

Aus der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Untersuchung der Depletion von Mikroglia durch CSF-1R Inhibitor in
einem experimentellen Schlaganfallmodell

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Leonard Sievernich

Datum der Promotion: 25.06.2023

1.	Inhaltsverzeichnis	
1.	Inhaltsverzeichnis	2
2.	Tabellen- und Abbildungsverzeichnis	5
2.1.	Abbildungen	5
2.2.	Tabellen	5
3.	Abkürzungsverzeichnis	7
4.	Zusammenfassung	9
5.	Abstract	10
6.	Einleitung	11
6.1.	Schlaganfall – Epidemiologie, Therapie und Pathophysiologie	11
6.2.	Mikrogliareaktionen im experimentellen Schlaganfall	14
6.3.	Mikroglia-depletionsmodelle	18
6.4.	Fragestellung	20
7.	Material und Methoden	21
7.1.	Material	21
7.1.1.	Reagenzien und Chemikalien	21
7.1.2.	Medikamente	21
7.1.3.	Antikörper	22
7.1.4.	Puffer und Lösungen	23
7.1.5.	Geräte und Verbrauchsmaterialien	23
7.1.6.	Software	24
7.2.	Methoden	26
7.2.1.	Mäuse	26
7.2.2.	Herstellung und Verabreichung von BLZ945 – Suspension	26
7.2.3.	Schlaganfallmodell	26
7.2.4.	Klinischer Score und Gewicht	27

7.2.5.	Perfusion und Organentnahme.....	28
7.2.6.	Hirnschnitte für histologische Untersuchungen	28
7.2.7.	Immunhistochemie	28
7.2.8.	Mikroskopie und Zellquantifizierung	29
7.2.9.	Durchflusszytometrie (FACS – Fluorescence-activated cell sorting).....	29
7.2.10.	Magnetresonanztomographie (MRT).....	31
7.2.11.	Infarktvolumetrie	31
7.2.12.	Statistik.....	32
8.	Ergebnisse.....	33
8.1.	Mikroglia-depletion durch CSF-1 Rezeptor Inhibitor	33
8.1.1.	FACS-Analyse	33
8.1.2.	CSF-1 Rezeptor Inhibitor bewirkt keine Veränderung des Gewichts oder des Verhaltens	37
8.1.3.	CSF-1 Rezeptor Inhibitor depletiert selektiv Mikroglia	37
8.2.	Mikroglia-depletion im Schlaganfallmodell.....	45
8.2.1.	Infarktvolumetrie im Depletionsmodell 1. Kohorte.....	45
8.2.2.	Infarktvolumetrie im Depletionsmodell 2. Kohorte.....	47
8.2.3.	Klinischer Score und Gewicht.....	48
8.2.4.	CSF-1 Rezeptor Inhibitor depletiert myeloide Zellen im MCAO-Modell.....	50
8.2.5.	Charakterisierung myeloider Zellen 3 Tage nach MCAO	52
8.2.6.	Immunstatus 7 Tage nach MCAO.....	55
9.	Diskussion.....	59
9.1.	Diskussion der Ergebnisse	59
9.2.	Limitationen	62
9.3.	Ausblick	64
10.	Literaturangaben.....	66

11. Appendix.....	83
11.1. Eidesstattliche Versicherung.....	83
11.2. Lebenslauf	84
11.3. Danksagung	86

2. Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

2.1. Abbildungen

Abbildung 1: Zeitlicher Verlauf der pathophysiologischen Prozesse in der Penumbra des ischämischen Schlaganfalls	13
Abbildung 2: Funktionszustände von Mikroglia und Makrophagen in der ZNS-Ischämie	17
Abbildung 3: Infarktvolumetrie im MRT	32
Abbildung 4: Depletionsexperiment – Ablauf	33
Abbildung 5: Gatingstrategie Blut	34
Abbildung 6: Gatingstrategie Gehirn	35
Abbildung 7: Gatingstrategie Milz.....	36
Abbildung 8: Depletionsexperiment – Gewicht	37
Abbildung 9: Depletionsexperiment - Quantifizierung von Mikroglia	38
Abbildung 10: Depletionsexperiment - Durchflusszytometrie Gehirn	40
Abbildung 11: Depletionsexperiment - Durchflusszytometrie Blut	42
Abbildung 12: Depletionsexperiment - Durchflusszytometrie Milz	44
Abbildung 13: CSF-1 Rezeptor Inhibitor im Schlaganfallmodell – Ablauf	45
Abbildung 14: CSF-1 Rezeptor Inhibitor im MCAO Modell – Infarktvolumetrie 1.Kohorte	46
Abbildung 15: CSF-1 Rezeptor Inhibitor im MCAO Modell – Infarktvolumetrie 2.Kohorte	48
Abbildung 16: Gewicht und Klinischer Score 1. Kohorte	49
Abbildung 17: Gewicht und Klinischer Score 2. Kohorte	50
Abbildung 17: CSF-1 Rezeptor Inhibitor im MCAO-Modell - Quantifizierung von Mikroglia und Makrophagen.....	51
Abbildung 18: CSF-1 Rezeptor Inhibitor im MCAO-Modell – Teilungsaktivität von Mikroglia ..	52
Abbildung 19: CSF-1 Rezeptor Inhibitor im MCAO-Modell – Expression von iNOS und Arginase-1	54
Abbildung 20: CSF-1 Rezeptor Inhibitor im MCAO Modell - Durchflusszytometrie Gehirn .	56
Abbildung 21: CSF-1 Rezeptor Inhibitor im MCAO Modell - Durchflusszytometrie Blut	57
Abbildung 22: CSF-1 Rezeptor Inhibitor im MCAO Modell - Durchflusszytometrie Milz	58

2.2. Tabellen

Tabelle 1: Reagenzien und Chemikalien	21
---	----

Tabelle 2: Medikamente	21
Tabelle 3: Antikörper Durchflusszytometrie	22
Tabelle 4: Immunhistochemie - Primärantikörper.....	22
Tabelle 5: Immunhistochemie - Sekundärantikörper	23
Tabelle 6: Puffer und Lösungen.....	23
Tabelle 7: Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	23
Tabelle 8: Software.....	24
Tabelle 9: Klinischer Score.....	27

3. Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
BDNF	brain-derived neurotrophic factor
BSA	Bovines Serumalbumin
Ca	Kalzium
CCR2	C-C chemokine receptor 2
CD	cluster of differentiation
c-KIT	stem cell growth factor receptor KIT
cMRT	cerebrale Magnetresonanztomographie
CSF-1R	colony stimulating factor 1 receptor
CX ₃ CR1	CX ₃ C chemokine receptor 1
DAMP	danger associated molecular pattern
DAPI	4'6'-Diamidino-2-Phenylindol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	fluorescence activated cell sorting
Flt3	receptor-type tyrosine-protein kinase Flt3
FSC	Vorwärtsstreulicht
GCV	Ganciclovir
gfp	green fluorescent protein
HSVTK	herpes simplex thymidine kinase
Iba-1	ionized calcium-binding adapter molecule 1
iDTR	inducible diphtheria toxin receptor
IFN- γ	Interferon γ
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
iNOS	inducible nitric oxide synthase
Ly6C	lymphocyte antigen 6c
MHCI	major histocompatibility complex II
M ϕ	Makrophage
NDS	Normal donkey serum

NGS	Normal goat serum
P2Y ₁₂ Rezeptor	P2Y purinoceptor 12
PBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
PDGFR- β	platelet-derived growth factor β
PFA	Paraformaldehyd
RNS	reactive nitrogen species
ROS	reactive oxygen species
SD	Standardabweichung
SSC	Seitwärtsstreulicht
TGF- β	transforming growth factor β
TLR-4	toll-like receptor 4
tMCAO	transient middle cerebral artery occlusion
TNF- α	tumor necrosis factor α
YM-1	heparin binding lectin
ZNS	Zentrales Nervensystem

4. Zusammenfassung

Der ischämische Schlaganfall ist eine der weltweit häufigsten Erkrankung, die hohe Mortalität und Morbidität verursacht. Die wirksamste zugelassene Therapiemaßnahme ist die medikamentöse oder mechanische Rekanalisation der betroffenen Arterie. Aufgrund des hohen Blutungsrisikos besteht jedoch ein enges Zeitfenster, so dass die Therapie häufig nicht angewendet werden kann. Weitere ähnlich wirksame medikamentöse Therapien, die auch später zum Einsatz kommen könnten, fehlen bisher. Die Schädigung des zentralen Nervensystems (ZNS) durch die Ischämie löst eine Immunreaktion aus, die sowohl mit der zusätzlichen Schädigung des ZNS wie auch mit der Reparatur und Regenerierung des ZNS in Verbindung gebracht wird. Mikroglia sind ortsständige Immunzellen im ZNS, die diese Immunreaktion initiieren, steuern und zudem als Effektorzellen tätig sind. Sie stellen daher ein interessantes Ziel für neue Therapien dar. Ob Mikroglia nach einem ischämischen Schlaganfall das ZNS weiter schädigen oder protektive Funktionen ausüben, ist aufgrund methodischer Limitationen der experimentellen Modelle zur Untersuchung der Mikroglia bisher unklar.

In dieser Arbeit verwendeten wir einen CSF-1R Inhibitor in C57Bl/6J Mäusen um Mikroglia zu depletieren. Wir untersuchten Gehirn, Milz und Blut mittels Durchflusszytometrie und Immunhistologie und konnten zeigen, dass Mikroglia depletiert werden. In einem zweiten Experiment untersuchten wir den Effekt der Mikrogliadepletion im experimentellen Schlaganfallmodell. Nach erfolgter Mikrogliadepletion wurde mittels Fadenokklusion der mittleren zerebralen Arterie eine transiente Ischämie (tMCAO) herbeigeführt. Mittels zerebraler Magnetresonanztomographie (cMRT) evaluierten wir die Infarktgrößen und konnten an Tag 7, nicht jedoch an Tag 1 und 7, einen signifikanten Unterschied der Infarktvolumina in den behandelten Mäusen beobachten. In den Infarktgebieten der depletierten Mäuse konnten wir mittels Immunhistologie und Durchflusszytometrie stark teilungsaktive Mikroglia und Makrophagen finden. Die überlebenden Mikroglia und Makrophagen zeigten zudem eine vermehrte Expression von Arginase-1, was auf eine anti-inflammatorische Funktion hinweisen könnte.

Zusammenfassend unterstreichen die Ergebnisse dieser Arbeit die Rolle der Mikroglia in der Pathophysiologie des ischämischen Schlaganfalls und geben Ansätze, um das therapeutische Potential dieser Zellen für die Therapie des ischämischen Schlaganfalls zu nutzen.

5. Abstract

Ischemic stroke is one of the leading causes for mortality and morbidity worldwide. The most effective and approved treatment is pharmacological or mechanical recanalization of the blocked artery. Since recanalization therapy is only applicable during a short period of time due to the high risk of bleeding, many patients do not receive this treatment. Unfortunately, equally effective pharmacological treatment that could be used in later stages of the disease are not available. Ischemic brain injury triggers a response of the immune system which has been associated both with adding additional damage to the brain tissue as with initiating repair and regeneration. Microglia, the resident immune cells of the brain, initiate and regulate this immune response and aswell play a role as effector cells, thus present a promising target for new therapies. It is currently under debate whether microglia protect or harm the brain tissue after an ischemic stroke. Much of this uncertainty is due to methodological limitations of the models that are used to investigate microglia.

In this study, we used a CSF-1R inhibitor in C57Bl/6J mice to deplete microglia. Using flow cytometry and immune histology, we show that the inhibitor depletes Microglia. Next, we examined the effect of the microglia depletion in an experimental stroke model. For this, we induced a transient cerebral ischemia by occluding the middle cerebral artery (tMCAO) with a filament in mice that had been treated with the inhibitor. Using cerebral magnetic resonance imaging we evaluated the effect of microglia depletion on stroke volume and found a significant difference of stroke volume on day 7 but not on day 1 or 3. Utilizing both flow cytometry and immune histology we examined the infarct areas of the treated animals and found microglia and macrophages that were highly proliferative. In addition, we found surviving microglia and macrophages that expressed arginase-1, hinting for possible anti-inflammatory functions of these cells.

Taken together, these results highlight the pivotal role of microglia in the pathophysiology of ischemic stroke and hint for approaches on how to utilize the therapeutic potential of these cells.

6. Einleitung

6.1. Schlaganfall – Epidemiologie, Therapie und Pathophysiologie

Als Schlaganfall wird der meist plötzlich („schlagartig“) einsetzende Funktionsausfall von Teilen des Gehirns, Rückenmarks oder der Retina aufgrund einer Durchblutungsstörung bezeichnet, die den Untergang von Neuronen zur Folge hat¹. Unter dem Begriff „Schlaganfall“ werden ischämische und hämorrhagische Schlaganfälle zusammengefasst, die sich in ihrer Pathologie und Therapie unterscheiden. Ischämische Schlaganfälle sind durch eine Minderdurchblutung des betroffenen Hirnabschnitts gekennzeichnet, bei hämorrhagischen Schlaganfällen kommt es durch eine intrazerebrale Blutung zu einem intrazerebralen Druckanstieg und sekundär zu einer Minderdurchblutung des Gehirns. Ungefähr 80 % aller Schlaganfälle sind ischämisch². Ischämische Schlaganfälle können vielfältige Ursachen haben, zu den häufigsten Ursachen zählen arterio-arterielle und kardiogene Embolien sowie Stenosen und Verschlüsse als Folge von makro- und mikroangiopathischen Veränderungen der hirnversorgenden Gefäße^{2,3}. Die meisten ischämischen Schlaganfälle befinden sich im Versorgungsgebiet der A. cerebri media².

Ischämische Schlaganfälle sind eine der häufigsten Ursachen für Mortalität und Morbidität weltweit⁴. Die Inzidenz ischämischer Schlaganfälle betrug 2015 weltweit 5.4 Millionen Fälle, die Prävalenz 24.9 Millionen. Fälle. Weltweit steigen in den letzten Jahren sowohl Inzidenz als auch Prävalenz an. Die Mortalität variiert stark in den unterschiedlichen Ländern und ist in Deutschland in den letzten Jahren um 20 % gesunken^{5,6}. Trotzdem sind ischämische Schlaganfälle weiterhin die zweithäufigste Todesursache in Deutschland⁵.

Die wichtigste therapeutische Maßnahme zur Behandlung des ischämischen Schlaganfalls ist die Rekanalisation des verschlossenen Gefäßes durch Fibrinolytika oder Katheterintervention^{1,7}. Beide Therapien kommen jedoch nur in der akuten Phase zum Einsatz, die systemische Thrombolyse z.B. nur innerhalb eines kurzen Zeitfensters bis 4,5 h nach Beginn der Symptome, da danach das Risiko von schweren Blutungen den zu erwartenden Therapieerfolg überwiegt^{2,3}. Daher kommen diese Therapien in vielen Fällen nicht zum Einsatz, wodurch die therapeutischen Optionen bei diesen Patienten stark eingeschränkt sind. Die weitere Therapie des ischämischen Schlaganfalls richtet sich nach der zugrundeliegenden Ätiologie und beinhaltet unter anderem die Kontrolle von Risikofaktoren und Maßnahmen zur funktionellen Rehabilitation.

Die unterschiedlichen, oben aufgeführten Ursachen führen zur Verminderung des zerebralen Blutflusses im Versorgungsgebiet der betroffenen Arterie. Da es vor allem in den Grenzgebieten zwischen zwei arteriellen Versorgungsgebieten eine überlappende Blutversorgung gibt, sind nicht alle Bereiche gleichsam von der verminderten Blutzufuhr betroffen. In den zentralen Anteilen, dem „Infarktkern“, ist der zerebrale Blutfluss maximal reduziert. Hier kommt es aufgrund der fehlenden Zufuhr von Glukose und Sauerstoff zu einem Zusammenbruch der Energieversorgung aller Zellen, der bei ausbleibender Reperfusion zum Zelluntergang durch Nekrose und Apoptose im betroffenen Gebiet führt⁸. Die Neuronen als stoffwechselaktivster Zelltyp im Gehirn gehen dabei als erstes zugrunde, im zeitlichen Verlauf sterben dann auch die unterschiedlichen Gliazellen. Zwischen den zentralen Anteilen des Schlaganfalls und gesundem Hirngewebe liegt die sogenannte Penumbra. In diesem Bereich ist die Ischämie weniger stark ausgeprägt und es kommt nicht zu einem sofortigen Zelluntergang. Die Neuronen dieses Bereich sind geschädigt und dysfunktional, können sich aber regenerieren und ihre Funktion wiedererlangen⁹. Innerhalb der Penumbra laufen nach der Ischämie verschiedene Prozesse ab, die die geschädigten und fragilen Neuronen in der Penumbra in den Zelltod treiben können (s. Abbildung 1). Einer der Prozesse, der sehr früh abläuft, ist die sogenannte glutamaterge Exzitotoxizität. Dabei kommt es aufgrund des Energiemangels zu einem Zusammenbruch des neuronalen Membranpotentials, was zur neuronalen Glutamatfreisetzung führt. Glutamat öffnet als Neurotransmitter weitere Ionenkanäle und depolarisiert die umgebenden Neuronen (was in sogenannten peri-infarziellen Depolarisationen resultiert), wodurch in diesen Neuronen ebenfalls Glutamat freigesetzt wird. Das in diesem „Teufelskreis“ freigesetzte Glutamat bewirkt in den Neuronen einen starken Kationen- und Wassereinstrom und verursacht so ein zytotoxisches Ödem. Hierdurch kann es zum Anschwellen des gesamten Infarktgebietes kommen, was die Verdrängung und Schädigung wichtiger Hirnstrukturen zur Folge haben kann. Das freigewordene Glutamat bewirkt des Weiteren eine starke Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} Konzentration, was neben der vermehrten Produktion von Entzündungsmediatoren und freien Radikalen über die Aktivierung von Caspasen in die Apoptose führt⁸. In ihrer Gesamtheit führen diese Prozesse ebenfalls zum Untergang von Neuronen und sind daher ein interessantes Ziel in der Entwicklung neuer Therapien. Aufgrund der zeitlichen Verzögerung, mit der diese Prozesse zum Untergang von Neuronen führen, könnten diese Therapien vermutlich auch in Patienten eingesetzt werden, die aufgrund des knappen Zeitfensters bisher keine wirksame Therapie erhalten können.

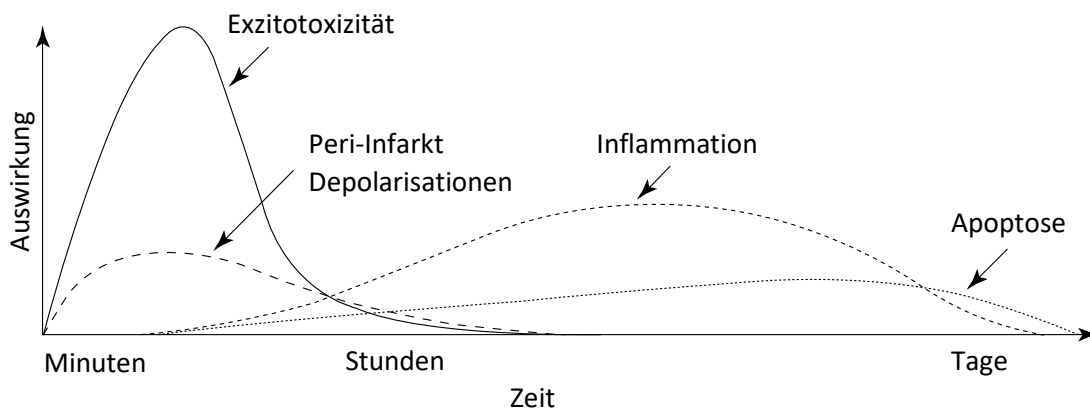


Abbildung 1: Zeitlicher Verlauf der pathophysiologischen Prozesse in der Penumbra des ischämischen Schlaganfalls (Abbildung aus Dirnagl et al. 1999)

Zur Untersuchung des menschlichen Schlaganfalls wurden verschiedene Tiermodelle vor allem in Ratten und Mäusen entwickelt, die auf unterschiedliche Weise eine Ischämie im zentralen Nervensystem (ZNS) induzieren. Häufig verwendet werden u.a. die chirurgische Okklusion, die Okklusion mit einem intraarteriellen Faden, die pharmakologisch-induzierte Okklusion und die photothrombotisch induzierte Ischämie. Die Modelle unterscheiden sich hinsichtlich der Dauer der Ischämiezeit, der Reperfusionzeit und ihrer Invasivität und bilden verschiedene Teilaspekte des menschlichen Schlaganfalls nach, da kein Modell die Vielzahl an Ätiologien, Komorbiditäten, Altersdifferenzen und anatomischen Varianten im Menschen in ihrer Gesamtheit nachahmen kann. Insbesondere der zeitliche Verlauf der neuronalen Schädigung sowie der Reparatur- und Regenerationsprozesse ist in allen Mausmodellen deutlich kürzer als im humanen Schlaganfall. Eine der häufigsten Ätiologien und Lokalisationen des humanen ischämischen Schlaganfalls ist die fokale Ischämie im Stromgebiet der A. cerebri media, ausgelöst durch eine Thromboembolie³. Das Fadenokklusionsmodell, bei dem im Bereich der A. cerebri media eine transiente Ischämie und anschließende Reperfusion induziert wird, bildet diese Konstellation des humanen Schlaganfalls gut nach. Für die Untersuchung der postischämischen Immunreaktion ist dieses Modell aufgrund der geringen Invasivität, der relativ ähnlichen Aktivierung des Immunsystems sowie der Ausbildung einer Penumbra vergleichsweise gut geeignet¹⁰.

Die durch die Ischämie getriggerte Immunreaktion ist ein komplexer Prozess, der in seinem Ablauf und Funktion nur unvollständig verstanden ist. Wie auch in anderen ZNS-Pathologien wird durch die Immunreaktion eine Vielzahl von Funktionen vermittelt, die sowohl protektive wie

auch schädigende Wirkung auf das Hirngewebe haben. So spielt die Immunreaktion nach einem ischämischen Schaden im ZNS eine wichtige Rolle bei der Regeneration des ischämischen Gebiets, kann aber auch zur sekundären Vergrößerung des ischämischen Schadens beitragen^{11,12}. Die Immunreaktion im Rahmen der ZNS-Ischämie aktiviert alle zellulären und humoralen Anteile des Immunsystems und ist in einer Vielzahl von Arbeiten untersucht worden^{8,11–13}. Den Beginn der Immunreaktion prägen Mikroglia und hirnständige Makrophagen, die zum nicht-adaptiven Teil des Immunsystems gehören. Sie rekrutieren und regulieren weitere Immunzellen, steuern so die Immunantwort und sind auch selbst als Effektorzellen tätig¹⁴. Als nächste Population von Immunzellen akkumulieren vor allem neutrophile Granulozyten und Monozyten aus dem Blut. Neutrophile Granulozyten produzieren reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies und betreiben Phagozytose, wodurch sie einerseits zur Entfernung von Zelldebris und toxischem Material beitragen als auch durch die Exazerbation des oxidativen Stresses Neuronen und der Blut-Hirn-Schranke weiteren Schaden zufügen^{15,16}. Murine Monozyten können nach ihrer Expression des *lymphocyte antigen 6c* (Ly6C) in Ly6C^{hi} und Ly6C^{lo} Monozyten eingeteilt werden. Ly6C^{hi} Monozyten werden auch als „*inflammatory monocytes*“ bezeichnet, da sie im Rahmen von inflammatorischen Prozessen schnell aus dem Blut zum Ort der Schädigung rekrutiert werden und dort in Effektorzellen wie monozytäre Makrophagen oder dendritische Zellen differenzieren. Im Rahmen der ZNS-Ischämie können sie die sekundäre Schädigung des ZNS verhindern und tragen zum Regenerationsprozess des ischämischen Schadens bei^{17,18}. Ly6C^{lo} Monozyten verbleiben dagegen überwiegend im Gefäßsystem, wandern am Endothel entlang und werden deshalb auch „*patrolling monocytes*“ genannt. Sie spielen im Allgemeinen beim sogenannten „*remodelling*“ des geschädigten Gewebes, einer später stattfindenden Phase der Immunreaktion eine Rolle, scheinen aber auf den Verlauf der ZNS-Schädigungen keinen Einfluss zu nehmen^{19,20}. Auch das adaptive Immunsystem ist mit etwas zeitlicher Verzögerung an der Immunreaktion beteiligt. Unterschiedliche T-Zellpopulationen tragen sowohl zur weiteren Schädigung des Gewebes durch die Produktion zytotoxischer Mediatoren wie auch zur Einleitung der Regeneration bei¹².

6.2. Mikrogliareaktionen im experimentellen Schlaganfall

Unter allen an der postischämischen Immunreaktion beteiligten Immunzellen nehmen Mikroglia eine zentrale Position ein. Zum einen gehören sie zu den ersten Zellen, die im Gebiet der Schädigung akkumulieren und so früh Einfluss auf den Verlauf nehmen können, zum anderen

sind Mikroglia an der Initiierung, Regulierung und Auflösung der Immunreaktion beteiligt und stellen so ein zentrales Steuerungselement der Immunreaktion im ZNS dar. Mikroglia machen ungefähr 10 % der gesamten Zellen im ZNS aus und sind die wichtigsten ortsständigen Immunzellen im Gehirn²¹. Sie gleichen in ihrer Funktion gewebsspezifischen mononukleären Makrophagen und gehören zum nicht-adaptiven Immunsystem. Anders als die meisten Gewebemakrophagen entstammen Mikroglia dem Dottersack, aus dem sie während der Embryonalentwicklung in das ZNS einwandern²². Während die meisten gewebsspezifischen Makrophagen in anderen Organen konstant durch einwandernde Monozyten aus dem Blut erneuert werden, sind Mikroglia langlebige Zellen, die sich eigenständig erneuern^{23,24}. Neben ihrer Rolle als Immunzellen unterstützen Mikroglia unter physiologischen Bedingungen die normale Hirnfunktion. Sie beeinflussen die Bildung von neuronalen Verbindungen, indem sie redundante Synapsen phagozytieren und über trophische Faktoren wie z.B. den *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) das Wachstum von Neuronen und die Formierung neuer synaptischer Verbindungen fördern²⁵. Dadurch sind sie für die normale Entwicklung des Gehirns und Funktionen wie Gedächtnis und Lernen wichtig^{25,26}.

Unter homöostatischen Bedingungen sind Mikroglia gleichmäßig im ZNS verteilt und besitzen weitreichende, vielfach verzweigte und bewegliche Zellfortsätze, mit denen sie in engem Kontakt zu den umliegenden Zellen stehen^{27,28}. An ihren Zellfortsätzen exprimieren Mikroglia eine Vielzahl von Rezeptoren für Zytokine, Chemokine, Komplementfaktoren, Neurotransmitter und *danger associated molecular patterns* (DAMP), mit denen sie ihre Umgebung konstant überwachen²⁷. Nehmen sie über die genannten Rezeptoren eine pathologische Veränderung wahr, kommt es zu einer als „Aktivierung“ bezeichneten Transformation des Aktivitätszustands und aus den überwachenden Mikroglia werden immunologisch aktive Zellen^{21,28}. Aktivierte Mikroglia nehmen eine runde, amöboide Form an, verlieren ihre Fortsätze und bewegen sich in das Gebiet der Schädigung²⁹. Neben den morphologischen Veränderungen verändern sich auch die Funktionen aktivierter Mikroglia. Sie aktivieren weitere Teile des Immunsystems durch die Produktion verschiedener Zytokine und Chemokine und der Präsentation von Antigenen. Im weiteren Verlauf sind sie an der Regulation und Auflösung der Immunreaktion beteiligt. Zudem sind sie als Phagozyten und durch ihre Funktion, reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies (ROS/RNS) zu produzieren, wichtige Effektorzellen des Immunsystems.

Aus Untersuchungen an Makrophagen ist bekannt, dass das breite Funktionsspektrum nach der Aktivierung der Zellen entscheidend vom aktivierenden Stimulus geprägt wird. Davon ausgehend wurden unterschiedliche Funktions- oder Polarisationszustände für Makrophagen definiert, die durch die *in vitro*-Stimulation von Makrophagen mit unterschiedlichen Substanzen induziert wurden^{30,31}. Grundsätzlich wird zwischen pro-inflammatorischen (M1) und antiinflammatorischen (M2) Makrophagen unterschieden (s. Abbildung 2)³¹. Als M1 bezeichnete Makrophagen werden durch das von T_H1 Zytokin Interferon- γ (IFN- γ), Lipopolysaccharid und *toll-like-receptor* 4 (TLR-4) aktiviert und stimulieren das Immunsystem über pro-inflammatorisch wirksame Zytokine wie Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Interleukin-1 (IL-1) und IL-6^{32,33}. Sie produzieren zudem reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies und Proteasen und vermitteln so zytotoxische Effekte^{32,34}. Anti-inflammatorische M2 Makrophagen, die je nach Subtyp durch das T_H2 Zytokin IL-4, IL-10 oder *transforming growth factor* β (TGF- β) aktiviert werden, üben eine Vielzahl von anti-inflammatorischen und die Geweberegeneration begünstigende Funktionen aus^{32,35,36}. Sie produzieren anti-inflammatorische Zytokine wie IL-10, TGF- β und IL-1R Antagonisten und können so die Entzündungsreaktion hemmen. Durch Phagozytose beseitigen sie Zelldebris und toxische Stoffe im Gebiet der Schädigung; ein Schritt, der für die Einleitung der Regeneration von entscheidender Bedeutung ist und auf molekularer Ebene unter anderem durch die vermehrte Expression von Scavengerrezeptoren vermittelt wird. Auch in der daraufhin einsetzenden Reparatur- und Regenerationsphase spielen Makrophagen eine wichtige Rolle. Im ZNS stimulieren sie z.B. durch die Produktion von Wachstumsfaktoren wie z.B. BDNF oder IGF-1 die Neurogenese, das axonale Wachstum und die Wiederherstellung von neuronalen Verbindungen^{37,38}. Die dichotome Einteilung in pro- und anti-inflammatorische Zellen ist jedoch *in vivo* nicht so klar abgrenzbar wie *in vitro*. Beispielsweise werden Marker für die unterschiedlichen Subtypen von einzelnen Zellen parallel exprimiert, so dass die Einteilung in pro- und anti-inflammatorische Zellen am ehesten die beiden Extreme eines breiten funktionellen Spektrums darstellen. Zudem sind Mikroglia und Makrophagen sehr plastische Zellen, die ihre Funktionen der Umgebung anpassen können.

Im Rahmen der ZNS-Ischämie haben Mikroglia und Makrophagen durch die oben dargestellten Funktionen sowohl neuroprotektive als auch schädigende Effekte auf die überlebenden Neuronen in der Penumbra. Neuroprotektive Effekte wie die Phagozytose von Zelldebris, die Induktion der Neurogenese durch die Ausschüttung von Wachstumsfaktoren und die Hemmung

der Immunantwort werden vor allem durch anti-inflammatorisch aktive Mikroglia und Makrophagen vermittelt. Pro-inflammatorische Mikroglia und Makrophagen können neurotoxische Effekte durch die Produktion von ROS, Phagozytose von Neuronen und der Produktion von pro-inflammatorischen Molekülen auslösen³². Phagozytose kann sowohl neuroprotektiv wie auch neurotoxisch wirken. So kann die Phagozytose von geschädigten, aber noch lebende Neuronen in der Penumbra zu weiterem Zellerntgang führen, gleichzeitig ist die Phagozytose von toxischem Zelldebris und pro-inflammatorischen neutrophilen Granulozyten ein wichtiger Schritt für die Einleitung der Geweberegeneration³⁹⁻⁴².

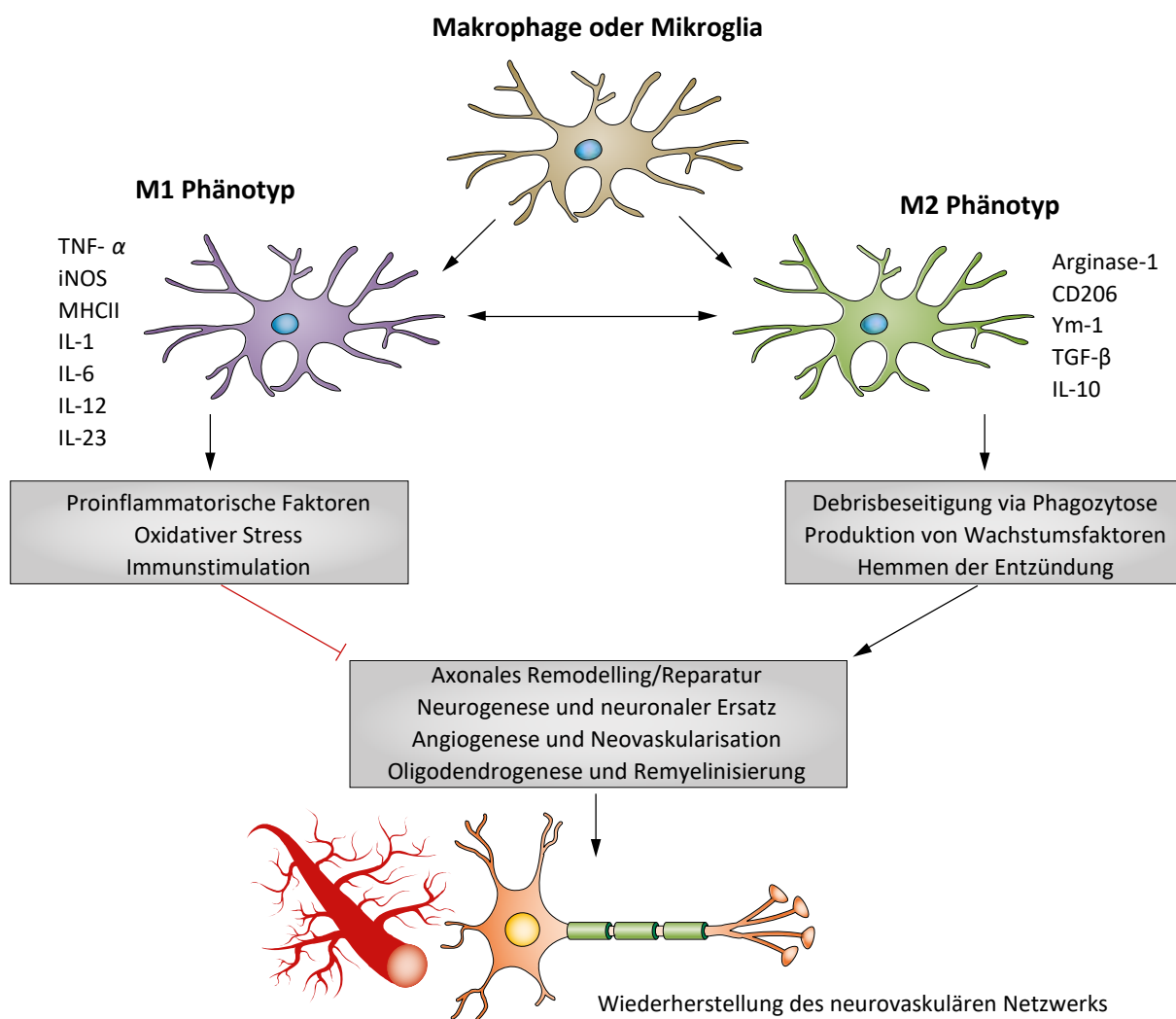


Abbildung 2: Funktionszustände von Mikroglia und Makrophagen in der ZNS-Ischämie Makrophagen und Mikroglia können verschiedene Funktionszustände einnehmen; Mikroglia produzieren TNF- α , iNOS, verschiedene pro-inflammatorische Zytokine und hemmen so die Regeneration nach ischämischer ZNS-Schädigung. Mikroglia exprimieren und produzieren aber auch Arginase-1, TGF- β sowie verschiedene anti-inflammatorische Zytokine. Sie stimulieren die Regeneration durch die Phagozytose von toxischen Stoffen, der Produktion von trophischen Faktoren

und hemmen die Entzündungsreaktion. Mikroglia und Makrophagen können zudem ihren Funktionszustand ändern (Abbildung geändert aus Hu et al. 2014)³².

Im Verlauf der ZNS-Ischämie kommen die unterschiedlichen Funktionen von Makrophagen und Mikroglia zu verschiedenen Zeitpunkten zum Tragen. In einem experimentellen Schlaganfallmodell konnten Hu et al.⁴³ beobachten, dass Mikroglia und Makrophagen im ischämischen Gebiet in der akuten Phase hauptsächlich M2-Marker exprimieren, diese im weiteren Verlauf jedoch herunterreguliert werden und die Zellen stattdessen vermehrt M1-Markern exprimieren. Diese Transition könnte einen wichtigen Angriffspunkt darstellen, um zusätzlichen Schaden durch die Immunreaktion zu verhindern³².

6.3. Mikroglia-depletionsmodelle

Um die Funktionen von Mikroglia zu untersuchen wurden verschiedene Modelle entwickelt um Mikroglia zu depletieren, sie weisen jedoch teils erhebliche Limitationen auf^{44,45}. So existieren genetische und pharmakologische Verfahren mit variierender Mikroglia-spezifität und Nebenwirkungen. Das *CX₃CR1^{cre^{ER};}iDTR* Mausmodell^{25,46} besitzt eine durch Tamoxifen induzierbare Cre-Rekombinase unter Kontrolle des *CX₃CR1* Promoters und einen Diphtherietoxinrezeptor (DTR) unter einem ubiquitär exprimierten Promoter mit einer von loxP flankierten Stoppkassette, die die Expression des DTR verhindert. *CX₃CR1* wird im Gehirn hauptsächlich von Mikroglia und in der Peripherie u.a. von Makrophagen, Monozyten und dendritischen Zellen exprimiert. Durch Gabe von Tamoxifen wird die Cre-Rekombinase in allen *CX₃CR1* exprimierenden Zellen aktiviert: Diese inaktiviert daraufhin die Stoppkassette und fördert so die Expression des DTR. Die Zellspezifität für Mikroglia wird durch Ausnutzen der unterschiedlichen Lebensspanne von Mikroglia und peripheren Immunzellen erreicht. Die Ablation der Zellen durch die Gabe von Diphtherietoxin (DT) findet 8 Wochen nach der Induktion der DTR-Expression durch Tamoxifen statt. Zu diesem Zeitpunkt sind alle peripheren Zellen, die den DTR exprimieren bereits ersetzt und nur die wesentlich länger lebenden Mikroglia exprimieren noch den DTR. Das Modell zeigt eine hohe Spezifität und reduziert Mikroglia um ca. 90 %. Limitationen dieses Modells bestehen durch die Freisetzung von pro-inflammatorischen Zytokinen, der Induktion einer Entzündungsreaktion im Gehirn und dem Aktivieren von Astrozyten^{25,46,47}.

Das *CD11b-HSVTK*-System ist ein weiteres Depletionsmodell, mit dem Mikroglia unter Verwendung einer transgenen Mauslinie depletiert werden können^{48,49}. In diesem wird das für

die Thymidinkinase des Herpes simplex Virus kodierende *hsvtk*-Gen unter Kontrolle des *CD11b* Promoters exprimiert. Bei gleichzeitiger Gabe von Ganciclovir (GCV) entstehen in *CD11b* exprimierenden Zellen durch die Thymidinkinase toxische Metabolite, die in die DNA eingebaut werden und zum Tod der Zelle führen. *CD11b* wird im Gehirn vor allem von Mikroglia und in der Peripherie von allen myeloiden Zellen exprimiert. GCV ist myelotoxisch und führt zusammen mit der Eliminierung der *CD11b* exprimierenden Zellen zu einer letalen Knochenmarksinsuffizienz. Daher wird nach der GCV-Gabe eine Knochenmarkstransplantation mit Ganzkörperbestrahlung durchgeführt. In diesem Modell wird die Zahl der Mikroglia nicht reduziert, sondern vielmehr ihre Aktivierung verhindert. Die Depletion von Mikroglia kann durch eine Modifikation des Modells erreicht werden, indem GCV intrazerebral mit einer Pumpe verabreicht wird. Dadurch wird eine Reduktion der Mikroglia um 90% nach 2 Wochen erreicht. Probleme dieses invasiven Modells sind die Beeinträchtigung der Blut-Hirn-Schranke durch die Implantation der GCV-Pumpe und die Ganzkörperbestrahlung, die zur Infiltration peripherer Immunzellen führen kann. Auch hier wurde eine Reaktion der Astrozyten mit nachfolgender Astrogliose beobachtet.

Eine pharmakologische Möglichkeit, Mikroglia zu depletieren, ist die Verwendung von CSF-1R Inhibitoren. Der *colony stimulating factor 1* Rezeptor (CSF-1R) wird durch seine beiden Liganden CSF-1 und IL34 stimuliert und reguliert die Proliferation, Differenzierung, Chemotaxis und das Überleben von Makrophagen und Monozyten^{50,51}. In der Peripherie wird der Rezeptor von Makrophagen und Monozyten exprimiert, im ZNS von Mikroglia und einzelnen hippocampalen Neuronen im ZNS^{50,52,53}. CSF-1 kann von einer Vielzahl von Zellen wie Fibroblasten, Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Makrophagen selbst produziert werden. Die über den CSF-1 Rezeptor vermittelten Wachstumssignale sind entscheidend für die Entwicklung von Mikroglia, so haben *CSF-1R*^{-/-} Mäusen keine und *CSF-1*^{+/-} Mäuse eine deutlich reduzierte Anzahl von Mikroglia^{22,54}. In erwachsenen Mäusen ist es durch die Verwendung von CSF-1R Inhibitoren möglich, diesen Signalweg ohne die Verwendung von transgenen Konstrukten zu untersuchen. CSF-1R Inhibitoren inhibieren die Autophosphorylierung der mit dem Rezeptor assoziierten Tyrosinkinase und verhindern so die intrazelluläre Signalweiterleitung. In erwachsenen Mäusen induzieren ZNS-gängige CSF-1R Inhibitoren die Apoptose von Mikroglia und eliminieren so innerhalb von 3 Wochen über 90 % aller Mikroglia⁵⁵⁻⁵⁷. Die Depletion hat keine Verhaltensänderungen oder kognitive Defizite zur Folge. Effekte auf andere Zellen im ZNS wurden nicht beobachtet und die Depletion löste weder eine Entzündungsreaktion noch eine

erhöhte Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke aus^{57,58}. Veränderungen der peripheren Immunzellen im Blut und in der Milz wurden bisher nicht beobachtet⁵⁷. Es existieren unterschiedliche CSF-1R Inhibitoren, die sich in ihrer Spezifität für den CSF-1R und ihrer Potenz unterscheiden. PLX3397 inhibiert neben dem CSF-1R auch die Tyrosinkinase c-KIT und kann daher potentiell die Hämatopoese beeinflussen⁵⁸. Der in dieser Arbeit benutzte CSF-1R Inhibitor BLZ945 inhibiert in geringem Maße c-KIT, PDGFR- β und Flt3 (IC₅₀ jeweils ca. drei Zehnerpotenzen höher als für CSF-1R)⁵⁶.

6.4. Fragestellung

Mikroglia sind ortständige Immunzellen im Gehirn, die die postischämische Immunreaktion im Rahmen eines ischämischen Schlaganfalls initiieren und steuern. In bisherigen Studien wurden ihnen sowohl schädigende als auch protektive Funktionen zugeschrieben, so dass ihr therapeutisches Potential weiterhin unklar ist. Ein Grund dafür liegt in den vielfältigen Limitationen der bisher verwendeten Modelle zur Untersuchung von Mikroglia. Ziel dieser Arbeit ist es daher, zunächst durch die Verwendung eines CSF-1R Inhibitors Mikroglia zu depletieren und dieses Depletionsmodell zu charakterisieren. Im nächsten Schritt soll durch die Verwendung des Depletionsmodells die Rolle der Mikroglia im Ischämiemodell untersucht werden.

7. Material und Methoden

7.1. Material

7.1.1. Reagenzien und Chemikalien

Tabelle 1: Reagenzien und Chemikalien

Reagenz/Chemikalie	Hersteller
4'6'-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich; Taufkirchen, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich; Taufkirchen, Deutschland
D-(+)-Glukose	Sigma-Aldrich; Taufkirchen, Deutschland
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	Gibco; Karlsruhe, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth; Karlsruhe, Deutschland
FluorSave Reagent®	Merck; Darmstadt, Deutschland
Lyse Puffer BD Pharm Lyse™	BD Bioscience; Heidelberg, Deutschland
Methylzellulose	Sigma-Aldrich; Taufkirchen, Deutschland
Natriumazid	Roth; Karlsruhe, Deutschland
Normal donkey serum (NDS)	Biozol; Eching, Deutschland
Normal goat serum (NGS)	Biozol; Eching, Deutschland
Paraformaldehyd, reinst	Roth; Karlsruhe, Deutschland
Percoll	GE Healthcare; Little Chalfont, UK
Salzsäure 37 %, reinst	Roth; Karlsruhe, Deutschland
Sucrose	Sigma-Aldrich; Taufkirchen, Deutschland
Tris-Base	Sigma-Aldrich; Taufkirchen, Deutschland
Tris-Hydrochlorid	Roth; Karlsruhe, Deutschland
Triton-X-100	Sigma-Aldrich; Taufkirchen, Deutschland
Tween 20	Sigma-Aldrich; Taufkirchen, Deutschland
Tween 80	Sigma-Aldrich; Taufkirchen, Deutschland

7.1.2. Medikamente

Tabelle 2: Medikamente

Medikament	Hersteller
Buprenorphinhydrochlorid	RB Pharmaceuticals Limited; Berkshire, UK
BLZ945 (CSF-1 Rezeptor Inhibitor)	Novartis; Basel, Schweiz
Sevofluran, Sevofluran	AbbVie, Wiesbaden, Deutschland
Ketaminhydrochlorid	Pfizer Pharmacia GmbH; Berlin, Deutschland
Lidocain (1%)	B. Braun; Melsungen, Deutschland
Xylazinhydrochlorid	Bayer AG; Leverkusen, Deutschland

7.1.3. Antikörper

Durchflusszytometrie

Tabelle 3: Antikörper Durchflusszytometrie

Antikörper	Fluorochrom	Klon	Hersteller	Verdünnung
α -CD11b	PerCP-Cy5.5	M1/70	BD Bioscience	1:200
α -Ly6C	APC-Cy7	HK1.4	Biolegend	1:200
α -CD115	PE	AFS98	Biolegend	1:200
α -F4/80	Brilliant Violet 421	BM8	Biolegend	1:200
α -MHCII	PE-Cy7	M5/114.15.2	Biolegend	1:400
α -CD45	FITC	30-F11	Biolegend	1:200
α -CD11c	APC	N418	Biolegend	1:200
Fc-Block (CD16/CD32)		93	Biolegend	1:100

Immunhistochemie

Tabelle 4: Immunhistochemie - Primärantikörper

Primärantikörper	Host	Hersteller	Verdünnung
α -Iba-1	rabbit	Wako	1:500
α -Iba-1	goat	Abcam	1:200
α -Ki-67	rabbit	Abcam	1:200
Primärantikörper	Host	Hersteller	Verdünnung

α -Arginase I (M-20)	goat	Santa Cruz	1:200
α -iNOS/NOS Type II	mouse	BD Bioscience	1:200
α -CD45	rat	BD Bioscience	1:500
α -P2Y ₁₂ R	rabbit	Sigma Aldrich	1:200

Tabelle 5: Immunhistochemie - Sekundärantikörper

Sekundärantikörper	Hersteller	Verdünnung
Alexa fluor 488 donkey α -rabbit	Invitrogen	1:250
Alexa fluor 568 donkey α -goat	Invitrogen	1:250
Alexa fluor 488 donkey α -mouse	Invitrogen	1:250
Alexa fluor 568 donkey α -goat	Invitrogen	1:250
Alexa fluor 647 donkey α -rabbit	Invitrogen	1:250
Alexa fluor 568 donkey α -rabbit	Invitrogen	1:250
Alexa fluor 488 donkey α -rat	Invitrogen	1:250

7.1.4. Puffer und Lösungen

Tabelle 6: Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
4 % PFA/PBS; pH 7,4	1 x PBS; 40 g/l Paraformaldehyd; 2 Pellets NaOH
FACS-Puffer	1 x PBS; 2 % FKS; 2 mM EDTA
TBS; pH 7,4	42 mM Tris HCL; 8 mM Tris Base; 154 mM NaCl
TBST (SDS-PAGE); pH 8,0	10 mM Tris Base; 150 mM NaCl; 0,05 % Tween

7.1.5. Geräte und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 7: Geräte und Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
0.2 μ m Filter	GE Healthcare; München, Deutschland
0.5-, 1.5-ml Safe-Lock tubes	Eppendorf; Hamburg, Deutschland
1-, 5-, 20 ml Spritzen	BD Bioscience; Heidelberg, Deutschland

Produkt	Hersteller
70 µm Cell Strainer	BD Bioscience; Heidelberg, Deutschland
Burker 7 T PharmaScan® 70/16	Bruker BioSpin; Ettlingen, Deutschland
CCD Kamera	Vilber; Eberhardzell, Deutschland
Cryostat HM 560	Microm International GmbH; Walldorf, Deutschland
Deckgläschen (24 x 50 mm)	Roth; Karlsruhe, Deutschland
Electronic Scale JJ3000 A Waage	G&G GmbH; Neuss, Deutschland
Extended Fine Tip NS	Alpha Laboratories; Hampshire, England
FACS Canto II	BD Bioscience; Heidelberg, Deutschland
FACS-Röhrchen	BD Bioscience; Heidelberg, Deutschland
Falcon Tubes (14, 15, 50 ml)	BD Bioscience; Heidelberg, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop DM-RA2	Leica; Wetzlar, Deutschland
Invers Mikroskop Zoom 2000	Leica; Wetzlar, Deutschland
Konfokales Mikroskop TSC, SP5	Leica; Wetzlar, Deutschland
MultiGuard barrier tips	Sorenson BioScience; Utah, USA
Multipipette	Eppendorf; Hamburg, Deutschland
OptimaTMMMax-XP-Ultracentrifuge	Beckmann Coulter; Krefeld, Deutschland
pH meter pH100	VWR International; Darmstadt, Deutschland
Pipettenspitzen	Sarstedt; Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipetten 5/10/25 ml	BD Bioscience; Heidelberg, Deutschland
Small Animal Monitoring & Gating	SA Instruments; NY, USA
Sterilbank Biowizard Typ KR-130	Kojair Tech Oy; AD Vught, Niederlande
SuperFrost Ultra plus Objektträger	R. Langenbrinck; Emmendingen, Deutschland
Zentrifuge Biofuge pico	Heraeus; Hanau, Deutschland
Zentrifuge Universal 32 R Type 1610	Hettich Zentrifugen; Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge Universal 320 R Typ 1460	Hettich Zentrifugen; Tuttlingen, Deutschland
Zentrifuge Universal 30 F	Hettich Zentrifugen; Tuttlingen, Deutschland

7.1.6. Software

Tabelle 8: Software

Software	Hersteller
Analyze 11.0	AnalyzeDirect, Inc.; Lenexa USA
FlowJo	TreeStar Inc.; Oregon, USA
GraphPad Prism 6	GraphPad Software, Inc.; CA, USA
ImageJ	National Institutes of Health, Maryland, USA
Paravision 5.1 Bruker	BioSpin, Ettlingen, Deutschland

7.2. Methoden

7.2.1. Mäuse

Alle Tierversuche wurden von Frau Dr. Chotima Böttcher unter Einhaltung der geltenden Tierschutzgesetze durchgeführt und vom Landesamt für Gesundheit und Soziales des Landes Berlin (LAGeSo) genehmigt.

Für alle Experimente wurden C57Bl/6J Mäuse verwendet.

7.2.2. Herstellung und Verabreichung von BLZ945 – Suspension

BLZ945 ist ein kommerziell erhältlicher CSF-1 Rezeptor Inhibitor (Novartis; Basel, CH). Es wurde eine Suspension von BLZ945 mit Methylzellulose und Tween 80 hergestellt. Dazu wurde die Methylzellulose in einem Verhältnis von 0.5 % Gewicht/Volumen in heißem Wasser gelöst und über Nacht bei 4° C gelagert. Anschließend wurde Tween 80 in einem Verhältnis von 0.5 % Volumen/Volumen hinzugefügt und gelöst. Abschließend wurde BLZ945 unter Rühren hinzugegeben.

Frau Dr. Böttcher hat den Mäusen einmal täglich mittels Gavage BLZ945 in einer Dosis von 200 mg/Kg Körpergewicht verabreicht. Die Kontrollgruppe erhielt die gleiche Menge an Trägersubstanz ohne BLZ945. Im Depletionsexperiment erhielten die Mäuse 4 bzw. 7 Tage lang BLZ945/Kontrolllösung, im Depletionsexperiment mit MCAO erhielten die Mäuse 4 Tage lang vor und weitere 3 bzw. 7 Tage lang nach Auslösen der Ischämie BLZ945/Kontrolllösung (s. Abbildung 4 und Abbildung 13).

7.2.3. Schlaganfallmodell

Alle Schlaganfallexperimente wurden von Herrn Dr. Fernández-Klett durchgeführt. Wie von Fernández-Klett et al. beschrieben⁵⁹, wurde zur Modellierung des Schlaganfalls eine transiente fokale Ischämie durch Okklusion der A. cerebri media ausgelöst. Die Narkose wurde nach der Narkoseeinleitung während des gesamten Eingriffs mit 1.0 % bis 1.5% Sevofluran in 70% N₂O/30% O₂ aufrechterhalten und die Körpertemperatur mittels Wärmeplatte konstant zwischen 37.1 °C und 37.5°C gehalten. Die linke A. carotis interna wurde aufgesucht und inzisiert. Danach wurde ein silikonbeschichteter Faden in die Arterie eingeführt und so weit vorgeschoben, bis die A. cerebri media verschlossen wurde. Die Okklusionszeit betrug 60 min. Nach der Okklusion wurde unter erneuter Narkose der Faden zurückgezogen, um die Reperfusion der A. cerebri media zu gewährleisten.

7.2.4. Klinischer Score und Gewicht

Die Mäuse wurden mit Beginn des Experiments täglich gewogen. Nach Auslösen der Ischämie wurde zur klinischen Überwachung täglich zur gleichen Uhrzeit ein klinischer Score nach der untenstehenden Tabelle erhoben und die einzelnen Punktwerte summiert. Der minimale Punktwert beträgt 0 (gesund), der maximale Punktwert beträgt 8 (schwer betroffen).

Tabelle 9: Klinischer Score

Punkte	0	0,5 (1 Item) – 1 (>1 Item)	1,5 (1 Item) – 2 (>1 Item)
Verhalten	Wach, aufmerksam, reagiert auf Umgebungsreize	Reduzierte Aufmerksamkeit, Maus zeigt weniger Interesse für Umwelt, nur wenige Schritte nach moderater Stimulation (< 3)	Lethargisch, keine Bewegung nach moderater Stimulation, kein Interesse für Umwelt
Haltung	physiologisch	Im Großen und Ganzen normal, aber etwas unsichere Bewegungen, gelegentlich Entlastungshaltungen	Aufgekrümmter Rücken, unsichere Bewegungen, evtl. Zittern
Haut und Haarkleid	Fell glatt, glänzend und anliegend, Fellpflege wird gründlich ausgeführt	Glanzlos, Fell etwas struppig, Fellpflege reduziert	Struppiges, glanzloses Fell Keine Fellpflege
Augen	Physiologisch, keine Konjunktivitis	Augen offen und klar, aber Augenausfluss (serös)	Augen fast geschlossen bzw zusammengekniffen, Auge macht trüben Eindruck, Augenausfluss (serös, gelegentlich mukös)

Atmung	Normal, keine Auffälligkeiten	Seröser Nasenausfluss	Verschärfte Atmung, Nasenausfluss, evtl. Anzeichen von Hyperventilation beim Handling
--------	-------------------------------	-----------------------	---

Um das Tierwohl zu wahren wurden Tiere, die einen Gewichtsverlust von mehr als 20 % des initial bestimmten Körpergewichts, offensichtliche Schmerzen, anhaltende Apathie über 24h nach MCAO oder epileptische Anfälle zeigten, entsprechend der laborinternen SOPs vorzeitig getötet.

7.2.5. Perfusion und Organentnahme

Die Mäuse wurden von Frau Dr. Böttcher mit einer Mischung aus Ketamin und Xylazin narkotisiert und nach dem Erlöschen der Schmerzreflexe durch eine mediane Inzision die Bauchhöhle eröffnet. Es erfolgte die Entnahme von 2 mL Blut aus der V. cava zur Untersuchung mittels Durchflusszytometrie und nach der Eröffnung des Brustraums die transkardiale Perfusion einer 4°C kalten PBS Lösung. Das entnommene Blut wurde mit Citrat versetzt, um die Gerinnung zu verhindern. Zur Untersuchung mittels FACS wurde im weiteren Milz und Gehirn präpariert und entnommen. Bis zur Messung wurden alle Proben in FACS Puffer auf Eis gelagert. Zur Untersuchung des Gehirns mittels Immunhistochemie wurden vor der Präparation und Entnahme des Gehirns 10 mL einer 4°C kalten Paraformaldehydlösung transkardial perfundiert.

7.2.6. Hirnschnitte für histologische Untersuchungen

Zunächst wurden die Gehirne 48 h in Paraformaldehyd bei 4° C postfixiert. Danach wurden die Gehirne in Sucrose bei 4° C kryopräserviert. Die Gehirne wurden bei – 50 ° C schockgefroren und mit Mounting Medium umhüllt. Anschließend wurden die Gehirne in koronarer Schnitfführung an Positionen 2.80, 1.54, 1.14 und -1.82 nach Bregma geschnitten und jeweils 12 Schnitte mit einer Schichtdicke von 30 µm gesammelt. Die Lagerung erfolgte „free-floating“ in PB und 0.1% Azid bei 4° C.

7.2.7. Immunhistochemie

Die Gehirnschnitte wurden dreimal in TBS für 5 min und anschließend einmal in TBST für 15 min auf dem Schüttler gewaschen. Danach erfolgte das Blocken unspezifischer Bindungen mit 10% NDS oder NGS, entsprechend dem Sekundärantikörper, für 1 h bei RT auf dem Schüttler.

Anschließend wurde die Primärantikörperlösung (s. Tabelle unter Materialien) hinzugegeben und die Schnitte über Nacht bei 4° C auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurde dreimal 10 min in TBS bei RT auf dem Schüttler gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation mit den Sekundärantikörpern (s. Tabelle unter Materialien) in 1% NDS / NGS in TBST für 2 h bei RT auf dem Schüttler unter Lichtschutz. Nach erneutem dreimaligem waschen für 10 min bei RT in TBS wurden die Schnitte für 3 min mit DAPI (1:10000) inkubiert. Anschließend wurde zweimal für 5 min bei RT mit TBS gewaschen. Danach wurden die Schnitte auf den Objektträgern aufgebracht und mit Fluorsave und einem Deckglas abgedeckt. Die Lagerung erfolgte bei 4° C.

7.2.8. Mikroskopie und Zellquantifizierung

Zur Visualisierung und Quantifizierung der antikörperpositiven Zellen in den histologischen Schnitten wurde ein Fluoreszenzmikroskop mit einem 40-fachen Objektiv verwendet. Zur Beurteilung der Kolo-kalisation von Arginase-1 oder iNOS und Iba-1 wurde ein konfokales Mikroskop mit einem 40-fachen Objektiv benutzt.

Die Quantifizierung der immunhistologischen Färbungen erfolgte unter verblindeten Bedingungen. In Gehirnen ohne Schlaganfall wurden in Kortex, Striatum und Hippocampus jeweils 8 Bilder aufgenommen. In Gehirnen mit Schlaganfall wurde unabhängig der Infarktgröße und Lokalisation an vorher definierten Bereichen des Kortex, des Striatums und des Hippocampus jeweils 8 Bilder aufgenommen. Die Zellen wurden anschließend manuell mittels ImageJ quantifiziert.

7.2.9. Durchflusszytometrie (FACS – Fluorescence-activated cell sorting)

Blut

Zur Lysierung der Erythrozyten wurden 200 µl Blut in einem 50 mL Falcontube mit 5 ml Lysepuffer versetzt, 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, danach die Lyse mit 20 ml FACS Pufferlösung gestoppt, mit 300 x g für 8 min bei 4° C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 1 ml FACS Pufferlösung resuspendiert, davon wurden 100 µl in ein FACS-Röhrchen transferiert und anschließend mit 300 x g für 10 min bei 4° C zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurde mit dem Färben fortgeführt (siehe unten).

Milz

Die entnommene Milz wurde durch einen mit 1 ml PBS angefeuchteten 100 µm Nylonfilter in eine Petrischale gedrückt, anschließend in ein 50 mL Falcontube transferiert und mit 300 x g bei

4°C für 8 min zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet zur Lysierung von Erythrozyten in 1 ml Lysepuffer resuspendiert und für 8 min bei RT inkubiert. Danach wurde die Lyse mit 20 ml FACS Puffer gestoppt, mit 300 x g bei 4°C für 8 min zentrifugiert und nach Verwerfen des Überstandes das Pellet in 5 ml FACS Puffer resuspendiert. 2-4 Mio Zellen wurden durch einen 40 µm Nylonfilter filtriert, in ein FACS-Röhrchen transferiert und mit 300 x g bei 4°C für 8 min zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde mit dem Färben der Zellen fortgesetzt (siehe unten).

Gehirn

Nach der Organentnahme wurde das Cerebellum und die Meningen entfernt, das restliche Hirn grob mit Skalpell zerkleinert, durch einen mit 1 ml PBS angefeuchteten 70 µm Nylonfilter in ein 15 mL Falcontube gedrückt und anschließend mit 300 x g bei 4°C für 10 min zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet in 3 ml 35% Percolllösung resuspendiert und mit 800 x g bei 4°C für 25 min ohne Bremse zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand und die Myelinschicht mit einer Pipette entfernt und das Pellet in 1 mL FACS-Puffer resuspendiert, in ein FACS-Röhrchen transferiert und mit 300 x g bei 4° C für 8 min zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurde mit dem Färben fortgesetzt (siehe unten).

Färbung und Messung der Zellsuspensionen

Zur Blockierung von unspezifischen Antigenbindungen wurden die Proben mit 50 µl einer 1:100 in FACS Pufferlösung verdünnten α-CD16/CD32 Fc-Blocklösung für 10 min bei 4° C geblockt. Anschließend wurden 50 µl der Antikörperlösung (Antikörper und Verdünnungen s. Tabelle unter Materialien) hinzugegeben, 20 min bei 4° C inkubiert, anschließend in 1 ml FACS Puffer gewaschen und bei 300 x g, 4° C für 8 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 200 µl FACS Puffer resuspendiert und anschließend in einem FACS Canto II Durchflusszytometer vermessen. Wenn eine spätere Messung im Durchflusszytometer erfolgen sollte, wurden die Zellen mit 100 µl einer 1%igen PFA Lösung für 10 min bei 4°C fixiert, anschließend mit 1 ml FACS Puffer gewaschen, mit 300 g bei 4° C für 8 min zentrifugiert und nach Verwerfen des Überstandes in 200 µl FACS Puffer resuspendiert und danach im Durchflusszytometer vermessen. Die Analyse der Daten erfolgte mit FlowJo, die Gatingstrategie ist in Abbildung 5, Abbildung 6 und Abbildung 7 (s. 34 ff.) dargestellt.

7.2.10. Magnetresonanztomographie (MRT)

An Tag 3 und 7 nach Auslösen der Ischämie wurde mittels zerebraler Magnetresonanztomographie (cMRT) das Infarktvolumen bestimmt. Es wurde ein 7 T Kleintier MRT (PharmaScan® 70/16, Burker BioSpin) mit einem 1H-RF-20 mm Quadratur-Volumenresonator (RAPID Biomedical) verwendet. Zur Akquirierung der Daten und Bildverarbeitung wurde Paravision 5.1 (Burker) verwendet. Zunächst wurden die Mäuse durch Inhalation von 2% Isofluran in 70 % N₂O und 30% O₂ narkotisiert. Nach vollständiger Narkotisierung wurden die Mäuse in der Haltevorrichtung fixiert und die Narkose über eine Inhalationsmaske mit 1.2-1.5 % Isofluran in 70 % N₂O und 30 % O₂ aufrechterhalten. Die Körpertemperatur wurde mit einer Wärmematte konstant gehalten, Herz- und Atemfrequenz kontinuierlich überwacht und die Isofluranzufuhr entsprechend angepasst. Anhand einer Tripilot-Sequenz (Aufnahmeparameter: Sichtfeld: 2.80 x 2.80 cm, Schichtdicke: 1.0 mm, Schichtorientierung: axial, TE: 3.0 ms, TR: 200 ms, 5 Schichten) wurden die Schichtführung an die Lage des Schädels angepasst. Danach erfolgte die Aufnahme von T2-gewichteten TurboRARE Sequenzen im Bereich des Bulbus olfactorius bis zum Kleinhirn (Aufnahmeparameter: Sichtfeld: 2.56 x 2.56 cm, Schichtdicke: 0.5 mm, Schichtorientierung: axial, TE: 36.0 ms, TR: 4200 ms, 20 Schichten).

7.2.11. Infarktvolumetrie

Zur weiteren Bildanalyse der MRT Bilder wurde das Dateiformat mittels ImageJ konvertiert und in Analyze 10 (AnalyzeDirect, Inc., Lenexa USA) semiautomatisch die in der T2-Wichtung hyperintens erscheinende Infarktregion sowie die ipsilaterale und kontralaterale Hemisphäre in jeder Schicht markiert. Anschließend wurden die entsprechenden Volumina automatisch mittels Analyze 10 berechnet. Die Größe der so bestimmten Infarktvolumina variiert aufgrund des zusätzlich entstehenden Ödems insbesondere bei großen Infarkten stark und kann weit vom tatsächlichen Infarktvolumen abweichen. Daher wurden ödemkorrigierte Infarktvolumina verwendet, die nach folgender Formel berechnet wurden ⁶⁰:

$$LVe = HVc + HVi - (HVc + HVi - LVu) * \frac{HVc + HVi}{2HVc}$$

LVe – Infarktvolumen mit Ödemkorrektur, *HVc* – Volumen der kontralateralen Hemisphäre, *HVi* – Volumen der ipsilateralen Hemisphäre, *LVu* – Infarktvolumen ohne Korrektur.

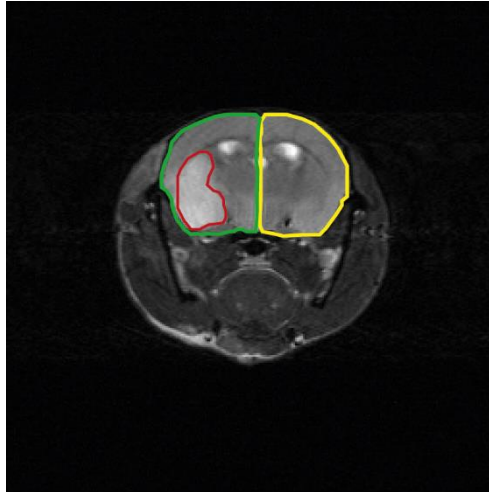


Abbildung 3: Infarktmetrie im MRT - Beispielbild eines T2-gewichteten cMRT-Bildes mit Infarkt. Das Infarktareal ist mit rot, die ipsilaterale Hemisphäre mit grün und die kontralaterale Hemisphäre mit gelb umrandet.

Mäuse, in denen kein Infarkt nachgewiesen werden konnte (Infarktvolumen $<1 \text{ mm}^3$) wurden von der statistischen Analyse ausgeschlossen.

7.2.12. Statistik

Die Mäuse wurden mit Hilfe von Zufallszahlen in die verschiedenen Gruppen randomisiert.

Wenn nicht anders angegeben sind die Ergebnisse als Mittelwerte \pm SD dargestellt. Die verwendeten Tests sind in den jeweiligen Berechnungen angegeben. Alle verwendeten Tests waren zweiseitig, das Signifikanzniveau auf $\alpha=0.05$ gesetzt. Als statistisch signifikant wurden Werte mit $p<0,05$ angesehen und entsprechend gekennzeichnet. Es wurden keine statistischen Methoden zur Berechnung der Gruppengrößen benutzt, orientierte sich jedoch an den üblichen Gruppengrößen vergleichbarer Studien^{57,61}

Alle Berechnungen von statistischen Kenngrößen wurden mit GraphPad Prism 6 durchgeführt.

8. Ergebnisse

8.1. Mikroglia-depletion durch CSF-1 Rezeptor Inhibitor

Das erste Experiment wurde mit dem Ziel gestaltet, die Verträglichkeit des Inhibitors zu prüfen, die Depletion der Mikroglia durch den CSF-1 Rezeptor Inhibitor zu bestätigen und zudem mögliche weitere Effekte auf Immunzellen im Gehirn, der Milz und im Blut aufzudecken. Der Versuchsablauf für dieses „Depletionsexperiment“ ist in Abbildung 4 zusammengefasst.

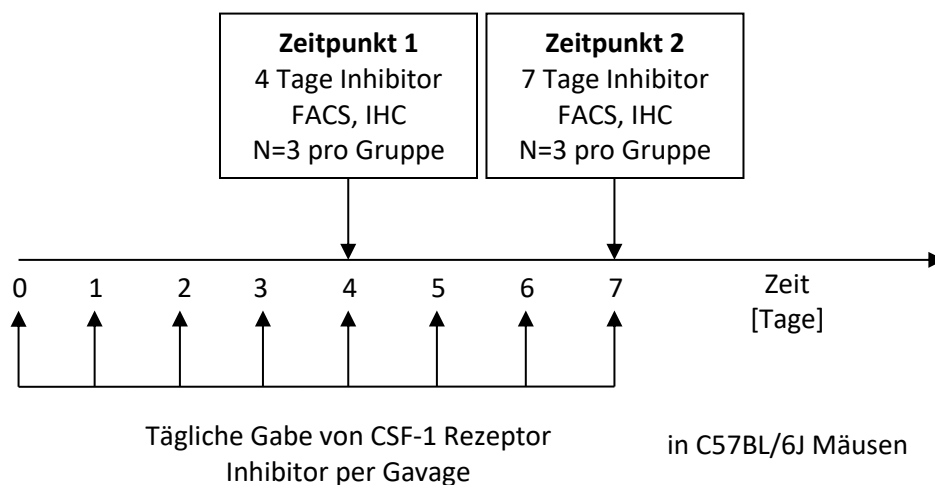


Abbildung 4: Depletionsexperiment – Ablauf Die Mäuse erhielten täglich 200 mg/Kg CSF-1 Rezeptor Inhibitor oder Kontrolllösung per Gavage. Nach 4 bzw. 7 Tagen wurden die Mäuse getötet und Gehirn, Milz und Blut mittels Durchflusszytometrie und Immunhistochemie (nur Gehirn) untersucht. FACS – Durchflusszytometrie, IHC – Immunhistochemie

8.1.1. FACS-Analyse

Zunächst wurde zur Identifizierung und Quantifizierung der verschiedenen Immunzellen in Gehirn, Blut und Milz mittels Durchflusszytometrie die in Abbildung 5, 6 und 7 dargestellten Gatingstrategien etabliert.

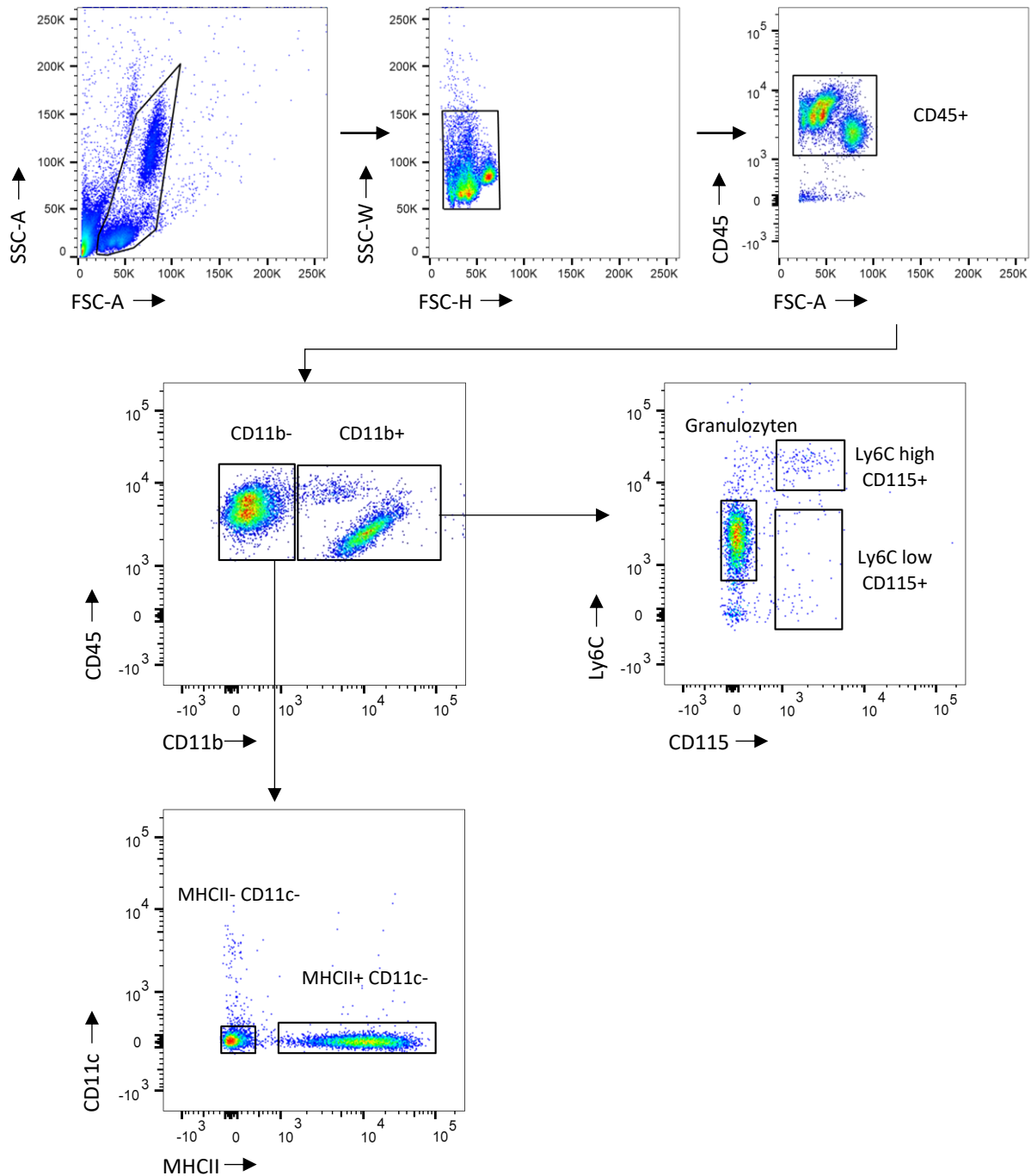


Abbildung 5: Gatingstrategie Blut In den ersten beiden Gatingschritten wurden Zelldebris und Dubletten ausgeschlossen. Danach wurden $CD45^+$ Zellen selektiert und in einem weiteren Schritt in $CD11b^+$ und $CD11b^-$ Zellen unterteilt. Die $CD11b^-$ Zellen wurden nach $CD11c$ und $MHCII$ weiter differenziert und eine $CD11c^-MHCII^+$ -Population (u.a. B-Zellen) und $CD11c^-MHCII^-$ Population (u.a. T-Zellen) unterschieden. Die $CD11b^+$ Zellen wurden nach $Ly6C$ und $CD115$ in Granulozyten ($Ly6C^{int}CD115^-$), $Ly6C^{hi}$ Monozyten und $Ly6C^{lo}$ Monozyten unterteilt.

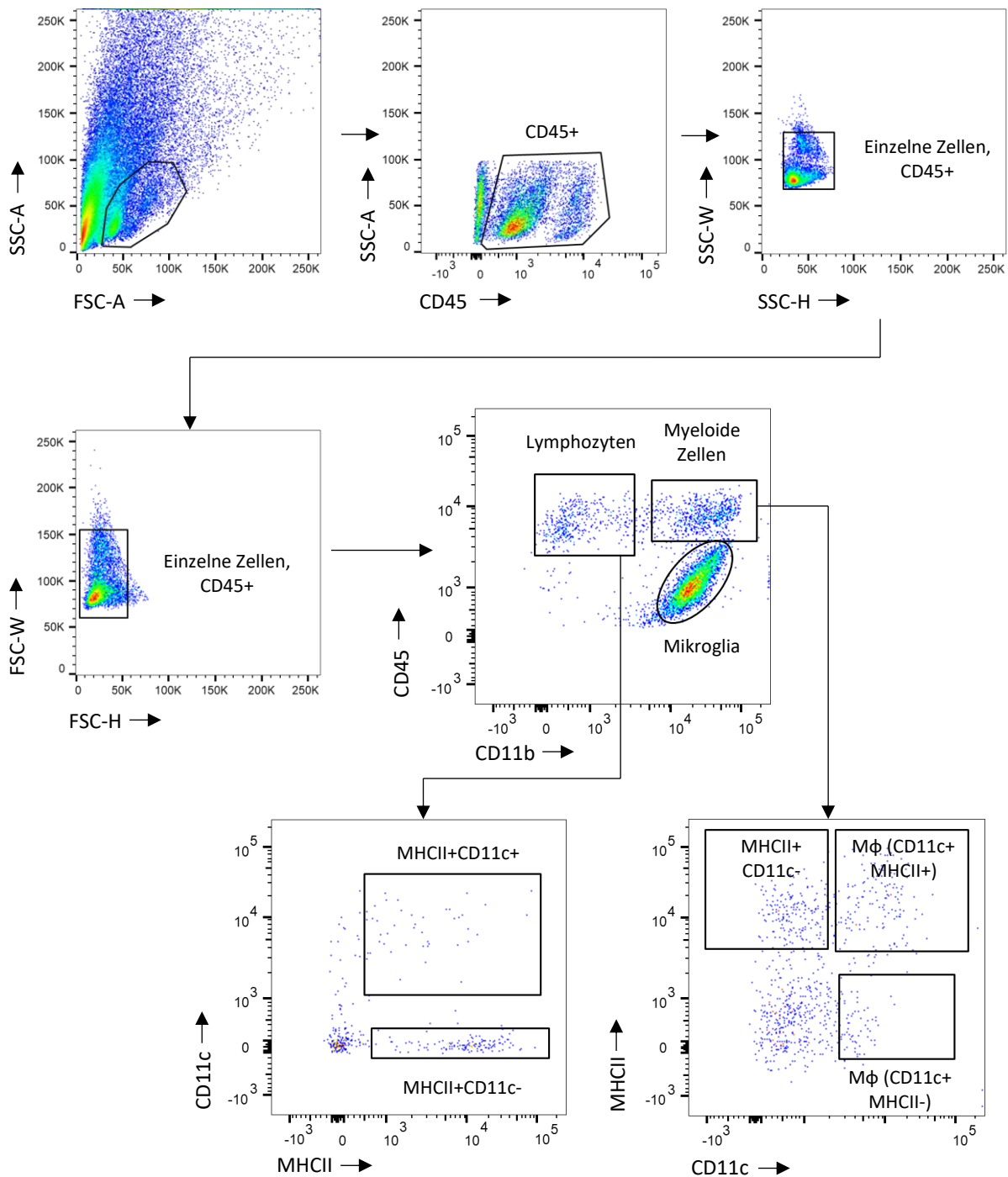


Abbildung 6: Gatingstrategie Gehirn In den ersten 4 Gatingschritten wurden Zelldebris, Myelin, Dubletten ausgeschlossen und $CD45^+$ Zellen selektiert. Danach wurden Lymphozyten ($CD45^{hi}CD11b^-$), myeloide Zellen ($CD45^{hi}CD11b^+$) und Mikroglia ($CD45^{int}CD11b^+$) identifiziert. Innerhalb der Lymphozyten wurden $MHCII^+CD11c^-$ Zellen (u.a. B-Zellen) und $MHCII^+CD11c^+$ Zellen (u.a. dendritische Zellen) differenziert. Innerhalb der myeloiden Zellen wurden $CD11c^+MHCII^+$ und $CD11c^+MHCII^-$ Makrophagen/monozytäre dendritische Zellen ($M\phi$) sowie $MHCII^+CD11c^-$ Zellen differenziert.

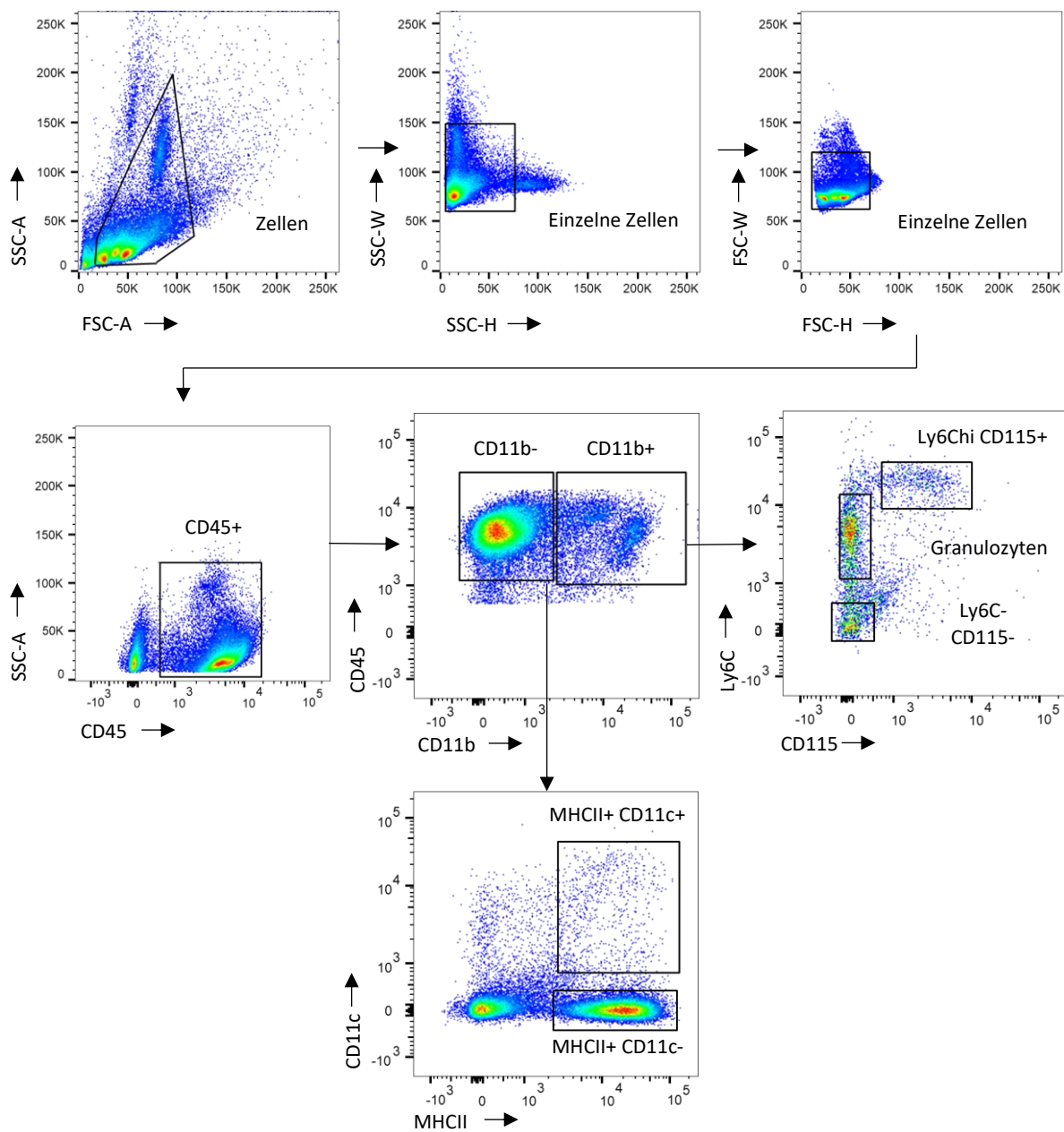


Abbildung 7: Gatingstrategie Milz In den ersten drei Gatingschritten wurden Zelldebris und Dubletten ausgeschlossen. Danach wurden alle CD45⁺ Zellen selektiert und anschließend in CD11b⁺ Zellen und CD11b⁻ Zellen unterteilt. Die CD11b⁻ Zellen wurden weiter in CD11c⁺MHCII⁺ Zellen (u.a. dendritische Zellen) und CD11c⁻MHCII⁺ Zellen (u.a. B-Zellen) unterteilt. Innerhalb der CD11b⁺ Zellen wurden Granulozyten (Ly6C^{int}CD115⁻), Ly6C^{hi} Monozyten und eine Ly6C⁻CD115⁻ Population differenziert.

8.1.2. CSF-1 Rezeptor Inhibitor bewirkt keine Veränderung des Gewichts oder des Verhaltens
 In der täglichen Gewichtskontrolle zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Gruppen (s. Abbildung 8). Es fielen keine offensichtlichen Verhaltensänderungen im täglichen Umgang mit den Mäusen auf.

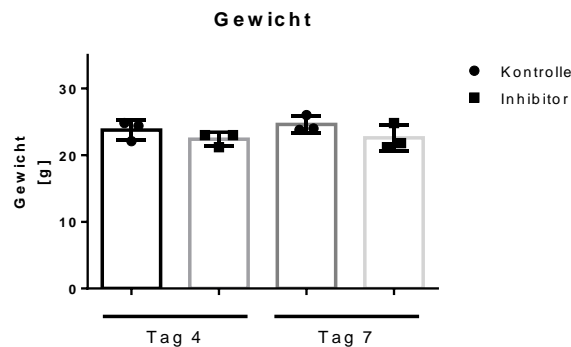


Abbildung 8: Depletionsexperiment – Gewicht Die Mäuse erhielten täglich 200 mg/Kg CSF-1 Rezeptor Inhibitor (respektive Trägerlösung für die Kontrollgruppe) per Gavage für 4 beziehungsweise 7 Tage und wurden täglich vor der Gavage gewogen (beispielhaft wurden hier die Werte für Tag 4 und 7 dargestellt). Die Werte sind dargestellt als Mittelwert \pm SD, $n=3$ pro Gruppe, ungepaarter T-Test, die Gruppen wurden für beide Tage getrennt verglichen.

8.1.3. CSF-1 Rezeptor Inhibitor depletiert selektiv Mikroglia

Um die Effizienz des Depletionsmodells zu bestimmen wurden mittels immunhistochemischer Färbung gegen Iba-1 und durchflusszytometrisch die Mikroglia/Makrophagen identifiziert und quantifiziert (siehe Abbildung 9 A und C sowie Abbildung 10 A). Je nach verwendeter Messmethode zeigte sich nach 4 Tagen eine Reduktion der Mikroglia um 41 % (Immunhistochemie) bzw. 67 % (Durchflusszytometrie). Nach 7 Tagen betrug die Reduktion 31 % (Immunhistochemie) bzw. 62 % (Durchflusszytometrie). Die überlebenden Mikroglia/Makrophagen zeigten keine veränderte Morphologie (Abbildung 9C).

In Anbetracht der unvollständigen Mikroglia-depletion untersuchten wir die überlebenden Mikroglia/Makrophagen mittels immunhistochemischer Färbung gegen Ki-67 und Iba-1 auf ihre Teilungsaktivität. In der Inhibitorgruppe befanden sich bis zu 34 % der überlebenden Mikroglia/Makrophagen in der Zellteilung, während in den Kontrollgruppen keine mitotisch aktive Mikroglia/Makrophagen nachzuweisen waren (s. Abbildung 9 B und C). Mittels Durchflusszytometrie überprüften wir die Möglichkeit einer erhöhten Infiltration von peripheren myeloiden Zellen, die im Trend erkennbar, jedoch nicht signifikant unterschiedlich war (s. Abbildung 10 B).

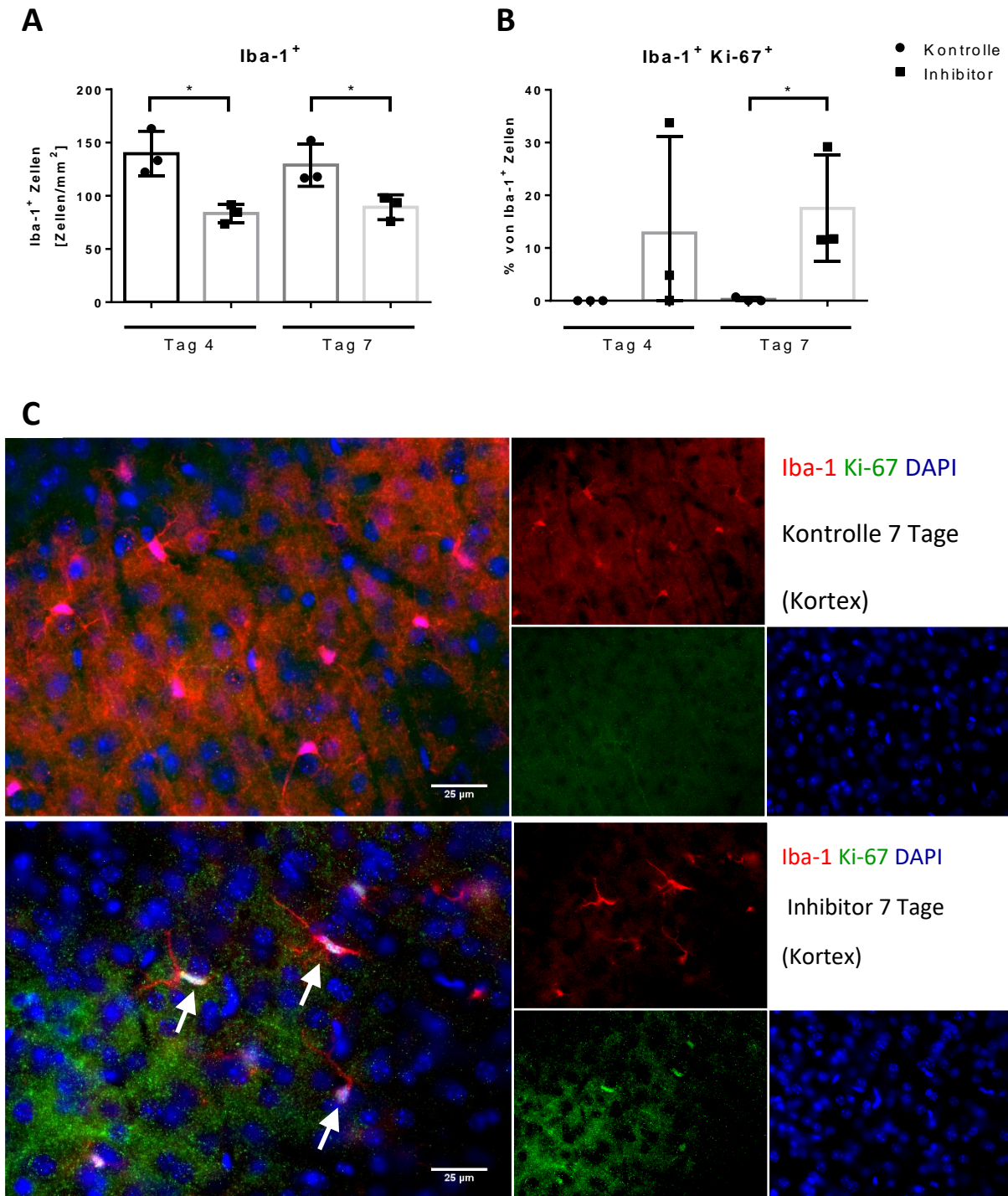


Abbildung 9: Depletionsexperiment - Quantifizierung von Mikroglia Die Mäuse erhielten täglich 200 mg/Kg CSF-1 Rezeptor Inhibitor (respektive Trägerlösung für die Kontrollgruppe) per Gavage für 4 beziehungsweise 7 Tage. **A)** Zur Identifikation und Quantifizierung von Mikroglia wurden Iba-1⁺DAPI⁺ Zellen gezählt. **B)** Zur Bestimmung der Zellteilungsaktivität wurden Iba-1⁺Ki-67⁺DAPI⁺ Zellen gezählt. Quantifizierung in je 8 Bildern von Kortex, Striatum und Hippocampus. **C)** Beispielbilder, die Pfeile zeigen Iba-1 und Ki-67 doppelpositive Zellen an. Die Werte sind dargestellt als Mittelwert \pm SD, $n = 3$ pro Gruppe, *= $p < 0.05$, **= $p < 0.01$, unpaarter T-Test.

Mittels Durchflusszytometrie untersuchten wir weitere Immunzellen im Gehirn, Blut und Milz. Im Gehirn konnte innerhalb der myeloiden Zellen eine Reduktion der CD11c⁺MHCII⁻ Zellen (MHCII⁻ Makrophagen/monozytäre dendritische Zellen) nach 4 Tagen sowie eine geringe Zunahme der CD11c⁺MHCII⁺ Zellen (MHCII⁺ Makrophagen/monozytäre dendritische Zellen) nach 7 Tagen beobachtet werden (Abbildung 10 D-F). Innerhalb der CD11b⁻ Zellen (Lymphozyten) fiel eine statistisch signifikante, aber geringe Zunahme von MHCII⁺CD11c⁺ (vor allem dendritische Zellen) und eine geringe Reduktion von MHCII⁺CD11c⁻ Zellen (vor allem B-Zellen) nach 4 Tagen auf, die zum zweiten Messzeitpunkt jedoch nicht mehr nachweisbar waren (s. Abbildung 10 G und H).

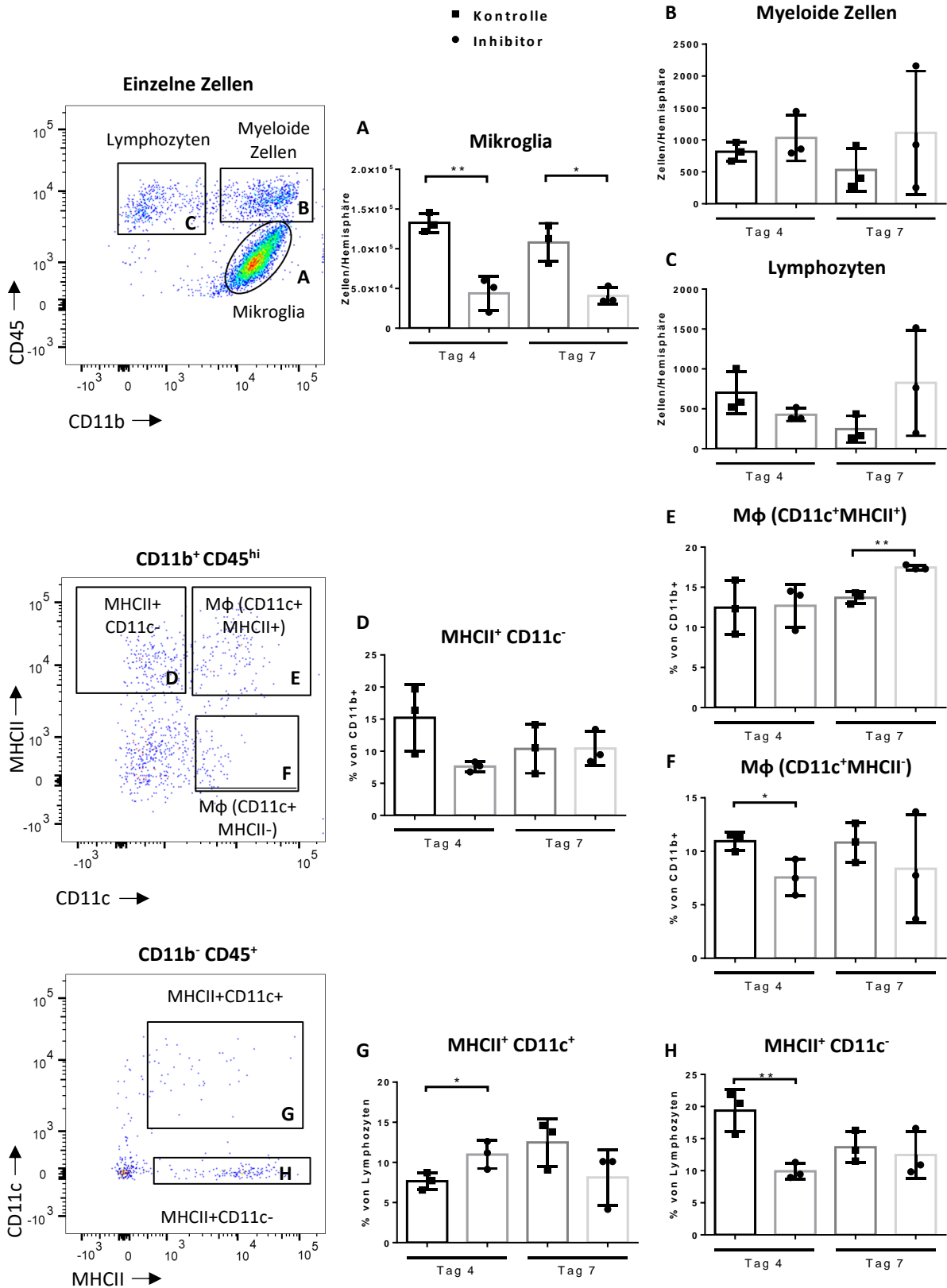


Abbildung 10: Depletionsexperiment - Durchflusszytometrie Gehirn Die Mäuse erhielten täglich 200 mg/Kg CSF-1 Rezeptor Inhibitor (respektive Trägerlösung für die Kontrollgruppe) per Gavage für 4 beziehungsweise 7 Tage. Es

wurde jeweils eine Hemisphäre für die Durchflusszytometrie verwendet. Die Werte sind dargestellt als Mittelwert \pm SD, $n = 3$ pro Gruppe, $*=p < 0.05$, $**=p < 0.01$, ungepaarter T-Test.

Im Blut zeigten sich keine signifikanten Unterschiede innerhalb der untersuchten myeloiden und lymphozytären Zellen (s. Abbildung 11A-G). Allerdings sieht es so aus, als gäbe es eine Reduktion der Monozyten, die aufgrund der zu geringen Fallzahl jedoch nicht signifikant ist (s. Abbildung 11 D und E).

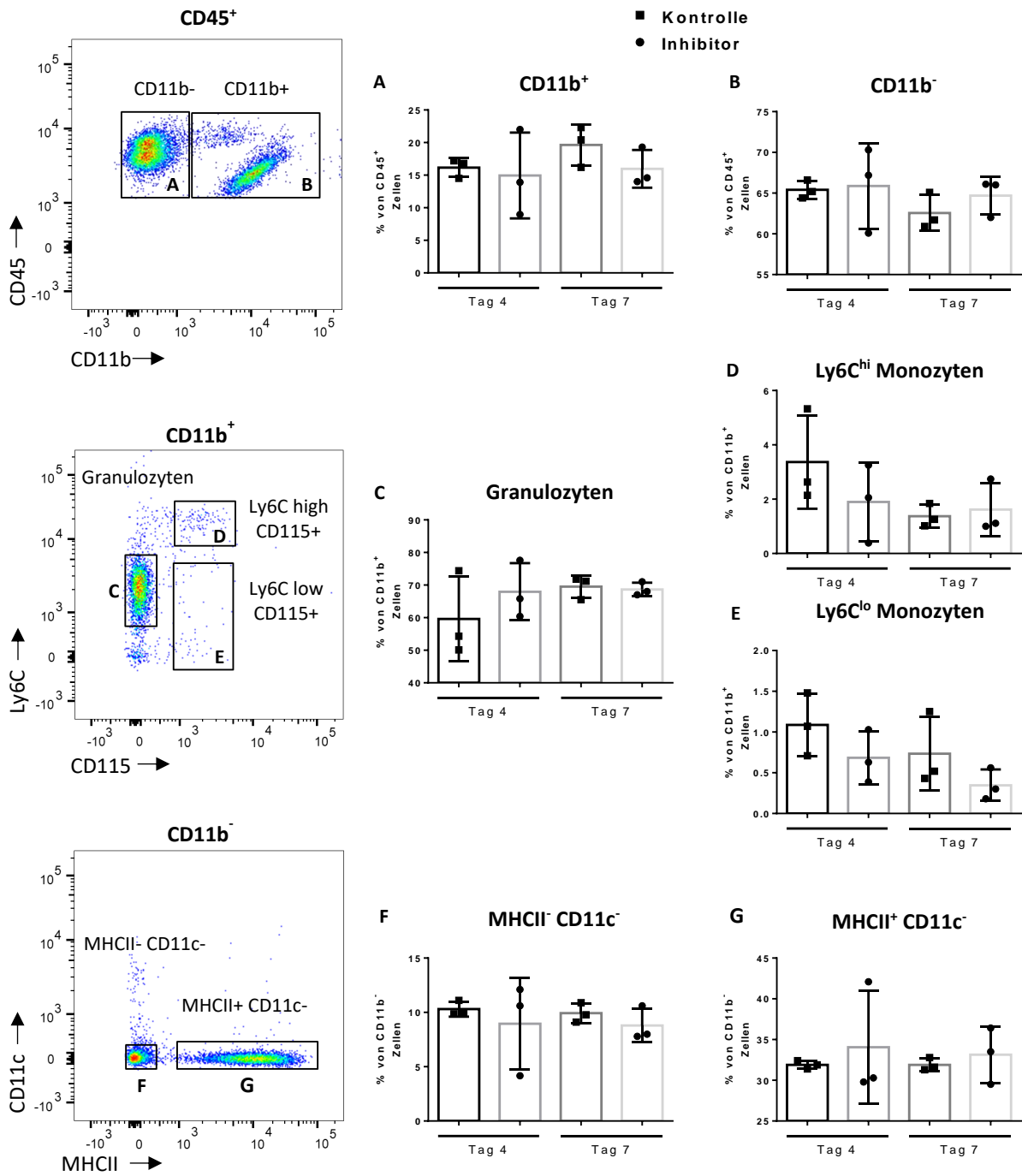


Abbildung 11: Depletionsexperiment - Durchflusszytometrie Blut Die Mäuse erhielten täglich 200 mg/Kg CSF-1 Rezeptor Inhibitor (respektive Trägerlösung für die Kontrollgruppe) per Gavage für 4 beziehungsweise 7 Tage. Es wurde Blut aus der V. cava inferior untersucht. Die Werte sind dargestellt als Mittelwert \pm SD, n=3 pro Gruppe, *= $p < 0.05$, **= $p < 0.01$, ungepaarter T-Test.

In der Milz zeigte sich eine geringe Reduktion der CD11b⁺ Zellen nach 7 Tagen (Abbildung 12 A). Die Analyse der CD11b⁺ Subpopulationen ergab jedoch keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 12 C-G). Es zeigte sich des Weiteren eine signifikante, aber geringe Zunahme der

CD11b⁻ Zellen nach 7 Tagen (Abbildung 12 B). Die weitere Analyse der CD11b⁻ Subpopulationen ergab eine geringe Reduktion von MHCII⁺ Zellen (CD11c⁺ und CD11c⁻), die jedoch nur nach 4 Tagen und nicht nach 7 Tagen nachweisbar war (Abbildung 12 H und I).

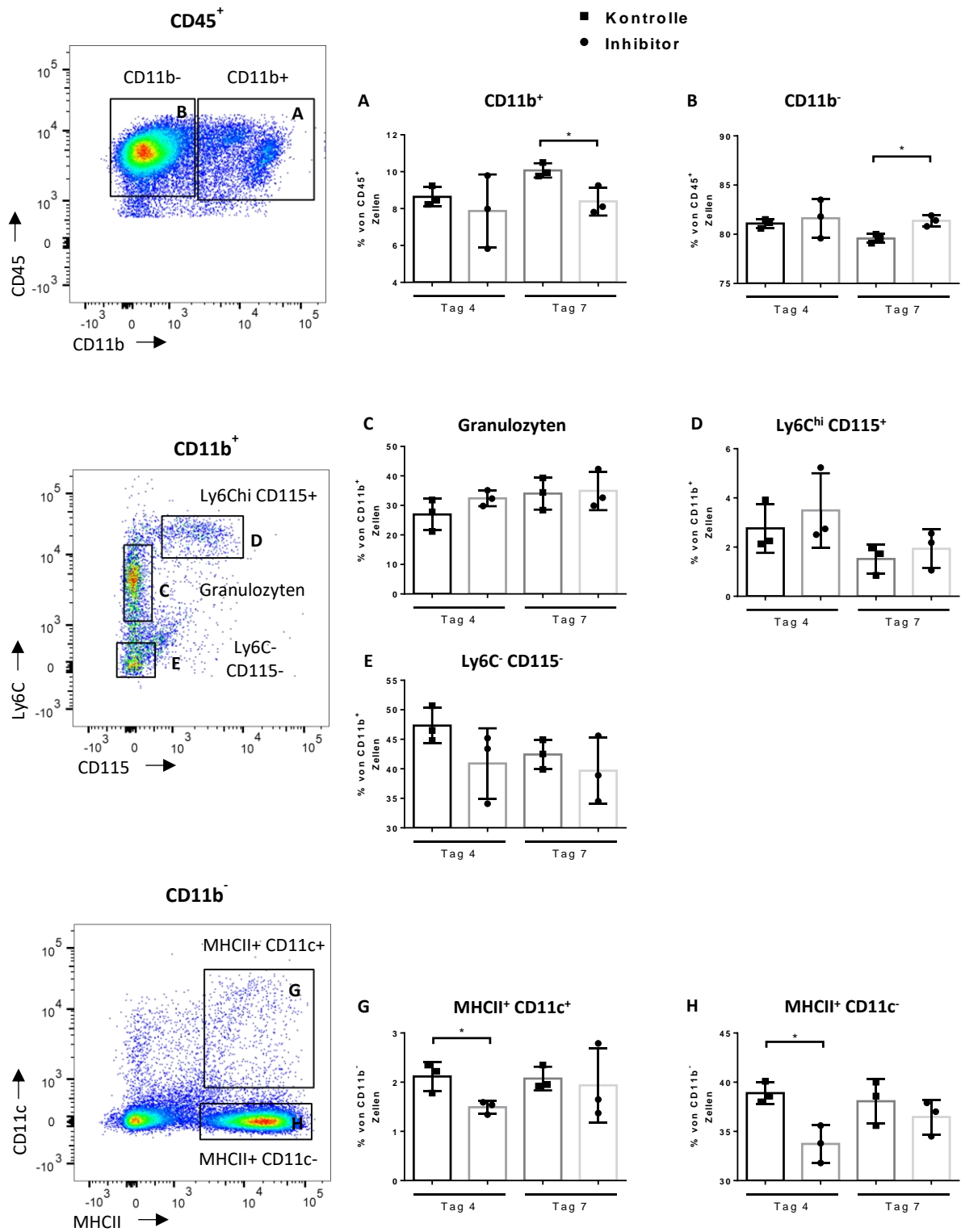


Abbildung 12: Depletionsexperiment - Durchflusszytometrie Milz Die Mäuse erhielten täglich 200 mg/Kg CSF-1 Rezeptor Inhibitor (respektive Trägerlösung für die Kontrollgruppe) per Gavage für 4 beziehungsweise 7 Tage. Es wurde die perfusionsgespülte Milz für die Durchflusszytometrie verwendet. Die Werte sind dargestellt als Mittelwert \pm SD, n = 3 pro Gruppe, * = p < 0.05, ** = p < 0.01, ungepaarter T-Test.

8.2. Mikrogliadepletion im Schlaganfallmodell

Das zweite Experiment wurde mit dem Ziel gestaltet, die Rolle der Mikroglia in der Pathophysiologie und Pathogenese der zerebralen Ischämie mit dem im ersten Experiment charakterisierten Depletionsmodell zu untersuchen. Dazu wurde nach erfolgter Depletion der Mikroglia mittels CSF-1 Rezeptor Inhibitor eine transiente Ischämie ausgelöst und anschließend mittels Infarktmetrie im MRT, Immunhistochemie und Durchflusszytometrie die Auswirkungen der Mikrogliadepletion im Ischämiemodell charakterisiert. Der Versuchsablauf ist in Abbildung 13 dargestellt.

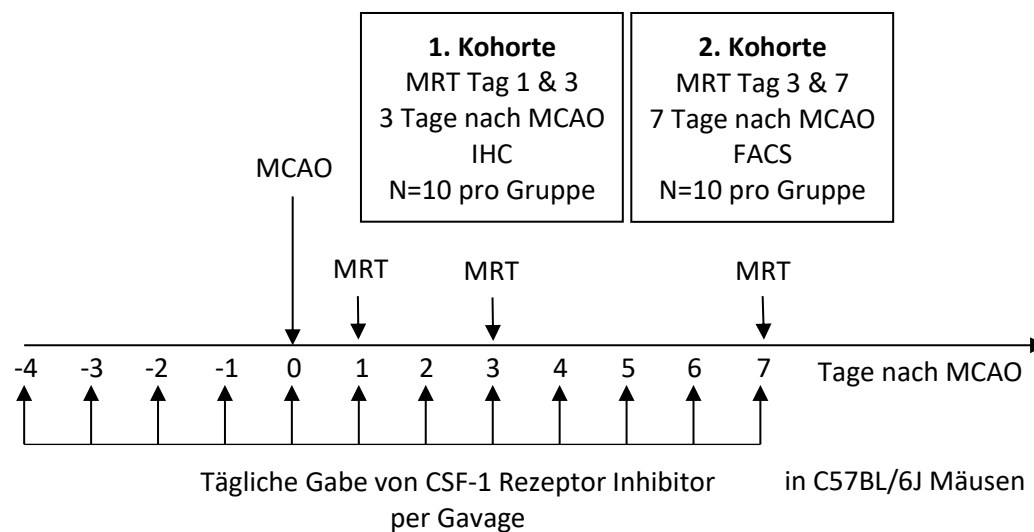


Abbildung 13: CSF-1 Rezeptor Inhibitor im Schlaganfallmodell – Ablauf Die Mäuse erhielten täglich 200 mg/Kg CSF-1 Rezeptor Inhibitor oder Kontrolllösung per Gavage, nach 4 Tagen wurde die zerebrale Ischämie mittels MCAO (1 h) ausgelöst. In der ersten Kohorte wurde an Tag 1 und 3 nach Auslösen der Ischämie das Infarktvolumen mittels MRT bestimmt, die Mäuse an Tag 3 getötet und die Gehirne mittels Immunhistochemie untersucht. In der zweiten Kohorte wurden an Tag 3 und 7 nach Auslösen der Ischämie das Infarktvolumen bestimmt, die Mäuse an Tag 7 getötet und die Gehirne entweder mittels FACS untersucht. IHC – Immunhistochemie, FACS – Durchflusszytometrie, MCAO – middle cerebral artery occlusion, MRT - Magnetresonanztomographie.

8.2.1. Infarktvolumetrie im Depletionsmodell 1. Kohorte

In der ersten Kohorte starben insgesamt 4 Mäuse (Inhibitorgruppe: 3 Mäuse an Tag 1; Kontrollgruppe: 1 Maus an Tag 3), die bis dahin erhobenen Daten wurden ausgewertet. In der ersten Kohorte bestimmten wir das Schlaganfallvolumen an Tag 1 und Tag 3 mittels cMRT. Mäuse, die keinen Infarkt zeigten (Infarktvolumen <math><1\text{mm}^3</math> in beiden Messungen) wurden ausgeschlossen (Inhibitorgruppe: 0 Mäuse; Kontrollgruppe: 1 Maus), so dass an Tag 1 in der

Inhibitorgruppe 7 Mäuse und in der Kontrollgruppe 9 Mäuse, und 7 bzw. 8 Mäuse in den respektiven Gruppen an Tag 3 eingeschlossen wurden.

Die Infarktvolumina an Tag 1 und Tag 3 zeigten keine signifikanten Unterschiede (Kontrolle vs. Inhibitor Tag 1: 47 ± 52 vs. 52 ± 33 mm^3 , $p=0.81$; Tag 3: 49 ± 60 vs. 64 ± 47 mm^3 ; $p=0.60$), siehe Abbildung 14: CSF-1 Rezeptor Inhibitor im MCAO Modell – Infarktvolumetrie 1.Kohorte

A: Die Mäuse erhielten täglich 200 mg/Kg CSF-1 Rezeptor Inhibitor oder Kontrolllösung, nach 4 Tagen wurde die Ischämie mittels tMCAO (1 h) ausgelöst und an Tag 1 und 3 nach Auslösen der Ischämie das ödemkorrigierte Infarktvolumen mittels cMRT bestimmt. Die Werte sind dargestellt als Mittelwert \pm SD, $n=9$ Kontrolle bzw. 7 Inhibitor. Unterschiede nicht signifikant, ungepaarter T-Test. Die individuelle Infarktdynamik zeigte in beiden Gruppen am ehesten im Rahmen des beginnenden Ödems bei größeren Infarkten tendenziell eine Zunahme und bei kleineren Infarkten keine Veränderung der Infarktgrößen von Tag 1 zu Tag 3.

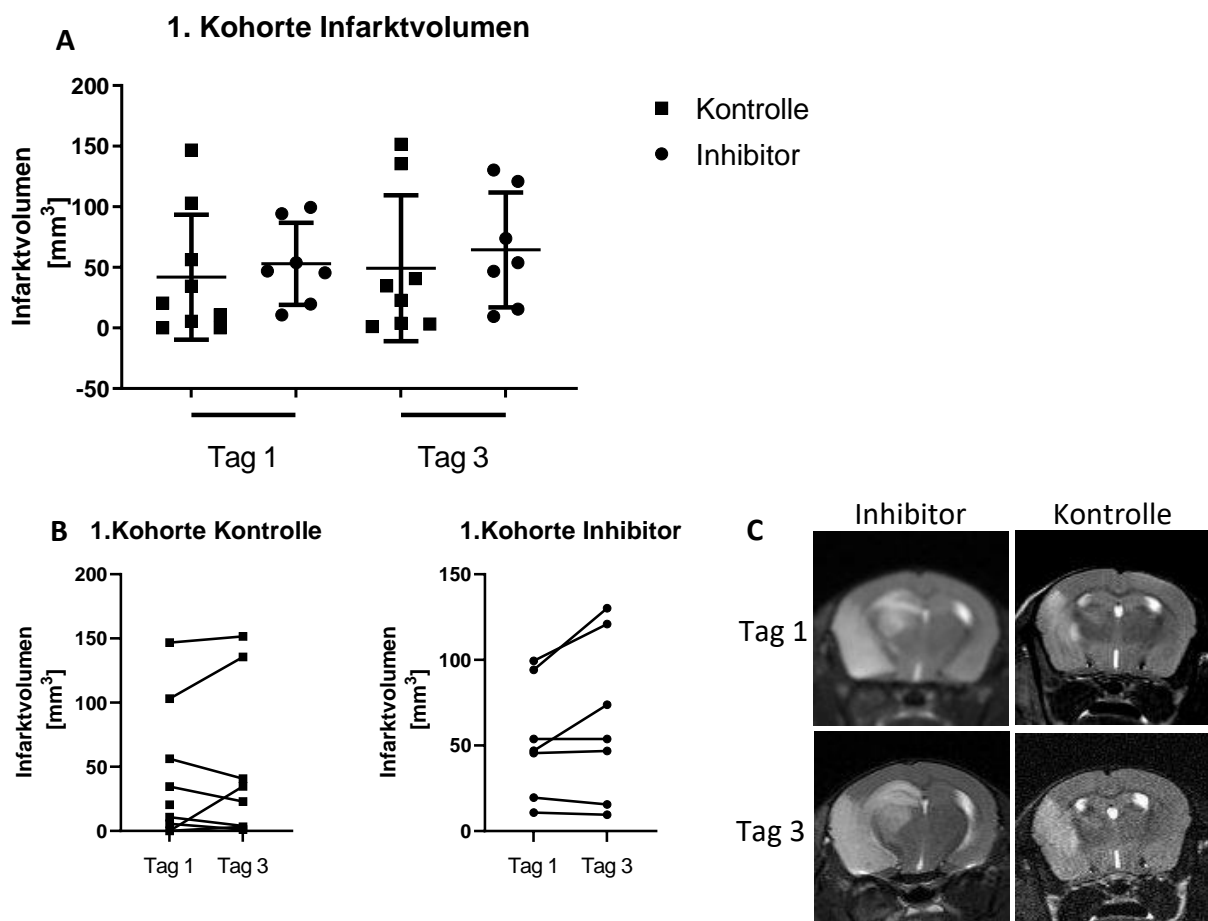


Abbildung 14: CSF-1 Rezeptor Inhibitor im MCAO Modell – Infarktvolumetrie 1.Kohorte **A:** Die Mäuse erhielten täglich 200 mg/Kg CSF-1 Rezeptor Inhibitor oder Kontrolllösung, nach 4 Tagen wurde die Ischämie mittels tMCAO (1 h) ausgelöst und an Tag 1 und 3 nach Auslösen der Ischämie das ödemkorrigierte Infarktvolumen mittels

cMRT bestimmt. Die Werte sind dargestellt als Mittelwert \pm SD, n=9 Kontrolle bzw. 7 Inhibitor. Unterschiede nicht signifikant, ungepaarter T-Test. B: Darstellung der Infarktdynamik der einzelnen Mäuse. C: Beispielbilder der T2 gewichteten cMRT Bilder mit dem hyperintensiven Infarktareal.

8.2.2. Infarktmetrie im Depletionsmodell 2. Kohorte

In der zweiten Kohorte starben insgesamt 4 Mäuse (Inhibitorgruppe: 1 Maus an Tag 5; Kontrollgruppe: 3 Mäuse an Tag 1, 4 und 5), die bis dahin erhobenen Daten wurden ausgewertet. In der zweiten Kohorte bestimmten wir das Schlaganfallvolumen an Tag 3 und Tag 7 mittels cMRT. Mäuse, die keinen Infarkt zeigten (Infarktvolumen $< 1 \text{ mm}^3$ in beiden Messungen) wurden ausgeschlossen (Inhibitorgruppe: 1 Maus; Kontrollgruppe: 2 Mäuse). An Tag 3 konnten 7 bzw. 9 Mäuse (Inhibitor bzw. Kontrolle), an Tag 7 konnten 5 bzw. 8 Mäuse (Inhibitor bzw. Kontrolle) in die Analyse eingeschlossen werden.

In der Inhibitorgruppe zeigte sich an Tag 3 im Vergleich zur Kontrollgruppe eine Reduktion des Infarktvolumens um 64%, das im ungepaarten t-Test signifikant war (31 ± 29 vs. $87 \pm 46 \text{ mm}^3$ $p=0,011$), siehe Abbildung 15. Wie durch den einsetzenden *fogging effect* zu erwarten, zeigten sich eine Reduktion der Infarktvolumina an Tag 7 in beiden Gruppen. Die Reduktion der Infarktvolumina in der Inhibitorgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe konnte auch an Tag 7 beobachtet werden und betrug 80% (8 ± 9 vs. $44 \pm 44 \text{ mm}^3$, $p=0,042$ im t-Test). Auffällig war, dass in der Inhibitorgruppe 4 Mäuse mit sehr kleinen Infarkten waren. Der Zeitverlauf dieser Mäuse von Tag 3 zu Tag 7 zeigte eine ähnliche Reduktion der Infarktvolumina wie der Rest der Inhibitorgruppe, so dass die Mäuse in die Analyse eingeschlossen wurden.

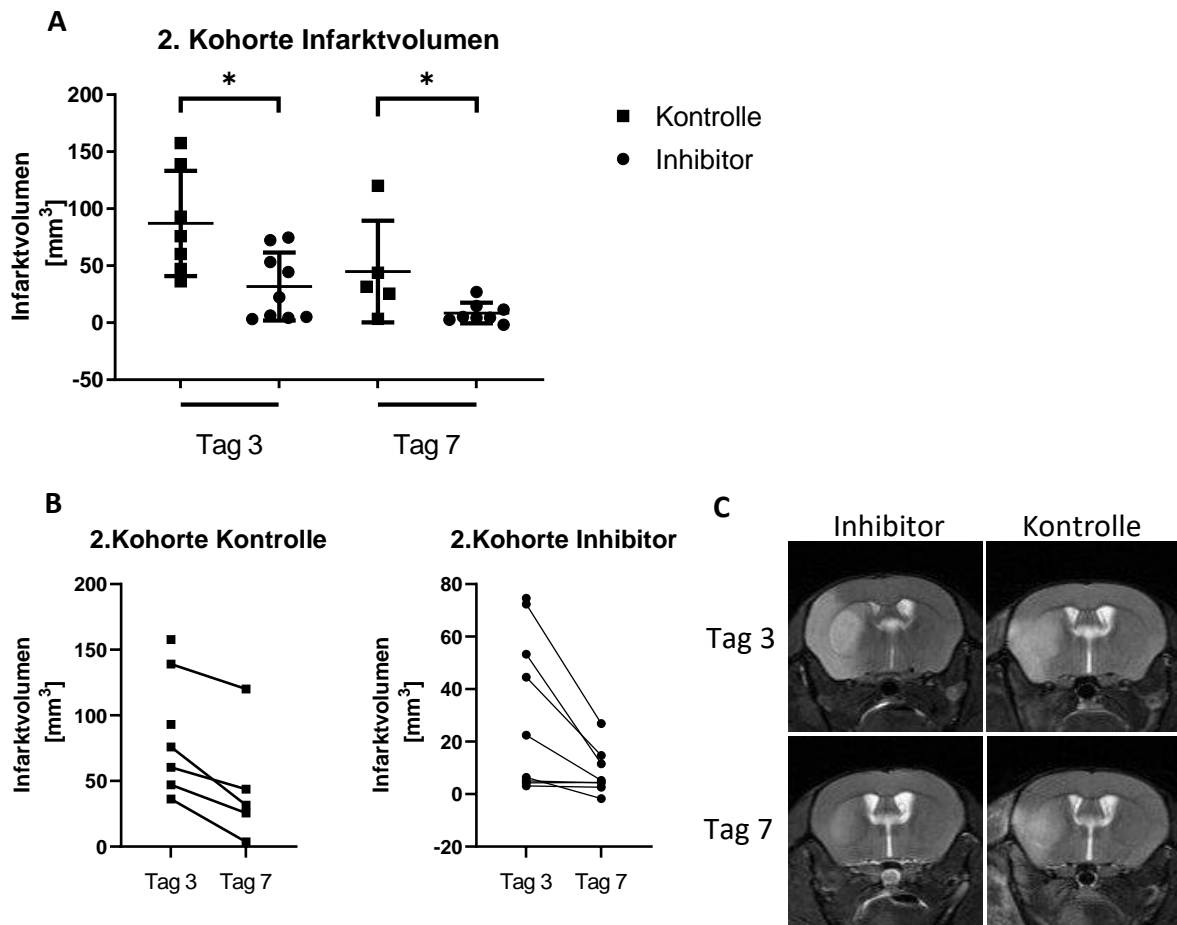


Abbildung 15: CSF-1 Rezeptor Inhibitor im MCAO Modell – Infarktvolumetrie 2.Kohorte **A:** Die Mäuse erhielten täglich 200 mg/Kg CSF-1 Rezeptor Inhibitor oder Kontrolllösung, nach 4 Tagen wurde die Ischämie mittels tMCAO (1 h) ausgelöst und an Tag 3 und 7 nach Auslösen der Ischämie das ödemkorrigierte Infarktvolumen mittels cMRT bestimmt. Die Werte sind dargestellt als Mittelwert \pm SD, $n=9/10$ (Tag 3 Kontrolle/Inhibitor); $n=7/9$ (Tag t Kontrolle/Inhibitor); $*=p<0.05$, ungepaarter T-Test. **B:** Darstellung der Infarktdynamik der einzelnen Mäuse. **C:** Beispielbilder der T2 gewichteten cMRT Bilder mit dem hyperintensiven Infarktareal.

In der gepoolten statistischen Analyse der Infarktvolumina beider Kohorten an Tag 3 zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen Inhibitor- und Kontrollgruppe (46 ± 40 vs. 66 ± 55 mm³, $n=16$ Inhibitor bzw. $n=15$ Kontrolle, $p=0,24$ im ungepaarten t-Test).

8.2.3. Klinischer Score und Gewicht

Beide Kohorten wurden täglich gewogen und es wurde nach Auslösen der Ischämie ein täglicher allgemeiner klinischer Score erhoben (Punktwert 0-8, höherer Wert=kranker, siehe Seite 27).

In der 1. Kohorte zeigte sich in beiden Gruppen eine vergleichbare Gewichtsabnahme (z.B. Tag 3: $19,2 \pm 2,4$ vs. $20,2 \pm 3$ g Kontrolle vs. Inhibitor, nicht signifikant im Mann Whitney Test, siehe Abbildung 16A). Der allgemeine klinische Score zeigte sich im zeitlichen Verlauf weitgehend

unverändert und zeigte ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen (z.B. Tag 2: Kontrolle vs. Inhibitor: 3,25 (0-6) vs. 2 (1-5) Punkte, Median + (Min-Max), nicht signifikant im Mann Whitney Test, siehe Abbildung 16B).

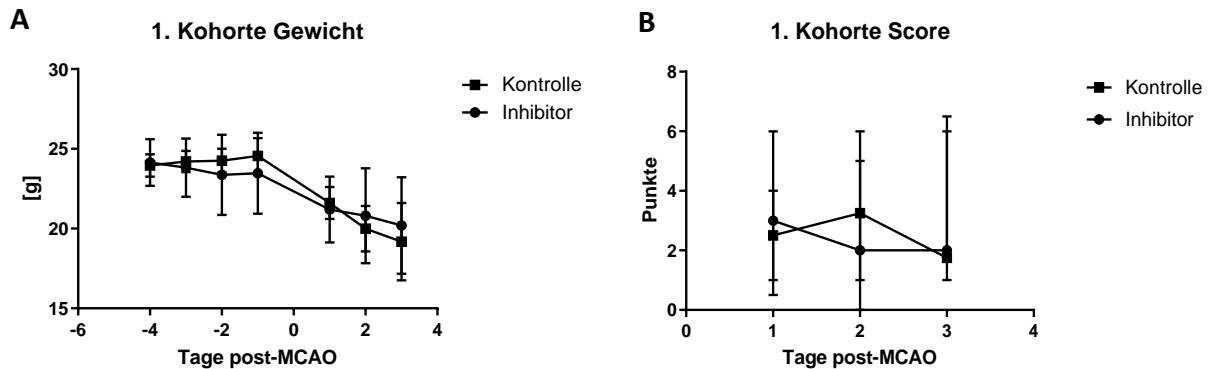


Abbildung 16: Gewicht und Klinischer Score 1. Kohorte **A:** Die Mäuse wurden täglich gewogen, es zeigten sich keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen (N=7 Inhibitor, N=9 Kontrolle, Mittelwerte \pm SD, nicht signifikant im Mann Whitney Test) **B:** Nach Auslösen der Ischämie wurde täglich ein klinischer Score erhoben, es zeigten sich keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen (N=7 Inhibitor, N=9 Kontrolle, Median + Min-Max, nicht signifikant im Mann Whitney Test).

In der 2. Kohorte zeigte sich in beiden Gruppen zunächst eine Gewichtsabnahme und im Verlauf wieder eine Gewichtszunahme. In der Inhibitorgruppe lag der Nadir bei Tag 2, in der Kontrollgruppe an Tag 4. Die Gewichtsabnahme in der Inhibitorgruppe scheint im Trend ab Tag 2 etwas geringer ausgeprägt, die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant (z.B. Tag 4: $19,9 \pm 2,9$ vs. $22,7 \pm 2,3$ g Kontrolle vs. Inhibitor, nicht signifikant im Mann Whitney Test, siehe Abbildung 18A). Der allgemeine klinische Score schien sich an Tag 3 und Tag 4 in der Inhibitorgruppe etwas rascher zu verbessern, die Unterschiede zwischen den beiden Gruppen waren jedoch nicht signifikant und waren ab Tag 5 ohne nennenswerte Unterschiede (z.B. Tag 4: Kontrolle vs. Inhibitor: 4 (0,5-5,5) vs. 2,5 (0-4,5) Punkte, Median + (Min-Max), nicht signifikant im Mann Whitney Test, siehe Abbildung 17B).

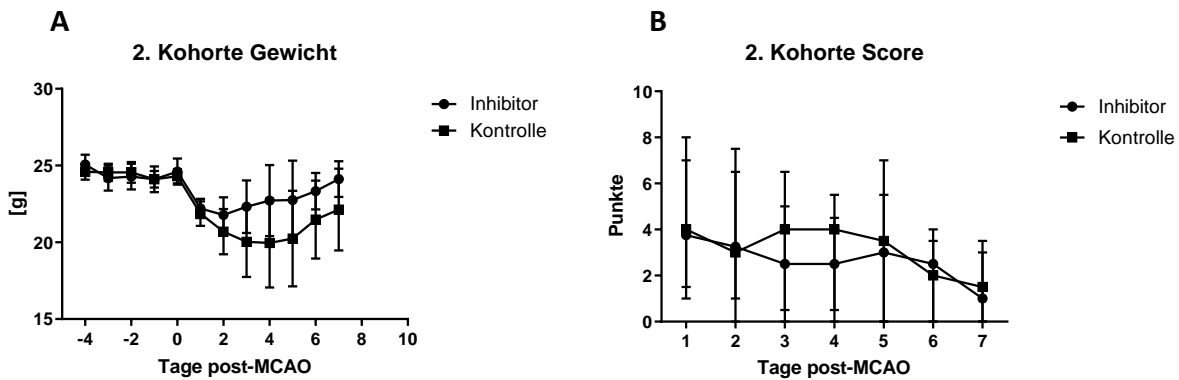


Abbildung 17: Gewicht und Klinischer Score 2. Kohorte **A:** Die Mäuse wurden täglich gewogen, es zeigten sich keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen (N=9 Inhibitor, N=7 Kontrolle, Mittelwerte \pm SD, nicht signifikant im Mann Whitney Test) **B:** Nach Auslösen der Ischämie wurde täglich ein klinischer Score erhoben, es zeigten sich keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen (N=9 Inhibitor, N=7 Kontrolle, Median + Min-Max, nicht signifikant im Mann Whitney Test).

8.2.4. CSF-1 Rezeptor Inhibitor depletiert myeloide Zellen im MCAO-Modell

Um zu bestätigen, dass die Depletion auch im MCAO-Modell erfolgreich war, quantifizierten wir die Mikroglia/Makrophagen 3 und 7 Tage nach Auslösen der Ischämie. In der ipsilateralen Hemisphäre betrug die Reduktion 3 Tage nach Auslösen der Ischämie 54 % (Immunhistochemie, s. Abbildung 15A und C) und 7 Tage nach Auslösen der Ischämie 58 % (Durchflusszytometrie, s. Abbildung 19A). In der kontralateralen Hemisphäre betrug die Reduktion 61 % nach 3 Tagen, die Reduktion um 47 % nach 7 Tagen war nicht signifikant.

Um die Infiltration von peripheren myeloiden Zellen zu untersuchen, quantifizierten wir 3 Tage nach Auslösen der Ischämie mittels immunhistochemischer Färbung CD45⁺Iba-1⁺ doppelpositive Zellen (s. Abbildung 15B und C). Die Dichte CD45⁺Iba-1⁺ Zellen war in der ipsilateralen Hemisphäre um 59 % vermindert, während in den kontralateralen Hemisphären in keiner der Gruppen CD45⁺Iba-1⁺ Zellen nachweisbar waren. Zum zweiten untersuchten Zeitpunkt, 7 Tage nach Auslösen der Ischämie, ergaben sich keine Unterschiede (Durchflusszytometrie, s. Abbildung 19B, D-F).

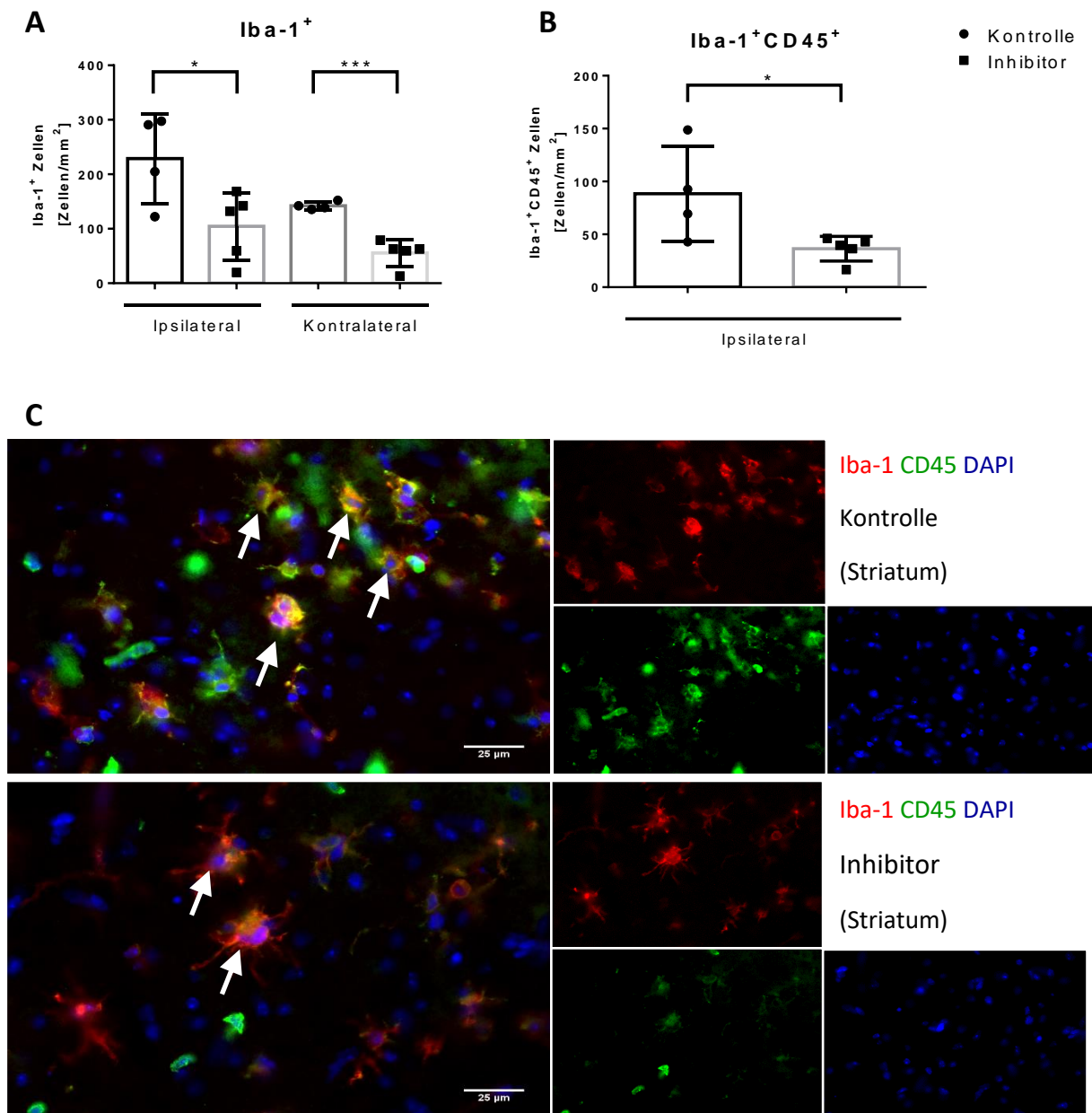


Abbildung 18: CSF-1 Rezeptor Inhibitor im MCAO-Modell - Quantifizierung von Mikroglia und Makrophagen
Die Mäuse erhielten täglich 200 mg/Kg CSF-1 Rezeptor Inhibitor oder Kontrolllösung, nach 4 Tagen wurde die Ischämie mittels MCAO für 1 h ausgelöst und 3 Tage nach Auslösen der Ischämie die Gehirne mittels Immunhistochemie untersucht. **A)** Iba-1⁺DAPI⁺ Zellen wurden als Mikroglia quantifiziert. **B)** Iba-1⁺CD45⁺DAPI⁺ Zellen wurden als infiltrierende myeloide Zellen quantifiziert. **C)** Beispielbilder, die Pfeile zeigen Iba-1 und CD45 doppelpositive Zellen an. Die Werte sind dargestellt als Mittelwert ± SD, n=4-5 pro Gruppe, *= $p < 0.05$, ****= $p < 0.001$, ungepaarter T-Test.

8.2.5. Charakterisierung myeloider Zellen 3 Tage nach MCAO

Die Teilungsaktivität bestimmten wir mit einer immunhistochemischen Färbung gegen Iba-1 und Ki-67 (s. Abbildung 16A und B). Der Anteil proliferierender Iba-1⁺ Zellen war in der Inhibitorgruppe deutlich erhöht, der Unterschied war in der kontralateralen Hemisphäre besonders ausgeprägt.

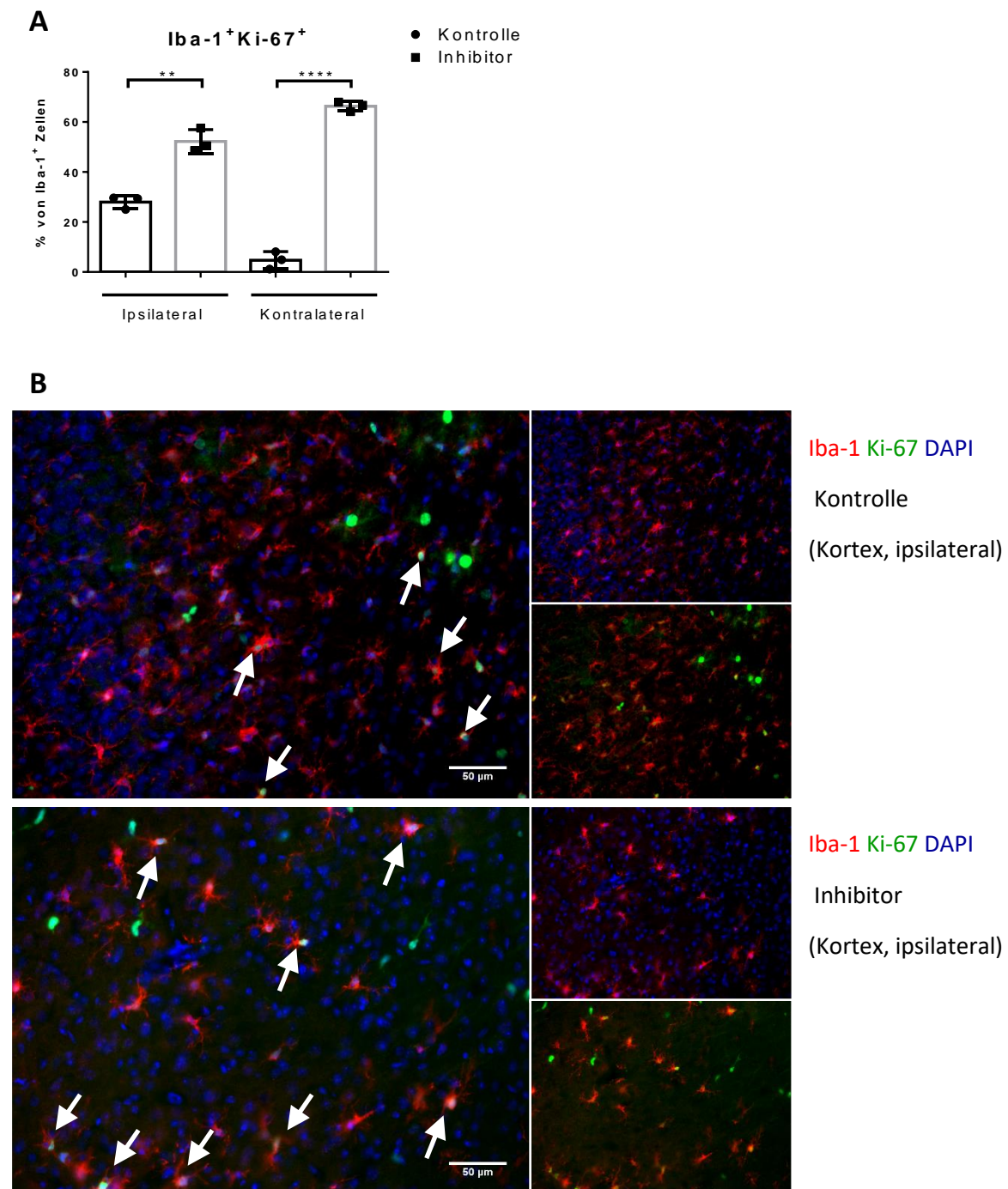


Abbildung 19: CSF-1 Rezeptor Inhibitor im MCAO-Modell – Teilungsaktivität von Mikroglia Die Mäuse erhielten täglich 200 mg/Kg CSF-1 Rezeptor Inhibitor oder Kontrolllösung, nach 4 Tagen wurde die Ischämie mittels

MCAO für 1 h ausgelöst und 3 Tage nach Auslösen der Ischämie die Gehirne mittels Immunhistochemie untersucht. **A)** Iba-1⁺DAPI⁺ Zellen wurden als Mikroglia, Iba-1⁺Ki-67⁺DAPI⁺ Zellen als teilungsaktive Mikroglia identifiziert und quantifiziert. **B)** Beispielbilder, die Pfeile zeigen auf Iba-1 und Ki-67 doppelpositive Zellen. Die Werte sind dargestellt als Mittelwert \pm SD, n=3 pro Gruppe, **= $p < 0.01$, ****= $p < 0.0001$, ungepaarter T-Test.

Als nächstes untersuchten wir die Expression von iNOS (Marker für pro-inflammatorisch aktive Mikroglia/Makrophagen) und Arginase 1 (Marker für anti-inflammatorisch aktive Mikroglia/Makrophagen) in Iba-1⁺ Zellen (s. Abbildung 18). In der ipsilateralen Hemisphäre zeigte sich eine Zunahme von Arginase 1⁺ Iba-1⁺ doppelpositiven Zellen in der Inhibitorgruppe (1.2 % vs. 4.5 %, $p=0.004$).

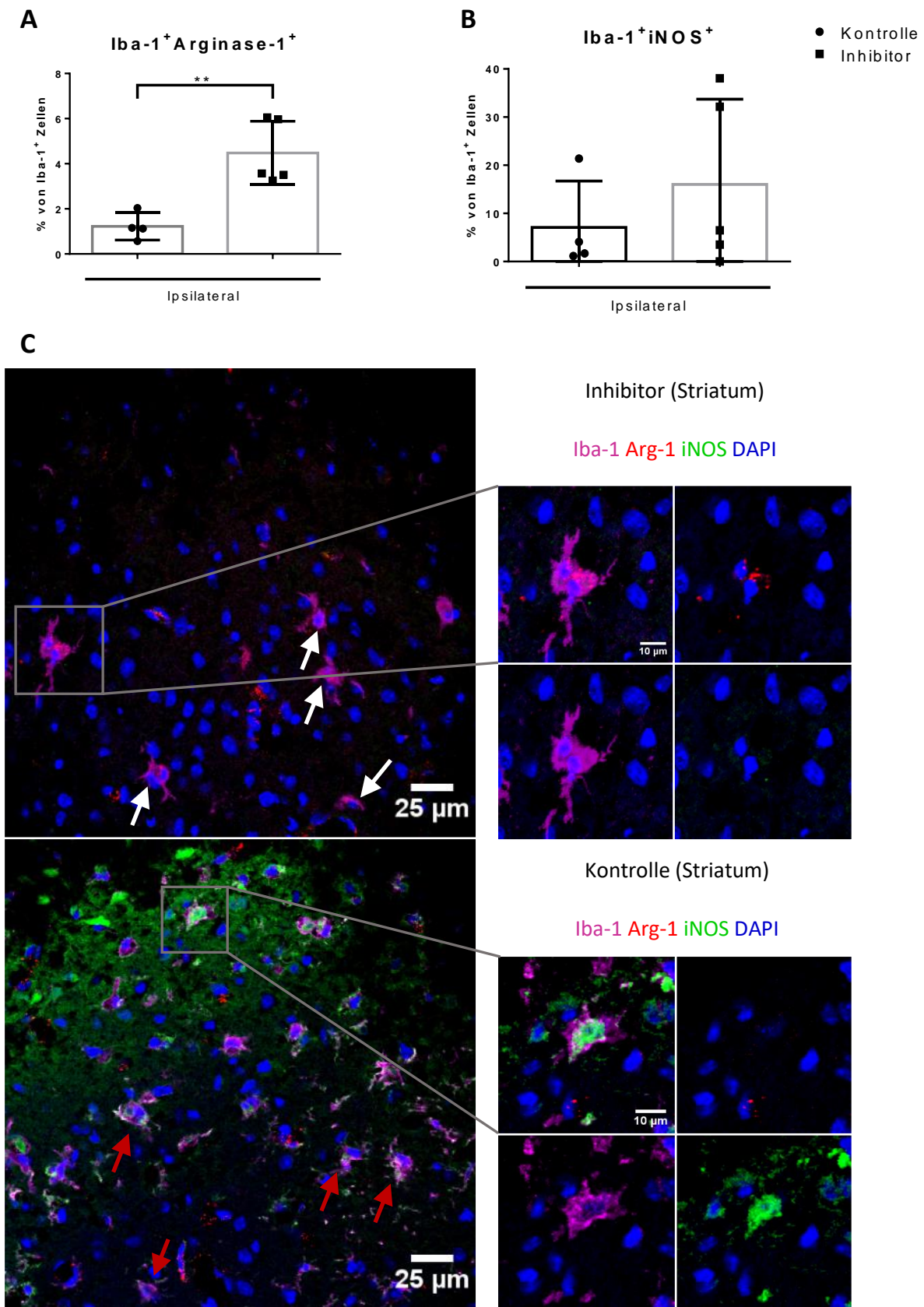


Abbildung 20: CSF-1 Rezeptor Inhibitor im MCAO-Modell – Expression von iNOS und Arginase-1 Die Mäuse erhielten täglich 200 mg/Kg CSF-1 Rezeptor Inhibitor oder Kontrolllösung, nach 4 Tagen wurde die Ischämie mittels

MCAO für 1 h ausgelöst und 3 Tage nach Auslösen der Ischämie die Gehirne mittels Immunhistochemie untersucht. **A)** Es wurden Iba-1⁺Arginase-1⁺DAPI⁺ Zellen quantifiziert. **B)** Es wurden Iba-1⁺iNOS⁺DAPI⁺ Zellen identifiziert und quantifiziert. **C)** Beispielbilder, die weißen Pfeile zeigen auf Arginase-1 und Iba-1 doppelpositive Zellen, die roten Pfeile auf iNOS und Iba-1 doppelpositive Zellen. Die Vergrößerungen zeigen die Kolokalisation der Marker. Die Werte sind dargestellt als Mittelwert \pm SD, n=4-5 pro Gruppe, **=p<0.01, ungepaarter T-Test.

8.2.6. Immunstatus 7 Tage nach MCAO

Um weitere Veränderungen der Immunzellen zu einem späteren Zeitpunkt aufzudecken wurden Gehirn, Blut und Milz 7 Tage nach Auslösen der Ischämie mittels Durchflusszytometrie untersucht. Außer der schon erwähnten Reduktion der Mikroglia konnten im Gehirn keine weiteren Unterschiede der übrigen Immunzellen beobachtet werden (s. Abbildung 19). Auch im Blut und in der Milz ließen sich keine signifikanten Unterschiede der myeloiden oder lymphozytären Zellen beobachten (s. Abbildung 20 und Abbildung 21).

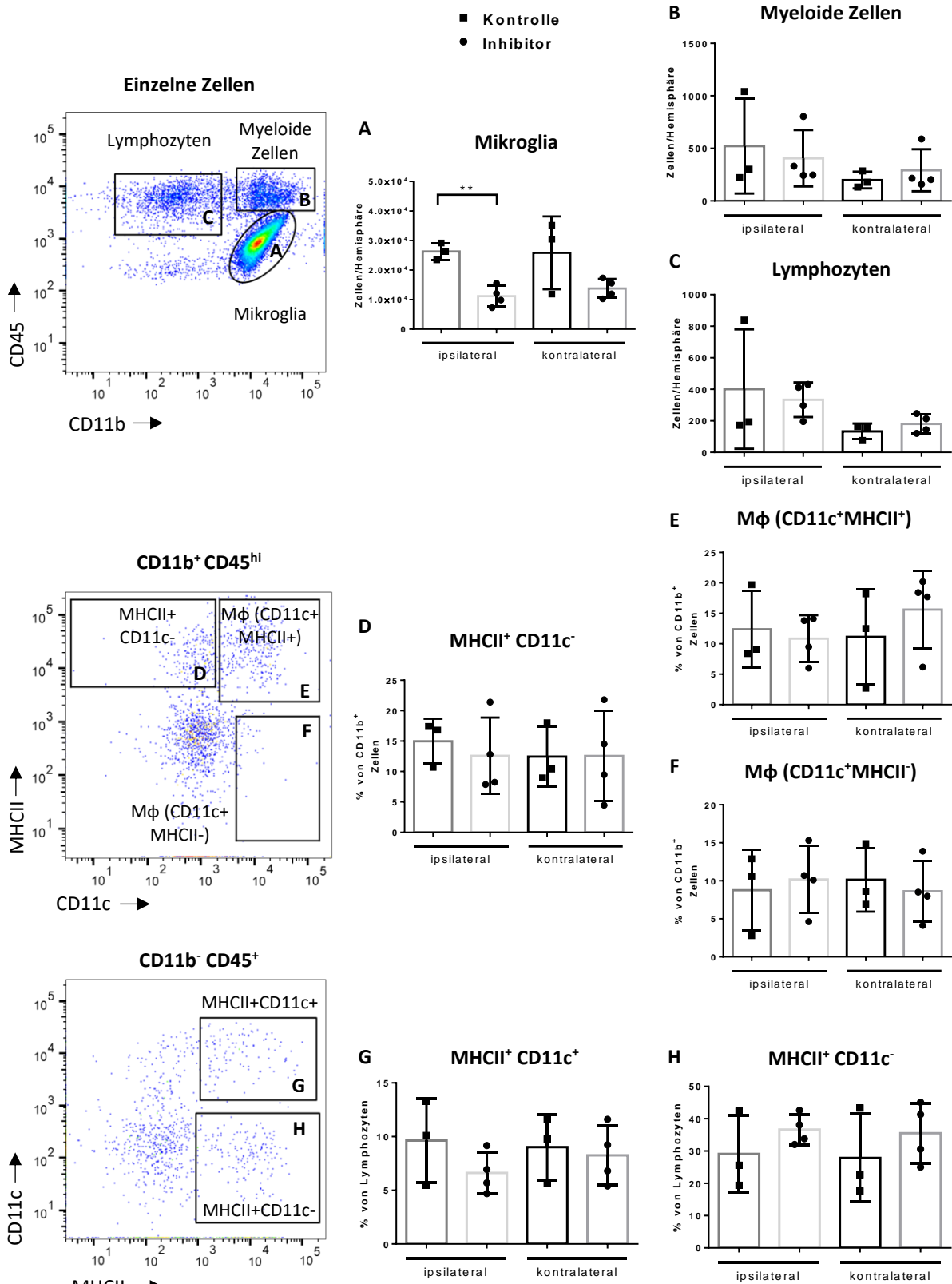


Abbildung 21: CSF-1 Rezeptor Inhibitor im MCAO Modell - Durchflusszytometrie Gehirn Die Mäuse erhielten täglich 200 mg/Kg CSF-1 Rezeptor Inhibitor oder Kontrolllösung, nach 4 Tagen wurde die Ischämie mittels MCAO (1 h)

ausgelöst und 7 Tage später die Gehirne nach Hemisphären getrennt mittels Durchflusszytometrie untersucht. Die Werte sind dargestellt als Mittelwert \pm SD, $n=3-4$ pro Gruppe, $**=p < 0.01$, ungepaarter T-Test.

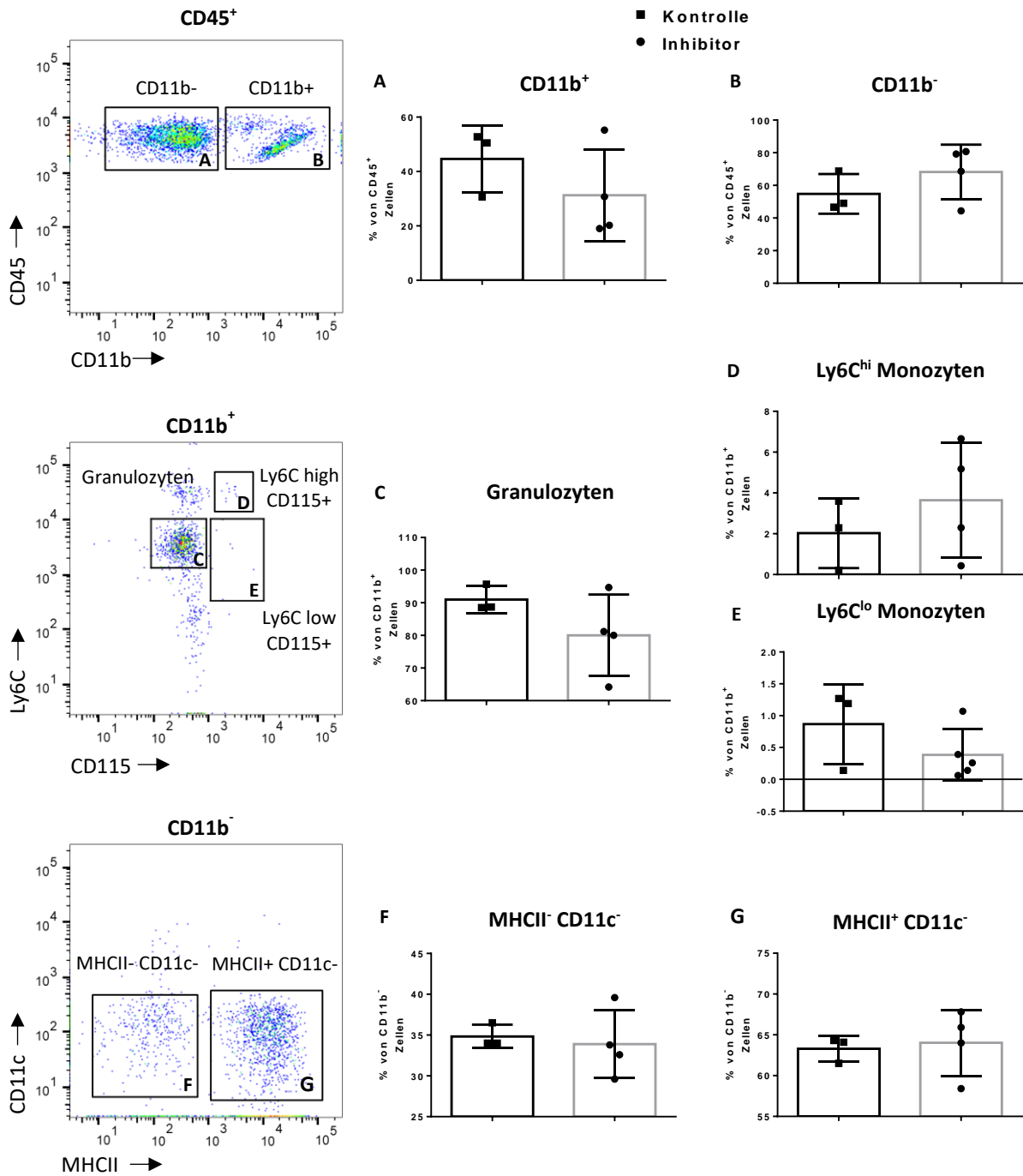


Abbildung 22: CSF-1 Rezeptor Inhibitor im MCAO Modell - Durchflusszytometrie Blut Die Mäuse erhielten täglich 200 mg/Kg CSF-1 Rezeptor Inhibitor oder Kontrolllösung, nach 4 Tagen wurde die Ischämie mittels MCAO für 1 h ausgelöst und 7 Tage danach Blut aus der V.cava mittels Durchflusszytometrie untersucht. Die Werte sind dargestellt als Mittelwert \pm SD, $n=3-4$ pro Gruppe, ungepaarter T-Test.

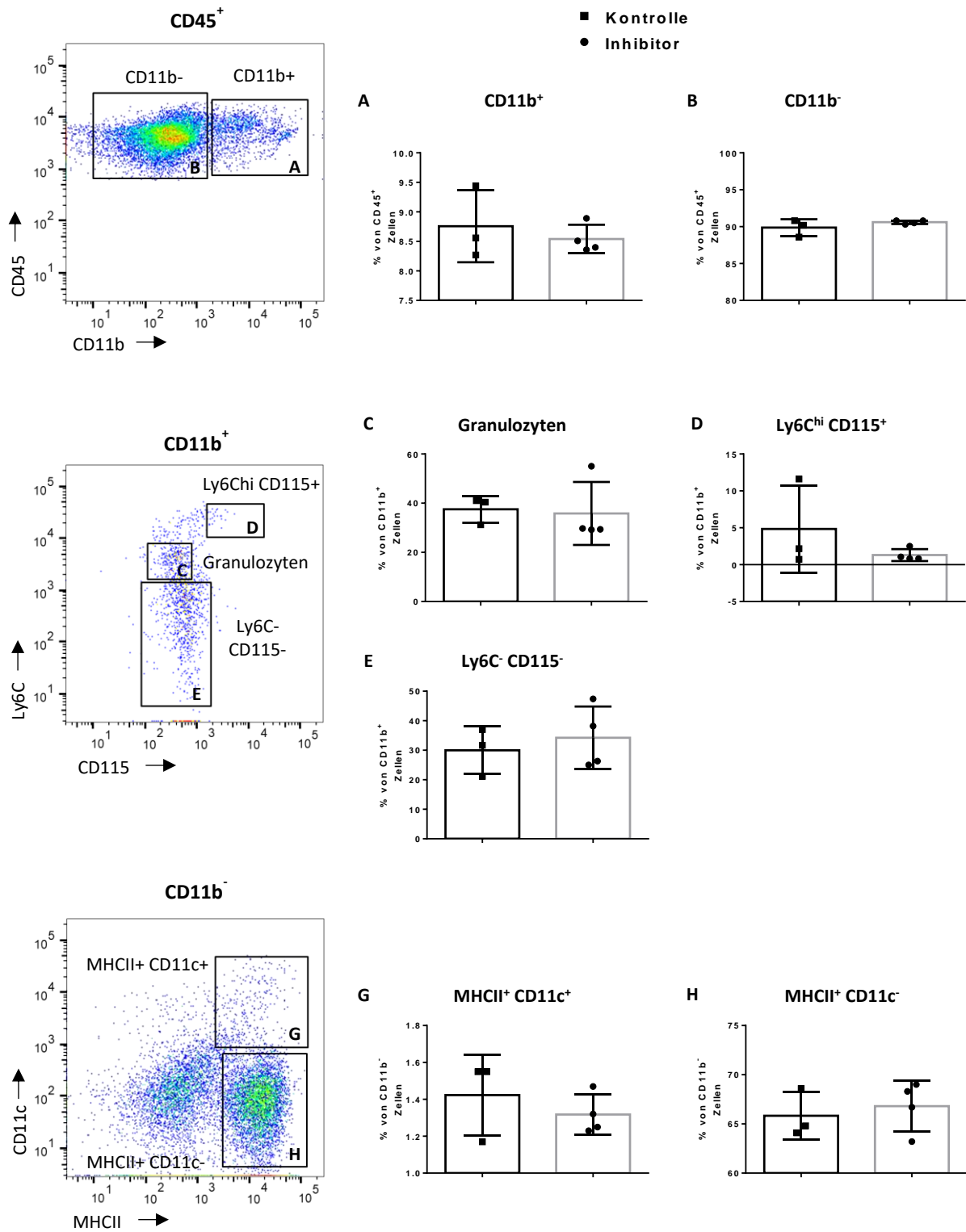


Abbildung 23: CSF-1 Rezeptor Inhibitor im MCAO Modell - Durchflusszytometrie Milz Die Mäuse erhielten täglich 200 mg/Kg CSF-1 Rezeptor Inhibitor oder Kontrolllösung, nach 4 Tagen wurde die Ischämie mittels MCAO für 1 h ausgelöst und 7 Tage danach die Milz mittels Durchflusszytometrie untersucht. Die Werte sind dargestellt als Mittelwert \pm SD, n=3-4 pro Gruppe, ungepaarter T-Test.

9. Diskussion

Diese Arbeit hat zum Ziel, die Rolle von Mikroglia in der Pathophysiologie des Schlaganfalls zu untersuchen. In bisherigen Studien wurden Mikroglia sowohl neuroprotektive wie auch neurotoxische Rollen zugeschrieben, so dass ihr therapeutisches Potential für die Behandlung des Schlaganfalls unklar ist. Ein Grund dafür ist, dass die bisher verwendeten Mikroglia-depletionsmodelle deutliche Limitationen aufweisen. Die Verwendung von CSF-1R Inhibitoren verspricht eine spezifische und nicht-invasive Depletion der Mikroglia und würde sich daher zur Untersuchung der Mikroglia im Schlaganfallmodell eignen. Wir untersuchten daher zunächst in C57Bl/6 Mäusen die Mikroglia-depletion mit einem CSF-1 Rezeptor Inhibitor und konnten eine Reduktion der Mikroglia und Makrophagen im Gehirn um ca. 60 % erzielen. Im zweiten Experiment untersuchten wir den Effekt der Mikroglia-depletion in einem Schlaganfallmodell, hier konnte an Tag 1 und 3 kein signifikanter Unterschied festgestellt werden, an Tag 7 zeigte sich eine signifikante Reduktion der Infarktolumina. Die Phänotypisierung der Mikroglia/Makrophagen im Infarktgebiet ergab eine vermehrte Expression von Arginase-1, einem Marker für anti-inflammatorische Mikroglia/Makrophagen. Die überlebenden Mikroglia/Makrophagen proliferierten zudem vermehrt. Zusätzlich war die Zahl CD45⁺Iba-1⁺ Zellen in der ischämischen Hemisphäre vermindert.

9.1. Diskussion der Ergebnisse

Die Mikroglia-depletion durch den CSF-1R Inhibitor konnte sowohl durchflusszytometrisch als auch histologisch via Immunfluoreszenz nachgewiesen werden. Dabei zeigten sich jedoch unterschiedliche Depletionsraten. Während die Reduktion der Mikroglia in der Durchflusszytometrie nach 4 und 7 Tagen zwischen 60 und 70 % betrug, konnten wir in der immunhistochemischen Quantifizierung eine Reduktion zwischen 30 und 40 % beobachten. Eine mögliche Erklärung für die unterschiedlich gemessenen Reduktionsraten ist die Verwendung von Iba-1 in der histologischen Analyse, der nicht zwischen Mikroglia und Makrophagen unterscheiden kann. Eine weitere mögliche Erklärung sind technische Limitationen der Mikroglia-isolierung für die FACS-Analyse, bei der es aufgrund von Zelladhäsion zur Selektion und Verlust von einzelnen Zellpopulationen kommen kann. Mikroglia, die als Immunzellen eine Vielzahl von Molekülen mit adhäsiven Eigenschaften auf ihrer Zelloberfläche präsentieren, sind dafür besonders anfällig. Für die histologische Quantifizierung wurden drei unterschiedliche Hirnregionen in die Analyse einbezogen, mögliche regionale Differenzen der Depletion sind so

zwar nicht auszuschließen aber unwahrscheinlich und könnten durch eine extensivere Analyse der einzelnen Regionen kontrolliert werden. Studien, die einen anderen CSF-1R Inhibitor (PLX3397) verwendeten, erreichten eine Reduktion um 90 % im selben Zeitraum^{57,58}. Diese Unterschiede könnten durch in der Verwendung unterschiedlicher CSF-1R Inhibitoren begründet liegen. In einer anderen Studie, die den hier verwendeten Inhibitor in der gleichen Dosierung und ebenfalls in C57Bl/6J Mäusen verwendete, wurde eine Reduktion der CD11b⁺Ly6G⁻ Zellen im Gehirn um ca. 80 % beobachtet, zu denen neben Mikroglia auch weitere myeloide Zellen zählen, so dass die Effizienz der Depletion nicht verlässlich abgeschätzt werden kann⁵⁶.

CSF-1R wird neben Mikroglia und hirnständigen Makrophagen auch von anderen mononukleären Phagozyten wie Monozyten im Blut und Makrophagen in den peripheren Organen exprimiert, die daher ebenfalls potenzielle Ziele des CSF-1R Inhibitors darstellen. Mittels Durchflusszytometrie untersuchten wir Blut, Milz und Gehirn, um mögliche Veränderungen der Immunzellen zu kontrollieren. Im Blut zeigten sich vermutlich aufgrund der niedrigen Fallzahl keine statistisch signifikanten Veränderungen, die Monozyten erschienen jedoch reduziert. In der Milz konnte eine geringe Reduktion aller CD11b⁺ Zellen nach 7 Tagen beobachtet werden, Ly6C^{hi} CD115⁺ Monozyten und Granulozyten waren jedoch nicht verändert. Innerhalb der CD11b⁻ Zellen waren nach 4 Tagen sowohl die MHCII⁺CD11c⁺ Zellen (vor allem dendritische Zellen) und die MHCII⁺CD11c⁻ Zellen (vor allem B-Zellen) vermindert. Beide Veränderungen waren nach 7 Tagen nicht mehr nachweisbar. Stattdessen konnte eine geringe Zunahme der gesamten CD11b⁻ Zellen beobachtet werden, die jedoch auf keine der untersuchten Subpopulationen zurückzuführen war. Im Gehirn gab es gering ausgeprägte Veränderungen innerhalb der CD11b⁻ Zellen: die MHCII⁺CD11c⁻ Zellen (vor allem B-Zellen) waren vermindert, die MHCII⁺CD11c⁺ Zellen (vor allem dendritische Zellen) waren leicht erhöht. Wie auch in der Milz waren diese Befunde nach 4 Tagen nachweisbar, während sich nach 7 Tagen Inhibitorgabe keine Unterschiede mehr zeigten. Innerhalb der CD11b⁺ Zellen gab es ebenfalls nach 4 Tagen eine geringe Verminderung der CD11c⁺MHCII⁻ Zellen (monozytäre Makrophagen/dendritische Zellen), die nach 7 Tagen nicht mehr nachweisbar war. Stattdessen konnte eine geringe Zunahme der CD11c⁺MHCII⁺ Zellen (MHCII⁺ monozytäre Makrophagen/dendritische Zellen) beobachtet werden. Die Veränderungen waren mit Ausnahme der erhöhten CD11b⁺CD11c⁺MHCII⁺ Zellen nach 7 Tagen im Gehirn nicht mehr nachweisbar bzw. gering ausgeprägt, so dass Limitationen für die Verwendung des

Inhibitors für die Untersuchung der Mikroglia im Schlaganfallmodell aufgrund dieser Veränderungen unwahrscheinlich sind.

Wir untersuchten als nächstes die Auswirkung der Mikroglia-depletion im Schlaganfallmodell. In der Infarktmetrie mittels cMRT zeigten sich in den zwei Kohorten uneinheitliche Ergebnisse. So zeigten sich in der ersten Kohorte an Tag 1 und Tag 3 keine Unterschiede der Infarktvolumina. In der zweiten Kohorte zeigte sich dagegen an Tag 3 und Tag 7 eine signifikante Reduktion (64% bzw. 80%) der Infarktvolumina in der Inhibitorgruppe. In der gepoolten Analyse an für Tag 3 zeigte sich kein signifikanter Unterschied. Mittels Immunhistochemie und Durchflusszytometrie quantifizierten wir die Mikroglia/Makrophagen und konnten die im ersten Experiment bestimmten Depletionsraten bestätigen. Die komplette Depletion der Mikroglia mit einem anderen CSF-1R Inhibitor (PLX3397) führte in zwei anderen Studien^{57,62} zu einer Zunahme der Schlaganfallvolumina. Szalay et al.⁵⁷ erklären diese in ihrer Arbeit durch eine Dysregulation von Kalzium-vermittelten Signalen, die durch Mikroglia vermittelt wird. Auch Jin et al.⁶² beobachteten nach der Depletion von Mikroglia mit PLX3397 eine Zunahme der Infarktvolumina und führen dies auf eine Zunahme von pro-inflammatorische Zytokinen, Leukozyteninfiltration und eine veränderte Mikroglia-Astrozyten-Kommunikation zurück⁶². Im Unterschied zu dieser Arbeit, in der es überlebende Mikroglia gibt, wurde in beiden Studien der Inhibitor über drei Wochen gegeben und so eine nahezu vollständige Depletion der Mikroglia erreicht. Eine weitere mögliche Erklärung der unterschiedlichen Ergebnisse könnte in den verwendeten, unterschiedlichen CSF-1R Inhibitoren liegen. PLX3397, der in den beiden Arbeiten verwendete CSF-1R, inhibiert im Vergleich zu dem hier verwendeten BLZ945 in stärkerem Maße auch die Tyrosinkinasen cKit und PDGFR- β inhibiert und könnte so Einfluss auf die Vorgänge im Infarktgebiet nehmen.

Wir konnten im Infarktgebiet der behandelten Mäuse eine Zunahme der Arginase-1 positiven Mikroglia/Makrophagen 3 Tage nach Auslösen der Ischämie beobachten. Arginase-1 ist ein Marker für anti-inflammatorische Mikroglia und Makrophagen³¹⁻³³. Arginase-1 positive Mikroglia und Makrophagen werden mit der Hemmung der Entzündungsreaktion und der Initiierung der Reparaturphase nach einer ZNS-Schädigung assoziiert^{33,43} und wirken neuroprotektiv, indem sie die Produktion von reaktive Stickstoffspezies einschränken⁶³. Aktivierte Mikroglia und Makrophagen exprimieren Arginase-1 in der akuten Phase des Schlaganfalls, im zeitlichen Verlauf verlieren sie jedoch diesen Marker und exprimieren vermehrt pro-inflammatorische Marker⁴³. Nach Hu et al.⁴³ ist die zusätzliche Schädigung des ZNS nach einer Ischämie mit dem Verlust der

anti-inflammatorischen Mikroglia/Makrophagen und der Zunahme von pro-inflammatorischen Mikroglia/Makrophagen assoziiert^{43,64}. Die hier beobachtete Zunahme von Arginase-1 positiven Mikroglia und Makrophagen in der ipsilateralen Hemisphäre unterstützt diese Hypothese. Um die Hypothese weiter zu untermauern müsste untersucht werden, inwiefern funktionelle Eigenschaften der Makrophagen/Mikroglia verändert wurden. Dies könnte zum Beispiel durch die Analyse von Zytokin- und ROS/RNS-Produktion geschehen.

Die nach der Depletion überlebenden Mikroglia/Makrophagen waren stark teilungsaktiv. Lalancette et al⁶¹ beobachteten, dass proliferierende Mikroglia neuroprotektive Eigenschaften haben. Sie benutzten das CD11b-HSVTK Modell, um proliferierende Mikroglia im MCAO Modell zu eliminieren und beobachteten eine Zunahme der Schlaganfallvolumina, vermehrte IL-6 und TNF- α Produktion sowie eine verminderte Produktion des Wachstumsfaktors IGF-1. In Verbindung mit den hier gezeigten Daten könnte dies sowohl ein Hinweis auf neuroprotektive Effekte von proliferierenden Mikroglia als auch einen schädigenden Einfluss älterer Mikroglia sein. Neben der genaueren funktionellen Charakterisierung der teilungsaktiven Mikroglia wäre es daher auch interessant den Einfluss des Alters der Mikroglia zu untersuchen.

Wir beobachteten des Weiteren eine reduzierte Dichte CD45⁺Iba-1⁺ Zellen in der ischämischen Hemisphäre. Da Mikroglia unter inflammatorischen Bedingungen CD45 hochregulieren können⁶⁵, könnte dies ein Hinweis auf eine reduzierte Aktivierung der Mikroglia als Folge der Depletion sein. Da CD45 unter homöostatischen Bedingungen stärker von myeloiden Zellen als von Mikroglia exprimiert wird, könnte die reduzierte Dichte von CD45⁺Iba-1⁺ Zellen jedoch auch eine Reduktion der myeloiden Zellen bedeuten, was die Mikroglia-spezifität des CSF-1 Inhibitors in Frage stellen würde. Die Differenzierung der beiden Möglichkeiten ist anhand der Färbung nicht möglich und könnte durch ergänzende Untersuchungen wie der eingehenderen Charakterisierung der aktivierten Mikroglia z.B. durch funktionelle Assays sowie der Verwendung von transgenen Mäusen zur Identifizierung von infiltrierenden myeloiden Zellen erreicht werden.

9.2. Limitationen

Das in dieser Arbeit verwendete transiente Ischämiemodell mittels Fadenokklusion der A. cerebri media ist ein etabliertes und viel genutztes Modell, das die Charakteristika des menschlichen Schlaganfalls gut nachbildet^{10,66}. Eine der wichtigsten Limitationen für die Aussagekraft dieser Arbeit ergibt sich aus der hohen Sterblichkeit und der Varianz der Infarkt volumina. Von insgesamt 40 Tieren starben 8 Tiere vor Ende des Experiments. Insgesamt 5 Tiere zeigten keinen

nachweisbaren Infarkt. Die in die Analyse eingeschlossenen Tiere hatten Schlaganfallvolumina zwischen 2 mm^3 und 157 mm^3 mit einer Standardabweichung in den einzelnen Gruppen von bis zu 49 mm^3 . Hierdurch ist die Aussagekraft hinsichtlich eines therapeutischen Effekts stark eingeschränkt. Die hohe Varianz dieses Schlaganfallmodells ist in der Literatur beschrieben und wird durch verschiedene Faktoren beeinflusst^{10,67}. Wichtige Störfaktoren wie unterschiedliche Operateure oder die Verwendung von transgenen Versuchstieren wurden in dieser Arbeit vermieden. Eine Erklärung der hohen Varianz könnte die hohe individuelle Variabilität der hirnersorgenden Gefäße sein⁶⁷ und könnte durch die Verwendung von mehr Versuchstieren pro Gruppe kontrolliert werden.

Wir evaluierten den Effekt der Mikroglia-depletion auf das Ausmaß der ZNS-Schädigung durch die Messung der Infarkt volumina mittels MRT an zwei Zeitpunkten. Hierdurch konnte die Infarktdynamik dargestellt werden und die Validität der Messung verstärkt werden. Die Bestimmung des Infarktvolumens mittels T2 gewichteter MRT-Bildgebung ist eine in Mäusen und Menschen lang etablierte Methode, die gut mit histologischen Methoden und funktionellen Defiziten korreliert und daher eine valide Messgröße darstellt⁶⁸. In der akuten Phase des Schlaganfalls variieren die Infarktgröße stark und nähern sich erst im Verlauf dem definitiven Volumen an, das Infarktvolumen an Tag 3 repräsentiert jedoch gut das endgültige Infarktvolumen⁶⁸. In der akuten Phase des Schlaganfalls kann es zur Entwicklung eines Ödems im Infarktgebiet kommen, wodurch die in der T2 Wichtung ermittelte Infarktgröße als zu groß eingeschätzt werden kann. Wir verwendeten einen rechnerischen Weg, um für diesen Faktor zu korrigieren⁶⁰. Zu den Vorteilen der MRT-basierten Infarktvolumetrie gehört die Möglichkeit, multiple Messungen durchzuführen und Gewebe zu sparen, das so für andere Methoden zur Verfügung steht. Insgesamt ermöglicht die Infarktvolumetrie mittels MRT eine adäquate Beurteilung des ZNS-Schadens *in vivo*, auch wenn der Untergang von Hirngewebe nur durch histologische Methoden dargestellt werden kann. Eine histologische Infarktvolumetrie zur Validierung der Unterschiede in der zweiten Kohorte und insbesondere an Tag 7 war nicht möglich, da die Hirne mittels Durchflusszytometrie untersucht wurden.

Eine weitere Limitation in der Beurteilung des therapeutischen Effekts ist das Fehlen eines Scores, der das funktionelle neurologische Defizit bestimmt (z.B. Bederson Score, Grip-Test, Pole Test oder Rotarod). Der in dieser Pilot-Arbeit bestimmte allgemeine klinische Score kann dies nicht hinreichend abbilden.

Eine abschließende Beurteilung eines möglichen therapeutischen Effekts ist aufgrund der beschriebenen methodischen Limitationen sowie der diskrepanten Ergebnisse der zwei Kohorten im Rahmen dieser Pilotstudie nicht ohne Einschränkungen möglich.

Mikroglia, hirnständige Makrophagen und infiltrierende myeloide Zellen zeigen viele Gemeinsamkeiten, unterscheiden sich jedoch in ihrer entwicklungsgeschichtlichen Herkunft und ihrer Funktion unter homöostatischen und pathologischen Bedingungen^{22,23,69–73}. Die sichere Unterscheidung der einzelnen Populationen unter physiologischen und pathologischen Bedingungen ist bisher nur durch das Markieren der Zellen durch genetische Methoden möglich. Die Differenzierung zwischen den einzelnen Zellpopulationen mit immunhistochemischen Methoden ist schwierig, da es bisher nur wenige spezifische Marker gibt, deren Expression zudem im Rahmen von pathologischen Prozessen variiert. Wir verwendeten Iba-1, einen robusten Marker, der jedoch nicht zwischen den Mikroglia und Makrophagen unterscheidet⁷⁴. Mikroglia und andere myeloide Zellen unterscheiden sich in ihrer Expression von CD45, dieser Unterschied kann mittels Durchflusszytometrie und Immunhistochemie dargestellt werden^{14,75}. Die Expression von CD45 kann im Rahmen von pathologischen Bedingungen variieren, so dass auch mit dieser Methode keine sichere Differenzierung möglich ist. Eine Möglichkeit wäre die Verwendung von transgenen Mäusen, wie zum Beispiel einer *CX3CR1^{gfp}::CCR2^{rfp}* Reportermaus, in der Mikroglia und Monozyten unterschiedlich fluoreszieren.

Die Blut-Hirn-Schranke spielt in der Pathophysiologie des Schlaganfalls eine wichtige Rolle. Die Verletzung der Blut-Hirn-Schranke im Rahmen des Schlaganfalls ist mit einem schlechteren Verlauf assoziiert^{16,76}. Da Mikroglia über inflammatorische Mediatoren die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke beeinflussen können, wäre es interessant zu untersuchen, ob die Mikroglia-depletion durch den Inhibitor die Blut-Hirn-Schranke beeinflusst.

Eine weitere sinnvolle Ergänzung wäre die Untersuchung der pro- und anti-inflammatorischen Zytokine nach der Mikroglia-depletion. Damit könnte ausgeschlossen werden, dass es im Rahmen der Depletion zu einer Aktivierung des Immunsystems kommt, was eine wichtige Limitation anderer Mikroglia-depletionsmodellen wie dem *CX₃CR1cre^{ER}:iDTR* Modell darstellt^{25,46}.

9.3. Ausblick

Die hier im Sinne einer Pilotstudie erhobenen Daten scheinen trotz der Limitationen darauf hinzudeuten, dass die unvollständige Depletion von Mikroglia zu einem verbesserten

Schlaganfalloutcome führen kann. Die starke Verschlechterung des Schlaganfalloutcome in zwei Studien, die ein ähnliches Depletionsmodell verwendeten^{57,62} zeigte sich hier jedoch trotz der Limitationen nicht. Zur weiterführenden Untersuchung wäre eine Wiederholung der hier gezeigten Experimente mit mehr Versuchstieren pro Untersuchungszeitpunkt, eine umfassendere Charakterisierung der neurologischen Defizite, Ergänzung der MRT Untersuchung für alle Tiere an Tag 1 und eine histologische Infarktvolumentrie sinnvoll.

In zentralen Anteilen des Schlaganfalls und der Penumbra herrschen unterschiedliche Bedingungen vor, die in den Mikroglia unterschiedliche Aktivitätszustände hervorrufen^{77,78}. Die Unterscheidung zwischen Penumbra und Schlaganfallkern ist jedoch nicht immer eindeutig feststellbar und daher eine potenzielle Quelle für Störfaktoren. In dieser Arbeit untersuchten wir daher die Mikroglia ungeachtet ihrer Relation zum ischämischen Gebiet. Es wäre zielführend, die Mikroglia in den jeweils unterschiedlichen Zonen zu untersuchen und so ein besseres Verständnis der Mechanismen zu bekommen, über die Mikroglia das ischämische Gewebe beeinflussen.

Das verwendete Depletionsmodell bietet im Gegensatz zu bisherigen Modellen die Möglichkeit, Mikroglia langfristig zu depletieren. Die Prozesse der Regeneration und Remodellierung des ischämischen ZNS-Schadens finden über lange Zeiträume statt, im Menschen deutlich länger als in der Maus. Mit diesem Depletionsmodell ist es erstmals möglich, auch langfristig die Rolle der Mikroglia in der Remodellierung und Regeneration des ZNS nach einem Schlaganfall zu untersuchen.

10. Literaturangaben

1. Veltkamp, R., Fieher, J., Grond, M., Hacke, W., Jungehülsing J, Lang, W., Mattle, H., Nabavi, D., Röther, J., Seifert, V., Veltkamp, R. & Weimar, C. S1 Leitlinie Akuttherapie des Ischämischen Schlaganfalls 2012. AWMF Nummer 030/46
https://www.dgn.org/images/red_leitlinien/LL_2012/pdf/II_22_2012_akuttherapie_des_ischmischen_schlaganfalls_update.pdf (2012).
2. Hankey, G. J. Stroke. *Lancet* **389**, 641–654 (2016).
3. Donnan, G. A., Fisher, M., Macleod, M. & Davis, S. M. Stroke. *Lancet* **371**, 1612–1623 (2008).
4. Vos, T., Allen, C., Arora, M., Barber, R. M., Bhutta, Z. A., Brown, A., Carter, A., Casey, D. C., Charlson, F. J., Chen, A. Z., Coggeshall, M., Cornaby, L., Dandona, L., Dicker, D. J., Dilegge, T., Erskine, H. E., Ferrari, A. J., Fitzmaurice, C., Fleming, T., Forouzanfar, M. H., Fullman, N., Gething, P. W., Goldberg, E. M., Graetz, N., Haagsma, J. A., Johnson, C. O., Kassebaum, N. J., Kawashima, T., Kemmer, L., Khalil, I. A., Kinfu, Y., Kyu, H. H., Leung, J., Liang, X., Lim, S. S., Lopez, A. D., Lozano, R., Marczak, L., Mensah, G. A., Mokdad, A. H., Naghavi, M., Nguyen, G., Nsoesie, E., Olsen, H., Pigott, D. M., Pinho, C., Rankin, Z., Reinig, N., Salomon, J. A., Sandar, L., Smith, A., Stanaway, J., Steiner, C., Teeple, S., Thomas, B. A., Troeger, C., Wagner, J. A., Wang, H., Wanga, V., Whiteford, H. A., Zoeckler, L., Abajobir, A. A., Abate, K. H., Abbafati, C., Abbas, K. M., Abd-Allah, F., Abraham, B., Abubakar, I., Abu-Raddad, L. J., Abu-Rmeileh, N. M. E., Ackerman, I. N., Adebisi, A. O., Ademi, Z., Adou, A. K., Afanvi, K. A., Agardh, E. E., Agarwal, A., Kiadaliri, A. A., Ahmadi, H., Ajala, O. N., Akinyemi, R. O., Akseer, N., Al-Aly, Z., Alam, K., Alam, N. K. M., Aldhahri, S. F., Alegretti, M. A., Alemu, Z. A., Alexander, L. T., Alhabib, S., Ali, R., Alkerwi, A., Alla, F., Allebeck, P., Al-Raddadi, R., Alsharif, U., Altirkawi, K. A., Alvis-Guzman, N., Amare, A. T., Amberbir, A., Amini, H., Ammar, W., Amrock, S. M., Andersen, H. H., Anderson, G. M., Anderson, B. O., Antonio, C. A. T., Aregay, A. F., Artaman, A., Asayesh, H., Assadi, R., Atique, S., Avokpaho, E. F. G. A., Awasthi, A., Quintanilla, B. P. A., Azzopardi, P., Bacha, U., Badawi, A., Balakrishnan, K., Banerjee, A., Barac, A., Barker-Collo, S. L., Barregard, L., Barrero, L. H., Basu, A., Bazargan-Hejazi, S., Bell, B., Bell, M. L., Bennett, D. A., Bensenor, I. M., Benzian, H., Berhane, A., Bernab, E., Betsu, B. D.,

Beyene, A. S., Bhala, N., Bhatt, S., Biadgilign, S., Bienhoff, K., Bikbov, B., Biryukov, S., Bisanzio, D., Bjertness, E., Blore, J., Borschmann, R., Boufous, S., Brainin, M., Brazinova, A., Breitborde, N. J. K., Brown, J., Buchbinder, R., Buckle, G. C., Butt, Z. A., Calabria, B., Campos-Nonato, I. R., Campuzano, J. C., Carabin, H., Cerdas, R., Carpenter, D. O., Carrero, J. J., Castañeda-Orjuela, C. A., Rivas, J. C., Catalá-López, F., Chang, J. C., Chiang, P. P. C., Chibueze, C. E., Chisumpa, V. H., Choi, J. Y. J., Chowdhury, R., Christensen, H., Christopher, D. J., Ciobanu, L. G., Cirillo, M., Coates, M. M., Colquhoun, S. M., Cooper, C., Cortinovis, M., Crump, J. A., Damtew, S. A., Dandona, R., Daoud, F., Dargan, P. I., das Neves, J., Davey, G., Davis, A. C., Leo, D. De, Degenhardt, L., Gobbo, L. C. Del, Dellavalle, R. P., Deribe, K., Deribew, A., Derrett, S., Jarlais, D. C. Des, Dharmaratne, S. D., Dhillon, P. K., Diaz-Torné, C., Ding, E. L., Driscoll, T. R., Duan, L., Dubey, M., Duncan, B. B., Ebrahimi, H., Ellenbogen, R. G., Elyazar, I., Endres, M., Endries, A. Y., Ermakov, S. P., Eshrati, B., Estep, K., Farid, T. A., Farinha, C. S. e S., Faro, A., Farvid, M. S., Farzadfar, F., Feigin, V. L., Felson, D. T., Fereshtehnejad, S. M., Fernandes, J. G., Fernandes, J. C., Fischer, F., Fitchett, J. R. A., Foreman, K., Fowkes, F. G. R., Fox, J., Franklin, R. C., Friedman, J., Frostad, J., Furst, T., Futran, N. D., Gabbe, B., Ganguly, P., Gankp, F. G., Gebre, T., Gebrehiwot, T. T., Gebremedhin, A. T., Geleijnse, J. M., Gessner, B. D., Gibney, K. B., Ginawi, I. A. M., Giref, A. Z., Giroud, M., Gishu, M. D., Glaser, E., Godwin, W. W., Gomez-Dantes, H., Gona, P., Goodridge, A., Gopalani, S. V., Gotay, C. C., Goto, A., Gouda, H. N., Grainger, R., Greaves, F., Guillemin, F., Guo, Y., Gupta, R., Gupta, R., Gupta, V., Gutiérrez, R. A., Haile, D., Hailu, A. D., Hailu, G. B., Halasa, Y. A., Hamadeh, R. R., Hamidi, S., Hammami, M., Hancock, J., Handal, A. J., Hankey, G. J., Hao, Y., Harb, H. L., Harikrishnan, S., Haro, J. M., Havmoeller, R., Hay, R. J., Heredia-Pi, I. B., Heydarpour, P., Hoek, H. W., Horino, M., Horita, N., Hosgood, H. D., Hoy, D. G., Htet, A. S., Huang, H., Huang, J. J., Huynh, C., Iannarone, M., Iburg, K. M., Innos, K., Inoue, M., Iyer, V. J., Jacobsen, K. H., Jahanmehr, N., Jakovljevic, M. B., Javanbakht, M., Jayatilleke, A. U., Jee, S. H., Jeemon, P., Jensen, P. N., Jiang, Y., Jibat, T., Jimenez-Corona, A., Jin, Y., Jonas, J. B., Kabir, Z., Kalkonde, Y., Kamal, R., Kan, H., Karch, A., Karema, C. K., Karimkhani, C., Kasaeian, A., Kaul, A., Kawakami, N., Keiyoro, P. N., Kemp, A. H., Keren, A., Kesavachandran, C. N., Khader, Y. S., Khan, A. R., Khan, E. A., Khang, Y. H., Khera, S., Khoja, T. A. M., Khubchandani, J., Kieling, C., Kim, P., Kim, C. il, Kim, D., Kim, Y. J., Kissoon, N., Knibbs, L. D., Knudsen, A. K., Kokubo, Y., Kolte, D., Kopec, J. A., Kosen, S., Kotsakis, G.

A., Koul, P. A., Koyanagi, A., Kravchenko, M., Defo, B. K., Bicer, B. K., Kudom, A. A., Kuipers, E. J., Kumar, G. A., Kutz, M., Kwan, G. F., Lal, A., Lalloo, R., Lallukka, T., Lam, H., Lam, J. O., Langan, S. M., Larsson, A., Lavados, P. M., Leasher, J. L., Leigh, J., Leung, R., Levi, M., Li, Y., Li, Y., Liang, J., Liu, S., Liu, Y., Lloyd, B. K., Lo, W. D., Logroscino, G., Looker, K. J., Lotufo, P. A., Lunevicius, R., Lyons, R. A., Mackay, M. T., Magdy, M., Razek, A. El, Mahdavi, M., Majdan, M., Majeed, A., Malekzadeh, R., Marcenes, W., Margolis, D. J., Martinez-Raga, J., Masiye, F., Massano, J., McGarvey, S. T., McGrath, J. J., McKee, M., McMahan, B. J., Meaney, P. A., Mehari, A., Mejia-Rodriguez, F., Mekonnen, A. B., Melaku, Y. A., Memiah, P., Memish, Z. A., Mendoza, W., Meretoja, A., Meretoja, T. J., Mhimbira, F. A., Miller, T. R., Mills, E. J., Mirarefin, M., Mitchell, P. B., Mock, C. N., Mohammadi, A., Mohammed, S., Monasta, L., Hernandez, J. C. M., Montico, M., Mooney, M. D., Moradi-Lakeh, M., Morawska, L., Mueller, U. O., Mullany, E., Mumford, J. E., Murdoch, M. E., Nachega, J. B., Nagel, G., Naheed, A., Naldi, L., Nangia, V., Newton, J. N., Ng, M., Ngalesoni, F. N., Nguyen, Q. Le, Nisar, M. I., Pete, P. M. N., Nolla, J. M., Norheim, O. F., Norman, R. E., Norrving, B., Nunes, B. P., Ogbo, F. A., Oh, I. H., Ohkubo, T., Olivares, P. R., Olusanya, B. O., Olusanya, J. O., Ortiz, A., Osman, M., Ota, E., PA, M., Park, E. K., Parsaeian, M., de Azeredo Passos, V. M., Caicedo, A. J. P., Patten, S. B., Patton, G. C., Pereira, D. M., Perez-Padilla, R., Perico, N., Pesudovs, K., Petzold, M., Phillips, M. R., Piel, F. B., Pillay, J. D., Pishgar, F., Plass, D., Platts-Mills, J. A., Polinder, S., Pond, C. D., Popova, S., Poulton, R. G., Pourmalek, F., Prabhakaran, D., Prasad, N. M., Qorbani, M., Rabiee, R. H. S., Radfar, A., Rafay, A., Rahimi, K., Rahimi-Movaghar, V., Rahman, M., Rahman, M. H. U., Rahman, S. U., Rai, R. K., Rajsic, S., Ram, U., Rao, P., Refaat, A. H., Reitsma, M. B., Remuzzi, G., Resnikoff, S., Reynolds, A., Ribeiro, A. L., Blancas, M. J. R., Roba, H. S., Rojas-Rueda, D., Ronfani, L., Roshandel, G., Roth, G. A., Rothenbacher, D., Roy, A., Sagar, R., Sahathevan, R., Sanabria, J. R., Sanchez-Niño, M. D., Santos, I. S., Santos, J. V., Sarmiento-Suarez, R., Sartorius, B., Satpathy, M., Savic, M., Sawhney, M., Schaub, M. P., Schmidt, M. I., Schneider, I. J. C., Schöttker, B., Schwebel, D. C., Scott, J. G., Seedat, S., Sepanlou, S. G., Servan-Mori, E. E., Shackelford, K. A., Shaheen, A., Shaikh, M. A., Sharma, R., Sharma, U., Shen, J., Shepard, D. S., Sheth, K. N., Shibuya, K., Shin, M. J., Shiri, R., Shiue, I., Shrimme, M. G., Sigfusdottir, I. D., Silva, D. A. S., Silveira, D. G. A., Singh, A., Singh, J. A., Singh, O. P., Singh, P. K., Sivonda, A., Skirbekk, V., Skogen, J. C., Sligar, A., Sliwa, K., Soljak, M., Søreide, K., Soriano, J. B., Sposato, L. A., Sreeramareddy, C. T., Stathopoulou,

- V., Steel, N., Stein, D. J., Steiner, T. J., Steinke, S., Stovner, L., Stroumpoulis, K., Sunguya, B. F., Sur, P., Swaminathan, S., Sykes, B. L., Szoeki, C. E. I., Tabar-Larsen, R., Takala, J. S., Tandon, N., Tanne, D., Tavakkoli, M., Taye, B., Taylor, H. R., Te, B. J., Tedla, B. A., Terkawi, A. S., Thomson, A. J., Thorne-Lyman, A. L., Thrift, A. G., Thurston, G. D., Tobegai, R., Tonelli, M., Topor-Madry, R., Topouzis, F., Tran, B. X., Dimbuene, Z. T., Tsilimbaris, M., Tura, A. K., Tuzcu, E. M., Tyrovolas, S., Ukwaja, K. N., Undurraga, E. A., Uneke, C. J., Uthman, O. A., van Gool, C. H., Varakin, Y. Y., Vasankari, T., Venketasubramanian, N., Verma, R. K., Violante, F. S., Vladimirov, S. K., Vlassov, V. V., Vollset, S. E., Wagner, G. R., Waller, S. G., Wang, L., Watkins, D. A., Weichenthal, S., Weiderpass, E., Weintraub, R. G., Werdecker, A., Westerman, R., White, R. A., Williams, H. C., Wiysonge, C. S., Wolfe, C. D. A., Won, S., Woodbrook, R., Wubshet, M., Xavier, D., Xu, G., Yadav, A. K., Yan, L. L., Yano, Y., Yaseri, M., Ye, P., Yebyo, H. G., Yip, P., Yonemoto, N., Yoon, S. J., Younis, M. Z., Yu, C., Zaidi, Z., Zaki, M. E. S., Zeeb, H., Zhou, M., Zodpey, S., Zuhlke, L. J. & Murray, C. J. L. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 310 diseases and injuries, 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet* **388**, 1545–1602 (2016).
5. Robert Koch-Institut (Hrsg) (2015) Gesundheit in Deutschland. Gesundheitsberichterstattung des Bundes. Gemeinsam getragen von RKI und Destatis. RKI, B. Gesundheit in Deutschland (2015). *Robert Koch-Institut (Hrsg) (2015) Gesundheit in Deutschland. Gesundheitsberichterstattung des Bundes. Gemeinsam getragen von RKI und Destatis. RKI, Berlin* 13–76 <http://www.gbe-bund.de/pdf/GESBER2015.pdf> (2015) doi:10.1016/0168-8510(91)90076-A.
6. Wang, H., Naghavi, M., Allen, C., Barber, R. M., Bhutta, Z. A., Carter, A., Casey, D. C., Charlson, F. J., Chen, A. Z., Coates, M. M., Coggeshall, M., Dandona, L., Dicker, D. J., Erskine, H. E., Ferrari, A. J., Fitzmaurice, C., Foreman, K., Forouzanfar, M. H., Fraser, M. S., Fullman, N., Gething, P. W., Goldberg, E. M., Graetz, N., Haagsma, J. A., Hay, S. I., Huynh, C., Johnson, C. O., Kassebaum, N. J., Kinfu, Y., Kulikoff, X. R., Kutz, M., Kyu, H. H., Larson, H. J., Leung, J., Liang, X., Lim, S. S., Lind, M., Lozano, R., Marquez, N., Mensah, G. A., Mikesell, J., Mokdad, A. H., Mooney, M. D., Nguyen, G., Nsoesie, E., Pigott, D. M., Pinho, C., Roth, G. A., Salomon, J. A., Sandar, L., Silpakit, N., Sligar, A., Sorensen, R. J. D., Stanaway, J., Steiner, C., Teeple, S., Thomas, B. A., Troeger, C., VanderZanden, A., Vollset,

S. E., Wanga, V., Whiteford, H. A., Wolock, T., Zoeckler, L., Abate, K. H., Abbafati, C., Abbas, K. M., Abd-Allah, F., Abera, S. F., Abreu, D. M. X., Abu-Raddad, L. J., Abyu, G. Y., Achoki, T., Adelekan, A. L., Ademi, Z., Adou, A. K., Adsuar, J. C., Afanvi, K. A., Afshin, A., Agardh, E. E., Agarwal, A., Agrawal, A., Kiadaliri, A. A., Ajala, O. N., Akanda, A. S., Akinyemi, R. O., Akinyemiju, T. F., Akseer, N., Lami, F. H. Al, Alabed, S., Al-Aly, Z., Alam, K., Alam, N. K. M., Alasfoor, D., Aldhahri, S. F., Aldridge, R. W., Alegretti, M. A., Aleman, A. V., Alemu, Z. A., Alexander, L. T., Alhabib, S., Ali, R., Alkerwi, A., Alla, F., Allebeck, P., Al-Raddadi, R., Alsharif, U., Altirkawi, K. A., Martin, E. A., Alvis-Guzman, N., Amare, A. T., Amegah, A. K., Ameh, E. A., Amini, H., Ammar, W., Amrock, S. M., Andersen, H. H., Anderson, B. O., Anderson, G. M., Antonio, C. A. T., Aregay, A. F., Ärnlöv, J., Arsenijevic, V. S. A., Artaman, A., Asayesh, H., Asghar, R. J., Atique, S., Avokpaho, E. F. G. A., Awasthi, A., Azzopardi, P., Bacha, U., Badawi, A., Bahit, M. C., Balakrishnan, K., Banerjee, A., Barac, A., Barker-Collo, S. L., Bärnighausen, T., Barregard, L., Barrero, L. H., Basu, A., Basu, S., Bayou, Y. T., Bazargan-Hejazi, S., Beardsley, J., Bedi, N., Beghi, E., Belay, H. A., Bell, B., Bell, M. L., Bello, A. K., Bennett, D. A., Bensenor, I. M., Berhane, A., Bernabé, E., Betsu, B. D., Beyene, A. S., Bhala, N., Bhalla, A., Biadgilign, S., Bikbov, B., Abdulhak, A. A. Bin, Biroscak, B. J., Biryukov, S., Bjertness, E., Blore, J. D., Blosser, C. D., Bohensky, M. A., Borschmann, R., Bose, D., Bourne, R. R. A., Brainin, M., Brayne, C. E. G., Brazinova, A., Breitborde, N. J. K., Brenner, H., Brewer, J. D., Brown, A., Brown, J., Brugha, T. S., Buckle, G. C., Butt, Z. A., Calabria, B., Campos-Nonato, I. R., Campuzano, J. C., Carapetis, J. R., Cárdenas, R., Carpenter, D. O., Carrero, J. J., Castañeda-Orjuela, C. A., Rivas, J. C., Catalá-López, F., Cavalleri, F., Cercy, K., Cerda, J., Chen, W., Chew, A., Chiang, P. P.-C., Chibalabala, M., Chibueze, C. E., Chimed-Ochir, O., Chisumpa, V. H., Choi, J.-Y. J., Chowdhury, R., Christensen, H., Christopher, D. J., Ciobanu, L. G., Cirillo, M., Cohen, A. J., Colistro, V., Colomar, M., Colquhoun, S. M., Cooper, C., Cooper, L. T., Cortinovis, M., Cowie, B. C., Crump, J. A., Damsere-Derry, J., Danawi, H., Dandona, R., Daoud, F., Darby, S. C., Dargan, P. I., das Neves, J., Davey, G., Davis, A. C., Davitoiu, D. V, de Castro, E. F., de Jager, P., Leo, D. De, Degenhardt, L., Dellavalle, R. P., Deribe, K., Deribew, A., Dharmaratne, S. D., Dhillon, P. K., Diaz-Torné, C., Ding, E. L., dos Santos, K. P. B., Dossou, E., Driscoll, T. R., Duan, L., Dubey, M., Duncan, B. B., Ellenbogen, R. G., Ellingsen, C. L., Elyazar, I., Endries, A. Y., Ermakov, S. P., Eshrati, B., Esteghamati, A., Estep, K., Faghmous, I. D. A., Fahimi, S., Faraon, E. J. A., Farid, T. A., Farinha, C. S. e S., Faro, A., Farvid, M. S.,

Farzadfar, F., Feigin, V. L., Fereshtehnejad, S.-M., Fernandes, J. G., Fernandes, J. C., Fischer, F., Fitchett, J. R. A., Flaxman, A., Foigt, N., Fowkes, F. G. R., Franca, E. B., Franklin, R. C., Friedman, J., Frostad, J., Fürst, T., Futran, N. D., Gall, S. L., Gambashidze, K., Gamkrelidze, A., Ganguly, P., Gankpé, F. G., Gebre, T., Gebrehiwot, T. T., Gebremedhin, A. T., Gebru, A. A., Geleijnse, J. M., Gessner, B. D., Ghoshal, A. G., Gibney, K. B., Gillum, R. F., Gilmour, S., Giref, A. Z., Giroud, M., Gishu, M. D., Giussani, G., Glaser, E., Godwin, W. W., Gomez-Dantes, H., Gona, P., Goodridge, A., Gopalani, S. V., Gosselin, R. A., Gotay, C. C., Goto, A., Gouda, H. N., Greaves, F., Gughani, H. C., Gupta, R., Gupta, R., Gupta, V., Gutiérrez, R. A., Hafezi-Nejad, N., Haile, D., Hailu, A. D., Hailu, G. B., Halasa, Y. A., Hamadeh, R. R., Hamidi, S., Hancock, J., Handal, A. J., Hankey, G. J., Hao, Y., Harb, H. L., Harikrishnan, S., Haro, J. M., Havmoeller, R., Heckbert, S. R., Heredia-Pi, I. B., Heydarpour, P., Hilderink, H. B. M., Hoek, H. W., Hogg, R. S., Horino, M., Horita, N., Hosgood, H. D., Hotez, P. J., Hoy, D. G., Hsairi, M., Htet, A. S., Htike, M. M. T., Hu, G., Huang, C., Huang, H., Huiart, L., Hussein, A., Huybrechts, I., Huynh, G., Iburg, K. M., Innos, K., Inoue, M., Iyer, V. J., Jacobs, T. A., Jacobsen, K. H., Jahanmehr, N., Jakovljevic, M. B., James, P., Javanbakht, M., Jayaraman, S. P., Jayatilleke, A. U., Jeemon, P., Jensen, P. N., Jha, V., Jiang, G., Jiang, Y., Jibat, T., Jimenez-Corona, A., Jonas, J. B., Joshi, T. K., Kabir, Z., Kamal, R., Kan, H., Kant, S., Karch, A., Karema, C. K., Karimkhani, C., Karletsos, D., Karthikeyan, G., Kasaeian, A., Katibeh, M., Kaul, A., Kawakami, N., Kayibanda, J. F., Keiyoro, P. N., Kemmer, L., Kemp, A. H., Kengne, A. P., Keren, A., Kereselidze, M., Kesavachandran, C. N., Khader, Y. S., Khalil, I. A., Khan, A. R., Khan, E. A., Khang, Y.-H., Khera, S., Khoja, T. A. M., Kieling, C., Kim, D., Kim, Y. J., Kissela, B. M., Kisson, N., Knibbs, L. D., Knudsen, A. K., Kokubo, Y., Kolte, D., Kopec, J. A., Kosen, S., Koul, P. A., Koyanagi, A., Krog, N. H., Defo, B. K., Bicer, B. K., Kudom, A. A., Kuipers, E. J., Kulkarni, V. S., Kumar, G. A., Kwan, G. F., Lal, A., Lal, D. K., Lalloo, R., Lallukka, T., Lam, H., Lam, J. O., Langan, S. M., Lansingh, V. C., Larsson, A., Laryea, D. O., Latif, A. A., Lawrynowicz, A. E. B., Leigh, J., Levi, M., Li, Y., Lindsay, M. P., Lipshultz, S. E., Liu, P. Y., Liu, S., Liu, Y., Lo, L.-T., Logroscino, G., Lotufo, P. A., Lucas, R. M., Lunevicius, R., Lyons, R. A., Ma, S., Machado, V. M. P., Mackay, M. T., MacLachlan, J. H., Razek, H. M. A. El, Magdy, M., Razek, A. El, Majdan, M., Majeed, A., Malekzadeh, R., Manamo, W. A. A., Mandisarisa, J., Mangalam, S., Mapoma, C. C., Marcenes, W., Margolis, D. J., Martin, G. R., Martinez-Raga, J., Marzan, M. B., Masiye, F., Mason-Jones, A. J., Massano, J., Matzopoulos, R., Mayosi, B. M., McGarvey, S. T.,

McGrath, J. J., McKee, M., McMahon, B. J., Meaney, P. A., Mehari, A., Mehendiratta, M. M., Mejia-Rodriguez, F., Mekonnen, A. B., Melaku, Y. A., Memiah, P., Memish, Z. A., Mendoza, W., Meretoja, A., Meretoja, T. J., Mhimbira, F. A., Micha, R., Milllear, A., Miller, T. R., Mirarefin, M., Misganaw, A., Mock, C. N., Mohammad, K. A., Mohammadi, A., Mohammed, S., Mohan, V., Mola, G. L. D., Monasta, L., Hernandez, J. C. M., Montero, P., Montico, M., Montine, T. J., Moradi-Lakeh, M., Morawska, L., Morgan, K., Mori, R., Mozaffarian, D., Mueller, U. O., Murthy, G. V. S., Murthy, S., Musa, K. I., Nachega, J. B., Nagel, G., Naidoo, K. S., Naik, N., Naldi, L., Nangia, V., Nash, D., Nejjari, C., Neupane, S., Newton, C. R., Newton, J. N., Ng, M., Ngalesoni, F. N., de Dieu Ngirabega, J., Nguyen, Q. Le, Nisar, M. I., Pete, P. M. N., Nomura, M., Norheim, O. F., Norman, P. E., Norrving, B., Nyakarahuka, L., Ogbo, F. A., Ohkubo, T., Ojelabi, F. A., Olivares, P. R., Olusanya, B. O., Olusanya, J. O., Opio, J. N., Oren, E., Ortiz, A., Osman, M., Ota, E., Ozdemir, R., PA, M., Pain, A., Pandian, J. D., Pant, P. R., Papachristou, C., Park, E.-K., Park, J.-H., Parry, C. D., Parsaeian, M., Caicedo, A. J. P., Patten, S. B., Patton, G. C., Paul, V. K., Pearce, N., Pedro, J. M., Stokic, L. P., Pereira, D. M., Perico, N., Pesudovs, K., Petzold, M., Phillips, M. R., Piel, F. B., Pillay, J. D., Plass, D., Platts-Mills, J. A., Polinder, S., Pope, C. A., Popova, S., Poulton, R. G., Pourmalek, F., Prabhakaran, D., Qorbani, M., Quame-Amaglo, J., Quistberg, D. A., Rafay, A., Rahimi, K., Rahimi-Movaghar, V., Rahman, M., Rahman, M. H. U., Rahman, S. U., Rai, R. K., Rajavi, Z., Rajsic, S., Raju, M., Rakovac, I., Rana, S. M., Ranabhat, C. L., Rangaswamy, T., Rao, P., Rao, S. R., Refaat, A. H., Rehm, J., Reitsma, M. B., Remuzzi, G., Resnikoff, S., Ribeiro, A. L., Ricci, S., Blancas, M. J. R., Roberts, B., Roca, A., Rojas-Rueda, D., Ronfani, L., Roshandel, G., Rothenbacher, D., Roy, A., Roy, N. K., Ruhago, G. M., Sagar, R., Saha, S., Sahathevan, R., Saleh, M. M., Sanabria, J. R., Sanchez-Niño, M. D., Sanchez-Riera, L., Santos, I. S., Sarmiento-Suarez, R., Sartorius, B., Satpathy, M., Savic, M., Sawhney, M., Schaub, M. P., Schmidt, M. I., Schneider, I. J. C., Schöttker, B., Schutte, A. E., Schwebel, D. C., Seedat, S., Sepanlou, S. G., Servan-Mori, E. E., Shackelford, K. A., Shaddick, G., Shaheen, A., Shahraz, S., Shaikh, M. A., Shakh-Nazarova, M., Sharma, R., She, J., Sheikhbahaei, S., Shen, J., Shen, Z., Shepard, D. S., Sheth, K. N., Shetty, B. P., Shi, P., Shibuya, K., Shin, M.-J., Shiri, R., Shiue, I., Shrimme, M. G., Sigfusdottir, I. D., Silberberg, D. H., Silva, D. A. S., Silveira, D. G. A., Silverberg, J. I., Simard, E. P., Singh, A., Singh, G. M., Singh, J. A., Singh, O. P., Singh, P. K., Singh, V., Soneji, S., Søreide, K., Soriano, J. B., Sposato, L. A., Sreeramareddy, C. T., Stathopoulou, V., Stein, D. J., Stein, M. B., Stranges,

- S., Stroumpoulis, K., Sunguya, B. F., Sur, P., Swaminathan, S., Sykes, B. L., Szoeki, C. E. I., Tabarés-Seisdedos, R., Tabb, K. M., Takahashi, K., Takala, J. S., Talongwa, R. T., Tandon, N., Tavakkoli, M., Taye, B., Taylor, H. R., Ao, B. J. Te, Tedla, B. A., Tefera, W. M., Have, M. Ten, Terkawi, A. S., Tesfay, F. H., Tessema, G. A., Thomson, A. J., Thorne-Lyman, A. L., Thrift, A. G., Thurston, G. D., Tillmann, T., Tirschwell, D. L., Tonelli, M., Topor-Madry, R., Topouzis, F., Towbin, J. A., Traebert, J., Tran, B. X., Truelsens, T., Trujillo, U., Tura, A. K., Tuzcu, E. M., Uchendu, U. S., Ukwaja, K. N., Undurraga, E. A., Uthman, O. A., Dingenen, R. Van, van Donkelaar, A., Vasankari, T., Vasconcelos, A. M. N., Venketasubramanian, N., Vidavalur, R., Vijayakumar, L., Villalpando, S., Violante, F. S., Vlassov, V. V., Wagner, J. A., Wagner, G. R., Wallin, M. T., Wang, L., Watkins, D. A., Weichenthal, S., Weiderpass, E., Weintraub, R. G., Werdecker, A., Westerman, R., White, R. A., Wijeratne, T., Wilkinson, J. D., Williams, H. C., Wiysonge, C. S., Woldeyohannes, S. M., Wolfe, C. D. A., Won, S., Wong, J. Q., Woolf, A. D., Xavier, D., Xiao, Q., Xu, G., Yakob, B., Yalew, A. Z., Yan, L. L., Yano, Y., Yaseri, M., Ye, P., Yebyo, H. G., Yip, P., Yirsaw, B. D., Yonemoto, N., Yonga, G., Younis, M. Z., Yu, S., Zaidi, Z., Zaki, M. E. S., Zannad, F., Zavala, D. E., Zeeb, H., Zeleke, B. M., Zhang, H., Zodpey, S., Zonies, D., Zuhlke, L. J., Vos, T., Lopez, A. D. & Murray, C. J. L. Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet* **388**, 1459–1544 (2016).
7. Ringleb, P. A., Hamann, G. F., Röther, J., Jansen, O., Groden, C. & Veltkamp, R. Akuttherapie des ischämischen Schlaganfalls - Rekanalisierende Therapie*: Ergänzung 2015. *Aktuelle Neurologie* vol. 43 82–91 (2016).
 8. Dirnagl, U., Iadecola, C. & Moskowitz, M. a. Pathobiology of ischaemic stroke. *Trends Neurosci.* **22**, 391–397 (1999).
 9. Lo, E. H. A new penumbra: transitioning from injury into repair after stroke. *Nat. Med.* **14**, 497–500 (2008).
 10. Howells, D. W., Porritt, M. J., Rewell, S. S. J., O'Collins, V., Sena, E. S., van der Worp, H. B., Traystman, R. J. & Macleod, M. R. Different strokes for different folks: the rich diversity of animal models of focal cerebral ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **30**, 1412–1431 (2010).

11. Iadecola, C. & Anrather, J. The immunology of stroke: from mechanisms to translation. *Nat. Med.* **17**, 796–808 (2011).
12. Chamorro, Á., Meisel, A., Planas, A. M., Urra, X., van de Beek, D. & Veltkamp, R. The immunology of acute stroke. *Nat. Rev. Neurol.* **8**, 401–410 (2012).
13. Macrez, R., Ali, C., Toutirais, O., Le Mauff, B., Defier, G., Dirnagl, U. & Vivien Denis, D. Stroke and the immune system: From pathophysiology to new therapeutic strategies. *Lancet Neurol.* **10**, 471–480 (2011).
14. Gelderblom, M., Leypoldt, F., Steinbach, K., Behrens, D., Choe, C. U., Siler, D. A., Arumugam, T. V., Orthey, E., Gerloff, C., Tolosa, E. & Magnus, T. Temporal and spatial dynamics of cerebral immune cell accumulation in stroke. *Stroke* **40**, 1849–1857 (2009).
15. Kolaczowska, E. & Kubes, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, (2013).
16. Turner, R. J. & Sharp, F. R. Implications of MMP9 for Blood Brain Barrier Disruption and Hemorrhagic Transformation Following Ischemic Stroke. *Front. Cell. Neurosci.* **10**, 56 (2016).
17. Gliem, M., Mausberg, A. K., Lee, J. I., Simiantonakis, I., Van Rooijen, N., Hartung, H. P. & Jander, S. Macrophages prevent hemorrhagic infarct transformation in murine stroke models. *Ann. Neurol.* **71**, 743–752 (2012).
18. Gliem, M., Schwaninger, M. & Jander, S. Protective features of peripheral monocytes/macrophages in stroke. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* vol. 1862 329–338 (2016).
19. ElAli, A. & Jean LeBlanc, N. The Role of Monocytes in Ischemic Stroke Pathobiology: New Avenues to Explore. *Front. Aging Neurosci.* **8**, 29 (2016).
20. Michaud, J.-P., Pimentel-Coelho, P. M., Tremblay, Y. & Rivest, S. The impact of Ly6Clow monocytes after cerebral hypoxia-ischemia in adult mice. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **34**, e1-9 (2014).
21. Benarroch, E. E. Microglia: Multiple roles in surveillance, circuit shaping, and response to injury. *Neurology* **81**, 1079–1088 (2013).

22. Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., Mehler, M. F., Conway, S. J., Ng, L. G., Stanley, E. R., Samokhvalov, I. M. & Merad, M. Fate Mapping Analysis Reveals That Adult Microglia Derive from Primitive Macrophages. *Science (80-.)*. **330**, 841–845 (2010).
23. Yona, S., Kim, K.-W., Wolf, Y., Mildner, A., Varol, D., Breker, M., Strauss-Ayali, D., Viukov, S., Guilliams, M., Misharin, A., Hume, D. A., Perlman, H., Malissen, B., Zelzer, E. & Jung, S. Fate Mapping Reveals Origins and Dynamics of Monocytes and Tissue Macrophages under Homeostasis. *Immunity* **38**, 79–91 (2013).
24. Tay, T. L., Mai, D., Dautzenberg, J., Fernández-Klett, F., Lin, G., Sagar, Datta, M., Drougard, A., Stempf, T., Ardura-Fabregat, A., Staszewski, O., Margineanu, A., Sporb, A., Steinmetz, L. M., Pospisilik, J. A., Jung, S., Priller, J., Grün, D., Ronneberger, O. & Prinz, M. A new fate mapping system reveals context-dependent random or clonal expansion of microglia. *Nat. Neurosci.* (2017) doi:10.1038/nn.4547.
25. Parkhurst, C. N., Yang, G., Ninan, I., Savas, J. N., Yates, J. R., Lafaille, J. J., Hempstead, B. L., Littman, D. R. & Gan, W.-B. Microglia Promote Learning-Dependent Synapse Formation through Brain-Derived Neurotrophic Factor. *Cell* **155**, 1596–1609 (2013).
26. Paolicelli, R. C., Bolasco, G., Pagani, F., Maggi, L., Scianni, M., Panzanelli, P., Giustetto, M., Ferreira, T. A., Guiducci, E., Dumas, L., Ragozzino, D. & Gross, C. T. Synaptic Pruning by Microglia Is Necessary for Normal Brain Development. *Science (80-.)*. **333**, (2011).
27. Hanisch, U.-K. & Kettenmann, H. Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat. Neurosci.* **10**, 1387–1394 (2007).
28. Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F. & Helmchen, F. Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science (80-.)*. **308**, 1314–1418 (2005).
29. Schilling, M., Besselmann, M., Leonhard, C., Mueller, M., Ringelstein, E. B. B. & Kiefer, R. Microglial activation precedes and predominates over macrophage infiltration in transient focal cerebral ischemia: a study in green fluorescent protein transgenic bone marrow chimeric mice. *Exp. Neurol.* **183**, 25–33 (2003).
30. Mantovani, A., Biswas, S. K., Galdiero, M. R., Sica, A. & Locati, M. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *J. Pathol.* **229**, 176–185 (2013).

31. Gordon, S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* **3**, 23–35 (2003).
32. Hu, X., Leak, R. K., Shi, Y., Suenaga, J., Gao, Y., Zheng, P. & Chen, J. Microglial and macrophage polarization—new prospects for brain repair. *Nat. Rev. Neurol.* **11**, 56–64 (2014).
33. David, S. & Kroner, A. Repertoire of microglial and macrophage responses after spinal cord injury. *Nat. Publ. Gr.* **12**, (2011).
34. Block, M. L., Zecca, L. & Hong, J. S. Microglia-mediated neurotoxicity: uncovering the molecular mechanisms. *Nat Rev Neurosci* **8**, 57–69 (2007).
35. Taylor, R. A., Chang, C.-F., Goods, B. A., Hammond, M. D., Grory, B. Mac, Ai, Y., Steinschneider, A. F., Renfro, S. C., Askenase, M. H., McCullough, L. D., Kasner, S. E., Mullen, M. T., Hafler, D. A., Love, J. C., Sansing, L. H., Manno, E., Qureshi, A., Mendelow, A., Hanley, D., Keep, R., Hua, Y., Xi, G., Zhao, X., Schulz, C., Hoeffel, G., Kierdorf, K., Butovsky, O., Bennett, M., Dey, A., Allen, J., Hankey-Giblin, P., Paolicelli, R., Mantovani, A., Biswas, S., Galdiero, M., Sica, A., Locati, M., Davies, L., Jenkins, S., Allen, J., Taylor, P., Wang, J., Starossom, S., Sica, A., Mantovani, A., Cherry, J., Olschowka, J., O’Banion, M., Ponomarev, E., Maresz, K., Tan, Y., Dittel, B., Liu, X., Wynn, T., Vannella, K., Qin, H., Wilson, C., Roberts, K., Baker, B., Zhao, X., Benveniste, E., Bilbao, F. de, Tsunawaki, S., Sporn, M., Ding, A., Nathan, C., Bonniaud, P., Eyo, U., Dailey, M., Abutbul, S., Jung, S., Chapman, G., Moores, K., Harrison, D., Campbell, C., Stewart, B., Strijbos, P., Harrison, J., Cardona, A., Corona, A., Ginhoux, F., Lim, S., Hoeffel, G., Low, D., Huber, T., Hu, S., Xi, G., Jin, H., He, Y., Keep, R., Hua, Y., Hua, Y., Keep, R., Hoff, J., Xi, G., Banks, J., Marotta, C., Rankin, J., Hemphill, J., Bonovich, D., Besmertis, L., Manley, G., Johnston, S., Ginhoux, F., Ginhoux, F., Williams, M., Perdiguero, E. G., Yamasaki, R., Ajmone-Cat, M., Mancini, M., Simone, R. De, Cilli, P., Minghetti, L., Gong, D., Shi, W., Yi, S., Chen, H., Groffen, J., Heisterkamp, N., Gordon, S., Norden, D., Fenn, A., Dugan, A., Godbout, J., Liu, Z., Chen, H., Huang, Y., Qiu, Y., Peng, Y., Pál, G., Lovas, G., Dobolyi, A., Campbell, I., Luo, J., Cekanaviciute, E., Fathali, N., Doyle, K., Williams, A., Han, J., Buckwalter, M., Hickman, S., Campanella, M., Sciorati, C., Tarozzo, G., Beltramo, M., Cardona, A., Huang, D., Sasse, M., Ransohoff, R., Schluns, K., Nowak, E., Cabrera-Hernandez, A., Puddington, L., Lefrançois, L., Aguila, H., Sansing, L., Kasner, S., McCullough, L., Agarwal, P., Welsh, F., Kariko, K.,

- Sansing, L., Harris, T., Welsh, F., Kasner, S., Hunter, C., Kariko, K., Zhu, W., Gao, Y., Chang, C., Wan, J., Zhu, S., Wang, J., Li, X., Blizzard, K., Zeng, Z., DeVries, A., Hurn, P., McCullough, L., Thal, S., Mebmer, K., Schmid-Elsaesser, R., Zausinger, S., Hetze, S., Römer, C., Teufelhart, C., Meisel, A., Engel, O., Ijichi, K., Devarajan, G., Chen, M., Muckersie, E., Xu, H., Regen, T., Livak, K., Schmittgen, T., Taylor, R., Hammond, M., Ai, Y. & Sansing, L. TGF- β 1 modulates microglial phenotype and promotes recovery after intracerebral hemorrhage. *J. Clin. Invest.* **127**, 598–610 (2016).
36. Benakis, C., Garcia-Bonilla, L., Iadecola, C. & Anrather, J. The role of microglia and myeloid immune cells in acute cerebral ischemia. *Front. Cell. Neurosci.* **8**, 461 (2015).
37. Batchelor, P. Macrophages and Microglia Produce Local Trophic Gradients That Stimulate Axonal Sprouting Toward but Not beyond the Wound Edge. *Mol. Cell. Neurosci.* **21**, 436–453 (2002).
38. Bouhy, D., Malgrange, B., Multon, S., Poirrier, A.-L., Scholtes, F., Schoenen, J. & Franzen, R. Delayed GM-CSF treatment stimulates axonal regeneration and functional recovery in paraplegic rats via an increased BDNF expression by endogenous macrophages. *FASEB J.* **20**, 1239–41 (2006).
39. Neher, J. J., Emrich, J. V., Fricker, M., Mander, P. K., Théry, C. & Brown, G. C. Phagocytosis executes delayed neuronal death after focal brain ischemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, E4098-107 (2013).
40. Brown, G. C. & Neher, J. J. Microglial phagocytosis of live neurons. *Nat. Publ. Gr.* **15**, 209–216 (2014).
41. Neumann, H., Kotter, M. R. & Franklin, R. J. M. Debris clearance by microglia: An essential link between degeneration and regeneration. *Brain* **132**, 288–295 (2009).
42. Neumann, J., Sauerzweig, S., Ronicke, R., Gunzer, F., Dinkel, K., Ullrich, O., Gunzer, M. & Reymann, K. G. Microglia Cells Protect Neurons by Direct Engulfment of Invading Neutrophil Granulocytes: A New Mechanism of CNS Immune Privilege. *J. Neurosci.* **28**, 5965–5975 (2008).
43. Hu, X., Li, P., Guo, Y., Wang, H., Leak, R. K., Chen, S., Gao, Y. & Chen, J. Microglia/macrophage polarization dynamics reveal novel mechanism of injury

- expansion after focal cerebral ischemia. *Stroke* **43**, 3063–3070 (2012).
44. Waisman, A., Ginhoux, F., Greter, M. & Bruttger, J. Homeostasis of Microglia in the Adult Brain: Review of Novel Microglia Depletion Systems. *Trends Immunol.* **36**, 625–636 (2015).
 45. Wieghofer, P., Knobloch, K. P. & Prinz, M. Genetic targeting of microglia. *Glia* **63**, 1–22 (2015).
 46. Bruttger, J., Karram, K., Wörtge, S., Regen, T., Marini, F., Hoppmann, N., Klein, M., Blank, T., Yona, S., Wolf, Y., Mack, M., Pinteaux, E., Müller, W., Zipp, F., Binder, H., Bopp, T., Prinz, M., Jung, S. & Waisman, A. Genetic Cell Ablation Reveals Clusters of Local Self-Renewing Microglia in the Mammalian Central Nervous System. *Immunity* **43**, 92–107 (2015).
 47. Frieler, R. A., Nadimpalli, S., Boland, L. K., Xie, A., Kooistra, L. J., Song, J., Chung, Y., Cho, K. W., Lumeng, C. N., Wang, M. M. & Mortensen, R. M. Depletion of macrophages in CD11b diphtheria toxin receptor mice induces brain inflammation and enhances inflammatory signaling during traumatic brain injury. *Brain Res* **1624**, 103–112 (2015).
 48. Heppner, F. L., Greter, M., Marino, D., Falsig, J., Raivich, G., Hövelmeyer, N., Waisman, A., Rülcke, T., Prinz, M., Priller, J., Becher, B. & Aguzzi, A. Experimental autoimmune encephalomyelitis repressed by microglial paralysis. *Nat. Med.* **11**, 146–152 (2005).
 49. Mirrione, M. M., Konomos, D. K., Gravanis, I., Dewey, S. L., Aguzzi, A., Heppner, F. L. & Tsirka, S. E. Microglial ablation and lipopolysaccharide preconditioning affects pilocarpine-induced seizures in mice. *Neurobiol. Dis.* **39**, 85–97 (2010).
 50. Pixley, F. J. & Stanley, E. R. CSF-1 regulation of the wandering macrophage: Complexity in action. *Trends Cell Biol.* **14**, 628–638 (2004).
 51. Hamilton, J. A. Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity. *Nature* (2008).
 52. Luo, J., Elwood, F., Britschgi, M., Villeda, S., Zhang, H., Ding, Z., Zhu, L., Alabsi, H., Getachew, R., Narasimhan, R., Wabl, R., Fainberg, N., James, M. L., Wong, G., Relton, J., Gambhir, S. S., Pollard, J. W. & Wyss-Coray, T. Colony-stimulating factor 1 receptor

- (CSF1R) signaling in injured neurons facilitates protection and survival. *J. Exp. Med.* **210**, 157–72 (2013).
53. John A. Hamilton. Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity. *Nat. Rev. Immunol.* (2008).
54. Erbllich, B., Zhu, L., Etgen, A. M., Dobrenis, K. & Pollard, J. W. Absence of colony stimulation factor-1 receptor results in loss of microglia, disrupted brain development and olfactory deficits. *PLoS One* **6**, e26317 (2011).
55. Elmore, M. R. P., Lee, R. J., West, B. L. & Green, K. N. Characterizing newly repopulated microglia in the adult mouse: Impacts on animal behavior, cell morphology, and neuroinflammation. *PLoS One* **10**, e0122912 (2015).
56. Pyonteck, S. M., Akkari, L., Schuhmacher, A. J., Bowman, R. L., Sevenich, L., Quail, D. F., Olson, O. C., Quick, M. L., Huse, J. T., Teijeiro, V., Setty, M., Leslie, C. S., Oei, Y., Pedraza, A., Zhang, J., Brennan, C. W., Sutton, J. C., Holland, E. C., Daniel, D. & Joyce, J. A. CSF-1R inhibition alters macrophage polarization and blocks glioma progression. *Nat. Med.* **19**, 1264–72 (2013).
57. Szalay, G., Martinecz, B., Lénárt, N., Környei, Z., Orsolits, B., Judák, L., Császár, E., Fekete, R., West, B. L., Katona, G., Rózsa, B. & Dénes, Á. Microglia protect against brain injury and their selective elimination dysregulates neuronal network activity after stroke. *Nat. Commun.* **7**, 11499 (2016).
58. Elmore, M. R. P., Najafi, A. R., Koike, M. A., Dagher, N. N., Spangenberg, E. E., Rice, R. A., Kitazawa, M., Matusow, B., Nguyen, H., West, B. L. & Green, K. N. Colony-stimulating factor 1 receptor signaling is necessary for microglia viability, unmasking a microglia progenitor cell in the adult brain. *Neuron* **82**, 380–397 (2014).
59. Fernández-Klett, F., Potas, J. R., Hilpert, D., Blazej, K., Radke, J., Huck, J., Engel, O., Stenzel, W., Genové, G. & Priller, J. Early loss of pericytes and perivascular stromal cell-induced scar formation after stroke. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **33**, 428–39 (2013).
60. Gerriets, T., Stolz, E., Walberer, M., Müller, C., Kluge, A., Bachmann, A., Fisher, M., Kaps, M. & Bachmann, G. Noninvasive Quantification of Brain Edema and the Space-Occupying Effect in Rat Stroke Models Using Magnetic Resonance Imaging. *Stroke* **35**, 566–571

- (2004).
61. Lalancette-Hebert, M., Gowing, G., Simard, A., Weng, Y. C. & Kriz, J. Selective ablation of proliferating microglial cells exacerbates ischemic injury in the brain. *J. Neurosci.* **27**, 2596–2605 (2007).
 62. Jin, W.-N., Shi, S. X.-Y., Li, Z., Li, M., Wood, K., Gonzales, R. J., Liu, Q., Xiang, S., Shi, -Yu, Li, Z., Li, M., Wood, K., Gonzales, R. J. & Liu, Q. Depletion of microglia exacerbates postischemic inflammation and brain injury. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 0271678X1769418 (2017) doi:10.1177/0271678X17694185.
 63. Rath, M., Müller, I., Kropf, P., Closs, E. I. & Munder, M. Metabolism via arginase or nitric oxide synthase: Two competing arginine pathways in macrophages. *Front. Immunol.* **5**, 1–10 (2014).
 64. Suenaga, J., Hu, X., Pu, H., Shi, Y., Hassan, S. H., Xu, M., Leak, R. K., Stetler, R. A., Gao, Y. & Chen, J. White matter injury and microglia/macrophage polarization are strongly linked with age-related long-term deficits in neurological function after stroke. *Exp. Neurol.* **272**, 109–119 (2015).
 65. Sedgwick, J. D., Schwender, S., Imrich, H., Dörries, R., Butcher, G. W. & ter Meulen, V. Isolation and direct characterization of resident microglial cells from the normal and inflamed central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 7438–7442 (1991).
 66. Dirnagl, U. Modeling immunity and inflammation in stroke: can mice be trusted? *Stroke.* **45**, e177-8 (2014).
 67. Leithner, C., Fächtemeier, M., Jorks, D., Mueller, S., Dirnagl, U. & Rojl, G. Infarct Volume Prediction by Early Magnetic Resonance Imaging in a Murine Stroke Model Depends on Ischemia Duration and Time of Imaging. *Stroke* **46**, 3249–3259 (2015).
 68. Palmer, G. C., Peeling, J., Corbett, D., Del Bigio, M. R. & Hudzik, T. J. T2-weighted MRI correlates with long-term histopathology, neurology scores, and skilled motor behavior in a rat stroke model. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **939**, 283–296 (2001).
 69. Mildner, A., Schlevogt, B., Kierdorf, K., Böttcher, C., Erny, D., Kummer, M. P., Quinn, M., Brück, W., Bechmann, I., Heneka, M. T., Priller, J. & Prinz, M. Distinct and non-redundant

- roles of microglia and myeloid subsets in mouse models of Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* **31**, 11159–71 (2011).
70. Prinz, M. & Priller, J. The role of peripheral immune cells in the CNS in steady state and disease. *Nat. Neurosci.* **20**, 136–144 (2017).
71. Prinz, M. & Priller, J. Microglia and brain macrophages in the molecular age: from origin to neuropsychiatric disease. *Nat. Rev. Neurosci.* **15**, 300–12 (2014).
72. Greter, M., Lelios, I. & Croxford, A. L. Microglia versus myeloid cell nomenclature during brain inflammation. *Front. Immunol.* **6**, (2015).
73. Goldmann, T., Wieghofer, P., Jordão, M. J. C., Prutek, F., Hagemeyer, N., Frenzel, K., Amann, L., Staszewski, O., Kierdorf, K., Krueger, M., Locatelli, G., Hochgerner, H., Zeiser, R., Epelman, S., Geissmann, F., Priller, J., Rossi, F. M. V., Bechmann, I., Kerschensteiner, M., Linnarsson, S., Jung, S. & Prinz, M. Origin, fate and dynamics of macrophages at central nervous system interfaces. *Nat. Immunol.* **17**, 797–805 (2016).
74. Ito, D., Imai, Y., Ohsawa, K., Nakajima, K., Fukuuchi, Y. & Kohsaka, S. Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1. *Mol. Brain Res.* **57**, 1–9 (1998).
75. Ford, A. L., Goodsall, A. L., Hickey, W. F., Sedgwick, J. D., Ford, A. 1, Goodsall, A. L., Hickey, W. F. & Sedgwick2, J. D. Normal adult ramified microglia separated Normal Adult Ramified Microglia Separated from Other Central Nervous System Macrophages by Flow Cytometric Sorting Phenotypic Differences Defined and Direct Ex Vivo Antigen Presentation to Myelin Basic Protein-Reactive CD4+ T Cells Compared'. *J Immunol J. Immunol.* **154**, 4309–4321 (1995).
76. Khatri, R., McKinney, A. M., Swenson, B. & Janardhan, V. Blood-brain barrier, reperfusion injury, and hemorrhagic transformation in acute ischemic stroke. *Neurology* **79**, S52-7 (2012).
77. Chiu, I. M., Morimoto, E. T. A., Goodarzi, H., Liao, J. T., O'Keeffe, S., Phatnani, H. P., Muratet, M., Carroll, M. C., Levy, S., Tavazoie, S., Myers, R. M. & Maniatis, T. A neurodegeneration-specific gene-expression signature of acutely isolated microglia from an amyotrophic lateral sclerosis mouse model. *Cell Rep.* **4**, 385–401 (2013).

78. Fumagalli, S., Perego, C., Pischiutta, F., Zanier, E. R. & De Simoni, M.-G. The ischemic environment drives microglia and macrophage function. *Front. Neurol.* **6**, 81 (2015).

11. Appendix

11.1. Eidesstattliche Versicherung

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Leonard Sievernich, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Untersuchung der Depletion von Mikroglia durch CSF-1R Inhibitor in einem experimentellen Schlaganfallmodell“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

[Für den Fall, dass Sie die Forschung für Ihre Promotion ganz oder teilweise in Gruppenarbeit durchgeführt haben:] Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

11.2. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

11.3. Danksagung

Mein erster Dank gilt Prof. Josef Priller für die freundliche Überlassung des spannenden Themas, die Unterstützung und die kritische Diskussion dieses Projekts.

Besonders möchte ich mich bei Dr. Chotima Böttcher bedanken, die mich während der gesamten Dauer dieser Doktorarbeit fachlich und menschlich hervorragend betreut hat und mit ihrer Geduld viel zu dem Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Für die tolle gemeinsame Zeit und Zusammenarbeit möchte ich mich bei allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern des Labors für molekulare Psychiatrie bedanken. Insbesondere bedanke ich mich bei Dr. Francisco Fernández-Klett für die MCAO Operationen und die vielen Anregungen, bei Christian Böttcher für die tolle Unterstützung insbesondere in der Histologie, bei Simone Rolfes und Qimuge Gong für die Einführung und Unterstützung beim MRT, bei Ekaterina-Maria Lyras für die vielen Diskussionen und Anregungen und bei Jasmin Jamal El-Din für die Einführung und Unterstützung während der gesamten Zeit im Labor.

Ein besonderer Dank gilt jedoch meinen Eltern Lothar Sievernich und Iris Telake sowie meiner Schwester Gina Sievernich, die mich während der gesamten Zeit unterstützt haben, in schwierigen Phasen für mich da waren und ohne die diese Arbeit nicht entstanden wäre. Ebenso danke ich allen meinen Freundinnen und Freunden, die mich immer wieder motiviert und unterstützt haben.