arrest in monkeys. Preservation of vision", Arch Neurol **34**(2): 65-74
- Nadeau, S. und Rivest, S. (2000): "Role of microglial-derived tumor necrosis factor in mediating CD14 transcription and nuclear factor kappa B activity in the brain during endotoxemia", J Neurosci **20**(9): 3456-68
- Nakamura, Y., Si, Q. S., Kataoka, K. (1999): "Lipopolysaccharide-induced microglial activation in culture: temporal profiles of morphological change and release of cytokines and nitric oxide", Neurosci Res **35**(2): 95-100
- Nakase, T., Yamazaki, T., Ogura, N., Suzuki, A., Nagata, K. (2008): "The impact of inflammation on the pathogenesis and prognosis of ischemic stroke", J Neurol Sci **271**(1-2): 104-9
- Napoli, I. und Neumann, H. (2010): "Protective effects of microglia in multiple sclerosis", Exp Neurol **225**(1): 24-28
- Nemoto, E. M. und Frinak, S. (1981): "Brain tissue pH after global brain ischemia and barbiturate loading in rats", Stroke **12**(1): 77-82
- Nissl, F. (1894): "Ueber eine neue Untersuchungsmethode des Centralorgans speciell zur Feststellung der Localisation der Nervenzellen", Centralblatt für Nervenheilkunde und Psychiatrie **17**(5): 337-344
- Perry, V. H., Hume, D. A., Gordon, S. (1985): "Immunohistochemical localization of macrophages and microglia in the adult and developing mouse brain", Neuroscience **15**(2): 313-26
- Persson, M., Brantefjord, M., Hansson, E., Ronnback, L. (2005): "Lipopolysaccharide increases microglial GLT-1 expression and glutamate uptake capacity in vitro by a mechanism dependent on TNF-alpha", Glia **51**(2): 111-20
- Rezaie, P., Dean, A., Male, D., Ulfing, N. (2005): "Microglia in the cerebral wall of the human telencephalon at second trimester", Cereb Cortex **15**(7): 938-49

- Rothwell, N. J. und Hopkins, S. J. (1995): "Cytokines and the nervous system II: Actions and mechanisms of action", Trends Neurosci **18**(3): 130-6
- Saura, J., Tusell, J. M., Serratosa, J. (2003): "High-yield isolation of murine microglia by mild trypsinization", Glia **44**(3): 183-9
- Schilling, M., Besselmann, M., Leonhard, C., Mueller, M., Ringelstein, E. B., Kiefer, R. (2003): "Microglial activation precedes and predominates over macrophage infiltration in transient focal cerebral ischemia: a study in green fluorescent protein transgenic bone marrow chimeric mice", Exp Neurol **183**(1): 25-33
- Schmidt, R. F., Thews, G., Rein, H. (1976): Einführung in die Physiologie des Menschen, Berlin ; New York, Springer Verlag
- Shichita, T., Sugiyama, Y., Ooboshi, H., Sugimori, H., Nakagawa, R., Takada, I., Iwaki, T., Okada, Y., Iida, M., Cua, D. J., Iwakura, Y., Yoshimura, A. (2009): "Pivotal role of cerebral interleukin-17-producing gammadelta T cells in the delayed phase of ischemic brain injury", Nat Med **15**(8): 946-50
- Siesjo, B. K. (1988): "Mechanisms of ischemic brain damage", Crit Care Med **16**(10): 954-63
- Spranger, M., Kiprianova, I., Krempien, S., Schwab, S. (1998): "Reoxygenation increases the release of reactive oxygen intermediates in murine microglia", J Cereb Blood Flow Metab **18** (6): 670-4
- Streit, W. J., Walter, S. A., Pennell, N. A. (1999): "Reactive microgliosis", Prog Neurobiol **57**(6): 563-81
- Tanaka, J., Toku, K., Sakanaka, M., Maeda, N. (1999): "Morphological differentiation of microglial cells in culture: involvement of insoluble factors derived from astrocytes", Neurosci Res **34**(4): 207-15
- van Noort, J. M., van den Elsen, P. J., van Horssen, J., Geurts, J. J., van der Valk, P., Amor, S. (2011): "Preactive multiple sclerosis lesions offer novel clues for neuroprotective therapeutic strategies", CNS Neurol Disord Drug Targets **10** (1):68-81
- Wang, Q., Tang, X. N., Yenari, M. A. (2007): "The inflammatory response in stroke", J Neuroimmunol **184**(1-2): 53-68
- Whiteley, W., Jackson, C., Lewis, S., Lowe, G., Rumley, A., Sandercock, P., Wardlaw, J., Dennis, M., Sudlow, C. (2009): "Inflammatory markers and poor outcome after stroke: a prospective cohort study and systematic review of interleukin-6", PLoS Med **6**(9): e1000145
- Whittingham, T. S., Lust, W. D., Passonneau, J. V. (1984): "An in vitro model of ischemia: metabolic and electrical alterations in the hippocampal slice", J Neurosci **4**(3): 793-802

- Yagami, T., Ueda, K., Hata, S., Kuroda, T., Itoh, N., Sakaguchi, G., Okamura, N., Sakaeda, T., Fujimoto, M. (2005): "S-2474, a novel nonsteroidal anti-inflammatory drug, rescues cortical neurons from human group IIA secretory phospholipase A(2)-induced apoptosis", Neuropharmacology **49**(2): 174-84
- Yenari, M. A. und Giffard, R. G. (2001): "Ischemic vulnerability of primary murine microglial cultures", Neurosci Lett **298**(1): 5-8
- Zaremba, J., Skrobanski, P., Losy, J. (2001): "Tumour necrosis factor-alpha is increased in the cerebrospinal fluid and serum of ischaemic stroke patients and correlates with the volume of evolving brain infarct", Biomed Pharmacother **55**(5): 258-63
- Zheng, Z., Zhao, H., Steinberg, G. K., Yenari, M. A. (2003): "Cellular and molecular events underlying ischemia-induced neuronal apoptosis", Drug News Perspect **16**(8): 497-503

Danksagung

Ich möchte mich bei PD Dr. med. Tim Magnus und der gesamten Arbeitsgruppe „ERSI“ für die Heranführung an die Thematik Entzündung und Schlaganfall, die Unterstützung bei der praktischen Umsetzung der Versuche in jeglicher Hinsicht und die freundliche Atmosphäre im Labor bedanken.

Außerdem danke ich Dr. med. Frank Leypoldt für eine sehr gute Betreuung während der praktischen und theoretischen Arbeitsphasen dieser Dissertation und die vielen hilfreichen Tipps und Wegweiser.

Ich danke Ellen Orthey und Kerstin Lardong für die Hilfe bei der Umsetzung der theoretischen Versuchsplanungen, ihre Motivation und die vielen netten Stunden im Labor.

Vielen Dank auch an Dr. med. Jan Lewerenz für die theoretische und praktische Einführung in die Arbeit mit Zellkulturen und Dr. med. Mathias Gelderblom als Ansprechpartner für alle aufkommenden Fragen.

Außerdem möchte ich mich bei Heidi Duske und der Arbeitsgruppe „Immune Regulation“ für die ideenreichen Labortreffen bedanken.

Lebenslauf

Vorname: Lena Charlotte

Name: Hoffmann

Geburtsdatum: 27. Dezember 1985

Geburtsort: Berlin-Wilmersdorf, Deutschland

Studium

- 2005 - 2012 Studium der Humanmedizin an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg mit Abschluss Staatsexamen mit Note „gut“
- WS 2006/07: Belegung des Wahlfachs „Biologie der Zelle aus Medizinersicht“ mit Note „sehr gut“
- 2009-2011: Experimentelle Doktorarbeit in der Forschungsgruppe ERSI, Klinik und Poliklinik für Neurologie des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf
- WS 2009/10: Belegung des Wahlblocks „experimentelle Medizin“ mit Note „sehr gut“
- 30.01.2010 – 04.04.2010: Auslandsaufenthalt mit allgemeinchirurgischer Famulatur in Singapur
- 3.10.2011 – 05.01.2012: Auslandsaufenthalt im Rahmen des Praktischen Jahres (Fach Chirurgie) in Kapstadt, Südafrika

Praktisches Jahr

- Februar 2011 - Juni 2011 Tertianer Innere Medizin am Israelitischen Krankenhaus, Hamburg
- Juni 2011 - Oktober 2011 Tertianer Neurologie am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
- Oktober 2011 - Januar 2012 Tertianer Chirurgie am Tygerberg Hospital, Kapstadt, Südafrika

Schule

- Besuch des Gymnasiums Großburgwedel (Niedersachsen) von 1998 - 2005 mit Abschluss Abitur
- 01.09.2002 – 22.12.2002: schulischer Auslandsaufenthalt in Saumur/Frankreich
- Besuch der Orientierungsstufe Burgwedel von 1996 – 1998
- Besuch der Grundschule Thönse von 1992 – 1996

Eidesstattliche Versicherung

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.



Unterschrift: