



**Molekulare Mechanismen
der Aktivierungs- und Migrationskontrolle
identifizierter Mikrogliazellen und Makrophagen
nach experimenteller zerebraler Ischämie**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften im Fachbereich Biologie
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von
Jan-Kolja Strecker
aus Telgte
2009

Dekan:

Prof. Dr. Christian Klämbt

Erster Gutachter:

Prof. Dr. Wolf-Michael Weber

Zweiter Gutachter:

Prof. Dr. Wolf-Rüdiger Schäbitz

Tag der mündlichen Prüfung:

Tag der Promotion:

Zusammenfassung

Molekulare Mechanismen der Aktivierungs- und Migrationskontrolle identifizierter Mikrogliazellen und Makrophagen nach experimenteller zerebraler Ischämie

Jan-Kolja Strecker

Der Schlaganfall ist nach Erkrankungen des Herzkreislaufsystems und malignen Tumoren mit ca. 150.000 Fällen pro Jahr die dritthäufigste Todesursache in Deutschland. Mit 85% bildet die fokale zerebrale Ischämie durch embolischen oder thrombotischen Verschluss einer Gehirnarterie die häufigste ätiologische Ursache dieser Erkrankung. Die Möglichkeiten einer akuten Schlaganfalltherapie sind bis heute sehr begrenzt. Aufgrund zahlreicher Kontraindikationen und einem begrenzten Zeitfenster steht die zum heutigen Zeitpunkt effektivste Maßnahme, die Thrombolysetherapie, einer nur begrenzten Anzahl Patienten zur Verfügung.

Eine zerebrale Ischämie resultiert in einer komplexen Kaskade inflammatorischer, zellulärer Reaktionen, die das endgültige Infarktausmaß bestimmen. Im Verlaufe der entzündlichen Reaktion kommt es zu einer vermehrten Expression inflammatorischer Proteine, die in einer Aktivierung residenter Mikroglia und Rekrutierung hämatogener immunkompetenter Zellen resultiert. Aufgrund fehlender Marker, die eine Unterscheidung zwischen residenten Mikrogliazellen und immigrierten Makrophagen möglich machen, konnten jedoch bis zum heutigen Zeitpunkt die Rollen beider Zellpopulationen bei der Entwicklung des ischämischen Schadens nicht differenziert untersucht werden. Durch die Generierung für das grün fluoreszierende Protein transgener knochenmarkchimärer Mäuse war es nun möglich, die postischämische Reaktion residenter Mikroglia und immigrierter hämatogener Zellen differenziert zu untersuchen.

Unter der Hypothese einer zentralen Beteiligung des chemoattraktiven Proteins MCP-1 bei der postischämischen Schadenentwicklung wurden für die Experimente dieser Arbeit für das grün-fluoreszierende Protein transgene knochenmarkchimäre MCP-1-defiziente sowie nicht-defiziente Mäuse einer experimentellen transienten fokalen zerebralen Ischämie unterzogen. Es wurden vergleichende Analysen zur postischämischen neurologischen Erholung, Entwicklung des Infarktvolumens, der zellu-

lären Reaktion immunkompetenter Zellen, der Expression an Entzündungsreaktionen beteiligter Gene sowie der infarktinduzierten Disruption der Bluthirnschranke durchgeführt.

Die Analysen zeigten, dass MCP-1-defiziente Mäuse im Vergleich zu nicht-defizienten Tieren eine verbesserte postischämische neurologische Erholung aufweisen und kleinere Infarkt volumina entwickeln. In MCP-1-defizienten Mäusen kam es zu einer reduzierten Immigration hämatogener Makrophagen, neutrophiler Granulozyten und T-Zellen in das infarzierte Areal. Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass MCP-1 in unserem Schlaganfallmodell keinen Einfluss auf die Aktivierung residenter Mikroglia, dem Turn-Over perivaskulärer- und meningealer Makrophagen sowie die Immigration neuronaler Vorläuferzellen hat.

Genexpressionsuntersuchungen laser-mikrodissektionierter Gehirnareale zeigten zwischen den untersuchten Gruppen eine differente postischämische Expression pro- und anti-inflammatorischer Gene. Es konnte nachgewiesen werden, dass die proinflammatorischen Gene Interleukin-1 β und Interleukin-6 sowie die Matrixmetalloprotease-9 in MCP-1-defizienten Mäusen in geringerem Ausmaß exprimiert werden. Außerdem wurde gezeigt, dass das potenziell neuroprotektive Gen für den Peroxisom-Proliferator-aktivierten-Rezeptor- γ in der MCP-1-defizienten Gruppe in höherem Ausmaß reguliert war. Das Transkript für den Granulozyten-koloniestimulierender Faktor (G-CSF) wurde in beiden untersuchten Gruppen herauf reguliert, jedoch in der MCP-1-defizienten Gruppe in geringerer Kopienzahl.

Vergleichende Untersuchungen der postischämischen Entwicklung der Bluthirnschrankenintegrität zeigten in MCP-1-defizienten Tieren eine verminderte Durchlässigkeit für Proteine und eine weniger stark ausgeprägte Änderung der Morphologie des tight-junction-Proteins Zonula-occludens-1.

Da molekulare Mechanismen der chemokingesteuerten postischämischen Entzündungsregulation zwischen Nagetieren und Menschen einen hohen Homologiegrad aufweisen, kann diese Arbeit Hinweise dafür geben, dass eine temporäre gezielte Inhibition des Proteins MCP-1 auch innerhalb der humanen Schlaganfalltherapie zu einem Vorteil für die Patienten mit der Folge eines verringerten Schlaganfallvolumens, verminderter Bluthirnschrankendisruption sowie verminderten Einstroms potenziell zytotoxischer hämatogener Zellpopulationen führen könnte.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Der Schlaganfall.....	1
1.2	Pathophysiologie	2
1.3	Postischämische Inflammation.....	4
1.4	Aktivierung residenter Mikroglia.....	4
1.5	Rekrutierung hämatogener Leukozyten und Lymphozyten.....	6
1.6	Postischämische Neuroblastenmigration	9
1.7	Molekulare Mechanismen der postischämischen Inflammation	10
1.7.1	Aktivierung und Rekrutierung immunkompetenter Zellen.....	10
1.7.2	Postischämische Veränderung der Bluthirnschrankenintegrität	14
1.8	Ziel der vorliegenden Arbeit	17
2	Material und Methoden	19
2.1	Antikörper, Chemikalien und Reagenzien.....	19
2.2	Mauslinien.....	24
2.3	Methoden.....	26
2.3.1	Erzeugen knochenmarkchimärer Mäuse	26
2.3.1.1	Genotypisierung	26
2.3.1.2	Knochenmarkchimäre Mäuse.....	28
2.3.1.3	Generierung von GFP ^{+/+} /MCP-1 ^{+/+} - Knochenmarkdonoren.....	28
2.3.1.4	Generierung von GFP ^{+/+} /MCP-1 ^{-/-} - Knochenmarkdonoren.....	29
2.3.1.5	Bestrahlung der Mäuse.....	30
2.3.1.6	Gewinnung von GFP-Knochenmark.....	31
2.3.1.7	Knochenmarktransplantation.....	31
2.3.2	Transiente fokale zerebrale Ischämie	32
2.3.3	Tierpräparation und Gewebefixation.....	35
2.3.3.1	Anfertigung von Gefrierschnitten	36
2.3.4	Quantifizierung der postischämischen neurologischen Defizite	37
2.3.4.1	Rotarodtestung	37
2.3.4.2	Neuroscorebewertung	38
2.3.4.3	Gewicht.....	39
2.3.5	Bestimmung des Infarkt Volumens.....	39
2.3.5.1	Toluidinblaufärbung.....	41
2.3.6	Immunhistochemie	42
2.3.6.1	Validierung des postischämischen Gewebes Schadens.....	44
2.3.6.1.1	Neuronenfärbung.....	45
2.3.6.1.2	Astrozytenfärbung	46
2.3.6.2	Immunhistochemische Quantifizierung immunrelevanter Zellen	46
2.3.6.2.1	Mikroglia und Makrophagen	47
2.3.6.2.2	Neutrophile Granulozyten.....	48

2.3.6.2.3	T-Zellen.....	49
2.3.6.2.4	Neuroblasten.....	50
2.3.6.3	Quantifizierung und Analyse der Immunfärbung.....	51
2.3.6.3.1	Hämatogene Makrophagen und residente Mikroglia	52
2.3.6.3.2	Neutrophile Granulozyten.....	52
2.3.6.3.3	T-Zellen.....	52
2.3.6.3.4	Neuroblastenmigration	53
2.3.6.4	<i>Turn-Over</i> perivaskulärer und meningealer Makrophagen.....	53
2.4	Molekularbiologische Analysen.....	54
2.4.1	Gewebefixation- und Präparation.....	55
2.4.2	Anfertigen von Gefrierschnitten	55
2.4.3	Toluidinfärbung	56
2.4.4	<i>Lasercapture</i> Mikrodissektion	57
2.4.5	Extraktion von mRNA.....	58
2.4.6	Bestimmung der RNA-Integrität	59
2.4.7	cDNA-Synthese	60
2.4.8	Qualitätskontrolle der cDNA-Bibliotheken.....	61
2.4.9	Quantitative <i>Real-Time</i> -PCR.....	62
2.4.10	Validierung der qRT-PCR.....	66
2.4.11	Oligonukleotide für die Expressionsanalysen	67
2.4.12	Primerdesign für die Protein-Histidin Phosphatase	68
2.4.13	Qualitätskontrolle des PHP-Primerpaars	69
2.5	Analyse der postischämischen Bluthirnschrankenintegrität.....	70
2.5.1	Densitometrische Auswertung des FITC-Albumin-Übertritts.....	71
2.5.2	ELISA-Auswertung des FITC-Albumin-Übertritts	73
2.5.3	Begutachtung der Bluthirnschrankenintegrität	74
2.5.3.1	von-Willebrand-Faktor-Immunhistochemie	74
2.5.3.2	<i>Zonula-occludens-1</i> und Occludin-Immunhistochemie.....	75
3	Ergebnisteil.....	77
3.1	Zucht und Generierung knochenmarkchimärer Mäuse.....	77
3.1.1	Genotypisierung.....	77
3.1.2	Chimären	77
3.2	Verhaltenstestungen	78
3.2.1	Rotarod.....	78
3.2.2	Neuroscore	80
3.2.3	Gewicht.....	82
3.3	Entwicklung des ischämischen Gewebeschadens.....	83
3.3.1	Infarktvolumen.....	83
3.3.2	Neuronenschädigung	85
3.3.3	Astrogliose.....	85
3.4	Differenzierung zwischen Mikroglia und Makrophagen	86
3.4.1	Mikrogliaaktivierung.....	89
3.4.2	Rekrutierung hämatogener Makrophagen.....	91

3.5	Rekrutierung neutrophiler Granulozyten	93
3.6	T-Zellen-Immigration	96
3.7	Neuroblastenmigration	98
3.7.1	Neuroblastenimmigration in das <i>Corpus Callosum</i>	99
3.7.2	Neuroblastenimmigration in das infarzierte Striatum	102
3.7.3	Potentiell hämatogene DCX-positive Zellen	105
3.8	<i>Turn-Over</i> perivaskulärer und meningealer Makrophagen.....	106
3.8.1	<i>Turn-Over</i> meningealer Makrophagen.....	107
3.8.2	<i>Turn-Over</i> perivaskulärer Makrophagen.....	108
3.9	Molekularbiologische Untersuchungen.....	110
3.9.1	Bestimmung der mRNA-Qualität.....	110
3.9.2	MCP-1 ^{+/+} - und MCP-1 ^{-/-} -mRNA postischämisch	112
3.9.3	MCP-1 ^{+/+} - und MCP-1 ^{-/-} -Kontroll-mRNA ohne Ischämie.....	113
3.9.4	Qualitätskontrolle der cDNA-Bibliotheken.....	113
3.9.5	Primerentwicklung zur PHP-1-Expressionsanalyse	115
3.9.6	Molekulargenetische Reaktionen nach zerebraler Ischämie.....	117
3.9.7	Validierung der qRT-PCR.....	119
3.9.8	Vergleichende Expressionsanalysen	120
3.9.8.1	Postischämische Genexpression in MCP-1 ^{+/+} -Mäusen	121
3.9.8.2	Postischämische Genexpression in in MCP-1 ^{-/-} -Mäusen.....	123
3.9.8.3	Differentielle Expression in MCP-1 ^{+/+} - und MCP-1 ^{-/-} -Mäusen	126
3.9.8.4	Konstitutive Expressionsunterschiede ohne zerebrale Ischämie	130
3.10	Analyse der Bluthirnschrankenintegrität	132
3.10.1	Densitometrische Auswertung.....	133
3.10.2	FITC-Albumin-Quantifizierung im Gehirnparenchym.....	135
3.10.3	Morphologische Analyse der Bluthirnschrankenintegrität	137
3.10.3.1	FITC-Albumin-Kokalisation mit dem Gefäßendothel.....	137
3.10.3.2	Morphologische Begutachtung des <i>Zonula-Occludens-1</i> -Signals.....	138
3.10.3.3	Morphologische Begutachtung des Occludin-Signals	140
4	Diskussion	142
4.1	Neurologische Erholung nach zerebraler Ischämie	144
4.2	Entwicklung des ischämischen Schadens.....	145
4.2.1	Infarktvolume.....	145
4.2.2	Neuronenschädigung	146
4.2.3	Astrozytose.....	146
4.3	Mikrogliaaktivierung und Rekrutierung hämatogener Makrophagen..	147
4.3.1	Aktivierung residenter Mikroglia.....	148
4.3.2	Rekrutierung hämatogener Makrophagen.....	149
4.4	Rekrutierung neutrophiler Granulozyten	151
4.5	T-Zellen-Immigration	154
4.6	Neuroblastenmigration	155
4.6.1	Herkunft postischämisch immigrierter Neuroblasten.....	157
4.7	<i>Turn-Over</i> perivaskulärer und meningealer Makrophagen.....	158

4.8	Molekularbiologischer Analyse der postischämischen Inflammation...	159
4.8.1	Interleukin-1 β (IL-1 β)	159
4.8.2	Tumor Nekrose Faktor-1 (TNF-1)	161
4.8.3	Interleukin-6 (IL-6)	162
4.8.4	Granulozyten-Kolonie Stimulierender Faktor (G-CSF)	164
4.8.5	Peroxisom-Proliferator-Aktivierter-Rezeptor- γ (PPAR- γ)	165
4.8.6	Matrix-Metalloprotease 9 (MMP-9)	167
4.8.7	Metalloproteinase-Inhibitor-1 (TIMP-1)	168
4.8.8	Vaskuläres Zell-Adhäsionsprotein 1 (V-CAM-1)	169
4.8.9	Protein-Histidin-Phosphatase 1 (PHP-1)	170
4.9	Vergleichende Analyse der Bluthirnschrankenintegrität	172
5	Schlussfolgerung	175
6	Veröffentlichungen	179
7	Literatur	182
8	Danksagung	210

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AV594	Streptavidin, Alexa Fluor 594™ konjugiert
bp	Basenpaar
BAM	Biotinylierte Pferd anti-Maus IgG-Antikörper
BGaRb	Biotinylierter Ziege anti-Kaninchen IgG-Antikörper
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BR	Block-Reagenz™
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
Da	Dalton
DAPI	4'-6-Diamidino-2-Phenylindol
DCX	<i>Double Cortin X</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
G-CSF	Granulozyten-Kolonie Stimulierender Faktor
GFP	<i>green fluorescent protein</i> , grün fluoreszierendes Protein
ELISA	<i>enzyme linked immuno-sorbent assay</i>
Fa.	Firma
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
°C	Grad Celsius
g	Gramm
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i> , gliales fibrilläres saures Protein
h	Stunde
HAES	Hydroxyethylstärke
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
HRP	Meerrettich Peroxidase
IHC	Immunhistochemie
IL-1β	Interleukin-1β
IL-6	Interleukin-6
k	Kilo (als Vorsatz von SI-Einheiten, 10 ³)

K _M -Wert	Michaelis-Konstante
l	Liter
M	Mol
MCP-1	Monozyten chemotaktisches Protein-1
MMP-9	Matrix-Metalloprotease-9
m	Milli (als Vorsatz von SI-Einheiten, 10 ⁻³)
min	Minute
μ	Mikro (als Vorsatz von SI-Einheiten, 10 ⁻⁶)
n	Nano (als Vorsatz von SI-Einheiten, 10 ⁻⁹)
NeuN	<i>Neuronal Nuclei</i>
p	Pico (als Vorsatz von SI-Einheiten, 10 ⁻¹²)
PBS	Phosphatgefufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PHP	Protein-Histidin Phosphatase-1
PPAR-γ	Peroxisom-Proliferator-Aktivierter-Rezeptor-γ
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
qRT-PCR	quantitative <i>Real-Time</i> -Polymerase-Kettenreaktion
s	Sekunde
Tab.	Tabelle
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TBST	Tris mit Tween-20®
TIMP-1	Metalloprotease-Inhibitor 1
TNF-1	Tumor Nekrose Faktor-1
Tris	Tris-(hydroxylmethyl)-diamin
U/min.	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
V-CAM-1	Vaskuläres Zell-Adhäsionsprotein-1

v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
ZNS	Zentrales Nervensystem
ZO-1	<i>Zonula Occludens-1</i>

1 Einleitung

1.1 Der Schlaganfall

Mit einer Inzidenz von 182 / 100000 Einwohnern ist der Schlaganfall neben dem Herzinfarkt sowie Krebserkrankungen eine der häufigsten Ursachen für Tod und Behinderung in Deutschland (Kolominsky-Rabas et al., 1998).

Etwa ein Drittel der Patienten versterben innerhalb der ersten vier Wochen. Weitere 30 Prozent bleiben dauerhaft schwerbehindert und sind auf Hilfe Dritter angewiesen. Steigende Lebenserwartung, zunehmende Inzidenz sowie ungünstige Prognose und Mortalität führen zu einer kontinuierlich zunehmenden sozioökonomischen und klinischen Belastung (Poeck et al., 1998; Donnan et al., 2008).

Der ischämische Gehirnfarkt ist mit 85 Prozent die häufigste Form des Schlaganfalls. Durch embolischen oder thrombotischen Verschluss kommt es hierbei zu einer temporären oder permanenten Durchblutungsstörung einer Gehirn versorgenden Arterie. In Folge des Sauerstoff- und Nährstoffmangels setzt innerhalb von Minuten eine komplexe Kaskade zellulärer Reaktionen ein, deren Verlauf das endgültige Infarktausmaß bestimmt. Diese Kaskade verläuft in vier Phasen. Exzitotoxische Phase, Peri-Infarkt-Depolarisation, Inflammation und Apoptose sind die bisher nachgewiesenen Mechanismen, die für die postischämische Schädigung von Infarktkern sowie peripheren Territorien verantwortlich sind (Dirnagl et al., 1999).

Zahlreiche Forschungsergebnisse haben gezeigt, dass das Gehirngewebe nach einem Schlaganfall im später resultierenden Infarktareal nicht sofort zerstört wird. Hierbei kommt der Penumbra, dem Randgebiet der Infarktzone, eine besondere Bedeutung zu. Neurone innerhalb dieses Areal sind aufgrund von

Minderperfusion und Substratmangel funktionell gestört, können aber prinzipiell für einen unbestimmten Zeitraum überleben (Garcia et al., 1989; Fisher et al., 1996).

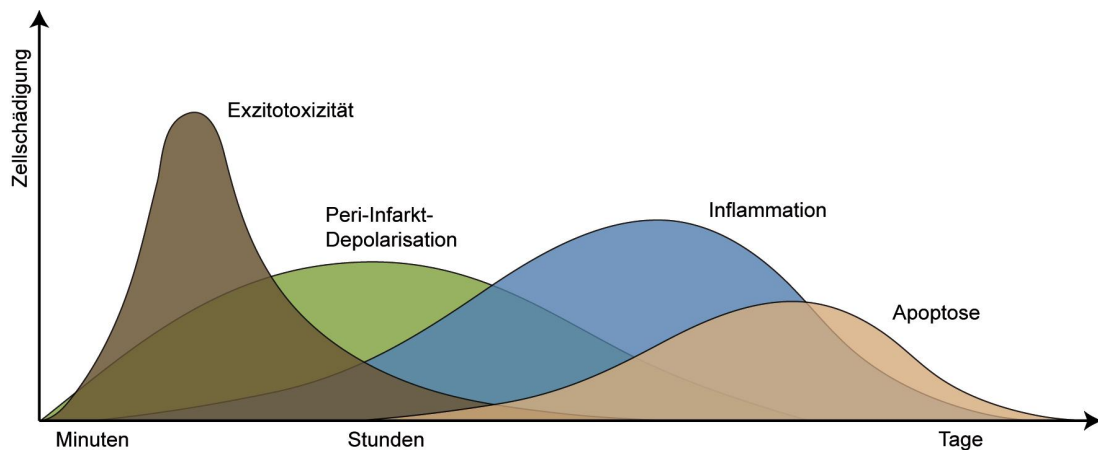


Abbildung 1.1: Zeitlicher Ablauf der postischämischen Schädenskaskade durch Exzitotoxizität, Peri-Infarkt-Depolarisationen, Inflammation und Apoptose.

1.2 Pathophysiologie

Wenige Minuten nach Beginn des Schlaganfalls versagt die sauerstoffabhängige oxidative Phosphorylierung der betroffenen Gehirnzellen. Neurone und Gliazellen depolarisieren und werden in Folge proteolytischer sowie osmotischer Prozesse irreversibel geschädigt. Aufgrund der zellulären Membranschädigung strömen Calciumionen in den Extrazellulärraum und aktivieren spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle benachbarter Zellen. Dies führt zu einer Freisetzung exzitatorischer Aminosäuren, insbesondere von Glutamat. Glutamat bindet an NMDA-Rezeptoren (N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptoren), mit der Folge weiterer Freisetzung von Calcium und Exzitation überlebender Neurone bei gleichzeitigem Substratmangel.

Als Folge des zellulären Ca^{2+} -Verlusts strömen Natriumionen und Wassermoleküle in die betroffenen Zellen wodurch es zur Ausbildung eines postischä-

mischen Gehirnödems kommt. Nach einigen Stunden entstehen im Randbereich des Infarktes Peri-Infarkt-Depolarisationen. Glutamat und Calcium überaktivieren Zellen innerhalb der Penumbra, die noch in der Lage sind zu depolarisieren. Aufgrund von Energie- und Substratmangel verbleiben diese Zellen jedoch schließlich im depolarisierten Zustand.

In seiner Funktion als ubiquitärer *second-messenger* aktiviert das freigesetzte Calcium außerdem zahlreiche Enzyme, die zur Bildung zytotoxischer Sauerstoffradikale sowie der Degradation von Zytoskelett und extrazellulärer Matrix beitragen. DNA-, Membran- und Proteinschädigung, freie Radikale sowie die Aktivierung von Proteasen und Caspasen setzen apoptotische Prozesse in Gang, die innerhalb der ersten Tage postischämisch den Gewebeschaden, insbesondere in der weniger von Nekrose betroffenen Penumbra, vergrößern (Hossmann et al., 1994; Dirnagl et al., 1999; Lo et al., 2005).

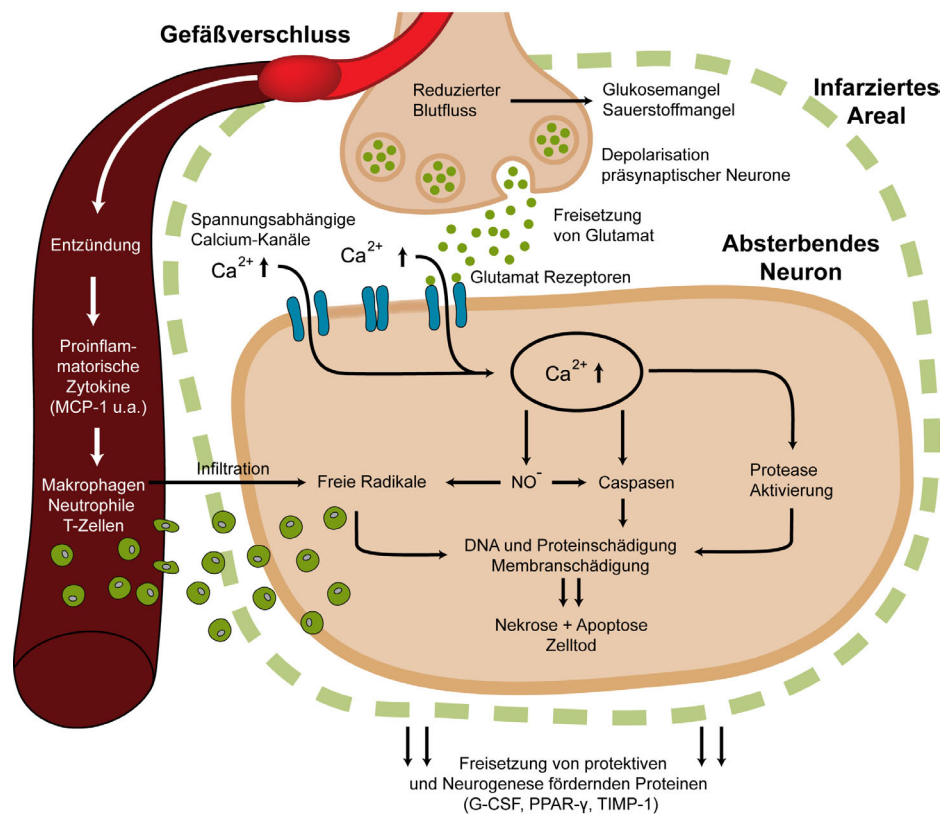


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der Pathophysiologie nach zerebraler Ischämie.

1.3 Postischämische Inflammation

Eine zentrale Rolle bei der Entwicklung des ischämischen Schadens wird den entzündlichen Reaktionen nach einem Schlaganfall zuteil. Sauerstoff- und Substratmangel, Exzitation sowie die Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies führen zu einer vermehrten Expression inflammatorischer Gene durch die geschädigten Zellen. Diese Prozesse setzen bereits innerhalb weniger Stunden nach dem Schlaganfall ein und dauern mehrere Tage an.

Dabei kommt es insbesondere zur Expression einer Vielzahl regulatorischer Proteine wie Zytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren, die sowohl zytotoxische aber auch neurotrophe Eigenschaften aufweisen. Chemokine wie MCP-1 (Monozyten Chemoattraktives Protein-1), TNF-1 (Tumor Nekrose Faktor-1), IL-1 β (Interleukin-1 β) oder IL-6 (Interleukin-6) sind Peptidhormone mit chemotaktischen Eigenschaften, die für die Aktivierung immunkompetenter Zellen des Gehirns sowie für die Rekrutierung hämatogener Leukozyten durch die Bluthirnschranke hindurch in das infarzierte Gehirnparenchym verantwortlich sind.

Zu den an der inflammatorischen Reaktion beteiligten Zellen gehören neben der residenten Mikroglia insbesondere Monozyten, Makrophagen, neutrophile Granulozyten, T-Zellen und Neuroblasten (Liu et al., 1994; Wang et al., 1994; Wang et al., 1995; Schilling et al., 2003; Sawamoto et al., 2006).

1.4 Aktivierung residenter Mikroglia

Da das zentrale Nervensystem durch die Ausbildung der Bluthirnschranke vom Blutgefäßsystem abgeschirmt ist und hämatogene Immunzellen dadurch erst verzögert in das ischämische Gewebe infiltrieren können, bedarf es nach pathophysiologischen Veränderungen innerhalb des Gehirns einer immu-

kompetenten Zellpopulation, die unmittelbar auf Veränderungen reagieren kann. Diese Aufgabe wird der residenten Mikroglia zuteil. Im ruhenden Gehirn zeigen Mikrogliazellen eine feine Ramifizierung, deren zahlreiche Fortsätze die umgebende extrazelluläre Matrix abtasten, überwachen und für den Erhalt der elektrochemischen Homöostase sorgen (Stoll et al., 1998; Nimmerjahn et al., 2005).

Als Reaktion auf verschiedene Stimuli wie Verletzung, Infektion oder Ischämie reagiert Mikroglia hochsensitiv mit Rückbildung der Ramifizierung, Proliferation und amöboider Fortbewegung in Richtung des betroffenen Gewebes (Abb. 1.3). Bereits wenige Stunden nach einem Schlaganfall findet sich aktivierte Mikroglia innerhalb des infarzierten Areals sowie der Penumbra und kann dort für mehrere Wochen nachgewiesen werden (Hughes et al., 2001; Schilling et al., 2003; Denes et al., 2007).

Aktivierte Mikrogliazellen exprimieren Chemokine, Wachstumsfaktoren, entgiften reaktive Sauerstoffspezies, phagozytieren Zellebris und fungieren als Antigen präsentierende Zellen (Needergard et al., 2005). Da Mikroglia nach einem Schlaganfall neuroprotektive Wachstumsfaktoren wie NGF (*Nerve-Growth-Factor*) oder BDNF (*Brain-Derived-Neurotrophic-Factor*) exprimiert, werden dieser Zellpopulation vor allem neurotrophe Eigenschaften nach einem Schlaganfall zugesprochen (Elkabes et al., 1996; Miwa et al., 1997; Streit et al., 2002).

Postischämisch aktivierte Mikroglia sezerniert jedoch auch potenziell neurotoxische Substanzen in Form von proinflammatorischen Chemokinen wie MCP-1, TNF-1 oder IL-1 β , die zu einer verstärkten Aktivierung und Rekrutierung immunkompetenter Zellen führen (Loddick et al. 1996; Sairanen et al., 1997; Hughes et al., 2002; Dziewulska et al., 2003). Des Weiteren wird diskutiert, ob Mikroglia durch die Expression von MMP-9 (Matrix-Metalloprotease-9), einer Endopeptidase, an der postischämischen Schädigung der Bluthirnschranke beteiligt ist (del Zoppo et al., 2007).

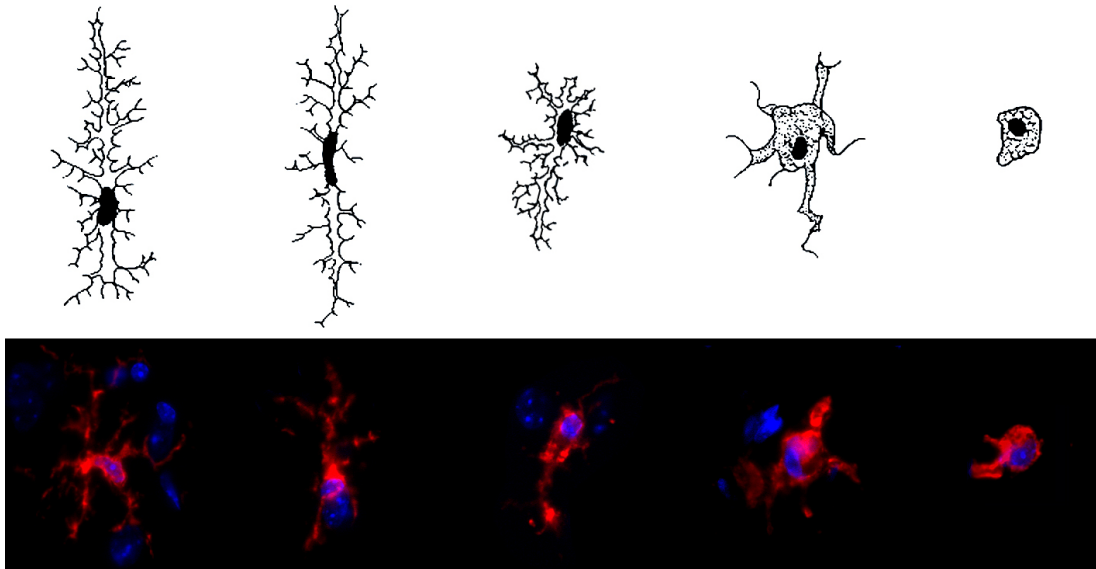


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung und immunhistochemische Aufnahmen zur Aktivierung und Morphologieveränderung von Mikrogliazellen. Nach Aktivierung zeigen die Zellen einen Rückgang der Ramifizierung und nehmen eine zunehmend rundliche Form an. In diesem Zustand sind Mikrogliazellen zu amöboider Bewegung fähig und nicht mehr von hämatogenen Makrophagen zu unterscheiden.

1.5 Rekrutierung hämatogener Leukozyten und Lymphozyten

Entzündliche Prozesse innerhalb des zentralen Nervensystems sind neben der Aktivierung residenter Mikroglia durch eine Infiltration hämatogener Zellen charakterisiert. Nach zerebraler Ischämie werden von den betroffenen Gehirnzellen eine Vielzahl regulatorischer Proteine exprimiert, die kapilläre Endothelzellen dazu anregen, Adhäsionsproteine zu exprimieren und diese luminal zu präsentieren (deGraba 1998).

V-CAM-1 (Vaskuläres Zell-Adhäsionsprotein-1) spielt bei der Rekrutierung hämatogener Zellen in das infarzierte Gewebe eine zentrale Rolle. Durch MCP-1, TNF-1 und IL-1 β induziert, interagiert V-CAM-1 mit Oberflächenrezeptoren zirkulierender hämatogener Zellen, die zunächst an der Kapillarwand adhären und anschließend, durch das Gefäßendothel hindurch, die Bluthirnschranke überwindend, das Gehirnparenchym infiltrieren (Panés et al., 1998; Dobbie et al., 1999).

Bereits nach wenigen Stunden immigrieren neutrophile Granulozyten in das Infarktareal. Im murinen Schlaganfallmodell konnte die maximale Anzahl dieser Leukozytensubpopulation vier Tage postischämisch nachgewiesen werden (Yamagami et al., 1999). Die genauen Aufgaben neutrophiler Granulozyten sind bis heute nicht bekannt, jedoch wird diskutiert, dass neutrophile Granulozyten durch Expression proinflammatorischer Proteine sowie Matrix-Metalloproteasen zu einer zusätzlichen zeitlich versetzten Schädigung des Gehirngewebes, insbesondere innerhalb der Penumbra, verantwortlich sind (Stoll et al., 1998; Mukaida et al., 1998; Justicia et al., 2003; Hisao et al. 2007).

Nach etwa einem Tag folgen den neutrophilen Granulozyten, ebenfalls durch Adhäsionsproteine rekrutiert, Monozyten und Makrophagen, die nach etwa einer Woche gemeinsam mit der Mikroglia den dominierenden Anteil inflammatorischer Zellen im Infarktareal stellen (Schilling et al., 2003). Hämatogene Monozyten und Makrophagen phagozytieren innerhalb des betroffenen Gehirngewebes Zelldebris, stellen aber auch eine Quelle für proinflammatorischer Zytokine, Chemokine und reaktive Sauerstoffspezies dar. Daher werden insbesondere immigrierten Monozyten und Makrophagen neurotoxische Eigenschaften bei der postischämischen Schadenentwicklung zugesprochen (Danton et al, 2003).

T-Zellen stellen die späteste in das Infarktgebiet immigrierende Zellpopulation dar. Etwa zwei bis vier Tage nach einem Schlaganfall kann eine zunehmende Anzahl hämatogener Lymphozyten im infarzierten Gehirngewebe nachgewiesen werden. T-Zellen werden durch MCP-1, TNF-1 und IL-6 (Interleukin-6) aktiviert, kommunizieren mit antigenpräsentierenden Zellen und exprimieren eine Vielzahl pro- und anti-inflammatorischer Proteine (Neumann et al., 1997; Stevens et al., 2002; Li et al., 2005). Den hämatogenen Lymphozyten wird bei der Entwicklung der postischämischen Schädigung vor allem eine schädigende Rolle zugesprochen (Becker et al., 2001; Huang et al., 2001).

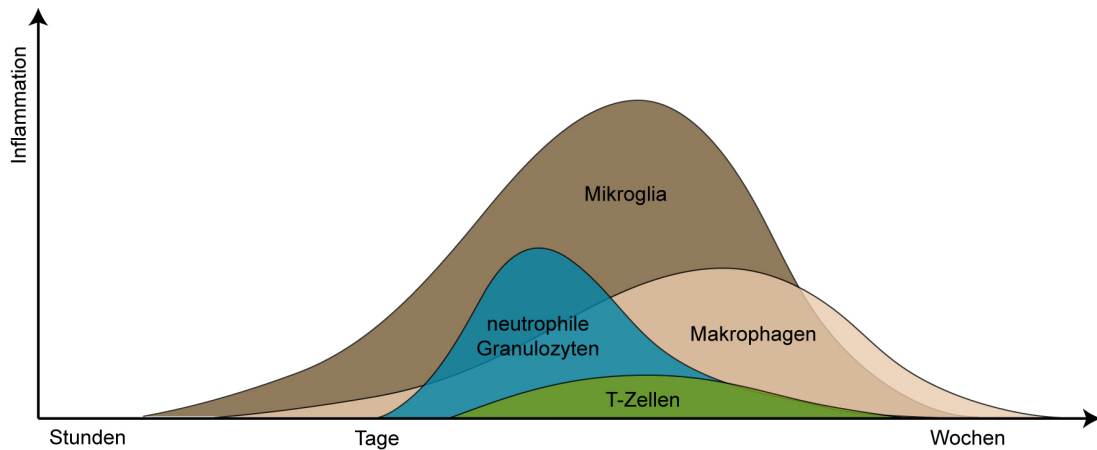


Abbildung 1.4: Zeitlich versetzte Aktivierung und Rekrutierung residenter und hämatogener Zellen in das infarzierte Areal nach transientser fokaler zerebraler Ischämie in chimären Wildtypmäusen.

Die Forschungen zu einer genaueren Aufklärung der molekularen Zusammenhänge von Mikrogliaaktivierung und Makrophagenrekrutierung sowie eine differenzierte Analyse der Beteiligung beider Zellpopulation an der Entwicklung des ischämischen Schadens war bisher nicht möglich. Aktivierte residente Mikroglia und infiltrierende Makrophagen sind morphologisch identisch und exprimieren die gleichen Oberflächenmarker und sind damit sowohl morphologisch als auch histologisch nicht voneinander zu unterscheiden. Erst durch die Entwicklung des Modells der GFP-transgenen knochenmarkchimären Mäuse ist es seit kurzem möglich, beide Zelltypen voneinander zu differenzieren (Schilling et al., 2003).

Bei den knochenmarkchimären Mäusen exprimieren sämtliche aus dem Knochenmark stammenden kernhaltigen Zellen das grün fluoreszierende Protein (GFP). Somit sind immunhistochemisch, in Kombination mit für beide Zellpopulationen spezifischen Antikörpern (z.B. F4/80), aktivierte Mikrogliazellen (F4/80-positiv, GFP-negativ) eindeutig von hämatogenen Makrophagen (F4/80-positiv, GFP-positiv) unterscheidbar.

1.6 Postischämische Neuroblastenmigration

Neueste Erkenntnisse der Schlaganfallforschung konnten belegen, dass neben hämatogenen Zellen und aktivierter Mikroglia eine weitere Zellpopulation nach einem Schlaganfall in das infarzierte Gewebe immigriert. Neuroblasten, neuronale Vorläuferzellen, bewegen sich im gesunden Gehirn entlang dem rostralen Migrationsstrom in Richtung des *Bulbus olfactorius* und differenzieren dort zu periglomerulären Neuronen. Als Reaktion auf eine zerebrale Ischämie proliferieren Neuroblasten innerhalb der Subventrikularzone, immigrieren in das infarzierte Gewebe und differenzieren dort im Anschluss zu adulten Neuronen (Doetsch et al., 1997; García-Verdugo et al., 1998; Arvidsson et al., 2002; Jin et al., 2003). Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass die postischämische Neurogenese innerhalb der Subventrikularzone unter anderem durch den hämatopoetischen Faktor G-CSF (Granulozyten-Kolonie Stimulierender Faktor) reguliert wird. Neben der Neurogeneseregulation konnte gezeigt werden, dass G-CSF innerhalb des zentralen Nervensystems postischämisch von Neuronen exprimiert wird und insbesondere neuroprotektive und anti-apoptotische Eigenschaften hat (Schneider et al., 2005; Xiao et al., 2007).

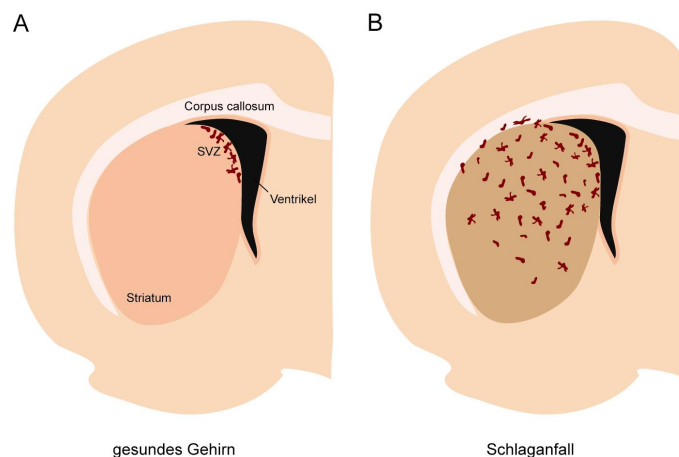


Abbildung 1.5: Schematische Darstellung der postischämischen Neuroblastenmigration. **A:** Im gesunden Gehirn bewegen sich neuronale Stammzellen von caudal entlang dem rostralen Migrationsstrom. **B:** Nach einem Schlaganfall proliferieren Neuroblasten innerhalb der Subventrikularzone und infiltrieren innerhalb weniger Tage das infarzierte Areal (dunkelbraun) und differenzieren dort zu Neuronen. SVZ = Subventrikularzone.

1.7 Molekulare Mechanismen der postischämischen Inflammation

1.7.1 Aktivierung und Rekrutierung immunkompetenter Zellen

Nach einem Schlaganfall exprimieren und sezernieren Neurone, Astrozyten, Mikroglia und immigrierte Leukozyten eine Vielzahl regulatorischer Proteine wie Zytokine und Wachstumsfaktoren. Den Chemokinen, einer Untergruppe der Zytokine wird bei der Regulation der inflammatorischen Reaktion eine zentrale Rolle zuteil. Chemokine sind Proteine geringen Molekulargewichts mit zellspezifischen chemotaktischen Eigenschaften, die für die Zellrekrutierung und -Migration von entscheidender Bedeutung sind (Balkwill 1998). Effektorzellen immigrieren in das ischämische Gewebe, indem sie Konzentrationsgradienten verschiedener Chemokine folgen. Zentraler Mediator für die Monozyten- und Makrophagenrekrutierung aus dem Blut in das infarzierte Gewebe ist das proinflammatorische Chemokin MCP-1.

MCP-1 ist eines der wichtigsten Mitglieder innerhalb der Chemokinfamilie und induziert während entzündlicher Prozesse die Infiltration von Leukozyten. Bei der Pathogenese zahlreicher Erkrankungen, die durch einen Einstrom von Monozyten und Makrophagen charakterisiert sind, spielt MCP-1 eine entscheidende Rolle. So konnte bereits die Beteiligung von MCP-1 an der Entwicklung von Multipler Sklerose, rheumatischer Arthritis oder Arteriosklerose nachgewiesen werden (Gong et al., 1997; Harrington 2000; Gaupp et al., 2003). CCR-2, das Effektorprotein für MCP-1 ist ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor. Dadurch kann MCP-1, neben gerichteter Zellmigration, weitere intrazelluläre Prozesse induzieren (Abb. 1.5). Die Bindung von MCP-1 an CCR-2 führt zu G-Protein-regulierter Aktivierung der Proteinkinase C, die unter anderem den Transkriptionsfaktor NF- κ B (Nukleärer Faktor- κ B) phosphoryliert. Dies führt zur Zelltyp abhängigen Expression zahlreicher proinflammatorischer Gene wie IL-1 β , IL-6, TNF-1, MCP-1 oder im Falle von Endothelzellen, zur lumina-

len Präsentation von Adhäsionsmolekülen (Shin et al., 2002; Mattson 2005; Hayden et al., 2006).

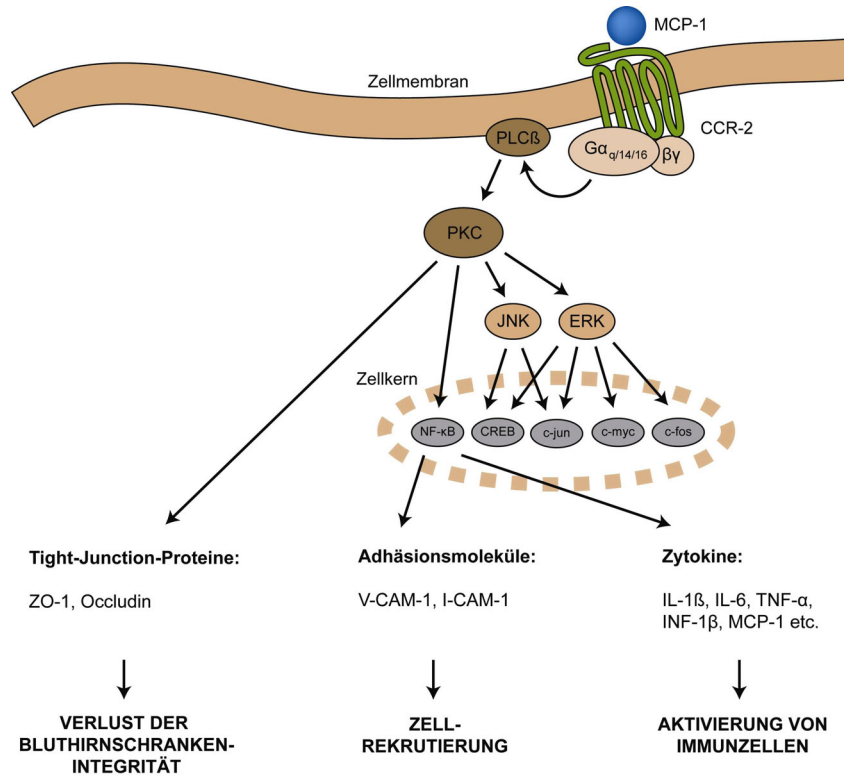


Abbildung 1.5: Schematische Darstellung der MCP-1 / CCR-2-induzierten Aktivierung der Proteinase C und des nukleären Faktor-κB.

MCP-1 wird nach zerebraler Ischämie insbesondere von Astrozyten, Mikroglia und Neuronen exprimiert (Che at al., 2001; Deng et al., 2008). Kapilläre Endothelzellen exprimieren den für MCP-1 spezifischen Rezeptor CCR-2 und werden durch die Aktivierung von MCP-1 dazu veranlasst, luminal Adhäsionsproteine (u. a. V-CAM-1) zu präsentieren, die die Rekrutierung hämatogener Zellen einleiten (Andjelkovic et al., 2000).

Nach Eintritt in den perivaskulären Raum folgen CCR-2-exprimierende hämatogene Zellen dem MCP-1-Gradienten in das infarzierte Gewebe. Bisher konnte CCR-2 auf Monozyten, Makrophagen sowie T-Zellen nachgewiesen werden. (Chen at al., 2002; Mahad et al., 2003; Brühl et al., 2004).

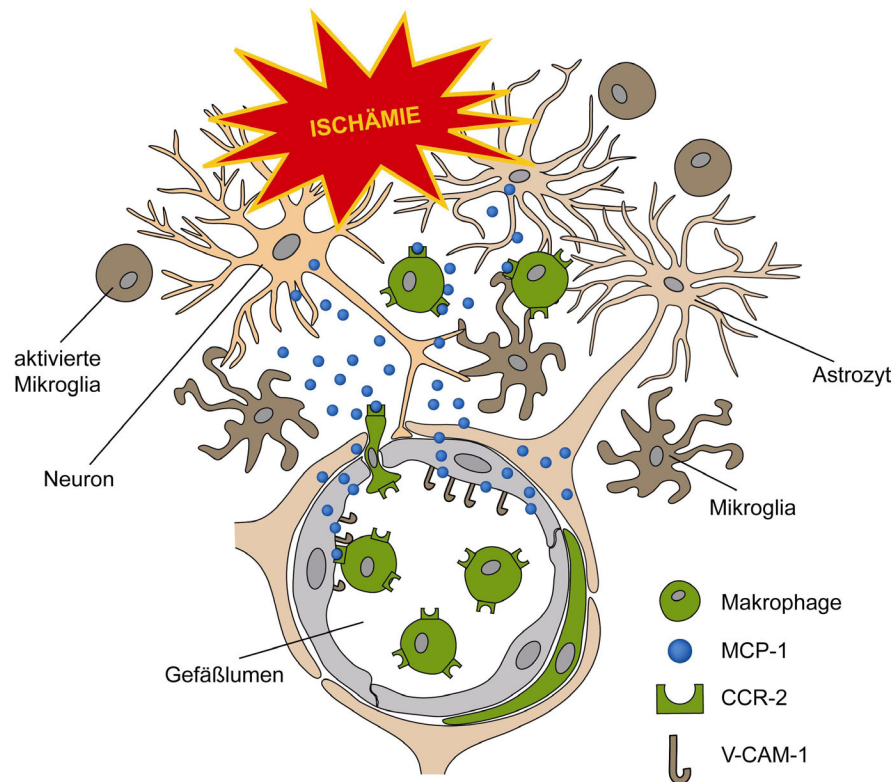


Abbildung 1.5: Schematische Darstellung der potentiellen molekularen Mechanismen der MCP-1-getriggerten Rekrutierung hämatogener Makrophagen in das von Ischämie betroffene Gehirnparenchym. Die postischämische Expression von MCP-1 durch Astrozyten und Neurone veranlasst kapilläre Endothelzellen zur Expression von V-CAM-1. Dadurch werden hämatogene Makrophagen dazu veranlasst an die Gefäßwand zu adhären und schließlich, dem MCP-1-Gradienten folgend, durch die Bluthirnschranke hindurch, in das infarzierte Gewebe zu immigrieren.

Neuste Erkenntnisse deuten auf einen weiteren Mechanismus der MCP-1-regulierten Rekrutierung hämatogener Monozyten und Makrophagen hin. So konnte *in-vitro* nachgewiesen werden, dass MCP-1 auf der abluminalen Seite kapillärer Endothelzellen an CCR-2 bindet und nach caveolinabhängigem vesikulären Transport auf der luminalen Seite des Gefäßendothels präsentiert wird (Ge et al., 2008). Diese Ergebnisse könnten auf eine ergänzende direkte Rekrutierung hämatogener Monozyten und Makrophagen durch MCP-1 hinweisen (Abb. 1.6).

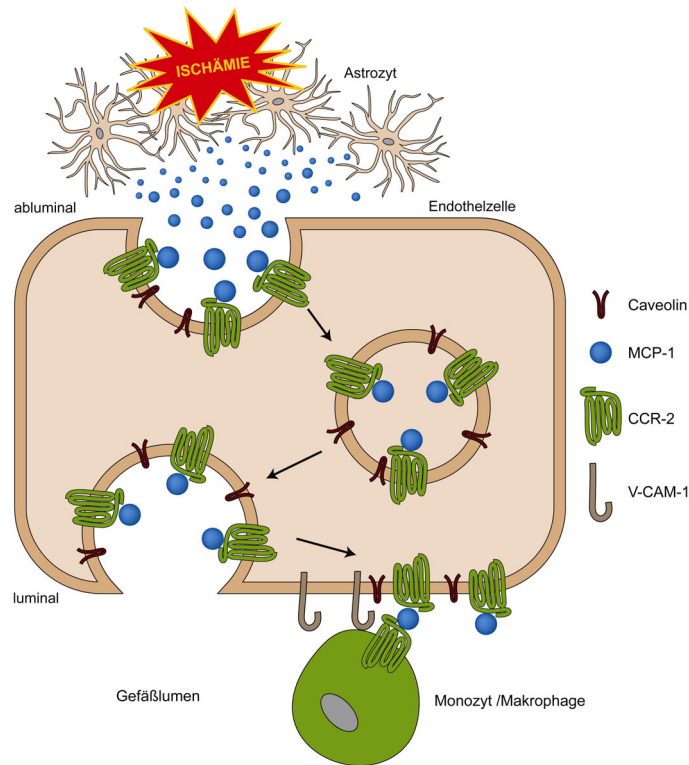


Abbildung 1.6: Schematische Darstellung einer möglichen direkten Rekrutierung hämatogener Zellen durch MCP-1. Postischämisch exprimiertes MCP-1 bindet abluminal an CCR-2. Durch caveolinabhängigen vesikulären Transport gelangt MCP-1 sowie CCR-2 auf die luminal Seite der Kapillare und interagiert auf direktem Wege mit hämatogenen Monozyten und Makrophagen.

In zahlreichen Arbeiten mit experimentellen murinen Schlaganfallmodellen konnte nachgewiesen werden, dass die Expression von MCP-1 und der daraus resultierende Einstrom hämatogener Zellen eine zentrale Rolle bei der Entwicklung der postischämischen Schadenentwicklung hat. Während MCP-1-defiziente Mäuse kleinere Infarkte entwickeln, zeigen Mäuse, die MCP-1 übermäßig exprimieren größere Infarkte in Kombination mit einer Zunahme der Leukozyteninfiltration (Hughes et al., 2002; Chen et al., 2002).

Da es bisher nicht möglich war, den Einfluss von MCP-1 auf die Aktivierung residenter Mikroglia und die Rekrutierung hämatogener Makrophagen differenziert zu analysieren, ist bisher nicht bekannt, welchen relativen Einfluss sowohl Mikrogliazellen als auch Leukozyten auf die postischämische Schadenentwicklung haben. Ein genaueres Verständnis der inflammatorischen Prozesse wäre somit hilfreich, um möglicherweise die Rekrutierung hämato-

gener Zellen zu manipulieren oder zu inhibieren, damit die Größe des Gehirnfarktes zu verringern und die mittel- und langfristige Prognose für Schlaganfallpatienten zu verbessern.

1.7.2 Postischämische Veränderung der Bluthirnschrankenintegrität

Die Bluthirnschranke schützt das zentrale Nervensystem durch die Ausbildung einer zellulären Barriere vor toxischen Verbindungen, infektiösen Keimen und dient zur Aufrechterhaltung des extrazellulären Milieus, indem sie einen unkontrollierten Stoffaustausch zwischen dem Gehirn und der Blutbahn verhindert. Die Bluthirnschranke wird von kapillären Endothelzellen, perivaskulären Makrophagen, Astrozyten und Neuronen ausgebildet. Zerebrale Endothelzellen umschließen das Gefäßlumen vollständig und sind durch *tight-junction*-Proteine wie ZO-1 (*Zonula-occludens-1*) und Occludin fest miteinander verbunden (Abb. 1.7).

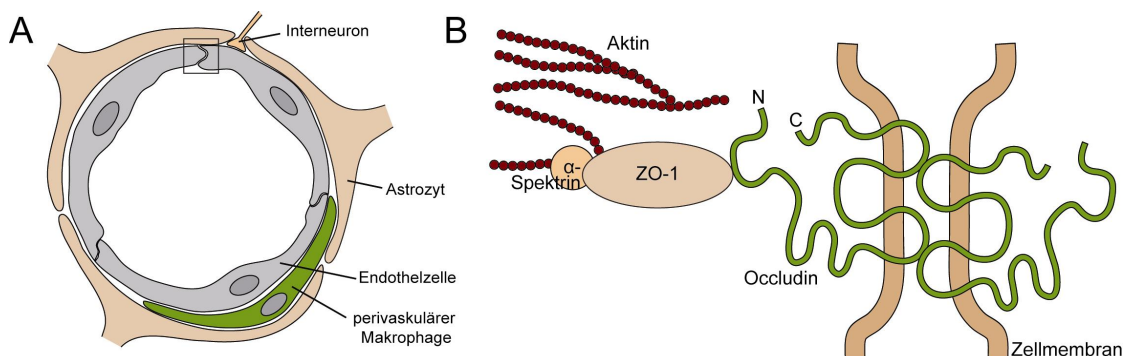


Abbildung 1.7: A: Schematische Darstellung des zellulären Aufbaus der Bluthirnschranke.

B: Schematische Darstellung der interzellulären Verbindung zweier Endothelzellen. Je eine extrazelluläre Occludin-Domäne bildet mit einer benachbarten Occludin-Domäne eine Zell-Zell-Verbindung aus. Intrazellulär ist Occludin über ZO-1 und α -Spektrin mit Aktinpolymeren des Zytoskeletts verbunden.

Den Endothelzellen liegen, von einer Basalmembran umgeben, perivaskuläre Makrophagen eng an. Perivaskuläre Makrophagen haben ihren Ursprung im Knochenmark, exprimieren ebenfalls den MCP-1 spezifischen Rezeptor CCR-2 und unterliegen einer regen Erneuerung durch hämatogene Makrophagen. Perivaskulären Zellen werden Aufgaben wie Regulation des mikropillären Blutdrucks sowie ein Einfluss auf die Proliferation und Differenzierung endothelialer Zellen zugesprochen (Bandopadhyay et al., 2001; Ramsauer et al., 2002; Pepiatt et al., 2006; Piquer-Gil et al., 2008). Zum Gehirnparenchym hin sind die Kapillaren fast vollständig von Astrozytenendfüßchen umgeben. Astrozyten regulieren das die Neurone umgebende Ionenmilieu und die Aufnahme und Metabolisierung synaptischer Neurotransmitter (Hertz 1991).

Eine zerebrale Ischämie resultiert in einem Verlust der Bluthirnschrankenintegrität innerhalb des infarzierten Gewebes. Die erhöhte Durchlässigkeit des Endothels kann zu einem sekundären vasogenen Ödem und Hämorrhagien führen (Yang et al., 1999). Als molekulare Ursache für den postischämischen Verlust der Bluthirnschrankenintegrität sind, neben Zytokinen und Wachstumsfaktoren, in den letzten Jahren die *tight-junction*-Proteine in den Fokus der Forschung gerückt. So werden Matrix-Metalloproteasen nach einem Schlaganfall insbesondere von infiltrierenden Leukozyten exprimiert und könnten durch Proteolyse von ZO-1 oder Occludin zu einem Zusammenbruch der Bluthirnschranke beitragen. Es konnte bereits bewiesen werden, dass die postischämische Permeabilitätszunahme der Bluthirnschranke durch Matrix-Metalloproteasen-Inhibitoren wie TIMP-1 (Metalloprotease-Inhibitor 1) verringert werden kann (Fujimoto et al., 2008).

Neueste Erkenntnisse deuten darauf hin, dass auch Chemokine die Permeabilität der Bluthirnschranke direkt regulieren können. So konnte gezeigt werden, dass insbesondere von Astrozyten und Neuronen postischämisch exprimiertes MCP-1 an abluminale CCR-2-Rezeptoren der kapillären Endothelzel-

len bindet und via G-Protein-regulierter Signaltransduktion Proteinkinasen aktiviert (Abb. 1.5). Die Aktivierung zweier Isoformen der Proteinkinase C (PKC α und PKC ζ) führt *in-vitro* zu einer Phosphorylierung und Strukturveränderung von ZO-1 und Occludin, was in einer Zunahme der Bluthirnschrankenpermeabilität resultieren könnte (Stamatovic et al., 2003; Stamatovic et al., 2006).

Die therapeutischen Möglichkeiten der akuten Schlaganfallbehandlung sind zum heutigen Zeitpunkt sehr begrenzt. So ist die Wiedereröffnung einer verschlossenen Arterie durch eine intravenöse thrombolytische Behandlung insbesondere durch das begrenzte Zeitfenster von 4,5 Stunden (Hacke et al., 2008) nach Eintreten der Symptome nur für einen geringen Anteil der Schlaganfallpatienten anwendbar.

Durch neue Erkenntnisse der regulatorischen Signalkaskaden, die nach einem Schlaganfall für die entzündlichen Prozesse verantwortlich sind, könnten sich, durch gezielte Manipulation der zellulären Regulation pro- und anti-inflammatorischer Proteine neue therapeutische Möglichkeiten ergeben. So könnte eine gezielte pharmakologische Inhibition bestimmter Chemokine oder deren Rezeptoren zu einer reduzierten Infiltration hämatogener Zellen in das infarzierte Gewebe und damit möglicherweise zu einer Verringerung des Infarktolumens führen.

1.8 Ziel der vorliegenden Arbeit

Die vorliegende Arbeit soll dazu beitragen, den Einfluss des Chemokins MCP-1 auf die Entwicklung der postischämischen Gewebeschädigung aufzuklären. Die Aktivierung residenter Mikroglia sowie die Rekrutierung hämatogener Makrophagen sollte nach einem experimentellen Schlaganfall differenziert analysiert werden. Residente aktivierte Mikrogliazellen und postischämisch in das Gehirnparenchym immigrierte Makrophagen exprimieren die gleichen Oberflächenantigene. Sie sind damit weder morphologisch noch immunhistochemisch unterscheidbar. Daher sollten zur Differenzierung dieser Zellen für das grün fluoreszierende Protein (GFP) transgene Knochenmarkchimäre Mäuse eingesetzt werden.

Durch die Kreuzung GFP-transgener Mäuse mit MCP-1-defizienten Tieren bestand die Möglichkeit, Knochenmarkdonoren zu züchten, die sowohl MCP-1-defizient als auch GFP-transgen sind. Als Kontrollen dienten GFP-transgene Knochenmarkchimären, die für das MCP-1-Allel nicht defizient waren.

Die Mäuse beider Gruppen sollten operativ einer 30-minütigen zerebralen fokalen Ischämie unterzogen werden und anschließend, neben der vergleichenden Bestimmung des Infarktolumens, die inflammatorische zelluläre Reaktion auf immunhistochemisch gefärbten Gefrierschnitten des Gehirns zu unterschiedlichen postoperativen Zeitpunkten untersucht werden.

Zu den postischämisch untersuchten Zellpopulationen gehören residente Mikroglia, hämatogene Makrophagen, neutrophile Granulozyten, T-Zellen, perivaskuläre- sowie meningeale Makrophagen und Neuroblasten.

Postoperativ sollte täglich die motorische und sensomotorische Leistungsfähigkeit sowie die neurologische Erholung der Mäuse beider Gruppen und damit der Einfluss von MCP-1 auf die Ausprägung des Schlaganfalls und die neurologischen Symptome der Tiere erfasst werden.

Zur Aufklärung der molekularen Mechanismen einer möglichen differentiellen MCP-1-abhängigen Aktivierung und Rekrutierung inflammatorischer Zellen sollten Expressionsanalysen mittels quantitativer *Real-Time*-PCR durchgeführt werden. Ziel dieser Analysen war, die Expression ausgewählter Gene in MCP-1-defizienten Mäusen und den nicht-defizienten Kontrolltieren zu einem frühen postischämischen Zeitpunkt (12 Stunden) zu ermitteln, um daraus resultierende molekularbiologischen Zusammenhänge der Zellrekrutierung und der Bluthirnschranken-Permeabilität aufzuklären. Zu den zu untersuchenden Genen gehörten potenziell pro- und anti-inflammatorische Gene (IL-1 β , TNF-1, IL-6, G-CSF, PPAR- γ), extrazelluläre Matrix-modulierende Faktoren (MMP-9 und TIMP-1), das Adhäsionsmolekül V-CAM-1 sowie die Protein-Histidin-Phosphatase-1 (PHP-1).

Darüber hinaus sollte ein möglicher Einfluss von MCP-1 auf die Infarkt induzierte Disruption der Bluthirnschranke *in-vivo* zu einem frühen postoperativen Zeitpunkt untersucht werden. Dazu wurde den Kontrollmäusen und den MCP-1-defizienten Tieren 12 Stunden postischämisch ein FITC-Albumin-Konjugat (Fluoreszeinisothiocyanat-Albumin) intravenös appliziert und der Übertritt dieses, im gesunden Gehirn nicht bluthirnschrankengängigen, Proteins in das Gehirnparenchym quantifiziert.

2 Material und Methoden

2.1 Antikörper, Chemikalien und Reagenzien

Antikörper	Anbieter
Primärantikörper	
7/4	Serotec GmbH, Düsseldorf, BRD
CD-3	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
DCX	Abcam Inc., Cambridge, MA, USA
F4/80	Serotec GmbH, Düsseldorf, BRD
GFAP	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, BRD
NeuN	Chemicon, Nürnberg, BRD
Occludin	Invitrogen, San Francisco, CA, USA
von Willebrand-Faktor	Invitrogen, San Francisco, CA, USA
ZO-1	Invitrogen, San Francisco, CA, USA
Sekundärantikörper (Biotin-konjugiert)	
Esel-anti-Ziege	Jackson Laboratories, Inc., West Grove, PA, USA
Kaninchen-anti-Ratte	Vector Labs, Burlingame, CA, USA
Ziege-anti-Kaninchen	Vectashield Labs, Peterborough, UK
Ziege-anti-Hamster	Jackson Laboratories, Inc., West Grove, PA, USA
Ziege-anti-Maus	Jackson Laboratories, Inc., West Grove, PA, USA
Ziege-anti-Ratte	Jackson Laboratories, Inc., West Grove, PA, USA
Sekundärantikörper (Meerrettichperoxidase-konjugiert)	
Streptavidin-HRP	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
Sekundärantikörper (Streptavidin-Fluoreszenzfarbstoff-konjugiert)	
AlexaFluor594®	Molecular Probes Europe, Leiden, NL
AlexaFluor488®	Molecular Probes Europe, Leiden, NL
Sekundärantikörper (Fluoreszenzfarbstoff-konjugiert)	
Ziege-anti-Kaninchen594	Molecular Probes Europe, Leiden, NL

Reagenzien und Chemikalien	Anbieter
6x <i>Loading Dye Solution</i>	MBI Fermentas, St.Leon-Rot, BRD
Blockierungsreagenz	Roche Diagnostics, Mannheim, BRD
Diethylether	Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt, BRD
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, München, BRD
FITC-Albumin-Konjugat	Sigma-Aldrich, München, BRD
<i>GeneRuler</i> TM 100 bp DNA-Marker	MBI Fermentas, St.Leon-Rot, BRD
HAES, 6%	Fresenius AG, Bad Homburg, BRD
HPLC-Wasser	J.T. Baker, Deventer, NL
Maleinsäure	Sigma-Aldrich, München, BRD
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt, BRD
<i>Mounting Medium</i> mit DAPI	Vectashield Labs, Peterborough, UK
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich, München, BRD
Tissue-Tek®	Sakura Finetek, Zoeterwoude, NL
Toluidin blau	Sigma-Aldrich, München, BRD
Tris	Sigma-Aldrich, München, BRD
Triton X-100	Sigma-Aldrich, München, BRD
Gebrauchsfertige Kits	Anbieter
Dneasy-Tissue Kit	Qiagen GmbH, Hilden
REDTaq-PCR Mix	Sigma-Aldrich, München, BRD
RNeasy-Micro Kit	Qiagen GmbH, Hilden
Reverse Transkriptions Kit	Qiagen GmbH, Hilden
SYBR-Green-PCR Mix	Qiagen GmbH, Hilden

Geräte	Anbieter
ABI PRISM® 7700 RT-PCR-Cycler	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Bioanalyzer 2100	Agilent Technologies, Waldbronn
Biofuge Stratos, Zentrifuge	Haereus-Christ, Hanau, BRD
DNA-Engine, PCR-Thermocycler	MJ Research Inc., Waltham, MA, USA
Feinwaage	Sartorius AG, Göttingen, BRD
Fluoreszenzmikroskop CMRX	Leica Mikrosystems, Nussloch, BRD
Kryotom CM3050S	Leica Mikrosystems, Nussloch, BRD
Lupe KL1500 LCD	Leica Mikrosystems, Nussloch, BRD
Milli QUF Plus	Millipore GmbH, Eschborn, BRD
Nylonfaden, Ethilon	Ethilocon, Norderstedt, BRD
Palm <i>Microbeam</i> Mikroskop	Carl Zeiss GmbH, München
Periflux 5001, Doppler Sonde	Perimed, Stockholm, Schweden
Picochip 6000 RNA-Assay	Agilent Technologies, Waldbronn
Rotamax 120, Schüttler	Heidolph, Schwabach, BRD
Spot Digitalkamera	Diagnostic Instr., Sterling Heights, USA
Thermomixer <i>comfort</i>	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, BRD
Zentrifuge 5415C	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, BRD
Software	Anbieter
Adobe Photoshop	Adobe, San José, CA, USA
Adobe Illustrator	Adobe, San José, CA, USA
Spot	Diagnostic Instr., Sterling Heights, USA
AbiPrism 7700 SDS v1.2.3	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Relative-Expression Software Tool	http://www.gene-quantification.de
ImageJ	http://rsb.info.nih.gov/ij/

Stammlösungen

Agarosegel 2 %

Agarose	20 g
TBE-Puffer 10x	100 ml
Aqua demin.	ad. 1000 ml

Unter Kochen in der Mikrowelle gelöst und im Wasserbad gelagert (62° C).

Blockierungslösung

Blockierungsreagenz	1 g
Maleinsäurepuffer pH 7,5	100 ml

Maleinsäurepuffer

Maleinsäure	116 ml
NaCl	58,5 g
Aqua demin.	ad. 1000 ml
pH	7,5

Paraformaldehydlösung (PFA) 4% (PBS gepuffer)

Paraformaldehyd 20 %	200 ml
NaCl	150 mM
Na ₂ HPO ₄	125 mM
NaH ₂ PO ₄	125 mM
Aqua demin.	ad. 1000 ml
pH	7,4 (NaOH titriert)

PBS (Phosphat gepufferte Salzlösung)

NaCl	1,87 M
Na ₂ HPO ₄	125 mM
NaH ₂ PO ₄	125 mM

Aqua demin.	ad. 1000 ml
Na ₂ HPO ₄ / NaH ₂ PO ₄ mit H ₃ PO ₄ titriert auf pH 7,2	
TBE-Puffer	
Tris	900 mM
Borsäure	900 mM
EDTA	250 mM
Aqua demin.	ad. 1000 ml
TBS-Puffer	
Tris-HCl	10 mM
NaCl	150 mM
pH	7,5
TRIS	
Tris	10 mM
Aqua demin.	ad. 1000 ml
pH	9,5

Oligonukleotide

Name	Sequenz	Größe
oIMR558	5' - CCT TCT ATC GCC TTC TTG ACG -3'	21-mer
oIMR1993	5' - GGA GCA TCC ACG TGT TGG C -3'	19-mer
oIMR1994	5' - ACA GCT TCT TTG GGA CAC C -3'	19-mer
PHPf	5' - ATC AGA GCC AGG ACA GGA AG -3'	20-mer
PHPr	5' - GTG GGG CAG AGC TTC AGT AG -3'	20-mer

2.2 Mauslinien

Wildtyp-Mäuse

Männliche C57/Bl6J-Wildtypmäuse, bezogen von der Firma Charles River Lab., Sulzfeld, Deutschland, wurden während der Zucht in die GFP-transgenen sowie MCP-1-defizienten Stämme eingekreuzt. Dadurch war ein homogener genetischer Hintergrund für die Experimente gesichert.

GFP-transgene Mäuse

Als Donoren für GFP-transgenes Knochenmark dienten C57/Bl6J-GFP-Mäuse aus der laboreigenen Zucht. Dieser Stamm wurde ursprünglich von Dr. Masaru Okabe, Osaka, Japan zur Verfügung gestellt. Jede kernhaltige Zelle dieser Tiere exprimiert das grün-fluoreszierende Protein (GFP) aus der Leuchtqualle *Aequoria victoria* unter Kontrolle des Hühner- β -Aktin Promotors. Eine verstärkte Expression dieses Proteins wird durch die einklonierte *immediate early enhancer*-Sequenz des Cytomegalovirus gewährleistet (Abb. 2.1).



Abbildung 2.1: Genkartierung von *enhancer*-, Promotor- und Protein-Sequenz GFP-transgener Mäuse.

MCP-1^{-/-}-Mäuse

MCP-1-defiziente Tiere (C57/Bl6.129S4-CCL2^{tm1Roi}) aus der laboreigenen Zucht wurden ursprünglich von der Firma Jaxmice, Bar Harbour, Maine, USA bezogen. Diese Tiere sind nicht in der Lage, das Chemokin MCP-1 (Monozyten Chemoattraktives Protein-1) zu exprimieren. Nach Einkreuzen von C57/Bl6J-Wildtypmäusen und entsprechender Zucht entstandene MCP-1^{+/+}-Tiere dienten für die Kontrollexperimente.

Alle Tiere wurden in der zentralen tierexperimentellen Einrichtung (ZTE) des Universitätsklinikums Münster gehalten.

Chimären aus MCP-1-positiven Mäusen, die Knochenmark von GFP-transgenen Mäusen erhalten haben (**MCP-1^{+/-} GFP^{-/-} / MCP-1^{+/-} GFP^{+/+}**), werden folgend als **MCP-1^{+/-}** bezeichnet.

Chimären aus MCP-1-defizienten Mäusen, die Knochenmark von MCP-1-defizienten und gleichzeitig GFP-transgenen Mäusen erhalten haben, werden (**MCP-1^{-/-} GFP^{-/-} / MCP-1^{-/-} GFP^{+/+}**) als **MCP-1^{-/-}** bezeichnet.

Auf nichtchimäre MCP-1^{+/-}- und MCP-1^{-/-}- Mäuse wird gesondert hingewiesen.

2.3 Methoden

2.3.1 Erzeugen knochenmarkchimärer Mäuse

2.3.1.1 Genotypisierung

Zur Kontrolle des genetischen Hintergrundes wurde von den eingesetzten Mäusen zunächst genomische DNA (gDNA) extrahiert. Mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und den für die jeweiligen Genotypen spezifischen Primern wurde die gDNA anschließend amplifiziert, die PCR-Produkte auf ein Agarosegel aufgetragen, die Gele fotografiert und begutachtet.

Zur Gewinnung genomischer DNA wurden jeder Maus ca. 5 mm der Schwanzspitze abgetrennt und in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß aufgenommen. Für die Aufreinigung der gDNA kam das kommerziell erhältliche DNeasy-Kit (Qiagen GmbH, Hilden) zum Einsatz. Die Aufreinigung erfolgte gemäß dem Herstellerprotokoll.

Für die Bestimmung des Genotyps der eingesetzten Tiere kamen spezielle Primer, die selektiv mit dem MCP-1-Wildtyp-Allel bzw. dem MCP-1-defizienten Allel konjugieren, zum Einsatz. Zu diesem Zweck wurden die Primer oIMR558, oIMR1993 und oIMR1994 genutzt. Bei einem homozygoten MCP-1^{+/+}-Tier generiert das Primerpaar oIMR1993 / oIMR1994 ein 888 Basenpaar (bp) langes PCR-Produkt. Bei einem homozygoten MCP-1-defizienten Tier generiert das Primerpaar oIMR558 / oIMR1993 ein 1375 Basenpaar langes PCR-Produkt. Die Allele MCP-1⁺ und MCP-1⁻ heterozygoter gDNA-Proben amplifizieren beide PCR-Produkte.

Die zuvor aufgereinigte gDNA wurde mit folgenden Komponenten (Tab. 2.1) in ein PCR-Reaktionsgefäß (500 µl) pipettiert. Die Zusammenstellung der An-

sätze erfolgte auf Eis. Jede Probe genomischer DNA wurde mit jeweils beiden Primerpaaren angesetzt.

Tabelle 2.1: PCR-Ansatz für eine Probe genomischer DNA.

Komponente	Menge
RedTaq-Mastermix	12 µl
HPLC-Wasser	11,5 µl
Primer A	0,5 µl
Primer B	0,5 µl
gDNA	0,5 µl

Anschließend wurden die PCR-Reaktionsgefäße in einen PCR-*Thermocycler* gegeben und ein für die Primer optimierter PCR-Zyklus gestartet (Tab. 2.2).

Tabelle 2.2: PCR-Programm für die Genotypisierung.

Schritt	Temperatur	Zeit
1. Aktivierung der Polymerase	95° C	10 min.
2. Denaturierung der DNA	94° C	1 min.
3. Primerbindung	56° C	0,5 min.
4. Prolongation	72° C	3 min.
5. Wiederholung von 2.-4. (35x)		
6. Finale Prolongation	72° C	3 min.

Nach erfolgter Polymerase-Kettenreaktion wurden 5 µl jedes gDNA-Amplifikats mit 1 µl *Loading-Dye* (6x) versetzt und auf ein Agarosegel (2 %, 40 ml Agarose, 5 µl Ethidium-bromidlösung) aufgetragen. Nach erfolgter elektrophoretischer Separation (120 V, 100 mA) wurden die Gele unter UV-Licht fotografiert und ausgewertet.

2.3.1.2 Knochenmarkchimäre Mäuse

Unter normalen Umständen ist es nicht möglich, aktivierte residente Mikroglia von immigrierten hämatogenen Makrophagen im Gehirn zu differenzieren. Um diese Unterscheidung möglich zu machen, generierten wir GFP-transgene knochenmarkchimäre Mäuse.

Für die Versuchsreihen wurden insgesamt 20 knochenmarkchimäre MCP-1^{+/+}/GFP- und 20 MCP-1^{-/-}/GFP-Mäuse generiert. Für jeden untersuchten Zeitpunkt (Null Tage ohne Ischämie, 1 Tag, 2 Tage, 4 Tage und 7 Tage postischämisch) kamen je Gruppe vier Mäuse zum Einsatz.

2.3.1.3 Generierung von GFP^{+/+}/MCP-1^{+/+} - Knochenmarkdonoren

Als Kontrolltiere dienten für die Versuche GFP-transgene knochenmarkchimäre Mäuse, die in der Lage waren, das Chemokin MCP-1 homozygot zu exprimieren. Um den genetischen Hintergrund der GFP-transgenen Mäuse an den der nicht-transgenen Wurfkontrollen der MCP-1^{-/-}-Zucht anzugleichen, wurden diese mehrfach miteinander verkreuzt (Abb. 2.2).

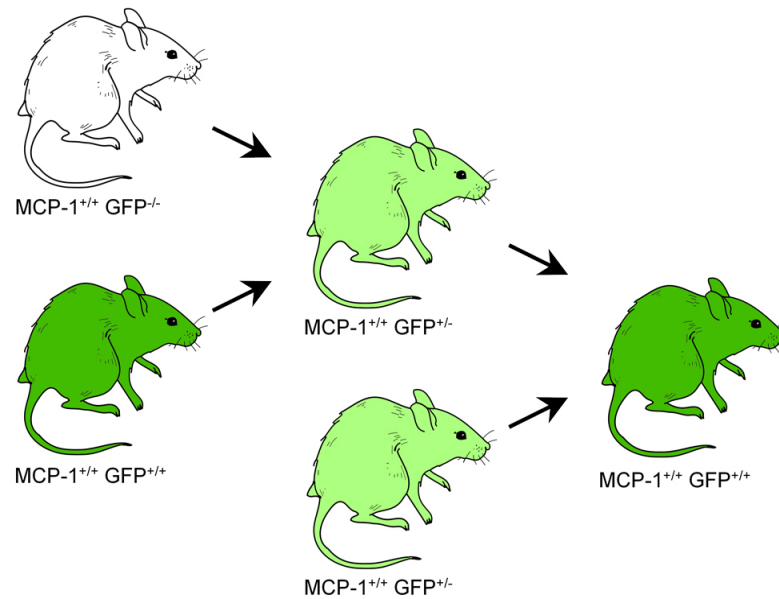


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung der Generierung GFP-transgener MCP-1^{+/+}-Mäuse.

GFP-transgene Mäuse (MCP-1^{+/+}/GFP^{+/+}) wurden zunächst mit Wurfkontrollen der MCP-1^{-/-}-Zucht (MCP-1^{+/+}/GFP^{-/-}) verpaart. Die Nachkommen, die für das GFP-Allel heterozygot waren (MCP-1^{+/+}/GFP^{+/-}) wurden wieder miteinander verkreuzt. Nachkommen, die sowohl für MCP-1 als auch für GFP homozygot-positiv (MCP-1^{+/+}/GFP^{+/+}) waren wurden für als Knochenmarkspender eingesetzt.

2.3.1.4 Generierung von GFP^{+/+}/MCP-1^{-/-}- Knochenmarkdonoren

Zur Generierung MCP-1^{-/-} und GFP-transgener Chimären wurden Knochenmarkdonoren benötigt, die zum einen für das MCP-1-Allel homozygot defizient waren und den gleichen genetischen Hintergrund wie die Kontrollchimären sowie die MCP-1^{-/-}-Knochenmarkrezipienten aufwiesen. Dazu wurden GFP-transgene Mäuse (MCP-1^{+/+}/GFP^{+/+}) zunächst mit MCP-1^{-/-}-Mäusen (MCP-1^{-/-}/GFP^{-/-}) verpaart (Abb. 2.3).

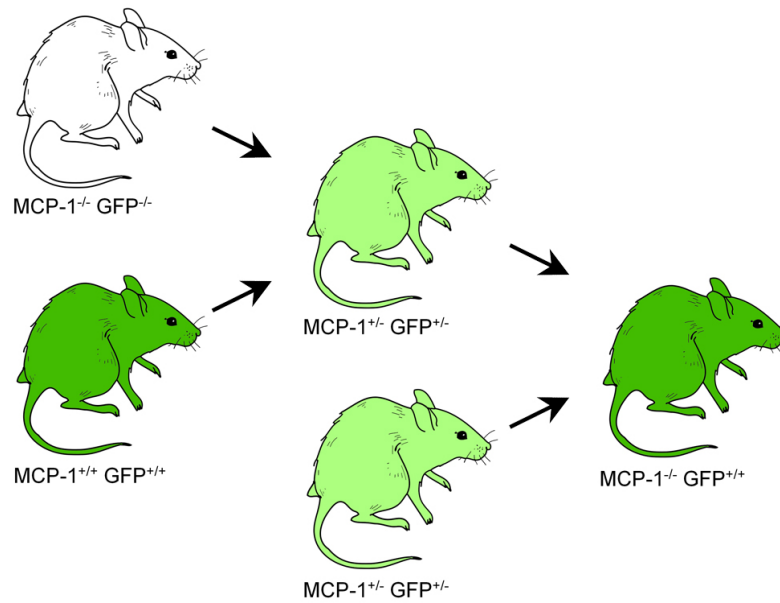


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung der Generierung GFP-trangener MCP-1-defizienter Mäuse.

Die Nachkommen, die sowohl für das GFP-Allel als für das MCP-1-Allel heterozygot waren (MCP-1^{+/-}/GFP^{+/-}) wurden wieder miteinander verkreuzt. Nachkommen, die für MCP-1 homozygot defizient und für GFP homozygot positiv waren (MCP-1^{-/-}/GFP^{+/+}) wurden als Knochenmarkspender eingesetzt.

2.3.1.5 Bestrahlung der Mäuse

Zur Zerstörung der blutbildenden Zellen der Knochenmarkrezipienten wurden männliche MCP-1^{+/+}/GFP^{-/-} und MCP-1^{-/-}/GFP^{-/-}-Mäuse im Alter von sechs bis acht Wochen einer Cobalt⁶⁰- γ -Strahlenquelle (durchgeführt in der Klinik und Poliklinik für Strahlentherapie des Universitätsklinikums Münster) ausgesetzt. Die Mäuse erhielten eine Strahlendosis von sieben Gray, die ohne anschließende Knochenmarktransplantation letal wäre.

2.3.1.6 Gewinnung von GFP-Knochenmark

Als Donoren für GFP-transgenes Knochenmark dienten sechs bis acht Wochen alte MCP-1^{+/+}/GFP^{+/+} und MCP-1^{-/-}/GFP^{+/+}-Mäuse. Die Tiere wurden zunächst mit Ether narkotisiert und durch Genickbruch getötet. Anschließend wurden Tibia und Femur herauspräpariert und auf Eis gelagert.

Nach Entfernung der Gelenke wurde das Knochenmark mittels einer Spritze mit 10 ml PBS aus dem Röhrenknochen gespritzt und in einem Reaktionsröhrchen gesammelt. Anschließend wurden die gewonnenen Zellen durch eine Spectra-Mesh®-Nylonfiltermembran (85 µm) gefiltert und je zweimal mit PBS gewaschen und zentrifugiert (1200 U/min., 10 Minuten). Es folgte eine letzte Resuspension in PBS. Abschließend wurde die Zelldichte der Suspension mit einer Thoma-Zählkammer bestimmt.

2.3.1.7 Knochenmarktransplantation

24 Stunden nach der Bestrahlung erhielten die MCP-1^{+/+}/GFP^{-/-}-Mäuse die MCP-1^{+/+}/GFP^{+/+}-Zellsuspension und die MCP-1^{-/-}/GFP^{-/-}-Mäuse die MCP-1^{-/-}/GFP^{+/+}-Zellsuspension transgener Knochenmarkzellen. Dabei wurden den Tieren, unter Ethernarkose, je 10⁷ Zellen in einem Volumen von 300 µl in die *Vena coccygealis lateralis* injiziert. Nach der Transplantation folgte eine drei Monate andauernde Rekonvaleszenzphase, in der die Mäuse mittels der Spende GFP-transgener Stammzellen neues Knochenmark etablieren konnten (Abb. 2.4).

Nach Ablauf der Zeit wurde jeder Maus aus der *Vena coccygealis lateralis* eine Blutprobe entnommen und ein Ausstrich auf einem Objektträger angefertigt. Der Blutausrich wurde unter einem Fluoreszenzmikroskop begutachtet und

das Verhältnis zwischen GFP⁺- und GFP⁻- Leukozyten ermittelt. Für die weiteren Versuche kamen nur diejenigen Mäuse zu Einsatz, deren Anteil GFP-positiver Leukozyten bei mindestens 90% lag.

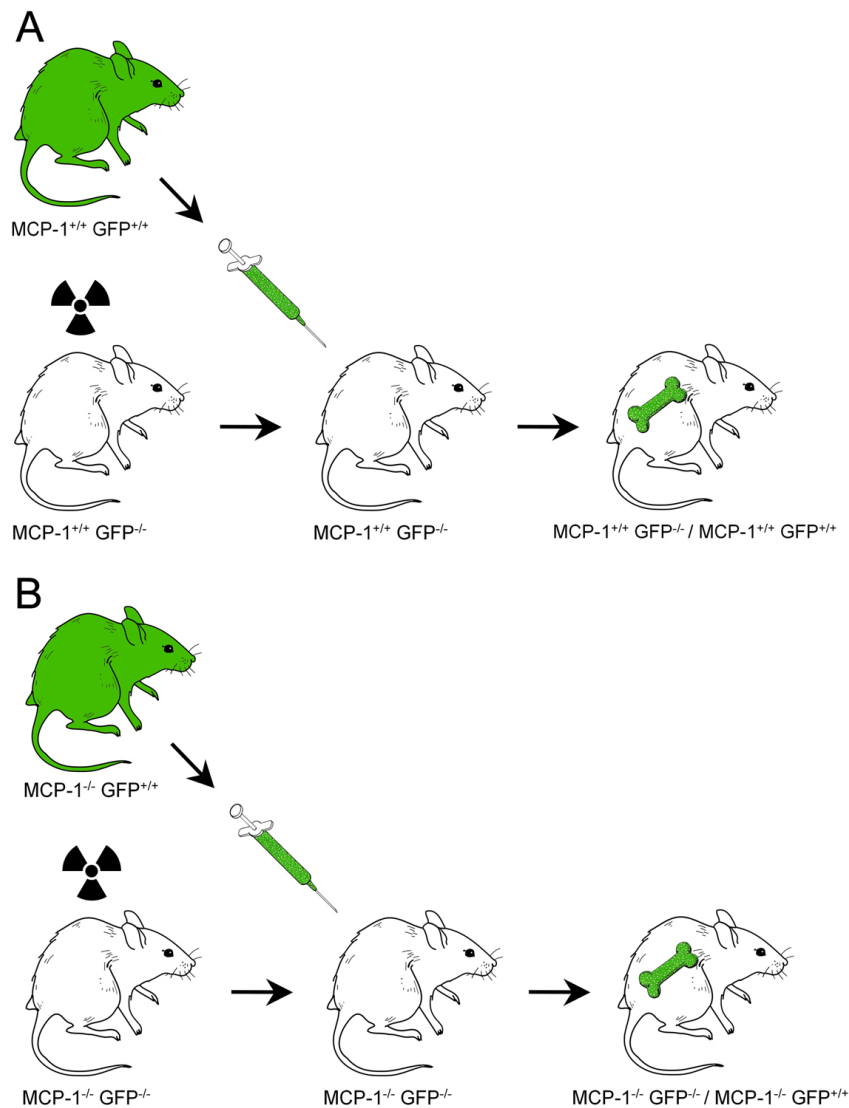


Abbildung 2.4: A: Schematische Darstellung der Methode zur Generierung GFP-transgener MCP-1^{+/+}-Chimären. B: Darstellung der Methode zur Generierung GFP-transgener MCP-1^{-/-}-Chimären.

2.3.2 Transiente fokale zerebrale Ischämie

Drei Monate nach erfolgreicher Knochenmarktransplantation wurden je 16 MCP-1^{+/+}- und 16 MCP-1^{-/-}-chimäre Tiere einer transienten zerebralen Ischämie

unterzogen. Je vier MCP-1^{+/+}- und vier MCP-1^{-/-}-chimäre Tiere wurden als Kontrolltiere ohne Ischämie perfundiert. Die Mäuse wurden mittels einer kombinierten N₂O / O₂ und Halothan-Inhalationsnarkose narkotisiert. Um ein Absinken der Körpertemperatur zu verhindern, lagen die Tiere während der gesamten Operation auf einer Wärmematte mit Rückkopplung zur kontinuierlich gemessenen Körpertemperatur (Zielkörpertemperatur: 37° C).

Nachdem die Tiere narkotisiert und fixiert waren, wurde am Kopf der Mäuse eine Laser-Doppler-Sonde auf Höhe des von der *Arteria cerebri media* perfundierten Gehirngewebes platziert. Damit war es möglich, die Blutperfusion durch das Gewebe während der gesamten Operationsdauer über einen Überwachungsmonitor zu messen.

Mit einem Skalpell wurde dann ein ventraler medianer Schnitt am Hals der Tiere durchgeführt. Die nun zugängliche Gefäßnervenscheide bestehend aus *Arteria carotis*, *Vena jugularis* und *Nervus vagus* wurde freipräpariert und die weiter distal liegende *Arteria carotis externa* mit einem Faden durch Umschlingen verschlossen (Abb.2.5.C A). Anschließend wurde die proximal gelegene *Arteria carotis communis* ebenfalls mit einem Faden umschlungen und verschlossen (Abb.2.5.C B). Etwa 5 mm über der zuvor angelegten Schlinge wurde eine Weitere um die *Arteria carotis communis* (Abb.2.5.C C) befestigt, durch Knoten angeschlungen, jedoch nicht verschlossen, gefolgt von einem zusätzlichen temporären Verschluss der *Arteria carotis communis* mit einem Metallclip weitere 5 mm darüber (Abb.2.5.C D). Da nun der Blutfluss gestoppt war, konnte ein kleiner Einschnitt in das Blutgefäß durchgeführt werden (Abb.2.5.C E).

Durch diesen Schnitt wurde ein Nylonfaden mit einer angefertigten Silikonspitze (160 µm Durchmesser an der Spitze) durch das Blutgefäß vorgeschoben. Der Metallclip wurde entfernt und der Faden weiter in die *Arteria carotis interna* gebracht. Das Absinken des Doppler-Signals zeigte die richtige Position der Fadenspitze vor dem Abgang der mittleren Gehirnarterie an und damit den

unterbrochenen Blutfluss in dem betroffenen Gehirnareal. In dieser Position wurde der Faden für 30 Minuten belassen. Nach erfolgter Ischämie wurde der Faden wieder herausgezogen und der angeschlungene Knoten oberhalb der Gefäßinzisur fest zusammengezogen. Die erfolgreiche Reperfusion wurde durch den Anstieg des gemessenen Dopplersignals dokumentiert. Nach abgeschlossener Operation wurde die Wunde am Hals der Mäuse mit einem chirurgischen Faden wieder verschlossen und die Narkose beendet. Anschließend wurden die Tiere in ihre Käfige zurückgebracht und etwa eine Stunde postoperativ beobachtet.

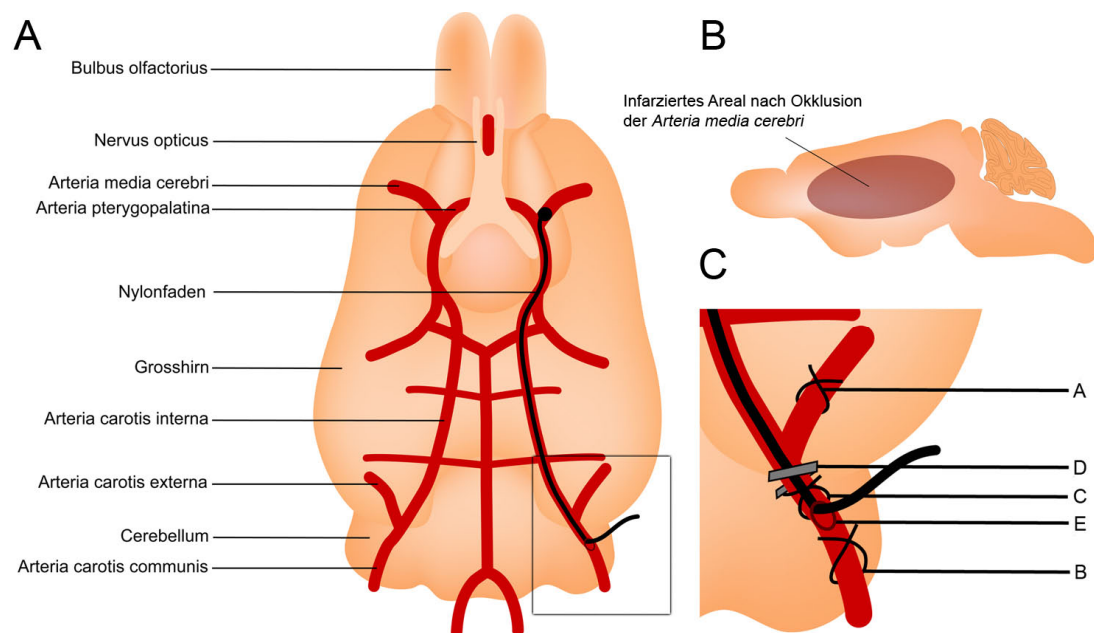


Abbildung 2.5: Schematische Darstellung der Methode zur Erzeugung einer transienten fokalen zerebralen Ischämie durch Fadenverschluss der *Arteria cerebri media*. **A:** Ventrale Übersicht des Gehirns und Lage der Blutgefäße. **B:** Laterale Ansicht des Mäusegehirns. Das nach einer Okklusion der *Arteria cerebri media* infarzierte Areal ist rot hervorgehoben. **C:** Vergrößerter Ausschnitt aus Abbildung 2.6A.

2.3.3 Tierpräparation und Gewebefixation

Je vier chimäre MCP-1^{+/-}- und vier MCP-1^{-/-}-Mäuse wurden nach einem, zwei, vier und sieben Tagen perfundiert. Die vier chimären MCP-1^{+/-}- und MCP-1^{-/-}-Tiere ohne Ischämie wurden sofort perfundiert (Kontrolltiere, Null Tage).

Zur Perfusion wurden die Mäuse zunächst in eine tiefe Ethernarkose versetzt und auf einem Sektionsbrett fixiert. Zur Eröffnung des Brustkorbes wurde mit einer Schere ein Schnitt unterhalb des Sternums durchgeführt. Es folgte ein weiterer, die Rippen durchtrennender, horizontaler Einschnitt des Diaphragmas bis etwas zwei Zentimeter über Herzhöhe. Thoraxwand und Sternum wurden zur Seite geklappt und das Perikard eröffnet. Das nun freigelegte, noch schlagende Herz wurde mit einer Kanüle, an der das Infusionsbesteck angeschlossen war, am linken Ventrikel punktiert. Anschließend wurde mit einer Sezierschere das rechte Atrium abgetrennt.

Zur Verhinderung von Thrombenbildung und zum Entbluten der Tiere wurden die Mäuse zunächst für etwa zwei Minuten mit 6%igem HAES perfundiert. Zur abschließenden Fixation des Gewebes wurden die Tiere für weitere fünf Minuten mit 4%iger Paraformaldehyd-Lösung (PFA) perfundiert. Eine erfolgreich durchgeführte Fixierung zeigte sich durch eine Verhärtung und Entfärbung des Gewebes.

Von jeder Maus wurde anschließend das Gehirn entnommen und für weitere drei Stunden in PFA nachfixiert, danach in eine 10%ige Saccharose-Lösung überführt (4° C, über Nacht) und abschließend dreimal in Phosphatpuffer (Na₂HPO₄ 200mM, NaH₂PO₄ 200 mM, in H₂O, pH 7,4) gewaschen.

Vor dem Einfrieren der Gehirne wurden diese in eine Silikonform gegeben und in TissueTek® eingebettet. Anschließend wurden die Formen für 20 Sekunden in ein mit flüssigem Stickstoff gekühltes Dimethylbutanbad gegeben

und die gefrorenen Blöckchen bis zur weiteren Bearbeitung bei -80°C gelagert.

2.3.3.1 Anfertigung von Gefrierschnitten

Die in TissueTek® eingebetteten Gehirne wurden mittels Kryotom bei -18°C geschnitten (Schnittdicke $10\ \mu\text{m}$) und auf Objektträger gebracht. Um eine vollständige Adhäsion der Schnitte auf den Objektträgern zu ermöglichen wurden diese für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Gewebeproben bei -20°C eingefroren.

Die Auszählungen von Mikroglia, Makrophagen, Neuroblasten, neutrophilen Granulozyten und T-Zellen sowie die Begutachtung von Astrogliose, Neuroenschädigung und Bluthirnschrankenintegrität wurden auf coronalen Schnitten auf der Höhe von Bregma = $\sim 0,64\text{ mm}$ durchgeführt.

Der Analyse des *Turn-Over* meningealer und perivaskulärer Makrophagen wurde in drei definierten Arealen bei Bregma = $\sim 1,98\text{ mm}$, $\sim 1,32\text{ mm}$ und $\sim -0,64\text{ mm}$ durchgeführt (Abb. 2.6).

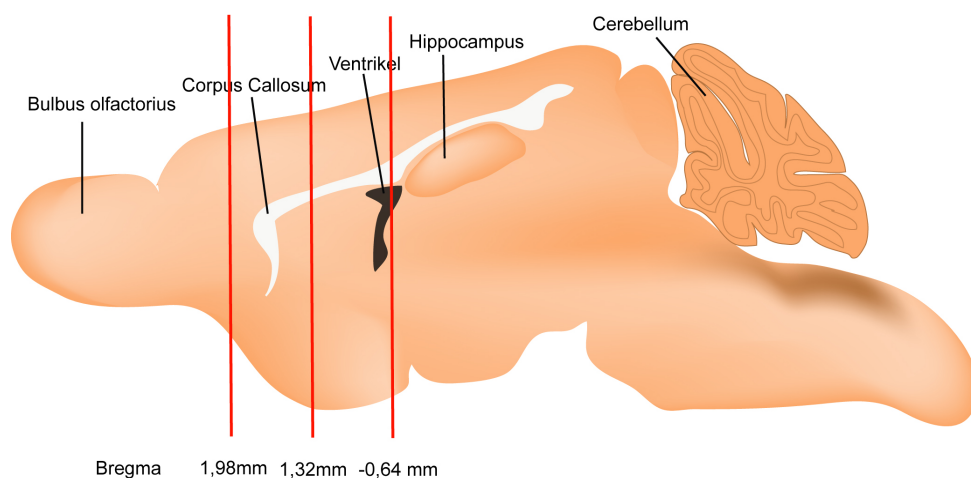


Abbildung 2.6: Schematische Seitenansicht des Mäusegehirns. Für alle Versuche wurden Schnitte auf der Höhe von Bregma = $\sim 1,98\text{ mm}$, $\sim 1,32\text{ mm}$ und $\sim -0,64\text{ mm}$ eingesetzt.

2.3.4 Quantifizierung der postischämischen neurologischen Defizite

Um mögliche postischämische motorische und sensomotorische Leistungsdefizite zwischen den MCP-1^{+/+}- und MCP-1^{-/-}-Tieren erfassen zu können, wurden die Mäuse einer Rotarodtestung und einer Neuroscorebegutachtung unterzogen. Zusätzlich wurde von jeder Maus während der gesamten Versuchsdauer das Gewicht bestimmt.

2.3.4.1 Rotarodtestung

Bei der Rotarodtestung wurde untersucht, wie lange die Mäuse fähig sind auf einer sich beschleunigenden Walze zu laufen (Abb. 2.7). Dabei wurden die Tiere auf die sich bereits mit 4 U/min. drehende Walze des Rotarod gesetzt und eine automatische Stoppuhr gestartet. Innerhalb von 300 Sekunden beschleunigte die Walze von 4 U/min. auf 40 U/min. Fiel die Maus herunter, passierte sie eine Lichtschranke und die Zeit wurde gestoppt.

Zur Gewöhnung an die Rotarodtestung wurde jede Maus 48 Stunden und 24 Stunden vor der Operation mehrfach auf die rotierende Walze gesetzt und das Testprogramm simuliert.

Am Tag der Operation wurde jedes Tier fünfmal getestet und der Mittelwert als Referenzzeit individuell gleich 100% gesetzt. Postoperativ wurde jede Maus täglich bis zur Perfusion fünfmal getestet und der Mittelwert als jeweilige prozentuale Veränderung im Vergleich zur Referenzzeit ermittelt.

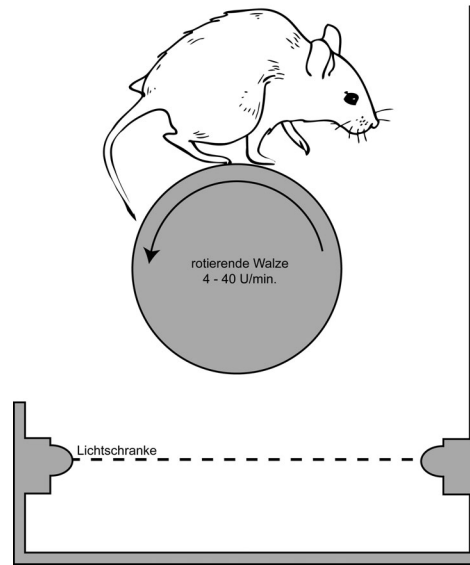


Abbildung 2.7: Schematische Darstellung der Rotarod-Untersuchung. Wird die Geschwindigkeit der Walze für die Maus zu hoch, fällt sie herunter und löst die Lichtschranke aus.

2.3.4.2 Neuroscorebewertung

Zur Bestimmung der funktionellen Schädigung bzw. Erholung der Tiere wurde an jedem postoperativen Tag ein Neuroscore erhoben. Dazu wurden die Tiere aus ihrem Käfig genommen und begutachtet. Zunächst wurden die Mäuse kurz am Schwanz in der Luft gehalten. Kam es dabei zu einer Beugung der kontralateralen Vorderpfote, wurde ein Neuroscore = 1 vergeben. Danach wurden die Tiere auf ein Metallgitter gesetzt und wieder weggezogen. Verringerte Kraft der Vorderpfoten bedeutete einen Neuroscore = 2.

Anschließend wurden die Tiere auf einen Tisch gesetzt und dabei am Schwanz festgehalten. Kam es hierbei zu einer Drehung in Richtung der Lähmung wurde ein Neuroscore = 3 vergeben. Bei spontaner Kreisbewegung bereits im Käfig, ein Neuroscore = 4.

Tiere, die keine neurologischen Auffälligkeiten zeigten, wurden mit einem Neuroscore = 0 bewertet, verstorbene Mäuse mit einem Neuroscore = 5 (Tab. 2.3).

Tabelle 2.3: Neuroscorebewertung zur Erfassung der neurologischen Erholung.

Neuroscore	Defizit
0	Neurologisch unauffällig
1	Kontralaterale Vorderbeinflexion
2	Verringerte Kraft in der kontralateralen Vorderpfote
3	Drehen im Kreis nach Zug am Schwanz
4	Spontane Kreisbewegung in Richtung der Hemiparese
5	Maus verstorben

2.3.4.3 Gewicht

Von jedem der MCP-1^{+/+}- und MCP-1^{-/-}-Tiere wurde mit einer Feinwaage am Tag der Operation und jedem folgenden postoperativen Tag das Gewicht bestimmt.

2.3.5 Bestimmung des Infarktolumens

Zur Untersuchung des Volumens der ischämischen Schadentwicklung in MCP-1^{+/+}- (n=16) und MCP-1^{-/-}-Tieren (n=16) wurde während des Anfertigens der Gefrierschnitte je alle 300 µm eine Stichprobe eines Schnittes entnommen und mit Toluidinblau angefärbt. Die Stichprobenentnahme wurde mit den ersten Anzeichen einer ischämischen Gewebeschädigung begonnen und bis zum Ende des infarzierten Areals fortgeführt (Abb. 2.10.A). Die mit Toluidin gefärbten Schnitte wurden mittels einer an eine Lupe angeschlossenen Digitalkamera fotografiert. Für die anschließende Flächenberechnung wurde mit jedem Schnitt zusätzlich ein Mikrometermaßstab fotografiert.

Mit Hilfe der Software Analysis wurde von jedem Gehirnschnitt je die Fläche der ipsilateralen und kontralateralen Hemisphäre, sowie des infarzierte Areal gemessen.

Da es nach einem Schlaganfall zu der Ausbildung eines Gehirnodems und damit zu einer Schwellung der ipsilateralen Hemisphäre kommt, musste dieser Faktor bei der Berechnung des Gesamtvolumens berücksichtigt werden. Das Gesamtvolumen des Infarktes wurde aus dem Produkt der Summe der Flächen des infarzierten Areals, der Höhe und dem Ödemfaktor (Quotient aus der Summe der kontralateralen und ipsilateralen Flächen) berechnet (Abb.2.8, Abb.2.9).

$$\text{Infarktvolume} = \frac{\sum \text{Flächen}_{\text{kontralateral}}}{\sum \text{Flächen}_{\text{ipsilateral}}} \times \sum \text{Flächen}_{\text{Infarkt}} \times 300 \mu\text{m}$$

Abbildung 2.8: Formel zur Berechnung des Infarkt volumens. Der Quotient aus kontralateraler und ipsilateraler Fläche entspricht dem Ödemfaktor.

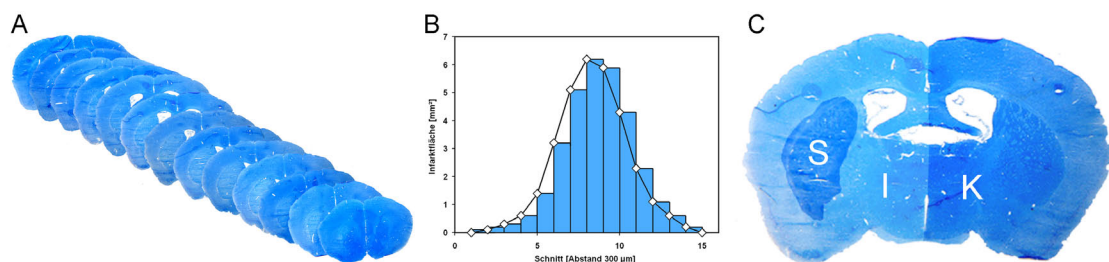


Abbildung 2.9: Beispielabbildungen zur Bestimmung des Infarkt volumens **A:** Im Abstand von 300 µm alternierende Stichproben eines toluidingefärbten postischämischen MCP-1^{+/-}-Gehirns. **B:** Durch Addition der Einzelflächen erhält man das Gesamtvolumen des infarziertes Areals. **C:** Toluidingefärbter coronaler Schnitt eines Gefrierschnitts. Die drei relevanten Flächen sind farblich hervorgehoben. S = Schlaganfall, I = ipsilaterale Hemisphäre, K = kontralaterale Hemisphäre.

2.3.5.1 Toluidinblaufärbung

Um eine korrekte Messung der Infarktfläche zu garantieren, wurden alle Gefrierschnitte für die Infarktvolumenbestimmung mit Toluidinblau gefärbt (Tab. 2.4). Infarziertes Gewebe nimmt Toluidinblau in geringeren Mengen auf, wodurch sich die Infarktfläche als helles Areal in Zentrum der ipsilateralen Hemisphäre darstellt.

Vor der Färbung wurden zunächst alle Gefrierschnitte in PBS (3x, 30 Sekunden) gewaschen, um überschüssiges TissueTek zu entfernen. Danach wurden die Schnitte in einer 0,1%igen Toluidinblau-Lösung (0,1% w/v Toluidinblau, 100 mM NaH_2PO_4 , 100 mM Na_2HPO_4 , pH 5,5) für 10 Minuten gefärbt. Die Trocknung der Schnitte erfolgte mittels aufsteigender Alkoholreihe. Für jeweils 5 Minuten wurden die Schnitte in 70%igem, 96%igem und 100%igem Ethanol entwässert und anschließend luftgetrocknet. Die getrockneten und entwässerten Schnitte wurden zur Konservierung mit Histokitt (Carl Roth, Karlsruhe) überschichtet und mit einem Deckgläschen versehen.

Tabelle 2.4: Protokoll zur Toluidinblaufärbung für die Lasercapturemikrodissektion

Schritt	Dauer
Waschen in PBS	3 x 30 Sekunden
Toluidinblau	10 Minuten
Ethanol 70 %	5 Minuten
Ethanol 96 %	5 Minuten
Ethanol 100 %	5 Minuten
Trocknen und Eindeckeln	

2.3.6 Immunhistochemie

Die Begutachtung des postischämischen Neuronenuntergangs, der Astrogliose, die Quantifizierung von Mikroglia, Makrophagen, neutrophilen Granulozyten, T-Zellen, Neuroblasten sowie die Untersuchung der Bluthirnschrankenintegrität wurde mit der Methode der immunhistochemischen Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt.

Bei dieser Methode wird das gesuchte Antigen mit einer Reaktion verschiedener Antikörper und Fluorochrome (Tabelle 2.5) sichtbar gemacht und mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops begutachtet und fotografiert.

Tabelle 2.5: Die in den immunhistochemischen Analysen eingesetzten Fluorochrome

Fluorochrom	Absorption	Emission
AlexaFluor594	594 nm	618 nm
GFP	498 nm	516 nm
DAPI	358 nm	461 nm

Zur Färbung der jeweiligen Antigene kamen die Avidin-Biotin-Methode sowie die tyramidamplifizierte Avidin-Biotin-Methode zum Einsatz.

Bei der Avidin-Biotin-Methode wurden zunächst alle zu färbenden Gefrierschnitte mit einem, für das fragliche Epitop, spezifischen Antikörper inkubiert. Danach folgte ein, gegen die jeweilige Tierspezies des Primärantikörpers gerichteter, Biotin-konjugierter Sekundärantikörper. Aufgrund der hohen Affinität des Streptavidins gegen das Vitamin Biotin ($K_m = 10^{-15}$ M) konnte abschließend ein Streptavidin-konjugierter Fluoreszenzfarbstoff (AlexaFluor594) an den Antikörperkomplex gebunden werden (Abb. 2.10). Zum Schluss wurden alle zu analysierenden Schnitte mit einem mit DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindol) versetzten Konservierungsmedium haltbar gemacht und mit ei-

nem Deckgläschen versehen. DAPI ist ein im ultravioletten Licht absorbierender Fluoreszenzfarbstoff, der sich in die AT-reichen Regionen der kleinen Furche des DNA-Strangs einlagert und im sichtbaren blauen Licht emittiert.

Durch die drei Filtersysteme des Fluoreszenzmikroskops war es möglich, den fraglichen Zelltyp bzw. das gesuchte Protein im roten Licht, die hämatogenen Zellen im grünen Licht, sowie die Zellkerne im blauen Licht zu beobachten und zu fotografieren.

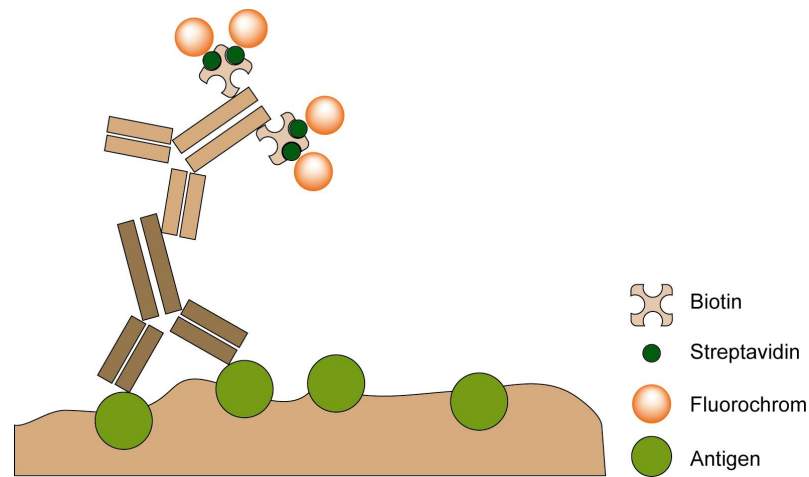


Abbildung 2.10: Schematische Darstellung der immunhistochemischen Färbung nach der Avidin-Biotin Methode. Der Primärantikörper gegen das zu untersuchende Antigen ist dunkelbraun gefärbt; der konjugierende Sekundärantikörper hellbraun.

Bei der Avidin-Biotin-Färbung einiger Zelltypen und Proteine reicht die Intensität des Fluoreszenzsignals für eine nachfolgende Begutachtung und Auswertung nicht aus. In diesen Fällen kam die tyramidamplifizierte Avidin-Biotin-Methode zum Einsatz. Nach der Inkubation mit Erst- und Biotin-konjugierten Sekundärantikörper wurde eine Streptavidin-gekoppelte Meerrettichperoxidase an den Antikörperkomplex gebunden, gefolgt von der Zugabe von Biotinyl-Tyramid. Biotinyl-Tyramid dient der Peroxidase als Substrat und wird von dieser in wasserunlösliches Biotin katalysiert, welches in der Folge an dem Epitop präzipitiert. Zu Schluss wurde der Streptavidin-Chromogen-Komplex auf die Gefrierschnitte gegeben, der aufgrund der vervielfachten Bi-

otinbindungsmöglichkeiten zu einem deutlich verstärkten Signal führte (Abb. 2.11).

Da endogene Peroxidasen der Gewebeproben zu einer Verfälschung des Signals führen würden, mussten diese vor der immunhistochemischen Färbung blockiert werden. Zu diesem Zweck wurden alle Gefrierschnitte bei denen eine tyramidamplifizierten Färbung durchgeführt wurde zunächst mit 3 %igem H_2O_2 / Methanol inkubiert (10 Minuten, Raumtemperatur). Somit konnte ausgeschlossen werden, dass die endogenen Peroxidasen Biotinyl-Tyramid umsetzen.

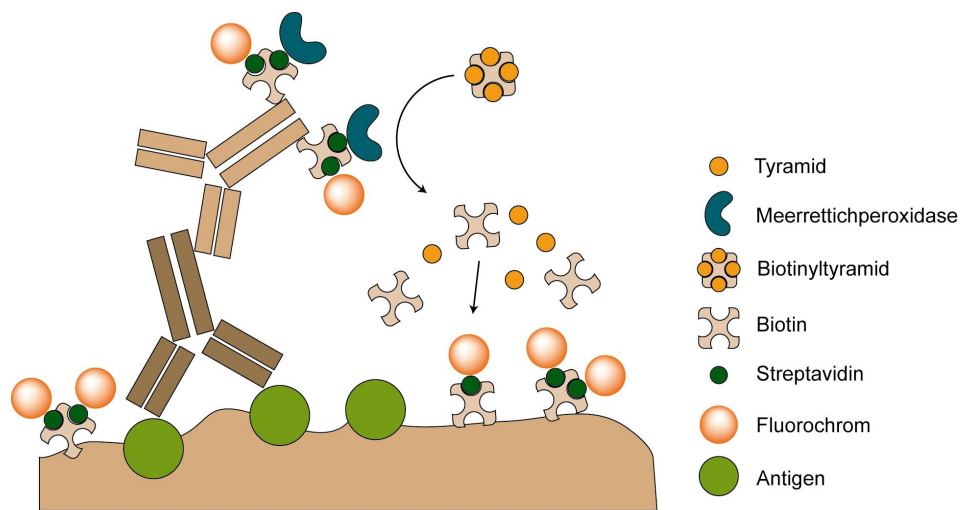


Abbildung 2.11: Schematische Darstellung der immunhistochemischen Färbung nach der tyramidamplifizierten Avidin-Biotin Methode. Der Primärantikörper gegen das zu untersuchende Antigen ist dunkelbraun gefärbt, der konjugierende Sekundärantikörper hellbraun.

2.3.6.1 Validierung des postischämischen Gewebeschadens

Neben der Toluidinfärbung wurde als zusätzliche Kontrolle einer suffizient durchgeführten Mediaokklusion eine immunhistochemische Begutachtung der postischämischen Neuronenschädigung und Astrogliose durchgeführt.

2.3.6.1.1 Neuronenfärbung

Eine erfolgreich durchgeführte zerebrale Ischämie zeichnet sich durch einen von Glukose- und Sauerstoffmangel induzierten Untergang von Neuronen aus. Von Nekrose oder Apoptose betroffenen Neurone zeigen eine veränderte Morphologie, geschrumpfte Zellkerne und einen Verlust des Fluoreszenzsignals.

Zur Validierung der korrekt durchgeführten Okklusion der *Arteria cerebri media* wurden von jedem untersuchten Tier zwei Gefrierschnitte mit dem für Neurone spezifischen nukleären Protein NeuN (*Neuronal Nuclei*) immunhistochemisch gefärbt (Tab. 2.6) und unter einem Fluoreszenzmikroskop begutachtet.

Tabelle 2.6: Protokoll zur immunhistochemischen Färbung des neuronalen Markers NeuN.

Komponente	Konzentration	Inkubation	Gelöst in
Waschen		3 x	PBS
Blocken		15 Minuten	Blockierungslösung
1. Antikörper (NeuN)	1 : 300	Ü / N bei 4 °C	Blockierungslösung
Waschen		3 x	PBS
2. Antikörper (BGoaM)	1 : 100	45 Minuten	Blockierungslösung
Waschen		3 x	PBS
AlexaFluor594®	1 : 100	45 Minuten	Blockierungslösung
DAPI			

BGoaM: Biotinylierter Ziege-anti-Maus Antikörper. Ü / N: Über Nacht.

2.3.6.1.2 Astrozytenfärbung

Nach einer zerebralen Ischämie kommt es insbesondere im Randbereich des infarzierten Areals zu einer ausgeprägten Astroglie. Dabei wird das für den Zelltyp der Astrozyten spezifische Intermediärfilament GFAP (*glial fibrillary acidic protein*, saures Gliafaserprotein) in den betroffenen Zellen verstärkt exprimiert. Damit ist GFAP ein robuster Indikator für neuropathologische Veränderungen im Gehirn. Zur Kontrolle der Astroglie wurden von jedem Tier zwei Gefrierschnitte mit dem Astrozytenmarker GFAP immunhistochemisch gefärbt (Tab. 2.7) und unter dem Fluoreszenzmikroskop begutachtet.

Tabelle 2.7: Protokoll zur immunhistochemischen Färbung des Astrozytenmarkers GFAP.

Komponente	Konzentration	Inkubation	Gelöst in
Waschen		3 x	PBS
Blocken		15 Minuten	Blockierungslösung
1. Antikörper (GFAP)	1 : 500	Ü / N bei 4 °C	Blockierungslösung
Waschen		3 x	PBS
2. Antikörper (BGoaM)	1 : 200	45 Minuten	Blockierungslösung
Waschen		3 x	PBS
AlexaFluor594®	1 : 100	45 Minuten	Blockierungslösung
DAPI			

BGoaM: Biotinylierter Ziege-anti-Maus Antikörper. Ü / N: Über Nacht.

2.3.6.2 Immunhistochemische Quantifizierung immunrelevanter Zellen

Die Quantifizierung und Begutachtung der Migration von Zellen hämatogenen Ursprungs (Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und T-Zellen), der residenten Mikroglia sowie der Neuroblasten wurde mit Hilfe der immunhistochemischen Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt.

2.3.6.2.1 Mikroglia und Makrophagen

Für die selektive Anfärbung hämatogener Makrophagen und residenter Mikroglia kam ein gegen das Glykoprotein F4/80 gerichteter Antikörper zum Einsatz. Dieses membranständige Protein wird ausschließlich von diesem Zelltyp exprimiert. Zur Verstärkung des Fluoreszenzsignals wurde die tyramidamplifizierte Biotin-Avidin-Methode eingesetzt (Tab. 2.8).

Tabelle 2.8: Protokoll zur immunhistochemischen Färbung von Mikroglia und Makrophagen.

Komponente	Konzentration	Inkubation	Gelöst in
Waschen		3 x	PBS
H ₂ O ₂	3 % v/v	10 Minuten	Methanol
Waschen		3 x	H ₂ O /PBS
Blockierungslösung		15 Minuten	
1. Antikörper (F4/80)	1 : 500	Ü / N bei 4 °C	Blockierungslösung
Waschen		3 x	PBS
2. Antikörper (BRbaR)	1 : 200	45 Minuten	Blockierungslösung
Waschen		3 x	PBS
Streptavidin-HRP	1 : 100	45 Minuten	Blockierungslösung
Waschen		3 x	PBS
Biotinyl-Tyramid	1 : 100	15 Minuten	Lösungspuffer
Waschen		3 x	H ₂ O / PBS
AlexaFluor594®	1 : 100	45 Minuten	Blockierungslösung
DAPI			

Lösungspuffer für Tyramid: H₂O₂ 3%, Imidazol 100mM in PBS. BRbaR: Biotinylierter Kaninchen-anti-Ratte Antikörper. Streptavidin-HRP: Streptavidin-Meerrettichperoxidase Konjugat. Ü / N: Über Nacht.

2.3.6.2.2 Neutrophile Granulozyten

Zur Färbung neutrophiler Granulozyten kam ein gegen das nur von polymorphonukleären Zellen exprimierte 7/4-Protein gerichteter Antikörper zum Einsatz, der mittels tyramidamplifizierter Biotin-Avidin-Methode sichtbar gemacht wurde (Tab. 2.9).

Tabelle 2.9: Protokoll zur immunhistochemischen Färbung neutrophiler Granulozyten.

Komponente	Konzentration	Inkubation	Gelöst in
Waschen		3 x	PBS
H ₂ O ₂	3 % v/v	10 Minuten	Methanol
Waschen		3 x	H ₂ O /PBS
Blockierungslösung		15 Minuten	
1. Antikörper (7/4)	1 : 200	Ü / N bei 4 °C	Blockierungslösung
Waschen		3 x	PBS
2. Antikörper (BRbaR)	1 : 100	45 Minuten	Blockierungslösung
Waschen		3 x	PBS
Streptavidin-HRP	1 : 100	45 Minuten	Blockierungslösung
Waschen		3 x	PBS
Biotinyl-Tyramid	1 : 100	15 Minuten	Lösungspuffer
Waschen		3 x	H ₂ O / PBS
AlexaFluor594®	1 : 100	45 Minuten	Blockierungslösung
DAPI			

Lösungspuffer für Tyramid: H₂O₂ 3%, Imidazol 100mM in PBS. BRbaR: Biotinylierter Kaninchen-anti-Ratte Antikörper. Streptavidin-HRP: Streptavidin-Myeloperoxidase Konjugat. Ü/N: Über Nacht.

2.3.6.2.3 T-Zellen

T-Lymphozyten exprimieren auf ihrer Zelloberfläche den membranständige Oberflächenrezeptor CD-3 (*cluster of differentiation-3*). Aus diesem Grund wurde für die immunhistochemische Färbung dieses Zelltyps ein monoklonaler Anti-CD-3-Antikörper eingesetzt (Tab. 2.10).

Tabelle 2.10: Protokoll zur immunhistochemischen T-Zell-Färbung.

Komponente	Konzentration	Inkubation	Gelöst in
Waschen		3 x	PBS
H ₂ O ₂	3 % v/v	10 Minuten	Methanol
Waschen		3 x	H ₂ O /PBS
Blockierungslösung		15 Minuten	
1. Antikörper (CD-3)	1 : 250	Ü / N bei 4 °C	Blockierungslösung
Waschen		3 x	PBS
2. Antikörper (BGoaHa)	1 : 100	45 Minuten	Blockierungslösung
Waschen		3 x	PBS
Streptavidin-HRP	1 : 100	45 Minuten	Blockierungslösung
Waschen		3 x	PBS
Biotinyl-Tyramid	1 : 100	15 Minuten	Lösungspuffer
Waschen		3 x	H ₂ O / PBS
AlexaFluor594®	1 : 100	45 Minuten	Blockierungslösung
DAPI			

Lösungspuffer für Tyramid: H₂O₂ 3%, Imidazol 100mM in PBS. BGoaHa: Biotinylierter Ziege-anti-Hamster Antikörper. Streptavidin-HRP: Streptavidin-Meerrettichperoxidase Konjugat. Ü/N: Über Nacht.

2.3.6.2.4 Neuroblasten

Doublecortin X (DCX) ist ein Mikrotubuli-assoziiertes Protein, das in neuronalen Vorläuferzellen während der adulten Neurogenese exprimiert wird. DCX ist nur vorübergehend in diesem Zelltyp und nicht in neuronalen Stammzellen oder adulten Nervenzellen nachweisbar. Aufgrund dieses Expressionsmusters wurde die Untersuchung der postschämische Neuroblastenmigration mittels einer immunhistochemischen DCX-Fluoreszenzfärbung durchgeführt (Tab. 2.11).

Tabelle 2.11: Protokoll zur immunhistochemischen Färbung neuronaler Vorläuferzellen.

Komponente	Konzentration	Inkubation	Gelöst in
Waschen		3 x	PBS
H ₂ O ₂	3 % v/v	10 Minuten	Methanol
Waschen		3 x	H ₂ O / PBS
Blockierungslösung		15 Minuten	
1. Antikörper (DCX)	1 : 500	Ü / N bei 4 °C	Blockierungslösung
Waschen		3 x	PBS
2. Antikörper (BGoaRb)	1 : 200	45 Minuten	Blockierungslösung
Waschen		3 x	PBS
Streptavidin-HRP	1 : 100	45 Minuten	Blockierungslösung
Waschen		3 x	PBS
Biotinyl-Tyramid	1 : 100	15 Minuten	Lösungspuffer
Waschen		3 x	H ₂ O / PBS
AlexaFluor594®	1 : 100	45 Minuten	Blockierungslösung
DAPI			

Lösungspuffer für Tyramid: H₂O₂ 3%, Imidazol 100mM in PBS. BGoaRb: Biotinylierter Ziegenanti-Kaninchen Antikörper. Streptavidin-HRP: Streptavidin-Meerrettichperoxidase Konjugat. Ü/N: Über Nacht.

2.3.6.3 Quantifizierung und Analyse der Immunfärbung

Alle immunhistochemischen Färbungen der 20 chimären MCP-1^{+/-} und 20 chimären MCP-1^{-/-}-Tiere wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop in 400-facher Vergrößerung begutachtet und digital fotografiert.

Von der ischämischen Hemisphäre wurden je Gehirnschnitt insgesamt fünf stichprobenartige, sich nicht überlappende Aufnahmen innerhalb des infarzierten *Striatums* angefertigt, die nahezu das gesamte Infarktareal abdeckten. Als Negativkontrolle wurden zusätzlich zwei weitere Areale des kontralateralen *Striatums* fotografiert (Abb. 2.12).

Für die Untersuchung der Neuroblastenmigration wurden zusätzlich je ipsi- und kontralateral zwei Fotos des *Corpus Callosums* und der Subventrikularzone (SVZ) angefertigt.

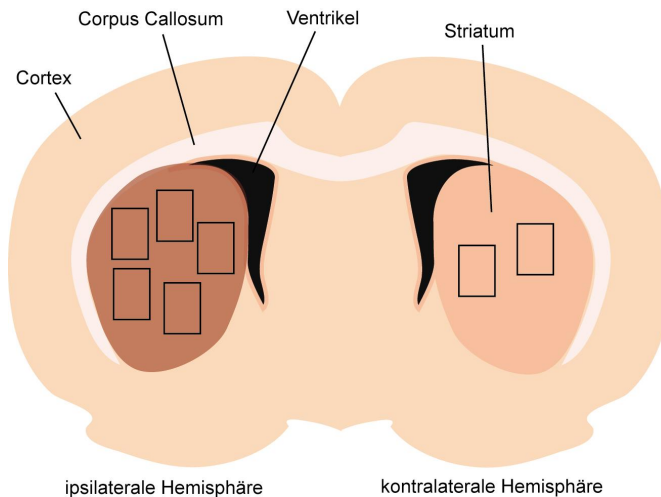


Abbildung 2.12 Schematische Darstellung eines Gehirnschnitts. Zur Zellquantifizierung residenter Mikroglia, hämatogener Makrophagen, neutrophiler Granulozyten, T-Zellen und Neuroblasten wurden je fünf Areale des ipsilateralen und zwei Areale des kontralateralen Striatums fotografiert und ausgewertet. Das infarzierte Areal ist rötlich hervorgehoben.

2.3.6.3.1 Hämatogene Makrophagen und residente Mikroglia

Die mit dem F4/80-Antikörper gefärbten Gehirnschnitte der MCP-1^{+/+}- und MCP-1^{-/-}-Tiere wurden zunächst fotografiert und die Bilder ausgewertet. Residente Mikroglia und hämatogene Makrophagen exprimieren beide das F4/80-Antigen und lassen sich erst unter Hinzunahme des GFP-Signals differenzieren. Zellen, die sowohl für F4/80 als auch GFP positive Signale zeigten, waren Makrophagen hämatogenen Ursprungs; Zellen die nur das F4/80-Signal zeigten, residente Mikroglia. Beide Zellpopulationen wurden ausgezählt und für die ipsi- und kontralaterale Hemisphäre der Mittelwert sowie die Standardabweichung ermittelt.

2.3.6.3.2 Neutrophile Granulozyten

Zur Quantifizierung der postischämischen Migration neutrophiler Granulozyten wurden alle 7/4-positiven Zellen der ipsi- und kontralateralen Hemisphäre gezählt und der Mittelwert sowie die Standardabweichung ermittelt.

2.3.6.3.3 T-Zellen

Zur Analyse einer möglichen differentiellen postischämischen T-Zell-Immigration, wurden alle CD-3-positiven Zellen der ipsi- und kontralateralen Hemisphäre ausgezählt und der Mittelwert sowie die Standardabweichung der Zellzahl ermittelt.

2.3.6.3.4 Neuroblastenmigration

Die Quantifizierung der postischämischen Neuroblastenmigration wurde in zwei definierten Arealen durchgeführt. Zunächst wurden alle DCX-positiven Zellen innerhalb des *Corpus Callosums* sowohl auf der ipsilateralen als auch auf der kontralateralen Hemisphäre gezählt und ausgewertet. Zusätzlich wurde die Neuroblastenzahl innerhalb des Striatums beider Hemisphären quantifiziert und statistisch analysiert.

2.3.6.4 *Turn-Over* perivaskulärer und meningealer Makrophagen

Da perivaskuläre und meningeale Makrophagen den für MCP-1 spezifischen Rezeptor CCR-2 exprimieren, wurde ein möglicher Einfluss des Chemokins MCP-1 auf die zyklische Erneuerung (*Turn-Over*) dieser Zellpopulation untersucht. Die Auswertung des *Turn-Over* perivaskulärer und meningealer Makrophagen wurde auf Gefrierschnitten aus je vier MCP-1^{+/-}- und MCP-1^{-/-}-Tieren ohne zerebrale Ischämie durchgeführt. Dazu wurden von jeder Maus jeweils drei Gehirnschnitte zuvor definierter Koordinaten (Bregma = ~1,98mm, ~1,32 mm und ~-0,64 mm) mit dem F4/80-Antikörper gefärbt und fotografiert.

Für die Quantifizierung des *Turn-Over* meningealer Makrophagen wurden alle F4/80-positiven Zellen entlang der Meningen beider Hemisphären gezählt. Makrophagen, die zusätzlich für das GFP-Signal positiv waren, waren nach der Transplantation in den Virchow-Robin-Raum (auch perivaskulärer Raum) immigriert. Beide Zelltypen wurden ausgezählt, deren Mittelwert sowie Standardabweichung ermittelt und die Frequenz des Austausches errechnet.

Zur Ermittlung des *Turn-Over* perivaskulärer Zellen wurden stichprobenartig etwa 20 Blutgefäße je Hemisphäre je Tier begutachtet. Perivaskuläre Zellen, die sowohl für F4/80 als auch für GFP positiv waren, sind nach der Transplantation ausgetauscht worden. Beide Zelltypen wurden ausgezählt, statistisch ausgewertet und der *Turn-Over* ermittelt (Abb. 2.13).

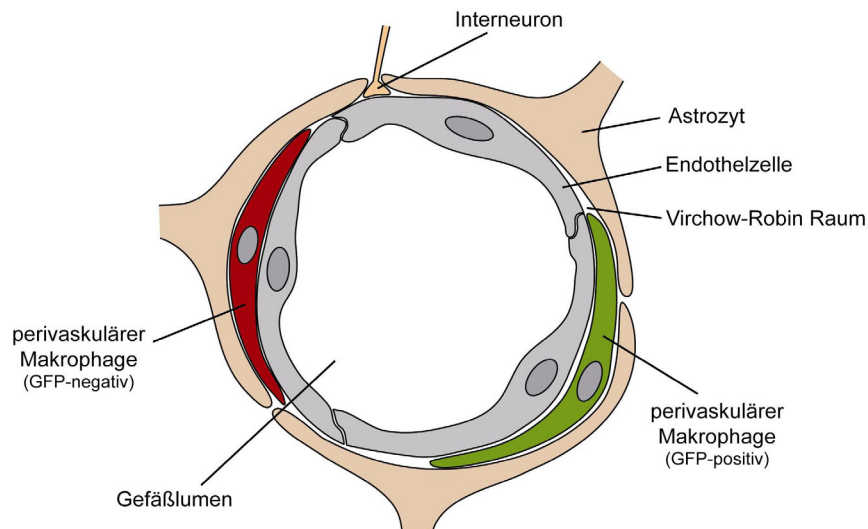


Abbildung 2.13: Schematische Darstellung des *Turn-Over* perivaskulärer und meningealer Makrophagen. Zellen, die nach der Transplantation in Virchow-Robin-Raum immigriert sind tragen das GFP-Transgen.

2.4 Molekularbiologische Analysen

MCP-1^{-/-}-Mäuse entwickeln im postischämischen Krankheitsverlauf kleinere Infarkte, zeigen eine verbesserte neurologische Erholung und einen attenuierten Einstrom hämatogener Zellen. Zur Aufklärung der molekularen Zusammenhänge wurden je fünf knochenmarkchimäre MCP-1^{+/-}- und MCP-1^{-/-}-Mäuse zunächst einer 30-minütigen Okklusion der *Arteria cerebri media* unterzogen und nach 12 Stunden perfundiert. Als Negativkontrollen dienten je drei knochenmarkchimäre MCP-1^{+/-}- und MCP-1^{-/-}-Mäuse, die ohne zerebrale Ischämie perfundiert wurden.

Im Anschluss wurden von den entnommenen Gehirnen Gefrierschnitte angefertigt, drei vordefinierte Areale (Cortex, Infarkt und kontralaterales Striatum) mittels Lasercapturemikrodissektion ausgeschnitten, die in dem Gewebe enthaltene mRNA extrahiert und die Expression ausgewählter Gene mit Hilfe der Methode der Real-Time-PCR analysiert.

2.4.1 Gewebefixation- und Präparation

Da die Fixation mit Paraformaldehyd einen nachteiligen Effekt auf die Integrität der im Gewebe enthaltenen RNA hat (Newton et al., 2002), musste die Gewebeaufbereitung für die molekularbiologischen Analysen mit einem modifizierten Protokoll durchgeführt werden.

Dazu wurden je fünf knochenmarkchimäre MCP-1^{+/-}- und MCP-1^{-/-}- Mäuse 12 Stunden postischämisch mit einer Natriumchlorid-Infusion (0,9%) perfundiert. Um eine Degradation der RNA zu verhindern, wurden die Gehirne sofort nach der Freipräparation auf Trockeneis kryoprotectiert und bis zur weiteren Bearbeitung bei -80° C gelagert.

2.4.2 Anfertigen von Gefrierschnitten

Bei der Anfertigung der Gefrierschnitte für die Mikrodissektion wurden spezielle, mit einer Polyethylenaphtalatmembran beschichtete Objektträger (*Palm Membranslides*, 1 mm) eingesetzt. Diese Membran stabilisiert den Gewebeverbund der Gehirnschnitte und vereinfacht das Ablösen des Gewebes nach dem Schneiden. Um eine Kontamination der Proben durch exogene RNAsen ausschließen zu können wurden die Objektträger vor ihrem Einsatz mit RNA-

seErase behandelt, anschließend mit DEPC-Wasser (Diethyl-Pyrocbonat, 0,1 %) gewaschen und getrocknet. Jeder Objektträger wurde mit fünf Gefrierschnitten (12 µm Schnittdicke) bestückt und anschließend für fünf Minuten in eiskaltem 96%igen Ethanol fixiert. Zum Schluss wurden die Objektträger für eine Minute luftgetrocknet und bis zur weiteren Verwendung bei -80° C gelagert.

Von jedem Tier wurden zwölf Objektträger mit je 5 Gefrierschnitten angefertigt (Bregma ca. 1,3 – -0,5 mm).

2.4.3 Toluidinfärbung

Um während der *Lasercapture*-Mikrodissektion eine sichere Identifizierung der vordefinierten Areale zu gewährleisten, wurden die Gehirnschnitte vor der Dissektion mit Toluidinblau angefärbt. Um die Gefahr einer RNA-Degradation während der Färbung zu minimieren, wurde hierzu ein modifiziertes Protokoll eingesetzt (Tab. 2.12).

Zunächst wurden die Schnitte für ca. 30 Sekunden aufgetaut und anschließend für zwei Minuten in die Toluidinblau-Lösung überführt (0,1 % w/v Toluidinblau in 100 mM Natriumphosphatpuffer, pH 5,5). Zur Entwässerung folgte eine in der Konzentration aufsteigende Alkoholreihe. Für jeweils 30 Sekunden wurden die Schnitte in 70%igem, 96%igem und 100%igem Ethanol inkubiert und anschließend für eine Minute luftgetrocknet. Durch den nun wasserfreien Zustand der Gefrierschnitte konnte eine fortschreitende Degradation der RNA weitestgehend ausgeschlossen werden.

Bis zur weiteren Verwendung wurden alle Gefrierschnitte bei -80° C gelagert.

Tabelle 2.12: Protokoll zur Toluidinblaufärbung für die *Lasercapture*-Mikrodissektion

Schritt	Dauer
Trocknen	30 Sekunden
Toluidinblau	120 Sekunden
Ethanol 70 %	30 Sekunden
Ethanol 96 %	30 Sekunden
Ethanol 100 %	30 Sekunden
Trocknen	60 Sekunden

2.4.4 *Lasercapture*-Mikrodissektion

Mit Hilfe der *Lasercapture*-Mikrodissektion ist es möglich, neben Gewebearealen einzelne Zellen oder Zellverbände kontaminationsfrei zu isolieren. Für die Untersuchung einer möglichen differentiellen postischämischen Genregulation in MCP-1^{+/-}- und MCP-1^{-/-}-Mäusen wurde die Methode der *Lasercapture*-Mikrodissektion genutzt, um drei vordefinierte Areale (Infarkt, ipsilateraler Cortex und kontralaterales Striatum) des Gehirns zu isolieren, die darin enthaltene mRNA zu gewinnen und die postischämische Expression der fraglichen Gene zu analysieren (Abb. 2.14).

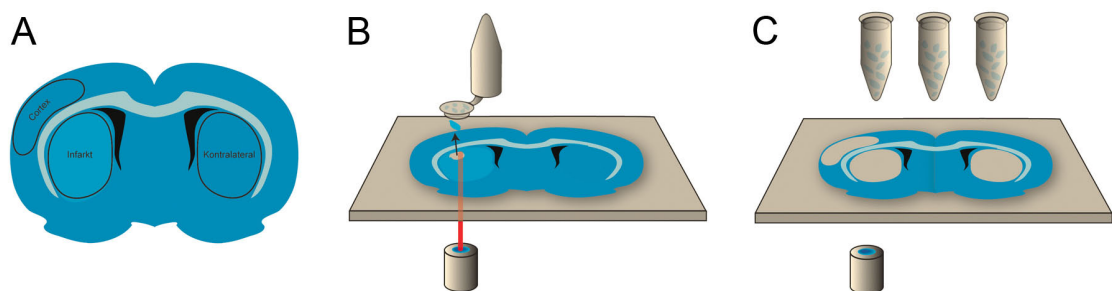


Abbildung 2.14: Schematische Darstellung zur Methode der *Lasercapture*-Mikrodissektion. **A:** von jedem toluidingefärbten Gefrierschnitt wurden drei definierte Areale untersucht. **B:** Mit Hilfe eines Laserstrahls wurde zunächst ein definiertes Areal ausgeschnitten und mit einem Plasmaimpuls in den Deckel eines Reaktionsgefäßes katapultiert. **C:** Die ausgeschnittenen Gewebeflocken jedes Areals wurden in separaten Reaktionsgefäßen gesammelt.

Jeder Gefrierschnitt wurde direkt vor der *Lasercapture*-Mikrodissektion für 30 Sekunden bei Raumtemperatur aufgetaut. Anschließend wurden die Objektträger auf dem Kreuztisch des Mikroskops fixiert und die drei definierten Areale (Abb. 2.14 A) mit Hilfe der mitgelieferten Software (Palm RoboSoftware 2.0) markiert. Die Isolierung der einzelnen Areale erfolgte mittels Impuls gesteuerter UV-Laserablation. Der fokussierte Laserstrahl wurde dabei entlang der vorgegebenen Konturen des jeweiligen Areals von der Software gesteuert und separierte es damit von dem Rest des Gewebes.

Nach durchgeführter Separation wurde die Gewebeflocke durch einen, ebenfalls von dem Laserstrahl erzeugten, Plasmaimpuls in ein mit 20 µl Lyse- und Denaturierungspuffer (143 mM β-Mercaptoethanol in RLT-Puffer, RNeasy Microkit, Qiagen) gefüllten Deckel eines Reaktionsgefäß katapultiert (Abb. 2.14 B). Für jedes Areal wurde ein separates Reaktionsgefäß verwendet. Nach erfolgter Mikrodissektion wurde der Deckel verschlossen und die Proben mittels Zentrifugation (1 Minute, 8000 U/min.) in das Reaktionsgefäß gebracht. Bei den Kontrolltieren ohne zerebrale Ischämie wurde anstatt des Infarktareals das ipsilaterale Striatum ausgeschnitten.

Bis zur weiteren Bearbeitung wurden alle dissektionierten Gewebeproben bei -80° C eingefroren.

2.4.5 Extraktion von mRNA

Für die molekularbiologischen Untersuchungen musste zunächst die RNA aus den dissektionierten Gewebeflocken extrahiert werden. Dazu wurden die Zellen zuerst durch den Lysepuffer aufgeschlossen und andere Zellbestandteile wie DNA, Lipide oder Proteine entfernt. Für die RNA-Extraktion wurde das RNeasy-Microkit (Qiagen GmbH, Hilden) eingesetzt. Mit diesem Kit ist es möglich, kleinste Mengen von total-RNA selektiv aufzureinigen. Die RNeasy-

Microtechnologie filtert während der Prozedur zusätzlich RNA-Moleküle einer Größe ≤ 200 Nukleotide aus der Lösung heraus, so dass es zu einer gewünschten Anreicherung von mRNA kommt.

Die RNA-Aufreinigung erfolgte gemäß dem Protokoll des RNeasy-Mikrokit (Qiagen GmbH, Hilden) für mikrodisektionierte Kryosektionen. Die extrahierte RNA wurde zum Schluss mit 13 μ l RNase-freiem Wasser eluiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80° C eingefroren.

2.4.6 Bestimmung der RNA-Integrität

Als transkriptives Zwischenelement vom Gen zum Genprodukt hat das mRNA-Molekül eine bedeutende Funktion in der Informationskette der Genexpression. Die vollständige Integrität der mRNA ist eine grundsätzliche Voraussetzung für eine suffiziente Translation der exprimierten Gene.

Die Instabilität der meisten mRNA-Moleküle sowie die Gefahr der Degradation durch exogene RNasen machen eine Kontrolle der RNA-Qualität und -Integrität für nachgeordnete Expressionsstudien mittels quantitativer *Real-Time*-PCR (qRT-PCR) unumgänglich.

Für die folgenden Genexpressionsstudien wurde die extrahierte gesamt-RNA mittels Agilent 2100 Bioanalyzer Technik einer standardisierten Qualitätsbestimmung unterzogen. Diese Technik basiert auf einer mikrokapillären, elektrophoretischen Größenseparation von RNA-Molekülen, die mittels laser-induzierter Fluoreszenz detektiert werden (Mueller et al., 2000; Miller et al., 2004). Dabei ist es möglich, geringste Mengen der RNA durch die gelhaltigen Mikrokanäle der RNA-Chips aufzutrennen. Zur Darstellung werden die Laufweiten-Elutionszeiten mit denen von vordefinierten RNA-Größen korreliert und daraus ein virtuelles Elektropherogramm generiert (Abb.2.15).

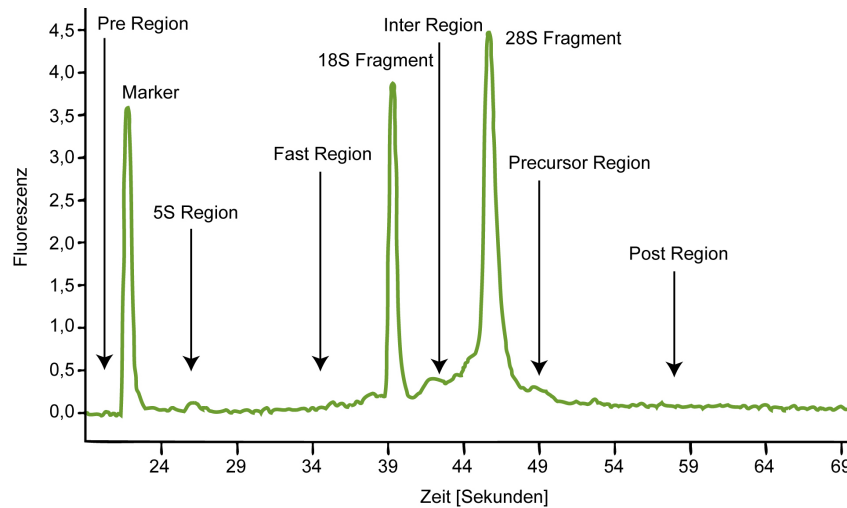


Abbildung 2.15: Darstellung eines exemplarischen Elektropherogramms. Die unterschiedlichen Regionen und die Spitzenwerte der 18S- und 28S-RNA innerhalb des Elektropherogramms repräsentieren definierte Bestandteile der total-RNA. Diesen Bereichen werden Qualitätswerte zugeordnet aus denen sich die RNA-Integrität (RIN) errechnen lässt.

Das digitale Elektropherogramm visualisiert die zeitabhängige Größenseparation und wird in verschiedene definierte Regionen unterteilt, die stellvertretend für die entsprechenden Bestandteile der total-RNA sind (Mueller et al., 2004). Diesen Regionen werden definierte Qualitätswerte von 1 bis 10 zugeordnet aus denen das RNA-Integritätsmaß errechnet wird. Eine RIN von 1 steht für vollständig degradierte RNA; eine RIN von 10 für vollständig intakte RNA. Für die folgenden Genexpressionsanalysen wurde nur RNA mit einer $RIN \geq 6,5$ eingesetzt. Für die Bestimmung der RNA-Integrität wurde von jeder RNA-Probe 1 μ l entnommen und auf einen RNA-Pico-Chip gegeben.

2.4.7 cDNA-Synthese

Für die rückläufige Übersetzung der genetischen Information von mRNA in cDNA (*complementary DNA*) wurde das Prinzip der reversen Transkription genutzt. Für die reverse Transkription werden heute genetisch optimierte Varianten der natürlich vorkommenden Retrovirus-Enzyme eingesetzt. Zur selektiven Umsetzung der enthaltenen mRNA wurden Oligo-(dT)-Primer einge-

setzt, die an die mRNA-Poly-(A)-Schwänze dieser binden und die Sequenzen der mRNA-Moleküle in komplementäre cDNA transkribieren. Der RNA-Strang wird nach erfolgter cDNA-Synthese von der RNase-H-Domäne der reversen Transkriptase abgebaut, so dass am Ende je ein einzelsträngiges cDNA-Molekül mit der komplementären Sequenz der Ursprungs-mRNA vorliegt.

Für die Generierung von cDNA aus der RNA des *lasercapture*-mikrodissektionierten Gewebes wurden die verbliebenen 12 µl jeder RNA-Probe eingesetzt. Die cDNA-Synthese erfolgte nach den Protokollen des Quantitect-Reverse-Transkriptionskit des Herstellers Qiagen.

2.4.8 Qualitätskontrolle der cDNA-Bibliotheken

Zur Überprüfung der erfolgreich durchgeführten reversen Transkription wurde von allen 48 generierten cDNA-Bibliotheken je eine Probe (0,5 µl) entnommen und damit eine Kontroll-PCR durchgeführt (Tab. 2.13).

Tabelle 2.13: PCR-Ansatz für die Kontrolle einer cDNA-Probe.

Komponente	Menge
RedTaq-Mastermix	12 µl
HPLC-Wasser	11,5 µl
GAPDH-Primerpaar	0,5 µl
cDNA	0,5 µl

Für die Kontroll-PCR kam ein Exon übergreifendes, für die GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) spezifisches Primerpaar (Quantitect Primer Assay, Qiagen GmbH, Hilden) zum Einsatz (Tab. 2.14). Bei korrekt durchgeführter reverser Transkription und PCR generiert dieses Primerpaar ein PCR-Produkt mit einer Länge von 144 Basenpaaren.

Nach erfolgter Amplifikation wurden die Proben auf ein Agarosegel (2%ig) aufgetragen, elektrophoretisch getrennt (120 V, 20 Minuten), fotografiert und begutachtet.

Tabelle 2.14: PCR-Programm der cDNA-Qualitätskontrolle.

Schritt	Temperatur	Zeit
1. Aktivierung der Polymerase	95° C	10 min.
2. Denaturierung der DNA	94° C	1 min.
3. Primerbindung	55° C	0,5 min.
4. Prolongation	72° C	3 min.
5. Wiederholung von 2.-4. (35x)		
6. Finale Prolongation	72° C	3 min.

Nach durchgeführter reverser-Transkription und Qualitätsbegutachtung wurden die verbliebenen 19,5 µl Endvolumen aller Proben mit weiteren 21,5 µl HPLC-Wasser für die folgenden quantitativen *Real-Time*-PCR-Auswertungen verdünnt.

2.4.9 Quantitative *Real-Time*-PCR

Durch die PCR (Polymerase-Kettenreaktion) ist es seit vielen Jahren möglich, kleinste DNA-Mengen in zyklischen Prozessen enzymatisch zu vervielfältigen und folgend zu analysieren. Jedoch waren quantitative Aussagen aufgrund des schwankenden Verhältnisses der DNA-Ausgangsmenge sehr unpräzise (Mullis et al., 1987). Mit der Entwicklung der Methode der quantitativen *Real-Time*-PCR (qRT-PCR) wurde diese Limitation überwunden (Higuchi et al., 1992). Bei der quantitativen *Real-Time*-PCR wird während der gesamten Amplifikation mit Hilfe von fluoreszierenden Reporterfarbstoffen die Zunahme der generierten PCR-Produkte detektiert. Dabei nimmt, bei idealer Effi-

zienz der Reaktion, die Zunahme der Fluoreszenz proportional mit der Menge des amplifizierten PCR-Produktes zu.

Konform dem Prinzip der gewöhnlichen PCR wurden die generierten cDNA-Proben zur Expressionsanalyse mittels qRT-PCR und für die Kandidatengene spezifischen Primer als Initiationsstelle der hier verwendeten Hot-Star Taq® Polymerase (Qiagen GmbH, Hilden) nach folgendem Ansatz (Tabelle 2.15) amplifiziert. Sämtliche Kandidatengene, Referenzproben und Negativkontrollen wurden in Duplikaten angesetzt und untersucht.

Tabelle 2.15: Einzelner Reaktionsansatz der qRT-PCR.

Komponente	Menge
SYBR-Green PCR-Master Mix	5 µl
10x Quantitect Primer Assay	1 µl
RNase-freies Wasser	3 µl
cDNA	1 µl
	Σ 10 µl

Alle qRT-PCR-Analysen wurden mit einem ABI PRISM® 7700 RT-PCR-Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) nach dem SYBR-Green-Mastermix-Protokoll (Qiagen GmbH, Hilden) durchgeführt (Tab. 2.16).

Tabelle 2.16: Zyklenprogramm der qRT-PCR.

Schritt	Zeit	Temperatur
1. Aktivierung der Polymerase	10 min.	95° C
2. Denaturierung	15 sek.	94° C
3. Primeranlagerung	30 sek.	55° C
4. Prolongation	30 sek.	72° C
5. Wiederholung von 2.-4. (40x)		
6. Schmelzkurvenanalyse	15 sek.	60° C – 95° C

Als Reporterfluoreszenzfarbstoff wurde für die Expressionsstudien der Cyanin-Farbstoff SYBR-Green eingesetzt (Morrison et al., 1998). SYBR-Green zeichnet sich durch die Eigenschaft aus, in doppelsträngige DNA zu interkalieren und ein Fluoreszenzsignal zu emittieren. Frei in Lösung zeigt der Farbstoff keine Fluoreszenz. Während der qRT-PCR steigt die Intensität des Fluoreszenzsignals linear mit der Menge der amplifizierten doppelsträngigen DNA.

Zu Beginn der Amplifikation ist das detektierbare Fluoreszenzsignal sehr schwach und nicht von dem vorherrschenden Hintergrundrauschen zu differenzieren (Abb. 2.16). Mit zunehmender Zyklenzahl und generierter DNA-Menge nimmt das Signal exponentiell an Intensität zu und nähert sich dem zuvor festgelegten Schwellenwert an. Der Zyklus, in dem der Schwellenwert überschritten wird, wird als C_T -Wert (*threshold cycle*) bezeichnet. Anhand der ermittelten C_T -Werte der einzelnen qRT-PCR-Analysen konnte die Berechnung der differentiellen Expressionsniveaus der fraglichen Gene in den untersuchten Gruppen durchgeführt werden. Die ursprüngliche Ausgangsmenge der eingesetzten mRNA zu Beginn der qRT-PCR steht dabei in direktem Zusammenhang mit dem C_T -Wert. Je höher die mRNA / cDNA-Ausgangsmenge, desto niedriger der ermittelte C_T -Wert.

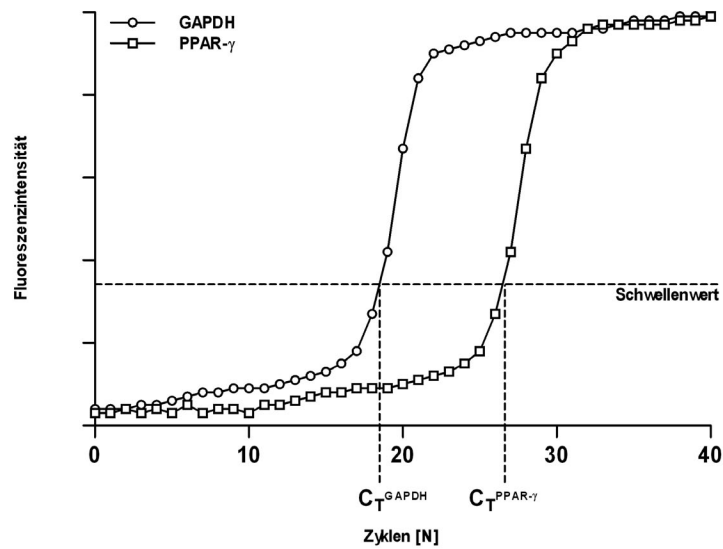


Abbildung 2.16: Beispielabbildung zur qRT-PCR. Dargestellt sind zwei Amplifikationskurven, bei denen die Zyklenzahl gegen die Fluoreszenzintensität aufgetragen ist. Der Schwellenwert dient als Ausgangspunkt für die Berechnung der DNA-Ausgangsmenge der Probe (hier: GAPDH und PPAR- γ) beim Start der qRT-PCR. Der C_T -Wert stellt den Zyklus dar, bei dem das Fluoreszenzsignal des fraglichen Produktes erstmalig exponentiell zunimmt.

Die postischämische Expression der untersuchten Gene wurde mit Hilfe der relativen Quantifizierung berechnet. Hierfür wurde die Expression der Kandidatengene mit der eines nicht regulierten Referenzgens (hier: Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) zunächst normalisiert und anschließend die relativen Expressionsdaten der untersuchten Gruppe auf die Expressionsdaten einer Kontrollgruppe bezogen.

Die Berechnung der differentiellen Expression zwischen Kontroll- und Untersuchungsgruppe erfolgte nach der Effizienz korrigierten $\Delta\Delta C_T$ -Methode (Abb. 2.17). Mit der Software „Relative Expression Software Tool“ (REST) (Pfaffl et al., 2002) wurden zunächst die Mittelwerte der Expressionsdaten innerhalb der untersuchten Gruppen berechnet. Anschließend wurden die mittleren Expressionsunterschiede (R) und Varianzen zwischen den Gruppen über die Expression des Haushaltsgens (HHG) normalisiert.

Die Effizienz (E) aller durchgeführten qRT-PCRs wurde auf einen Wert von 90 % festgelegt. Dieser Wert basiert auf Untersuchungen und Ergebnissen einer anderen Arbeitsgruppe zur *Real-Time-PCR-Effizienz* (Tichopad et al., 2003).

$$R = \frac{(E_{\text{Kandidatengen}})^{\Delta C_{T \text{ Kandidatengen}} (MW_{\text{Kontrolle}} - MW_{\text{Probe}})}}{(E_{\text{HHG}})^{\Delta C_{T \text{ HHG}} (MW_{\text{Kontrolle}} - MW_{\text{Probe}})}}$$

Abbildung 2.17: Formel zur effizienz-korrigierten $\Delta\Delta C_T$ -Methode (R: Expressionsdifferenz, E: Effizienz).

2.4.10 Validierung der qRT-PCR

Nach jeder qRT-PCR wurde abschließend eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Mit Hilfe dieser Methode ist es möglich, die korrekte Amplifikation der Fragmente zu validieren. Im Anschluss an die qRT-PCR wird die Temperatur in den Reaktionsvertiefungen des *Thermocyclers* für 15 Sekunden von 60° C auf 95° C erhöht. Sobald die der Produktlänge sowie dessen GC- und AT-Gehalt entsprechende Schmelztemperatur erreicht ist, beginnen die doppelsträngigen DNA-Moleküle zu einzelsträngiger DNA aufzuschmelzen. Da *SYBR-Green* nur in Verbindung mit doppelsträngiger DNA ein Fluoreszenzsignal emittiert, nimmt die detektierbare Fluoreszenz mit zunehmender Konzentration einzelsträngiger DNA ab.

Bei korrekter Amplifikation zeigt sich lediglich eine der Fragmentlänge entsprechende Schmelztemperatur. Mehrere Schmelztemperaturen in einer gemessenen Probe deuten auf unspezifische Primeranlagerung und damit auf eine fehlerhafte oder unspezifische Amplifikation hin.

Zur abschließenden Kontrolle wurden stichprobenartig nach durchgeführter Amplifikation einige qRT-PCR-Produkte auf ein Agarosegel (2%ig) aufgetra-

gen, elektrophoretisch getrennt, fotografiert und begutachtet. Bei korrekt amplifizierter cDNA zeigt sich jeweils nur die Bande der zu erwarteten Größe.

2.4.11 Oligonukleotide für die Expressionsanalysen

Für die Expressionsanalyse der fraglichen Gene wurden, mit einer Ausnahme, kommerziell erhältliche, für die qRT-PCR optimierte und validierte Primer (Quantitect Primer Assay, Qiagen GmbH) eingesetzt (Tab. 2.17). Um eine unerwünschte Amplifikation genomischer DNA zu vermeiden, wurden nur Primer eingesetzt, die Exon übergreifend binden und somit nur prozessierte, transkribierte cDNA amplifizieren. Für die Untersuchung der postischämischen Protein-Histidin-Phosphatase-1-Expression stand kein kommerziell erhältlicher Primer zur Verfügung.

Tab. 2.17: Primer für die Expressionsanalyse der fraglichen Gene.

Gen	QuantiTect Primer	Produktgröße
Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)	QT01658692	144 bp
Interleukin 1 β (IL-1 β)	QT01048355	150 bp
Tumor Nekrose Faktor 1 (TNF-1)	QT00104006	112 bp
Interleukin 6 (IL-6)	QT00098875	128 bp
Granulozyten-Kolonie Stimulierender Faktor (G-CSF)	QT00105140	67 bp
Peroxisom Proliferator Aktivierter Rezeptor- γ (PPAR- γ)	QT00100296	144 bp
Matrix-Metalloprotease 9 (MMP-9)	QT00108815	84 bp
Metalloprotease-Inhibitor 1 (TIMP-1)	QT00996282	134 bp
Vaskuläres Zell-Adhäsionsprotein 1 (V-CAM-1)	QT00128793	130 bp
Protein-Histidin-Phosphatase 1 (PHP-1)	-	150 bp

2.4.12 Primerdesign für die Protein-Histidin Phosphatase

Da für die Expressionsanalyse der postischämischen Expression der Protein-Histidin-Phosphatase-1 (PHP) kein kommerziell erhältlicher Primer zur Verfügung stand, musste – unter Zuhilfenahme der genomischen DNA-Sequenz der PHP – ein für die qRT-PCR geeignetes Primerpaar gefunden werden. Der bereits sequenzierte DNA-Abschnitt der PHP wurde mittels des UCSC *Genome Browser* (<http://genome.ucsc.edu>) ermittelt und mit Hilfe der im Internet frei verfügbaren Primerdesignsoftware „Primer3“ (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) ein geeignetes Primerpaar entwickelt (Abb. 2.18).

```
GGTCGGGTTTGGTAAGGGGCTGTGGGGCCCAGAGATCGAGCGCTTCGGGGAACATGGCGG
CGGACCTCGGTCAGATTCCTGATGTAGACATTGATTCGGATGGCGTCTTCAAGTATGTGC
TGATTCGAGTCCACTTAGCAGAGCCTTCTGGGGATCCGGCGAAGGAGTGCAAGGAAATCG
TGCGTGGCTACAAATGGGCTGAGTACCACGtgacatctatgacaaagtgtcaggcgagc
tgcaaaggaatggctatgactgtgagtgcctaggcggggggcgcatctcccatcagagcca
ggacaggaagatacacgtgtatggctactctatgGGTTACGGTCGTGCCCAGCACTCTGT
TTCAACTGAGAAGATCAAAGCCAAGTATCCTGACTATGAGGTCACCTGGGCTGACGATGG
CTACTGAAGCTCTGCCCCACCCCCCACCCTGGACTAAGTCAGGTCTCTGCTCTTGCTG
TGTTCTGTTTTGAGGGGCTGGCCCTGTGCTTTCCTTTTGTACCTTAGGCAGCATAGCACC
TGCCAGGCCTTAGAGGCCAGACCAATCTGGTCCATAGGAATAAAAGCATTGATATGCCT
Acg
```

Abbildung 2.18: Darstellung der DNA-Sequenz der Protein-Histidin-Phosphatase. Die beiden flankierenden Primer sind in rot (PHPf) und blau (PHPr) hervorgehoben. Die drei Exons der PHP sind durch Groß- und Kleinschreibung differenziert.

Das Primerpaar PHPf / PHPr bindet in Exon 2 und Exon 3 und generiert bei korrekter Anlagerung an reverse-transkribierte cDNA ein Amplikon mit einer Größe von 150 Basenpaaren.

2.4.13 Qualitätskontrolle des PHP-Primerpaars

Um ausschließen zu können, dass das Primerpaar PHPf / PHPr genomische DNA oder Fragmente unerwünschter Größe amplifiziert, wurde zunächst eine Temperaturgradienten-PCR mit einer MCP-1^{+/+}-Probe genomischer DNA durchgeführt (Tab. 2.13).

Bei der Temperaturgradienten-PCR wurden 12 identische PCR-Reaktionsansätze mit jeweils unterschiedlicher, aufsteigender Primerbindungstemperatur amplifiziert (50° C, 50,4° C, 51,2° C, 52,5° C, 54,2° C, 56,4 °C, 58,9° C, 61° C, 62,7° C, 63,9° C, 64,7° C, 65° C) (Tab. 2.14).

Nach durchgeführter PCR wurden alle Proben auf ein Agarosegel (2%ig) aufgetragen, elektrophoretisch getrennt (120 V, 20 Minuten) und fotografiert. Bei der Begutachtung des Gels wurde untersucht, ob das Primerpaar PHPf / PHPr mit genomischer DNA bindet und Fragmente fraglicher Größe dieser amplifiziert.

Um zusätzlich sicherzustellen, dass das Primerpaar PHPf / PHPr mit reverse-transkribierter cDNA nur das erwartete Produkt der Größe von 150 Basenpaaren generiert, wurde anschließend eine weitere Temperatur-Gradienten-PCR mit einer cDNA-Probe eines MCP-1^{+/+}-Tieres durchgeführt. Hierzu wurden die gleichen Ansätze und das gleiche PCR-Programm wie bei der Kontrolle der genomischen DNA eingesetzt (Tab. 2.18, Tab. 2.19).

Tabelle 2.18: PCR-Ansatz für die Temperaturgradienten-PCR.

Komponente	Menge
RedTaq-Mastermix	12 µl
HPLC-Wasser	11,5 µl
Primer PHPf	0,5 µl
Primer PHPr	0,5 µl
gDNA / cDNA	0,5 µl

Tabelle 2.19: PCR-Programm der Temperatur-Gradienten-PCR.

Schritt	Temperatur	Zeit
1. Aktivierung der Polymerase	95° C	10 min.
2. Denaturierung der DNA	94° C	1 min.
3. Primerbindung	50° C -65° C	0,5 min.
4. Prolongation	72° C	3 min.
5. Wiederholung von 2.-4. (35x)		
6. Finale Prolongation	72° C	3 min.

2.5 Analyse der postischämischen Bluthirnschrankenintegrität

Zur Untersuchung möglicher Unterschiede der postischämischen Bluthirnschrankenpermeabilität wurden je fünf nicht-chimäre MCP-1^{+/-} und MCP-1^{-/-} Mäuse einer zerebralen transienten fokalen Ischämie durch Okklusion der *Arteria cerebri media* unterzogen.

12 Stunden nach durchgeführter Operation wurde jedem Tier 10 mg des Eiweiß gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffs FITC-Albumin (Fluoreszeinisothiocyanat-Albumin, gelöst in 300 µl PBS) in die *Vena coccygealis lateralis* injiziert, die Mäuse nach weiteren 20 Minuten perfundiert und die Gehirne kyroprotektiert.

FITC-Albumin eignet sich durch seine Fluoreszenzeigenschaften (Absorption bei 488 nm, Emission 530 nm), den Übertritt von Eiweißen durch die Bluthirnschranke zu verfolgen. Bei gesunden Mäusen ist FITC-Albumin aufgrund seiner Molekulargröße und Polarität nicht Bluthirnschranken gängig. Nach einem Schlaganfall kommt es jedoch zu einer Umstrukturierung von Bluthirnschrankenproteinen sowie zu Schädigungen des Gefäßendothels mit der Folge erhöhter Permeabilität. FITC-Albumin kann somit postischämisch in das Gewebe diffundieren (Abb. 2.19). Durch Messung der Fluoreszenzintensität des übergetretenen FITC-Albumins in das Gehirngewebe sollte ermittelt werden,

ob es zu einer differenziellen Schädigungen der Bluthirnschranke in MCP-1^{+/+}- und MCP-1^{-/-}-Mäusen kommt.

Von den Gehirnen beider Gruppen wurden für die immunhistochemischen Analysen je 15 Gefrierschnitte (Bregma ~ -0,64) mit einer Dicke von 10 µm und für die densitometrischen Analysen je fünf Gefrierschnitte (Bregma ~ -0,64) mit einer Dicke von 25 µm angefertigt.

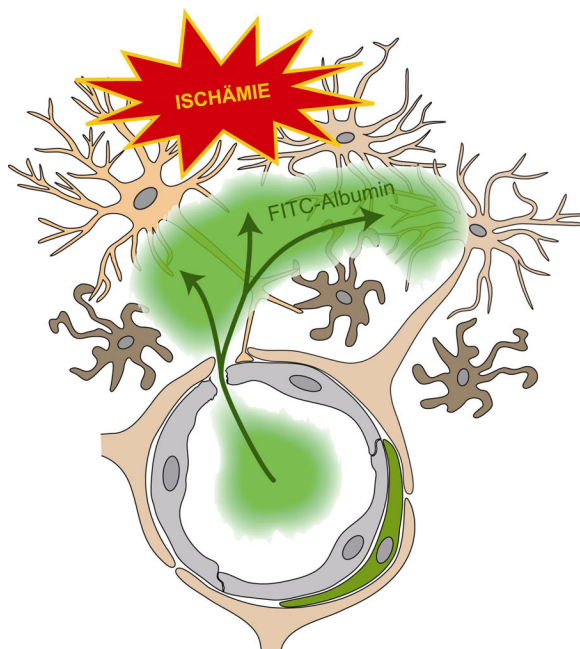


Abbildung 2.19: Schematische Darstellung des postischämischen Übertritts von FITC-Albumin durch das geschädigte Gefäßendothel in das Gehirnparenchym.

2.5.1 Densitometrische Auswertung des FITC-Albumin-Übertritts

Zur Bestimmung des postischämischen intrazerebralen FITC-Albumin-Gehalts wurde die Methode der densitometrischen Fluoreszenzanalyse eingesetzt. Dazu wurden pro Tier von jeder ipsilateralen Hemisphäre sechs und von jeder kontralateralen Hemisphäre drei Fotos mit einem Fluoreszenzmik-

roskop mit den für FITC-Albumin spezifischen Absorptions- und Emissionsfrequenzen angefertigt (Abb. 2.20 A).

Um eine Verfälschung der Ergebnisse durch Autofluoreszenz des Gewebes ausschließen zu können, wurde zunächst der Durchschnitt der Autofluoreszenzsignale der drei kontralateralen Aufnahmen mittels der frei verfügbaren Software ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) errechnet und daraus ein Foto generiert, das von jeder Aufnahme des infarzierten Areals subtrahiert wurde (Abb. 2.20 B).

Für die Quantifizierung des verbliebenen ipsilateralen FITC-Signals wurden die Fotos im Anschluss, ebenfalls mit ImageJ, von der ursprünglichen Farbtiefe (8 Bit) auf Fotos mit einer Farbtiefe von 1 Bit reduziert (schwarz / weiß). Dadurch war es möglich, zwischen zwei Zuständen innerhalb der Aufnahme zu differenzieren. Ein weißes Pixel stand dabei für 0 = kein FITC-Signal und ein schwarzes Pixel für 1 = FITC-Signal (Abb. 2.20 C). Für eine exakte Vergleichbarkeit wurde bei der Erstellung der 1 Bit-Fotos innerhalb aller Aufnahmen und Gruppen derselbe Schwellenwert für den Übergang von 0 auf 1 gewählt.

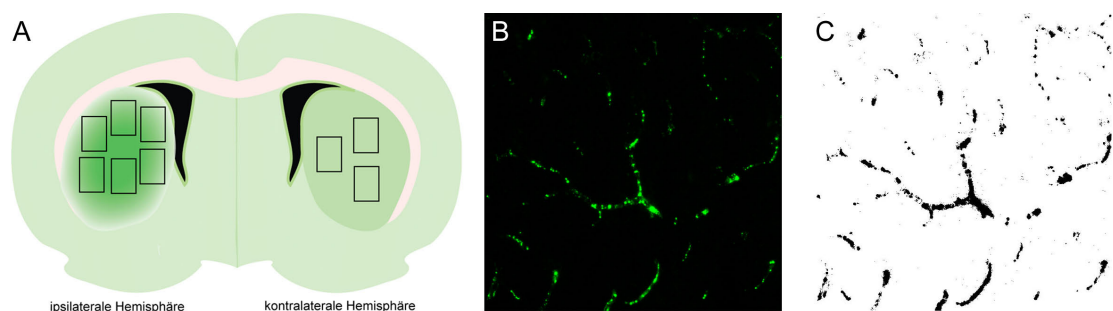


Abbildung 2.20: A: Schematische Darstellung eines postischämischen, mit FITC-Albumin behandelten Gehirnschnitts. Zur Quantifizierung des diffundierten FITC-Albumins wurden je sechs Areale des ipsilateralen und drei Areale des kontralateralen Striatums fotografiert. B: Beispiel einer 8-Bit Fluoreszenzaufnahme des FITC-Signals. Die Autofluoreszenz ist bereits aus dem Foto subtrahiert. C: Derselbe Ausschnitt nach Umwandlung in ein binäres Bild. Zwei Zustände sind möglich: 0 = kein FITC-Signal und 1 = FITC-Signal

Zur Auswertung eines möglichen differenziellen Albumin-Übertritts wurden alle FITC-positiven Pixel je Aufnahme mit ImageJ gezählt, die Mittelwerte sowie Standardabweichungen errechnet und die Ergebnisse zwischen den MCP-1^{+/-}- und MCP-1^{-/-}-Mäusen verglichen.

2.5.2 ELISA-Auswertung des FITC-Albumin-Übertritts

Eine weitere Möglichkeit, die Konzentration des ins das Gehirnparenchym diffundierten FITC-Albumin-Konjugats zu quantifizieren, ist die Bestimmung der Fluoreszenzintensität mittels ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*).

Für die Analyse wurden je 50 mg der ipsilateralen und kontralateralen Hemisphäre aller Tiere in Lysepuffer (Tris 25 mM, NaNO₃ 1 mM, SDS 1%, EDTA 2 mM, pH 7,4) mit einem elektrischen Pürierstab zerkleinert und die Suspension anschließend zentrifugiert (8000 U/min., 10 min., 4° C). Anschließend wurde der Überstand in die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte pipettiert und die Fluoreszenzintensität der Lösungen mittels eines Mikrotiterplattenlesers für die FITC-spezifischen Absorptions- und Emissionsfrequenzen detektiert und ausgewertet.

Für die Berechnung der FITC-Albuminkonzentration der Proben wurde eine Eichgerade erstellt. Dazu wurden sieben FITC-Albuminlösungen bekannter, aufsteigender Konzentration in Duplikaten (0 µg/ml, 3,125 µg/ml, 6,25 µg/ml, 12,5 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml und 100 µg/ml in Lysepuffer) in die Vertiefungen pipettiert und gemessen. Anhand der ermittelten Fluoreszenzsignale wurde eine Formel zu Berechnung der FITC-Konzentration in den Gewebeproben erstellt.

Zur vergleichenden Analyse der Messwerte wurden die ermittelten FITC-Albuminkonzentrationen jeder Gruppe gemittelt und die Standardabweichung errechnet.

2.5.3 Begutachtung der Bluthirnschrankenintegrität

2.5.3.1 von-Willebrand-Faktor-Immunhistochemie

Bei der densitometrischen Analyse des FITC-Albumin-Übertritts durch die Bluthirnschranke konnte insbesondere bei den MCP-1^{-/-}-Mäusen eine offensichtliche Kolo-kalisation des FITC-Signals mit Blutgefäßen beobachtet werden. Zur Bestätigung wurde von jedem MCP-1^{+/-}- und MCP-1^{-/-}-Tier aus der FITC-Analyse je ein Gefrierschnitt (Bregma ~ -0,64 mm) mit dem für Endothelzellen spezifischen Marker von-Willebrand-Faktor immunhistochemisch gefärbt und mittels Fluoreszenzmikroskop begutachtet (Tab. 2.19).

Tabelle 2.19: Protokoll zur immunhistochemischen Färbung des von-Willebrand-Faktors.

Komponente	Konzentration	Inkubation	Gelöst in
Waschen		3 x	PBS
Blocken		15 Minuten	Blockierungslösung
1. Antikörper (vWF)	1 : 100	Ü / N bei 4 °C	Blockierungslösung
Waschen		3 x	PBS
2. Antikörper (BGoaRb)	1 : 200	45 Minuten	Blockierungslösung
Waschen		3 x	PBS
AlexaFluor594®	1 : 100	45 Minuten	Blockierungslösung
DAPI			

BGoaRb: Biotinylierter Ziege-anti-Kaninchen Antikörper. Ü / N: Über Nacht.

2.5.3.2 *Zonula-occludens-1* und Occludin-Immunhistochemie

In-vitro durchgeführte Analysen konnten zeigen, dass MCP-1 über eine Aktivierung der Proteinkinase C die für die Ausbildung der Bluthirnschranke essentiellen Proteine ZO-1 sowie Occludin phosphoryliert. Die Phosphorylierung dieser Proteine könnte in einer Veränderung der Tertiärstruktur und dem Verlust der Bluthirnschrankenintegrität einhergehen. Daher wurde ein möglicher Einfluss von MCP-1 auf die postoperative strukturelle Integrität der beiden *tight-junction*-Proteine ZO-1 und Occludin mittels Immunfluoreszenz analysiert. Die Analyse erfolgte auf jeweils einem Gefrierschnitt (Bregma ~ -0,64 mm) der fünf MCP-1^{+/-} und MCP-1^{-/-}-Tiere aus der FITC-Albumin-Untersuchung.

Zur Färbung des intrazellulären *tight-junction*-Proteins ZO-1 wurde ein im Kaninchen generierter ZO-1-spezifischer Antikörper eingesetzt (Tab. 2.20). Nach durchgeführter Färbung wurden die Schnitte mittels Fluoreszenzmikroskop begutachtet und die Morphologie des ZO-1-Signals bei MCP-1^{+/-} und MCP-1^{-/-}-Mäusen verglichen.

Tabelle 2.20: Protokoll zur immunhistochemischen Färbung von ZO-1.

Komponente	Konzentration	Inkubation	Gelöst in
Waschen		3 x	PBS
Blocken		15 Minuten	Blockierungslösung
1. Antikörper (ZO-1)	1 : 100	Ü / N bei 4 °C	Blockierungslösung
Waschen		3 x	PBS
2. Antikörper (BGoaRb)	1 : 100	45 Minuten	Blockierungslösung
Waschen		3 x	PBS
AlexaFluor594®	1 : 100	45 Minuten	Blockierungslösung
DAPI			

BGoaRb: Biotinylierter Ziege-anti-Kaninchen Antikörper. Ü / N: Über Nacht.

Zur Färbung des transmembranen *tight-junction*-Proteins Occludin kam ebenfalls ein im Kaninchen generierter Antikörper zum Einsatz (Tab. 2.21). Konform zu der Analyse von ZO-1 wurde die Morphologie des Occludinsignals beider Gruppen mittels Fluoreszenzmikroskop begutachtet und miteinander verglichen.

Tabelle 2.21: Protokoll zur immunhistochemischen Occludin-Färbung.

Komponente	Konzentration	Inkubation	Gelöst in
Waschen		3 x	PBS
Blocken		15 Minuten	Blockierungslösung
1. Antikörper (Occludin)	1 : 250	Ü / N bei 4 °C	Blockierungslösung
Waschen		3 x	PBS
2. Antikörper (BGoaRb)	1 : 200	45 Minuten	Blockierungslösung
Waschen		3 x	PBS
AlexaFluor594®	1 : 100	45 Minuten	Blockierungslösung
DAPI			

BGoaRb: Biotinylierter Ziege-anti-Kaninchen Antikörper. Ü / N: Über Nacht.

3 Ergebnisteil

3.1 Zucht und Generierung knochenmarkchimärer Mäuse

3.1.1 Genotypisierung

Um sicherzustellen, dass es sich sowohl bei den Knochenmarkrezipienten als auch den -donoren um homozygote MCP-1^{-/-} bzw. homozygote MCP-1^{+/+}-Mäuse handelt, wurde von jedem Tier eine Probe genomischer DNA (gDNA) entnommen und mittels PCR untersucht.

Das Primerpaar oIMR1993 / oIMR1994 amplifiziert ein für das Wildtypallel markierendes Fragment mit einer Länge von 888 bp. Das Primerpaar oIMR1993 / oIMR558 erzeugt ein 1375 bp langes, bei vorhandener MCP-1-Defizienz entstehendes Amplikon. Heterozygote MCP-1^{+/-}-gDNA amplifiziert beide Fragmente. Die jeweiligen PCR-Produkte wurden auf ein Gel aufgetragen und nach elektrophoretischer Auftrennung fotografiert und ausgewertet. Während der laufenden Zucht wurde eine stete Selektion zugunsten der jeweiligen homozygoten Mäuselinie durchgeführt, so dass zu Versuchsbeginn ausreichend MCP-1^{-/-} bzw. MCP-1^{+/+}- Rezipienten und Donoren zur Verfügung standen.

3.1.2 Chimären

Um eine Differenzierung residenter Mikroglia und hämatogener Makrophagen zu ermöglichen, wurden für die Experimente chimäre Mäuse mit GFP-transgenem Knochenmark hergestellt. Jeder GFP-chimären Maus wurde nach drei Monaten eine Blutprobe aus der *Vena coccygealis lateralis* entnommen und davon ein Ausstrich auf einem Objektträger angefertigt. Die GFP-positiven Leukozyten in dem Blutausrich wurden unter einem Fluoreszenzmikroskop

mit den für das grün-fluoreszierende Protein spezifischen Frequenzen (395 nm Absorption, 509 nm Emission) sichtbar gemacht und deren prozentualer Anteil an der Gesamtleukozytenzahl ermittelt (Abb. 3.1). Jede Chimäre, deren Anteil GFP-transgener Leukozyten $\geq 90\%$ war, wurde für die weiteren Versuchsreihen eingesetzt.

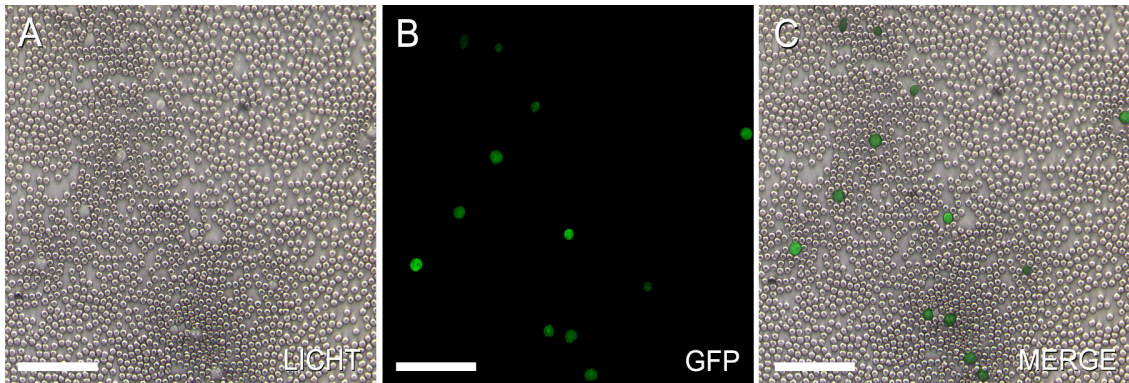


Abbildung 3.1 **A:** Durchlichtaufnahme eines Blutausstrichs. **B:** Derselbe Ausschnitt im Fluoreszenzkanal dargestellt. **C:** Überlagerung von lichtmikroskopischer Darstellung und Fluoreszenzaufnahme. In diesem Beispiel sind 100% der vorhandenen Leukozyten GFP-transgen. Den Grossteil, der auf den Abbildungen 3.1. A und C zu erkennenden Zellen, machen die grau-braun gefärbten kernlosen Erythrozyten aus. Messbalken = 100 μm .

3.2 Verhaltenstestungen

3.2.1 Rotarod

Zur Erfassung möglicher postischämischer motorischer und sensomotorischer Leistungsdifferenzen zwischen MCP-1^{+/+}- und MCP-1^{-/-}-Mäusen, wurden alle Tiere vor und nach der operativen Okklusion der *Arteria cerebri media* einer Rotarodtestung unterzogen. Bei diesem Test wird ermittelt, wie lange die Mäuse fähig sind, auf einer sich beschleunigenden Walze (von 5 auf 40 Umdrehungen/min innerhalb von 300 Sekunden) zu laufen. Unmittelbar vor der Operation wurde jedes Tier fünfmal getestet und der ermittelte Mittelwert individuell gleich 100% als Referenzzeit gesetzt. Postoperativ wurde jede Maus

täglich bis zum Tag der Perfusion getestet und die jeweilige absolute prozentuale Veränderung festgehalten (Abb. 3.2).

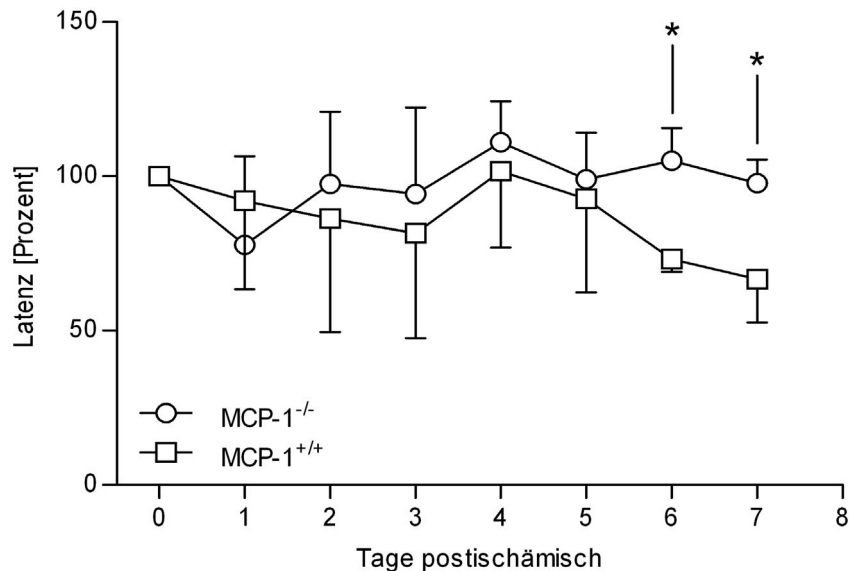


Abbildung 3.2: Statistische Auswertung der Rotarod-Untersuchung. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung der jeweils individualisierten prozentualen Verweildauer auf der rotierenden Walze. Tag 0 und Tag 1 n=16. Tag 2 n=12. Tag 3 und Tag 4 n=8 und Tag 5-7 n=4. Signifikanz nach ANOVA * $p < 0,05$.

Am Tag der Referenznahme (Tag 0) konnten zwischen MCP-1^{+/+}- und MCP-1^{-/-}-Chimären keinerlei Leistungsunterschiede auf der rotierenden Walze gemessen werden.

An Tag 1 nach zerebraler Ischämie liefen die MCP-1^{+/+}-Mäuse noch $92,06 \pm 28,62$ Prozent der Referenzzeit und erholten sich bis Tag 4 auf $101,67 \pm 24,69$ Prozent. Ab Tag 4 kam es bei den Kontrollen zu einem Einbruch der motorischen Leistung. Die Tiere schafften $92,70 \pm 30,21$ Prozent an Tag 5, $73,21 \pm 4,14$ Prozent an Tag 6 und $66,65 \pm 13,97$ Prozent an Tag 7. Bei den MCP-1^{-/-}-Mäusen liefen die Tiere an Tag 1 noch $78,43 \pm 28,73$ Prozent der Referenzzeit und erholten sich an Tag 4 bis auf $111,09 \pm 13,19$ Prozent. Im weiteren Verlauf kam es nicht zu einem Leistungseinbruch sondern zu einer signifikanten ($p < 0,05$)

Verbesserung gegenüber sowohl MCP-1^{+/+}-Tier als auch Referenzzeit (105,06 ± 10,60 Prozent an Tag 6 und 97,84 ± 7,56 Prozent an Tag 7).

3.2.2 Neuroscore

Zur weiteren Beurteilung der postischämischen Beeinträchtigung wurden alle Tiere einer täglichen Begutachtung des gesundheitlichen Gesamtzustandes unterzogen und dieser mit Hilfe einer Neuroscoretablette bewertet (Abb. 3.3).

Die Mäuse beider Gruppen zeigten bereits an Tag 1 nach Induktion der zerebralen Ischämie erhebliche funktionelle Beeinträchtigungen. Bei den MCP-1^{+/+}-Mäusen wurde ein Neuroscore von 3,15 ± 0,69; bei den MCP-1^{-/-}-Tieren ein Neuroscore von 2,67 ± 0,72 ermittelt.

Vier Tage nach der Operation kam es bei der Kontrollgruppe im weiteren Verlauf zu einer weiteren Verschlechterung bis auf einen Neuroscore von 3,5 ± 0,71 an Tag 7. Die MCP-1^{-/-}-Tiere erholten sich im Verlauf der Versuchswoche wieder bis auf einen Neuroscore von 2,33 ± 0,57 und zeigten damit eine signifikante Verbesserung gegenüber der Kontrollgruppe an Tag 7 ($p < 0,05$).

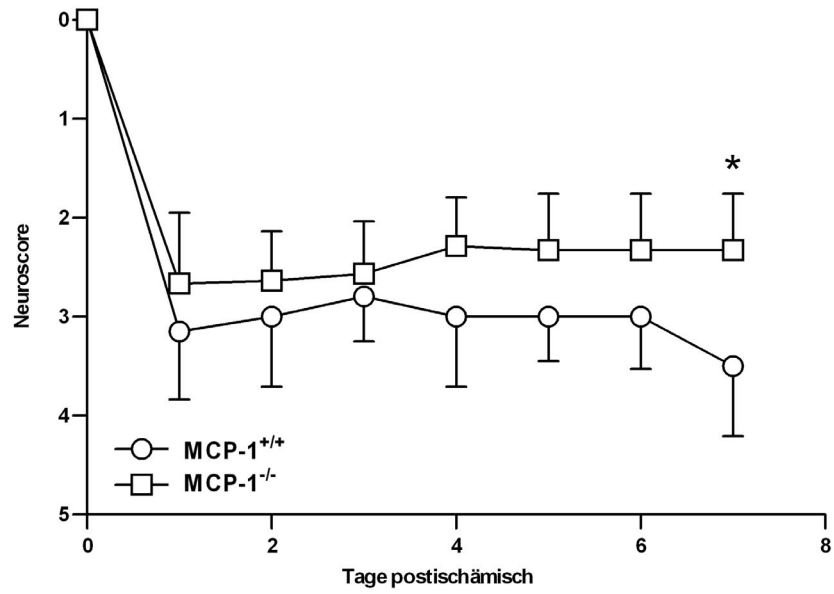


Abbildung 3.3: Statistische Auswertung der Neuroscorebewertung. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung. Tag 0 und Tag 1 n=16. Tag 2 n=12. Tag 3 und Tag 4 n=8 und Tag 5-7 n=4. Signifikanz nach ANOVA * $p < 0,05$.

3.2.3 Gewicht

Direkt vor der Schlaganfall-Operation und während der nachfolgenden sieben Tage wurde von jeder Maus täglich das Gewicht bestimmt (Abb. 3.4).

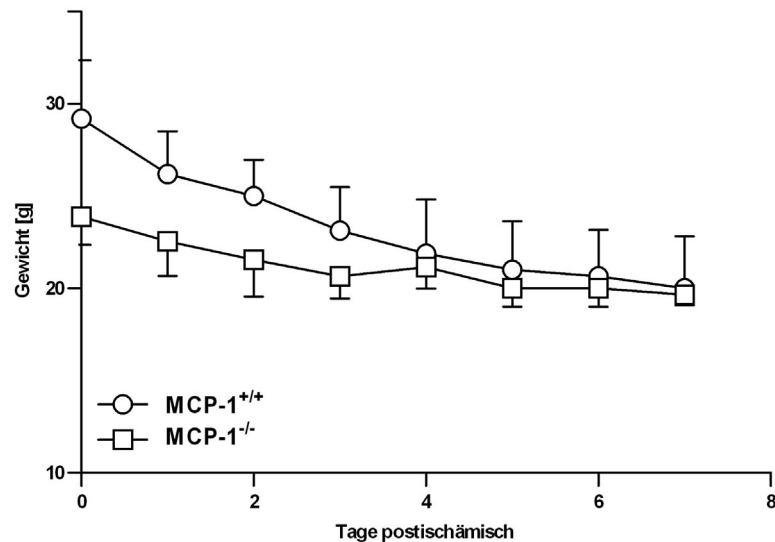


Abbildung 3.4: Statistische Auswertung der postoperativen Gewichtsentwicklung. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung. Tag 0 und Tag 1 $n=16$. Tag 2 $n=12$. Tag 3 und Tag 4 $n=8$ und Tag 5-7 $n=4$.

Die Kontrolltiere wogen am Tag der Operation $29,19 \pm 3,17$ g; die MCP-1^{-/-}-Mäuse $23,73 \pm 1,33$ g. Im Verlauf der Versuchswoche verlor die Kontrollgruppe 31,5% ihres Gewichtes und wog an Tag 7 im Durchschnitt $20 \pm 2,83$ g. Die MCP-1^{-/-}-Tiere verloren in dieser Zeit 17,1% an Gewicht und wogen durchschnittlich $19,67 \pm 0,59$ g an Tag 7.

3.3 Entwicklung des ischämischen Gewebeschadens

Der 30-minütige operative Verschluss der *Arteria cerebri media* verursachte reproduzierbar einen unilateralen Infarkt innerhalb der Stammganglien / Striatum mit nur geringer Variation zwischen den untersuchten Tieren und Gruppen (Abb. 3.5).



Abbildung 3.5: Toluidin gefärbter Gefrierschnitt eines Mausgehirns nach zerebraler transienter fokaler Ischämie. Das Infarktareal ist durch die roten Pfeile gekennzeichnet.

3.3.1 Infarktvolumen

Um zu ermitteln, ob es bei der ischämischen Schadenentwicklung zu Infarktgrößendifferenzen zwischen MCP-1^{+/+}- und MCP-1^{-/-}-Mäusen kommt, wurde während des Anfertigens der Kryoschnitte nach jeweils 300 µm eine Stichprobe eines Gefrierschnitts entnommen, mit Toluidin angefärbt und die Infarktfläche gemessen. Aus der Summe der ermittelten Flächen wurde für jedes Tier das Infarktvolumen errechnet und statistisch ausgewertet (Abb. 3.5).

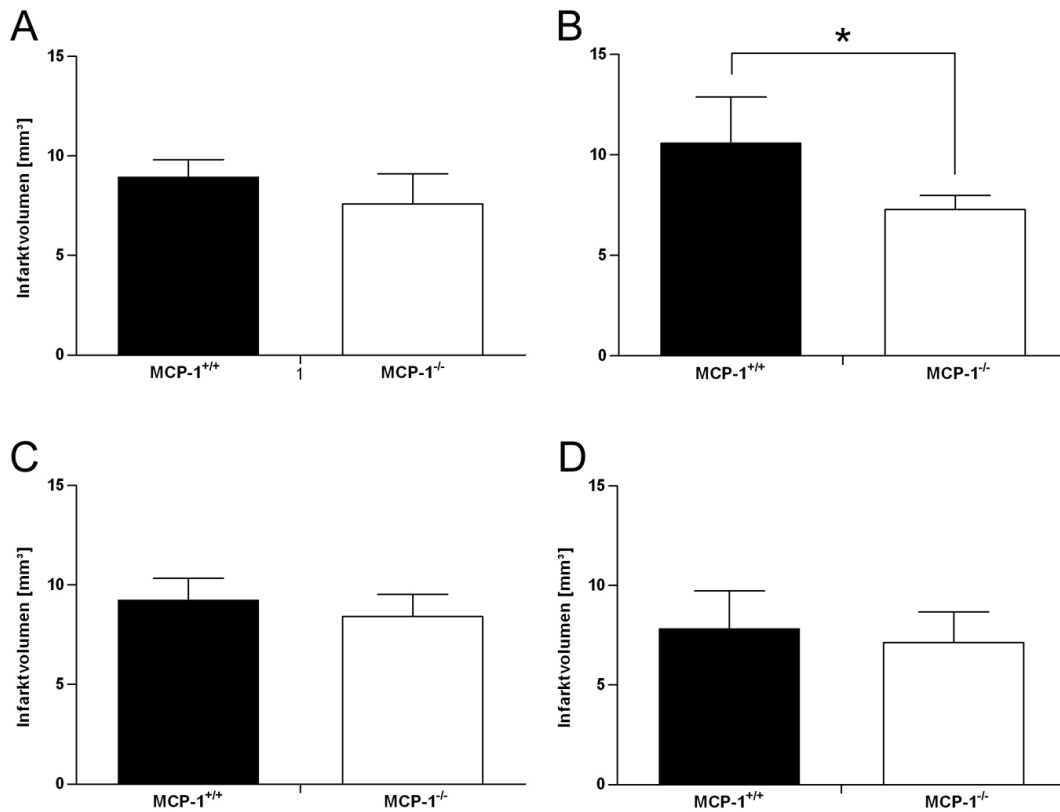


Abbildung 3.5: Auswertung des Infarkt volumens. **A:** Infarktgrößenvergleich zwischen MCP-1^{+/+}- und MCP-1^{-/-}-Tieren 1 Tag postischämisch. **B:** Infarktgrößenvergleich 2 Tage postischämisch. **C:** Infarktgrößenvergleich 4 Tage postischämisch. **D:** Infarktgrößenvergleich 7 Tage postischämisch. Je Gruppe und untersuchtem Zeitpunkt n=4. Signifikanz nach ANOVA,* p < 0,05.

Bei den MCP-1^{+/+}-Tieren konnte an Tag 1 postischämisch ein Infarktvolumen von $8,93 \pm 0,89 \text{ mm}^3$ ermittelt werden. Die MCP-1^{-/-}-Tiere zeigten zu diesem Zeitpunkt ein geringeres Infarktvolumen mit $7,585 \pm 1,52 \text{ mm}^3$. Zwei Tage nach durchgeführter Schlaganfalloperation zeigten die MCP-1^{+/+}-Tiere mit einem Infarktvolumen von $10,58 \pm 2,3 \text{ mm}^3$ eine signifikant ($p < 0,05$) größere Schädigung als die MCP^{-/-}-Tiere zu diesem Zeitpunkt ($7,288 \pm 0,71 \text{ mm}^3$).

Nach vier und sieben Tagen konnte bei den MCP-1^{+/+}-Mäusen mit $9,24 \pm 1,1 \text{ mm}^3$ bzw. $7,83 \pm 1,9 \text{ mm}^3$ ebenfalls je ein vergrößertes Infarktvolumen gegenüber dem MCP^{-/-}-Tieren mit $8,426 \pm 1,1 \text{ mm}^3$ bzw. $7,136 \pm 1,54 \text{ mm}^3$ gemessen werden.

3.3.2 Neuronenschädigung

Ein sicherer Hinweis für eine erfolgreich durchgeführte 30-minütige Okklusion der *Arteria cerebri media* und damit einhergehende Ischämie ist der morphologische Zustand der Neurone in dem betroffenen Areal. Hierfür wurde eine immunhistochemische Färbung des neuronenspezifischen Proteins NeuN auf Gefrierschnitten (10 μm) durchgeführt und die fraglichen Zellen mittels Fluoreszenzmikroskop begutachtet.

Die Morphologie der Neurone und der Verlust des Fluoreszenzsignals in dem infarzierten Areal deuteten auf eine ausgeprägte Schädigung der Zellen hin. Stark geschrumpfte, kondensierte Zellkerne sind ein robuster Indikator für apoptotische und nekrotische Prozesse (Abb. 3.6).

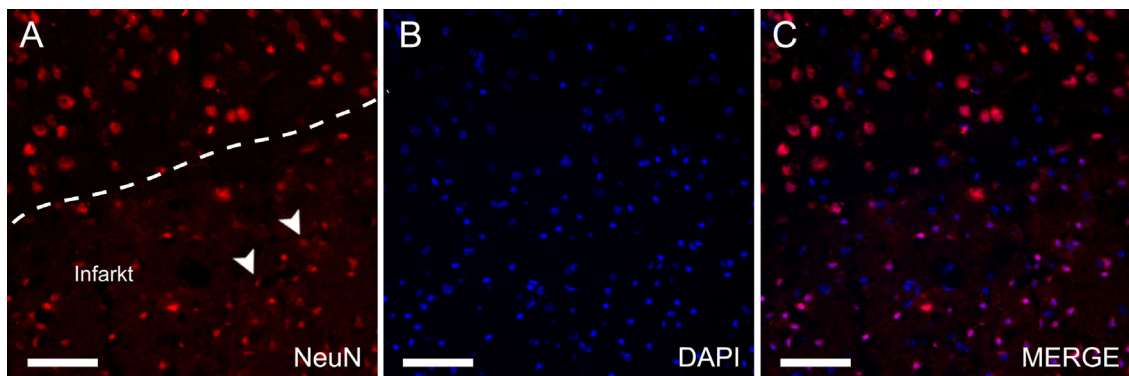


Abbildung 3.6: Immunhistochemische Neuronenfärbung auf einem Gefrierschnitt (10 μm) eines infarzierten Mäusegehirns. Der Übergang zum von Ischämie betroffenen Areal ist durch eine gestrichelte Linie gekennzeichnet (Abb. 3.6 A). Die Pfeile markieren exemplarisch zwei nekrotische Neurone. Messbalken = 50 μm . Zellkerne blau gefärbt (DAPI).

3.3.3 Astrogliose

Als zusätzliche Kontrolle wurde zudem eine Immunfärbung der Astroglia durchgeführt. Dieser im Gehirn dominierend vorhandene Zelltyp reagiert extrem sensibel auf neuropathologische Veränderungen wie Verletzung, Ent-

zündung oder Ischämie mit einer Zunahme der Expression des glialen fibrillären sauren Proteins (GFAP). In dem während der Versuche angewandten Schlaganfallmodell kam es insbesondere in der Penumbra zu einer ausgeprägten Astrogliose (Abb. 3.7).

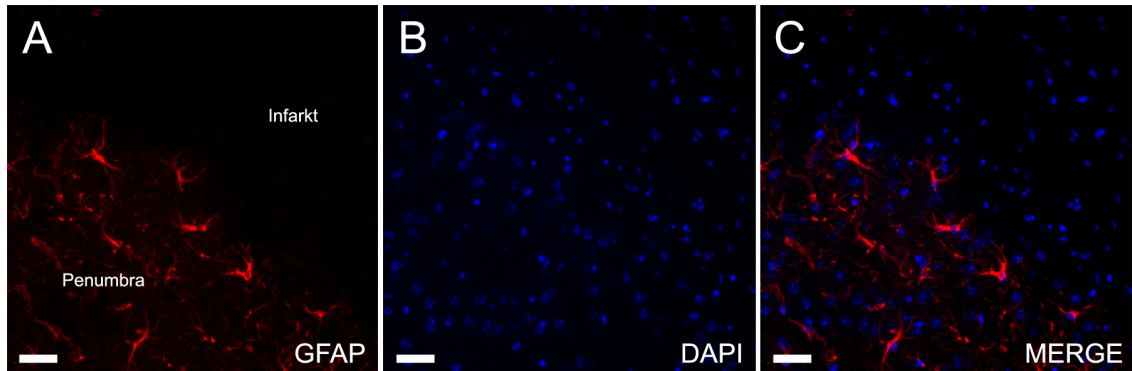


Abbildung 3.7: Immunhistochemische Astrozytenfärbung auf einem Gefrierschnitt (10 µm). Ausschnitt eines Infarktareals. Zahlreiche GFAP⁺-Zellen finden sich im Randbereich des infarzierten Gewebes und zeigen den Übergang vom Infarkt zur Penumbra. Messbalken = 25 µm. Zellkerne blau gefärbt (DAPI).

3.4 Differenzierung zwischen Mikroglia und Makrophagen

Diese Versuchsreihe diente der Untersuchung des Einflusses des Chemokins MCP-1 auf die Aktivierung von residenter Mikroglia und der Rekrutierung hämatogener Makrophagen in das geschädigte Gewebe nach einem experimentellen Schlaganfall. Hierzu wurde bei je 16 MCP-1^{+/-} und 16 MCP-1^{-/-} Mäusen eine transiente fokale zerebrale Ischämie erzeugt und jeweils 4 Tiere je Gruppe zu unterschiedlichen Zeitpunkten (1 Tag, 2 Tage, 4 Tage und 7 Tage postischämisch) untersucht. Aus jeder Gruppe wurden zusätzlich je 4 Tiere ohne Schlaganfall (Null Tage) als Kontrollen herangezogen.

Die Untersuchung von Mikroglia und Makrophagen nach immunhistochemischer Färbung mit dem für diese Zellpopulation spezifischen F4/80-Antikörper zeigte eine Aktivierung dieser Zellen mit sichtbarer Änderung der

Zellmorphologie im infarzierten Areal (Abb. 3.8 A-D, F-H). Außerhalb des betroffenen Gewebes fanden sich nicht aktivierte residente F4/80⁺-Zellen mit dünnen Zellkörpern und feiner Ramifizierung (Abb. 3.7 E); innerhalb des Infarktgebietes bildeten sich bei der überwiegenden Anzahl der Mikrogliazellen die Fortsätze zurück und die Zellen zeigten ein runde Form mit vergrößertem Zellkörper (Abb. 3.8 A-D). Eine geringe Anzahl F4/80⁺-Zellen besaß eine plumpe Ramifizierung (Abb. 3.8 F-H).

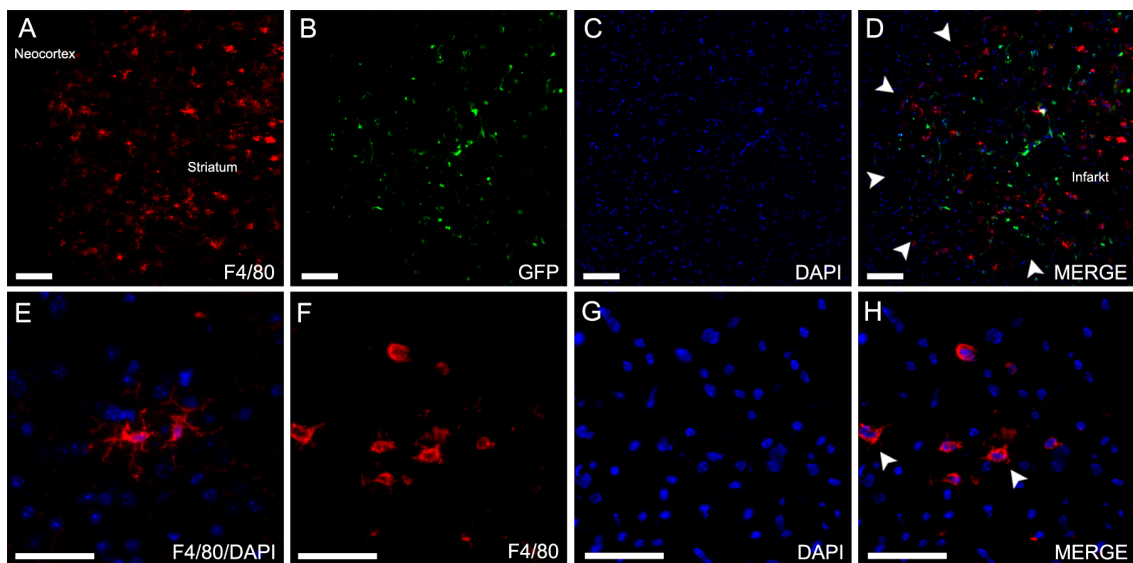


Abbildung 3.7 A-D: Ausschnitt eines Infarktareals (Infarktgrenzen durch weiße Pfeile gekennzeichnet). Im Striatum sind postischämisch zahlreiche F4/80⁺ (A) sowie immigrierte GFP⁺-Zellen (B) zu sehen. Im Neokortex findet sich hingegen eine deutlich geringere Anzahl immunhistochemisch detektierbarer Zellen. E: Ruhende, mit feiner Ramifizierung versehene Mikrogliazellen im Neokortex. F-G: Einige immunhistochemisch angefärbte Mikrogliazellen zeigen im Infarktareal eine plumpe Ramifizierung (durch Pfeile gekennzeichnet). Alle Färbungen sind auf 10 µm dicken Gefrierschnitten erstellt worden. Messbalken A-D = 100 µm; E-H = 25 µm. Zellkerne blau gefärbt (DAPI).

Zur Untersuchung des Einfluss von MCP-1 auf die Mikrogliaaktivierung und Makrophagenrekrutierung wurde von jedem Tier ein Gefrierschnitt (Bregma x ~ 0,64 mm) entnommen und mit dem für Mikroglia / Makrophagen-spezifischen F4/80-Antikörper gefärbt. Zur Detektion des Antikörpers wurde Alexa-Fluor594® eingesetzt, welches im langwelligen sichtbaren Licht bei 594 nm emittiert.

Da die untersuchten Tiere GFP-transgenes Knochenmark erhalten haben, exprimierten alle hämatogenen Zellen das grün-fluoreszierende Protein und leuchteten grün (488 nm). Somit war es möglich, zwischen residenter Mikroglia ($F4/80^+$ / GFP $^-$) und immigrierten Makrophagen ($F4/80^+$ / GFP $^+$) zu differenzieren (Abb. 3.8). Die gefärbten Schnitte wurden mittels Immunfluoreszenzmikroskop begutachtet und für die weitere Auswertung fotografiert.

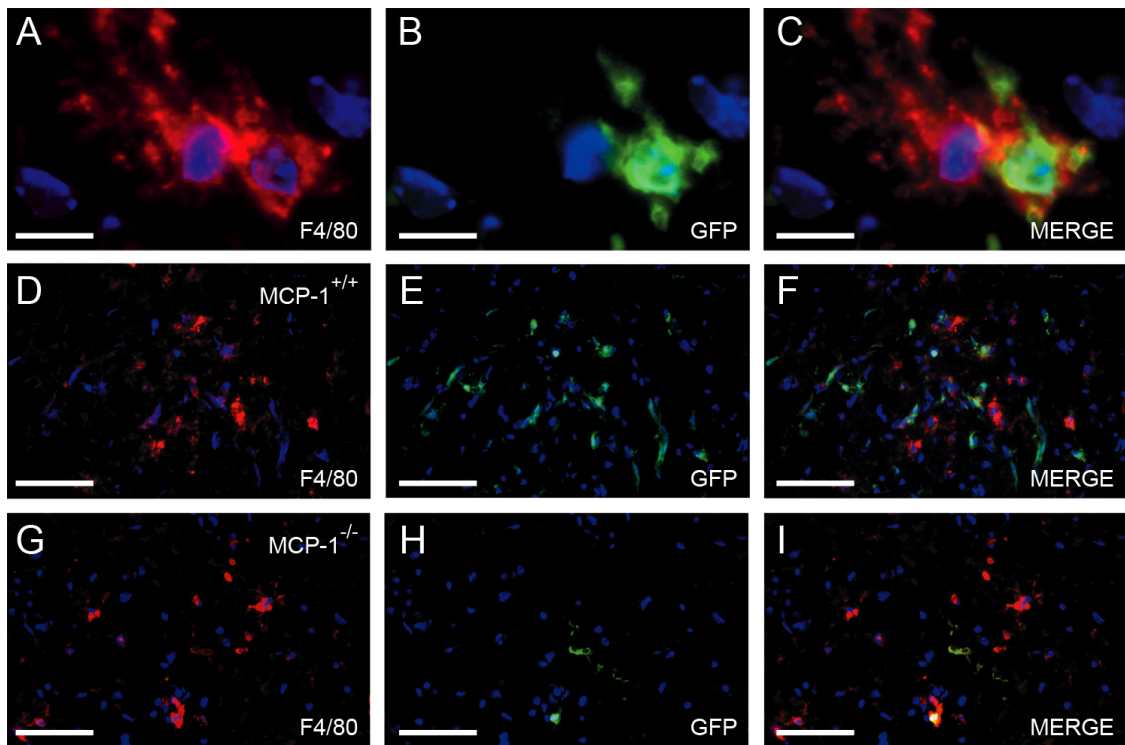


Abbildung 3.8: Beispielfotos zur Differenzierung zwischen residenter Mikroglia und hämatogenen Makrophagen nach zerebraler Ischämie. **A-C:** Vergrößerte Aufnahme einer F4/80-Färbung. Die F4/80 $^+$ - sowie GFP $^-$ -Zelle ist ein immigrierter Makrophage; die F4/80 $^-$ - sowie GFP $^-$ -Zelle eine residente Mikrogliazelle. **D-F:** Beispielaufnahme eines Infarktareals (MCP-1 $^{+/+}$ -Tier, sieben Tage postischämisch). Zahlreiche F4/80 $^+$ -Zellen sowie immigrierte GFP $^+$ -Zellen finden sich in dem infarzierten Gewebe. **G-I:** Immunfärbung eines MCP-1 $^{-/-}$ -Tieres (7 Tage postischämisch). Deutlich zu erkennen ist die geringere Anzahl GFP $^+$ -Zellen im Infarktareal im Vergleich zum MCP-1 $^{+/+}$ -Tier. Messbalken A-C = 10 μ m, D-I = 50 μ m. Zellkerne sind blau gefärbt (DAPI).

3.4.1 Mikrogliaaktivierung

In dieser Versuchsreihe sollte der Einfluss des Chemokins MCP-1 auf die Aktivierung residenter Mikroglia nach transienter fokaler Ischämie untersucht werden. Dazu wurden je Gruppe (MCP-1^{+/+} und MCP-1^{-/-}) 20 Tiere untersucht. Jeweils vier Tiere wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten (0 Tage = Kontrolle, 1 Tag, 2 Tage, 4 Tage und 7 Tage) nach Schlaganfall perfundiert, die Gehirne mit einem Kryostaten geschnitten, ein Gefrierschnitt aus der Zielebene (Bregma $x \sim 0,64$ mm) entnommen und mit dem für Mikroglia und Makrophagen spezifischen Antikörper F4/80 immunhistochemisch gefärbt.

Anschließend wurden von dem infarzierten Areal jeweils fünf nicht überlappende Areale fotografiert und mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops untersucht, die F4/80⁺- und GFP-Zellen (Mikroglia) gezählt und statistisch ausgewertet (Abb.3.9). Als zusätzliche Kontrolle wurden zudem von jedem Tier jeweils zwei Areale der kontralateralen Hemisphäre ausgewertet.

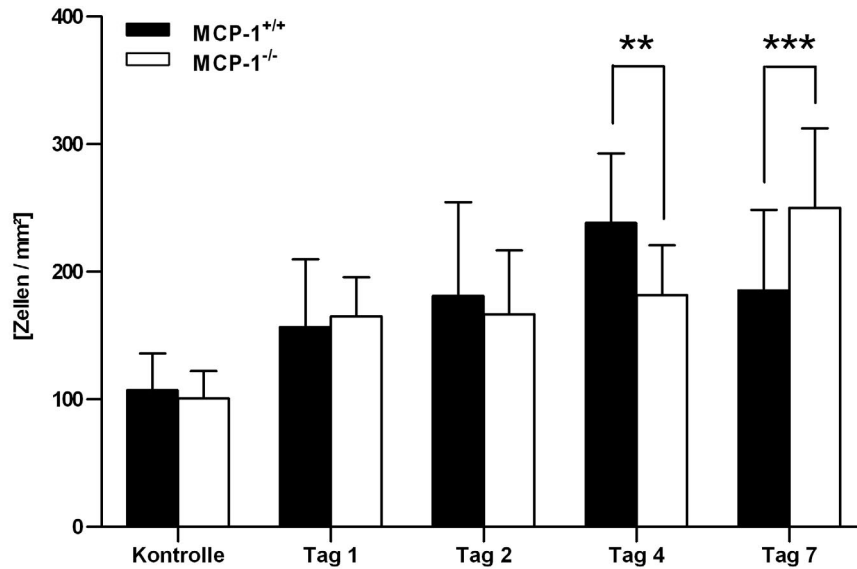


Abbildung 3.9: Auszählung der residenten Mikroglia innerhalb des infarzierten Areals zu unterschiedliche Zeitpunkten nach fokaler transientser zerebraler Ischämie in MCP-1^{+/+}- und MCP-1^{-/-}-Mäusen. Kontrolltiere (Tag 0) ohne Schlaganfall. Die Zahlen ergaben sich aus den Mittelwerten von je fünf ipsilateralen Arealen pro Tier. Je Zeitpunkt und Gruppe n=4. Dargestellt sind Mittelwert sowie Standardabweichung. Signifikanz nach ANOVA sowie Bonferroni *post-hoc*-Test ** p<0,01; *** p<0,001.

Als Ausgangsniveau zeigten die MCP-1^{+/+}-Tiere (ohne Schlaganfall) $107 \pm 29,16$ Mikrogliazellen/mm² und die MCP-1^{-/-}-Kontrolltiere $100,84 \pm 21,21$ Zellen/mm² auf der ipsilateralen Hemisphäre. Nach einem Tag nahm die Anzahl F4/80⁺- und GFP-Zellen bei den MCP-1^{+/+}-Mäusen auf $156,61 \pm 53,03$ Zellen/mm² und bei den MCP-1^{-/-}-Mäusen auf $165 \pm 30,68$ Zellen/mm² zu. Zwei Tage nach zerebraler Ischämie stieg die Mikrogliazahl der MCP-1^{+/+}-Gruppe auf $181,33 \pm 73,10$ Zellen/mm² an; in der MCP-1^{-/-}-Gruppe lag das Niveau F4/80⁺- und GFP-Zellen auf dem des vorherigen Tages mit $166,65 \pm 50,09$ Zellen/mm².

Zu einer weiteren Zunahme von Mikrogliazellen kam es an Tag 4 in beiden Gruppen. Bei den MCP-1^{+/+}-Mäusen konnten $238 \pm 54,73$ Mikrogliazellen/mm² gezählt werden. Die MCP-1^{-/-}-Mäuse zeigten an Tag 4 ein signifikant niedrigeres Niveau ($p < 0,01$) von $181,80 \pm 38,92$ Zellen/mm² im infarzierten Areal. Eine Woche nach erfolgtem Schlaganfall wurden in der MCP-1^{+/+}-Gruppe im Vergleich zu Tag 4 ein geringerer Wert von nur noch $185,50 \pm 63,03$

Mikroglia/mm² gezählt. Bei den MCP-1^{-/-}-Tieren stieg die Anzahl F4/80⁺- und GFP⁻-Zellen weiter auf einen Wert von 250 ± 62,40 Zellen/mm² an und lag damit signifikant höher als der Wert der MCP-1^{+/-}-Gruppe an Tag 7 (p < 0,001).

Als zusätzliche Negativkontrolle wurden jeweils zwei Areale der kontralateralen Hemisphäre der beiden Gruppen zu allen fünf Zeitpunkten untersucht. Zu keinem Zeitpunkt konnte ein Unterschied der kontralateralen Mikrogliazahl im Vergleich zu den Kontrolltieren ohne Schlaganfall festgestellt werden.

3.4.2 Rekrutierung hämatogener Makrophagen

Nach einem Schlaganfall kommt es innerhalb von wenigen Tagen postischämisch zu einem Einstrom hämatogener Zellen. Diese Versuchsreihe sollte zur Aufklärung der Rolle des Chemokins MCP-1 auf die Rekrutierung hämatogener Makrophagen aus dem peripheren Blutgefäßsystem, durch die Bluthirnschranke in das geschädigte Gewebe hinein, dienen. Dazu wurden die zur Auswertung residenter Mikroglia verwendeten je 20 MCP-1^{+/-}- und 20 MCP-1^{-/-}-Tiere untersucht.

Da hämatogene Zellen zusätzlich das grün-fluoreszierende Protein (GFP) exprimieren, wurden alle Zellen, die sowohl F4/80⁺ als auch GFP⁺ waren, als hämatogene Makrophagen identifiziert, gezählt und statistisch ausgewertet (Abb. 3.10).

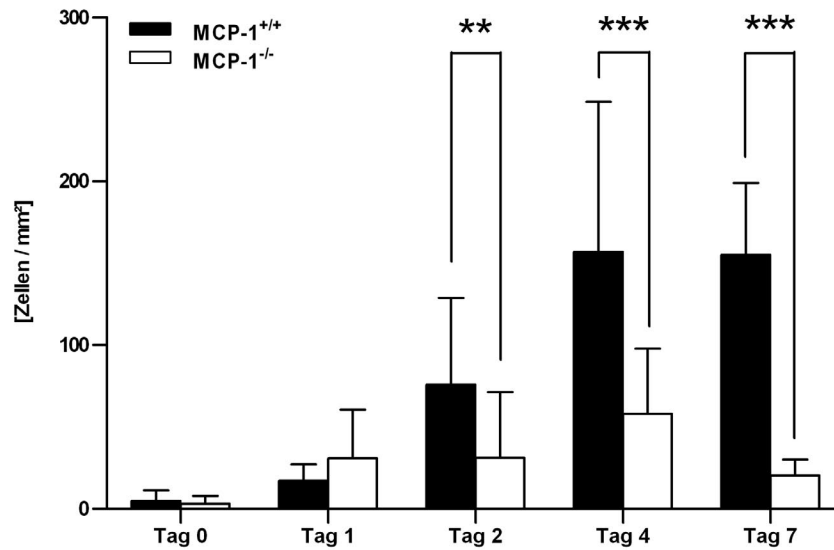


Abbildung 3.10: Auszählung der immigrierten hämatogenen Makrophagen innerhalb des infarzierten Areals zu unterschiedliche Zeitpunkten nach fokaler transienter zerebraler Ischämie in MCP-1^{+/+}- und MCP-1^{-/-}-Mäusen. Kontrolltiere (Tag 0) ohne Schlaganfall. Die Zahlen ergaben sich aus den Mittelwerten von je fünf ipsilateralen Arealen pro Tier. Je Zeitpunkt und Gruppe n=4. Dargestellt sind Mittelwert sowie Standardabweichung. Signifikanz nach ANOVA und Bonferroni *post-hoc*-Test ** p<0,01; *** p<0,001.

Bei den Kontrollgruppen ohne Schlaganfall konnten $4,92 \pm 6,44$ hämatogene Makrophagen/mm² (MCP-1^{+/+}) und $3 \pm 4,77$ hämatogene Makrophagen/mm² bei den MCP-1^{-/-}-Mäusen gezählt werden. Einen Tag nach zerebraler Ischämie wurden bereits $17 \pm 10,23$ Zellen/mm² innerhalb des infarzierten Areals bei der MCP-1^{+/+}-Tieren gezählt. Mit $30,22 \pm 29,92$ Makrophagen/mm² lag der Wert in der MCP-1^{-/-}-Gruppe im Vergleich zu den MCP-1^{+/+}-Mäusen höher.

Zwei Tage postoperativ blieb die Anzahl hämatogener Makrophagen bei den MCP-1^{-/-}-Tieren im Vergleich zum Vortag unverändert ($31,15 \pm 40,15$ Zellen/mm²). Bei den MCP-1^{+/+}-Mäusen kam es zwischen Tag 1 und Tag 2 zu einem weiteren, im Vergleich zu den MCP-1^{-/-}-Tieren, signifikant höheren Makrophageneinstrom ($p < 0,01$) bis auf einen Wert von $75,75 \pm 53,03$ Zellen/mm².

Der Maximalwert immigrierter Makrophagen wurde sowohl in der MCP-1^{+/+}- als auch in der MCP-1^{-/-}-Gruppe an Tag 4 erreicht. Mit $156,90 \pm 91,66$ Zel-

len/mm² lag die Anzahl hämatogener Makrophagen bei den MCP-1^{+/+}- Mäusen signifikant höher ($p < 0,001$) als die Anzahl immigrierter Zellen in der MCP-1^{-/-}-Gruppe ($58 \pm 39,86$ Zellen/mm²). Zwischen Tag 4 und Tag 7 konnte bei den MCP-1^{+/+}-Mäusen kein weiterer Einstrom der fraglichen Zellen beobachtet werden. Die Anzahl F4/80⁺ und GFP⁺-Zellen blieb mit einem Wert von $155 \pm 44,13$ Makrophagen/mm² konstant. Bei den MCP-1^{-/-}-Tieren kam es hingegen zu einer deutlichen Abnahme detektierbarer Zellen an Tag 7 auf eine Anzahl von $20,45 \pm 9,75$ Makrophagen/mm², der signifikant unter dem der MCP-1^{+/+}-Mäuse lag ($p < 0,001$).

Die kontralateralen Areale beider Gruppen zeigten zu allen fünf Zeitpunkten keine Unterschiede der Makrophagenanzahl im Vergleich zu den Kontrolltieren ohne Schlaganfall.

3.5 Rekrutierung neutrophiler Granulozyten

Diese Versuchsreihe diente zur Untersuchung des Einflusses des Chemokins MCP-1 auf die postoperative Immigration neutrophiler Granulozyten in das infarzierte Gewebe. Diese Zellpopulation wird im Gehirn nach neuropathologischer Veränderung aus den die Schädigung umgebenden Blutgefäßen rekrutiert. Auch in diesem Experiment wurde je Tier ein Gefrierschnitt (Bregma $x \sim 0,64$ mm) entnommen und mit dem für neutrophile Granulozyten spezifischen 7/4-Antikörper gefärbt (Abb. 3.11). Zur Detektion des Antikörpers wurde der Farbstoff AlexaFluor594® eingesetzt. Die gefärbten Schnitte wurden mittels Immunfluoreszenzmikroskop begutachtet, fotografiert und der zeitliche Verlauf der Zellmigration statistisch ausgewertet (Abb. 3.12).

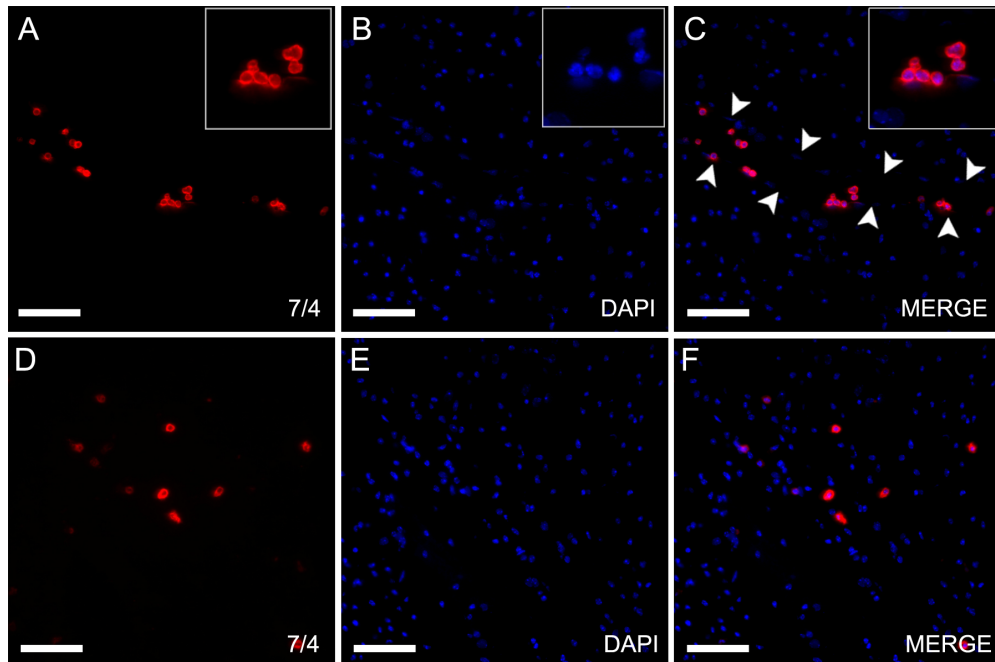


Abbildung 3.11: Immunhistochemische Färbung neutrophiler Granulozyten. Die Abbildungen zeigen Ausschnitte infarzierten Gewebes zu unterschiedlichen Zeitpunkten. **A-C:** Immunfärbung auf einem Gefrierschnitt 24 Stunden nach Schlaganfall. Deutlich sind neutrophile Granulozyten (rot) zu erkennen, die durch Adhäsionsproteine am Gefäßendothel, kurz vor der Migration in das Gehirnparenchym, haften („rolling“). Die weißen Pfeile kennzeichnen die Grenzen zwischen Blutgefäß und Gehirnparenchym. **D-E:** Ausschnitt eines immungefärbten Gefrierschnitts 4 Tage nach zerebraler Ischämie. Zu diesem Zeitpunkt sind zahlreiche 7/4⁺-Zellen in das von Ischämie betroffene Parenchym immigriert. Messbalken = 50 µm. Zellkerne blau (DAPI).

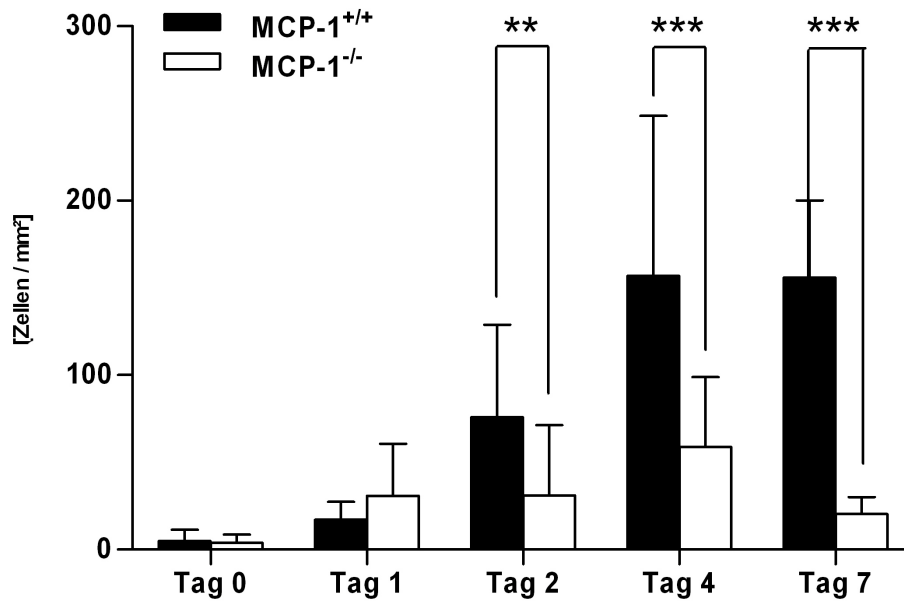


Abbildung 3.12 Auszählung der immigrierten neutrophilen Granulozyten in das infarzierte Areal zu unterschiedliche Zeitpunkten nach fokaler transienter zerebraler Ischämie in MCP-1^{+/+}- und MCP-1^{-/-}-Mäusen. Kontrolltiere (Tag 0) ohne Schlaganfall. Die Zahlen ergaben sich aus den Mittelwerten von je fünf ipsilateralen Arealen pro Tier. Dargestellt sind Mittelwert sowie Standardabweichung. Je Zeitpunkt und Gruppe n=4. Signifikanz nach ANOVA sowie Bonferroni *post-hoc*-Test *** p<0,001.

Bei den MCP-1^{+/+}-Tieren ohne Schlaganfall wurden im Durchschnitt $4,92 \pm 6,44$ neutrophile Granulozyten/mm² gezählt. Bei den MCP-1^{-/-}-Mäusen $3,97 \pm 4,77$ Zellen/mm². Innerhalb der ersten 24 Stunden nach erfolgter transienter fokaler zerebraler Ischämie immigrierten erste neutrophile Zellen in das Gewebe ein. Deren Anzahl stieg auf $17,04 \pm 10,23$ Granulozyten/mm² in der MCP-1^{+/+}-Gruppe und $30,77 \pm 29,92$ Granulozyten/mm² in der MCP-1^{-/-}-Gruppe.

Zu einer deutlichen Zunahme neutrophiler Granulozyten kam es 2 Tage nach Schlaganfall bei den MCP-1^{+/+}-Tieren. $75,75 \pm 53,03$ Zellen/mm² waren in das infarzierte Areal immigriert. Bei den MCP-1^{-/-}-Mäusen änderte sich die Zahl neutrophiler Granulozyten in diesem Zeitraum nicht. Mit $31,15 \pm 40,15$ Zellen/mm² blieb die Anzahl auf dem Wert des Vortages und damit signifikant geringer im Vergleich zur MCP-1^{+/+}-Gruppe (p < 0,01).

Der Maximalwert neutrophiler Granulozyten wurde an Tag 4 erreicht. In der MCP-1^{+/+}-Gruppe wurden $156,90 \pm 91,66$ Zellen/mm² gezählt. Auch bei den MCP-1^{-/-}-Tieren wurde die maximale Anzahl neutrophiler Granulozyten gezählt. Jedoch lag dieser Wert mit $58,90 \pm 39,86$ Zellen/mm² signifikant ($p < 0,001$) unter dem der MCP-1^{+/+}-Mäuse.

Eine Woche nach erfolgtem Schlaganfall ging die Anzahl neutrophiler Granulozyten in beiden Gruppen zurück. Bei den MCP-1^{+/+}-Mäusen wurden noch $155,90 \pm 44,13$ Zellen/mm² gezählt. Die MCP-1^{-/-}-Tiere zeigten auch an Tag 7 einen signifikant niedrigeren Wert ($p < 0,001$) mit $20,45 \pm 9,75$ neutrophilen Granulozyten/mm².

In den kontralateralen Hemisphären beider Gruppen konnten zu allen fünf Zeitpunkten keine Unterschiede der Anzahl neutrophiler Granulozyten im Vergleich zu den Kontrolltieren ohne zerebrale Ischämie detektiert werden.

3.6 T-Zellen-Immigration

Die immunhistochemische Färbung des ausschließlich von T-Zellen exprimierten Rezeptors CD-3 sollte Aufschluss über einen möglichen Einstrom von T-Zellen in das geschädigte Areal nach fokaler zerebraler Ischämie geben. Zudem sollte geklärt werden, ob das Fehlen des Chemokins MCP-1 einen Einfluss auf die Anzahl der immigrierenden T-Zellen hat.

Dazu wurden, analog zu den vorherigen immunhistochemischen Untersuchungen, von jedem Tier ein Gehirnschnitt (Bregma $x \sim 0,64$ mm) entnommen, mit dem für T-Zellen spezifischen Antikörper CD-3 gefärbt (Abbildung 3.12), fotografiert und statistisch ausgewertet (Abbildung 3.13).

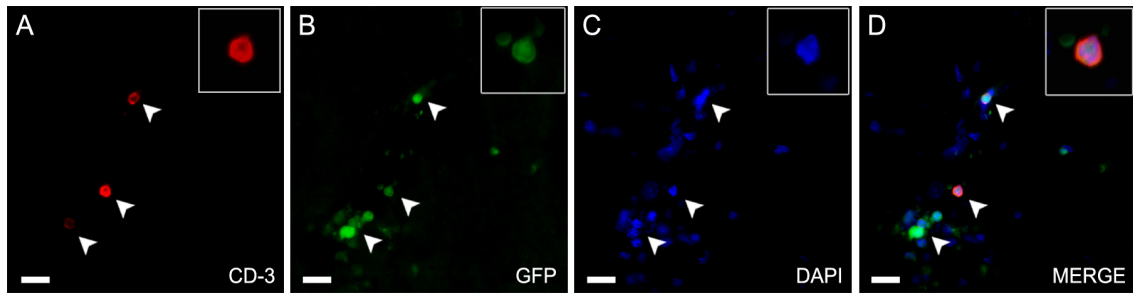


Abbildung 3.12: Immunhistochemische CD-3-Färbung. Die Abbildung zeigt einige T-Zellen (Abbildung 3.12 A-D, durch Pfeile gekennzeichnet) innerhalb des infarzierten Areals eines MCP-1^{+/+}-Tieres 4 Tage nach Schlaganfall. Messbalken = 25 μ m. GFP⁺-Zellen grün, Zellkerne blau (DAPI).

Bei den Kontrolltieren ohne Schlaganfall konnten, sowohl bei den MCP-1^{+/+}- als auch den MCP-1^{-/-}-defizienten Tieren, nur vereinzelte CD-3⁺-Zellen gezählt werden. Die immunhistochemischen Analysen zeigten, dass im ungeschädigten Gehirn keinerlei T-Zellen im Gehirnparenchym zu finden sind (MCP-1^{+/+} $4,33 \pm 4,82$ Zellen/mm²; MCP-1^{-/-} $3,59 \pm 4,73$ Zellen/mm²). Alle detektierten T-Zellen fanden sich innerhalb des Lumens von Blutgefäßen.

An Tag 1 nach durchgeführter Ischämie stieg die Anzahl CD-3⁺-Zellen in beiden untersuchten Gruppen an. Bei den MCP-1^{+/+}-Mäusen wurden $8,2 \pm 7,49$ Zellen/mm² und bei den MCP-1^{-/-}-Mäusen $13,96 \pm 10,55$ Zellen/mm² gezählt. Auch an Tag 1 waren alle CD-3⁺-Zellen mit Blutgefäßen assoziiert. Zwei Tage nach zerebraler Ischämie blieb die Anzahl der T-Zellen auf dem Niveau des vorherigen Tages mit $11,17 \pm 9,67$ T-Zellen/mm² in der MCP-1^{+/+}- und $11,56 \pm 7,97$ T-Zellen/mm² in der MCP-1^{-/-}-Gruppe.

An Tag 4 kam es bei den MCP-1^{+/+}-Tieren zu einem deutlichen Anstieg auf $61,75$ Zellen/mm². Damit lag die Anzahl der immigrierten T-Zellen an Tag 4 signifikant ($p < 0,001$) höher als bei den MCP-1^{-/-}-Tieren mit $18,34 \pm 17,32$ Zellen/mm². Eine Woche nach erfolgtem Schlaganfall ging die Anzahl detektierbarer CD-3⁺-Zellen bei beiden Gruppen wieder auf das Niveau von Tag 1 und 2 zurück. Bei den MCP-1^{+/+}-Mäusen wurden $13,72 \pm 6,5$ und bei den MCP-1^{-/-}-Tieren $15,15 \pm 13,51$ Zellen/mm² gezählt.

Die kontralateralen Areale beider Gruppen zeigten, konform zu den Kontrolltieren ohne Schlaganfall, zu allen fünf Zeitpunkten keinerlei Unterschiede in der Anzahl detektierbarer T-Zellen.

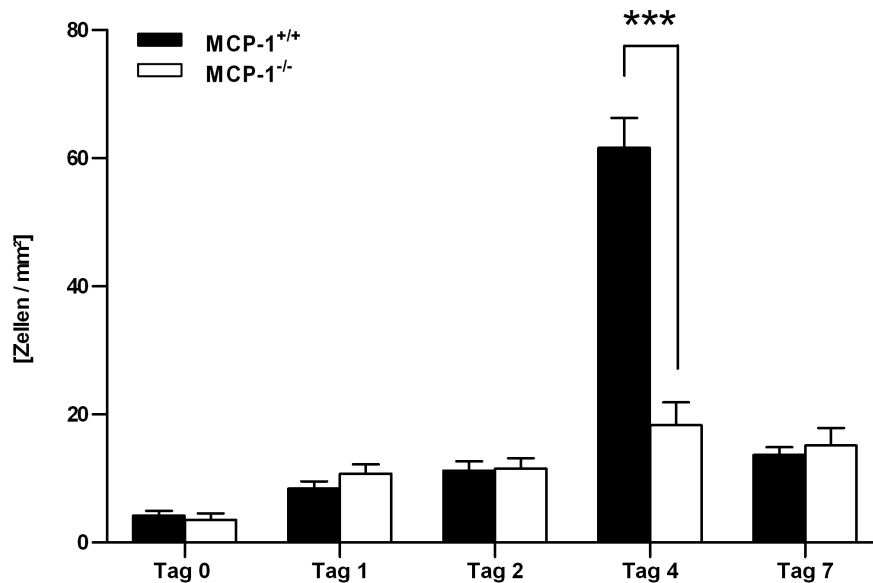


Abbildung 3.13: Auszählung immigrierter T-Zellen innerhalb des infarzierten Areals zu unterschiedliche Zeitpunkten nach transientser fokaler zerebraler Ischämie in MCP-1^{+/+}- und MCP-1^{-/-}-Mäusen. Kontrolltiere (Tag 0) ohne Schlaganfall. Die Zahlen ergaben sich aus den Mittelwerten von je fünf ipsilateralen Arealen pro Tier. Je Zeitpunkt und Gruppe n=4. Dargestellt sind Mittelwert sowie Standardabweichung. Signifikanz nach ANOVA sowie Bonferroni *post-hoc*-Test *** p<0,001.

3.7 Neuroblastenmigration

Neuroblasten bewegen sich im gesunden Gehirn entlang dem für diesen Zelltyp bekannten rostralen Migrationspfad. Nach zerebraler Ischämie kommt es jedoch in der subventrikulären Zone zu einer Proliferation dieser Zellen. Nach wenigen Stunden beginnen die Neuroblasten in das *Corpus Callosum* zu immigrieren und folgen anschließend vermutlich dem von dem entzündeten Gewebe exprimierten Chemokingradienten in das infarzierte Areal.

3.7.1 Neuroblastenimmigration in das *Corpus Callosum*

In diesem Versuch sollte ein möglicher Einfluss der MCP-1-Expression auf die postoperative Immigration von Neuroblasten in das *Corpus Callosum* untersucht werden. Dazu wurde von jedem Tier und jedem Zeitpunkt beider untersuchten Gruppen ein Gehirnschnitt (Bregma $x \sim 0,64$ mm) entnommen und immunhistochemisch gefärbt. Da nur Neuroblasten das Protein *Doublecortin X* (DCX) exprimieren, wurde ein DCX-Antikörper für die Färbungen eingesetzt. Anschließend wurden die Gehirne fotografiert (Abb. 3.14), die Zellen gezählt und statistisch ausgewertet (Abb. 3.15).

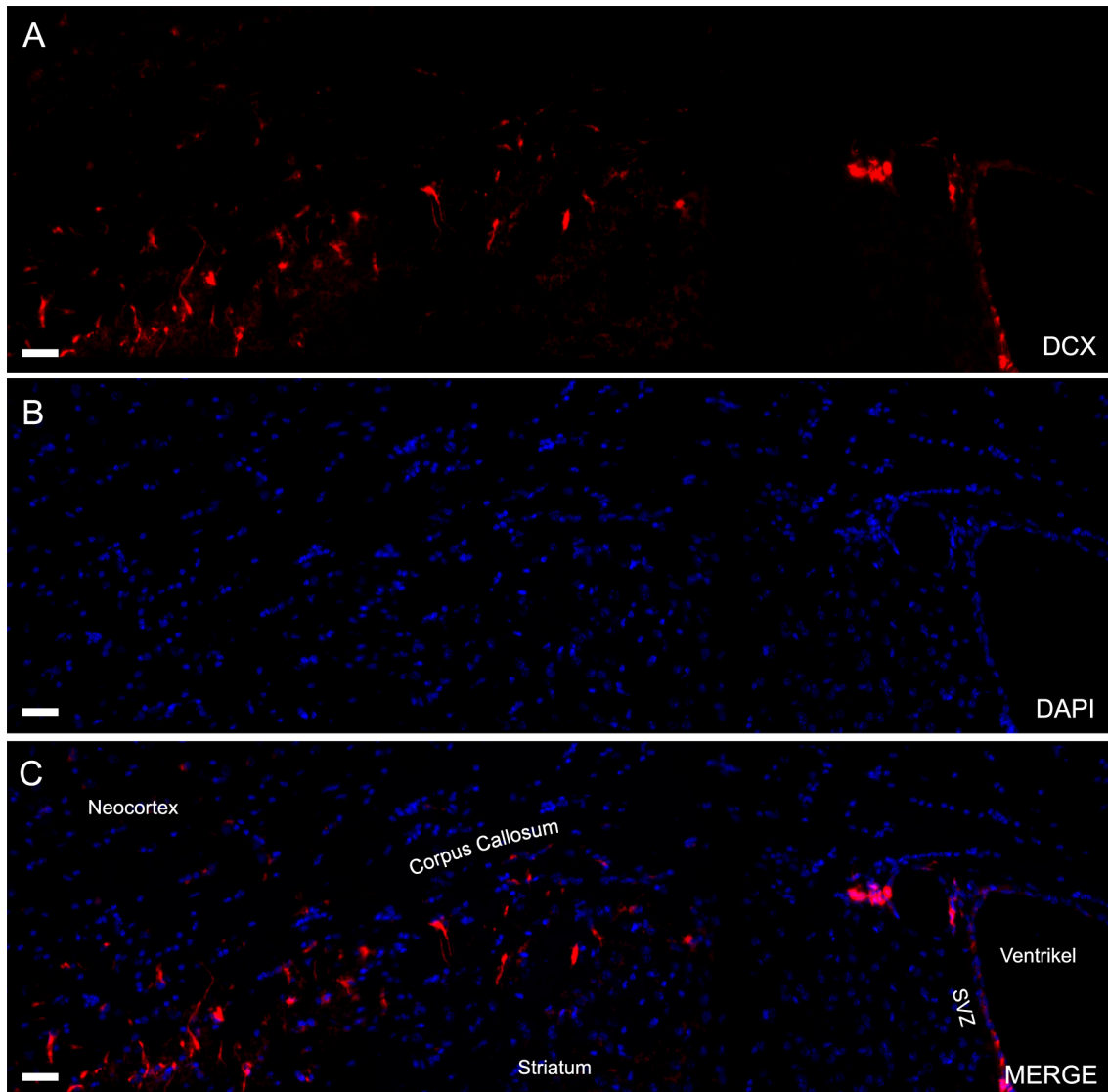


Abbildung 3.14: Immunhistochemische Neuroblastenfärbung mit dem für diesen Zelltyp spezifischen Antikörper DCX. Dargestellt ist ein Ausschnitt der ipsilateralen Hemisphäre eines MCP-1^{+/+}-Tiers zwei Tage nach zerebraler Ischämie. Deutlich sind die aus der subventrikulären Zone (SVZ) in das *Corpus Callosum* immigrierten DCX-positiven Zellen zu erkennen. Messbalken = 50 μ m. Zellkerne blau (DAPI).

Die Gehirnschnitte ohne Schlaganfall zeigten vereinzelte DCX-positive Zellen im *Corpus Callosum*. Bei den MCP-1^{+/+}-Tieren fanden sich $56,22 \pm 33,71$ Zellen/ mm^2 ; bei den MCP-1^{-/-}-Mäusen $45,46 \pm 28,82$ Zellen/ mm^2 .

Einen Tag nach erfolgter zerebraler Ischämie stieg die Neuroblastenanzahl bei den MCP-1^{+/+}-Mäusen auf $108,06 \pm 31,51$ Zellen/ mm^2 . Mit $92,11 \pm 25,03$ Neuroblasten/ mm^2 war die Anzahl dieses Zelltyps bei den MCP-1^{-/-}-Tieren ebenfalls auf ein ähnliches Niveau angestiegen. Eine deutliche Zunahme immig-

rierter DCX-positiver Zellen wurde bei den MCP-1^{+/+}-Mäusen nach zwei Tagen gezählt. Die Anzahl der Neuroblasten im *Corpus Callosum* stieg auf $234,47 \pm 55,72$ Zellen/mm² und lag damit signifikant ($p < 0,001$) über der Neuroblastenanzahl bei den MCP-1^{-/-}-Mäusen zu diesem Zeitpunkt ($100,49 \pm 31,53$ Zellen/mm²).

Vier Tage nach erfolgtem Schlaganfall wurde in beiden Gruppen die gleiche Anzahl DCX-positiver Zellen gezählt. Bei den MCP-1^{+/+}-Tieren $296,67 \pm 24,77$ Zellen/mm² und bei den MCP-1^{-/-}-Mäusen $294,28 \pm 81,65$ Zellen/mm².

Nach sieben Tagen kam es zu einem weiteren Anstieg der immigrierten DCX-positiver Zellen in das *Corpus Callosum*. In der MCP-1^{+/+}-Gruppe wurden $358,88 \pm 63,69$ Neuroblasten/mm² gezählt. In der MCP-1^{-/-}-Gruppe lag die Anzahl bei $384,4 \pm 59,74$ Neuroblasten/mm².

Die kontralateralen Areale beider Gruppen zu jedem Zeitpunkt wurden als zusätzliche Negativkontrollen eingesetzt. Es fanden sich keinerlei Unterschiede in der Anzahl der DCX-positiven Zellen im Vergleich zu den Kontrolltieren ohne Schlaganfall.

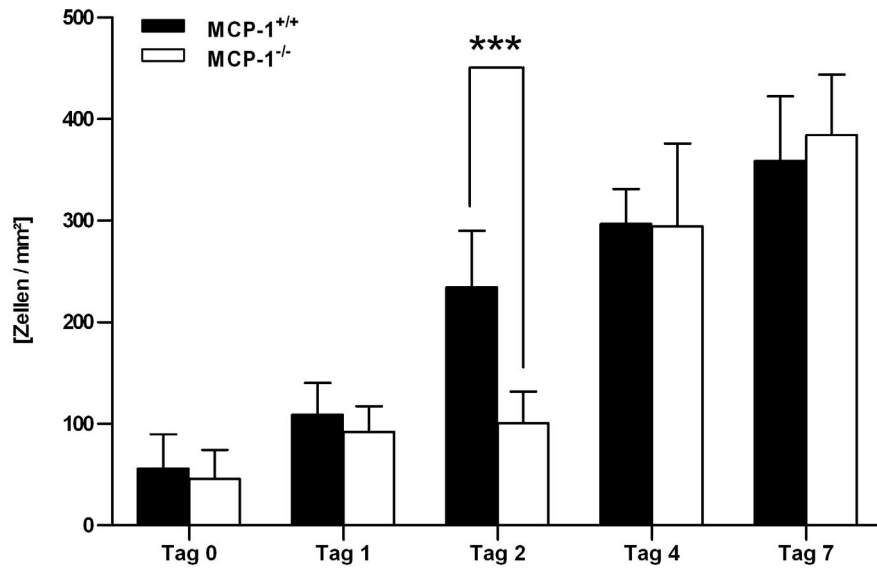


Abbildung 3.15: Auszählung der in das *Corpus Callosum* immigrierten Neuroblasten zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach transienter fokaler zerebraler Ischämie in MCP-1^{+/+}- und MCP-1^{-/-}-Mäusen. Kontrolltiere (Tag 0) ohne Schlaganfall. Die Zahlen ergaben sich aus den Mittelwerten von je zwei ipsilateralen Arealen des *Corpus Callosum* pro Tier. Dargestellt sind Mittelwert sowie Standardabweichung. Je Zeitpunkt und Gruppe n=4. Signifikanz nach ANOVA sowie Bonferroni *post-hoc*-Test *** p<0,001.

3.7.2 Neuroblastenimmigration in das infarzierte Striatum

Diese Versuchsreihe diente zur Aufklärung eines möglichen Einflusses des Chemokins MCP-1 auf die Migration DCX-positiver Zellen in das infarzierte Areal nach zerebraler Ischämie. Für die Auswertung wurden ebenfalls die mit dem für Neuroblasten spezifischen Antikörper DCX gefärbten Gehirnschnitte fotografiert (Abb. 3.16) und statistisch ausgewertet (Abb. 3.17).

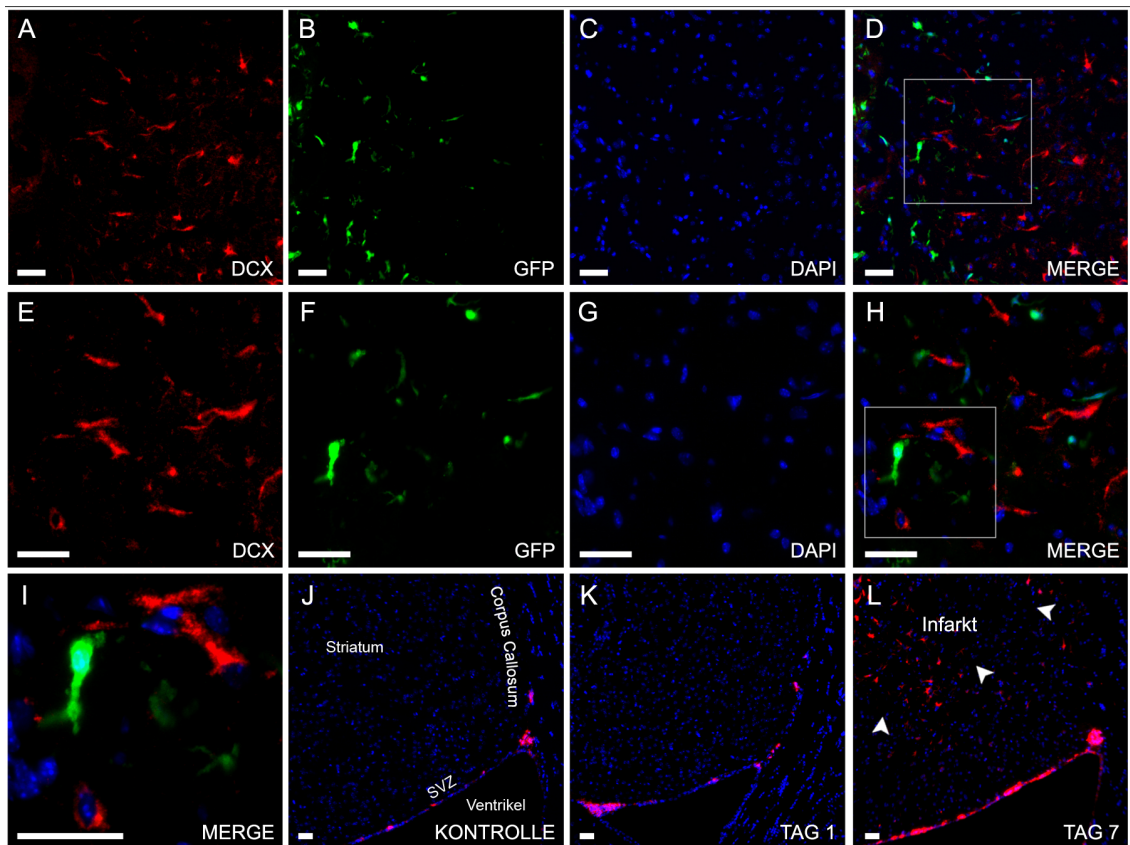


Abbildung 3.16: Beispielaufnahmen immunhistochemischer Neuroblastenfärbungen mit dem für diesen Zelltyp spezifischen DCX-Antikörper. **A-D:** Immunhistochemische Neuroblastenfärbung innerhalb des infarzierten Areals eines MCP-1^{-/-}-Tieres 4 Tage nach zerebraler Ischämie. Deutlich sind die in das geschädigte Areal immigrierten Neuroblasten (rot, **A**) sowie die immigrierten hämatogenen Makrophagen (grün, **B**) zu erkennen. **E-H:** Ausschnittvergrößerungen aus Abbildung 3.14 A-D. **I:** Ausschnittvergrößerung aus Abbildung 3.14 H. Zu keinem Zeitpunkt konnte in beiden Tiermodellen eine Kolokalisation von DCX- und GFP-positiven Zellen entdeckt werden. **J:** Neuroblastenfärbung eines MCP-1^{+/+}-Gehirnes ohne Schlaganfall. Im unteren Bereich ist das linke Gehirnventrikel zu erkennen. Zahlreiche Neuroblasten (rot) finden sich im Bereich der subventrikulären Zone (SVZ) und in dem Übergang zum *Corpus Callosum*. **K:** Der gleiche Ausschnitt wie in Abbildung 3.14 H, einen Tag nach zerebraler Ischämie (MCP-1^{+/+}). Einige immigrierte DCX-positiven Zellen sind bereits im *Corpus Callosum* zu sehen. **L:** Sieben Tage nach zerebraler Ischämie finden sich zahlreiche Neuroblasten in der subventrikulären Zone, dem *Corpus Callosum* und dem infarzierten Striatum (durch Pfeile gekennzeichnet). Messbalken = 25 µm. GFP⁺-Zellen grün, Zellkerne blau (DAPI).

Sowohl MCP-1^{+/+}- als auch MCP-1^{-/-}-Tiere zeigten ohne Schlaganfall in dem fraglichen Areal vereinzelte DCX-positive Zellen. Bei den MCP-1^{+/+}-Mäusen wurden $31,7 \pm 13,85$ Neuroblasten/mm²; bei den MCP-1^{-/-}-Mäusen $32,9 \pm 13,06$ Neuroblasten/mm² gezählt. Bereits nach einem Tag stieg die Anzahl immigrierter Neuroblasten bei den Kontrolltieren auf $116,04 \pm 38,89$ Zellen/mm² an.

Auch bei den MCP-1^{-/-}-Tieren nahm die Anzahl der Neuroblasten auf $110,65 \pm 25,43$ Zellen/mm² im infarzierten Areal zu.

Zwei Tage postoperativ verdoppelte sich die Anzahl immigrierter Neuroblasten in beiden Gruppen. Bei den MCP-1^{+/+}-Tieren wurden $198,58 \pm 28,89$ Neuroblasten/mm² gezählt und $223,1 \pm 26,08$ Neuroblasten/mm² bei den MCP-1^{-/-}-Tieren.

Zu einer weiteren Migration DCX-positiver Zellen kam es zwischen Tag zwei und Tag vier. Im infarzierten Areal der Kontrolltiere konnten vier Tage nach zerebraler Ischämie $405,93 \pm 56,76$ Zellen/mm² detektiert werden. Mit $467,14 \pm 66,42$ Zellen/mm² lag die Anzahl immigrierter Neuroblasten bei den MCP-1^{-/-}-Mäusen signifikant höher als in der Kontrollgruppe ($p < 0,01$).

Eine Woche nach erfolgtem Schlaganfall ging bei beiden untersuchten Gruppen die Anzahl DCX-positiver Zellen im fraglichen Areal wieder zurück. Bei den MCP-1^{+/+}-Mäusen wurden $276,82 \pm 61,56$ Neuroblasten/mm² gezählt. Die Anzahl der Neuroblasten im infarzierten Areal der MCP-1^{-/-}-Mäuse lag mit $400,35 \pm 49,11$ Zellen/mm² auf ähnlichen Niveau wie das der MCP-1^{+/+}-Gruppe.

Zu keinem Zeitpunkt konnte eine veränderte Anzahl DCX-positiver Zellen auf der kontralateralen Hemisphäre beider Gruppen im Vergleich zu den Tieren ohne Schlaganfall gezählt werden.

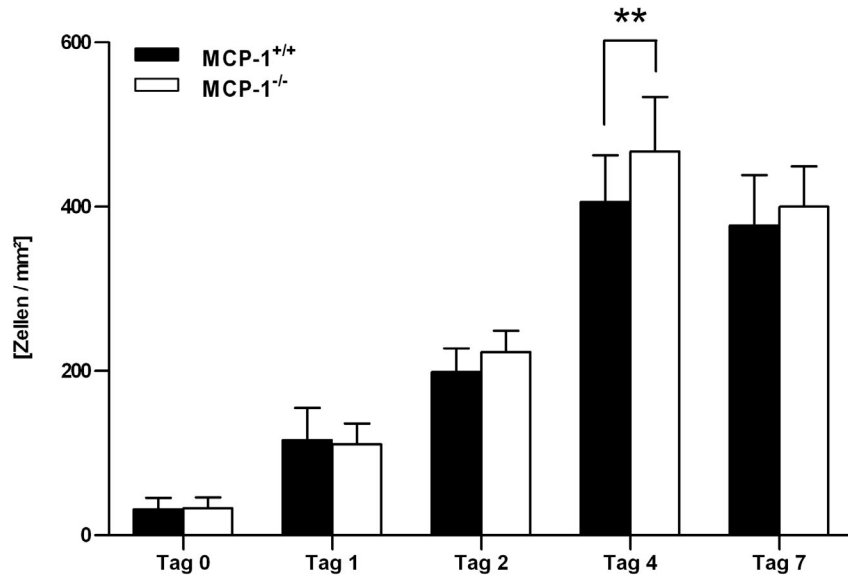


Abbildung 3.17: Statistische Auswertung der in das infarzierte Areal immigrierten Neuroblasten zu unterschiedliche Zeitpunkten nach fokaler transients zerebraler Ischämie in MCP-1^{+/+}- und MCP-1^{-/-}-Mäusen. Kontrolltiere (Tag 0) ohne Schlaganfall. Die Zahlen ergaben sich aus den Mittelwerten von je fünf ipsilateralen Arealen pro Tier. Dargestellt sind Mittelwert sowie Standardabweichung. Je Zeitpunkt und Gruppe n=4. Signifikanz nach ANOVA sowie Bonferroni *post-hoc*-Test *** p<0,01.

3.7.3 Potentiell hämatogene DCX-positive Zellen

Mit Hilfe der Kolo-kalisation von GFP und DCX sollte geklärt werden, ob ein Teil der in das infarzierte Areal immigrierten Neuroblastenpopulation hämatogenen Ursprungs ist. Dazu wurden die immunhistochemisch gefärbten Schnitte aller Gruppen und Zeitpunkte nach vorhandenen DCX-positiven Zellen, die das grün-fluoreszierende Protein exprimieren, untersucht (Abb. 3.16 A-I). Zu keinem Zeitpunkt konnte sowohl in MCP-1^{+/+}- als auch MCP-1^{-/-}-Mäusen eine Kolo-kalisation von DCX-positiven Zellen mit GFP-positiven Zellen gezeigt werden (Abb. 3.16 D, H, I). Damit konnte ein hämatogener Ursprung DCX-exprimierender Zellen bzw. Neuroblasten ausgeschlossen werden.

3.8 *Turn-Over* perivaskulärer und meningealer Makrophagen

Neben der residenten Mikroglia zählen die perivaskulären und meningealen Makrophagen ebenfalls zu dem Monozyten-Makrophagensystem des Gehirns. Beide Zelltypen befinden sich in den Virchow-Robinschen Räumen der Blutgefäße und unterliegen einem regen Austausch durch Monozyten und Makrophagen hämatogenen Ursprungs. In dieser Versuchsreihe sollte geklärt werden, mit welcher Frequenz perivaskuläre und meningeale Makrophagen erneuert werden (*Turn-Over*). Zusätzlich sollte ein möglicher molekularbiologischer Zusammenhang mit der Expression von MCP-1 und dem Austausch perivaskulärer und meningealer Makrophagen geklärt werden.

Jeweils vier MCP-1^{+/-}- und MCP-1^{-/-}-Tiere wurden drei Monate nach Transplantation GFP-transgenen Knochenmarks perfundiert. Von diesen nicht-ischämischen Gehirnen der Mäuse wurden mit einem Kryostaten Gefrierschnitte erstellt (10 µm) und mit dem für Monozyten und Makrophagen spezifischen Antikörper F4/80 immunhistochemisch gefärbt und fotografiert (Abb. 3.18 a und Abb. 3.19 a). F4/80-positive und GFP-positive Zellen mussten nach der Transplantation in die Virchow-Robin-Räume immigriert sein.

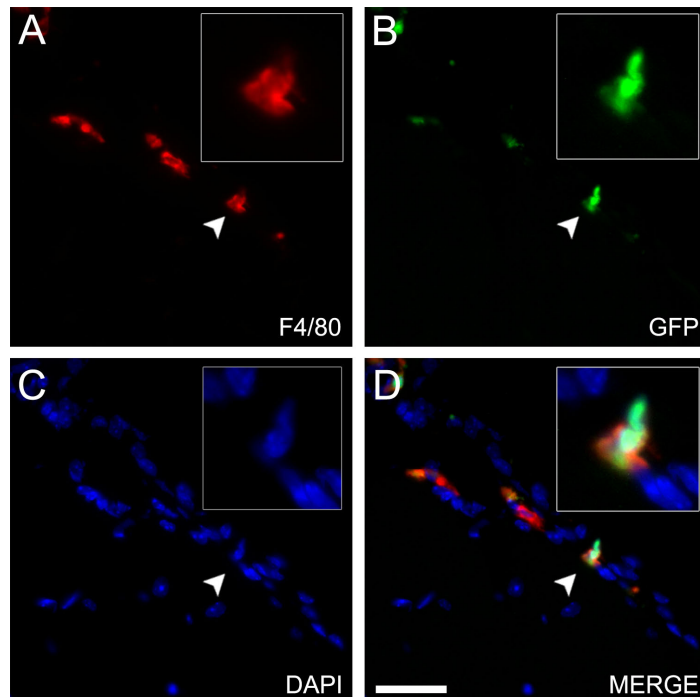
3.8.1 *Turn-Over* meningealer Makrophagen

Abbildung 3.18: Beispielfotos zur Untersuchung des *Turn-Overs* meningealer Makrophagen. **A-D:** Übersichtsaufnahme meningealer Makrophagen (MCP-1^{+/+}). Die Ausschnittvergrößerung (Pfeil) zeigt beispielhaft eine Zelle, die nach der Transplantation in den Virchow-Robin-Raum immigriert ist. Messbalken = 50 μ m. Zellkerne blau (DAPI).

Bei den MCP-1^{+/+}-Mäusen wurden, drei Monate nach erfolgter Transplantation GFP-transgenen Knochmarks, insgesamt $196,46 \pm 29,12$ F4/80⁺ und GFP-meningeale Makrophagen gezählt. $109,33 \pm 19,99$ Zellen waren sowohl F4/80⁺ als auch GFP⁺. Daraus ergab sich ein *Turn-Over* von 52,49 Prozent innerhalb von drei Monaten. Bei den MCP-1^{-/-}-Tieren wurde eine geringfügig niedrigere Anzahl meningeale Makrophagen gezählt. $181,54 \pm 31,80$ Zellen waren F4/80⁺ und GFP⁺; F4/80⁺ und GFP⁺ insgesamt $103,50 \pm 21,56$ Zellen.

Daraus ergab sich kein relevanter Unterschied des *Turn-Over* zwischen MCP-1^{+/+}- und MCP-1^{-/-}- Tieren innerhalb von drei Monaten (Abb. 3.19).

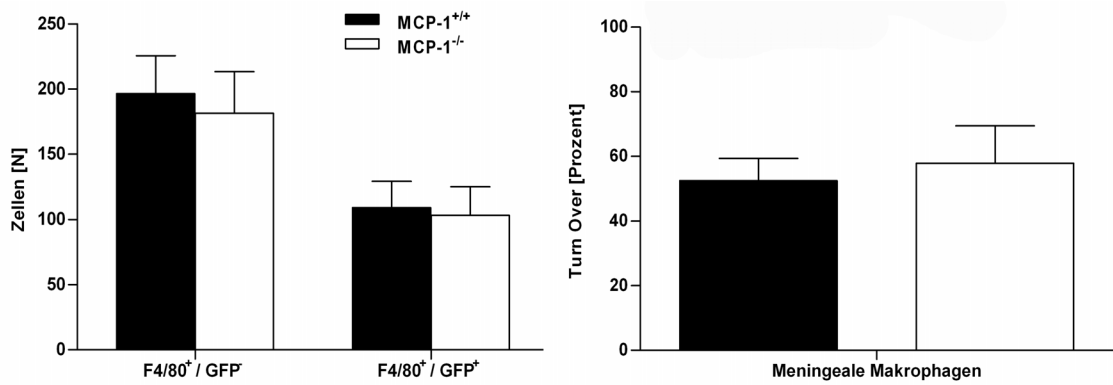


Abbildung 3.19: Statistische Auswertung des *Turn-Over* meningealer Makrophagen drei Monate nach Transplantation GFP-transgenen Knochenmarks. Die Zahlen ergaben sich der Auszählung F4/80⁺ sowie GFP / GFP⁺ -Zellen innerhalb der Meningen beider Hemisphären. Dargestellt sind Mittelwert sowie Standardabweichung. MCP-1^{+/+}- und MCP-1^{-/-}-Gruppe je n=4.

3.8.2 *Turn-Over* perivaskulärer Makrophagen

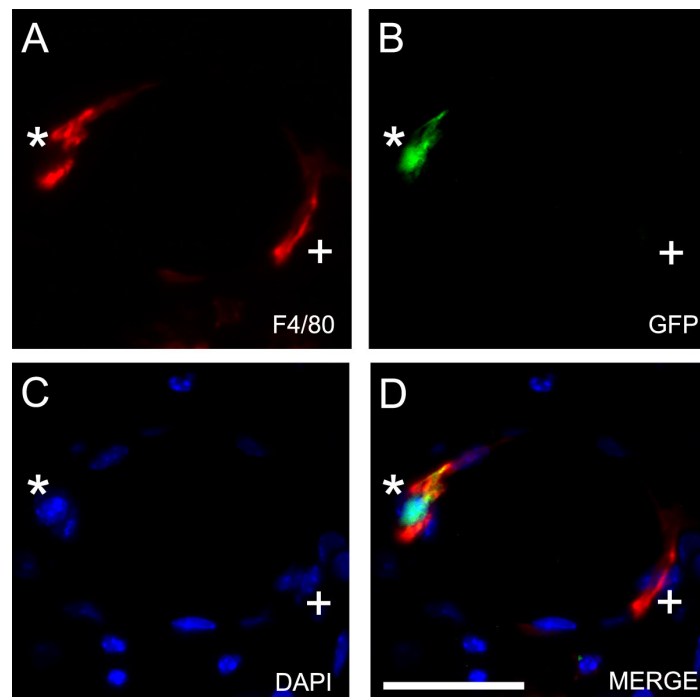


Abbildung 3.20: Beispielfotos zur Untersuchung des *Turn-Over* perivaskulärer Makrophagen. A-D: Querschnitts eines Blutgefäßes. Der mit einem (*) markierte perivaskuläre Makrophage ist für F4/80 und GFP positiv und damit nach der Transplantation immigriert. Der mit einem (+) markierte Makrophage ist lediglich für F4/80 positiv und damit vor der Transplantation immigriert. Messbalken = 50 μ m. Zellkerne blau (DAPI).

Bei den MCP-1^{+/+}-Mäusen wurden $47,38 \pm 14,31$ F4/80⁺- und GFP⁻-perivaskulären Zellen pro Hemisphäre gezählt (Abb. 3.20). Damit lag die Ausgangszahl dieses Zelltyps im Vergleich zu den MCP-1^{-/-}-Tieren ($57,58 \pm 18,69$ Zellen) signifikant ($p < 0,001$) niedriger.

In der MCP-1^{+/+}-Kontrollgruppe wurden insgesamt $26,54 \pm 7,90$ sowohl F4/80⁺ als auch GFP⁺-Zellen pro Hemisphäre gezählt. Somit lag kein signifikanter Unterschied zu der untersuchten MCP-1^{-/-}-Gruppe vor ($27,08 \pm 12,40$ Zellen).

Ausgehend von einer erhöhten Ausgangszahl perivaskulärer Makrophagen in MCP-1^{-/-}-Mäusen konnte somit auch kein signifikanter Unterschied des *Turn-Over* perivaskulärer Makrophagen im Vergleich zu den MCP-1^{+/+}-Tieren gezeigt werden (Abb. 3.21).

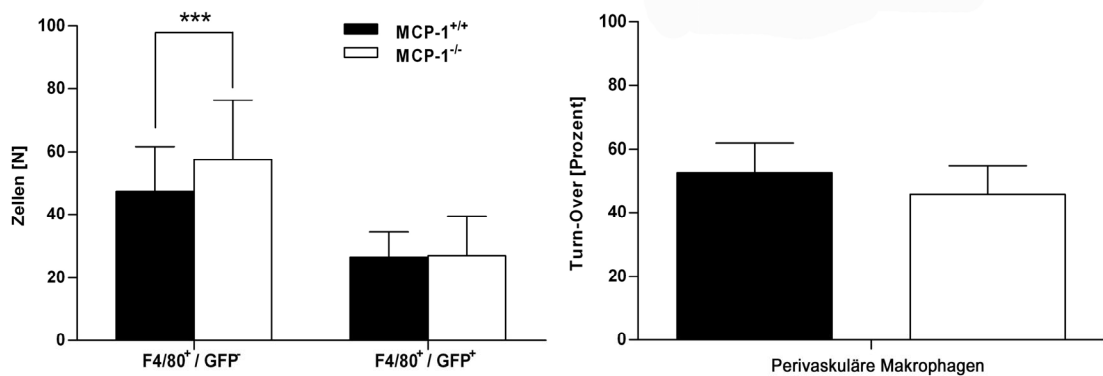


Abbildung 3.21: Statistische Auswertung des *Turn-Over* perivaskulärer Makrophagen drei Monate nach Transplantation GFP-transgenen Knochenmarks. Die Zahlen ergaben sich der Auszählung F4/80⁺ sowie GFP / GFP⁺ -Zellen innerhalb beider Hemisphären. Dargestellt sind Mittelwert sowie Standardabweichung. MCP-1^{+/+}- und MCP-1^{-/-}-Gruppe je n= 4.

3.9 Molekularbiologische Untersuchungen

Diese Versuchsreihe diente zu Aufklärung der molekularbiologischen Zusammenhänge zwischen der Expression von MCP-1 und der Expression von an inflammatorischen Prozessen beteiligten Genen. Dazu wurden je fünf MCP-1^{+/+}- sowie MCP-1^{-/-}-Mäuse einer 30-minütigen Okklusion der *Arteria cerebri media* unterzogen. Um eine mögliche Verfälschung durch die Proteinexpression immigrierter hämatogener Zellen ausschließen zu können, wurde ein früher postoperativer Zeitpunkt von 12 Stunden ausgewählt.

Zwölf Stunden nach erfolgter Ischämie wurden die Gehirne entnommen, die mRNA extrahiert, mittels reverser Transkription in cDNA-Bibliotheken umgeschrieben und die Expression der fraglichen Gene mittels quantitativer *Real-Time-PCR* (qRT-PCR) untersucht. Als Kontrollen dienten drei MCP-1^{+/+}- und drei MCP-1^{-/-}-Tiere ohne zerebrale Ischämie.

3.9.1 Bestimmung der mRNA-Qualität

Zwölf Stunden nach erfolgter Ischämie wurden die MCP-1^{+/+}- und die MCP-1^{-/-}-Mäuse mit NaCl perfundiert, die Gehirne entnommen und in TissueTek® bei -80° C eingefroren. Anschließend wurden von den Gehirnen Gefrierschnitte (12 µm) angefertigt und diese mit Toluidinblau angefärbt.

Mittels eines Lasercapture-Mikrodissektionsmikroskops wurden die zu untersuchenden Areale (Infarkt (=infarziertes Areal), Cortex (=ipsilateraler Cortex) sowie Kontralateral (=kontralaterales Striatum) ausgeschnitten und in Reaktionsgefäßen gesammelt.

Mit Hilfe eines speziell für kleine Mengen RNA entwickelten Aufreinigungskit (Rneasy micro, Qiagen) wurde die gesamt-RNA (gRNA) der 48 Proben aufgereinigt.

Die Bestimmung der RNA-Qualität wurde mit der Agilent Bioanalyzertechnik durchgeführt. Diese Technik basiert auf einer mikrokapillären elektrophoretischen Größenseparation der fraglichen Nukleinsäuremoleküle, die mittels laser-induzierter Fluoreszenz detektiert werden. Je 1 µl jeder Probe wurde auf einem RNA 6000 Pico-Labchip (Agilent Technologies) aufgetragen und die enthaltene RNA nach ihrer Molekulargröße aufgetrennt. Dabei wurden die Laufweiten-Elutionszeiten mit der Größe der enthaltenen RNA-Moleküle korreliert und ein virtuelles Elektropherogramm erstellt (Abb. 3.22).

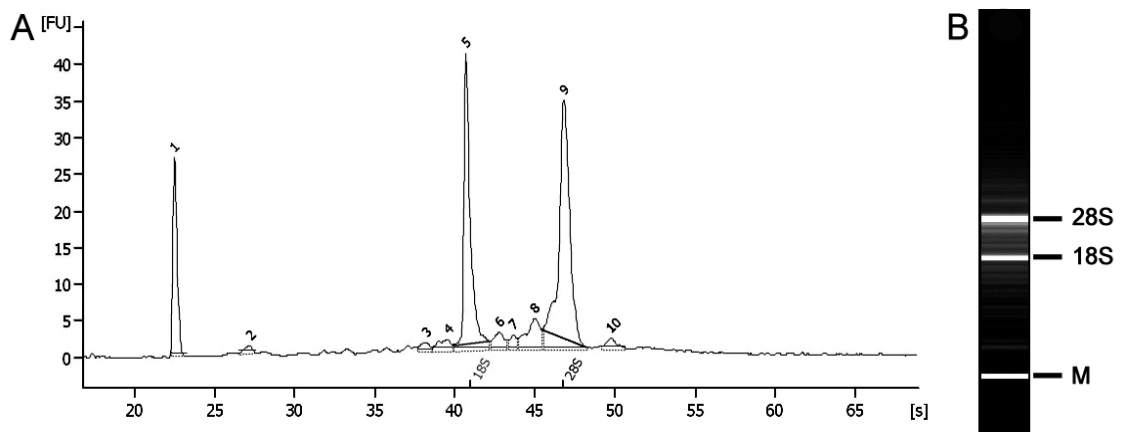


Abbildung 3.22 A: Beispiel eines Elektropherogramms einer MCP-1^{+/+}-Probe ohne Ischämie. Die hier gezeigte Probe ergab ein RNA-Integritätsmaß von 9,1. Die drei Spitzenwerte zeigen den Marker (1), die 18S-rRNA (5) und die 28S-rRNA (9). B: Virtuelles Gel des Elektropherogramms. Die distinkten Banden der 28S- und der 18S-rRNA deuten auf intakte Gesamt-RNA hin. M=Marker

Aus den erhaltenen Bestandteilen der separierten gRNA wurde anschließend mit der Agilent-Bioanalyzertechnik Expert Software die Qualität der untersuchten RNA errechnet. Die Qualität wurde durch die Ermittlung einer RIN-Nummer (RNA-Integritätsmaß) angegeben. Dabei steht ein gemessener RIN-Wert von 1 für eine gänzlich degradierte RNA; ein RIN-Wert von 10 für eine vollständig

intakte RNA. Für die Expressionsstudien in dieser Versuchsreihe wurden alle RNA-Proben mit einer RIN $\geq 6,5$ eingesetzt.

3.9.2 MCP-1^{+/+}- und MCP-1^{-/-}-mRNA postischämisch

Nach erfolgter Aufreinigung der gRNA der von Ischämie betroffenen Tiere wurde von jeder Probe 1 μ l auf einen Pico-Chip aufgetragen und elektrophoretisch separiert. Aus den ermittelten Elektropherogrammen wurden virtuelle Gele errechnet und analysiert (Abb. 3.23).

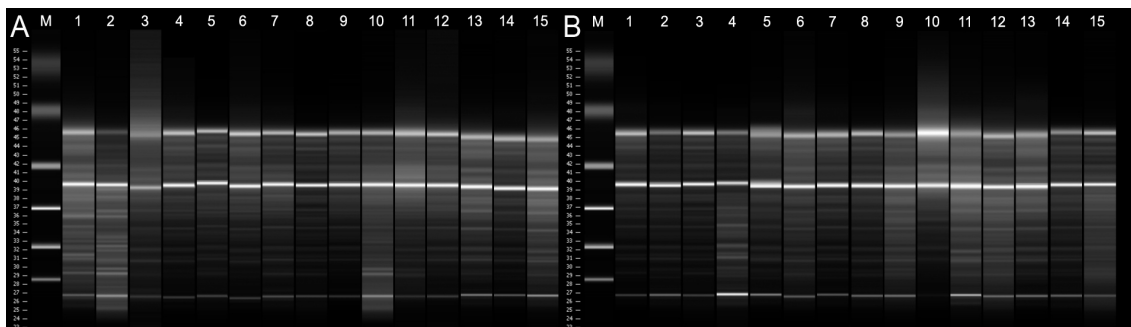


Abbildung 3.23: Virtuelle Gele der RNA-Proben (12 Stunden postischämisch) **A:** Probenauftrag der MCP-1^{+/+}-RNA. **B:** Probenauftrag der MCP-1^{-/-}-RNA. Dargestellt sind jeweils alternierend Ischämie, Cortex und kontralaterale Hemisphäre der fünf MCP-1^{+/+}- und fünf MCP-1^{-/-}- Mäuse.

Da das RNA-Integritätsmaß bei allen Proben über 6,5 lag und die 18S- und 28S-rRNA ausreichend erhalten war, konnten alle RNA-Proben für die weiteren Versuche eingesetzt werden.

3.9.3 MCP-1^{+/+}- und MCP-1^{-/-}-Kontroll-mRNA ohne Ischämie

Nach Mikrodissektion der fraglichen Areale und Aufreinigung der gRNA wurden die nicht von Ischämie betroffenen Kontrollproben ebenfalls mittels Pico-Chip-Analyse analysiert und bewertet (Abb. 3.24).

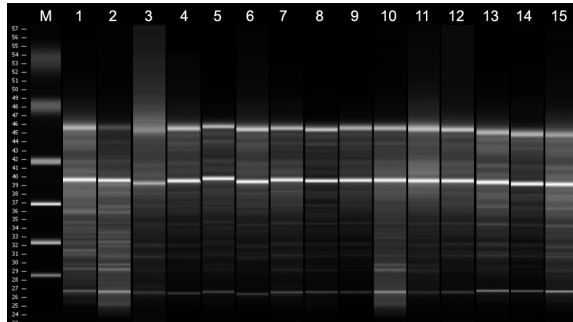


Abbildung 3.24: Virtuelles Gel der Kontroll-RNA-Proben. Dargestellt sind jeweils alternierend Ischämie, Cortex und kontralaterale Hemisphäre der drei MCP-1^{+/+}- (1-9) und der drei MCP-1^{-/-}-Mäuse (10-18).

Auch bei den Kontrollproben zeigten sowohl das RNA-Integritätsmaß ($\geq 6,5$) als auch die 18S- und 28S-rRNA eine ausreichende Qualität, um für die weiteren Versuche eingesetzt zu werden.

3.9.4 Qualitätskontrolle der cDNA-Bibliotheken

Nach erfolgreicher Aufreinigung der gRNA wurde die in den Proben enthaltene mRNA mittels eines reverse-Transkriptionskits (Quantitect reverse-Transkriptions-kit, Qiagen) für die folgenden Expressionsstudien in einzelsträngige cDNA umgeschrieben.

Aus den 20 μ l Endvolumen der 48 erhaltenen cDNA-Bibliotheken wurde je eine Probe (0,5 μ l) entnommen, um die erfolgreich durchgeführte Transkription zu überprüfen. Dazu wurde jede cDNA-Probe mit einem Exon übergrei-

fenden, für die GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydro-genase) spezifischen Primer (Quantitect Primer Assay, Qiagen) versetzt und eine PCR durchgeführt. Diese Methode ist eine robuste Variante, um sowohl den Erfolg der reversen Transkription als auch die komplette Eliminierung genomischer DNA zu kontrollieren.

Korrekt transkribierte cDNA generiert eine Bande mit der Größe von 144 Basenpaaren. Fehlerhafte oder mit genomischer DNA kontaminierte Proben zeigen auf einem Agarosegel-Auftrag zusätzliche Banden differenter Größe.

Nach erfolgter PCR wurden alle Proben auf ein Agarose-Gel (2 %) aufgetragen, das Gel fotografiert und begutachtet (Abb. 3.25 und Abb. 3.26).

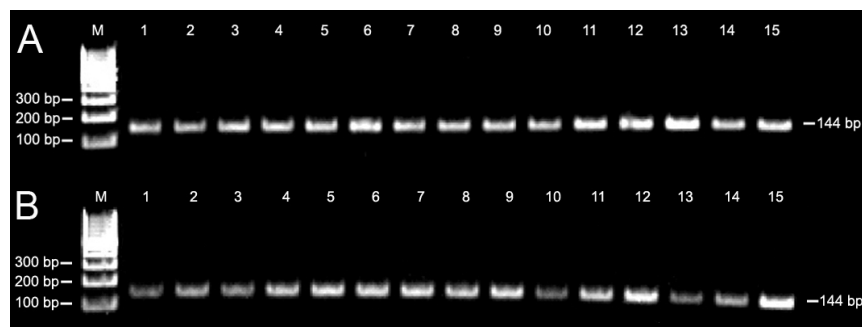


Abbildung 3.25: Agarosegel zur Qualitätskontrolle der cDNA-Bibliotheken mittels PCR. **A:** PCR-Amplifikate aus MCP-1^{+/+}-cDNA-Proben (12 h postischämisch). **B:** PCR-Amplifikate aus MCP-1^{-/-}-cDNA-Proben (12 h postischämisch). Dargestellt sind jeweils alternierend Ischämie, Cortex und kontralaterale Hemisphäre der fünf MCP-1^{+/+}- und fünf MCP-1^{-/-}-Mäuse.

Bei allen MCP-1^{+/+}- und MCP-1^{-/-}-cDNA-Proben aus den von Ischämie betroffenen Gruppen zeigte sich nur die zu erwartende Bande des 144 Basenpaare großen PCR-Amplikons.

Somit konnte von einer suffizienten reversen Transkription ausgegangen und eine Kontamination mit genomischer DNA ausgeschlossen werden.

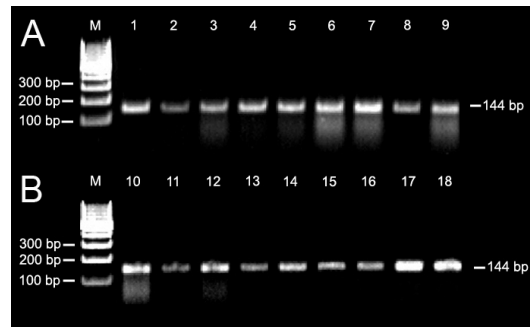


Abbildung 3.26: Agarosegel zur Qualitätskontrolle der Kontroll-cDNA-Bibliotheken mittels PCR. **A:** PCR-Amplifikate aus MCP-1^{+/+}-cDNA-Proben (ohne Ischämie). **B:** PCR-Amplifikate aus MCP-1^{-/-}-cDNA-Proben (ohne Ischämie). Dargestellt sind jeweils alternierend Ischämie (resp. linkes *Striatum*), (linker) Cortex und kontralaterale Hemisphäre (rechtes *Striatum*) der drei MCP-1^{+/+}- und drei MCP-1^{-/-}-Mäuse.

Bei den MCP-1^{+/+}- und MCP-1^{-/-}-cDNA-Proben ohne Ischämie zeigte sich ebenfalls je nur eine Bande des 144 Basenpaare großen PCR-Amplikons.

Somit konnte auch bei den Negativkontrollen von einer korrekten reversen Transkription ausgegangen und eine Kontamination mit genomischer DNA ausgeschlossen werden.

3.9.5 Primerentwicklung zur PHP-1-Expressionsanalyse

Da es keine kommerziell erhältlichen Primer oder Primersequenzen für Expressionsstudien der Protein-Histidin-Phosphatase-1 (PHP) gab, musste für diese Untersuchung ein spezifisches Primerpaar gefunden werden. Dazu wurde unter Zuhilfenahme der DNA-Sequenzen der murinen PHP-1 mittels der Software „Primer3“ je ein, das PHP-1-Gen flankierender Primer (PHPf, PHPr) gefunden. Bei korrekter Anlagerung an die zu untersuchende cDNA durfte während der qRT-PCR nur ein Fragment der Größe von 150 Basenpaaren amplifiziert werden (Exon 2 und Exon 3 übergreifend). Amplikons anderer Fragmentlänge deuten auf eine unspezifische Anlagerung hin.

Um ausschließen zu können, dass das Primerpaar PHPf / PHPr auch mit genomischer DNA ein Fragment der Größe von 150 Basenpaaren generiert, wurde zunächst eine Temperaturgradient-PCR mit einer MCP-1^{+/-}-Probe genomischer DNA durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden anschließend auf ein Agarosegel (2 %) aufgetragen, fotografiert und begutachtet (Abb. 3.27).

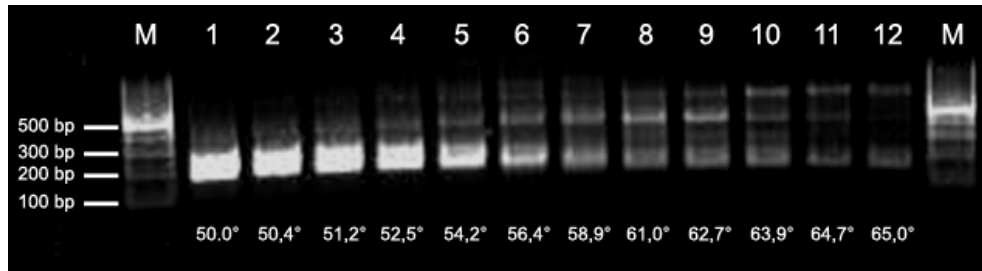


Abbildung 3.27: PCR-Produkte nach Temperaturgradienten-Amplifikation einer genomischen MCP-1^{+/-}-DNA-Probe mit dem Primerpaar PHPf / PHPr. Dargestellt sind zwölf PCR-Produkte mit aufsteigenden Primeranlagerungstemperaturen (50° C – 65° C). Agarosegel 2 %ig. M=Marker

Die Temperaturgradienten-PCR genomischer DNA mit dem Primerpaar PHPf / PHPr zeigte eine, von der Primeranlagerungstemperatur abhängige Generierung von PCR-Produkten unterschiedlicher Fragmentgröße. Zwischen 50° C und 52,5° C wurde ein Amplikon mit einer Größe von ca. 190 Basenpaaren gebildet. Zwischen 54,2° C und 64,7° C wurde ein zusätzliches Fragment mit einer Länge von ca. 480 Basenpaaren amplifiziert. Ab 61° C bis 65° C konnte ein zusätzliches PCR-Produkt mit einer Größe von ca. 750 Basenpaaren detektiert werden.

Somit konnte die Bildung eines 150 Basenpaar-PCR-Produkt durch fehlerhafte Primeranlagerung an genomische DNA während der PCR weitestgehend ausgeschlossen werden.

Um sicherzustellen, dass bei der PCR-Amplifikation reverse-transkribierter cDNA nur das erwartete Fragment der Länge von 150 Basenpaaren generiert wird, wurde zusätzlich eine Temperaturgradient-PCR mit einer cDNA-Probe

eines MCP-1^{+/-}-Tieres durchgeführt. Die PCR-Produkte wurde anschließend auf ein Agarosegel (2 %) aufgetragen, das Gel fotografiert und bewertet (Abb. 3.28).

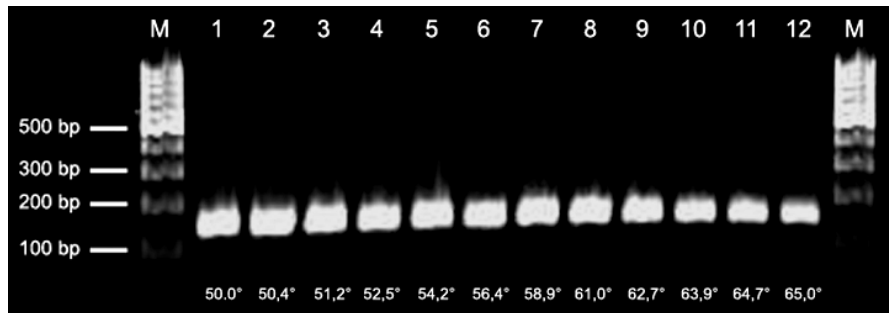


Abbildung 3.28: PCR-Produkte nach Temperaturgradienten-Amplifikation einer MCP-1^{+/-}-cDNA-Probe mit dem Primerpaar PHPf / PHPr. Dargestellt sind zwölf PCR-Produkte mit aufsteigenden Primeranlagerungstemperaturen (50° C – 65° C). Agarosegel 2 %ig. M=Marker

Die Analyse der PCR-Produkte zeigte, dass bei allen gewählten Temperaturen nur das erwartete Fragment mit 150 Basenpaaren amplifiziert wurde. Somit war sichergestellt, dass bei der *Real-Time*-PCR-Analyse nur die fragliche Gensequenz der PHP-1-cDNA amplifiziert wird.

3.9.6 Molekulargenetische Reaktionen nach zerebraler Ischämie

MCP-1^{-/-}-Mäuse zeigen nach einem 30-minütigen Schlaganfall ein verringertes Infarktvolume, eine geringere Einschränkung sensomotorischer Eigenschaften und einen attenuierten Einstrom inflammatorischer Zellen in das infarzierte Areal.

In dieser Versuchsreihe sollte geklärt werden, ob die Defizienz des Chemokins MCP-1 zu einem veränderten Expressionsmuster ausgewählter Gene (Tab. 3.1) nach zerebraler Ischämie führt und welche molekularbiologischen Zusammenhänge als Ursache für das abgeschwächte Krankheitsbild bei MCP-1^{-/-}-Tieren nach 30-minütigen Schlaganfall in Frage kommen.

Tabelle 3.1: Aufstellung der in den Expressionsstudien untersuchten Gene.

Pro- und anti-inflammatorische Proteine
Interleukin 1 β (IL-1 β)
Tumor Nekrose Faktor 1 (TNF-1)
Interleukin 6 (IL-6)
Granulozyten-Kolonie Stimulierender Faktor (G-CSF)
Peroxisom Proliferator Aktivierter Rezeptor- γ (PPAR- γ)
Extrazelluläre Matrix-Modulierende Faktoren
Matrix-Metalloprotease 9 (MMP-9)
Metalloprotease-Inhibitor 1 (TIMP-1)
Adhäsionsproteine
Vaskuläres Zell-Adhäsionsprotein 1 (V-CAM-1)
Stoffwechsellenzyme
Protein-Histidin-Phosphatase 1 (PHP-1)

Für die Expressionsstudie standen insgesamt je fünf generierte MCP-1^{+/-}- und fünf MCP-1^{-/-}- cDNA-Bibliotheken (12 Stunden postischämisch) aus den drei definierten Arealen Ischämie, Cortex und Kontralateral zur Verfügung.

Als Referenz wurden je drei generierte MCP-1^{+/-}- und MCP-1^{-/-}-cDNA-Bibliotheken (ohne Schlaganfall) aus den drei definierten Arealen eingesetzt.

Die cDNA-Proben wurden, in Doppelbestimmung, mit den Primern für die fraglichen Gene versetzt und eine Real-Time-PCR durchgeführt.

3.9.7 Validierung der qRT-PCR

Nach abgeschlossener qRT-PCR wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Diese Methode bietet die Möglichkeit, die Reinheit der amplifizierten Fragmente zu überprüfen. Während der Schmelzkurvenbestimmung wird die Temperatur in den Reaktionsvertiefungen des Thermocyclers über einen definierten Zeitraum (15 Sekunden) von 60° C auf 95° C erhöht. Sobald die, der Amplikonlänge entsprechende Schmelztemperatur erreicht ist, beginnen die amplifizierten doppelsträngigen DNA-Moleküle zu einzelsträngiger DNA aufzuschmelzen. Dabei nimmt die gemessene Fluoreszenz mit zunehmender Konzentration einzelsträngiger DNA ab (Abb. 3.29).

Eine korrekte Amplifikation zeigt eine der Fragmentlänge entsprechende Schmelztemperatur. Verschiedene Schmelztemperaturen in einer gemessenen Probe deuten auf unspezifische Primeranlagerung und damit auf eine fehlerhafte Amplifikation hin.

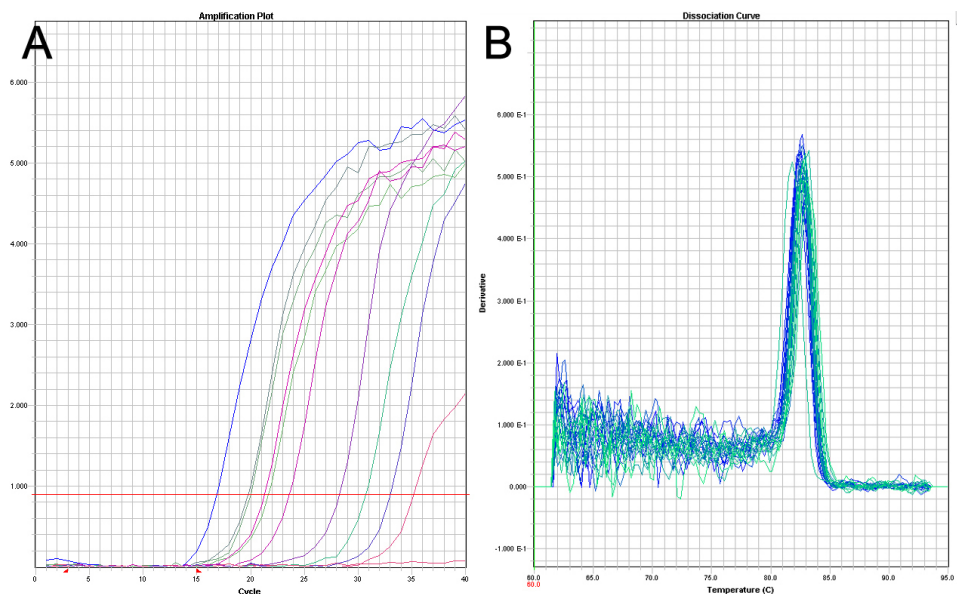


Abbildung 3.29: **A:** Beispielabbildung zur qRT-PCR. Dargestellt sind die Amplifikationsverläufe der zehn fraglichen Gene bei einer MCP-1^{+/+}-Probe (12 h postischämisch, Cortex). **B:** Beispielabbildung einer Schmelzkurve. Dargestellt sind die Schmelzkurven der GAPDH-Messungen aus der cDNA der MCP-1^{-/-}-Kontrollproben (Schmelztemperatur in diesem Beispiel ~83° C).

Alle amplifizierten Proben zeigten die erwarteten Schmelztemperaturen, so dass von einer korrekten Primeranlagerung ausgegangen werden konnte.

Als letzte Kontrolle wurden nach durchgeführter qRT-PCR stichprobenartig amplifizierte qRT-PCR-Produkte auf ein Agarosegel aufgetragen und begutachtet. Korrekt amplifizierte cDNA zeigt nur eine distinkte Bande der zu erwarteten Größe (Abb. 3.30).

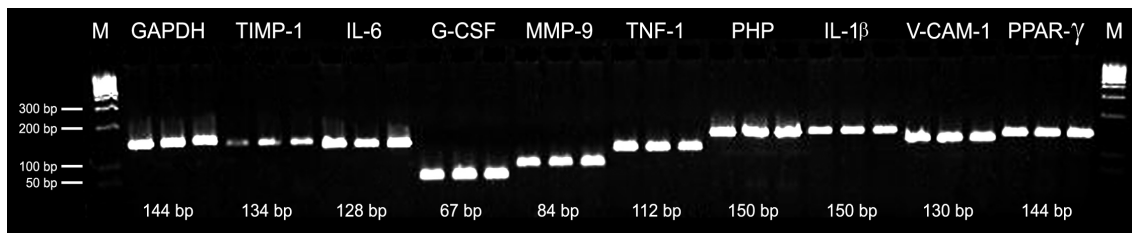


Abbildung 3.30: Beispielabbildung zur Fragmentgrößenkontrolle der amplifizierten cDNAs. Agarosegel 2 %ig. M=Marker.

Bei allen untersuchten DNA-Proben zeigte sich auf dem Agarosegel lediglich die Bande mit der zu erwartenden Fragmentlänge. Somit konnte von einer korrekten Amplifikation der fraglichen cDNA-Sequenzen ausgegangen werden.

3.9.8 Vergleichende Expressionsanalysen

Die qRT-PCR ermöglicht quantitative Aussagen über die in den Proben vorhandenen Kopienzahlen der fraglichen cDNA-Transkripte. Zur Quantifizierung wurden die zehn sequenzspezifischen Primer und der DNA-bindenden Farbstoff SYBR-Green den qRT-PCR-Ansätzen der zu untersuchenden Proben zugegeben.

Für jede Probe wurden zwei Ansätze parallel untersucht. Um Konzentrationschwankungen zwischen den Ansätzen auszugleichen wurde jeder Ansatz in Relation mit der konstitutiv exprimierten GAPDH standardisiert.

3.9.8.1 Postischämische Genexpression in MCP-1^{+/+}-Mäusen

Die gemessenen C_T -Werte jeder MCP-1^{+/+}-Probe wurden von dem für jede Probe individuell ermittelten C_T -Wert des Haushaltsgens GAPDH subtrahiert. Die daraus ermittelten ΔC_T -Werte jedes fraglichen Gens wurden mit den analogen ΔC_T -Werten der Kontrollproben aus Tieren ohne Infarkt verglichen und das mathematische Verhältnis errechnet. Die ermittelten $\Delta\Delta C_T$ -Werte wurden statistisch ausgewertet und grafisch als x-fache Expression im Vergleich zur Expression des fraglichen Gens ohne Schlaganfall dargestellt (Abb. 3.31).

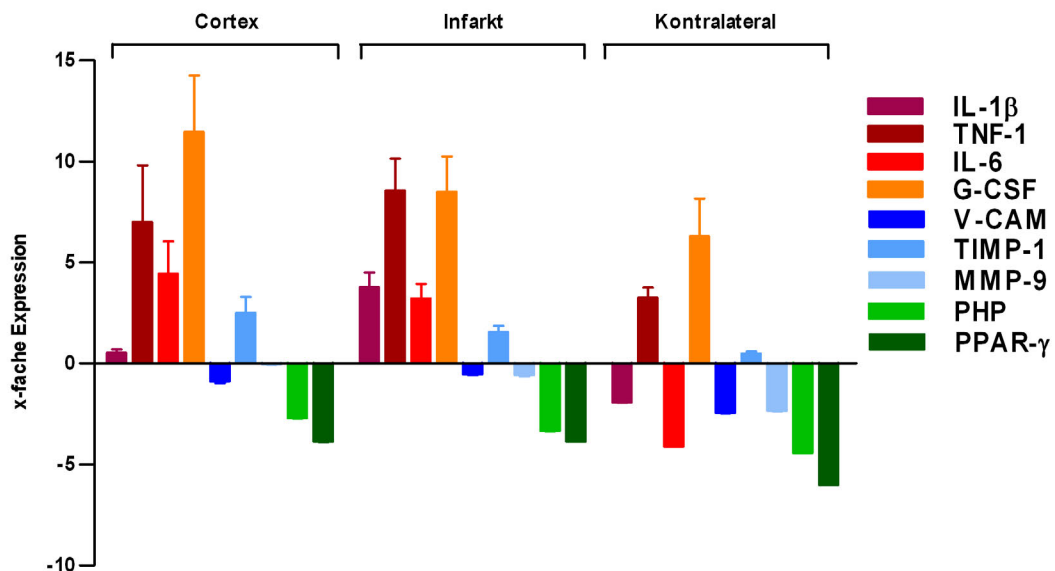


Abbildung 3.31: Relative Expression der fraglichen Gene in MCP-1^{+/+}-Tieren 12 h nach zerebraler Ischämie in Relation zu MCP-1^{+/+}-Tieren ohne Schlaganfall. Dargestellt sind die $\Delta\Delta C_T$ -Werte (x-fache Expression) \pm Standardfehler. Je untersuchtes Gen n=10, je Kontrolle n=6.

Tab.3.2: Regulation der fraglichen Gene in MCP-1^{+/-}-Mäusen, 12 Stunden postischämisch

Gen	Regulation	Standardabweichung	p-Wert	Signifikant reguliert
Cortex				
IL-1 β	+0.522	0.571	0,995	-
TNF-1	+7.016	8,895	0,083	-
IL-6	+4,458	5,012	0,412	-
G-CSF	+11.463	8.836	0,001	hoch reguliert ***
V-CAM	-0.892	0.242	0,980	-
TIMP-1	+2.518	2.451	0,825	-
MMP-9	-0.038	0.035	1,000	-
PHP	-2.695	0.056	0,759	-
PPAR- γ	-3.870	0.017	0,541	-
Infarkt				
IL-1 β	+3.781	2.310	0,284	-
TNF-1	+8.566	5.004	0,001	hoch reguliert ***
IL-6	+3.210	2.304	0,542	-
G-CSF	+8.500	5.572	0,001	hoch reguliert ***
V-CAM	-0.527	0.123	0,996	-
TIMP-1	+1.557	0.964	0,924	-
MMP-9	-0.579	0.154	0,987	-
PHP	-3.352	0.015	0,480	-
PPAR- γ	-3.858	0.012	0,362	-
Kontralateral				
IL-1 β	-1.926	0.086	0,219	-
TNF-1	+3.257	1.620	0,001	hoch reguliert ***
IL-6	-4.123	0.006	0,015	herunter reguliert **
G-CSF	+6.310	5.895	0,001	hoch reguliert ***
V-CAM	-2.448	0.040	0,074	-
TIMP-1	+0.492	0.303	0,808	-
MMP-9	-2.343	0.037	0,083	-
PHP	-4.424	0.003	0,011	herunter reguliert **
PPAR- γ	-6.007	0.001	0,001	herunter reguliert ***

Zwölf Stunden nach zerebraler Ischämie wurden in MCP-1^{+/-}-Mäusen sowohl ipsi- als auch kontralateral zahlreiche inflammatorische Gene herauf reguliert.

Im kortikalen Areal waren TNF-1 ($+7,016 \pm 8,895$ -fach), IL-6 ($+4,458 \pm 5,012$ -fach) und G-SCF ($+11,463 \pm 8,836$ -fach, signifikant $p < 0,001$) höher exprimiert als in MCP-1^{+/-}-Tieren ohne Schlaganfall. Der Matrix-Metalloprotease-Inhibitor-1 (TIMP-1) war um den Faktor $+2,518 \pm 2,415$ -fach höher exprimiert. Im Cortex herunter reguliert wurden sowohl die PHP ($-2,695 \pm 0,056$ -fach) als auch PPAR- γ ($-3,870 \pm 0,017$ -fach).

Im infarzierten Areal zeigte sich ebenfalls eine höhere Expression inflammatorischer Gene. Eine Zunahme der Expression konnte bei IL-1 β ($+3,781 \pm 2,310$ -fach), TNF-1 ($+8,566 \pm 5,004$ -fach, signifikant $p < 0,001$), IL-6 ($+3,210 \pm 2,304$ -fach) und G-CSF ($+8,500 \pm 5,572$ -fach, signifikant $p < 0,001$) detektiert werden. Der Matrixmetalloprotease-Inhibitor-1 war um den Faktor $+1,557 \pm 0,964$ -fach herauf reguliert. Herunter reguliert war neben der PHP ($-3,352 \pm 0,015$ -fach) PPAR- γ ($-3,358 \pm 0,012$ -fach).

Im kontralateralen Striatum zeigte sich für TNF-1 ($+3,257 \pm 1,620$ -fach, signifikant $p < 0,001$) und G-CSF ($+6,310 \pm 5,895$ -fach) eine verstärkte Expression gegenüber den Kontrolltieren. Attenuierte Expression konnte für IL-6 ($-4,123 \pm 0,006$ -fach, signifikant $p < 0,01$), V-CAM-1 ($-2,448 \pm 0,040$ -fach), MMP-9 ($-2,343 \pm 0,037$ -fach), der PHP ($-4,424 \pm 0,003$ -fach, signifikant $p < 0,01$) und PPAR- γ ($-6,007 \pm 0,001$ -fach, signifikant $p < 0,001$) detektiert werden.

3.9.8.2 Postischämische Genexpression in in MCP-1^{-/-}-Mäusen

Die ermittelten C_T-Werte jedes MCP-1^{-/-}-cDNA-Transkripts wurden von dem für jede Probe individuell ermittelten C_T-Wert des Haushaltsgens GAPDH subtrahiert. Die daraus ermittelten Δ C_T-Werte jedes fraglichen Gens wurden mit den analogen Δ C_T-Werten der Kontrollproben aus Tieren ohne Infarkt

verglichen und das mathematische Verhältnis errechnet. Die ermittelten $\Delta\Delta C_T$ -Werte wurden statistisch ausgewertet und grafisch als x-fache Expression im Vergleich zur Expression des fraglichen Gens ohne Schlaganfall dargestellt (Abb. 3.32).

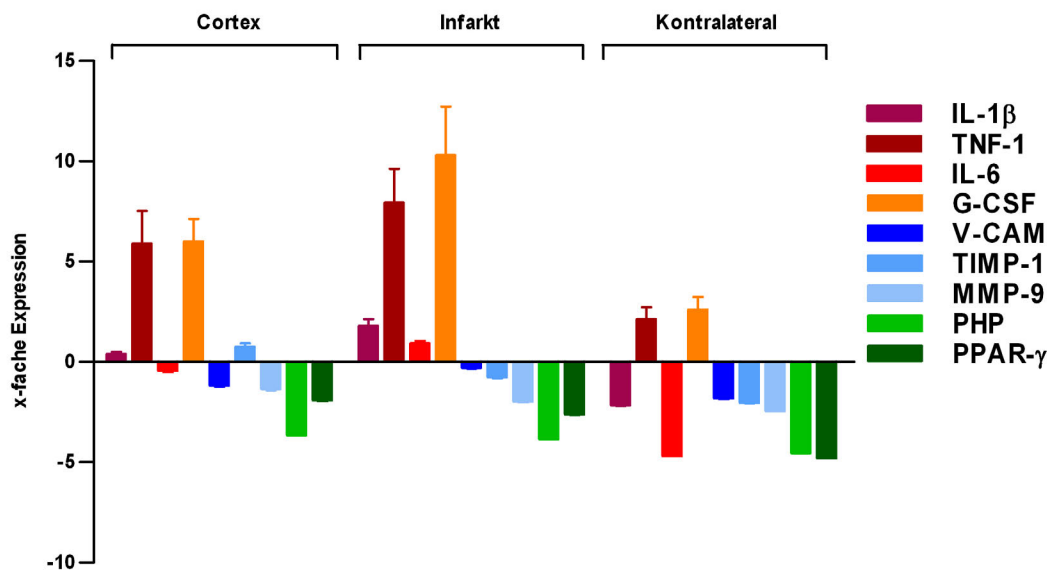


Abbildung 3.32: Relative Expression der untersuchten Gene in MCP-1^{-/-}-Tieren 12 h nach zerebraler Ischämie in Relation zu MCP-1^{-/-}-Tieren ohne Schlaganfall. Dargestellt sind die $\Delta\Delta C_T$ -Werte (x-fache Expression) \pm Standardfehler. Je untersuchtes Gen n=10, je Kontrolle n=6.

Tab.3.3: Regulation der fraglichen Gene in MCP-1^{-/-}-Mäusen, 12 Stunden postischämisch

Gen	Regulation	Standardabweichung	p-Wert	Signifikant reguliert
Cortex				
IL-1 β	+0.400	0.367	0,871	-
TNF-1	+5.911	5.126	0,012	hoch reguliert *
IL-6	-0.431	0.177	0,900	-
G-CSF	+6.010	3.585	0,004	hoch reguliert **
V-CAM	-1.169	0.159	0,564	-
TIMP-1	+0.765	0.491	0,754	-
MMP-9	-1.351	0.144	0,479	-
PHP	-3.649	0.015	0,001	herunter reguliert ***
PPAR- γ	-1.916	0.102	0,202	-
Infarkt				
IL-1 β	+1.812	1.015	0,224	-
TNF-1	+7.957	5.288	0,001	hoch reguliert ***
IL-6	+0.918	0.415	0,812	-
G-CSF	+10.333	7.633	0,001	hoch reguliert ***
V-CAM	-0.284	0.097	0,949	-
TIMP-1	-0.762	0.156	0,778	-
MMP-9	-1.978	0.068	0,232	-
PHP	-3.838	0.009	0,038	herunter reguliert *
PPAR- γ	-2.622	0.033	0,121	-
Kontralateral				
IL-1 β	-2.150	0.067	0,055	-
TNF-1	+2.133	1.895	0,139	-
IL-6	-4.685	0.004	0,001	herunter reguliert ***
G-CSF	+2.617	1.968	0,209	-
V-CAM	-1.811	0.081	0,102	-
TIMP-1	-2.039	0.066	0,058	-
MMP-9	-2.440	0.041	0,009	herunter reguliert **
PHP	-4.533	0.004	0,001	herunter reguliert ***
PPAR- γ	-4.792	0.003	0,001	herunter reguliert ***

In MCP-1^{-/-}-Mäusen wurden 12 Stunden nach zerebraler Ischämie im ipsilateralen Cortex TNF-1 (+5,911 \pm 5,126-fach, signifikant p < 0,05) und G-CSF

(+6,010 ± 3,585-fach, signifikant $p < 0,01$) im Vergleich zu MCP-1^{-/-}-Tieren ohne Infarkt herauf reguliert. Eine geringere Expression konnte bei V-CAM-1 (-1,169 ± 0,159-fach), MMP-9 (-1,351 ± 0,144-fach), der PHP (-3,649 ± 0,015, signifikant $p < 0,001$) und PPAR- γ (-1,916 ± 0,102-fach) detektiert werden.

Im infarzierten Areal wurden IL-1 β (+1,812 ± 1,015-fach), TNF-1 (+7,957 ± 5,288-fach, signifikant $p < 0,001$) und G-CSF (+10,333 ± 7,733, signifikant $p < 0,001$) höher exprimiert als in den Kontrolltieren.

In der kontralateralen, nicht von Ischämie betroffenen Region wurden TNF-1 (+2,133 ± 1,895-fach) und G-CSF (+2,617 ± 1,968-fach) herauf reguliert. Eine attenuierte Expression konnte bei IL-1 β (-2,150 ± 0,067-fach), IL-6 (-4,685 ± 0,004-fach, signifikant $p < 0,001$), V-CAM (-1,811 ± 0,081-fach), TIMP-1 (-2,039 ± 0,066-fach), MMP-9 (-2,440 ± 0,041-fach, signifikant $p < 0,01$), der PHP (-4,533 ± 0,004-fach, signifikant $p < 0,001$) und PPAR- γ (-4,792 ± 0,003-fach, signifikant $p < 0,001$) ermittelt werden.

3.9.8.3 Differentielle Expression in MCP-1^{+/-}- und MCP-1^{-/-}-Mäusen

Für den direkten Vergleich der postischämischen Expression der fraglichen Gene in MCP-1^{+/-}- und MCP-1^{-/-}-Mäusen wurden zunächst die gemessenen C_T-Werte jedes MCP-1^{-/-}-cDNA-Transkripts von dem für jede Probe individuell ermittelten C_T-Wert des Haushaltsgens GAPDH subtrahiert. Die daraus ermittelten Δ C_T-Werte wurden mit den analogen Δ C_T-Werten der MCP-1^{+/-}-Proben verglichen und das mathematische Verhältnis errechnet. Die $\Delta\Delta$ C_T-Werte wurden statistisch ausgewertet und grafisch als x-fache Expression im Vergleich zur Expression des fraglichen Genes im MCP-1^{+/-}-Tier dargestellt (Abb. 3.33).

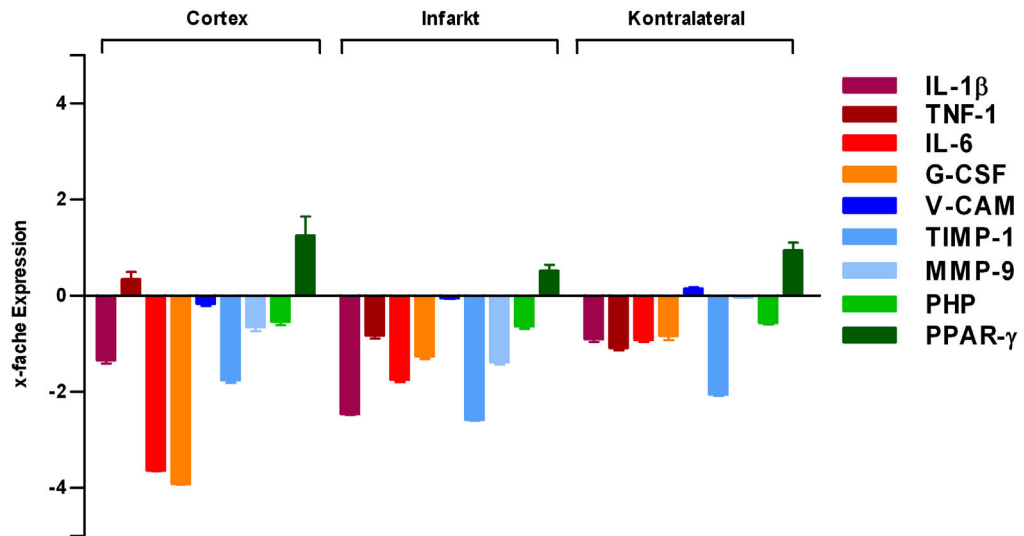


Abbildung 3.33: Relative Expression der fraglichen Gene in MCP-1^{-/-}-Tieren 12 h nach zerebraler Ischämie in Relation zur Expression in MCP-1^{+/+}-Tieren 12 h nach zerebraler Ischämie. Dargestellt sind die $\Delta\Delta C_T$ -Werte (x-fache Expression) \pm Standardfehler. Je untersuchtes Gen n=10, je Kontrolle n=6.

Tab.3.4: Direkter Vergleich der relativen Expression fraglicher Gene zwischen MCP-1^{-/-}-und MCP-1^{+/-}-Mäusen 12 Stunden postischämisch.

Gen	Regulation	Standardabweichung	p-Wert	Signifikant reguliert
Cortex				
IL-1 β	-1.342	0.234	0,982	-
TNF-1	+0.349	0.457	0,985	-
IL-6	-3.637	0.019	0,740	-
G-CSF	-3.914	0.014	0,584	-
V-CAM	-0.171	0.132	1,000	-
TIMP-1	-1.766	0.154	0,979	-
MMP-9	-0.651	0.269	0,999	-
PHP	-0.540	0.232	1,000	-
PPAR- γ	+1.252	1.233	0,962	-
Infarkt				
IL-1 β	-2.463	0.057	0,467	-
TNF-1	-0.831	0.190	0,968	-
IL-6	-1.757	0.119	0,774	-
G-CSF	-1.264	0.161	0,921	-
V-CAM	-0.050	0.027	1,000	-
TIMP-1	-2.578	0.053	0,426	-
MMP-9	-1.380	0.149	0,898	-
PHP	-0.637	0.166	0,993	-
PPAR- γ	+0.523	0.397	0,966	-
Kontralateral				
IL-1 β	-0.907	0.165	0,765	-
TNF-1	-1.085	0.143	0,706	-
IL-6	-0.917	0.156	0,760	-
G-CSF	-0.838	0.261	0,718	-
V-CAM	+0.155	0.085	0,979	-
TIMP-1	-2.054	0.083	0,289	-
MMP-9	-0.041	0.019	0,996	-
PHP	-0.561	0.123	0,955	-
PPAR- γ	+0.945	0.514	0,747	-

Der direkte Expressionsvergleich zwischen beiden von zerebraler Ischämie betroffenen Gruppen zeigte bei den MCP-1^{-/-}-Mäusen insbesondere innerhalb der inflammatorischen Genen eine verringerte Transkriptkonzentration.

Im kortikalen Areal waren sowohl IL-1 β (-1,342 \pm 0,234-fach), IL-6 (-3,637 \pm 0,019-fach), G-CSF (-3,914 \pm 0,014-fach) als auch TIMP-1 (-1,766 \pm 0,154-fach) in geringerem Ausmaß herauf reguliert. PPAR- γ (+1,252 \pm 1,233-fach) war das einzige Gen, welches in MCP-1^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu MCP-1^{+/-}-Tieren im ipsilateralen Cortex 12 Stunden postischämisch in höherer Konzentration vorlag.

Im infarzierten Areal wurden ebenfalls zahlreiche untersuchte inflammatorische Gene auf niedrigerem Niveau exprimiert. IL-1 β (-2,463 \pm 0,057-fach), IL-6 (-1,757 \pm 0,119-fach) und G-CSF (-1,264 \pm 0,161-fach). Bei den extrazellulären Matrix modulierenden Proteinen TIMP-1 (-2,578 \pm 0,053-fach) und MMP-9 (-1,380 \pm 0,149-fach) wurde ebenfalls eine geringere Transkriptmenge detektiert. PPAR- γ war auch in diesem Areal das einzige Gen, welches in leicht erhöhter Kopienzahl vorlag (+0,523 \pm 0,397-fach).

Auch auf der kontralateralen Hemisphäre konnte bei den MCP-1^{-/-}-Mäusen eine insgesamt abgeschwächte inflammatorische Reaktion beobachtet werden. Insbesondere TNF-1 (-1,085 \pm 0,143-fach) und TIMP-1 (-2,054 \pm 0,083-fach) wurden im Vergleich zu MCP-1^{+/-}-Tieren schwächer exprimiert. Kontralateral zeigte PPAR- γ in MCP-1^{-/-}-Tieren gegenüber den MCP-1^{+/-}-Mäusen ebenfalls eine leicht erhöhte Expression (+0,945 \pm 0,514-fach).

3.9.8.4 Konstitutive Expressionsunterschiede ohne zerebrale Ischämie

Um mögliche Unterschiede der Expression der untersuchten Gene zwischen gesunden MCP-1^{-/-} und gesunden MCP-1^{+/+}-Mäusen zu untersuchen, wurden die gemessenen ΔC_T -Werte der MCP-1^{-/-}-Kontrolltiere von den jeweils analogen ΔC_T -Werten der MCP-1^{+/+}-Kontrolltiere subtrahiert. Die daraus ermittelten $\Delta\Delta C_T$ -Werte wurden statistisch ausgewertet und grafisch als x-fache Expression im Vergleich zur Expression des jeweiligen Genes im MCP-1^{+/+}-Tier dargestellt. Dadurch konnte der direkte Einfluss des Chemokins MCP-1- auf die konstitutionelle Expression der untersuchten Gene in gesunden Mäusen dargestellt werden (Abb. 3.34).

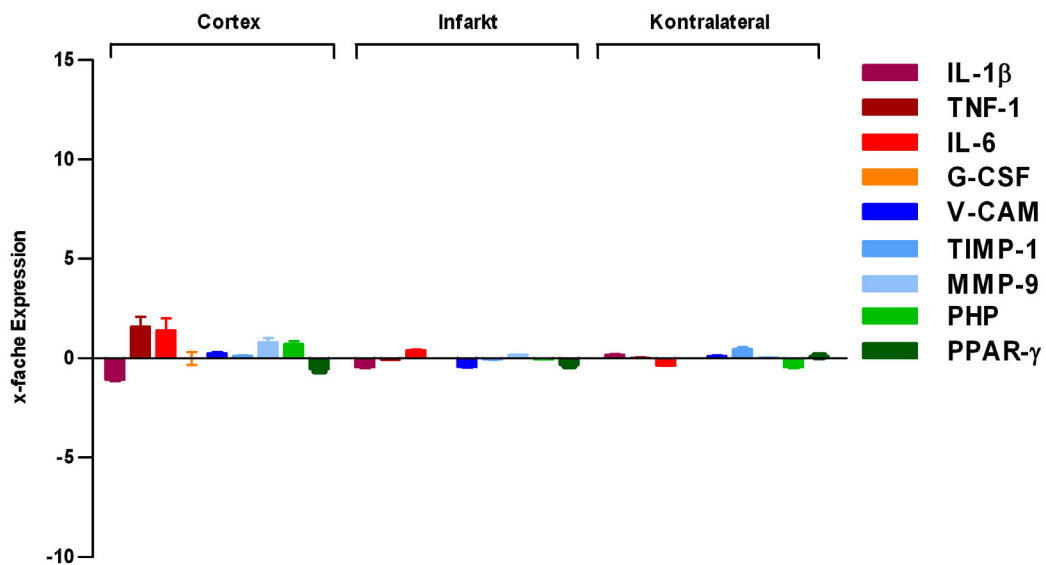


Abbildung 3.34: Relative Expression der fraglichen Gene in MCP-1^{+/+}-Tieren ohne Ischämie in Relation zu MCP-1^{-/-}-Tieren ohne Ischämie. Dargestellt sind die $\Delta\Delta C_T$ -Werte (x-fache Expression) \pm Standardfehler. Je untersuchtes Gen n=10, je Kontrolle n=6.

Tab.3.5: Direkter Vergleich der konstitutiven Expression der untersuchten Gene zwischen MCP-1^{-/-} und MCP-1^{+/-}-Mäusen ohne zerebrale Ischämie.

Gen	Regulation	Standardabweichung	p-Wert	Signifikant reguliert
Cortex				
IL-1 β	-1.072	0.211	0,686	-
TNF-1	+1.599	1.226	0,533	-
IL-6	+1.400	1.476	0,586	-
G-CSF	+0.010	0.779	0,521	-
V-CAM	+0.254	0.151	0,989	-
TIMP-1	+0.135	0.072	0,996	-
MMP-9	+0.810	0.489	0,898	-
PHP	+0.718	0.362	1,000	-
PPAR- γ	-0.554	0.175	0,826	-
Infarkt				
IL-1 β	-0.438	0.106	0,509	-
TNF-1	-0.063	0.030	0,924	-
IL-6	+0.405	0.113	0,419	-
G-CSF	+0.012	0,009	1,000	-
V-CAM	-0.437	0.083	0,412	-
TIMP-1	-0.055	0.026	0,967	-
MMP-9	+0.173	0.059	0,759	-
PHP	-0.043	0.009	0,971	-
PPAR- γ	-0.326	0.073	0,538	-
Kontralateral				
IL-1 β	+0.173	0.113	0,820	-
TNF-1	+0.039	0.032	0,990	-
IL-6	-0.355	0.080	0,410	-
G-CSF	+0,012	0,011	0,160	-
V-CAM	+0.122	0.062	0,940	-
TIMP-1	+0.477	0.208	0,370	-
MMP-9	+0.056	0.024	0,900	-
PHP	-0.452	0.087	0,330	-
PPAR- γ	+0.117	0.052	0,830	-

Bei gesunden MCP-1^{-/-}-Tieren konnte im direkten Vergleich lediglich eine leicht erhöhte Expression der Gene für TNF-1 (+1,599 ± 1,226-fach) und IL-6 (+1,400 ± 1,476-fach) im kortikalen Areal ermittelt werden. Für das IL-1 β -Transkript fand sich in den MCP-1^{-/-}-Mäusen eine leicht verringerte Kopienzahl (-1,072 ± 0,211-fach) im kortikalen Areal. Alle anderen untersuchten cDNA-Transkripte zeigten zwischen MCP-1^{-/-}- und MCP-1^{+/-}-Mäuse keine differente Expressionsrate.

3.10 Analyse der Bluthirnschrankenintegrität

Nach transientser zerebraler Ischämie kommt es, im Vergleich zu MCP-1^{+/-}-Tieren, in MCP-1^{-/-}-Tieren zu einem verminderten Einstrom hämatogener Makrophagen, neutrophiler Granulozyten und T-Zellen. Diese Versuchsreihe sollte zeigen, ob die Ursache hierfür u. a. eine unterschiedlich ausgeprägte postischämische Disruption der Bluthirnschranke ist. Dazu wurde je fünf MCP-1^{+/-}- und MCP-1^{-/-}-Mäuse 12 Stunden nach transientser fokaler zerebraler Ischämie ein mit dem Fluoreszenzfarbstoff FITC (Fluoreszeinisothiocyanat) konjugiertes Albumin intravenös appliziert. Bei Mäusen ohne Schlaganfall ist FITC-Albumin nicht Bluthirnschranken gängig. Kommt es nach zerebraler Ischämie zu einer Umstrukturierung der Bluthirnschrankenproteine und Disruption des Gefäßendothels tritt FITC-Albumin in das Gehirnparenchym über. Anhand der Fluoreszenzintensität des übergetretenen FITC-Albumins sollte ermittelt werden, ob es zu einer unterschiedlichen Schädigung der Bluthirnschranke in MCP-1^{-/-}- und MCP-1^{+/-}-Mäusen kommt.

3.10.1 Densitometrische Auswertung

Eine Möglichkeit zur Konzentrationsbestimmung des intrazerebralen FITC-Albumins ist die densitometrische Analyse. Dazu wurden von jeder ipsilateralen Hemisphäre sechs Areale innerhalb des infarzierten Areals mit einem Fluoreszenzmikroskop fotografiert. Um eine Verfälschung durch die Autofluoreszenz des Gewebes ausschließen zu können, wurden zusätzlich von jedem Tier drei Areale innerhalb der kontralateralen Stammganglien fotografiert. Die durchschnittliche Autofluoreszenz dieser drei Aufnahmen wurde mittels der Software ImageJ errechnet und von jeder ipsilateralen Aufnahme subtrahiert (Abb. 3.35 A und Abb. 3.35 D). Von dem verbliebenen Signal jeder Aufnahme wurde anschließend, ebenfalls mit ImageJ, ein binäres Bild erzeugt (Abb. 3.35 B und Abb. 3.35 E). Dadurch konnte zwischen weißen Pixeln (FITC-Signal = 0) und schwarzen Pixeln (FITC-Signal = 1) differenziert werden. Die Anzahl FITC-positiver Pixel wurde für alle Tier beider Gruppen ermittelt und statistisch ausgewertet (Abb. 3.36).

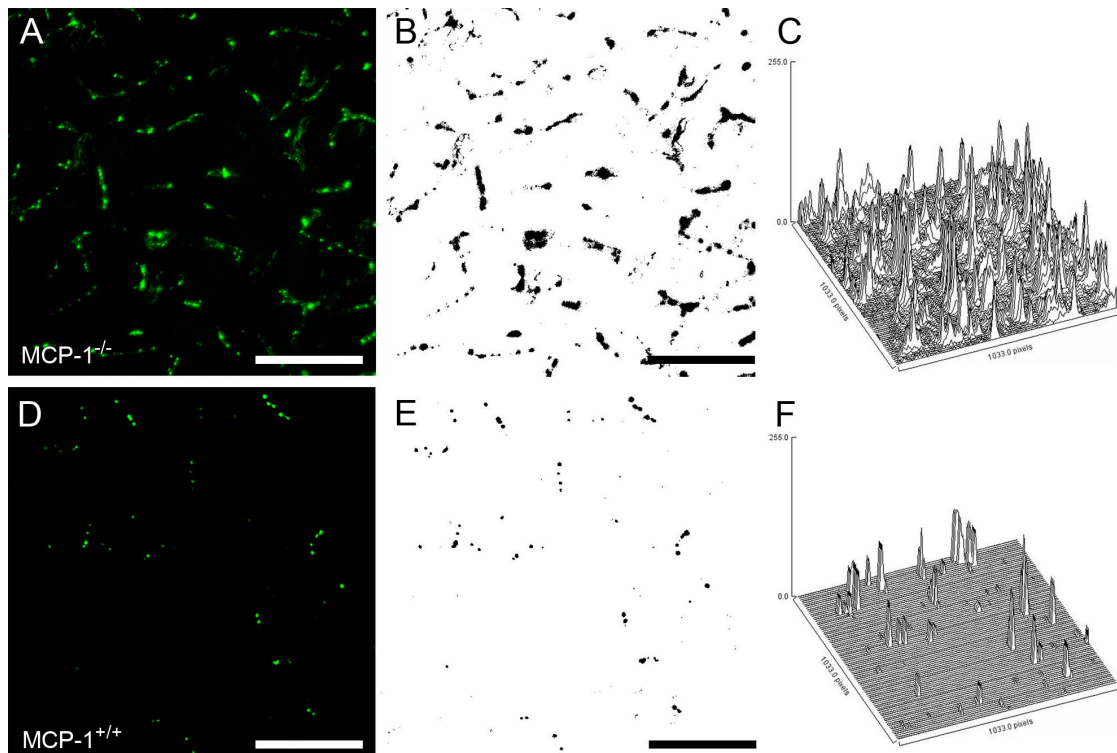


Abb. 3.35: Beispielabbildungen zur densitometrischen Analyse des FITC-Übertritts durch die Bluthirnschranke nach zerebraler Ischämie. **A:** Ausschnitt des FITC-Albumin-Signals innerhalb des infarzierten Areals eines MCP-1^{-/-}-Tieres 12 Stunden nach zerebraler Ischämie. **B:** Derselbe Ausschnitt nach Umrechnung in eine Binärgrafik. **C:** Dreidimensionales Histogramm von Abbildung A. Dargestellt sind alle Pixel der Aufnahme in einem Koordinatensystem. Dabei entspricht die Höhe der Pixelausschläge der jeweiligen Fluoreszenzintensität. **D:** Ausschnitt des FITC-Albumin-Signals innerhalb des infarzierten Areals eines MCP-1^{+/+}-Tieres 12 Stunden nach zerebraler Ischämie. **E:** Binärgrafik der MCP-1^{+/+}-Aufnahme. **F:** Dreidimensionales Histogramm von Abbildung D. Messbalken = 100 μm .

Die Auswertung der FITC-Albumin positiven Signale ergab für die MCP-1^{+/+}-Mäuse eine relative Zunahme gegenüber der kontralateralen Hemisphäre von $0,27 \pm 0,16$. Bei den MCP-1^{-/-}-Tieren konnte eine relative Zunahme von $0,47 \pm 0,25$ ermittelt werden (Abb. 3.36). Damit lag das ipsilaterale FITC-Albumin-Signal bei den MCP-1^{-/-}-Mäusen signifikant ($p < 0,001$) über dem der MCP-1^{+/+}-Tiere. Hierbei zeigte sich morphologisch eine mögliche Kolo-kalisation mit Blutgefäßen. Somit konnte durch die densitometrische Auswertung keine zuverlässige Aussage über den Verbleib des FITC-Albumins im Gehirnparenchym getroffen werden.

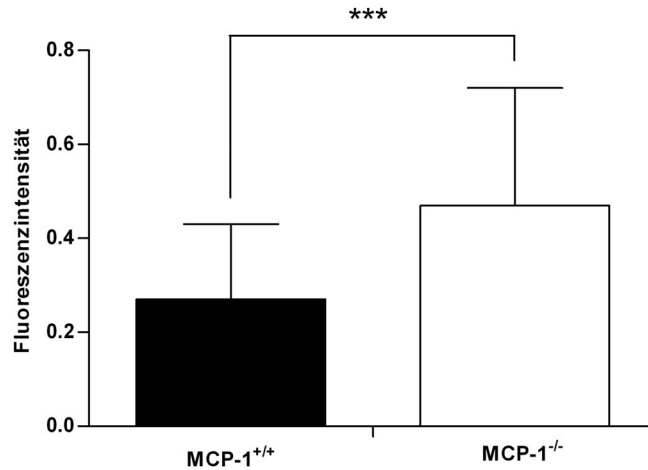


Abb. 3.35: Statistische Auswertung des densitometrisch ermittelten FITC-Albumin-Gehalts 12 Stunden nach zerebraler Ischämie in MCP-1^{-/-}- und MCP-1^{+/+}-Tieren. Die Zahlen ergaben sich aus der gemittelten ipsilateralen Fluoreszenzintensitätszunahme im Vergleich zur kontralateralen Hemisphäre. Pro Tier wurden je sechs Areale auf der infarzierten Hemisphäre und 3 Areale auf der kontralateralen Hemisphäre fotografiert. Dargestellt sind die Mittelwerte sowie Standardabweichungen. Signifikanz ($p < 0,001$) nach t-Test. MCP-1^{+/+}- und MCP-1^{-/-}-Gruppe je $n=5$.

3.10.2 FITC-Albumin-Quantifizierung im Gehirnparenchym

Da die densitometrische Auswertung keine exakte Aussage über die FITC-Albumin-Konzentration im Gehirnparenchym liefern konnte, wurde eine zusätzliche Analyse des Gewebes mittels ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) durchgeführt. Dazu wurden je 50 mg der der ipsi- und kontralateralen Hemisphäre püriert, zentrifugiert und der FITC-Albumin-Gehalt des Überstands mittels ELISA ermittelt (Abb. 3.37).

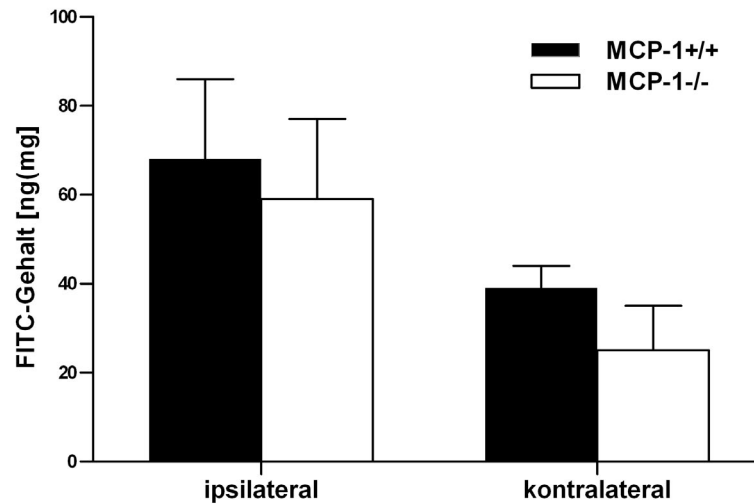


Abb. 3.37: Statistische Auswertung der FITC-Albumin-Konzentration 12 Stunden postoperativ in den Gehirnproben der MCP-1^{+/+}- und MCP-1^{-/-}-Tiere. Dargestellt sind die Mittelwerte sowie Standardabweichungen. MCP-1^{+/+}- und MCP-1^{-/-}-Gruppe je n=5.

Der FITC-Albumin Gehalt betrug $68,54 \pm 17,5$ ng/mg in der ipsilateralen Hemisphäre der MCP-1^{+/+}-Tiere. Mit $58,8 \pm 18,03$ ng/mg konnte bei den MCP-1^{-/-}-Mäusen zwar eine niedrigere FITC-Albumin-Konzentration ermittelt werden, jedoch waren diese Werte nicht signifikant.

Innerhalb der kontralateralen Hemisphäre wurde bei den MCP-1^{+/+}-Tieren eine FITC-Albumin Konzentration von $38,59 \pm 4,9$ ng/mg und bei den MCP-1^{-/-}-Mäusen $24,54 \pm 5,82$ ng/mg gemessen. Auch hier konnte zwar ein geringfügiger Unterschied festgestellt werden, der sich in der statistischen Analyse jedoch als nicht-signifikant herausstellte.

Somit konnte bei beiden untersuchten Gruppen eine Disruption der Bluthirnschranke und ein damit verbundener Übertritt von FITC-Albumin in das Gehirnparenchym nachgewiesen werden. Dabei konnte im Gehirngewebe der MCP-1^{+/+}-Tiere eine geringfügig erhöhte FITC-Albumin-Konzentration ermittelt werden.

3.10.3 Morphologische Analyse der Bluthirnschrankenintegrität

Da es nach einem Schlaganfall durch apoptotische und nekrotische Prozesse sowie Umstrukturierungen der *tight-Junction*-Proteine zu Schädigungen und Integritätsverlusten der Bluthirnschranke kommt, sollte mittels Immunfluoreszenz morphologisch gezeigt werden, ob MCP-1 *in-vivo* einen Effekt auf die Strukturen der Bluthirnschranke nach zerebraler Ischämie hat.

3.10.3.1 FITC-Albumin-Kolokalisation mit dem Gefäßendothel

Da die densitometrische Auswertung der Bluthirnschrankenintegrität in MCP-1^{+/-}- und MCP-1^{-/-}-Mäusen Hinweise auf eine Kolokalisation des FITC-Signals mit Blutgefäßen gab, wurde zur Verifizierung eine immunhistochemische Färbung des Endothelmarkers von-Willebrand-Faktor durchgeführt (Abb. 3.38).

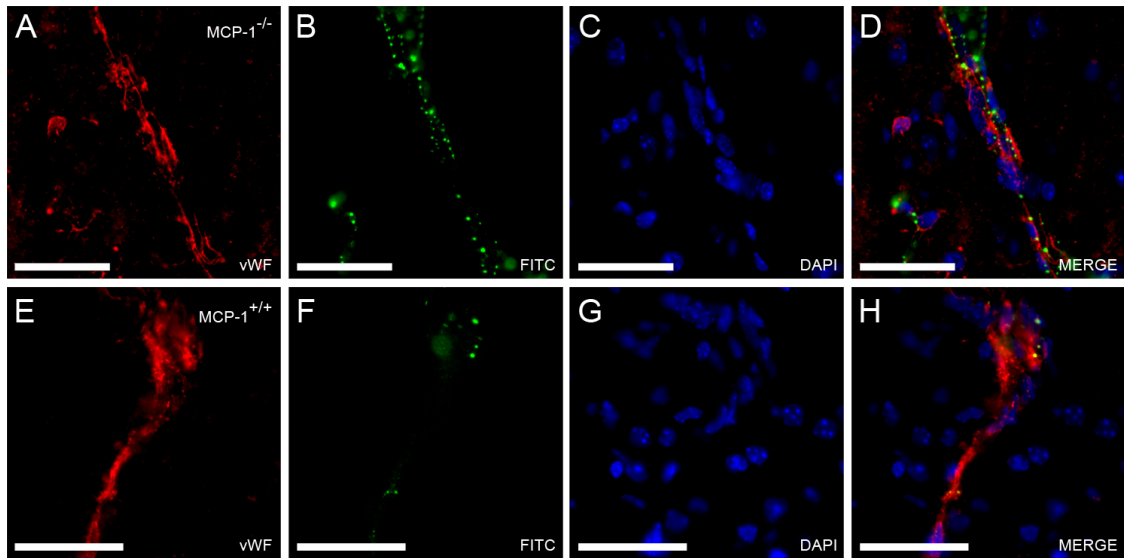


Abb.3.38: Beispielaufnahmen zur immunhistochemischen Untersuchung der Kolokalisation von FITC-Albumin mit Endothelzellen. **A-D:** Von-Willebrand-Faktor-Färbung auf einem MCP-1^{-/-}, 12 Stunden postischämischen Gehirnschnitt. Deutlich ist die Kolokalisation des vWF mit dem FITC-Signal zu erkennen. **E-H:** Von-Willebrand-Faktor-Färbung auf einem MCP-1^{+/+}-Schnitt. Auch hier ist eine Kolokalisation von FITC mit dem Endothelmarker vWF auszumachen. Das FITC-Signal der MCP-1^{+/+}-Tiere ist im Vergleich zu dem der MCP-1^{-/-}-Mäuse (B + D) deutlich abgeschwächt (F + H). Messbalken = 50 μm. Zellkerne blau (DAPI)

Anhand der von-Willebrand-Faktor-Färbung konnte eine eindeutige Kolokalisation des FITC-Albumins mit dem Blutgefäßendothel bestätigt werden. Die morphologische Begutachtung der von-Willebrand-Färbung zeigte keinen Unterschied zwischen MCP-1^{-/-} und MCP-1^{+/+}-Tieren. Auch in dieser Analyse wurde bei den MCP-1^{+/+}-Mäusen ein weniger ausgeprägtes FITC-Albumin-Signal beobachtet.

3.10.3.2 Morphologische Begutachtung des *Zonula-Occludens-1*-Signals

Neben Occludin-1 und den Proteinen der Claudin-Familie ist *Zonula-Occludens-1* ein zentrales Protein, das für die Ausbildung der *Tight-junctions* der Bluthirnschranke verantwortlich sind. Die immunhistochemische Färbung von ZO-1 sollte Aufschluss über mögliche Veränderungen der Proteinstruktur

dieser Zell-Zell-Verbindungen innerhalb des Gefäßendothels in postischämischen Gehirnen von MCP-1^{+/-}- und MCP-1^{-/-}-Mäusen geben (Abb. 3.39).

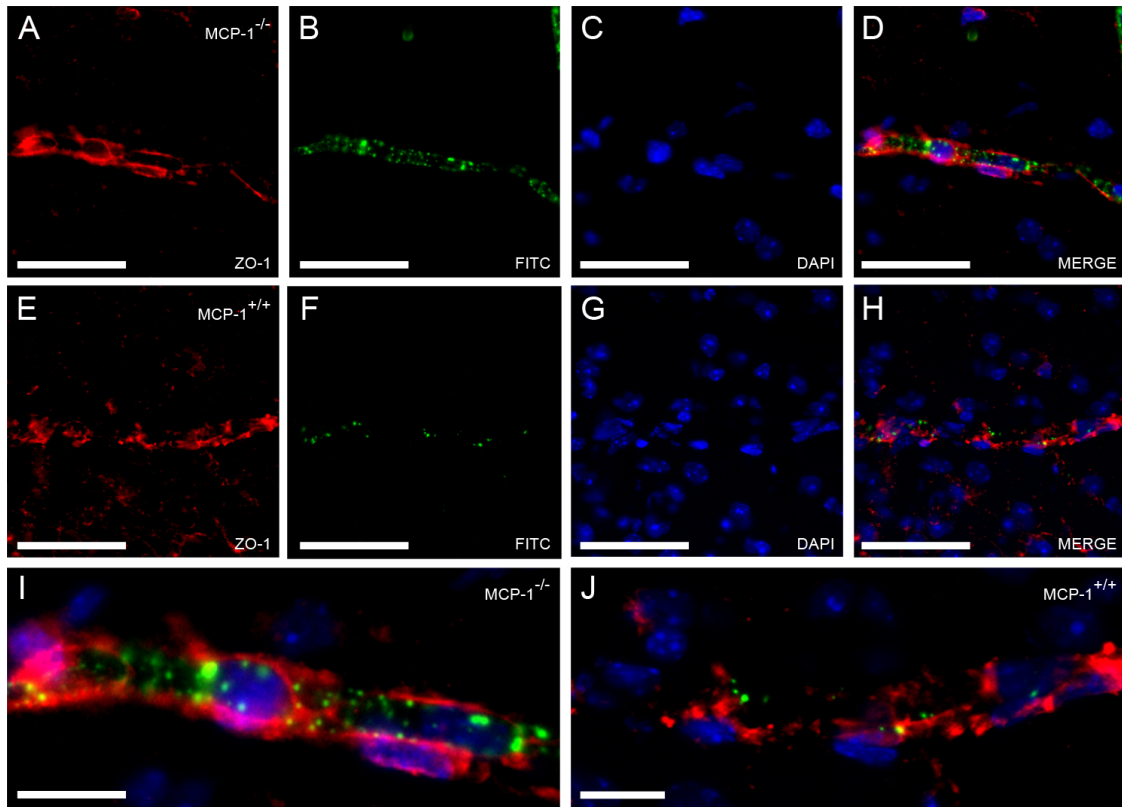


Abb.3.39: Beispielaufnahmen zur immunhistochemischen Untersuchung der Bluthirnschrankeintegrität. **A-D:** *Zonula-Occludens-1*-Färbung und FITC-Kolokalisation auf einem MCP-1^{-/-}-Gehirnschnitt (12 Stunden postischämisch). **E-H:** *Zonula-Occludens-1*-Färbung und FITC-Kolokalisation auf einem MCP-1^{+/-}-Schnitt (12 Stunden postischämisch). **I:** Ausschnittvergrößerung von Abbildung D. **J:** Ausschnittvergrößerung von Abbildung H. Ein Vergleich zwischen den Gruppen zeigt die morphologischen Unterschiede des ZO-1-Signals zwischen den MCP-1^{-/-}-Mäusen und den MCP-1^{+/-}-Tieren (Abb. I + J). Messbalken A-H = 50 µm. I + J = 10 µm. Zellkerne blau (DAPI)

Der morphologischer Vergleich des ZO-1-Signals zwischen MCP-1^{+/-}- und MCP-1^{-/-}-Mäusen 12 Stunden postoperativ zeigte deutliche Unterschiede zwischen den Gruppen. Durch mikroskopische Begutachtung konnte bei den MCP-1^{+/-}-Tieren ein struktureller Verlust des ZO-1-Signals entlang des Gefäßendothels beobachtet werden (Abb. 3.38 I + J).

3.10.3.3 Morphologische Begutachtung des Occludin-Signals

Das sich durch seine vier transmembranen Dömanen auszeichnende *tight-junction*-Protein Occludin ist einer der zentralen Bestandteile der Bluthirnschranke. Je zwei extrazelluläre Aminosäureschleifen bilden die interzelluläre Verbindung aus und sind damit für die Zell-Zell-Adhäsion und die Abdichtung des Gefäßendothels verantwortlich. Die immunhistochemische Färbung von Occludin sollte einen Hinweis auf mögliche differenzielle strukturelle Veränderungen dessen Proteinstruktur zwischen MCP-1^{+/-} und MCP-1^{-/-} Tieren 12 Stunden postischämisch geben (Abb. 3.40).

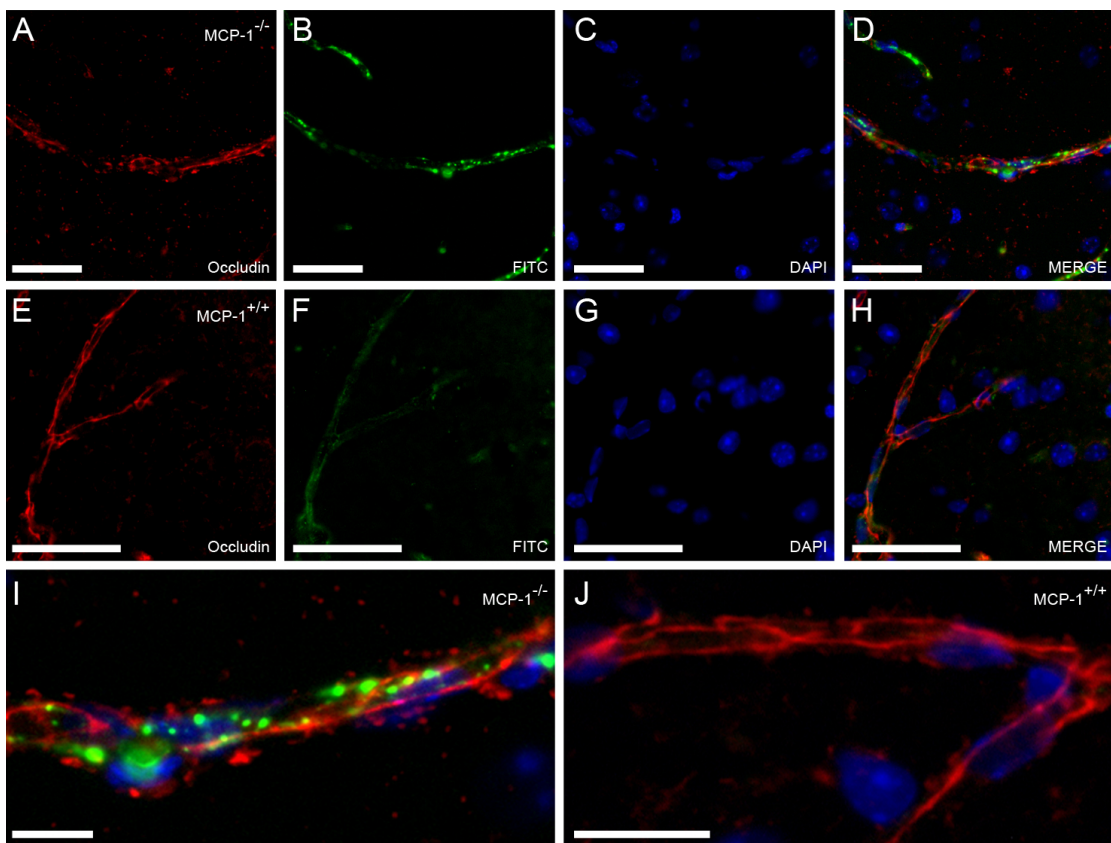


Abb.3.40: Beispielaufnahmen zur immunhistochemischen Untersuchung der Bluthirnschrankenintegrität. **A-D:** Occludin-1-Färbung und FITC-Kolokalisation auf einem MCP-1^{-/-} Gehirnschnitt (12 Stunden postischämisch). **E-H:** Occludin1-Färbung und FITC-Kolokalisation auf einem MCP-1^{+/-}-Schnitt (12 Stunden postischämisch). **I:** Ausschnittvergrößerung von Abbildung D. **J:** Ausschnittvergrößerung von Abbildung H. Die Begutachtung des Fluoreszenzsignals zwischen beiden Gruppen zeigte keinen relevanten Unterschied der Occludin-1-Morphologie (Abb. I + J). Messbalken A-H = 50 µm. I + J = 10 µm. Zellkerne blau.

Die vergleichende Analyse der Occludinmorphologie konnte keinen relevanten Unterschied der Proteinstruktur zwischen MCP-1^{-/-} und MCP-1^{+/+}-Mäusen nachweisen.

4 Diskussion

Der Schlaganfall ist weltweit eine der häufigsten Todesursachen sowie Ursache schwerwiegender körperlicher Behinderung und Pflegebedürftigkeit. Somit hat diese Erkrankung vor dem Hintergrund der demographischen Entwicklung größte klinische und sozioökonomische Relevanz.

Neben zahlreichen pathophysiologischen Mechanismen bei der Schadenentwicklung hat die postischämische Inflammation eine große Bedeutung in der Schlaganfallforschung (Samson et al., 2005; Chamorro et al., 2006).

Minuten nach dem Verschluss eines Gehirngefäßes kommt es durch Sauerstoff- und Glukosemangel zu einem Absterben von Neuronen. Im weiteren Verlauf werden u.a. residente Mikroglia aktiviert und hämatogene Zellen immigrieren in das Gehirnparenchym (Becker, 1998; Schilling et al., 2003; Zheng et al., 2004). Die an den inflammatorischen Prozessen beteiligten Zellen sezernieren eine Vielzahl zytotoxischer Proteine wie Chemokine, Matrixmetalloproteasen und reaktive Sauerstoff-Derivate. Diese Substanzen tragen zu einer weiteren Schädigung der Neurone, der extrazellulären Matrix sowie zu einem Verlust der Bluthirnschrankenintegrität bei (Emsley et al., 2002; Danton et al., 2003).

In Experimenten mit verschiedenen Tier- und Schlaganfallmodellen konnte die zentrale Rolle des Chemokins MCP-1 bei der Entwicklung des postischämischen Schadens bereits nachgewiesen werden. Nach zerebraler Ischämie exprimieren sowohl Neurone als auch Astrozyten MCP-1 (Che et al., 2001). Auch Monozyten, Makrophagen, Mikroglia und vaskuläre Endothelzellen können eine Quelle für MCP-1 sein (Chen et al., 2002; Mahad et al., 2003; Ge et al., 2008).

MCP-1-überexprimierende Mäuse entwickeln größere und MCP-1-defiziente Tiere kleinere Infarkte als die jeweiligen Kontrollgruppen (Hughes et al., 2002;

Chen et al., 2003). Des Weiteren zeigen Mäuse, die für den MCP-1-Rezeptor CCR-2 defizient sind, einen reduzierten postischämischen Makrophagenstrom und kleinere Infarkte (Dimitrijevic et al., 2007). Die molekularen Ursachen hierfür sind jedoch bisher weitestgehend unbekannt.

Ein möglicher Mechanismus, bei dem MCP-1 einen Einfluss auf die Infarktgröße haben, könnte ist die postischämische Regulation der Mikrogliaaktivierung sowie der Chemoattraktion hämatogener Zellen (Kumai et al., 2004; Denker et al., 2007). Da aktivierte residente Mikrogliazellen sowohl morphologisch als auch immunhistochemisch nicht von immigrierten hämatogenen Makrophagen zu differenzieren sind (Kreuzberg et al., 1996), war es bisher nicht möglich den Einstrom und die Aktivierung beider Zellpopulationen in einem Modell MCP-1-defizienter Mäuse differenziert zu quantifizieren.

Mit Hilfe der knochenmarkchimären GFP-transgenen- und MCP-1-defizienten Mäuse bestand zum ersten Mal die Möglichkeit, den Einfluss von MCP-1 auf den Einstrom hämatogener Makrophagen und die Aktivierung residenter Mikroglia differenziert zu untersuchen.

Neben der quantitativen Analyse der Mikrogliaaktivierung und Makrophagenrekrutierung wurde außerdem die postischämische neurologische Erholung, die Migration neutrophiler Granulozyten, T-Zellen und Neuroblasten, ein möglicher differenzieller Verlust der Bluthirnschrankenintegrität, der *Turn-Over* perivaskulärer und meningealer Makrophagen sowie die Expression von an der Inflammation beteiligten Genen in Anhängigkeit von MCP-1 untersucht.

4.1 Neurologische Erholung nach zerebraler Ischämie

Um ein möglichst breites Spektrum der postischämischen neurologischen Erholung zu erfassen, wurde sowohl von den MCP-1^{+/-}- als auch von den MCP-1^{-/-}-Tieren an jedem postoperativen Tag der Neuroscore ermittelt, eine Rotarodtestung durchgeführt und das Gewicht der Tiere bestimmt.

Bei der Ermittlung des Neuroscore zeigten die MCP-1^{-/-}-Tiere über den gesamten Untersuchungszeitraum eine geringere funktionelle Beeinträchtigung. Eine Woche postischämisch wurde für die MCP-1^{+/-}-Tiere ein durchschnittlicher Neuroscore von $3,5 \pm 0,71$ ermittelt. Die MCP-1^{-/-}-Tiere zeigten mit einem Neuroscore von $2,33 \pm 0,57$ eine signifikant ($p < 0,05$) verbesserte Erholung.

Bei den Rotaroduntersuchungen zeigte sich, konform zu den Ergebnissen der Neuroscorebewertung an Tag sechs und sieben eine signifikant ($p < 0,05$) verbesserte sensomotorische Erholung der MCP-1^{-/-}-Gruppe.

Als allgemeiner Indikator für den Gesundheitszustand der Tiere wurde zusätzlich die postischämische Entwicklung des Körpergewichts herangezogen. Hierbei stellte sich heraus, dass die MCP-1^{-/-}-Mäuse zu Beginn der Untersuchung ein geringeres Gewicht hatten als die Tiere der Kontrollgruppen. Im Verlauf der Untersuchung zeigte sich bei den Mäusen beider Gruppen ein Gewichtsverlust, jedoch war dieser bei den MCP-1^{-/-}-Tieren weniger stark ausgeprägt.

Die Ergebnisse aus Neuroscorebewertung, Rotaroduntersuchung und Gewichtsbestimmung weisen darauf hin, dass die Defizienz von MCP-1 unter sensomotorischen Gesichtspunkten und neurologischer Erholung insbesondere zu späteren postischämischen Zeitpunkten einen moderaten Vorteil gegenüber der Kontrollgruppe bringt. Vermutlich sind die geringen Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen in der kurzen Ischämiedauer und der damit verbunden geringen Infarktgröße begründet und würden sich nach entsprechend längerer Ischämiedauer noch deutlicher zeigen.

4.2 Entwicklung des ischämischen Schadens

4.2.1 Infarktverhalten

MCP-1-überexprimierende Mäuse, die einer zweistündigen transienten Okklusion der *Arteria cerebri media* ausgesetzt waren (Chen et al. 2003) zeigten 48 Stunden postoperativ ein Infarktvolumen von $17.32 \pm 15.37 \text{ mm}^3$. Bei der MCP-1^{+/+}-Gruppe betrug das Volumen des infarzierten Areals nach 48 Stunden $8.55 \pm 5.47 \text{ mm}^3$.

In Untersuchungen einer anderen Arbeitsgruppe zeigten MCP-1-defiziente Mäuse nach permanentem Verschluss der mittleren Gehirnarterie ein um 29 % reduziertes Infarktvolumen gegenüber den Wildtypkontrollen (Hughes et al., 2002). Diese Ergebnisse konnten in den Experimenten unserer Arbeitsgruppe weitestgehend bestätigt werden.

Nach 30-minütiger fokaler Ischämie zeigten die MCP-1^{-/-}-Mäuse zwei Tage postischämisch mit einem Infarktvolumen von $7,288 \pm 0,71 \text{ mm}^3$ ein signifikant ($p < 0,05$) geringeres Infarktvolumen als die MCP-1^{+/+}-Gruppe mit $10,58 \pm 2,3 \text{ mm}^3$.

Im weiteren Zeitverlauf konnte innerhalb beider untersuchter Gruppen keine weitere signifikante Entwicklung der Infarktgröße festgestellt werden. Bereits 24 Stunden postischämisch war das Volumen des infarzierten Areals bei sowohl MCP-1^{+/+}- als auch bei den MCP-1^{-/-}-Mäusen voll ausgeprägt.

Somit konnte auch in unserem Modell ein Trend zu einer Reduktion der Infarktgröße bei MCP-1-defizienten Tieren gezeigt werden. Jedoch ist dieser, wahrscheinlich aufgrund der kürzeren Ischämiedauer, weniger ausgeprägt.

4.2.2 Neuronenschädigung

Neben der Toluidinfärbung zur Ermittlung der Infarktgröße wurde zusätzlich eine immunhistochemische Neuronenfärbung zur Verifizierung der korrekt durchgeführten Operation durchgeführt. Sauerstoff- und Glukosemangel während der ischämischen Phase führen zu apoptotischen und nekrotischen Prozessen, die die Morphologie der Neurone innerhalb des infarzierten Areals verändern und zu einem Verlust des Fluoreszenzsignals führen.

Bei der Begutachtung der gefärbten Gefrierschnitte beider Gruppen konnte ein ausgeprägter Untergang von Neuronen innerhalb des ipsilateralen Striatums beobachtet werden. Ein Vergleich des Fluoreszenzsignals zeigte zwischen den MCP-1^{-/-}- und den MCP-1^{+/+}-Tieren jedoch keine morphologischen Unterschiede.

4.2.3 Astrozytose

Die im Gehirn dominierende Population der Gliazellen stellen die Astrozyten dar. Dieser Zelltyp reagiert extrem sensibel auf pathologische Veränderungen innerhalb des Gehirnparenchyms insbesondere nach zerebraler Ischämie (Petito et al., 1990; Chiamulera et al., 1993). Daher wurde als weitere Kontrolle der korrekt durchgeführten Operation eine immunhistochemische Färbung des hochspezifischen Astrozytenmarkers GFAP durchgeführt und je ein Schnitt jedes Tieres mittels Immunfluoreszenzmikroskopie begutachtet.

Sowohl in MCP-1^{-/-}- als auch in MCP-1^{+/+}-Tieren konnte zu allen postischämischen Zeitpunkten eine ausgeprägte Astroglie in der Penumbra beobachtet werden. Bei den Kontrolltieren ohne zerebrale Ischämie zeigte sich nur die basale Expression des GFAP und histologisch keine Aktivierung der Astrozyten.

Bei der vergleichenden Untersuchung zwischen beiden untersuchten Gruppen konnte kein Unterschied in Ausprägung sowie Morphologie des GFAP-Signals erkannt werden.

4.3 Mikrogliaaktivierung und Rekrutierung hämatogener Makrophagen

Sowohl residente Mikrogliazellen als auch hämatogene Makrophagen spielen bei der postischämischen Inflammation und Schadentwicklung eine zentrale Rolle. Bis heute ist jedoch nicht geklärt, welche Aufgabe der jeweiligen Zellpopulation zuteil ist. In verschiedenen Arbeiten werden Mikrogliazellen sowohl neuroprotektive (Stoll et al., 2002; Streit et al., 2002; Hailer, 2008) als auch zyto- und neurotoxische Eigenschaften (Kreutzberg, 1996; Stoll et al., 2002; Hailer 2008); hämatogenen Makrophagen insbesondere zytotoxische Eigenschaften zugeschrieben.

Da es bisher keine differenzierenden Marker für die Unterscheidung der beiden Zellpopulationen gab, war es nicht möglich den Einfluss von MCP-1 auf die Aktivierung residenter Mikroglia und die Rekrutierung hämatogener Makrophagen zu untersuchen.

Durch die Generierung GFP-transgener knochenmarkchimärer MCP-1-defizienter Mäuse bestand zum ersten Mal die Möglichkeit die Effekte des Chemokins MCP-1 auf die postischämischen Reaktionen dieser beiden Zelltypen zu analysieren.

4.3.1 Aktivierung residenter Mikroglia

Nach zerebraler Ischämie reagieren Mikrogliazellen, die residenten Makrophagen des Gehirns, mit einer Veränderung ihrer Morphologie, mit Proliferation und amöboider Zellbewegung in Richtung des infarzierten Areals. Dabei ist MCP-1 ein entscheidender Faktor, der die Proliferierung residenter Mikroglia fördert (Yan et al., 2007; Jiang et al., 2008).

Es konnte bereits gezeigt werden, dass Mikroglia nach 30-minütiger transien-ter fokaler Ischämie bereits nach einem Tag postischämisch proliferiert und in das infarzierte Areal immigriert (Schilling et al., 2003). In den folgenden Tagen nahm die Anzahl aktivierter Mikroglia in diesem Modell zu und zeigte nach zwei und vier Tagen ein quantitatives Maximum.

In unseren Versuchen sollte geklärt werden, ob MCP-1 einen Einfluss auf die Proliferation und Aktivierung residenter Mikroglia nach zerebraler Ischämie hat. Unsere Experimente zeigten, dass residente Mikroglia bereits nach einem Tag auf die zerebrale Ischämie mit einer deutlichen Zunahme der Zellanzahl reagiert. Dabei konnte zu diesem frühen Zeitpunkt zwischen den MCP-1^{-/-}- und den MCP-1^{+/-}-Tieren kein quantitativer Unterschied festgestellt werden. Nach vier Tagen wurde bei den MCP-1^{+/-}-Mäusen die maximale Anzahl aktivierter Mikrogliazellen gezählt. Bei den MCP-1^{-/-}-Tieren lag die Anzahl des fraglichen Zelltyps zu diesem Zeitpunkt signifikant niedriger ($p < 0,01$) und erreichte das Maximum aktiver Mikrogliazellen erst am Tag sieben. Bei den MCP-1^{+/-}-Mäusen war die Anzahl aktiver Mikroglia am Tag sieben bereits wieder rückläufig und lag signifikant ($p < 0,01$) niedriger als in der MCP-1^{-/-}-Gruppe.

Offensichtlich hat das Chemokin MCP-1 in unserem Modell einen geringfügigen Effekt auf die Aktivierung und Proliferation residenter Mikroglia. MCP-1^{-/-}-Mäuse zeigen, im Vergleich zu den MCP-1^{+/-}-Tieren, eine schwach

verminderte Mikroglia proliferation innerhalb der ersten vier Tage postoperativ.

Entgegen der Erwartungen konnte an Tag sieben postoperativ bei den MCP-1^{-/-}-Tieren eine weitere Zunahme der Anzahl aktivierter Mikroglia festgestellt werden. Eine mögliche Erklärung wäre, dass der verminderte Einstrom hämatogener Makrophagen bei den MCP-1^{-/-}-Tieren in einer Kompensation durch vermehrte Mikroglia proliferation resultiert.

Da innerhalb der ersten fünf postoperativen Tage kein Unterschied bei der neurologischen Erholung zwischen MCP-1^{-/-}- und den MCP-1^{+/-}-Tieren nachgewiesen werden konnte und erst nach vier Tagen ein Unterschied der Mikrogliaanzahl auszumachen war, kann davon ausgegangen werden, dass Mikrogliazellen in diesem Modell als Ursache für die zunehmende Schadenentwicklung weitestgehend ausscheiden.

4.3.2 Rekrutierung hämatogener Makrophagen

Nach pathologischen Veränderungen innerhalb des Gehirnparenchyms, insbesondere als Reaktion auf inflammatorische Prozesse, immigrieren hämatogene Makrophagen aus dem Blutgefäßsystem durch die Bluthirnschranke hindurch in das geschädigte Gehirngewebe. Dabei folgen diese Zellen einem Chemokingradienten, der von den an der Entzündung beteiligten Zellen exprimiert wird (Stoll et al., 2002). MCP-1-defiziente Mäuse haben kleinere Infarkte und einen reduzierten Makrophageneinstrom (Hughes et al., 2002).

Mäuse, die nicht in der Lage sind, den für MCP-1 spezifischen Rezeptor CCR-2 zu exprimieren, weisen einen in unterschiedlichen Krankheitsmodellen des murinen ZNS reduzierten Makrophageneinstrom und eine verminderte Krankheitsausprägung auf (Izikson et al., 2000; Gaupp et al., 2003). Bei der Rekrutierung hämatogener Makrophagen nach einem Schlaganfall wird ins-

besondere MCP-1 eine zentrale Rolle zugeschrieben und zwei mögliche molekulare Mechanismen diskutiert.

Nach einem ischämischen Schlaganfall konnten insbesondere Astrozyten und Neurone als Quelle von MCP-1 identifiziert werden (Wang et al., 1995; Yamagami et al., 1999; Che et al., 2001). MCP-1 kann im gesunden Gehirn nicht nachgewiesen werden, wird jedoch nach einem Schlaganfall bereits nach wenigen Stunden in dem betroffenen Gewebe exprimiert und erreicht ein Maximum nach zwei Tagen (Wang et al., 1995; Yang et al., 2007). Es wird diskutiert, ob die Expression von MCP-1 in Endothelzellen der Blutgefäße dazu veranlasst, vermehrt Adhäsionsproteine (u.a. V-CAM-1) zu exprimieren und auf diesem Wege hämatogene Zellen rekrutiert. Diese folgen nach dem Durchtritt durch die Bluthirnschranke dem Chemokingradienten in das infarzierte Areal (del Pozo et al. 1995; Yamamagi et al., 1999).

Ein anderer Mechanismus der postischämischen Makrophagenrekrutierung wird von Ge et al. (2008) vorgeschlagen. So wird postuliert, dass abluminal von Astrozyten und Neuronen exprimiertes MCP-1 über einen Caveolin abhängigen transzellulären Transport durch die Endothelzellen hindurch auf der luminalen Seite membranständig präsentiert wird und in Verbindung mit Adhäsionsproteinen hämatogene Zellen in das geschädigte Parenchym rekrutiert.

Die Forschungen zur Aufklärung der genauen molekularbiologischen Zusammenhänge wurden durch das Fehlen differenzierender Marker von residenter Mikroglia und immigrierten Makrophagen erschwert.

Mit Hilfe der GFP-transgenen knochenmarkchimären Mäuse konnte, im Vergleich zu der Aktivierung residenter Mikroglia, die verzögerte Immigration hämatogener Makrophagen bereits dargestellt werden (Schilling et al., 2003). In der hier vorgestellten Arbeit zeigte sich erst zwei Tage postoperativ eine Zunahme der Makrophageninfiltration in das von Ischämie betroffene Stria-

tum. Das quantitative Maximum hämatogener Makrophagen wurde bei MCP-1^{+/+}-Tieren an Tag vier und Tag sieben gezählt. Auch bei den MCP-1^{-/-}-Tieren waren nach vier Tagen die maximale Anzahl hämatogener Makrophagen in das infarzierte Areal immigriert. Jedoch lag die Anzahl dieser Zellen an Tag zwei ($p < 0,01$), Tag vier ($p < 0,001$) und Tag sieben ($p < 0,001$) signifikant niedriger als in der MCP-1^{+/+}-Gruppe.

Damit konnte gezeigt werden, dass MCP-1 eine zentrale Rolle bei der Chemoattraktion hämatogener Makrophagen hat. Da jedoch bereits einen Tag postischämisch die Infarktgröße in beiden Gruppen nahezu voll ausgebildet war und die maximale Anzahl hämatogener Makrophagen erst nach vier Tagen ermittelt wurde, kann der verringerten Immigration dieser Zellpopulation als Ursache für die Vermittlung der protektiven Effekte der MCP-1-Defizienz nur eine indirekt beteiligende Rolle zugesprochen werden.

4.4 Rekrutierung neutrophiler Granulozyten

Neutrophile Granulozyten gehören zu der Population hämatogener Zellen, die zu sehr frühen postischämischen Zeitpunkten aus dem Blutgefäßsystem durch die Bluthirnschranke hindurch ins das infarzierte Areal immigrieren. Bereits 24 Stunden postoperativ konnten neutrophile Granulozyten im ipsilateralen Gehirnparenchym GFP-transgener knochenmarkchimärer Wildtypmäuse nachgewiesen werden (Schilling et al., 2003).

Die postischämische Expression insbesondere der Chemokine CINC-1 (Cytokine-Induced Neutrophil Chemoattractant-, auch Interleukin 8) und G-CSF (Granulocyte-Colony Stimulating Factor) durch geschädigte Neurone rekrutiert neutrophile Granulozyten in das infarzierte Areal (Yamasaki et al., 1995; Schneider et al., 2005). Es wird diskutiert, dass die postischämische Anhäufung neutrophiler Granulozyten in Kapillargefäßen des Gehirns zu Unterbre-

chungen der Mikrozirkulation führen könnte und damit in einer weiteren Vergrößerung des Schadens resultiert (Stoll et al., 1998).

Zusätzlich könnte die Expression zytotoxischer Proteine durch immigrierte neutrophile Granulozyten zu einer verzögerten Schädigung des Gehirnparenchyms führen. In verschiedenen Krankheitsmodellen konnte gezeigt werden, dass eine Inhibition der Neutrophilenmigration zu einer Verbesserung des Krankheitsbildes führt (Mukaida et al., 1998; Hisao et al. 2007). In einer 173 Schlaganfallpatienten umfassenden Studie wurde nachgewiesen, dass die Anzahl der peripheren hämatogenen Zellen, insbesondere der neutrophilen Granulozyten in direktem Zusammenhang mit der resultierenden Größe des infarzierten Gehirngewebes steht (Buck et al., 2008). Patienten, deren Blutproben eine höhere Anzahl fraglicher Zellen aufwiesen entwickelten ein größeres Infarkt volumen.

In bisherigen Versuchen mit MCP-1-defizienten Mäusen konnte kein Einfluss des Chemokins auf die postoperative Rekrutierung neutrophiler Granulozyten nachgewiesen werden (Hughes et al., 2002). Jedoch beschränkte sich diese Untersuchungen auf den Zeitpunkt von 24 Stunden postischämisch.

In unseren Versuchsreihen zeigte sich zu späteren postoperativen Zeitpunkten bei den MCP-1^{-/-} und den MCP-1^{+/+}-Tieren ein signifikanter Unterschied der Anzahl immigrierter neutrophiler Granulozyten. Zwei Tage ($p < 0,01$), vier Tage ($p < 0,001$) und sieben Tage ($p < 0,001$) postischämisch konnte bei den MCP-1^{-/-}-Tieren eine erheblich geringere Anzahl der fraglichen Zellen im ipsilateralen Striatum nachgewiesen werden.

Da neutrophile Granulozyten nicht den für MCP-1 spezifischen Rezeptor CCR-2 exprimieren, müssen sekundäre Mechanismen für deren attenuierte Immigration verantwortlich sein. In einem inflammatorischen Krankheitsmodell mit juvenilen Ratten wurde nachgewiesen, dass eine erhöhte Konzentration von Interleukin-1 β zu einer vermehrten Expression des für neutrophile

Granulozyten chemoattraktiven Proteins CINC-1 führt (Campbell et al., 2002). Übereinstimmend mit dieser Beobachtung konnten wir in unseren Experimenten in den MCP-1-defizienten Mäusen 12 Stunden postischämisch im zerebralen Cortex eine um den Faktor 1,342 und im infarzierten Striatum eine um dem Faktor 2,463 reduzierte Expression von Interleukin-1 β nachweisen.

Einen noch deutlicheren Effekt konnte bei der Expressionsanalyse des G-CSF nachgewiesen werden. So war G-CSF im zerebralen Cortex der MCP-1-defizienten Mäuse im Vergleich zu den MCP-1^{+/+}-Tieren um den Faktor 3,914 und im infarzierten Areal um den Faktor 1,264 geringer exprimiert. Daher könnte die Defizienz von MCP-1 auf diesem Wege einen indirekten Einfluss auf die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten haben.

Diese Zellen gelten neben Mikroglia als zentrale Quelle für die postischämisch exprimierte Matrix-Metalloprotease-9 (MMP-9) im infarzierten Gewebe (Justicia et al., 2003). Die Funktionen von MMP-9 nach einem Schlaganfall sind bis heute nicht genau aufgeklärt. So trägt MMP-9 zu der Neustrukturierung der von Ischämie geschädigten extrazellulären Matrix bei, kann aber auch durch Proteolyse Proteine der Bluthirnschranke schädigen und damit einen nachteiligen Effekt haben (Kelly et al., 2006).

Die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen unterstützen die These, dass MMP-9 insbesondere von immigrierten Zellen exprimiert wird. Wildtypmäuse, die MMP-9-defizientes Knochenmark erhalten haben, zeigen eine geringere Krankheitsausprägung (Gidday et al., 2005); MMP-9-defiziente Mäuse ein kleineres Infarktvolumen als die Wildtypkontrollen (Asahi et al., 2000).

Unsere Expressionsstudien haben gezeigt, dass 12 Stunden postischämisch sowohl in den MCP-1^{-/-} als auch den MCP-1^{+/+}-Tieren MMP-9 in der ipsilateralen Hemisphäre nicht herauf reguliert ist. Sollten neutrophile Granulozyten eine zentrale Quelle für exogenes MMP-9 sein, könnte der attenuierte Einstrom dieser Zellpopulation in MCP-1^{-/-}-Mäusen für eine verzögerte oder inhibierte Expression von Matrix-Metalloproteasen sein, was in einer geringeren

Schädigung der Gewebematrix und der Bluthirnschrankenproteine resultieren könnte.

4.5 T-Zellen-Immigration

Hämatogenen Lymphozyten wird neben den Leukozyten und residenten Mikrogliazellen eine zentrale Rolle bei der Entwicklung der postischämischen Schädigung zuteil. T-Zellen immigrieren zu späteren Zeitpunkten als neutrophile Granulozyten in das infarzierte Areal, kommunizieren mit MHC-Klasse-I-präsentierenden Zellen, wie aktivierten Mikroglia und sezernieren pro- und antiinflammatorische Proteine (Neumann et al., 1997; Stevens et al., 2002; Li et al., 2005).

Dabei wird den Lymphozyten vor allem eine schädigende Rolle bei der Entwicklung des entzündlichen Gewebeschadens zugesprochen. So entwickeln Mäuse, bei denen die T-Zell-Migration inhibiert ist, nach zerebraler Ischämie kleinere Infarkte (Becker et al., 2001). In einer Studie mit Schlaganfallpatienten konnte außerdem nachgewiesen werden, dass die Anzahl peripherer T-Zellen in direktem Verhältnis zu der Verlaufsprognose steht (Nadareishvili ZG et al., 2004).

Bei den molekularen Mechanismen der T-Zell-Migration werden verschiedene Möglichkeiten diskutiert. So konnte der für das Chemokin MCP-1 spezifische Rezeptor CCR-2 auf T-Zellen bereits nachgewiesen werden (Brühl et al., 2004). Dies lässt auf einen direkten Einfluss von MCP-1 auf die T-Zell-Migration durch Chemoattraktion schließen. In einem Modell experimenteller multipler Sklerose zeigten MCP-1^{-/-}-Mäuse einen reduzierten T-Zell-Einstrom in das geschädigte Gewebe und ein milderer Krankheitsbild (Huang et al., 2001). Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass T-Zellen durch die Stimulation

mit TNF-1 (Tumor-Nekrose-Faktor 1) und IL-6 (Interleukin 6) aktiviert werden (Boros et al., 2006).

Die Analyse der postischämischen T-Zell-Reaktion in GFP-transgenen MCP-1^{-/-} und MCP-1^{+/+}-Mäusen zeigte bei beiden Gruppen eine Aktivierung dieses Zelltyps. Bereits an Tag eins und zwei kam es zu einem geringen Einstrom von T-Zellen in das Infarktareal. Das quantitative Maximum konnte bei den MCP-1^{+/+}-Tieren an Tag vier festgestellt werden. Bei den MCP-1^{-/-}-Mäusen wurde vier Tage postoperativ eine signifikant ($p < 0,001$) geringere T-Zell-Anzahl gezählt. Offenbar führt der Verlust von MCP-1 zu einer deutlichen Abschwächung der postischämischen T-Zell-Aktivierung. Jedoch zeigte sich in beiden Gruppen eine, im Verhältnis zu den anderen immunkompetenten Zellen, geringe Absolutzahl CD-3-positiver T-Zellen.

In unserem Ischämiemodell konnte bei den MCP-1^{-/-}-Mäusen eine im Vergleich zu den MCP-1^{+/+}-Tieren geringere Expression von TNF-1 und IL-6 im Cortex und ischämischen Striatum nachgewiesen werden. Jedoch ist der Zeitpunkt von 12 Stunden postischämisch zu früh, um die abgeschwächte T-Zell-Immigration in MCP-1^{-/-}-Mäusen an Tag vier postischämisch zu erklären. T-Zellen exprimieren CCR-2 und damit könnte das Fehlen von MCP-1 zu einer direkten Reduktion der T-Zell-Aktivierung und Migration zu späten postoperativen Zeitpunkten führen.

4.6 Neuroblastenmigration

Im gesunden Gehirn bewegen sich Neuroblasten entlang dem rostralen Migrationsstrom (RMS, *rostral migratory stream*) in Richtung des Bulbus olfactorius und differenzieren dort zu periglomerulären Neuronen (Doetsch et al., 1997; García-Verdugo et al., 1998). Als Reaktion auf eine zerebrale Ischämie

proliferieren Neuroblasten innerhalb der Subventrikularzone (SVZ), immigrieren in das infarzierte Striatum und differenzieren dort zu striatalen Neuronen (Arvidsson et al., 2002; Jin et al., 2003). Es konnte nachgewiesen werden, dass ein Schlaganfall in einer Neurogenese innerhalb der SVZ resultiert und neuronale Vorläuferzellen (Neuroblasten) in das infarzierte Areal geleitet werden, um dort untergegangene Neurone zu ersetzen (Zangh et al., 2004; Yamashita et al., 2006).

Als einer der zentralen Faktoren, die Neuroblasten dazu veranlassen, in das infarzierte Areal zu immigrieren, konnte MCP-1 identifiziert werden. In MCP-1- und CCR-2-defizienten Mäusen wurde eine, im Vergleich zu Wildtyp-tieren, signifikant verringerte Immigration von Neuroblasten in das infarzierte Areal drei Tage nach 60-minütiger transientser fokaler Ischämie nachgewiesen (Yan et al., 2007).

Die Analysen unsere Arbeitsgruppe konnten nach 30-minütigem Verschluss der mittleren Gehirnarterie, im Kontrast zu den Ergebnissen von Yan et al. (2007), nur geringe Unterschiede in der Anzahl immigrierter Neuroblasten nachweisen. Zwei Tage postoperativ wurde bei den MCP-1^{-/-}-Mäusen innerhalb des *Corpus Callosums* eine geringere Anzahl Neuroblasten als bei der MCP-1^{+/-}-Gruppe gezählt. Hingegen zeigte sich im ipsilateralen Striatum vier Tage postischämisch bei den MCP-1^{-/-}-Tieren eine geringfügig erhöhte Anzahl DCX-positiver Zellen.

Eine mögliche Erklärung für die differenten Ergebnisse ist die jeweils gewählte Ischämiedauer, die in unseren Versuchen mit 30 Minuten zu einem milderen Verlauf der Ischämie führt. Eine 60-minütige Okklusion der mittleren Gehirnarterie resultiert insbesondere in einer Zunahme nekrotischer Prozesse und damit in einer differenten Expression an der Inflammation beteiligten Proteine. Yan und Mitarbeiter konnten in MCP-1- oder CCR-2-defizienten Tieren einen Rückgang der Neuroblastenmigration nachweisen, jedoch kam es zu keiner vollständigen Blockade. Daher muss es weitere synergistische Faktoren

geben, die zu der Chemoattraktion neuronaler Stammzellen in das Infarktareal führen und in unseren Versuchen das Fehlen von MCP-1 kompensieren.

So kommen andere Studien zu dem Ergebnis, dass neben MCP-1 weitere Chemokine wie SDF-1 (*Stromal cell-derived factor-1*) sowie Matrixmetalloproteasen eine Rolle bei der Ischämie-induzierten Neuroblastenmigration spielen (Imitola et al., 2004; Lee et al., 2006; Wang et al., 2006, Ohab et al., 2006). Daher könnte die Kombination aus kürzerer Ischämiezeit und dem daraus resultierendem differenten Expressionsprofil inflammatorischer Faktoren eine Erklärung für diese Differenz der Ergebnisse sein.

4.6.1 Herkunft postischämisch immigrierter Neuroblasten

Die Subgranulär- und die Subventrikularzonen konnten bereits als Quelle neuronaler Stammzellen im Nagetier, Primaten und Mensch nachgewiesen werden (Suzuki et al., 2003; Jin et al., 2007). Als Reaktion auf eine Vielzahl pathologischer Veränderungen proliferieren diese Zellen und immigrieren in das entzündete Gewebe. Mit Hilfe der GFP-transgenen knochenmarkchimären Tiere sollte eine mögliche hämatogene Herkunft neuronaler Vorläuferzellen im infarzierten Striatum sowie der Subventrikularzone dargestellt werden. Bei den Analysen konnten sowohl in den MCP-1^{-/-} als auch in den MCP-1^{+/-} Tieren keine DCX- und GFP-positiven Zellen ausgemacht werden. Damit ist eine hämatogene Herkunft neuronaler Vorläuferzellen weitestgehend auszuschließen.

4.7 *Turn-Over* perivaskulärer und meningealer Makrophagen

Perivaskuläre und meningeale Makrophagen finden sich in den Virchow-Robinschen Räumen der Meningen und Blutgefäße des Gehirns und bilden zusammen mit Gefäßendothelzellen und Astrozytenfortsätzen die Bluthirnschranke aus (Hickey et al., 1988; Streit et al., 1993; Williams et al., 2001). Diese Zellpopulation hat ihren Ursprung im blutbildenden Knochenmark und unterliegt einem regen Austausch durch hämatogene Monozyten und Makrophagen.

Meningeale und perivaskuläre Makrophagen regulieren die Aktivität der gefäßbildenden Endothelzellen, tragen zur postischämischen Neoangiogenese bei, exprimieren inflammatorische Faktoren als Reaktion auf pathologische Veränderungen innerhalb des Gehirns und steuern den mikropillären Blutfluss durch Regulierung des Gefäßdurchmessers (Bandopadhyay et al., 2001; Ramsauer et al., 2002; Pepiatt et al., 2006; Piquer-Gil et al., 2008).

Da sowohl hämatogene Monozyten als auch Makrophagen den für das Chemokin MCP-1 spezifischen Rezeptor CCR-2 exprimieren, sollte geklärt werden, ob der *Turn-Over* dieser Zellpopulation durch MCP-1 reguliert wird. Hierbei stellte sich heraus, dass das Fehlen von MCP-1 keinen signifikanten Einfluss auf den Austausch perivaskulärer und meningealer Zellen hat. Sowohl in MCP-1^{-/-} als auch MCP-1^{+/+}-Tieren waren drei Monate nach durchgeführter Knochenmarktransplantation ca. 50 % der perivaskulären und meningealen Makrophagen GFP-positiv und somit erneuert. Experimente unserer Arbeitsgruppe mit knochenmarkchimären CCR-2-defizienten Mäusen zeigten ebenfalls im Vergleich zu der CCR-2^{+/-}-Gruppe nach drei Monaten keinen Unterschied des *Turn-Overs*. Interessanterweise konnten erste Versuche mit MCP-1^{-/-} / CCR-2^{-/-}-doppelt-defizienten Chimären in unseren Laboren eine fast vollständige Blockade des Austausches innerhalb von drei Monaten zeigen. Offensichtlich kann das Fehlen des Liganden oder des Rezeptors innerhalb

des promiskuitiven Chemokinrezeptorsystems kompensiert werden. Sobald jedoch sowohl MCP-1 als auch sein Hauptrezeptor fehlen ist die Kompensation nicht mehr möglich.

Da sowohl bei CCR-2-defizienten und MCP-1-defizienten Mäusen keine Veränderung des *Turn-Overs* nachgewiesen wurde, kann somit eine kompensatorische Gegenregulation durch mögliche andere MCP-1-spezifische Rezeptoren oder CCR-2-spezifische Chemokine weitestgehend ausgeschlossen werden.

4.8 Molekularbiologischer Analyse der postischämischen Inflammation

GFP-transgene knochenmarkchimäre MCP-1^{-/-}-Mäuse entwickeln nach 30-minütiger fokaler zerebraler Ischämie im Vergleich zu MCP-1^{+/-}-Tieren kleinere Infarkte, haben eine bessere neurologische Erholung und zeigen einen reduzierten Einstrom hämatogener Zellen in das infarzierte Areal.

Da das Infarktvolume in beiden untersuchten Gruppen bereits nach 24 Stunden nahezu voll ausgeprägt war, wurden mögliche molekularbiologische Ursachen mittels Genexpressionsstudien zu einem frühen postischämischen Zeitpunkt von 12 Stunden analysiert.

4.8.1 Interleukin-1 β (IL-1 β)

In verschiedenen Tiermodellen konnte nachgewiesen werden, dass Interleukin-1 β , ein zu den Peptidhormonen gehörendes Zytokin, bereits eine Stunde nach einem Schlaganfall von Mikrogliazellen exprimiert wird. Zu späteren postischämischen Zeitpunkten wurden außerdem Astrozyten und hämatogene Monozyten als IL-1 β -Quelle identifiziert (Liu et al., 1993; Hillhouse et al., 1998; Pearson et al., 1999). Verschiedene experimentelle Schlaganfallstudien

konnten zeigen, dass postischämische Applikation von Interleukin-1 β den Gewebeschaden vergrößert, dessen Blockade das Infarktvolume jedoch verringert (Loddick et al., 1996; Boutin et al., 2001; Pringel et al., 2001). Da bereits nachgewiesen wurde, dass die Expression von Interleukin-1 β unter anderem durch MCP-1 gesteuert wird (Jiang et al., 1992), sollte in unseren Versuchen untersucht werden, ob die Defizienz von MCP-1 einen Einfluss auf die postoperative Expression von IL-1 β in unserem Tiermodell hat.

Bei den MCP-1^{+/-}-Tieren konnte im infarzierten Areal ein Anstieg der IL-1 β -Expression um den Faktor 3,781 nachgewiesen werden. Auf der kontralateralen Hemisphäre wurde, im Vergleich zu den MCP-1^{+/-}-Mäusen ohne Infarkt, hingegen eine 1,926-fach niedrigere Konzentration der IL-1 β -mRNA gefunden.

Die MCP-1^{-/-}-Mäuse zeigten in allen drei untersuchten Arealen eine im Vergleich zu den MCP-1^{+/-}-Tieren attenuierte Expression von Interleukin-1 β . Insbesondere im infarzierten Areal konnte eine um den Faktor 2,463 verringerte IL-1 β -mRNA-Konzentration gefunden werden.

Da aktivierte Mikroglia als Quelle für Interleukin-1 β innerhalb der ersten zwei Tage postischämisch identifiziert worden ist und MCP-1 eine zentrale Rolle bei der Regulation von Interleukin-1 β zugeschrieben wird, könnte in der MCP-1-Defizienz die Ursache für die verminderte Expression dieses Gens durch Mikrogliazellen liegen. Die immunhistochemischen Analysen zeigten, dass aktivierte Mikroglia bereits nach einem Tag innerhalb des infarzierten Areals zu finden ist. Da sich das Expressionsprofil von Interleukin-1 β mit dem Fluoreszenzsignal aktivierter Mikroglia jeweils auf das ipsilaterale Striatum beschränkt, wäre eine verminderte IL-1 β -Expression durch Mikrogliazellen eine mögliche Ursache für die geringere Infarktgröße in der MCP-1^{-/-}-Gruppe.

4.8.2 Tumor Nekrose Faktor-1 (TNF-1)

Dem zu den proinflammatorischen Zytokinen gehörendem Tumor-Nekrose-Faktor-1 werden bei der postischämischen Inflammation insbesondere neurotoxische Eigenschaften zugesprochen (Lambertsen et al., 2007). Astrozyten, Neurone, Mikrogliazellen und hämatogene Makrophagen sezernieren TNF-1 nach fokaler Ischämie und tragen möglicherweise auf diesem Wege zu einer weiteren Schädigung des Gehirngewebes bei (Yang et al., 1999; Gregersen et al., 2000; Lambertsen et al., 2005). Daher sollte durch die Analyse der frühen postoperativen Expression von TNF-1 ermittelt werden, ob MCP-1 einen regulatorischen Einfluss auf die TNF-1-Expression durch Mikrogliazellen und damit auf die Schadenentwicklung des infarzierten Gewebes hat. Immigrierte hämatogene Makrophagen konnten in dieser Studie als TNF-1-Quelle aufgrund des früh gewählten Zeitpunkts weitestgehend ausgeschlossen werden.

Die Expressionsanalyse zeigte sowohl bei den MCP-1^{+/+}- als auch den MCP-1^{-/-}-Mäusen eine massive Hochregulation des TNF-1-Gens. Bei den MCP-1^{-/-}-Tieren wurde postischämisch im ipsilateralen Cortex eine 5,911-fache; im infarzierten Areal eine 7,957-fache höhere Expression als in den MCP-1^{-/-}-Tieren ohne Ischämie ermittelt. Die MCP-1^{+/+}-Tiere zeigten im ipsilateralen Cortex eine 7,016-fache; im infarzierten Areal eine 8,5-fache erhöhte Expression von TNF-1 im Vergleich zu den MCP-1^{+/+}-Tieren ohne Ischämie. Somit konnte keine wesentliche differentielle Expression von TNF-1 zwischen MCP-1^{-/-}- und MCP-1^{+/+}-Tieren festgestellt und MCP-1 als Regulator für dieses Gen 12 Stunden postoperativ weitestgehend ausgeschlossen werden.

4.8.3 Interleukin-6 (IL-6)

In einem experimentellen Schlaganfallmodell mit Ratten konnte nachgewiesen werden, dass das Zytokin Interleukin-6 bereits nach wenigen Stunden insbesondere innerhalb des ischämischen Areals und der Penumbra von aktivierten Mikroglia, Astrozyten und Neuronen exprimiert wird (Suzuki et al., 1999; Van Wagoner et al., 1999). Dabei wird Interleukin-6 vor allem die Rolle eines die Entzündungsreaktion modulierenden Proteins zugesprochen, indem es die Expression weiterer inflammatorischer Proteine reguliert (Xing et al., 1998).

Im Gegensatz zu Interleukin-1 β und Tumor-Nekrose-Faktor-1 wird der Expression von Interleukin-6 sowohl neuroprotektive als auch neurotoxische Wirkung zugeschrieben (Van Wagoner et al., 1999; Suzuki et al., 2000). So führt intraventrikuläre Injektion rekombinanten IL-6 zu einer Reduzierung des Infarkt Volumens in einem an Ratten durchgeführten Schlaganfallmodell (Loddick et al., 1998). In Mäusen, die das Zytokin IL-6 unter Kontrolle des GFAP-Promotors überexprimierten, entwickelten sich jedoch verschiedene Krankheitsbilder wie Kleinwüchsigkeit, Tremor und Ataxie. Außerdem kam es in diesem Tiermodell zu einer Astrogliose und Neurodegeneration (Campbell et al., 1993).

Verschiedene Studien zeigten bereits einen Einfluss von Interleukin-1 β und Tumor-Nekrose-Faktor-1 auf die Regulation des Interleukin-6 (Sawada et al., 1992; Suzuki et al., 1999). Da bisher noch keine Untersuchungen über eine mögliche Regulation von Interleukin-6 durch MCP-1 nach einem Schlaganfall durchgeführt wurden, wurde in unseren Versuchen eine mögliche differente postischämische Expression von IL-6 in MCP-1^{-/-} und MCP-1^{+/+}-Tieren analysiert. Bei der MCP-1^{+/+}-Gruppe konnte im ipsilateralen Cortex eine IL-6-Zunahme um den Faktor 4,458 ermittelt werden. Im infarzierten Areal nahm die Konzentration der IL-6-mRNA um den Faktor 3,21 zu. Damit konnten die Ergebnisse von Suzuki und Mitarbeitern, die eine verstärkte Zunahme der

IL-6-Expression insbesondere in der Peri-Infarktzone feststellten, bestätigt werden.

Die MCP-1^{-/-}-Tiere zeigten im Gegensatz zu der MCP-1^{+/-}-Gruppe keine postoperative Veränderung der IL-6-Expression sowohl im zerebralen Cortex als auch im infarzierten Areal.

Offensichtlich führt das Fehlen des MCP-1-Signals zu einer nahezu vollständigen Blockade der IL-6-Produktion. Bei den MCP-1^{-/-}-Mäusen wurde sowohl für Interleukin-1 β als auch Tumor-Nekrose-Faktor-1 eine verringerte postischämische mRNA-Konzentration festgestellt. Da diese beiden Proteine bereits als Regulatoren für die IL-6-Produktion identifiziert wurden, könnte eine niedrigere IL-1 β - und TNF-1-Konzentration zu einer postoperativen IL-6-Suppression führen.

Überraschenderweise wurde die Expression von IL-6 im kontralateralen Striatum 12 Stunden postoperativ sowohl bei den MCP-1^{-/-} (4,685-fach) als auch bei den MCP-1^{+/-}-Tieren (4,123-fach) herunter reguliert. Dieses Ergebnis deutet zum einen darauf hin, dass es zu einer postischämischen Kommunikation zwischen ipsilateraler- und kontralateraler Hemisphäre kommt, zum anderen, dass es weitere Signale geben muss, die die Expression von Interleukin-6 steuern. So wurde IL-1 β in beiden untersuchten Gruppen postoperativ um den Faktor 2 herunter reguliert, TNF-1 jedoch in der MCP-1^{+/-}- um den Faktor 3,257 und in der MCP-1^{-/-}-Gruppe um den Faktor 2,133 herauf reguliert, was gegen eine direkte Regulation von TNF-1 auf die IL-6-Expression spricht.

4.8.4 Granulozyten-Kolonie Stimulierender Faktor (G-CSF)

Der Granulozyten-Kolonie Stimulierender Faktor (G-CSF) wurde ursprünglich als hämatopoetischer Wachstumsfaktor der myeloiden Zelllinie identifiziert (Welte et al., 1985). Studien zahlreicher Arbeitsgruppen haben inzwischen eine Vielzahl weiterer Funktionen von G-CSF unter anderem im zentralen Nervensystem nachweisen können. So wird G-CSF nach einem Schlaganfall insbesondere innerhalb der Penumbra von Neuronen exprimiert (Schneider et al., 2005).

In verschiedenen experimentellen Schlaganfallmodellen konnte dargestellt werden, dass die Applikation von G-CSF zu einer Verkleinerung des Infarktolumens und einer verbesserten neurologischen Erholung führt (Schäbitz et al., 2003; Six et al., 2003; Gibson et al., 2005; Lan et al., 2008). Als Ursache wird hierfür vor allem eine anti-apoptotische Wirkung sowie eine Inhibition der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase durch G-CSF diskutiert (Komine-Kobayashi et al., 2006). Neben der inflammationsregulierenden Funktion hat G-CSF außerdem eine zentrale Rolle bei der Differenzierung neuronaler Vorläuferzellen der SVZ in adulte Neurone und damit einen direkten Einfluss auf die Regeneration des infarzierten Gewebes (Schneider et al., 2005).

Eine mögliche G-CSF-Regulation durch MCP-1 sollte durch eine vergleichende Expressionsuntersuchung des G-CSF-Transkripts in MCP-1^{-/-} und MCP-1^{+/-}-Tieren 12 Stunden postischämisch aufgeklärt werden. Hierbei zeigte sich, dass G-CSF im Gehirn der MCP-1^{+/-}-Tiere sowohl ipsi- als auch kontralateral herauf reguliert wurde. Innerhalb des ipsilateralen Cortex konnte eine Zunahme der G-CSF-Expression um den Faktor 11,463 ermittelt werden; im infarzierten Areal eine Zunahme um das 8,5-fache; im kontralateralen Striatum eine 6,31-fach erhöhte Expression.

Bei den MCP-1^{-/-}-Tieren zeigte sich ein gegenüber den MCP-1^{+/-}-Tieren verändertes Profil der G-CSF-Expression. Hier wurde die höchste G-CSF-mRNA-

Konzentration innerhalb des infarzierten Striatums gefunden. Die Konzentration des G-CSF-Transkripts innerhalb des ipsilateralen Cortex war gegenüber den MCP-1^{+/-}-Tieren um den Faktor 3,914 geringer herauf reguliert. Innerhalb des ipsilateralen- und kontralateralen Striatums konnte eine nur geringfügig differente Transkription von G-CSF im Vergleich zu der MCP-1^{+/-}-Gruppe nachgewiesen werden.

In-vitro-Studien haben gezeigt, dass die Produktion von G-CSF durch TNF-1 und IL-1 β induziert werden kann (Koeffler et al., 1987; Kaushansky et al., 1988). Da bei den MCP-1^{-/-}-Mäusen neben TNF-1 insbesondere IL-1 β im Vergleich zu den MCP-1^{+/-}-Tieren herunter reguliert ist, könnte dies eine Erklärung für die attenuierte Expression von G-CSF sein.

Da immigrierte hämatogene Zellen als zusätzliche Quelle für pro- und anti-inflammatorische Proteine gelten, wurde ein früher postischämischer Zeitpunkt von 12 Stunden gewählt, um eine Verfälschung der Expressionsuntersuchungen durch einen möglichen differenten Einstrom hämatogener Zellen ausschließen zu können. Aufgrund dessen können neutrophile Granulozyten und hämatogene Makrophagen als Quelle für G-CSF weitestgehend ausgeschlossen werden. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass MCP-1 einen indirekten Einfluss auf die frühe postischämische Expression von G-CSF hat.

4.8.5 Peroxisom-Proliferator-Aktivierter-Rezeptor- γ (PPAR- γ)

PPAR- γ ist ein Glukose- und Fettmetabolismus regulierender nukleärer Hormonrezeptor (Schoonjans et al., 1996; Vamecq et al., 1999). In zahlreichen Studien konnte nachgewiesen werden, dass die Applikation von PPAR- γ -Agonisten (u.a. Pioglitazone und Rosiglitazone) neuroprotektive Effekte nach

einen Schlaganfall durch allgemeine Suppression der Inflammation hat (Sundararajan et al., 2005; Zhao et al., 2005; Tureyen et al., 2007). So führt die Aktivierung von PPAR- γ in einem murinen Modell einer Rückenmarkverletzung zu einem verringerten Absterben von Neuronen, einer reduzierten Aktivierung von Astrozyten und Mikroglia sowie zu einer verminderten Expression inflammatorischer Zytokine wie MCP-1, IL-1 β und IL-6 (Park et al., 2006). *In vitro* Untersuchungen mit murinen Mikrogliazellen und Astrozyten zeigten ebenfalls, dass eine Aktivierung von PPAR- γ zu einer Inhibition der IL-1 β , TNF-1, MCP-1-Expression sowie einer Inhibition der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase führt (Bernado et al., 2000; Storer et al., 2005).

In unseren Expressionsuntersuchungen konnte bestätigt werden, dass sowohl in den MCP-1^{-/-}- und MCP-1^{+/-}-Tieren PPAR- γ 12 Stunden postoperativ herunter reguliert wird. Bei den MCP-1^{+/-}-Mäusen wurde im ipsilateralen Cortex eine um den Faktor 3,78; im infarzierten Areal um den Faktor 3,858 niedrigere Expression im Vergleich zu MCP-1^{+/-}-Tieren ohne Ischämie ermittelt. Auf der kontralateralen Hemisphäre wurde eine um den Faktor 6,007 geringere Konzentration der im ipsilateralen PPAR- γ -mRNA gemessen. Damit kann ausgeschlossen werden, dass das niedrigere Expressionsniveau lediglich durch einen möglichen Gewebeuntergang resultiert. Bei den MCP-1^{-/-}-Mäusen kam es zu einer geringeren Attenuierung der PPAR- γ -Expression. So war PPAR- γ im ipsilateralen Cortex um das 1,252-fache, im infarzierten Areal um das 0,532-fache und im kontralateralen Striatum um das 0,945-fach höher reguliert als bei den MCP-1^{+/-}-Tieren. Das Fehlen von MCP-1 führt offensichtlich zu einer geringeren postischämischen Repression der PPAR- γ -Transkription. Da die ermittelten Differenzen der PPAR- γ -Expression zwischen MCP-1^{-/-}- und MCP-1^{+/-}-Tieren jedoch sehr gering sind, kann dies nicht die alleinige Ursache für die verzögerte Mikrogliaaktivierung sowie die reduzierte Expression von IL-1 β und TNF-1 sein.

4.8.6 Matrix-Metalloprotease 9 (MMP-9)

Die Matrix-Metalloproteasen gehören zu der Proteinklasse der Endopeptidasen mit einem weiten Aufgabenspektrum. So spielen diese Proteine eine Rolle bei der Wundheilung, der Krebs- und Arterioskleroseentwicklung sowie der Homöostaseerhaltung des Gehirns durch Modellierung der extrazellulären Matrix. Matrix-Metalloproteasen sind außerdem an der Entwicklung des ischämischen Schadens nach einem Schlaganfall beteiligt (Gasche et al., 2001; Yong et al., 2001; Rosenberg 2002).

Durch Proteolyse von Bluthirnschrankenproteinen und Abbau der Basallamina können Matrix-Metalloproteasen die Bluthirnschrankenintegrität stören und damit die Ödembildung sowie Einblutungen in das Gehirnparenchym fördern (Fujimoto et al., 2008). Des Weiteren wird diskutiert, dass MMP neuronale Apoptose induzieren (Rosenberg 2002; Gu et al., 2002). MMP-9^{-/-}-Tiere zeigten in einem murinen Schlaganfallmodell 24 Stunden postischämisch ein kleineres Infarkt volumen, eine verminderte Degradation des Bluthirnschrankenproteins ZO-1 und eine geringere Durchlässigkeit für Evans-Blue in das Gehirnparenchym (Asahi et al., 2001). Da MCP-1 ebenfalls als Faktor für die postischämische Degradation der Bluthirnschranke diskutiert wird (Stamatovic et al., 2005; Dimitrijevic et al., 2006; Stamatovic et al., 2006), sollte eine mögliche differente Regulation des MMP-9-Gens in MCP-1^{-/-}- und MCP-1^{+/-}-Tieren untersucht werden.

Bei der vergleichenden Analyse der MMP-9-Expression konnte bei den MCP-1^{-/-}-Tieren eine geringfügig verminderte Konzentration der fraglichen mRNA gemessen werden. Im ipsilateralen Cortex war MMP-9 12 Stunden postischämisch um den Faktor 0,651 und im infarzierten Areal um den Faktor 1,38 niedriger reguliert als bei den MCP-1^{+/-}-Tieren. Damit konnte gezeigt werden, dass MCP-1 einen geringen Einfluss auf die Transkription des

MMP-9-Gens hat. Die MMP-9-Suppression könnte zu einer verminderten Degradation der Bluthirnschrankenproteinen ZO-1 und Occludin führen und damit in einer verminderten Störung der Bluthirnschrankenintegrität und einer verringerten Gewebeschädigung resultieren.

4.8.7 Metalloproteinase-Inhibitor-1 (TIMP-1)

Matrix-Metalloproteasen werden durch TIMP-Proteine (*tissue inhibitor of metalloproteinases*) in ihrer Aktivität reguliert. Durch nicht-kovalente Bindung innerhalb der katalytischen Domäne können TIMP-Proteine Matrix-Metalloproteasen blockieren (Brew et al., 2000). Dabei ist die ausgeglichene Aktivität beider Proteine von entscheidender Bedeutung für die Aufrechterhaltung der extrazellulären Matrix sowohl im gesunden als auch im pathologisch veränderten Gehirn.

Da eine erhöhte postischämische MMP-Aktivität im Gehirn zu einer weiteren Verschlechterung des Krankheitsbildes durch Disruption der Bluthirnschranke und Induktion von apoptotischen Prozessen in Neuronen führt, wird als mögliche therapeutische Maßnahme nach einem Schlaganfall die Inhibierung von Matrixmetalloproteasen diskutiert (Cunningham et al., 2005; Gasche et al., 2006). In Versuchen mit TIMP-1^{-/-}-Mäusen konnte nach einer 30-minütigen Okklusion der *Arteria cerebri media* 24 Stunden postischämisch eine Vergrößerung des ischämischen Schadens, eine Zunahme apoptotischer Zellen, ZO-1-Degradation, eine Attenuierung der MMP-9-Aktivität und eine verstärkte Durchlässigkeit der Bluthirnschranke für Evans-Blue gezeigt werden (Fujimoto et al., 2008).

In unserem Schlaganfallmodell konnte bei den MCP-1^{+/-}-Tieren eine geringe Zunahme der TIMP-1-Expression 12 Stunden postischämisch nachgewiesen werden. Innerhalb des ipsilateralen Cortex wurde TIMP-1 im Vergleich zu

den MCP-1^{+/+}-Tieren ohne Infarkt um den Faktor 2,518, im infarzierten Areal um den Faktor 1,557 herauf reguliert. Fujimoto und Mitarbeiter konnten in ihren Experimenten an MCP-1^{+/+}-Mäusen ebenfalls eine Zunahme der TIMP-1-mRNA bereits nach 3 Stunden und das Maximum nach 24 Stunden ermitteln. Überraschenderweise zeigte sich bei den MCP-1^{-/-}-Tieren auf der ipsilateralen Hemisphäre nahezu keine postischämische Regulation. Auf der kontralateralen Hemisphäre wurde TIMP-1 im Vergleich zu der MCP-1^{-/-}-Gruppe ohne Infarkt um den Faktor 2,039 herunter reguliert.

Aufgrund dieser Ergebnisse kann somit ein Einfluss von MCP-1 auf die postischämische Transkription von TIMP-1 nicht ausgeschlossen werden. Da die Expressionsuntersuchungen jedoch auf Transkriptionsebene durchgeführt worden sind, kann über die Proteininteraktion von MMP-9 und TIMP-1 und daraus mögliche resultierende Vorteile der MCP-1^{-/-}-Gruppe zu diesem frühen postischämischen Zeitpunkt keine exakte Aussage getroffen werden.

4.8.8 Vaskuläres Zell-Adhäsionsprotein 1 (V-CAM-1)

Zell-Adhäsionsproteine haben während inflammatorischer Prozesse eine zentrale Rolle bei Rekrutierung hämatogener Leukozyten durch die Bluthirnschranke hindurch in das entzündete Gewebe (Panés et al., 1998). Die postischämische Expression von TNF-1 und IL-1 β veranlasst kapilläre Endothelzellen dazu, das Vaskuläre Zell-Adhäsionsprotein-1 (V-CAM-1) zu exprimieren. V-CAM-1 leitet die Rekrutierung hämatogener Zellen ein, indem es die Adhäsion hämatogener Leukozyten und Monozyten an der luminalen Gefäßwand unterstützt (Panés et al., 1998; Dobbie et al., 1999). V-CAM-1 wird in Ratten nach wenigen Stunden postischämisch exprimiert und hat sein Aktivitätsmaximum nach 24 Stunden erreicht (Justicia et al., 2006). Die Blockade von V-CAM-1 führte in einem experimentellen Schlaganfallmodell mit Ratten zu

einer verminderten Rekrutierung hämatogener Makrophagen und Monozyten, jedoch nicht zu einer Veränderung des Infarktolumens (Justicia et al., 2006).

In unserer Analyse sollte geklärt werden, ob der verringerte Einstrom hämatogener Leukozyten in unserem Mausmodell in einer reduzierten Expression des Vaskulären Zell-Adhäsionsprotein-1 begründet ist. Die Analysen der postischämischen V-CAM-1-Expression konnten sowohl bei den MCP-1^{-/-} als auch bei den MCP-1^{+/-}-Tieren nach 12 Stunden postoperativ keine veränderte Regulation gegenüber den jeweiligen Gruppen ohne Ischämie zeigen. Daher kann keine Aussage über einen möglichen Einfluss von MCP-1 auf die Regulation von V-CAM-1 getroffen werden. Möglicherweise wird V-CAM-1 in der Maus erst zu einem späteren Zeitpunkt aktiviert, so dass weitere Analysen zu späteren postoperativen Zeitpunkten Aufschluss geben könnten.

4.8.9 Protein-Histidin-Phosphatase 1 (PHP-1)

Die reversible Phosphorylierung von Serin, Threonin- und Tyrosin eukaryotischer Proteine durch Kinasen und Phosphatasen spielt eine wichtige Rolle bei der interzellulären Kommunikation sowie dem Zellwachstum (Graves et al., 1999). Zahlreiche Studien belegen, dass gestörte Proteinphosphorylierung eine Ursache für u.a. neurologische Erkrankungen ist. (Dombradi et al., 2002; Besant et al., 2005). Vor einigen Jahren konnte mit der Protein-Histidin-Phosphatase-1 erstmalig ein eukaryotisches histidindephosphorylierendes Enzym entdeckt werden (Klumpp et al., 2002). Als Substrate wurden die ATP-Citrat-Lyase und die G β -Untereinheit des G-Proteins identifiziert (Klumpp et al., 2003; Mäurer et al., 2005). Die Protein-Histidin-Phosphatase-1 konnte bisher *in-vitro* in primären Neuronenzelllinien sowie in Neuronen von *C. elegans* nachgewiesen werden. Daher wird diskutiert, dass PHP-1 möglicherweise ei-

ne Rolle bei der neuronalen Signaltransduktion spielen könnte (Klumpp et al., 2002). In unserem Labor konnten wir bereits durch immunhistochemische Kollokalisationsstudien belegen, dass PHP-1 im Mausgehirn von Neuronen und Astrozyten exprimiert wird (noch unveröffentlicht). Die immunhistochemischen Untersuchungen auf Gefrierschnitten zeigten zu verschiedenen postoperativen Zeitpunkten differente Profile des PHP-1-Signals. Daher sollte mittels qRT-PCR untersucht werden, ob PHP-1 durch postischämische Inflammation reguliert wird und ob MCP-1 einen Einfluss auf die PHP-1-Expression hat.

Hierbei zeigte sich sowohl bei den MCP-1^{+/-}- als auch den MCP-1^{-/-}-Tieren eine postischämische Regulation der PHP-1. In beiden Gruppen wurde die Expression der PHP-1 12 Stunden postoperativ herunter reguliert. Bei den MCP-1^{+/-}-Tieren konnte im ipsilateralen Cortex eine 2,695-fache, im infarzierten Areal eine 3,352-fache und im kontralateralen Striatum eine 4,424-fache Regulierung gegenüber MCP-1^{+/-}-Tieren ohne Schlaganfall ermittelt werden.

Die MCP-1^{-/-}-Tieren zeigten im ipsilateralen Cortex eine Regulation um den Faktor 3,649; im infarzierten Areal um den Faktor 3,838. Innerhalb des kontralateralen Striatums wurde die PHP-1 um das 4,533-fache gegenüber den MCP-1^{-/-}-Tieren ohne Schlaganfall herunter reguliert.

Damit konnte nachgewiesen werden, dass die Protein-Histidin-Phosphatase-1 durch inflammatorische Prozesse reguliert wird, MCP-1 12 Stunden postoperativ jedoch keinen nennenswerten Einfluss auf die Expressionsrate hat. Weiterführende Studien, die den zeitlichen Verlauf der postischämischen PHP-1-Expression analysieren, sowie die beteiligten Zellen identifizieren, werden zurzeit in unseren Laboren durchgeführt.

4.9 Vergleichende Analyse der Bluthirnschrankenintegrität

Die Bluthirnschranke dient als physiologische Barriere zwischen Blutkreislauf und zentralem Nervensystem. Dieser Schutz wird durch Endothelzellen, Perizyten, Astrozyten und interzellulären Proteine, den *tight-junction*-Proteinen wie *Zonulae-Occludens-1* und Occludin ausgebildet (Citi et al., 1998; Huber et al., 2001). Zahlreiche neurologische Erkrankungen, wie Gehirntumore, Multiple Sklerose, Verletzungen aber auch Schlaganfälle können zu einer Erhöhung der Bluthirnschrankenpermeabilität führen (Stamatovic et al., 2003).

Eine Erhöhung der Bluthirnschrankenpermeabilität resultiert in Hämorrhagie, Ausbildung eines vasogenen Gehirnödems und Immigration hämatogener Zellen (Persidsky et al., 2006). Es werden zahlreiche Mechanismen diskutiert, die zu einer pathologischen Störung der Bluthirnschrankenintegrität führen können. Dabei liegt der Fokus vor allem auf der strukturellen Reorganisation endothelialer *tight-junction*-Proteine (Garcia et al., 1995; Tsukamoto et al., 1999; Farshori et al., 1999). Als molekulare Mechanismen konnten bisher die Phosphorylierung von ZO-1 und Occludin durch verschiedene Isoformen der Proteinkinase C (PKC, PKC ζ , PKC λ) sowie die Occludin-Degradation durch MMP-9 identifiziert werden (Sakakibara et al., 1997; Fujimura et al., 1999; Fujimoto et al., 2008).

Die Ergebnisse zahlreicher Studien der letzten Jahre deuten darauf hin, dass MCP-1 während inflammatorischer Prozesse nicht nur einen Chemokingradienten ausbildet, dem CCR-2-exprimierende Zellen folgen, sondern dass MCP-1 darüber hinaus einen direkten Einfluss auf die Bluthirnschrankenintegrität hat. So konnte in einem *in-vitro*-Modell der Bluthirnschranke nachgewiesen werden, dass die Applikation von MCP-1 zu einer Reduzierung des transendothelialen Widerstandes führt (Stamatovic et al., 2003).

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass ein Anstieg der MCP-1-Konzentration zu einer verstärkten postischämischen Ödemausbildung führt. Zwei bekannte Isoformen der Proteinkinase C ($PKC\alpha$, $PKC\zeta$) werden durch MCP-1 aktiviert und phosphorylieren die *tight-junction*-Proteine ZO-1 und Occludin, was in einer Öffnung der Bluthirnschranke resultiert (Stamtovic et al., 2005, Dimitrijevic et al., 2006, Lee et al., 2006).

Die Ergebnisse dieser Arbeit konnten *in-vivo* zu einem frühen postischämischen Zeitpunkt (12 Stunden) eine Veränderung der Bluthirnschrankenpermeabilität bei MCP-1^{-/-}-Mäusen gegenüber der MCP-1^{+/+}-Gruppe bestätigen. So wurde bei den MCP-1^{-/-}-Tieren innerhalb des Gehirnparenchyms mittels ELISA-Quantifizierung eine niedrigere Konzentration von FITC-Albumin gemessen, was auf einen, gegenüber den MCP-1^{+/+}-Tieren, verminderten Übertritt des fluoreszierenden Proteins durch die Bluthirnschranke hinweist.

Überraschenderweise zeigte die densitometrische Analyse ein gegenteiliges Ergebnis. Offensichtlich kommt es bei MCP-1^{-/-}-Tieren zu einer massiven Akkumulation des FITC-Albumins innerhalb der Kapillarwände oder möglicherweise der Virchow-Robin-Räume. Dies könnte das bei der densitometrischen Analyse signifikant erhöhte FITC-Albumin-Fluoreszenz-Signal innerhalb der MCP-1^{-/-}-Mäuse im Vergleich zu der Kontrollgruppe erklären. Somit muss die Effektivität der densitometrischen Quantifizierung fluoreszierender Proteine im Gehirn in Frage gestellt werden, da die vaskuläre Anhäufung des FITC-Albumins innerhalb der Kapillaren der MCP-1^{-/-}-Tiere möglicherweise zu Verfälschungen führt. So könnte in das Gehirnparenchym diffundiertes FITC-Albumin in seiner Signalintensität unterhalb des definierten Schwellenwertes liegen und damit durch diese Messmethode nicht erfasst werden.

Die immunhistochemischen Analysen konnten insbesondere für das *tight-junction*-Protein *Zonula-Occludens-1* bei den MCP-1^{+/+}-Mäusen einen postischämischen strukturellen Verlust zeigen. Die Begutachtung des Occludin-Signals ließ keinen morphologischen Unterschied zwischen beiden Gruppen

erkennen. Daraus kann geschlossen werden, dass die Expression von MCP-1 *in-vivo* 12 Stunden postischämisch in einer Strukturveränderung von ZO-1 resultiert, was zu einer Zunahme der Bluthirnschrankenpermeabilität führen könnte. Die immunhistochemischen Kolokalisationsuntersuchungen von FITC-Albumin und dem von-Willebrand-Faktor zeigten bei den MCP-1^{-/-}-Mäusen eine erhöhte vaskuläre Akkumulation des fluoreszierenden Proteins. Dies könnte in einer erhöhten Dichtigkeit der Bluthirnschranke und damit einer verringerten Durchlässigkeit für Proteine innerhalb der MCP-1^{-/-}-Gruppe begründet sein.

5 Schlussfolgerung

Sowohl residenten Mikrogliazellen als auch immigrierenden hämatogenen Makrophagen kommt bei der Entwicklung des postischämischen Schadens eine zentrale Rolle zuteil. Ob jedoch Mikroglia und Makrophagen die gleichen Aufgaben nach einem Schlaganfall haben und ob diese eher neurotoxischer oder neuroprotektiver Natur sind, konnte bisher aufgrund fehlender differenzierender zellulärer Marker nicht aufgeklärt werden.

In der postischämischen Entzündungsregulation und Chemoattraktion immunkompetenter Zellen spielt das Chemokin MCP-1 eine entscheidende Rolle. Um den Einfluss von MCP-1 auf die Aktivierung residenter Mikroglia und die Immigration hämatogener Makrophagen differenziert analysieren zu können, generierten wir für das grün fluoreszierende Protein transgene MCP-1-defiziente Mäuse.

Darüber hinaus sollten die Experimente dieser Arbeit zur Aufklärung des Einflusses von MCP-1 auf die postischämische neurologische Erholung sowie die Immigration neutrophiler Granulozyten, perivaskulärer und meningealer Makrophagen, T-Zellen und Neuroblasten beitragen. Zur Analyse der molekulargenetischer Mechanismen einer differentiellen Immigration fraglicher immunkompetenter Zellen in das infarzierte Areal wurde zudem die Expression pro- und anti-inflammatorischer Gene 12 Stunden nach durchgeführter experimenteller zerebraler Ischämie bei MCP-1^{+/-}- und MCP-1^{-/-}-Mäusen untersucht.

In *in-vitro*-Untersuchungen konnte ein Zusammenhang zwischen der Konzentration des Chemokins MCP-1 und der inflammationsbedingten Bluthirnschrankendisruption nachgewiesen werden. Daher wurde außerdem der Einfluss von MCP-1 auf die postischämische Entwicklung der Bluthirnschrankenintegrität *in-vivo* untersucht.

Zu frühen postischämischen Zeitpunkten konnte auf zellulärer Ebene ein Untergang striataler Neurone sowie eine Aktivierung residenter Makrophagen und Astrozyten beobachtet werden. Dabei zeigte sich zwischen MCP-1^{+/-}- und MCP-1^{-/-}-Tieren kein morphologischer Unterschied der Zellen.

Das Infarktvolume war sowohl bei den MCP-1^{-/-}- als auch bei den MCP-1^{+/-}-Mäusen bereits 24 Stunden postoperativ nahezu voll ausgeprägt. Dabei wiesen die Mäuse der MCP-1^{-/-}-Gruppe geringfügig kleinere Infarkte auf.

Als mögliche Ursache hierfür könnte die differente Expression potenziell neurotoxisch bzw. neuroprotektiv wirkender Proteine in Frage kommen. Die Ergebnisse der molekulargenetischen Untersuchungen zeigten einen direkten Einfluss von MCP-1 auf die Regulation der potentiell neurotrophen Proteine PPAR- γ , G-CSF und TIMP-1.

Die verringerte Transkription neurotoxischer Proteine wie Interleukin-1 β , Interleukin-6 und der Matrix-Metalloprotease-9 könnten in einem verminderten Gewebeschaden und einer reduzierten Disruption der Bluthirnschranke resultieren. Dies konnte anhand der Untersuchung der postoperativen Bluthirnschrankenpermeabilität bestätigt werden. Intravenös appliziertes FITC-Albumin akkumulierte bei den MCP-1^{-/-}-Mäusen innerhalb der Kapillarwände und diffundierte in geringerer Menge als bei den MCP-1^{+/-}-Tieren in das Gehirnparenchym, was auf eine verminderte Störung der Bluthirnschrankintegrität hinweist. Dies belegten die immunhistochemischen Auswertungen des *tight-junction*-Proteins *Zonula-Occludens-1*, welche bei MCP-1^{-/-}-Tieren einen weniger ausgeprägten strukturellen Schaden zeigten.

Möglicherweise ist dieser Mechanismus für die MCP-1-abhängige Regulation der Infiltration hämatogener Zellen in das infarzierte Gehirngewebe verantwortlich. Es konnte gezeigt werden, dass MCP-1 zumindest zu späten postoperativen Zeitpunkten für die Rekrutierung hämatogener Makrophagen und neutrophiler Granulozyten durch die Bluthirnschranke hindurch in das ischämische Gewebe verantwortlich ist.

Die Analysen der Mikrogliaaktivierung zeigten zwischen den MCP-1^{-/-}- und den MCP-1^{+/-}-Mäusen nur geringfügige Unterschiede. Ob das Expressionsprofil der MCP-1^{+/-}- oder MCP-1^{-/-}-Mikroglia different ist, kann in diesen Untersuchungen nicht belegt werden, ist aber Gegenstand weiterer Forschungstätigkeit.

Bei der Untersuchung der postoperativen motorischen und sensomotorischen Leistungsunterschiede zwischen MCP-1^{-/-}- und MCP-1^{+/-}-Tieren zeigten sich erst zu späten Zeitpunkten Unterschiede zwischen den Gruppen. Es konnte dargestellt werden, dass MCP-1^{-/-}-Tiere eine geringfügig verbesserte neurologische Erholung 5-7 Tage postischämisch aufweisen. Eine Ursache für die nur geringen Unterschiede könnte die mit 30 Minuten kurz gewählte Ischämiedauer und das damit verbundene relativ geringe neurologische Defizit sein. Somit zeigte die MCP-1-Defizienz zumindest einen Trend zu einem verbesserten Befund in den Verhaltenstestungen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen, dass das Chemokin MCP-1 zu frühen postischämischen Zeitpunkten einen negativen Effekt auf die Entwicklung des Gewebeschadens durch Einflussnahme auf die Permeabilität der Bluthirnschranke und die vermehrte Expression proinflammatorischer Gene hat.

Die verminderte Infiltration hämatogener Zellen in das infarzierte Areal bei MCP-1^{-/-}-Mäusen und die damit wahrscheinlich verbundene verringerte importierte Expression potenziell zytotoxischer Substanzen könnte in unserem Schlaganfallmodell eine Mitursache für die verbesserte neurologische Erholung des Krankheitsbildes innerhalb einer Woche darstellen.

Da die molekularen Mechanismen der chemokingesteuerten postischämischen Entzündungsregulation zwischen Nagetieren und Menschen einen hohen Homologiegrad aufweisen, könnte eine temporäre gezielte Inhibition der MCP-1-Expression auch bei der humanen Schlaganfalltherapie zu einem Vorteil für die Patienten mit der Folge eines verringerten Schlaganfallvolumens,

verminderter Bluthirnschrankendisruption sowie vermindertem Einstrom potenziell zytotoxischer hämatogener Zellpopulationen führen.

Tabelle 7.1: Übersicht über die postischämischen differentiellen zellulären und molekulargenetischen Reaktionen in MCP-1^{-/-}-Tieren im Vergleich zu MCP-1^{+/+}-Tieren nach zerebraler Ischämie.

Postischämische Entwicklung	Veränderung in MCP-1 ^{-/-} -Tieren gegenüber MCP-1 ^{+/+} -Tieren
Neurologische Erholung	↑
Infarkt volumen	↓
Disruption der Bluthirnschranke	↓
Genexpression	
IL-1 β	↓↓
TNF-1	-
IL-6	↓↓
G-CSF	↓
V-CAM-1	-
TIMP-1	↓
MMP-9	↓
PHP	↓
PPAR- γ	↑
Zelluläre Reaktionen	
Aktivierung residenter Mikroglia	-
Rekrutierung hämatogener Makrophagen	↓
Rekrutierung neutrophiler Granulozyten	↓↓
T-Zell-Immigration	↓↓
Neuroblastenrekrutierung	-
<i>Turn-Over</i> perivaskulärer Makrophagen	-
<i>Turn-Over</i> meningealer Makrophagen	-

6 Veröffentlichungen

Schilling M, Besselmann M, Muller M, Strecker JK, Ringelstein EB, Kiefer R

Predominant phagocytic activity of resident microglia over hematogenous macrophages following transient focal cerebral ischemia: an investigation using green fluorescent protein transgenic bone marrow chimeric mice.

Exp Neurol. 2005 Dec; 196(2):290-7.

Schilling M, Strecker JK, Ringelstein EB, Kiefer R, Schäbitz WR

Turn-Over of meningeal and perivascular macrophages in the brain of MCP-1, CCR-2 or double knock-out mice. Eingereicht.

Schilling M, Strecker JK, Schäbitz WR, Ringelstein EB, Kiefer R

Monocyte chemoattractant protein-1 plays a critical role in blood-borne cell recruitment after focal cerebral ischemia in mice. Eingereicht.

Schilling M, Strecker JK, Schäbitz WR, Ringelstein EB, Kiefer R

The role of CC chemokine receptor 2 on microglia activation and blood-borne cell recruitment after transient focal cerebral ischemia in mice. Eingereicht.

Sevimli S, Diederich K, Strecker JK, Schilling M, Klocke R, Nikol S, Kirsch F, Schneider A, Schäbitz WR.

Endogenous brain protection by granulocyte-colony stimulating factor after ischemic stroke. Eingereicht.

Poster / Kongressbeiträge

DGN 2005, Wiesbaden

Jan-Kolja Strecker, Matthias Schilling, Marcus Müller, Antje Stöber, E.Bernd Ringelstein, Reinhard Kiefer

Untersuchung des Austausches perivaskulärer und meningealer Makrophagen an einem Modell transgener knochenmarkchimärer Mäuse

DGN 2005, Wiesbaden

Matthias Schilling, Jan-Kolja Strecker, Marcus Müller, Antje Stöber, E.Bernd Ringelstein, Reinhard Kiefer

Untersuchung der Migration hämatogener Makrophagen in das Gehirn nach ischämischem Schlaganfall in Abhängigkeit von der Bestrahlungsintensität bei der Produktion knochenmarkchimärer Mäuse

Stemcell Meeting NRW, 2006

Strecker JK, Stöber A, Ringelstein EB, Schilling M

Involvement of the MCP-1 / CCR-2 pathway in hematogenous cell influx after transient cerebral ischemia in mice

Stemcell Meeting NRW, 2006

Schilling M, Strecker JK, Stöber A, Ringelstein EB, Schäbitz WR

Hematogenous macrophage recruitment is regulated by the chemokine receptor-2 after transient cerebral ischemia in mice

Neurodegeneration and Neuroprotection, Münster, 2006

Schilling M, Strecker JK, Stöber A, Ringelstein EB, Schäbitz WR

Monocyte chemoattractant protein-1 is involved in lymphocyte recruitment after focal cerebral ischemia in mice

Neurodegeneration and Neuroprotection, Münster, 2006

Schilling M, Strecker JK, Stöber A, Ringelstein EB, Schäbitz WR

Hematogenous macrophage recruitment is regulated by the chemokine receptor-2 after transient cerebral ischemia in mice

Neuroscience Symposium, Münster, 2007

Schilling M, Strecker JK, Minnerup J, Rogalewski A, Schäbitz WR

Inflammatory response and resident/hematogenous cellular mechanisms of reorganisation after cerebral ischemia

Neuroscience Symposium, Münster, 2007

Seeger A, Schilling M, Strecker JK, Lehmann M, Faber D, Kriegelstein J, Klumpp S

Protein histidine phosphatase in neuronal cells

International Stroke Conference, San Diego, USA, 2009

Kraemer C, Sevimli S, Diederich K, Strecker JK, Schilling M, Klocke R, Nikol S, Kirsch F, Schneider A, Schäbitz WR

Effect Of Granulocyte-Colony Stimulating Factor Deficiency In Ischemic Stroke

7

Literatur

Andjelkovic AV, Pachter JS. (2000) Characterization of binding sites for chemokines MCP-1 and MIP-1alpha on human brain microvessels. *J Neurochem.* 2000 Nov; 75(5):1898-906.

Amantea D, Nappi G, Bernardi G, Bagetta G, Corasaniti MT. (2009) Post-ischemic brain damage: pathophysiology and role of inflammatory mediators. *FEBS J.* 2009 Jan; 276(1):13-26.

Arvidsson A, Collin T, Kirik D, Kokaia Z, Lindvall O. (2002) Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nat Med.* 2002 Sep; 8(9):963-70.

Asahi M, Asahi K, Jung JC, del Zoppo GJ, Fini ME, Lo EH. (2000) Role for matrix metalloproteinase 9 after focal cerebral ischemia: effects of gene knockout and enzyme inhibition with BB-94. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2000 Dec; 20(12):1681-9.

Asahi M, Wang X, Mori T, Sumii T, Jung JC, Moskowitz MA, Fini ME, Lo EH. (2001) Effects of matrix metalloproteinase-9 gene knock-out on the proteolysis of blood-brain barrier and white matter components after cerebral ischemia. *J Neurosci.* 2001 Oct 1; 21(19):7724-32.

Balkwill F. (1998) The molecular and cellular biology of the chemokines. *J Viral Hepat.* 1998 Jan; 5(1):1-14.

Bandopadhyay R, Orte C, Lawrenson JG, Reid AR, De Silva S, Allt G. (2001) Contractile proteins in pericytes at the blood-brain and blood-retinal barriers. *J Neurocytol.* 2001 Jan; 30(1):35-44.

Bauer J, Berkenbosch F, Van Dam AM, Dijkstra CD. (1993) Demonstration of interleukin-1 beta in Lewis rat brain during experimental allergic encephalomyelitis by immunocytochemistry at the light and ultrastructural level. *J Neuroimmunol.* 1993 Oct; 48(1):13-21.

Becker KJ. (1998) Inflammation and acute stroke. *Curr Opin Neurol.* 1998 Feb; 11(1):45-9.

Becker K, Kindrick D, Relton J, Harlan J, Winn R. (2001) Antibody to the alpha4 integrin decreases infarct size in transient focal cerebral ischemia in rats. *Stroke.* 2001 Jan; 32(1):206-11.

Bernardo A, Levi G, Minghetti L. (2000) Role of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR-gamma) and its natural ligand 15-deoxy-Delta12, 14-prostaglandin J2 in the regulation of microglial functions. *Eur J Neurosci.* 2000 Jul; 12(7):2215-23.

Besant PG, Attwood PV. (2005) Mammalian histidine kinases. *Biochim Biophys Acta.* 2005 Dec 30; 1754(1-2):281-90.

von Bohlen Und Halbach O. (2007) Immunohistological markers for staging neurogenesis in adult hippocampus. *Cell Tissue Res.* 2007 Sep; 329(3):409-20.

Boros P, Bromberg JS. (2006) New cellular and molecular immune pathways in ischemia/reperfusion injury. *Am J Transplant.* 2006 Apr; 6(4):652-8.

Boutin H, LeFeuvre RA, Horai R, Asano M, Iwakura Y, Rothwell NJ. (2001) Role of IL-1 alpha and IL-1 beta in ischemic brain damage. *J Neurosci*. 2001 Aug 1; 21(15):5528-34.

Brühl H, Cihak J, Schneider MA, Plachý J, Rupp T, Wenzel I, Shakarami M, Milz S, Ellwart JW, Stangassinger M, Schlöndorff D, Mack M. (2004) Dual role of CCR2 during initiation and progression of collagen-induced arthritis: evidence for regulatory activity of CCR2+ T cells. *J Immunol*. 2004 Jan 15; 172(2):890-8.

Brew K, Dinakarandian D, Nagase H. (2000) Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta*. 2000 Mar 7; 1477(1-2):267-83.

Buck BH, Liebeskind DS, Saver JL, Bang OY, Yun SW, Starkman S, Ali LK, Kim D, Villablanca JP, Salamon N, Razinia T, Ovbiagele B. (2008) Early neutrophilia is associated with volume of ischemic tissue in acute stroke. *Stroke*. 2008 Feb; 39(2):355-60.

Campbell IL, Abraham CR, Masliah E, Kemper P, Inglis JD, Oldstone MB, Mucke L. (1993) Neurologic disease induced in transgenic mice by cerebral overexpression of interleukin 6. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993 Nov 1; 90(21):10061-5.

Campbell SJ, Wilcockson DC, Butchart AG, Perry VH, Anthony DC. (2002) Altered chemokine expression in the spinal cord and brain contributes to differential interleukin-1beta-induced neutrophil recruitment. *J Neurochem*. 2002 Oct; 83(2):432-41.

Chamorro A, Hallenbeck J. (2006) The harms and benefits of inflammatory and immune responses in vascular disease. *Stroke*. 2006 Feb; 37(2):291-3.

Che X, Ye W, Panga L, Wu DC, Yang GY (2001) Monocyte chemoattractant protein-1 expressed in neurons and astrocytes during focal ischemia in mice. *Brain Res* 902:171–177.

Chen Y, Hallenbeck JM, Ruetzler C, Bol D, Thomas K, Berman NE, Vogel SN. (2003) Overexpression of monocyte chemoattractant protein 1 in the brain exacerbates ischemic brain injury and is associated with recruitment of inflammatory cells. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2003 Jun; 23(6):748-55.

Chiamulera C, Terron A, Reggiani A, Cristofori P. (1993) Qualitative and quantitative analysis of the progressive cerebral damage after middle cerebral artery occlusion in mice. *Brain Res*. 1993 Mar 26; 606(2):251-8.

Citi S, Cordenonsi M. (1998) Tight junction proteins. *Biochim Biophys Acta*. 1998 Nov 19; 1448(1):1-11.

Cunningham LA, Wetzel M, Rosenberg GA. (2005) Multiple roles for MMPs and TIMPs in cerebral ischemia. *Glia*. 2005 Jun; 50(4):329-39.

Danton GH, Dietrich WD. (2003) Inflammatory mechanisms after ischemia and stroke. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2003 Feb; 62(2):127-36.

DeGraba TJ. (1998) The role of inflammation after acute stroke: utility of pursuing anti-adhesion molecule therapy. *Neurology*. 1998 Sep; 51(3 Suppl 3): S62-8.

Deng YY, Lu J, Ling EA, Kaur C. (2008) Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) produced via NF-kappaB signaling pathway mediates migration of amoeboid microglia in the periventricular white matter in hypoxic neonatal rats. *Glia*. 2008 Oct 22.

Denes A, Vidyasagar R, Feng J, Narvainen J, McColl BW, Kauppinen RA, Allan SM. (2007) Proliferating resident microglia after focal cerebral ischaemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2007 Dec; 27(12):1941-53.

Denker SP, Ji S, Dingman A, Lee SY, Derugin N, Wendland MF, Vexler ZS. (2007) Macrophages are comprised of resident brain microglia not infiltrating peripheral monocytes acutely after neonatal stroke. *J Neurochem*. 2007 Feb; 100(4):893-904.

Dimitrijevic OB, Stamatovic SM, Keep RF, Andjelkovic AV. (2006) Effects of the chemokine CCL2 on blood-brain barrier permeability during ischemia-reperfusion injury. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2006 Jun; 26(6):797-810.

Dimitrijevic, Oliver B.; Stamatovic, Svetlana M., PhD; Keep, Richard F.; Andjelkovic, Anuska V., (2007) Absence of the Chemokine Receptor CCR2 Protects Against Cerebral Ischemia / Reperfusion Injury in Mice. *Stroke*. 38(4):1345-1353, April 2007.

Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz M (1999) Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* 22(9):391-7.

Dobbie MS, Hurst RD, Klein NJ, Surtees RA. (1999) Upregulation of intercellular adhesion molecule-1 expression on human endothelial cells by tumour ne-

cross factor-alpha in an in vitro model of the blood-brain barrier. *Brain Res.* 1999 Jun 5; 830(2):330-6.

Doetsch F, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. (1997) Cellular composition and three-dimensional organization of the subventricular germinal zone in the adult mammalian brain. *J Neurosci.* 1997 Jul 1; 17(13):5046-61.

Dombradi V, Krieglstein J, Klumpp S. (2002) Regulating the regulators. Conference on protein phosphorylation and protein phosphatases. *EMBO Rep.* 2002 Feb; 3(2):120-4.

Donnan GA, Fisher M, Macleod M, Davis SM. (2008) Stroke. *Lancet.* 2008 May 10; 371(9624):1612-23.

Dziewulska D, Mossakowski MJ. (2003) Cellular expression of tumor necrosis factor α and its receptors in human ischemic stroke. *Clin Neuropathol.* 2003 Jan-Feb; 22(1):35-40.

Elhofy A, Wang J, Tani M, Fife BT, Kennedy KJ, Bennett J, Huang D, Ransohoff RM, Karpus WJ. (2005) Transgenic expression of CCL2 in the central nervous system prevents experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Leukoc Biol.* 2005 Feb; 77(2):229-37.

Elkabes S, DiCicco-Bloom EM, Black IB. (1996) Brain microglia/macrophages express neurotrophins that selectively regulate microglial proliferation and function. *J Neurosci.* 1996 Apr 15;16(8):2508-21.

Emsley HC, Tyrrell PJ. (2002) Inflammation and infection in clinical stroke. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2002 Dec; 22(12):1399-419.

Farshori P, Kachar B. (1999) Redistribution and phosphorylation of occludin during opening and resealing of tight junctions in cultured epithelial cells. *J Membr Biol.* 1999 Jul 15; 170(2):147-56.

Fisher M, Garcia JH (1996) Evolving stroke and the ischemic penumbra. *Neurology* 47:884-888.

Flynn RW, MacWalter RS, Doney AS. (2008) The cost of cerebral ischaemia. *Neuropharmacology.* 2008 Sep; 55(3):250-6.

Fujimoto M, Takagi Y, Aoki T, Hayase M, Marumo T, Gomi M, Nishimura M, Kataoka H, Hashimoto N, Nozaki K. (2008) Tissue inhibitor of metalloproteinases protect blood-brain barrier disruption in focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2008 Oct; 28(10):1674-85.

Fujimura M, Gasche Y, Morita-Fujimura Y, Massengale J, Kawase M, Chan PH. (1999) Early appearance of activated matrix metalloproteinase-9 and blood-brain barrier disruption in mice after focal cerebral ischemia and reperfusion. *Brain Res.* 1999 Sep 18; 842(1):92-100

Garcia JH, Anderson ML. (1989) Physiopathology of cerebral ischemia. *Crit Rev Neurobiol.* 1989;4(4):303-24.

Garcia JH, Liu KF, Yoshida Y, Lian J, Chen S, del Zoppo GJ. (1994) Influx of leukocytes and platelets in an evolving brain infarct (Wistar rat). *Am J Pathol.* 1994 January; 144(1): 188–199.

Garcia JG, Schaphorst KL. (1995) Regulation of endothelial cell gap formation and paracellular permeability. *J Investig Med.* 1995 Apr; 43(2):117-26.

García-Verdugo JM, Doetsch F, Wichterle H, Lim DA, Alvarez-Buylla A. (1998) Architecture and cell types of the adult subventricular zone: in search of the stem cells. *J Neurobiol.* 1998 Aug; 36(2):234-48.

Gasche Y, Copin JC, Sugawara T, Fujimura M, Chan PH. (2001) Matrix metalloproteinase inhibition prevents oxidative stress-associated blood-brain barrier disruption after transient focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2001 Dec; 21(12):1393-400.

Gasche Y, Socal PM, Kanemitsu M, Copin JC. (2006) Matrix metalloproteinases and diseases of the central nervous system with a special emphasis on ischemic brain. *Front Biosci.* 2006 May 1; 11:1289-301.

Gaupp S, Pitt D, Kuziel WA, Cannella B, Raine CS. (2003) Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in CCR2(-/-) mice: susceptibility in multiple strains. *Am J Pathol.* 2003 Jan; 162(1):139-50.

Ge S, Song L, Serwanski DR, Kuziel WA, Pachter JS (2008) Transcellular transport of CCL2 across brain microvascular endothelial cells. *Journal of neurochemistry* 2008; 104(5):1219-32.

Gibson CL, Bath PM, Murphy SP. (2005) G-CSF reduces infarct volume and improves functional outcome after transient focal cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2005 Apr; 25(4):431-9.

Gidday JM, Gasche YG, Copin JC, Shah AR, Perez RS, Shapiro SD, Chan PH, Park TS. (2005) Leukocyte-derived matrix metalloproteinase-9 mediates blood-brain barrier breakdown and is proinflammatory after transient focal cerebral ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005 Aug; 289(2):H558-68.

Gregersen R, Lambertsen K, Finsen B. (2000) Microglia and macrophages are the major source of tumor necrosis factor in permanent middle cerebral artery occlusion in mice. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2000 Jan; 20(1):53-65.

Gong JH, Ratkay LG, Waterfield JD, Clark-Lewis I. (1997) An antagonist of monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) inhibits arthritis in the MRL-lpr mouse model. *J Exp Med.* 1997 Jul 7; 186(1):131-7.

Gourmala NG, Buttini M, Limonta S, Sauter A, Boddeke HW. (1997) Differential and time-dependent expression of monocyte chemoattractant protein-1 mRNA by astrocytes and macrophages in rat brain: effects of ischemia and peripheral lipopolysaccharide administration. *J Neuroimmunol.* 1997 Apr; 74(1-2):35-44.

Graves JD, Krebs EG. (1999) Protein phosphorylation and signal transduction. *Pharmacol Ther.* 1999 May-Jun; 82(2-3):111-21.

Gu Z, Kaul M, Yan B, Kridel SJ, Cui J, Strongin A, Smith JW, Liddington RC, Lipton SA. (2002) S-nitrosylation of matrix metalloproteinases: signaling pathway to neuronal cell death. *Science.* 2002 Aug 16; 297(5584):1186-90.

Hacke W, Kaste M, Bluhmki E, Brozman M, Dávalos A, Guidetti D, Larrue V, Lees KR, Medeghri Z, Machnig T, Schneider D, von Kummer R, Wahlgren N, Toni D; ECASS Investigators. (2008) Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. *N Engl J Med.* 2008 Sep 25; 359(13):1317-29.

Hailer NP. (2008) Immunosuppression after traumatic or ischemic CNS damage: it is neuroprotective and illuminates the role of microglial cells. *Prog Neurobiol.* 2008 Mar; 84(3):211-33.

Harrington JR. (2000) The role of MCP-1 in atherosclerosis. *Stem Cells*. 2000; 18(1):65-6.

Hayden MS, West AP, Ghosh S. (2006) NF-kappaB and the immune response. *Oncogene*. 2006 Oct 30; 25(51):6758-80.

Hertz L. (1991) Neuronal-astrocytic interactions in brain development, brain function and brain disease. *Adv Exp Med Biol*. 1991; 296:143-59.

Hickey WF, Kimura H. (1988) Perivascular microglial cells of the CNS are bone marrow-derived and present antigen in vivo. *Science*. 1988 Jan 15; 239(4837):290-2.

Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R.(1992) Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)*. 1992 Apr; 10(4):413-7.

Hillhouse EW, Kida S, Iannotti F. (1998) Middle cerebral artery occlusion in the rat causes a biphasic production of immunoreactive interleukin-1beta in the cerebral cortex. *Neurosci Lett*. 1998 Jun 19; 249(2-3):177-9.

Hossmann KA. (1994) Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia. *Ann Neurol*. 1994 Oct; 36(4):557-65.

Hsiao G, Lee JJ, Chen YC, Lin JH, Shen MY, Lin KH, Chou DS, Sheu JR. (2007) Neuroprotective effects of PMC, a potent alpha-tocopherol derivative, in brain ischemia-reperfusion: reduced neutrophil activation and anti-oxidant actions. *Biochem Pharmacol*. 2007 Mar 1; 73(5):682-93.

Huang DR, Wang J, Kivisakk P, Rollins BJ, Ransohoff RM. (2001) Absence of monocyte chemoattractant protein 1 in mice leads to decreased local macrophage recruitment and antigen-specific T helper cell type 1 immune response in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med.* 2001 Mar 19; 193(6):713-26

Huber JD, Egleton RD, Davis TP. (2001) Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions in the blood-brain barrier. *Trends Neurosci.* 2001 Dec; 24(12):719-25.

Hughes PM, Allegrini PR, Rudin M, Perry VH, Mir AK, Wiessner C. (2002) Monocyte chemoattractant protein-1 deficiency is protective in a murine stroke model. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2002 Mar; 22(3):308-17.

Imitola J, Raddassi K, Park KI, Mueller FJ, Nieto M, Teng YD, Frenkel D, Li J, Sidman RL, Walsh CA, Snyder EY, Khoury SJ. (2004) Directed migration of neural stem cells to sites of CNS injury by the stromal cell-derived factor 1alpha/CXC chemokine receptor 4 pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Dec 28; 101(52):18117-22.

Izikson L, Klein RS, Charo IF, Weiner HL, Luster AD. (2002) Resistance to experimental autoimmune encephalomyelitis in mice lacking the CC chemokine receptor (CCR)2. *J Exp Med.* 2000 Oct 2;192(7):1075-80.

Jiang Y, Beller DI, Frenzl G, Graves DT. (1992) Monocyte chemoattractant protein-1 regulates adhesion molecule expression and cytokine production in human monocytes. *J Immunol.* 1992 Apr 15; 148(8):2423-8.

Jiang L, Newman M, Saporta S, Chen N, Sanberg C, Sanberg PR, Willing AE. (2008) MIP-1alpha and MCP-1 Induce Migration of Human Umbilical Cord Blood Cells in Models of Stroke. *Curr Neurovasc Res.* 2008 May; 5(2):118-24.

Jin K, Sun Y, Xie L, Peel A, Mao XO, Batteur S, Greenberg DA. (2003) Directed migration of neuronal precursors into the ischemic cerebral cortex and striatum. *Mol Cell Neurosci.* 2003 Sep; 24(1):171-89.

Jin K, Galvan V. (2007) Endogenous neural stem cells in the adult brain. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2007 Sep; 2(3):236-42.

Justicia C, Panés J, Solé S, Cervera A, Deulofeu R, Chamorro A, Planas AM. (2003) Neutrophil infiltration increases matrix metalloproteinase-9 in the ischemic brain after occlusion/reperfusion of the middle cerebral artery in rats. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2003 Dec; 23(12):1430-40.

Justicia C, Martín A, Rojas S, Gironella M, Cervera A, Panés J, Chamorro A, Planas AM. (2006) Anti-VCAM-1 antibodies did not protect against ischemic damage either in rats or in mice. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2006 Mar; 26(3):421-32.

Kaushansky K, Lin N, Adamson JW. (1988) Interleukin 1 stimulates fibroblasts to synthesize granulocyte-macrophage and granulocyte colony-stimulating factors. Mechanism for the hematopoietic response to inflammation. *J Clin Invest.* 1988 Jan; 81(1):92-7.

Kelly MA, Shuaib A, Todd KG. (2006) Matrix metalloproteinase activation and blood-brain barrier breakdown following thrombolysis. *Exp Neurol.* 2006 Jul; 200(1):38-49.

Klumpp S, Hermesmeier J, Selke D, Baumeister R, Kellner R, Krieglstein J. (2002) Protein histidine phosphatase: a novel enzyme with potency for neuronal signaling. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2002 Dec; 22(12):1420-4.

Klumpp S, Bechmann G, Mäurer A, Selke D, Krieglstein J (2003) ATP-citrate lyase as a substrate of protein histidine phosphatase in vertebrates. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003 Jun 20; 306(1):110-5.

Koeffler HP, Gasson J, Ranyard J, Souza L, Shepard M, Munker R. (1987) Recombinant human TNF alpha stimulates production of granulocyte colony-stimulating factor. *Blood.* 1987 Jul; 70(1):55-9.

Kolominsky-Rabas PL, Sarti C, Heuschmann PU, Graf C, Siemonsen S, Neundoerfer B, Katalinic A, Lang E, Gassmann KG, von Stockert TR. (1998) A prospective community-based study of stroke in Germany--the Erlangen Stroke Project (ESPro): incidence and case fatality at 1, 3, and 12 months. *Stroke.* 1998 Dec; 29(12):2501-6.

Komine-Kobayashi M, Zhang N, Liu M, Tanaka R, Hara H, Osaka A, Mochizuki H, Mizuno Y, Urabe T. (2006) Neuroprotective effect of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in transient focal ischemia of mice. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2006 Mar; 26(3):402-13.

Kreutzberg GW. (1996) Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci.* 1996 Aug; 19(8):312-8.

Kumai Y, Ooboshi H, Takada J, Kamouchi M, Kitazono T, Egashira K, Ibayashi S, Iida M. (2004) Anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy

protects against focal brain ischemia in hypertensive rats. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2004 Dec; 24(12):1359-68.

Lambertsen KL, Meldgaard M, Ladeby R, Finsen B. (2005) A quantitative study of microglial-macrophage synthesis of tumor necrosis factor during acute and late focal cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2005 Jan; 25(1):119-35.

Lambertsen KL, Clausen BH, Fenger C, Wulf H, Owens T, Dagnaes-Hansen F, Meldgaard M, Finsen B. (2007) Microglia and macrophages express tumor necrosis factor receptor p75 following middle cerebral artery occlusion in mice. *Neuroscience.* 2007 Feb 9; 144(3):934-49.

Lan X, Qu H, Yao W, Zhang C. (2008) Granulocyte-colony stimulating factor inhibits neuronal apoptosis in a rat model of diabetic cerebral ischemia. *Tohoku J Exp Med.* 2008 Oct; 216(2):117-26.

Lee SR, Kim HY, Rogowska J, Zhao BQ, Bhide P, Parent JM, Lo EH. (2006) Involvement of matrix metalloproteinase in neuroblast cell migration from the subventricular zone after stroke. *J Neurosci.* 2006 Mar 29; 26(13):3491-5.

Lee YR, Liu MT, Lei HY, Liu CC, Wu JM, Tung YC, Lin YS, Yeh TM, Chen SH, Liu HS. (2006) MCP-1, a highly expressed chemokine in dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome patients, may cause permeability change, possibly through reduced tight junctions of vascular endothelium cells. *J Gen Virol.* 2006 Dec; 87(Pt 12):3623-30.

Li GZ, Zhong D, Yang LM, Sun B, Zhong ZH, Yin YH, Cheng J, Yan BB, Li HL. (2005) Expression of interleukin-17 in ischemic brain tissue. *Scand J Immunol*. 2005 Nov; 62(5):481-6.

Liu T, McDonnell PC, Young PR, White RF, Siren AL, Hallenbeck JM, Barone FC, Feuerstein GZ. (1993) Interleukin-1 beta mRNA expression in ischemic rat cortex. *Stroke*. 1993 Nov; 24(11):1746-50

Liu T, Clark RK, McDonnell PC, Young PR, White RF, Barone FC, Feuerstein GZ. (1994) Tumor necrosis factor-alpha expression in ischemic neurons. *Stroke*. 1994 Jul; 25(7):1481-8.

Lo EH, Moskowitz MA, Jacobs TP. (2005) Exciting, radical, suicidal: how brain cells die after stroke. *Stroke*. 2005 Feb; 36(2):189-92.

Loddick SA, Rothwell NJ. (1996) Neuroprotective effects of human recombinant interleukin-1 receptor antagonist in focal cerebral ischaemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1996 Sep; 16(5):932-40.

Loddick SA, Turnbull AV, Rothwell NJ. (1998) Cerebral interleukin-6 is neuroprotective during permanent focal cerebral ischemia in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1998 Feb; 18(2):176-9.

Mahad DJ, Ransohoff RM. (2003) The role of MCP-1 (CCL2) and CCR2 in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Semin Immunol*. 2003 Feb; 15(1):23-32.

Mattson MP. (2005) NF-kappaB in the survival and plasticity of neurons. *Neurochem Res*. 2005 Jun-Jul; 30(6-7):883-93.

Mäurer A, Wieland T, Meissl F, Niroomand F, Mehringer R, Krieglstein J, Klumpp S. (2005) The beta-subunit of G proteins is a substrate of protein histidine phosphatase. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005 Sep 9; 334(4):1115-20.

Menzies SA, Hoff JT, Betz AL. (1992) Middle cerebral artery occlusion in rats: a neurological and pathological evaluation of a reproducible model. *Neurosurgery.* 1992 Jul; 31(1):100-6; discussion 106-7.

Miller CL, Diglisic S, Leister F, Webster M, Yolken RH. (2004) Evaluating RNA status for RT-PCR in extracts of postmortem human brain tissue. *Biotechniques.* 2004 Apr; 36(4):628-33.

Miwa T, Furukawa S, Nakajima K, Furukawa Y, Kohsaka S. (1997) Lipopolysaccharide enhances synthesis of brain-derived neurotrophic factor in cultured rat microglia. *J Neurosci Res.* 1997 Dec 15; 50(6):1023-9.

Morrison TB, Weis JJ, Wittwer CT. (1998) Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques.* 1998 Jun; 24(6):954-8, 960, 962.

Mueller O, Hahnenberger K, Dittmann M, Yee H, Dubrow R, Nagle R, Ilsley D. (2000) A microfluidic system for high-speed reproducible DNA sizing and quantitation. *Electrophoresis.* 2000 Jan; 21(1):128-34.

Mueller O, Lightfoot S, Schroeder A. (2004) RNA Integrity Number (RIN) – Standardization of RNA Quality Control. Agilent Technologies.

Mullis KB, Faloona FA. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 1987;155:335-50.

Mukaida N, Matsumoto T, Yokoi K, Harada A, Matsushima K. (1998) Inhibition of neutrophil-mediated acute inflammation injury by an antibody against interleukin-8 (IL-8) *Inflamm Res.* 1998 Oct;47 Suppl 3: S151-7.

Nadareishvili ZG, Li H, Wright V, Maric D, Warach S, Hallenbeck JM, Dambrosia J, Barker JL, Baird AE. (2004) Elevated pro-inflammatory CD4+CD28- lymphocytes and stroke recurrence and death. *Neurology.* 2004 Oct 26; 63(8):1446-51.

Nedergaard M, Dirnagl U. (2005) Role of glial cells in cerebral ischemia. *Glia.* 2005 Jun; 50(4):281-6.

Neumann H, Schmidt H, Cavalié A, Jenne D, Wekerle H. (1997) Major histocompatibility complex (MHC) class I gene expression in single neurons of the central nervous system: differential regulation by interferon (IFN)-gamma and tumor necrosis factor (TNF)-alpha. *J Exp Med.* 1997 Jan 20; 185(2):305-16.

Newton SS, Dow A, Terwilliger R, Duman R. (2002) A simplified method for combined immunohistochemistry and in-situ hybridization in fresh-frozen, cryocut mouse brain sections. *Brain Res Brain Res Protoc.* 2002 Jun; 9(3):214-9.

Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F. (2005) Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science.* 2005 May 27; 308(5726):1314-8.

Ohab JJ, Fleming S, Blesch A, Carmichael ST. (2006) A neurovascular niche for neurogenesis after stroke. *J Neurosci*. 2006 Dec 13; 26(50):13007-16.

Panés J, Granger DN. (1998) Leukocyte-endothelial cell interactions: molecular mechanisms and implications in gastrointestinal disease. *Gastroenterology*. 1998 May; 114(5):1066-90.

Park SW, Yi JH, Miranpuri G, Satriotomo I, Bowen K, Resnick DK, Vemuganti R. (2006) Thiazolidinedione class of peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists prevents neuronal damage, motor dysfunction, myelin loss, neuropathic pain, and inflammation after spinal cord injury in adult rats. *J Pharmacol Exp Ther*. 2007 Mar; 320(3):1002-12.

Pearson VL, Rothwell NJ, Toulmond S. (1999) Excitotoxic brain damage in the rat induces interleukin-1beta protein in microglia and astrocytes: correlation with the progression of cell death. *Glia*. 1999 Feb 15; 25(4):311-23.

Peppiatt CM, Howarth C, Mobbs P, Attwell D. (2006) Bidirectional control of CNS capillary diameter by pericytes. *Nature*. 2006 Oct 12; 443(7112):700-4.

Persidsky Y, Ramirez SH, Haorah J, Kanmogne GD. (2006) Blood-brain barrier: structural components and function under physiologic and pathologic conditions. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2006 Sep; 1(3):223-36.

Petito CK, Morgello S, Felix JC, Lesser ML. (1990) The two patterns of reactive astrocytosis in postischemic rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1990 Nov; 10(6):850-9.

Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle (2002) L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* 2002 May 1; 30(9):e36

Piquer-Gil M, García-Verdugo JM, Zipancic I, Sánchez MJ, Alvarez-Dolado M. (2008) Cell fusion contributes to pericyte formation after stroke. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2008 Dec 10.

Pringle AK, Niyadurupola N, Johns P, Anthony DC, Iannotti F. (2001) Interleukin-1beta exacerbates hypoxia-induced neuronal damage, but attenuates toxicity produced by simulated ischaemia and excitotoxicity in rat organotypic hippocampal slice cultures. *Neurosci Lett.* 2001 Jun 1; 305(1):29-32.

Poeck K, Hacke W (1998) *Neurologie* 10. Aufl. Springer, Berlin-Heidelberg-New York.

Del Pozo, MA, Sánchez-Mateos P, Nieto M, Sánchez-Madrid F. (1995) Chemokines regulate cellular polarization and adhesion receptor redistribution during lymphocyte interaction with endothelium and extracellular matrix. Involvement of cAMP signaling pathway. *J Cell Biol.* 1995 Oct; 131(2):495-508.

Ramsauer M, Krause D, Dermietzel R. (2002) Angiogenesis of the blood-brain barrier in vitro and the function of cerebral pericytes. *FASEB J.* 2002 Aug; 16(10):1274-6.

Rankine EL, Hughes PM, Botham MS, Perry VH, Felton LM. (2006) Brain cytokine synthesis induced by an intraparenchymal injection of LPS is reduced in MCP-1-deficient mice prior to leucocyte recruitment. *Eur J Neurosci.* 2006 Jul; 24(1):77-86.

Rosenberg GA. (2002) Matrix metalloproteinases in neuroinflammation. *Glia*. 2002 Sep; 39(3):279-91.

Rothwell PM, Coull AJ, Silver LE, Fairhead JF, Giles MF, Lovelock CE, Redgrave JN, Bull LM, Welch SJ, Cuthbertson FC, Binney LE, Gutnikov SA, Anslow P, Banning AP, Mant D, Mehta Z; Oxford Vascular Study. (2005) Population-based study of event-rate, incidence, case fatality, and mortality for all acute vascular events in all arterial territories (Oxford Vascular Study). *Lancet*. 2005 Nov 19; 366(9499):1773-83.

Sairanen TR, Lindsberg PJ, Brenner M, Sirén AL. (1997) Global forebrain ischemia results in differential cellular expression of interleukin-1beta (IL-1beta) and its receptor at mRNA and protein level. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1997 Oct; 17(10):1107-20.

Sakakibara A, Furuse M, Saitou M, Ando-Akatsuka Y, Tsukita S. (1997) Possible involvement of phosphorylation of occludin in tight junction formation. *J Cell Biol*. 1997 Jun 16; 137(6):1393-401.

Samson Y, Lapergue B, Hosseini H. (2005) Inflammation and ischemic stroke: current status and future perspectives. *Rev Neurol (Paris)*. 2005 Dec; 161:1177-82.

Sawada M, Suzumura A, Marunouchi T. (1992) TNF alpha induces IL-6 production by astrocytes but not by microglia. *Brain Res*. 1992 Jun 26; 583(1-2):296-9.

Schäbitz WR, Kollmar R, Schwaninger M, Juettler E, Bardutzky J, Schölzke MN, Sommer C, Schwab S. (2003) Neuroprotective effect of granulocyte col-

ony-stimulating factor after focal cerebral ischemia. *Stroke*. 2003 Mar; 34(3):745-51.

Schilling M, Besselmann M, Leonhard C, Mueller M, Ringelstein EB, Kiefer R. (2003) Microglial activation precedes and predominates over macrophage infiltration in transient focal cerebral ischemia: a study in green fluorescent protein transgenic bone marrow chimeric mice. *Exp Neurol*. 2003 Sep; 183(1):25-33.

Schneider A, Krüger C, Steigleder T, Weber D, Pitzer C, Laage R, Aronowski J, Maurer MH, Gassler N, Mier W, Hasselblatt M, Kollmar R, Schwab S, Sommer C, Bach A, Kuhn HG, Schäbitz WR. (2005) The hematopoietic factor G-CSF is a neuronal ligand that counteracts programmed cell death and drives neurogenesis. *J Clin Invest*. 2005 Aug;115(8):2083-98.

Schneider A, Kuhn HG, Schäbitz WR. (2005) A role for G-CSF (granulocyte-colony stimulating factor) in the central nervous system. *Cell Cycle*. 2005 Dec; 4(12):1753-7.

Schoonjans K, Staels B, Auwerx J. (1996) The peroxisome proliferator activated receptors (PPARS) and their effects on lipid metabolism and adipocyte differentiation. *Biochim Biophys Acta*. 1996 Jul 26; 1302(2):93-109

Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, Gassmann M, Lightfoot S, Menzel W, Granzow M, Ragg T. (2004) The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol*. 2006 Jan 31; 7:3.

Shin WS, Szuba A, Rockson SG. (2002) The role of chemokines in human cardiovascular pathology: enhanced biological insights. *Atherosclerosis*. 2002 Jan; 160(1):91-102.

Six I, Gasan G, Mura E, Bordet R. (2003) Beneficial effect of pharmacological mobilization of bone marrow in experimental cerebral ischemia. *Eur J Pharmacol*. 2003 Jan 5; 458(3):327-8.

Stamatovic SM, Keep RF, Kunkel SL, Andjelkovic AV. (2003) Potential role of MCP-1 in endothelial cell tight junction 'opening': signaling via Rho and Rho kinase. *J Cell Sci*. 2003 Nov 15; 116(Pt 22):4615-28.

Stamatovic SM, Shakui P, Keep RF, Moore BB, Kunkel SL, Van Rooijen N, Andjelkovic AV. (2005) Monocyte chemoattractant protein-1 regulation of blood-brain barrier permeability. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2005 May; 25(5):593-606

Stamatovic SM, Dimitrijevic OB, Keep RF, Andjelkovic AV. (2006) Protein kinase Calpha-RhoA cross-talk in CCL2-induced alterations in brain endothelial permeability. *J Biol Chem*. 2006 Mar 31;281(13):8379-88.

Stamatovic SM, Dimitrijevic OB, Keep RF, Andjelkovic AV. (2006) Protein kinase Calpha-RhoA cross-talk in CCL2-induced alterations in brain endothelial permeability. *J Biol Chem*. 2006 Mar 31; 281(13):8379-88.

Stevens SL, Bao J, Hollis J, Lessov NS, Clark WM, Stenzel-Poore MP. (2002) The use of flow cytometry to evaluate temporal changes in inflammatory cells following focal cerebral ischemia in mice. *Brain Res*. 2002 Apr 5; 932(1-2):110-9.

Stoll G, Jander S, Schroeter M. (1998) Inflammation and glial responses in ischemic brain lesions. *Prog Neurobiol.* 1998 Oct; 56(2):149-71.

Stoll G, Jander S, Schroeter M. (2002) Detrimental and beneficial effects of injury-induced inflammation and cytokine expression in the nervous system. *Adv Exp Med Biol.* 2002; 513:87-113.

Storer PD, Xu J, Chavis J, Drew PD. (2005) Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists inhibit the activation of microglia and astrocytes: implications for multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2005 Apr; 161(1-2):113-22.

Streit WJ, Graeber MB. (1993) Heterogeneity of microglial and perivascular cell populations: insights gained from the facial nucleus paradigm. *Glia.* 1993 Jan; 7(1):68-74.

Streit WJ. (2002) Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS. *Glia.* 2002 Nov; 40(2):133-9.

Sundararajan S, Gamboa JL, Victor NA, Wanderi EW, Lust WD, Landreth GE. (2005) Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands reduce inflammation and infarction size in transient focal ischemia. *Neuroscience.* 2005; 130(3):685-96.

Suzuki S, Tanaka K, Nogawa S, Nagata E, Ito D, Dembo T, Fukuuchi Y. (1999) Temporal profile and cellular localization of interleukin-6 protein after focal cerebral ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1999 Nov; 19(11):1256-62.

Suzuki S, Tanaka K, Nogawa S, Dembo T, Kosakai A, Fukuuchi Y. (2000) Expression of interleukin-6 is suppressed by inhibition of voltage-sensitive Na⁺/Ca²⁺ channels after cerebral ischemia. *Neuroreport*. 2000 Aug 3; 11(11):2565-9.

Suzuki SO, Goldman JE. (2003) Multiple cell populations in the early postnatal subventricular zone take distinct migratory pathways: a dynamic study of glial and neuronal progenitor migration. *J Neurosci*. 2003 May 15; 23(10):4240-50.

Tichopad A, Dilger M, Schwarz G, Pfaffl MW. (2003) Standardized determination of real-time PCR efficiency from a single reaction set-up. *Nucleic Acids Res*. 2003 Oct 15; 31(20):e122.

Thibeault I, Laflamme N, Rivest S. (2001) Regulation of the gene encoding the monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) in the mouse and rat brain in response to circulating LPS and proinflammatory cytokines. *J Comp Neurol*. 2001 Jun 11; 434(4):461-77.

Tsukamoto T, Nigam SK. (1999) Role of tyrosine phosphorylation in the reassembly of occludin and other tight junction proteins. *Am J Physiol*. 1999 May; 276(5 Pt 2):F737-50.

Tureyen K, Kapadia R, Bowen KK, Satriotomo I, Liang J, Feinstein DL, Vemuganti R. (2007) Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists induce neuroprotection following transient focal ischemia in normotensive, normoglycemic as well as hypertensive and type-2 diabetic rodents. *J Neurochem*. 2007 Apr; 101(1):41-56.

Vamecq J, Latruffe N. (1999) Medical significance of peroxisome proliferator-activated receptors. *Lancet*. 1999 Jul 10; 354(9173):141-8.

Van Wagoner NJ, Benveniste EN. (1999) Interleukin-6 expression and regulation in astrocytes. *J Neuroimmunol*. 1999 Dec; 100(1-2):124-39.

Van Wagoner NJ, Oh JW, Repovic P, Benveniste EN. (1999) Interleukin-6 (IL-6) production by astrocytes: autocrine regulation by IL-6 and the soluble IL-6 receptor. *J Neurosci*. 1999 Jul 1;19(13):5236-44.

Wang X, Yue TL, Barone FC, White RF, Gagnon RC, Feuerstein GZ. (1994) Concomitant cortical expression of TNF-alpha and IL-1 beta mRNAs follows early response gene expression in transient focal ischemia. *Mol Chem Neuro-pathol*. 1994 Oct-Dec; 23(2-3):103-14.

Wang X, Yue TL, Barone FC, Feuerstein GZ. (1995) Monocyte chemoattractant protein-1 messenger RNA expression in rat ischemic cortex. *Stroke*. 1995 Apr; 26(4):661-5; discussion 665-6.

Wang L, Zhang ZG, Zhang RL, Gregg SR, Hozeska-Solgot A, LeTourneau Y, Wang Y, Chopp M. (2006) Matrix metalloproteinase 2 (MMP2) and MMP9 secreted by erythropoietin-activated endothelial cells promote neural progenitor cell migration. *J Neurosci*. 2006 May 31; 26(22):5996-6003.

Welte K, Platzer E, Lu L, Gabrilove JL, Levi E, Mertelsmann R, Moore MA. (1985) Purification and biochemical characterization of human pluripotent hematopoietic colony-stimulating factor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1985 Mar; 82(5):1526-30.

Williams K, Alvarez X, Lackner AA. (2001) Central nervous system perivascular cells are immunoregulatory cells that connect the CNS with the peripheral immune system. *Glia*. 2001 Nov; 36(2):156-64.

Xiao BG, Lu CZ, Link H. (2007) Cell biology and clinical promise of G-CSF: immunomodulation and neuroprotection. *J Cell Mol Med*. 2007 Nov-Dec; 11(6):1272-90.

Xing Z, Gauldie J, Cox G, Baumann H, Jordana M, Lei XF, Achong MK. (1998) IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *J Clin Invest*. 1998 Jan 15; 101(2):311-20.

Yamagami S, Tamura M, Hayashi M, Endo N, Tanabe H, Katsuura Y, Komoriya K. (1999) Differential production of MCP-1 and cytokine-induced neutrophil chemoattractant in the ischemic brain after transient focal ischemia in rats. *J Leukoc Biol*. 1999 Jun; 65(6):744-9.

Yamasaki Y, Matsuo Y, Matsuura N, Onodera H, Itoyama Y, Kogure K. (1995) Transient increase of cytokine-induced neutrophil chemoattractant, a member of the interleukin-8 family, in ischemic brain areas after focal ischemia in rats. *Stroke*. 1995 Feb; 26(2):318-22; discussion 322-3.

Yamagami S, Tamura M, Hayashi M, Endo N, Tanabe H, Katsuura Y, Komoriya K. (1999) Differential production of MCP-1 and cytokine-induced neutrophil chemoattractant in the ischemic brain after transient focal ischemia in rats. *J Leukoc Biol*. 1999 Jun; 65(6):744-9.

Yamashita T, Ninomiya M, Hernández Acosta P, García-Verdugo JM, Sunabori T, Sakaguchi M, Adachi K, Kojima T, Hirota Y, Kawase T, Araki N, Abe

K, Okano H, Sawamoto K. (2006) Subventricular zone-derived neuroblasts migrate and differentiate into mature neurons in the post-stroke adult striatum. *J Neurosci.* 2006 Jun 14; 26(24):6627-36.

Yan YP, Sailor KA, Lang BT, Park SW, Vemuganti R, Dempsey RJ. (2007) Monocyte chemoattractant protein-1 plays a critical role in neuroblast migration after focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2007 Jun; 27(6):1213-24.

Yang GY, Gong C, Qin Z, Liu XH, Lorrin Betz A. (1999) Tumor necrosis factor alpha expression produces increased blood-brain barrier permeability following temporary focal cerebral ischemia in mice. *Brain Res Mol Brain Res.* 1999 May 21; 69(1):135-43.

Yong VW, Power C, Forsyth P, Edwards DR. (2001) Metalloproteinases in biology and pathology of the nervous system. *Nat Rev Neurosci.* 2001 Jul; 2(7):502-11.

Zhang R, Zhang Z, Wang L, Wang Y, Gousev A, Zhang L, Ho KL, Morshead C, Chopp M. (2004) Activated neural stem cells contribute to stroke-induced neurogenesis and neuroblast migration toward the infarct boundary in adult rats. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2004 Apr; 24(4):441-8.

Zhao Y, Patzer A, Gohlke P, Herdegen T, Culman J. (2005) The intracerebral application of the PPARgamma-ligand pioglitazone confers neuroprotection against focal ischaemia in the rat brain. *Eur J Neurosci.* 2005 Jul; 22(1):278-82.

Zheng Z, Yenari MA. (2004) Post-ischemic inflammation: molecular mechanisms and therapeutic implications. *Neurol Res.* 2004 Dec; 26(8):884-92.

del Zoppo GJ, Milner R, Mabuchi T, Hung S, Wang X, Berg GI, Koziol JA. (2007) Microglial activation and matrix protease generation during focal cerebral ischemia. *Stroke*. 2007 Feb; 38(2 Suppl):646-51.

8 Danksagung

Ganz besonderer Dank gilt Dr. Matthias Schilling und Prof. Dr. Wolf-Rüdiger Schäbitz, die mir dieses interessante Thema zur Bearbeitung anvertraut und mich während der gesamten Promotionszeit unterstützt und motiviert haben.

Ebenso möchte ich mich sehr bei Herrn Prof. Dr. Wolf-Michael Weber bedanken, der so freundlich war, die Betreuung von biologischer Seite zu übernehmen.

Herrn Prof. Dr. Reinhard Kiefer gilt ebenfalls mein Dank, der das Modell der knochenmarkchimären Mäuse, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre, in unserem Labor etabliert hat.

In all den Jahren der Zusammenarbeit bin ich zu der Überzeugung gelangt, dass niemand hochwertigere Gefrierschnitte anfertigen kann als Antje Stöber. Für die angenehme und freundliche Arbeitsatmosphäre und stete Hilfsbereitschaft möchte ich mich herzlich bei ihr bedanken. Ohne ihre Hilfe wäre es so nicht möglich gewesen.

Für die tatkräftige Unterstützung bei der Generierung unserer chimären Mäuse gilt besonderer Dank Frau Karin Wacker.

Dass eigentlich niemals schlechte Laune oder Frust aufkam habe ich vor allem Maike Hoppen, Martina Oberländer, Sevgi Sevimli, Stella Robert, Anne Humberg und Ruth Brüffer zu verdanken. Solche Kolleginnen kann man sich nur wünschen.

Und zu guter Letzt natürlich mein lieber Studienkollege Dr. Heiner Nattkämper, den ich seit dem ersten Studientag nicht losgeworden bin. Vielen Dank, Heiner. Das war eine großartige Zeit!