

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Klinik und Poliklinik für Neurologie
Prof. Dr. med. Christian Gerloff

Experimental Research in Stroke and Inflammation
Prof. Dr. med. Tim Magnus

Die Rolle von IL-17 im Kontext der sekundären Gewebeschädigung bei zerebraler Ischämie

Dissertation

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

vorgelegt von:

Anna Weymar
aus Odessa

Hamburg 2014

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 16.07.2015**

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

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. med. T. Magnus

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: PD Dr. rer. nat. J. Herkel

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: Prof. Dr. Dr. Th. Renné

Inhaltsverzeichnis

0. Arbeitshypothese und Fragestellung	5
1. Einleitung	6
1.1. Schlaganfall: Krankheitsbild und Statistik	6
1.2. Reperfusion, sterile Inflammation und Immunsuppression	7
1.3. Zellpopulationen beim Schlaganfall	8
1.3.1. $\gamma\delta$ -T-Zellen	13
1.4. Zytokine beim Schlaganfall	14
1.4.1. IL-17	18
1.5. Chemokine beim Schlaganfall	21
1.5.1. CXCL1	23
2. Materialien und Methoden	26
2.1. Tiere	26
2.2. Zellkultur	26
2.2.1. Primäre Mischkultur aus Astrozyten und Mikroglia	26
2.2.2. Aufreinigung der Mikroglia aus der primären glialen Mischkultur	27
2.3. Versuche mit OGD (Oxygen-Glucose-Deprivation)	28
2.4. Stimulations- und Inhibitionsversuche	29
2.4.1. Stimulation mit TNF- α und IL-17	29
2.4.2. Inhibition mit Actinomycin D	29
2.5. Molekularbiologische Techniken	30
2.5.1. RNA-Isolation aus Astrozyten	30
2.5.2. RNA-Isolation aus Mikroglia	30
2.5.3. RNA-Isolation aus dem Gehirn	31
2.5.4. cDNA-Synthese aus der isolierten RNA	32
2.5.5. Real-Time Polymerase-Chain-Reaction	32

2.5.6. Proteinbestimmung in den Zellüberständen mittels ELISA	33
2.5.6.1. ELISA für CCL-2 und IL-6	33
2.5.6.2. ELISA für CXCL-1 und G-CSF	34
2.6. Immunhistochemie	35
2.7. in-vivo Schlaganfallmodell (tMCAO)	36
2.8. Statistische Auswertung	37
3. Ergebnisse	38
3.1. Mikroglia: keine signifikante Genregulation nach IL-17-Gabe	40
3.2. Astrozyten: keine signifikante Regulation unter Ischämie-Simulation	42
3.3. Astrozyten: synergistischer Effekt von TNF- α und IL-17	44
3.4. Astrozyten: Regulation der IL-17-Rezeptoren	46
3.5. Astrozyten: Synergismus von TNF- α und IL-17 auf Proteinebene	47
3.6. Astrozyten: zeitliche Dynamik der Genexpression	49
3.7. Astrozyten: IL-17 verlangsamt RNA-Degradierung durch Stabilisation	51
3.8. IL-17-Effekte <i>in vivo</i>	53
3.9. Astrozyten: neutrophilen-unabhängige Effekte von IL-17	55
4. Diskussion	57
5. Zusammenfassung	69
6. Abkürzungsverzeichnis	71
7. Literaturverzeichnis	74
8. Danksagung	88
9. Lebenslauf	89
10. Eidesstattliche Versicherung	90

0. Arbeitshypothese und Fragestellung

In den Industrienationen ist der ischämische Schlaganfall trotz Prävention und moderner Therapie weiterhin die zweithäufigste Todes- und die häufigste Behinderungsursache. Intensive Forschung führte zum besseren Verständnis der Pathogenese dieser Erkrankung. Hervorzuheben ist in diesem Zusammenhang die Erkenntnis, dass auf den initial nach einem Gefäßverschluss durch Glukose und Sauerstoffentzug induzierten Zelltod ein nicht weniger wichtiger sekundärer Reperfusionsschaden folgt. In diesem Rahmen wandern Zellen des Immunsystems in das Hirnparenchym ein und vergrößern durch die Initiierung eines entzündlichen Prozesses den primären Schaden. In zahlreichen Originalarbeiten der vergangenen Jahre wurden die Mechanismen der Entzündungsreaktion näher differenziert. So ist mittlerweile verstanden, dass in der Folge einer zerebralen Ischämie hirneigene Zellen über diverse Gefahrensignale - wie proinflammatorische Zytokine und Chemokine - mit den peripheren Immunzellen interagieren und damit ihr Migrationsverhalten in das geschädigte Gehirn hinein entscheidend beeinflussen. In diesem Kontext rückt eine Lymphozyten-Subpopulation in den Fokus der neuroimmunologischen Forschung – $\gamma\delta$ -T-Zellen. Sie sind bereits in den frühen Ischämienstadien im ZNS nachweisbar und produzieren Interleukin-17, ein proinflammatorisches Zytokin. Parallel demonstrieren Arbeiten in anderen Modellen der Ischämie-Reperfusion-Schädigung (z.B. in der Lunge oder Niere), dass eine der Hauptfunktionen von IL-17 unter diesen Umständen die Induktion einer schädigenden Neutrophileninfiltration in das absterbende Gewebe zu sein scheint.

Unter Berücksichtigung dieser Vordaten strebt diese Arbeit an, die Rolle des Zytokins IL-17 im Kontext des ischämischen Schlaganfalls näher zu beschreiben. Wenngleich diverse Vorarbeiten die $\gamma\delta$ -T-Zellen als IL-17-Hauptquelle beim Schlaganfall bereits identifizierten und den Effekt von IL-17 auf die Neutrophileneinwanderung verdeutlichen, sind die Signalwege bisher unklar, die für die IL-17 induzierte Immunzellinvasion in das postischämische ZNS kritisch sind. Ziel dieser Arbeit ist es den Einfluss von IL-17 auf die zelluläre postischämische Entzündungsreaktion beim Schlaganfall zu untersuchen, um anhand dieser Erkenntnisse neue therapeutische Optionen zu entwickeln.

1. Einleitung

1.1. Schlaganfall: Krankheitsbild und Statistik

Als Schlaganfall wird eine plötzliche Unterbrechung der Blutversorgung in einem Gehirnareal bezeichnet. Dies kann als Folge von einem Arterienverschluss entstehen (ischämischer Schlaganfall), aber auch aus einer Einblutung ins Gewebe bei einer Gefäßruptur (hämorrhagischer Schlaganfall) resultieren, wobei der ischämische Schlaganfall mit etwa 80% der Fälle die häufigere Form ist.

Für einen Gefäßverschluss beim ischämischen Schlaganfall gibt es grundsätzlich zwei Entstehungsursachen: einen Thrombus oder einen Embolus. Thrombotisch bedingte Schlaganfälle entstehen durch atherosklerotische Vorgänge. Dadurch wird einerseits die Blutzufuhr eingeschränkt, andererseits kann der Blutfluss im engen Lumen turbulenter werden und somit zu Thrombozytenaggregation führen, was eine Thrombus-Bildung verursacht. Embolisch bedingte Schlaganfälle haben als Ursache ebenfalls einen Verschluss von zerebralen Arterien, wobei dieser nicht vor Ort entsteht, sondern als Embolus (meist körpereigenes Material, wie Plaques, koaguliertes Blut, Fett etc.) aus einem anderen Organ über das Gefäßsystem eingeschwemmt wird. Beide Formen resultieren in einer unterbrochenen Blutversorgung und somit in einem Sauerstoff- und Metabolitenmangel, der innerhalb kurzer Zeit zu irreversiblen Schäden und Absterben der empfindlichen Nervenzellen führen kann.

Laut der Weltgesundheitsorganisation WHO (World Health Organization) ist der ischämische Schlaganfall die zweithäufigste Todesursache bei Erwachsenen. Schätzungsweise sind jährlich etwa 10% der Todesfälle auf den Schlaganfall und/oder seine Folgen zurückzuführen (<http://www.who.int/en/>). Trotz der zunehmenden Sensibilisierung der Bevölkerung für das Thema und der intensiven Präventionsmaßnahmen, verursachen dieser neurologische Notfall und die ihm folgenden Behinderungen enorme Kosten im Gesundheitssystem. Auch die Therapieoptionen bleiben weiterhin spärlich – Reperfusion des ischämischen Hirnareals durch systemische Applikation von rtPA (recombinant tissue plasminogen activator) innerhalb von 4.5h nach dem Ereignis ist nach wie vor Goldstandard. Bedingt durch diverse Faktoren (Zeitfenster, Organisation der

medizinischen Versorgung, Kontraindikationen für die Methode bei bestimmten Patienten) können von der rtPA-Lyse lediglich 5 bis 10% der Schlaganfall-Patienten profitieren (Donnan et al. 2008, Lindsberg und Kaste 2003). In diesem Zusammenhang kann eine tiefere Erforschung der Mechanismen der Gewebeschädigung durch die Ischämie eventuelle Ansätze für neue Therapieoptionen bieten.

1.2. Reperfusion, sterile Inflammation und Immunsuppression

Zwar ist ein großer Teil des Schadens auf den Sauerstoffmangel im Gehirn durch einen Verschluss des versorgenden Gefäßes zurückzuführen, doch die Forschungsarbeiten der letzten Jahre zeigen, dass nicht nur die Minderversorgung des Gehirns mit Sauerstoff, sondern auch die sekundäre Schädigung des ischämischen Gewebes durch starke lokale und systemische Entzündungsprozesse nach Wiederherstellung der Durchblutung eine wichtige Rolle spielen. Des Weiteren beeinflusst die entzündliche Reaktion die nachfolgenden Vorgänge der Regeneration in den Organen.

Die neuesten Publikationen zeigen, dass die sich im Gehirn entwickelnde sterile Entzündungsreaktion nach Ischämie auf mehrere Faktoren zurückzuführen ist: dem unmittelbaren Gefäßverschluss und dem daraus resultierenden Gewebeschaden folgt eine erhöhte Expression von Adhäsionsmolekülen an den Endothelzellen des verschlossenen Gefäßes sowie eine Ausschüttung von diversen Gefahrensignalen (DAMPs = danger-associated molecular patterns) aus den geschädigten und/oder absterbenden Zellen. Die Freisetzung dieser Stoffe verursacht einen Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke durch Trennung der *tight junctions*, was ein Hirnödem und eine Infiltration von den im Blut zirkulierenden Immunzellen in die geschädigten und unterversorgten Hirnareale zur Folge hat. Das Zusammenspiel der hirneigenen und der einwandernden Immunzellen, die sich gegenseitig zur Ausschüttung weiterer proinflammatorischer Signale stimulieren und somit die Entzündung potenzieren, bestimmt schlussendlich das Ausmaß der Gewebeschädigung. Die entscheidende Bedeutung des Immunsystems für den sekundären Schaden nach einer Hirnischämie veranschaulichen experimentelle Arbeiten mit immundefizienten

Mäusen, die deutlich kleinere Schlaganfallvolumina zeigten und die sich nach dem Ereignis insgesamt besser erholt haben (Hurn et al. 2007, Yilmaz et al. 2006).

Übertragen auf den klinischen Alltag bedeutet dies, dass die einzige bisher bewährte Therapieoption, der rechtzeitige Einsatz von rtPA, kontroverse Ergebnisse liefert. Einerseits wird der das Gefäß verschließende Thrombus lysiert und die Durchblutung wieder hergestellt. Andererseits wird gleichzeitig dank der wiederhergestellten Durchblutung eine verstärkte Migration von Immunzellen ins geschädigte Gewebe begünstigt und somit die unter sterilen Bedingungen ablaufende Entzündungsreaktion weiter unterhalten und ausgeweitet. Zusätzlich zeigt die Behandlung mit rtPA einige weitere kritische Aspekte: sie fördert den Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke und kann ebenfalls entzündliche Prozesse induzieren sowie zu einer hämorrhagischen Transformation führen (Yamashita und Abe 2011).

Die neuen Erkenntnisse über die Rolle des Immunsystems im Kontext des ischämischen Schlaganfalls legen nahe, dass die therapeutische Beeinflussung der entzündlichen Prozesse eine mögliche neue Therapieoption darstellen könnte. Zugleich wird aber klar, dass der Einsatz von immunmodulierenden Medikamenten bei bestimmten Patienten mit großen Risiken verbunden ist, da bei ihnen ohnehin aufgrund von Infektionen eine höhere Morbidität/Mortalität besteht. In diesem Zusammenhang spielt die Immunsuppression nach einem ischämischen Schlaganfall eine nicht zu vernachlässigbare Rolle: die betroffenen Patienten leiden u.a. an schweren Pneumonien und Harnwegsinfekten, die in Metaanalysen als ein unabhängiger Prädiktor für ein schlechtes Outcome eingestuft werden (Ionita et al. 2011, Stott et al. 2009, Vermeij et al. 2009). Tierexperimentelle Ansätze zeigten ebenfalls, dass nach einem ischämischen Ereignis durch (Stress-) Hormone (Katecholamine und Steroide) diverse immunsuppressive Mechanismen induziert werden – wie etwa Lymphozytopenie oder Inhibition der Makrophagen (Vogelgesang und Dressel 2011).

1.3. Zellpopulationen beim Schlaganfall

Die entzündlichen Vorgänge im Gehirn während und nach einem ischämischen Ereignis sind auf ein enges Zusammenspiel der hirneigenen und der

einwandernden Zellen zurückzuführen. Die jüngsten Publikationen haben den Begriff „neurovascular unit“ geprägt, um zu betonen, dass die genauen Mechanismen der beim Schlaganfall entstehenden Schäden nur verstanden werden können, wenn die Zellpopulationen und ihre Eigenschaften im Einzelnen studiert, aber auch die Wechselwirkungen und Kommunikationswege zwischen ihnen genauestens unter die Lupe genommen werden. Wie bereits der Name verrät, umfasst eine „neurovascular unit“ die Neuronen mit den sie unterstützenden Gliazellen (Astrozyten, Oligodendrozyten und Mikroglia) und stellt ihre Beziehung zu den diversen Zellen aus den Gefäßen (Perizyten, Endothel- und Blutzellen) dar (del Zoppo 2010). Angefangen im versorgenden Gefäß, breitet sich der zelluläre Schaden von den Endothelzellen über die unterbrochene Blut-Hirn-Schranke auf die Astrozyten aus, welche demzufolge keine adäquate Versorgung der Neurone mehr gewährleisten können und somit indirekt für den neuronalen Untergang verantwortlich sind. Gleichzeitig werden durch die Signalmoleküle der absterbenden und geschädigten Zellen die Mikroglia als hirneigene Immunzellen aktiviert und über die zerstörte Blut-Hirn-Schranke weitere Immunzellen aus dem Kreislauf ins Gewebe gelockt.

Die die Gefäße von innen auskleidenden Endothelzellen sind offensichtlich eine der ersten Stationen für die Beeinträchtigung durch den Gefäßverschluss und den Sauerstoffmangel. Unter normalen Bedingungen sind diese Zellen durch *tight* und *adherens junctions* miteinander verbunden und kontrollieren somit den Übertritt von Flüssigkeit, Zellen und Proteinen aus dem Gefäß ins Hirnparenchym. Wenn der Blutfluss unterbrochen ist und keine Nährstoffe mehr geliefert werden, reagieren die Zellen mit Freisetzung von Zytokinen und erhöhter Expression von Chemokinen als Lockstoff für Immunzellen und Adhäsionsmolekülen, die eine Zellmigration ermöglichen. Diese Vorgänge resultieren in einer Zerstörung der *junctions*, Weitergabe der Warnsignale an die kommunizierenden Zellen (Astrozyten) und begünstigen Hirnödembildung sowie Einwanderung der Immunzellen aus dem Kreislauf über die geschädigte Blut-Hirn-Schranke (Berezowski et al. 2012).

Als nächstes Kettenglied sind die Astrozyten von der Ischämie betroffen, da sie mit ihren Ausläufern einen direkten Kontakt zu den Gefäßen haben. Normalerweise sind diese relativ robusten Zellen für die Homöostase der

sensiblen Neuronen zuständig. Unter den Konditionen eines Schlaganfalls können Astrozyten keine adäquate Versorgung der Neuronen mehr gewährleisten, obwohl sie selbst im Vergleich zu Neuronen als resistenter gegenüber Stress gelten: experimentelle Arbeiten mit OGD (oxygen glucose deprivation) als einem *in vitro* Schlaganfall-Modell zeigten, dass die Neuronen bereits nach 1h absterben, während bei den Astrozyten das gleiche Ausmaß an Zelltod erst nach 4-6h erreicht wird (Giffard und Swanson 2005). Außerdem scheinen Astrozyten kontroverse Funktionen in postischämischen Verhältnissen zu haben. Einerseits lassen sie die *gap junctions* durchlässig für proapoptotische Faktoren und schütten Substanzen wie CCL2 (chemokine (C-C motif) ligand 2) oder ATP (Adenosintriphosphat) aus, die proinflammatorisch wirken (Mojsilovic-Petrovic et al. 2007, Takano et al. 2009), was den ischämischen Schaden ausweiten kann. Andererseits schützen Astrozyten in späteren Stadien das umgebende Gewebe durch Narbenbildung: sie produzieren neurotrophe bzw. neuroprotektive Stoffe (Nedergaard und Dirnagl 2005) und modulieren die entzündungsfördernde Aktivierung der Mikroglia (Kim et al. 2010).

Die für den endgültigen Schaden und die Folgen des Schlaganfalls wichtigste aber auch anfälligste Zellpopulation sind die Nervenzellen selbst. Die Neuronen haben wenig eigene Ressourcen, ihre Ischämietoleranz ist mit gerade mal 10 Minuten sehr niedrig und sie sind strengstens auf die Versorgung durch die Astrozyten angewiesen. Unter den Konditionen beim Schlaganfall ist die Zufuhr von Sauerstoff und Nährstoffen nicht mehr gewährleistet, was zu einer Störung des ionischen Gleichgewichtes über der neuronalen Zellmembran führt. Dies verursacht eine unregelmäßige Ausschüttung von Neurotransmittern (speziell Glutamat) und induziert die Mechanismen der sogenannten Exzitotoxizität: die glutamat-induzierte Änderung des intrazellulären Ionenhaushaltes verursacht ein Funktionsdefizit der Mitochondrien, eine vermehrte Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies und schließlich den neuronalen Zelltod (Kostandy 2012, Xing et al. 2012).

Neben den Astrozyten sind auch Oligodendrozyten für die Aufrechterhaltung der neuronalen Funktionen wichtig – sie sind der Hauptbestandteil der weißen Substanz und der wichtigste Baustoff für die

Myelinscheiden der Axone. Zwar ist die weiße Substanz schlechter durchblutet als die graue, doch die Folgen der Ischämie sind nicht weniger verheerend: mit dem Tod der Oligodendrozyten schwindet das Myelin und legt die Axone frei, was zum Zusammenbruch des Ionengradienten führt und die Neuronen schädigt. Auch in der postischämischen Phase sind die Oligodendrozyten und ihre Vorgänger (OPCs, oligodendrocyte precursor cells) von großer Bedeutung – sie wandern in die geschädigten Hirnareale und verhelfen zur Wiederherstellung des axonalen Netzwerkes durch Remyelinisierung (Xing et al. 2012).

Die einzigen hirneigenen Immunzellen, die Mikroglia, sorgen unter normalen Bedingungen für spezifische Abwehr von Mikroorganismen und unspezifische Immunreaktionen bei lokalen/systemischen Entzündungsprozessen. Die Aktivierung der Mikroglia ist kennzeichnend für neurodegenerative und neuroinflammatorische Veränderungen, da sie über die Toll-like-Rezeptoren an ihrer Oberfläche auf minimalste Schäden hoch sensibel reagieren und analog den Makrophagen diverse Funktionen von Antigen-Präsentation über Phagozytose bis hin zur Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen haben (Lv et al. 2011). Nach einem ischämischen Ereignis akkumulieren aktivierte Mikroglia um die Läsion herum, proliferieren stark und können situationsbedingt in zwei Phänotypen differenzieren: den „klassisch aktivierten“ proinflammatorischen M1-Typ mit Produktion von schädigenden reaktiven Sauerstoffspezies sowie Zytokinen und den „alternativ aktivierten“ antiinflammatorischen M2-Typ mit neuroprotektiven Eigenschaften, wie Freisetzung von neuro- und angiotrophen Substanzen (Hu et al. 2012).

Neben den unmittelbar vor Ort agierenden hirneigenen Zellen sind speziell die einwandernden Zellen des Immunsystems von großem Interesse, da sie lokale und systemische Entzündungsreaktionen einleiten, aber auch neuroprotektive Signalwege bahnen können. Mithilfe des MCAO-Modells (middle cerebral artery occlusion) konnten unsere und andere Arbeitsgruppen die genauen Mechanismen der postischämischen Reaktionen näher untersuchen, indem die einzelnen Zellpopulationen differenziert und definiert wurden.

Es konnte gezeigt werden, dass es innerhalb der ersten Tage nach dem induzierten Schlaganfall zu einem massiven Einstrom von unterschiedlichsten

Immunzellen kommt, wobei der Höhepunkt der Infiltration am 3.Tag erreicht wird. Die am zahlreichsten vertretene Zellart sind die neutrophilen Granulozyten, wobei kurz zuvor eine starke Proliferation von Mikroglia und die Einwanderung von dendritischen Zellen, Lymphozyten und Makrophagen zu verzeichnen ist (Gelderblom/Leypold/Steinbach et al. 2009). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die hirneigenen bzw. früh einwandernden Zellen durch Freisetzung bestimmter Signale eine weitere Infiltration von Immunzellen hervorrufen. So konnte in diversen Publikationen gezeigt werden, dass Zellen im ischämischen Areal diverse Zytokine (IL-1, Interleukin-1; IL-6, Interleukin-6; TNF- α , Tumornekrose-Faktor- α ; etc.) produzieren, wodurch die Expression von Adhäsionsmolekülen (ICAM, intercellular adhesion molecule; VCAM, vascular cell adhesion molecule; etc.) stimuliert und somit die Neutrophileneinwanderung begünstigt wird (Huang et al. 2006).

Allerdings postulieren einige Studien, dass die Depletion von neutrophilen Granulozyten keine eindeutige Besserung bei der Hirnischämie zur Folge hatte (Beray-Berthat et al. 2003, Harris et al. 2005, Yilmaz/Arumugam et al. 2006), was darauf hinweist, dass die entscheidenden das Gewebe schädigenden Signale bereits vorher freigesetzt werden und somit von den früher einwandernden Zellen stammen müssen. Trotz der relativ kleinen Zellzahlen scheinen CD4+ (cluster of differentiation) und CD8+ T-Zellen sowie andere Subpopulationen eine kritische proinflammatorische Rolle zu spielen, indem sie IL-1 β , IL-12, IL-23, IFN- γ (Interferon- γ), TNF- α und IL-17 ausschütten (Shichita et al. 2009). Gleichzeitig werden ihnen B-Lymphozyten und regulatorische T-Zellen gegenübergestellt. Diese Zellen werden als protektiv betrachtet, und den von ihnen produzierten Zytokinen IL-4, IL-10 und TGF- β (transforming growth factor β) schreibt man antiinflammatorische Eigenschaften zu (Liesz et al. 2009, Xiong et al. 2011).

Zusammengefasst bedeutet dies, dass die immunologische Funktion jeder einzelnen Zellpopulation von Bedeutung sein kann, dass keine von ihnen definitiv als destruktiv oder protektiv eingestuft werden darf, und dass erst ihr Zusammenspiel und Gleichgewicht über das Ausmaß der Schädigung entscheiden.

1.3.1. $\gamma\delta$ -T-Zellen

In den letzten Jahren sind die unkonventionellen $\gamma\delta$ -T-Zellen zunehmend in den Mittelpunkt der immunologischen Forschung gerückt. Diese Population umfasst bis zu 5% der T-Lymphozyten und wird in der Literatur gesondert behandelt, da sie einerseits durch das Rearrangement der Antigen-Rezeptor-Gene dem adaptiven Immunsystem angehören, andererseits viele Eigenschaften mit den Zellen der angeborenen Immunabwehr gemeinsam haben. Der Rezeptor dieser Zellen besteht, wie der Name bereits verrät, aus einer γ - und einer δ -Kette und sie bedürfen keiner Antigen-Präsentation über MHC (major histocompatibility complex), da die Antigene direkt erkannt und somit schneller bekämpft werden können. Außerdem sind die $\gamma\delta$ -T-Zellen die einzigen bereits im fetalen Alter nachgewiesenen Immunzellen, die auch kurz nach der Geburt einen Schutz bieten, bevor sich die adaptive Immunität ausbildet (Vantourout und Hayday 2013).

Die $\gamma\delta$ -T-Zellen lassen sich durch diverse Zytokine und über TLR (toll-like-receptor) aktivieren und reagieren abhängig von ihrer vorherigen Antigen-Exposition: die antigen-naiven Zellen schütten eher IL-17 aus, während die antigen-geprägten Zellen IFN- γ produzieren (Jensen et al. 2008, Reynolds et al. 2012). Diese T-Zellpopulation ist in diverse immunologische Prozesse involviert – von den oberflächlichen Abwehrmechanismen der $\gamma\delta$ -T-Zellen im respiratorischen Epithel und in der Haut über autoimmune Reaktionen in chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen und Arthritis bis hin zur antitumoralen Aktivität (Sutton/Mielke et al. 2012).

Auf dem Gebiet der ZNS-Forschung (zentrales Nervensystem) wurde speziell im EAE-Tiermodell (experimental autoimmune encephalomyelitis) als Pendant zur MS (multiple Sklerose) die kritische Rolle der $\gamma\delta$ -T-Zellen mehrfach und kontrovers beschrieben. Einerseits wurden ihnen destruktive Eigenschaften zugeschrieben, andererseits auch protektiv Effekte nachgewiesen. In der Klinik ist diese Lymphozyten-Population bei den Patienten in den MS-Läsionen und im Liquor ebenfalls nachweisbar, jedoch nur bei akuten Schüben oder Neuerkrankungen, was darauf hinweist, dass $\gamma\delta$ -T-Zellen abhängig vom Krankheitsstadium unterschiedlich wirken (Mayo et al. 2012, Odyniec et al. 2004).

Auch bei diversen ischämischen Ereignissen ist die Rolle der $\gamma\delta$ -T-Zellen bereits beschrieben worden: diese Zellen sind beim akuten Nierenversagen sowie im Tiermodell der Leber-Ischämie vorhanden und scheinen für die Rekrutierung der neutrophilen Granulozyten verantwortlich zu sein (Hochegger et al. 2007, Kuboki et al. 2009). Des Weiteren konnte die kritische Bedeutung der $\gamma\delta$ -T-Zellen auch im Schlaganfallmodell (MCAO) demonstriert werden: hier wurde zum ersten Mal nachgewiesen, dass $\gamma\delta$ -T-Zellen – und nicht wie bisher spekuliert die Th17-Zellen – die Hauptproduzenten von IL-17 im Rahmen der ZNS-Ischämie sind. In den Experimenten fielen die Schlaganfälle und die neurologischen Defizite signifikant geringer aus, ebenso die absoluten Zahlen der $\gamma\delta$ -T-Zellen, wenn die Tiere mit FTY20 (Fingolimod), einem Inhibitor der Lymphozyteninfiltration, behandelt wurden. Analog waren die Daten in Versuchsreihen an TCR $\gamma\delta$ -defizienten (T-cell receptor) und an den mit anti-TCR $\gamma\delta$ -Antikörpern behandelten Mäusen, die deutlich weniger Immuzellinfiltration und Expression von proinflammatorischen Molekülen zeigten (Shichita et al. 2009).

1.4. Zytokine beim Schlaganfall

Während der Minderdurchblutung und der anschließenden Reperfusion sind die Zellen einem enormen Stress ausgesetzt, welcher die Genexpression verändert und zur Produktion und Ausschüttung von diversen Signalmolekülen, u.a. Zytokinen führt. Zytokine sind relativ kleine Proteine (8-25 kDa, Kilodalton), die von verschiedensten Zellen synthetisiert werden und andere Zellen in ihrer Funktion beeinflussen können.

Es gibt 5 Gruppen von Zytokinen (Murphy 2012):

- kolonie-stimulierende Faktoren (G-CSF, granulocyte colony stimulating factor ; GM-CSF, granulocyte-macrophage colony stimulating factor ; M-CSF, macrophage colony stimulating factor), die als hämatopoetische Wachstums- und Differenzierungsfaktoren fungieren;
- Interferone (IFN- α , IFN- β , IFN- γ), die meist MHC-Expression stimulieren und antiviral wirken;
- Interleukine (IL-1 bis IL-37), die hauptsächlich für die Interaktion der Leukozyten untereinander verantwortlich sind;

- Tumor-Nekrose Faktoren (TNF- α und andere), die zur Aktivierung anderer Immunzellen für Entzündungsreaktionen oder Apoptose/Tumornekrose dienen;
- andere Zytokine (TGF- β ; MIF, macrophage migration inhibitory factor), die unterschiedlich regulatorische und antiinflammatorische Prozesse einleiten.

Im Kontext des Schlaganfalls scheinen viele Zytokine an den entzündlichen Vorgängen beteiligt zu sein. Einerseits werden von den $\alpha\beta$ -T-Zellen große Mengen an IFN- γ ausgeschüttet. Gleichzeitig wird in den Makrophagen und den hirneigenen Immunzellen, Mikroglia – die Produktion von TNF- α erhöht und die $\gamma\delta$ -T-Zellen setzen das IL-17 frei. Auch das von Gliazellen und Neuronen produzierte IL-6 scheint proinflammatorische Signalwege einzuleiten (Lambertsen et al. 2012). Währenddessen werden auch antiinflammatorische Zytokine wie etwa IL-10 und TGF- β synthetisiert, wofür vorwiegend B-Lymphozyten und evtl. die regulatorischen T-Zellen verantwortlich sind.

In diversen das ZNS betreffenden Krankheitsbildern ist TNF- α eines der am besten untersuchten Zytokine. Es wird hauptsächlich von der Mikroglia, aber auch von Makrophagen und in geringen Mengen sogar von Neuronen und Astrozyten produziert. Bereits wenige Minuten bis Stunden nach dem Gefäßverschluss wird die Expression von TNF- α hochreguliert und persistiert für mindestens 24h nach dem ischämischen Ereignis. In dieser Zeit richtet TNF- α über seine Signalwege schon die ersten Schäden an: es induziert Nekrose und Apoptose, initiiert weitere Entzündungsausbreitung, trägt zum Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke und durch Hemmung der Glutamat-Wiederaufnahme zur Exzitotoxizität bei (Badiola et al. 2009, Zou und Crews 2005). Zusätzlich konnte in tierexperimentellen Studien gezeigt werden, dass die Applikation von TNF- α -neutralisierenden Antikörpern einen protektiven Effekt hat – die Schlaganfälle sind kleiner und die Tiere haben weniger neurologische Defizite (Hosomi et al. 2005). Dennoch haben einige Arbeitsgruppen nachgewiesen, dass TNF- α auch neuroprotektive Eigenschaften besitzen kann und zwar abhängig davon, über welchen seiner Rezeptoren und in welchem Hirnareal es wirkt (Lambertsen et al. 2009, McCoy und Tansey 2008).

Auch die Rolle von IL-1 β und sein biphasisches Konzentrationsmuster in der ZNS-Ischämie ist mittlerweile ausführlich beschrieben: dieses Zytokin wird genauso wie TNF- α sehr früh nach einem Schlaganfall (bereits in der ersten Stunde) hauptsächlich von Mikroglia und Makrophagen ausgeschüttet und zeigt einen zweiten Peak zwischen 6 und 24h nach Gefäßverschluss, welcher auf die Produktion durch die eingewanderten Immunzellen zurückgeführt wird (Wang et al. 2007). Ähnlich dem TNF- α , übt IL-1 β diverse destruktive Effekte aus: es induziert Ausschüttung von anderen proinflammatorischen Zytokinen, bewirkt stärkere Empfindlichkeit der Neurone gegenüber der Ischämie und höhere Durchlässigkeit des Endothels für Leukozyten, womit es ebenfalls für größere Infarkt volumina verantwortlich gemacht wird (Ceulemans et al. 2010). Diverse Studien mit den IL-1-Rezeptoren zeigten, dass die Anwendung von einem Rezeptorantagonisten (IL-1ra) oder ein knock-out des Rezeptors zu einer Verbesserung des Outcomes führten (Mulcahy et al. 2003). Diese Daten werfen wiederum die Frage nach den neuroprotektiven Eigenschaften von IL-1 β auf, da sein Antagonist IL-1ra auch endogen vorkommt und dessen Konzentration im Verlauf der Ischämie und Reperfusion durch IL-1 β erhöht werden kann.

Im Falle von IFN- γ konnte gezeigt werden, dass es unter normalen Bedingungen im Gehirn nicht nachweisbar ist, während es nach einem ischämischen Ereignis nicht nur lokal im ZNS, sondern auch systemisch frühzeitig hochreguliert wird. Des Weiteren gibt es zwei Hauptquellen von IFN- γ : NK-Zellen (natural killer cells) in den ersten Stunden nach dem Schlaganfall und T-Zellen später nach der Reperfusion (Liesz et al. 2009, Yilmaz/Arumugam et al. 2006). Gleichzeitig konnte dem IFN- γ bisher keine eindeutige Rolle im Rahmen der ischämischen Schädigung zugeschrieben werden – einerseits hatten IFN- γ -defiziente Mäuse genauso große Infarkte wie die Wildtyp-Tiere (Shichita et al. 2009), andererseits konnte eine andere Arbeitsgruppe durch eine Behandlung mit IFN- γ -neutralisierenden Antikörpern das Infarktvolumen signifikant reduzieren (Liesz et al. 2011).

Zur Bedeutung von IL-6 ist die Datenlage spärlich und die Ergebnisse sind teilweise kontrovers. Bereits kurz nach der Entdeckung dieses Zytokins, hat man festgestellt, dass es diametral unterschiedliche Funktionen haben kann:

Stimulation, aber auch Inhibierung des Zellwachstums sowie Induktion der Zelldifferenzierung. Im ZNS wird IL-6 überwiegend von Gliazellen und Neuronen produziert, sein Rezeptor ist ebenfalls auf zahlreichen Zellen zu finden, und im Kontext der ischämischen Schädigung scheint es abhängig vom Stadium unterschiedliche Effekte zu haben. Während der frühen Ischämie-Phase steuert dieses proinflammatorische Zytokin, welches nach dem Schlaganfall hochreguliert wird, das Zusammenspiel der hirneigenen Zellen mit dem Endothel und den Blutzellen und trägt somit zur Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke bei (Huang et al. 2006). Zu späteren Zeitpunkten schwenkt seine Funktion jedoch um, sodass IL-6 dann neuroprotektiv, regenerativ, neurotroph und angiogenetisch wirkt (Erta et al. 2012, Gertz et al. 2012, Suzuki et al. 2009).

Von den antiinflammatorisch wirkenden Zytokinen ist das IL-10 am besten charakterisiert. Es wird u.a. von Gliazellen synthetisiert und scheint die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- α und IL-1 zu unterdrücken sowie die Expression der Zytokinrezeptoren zu dämpfen. Tierexperimentell zeigte eine Behandlung mit IL-10 (als Gen-Transfer) im Rahmen des Schlaganfalls positive Ergebnisse hinsichtlich der Infarktgröße (Ooboshi et al. 2005). Des Weiteren wurde in einer Publikation zu IL-10-überexprimierenden Mäusen nachgewiesen, dass in diesen verglichen mit dem Wildtyp die Glukose-Transporter hochreguliert und antioxidative Prozesse gefördert wurden, was das Überleben von Neuronen deutlich besserte (de Bilbao et al. 2009). Lange Zeit ist man davon ausgegangen, dass beim Schlaganfall die regulatorischen T-Zellen die Hauptquelle von IL-10 darstellen (Liesz et al. 2009), wobei die neuesten Arbeiten gezeigt haben, dass auch die B-Zellen dieses wichtige antiinflammatorische Zytokin produzieren können (Ren/Akiyoshi et al. 2011).

Auch TGF- β wird nach einem ischämischen Ereignis vermehrt im ZNS nachgewiesen. Unter normalen Bedingungen wird es hauptsächlich von Gliazellen produziert, während nach einem Schlaganfall auch Makrophagen und Neuronen in der Penumbra dazu beitragen. TGF- β scheint ebenfalls neuroprotektiv zu wirken: die Überexpression von TGF- β (mittels Gen-Transfer) reduziert die Infarktgröße und die Expression von Entzündungsmediatoren (Pang et al. 2001), gleichzeitig spielt es eine wichtige Rolle bei Narbenbildung, Neuroregeneration und

Neoangiogenese (Ma et al. 2008). Zudem kann TGF- β die Apoptose der Neurone verhindern, d. h. es kann seine Wirkung in der Penumbra entfalten. Allerdings gibt es auch Daten zur Alzheimer-Demenz, die nachweisen, dass TGF- β die Produktion von β -Amyloiden fördert und somit das Auftreten von kognitiven Defiziten nach dem Schlaganfall erhöhen könnte (Dobolyi et al. 2012).

Neben den oben genannten wird auch IL-4 als antiinflammatorisches Zytokin betrachtet, da es die Differenzierung von naiven T-Zellen zu (überwiegend antiinflammatorischen) Th2-Zellen (T helper cells) induziert und gleichzeitig die Entwicklung der (eher proinflammatorischen) Th1-Zellen hemmt. Die bisher wenigen Daten zu diesem Zytokin demonstrieren, dass in IL-4-defizienten Mäusen größere Infarkt volumina nachweisbar sind, stärkere Mikrogliaaktivierung stattfindet und das Th1/Th2-Verhältnis gestört ist, was insgesamt für eine neuroprotektive Rolle von IL-4 spricht (Xiong et al. 2011). Andererseits brachte eine Behandlung mit IL-4 in den Tierexperimenten keinen zusätzlichen positiven Effekt, was für eine ausreichende endogene Regulation spricht, und auch im klinischen Alltag hat sich IL-4 nicht als Verlaufsp parameter bei Schlaganfallpatienten durchgesetzt (Vila et al. 2003).

1.4.1. IL-17

In der letzten Zeit ist das Zytokin IL-17 in Verbindung mit autoimmun-entzündlichen Krankheitsbildern gebracht worden und damit in den Mittelpunkt der immunologischen Forschung gerückt.

Die IL-17-Familie besteht aus 6 Mitgliedern, die unterschiedlich gut beschrieben sind (Iwakura et al. 2011):

- IL-17A (was meistens mit „IL-17“ gemeint ist) ist häufig in diverse Abwehrmechanismen und entzündliche Reaktionen verwickelt, da es die Genexpression von proinflammatorischen Zytokinen, Chemokinen, Adhäsionsmolekülen und anderen Entzündungsmediatoren induziert; es wird hauptsächlich von CD4⁺, $\gamma\delta$ - und NK-T-Zellen produziert und wirkt über 2 Rezeptoren, IL-17ra und IL-17rc, auf diverse Zellarten und ist für seine neutrophilen-rekrutierende Funktion bekannt;

- IL-17B ist wenig erforscht – die Hauptquelle scheinen Chondrozyten und Neuronen zu sein, während die Zielzellen Monozyten und Endothelzellen sind, in welchen über den Rezeptor IL-17rb die Expression von proinflammatorischen Zytokinen eingeleitet wird;
- IL-17C ist auch wenig charakterisiert worden, wobei man weiß, dass es vorwiegend von CD4+-T-Zellen, DCs (dendritic cells) und Makrophagen produziert wird und über den Rezeptor IL-17re auf den Monozyten ebenfalls zur Überexpression von proinflammatorischen Zytokinen führt;
- IL-17D, dessen Erforschung bisher die wenigsten Ergebnisse lieferte, wird anscheinend von CD4+-T-Zellen und B-Zellen hergestellt und hat die gleichen Funktionen wie die IL-17A, -B und -C, sein Rezeptor ist jedoch unbekannt;
- IL-17E (auch als IL-25 bezeichnet) wird von diversen Immun- und Epithelzellen produziert und wirkt über die Rezeptoren IL-17ra und IL-17rb auf Th1-, Th2-, und Th17-Zellen als Modulator von angeborener sowie erworbener Immunantwort und ist als einziges Mitglied der IL-17-Familie in die Eosinophilenrekrutierung involviert;
- IL-17F ist der molekularen Struktur nach dem IL-17A sehr ähnlich, wird in den gleichen Zellarten synthetisiert und wirkt über die gleichen Rezeptoren, wobei seine Funktionen wenig breit gefächert sind, und es hauptsächlich für die Abwehrmechanismen in den Schleimhäuten verantwortlich ist.

Bezüglich der Induktion von IL-17-Produktion ist mittlerweile bekannt, dass diese weitgehend auf die Wirkung von einem anderen Zytokin, IL-23 zurückzuführen ist. Dabei bedürfen konventionelle $\alpha\beta$ -T-Zellen (Th17) zusätzlich zu IL-23 einer kombinierten Stimulation mit IL-6 und IL-21 um IL-17 freizusetzen, während die unkonventionellen $\gamma\delta$ -T-Zellen lediglich IL-23 brauchen (Croxford et al. 2012). In der EAE wurde postuliert, dass den $\gamma\delta$ -T-Zellen in den entzündlichen Prozessen im ZNS eine wesentlich größere Rolle zukommt als bisher gedacht: sie werden von IL-23 und IL-1 ohne Beteiligung von T-Zell-Rezeptor zur Produktion von IL-21 und IL-17 angeregt, wobei Letzteres anschließend die $\alpha\beta$ -T-Zellen im Sinne eines positiven Feedbacks zur weiteren IL-17-Produktion stimuliert

(Sutton/Lalor et al. 2009). Gleichzeitig gibt es Daten, die belegen, dass bestimmte Subpopulationen von $\gamma\delta$ -T-Zellen keinen IL-23-Rezeptor exprimieren und somit auch unabhängig von IL23 aktiviert werden können (Korn und Petermann 2012).

Aus zahlreichen Vorarbeiten geht hervor, dass dem Zytokin IL-17 eine große Bedeutung im Rahmen der sterilen Inflammation beigemessen werden kann, wie sie bei einer I/R-Schädigung (Ischämie/Reperfusion) zu beobachten ist. In diversen Modellen der Ischämie und Reperfusion in anderen Organsystemen konnte die kritische Rolle von IL-17 nachgewiesen werden. Im Modell der renalen I/R-Schädigung wurden signifikant erhöhte Konzentrationen von IL-17 im Plasma und im Nierengewebe nachgewiesen und die Applikation von einem IL-17-Antikörper hatte zur Folge, dass nicht nur die Nierenfunktion sich verbesserte, sondern auch dass die Plasmaspiegel von proinflammatorischen Zytokinen abnahmen und die von antiinflammatorischen Zytokinen zunahm (Xue et al. 2011). Auch im Tiermodell des Myokardinfarktes wurden ähnliche Ergebnisse festgestellt – einerseits hatten IL-17-knock-out Mäuse kleinere Infarkte und bessere Herzleistung, gleichzeitig wurde nachgewiesen, dass IL-17 die Apoptose der Kardiomyozyten induziert, die Adhäsion der Leukozyten fördert, die Durchlässigkeit der Gefäßwand erhöht und somit zur Einwanderung von Immunzellen ins Gewebe beiträgt (Liao et al. 2012).

Über die Rolle von IL-17 im ZNS gibt es ebenfalls diverse Publikationen, die das proinflammatorische Potenzial dieses Zytokins hervorheben und seine Bedeutung in der entzündungsbedingten Gewebeschädigung betonen. In der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis, einem Tiermodell der Multiplen Sklerose, boten IL-17-defiziente Mäuse eine signifikante Suppression der Krankheitsprogression gegenüber den Wildtyp-Mäusen: es zeigten sich eine wesentliche Reduktion entzündlicher Läsionen, weniger Immunzellen im ZNS sowie niedrigere Konzentrationen von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen (Kang/Altuntas et al. 2010).

Auch im Schlaganfallmodell mit IL-17-knock-out-Mäusen wurde nachgewiesen, dass die Schlaganfallgröße und die neurologischen Defizite signifikant geringer ausfallen als in den Wildtyp-Kontrollen und die Expression von proinflammatorischen Substanzen in Abwesenheit von IL-17 deutlich sinkt. Wie bereits oben erwähnt, konnte gleichzeitig erstmals gezeigt werden, dass eine besondere Subpopulation von Lymphozyten, $\gamma\delta$ -T-Zellen, die Hauptproduzenten

von IL-17 nach ischämischen Ereignissen sind und dass $\gamma\delta$ -T-Zell-ko-Mäuse ebenfalls weniger Immunzellinfiltration und kleinere Infarkt volumina zeigen (Shichita et al. 2009). Zusätzlich wird postuliert, dass die oben genannten Prozesse im engen Zusammenhang mit der Regulation von weiteren Entzündungsmediatoren durch IL-17 stehen, wie etwa diversen Enzymen, die die Produktion von inflammatorischen Signalen katalysieren (ROS, reactive oxygen species; NO, nitric oxide, Stickstoffmonoxid; Prostaglandine etc.), sowie Proteinen, die Bestandteile der extrazellulären Matrix lysieren und damit die Blut-Hirn-Schranke zerstören können (Iwakura et al. 2011).

Dennoch bleibt es unklar, welche der vielen im ischämischen Schlaganfall beteiligten Zellpopulationen auf IL-17 reagiert und welche zellulären Mechanismen hinter der dadurch induzierten Entzündungsreaktion stehen. Aus den oben erwähnten Arbeiten geht hervor, dass die IL-17-induzierte Infiltration von neutrophilen Granulozyten für die sekundäre Schädigung verantwortlich ist, doch die Neutrophilen selbst exprimieren keinen IL-17-Rezeptor, sondern werden vielmehr über steigende Konzentrationen von Chemokinen ins Gewebe gelockt. Im Gehirn gibt es einige als Ziel von IL-17 in Frage kommende Zellpopulationen – unter Normalbedingungen sind auf der Oberfläche von Mikroglia und Astrozyten IL-17-Rezeptoren nachweisbar, während unter Stresskonditionen (z.B. Schlaganfall) auch Neurone, eingewanderte Lymphozyten sowie Makrophagen IL-17-Rezeptoren exprimieren (Kawanokuchi et al. 2008, Wang/Zhao et al. 2009).

Somit ist zwar eindeutig, dass die Rolle von IL-17 beim Schlaganfall nicht zu vernachlässigen ist, doch die genauen durch dieses Zytokin induzierten Kaskaden bleiben ungeklärt.

1.5. Chemokine beim Schlaganfall

Aktiviert durch die Zytokine, können diverse Zellpopulationen weitere Mediatoren freisetzen, sogenannte Chemokine, die chemoattraktiv wirken und somit eine zielgerichtete Wanderung der entsprechenden Zellen ins geschädigte Gewebe induzieren. Chemokine sind mit 8-14 kDa noch kleiner als Zytokine und entfalten ihren Effekt über einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor: das Zytoskelett der Zielzelle ändert sich und ermöglicht eine Zellmigration.

Es werden 3 Gruppen von Chemokinen unterschieden (Murphy 2012):

- CXCL-Chemokine CXCL1 bis CXCL16 (chemokine (C-X-C motif) ligand), die hauptsächlich neutrophile Granulozyten zum Wandern aktivieren;
- CCL-Chemokine CCL1 bis CCL28, die vorwiegend eine Migration von Monozyten und Lymphozyten induzieren;
- andere Chemokine wie XCL1, XCL2, CX3CL1 (chemokine (X-C motif) ligand, chemokine (C-X3-C motif) ligand), die auf diverse Zellpopulationen wirken können.

Die Rolle der Chemokine beim Schlaganfall ist erst in den letzten Jahren genauer untersucht worden, obwohl ihre Wirkung unter ischämischen Bedingungen in anderen Organen und bei einigen Erkrankungen des ZNS seit längerem bekannt ist. Zum Beispiel wurde im hepatischen Ischämie-Reperfusion-Modell nachgewiesen, dass die geschädigten Hepatozyten chemotaktische Signale produzieren, welche zur Extravasation von neutrophilen Granulozyten ins Parenchym führen und somit den Gewebeschaden zusätzlich ausweiten (Jaeschke 2006). Auch im Myokard wird durch die Ischämie und nachfolgende Reperfusion erhöhte Produktion von freien Sauerstoffradikalen, proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen registriert, die in einer Neutrophileninfiltration und weiterer Myokard-Schädigung resultiert (Chandrasekar et al. 2001). Andererseits wurde am renalen Ischämie-Reperfusion-Modell demonstriert, dass Chemokine nicht nur für die entzündlichen Prozesse durch Neutrophilenrekrutierung verantwortlich sind, sondern dass sie auch in einer späteren reparativen Phase hochreguliert werden und sich somit wahrscheinlich an Regeneration, Homöostase und Angiogenese beteiligen (Stroo et al. 2010).

Über die Rolle der Chemokine im ZNS gibt es mittlerweile zahlreiche Publikationen, die postulieren, dass nur wenige Chemokine konstitutiv in den ZNS-Zellen produziert werden, wobei unter pathologischen Bedingungen eine deutliche Hochregulation von vielen anderen Chemokinen zu verzeichnen ist. Außerdem sind ihre Funktionen wesentlich differenzierter als bislang angenommen: neben Einleitung proinflammatorischer Kaskaden gehören auch Modulation der synaptischen Aktivität sowie Migration von neuronalen Vorgängerzellen und gliale Proliferation zu den Effektorfunktionen von Chemokinen (Cartier/Hartley et al.

2005). Speziell in der EAE, wurden die Eigenschaften einzelner Chemokine detailliert charakterisiert und in 3 Gruppen unterteilt: 1) die für die Migration von Entzündungszellen in das ZNS verantwortlichen; 2) die die Migration regulatorischer Zellen induzierenden; und 3) die die Ausbreitung des inflammatorischen Schadens begrenzenden Chemokine (Hamann et al. 2008).

Im Rahmen der ZNS-Ischämie kommt den Chemokinen aus vielen Gründen eine besondere Bedeutung zu. In zahlreichen Arbeiten wurde gezeigt, dass sie über ihr chemoattraktives Verhalten eine Rekrutierung von Leukozyten und die Bildung von zellulären Aggregaten begünstigen und somit in die Plaque-Formation in den Gefäßwänden involviert sind (Legein et al. 2013). Des Weiteren wurde in diversen Publikationen die Rolle einzelner Chemokine spezifiziert: CCL2 und CCL5 sollen einerseits für den durch Monozyten und Makrophagen vermittelten Gewebeschaden verantwortlich sein, können aber andererseits die Migration von Stammzellen induzieren und in späteren Stadien zur Neurogenese beitragen. Auch für CXCL2 und CXCL12 mit ihren sowohl pro- als auch antiinflammatorischen Eigenschaften ist die Datenlage teilweise kontrovers (Mirabelli-Badenier et al. 2011).

Zusammengefasst lässt sich jedoch sagen, dass mit großer Wahrscheinlichkeit speziell die Vertreter der CXCL-Gruppe von großer Bedeutung sein könnten, da diese neutrophile Granulozyten anlocken, welche im Rahmen des sekundären Schadens nach dem Schlaganfall während der Reperfusion die zahlreichste Zellpopulation sind.

1.5.1. CXCL1

CXCL1 ist in der Literatur auch unter den Namen GRO α (growth regulated oncogene alpha), KC (keratinocyte-derived chemokine) oder MIP-2 (macrophage inflammatory protein-2) zu finden. Es gehört zu der Familie der CXCL-Chemokine, besteht also aus zwei Cysteinen, getrennt durch eine weitere Aminosäure, bindet an den Rezeptor CXCR2 und hat als Zielzellen hauptsächlich neutrophile Granulozyten.

Im Zusammenhang mit inflammatorischen Prozessen nach Ischämie und Reperfusion wird CXCL1 häufig als ein wichtiges chemoattraktives Molekül

erwähnt. Zum Beispiel konnte nachgewiesen werden, dass erhöhte Konzentrationen von IL-6 im Serum nach akutem Nierenversagen zu einer Überexpression von CXCL1 in der Lunge führen, was über Neutrophilenrekrutierung zusätzliche pulmonale Schäden bedingt (Ahuja et al. 2012). Auch im Ischämie-Reperfusion-Modell der Leber wurde durch Behandlung mit einem Zytokin, IL-37, die Expression von zahlreichen proinflammatorischen Substanzen unterdrückt, was eine eingeschränkte Infiltration von neutrophilen Granulozyten zu Folge hatte und in einer Reduktion der Gewebeschädigung resultierte (Sakai et al. 2012).

Zu der Rolle von CXCL1 im ZNS ist die Datenlage teilweise kontrovers. Es gibt Arbeiten über die EAE, in welchen die destruktive proinflammatorische Wirkung von CXCL1 postuliert wird, da es eine Gefäßadhäsion von Leukozyten und ihre Extravasation ins Hirngewebe fördert und damit die Entzündung aufrechterhält (Roy/Richard et al. 2012). Andererseits gibt es Publikationen, die demonstrieren, dass CXCL1 für die Remyelinisierung der Läsionen nach MS/EAE von entscheidender Bedeutung ist, da es die Migration und Proliferation der oligodendrozytären Vorläuferzellen positiv beeinflusst und somit neuroprotektiv wirkt (Omari et al. 2009). Im Tiermodell für Epilepsie wurde aber wiederum gezeigt, dass die zu Grunde gehenden Neuronen vermehrt CXCL1 sezernieren, was mit dem Grad der Neutrophileninfiltration ins Gehirn und dem sekundären Gewebeschaden übereinstimmte (Johnson et al. 2011).

Bezüglich der Funktion von CXCL1 beim Schlaganfall wurden bereits 2005 die ersten Daten im Rahmen klinischer Studien publiziert: es wurden erhöhte Liquorspiegel von CXCL1 bei den Schlaganfall-Patienten gemessen und es wurde eine positive Korrelation mit der Hirninfarktgröße im CT (computed tomography) festgestellt (Losy et al. 2005). Weiterhin wurde in einer Arbeit, die das MCAO-Modell nutzte, postuliert, dass unter ischämischen Bedingungen und zusätzlicher IL-1-Stimulation (als Nachahmung einer systemischen Infektion) zahlreiche proinflammatorische Signalwege eingeleitet werden, unter anderem die Hochregulation von CXCL1 und CXCL2, welche die Neutrophileninfiltration induziert und das neurologische Outcome verschlechtert (McColl et al. 2007). In einer weiteren Publikation wurde sogar von einer frühen peripheren Immunreaktion nach MCAO berichtet: CXCL1-Konzentrationen in Plasma, Leber und Lunge waren bereits 4h nach der Ischämie an ihrem Maximum, während der

ZNS-Spiegel erst nach 24h seinen Peak erreichte und die Neutrophileneinwanderung eine ähnliche Kinetik zeigte (Chapman et al. 2009).

Dennoch ist die genaue Quelle von CXCL1 beim Schlaganfall nicht definitiv bekannt und der Zusammenhang mit den übrigen inflammatorischen Kaskaden unklar.

2. Materialien und Methoden

2.1. Tiere

Alle Experimente an Tieren wurden durch die Behörde für Lebensmittelsicherheit und Veterinärwesen genehmigt und unter Einhaltung der entsprechenden Richtlinien durchgeführt.

C57BL/6 und immundefiziente *Rag1*^{-/-} Mäuse (recombination activating gene) wurden von der The Jackson Laboratory bezogen.

$\gamma\delta$ -T-Zell-defiziente *Tcrd*^{-/-} Mäuse (aus The Jackson Laboratory) wurden freundlicherweise von Dr. Immo Prinz (Medizinische Hochschule Hannover) zur Verfügung gestellt.

IL-17-Rezeptor-A-defiziente *IL17ra*^{-/-} Mäuse wurden von Amgen bezogen.

2.2. Zellkultur

2.2.1. Primäre Mischkultur aus Astrozyten und Mikroglia

P1-2 (postnatal day 1-2) Mäuse (C57BL/6, männlich) wurden dekapitiert, die Gehirne freipräpariert und in eine 60mm Petri-Schale mit kalten 1xHBSS (Hank's Balanced Salt Solution) / 10mM-HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure) (Gibco/Invitrogen, #14025; Gibco/Invitrogen, #15630) auf Eis transferiert. Die Hemisphären wurden unter einem Auflichtmikroskop voneinander getrennt und die Meningen, das Cerebellum, die Bulbi olfactorii sowie das Mittelhirn abpräpariert. Jede Hemisphäre wurde zerteilt und weiter unter der sterilen Werkbank verarbeitet.

Die Gehirne wurden mit einer 10 ml Pipette in ein 15 ml Falcon überführt und 1 min mit 300 g bei RT (Raumtemperatur) herunterzentrifugiert. Nachdem der Überstand abgenommen und das Gewebe erneut in etwa 10 ml HBSS / 10mM-HEPES resuspendiert wurde, folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt für 1 min mit 300 g bei RT. Der Überstand wurde verworfen und das Gewebe in 5 ml Verdauungslösung, HBSS/10mM HEPES + 0,5 mg/ml Papain + 10 μ g/ml DNase (Sigma, #P4762; Roche, #11284932001), resuspendiert und im Wasserbad bei

37°C für 25 min geschüttelt. Anschließend wurde die Suspension 5 min lang mit 300 g bei RT herunterzentrifugiert, der Überstand abgegossen und das Gewebe in mind. 5 ml vorgewärmten Medium, BME (Basal Medium Eagle) + 10% FCS (fetal calf serum) + 0,5% P/S (Penicillin/Streptomycin) (Gibco/Invitrogen, #41010; Gibco/Invitrogen, #10270; Invitrogen, #15140-122) aufgenommen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (5 min, 300 g, RT) wurde der Überstand erneut verworfen, das Pellet in 2 ml Medium resuspendiert und mit feuerpolierten Pasteurpipetten (3 unterschiedliche Größen) vereinzelt. Anschließend wurde die Suspension durch ein 70 µm Zellfilter transferiert und mit Medium nachgewaschen. Die Zellkonzentration wurde nach 1:10 Verdünnung in Trypanblau (Sigma, #T8154) in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt, ggf. angepasst, sodass die endgültige Zellkonzentration bei 300.000 Zellen/ml lag. Die Zellen wurden in 75-cm²-Zellkulturflaschen ausgesät und das Medium alle 5 Tage gewechselt (3 ml altes Medium wurden entnommen und 5 ml frisches Medium hinzugegeben).

2.2.2. Aufreinigung der Mikroglia aus der primären glialen Mischkultur

Für die einzelnen Versuche wurden die Mikroglia und die Astrozyten aus der ursprünglichen Mischzellkultur nach etwa 24-28 Tagen voneinander getrennt und die beiden Zellpopulationen einzeln ausplattiert. Hierzu wurden die Kulturen nach der besagten Zeit für 2-3 h auf einem Rotationsschüttler mit 600-700 rpm (rounds per minute) bei 37°C geschüttelt.

Die Mikroglia lösten sich hierbei ab und konnten mit dem Medium abgenommen werden. Dieses wurde 10 min lang mit 300 g bei RT herunterzentrifugiert, der Überstand wurde 2:1 mit frischem Medium vermischt und für die einzelnen Zellkulturen weiterverwendet. Das Pellet wurde in 1ml Medium resuspendiert, die Zellkonzentration wurde nach 1:10 Verdünnung in Trypanblau in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt, auf eine Zellkonzentration von 200.000 Zellen/ml gebracht und in 48-well-Zellkulturplatten ausgesät.

Die Astrozyten wurden nach 2-3 Tagen „Ruhepause“ wie folgt abtrypsiniert: die Kulturen wurden 2 mal mit etwa 10 ml vorgewärmten PBS (phosphate buffered saline) (Invitrogen, #14190) gewaschen und vollständig abgesaugt, anschließend

wurden 2 ml 0,05% Trypsin-EDTA (Ethylendiamin-tetraacetat) (Invitrogen, #25300062) pro 75 cm²-Flask hinzugegeben, sorgfältig verteilt und für 2-3 min im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Nachdem die Zellkulturflaschen per Hand leicht geschüttelt wurden und viele Zellen sich bereits abgelöst haben, wurden die restlichen adhären Zellen mit einer 1ml Eppendorf-Pipette wiederholt heruntergewaschen und vereinzelt. Nach einer Kontrolle der Zellablösung unterm Mikroskop wurde die Zellsuspension in ein Falcon mit etwa 5 ml vorgelegtem vorgewärmten Medium transferiert. Nach einem Zentrifugationsschritt für 10 min mit 300 g bei RT wurde der Überstand verworfen, das Pellet in 2 ml Medium resuspendiert und wenn nötig mit feuerpolierten Pasteurpipetten (3 unterschiedliche Größen) vereinzelt. Anschließend wurde die Suspension mit Medium aufgefüllt, die Zellkonzentration nach 1:10 Verdünnung in Trypanblau in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und ggf. angepasst, sodass die endgültige Zellkonzentration bei 2.000.000 Zellen/ml für TNF- α /IL-17-Stimulationsversuche und bei 500.000 Zellen/ml für Actinomycin D-Versuche lag.

2.3. Versuche mit OGD (Oxygen-Glucose-Deprivation)

Als ein *in vitro* Paradigma der Ischämie wurde das OGD-Modell an Astrozyten im 6-Well-Format angewandt. Hierfür wurden zwei Puffer angefertigt: beide entsprachen der Zusammensetzung des Extrazellularraumes, unterschieden sich jedoch im Glukose- und Sauerstoffgehalt. Der Locke's-Puffer (NaCl 154mM; KCl 5.6mM; NaHCO₃ 3.6mM; HEPES, 5.0; pH 7.4.) für Kontrollen enthielt 10mM Glukose und der Locke's-Puffer für OGD enthielt keine Glukose und wurde zusätzlich etwa 5 min mit 95% N₂ und 5% CO₂ begast.

Das konditionierte Medium wurde abgenommen und aufbewahrt, während die Zellen mit jeweils 2 ml vorgewärmten 1xPBS und dem entsprechenden vorgewärmten Puffer gewaschen wurden. Anschließend folgte eine Zugabe von 2 ml des korrespondierenden Puffers und eine Aufbewahrung der Kontroll-Proben im Inkubator, während die OGD-Proben ohne Deckel in die OGD-Kammer mit einer wassergefüllten Petrischale platziert, 10 min lang begast und anschließend ebenfalls in den Inkubator gestellt wurden.

Nach Ablauf der gewünschten Zeit (3.5 h) wurden die Puffer abgenommen und weggefroren und die Zellen jeweils mit vorgewärmten 1xPBS und Medium gewaschen. Danach wurde konditioniertes Medium 1:1 vermisch mit frischem Medium auf die Zellen gegeben und für 24 h belassen. Am nächsten Tag wurden die Zellüberstände abgenommen und weggefroren, während aus den Zellen die Gesamt-RNA (ribonucleic acid) isoliert wurde.

2.4. Stimmulations- und Inhibitionsversuche

2.4.1. Stimulation mit TNF- α und IL-17

Die einzelnen Zellpopulationen wurden in dem vorgegebenen Format neu ausplattiert und nach einer Erholungszeit von 24 h für Mikroglia und 48-72 h für Astrozyten mit 10 ng/ml TNF- α (R&D Systems, #410MT) und mit 10 bzw. 100 ng/ml IL-17 (R&D Systems, #421ML) 24 h lang stimuliert.

2.4.2. Inhibition mit Actinomycin D

Um den natürlichen Zerfall der RNA zu quantifizieren, wurde eine Versuchsreihe mit Transkriptionsstopp und der darauffolgenden Genexpressionsmessung zu 4 unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführt. Hierfür wurden die 24 h lang mit TNF- α (10 ng/ml) und IL-17 (10 bzw. 100 ng/ml) stimulierten Astrozyten anschließend mit 5 μ g/ml Actinomycin D (R&D Systems, #1229/10) behandelt, um die durch die Stimulation angeregte Transkription zu unterbinden. Actinomycin D ist ein Peptidprodukt von Bakterien, Streptomyceten und hat eine zytostatische Wirkung, welche durch Interkalation der DNA (deoxyribonucleic acid) entfaltet wird, wodurch keine mRNA-Bildung (messenger RNA) und somit auch keine Proteinsynthese mehr möglich ist.

Die Gesamt-RNA wurde zu folgenden Zeiten isoliert: 0 min (sofort), 45 min, 90 min und 180 min – und weiter genauso wie die restlichen Proben behandelt (cDNA-Synthese (complementary DNA), RT-qPCR-Analyse (real-time quantitative polymerase chain reaction)).

2.5. Molekularbiologische Techniken

2.5.1. RNA-Isolation aus Astrozyten

Für die RNA-Isolation aus Astrozyten wurde der RNeasy Mini Kit (Qiagen, # 74104) benutzt und das beigelegte Protokoll angewendet.

Nach dem Abnehmen der Zellüberstände wurden die Zellen 2 Mal mit 1xPBS gewaschen. Um die Zellen vom Wellboden zu lösen, wurden 350 µl RLT-Puffer pro Well hinzugefügt und mehrmals sorgfältig pipettiert bis die Suspension zähflüssig wurde. Dann wurde diese auf die QIA-Shredder Säule (Qiagen, #79654) gegeben und 2 min lang bei 14000 rpm zentrifugiert. Zum Durchfluss wurde gleiches Volumen 70%-iges Ethanol (Merck, #1.08543.0250) hinzugegeben, gut durchs Pipettieren vermischt, auf die RNeasy Säule gegeben und 15 s bei 8000 g (=10000 rpm) zentrifugiert. Weiter wurde ausschließlich mit der Säule gearbeitet: es wurden 700 µl RW1-Puffer hinzugeben und 15 s bei 8000 g zentrifugiert. Nachdem der Durchfluss verworfen wurde, folgten 2 Waschschrte mit jeweils 500 µl RPE-Puffer, wobei das erste Mal 15 s lang bei 8000 g und das zweite Mal 2 min lang bei 8000 g zentrifugiert wurde.

Danach wurde der Filter in ein frisches 1,5-ml-Eppendorfgefäß platziert und die RNA wie folgt eluiert: nach Zugabe von 30 µl RNase freies Wasser und 1 min Inkubation bei RT wurde 1 min lang bei 8000g zentrifugiert und dieser Schritt wurde noch 2 Mal wiederholt. Die fertig eluierte RNA wurde entweder sofort weggefroren oder direkt in cDNA umgeschrieben.

2.5.2. RNA-Isolation aus Mikroglia

Für die RNA-Isolation aus der Mikroglia wurde TRIzol Reagent (Invitrogen, #15596-026) benutzt und das vom Hersteller beigelegt Protokoll befolgt.

Nach dem Abnehmen der Zellüberstände wurden die Zellen 2 Mal mit 1xPBS gewaschen. Um die Zellen aufzulösen, wurden 200 µl TRIzol Reagent pro Well hinzugefügt und mehrmals sorgfältig pipettiert, bis die Suspension leicht trüb wurde. Nach 5 min Inkubation bei RT wurden 40 µl Chlorophorm (Sigma, #C2432) hinzugefügt und 15-20 s kräftig per Hand geschüttelt. Nach weiteren 2-3 min

Inkubation wurden die Proben bei 12000 g 15 min lang bei 2-8 °C zentrifugiert. Die wässrige durchsichtige Phase wurde vorsichtig und möglichst vollständig in ein frisches Eppendorfgefäß überführt und nach Zugabe von 100 µl Isopropanol (Sigma, #59304) für 10 min bei RT inkubiert. Darauf folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt mit 12000 g für 10 min bei 2-8 °C.

Nach dem Verwerfen des Überstandes wurden das Pellet 1 Mal mit etwa 1 ml 70% Ethanol und ein weiteres Mal mit etwa 1 ml 80% Ethanol jeweils gevortext und mit 7500 g für 5 min bei 2-8°C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand möglichst schnell und vollständig abgekippt und das Pellet luftgetrocknet. Trockenes RNA-Pellet wurde in 25 µl RNase-freiem Wasser (Thermo Scientific, #R0581) aufgelöst. Die fertige RNA wurde entweder sofort weggefroren oder direkt in cDNA umgeschrieben.

2.5.3. RNA-Isolation aus dem Gehirn

Für die RNA-Isolation aus dem Gehirn wurde TRIzol Reagent benutzt und das vom Hersteller beigelegte Protokoll befolgt.

Die Tiere wurden 1 Tag nach der MCAO mit Isofluran anästhesiert; nach Sistieren der Atmung, fehlender Reaktion auf Schmerzreize und zervikaler Dislokation wurden die Gehirne entnommen, von den Bulbi olfactorii und den Cerebella getrennt, in linke (ipsilesional) und rechte (kontralesional) Hemisphäre geteilt, gewogen und in TRIzol Reagent (1ml pro 100mg Gewebe) mithilfe des „Potter-Elvehjem tissue grinder“ auf Eis homogenisiert (3 Mal á 10 s mit 1 min Pause dazwischen).

Es folgte ein Inkubationsschritt für 5 min bei RT. Danach wurde zum Homogenisat 0.2ml Chlorophorm pro 1ml TRIzol Reagent hinzugefügt, 15 s lang manuell geschüttelt und erneut 3 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit 12000 g für 15 min bei 4°C zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde vorsichtig und möglichst vollständig in ein frisches Eppendorfgefäß überführt. Dann wurde die RNA präzipitiert, indem 500 µl Isopropanol pro 1ml TRIzol Reagent zugegeben wurden und für 10 min bei RT inkubiert. Darauf folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt mit 12000 g für 10 min bei 4°C.

Nach dem Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet mit etwa 1 ml 75% Ethanol auf dem Vortex gemischt und mit 7500 g für 5 min bei 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand möglichst schnell und vollständig abgekippt und das Pellet luftgetrocknet. Trockenes RNA-Pellet wurde in TE-Puffer resuspendiert und ggf. in cDNA umgeschrieben.

2.5.4. cDNA-Synthese aus der isolierten RNA

Der RNA-Gehalt der Proben wurde am NanoDrop bestimmt, um die gleiche Menge von RNA für die cDNA-Synthese zu benutzen. Für die Transkription wurde das Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR (Thermo Scientific, #K1642) verwendet. Pro Reaktion wurden 4 µl Reaktionsmix (Puffer, Nukleotid-Mischung etc.), 2 µl Enzym (Reverse Transkriptase) sowie eine entsprechende Menge von RNA (1300 ng pro Reaktion) eingesetzt, wobei die Mischung mit RNase-freiem Wasser auf 20 µl aufgefüllt wurde.

Das Reverse-Transkription-Programm des PCR-Cycler hatte folgende Spezifikationen: 10 min Inkubation bei 25°C, 30 min reverse Transkription bei 50°C, 5 min Inaktivierung der reversen Transkriptase bei 85°C und ein anschließendes abkühlen auf 4°C.

2.5.5. Real-Time Polymerase-Chain-Reaction

Die fertig synthetisierte cDNA wurde 1:10 in RNase-freiem Wasser vorverdünnt und jeweils 9 µl pro Bedingung eingesetzt. Die Sonden wurden 1:11 im Reaktionsmix angesetzt und jeweils 11 µl pro Well pipettiert.

Die RT-qPCR wurde am StepOne Gerät von Applied Biosystems durchgeführt und für die Bestimmung der Genexpression der einzelnen Chemokine und Zytokine – die $\Delta\Delta CT$ -Methode mit β -Actin als house-keeping-Gen angewandt.

Sonden:

Gen	Bestell-Nr.
CCL2	Mm00441242_m1

CCL20	Mm00444228_m1
Cox-2	Mm00478374_m1
CXCL1	Mm00433859_m1
CXCL2	Mm00436450_m1
G-CSF	Mm00438334_m1
IL-17ra	Mm00434214_m1
IL-17rc	Mm00661861_m1
IL-6	Mm00446190_m1
iNOS	Mm00440502_m1
MMP13	Mm00439491_m1
MMP3	Mm00440295_m1
β-Actin	Mm00607939_s1

(Cox-2, Cyclooxygenase-2; iNOS, induzierbare Stickstoffmonoxid Synthetase; MMP, matrix metalloproteinase)

2.5.6. Proteinbestimmung in den Zellüberständen mittels ELISA

Die Proteinkonzentration der einzelnen Chemokine und Zytokine in den Zellüberständen nach 24 h Stimulation mit TNF- α und IL-17 wurde mit Hilfe von ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) bestimmt. Hierfür wurden folgende Kits benutzt und die Versuche laut den Vorschriften des Herstellers durchgeführt: CCL-2 (BD Biosciences, #555260), IL-6 (BD Biosciences, #555240), CXCL-1 (R&D Systems, #DY453) und G-CSF (R&D Systems, #DY414).

2.5.6.1. ELISA für CCL-2 und IL-6

Eine Flachbodenplatte wurde am Tag vor dem Versuch mit 100 μ l Capture Antibody in Coating Buffer bei 4°C beschichtet und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Platte 3 Mal mit 300 μ l Wash Buffer (0.05% Tween-20 (Roth, #9127.2) in PBS) gewaschen und mit 200 μ l Assay Diluent (10% FBS in PBS) für 1 h bei RT geblockt. Währenddessen wurden die Zellüberständen

vorsichtig auf Eis aufgetaut und entsprechend verdünnt (CCL-2 1:100 und IL-6 1:5).

Nach dem Blockschrift wurde die Platte erneut 3 Mal mit 300 µl Wash Buffer gewaschen und anschließend mit je 100 µl der Standardreihe und der einzelnen vorverdünnten Proben bestückt und 2 h bei RT inkubiert. Darauf folgte ein weiterer Waschschrift: 5 Mal mit 300 µl Wash Buffer. Danach wurde die Platte mit 100 µl Working Detector (Detection Antibody im Assay Diluent) für 1h bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Platte erneut 7 Mal mit 300 µl Wash Buffer gewaschen und mit 100 µl Substrate Solution, 1:1 Tetramethylbenzidine und Hydrogen Peroxide (BD Biosciences, #555214), für 30 min bei RT in der Dunkelheit belassen. Die Reaktion wurde mit 50 µl Stop Solution, 1 M H₃PO₄ (Merck, #1.00563.1000) gestoppt und die Absorption bei 450 nm mit einer Wellenlängenreferenz bei 570 nm gemessen.

2.5.6.2. ELISA für CXCL-1 und G-CSF

Eine Flachbodenplatte wurde am Tag vor dem Versuch mit 100 µl Capture Antibody in 1xPBS bei RT beschichtet und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Platte 3 Mal mit 300 µl Wash Buffer gewaschen und mit 300 µl Reagent Diluent (1% BSA, bovine serum albumine in PBS) für 1 h bei RT geblockt. Währenddessen wurden die Zellüberständen vorsichtig auf Eis aufgetaut und entsprechend verdünnt (CXCL-1 1:30 und G-CSF unverdünnt).

Nach dem Blockschrift wurde die Platte erneut 3 Mal mit 300 µl Wash Buffer gewaschen und anschließend mit je 100 µl der Standardreihe und der einzelnen vorverdünnten Proben bestückt und 2 h bei RT inkubiert. Darauf folgte ein weiterer Waschschrift: 3 Mal mit 300 µl Wash Buffer. Danach wurde die Platte mit 100 µl Detection Antibody im Reagent Diluent für 2h bei RT inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift 3 Mal mit 300 µl Wash Buffer wurde die Platte mit 100 µl of Streptavidin-HRP im Reagent Diluent für 20 min bei RT belassen. Darauf folgend wurde die Platte erneut 3 Mal mit 300 µl Wash Buffer gewaschen und mit 100 µl Substrate Solution (1:1 Tetramethylbenzidine und Hydrogen Peroxide) für 30 min bei RT in der Dunkelheit inkubiert. Die Reaktion wurde mit 50 µl Stop Solution, 2 N

H₂SO₄ (Sigma, #35276) gestoppt und die Absorption bei 450 nm mit einer Wellenlängenreferenz bei 570 nm gemessen.

2.6. Immunhistochemie

Um die Reinheit der gespaltenen Kulturen einzuschätzen, wurde für jeden Versuch eine Immunfärbung der entsprechenden Astrozyten bzw. Mikroglia angefertigt und beurteilt. Hierfür wurden 24-mm-Coverslips in eine 24-Well-Platte hineingelegt und mit 200 µl Poly-L-Lysin (Sigma, #P4832) 2-3h lang inkubiert. Unmittelbar vor dem Ausplattieren der Zellen wurde Poly-L-Lysin abgesaugt und die Coverslips mit Medium gewaschen.

Die auf Coverslips ausplattierten Zellen wurden über 24h (Mikroglia) bzw. 48-72h (Astrozyten) inkubiert und nach Erreichen der Konfluenz einer Fixierung und Färbung unterzogen. Das Medium wurde abgenommen und die Coverslips vorsichtig mit vorgewärmtem 1xPBS gewaschen. Die Zellen wurden mit 200-300 µl 4% PFA (Paraformaldehyd) (Electron Microscopy Sciences, #15713-S) für 12 min fixiert und nachdem dieses abgenommen wurde, mit 200-300 µl 0.2% Triton (Fluka, #93443) für 4 min permeabilisiert. Es folgte ein Blockschritt mit Block Solution, 3% BSA/PBS + 2% NGS (normal goat serum) (Invitrogen, #16210-064) für mind. 30 min. Danach wurden die Coverslips auf einen Tropfen Erstantikörper auf Parafilm platziert und bei 4°C über Nacht stehen gelassen: GFAP (glial fibrillary acidic protein) (BD Biosciences, #556327) mit 1:500, Iba1 (Ionized calcium-binding adapter molecule 1) (Wako, #019-19741) mit 1:400 Verdünnung in Block Solution.

Am nächsten Tag wurden die Coverslips erneut in die 24-Well-Platte gelegt und – nach 3-maligem jeweils 5-minütigem Waschen mit etwa 1 ml PBS – für 3-5 h bei RT in der Dunkelheit mit dem Zweitantikörper bestückt: Alexa 488 (Invitrogen, #A11001) oder Alexa 568 (Invitrogen, #A11004) mit 1:2000 Verdünnung in PBS.

Nach Abnahme der Zweitantikörper und zweimaligem Waschen mit etwa 1ml PBS, wurde auf die Coverslips DAPI (Diamidinophenylindol) (Sigma, #D8417) mit 1:1000 Verdünnung in PBS für 5 min hinzugegeben. Nach erneutem Waschen wie oben beschrieben sind die Coverslips in einen Tropfen Fluoromount (Biozol

Diagnostica, #SBA-0100-01) auf dem Objektträger gelegt und die Ränder versiegelt worden.

2.7. *in vivo* Schlaganfallmodell (tMCAO)

Für die Durchführung der Operation (temporary middle cerebral artery occlusion) wurden 12 Wochen alte und 20-25g schwere männliche C57BL/6 Mäuse genommen. Die Anästhesie wurde mit Isofluran (Abbott, #B506) 1-2% v/v in Sauerstoff und die Analgesie mit Buprenorphin (Reckitt Benckiser, Temgesic®) intraperitoneal 0.03mg pro kg Körpergewicht alle 12h für 24h nach dem Eingriff durchgeführt.

Die tMCAO wurde durch die Einführung eines 6-0 Nylon Filaments in die A. cerebri media für eine Stunde induziert und der Verschluss der A. cerebri media mittels transkraniellem Laser-Doppler kontrolliert. Die Filamente wurden präpariert, indem die distalen Enden auf einen Durchmesser von 0.2–0.22 mm durch Thermokoagulation präpariert wurden. Im Rahmen der Prozedur wurde initial die linke Bifurkation der A. carotis communis über eine zervikale Mittellinieninzision dargestellt. Im nächsten Schritt wurden die proximale A. carotis externa und die A. carotis interna mit einem 5-0 Seidenfaden ligiert. Anschließend wurde nach einer Inzision das Filament in die A. carotis externa eingebracht und nach Eröffnung der Ligatur über der A. carotis interna nach distal vorgeschoben, so dass es im Bereich der Bifurkation der A. cerebri media sowie A. cerebri anterior zum Liegen kam. Hierdurch wurde ein Verschluss der A. cerebri media erreicht. Nach einer Stunde wurde das Filament entfernt, die A. carotis externa wurde verschlossen und die Reperfusion wurde mittels Wiedereröffnung der proximalen Ligatur über der A. carotis communis erreicht.

Als Kontrolle dienten sham-Mäuse (nach einer Scheinoperation): dabei wurden im gleichen Vorgehen die Gefäße dargestellt, allerdings erfolgte weder eine Unterbindung des Blutflusses noch eine Einführung des Filaments.

Alle Tiere wurden postoperativ täglich bis zum Ende des Versuches gewogen und hinsichtlich des neurologischen Defizite auf einer Skala von 0 bis 5 eingestuft (0 – kein Defizit, 1 – präferentielle Drehung zu einer Seite, 2 – Kreiseln, 3 – Rollen um die eigene Körperachse, 4 – keine Bewegung, 5 – Tod).

2.8. Statistische Auswertung

Versuche mit mehreren Gruppen zu einem Zeitpunkt wurden mit one-way ANOVA (analysis of variance) und Bonferroni post-hoc Test analysiert.

Versuche mit mehreren Gruppen und mehreren Zeitpunkten wurden erst für jeden einzelnen Zeitpunkt mit t-Test und anschließend aufeinander bezogen mit one-way ANOVA und Bonferroni post-hoc Test analysiert.

Die Daten werden als Mittelwert plus/minus Standardabweichung dargestellt.

Das Signifikanz-Niveau wurde folgendermaßen eingestuft:

- ns nicht signifikant
- * $p < 0.05$
- ** $p < 0.01$
- *** $p < 0.001$

3. Ergebnisse

Da die Vorarbeiten unserer und anderer Gruppen darauf hinweisen, dass die neutrophilen Granulozyten einen großen Teil der einwandernden Immunzellen nach einer zerebralen Ischämie darstellen, haben wir die Frage nach den Mechanismen der Neutrophileneinwanderung gestellt. Hier sind Chemokine von besonderem Interesse, sodass wir nach sorgfältiger Recherche unsere Auswahl schließlich eingrenzen konnten und einige Kandidaten (s.u.) ausgesucht haben.

Von den genannten Zellpopulationen im Gehirn haben wir uns auf die Untersuchung der Mikroglia und Astrozyten beschränkt, da die ersteren die einzigen hirneigenen Immunzellen sind und die letzteren die am zahlreichsten vertretene Zellart ist.

Somit wurde die Genexpression von den Chemokinen CXCL1, CXCL2, CCL2 und CCL20, von den Zytokinen G-CSF und IL-6 und von einigen Enzymen (MMPs, iNOS und COX-2) in den untersuchten Zellen (Mikroglia und/oder Astrozyten) zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Stimulation mit TNF- α und/oder IL-17 gemessen.

Da die einzelnen Zellpopulation *in vitro* getrennt untersucht werden sollten und dafür die Astrozyten und die Mikroglia aus den Mischkulturen voneinander getrennt werden mussten, haben wir als Erstes die Reinheit der jeweiligen Kultur beurteilt (s. Abbildung 1). Es konnte eine nahezu 100% Reinheit der Mikroglia erreicht werden, während die Astrozytenkulturen durch einzelne trotz Abschütteln haftende Mikroglia eine Reinheit von ca. 92% aufwiesen.

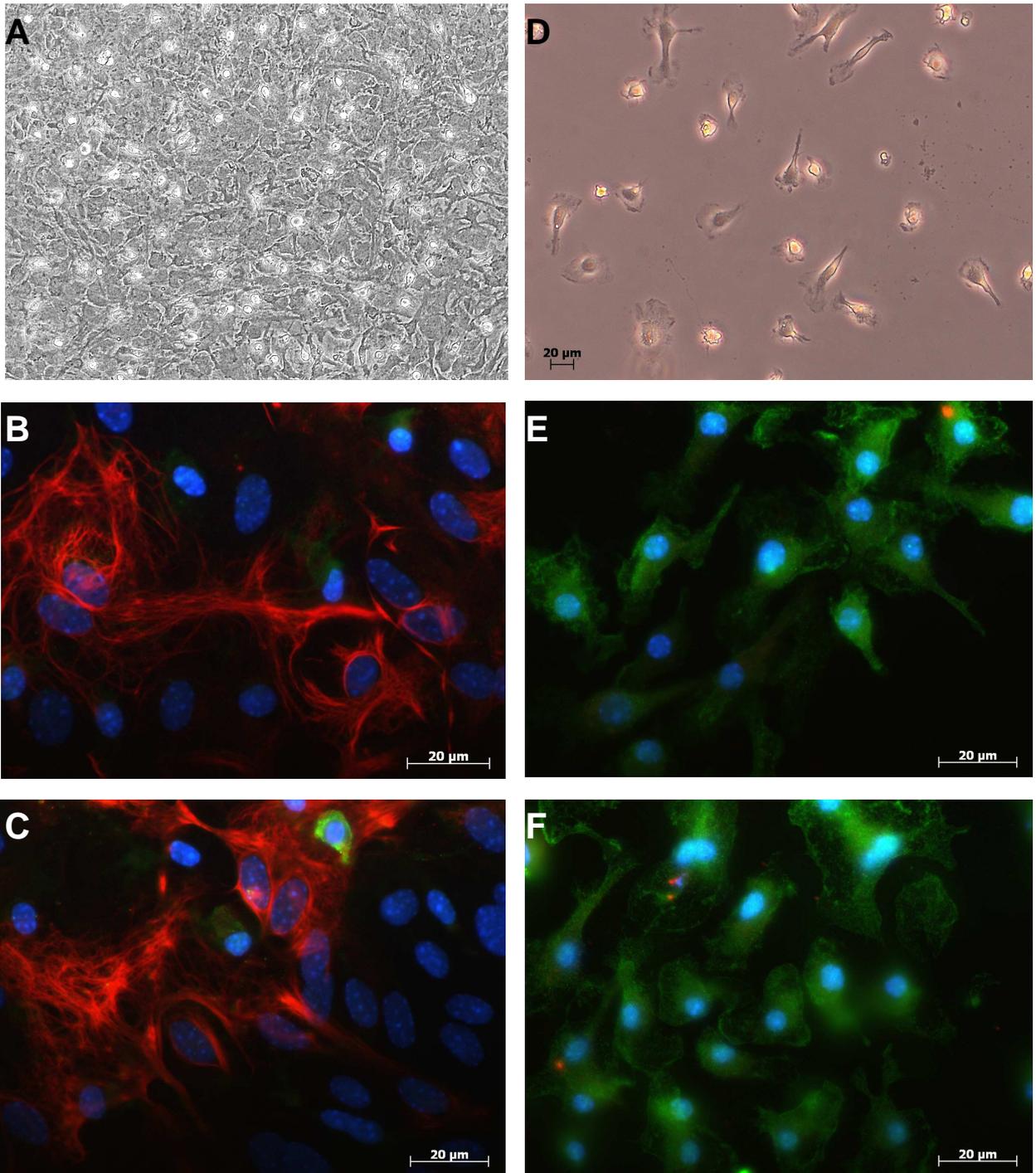


Abbildung 1: **A** aufgereinigte (mittels Trypsin) Astrozyten, **B** und **C** immunhistochemische Färbung der aufgereinigten Astrozyten mit minimaler Kontamination durch Mikroglia. **D** aufgereinigte (mittels Schüttler) Mikroglia, **E** und **F** immunhistochemische Färbung der aufgereinigten Mikroglia ohne Kontamination durch Astrozyten. Für die Astrozyten (rot) wurde Alexa Fluor 568 und für die Mikroglia (grün) – Alexa Fluor 488 benutzt, Zellkerne (blau) sind mit DAPI gefärbt.

3.1. Mikroglia: keine signifikante Genregulation nach IL-17-Gabe

Als erstes wurde die Mikroglia mit IL-17 in zwei unterschiedlichen Konzentrationen (10 und 100 ng/ml) behandelt, sowie die alleinige Gabe von TNF- α (10 ng/ml) als auch kombinierte Gabe von TNF- α mit IL-17 angewandt.

Die Genexpression von CXCL1, CCL2 und IL-6 in Mikroglia zeigte keine signifikanten Änderungen – weder nach alleiniger Gabe von TNF- α bzw. IL-17 noch nach kombinierter Gabe von TNF- α und IL-17 (s. Abbildung 2).

Diese Ergebnisse ließen uns vermuten, dass die Mikroglia in unserem Modell mit großer Wahrscheinlichkeit keine kritische Rolle bei der Expression von Chemokinen als Antwort auf Zytokinstimulation spielen.

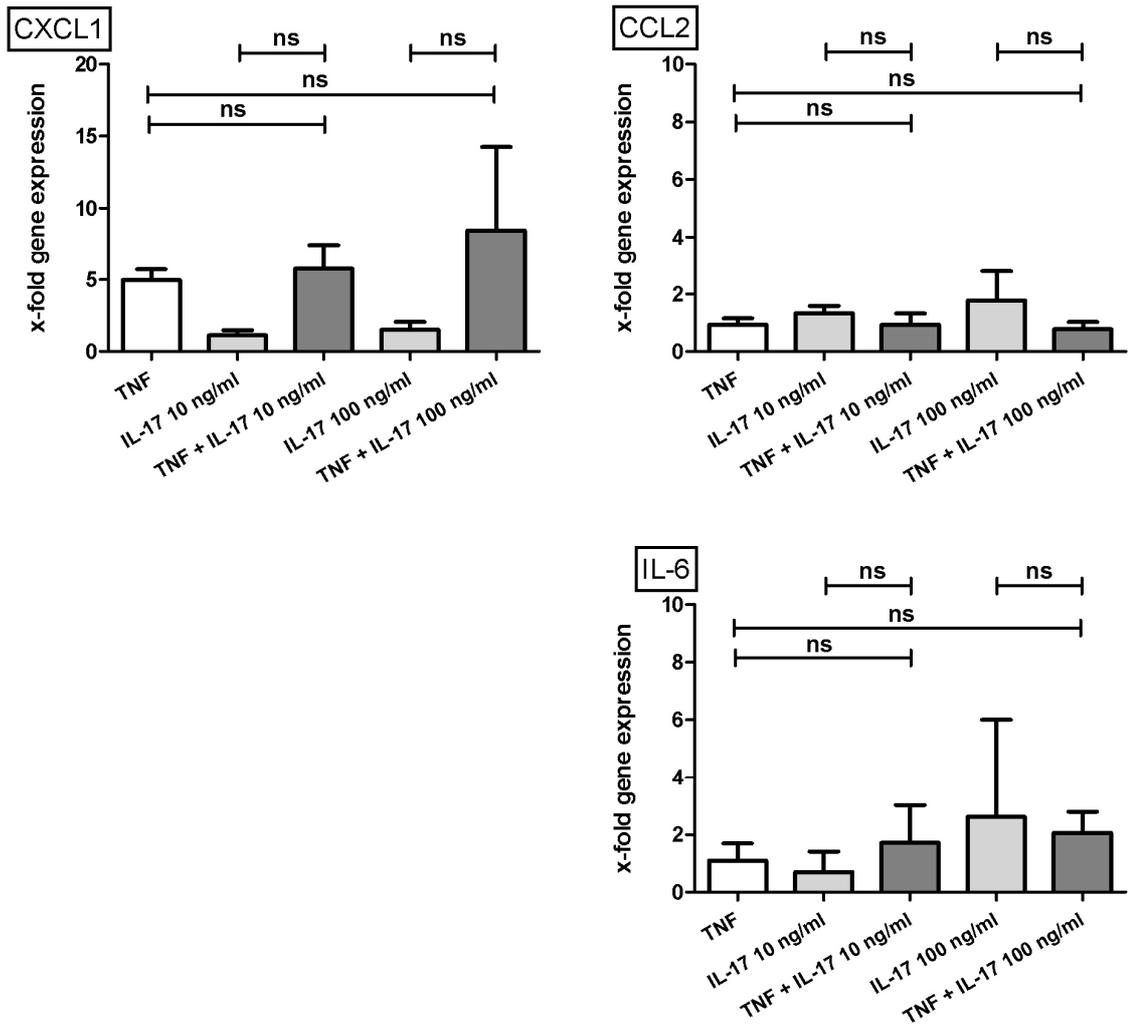


Abbildung 2: Genexpression von CXCL1, CCL2 und IL-6 in Mikroglia nach 24h Stimulation mit TNF- α (10ng/ml) alleine, mit IL-17 (10 ng/ml und 100ng/ml) alleine oder beiden Zytokinen zusammen. Es sind Daten von 3 unabhängigen Experimenten mit Mittelwerten \pm Standardabweichung abgebildet. Zur Übersichtlichkeit ist die Bedingung „Kontrolle“, welche definitionsgemäß 1 ist, weggelassen worden. Der Effekt von IL-17-Zugabe auf die Genexpression wurde mit one-way ANOVA und Bonferroni post-hoc test analysiert. ^{ns} $p > 0.05$

3.2. Astrozyten: keine signifikante Regulation unter Ischämie-Simulation

Als nächstes fokussierten wir uns auf die Astrozyten und führten eine Reihe von Schlaganfallsimulationsversuchen (OGD) durch, um die Reaktion dieser Zellpopulation auf den Mangel von Sauerstoff und Glukose zu untersuchen. Hierfür wurden die Zellen unter 3 Bedingungen inkubiert: 3.5h nur mit OGD, 24h nur mit IL-17 10 ng/ml oder einer Kombination aus beiden Bedingungen (3.5 h OGD und anschließend 24 h mit IL-17 10 ng/ml).

Die Genexpression von CXCL1, CCL2, G-CSF und IL-6 in Astrozyten zeigte keine signifikanten Änderungen – weder nach alleiniger Gabe von IL-17 noch nach kombinierter Anwendung von OGD und IL-17 (s. Abbildung 3).

Diese Ergebnisse legen nahe, dass weder der Sauerstoff- und Glukoseentzug alleine noch assoziiert mit anschließender Gabe von IL-17 ein ausreichender Stimulus für die Chemokin- und Zytokinproduktion in dieser Zellpopulation ist.

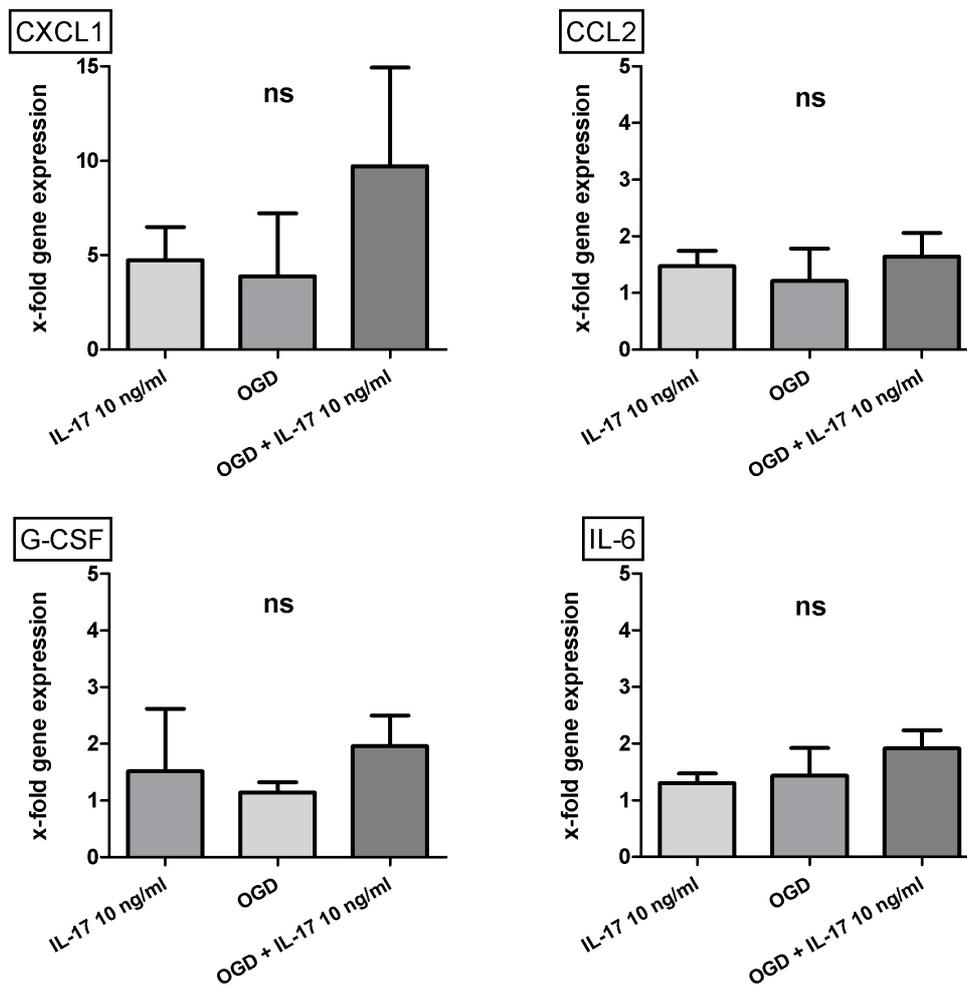


Abbildung 3: Genexpression von CXCL1, CCL2, G-CSF und IL-6 in den Astrozyten unter alleinigem 3.5h-Sauerstoff-Glukose-Entzug (OGD), unter alleiniger 24h-Stimulation mit IL-17 (10ng/ml) und unter Kombination der beiden Bedingungen. Es sind Daten von 3 unabhängigen Experimenten mit Mittelwerten \pm Standardabweichung abgebildet. Zur Übersichtlichkeit ist die Bedingung „Kontrolle“, welche definitionsgemäß 1 ist, weggelassen worden. Der Effekt von IL-17-Zugabe auf die Genexpression wurde mit one-way ANOVA und Bonferroni post-hoc test analysiert. ^{ns} $p > 0.05$

3.3. Astrozyten: synergistischer Effekt von TNF- α und IL-17

Im Folgenden haben wir die Stimulation mit einem weiteren wichtigen proinflammatorischen Zytokin in die Versuche mit einbezogen und die Astrozyten mit IL-17 in unterschiedlichen Konzentrationen (10 und 100 ng/ml) behandelt, sowie die alleinige Gabe von TNF- α (10 ng/ml) als auch kombinierte Gabe von TNF- α mit IL-17 angewandt.

Die Genexpression von allen untersuchten Zytokinen und Chemokinen (CXCL1, CXCL2, CCL2, CCL20, G-CSF und IL-6) in Astrozyten zeigte keine signifikanten Änderungen nach IL-17-Gabe, während TNF- α einen unterschiedlich hohen aber signifikanten Anstieg der Genexpression aller Kandidaten zur Folge hatte. Bei der kombinierten Stimulation mit TNF- α und IL-17 beobachteten wir schließlich einen stark potenzierenden Effekt auf die Genexpression von CXCL1, G-CSF und IL-6, während CXCL2, CCL2 und CCL20 nach dem Zusatz von IL-17 unverändert blieben. Die Wirkung von IL-17 in Kombination mit TNF- α ließ sich dabei nicht auf die einfache Addition von den einzelnen TNF- α - und IL-17-Effekten zurückführen – die Genexpression veränderte sich mehrfach (s. Abbildung 4).

Diese Ergebnisse ließen uns schlussfolgern, dass sowie TNF- α als auch IL-17 alleine nur schwache Stimuli für die Chemokin- und Zytokinproduktion darstellen, jedoch ihre Kombination die Genexpression einiger Kandidaten zu multiplizieren scheint.

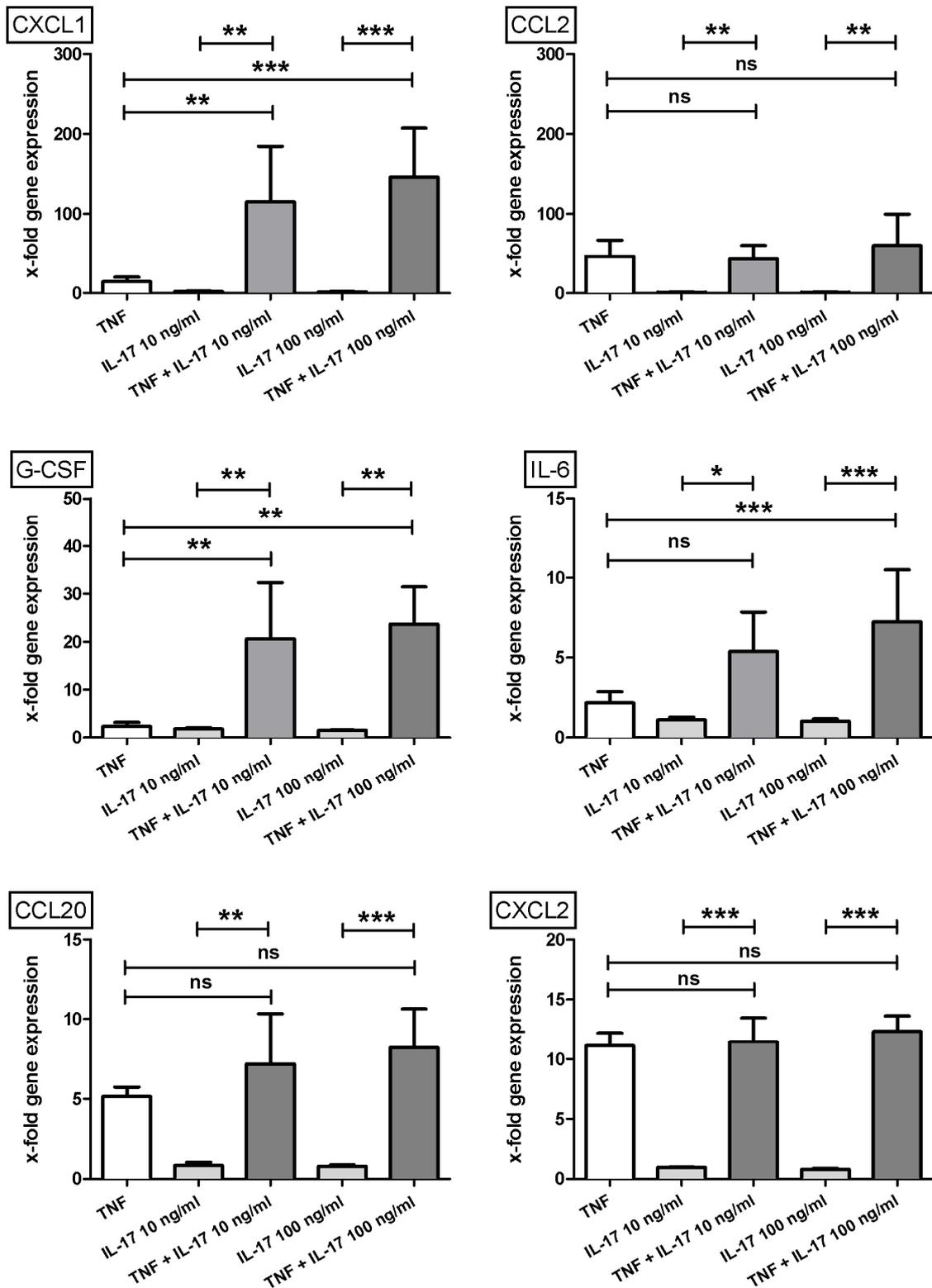


Abbildung 4: Genexpression von CXCL1, CCL2, G-CSF, IL-6, CCL20 und CXCL2 in Astrozyten nach 24h Stimulation mit TNF- α (10ng/ml) alleine, mit IL-17 (10 ng/ml und 100ng/ml) alleine oder beiden Substanzen zusammen. Es sind Daten von 4 unabhängigen Experimenten mit Mittelwerten \pm Standardabweichung abgebildet. Zur Übersichtlichkeit wurde die Bedingung „Kontrolle“, welche definitionsgemäß gleich 1 ist, weggelassen. Der Effekt von IL-17-Zugabe auf die Genexpression wurde mit one-way ANOVA und Bonferroni post-hoc test analysiert. ^{ns} $p > 0.05$ * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$

3.4. Astrozyten: Regulation der IL-17-Rezeptoren

Als Nächstes galt auszuschließen, dass der potenzierende Effekt von IL-17 auf die Genexpression durch die Hochregulation der IL-17-Rezeptoren nach Stimulation mit TNF- α und/oder IL-17 zustande kommt. Hierfür bestimmten wir die Genexpression für die beiden Rezeptortypen – IL-17RA und IL-17RC – an die IL-17 potenziell binden könnte.

Die Niveaus von IL-17RA und IL-17RC zeigten keine signifikanten Änderungen, weder nach alleiniger Gabe von TNF- α oder IL-17 noch nach deren Kombination (s. Abbildung 5).

Dieser Befund ließ uns darauf schließen, dass die von uns durchgeführte Stimulation an sich keine Hochregulation der IL-17-Rezeptoren verursacht und die potenzierende Wirkung von IL-17 somit auf einer anderen Ebene stattfindet.

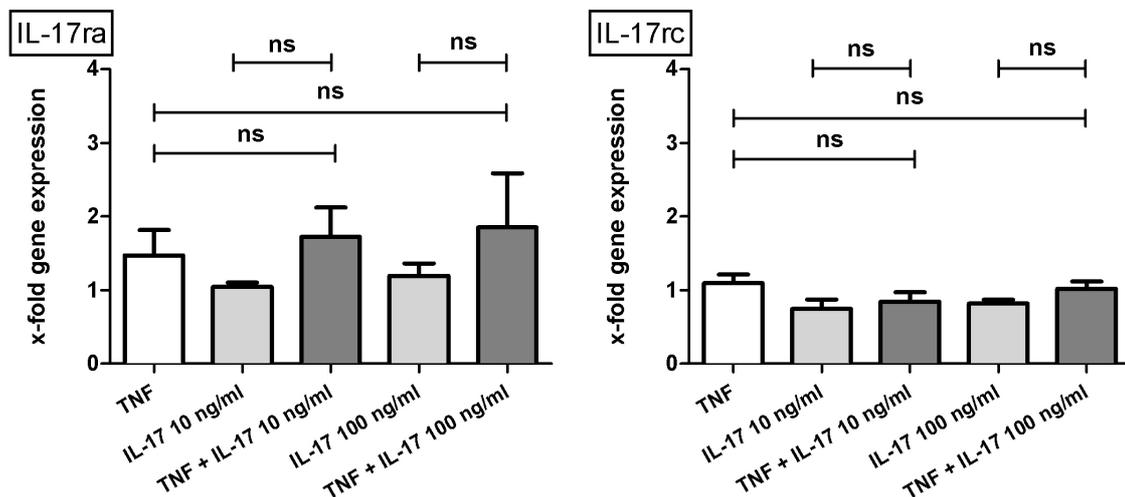


Abbildung 5: Genexpression von IL-17 Rezeptoren IL-17ra und IL-17rc in Astrozyten 24h nach Stimulation mit TNF- α (10ng/ml) alleine, mit IL-17 (10 ng/ml und 100ng/ml) alleine oder beiden Zytokinen zusammen. Es sind Daten von 3 unabhängigen Experimenten mit Mittelwerten \pm Standardabweichung abgebildet. Zur Übersichtlichkeit wurde die Bedingung „Kontrolle“, welche definitionsgemäß gleich 1 ist, weggelassen. Der Effekt von IL-17-Zugabe auf die Genexpression wurde mit one-way ANOVA und Bonferroni post-hoc test analysiert. ^{ns} $p>0.05$

3.5. Astrozyten: Synergismus von TNF- α und IL-17 auf Proteinebene

Des Weiteren haben wir untersucht, ob die erhöhte Expression auf mRNA-Ebene auch auf Proteinebene eine Änderung bewirkt, und die Konzentration der jeweiligen Chemokine/Zytokine in den Überständen der stimulierten Zellen mit Hilfe von ELISA gemessen. Auch hier konnten wir nur eine geringe Zunahme der Konzentration von CXCL1, IL-6, G-CSF und CCL-2 bei alleiniger Stimulation mit IL-17 oder TNF- α verzeichnen, während eine gleichzeitige Stimulation mit beiden Substanzen in einer starken Erhöhung der Konzentration speziell von CXCL1 resultierte, während dieser Effekt bei den anderen Chemokinen/Zytokinen nicht signifikant war oder ganz ausblieb (s. Abbildung 6).

Genauso wie auf der RNA-Ebene zeigte sich auf Proteinebene kein signifikanter Unterschied zwischen der niedrigen (10ng/ml) und der hohen (100ng/ml) Konzentrationen von IL-17.

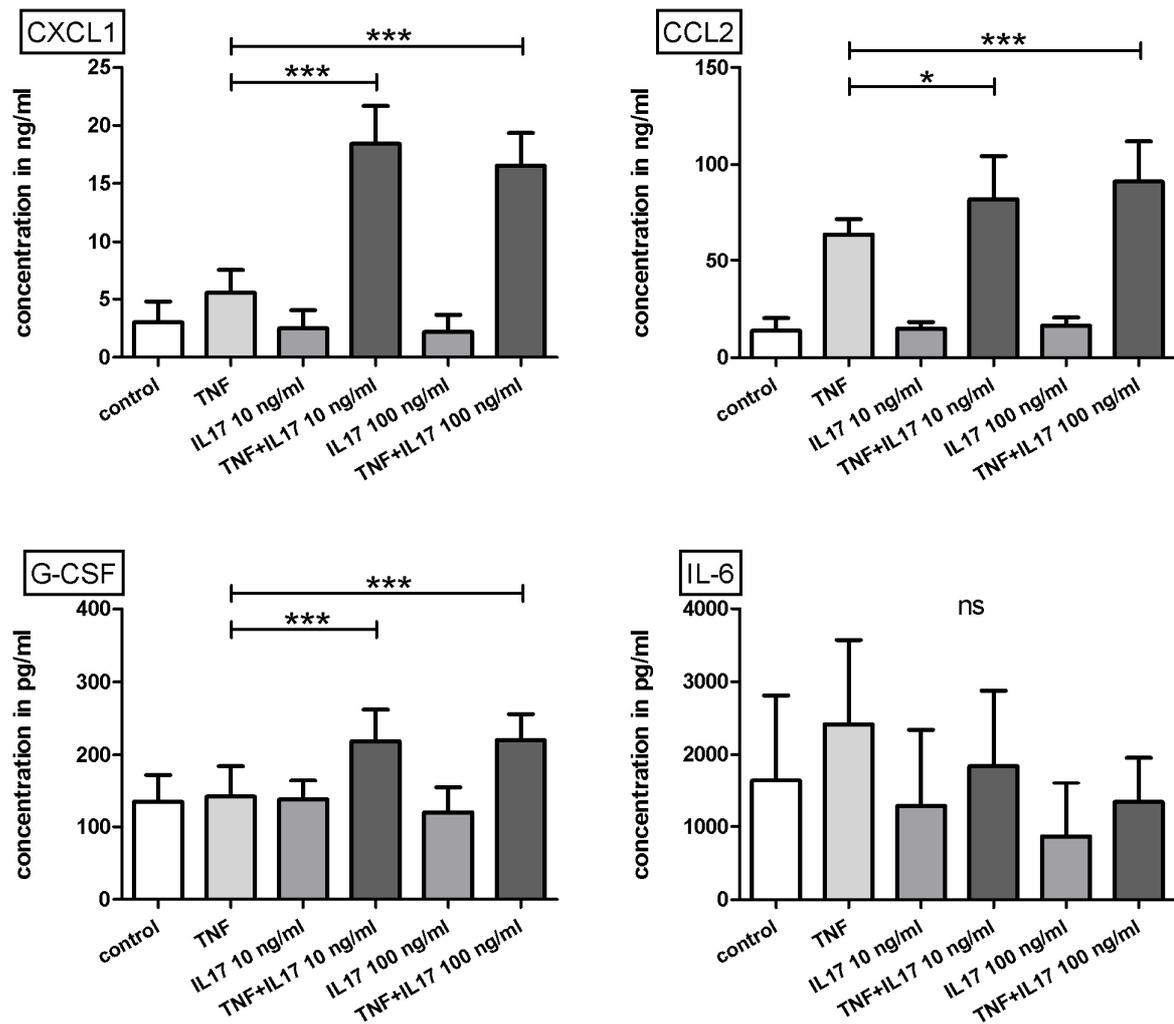


Abbildung 6: Konzentration des jeweiligen Proteins (CXCL1, CCL2, G-CSF und IL-6) in den Überständen der Astrozyten 24h nach Stimulation mit TNF- α (10ng/ml) alleine, mit IL-17 (10 ng/ml und 100ng/ml) alleine oder beiden Substanzen zusammen. Es sind Daten von 3 unabhängigen Experimenten mit Mittelwerten \pm Standardabweichung abgebildet. Der Effekt von IL-17-Zugabe auf die Genexpression wurde mit one-way ANOVA und Bonferroni post-hoc test analysiert. ^{ns} $p > 0.05$ * $p < 0.05$ *** $p < 0.001$

3.6. Astrozyten: zeitliche Dynamik der Genexpression

In unseren oben beschriebenen Versuchen haben wir eine deutliche Erhöhung der Genexpression bestimmter Gene 24h nach simultaner Stimulation mit TNF- α und IL-17 gesehen. Da die Ausschüttung der Zytokine nach einem Gewebeschaden im Rahmen eines Schlaganfalls jedoch innerhalb weniger Stunden anfängt, lag es nahe, den genauen zeitlichen Verlauf der Genexpression zu untersuchen, um zu analysieren, ob es bereits in den ersten Stunden nach einer zerebralen Ischämie zu einer Induktion der mRNA Expression kommt.

Hierfür haben wir, wie bereits beschrieben, Astrozyten mit TNF- α (10ng/ml) und IL-17 (100ng/ml) stimuliert und die Expression der chemotaktisch wirkenden Substanzen zu folgenden Zeitpunkten auf mRNA-Ebene gemessen: 1.5h, 3h, 6h und 24h.

In diesen Experimenten beobachteten wir, dass die CXCL1- und CXCL2-mRNAs bereits nach 1.5h Stimulation ein Maximum der Expression erreichen. In der Folge fielen die Expressionsniveaus kontinuierlich ab. Bei CCL2 und CCL20 war diese Dynamik weniger ausgeprägt: die mRNA-Expression wird zwar früh gesteigert, hält dann jedoch auf ungefähr gleichem Niveau über 3 bis 6 Stunden an. Gleichzeitig konnten wir nach wie vor einen signifikanten Unterschied bei der Expression von CXCL1 zwischen den alleine mit TNF- α und den mit TNF- α plus IL-17 stimulierten Astrozyten sehen, während die IL-17-Zugabe keinen signifikanten Effekt auf die Expression von CXCL2, CCL2 und CCL20 feststellen ließ (s. Abbildung 7).

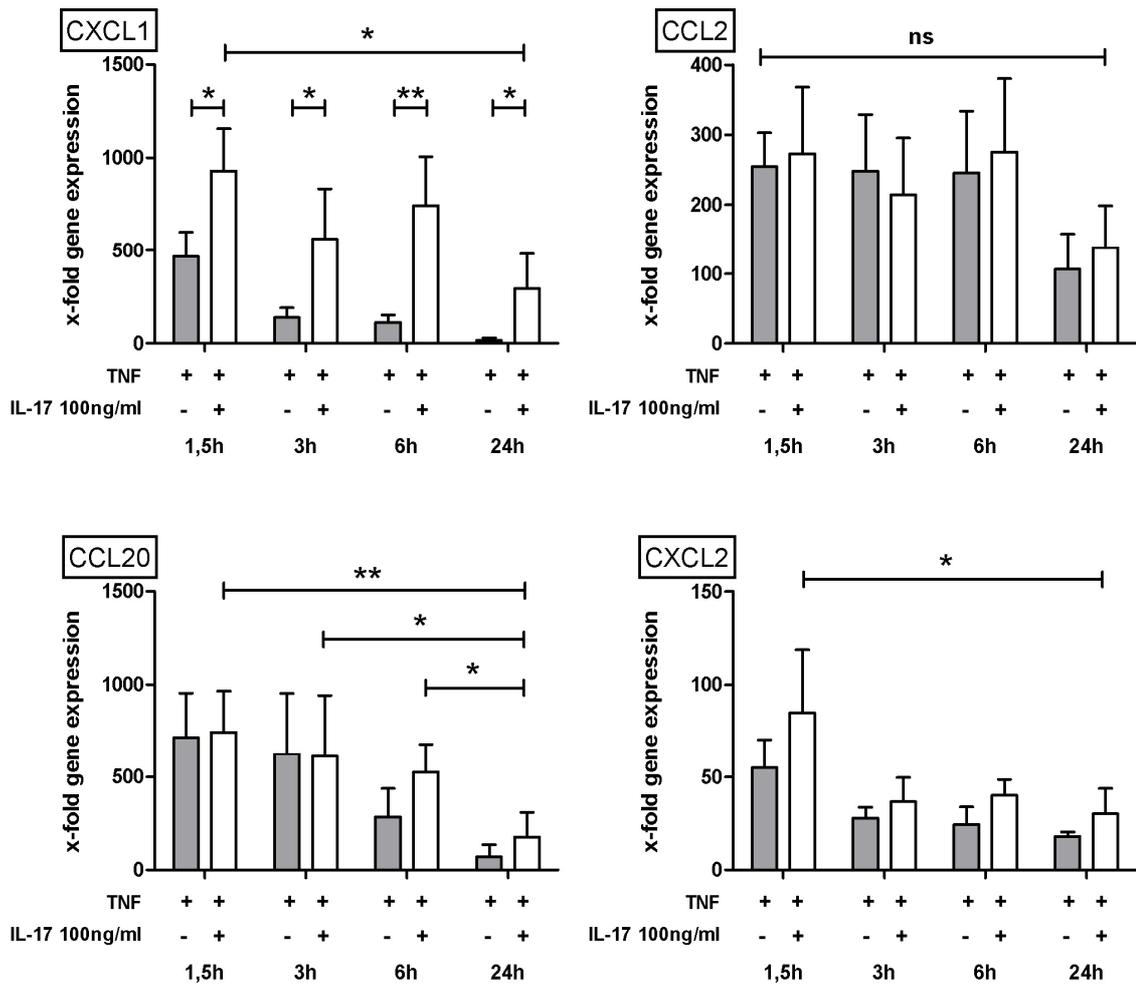


Abbildung 7: Relative mRNA-Expressionsniveaus von CXCL1, CCL2, CCL20 und CXCL2 jeweils 1,5, 3, 6 und 24h nach Stimulation mit TNF- α alleine oder in Kombination mit IL-17 (100ng/ml). Es sind Daten von 4 unabhängigen Experimenten mit Mittelwerten \pm Standardabweichung abgebildet. Der zeitliche Verlauf wurde mit one-way ANOVA und Bonferroni post-hoc test analysiert. Der Effekt von IL-17-Zugabe auf die Genexpression zu den einzelnen Zeitpunkten wurde mit dem t-test analysiert. ^{ns} $p > 0.05$ * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$

3.7. Astrozyten: IL-17 verlangsamt RNA-Degradierung durch Stabilisation

Da einige Literaturquellen auf einen stabilisierenden Effekt von IL-17 auf die RNA hinweisen, haben wir die folgende Versuchsreihe durchgeführt: die Transkription wurde durch Zugabe von Actinomycin D gestoppt und die Genexpression anschließend in unterschiedlichen Zeitabständen gemessen (0, 45, 90 und 180 min).

Für CXCL1 konnte unter alleiniger TNF- α -Stimulation ein rascher Abfall des mRNA-Niveaus nachgewiesen werden, was einem schnellen mRNA-Abbau entspricht. Währenddessen hatte die kombinierte Gabe von TNF- α und IL-17 zur Folge, dass die mRNA-Degradierung signifikant verlangsamt wurde: bereits nach 45 min ist der Unterschied deutlich (60 % verbleibende mRNA unter TNF- α -Stimulation vs. 95 % unter TNF- α +IL-17-Stimulation), aber auch nach 90 und 180 min blieb der Effekt offensichtlich und hoch signifikant (90 min: 40 % vs. 80 %, 180 min: 45 % vs. 10 %). Gleichzeitig konnten keine vergleichbaren Effekte für CCL-2 gezeigt werden: hier hatte IL-17 keine signifikant stabilisierende Wirkung auf die mRNA-Degradierung und die beiden Abbau-Kurven verliefen parallel zueinander (s. Abbildung 8).

Diese Ergebnisse ließen uns postulieren, dass der amplifizierende Effekt von IL-17 auf die Genexpression in den TNF- α -stimulierten Astrozyten auf der Eigenschaft von IL-17 beruht, einzelne Chemokin- und Zytokin-mRNAs zu stabilisieren und somit die Expression dieser Moleküle zu verstärken.

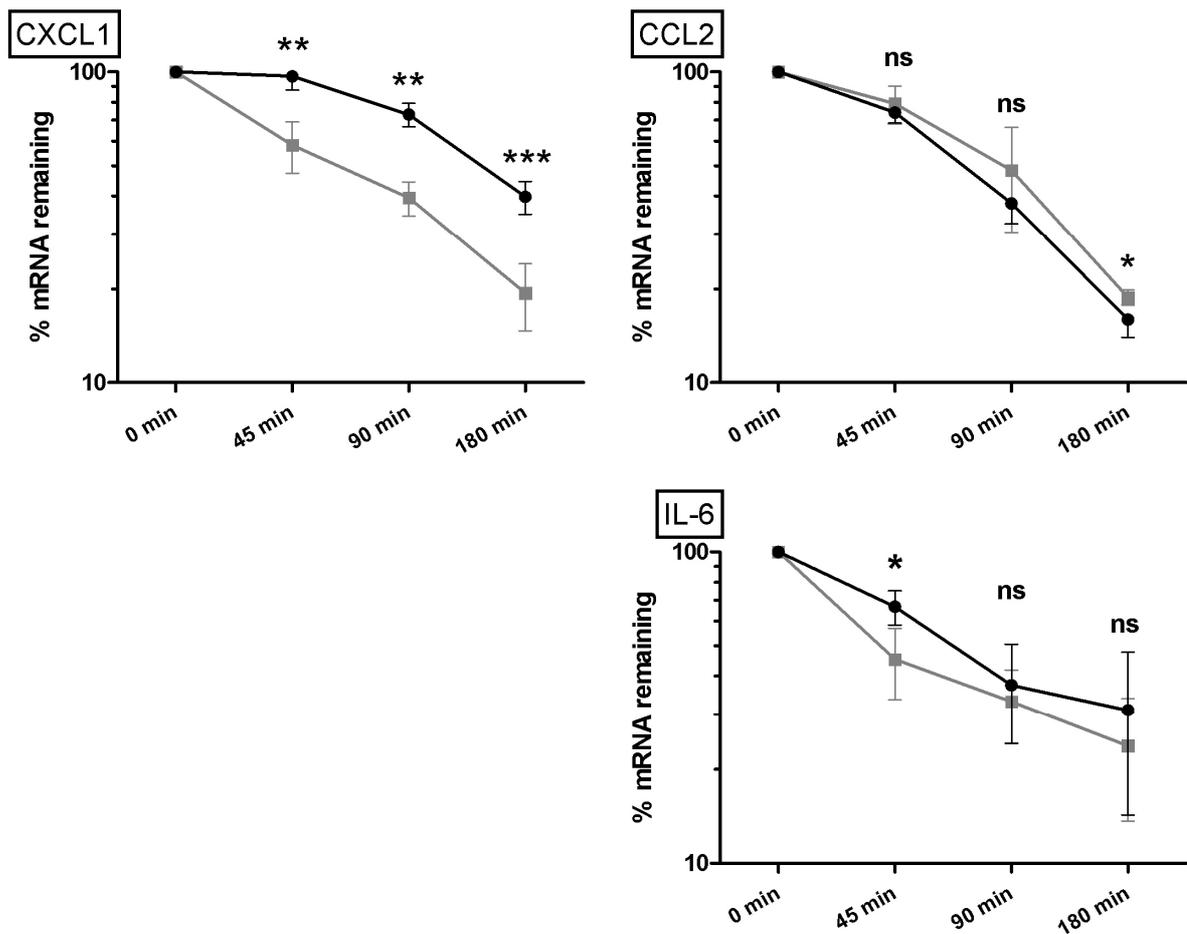


Abbildung 8: Prozentueller Anteil der noch verbliebenen mRNA jeweils 45, 90 und 180 min nach Transkriptionsstopp mit Actinomycin D folgend einer 24h-Stimulation mit TNF- α (10ng/ml) alleine oder zusammen mit IL-17 (100ng/ml). Es sind Daten von 4 unabhängigen Experimenten mit Mittelwerten \pm Standardabweichung abgebildet. Der Effekt von IL-17-Zugabe auf die Genexpression zu den einzelnen Zeitpunkten wurde mit dem t-test analysiert. ^{ns} $p > 0.05$ * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$

3.8. IL-17-Effekte *in vivo*

In zahlreichen Vorarbeiten konnte gezeigt werden, dass $\gamma\delta$ -T-Zellen ein wichtiger Produzent von IL-17 beim Schlaganfall sind und IL-17 als ein proinflammatorisches Zytokin andere Zellen zur Ausschüttung von chemoattraktiven Substanzen stimulieren kann und somit die Einwanderung von Entzündungszellen ins geschädigte Gewebe induziert. Da wir in unseren *in vitro* Experimenten bereits nachweisen konnten, dass Astrozyten als Zellen des ZNS gegenüber IL-17 responsiv sind, haben wir weitere Versuche *in vivo* durchgeführt. Hierfür haben wir die mRNA-Expression der entsprechenden Zytokine und Chemokine aus Gesamthirn-mRNA linker Hemisphären von Tieren nach tMCAO mit der mRNA-Expression aus Gesamthirn-mRNA linker Hemisphären von Tieren verglichen, die einer sham-Operation unterzogen wurden, d.h. ebenfalls eine Intervention mit einer OP-Wunde hatten, ohne jedoch einen ZNS-Schaden zu erleiden (s. Material und Methoden).

Passend zu den *in vitro* Experimenten konnte gezeigt werden, dass die mRNA-Niveaus der chemoattraktiven Gene 24h nach MCAO gegenüber sham-Operation hochreguliert werden. Es gab einen signifikanten Unterschied zwischen den Wildtyp-Mäusen und den immundefizienten (Rag1-ko) sowie T-Zell-Rezeptor- (Tcrd-ko) bzw. IL-17-Rezeptor-defizienten (IL17ra-ko) Tieren hinsichtlich der CXCL1-Expression, während andere Chemokine in den Mäusen der transgenen Linien nicht beeinflusst wurden (s. Abbildung 9).

Diese Daten bestätigen, dass das Immunsystem in der Entzündungsreaktion nach einem Schlaganfall eine entscheidende Rolle spielt. Gleichzeitig wird die Hypothese untermauert, dass IL-17 eine große Bedeutung in der Auslösung und Potenzierung der Immunantwort nach einer Gewebeschädigung hat: die Tcrd-ko-Mäuse, die keine IL-17-produzierenden $\gamma\delta$ -T-Zellen besitzen, sowie die IL17ra-ko-Mäuse, die keinen IL-17-Rezeptor auf ihren Zellen haben, ebenso wie die Rag1-ko-Mäuse, die defizient für T-Zellen, B-Zellen und NKT-Zellen sind, wiesen eine signifikant niedrigere Expression von CXCL1 gegenüber dem Wildtyp auf.

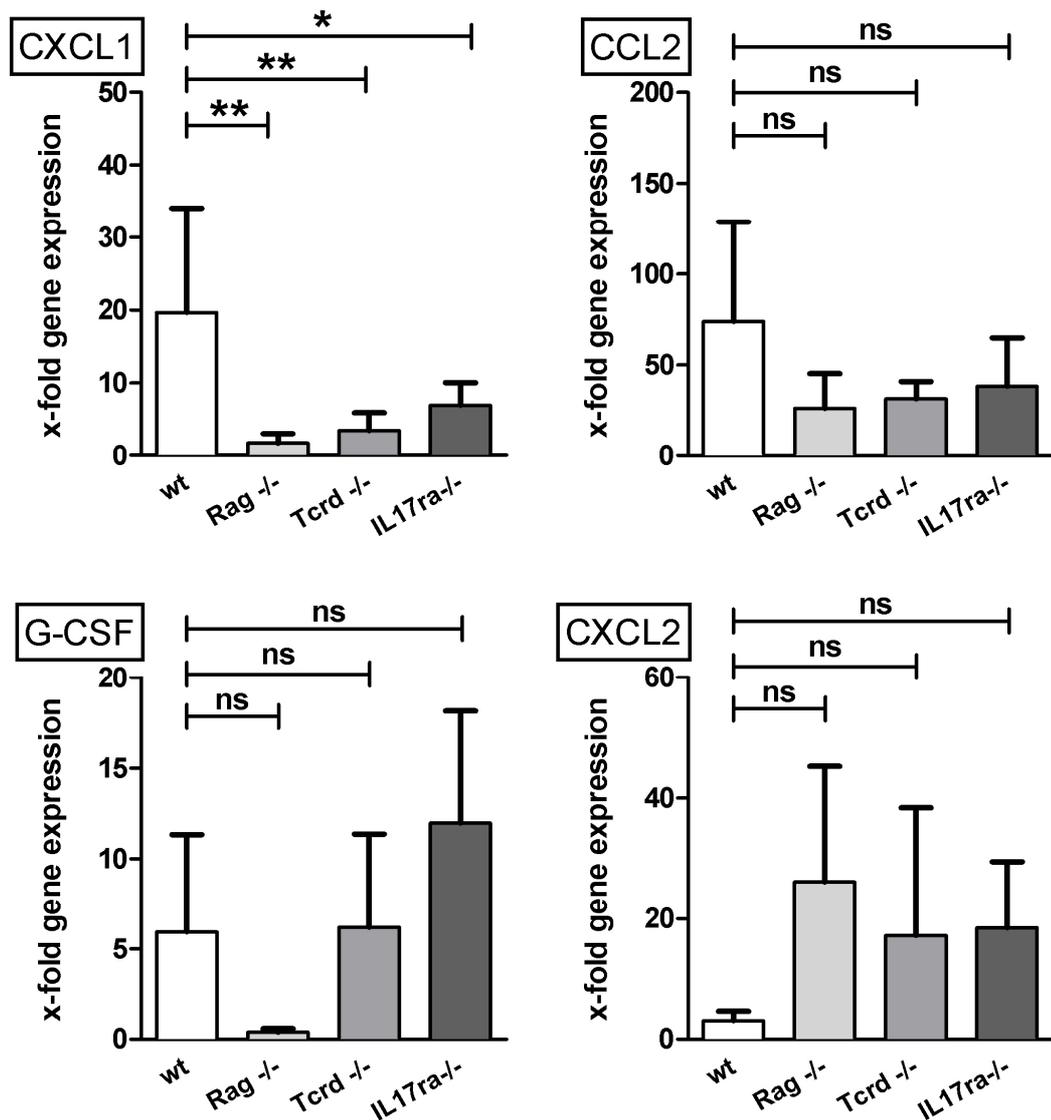


Abbildung 9: Genexpression von CXCL1, CCL2, G-CSF und CXCL2 in der linken Hemisphäre der Wildtyp-, immundefizienten Rag1-ko-, T-Zellrezeptor-defizienten Tcrd-ko- und IL-17-Rezeptor-defizienten IL17ra-Mäusen 24h nach tMCAO. Es sind Daten von 6 unabhängigen Experimenten mit Mittelwerten \pm Standardabweichung abgebildet. Die einzelnen Datensätze sind auf die entsprechenden Daten aus den sham-operierten Tieren normalisiert. Die Gruppenunterschiede wurden mit one-way ANOVA und Bonferroni post-hoc test analysiert. ^{ns} $p > 0.05$ * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$

3.9. Astrozyten: neutrophilen-unabhängige Effekte von IL-17

Angesichts multipler Effekte von IL-17 auf die Prozesse im Rahmen einer sterilen Inflammation, neben den Effekten auf die Chemokinexpression, stellte sich die Frage, ob es im Rahmen der postischämischen Entzündungsreaktion weitere Effekte von IL-17 gibt, die nicht über die Infiltration von Granulozyten vermittelt werden. Da der Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke kritisch für die Zellmigration über die „neurovascular unit“ hinaus ins ZNS Parenchym ist, entschieden wir uns, die Genexpression von Kandidaten zu untersuchen, welche möglicherweise in diesen Prozess involviert sind.

Hierfür haben wir die Astrozyten, wie bereits beschrieben, mit TNF- α (10ng/ml) und IL-17 (100ng/ml) stimuliert und die Genexpression zu folgenden Zeitpunkten gemessen: 1.5h, 3h, 6h und 24h (s. Abbildung 10).

In diesen Experimenten bestätigte sich der amplifizierende Effekt von IL-17: z.B. wurde MMP3 durch die kombinierte Gabe von TNF- α und IL-17 nach 24h signifikant höher reguliert als nach alleiniger TNF- α -Stimulation. MMP13 wurde nur sehr wenig reguliert und die Zugabe von IL-17 änderte die Expression nicht signifikant. COX-2 zeigte einen Peak mit etwa 25facher Regulation bei 3h und der Unterschied zwischen TNF- α alleine und Kombination mit IL-17 war bei 6h sowie 24h signifikant, was mit den Daten zu CXCL1 übereinstimmt. iNOS hatte mit etwa 500facher Genexpression bei 6h die stärkste Regulation, wobei IL-17 erst bei 24h eine signifikante Differenz bewirkte.

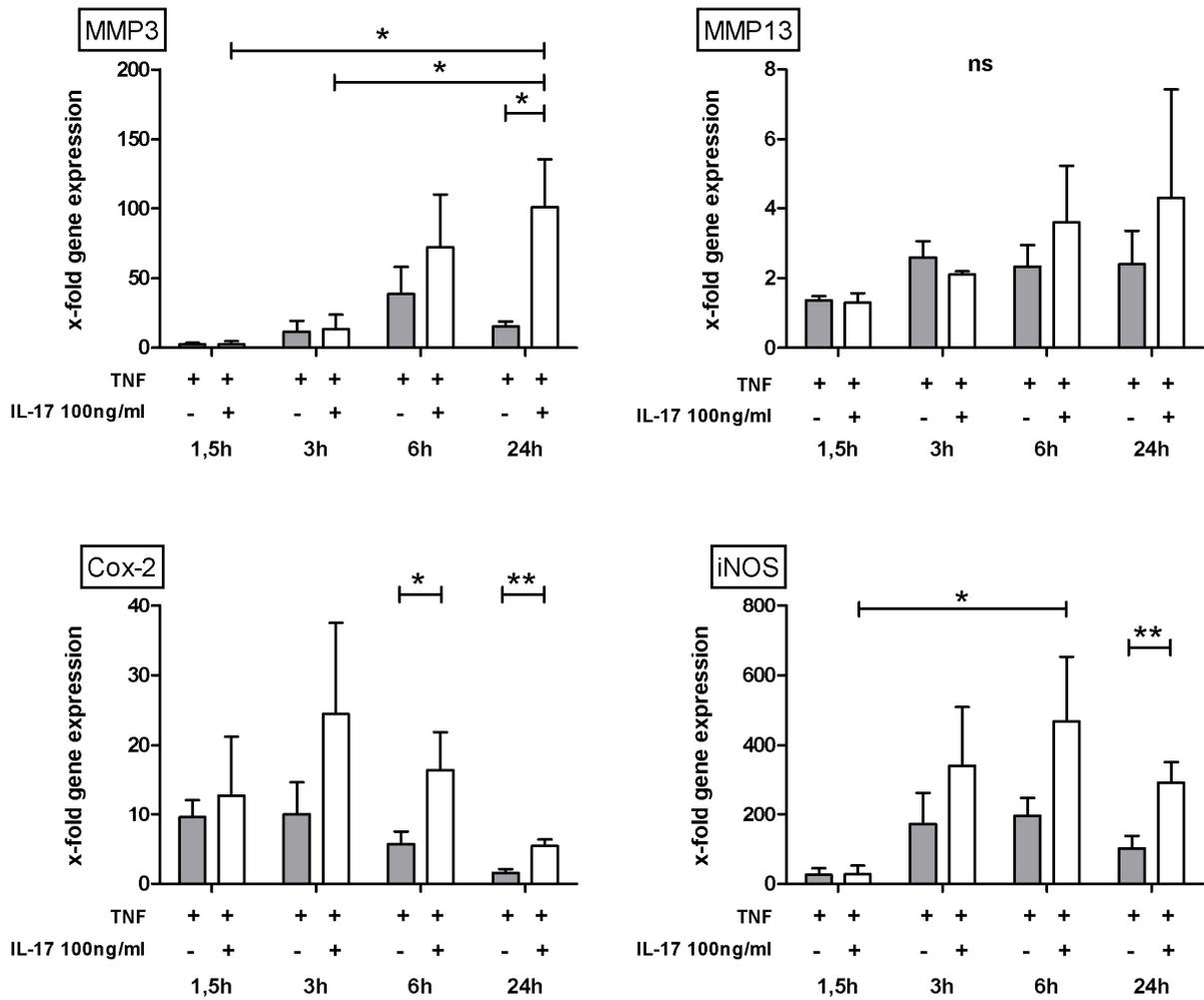


Abbildung 10: Genexpression von MMP3, MMP13, Cox-2 und iNOS jeweils 1,5, 3, 6 und 24h nach Stimulation mit TNF- α alleine oder in Kombination mit IL-17 (100ng/ml). Es sind Daten von 4 unabhängigen Experimenten mit Mittelwerten \pm Standardabweichung abgebildet. Der zeitliche Verlauf wurde mit one-way ANOVA und Bonferroni post-hoc test analysiert. Der Effekt von IL-17-Zugabe auf die Genexpression zu den einzelnen Zeitpunkten wurde mit dem t-test analysiert. ^{ns} $p > 0.05$ * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$

4. Diskussion

Der Schlaganfall bleibt, trotz präventiver Maßnahmen, aktueller Therapiemethoden und intensiver Forschung, ein bisher nur unzureichend behandelbares Krankheitsbild, welches weiterhin mit einer hohen Mortalität und Morbidität einhergeht: jährlich versterben weltweit etwa 5 Mio. Menschen an Schlaganfall oder seinen Folgen (etwa 10% aller Todesfälle) und weitere 5 Mio. Menschen leiden nach Schlaganfällen an dauerhaften körperlichen Behinderungen (<http://www.who.int/en/>). Die möglichst rasche Reperfusion mittels Gabe von rtPA ist nach wie vor die Therapie der Wahl, die jedoch durch das enge Zeitfenster von 4.5 h für die überwiegende Zahl der Patienten nicht in Frage kommt: z.B. zeigte eine Studie aus Kalifornien im Jahr 2005, dass nur etwa ein Viertel der Patienten mit einem Schlaganfall ein Krankenhaus innerhalb des therapeutischen Fensters erreichte und etwas weniger als 5% die thrombolytische Behandlung erhielt, während der Rest wegen Kontraindikationen ausschied (CASPR Investigators 2005). Darüber hinaus hat die Wiederherstellung des Blutflusses neben den positiven Aspekten auf die Reperfusion auch negative Folgen. Hierzu zählen die Induktion einer postischämischen Entzündungsreaktion, die sekundäre hämorrhagische Transformation und die Entwicklung eines Hirnödems. Schließlich hat auch rtPA negative Effekte: es erhöht die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke, aktiviert Makrophagen und Mikroglia, induziert die Expression von NF- κ B (nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells) und folglich die Freisetzung von Entzündungsmediatoren, interagiert mit NMDA-Rezeptoren (N-Methyl-D-Aspartat) und potenziert das Phänomen der Exzitotoxizität (Yepes et al. 2009). Die genauen Mechanismen und zu welchem Ausmaß das Immunsystem in die Pathologie des Schlaganfalls involviert ist, blieb jedoch lange unklar.

Mittlerweile ist durch experimentelle Studien gut belegt, dass hirneigene und einwandernde Immunzellen auf der einen Seite proinflammatorische Signalwege anstoßen und damit den postischämischen Schaden vergrößern. So konnte in zahlreichen tierexperimentellen Studien gezeigt werden, dass immundefiziente Mäuse deutlich kleinere Schlaganfälle im MCAO-Modell entwickeln (Yilmaz/Arumugam et al. 2006). Auf der anderen Seite setzen Immunzellen auch antiinflammatorisch wirkende Substanzen frei, die den

Gewebeverlust einschränken und für die Umbauprozesse wie Neuro-/Angiogenese und Narbenbildung von entscheidender Bedeutung sind (Iadecola und Anrather 2011). Allerdings stellen die das Immunsystem hemmenden Medikamente wahrscheinlich keine sichere Therapieoption dar, weil eine endogene Immunsuppression nach einem ischämischen Ereignis bereits zu erhöhter Inzidenz von Infektionen führt (Prass/Meisel et al. 2003).

Vergleichbare pathophysiologische Prozesse sind aus der Literatur über Modelle der I/R Schädigung im Herzen (Liao et al. 2012) sowie in der Niere (Xue et al. 2011) bekannt. In den publizierten Modellen kommt Zytokinen und insbesondere IL-17 eine Schlüsselrolle zu, da es im Zuge der Entzündungsreaktion von einer T-Zell-Subpopulation, den $\gamma\delta$ -T-Zellen, produziert wird und auf eine bisher ungeklärte Weise entzündliche Prozesse einleitet.

Die vorliegende Arbeit hat das Ziel, die Rolle des Zytokins IL-17 im Kontext des ischämischen Schlaganfalls näher zu charakterisieren und seine Wirkungsmechanismen genauer zu identifizieren.

Wie bereits in diversen Publikationen beschrieben, scheinen auch beim Schlaganfall die sogenannten „unkonventionellen“ $\gamma\delta$ -T-Zellen wichtige Produzenten von IL-17 zu sein (Shichita et al. 2009). Diese Zellpopulation nimmt dank ihrer Eigenschaften eine Sonderstellung unter den Lymphozyten ein und wird als „innate-like lymphocytes“ bezeichnet (Murphy 2012). Anders als konventionelle T-Zellen können $\gamma\delta$ -T-Zellen auch über „danger“-Signale Antigen-unabhängig sowie über die T-Zell-Rezeptoren (TCR-Signalling) aktiviert werden, was dieser Zellart erlaubt gleichermaßen auf exogene entzündliche Mediatoren und auf körpereigene dysregulierte Abläufe zu reagieren (Vantourout und Hayday 2013). Als wichtigster Effektormechanismus spielt das von ihnen sezernierte Zytokin IL-17 eine entscheidende Rolle, indem es die Infiltration von neutrophilen Granulozyten induziert.

In einem gesunden unbeschädigten ZNS-Gewebe finden sich nur vereinzelt Zellen des peripheren Immunsystems. Dominiert wird das ZNS-eigene Immunsystem durch residente immunkompetente Zellen, die Mikroglia, welche von den gleichen Vorgängerzellen abstammen wie die Makrophagen und Monozyten (Saijo und Glass 2011). Ihre primäre Funktion ist eine engmaschige

Überwachung des extrazellulären Milieus im ZNS. Gleichzeitig ist die Aktivierung der Mikroglia und deren Differenzierung in M1- (proinflammatorisch) und M2-Typ (antiinflammatorisch) ein wichtiger Aspekt. Über zahlreiche Kaskaden (JNK, c-Jun N-terminal kinase; MAPK, mitogen-activated protein kinase; ERK, extracellular-signal regulated kinase) führt die Aktivierung von Mikroglia durch Induktion von diversen Transkriptionsfaktoren (NF- κ B; AP-1, activator protein 1; PPAR γ , peroxisome proliferator-activated receptor gamma) einerseits zu zytotoxischen Reaktionen mit Freisetzung von proinflammatorischen Signalmolekülen (Yenari et al. 2010) und andererseits zu den Gewebeschaden limitierenden Prozessen mit Ausschüttung von antiinflammatorischen Mediatoren (Veroni et al. 2010). Im Rahmen einer ischämischen Schädigung werden von den nekrotischen und apoptotischen Neuronen Gefahrensignale (DAMP, s.o.) freigesetzt – dabei stellen Mikroglia die erste Zellpopulation dar, die auf diese Vorgänge mit einer Aktivierung über Rezeptoren, wie z.B. TLR, reagiert und eine Vielzahl von proinflammatorischen Zytokinen und Effektormolekülen (z.B. NO) ausschüttet (Magnus et al. 2012). Hiermit sind Mikroglia an dem frühen Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke sowie der Regulation von Adhäsionsmolekülen beteiligt. Diese Mechanismen sind in der Folge kritisch für die Einwanderung von weiteren Immunzellen des peripheren Immunsystems und die Freisetzung von Zytokinen. In den Vorarbeiten unserer und anderer Gruppen wurden vor allem die früh einwandernden CD4⁺, CD8⁺ T-Zellen und NK-Zellen als Hauptquellen von IFN- γ identifiziert (Gelderblom/Leypold/Steinbach et al. 2009, Yilmaz/Arumugam et al. 2006). Im weiteren Verlauf bewirkt IFN- γ eine Rekrutierung und Aktivierung der Makrophagen und Mikroglia, welche als wichtigste Produzenten von TNF- α im ischämischen Gewebe fungieren (Gelderblom et al. 2012). Gleichzeitig führt die Unterversorgung mit oxygeniertem Blut zu einer Aktivierung von hirneigenen Zellen, die stressinduziert zahlreiche Signale in Form von spezifischen Molekülen aussenden, welche die Apoptose einleiten oder der Weitergabe der Entzündungsreaktion dienen. So z. B. führt der Sauerstoff- und Nährstoffmangel zusammen mit zirkulierenden Zytokinen infolge einer Ischämie zur Aktivierung der Mikroglia und der Makrophagen, die zahlreiche Zytokine, u.a. TNF- α produzieren (Hu et al. 2012).

Diese zwei Signalwege – die IL-17-Ausschüttung durch die $\gamma\delta$ -T-Zellen und die TNF- α -Freisetzung durch die Makrophagen und Mikroglia – haben, wie unsere

Experimente zeigten, einen gemeinsamen Endpunkt: die Astrozyten. Während sowohl IL-17 als auch TNF- α alleine keinen oder lediglich einen geringen Effekt auf die Astrozyten haben, löst ihre Kombination eine starke Reaktion mit amplifizierendem Effekt in diesen Zellen aus – die Genexpression von chemoattraktiven Substanzen wird deutlich erhöht und induziert die Produktion von Chemokinen, wie z.B. CXCL1. Das die Neutrophilen anziehende Chemokin CXCL1 ruft schlussendlich die Infiltration von neutrophilen Granulozyten ins postischämisch geschädigte Gewebe hervor, was eine zusätzliche Entzündungsreaktion zur Folge hat und den Schaden auf die umliegende primär unversehrte Penumbra erweitert.

Dabei wären die Astrozyten nicht notwendigerweise die primären Kandidaten, wenn es um immunologische Prozesse geht. Bisher wurde die fehlende astrozytäre Unterstützung und Versorgung der Neuronen im Rahmen einer Ischämie als vorrangig für den fortschreitenden neuronalen Zelltod interpretiert, während die eigentliche proinflammatorische Rolle von Astrozyten weniger beachtet wurde (Nedergaard und Dirnagl 2005). Lediglich in den letzten Jahren sind Publikationen erschienen, in denen die Rolle der Astrozyten in Immunreaktionen thematisiert wurde. Es wurde z.B. gezeigt, dass die aktivierte Mikroglia Astrozytenfunktionen induziert, die als positives Feedback zur zunehmenden Mikroglia rekrutierung führen (proinflammatorische Abläufe), aber auch im Sinne eines negativen Feedbacks die Mikroglia unterdrücken (antiinflammatorische Wirkung) (Liu et al. 2011).

Trotzdem waren bisher die Mikroglia als die einzigen hirneigenen Immunzellen von großem Interesse, da sie als erste für die Abwehr von pathogenen Keimen sowie für die Reaktion auf autoimmune Faktoren verantwortlich sind und ihre Aktivierung als ein typisches Kennzeichen für neuroinflammatorische Vorgänge betrachtet wird (Saijo und Glass 2011). Diverse Arbeiten auf dem Gebiet der neurologischen Erkrankungsmodelle haben die Mikroglia in den Mittelpunkt gestellt, da sie viele Voraussetzungen erfüllen, um als die für die Regulation entscheidende Zellart zu sein. Zwar wurde die kritische Rolle der TLR2/IL-23/IL-17-Achse in der Mikroglia unter Bedingungen der Ischämie/Reperfusion nachgewiesen (Lv/Liu et al. 2011), doch hat sich in unseren Experimenten gezeigt, dass diese Zellen nicht alleine für die Neutrophileninfiltration verantwortlich sind. Zwar besitzen Mikroglia offensichtlich

IL-17- und TNF- α -Rezeptoren, jedoch haben sie weder auf IL-17 noch auf die Kombination von IL-17 mit TNF- α eine adäquate Erhöhung der Transkription von chemoattraktiven Mediatoren gezeigt. Somit wurde schnell klar, dass Mikroglia zwar für diverse pro- aber auch antiinflammatorische Signalwege während und nach der Ischämie von entscheidender Bedeutung sind, dennoch findet die Infiltration von neutrophilen Granulozyten und die dadurch bedingte sekundäre Schädigung lediglich unter indirekter Beteiligung der Mikroglia statt (Ausschüttung von TNF- α). Nichtsdestotrotz wurde bereits darüber spekuliert, ob die hypoxiebedingten Gefahrensignale über TLR2 die IL-23-Produktion in der Mikroglia induzieren und das IL-23 seinerseits die IL-17-Sekretion aus den T-Zellen stimuliert (Lv/Liu et al. 2011).

Aufgrund der oben beschriebenen Daten fokussierten wir unsere weiteren Studien auf die bisher weitgehend unklare Rolle von Astrozyten. Wie bereits beschrieben, ging man lange davon aus, dass diese Zellpopulation relativ widerstandsfähig gegenüber ischämischen Schädigungen ist und hauptsächlich die Homöostase der Neurone aufrechterhält, ohne dabei „höhere“ Funktionen zu besitzen. Um die potentiellen immunologischen Eigenschaften dieser Zellen zu analysieren, bedarf es eines adäquaten Stimulus, wie etwa die Zytokinausschüttung im Rahmen eines ischämischen Ereignisses – da die Astrozyten sonstige Reize, wie z.B. Elektrolytverschiebungen oder Energiemangel, gut tolerieren (Sofroniew und Vinters 2010). Diese Erkenntnisse deuten darauf hin, dass neben dem Wegfall der Astrozytenfunktion im Rahmen der Gewebeschädigung auch den regulatorischen Eigenschaften dieser Zellen eine wichtige Rolle zukommt. In unseren Experimenten schien das *in vitro* Schlaganfall-Modell (OGD) alleine aber auch zusammen mit IL-17 ein ungenügender Stimulus für eine Änderung der Genexpression in den Astrozyten zu sein. Diese Versuchsreihe beweist erneut, dass Astrozyten eine robuste und stressresistente Zellpopulation sind, die kurzfristige Schwankungen im Sauerstoffangebot oder Zuckerhaushalt mit geringem Einfluss auf ihre immunologische Funktion tolerieren (in unseren Experimenten 3.5h OGD). Diese Eigenschaften wurden bereits im Zusammenhang mit pH-Wert-Änderungen in der Ischämie gezeigt: die Hypoxie alleine hat erst nach über 12h den Zelltod verursacht, während eine zusätzliche Azidose zu einer Beschleunigung des Zelluntergangs führte (Chesler 2005). Auch laut den neuesten Publikationen

induziert ein längerer Mangel an Sauerstoff und Glukose (12h und mehr) nekrotische und apoptotische Signalwege in den Astrozyten (Paquet et al. 2013). Diese Daten lassen zusammenfassend postulieren, dass einzelne Stimuli die Astrozyten nur unzureichend aktivieren können und erst ein Zusammenspiel mehrerer Signale einen adäquaten Reiz bietet.

Trotzdem standen für uns die Astrozyten, als die im ZNS am zahlreichsten vertretene Zellpopulation, im Mittelpunkt der weiteren Experimente, da sie einerseits ausreichend Stabilität zeigen, um eine gewisse Unterversorgung zu überleben, andererseits im ZNS-Gewebe ubiquitär sind, um ein Signal flächendeckend auszulösen und aufrechtzuerhalten.

Die Stimulationsversuche mit IL-17 in unterschiedlichen Konzentrationen (10 und 100 ng/ml) haben jedoch gezeigt, dass dieses Zytokin keinen signifikanten Effekt auf die Expression proinflammatorischer Chemokine und Zytokine in Astrozyten hat. In der Literatur haben wir ebenfalls Hinweise darauf gefunden, dass IL-17 alleine möglicherweise eher wenig genregulatorisches Potenzial hat und erst durch das Zusammenspiel mit anderen Zytokinen seine volle Wirkung entfaltet (Csiszar und Ungvari 2004, Paintlia et al. 2011). Tatsächlich reagierten die Astrozyten auf eine kombinierte Stimulation mit IL-17 und TNF- α mit einer frühzeitigen (bereits nach 1.5h) und anhaltenden (über die ersten 6h) Hochregulation der Genexpression speziell für die neutrophilen-anlockenden Chemokine wie etwa CXCL-1. Dabei war der Effekt von IL-17-Zugabe nicht nur additiv sondern potenzierend, ohne dass die IL-17-Rezeptor-Expression selber reguliert wurde, was bestätigte, dass IL-17 einen anderen Signalweg als den über die Rezeptoramplifikation haben muss.

Zusätzlich haben wir untersucht, ob sich die IL-17-Stimulation nur auf der mRNA-Ebene auswirkt oder ob die Proteinproduktion ebenfalls verändert wird. Mithilfe der ELISA-Methode konnten wir nachweisen, dass die Regulation auf der mRNA-Ebene durch kombinierte Gabe von IL-17 und TNF- α auch auf der Proteinebene umgesetzt wird. Diese Erkenntnis warf Fragen zu eventuellen zusätzlichen Mechanismen auf, über die IL-17 seine Wirkung entfalten und unterhalten könnte. Da ähnliche Ergebnisse für Stimulations-Experimente in Fibroblasten gezeigt werden konnten (Hartupée et al. 2007), führten wir weitere Experimente zur Hemmung der Transkription mittels Actinomycin D durch und haben die im Verlauf verbliebene mRNA gemessen. So wiesen wir den

stabilisierenden Effekt von IL-17 auf die Chemokin-mRNA nach: die alleine mit TNF- α stimulierten Astrozyten zeigten eine deutliche Reduktion von verbliebenen mRNA-Transkripten im Vergleich zu den mit IL-17 und TNF- α stimulierten Zellen – 10% vs. 45% der ursprünglichen Genexpression 3h nach Transkriptionsstopp.

In den Arbeiten anderer Gruppen konnten ähnliche Ergebnisse erzielt und der mRNA-stabilisierende Effekt von IL-17 in anderen Zelltypen gezeigt werden (Hartupée et al. 2007, Qian/Liu et al. 2007). Dabei wurden in weiteren Versuchen die verschiedenen Signalwege untersucht und es wurde postuliert, dass IL-17 seine Wirkung über ein zytoplasmatisches Adaptor-Protein Act1 entfaltet, welches den IL-17-Rezeptor mit den weiteren nachgeschalteten Transkriptionsfaktoren – TAK1 (Transforming growth factor beta-activated kinase 1), TRAF6 (TNF receptor associated factor) und schließlich NF- κ B verbindet (Lindén 2007). Die durch IL-17 gestartete Kaskade unterscheidet sich von den durch die anderen Zytokinen induzierten Signalwegen, was auch den potenzierenden Effekt von gleichzeitiger IL-17- und TNF- α -Gabe in unseren Experimenten erklärt – z.B. hat TNF- α neben dem NF- κ B auch das AP-1 zum Ziel und wirkt dabei über MAPK und JNK (Baud und Karin, 2001). Außerdem wurde zeitgleich mit der Durchführung der vorliegenden Arbeit in einer Publikation über die Rolle von IL-17 in der EAE nachgewiesen, dass Act1-defiziente Mäuse signifikant geringere Neutrophileninfiltration zeigten, und zugleich wurde demonstriert, dass die Astrozyten die wichtigste Quelle von Chemokinen in der EAE unter IL-17-Stimulation darstellen, was mit unseren Ergebnissen im Einklang steht (Kang/Altuntas et al. 2010). Interessanterweise gibt es auch Arbeiten, die sich mit der Auswirkung von antiinflammatorischen Zytokinen auf die mRNA-Stabilität befassen und in denen nachgewiesen wurde, dass z.B. IL-10 zum Zerfall der CXCL1-mRNA in Makrophagen beitragen kann, indem es die mRNA-stabilisierende Wirkung der proinflammatorischen Substanzen, wie etwa LPS, aufhebt (Biswas/Datta et al. 2003).

Eine weitere Publikation ist auf die Signalkaskade eingegangen, die speziell zur Stabilisierung der CXCL1-mRNA nach IL-17-Gabe beiträgt. Es wurde postuliert, dass dem ASF (alternative splicing factor) eine besondere Rolle dabei zukommt – ASF ist neben dem Splicing der pre-mRNA auch für den mRNA-Transport aus dem Kern und die nachfolgende Translation wichtig. Die oben genannte Studie konnte zeigen, dass ASF an die mRNA bindet und sie damit

destabilisiert, während unter IL-17-Stimulation diese Interaktion gestört ist und die mRNA somit eine längere Halbwertszeit aufweist (Sun et al. 2011).

Auch weitere Experimente unserer Arbeitsgruppe mit diversen oben genannten *knock-out* Mäusen haben gezeigt, dass die Unterbrechung der IL-17-Achse an verschiedenen Stellen zur Aufhebung des Neutrophileneffektes führt. Alle 3 Versuchsansätze – Rag1- sowie IL-17ra-Defizienz als auch eine Behandlung mit anti-IL-17-Antikörpern – wiesen nach, dass in diesen Tieren signifikant weniger eingewanderte neutrophile Granulozyten vorhanden waren als in den Wildtyp-Kontrollen (Gelderblom et al. 2012). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit unseren Hypothesen bezüglich der Rolle von IL-17(A) in der sekundären Schädigung des ischämischen Gewebes, wobei es nicht abschließend untersucht worden ist, ob andere IL-17 Subtypen eventuell von Bedeutung sein können.

Des Weiteren ist bekannt, dass IL-17 neben der Induktion von chemotaktischen und proinflammatorischen Genen auch die Produktion von anderen in die entzündlichen Prozesse involvierten Effektormolekülen anregen kann, wie etwa Enzyme (Proteinasen, Synthasen etc.) oder antimikrobielle Peptide (Iwakura et al. 2011). In diesem Zusammenhang haben wir in einem zusätzlichen Experiment gezeigt, dass IL-17 auch andere Effekte eigen sind, die nicht über die Neutrophilenmigration entfaltet werden – es induziert Entzündungsmediatoren, die auf einem leukozytenunabhängigen Weg zum Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke beitragen können. Insbesondere MMP3 wurde durch die kombinierte TNF- α - und IL-17-Gabe mit einem Peak bei 24h hochreguliert und hat einen gegenüber alleiniger TNF- α -Stimulation signifikanten amplifizierenden Effekt von IL-17 verdeutlicht. MMP3 gehört zu den sogenannten Matrix-Metalloproteinasen, die unter bestimmten Voraussetzungen die Integrität der extrazellulären Matrix zerstören und ins Gewebe-Remodelling involviert sind, indem sie diverse Bindegewebesubstanzen (Kollagen, Elastin, Proteoglykane etc.) degradieren. Auch iNOS und COX-2 wurden hochreguliert und zwar bei 3h bis 6h und zeigten zu späteren Zeitpunkten eine ähnliche Dynamik wie CXCL1 und MMP3: die mit TNF- α und IL-17 behandelten Zellen wiesen im Verlauf signifikant höhere Genexpression auf, als die alleine mit TNF- α stimulierten Proben, was auf den gleichen Mechanismus der mRNA-Stabilisierung hinweisen könnte. Interessant ist

auch das zeitliche Muster: eine relativ frühe Hochregulation von iNOS und COX-2 (NO- und Prostaglandine-produzierende Enzyme) entsprechend einer initialen Entzündungsreaktion und die später einsetzende MMP3-Hochregulation – entsprechend dem auf die Inflammation folgenden Ab- und Umbau der extrazellulären Matrix. Eine ähnliche zeitliche Dynamik speziell mit früher iNOS- und COX-2-Expression in glialen Zellen wurde bereits in einigen Publikationen über neuronalen Stress und die Neuroinflammation (Munhoz et al. 2008, Saha und Pahan, 2006) demonstriert, und auch die kritische Rolle von MMPs im Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke nach dem Schlaganfall, insbesondere in Kombination mit tPA, ist von anderen Arbeitsgruppen beschrieben worden (Fernandez-Cadenas et al. 2011, Jin et al. 2010).

Diese Daten liefern gleichzeitig eine Erklärung für die Tatsache, dass in unseren Versuchen die Depletion von IL-17 deutlich stärkere Effekte zeigt als die alleinige Hemmung der Neutrophilen in MPO(Myeloperoxidase)-defizienten Tieren (Gelderblom et al. 2012). Dabei verhindert der letztere Ansatz lediglich die Einwanderung von Neutrophilen ins Schlaganfallgebiet und begrenzt somit den sekundären immunologisch vermittelten Schaden. Im Gegensatz dazu führt die Inhibition der IL-17-Achse zusätzlich zum Wegfall der oben beschriebenen neutrophilen-unabhängigen Effekte, wie etwa Entwicklung eines Ödems und Neuroinflammation durch iNOS und COX-2 sowie Destruktion der Blut-Hirn-Schranke durch MMP3.

Insgesamt bleibt die Studienlage bezüglich der Rolle der Neutrophilen in Ischämie-Reperfusion-Modellen sehr kontrovers. Neben Publikationen, die diesen Zellen nicht nur lokale sondern auch systemische proinflammatorische Effekte zuschreiben (McColl et al. 2008), stellt eine Reihe von Arbeiten ihre Rolle beim Schlaganfall in Frage (Beray-Berthat et al. 2003). Jüngste Publikationen weisen sogar darauf hin, dass auch Neutrophile analog zu Makrophagen einen antiinflammatorischen N2-Typ annehmen und damit den ischämischen Schaden begrenzen können (Cuartero et al. 2013, Easton 2013).

Rückblickend liefern unsere Experimente unter Hinzuziehung der früheren eigenen und der von anderen Arbeitsgruppen publizierten Ergebnisse neue Erkenntnisse. So ist beispielsweise das angewandte *in vitro* Schlaganfall-Modell, die OGD, wahrscheinlich nicht ausgereift, um speziell die Reaktion der Astrozyten

zu untersuchen, da es eines längeren Zeitraumes von Unterversorgung bedarf, um diese relativ robusten Zellen in einer Monokultur relevantem Stress auszusetzen. Dabei ist unter Schlaganfallbedingungen *in vivo* sicherlich auch eine kürzere Unterversorgung schädigend, da sie mit der Ausschüttung von diversen Signalmolekülen aus der Mikroglia und den Neuronen einhergeht, die bei der OGD *in vitro* fehlen und nur schwer nachzustellen sind, da *in vitro* grundsätzlich die Interaktion zwischen den verschiedenen Zellpopulation nicht vorhanden ist. Auch die tMCAO bildet, wie andere *in vivo* Schlaganfall-Modelle, nur einen Teil der humanen Pathophysiologie ab: die Reperfusion wird durch ein relativ plötzliches Entfernen eines Filaments erreicht, während dieser Prozess im menschlichen Gehirn graduell durch endogene oder iatrogene Thrombolyse abläuft. Daher lässt es sich darüber diskutieren, ob die schlagartige Reperfusion und die Anwendung von einem Fremdmaterial (Plastikfilament) nicht ohnehin eine überschießende Immunreaktion hervorruft, verglichen mit der langsam einsetzenden Reperfusion nach rtPA-Applikation und einer endogenen Verschlusssubstanz (Thrombus oder Embolus).

Des Weiteren bleiben bei der *in vitro* Forschung ebenso wie bei den Mausmodellen einige Faktoren unberücksichtigt, die im Klinikalltag und dem Management von Schlaganfallpatienten von entscheidender Bedeutung sind. Hier wären zu nennen das Geschlecht (in den Experimenten werden lediglich männliche Tiere verwendet, da die weiblichen wegen den Zyklusschwankungen wesentlich mehr Variabilität zeigen), das Alter (die Funktionen des Organismus und seine Regenerationsfähigkeit bei 10-12 Wochen alten Mäusen können nicht mit denen von 60-70 Jahre alten Menschen verglichen werden) sowie Komorbiditäten (Atherosklerose, Vorhofflimmern und andere kardiovaskuläre Risikofaktoren wie Adipositas, Tabakkonsum, Diabetes oder hoher Cholesterinspiegel sind teilweise ebenfalls nur schwer in die Tiermodelle zu integrieren). Außerdem zeigt die wachsende Anzahl an Publikationen, wie kontrovers die Datenlage sein kann und dass kaum eine Zellpopulation oder eine Substanz als streng protektiv oder schädigend klassifiziert werden kann. So auch die untersuchten Zytokine und Chemokine - sie präsentieren ein biphasisches Verhalten und mögen initial unmittelbar nach dem ischämischen Ereignis als proinflammatorisch gelten und durch die Migration von Immunzellen für die Initiierung entzündlicher Prozesse verantwortlich sein. Allerdings ist zu beachten,

dass später einsetzende regenerative und neurotrophe Vorgänge ebenfalls von der Aktivierung des Immunsystems abhängen können, und dass die Antagonisierung von bestimmten Zytokinen somit potentiell regenerative und neuroprotektive Mechanismen unterbinden kann (Kadhim et al. 2008).

Die Ergebnisse dieser und anderer Arbeiten auf dem Gebiet der Schlaganfallforschung mögen manchmal nicht direkt in die klinische Forschung übertragbare Konzepte liefern. Trotzdem bieten sie eine solide Grundlage für weitere wissenschaftliche Ideen und Projekte, da Versuche mit bestimmten Substanzen und Zelltypen in derartiger Ausführung in der Realität nicht möglich wären.

Zusammenfassend lassen sich anhand der im Rahmen dieses Projektes durchgeführten Experimente sowie unter Berücksichtigung weiterer Ergebnisse unserer und anderer Arbeitsgruppen wichtige Erkenntnisse herleiten. Erstmals konnte die *in vivo* beobachtete Einwanderung von neutrophilen Granulozyten nach dem Schlaganfall durch *in vitro* Versuche erklärt werden. Wir haben auf molekulargenetischer Ebene die Wirkung des von den $\gamma\delta$ -T-Zellen produzierten IL-17 untersucht sowie eine Erklärung für seine entscheidende Rolle bei der Einleitung der Immunantwort und dem Sekundärschaden nach einem Schlaganfall gefunden. Somit könnte IL-17 zu einem wichtigen Ansatzpunkt im therapeutischen Vorgehen werden, da es eine Verbindung zwischen dem Immunsystem und dem ZNS darstellt. Des Weiteren gibt es bislang keine Hinweise für jegliche antiinflammatorische oder protektive Eigenschaften von diesem Zytokin und durch eine selektive Beeinflussung von IL-17-Signalwegen ließen sich systemische Nebeneffekte vermeiden. Wie bereits in der Einleitung angesprochen, wäre eine medikamentöse generelle Immunsuppression nach einem Schlaganfall von großem Nachteil, da es ohnehin zu einer endogenen Immunsuppression mit lokalen und generalisierten Infektionen kommt (Vogelgesang und Dressel 2011). Analog den bisher beschriebenen Prozessen hat auch die Post-Stroke-Immunsuppression eine ambivalente Natur: neben der negativen Auswirkung auf die systemische Abwehr sind die protektiven Effekte auf der ZNS-Ebene nicht zu vernachlässigen – sollten die immunologischen Vorgänge nach einem Schlaganfall ungebremst ablaufen, so könnte dies in einer autoimmunen Zerstörung des Gehirns enden, da wegen der zusammengebrochenen Blut-Hirn-

Schranke die ZNS-Bestandteile als Antigene den zirkulierenden Lymphozyten präsentiert worden wären (Kamel und Iadecola 2012).

Gleichzeitig zeigen zahlreiche Arbeiten, dass die einzige klinisch eingesetzte Behandlungsoption nach einem Schlaganfall – die Behandlung mit rtPA – als Nebenwirkungen Neurotoxizität und Aktivierung des Immunsystems nach sich zieht (Kaur et al. 2004, Kleinschnitz und Plesnila 2012). Insofern ergibt sich die Notwendigkeit einer Therapiesubstanz, die einerseits die Durchblutung im ischämischen Areal wiederherstellt, andererseits aber die frühe schädliche Komponente der Immunreaktion unterbindet, ohne die späte protektive und regenerative Komponente zu beeinflussen. Unter diesen Gesichtspunkten wäre beispielsweise ein IL-17-spezifischer Antikörper appliziert zusammen mit dem bereits verwendeten rtPA eine sinnvolle Kombination.

5. Zusammenfassung

Der ischämische Schlaganfall ist nach wie vor eine der häufigsten Ursachen für Tod und bleibende Behinderungen weltweit. Die jüngsten Forschungsergebnisse zeigen, dass neben dem primären Schaden durch den Gefäßverschluss dem sekundären Schaden durch die Reperfusion eine wichtige Rolle zukommt. Hierbei treten zahlreiche Immunzellen aus dem Blut durch die zusammengebrochene Blut-Hirn-Schranke ins Parenchym über, wobei ihre Entzündungsaktivität im ischämischen Gewebe den primären Schaden vergrößert.

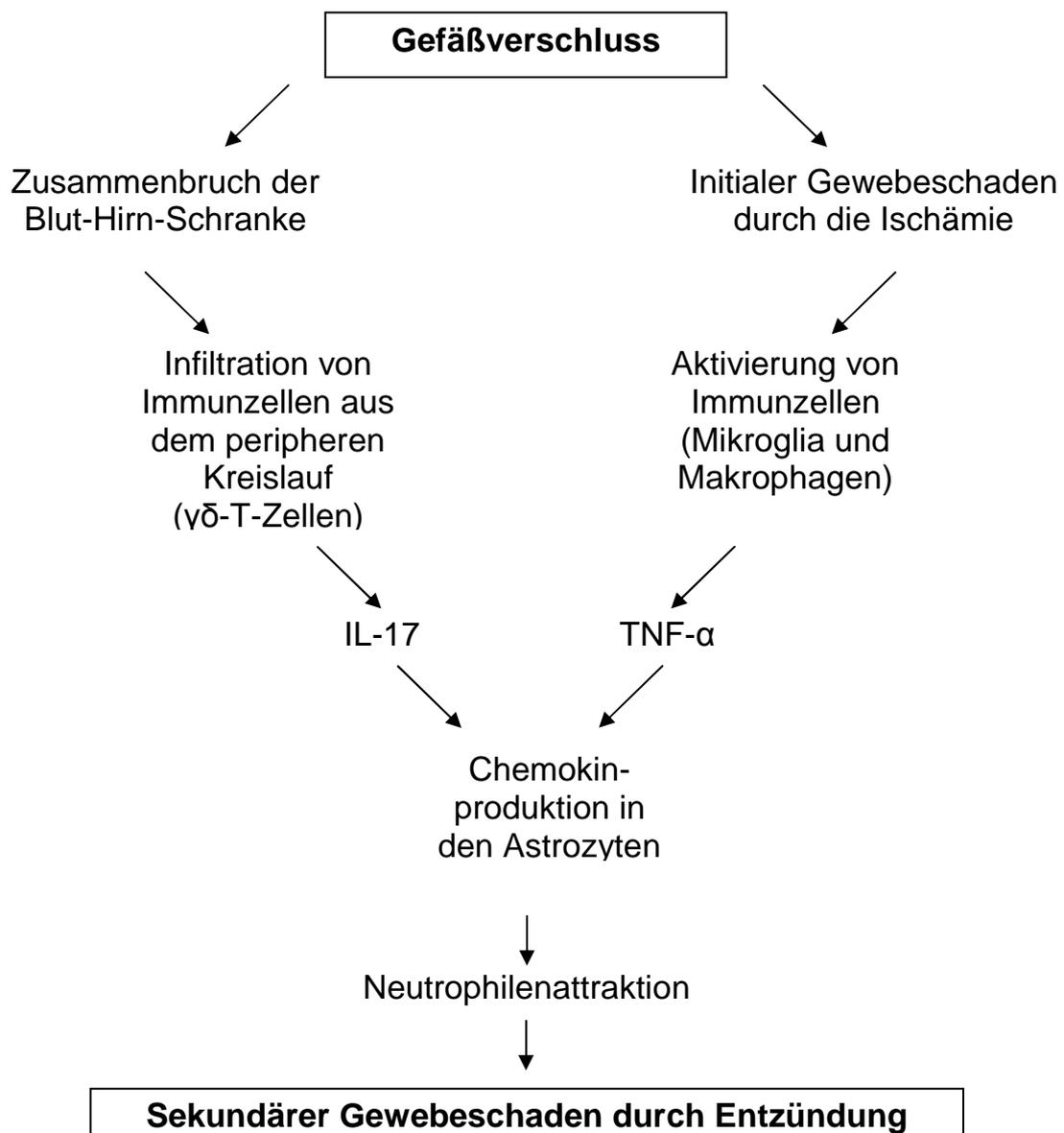
Die einzelnen Zellpopulationen tragen hierzu in unterschiedlichem Maße bei. Die absterbenden Neuronen schütten Gefahrensignale aus und aktivieren dadurch hirneigene Immunzellen, die Mikroglia; diese setzen proinflammatorische Zytokine frei und locken die Zellen des Immunsystems aus den Gefäßen ins Hirngewebe. Dabei kommt eine kritische Rolle den $\gamma\delta$ -T-Zellen zu, da diese frühzeitig einwandern und ein wichtiges proinflammatorisches Zytokin, Interleukin-17 produzieren. Des Weiteren hat speziell die Infiltration der neutrophilen Granulozyten einen besonders schädlichen Einfluss auf das Schicksal des Hirnparenchyms. Die vorliegende Arbeit hat das Ziel, die Rolle von IL-17 im Kontext der sekundären Gewebeschädigung beim ischämischen Schlaganfall zu charakterisieren und seinen Wirkungsmechanismus zu spezifizieren.

In den *in vitro* Experimenten dieser Arbeit wurden die Astrozyten als Zielzellen von IL-17 im ZNS nach einem Schlaganfall identifiziert. Außerdem zeigte sich, dass IL-17 erst in Kombination mit einem anderen proinflammatorischen Zytokin, TNF- α , seine volle immunologische Funktion im Kontext der frühen postischämischen Entzündungsreaktion entfaltet. Diese besteht in der Stabilisierung der mRNA von diversen durch TNF- α hochregulierten Chemokinen, Wachstumsfaktoren und Metalloproteinasen (insbesondere von CXCL1). Die entscheidende Konsequenz der kombinierten Stimulation durch IL-17 und TNF- α besteht damit in einer Amplifikation, nicht lediglich Addition, der Expression von entsprechenden Zielgenen. Unter diesen ist CXCL-1 hauptverantwortlich für die Neutrophileninfiltration nach einer zerebralen Ischämie. Neben der Induktion und Amplifikation der Neutrophileninfiltration, trägt IL-17 zusätzlich zum postischämischen Gewebeschaden durch die Induktion von

weiteren Molekülen (z.B. MMP3) bei, die unabhängig von infiltrierenden Neutrophilen zu einem Progress der ZNS-Schädigung führen können.

Im *in vivo* Teil konnten die Daten aus den *in vitro* Versuchen bestätigt werden: Tiere, denen $\gamma\delta$ -T-Zell- oder IL-17-Rezeptor fehlt, haben signifikant erniedrigte Chemokin-Levels, was mit der in Vorarbeiten nachgewiesenen geringeren Neutrophileninfiltration und reduzierten Schlaganfallvolumina im Einklang steht.

Die bisher bekannten und die in dieser Arbeit zusätzlich beschriebenen Abläufe lassen sich im nachstehenden Fließschema zusammenfassen:



6. Abkürzungsverzeichnis

(englische und deutsche Abkürzungen)

ANOVA	analysis of variance
AP-1	activator protein 1
APC	antigen-presenting cell
ASF	alternative splicing factor
ATP	Adenosintriphosphat
BME	Basal Medium Eagle
BSA	bovine serum albumine
CASPR	California Acute Stroke Pilot Registry
CCL	chemokine (C-C motif) ligand
CD	cluster of differentiation
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
COX-2	Cyclooxygenase-2
CT	computed tomography
CXCL	chemokine (C-X-C motif) ligand
DAMP	danger-associated molecular patterns
DAPI	Diamidinophenylindol
DC(s)	dendritic cell(s)
DNA	deoxyribonucleic acid
EAE	experimental autoimmune encephalomyelitis
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetat
ERK	extracellular-signal regulated kinase
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FCS	fetal calf serum
FTY20	Fingolimod (Immunsuppressivum bei multipler Sklerose)
g	mittlere Erdbeschleunigung
G-CSF	granulocyte colony stimulating factor
GFAP	glial fibrillary acidic protein
GM-CSF	granulocyte-macrophage colony stimulating factor
GRO α	growth regulated oncogene alpha
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure

Iba1	Ionized calcium-binding adapter molecule 1
ICAM	intercellular adhesion molecule
IFN-	interferon-
IL-	Interleukin-
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid Synthetase
JNK	c-Jun N-terminal kinase
KC	keratinocyte-derived chemokine
kDa	Kilodalton
-ko	-knock-out
LPS	Lipopolysaccharide
M	Mol/Molar
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MCAO	<i>*siehe (t)MCAO</i>
M-CSF	macrophage colony stimulating factor
MHC	major histocompatibility complex
MIF	macrophage migration inhibitory factor
MIP-2	macrophage inflammatory protein-2
MMP-	matrix metalloproteinase-
MPO	Myeloperoxidase
(m)RNA	(messenger) ribonucleic acid
MS	multiple Sklerose
N	Normal
NaCl	Natriumchlorid / Kochsalzlösung
NF-κB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
NGS	normal goat serum
NK	natural killer
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NO	nitric oxide (Stickstoffmonoxid)
OGD	oxygen glucose deprivation
OPC	oligodendrocyte precursor cells
PBS	phosphate buffered saline
PFA	Paraformaldehyd
PPARγ	peroxisome proliferator-activated receptor gamma
P/S	Penicillin/Streptomycin

Rag	recombination activating gene
RNA	ribonucleic acid
ROS	reactive oxygen species
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
RT-qPCR	real-time quantitative polymerase chain reaction
rtPA	recombinant tissue plasminogen activator
sham	Scheinoperation
TAK1	transforming growth factor beta-activated kinase 1
TCR	T-cell receptor
Tcrd	T-cell receptor delta chain
TGF- β	transforming growth factor β
Th	T helper
TLR	toll-like-receptor
(t)MCAO	(temporal) middle cerebral artery occlusion
TNF-	tumor necrosis factor-
TRAF	TNF receptor associated factor
VCAM	vascular cell adhesion molecule
WHO	world health organization
ZNS	zentrales Nervensystem

7. Literaturverzeichnis

Ahuja N, Andres-Hernando A, Altmann C, Bhargava R, Bacalja J, Webb RG, He Z, Edelstein CL, Faubel S (2012) Circulating IL-6 mediates lung injury via CXCL1 production after acute kidney injury in mice. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*. 303(6):F864-72.

Badiola N, Malagelada C, Llecha N, Hidalgo J, Comella JX, Sabriá J, Rodríguez-Alvarez J (2009) Activation of caspase-8 by tumour necrosis factor receptor 1 is necessary for caspase-3 activation and apoptosis in oxygen-glucose deprived cultured cortical cells. *Neurobiology of Disease*. 35:438–47.

Baud V, Karin M (2001) Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends in Cell Biology*. 11(9):372-7.

Beray-Berthat V, Palmier B, Plotkine M, Margail I (2003) Neutrophils do not contribute to infarction, oxidative stress, and no synthase activity in severe brain ischemia. *Experimental Neurology*. 182:446–454.

Berezowski V, Fukuda AM, Cecchelli R and Badaut J (2012) Endothelial Cells and Astrocytes:A Concerto en Duo in Ischemic Pathophysiology. *International Journal of Cell Biology*. 2012: 176287.

Biswas R, Datta S, Gupta JD, Novotny M, Tebo J, Hamilton TA (2003) Regulation of chemokine mRNA stability by lipopolysaccharide and IL-10. *Journal of Immunology*. 170(12):6202-8.

California Acute Stroke Pilot Registry (CASPR) Investigators (2005) Prioritizing interventions to improve rates of thrombolysis for ischemic stroke. *Neurology*. 64(4):654-9.

Cartier L, Hartley O, Dubois-Dauphin M, Krause KH (2005) Chemokine receptors in the central nervous system: role in brain inflammation and neurodegenerative diseases. *Brain Research Reviews*. 48(1):16-42.

Ceulemans AG, Zgavc T, Kooijman R, Hachimi-Idrissi S, Sarre S, Michotte Y (2010) The dual role of the neuroinflammatory response after ischemic stroke: modulatory effects of hypothermia. *Journal of Neuroinflammation*. 7:74.

Chandrasekar B, Smith JB, Freeman GL (2001) Ischemia-Reperfusion of Rat Myocardium Activates Nuclear Factor-kB and Induces Neutrophil Infiltration Via Lipopolysaccharide-Induced CXC Chemokine. *Circulation*. 103(18):2296-302.

Chapman KZ, Dale VQ, Dénes Á, Bennett G, Rothwell NJ, Allan SM, McColl BW (2009) A rapid and transient peripheral inflammatory response precedes brain inflammation after experimental stroke. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 29(11):1764-8.

Chesler M (2005) Failure and function of intracellular pH regulation in acute hypoxic-ischemic injury of astrocytes. *Glia*. 50(4):398-406.

Croxford AL, Mair F, Becher B (2012) IL-23: one cytokine in control of autoimmunity. *European Journal of Immunology*. 42 (9):2263-73.

Csiszar A, Ungvari Z (2004) Synergistic effects of vascular IL-17 and TNFalpha may promote coronary artery disease. *Medical Hypotheses*. 63(4):696-8.

Cuartero MI, Ballesteros I, Moraga A, Nombela F, Vivancos J, Hamilton JA, Corbí AL, Lizasoain I, Moro MA (2013) N2 Neutrophils, Novel Players in Brain Inflammation After Stroke: Modulation by the PPARγ Agonist Rosiglitazone. *Stroke*. 44(12):3498-508.

de Bilbao F, Arsenijevic D, Moll T, Garcia-Gabay I, Vallet P, Langhans W, Giannakopoulos P (2009) In vivo over-expression of interleukin-10 increases resistance to focal brain ischemia in mice. *Journal of Neurochemistry*. 110(1):12-22.

del Zoppo GJ (2010) The neurovascular unit in the setting of stroke. *Journal of Internal Medicine*. 267(2): 156-71.

Dobolyi A, Vincze C, Pál G, Lovas G (2012) The neuroprotective functions of transforming growth factor Beta proteins. *International Journal of Molecular Sciences*. 13(7):8219-58.

Donnan GA, Fisher M, Macleod M, Davis SM (2008) Stroke. *Lancet*. 371(9624):1612-23.

Easton AS (2013) Neutrophils and stroke - Can neutrophils mitigate disease in the central nervous system? *International Immunopharmacology*. 17(4):1218-25.

Erta M, Quintana A, and Hidalgo J (2012) Interleukin-6, a Major Cytokine in the Central Nervous System. *International Journal of Biological Sciences*. 8(9):1254-1266.

Fernandez-Cadenas I, Mendioroz M, Domingues-Montanari S, Del Rio-Espinola A, Delgado P, Ruiz A, Hernandez-Guillamon M, Giralt D, Chacon P, Navarro-Sobrino M, Ribo M, Molina CA, Alvarez-Sabin J, Rosell A, Montaner J (2011) Leukoaraiosis is associated with genes regulating blood-brain barrier homeostasis in ischaemic stroke patients. *European Journal of Neurology*. 18(6):826-35.

Gelderblom M, Leyboldt F, Steinbach K, Behrens D, Choe C, Siler DA, Arumugam TV, Orthey E, Gerloff C, Tolosa E, Magnus T (2009) Temporal and spatial dynamics of cerebral immune cell accumulation in stroke. *Stroke*. 40(5):1849-1857.

Gelderblom M, Weymar A, Bernreuther C, Velden J, Arunachalam P, Steinbach K, Orthey E, Arumugam TV, Leyboldt F, Simova O, Thom V, Friese MA, Prinz I, Hölscher C, Glatzel M, Korn T, Gerloff C, Tolosa E, Magnus T (2012) Neutralization of the IL-17 axis diminishes neutrophil invasion and protects from ischemic stroke. *Blood*. 120(18):3793-802.

Gertz K, Kronenberg G, Kälin RE, Baldinger T, Werner C, Balkaya M, Eom GD, Hellmann-Regen J, Kröber J, Miller KR, Lindauer U, Laufs U, Dirnagl U, Heppner FL, Endres M (2012) Essential role of interleukin-6 in post-stroke angiogenesis. *Brain*. 135(Pt 6): 1964-1980.

Giffard RG, Swanson RA (2005) Ischemia-induced programmed cell death in astrocytes. *Glia*. 50:299–306

Hamann I, Zipp F, Infante-Duarte C (2008) Therapeutic targeting of chemokine signaling in Multiple Sclerosis. *Journal of the Neurological Sciences*. 274(1-2):31-8.

Harris AK, Ergul A, Kozak A, Machado LS, Johnson MH, Fagan SC (2005) Effect of neutrophil depletion on gelatinase expression, edema formation and hemorrhagic transformation after focal ischemic stroke. *BMC Neuroscience*. 6:49.

Hartupée J, Liu C, Novotny M, Li X, and Hamilton T (2007) IL-17 Enhances Chemokine Gene Expression through mRNA Stabilization. *The Journal of Immunology*. 179: 4135–4141.

Hochegger K, Schätz T, Eller P, Tagwerker A, Heining D, Mayer G, Rosenkranz AR (2007) Role of alpha/beta and gamma/delta T cells in renal ischemia-reperfusion injury. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*. 293(3):F741-7.

Homepage der Weltgesundheitsorganisation (2006) The global burden of cerebrovascular disease. http://www.who.int/healthinfo/statistics/bod_cerebrovascular_diseases_stroke.pdf (Zugriff am 15.12.2012)

Hosomi N, Ban CR, Naya T, Takahashi T, Guo P, Song XY, Kohno M (2005) Tumor necrosis factor-alpha neutralization reduced cerebral edema through inhibition of matrix metalloproteinase production after transient focal cerebral ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 25:959-967.

Hu X., Li P., Guo Y., Wang H., Leak RK., Chen S., Gao Y., Chen J (2012) Microglia/ Macrophage Polarization Dynamics Reveal Novel Mechanism of Injury Expansion After Focal Cerebral Ischemia. *Stroke*. 43(11):3063-70.

Huang J, Upadhyay UM, Tamargo RJ (2006) Inflammation in stroke and focal cerebral ischemia. *Surgical Neurology*. 66:232–245.

Hurn PD, Subramanian S, Parker SM, Afentoulis ME, Kaler LJ, Vandenberg AA, Offner H (2007) T- and B-cell-deficient mice with experimental stroke have reduced lesion size and inflammation. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 27:1798 –1805.

Iadecola C, Anrather J (2011) The immunology of stroke: from mechanisms to translation. *Nature Medicine*. 17(7):796-808.

Ionita CC, Siddiqui AH, Levy EI, Hopkins LN, Snyder KV, Gibbons KJ (2011) Acute ischemic stroke and infections. *Journal of stroke and cerebrovascular diseases: the official journal of National Stroke Association*. 20(1):1-9.

Iwakura Y, Ishigame H, Saijo S, Nakae S (2011) Functional Specialization of Interleukin-17 Family Members. *Immunity*. 34 (2):149-62.

Jaeschke H (2006) Mechanisms of Liver Injury. II. Mechanisms of neutrophil-induced liver cell injury during hepatic ischemia-reperfusion and other acute inflammatory conditions. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*. 290(6):G1083-8.

Jensen KD, Su X, Shin S, Li L, Youssef S, Yamasaki S, Steinman L, Saito T, Locksley RM, Davis MM, Baumgarth N, Chien YH (2008) Thymic selection determines gammadelta T cell effector fate: antigen-naive cells make interleukin-17 and antigen-experienced cells make interferon gamma. *Immunity*. 29: 90–100.

Jin R, Yang G, Li G (2010) Molecular insights and therapeutic targets for blood-brain barrier disruption in ischemic stroke: critical role of matrix metalloproteinases and tissue-type plasminogen activator. *Neurobiology of disease*. 38(3):376-85.

Johnson EA, Dao TL, Guignet MA, Geddes CE, Koemeter-Cox AI, Kan RK (2011) Increased expression of the chemokines CXCL1 and MIP-1 α by resident brain cells precedes neutrophil infiltration in the brain following prolonged soman-induced status epilepticus in rats. *Journal of Neuroinflammation*. 8:41.

Kadhim HJ, Duchateau J, Sébire G (2008) Cytokines and brain injury: invited review. *Journal of Intensive Care Medicine*. 23(4):236-49.

Kamel H, Iadecola C (2012) Brain-immune interactions and ischemic stroke: clinical implications. *Archives of neurology*. 69(5):576-81.

Kang Z, Altuntas CZ, Gulen MF, Liu C, Giltiay N, Qin H, Liu L, Qian W, Ransohoff RM, Bergmann C, Stohlman S, Tuohy VK, Li X (2010) Astrocyte-restricted ablation of Interleukin-17-induced Act1-mediated signaling ameliorates autoimmune encephalomyelitis. *Immunity*. 32(3):414-25.

Kaur J, Zhao Z, Klein GM, Lo EH, Buchan AM (2004) The neurotoxicity of tissue plasminogen activator? *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 24(9):945-63.

Kawanokuchi J, Shimizu K, Nitta A, Yamada K, Mizuno T, Takeuchi H, Suzumura A (2008) Production and functions of IL-17 in microglia. *Journal of Neuroimmunology*. 194(1-2):54-61.

Kim JH, Min KJ, Seol W, Jou I, Joe EH (2010) Astrocytes in injury states rapidly produce anti-inflammatory factors and attenuate microglial inflammatory responses. *Journal of Neurochemistry*. 115(5):1161-71.

Kleinschnitz C, Plesnila N (2012) Experimentelle Ansätze zur Therapie des ischämischen Schlaganfalls. *Nervenarzt*. 83(10):1275-81.

Korn T, Petermann F (2012) Development and function of interleukin 17-producing $\gamma\delta$ T cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1247:34-45.

Kostandy BB (2012) The role of glutamate in neuronal ischemic injury: the role of spark in fire. *Neurological Sciences*. 33(2):223-37.

Kuboki S, Sakai N, Tschöp J, Edwards MJ, Lentsch AB, Caldwell CC (2009) Distinct contributions of CD4+ T cell subsets in hepatic ischemia/reperfusion injury. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*. 296(5):G1054-9.

Lambertsen KL, Biber K and Finsen B (2012) Inflammatory cytokines in experimental and human stroke. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 32, 1677–1698

Lambertsen KL, Clausen BH, Babcock AA, Gregersen R, Fenger C, Nielsen HH, Haugaard LS, Wirefeldt M, Nielsen M, Dagnaes-Hansen F, Bluethmann H, Faergeman NJ, Meldgaard M, Deierborg T, Finsen B (2009) Microglia protect neurons against ischemia by synthesis of tumor necrosis factor. *The Journal of Neuroscience*. 29:1319–30

Legein B, Temmerman L, Biessen EA, Lutgens E (2013) Inflammation and immune system interactions in atherosclerosis. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 70(20):3847-69.

Liao YH, Xia N, Zhou SF, Tang TT, Yan XX, Lv BJ, Nie SF, Wang J, Iwakura Y, Xiao H, Yuan J, Jevallee H, Wei F, Shi GP, Cheng X (2012) Interleukin-17A contributes to myocardial ischemia/reperfusion injury by regulating cardiomyocyte apoptosis and neutrophil infiltration. *Journal of the American College of Cardiology*. 59(4):420-9.

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. *Nature Medicine*. 15(2):192-199.

Liesz A, Zhou W, Mracskó É, Karcher S, Bauer H, Schwarting S, Sun L, Bruder D, Stegemann S, Cerwenka A, Sommer C, Dalpke AH, Veltkamp R (2011) Inhibition of lymphocyte trafficking shields the brain against deleterious neuroinflammation after stroke. *Brain*. 134(Pt 3):704-720.

Lindén A (2007) A role for the cytoplasmic adaptor protein Act1 in mediating IL-17 signaling. *Science's STKE: signal transduction knowledge environment*. 2007(398):re4.

Lindsberg PJ, Kaste M (2003) Thrombolysis for acute stroke. *Current Opinion in Neurology*. 16(1):73-80.

Liu W, Tang Y, Feng J (2011) Cross talk between activation of microglia and astrocytes in pathological conditions in the central nervous system. *Life sciences*. 89(5-6):141-6.

Losy J, Zaremba J, Skrobański P (2005) CXCL1 (GRO-alpha) chemokine in acute ischaemic stroke patients. *Folia Neuropathologica*. 43(2):97-102.

Lv M, Liu Y, Zhang J, Sun L, Liu Z, Zhang S, Wang B, Su D, Su Z (2011) Roles of inflammation response in microglia cell through Toll-like receptors 2/interleukin-23/interleukin-17 pathway in cerebral ischemia/reperfusion injury. *Neuroscience*. 176:162-72.

Ma M, Ma Y, Yi X, Guo R, Zhu W, Fan X, Xu G, Frey WH 2nd, Liu X (2008) Intranasal delivery of transforming growth factor-beta1 in mice after stroke reduces infarct volume and increases neurogenesis in the subventricular zone. *BMC Neuroscience*. 9:117.

Magnus T, Wiendl H, Kleinschnitz C (2012) Immune mechanisms of stroke. *Current opinion in neurology*. 5(3):334-40.

Mayo L, Quintana FJ, Weiner HL (2012) The innate immune system in demyelinating disease. *Immunological Reviews*. 248(1):170-87.

McColl BW, Rothwell NJ, Allan SM (2008) Systemic inflammation alters the kinetics of cerebrovascular tight junction disruption after experimental stroke in mice. *The Journal of Neuroscience*. 28(38):9451-62.

McColl BW, Rothwell NJ, Allan SM (2007) Systemic inflammatory stimulus potentiates the acute phase and CXC chemokine responses to experimental stroke and exacerbates brain damage via interleukin-1- and neutrophil-dependent mechanisms. *The Journal of Neuroscience*. 27(16):4403-12.

McCoy MK, Tansey MG (2008) TNF signaling inhibition in the CNS: implications for normal brain function and neurodegenerative disease. *Journal of Neuroinflammation*. 5:45.

Mirabelli-Badenier M, Braunersreuther V, Viviani GL, Dallegri F, Quercioli A, Veneselli E, Mach F, Montecucco F (2011) CC and CXC chemokines are pivotal mediators of cerebral injury in ischaemic stroke. *Thrombosis and Haemostasis*. 105(3):409-20.

Mojsilovic-Petrovic J, Callaghan D, Cui H, Dean C, Stanimirovic DB, Zhang W (2007) Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) is involved in the regulation of hypoxia-stimulated expression of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1/CCL2) and MCP-5 (Ccl12) in astrocytes. *Journal of Neuroinflammation*. 4:12.

Mulcahy NJ, Ross J, Rothwell NJ, Loddick SA (2003) Delayed administration of interleukin-1 receptor antagonist protects against transient cerebral ischaemia in the rat. *British Journal of Pharmacology*. 140, 471–476.

Munhoz CD, García-Bueno B, Madrigal JL, Lepsch LB, Scavone C, Leza JC (2008) Stress-induced neuroinflammation: mechanisms and new pharmacological targets. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 41(12):1037-46.

Murphy K.P (2012) Janeway's Immunology 8th edition. *Garland Science, Taylor & Francis Group, LLC*.

Nedergaard M, Dirnagl U (2005) Role of Glial Cells in Cerebral Ischemia. *Glia*. 50 (4): 281-6

Odyniec A, Szczepanik M, Mycko MP, Stasiolek M, Raine CS, Selmaj KW (2004) Gammadelta T cells enhance the expression of experimental autoimmune encephalomyelitis by promoting antigen presentation and IL-12 production. *Journal of Immunology*. 173(1): 682–94.

Omari KM, Lutz SE, Santambrogio L, Lira SA, Raine CS (2009). Neuroprotection and remyelination after autoimmune demyelination in mice that inducibly overexpress CXCL1. *The American Journal of Pathology*. 174(1):164-76.

Ooboshi H, Ibayashi S, Shichita T, Kumai Y, Takada J, Ago T, Arakawa S, Sugimori H, Kamouchi M, Kitazono T, Iida M (2005) Postischemic gene transfer of interleukin-10 protects against both focal and global brain ischemia. *Circulation*. 111(7): 913–919.

Paintlia MK, Paintlia AS, Singh AK, Singh I (2011) Synergistic activity of interleukin-17 and tumor necrosis factor- α enhances oxidative stress-mediated oligodendrocyte apoptosis. *Journal of Neurochemistry*. 116(4):508-21.

Pang L, Ye W, Che XM, Roessler BJ, Betz AL, Yang GY (2001) Reduction of inflammatory response in the mouse brain with adenoviral-mediated transforming growth factor- β 1 expression. *Stroke*. 32:544–552.

Paquet M1, Ribeiro FM, Guadagno J, Esseltine JL, Ferguson SS, Cregan SP (2013) Role of metabotropic glutamate receptor 5 signaling and homer in oxygen glucose deprivation-mediated astrocyte apoptosis. *Molecular Brain*. 6:9.

Prass K, Meisel C, Höflich C, Braun J, Halle E, Wolf T, Ruscher K, Victorov IV, Priller J, Dirnagl U, Volk HD, Meisel A (2003) Stroke-induced immunodeficiency promotes spontaneous bacterial infections and is mediated by sympathetic activation reversal by poststroke T helper cell type 1-like immunostimulation. *The Journal of Experimental Medicine*. 198(5):725-36.

Qian Y, Liu C, Hartupée J, Altuntas CZ, Gulen MF, Jane-Wit D, Xiao J, Lu Y, Giltiay N, Liu J, Kordula T, Zhang QW, Vallance B, Swaidani S, Aronica M, Tuohy VK, Hamilton T, Li X (2007) The adaptor Act1 is required for interleukin 17-dependent signaling associated with autoimmune and inflammatory disease. *Nature Immunology*. 8(3):247-56.

Ren X, Akiyoshi K, Dziennis S, Vandembark AA, Herson PS, Hurn PD, Offner H (2011) Regulatory B cells limit CNS inflammation and neurologic deficits in murine experimental stroke. *The Journal of Neuroscience*. 31(23):8556-63.

Reynolds JM, Martinez GJ, Chung Y, Dong C (2012) Toll-like receptor 4 signaling in T cells promotes autoimmune inflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 109(32):13064-9.

Roy M, Richard JF, Dumas A, Vallières L (2012) CXCL1 can be regulated by IL-6 and promotes granulocyte adhesion to brain capillaries during bacterial toxin exposure and encephalomyelitis. *Journal of Neuroinflammation*. 9:18.

Saha RN, Pahan K (2006) Regulation of inducible nitric oxide synthase gene in glial cells. *Antioxidants & Redox Signalling*. 8(5-6):929-47.

Saijo K, Glass CK (2011) Microglial cell origin and phenotypes in health and disease. *Nature reviews. Immunology*. 11(11):775-87.

Sakai N, Van Sweringen HL, Belizaire RM, Quillin RC, Schuster R, Blanchard J, Burns JM, Tevar AD, Edwards MJ, Lentsch AB (2012) Interleukin-37 reduces liver inflammatory injury via effects on hepatocytes and non-parenchymal cells. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 27(10):1609-16.

Shichita T, Sugiyama Y, Ooboshi H, Sugimori H, Nakagawa R, Takada I, Iwaki T, Okada Y, Iida M, Cua DJ, Iwakura Y, Yoshimura A (2009) Pivotal role of cerebral interleukin-17-producing gammadeltaT cells in the delayed phase of ischemic brain injury. *Nature Medicine*. 15(8):946-50.

Sofroniew MV, Vinters HV (2010) Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathologica*. 119(1):7-35.

Stott DJ, Falconer A, Miller H, Tilston JC, Langhorne P (2009) Urinary tract infection after stroke. *QJM: monthly journal of the Association of Physicians*. 102(4):243-249.

Stroo I, Stokman G, Teske GJ, Raven A, Butter LM, Florquin S, Leemans JC (2010) Chemokine expression in renal ischemia/reperfusion injury is most profound during the reparative phase. *International Immunology*. 22(6):433-42

Sun D, Novotny M, Bulek K, Liu C, Li X, Hamilton T (2011) Treatment with IL-17 prolongs the half-life of chemokine CXCL1 mRNA via the adaptor TRAF5 and the splicing-regulatory factor SF2 (ASF). *Nature Immunology*. 12(9):853-60.

Sutton CE, Lalor SJ, Sweeney CM, Brereton CF, Lavelle EC, Mills KH (2009) Interleukin-1 and IL-23 induce innate IL-17 production from gammadelta T cells, amplifying Th17 responses and autoimmunity. *Immunity*. 31(2):331-41.

Sutton CE, Mielke LA, Mills KH (2012) IL-17-producing $\gamma\delta$ T cells and innate lymphoid cells. *European Journal of Immunology*. 42(9):2221-31.

Suzuki S, Tanaka K, Suzuki N (2009) Ambivalent aspects of interleukin-6 in cerebral ischemia: inflammatory versus neurotrophic aspects. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*. 29(3):464-79.

Takano T, Oberheim N, Cotrina ML, Nedergaard M (2009). Astrocytes and ischemic injury. *Stroke*. 40(3 Suppl):S8-12.

Vantourout P, Hayday A (2013) Six-of-the-best: unique contributions of $\gamma\delta$ T cells to immunology. *Nature reviews. Immunology*. 13(2):88-100.

Vermeij FH, Scholte op Reimer WJ, de Man P, van Oostenbrugge RJ, Franke CL, de Jong G, de Kort PL, Dippel DW; Netherlands Stroke Survey Investigators (2009) Stroke-associated infection is an independent risk factor for poor outcome after acute ischemic stroke: data from the Netherlands Stroke Survey. *Cerebrovascular Diseases*. 27(5):465-71.

Veroni C, Gabriele L, Canini I, Castiello L, Coccia E, Remoli ME, Columba-Cabezas S, Aricò E, Aloisi F, Agresti C (2010) Activation of TNF receptor 2 in microglia promotes induction of anti-inflammatory pathways. *Molecular and cellular neurosciences*. 45(3):234-44.

Vila N, Castillo J, Dávalos A, Esteve A, Planas AM, Chamorro A (2003) Levels of anti-inflammatory cytokines and neurological worsening in acute ischemic stroke. *Stroke*. 34(3):671-5.

Vogelgesang A, Dressel A (2011). Immunological consequences of ischemic stroke: immunosuppression and autoimmunity. *Journal of Neuroimmunology*. 231(1-2):105-10.

Wang Q, Tang XN, Yenari MA (2007) The inflammatory response in stroke. *Journal of Neuroimmunology*. 184 (1-2): 53–68

Wang DD, Zhao YF, Wang GY, Sun B, Kong QF, Zhao K, Zhang Y, Wang JH, Liu YM, Mu LL, Wang DS, Li HL (2009) IL-17 potentiates neuronal injury induced by oxygen-glucose deprivation and affects neuronal IL-17 receptor expression. *Journal of Neuroimmunology*. 212(1-2):17-25.

Xing C, Arai K, Lo EH, Hommel M (2012) Pathophysiologic cascades in ischemic stroke. *International Journal of Stroke*. 7(5):378-85.

Xiong X, Barreto GE, Xu L, Ouyang YB, Xie X, Giffard RG (2011) Increased brain injury and worsened neurological outcome in interleukin-4 knockout mice after transient focal cerebral ischemia. *Stroke*. 42(7):2026-2032.

Xue L, Xie K, Han X, Yang Z, Qiu J, Zhao Z, Bao T (2011) Detrimental functions of IL-17A in renal ischemia-reperfusion injury in mice. *The Journal of Surgical Research*. 171(1):266-74.

Yamashita T, Abe K (2011) Therapeutic approaches to vascular protection in ischemic stroke. *Acta Medica Okayama*. 65(4):219-23.

Yenari MA, Kauppinen TM, Swanson RA (2010) Microglial activation in stroke: therapeutic targets. *Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*. 7(4):378-91.

Yepes M, Roussel BD, Ali C, Vivien D (2009) Tissue-type plasminogen activator in the ischemic brain: more than a thrombolytic. *Trends in Neurosciences*. 32(1):48-55.

Yilmaz G, Arumugam TV, Stokes KY, Granger DN (2006) Role of T lymphocytes and interferon-gamma in ischemic stroke. *Circulation*. 113:2105–2112.

Zou JY, Crews FT (2005) TNF alpha potentiates glutamate neurotoxicity by inhibiting glutamate uptake in organotypic brain slice cultures: neuroprotection by NF kappa B inhibition. *Brain Research*. 1034:11–24.

8. Danksagung

Als Erstes möchte ich mich bei Herrn Prof. Christian Gerloff, Direktor der Klinik für Neurologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf, sowie v.a. bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Tim Magnus, ltd. Oberarzt der vorgenannten Klinik und Leiter der Arbeitsgruppe ERSI (Experimental Research in Stroke and Inflammation), für die Bereitstellung der Promotionsstelle und die Betreuung bedanken.

In ganz besonderem Maße danke ich meinem Betreuer, Herrn Dr. med. Mathias Gelderblom, Oberarzt der Klinik für Neurologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf, der mich vom ersten Tag an in jeder Hinsicht unterstützt hat, mir die Einführung in die Thematik erleichterte sowie bei der Etablierung der Methoden stets zur Seite stand. Außerdem waren seine bereichernden Denkanstöße und konstruktive Kritik bei der Auswertung der Ergebnisse und der Erstellung des Manuskripts außerordentlich hilfreich.

Einen großen Dank spreche ich hiermit auch Frau Ellen Orthey aus, die mir insbesondere am Anfang aber auch später im Verlauf, beim Erlernen der verschiedenen Labortechniken geholfen hat und immer ein offenes Ohr anbot.

Des Weiteren möchte ich Frau Priyadharshini Arunachalam für ihren Beitrag zu den *in vivo* Experimenten danken – ohne ihre gewissenhafte Arbeit würde dem Gesamtkonzept dieser Dissertation ein praktischer Bezug fehlen.

Für die erfolgreiche Durchführung der Experimente sind auch viele andere Kollegen hilfreich gewesen – auf diesem Wege bedanke ich mich bei den Mitarbeitern aus unserem Kooperationslabor unter der Leitung von Frau PD Dr. rer. nat. Eva Tolosa und speziell beim Institut für Immunologie für die Mitbenutzung der Geräte sowie bei den Kollegen aus den Nachbarschaftslabors im Erdgeschoss des Campus Forschung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf.

Zusätzlich danke ich dem Graduiertenkolleg „Entzündung und Regeneration“ für die finanzielle Förderung und das Fortbildungsangebot.

Ein herzlicher Dank gilt auch meiner Familie - für ihre Geduld, Unterstützung und Inspiration, die diese Promotion überhaupt ermöglichten.

9. Lebenslauf

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen

10. 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.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: