

Aus der Klinik für Neurologie  
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Die Rolle der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthetase  
(iNOS) in einwandernden Leukozyten in einem  
Schlaganfallmodell der Maus

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité - Universitätsmedizin  
Berlin

von

Leyli Ghaeni  
aus Hofheim am Taunus

Gutachter:       1. Prof. Dr. J. Priller  
                      2. Prof. Dr. I. Bechmann  
                      3. Prof. Dr. K.-M. Einhäupl

Datum der Promotion: 23.06.2008

---

<b>Verzeichnis der Abkürzungen</b> .....	<b>III</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Zerebrale Ischämie .....	1
1.2 Pathophysiologie des Schlaganfalls.....	2
1.2.1 Energieverlust und Exzitotoxizität.....	2
1.2.2 Apoptose und Nekrose .....	3
1.2.3 Post-ischämische Inflammation .....	4
1.3 Synthese und Funktion von NO nach zerebraler Ischämie .....	5
1.3.1 Biologische Effekte von NO in der zerebralen Ischämie.....	5
1.3.2 NOS-Isoformen.....	7
1.3.3 Pathophysiologische Rolle der iNOS.....	9
1.4 Einwanderung hämatopoetischer Zellen in das ZNS .....	10
1.5 Modell der GFP-Knochenmarkchimäre der Maus.....	11
1.6 Herleitung einer Aufgabenstellung .....	13
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>14</b>
2.1 Materialien.....	14
2.2 Methoden .....	18
2.2.1 Generierung GFP-exprimierender Knochenmarkchimären .....	18
2.2.2 Evaluation von Transduktion und Knochenmarktransplantation.....	20
2.2.3 Chimärengenerierung ohne GFP-Markierung der hämatopoetischen Stammzellen .....	21
2.2.4 Verschluss der Arteria cerebri media.....	22
2.2.5 Perfusion, Organfixierung und Schneiden .....	23
2.2.6 Immunhistochemie.....	23
2.2.7 Berechnung der Infarktgrößen.....	25
2.2.8 Western Blot .....	26
2.2.9 Statistik .....	26
<b>3 Resultate</b> .....	<b>27</b>
3.1 Beurteilung des Transduktionserfolges der hämatopoetischen Zellen und des Transplantationserfolges .....	27
3.1.1 Vergleichbare Transduktionsraten bei iNOS-Knock-out- und Wildtyp-Knochenmarkzellen .....	27
3.1.2 Beurteilung des Transplantationserfolges mittels FACS-Untersuchung.....	28

3.2	Beurteilung der Einwanderung von Leukozyten in das Gehirn .....	29
3.2.1	Einwanderung GFP-positiver Zellen in das ZNS 96 Stunden nach transienter fokaler zerebraler Ischämie .....	29
3.2.2	GFP-positive Zellen im Infarktareal exprimieren Iba-1 .....	31
3.3	Infarktgrößen der Chimärengruppen .....	32
3.3.1	Kein signifikanter Unterschied der Infarktgrößen in den vier Chimärengruppen ..	32
3.3.2	Drei verschiedene Stämme von iNOS-Knock-out-Mäusen sind gegenüber transienter zerebraler Ischämie nicht geschützt .....	34
3.4	iNOS-Immunhistochemie .....	36
3.4.1	Keine iNOS-Expression in GFP-Chimären nach transienter fokaler Ischämie .....	36
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>39</b>
4.1	Chimärengenerierung .....	39
4.2	Einwanderung und Differenzierung .....	40
4.3	Die Rolle einwandernder Leukozyten im Schlaganfall .....	43
4.4	Bedeutung der iNOS im Schlaganfall.....	44
4.4.1	Bedeutung des Ischämie-Modells.....	47
4.4.2	Spezies-spezifische Unterschiede der iNOS-Expression .....	48
4.4.3	Die Auswirkung der Knock-out-Maus auf die Infarktgröße .....	49
4.4.4	Alter und Geschlecht der Mäuse beeinflussen die iNOS-Expression.....	50
4.4.5	Die Auswirkung der Calcium-Konzentration auf die iNOS-Aktivitäts-Bestimmung .....	51
4.4.6	Aminoguanidin - ein unselektiver Hemmstoff der iNOS.....	52
4.5	Ausblick.....	52
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>53</b>
	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>54</b>
	<b>Publikationen.....</b>	<b>64</b>
	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>65</b>
	<b>Eidesstattliche Erklärung .....</b>	<b>667</b>
	<b>Danksagung.....</b>	<b>67</b>

## Verzeichnis der Abkürzungen

1400 W	N-[3-(aminomethyl)benzyl]Azetamidin
ABC	Avidin-Biotin-Komplex
AMPA	Alphaaminohydroxymethylisoxazolepropionsäure
ATP	Adenosintriphosphat
BrdU	5-Bromdesoxyuridin
BSA	Bovines Serumalbumin
CaM	Calmodulin
CD	Differenzierungsantigen, engl. <i>cluster determinant</i>
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
COX	Cyclooxygenase
DAB	Diaminobenzidin
DMFA	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure, engl. <i>desoxyribonucleic acid</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	Verstärkte Variante des grün fluoreszierenden Proteins, engl. <i>enhanced green fluorescent protein</i>
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxidsynthetase
FACS	Fluoreszenz-gesteuerte Zellsortierung, engl. <i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FCS	fötale Kälberserum, engl. <i>fetal calf serum</i>
FMN	Flavin-Adenin-Mononukleotid
GFAP	saures Gliafaserprotein, engl. <i>glial fibrillary acidic protein</i>
GFP	grün fluoreszierendes Protein
H.-E.	Hämatoxylin-Eosin
HCl	Hydrogenchlorid (Salzsäure)
HIF	Hypoxie-induzierbarer Faktor
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HSZ	Hämatopoetische Stammzellen
Iba-1	ionisiertes Calcium-bindendes Adaptermolekül 1
ICAM-1	Interzelluläres Zelladhäsionsmolekül 1, engl. <i>intercellular cell adhesion molecule 1</i>
IFN	Interferon
IL	Interleukin
iNO	induzierbares Stickstoffmonoxid

---

iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxidsynthetase
iNOS <sup>-/-</sup>	iNOS-defiziente Mäuse
IRF	Interferon-regulierender Faktor
KHCO <sub>3</sub>	Kaliumhydrogencarbonat
KMT	Knochenmarktransplantation
L-NA	Nitro-L-Arginin
L-NAME	L-Nitro-Arginin-Methyl-Ester
LPS	Lipopolysaccharid
MCAO	Verschluß der Arteria cerebri media, engl. <i>middle cerebral artery occlusion</i>
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
NaCl	Natriumchlorid, physiologische Kochsalzlösung
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Natriumhydrogenphosphat
NeuN	neuronaies nukleäres Antigen
NF <sub>κ</sub> B	Nukleärer Faktor-kappa-B
NH <sub>4</sub> Cl	Ammoniumchlorid
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor
nNOS	neuronaie Stickstoffmonoxidsynthetase
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxidsynthetase
PAF	Plättchenaktivierender Faktor
PBS	Phosphatpuffer, engl. <i>phosphate buffered saline</i>
PFA	Paraformaldehyd
rHuIL-6	rekombinantes humanes Interleukin 6
rMuIL-3	rekombinantes murines Interleukin 3
rtPA	rekombinanter Gewebsplasminogenaktivator, engl. <i>recombinant tissue plasminogen activator</i>
rSCF	Stammzellfaktor aus der Ratte, engl. <i>rat stem cell factor</i>
SDS	Natriumdodezylsulfat, engl. <i>sodiumdodecylsulfate</i>
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung, engl. <i>Tris-buffered saline</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
ZKM	Zellkulturmedium
ZNS	Zentrales Nervensystem

# 1 Einleitung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Untersuchung der Rolle der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthetase (iNOS) in einem Schlaganfallmodell der Maus. Der iNOS wird eine wichtige Rolle in der Vermittlung des späten ischämischen Schadens durch Produktion toxischer Mengen von Stickstoffmonoxid (NO) zugesprochen. Um den Expressionsort der iNOS näher zu bestimmen, wurde eine Knochenmarkchimäre der Maus verwendet, welche die Unterscheidung zwischen ortständiger Mikroglia und einwandernden Leukozyten erlaubt.

## 1.1 Zerebrale Ischämie

Der Schlaganfall ist in Deutschland nach dem Herzinfarkt und malignen Tumorerkrankungen die dritthäufigste Todesursache (Berlit, 2000) sowie die am häufigsten zu dauerhafter Invalidität führende Erkrankung in den westlichen Industrieländern (Schellinger, 2001). Dieses verleiht dem Schlaganfall nicht nur eine medizinische, sondern auch eine soziale und ökonomische Dimension.

In Deutschland erleiden zurzeit ungefähr 150 000 Einwohner pro Jahr einen Schlaganfall. Rund 800 000 Menschen in Deutschland müssen mit den Folgen eines Schlaganfalls leben (Poeck, Hacke, 2001). Etwa 15-20% der Schlaganfallpatienten sterben innerhalb der ersten vier Wochen. Von den Überlebenden wird nur etwa ein Drittel der Kranken wieder vollständig rehabilitiert. Ein Drittel kann zwar einfache tägliche Aufgaben verrichten, leidet jedoch an deutlichen Einschränkungen. Ein Drittel der Patienten bleibt dauerhaft pflegebedürftig (Berlit, 2000).

Bisher steht als einzige kausal wirksame Akutmaßnahme nur die rekanalisierende Therapie mittels gentechnisch hergestellter Alteplase (rt-PA - *recombinant tissue plasminogen activator*) zur Verfügung. Diese kann jedoch aufgrund des engen Zeitfensters von maximal drei bis sechs Stunden nach dem Schlaganfall nur bei ein bis vier Prozent aller betroffenen Patienten durchgeführt werden. Alle anderen Patienten können nur durch eine so genannte Basistherapie, d.h. die Einstellung eines optimalen Blutdrucks sowie die Verhinderung von Hyperglykämien, Fieber und anderen Komplikationen (z.B. Infektionen) unterstützend behandelt werden (Warlow et al., 2003; Davalos, 2005).

Aus diesem Grund richtet sich ein Schwerpunkt der Schlaganfallforschung auf die Entwicklung von Therapieansätzen, die auch außerhalb dieser Akutphase wirksam sind.

## 1.2 Pathophysiologie des Schlaganfalls

### 1.2.1 Energieverlust und Exzitotoxizität

Das Hirngewebe hat unter physiologischen Umständen einen hohen Verbrauch an Sauerstoff und Glukose und bezieht seine Energie hauptsächlich durch oxidative Phosphorylierung (Übersicht siehe Moro et al., 2004; Dirnagl et al., 1999). Die fokale zerebrale Ischämie führt zu einem schnellen Abfall der zerebralen Blutversorgung und dadurch zu einem Versiegen der Energiequellen im betroffenen Teil des Gehirns. Das verschlossene Gefäß verhindert den Transport der für die Energiegewinnung notwendigen Metaboliten Glukose und Sauerstoff. Eine Aufrechterhaltung der normalen Zellfunktion wird daher unmöglich. Durch das Versagen der ATP-abhängigen Ionenpumpen kommt es zum Verlust des Ionengradienten über der Zellmembran und hierdurch zur Depolarisation von Neuronen und Gliazellen. Potential-abhängige Calcium-Kanäle werden aktiviert und führen zur Ausschüttung exzitatorischer Aminosäuren in den synaptischen Spalt. Abb.1 zeigt eine Übersicht der pathophysiologischen Prozesse nach zerebraler Ischämie.

Vor allem durch die Aktivierung von Glutamat-Rezeptoren kommt es zu einer Überladung der Zelle mit Calcium und zu einem Einstrom von Natrium- und Chlorid-Ionen in die Zelle. Wasser folgt über den Konzentrationsgradienten und bewirkt die Entstehung eines zytotoxischen Ödems. Das Hirnödem führt zur Ausdehnung des Perfusionsdefizits und leistet durch Erhöhung des Hirndrucks, vaskuläre Kompression und Herniation einen wesentlichen Beitrag zur Verschlechterung der Klinik nach dem Schlaganfall (Übersicht siehe Dirnagl et al., 1999).

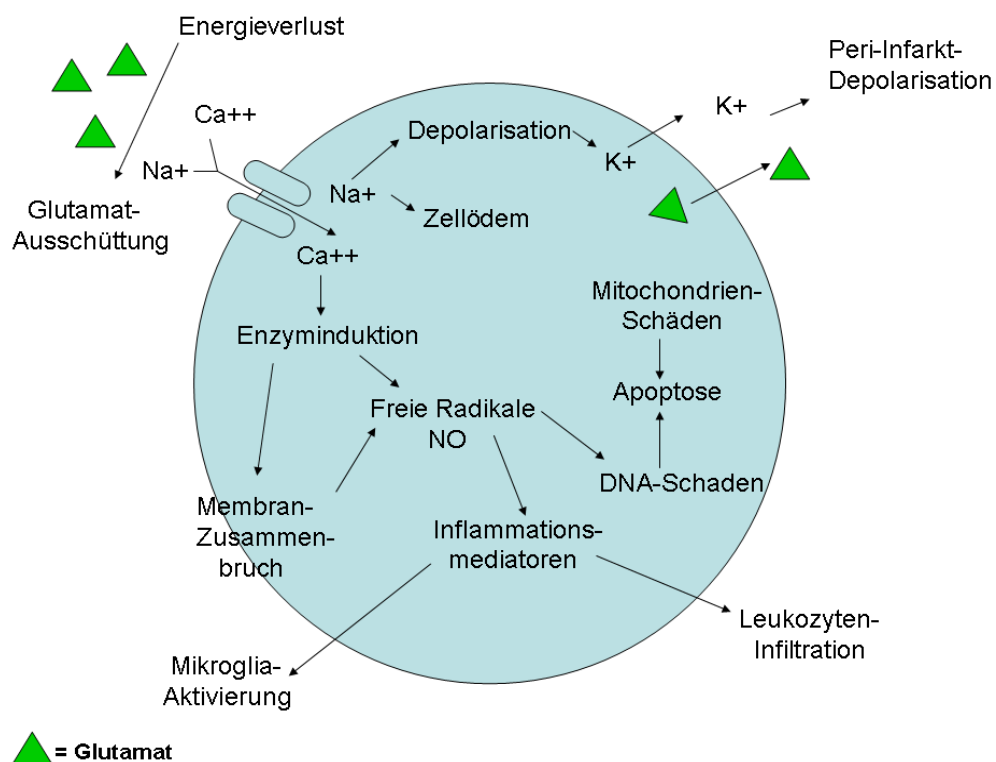
Durch seine Funktion als sekundärer Botenstoff aktiviert der erhöhte Calcium-Spiegel verschiedene Enzyme und Reaktionsketten in Kern und Zytoplasma, die den Gewebsschaden vergrößern. Hierzu gehört die Aktivierung proteolytischer Enzyme, die Proteine des Zytoskeletts und der extrazellulären Matrix angreifen können, aber auch die Aktivierung der Phospholipase A<sub>2</sub> und der Cyclooxygenase (COX), welche die Entstehung freier Radikale fördern. Die freien Radikale sind eine Gruppe von Molekülen, die aufgrund eines ungepaarten Elektrons extrem reaktionsfreudig und aggressiv sind. Durch sie kommt es zu einer Schädigung von Lipiden, DNA und Proteinstrukturen der Zelle. Darüber hinaus können freie Sauerstoff-Radikale als wichtige Signalmoleküle agieren und so die Einleitung des programmierten Zelltods (Apoptose) und inflammatorischer Reaktionen fördern. Sie tragen weiterhin durch die Aktivierung von Proteasen und Veränderung von Makromolekülen zum Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke sowie der Bildung eines Hirnödems bei. Aufgrund ihrer aggressiven Eigenschaften wird ihnen ein wesentlicher Beitrag am sekundären Schaden nach zerebraler Ischämie zugeschrieben.



## 1.2.2 Apoptose und Nekrose

Nicht das gesamte ischämische Territorium ist gleichermaßen von den oben beschriebenen Veränderungen betroffen. Im Zentrum des ischämischen Gebietes (dem so genannten Infarktkern) ist die Blutflussreduktion am deutlichsten (0-20%) und führt durch anhaltende Depolarisation und Exzitotoxizität zu einem schnellen Energieverlust und nachfolgend durch Lipolyse, Proteolyse und dem anhaltenden Zusammenbruch des Ionengleichgewichts schließlich zum Zelltod (Hossmann, 1994). Hier ist die Nekrose der vorherrschende Mechanismus.

In der Peripherie der ischämischen Region (der so genannten Penumbra) wird die Flussreduktion nach außen hin immer weniger relevant, da Kollateralgefäße aus benachbarten Regionen zur Perfusion beitragen und somit die Aufrechterhaltung eines reduzierten Energiemetabolismus unterstützen können. Der Tod der Zellen wird hier vor allem durch den programmierten Zelltod, die Apoptose, hervorgerufen. Neuronen in der Penumbra sind elektrisch stumm, können jedoch gerettet werden, wenn der Blutfluss wiederhergestellt und neuroprotektive Maßnahmen unternommen werden (Astrup et al., 1977).



**Abb. 1: Vereinfachte Übersicht der pathophysiologischen Prozesse nach fokaler zerebraler Ischämie. Modifiziert nach Dirnagl et al., 1999.** Energieverlust führt zur Depolarisation von Neuronen. Aktivierung von spezifischen Glutamatrezeptoren erhöht den intrazellulären Spiegel von Natrium, Calcium und Chlorid, während Kalium in den Extrazellulärraum ausgeschüttet wird. Die Diffusion von Glutamat und Kalium in den Extrazellulärraum kann zu peri-Infarkt-Depolarisationen führen, während der osmotische Gradient Flüssigkeitsverschiebungen in den Intrazellulärraum und

dadurch die Ödembildung bewirkt. Durch Calcium als Botenstoff kommt es zur Überaktivierung verschiedener Enzymsysteme (Proteasen, Lipasen, etc.). Es entstehen freie Radikale, die Membranen, Mitochondrien und DNA zerstören und die Apoptose einleiten können. Freie Radikale induzieren die Bildung von Entzündungsmediatoren, die Mikroglia aktivieren können und über Hochregulation von Adhäsionsmolekülen der Endothelzellen die Einwanderung von Entzündungszellen aus dem peripheren Blut fördern (Leukozyten-Infiltration).

### 1.2.3 Post-ischämische Inflammation

Die Calcium-abhängige Aktivierung von second-messenger Systemen, der Anstieg von freien Radikalen sowie die Hypoxie an sich führen über die Induktion verschiedener Transkriptionsfaktoren zur Expression unterschiedlicher proinflammatorischer Gene. Zu diesen Transkriptionsfaktoren gehört unter anderem der nukleäre Faktor-kappa-B ( $\text{NF}\kappa\text{B}$ ), dem eine Schlüsselrolle in der Einleitung der nachfolgenden Inflammation und des programmierten Zelltodes zugeschrieben wird. Dieser reguliert unter anderem die Transkription inflammatorischer Enzyme wie der iNOS, der COX-2, proinflammatorischer Zytokine, pro-apoptotischer Faktoren sowie von Adhäsionsmolekülen (Übersicht siehe Iadecola, 1997b; Buttini et al., 1994).

Bereits wenige Stunden nach zerebraler Ischämie werden Adhäsionsmoleküle auf der Endotheloberfläche exprimiert. Diese interagieren mit den Oberflächenrezeptoren neutrophiler Granulozyten, welche daraufhin ins Hirngewebe einwandern. Gelenkt durch Chemokine folgen Makrophagen und Monozyten den neutrophilen Granulozyten. Fünf bis sieben Tage nach der Ischämie bilden diese die Hauptpopulation der Zellen im Infarktgebiet (Übersicht siehe Moro et al., 2004; Iadecola, 1997b; Dirnagl et al., 1999).

Es gibt Hinweise, dass einwandernde Leukozyten den Schaden vergrößern (Clark et al., 1991). Diese Beobachtungen werden dadurch gestützt, dass der ischämische Schaden verringert wird, wenn Adhäsionsmoleküle oder inflammatorische Mediatoren wie Interleukine durch Antikörper geblockt werden oder eine systemische Neutropenie induziert wird. Auch transgene Mäuse, denen das Gen für den Transkriptionsfaktor Interferon-regulierender-Faktor (IRF) fehlt, der die Expression Inflammations-assoziiierter Gene reguliert, weisen kleinere Infarktgrößen im Vergleich zum Wildtyp auf (Iadecola et al., 1999).

Neutrophile Granulozyten produzieren außer Chemokinen auch Proteasen, Lipasen und Sauerstoffradikale und führen somit möglicherweise zu einer Potenzierung des Schadens in den Zellen der Penumbra. Außerdem können sie durch Koagulation mit Erythrozyten und Blutplättchen eine Verlegung der Kapillaren („*capillary plugging*“) hervorrufen und hierdurch zur Verschlechterung des mikrovaskulären Blutflusses beitragen (Winqvist et al., 1997, Becker, 2001). Die Aktivierung von Phospholipasen durch Calcium-abhängige Signaltransduktion führt zur Produktion von biologisch aktiven Substanzen wie Leukotrienen, Eicosanoiden, Prostaglandinen und dem Plättchenaktivierenden Faktor (PAF). Hierdurch kommt es zur Vasokonstriktion und Plättchenaggregation (Becker, 2001).

Auch die residenten immunkompetenten Zellen des zentralen Nervensystems (ZNS), die Mikrogliazellen, reagieren umgehend auf den Gewebsschaden (Gehrmann et al., 1992; Morioka et al., 1992). Sie erkennen apoptotische oder geschädigte Zellen in ihrer Umgebung und stoßen daraufhin eine inflammatorische Reaktion an. Die Aktivierung der Mikroglia ist durch einen Übergang in eine typische amöbioide Morphologie erkennbar (Giulian et al., 1994). Die Mikroglia wird wie die Makrophagen phagozytisch aktiv, kann von diesen jedoch weder morphologisch noch immunhistochemisch eindeutig unterschieden werden, da sie zugleich weitgehend identische intrazelluläre und membranständige Marker exprimiert (Perry et al., 1993; George et al., 1994). Eine Unterscheidung ist nur über die Bestimmung von drei unterschiedlichen Transkriptionsprodukten möglich, die von der aktivierten Mikroglia, jedoch nicht von Makrophagen exprimiert werden (Donnou et al., 2005). In den ersten Stunden nach fokaler zerebraler Ischämie bildet sich ein Astrozytenwall aus hypertrophen Astrozyten um das Infarktgebiet herum. In der Kernregion des Infarktes hingegen lassen sich ab den ersten Tagen nach dem ischämischen Ereignis keine Astrozyten mehr nachweisen (Chen et al., 1993; Li et al., 1995). Es wird vermutet, dass die sich ausbildende Glianarbe das geschädigte Areal vom gesunden Gewebe abschottet und dieses so vor einer Ausbreitung des pathologischen Prozesses schützt. Die aktivierten Astrozyten sezernieren eine Vielzahl proinflammatorischer Mediatoren, welche die Entzündungsreaktion fördern (Yu et al., 2000). Darüber hinaus gibt es auch Hinweise, dass die reaktive Astroglie die neuronale Regeneration nicht nur fördert, sondern überhaupt erst möglich macht (Ridet et al., 1997).

### **1.3 Synthese und Funktion von NO nach zerebraler Ischämie**

#### **1.3.1 Biologische Effekte von NO in der zerebralen Ischämie**

Glutamat wirkt postsynaptisch über die Bindung an vier Hauptrezeptortypen: den metabotropen Rezeptor, den N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor (NMDA-Rezeptor), den Alphaaminohydroxymethylisoxazolepropionsäure-Rezeptor (AMPA-Rezeptor) und den Kainat-Rezeptor. Für die Vermittlung der Glutamat-Exzitotoxizität ist vor allem der NMDA-Rezeptor verantwortlich (Übersicht siehe Samdani et al., 1997).

Die Aktivierung des NMDA-Rezeptors führt zum Calcium-abhängigen Anstieg von NO. NO entsteht, katalysiert durch die NO-Synthetase (NOS), aus L-Arginin. Es existieren drei Isoformen der NOS: die neuronale, die induzierbare und die endotheliale NO-Synthetase (siehe Kapitel 1.3.2).

Nach fokaler zerebraler Ischämie steigt die Konzentration von NO innerhalb von 20 Minuten auf mikromolare Konzentrationen und nimmt dann wieder ab. Der NO-Anstieg geht einher mit dem Anstieg von NOS-Aktivität und NOS-Expression und kann durch Glutamat-Rezeptor-Antagonisten gehemmt werden. Die Aktivierung von Glutamat-Rezeptoren ist ein

wichtiger Faktor bei der Entstehung und Aufrechterhaltung der Exzitotoxizität. Dies stellt einen der Hauptmechanismen in der Vermittlung des neuronalen Schadens und Zelltodes nach der Ischämie dar (Übersicht siehe Samdani et al., 1997; Dirnagl et al., 1999).

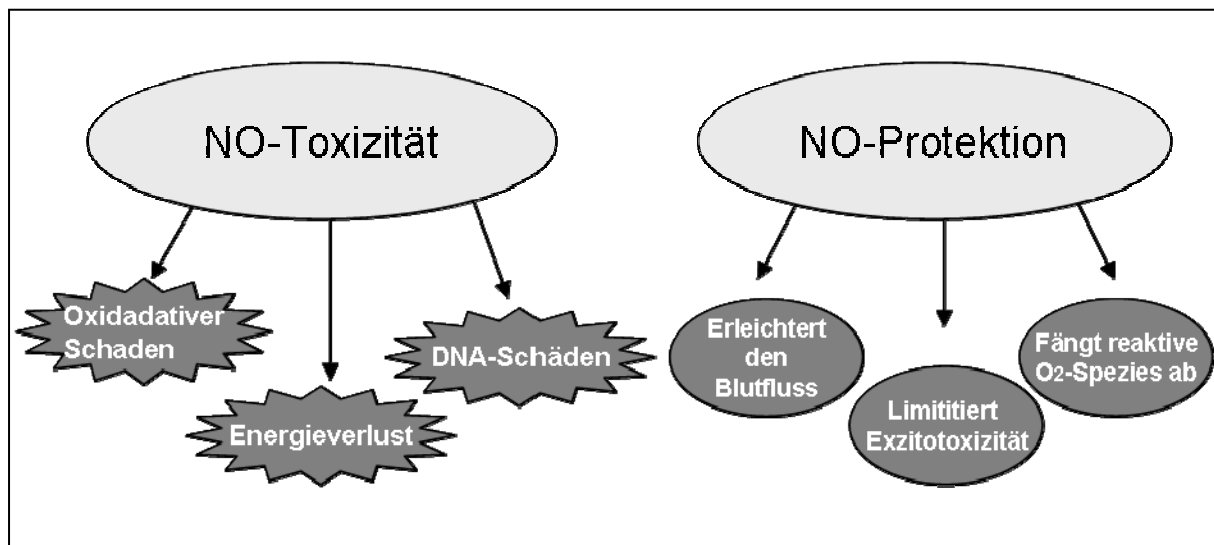
Die Ergebnisse dazu, welche Rolle NO in der Pathophysiologie des ischämischen Schadens wirklich spielt, sind jedoch widersprüchlich. Die Daten einiger Arbeiten deuten darauf hin, dass NO bei zerebraler Ischämie nicht nur destruktiv, sondern auch protektiv wirken kann, je nach Zeitpunkt und dem zellulären Ursprung der Synthese (Übersicht siehe Iadecola, 1997b; Samdani et al., 1997; Peng et al., 1998).

Auf der einen Seite ist NO ein potenter Vasodilatator und ein Inhibitor der Plättchen-Aggregation und Leukozyten-Adhäsion. Dies fördert den post-ischämischen Blutfluss durch Verbesserung des kollateralen Blutflusses und Verhinderung von mikrovaskulärer Verlegung durch Leukozyten und Blutplättchen. Außerdem kann NO den Calcium-Einstrom über NMDA-Rezeptoren hemmen und dadurch die Glutamat-Neurotoxizität deutlich senken. NO bindet darüber hinaus andere reaktive Sauerstoffradikale und senkt hierdurch den Ischämie-induzierten oxidativen Schaden (Übersicht siehe Iadecola, 1997b). Weiterhin verändert es die Konformation der Guanylatzyklase, was zur Bildung von zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) führt, welches neuroprotektiv wirken kann (Radomski et al., 1990). Es gibt Hinweise, dass NO als antiinflammatorischer Faktor wirkt. Von exogenen NO-Donoren freigesetztes NO kann die Zytokin-induzierte Endothelzell-Aktivierung hemmen (De Caterina et al., 1995; Khan et al., 1996), Endothel-Leukozyten-Interaktionen unterbinden (Tsao et al., 1997) und die vaskuläre Inflammation verringern (Übersicht siehe Peng et al., 1998).

Auf der anderen Seite ist NO ein Zytotoxin, welches das Hirngewebe auf verschiedene Arten schädigen kann. Aufgrund eines ungepaarten Elektrons in seiner äußeren Elektronenhülle agiert NO als freies Radikal. Zu seinen Zielmolekülen gehören Sauerstoff, Metallverbindungen, Eisen-Schwefel- und Häm-haltige Proteine (Übersicht siehe Peng et al., 1998). Es fördert die oxidative Schädigung durch die Reaktion mit dem Superoxid-Anion ( $O_2^-$ ) unter Bildung von Peroxynitrit ( $ONNO^-$ ), einem starken Oxidans ( $NO + O_2^- \rightarrow ONOO^-$ ) sowie durch die Störung des Eisenmetabolismus (Übersicht siehe Samdani et al., 1997). NO verursacht, sowohl direkt als auch indirekt durch seine gebildeten Metaboliten, DNA Schäden, hemmt die DNA-Synthese und löst den programmierten Zelltod aus. Außerdem kann NO den Schaden, der durch die Ausschüttung exzitatorischer Neurotransmitter nach Ischämie entsteht, vergrößern (Übersicht siehe Iadecola, 1997b).

Zum jetzigen Zeitpunkt bleibt die genaue Rolle von NO in der zerebralen Ischämie ungeklärt. Vermutlich hängt die Wirkung von NO vor allem davon ab, wo und zu welchem Zeitpunkt nach dem ischämischen Schaden und in welchem Redoxmilieu es gebildet wird (Lipton et al., 1993). Weitere Erkenntnisse über die protektiven oder destruktiven Eigenschaften von

NO erhofft man sich durch die Untersuchung der Funktion der einzelnen NO-Synthetase-Formen. Abb. 2 zeigt eine Übersicht über die verschiedenen biologischen Funktionen von NO nach fokaler zerebraler Ischämie.



**Abb. 2: Übersicht über protektive und destruktive Funktionen von NO nach fokaler zerebraler Ischämie. Modifiziert nach Iadecola, 1997b.** NO kann nach ischämischem Hirnschaden sowohl toxische als auch protektive Funktionen ausüben und führt über die Bildung von Peroxynitrit, einem starken Oxidans, zu oxidativem Schaden. Es setzt Eisen aus der Zelle frei und fördert so die Radikalbildung und Lipid-Peroxidation durch Eisen-Komplexe. Sowohl Enzyme der Glykolyse als auch die mitochondriale Energiegewinnung können von NO gehemmt werden. Die Hemmung der Kreatinkinase-Bildung führt zu weiterem Energieverlust nach der Ischämie. Die DNA-Synthese wird durch Hemmung des Schlüsselenzyms Ribonukleotid-Reduktase inhibiert. Durch Basenabbau kann NO die DNA weiter schädigen und letztendlich zur Apoptose führen. Jedoch übt NO auch protektive Effekte aus: Durch Aktivierung von cGMP sowie Calcium-abhängiger Kalium-Kanäle führt NO zu Vasodilatation. Durch Hemmung der Plättchenaggregation sowie der Leukozytenadhäsion wird die Mikrozirkulation verbessert. NO kann NMDA-Rezeptoren hemmen und somit Exzitotoxizität regulieren. Durch Reaktion mit Alkoxyl (LO•), Peroxyl (LOO•) sowie OH•-Radikalen wirkt NO als Radikalen-Fänger.

### 1.3.2 NOS-Isoformen

Die NOS katalysiert bei Vorliegen von Nikotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH) und Sauerstoff die Oxidation von L-Arginin zu NO. Als Nebenprodukt der Reaktion entsteht Citrullin. Notwendige Kosubstrate der Reaktion sind reduzierte Thiole, Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD), Flavin-Adenin-Mononukleotid (FMN) und Tetrahydrobiopterin.

Bisher sind drei Isoformen der NOS charakterisiert worden, die nach dem Gewebe benannt wurden, aus dem sie zuerst extrahiert wurden: die neuronale (nNOS, Typ I), die induzierbare oder auch immunologische (iNOS, Typ II) und die endotheliale NO-Synthetase (eNOS, Typ III). Die neuronale und endotheliale NOS werden konstitutiv gebildet, während die iNOS unter normalen Umständen nicht exprimiert wird, jedoch in vielen Zelltypen auf entzündliche Stimuli hin induziert wird. Die eNOS und nNOS synthetisieren NO nur, wenn hohe Calcium-Konzentrationen vorliegen und Calmodulin (CaM) an das Enzym gebunden ist. Dagegen findet die NO-Produktion durch iNOS kontinuierlich und unabhängig von der Calcium-Konzentration der Zelle statt, da Calmodulin selbst bei niedrigen Calcium-Konzentrationen

an iNOS bindet. Somit produzieren eNOS und nNOS kleine und sehr regulierte Mengen von NO, die an die Messenger-Funktion dieses Moleküls angepasst sind, während iNOS große Mengen von NO kontinuierlich über einen längeren Zeitraum produziert. Diese Eigenschaft scheint für den zytotoxischen Effekt von NO mitverantwortlich zu sein (Übersicht siehe Iadecola, 1997b; Samdani et al., 1997).

Bisherige Studien nutzten zur Untersuchung der Wirkung der NO-Synthetasen zunächst Nitro-L-Arginin (L-NA) und L-Nitro-Arginin-Methyl-Ester (L-NAME), unspezifische Hemmstoffe, die alle drei Isoformen der NOS gleichzeitig hemmen. Die Resultate dieser Untersuchungen waren sehr widersprüchlich (Übersicht siehe Iadecola, 1997b) und somit wenig aussagekräftig.

Ende der Neunziger konnten durch die Entwicklung von Hemmstoffen der spezifischen Unterformen der NO-Synthetasen und vor allem auch durch die Nutzung Isoform-spezifischer Knock-out-Mäuse weiterführende Erkenntnisse über die Funktion der einzelnen Subtypen der NO-Synthetasen gefunden werden.

Studien mit nNOS- und iNOS-Hemmern im ischämischen Schlaganfall haben durchgehend eine Reduzierung der Infarktgrößen gezeigt. Mäuse, die mit nNOS-Hemmern behandelt wurden, hatten deutlich kleinere Infarkte als ihre Kontrollgruppe (Zhang et al., 1996; Nagafuji et al., 1995). nNOS-Knock-out-Mäuse hatten nach permanentem Verschluss der Arteria cerebri media (MCAO) um 40% kleinere Infarkte als entsprechende Wildtypen. Neuronenkulturen aus diesen Mäusen waren resistenter gegen Glutamat-vermittelte Neurotoxizität (Huang et al., 1994; Hara et al., 1996). Die Produktion der neuronalen NOS konnte hierbei vor allem in Astrozyten nachgewiesen werden.

eNOS-defiziente Mäuse wiesen größere Infarkte als ihre entsprechenden Wildtypen auf. Eine Erklärung hierfür könnte die Aufrechterhaltung des zerebralen Blutflusses durch Vasodilatation in der Region der Penumbra sowie eine Verhinderung der Plättchenaggregation in diesen Mäusen sein (Huang et al., 1996; Loihl et al., 1999).

Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass sowohl die nNOS- als auch iNOS-Aktivität schädlich für das ischämische Hirn sind, während die eNOS-Aktivität zumindest in den frühen Phasen nach Infarkt protektiv sein kann. Es wird vermutet, dass neuronales NO zur Entstehung des Gewebes Schadens beiträgt, während endotheliales NO eine protektive Rolle einnimmt. Wahrscheinlich überwiegen in der frühen Phase der zerebralen Ischämie die vorteilhaften Effekte des endothelialen NO gegenüber dem neurotoxischen Potential von neuronalem NO. Einige Stunden nach der Ischämie wirken die vaskulären Effekte von NO jedoch nicht mehr protektiv und NO beginnt neurotoxisch zu wirken. In der späten Phase nach der Ischämie wird iNOS im Rahmen der post-ischämischen Entzündungsreaktion exprimiert und trägt vermutlich zum verspäteten ischämischen Schaden bei (Übersicht siehe Iadecola, 1997b).

### 1.3.3 Pathophysiologische Rolle der iNOS

Die immunologische NO-Synthetase erhielt ihren Namen aus dem Gewebe, aus dem sie zuerst kloniert wurde. Da sie aber im Gegensatz zur nNOS und eNOS Calcium-unabhängig und auf entzündliche Stimuli hin exprimiert wird, wird sie auch induzierbare NOS genannt.

In vielen Zellen wird iNOS von Lipopolysacchariden (LPS) und Zytokinen induziert. Proinflammatorische Zytokine wie Interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) oder Interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) werden frühzeitig nach der Ischämie induziert und sind an der Expression von iNOS beteiligt. In Makrophagen wird die Transkription von iNOS durch LPS-Sequenzen des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B induziert, während die Aktivierung durch IFN- $\gamma$  den Interferon-regulierenden-Faktor 1 (IRF-1) benötigt. Ebenso wird iNOS durch Hypoxie mittels Bindung des Hypoxie-induzierbaren-Faktors 1 (HIF-1) an die iNOS Promoter-Region aktiviert (Übersicht siehe Moro et al., 2004).

Eine Hochregulation der iNOS wurde während arteriosklerotischer Prozesse (Buttery et al., 1996), Gefäßschäden nach Ballon-Dilatation (Douglas et al., 1994; Joly et al., 1992) und vor allem auch während zahlreicher inflammatorischer Prozesse und Infektionen beobachtet (Übersicht siehe Nathan, 1997). Viele ZNS-Pathologien wie Gehirntumore, Traumata (Clark et al., 1996; Sinz et al., 1999), AIDS-Demenz, Alzheimer, die experimentelle Autoimmun-Enzephalomyelitis (Ding et al., 1997) und demyelinisierende Erkrankungen sind mit einer Expression von iNOS assoziiert (Übersicht siehe Iadecola, 1997b). In all diesen Pathologien wird die iNOS seit Jahren insbesondere als Teil einer komplexen Entzündungsreaktion nach verschiedenen inflammatorischen Prozessen gesehen (Buttini et al., 1994; Schroeter et al., 1995).

Auch in der zerebralen Ischämie, insbesondere in der Vermittlung des späten neuronalen Schadens, wird der iNOS eine wichtige Rolle zugeschrieben. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass die iNOS nach Sauerstoffentzug hochreguliert wird und toxische Mengen an NO produziert (Übersicht siehe Gross und Wolin, 1995). Das von der iNOS produzierte NO ist verantwortlich für die Toxizität von aktivierten Mikroglia/Makrophagen und vergrößert den durch Glutamat verursachten neuronalen Schaden (Chao et al., 1992; Dawson et al., 1994, Hewett et al., 1994).

Auch *in vivo* wurde zwölf Stunden nach Verschluss der A. cerebri media in der Ratte ein Anstieg der iNOS-Expression beobachtet. Das Maximum der iNOS-Expression wurde 48 Stunden nach dem Schlaganfall erreicht. Sieben Tage nach der Ischämie war die iNOS nicht mehr nachweisbar (Iadecola et al., 1995a; Grandati et al., 1997; Moro et al., 2004). Auch im Schlaganfallmodell der Maus begann die iNOS-mRNA-Expression zwischen 24 und 48 Stunden nach Infarktbeginn und endete sieben Tage nach MCAO. Die späte Expression der iNOS legt nahe, dass sie zur späten Phase des ischämischen Schadens beiträgt (Iadecola et al., 1995c).

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Gabe von Aminoguanidin, einem pharmakologischen Hemmstoff der iNOS, 24 Stunden nach MCAO das Infarktvolumen um ungefähr 30% sowohl bei permanenter (Iadecola et al 1995b; Cockcroft et al., 1996) als auch bei transienter Ischämie reduzierte (Iadecola et al., 1996; Zhang et al., 1996a). Die Gabe des selektiven iNOS-Inhibitors N-[3-(aminomethyl)benzyl]Azetamidin (1400W) führte zu einem vergleichbaren protektiven Effekt (Babu et al., 1998; Garvey et al., 1997; Parmentier et al., 1999).

Untersuchungen an iNOS-Knock-out-Mäusen stärken die These einer destruktiven Rolle der iNOS nach zerebraler Ischämie. iNOS-defiziente Mäuse wiesen 96 Stunden nach permanenter zerebraler Ischämie um 28% kleinere Infarktvolumina und ein signifikant kleineres neurologisches Defizit als entsprechende Wildtypen auf. Dieser Unterschied ließ sich 24 Stunden nach dem ischämischen Ereignis noch nicht nachweisen. Eine iNOS-Expression zeigte sich vor allem in Leukozyten, die zu einem späten Zeitpunkt nach der Ischämie einwanderten (Iadecola et al., 1997a).

Eine andere Studie konnte die Protektion von iNOS-defizienten Mäuse gegenüber zerebraler Ischämie bestätigen, jedoch war dieser Effekt nur in männlichen Mäusen nachzuweisen (Loihl et al., 1999). Für die weiblichen Mäuse wird eine Wechselwirkung der iNOS mit Progesteron angenommen. Progesteron hemmt die Expression der iNOS. Dies konnte auch in anderen Arbeiten bestätigt werden, in denen ein Anstieg der iNOS in Mäusen nach Ovariectomie nachzuweisen war (Park et al., 2006).

Eine iNOS-Immunreaktivität nach zerebraler Ischämie wurde außer in mono- und polynukleären inflammatorischen Zellen, welche die Infarktgrenze infiltrierten (Iadecola et al., 1997a), auch in residenter Glia (Loihl et al., 1999), Astrozyten und Endothelzellen nachgewiesen (Übersicht siehe Moro et al., 2004).

Durch die schädigende Wirkung der iNOS in der späten Phase ist eine klinische Anwendung von iNOS-Hemmern auch mehrere Stunden nach Beginn des ischämischen Ereignisses denkbar. Dies ist von besonderem Interesse, da viele Patienten oft erst Stunden nach dem ischämischen Ereignis in das Krankenhaus gebracht werden.

Hinsichtlich einer therapeutischen Anwendung ist somit die Klärung des genauen Expressionsmusters und des Expressionsortes der iNOS von höchstem Interesse.

#### **1.4 Einwanderung hämatopoetischer Zellen in das ZNS**

1963 gelang die Identifizierung hämatopoetischer Stammzellen im Knochenmark durch Siminovitch, Becker und ihre Mitarbeiter. Sie konnten zeigen, dass Zellen aus dem Knochenmark die Hämatopoese von tödlich bestrahlten Mäusen rekonstituieren können. Außerdem wiesen sie durch Serien-Transplantationen nach, dass Knochenmarkzellen das Potential besitzen, sich selbst zu erneuern. Hämatopoetische Stammzellen (HSZ) wurden



somit als Zellen definiert, die sowohl die Fähigkeit zu uneingeschränkter Selbsterneuerung als auch zur Differenzierung in verschiedene Zelllinien (*multilineage*) besitzen (Siminovitch et al., 1963; Becker et al., 1963).

Obwohl HSZ zuerst im Knochenmark identifiziert wurden, konnten sie nach Stimulation, z.B. nach myelosuppressiver Therapie oder Zytokintherapie, auch im peripheren Blut nachgewiesen werden. Durch Blut-Stammzell-Transplantationen konnte gezeigt werden, dass somatische Stammzellen die Fähigkeit besitzen, an Orte zu migrieren, an denen sie gebraucht werden – ein Phänomen, das als *homing* bezeichnet wird (Ho et al., 2003).

Genetisch modifizierte hämatopoetische Zellen wandern in das ZNS ein und können dort nach Transplantation von Knochenmarkzellen zu perivaskulären Zellen, Mikroglia und eventuell zu Astrozyten differenzieren und sich an Entzündungsreaktion des ZNS beteiligen (Lassmann et al., 1993; Eglitis et al., 1997; Hickey und Kimura, 1988; Priller et al., 2001a).

Die systemische Infusion von männlichen Knochenmarkzellen in bestrahlte weibliche Mäuse führte zu einer Einwanderung Y-Chromosom-positiver Donorzellen in das ZNS und zu einer Differenzierung dieser Zellen zu Astro- und Mikroglia (Eglitis et al., 1997). Man geht davon aus, dass etwa 20% aller Mikroglia des adulten Gehirns ihren Ursprung im Knochenmark haben (Krall et al., 1994; Kennedy et al., 1997).

## 1.5 Modell der GFP-Knochenmarkchimäre der Maus

Durch die letale Bestrahlung von Mäusen und die darauf folgende Injektion einer ausreichenden Dosis an Knochenmarkzellen können die Rezipientenzellen die Hämatopoese rekonstituieren und eine Maus mit zwei unterschiedlichen Genotypen generiert werden. Diese Tiere, deren gewebständigen Zellen eine andere genetische Information als die hämatopoetischen Zellen tragen, werden als Chimären bezeichnet. Durch verschiedene Transplantationsansätze kann der Effekt von extern importierter genetischer Information untersucht werden.

Jedoch ist der zytologische und immunhistochemische Nachweis der Donorzellen in den einfachen Chimärenmodellen schwierig. In früheren Experimenten hat man verschiedene Methoden wie die Bromdesoxyuridin(BrdU)-Markierung (Chen et al., 2001) oder die Nutzung des Y-Chromosoms als Marker bei männlichen Donoren verwendet (Cohen et al., 2006). Diese Methoden sind jedoch mit einem größeren technischen Aufwand und einer hohen Fehlerquote verbunden.

Eine Alternative zur Markierung der Donor-Knochenmarkzellen bietet die Nutzung der natürlichen Eigenschaften des Grün-Fluoreszierenden Proteins (GFP), einem 1962 erstmals aus der Qualle *Aequorea victoria* gewonnenen Protein (Shimomura et al., 1962). Der Vorteil des GFPs besteht darin, dass das entsprechende Gen alle notwendigen Informationen für die post-translationale Synthese des Chromophors auf demselben Gen enthält und keine

weiteren Enzyme nötig sind (Übersicht siehe Tsien, 1998). Es ist in lebenden Zellen direkt sichtbar und benötigt keine Fixation, Substrate oder Co-Enzyme (van Roessel et al., 2002).

Durch Transduktion mit einem GFP-kodierenden retroviralen Vektor konnten Knochenmarkzellen in vorangehenden Arbeiten stabil genetisch markiert werden. Dies ermöglichte die Beobachtung und Verfolgung der Zellen über ihre komplette Lebenszeit. Nach Transplantation von GFP-markierten hämatopoetischen Zellen konnte ein signifikanter Austausch perivaskulärer Zellen mit GFP-markierten Blutzellen nachgewiesen und quantifiziert werden (Bechmann et al., 2001). Weiterhin konnte eine signifikante Differenzierung hämatogener Zellen zu Mikroglia gezeigt werden. Diese Zellen konnten immunhistochemisch, morphologisch und ultrastrukturell als Mikroglia identifiziert und ihre Einwanderungskinetik charakterisiert werden (Priller et al., 2001a). In frühen Studien konnte keine Differenzierung von Knochenmarkzellen zu Astrozyten beobachtet werden (Wehner et al., 2003).

Diese Ergebnisse zeigen, dass hämatopoetische Zellen in der Lage sind, in das ZNS einzuwandern und dort teilweise in einen Austausch mit der residenten Zellpopulation treten. Weiterführende Studien sind nötig, um die genauen Differenzierungswege hämatopoetischer Zellen näher zu beleuchten.

## 1.6 Herleitung einer Aufgabenstellung

Der iNOS wird eine wichtige Rolle in der Vermittlung des späten ischämischen Schadens durch Produktion toxischer Mengen an NO zugesprochen. Eine Expression der iNOS findet in der späten Phase nach permanenter und transientser Ischämie statt. iNOS-defiziente Mäuse haben nach 96 Stunden signifikant kleinere Infarkte als ihre Wildtypen. Der Expressionsort des iNOS-Proteins ist jedoch bisher ungeklärt. Es gibt Hinweise darauf, dass einwandernde Leukozyten iNOS exprimieren und somit zu einer Vergrößerung des Infarkts führen. Jedoch ist auch eine Expression der iNOS in residenten Gliazellen beschrieben worden.

Eine Differenzierung dieser beiden Zellpopulationen ist bisher nicht gelungen, da Monozyten und Makrophagen des Blutes immunhistochemisch nicht ohne weiteres von aktivierter Mikroglia zu unterscheiden sind.

Hieraus ergaben sich folgende Fragestellungen:

1. Welche Rolle spielt die Expression von iNOS in einem transienten fokalen Schlaganfallmodell der Maus? Kann in diesem Modell ebenso wie in der permanenten zerebralen Ischämie ein wesentlicher Beitrag der iNOS bei der Vergrößerung des ischämischen Schadens gezeigt werden?
2. In welcher Zellpopulation wird die iNOS nach fokaler zerebraler Ischämie vorwiegend exprimiert? Welche Rolle spielen dabei hämatogen eingewanderte Leukozyten gegenüber ortständigen ZNS-Populationen?

Um diese Fragen zu beantworten, wurde in der vorliegenden Arbeit eine Knochenmarkchimäre der Maus verwendet. Durch Transplantation GFP-markierter Knochenmarkzellen aus iNOS-Knock-out-Mäusen in Wildtyp-Mäuse (und umgekehrt) sollten gleichsam „konditionale“ Knock-out-Tiere geschaffen werden, d.h. Tiere, bei denen je nach Zeitpunkt entweder nur Zellen des ZNS oder nur periphere Blutzellen das iNOS-Gen exprimieren. Mit Hilfe molekularbiologischer, histologischer und immunhistochemischer Methoden sollten sowohl der Expressionsort und das Expressionsmuster des iNOS-Proteins als auch der Beitrag der einzelnen Zellpopulationen zur Größe des ischämischen Schadens beurteilt werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

Produkt	Herkunft
<b>Zellkultur</b>	
Bovines Serumalbumin (BSA)	DAKO, Hamburg
D-Glucose	Sigma, Deisenhofen
<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>	Gibco, Eggenstein
Foetales Kälberserum (FKS)	Biochrom, Berlin
Fuchs-Rosenthal-Zählkammer	Optik-Labor, Stuttgart
Gelatine 2%	Sigma, Deisenhofen
Inkubator IG 150, Zellkultur	Jouan/Thermo electron corp., Waltham, MA, USA
Kanülen 23 G	Terumo, Leuven, Belgien
Kanülen 25 G	Braun, Melsungen
L-Glutamin	Biochrom, Berlin
MethoCult GF® Spezialmedium	Stem Cell Technologies, Vancouver, Canada
Mikroliterpipetten	Eppendorf, Hamburg
<i>Modified Eagle's Medium (MEM)</i>	Gibco, Eggenstein
Petrischalen, steril (3 cm Durchmesser)	Falcon, Heidelberg
Penicillin	Biochrom, Berlin
Polybrene	Sigma, Deisenhofen
rekombinantes humanes Interleukin 6 (rHuIL-6)	PromoCell, Heidelberg
rekombinantes murines Interleukin 3 (rMuIL-3)	PromoCell, Heidelberg
<i>rat stem cell factor (rSCF)</i>	Amgen, Thousand Oaks, CA, USA
Sterlisator, Stericell	MMM Medcenter Einrichtungen, München
Streptomycin	Biochrom, Berlin
Trypsin	Biochrom, Berlin
Virus-Producer-Zelllinie	Dr. Derek A. Persons, St. Jude Children's Hospital, Memphis, Tennessee, USA
Zellkultureinsätze	Millipore, Eschborn
Zellkulturflaschen 75 cm <sup>3</sup>	Falcon, Heidelberg
Zellkulturplatten (24 wells)	Falcon, Heidelberg
Zellkulturplatten (6 wells)	Falcon, Heidelberg
Zellschaber	Greiner

Zentrifugen	Becton Dickinson, Heidelberg
<b>Chimärengenerierung</b>	
5-Fluorouracil	Sigma, Deisenhofen
Autoklav	Systec V100, Wettenberg
Autoklaviertes Futter	Charles River, Sulzfeld
Bestrahlungsquelle	60Co, Siemens, Strahlenklinik der Charité
Chloralhydrat	Merck, Darmstadt
Cotrimoxazol (Cotrim E)	Ratiopharm, Ulm
Halothan	ASID Büsch, Böblingen
Insulinspritzen 1 ml	Becton Dickinson, Heidelberg
IVC-Regal ( <i>isolated ventilation cage system</i> )	Charles River, Sulzfeld
Sterilisator	Heraeus Instruments, Berlin
Infarktauswertungssoftware	Sigma Scan 4.0
<b>Histologie</b>	
Alkohole	J. T. Baker, Deventer, Niederlande
Bikarbonat	Sigma, Deisenhofen
Deckgläser	Marienfeld GmbH, Lauda-Königshofen
Hämalaun	Sigma, Deisenhofen
Hydrogenchlorid (HCl)	Merck, Darmstadt
Kryostat HM 500 OM	Microm/Zeiss, Walldorf
Lithium-Carbonat	Merck, Darmstadt
Methylbutan	Roth, Karlsruhe
Mikroskop 1:	Leica DMRA, Heidelberg
Mikroskop 2:	Leica DMIL, Heidelberg
Mikroskop 3:	Olympus, Hamburg
Natriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt
Ammoniumchlorid (NH <sub>4</sub> Cl)	Sigma, Deisenhofen
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma, Deisenhofen
Sucrose	Sigma, Deisenhofen
Vitroclud	Langenbrück, Emmendingen
<b>Immunhistologie</b>	
Avidin-Biotin-Komplex (ABC-Kit)	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Antikörper: anti-GFAP (rabbit, polyclonal)	DAKO, Hamburg
Antikörper: anti-Iba-1	Dr. Y. Imai, Tokyo, Japan

Antikörper: anti-rabbit, biotinyliert	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Antikörper: anti-NeuN (Maus, polyclonal)	Chemicon, Temecula, CA, USA
Antikörper: anti-GFP	Clontech, BD, Heidelberg
Antikörper: anti-iNOS	Chemicon, Temecula, CA, USA
Ascorbinsäure	Sigma, Deisenhofen
Diaminobenzidin (DAB)	Sigma, Deisenhofen
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Merck, Darmstadt
<i>Immuno Fluore Mounting Medium</i>	ICN Biomedicals GmbH, Meckenheim
<i>Normal Goat Serum</i>	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
<i>Normal Horse Serum</i>	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS ohne Calcium und Magnesium bzw. PBS w/o)	Gibco, Eggenstein
Streptavidin-Texas Red	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Triton X-100	DAKO, Hamburg
<b>FACS (Fluoreszenz-gesteuerte Zellsortierung)</b>	
Antikörper: anti-Mac-1-PE	Clontech, BD, Heidelberg
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma, Deisenhofen
FACS Calibur	Becton Dickinson, Heidelberg
Cellquest Software für Apple	Apple
KHCO <sub>3</sub> (Kaliumhydrogencarbonat)	Sigma, Deisenhofen
<b>Western Blot</b>	
Tris	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma, Deisenhofen
Tween 20	Serva, Heidelberg
Magermilchpulver (5%)	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Merck, Darmstadt
Glycin	Roth, Karlsruhe
Natriumdodezylsulfat (SDS)	Sigma, Deisenhofen
Dimethylfomamid (DMFA)	VEB Laborchemie, Apolda
5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate	Sigma, Deisenhofen
p-toluidine Salz	Sigma, Deisenhofen

**Tiere**

*Tiere 1a:* iNOS-Knock-out-Mäuse, ursprünglich von Laubach et al. (1995) vor einem gemischten Hintergrund generierte Mäuse, zurückgekreuzt auf C57BL/6-Mäuse wurden freundlicherweise von Prof. Bogdan, Erlangen, überlassen. Zucht: Abteilung für experimentelle Neurologie, Charité, Berlin.

*Tiere 1b:* Die entsprechenden Wildtypen, C57BL/6-Mäuse, Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin, Berlin.

*Tiere 2a:* Ursprünglich generierte Laubach-Mäuse (1995) mit gemischtem genetischem Hintergrund aus C57BL/6 und SV129-Mäusen, Jackson Laboratories (Ben Harbour, ME; USA).

*Tiere 2b:* Wildtyp-Mäuse mit gemischtem Hintergrund (B6129PF2/J), Jackson Laboratories (Ben Harbour, ME; USA).

*Tiere 3a:* Zuchtpaare der von MacMicking et al. (1995) generierten iNOS-Knock-out Maus wurden freundlicherweise von Dr. S. Murphy (University of Nottingham, Nottingham, UK) überlassen und heterozygot gezüchtet, um eine homozygote Linie von iNOS-Knock-out-Tieren sowie ihre entsprechenden Wildtypen (Tiere 3b) zu erhalten. Zucht: Abteilung für experimentelle Neurologie, Charité, Berlin.

In allen Tierexperimenten wurden die Tierschutzbedingungen des Landes Berlin eingehalten.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Generierung GFP-exprimierender Knochenmarkchimären

GFP<sup>1</sup>-exprimierende Knochenmarkchimären wurden nach dem Protokoll von Priller et al. (2001a) hergestellt.

#### 2.2.1.1 Allgemeine Zellkulturbedingungen

Das Zellkulturmedium (ZKM) bestand aus 85% Dulbecco's Modified Eagle Medium und 15% Hitze-inaktiviertem fötales Kälberserum (FCS). Es enthielt zudem 3,25 g/l D-Glucose, 2 mmol/l Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 U/ml Streptomycin. Die Zellen wurden jeweils bei 37°C in 95% Luft und 5% CO<sub>2</sub> bei 95% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Zum Spülen wurde phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS) ohne Calcium und Magnesium verwendet.

#### 2.2.1.2 Präparation von Knochenmark

Erwachsene männliche C57BL/6-Mäuse und iNOS-Knock-out-Mäuse (8-12 Wochen, Mindestgewicht 18 g) erhielten zur Stimulation des Zellzyklus eine intraperitoneale Injektion von 5-Fluorouracil (150 mg/kg Körpergewicht gelöst in 100 µl 0,9% NaCl pro mg Substanz). 48 Stunden später wurden die Tiere durch eine intraperitoneale Injektion von Chloralhydrat (250 µl einer 10%-igen Lösung) tief narkotisiert und getötet. Nach Abtrennung der Hinterbeine wurden die Femores und Tibiae von der umgebenden Muskulatur freipräpariert. Die Knochen wurden mit eiskaltem 2%-igem FCS mehrmals durchgespült, bis die Spülflüssigkeit makroskopisch klar war. Das auf diese Weise gewonnene Knochenmark von zwei Tieren wurde im Folgenden gemeinsam weiter verarbeitet.

#### 2.2.1.3 Prästimulationskultur

Das Knochenmark wurde aus der Spüllösung und aus dem ersten Überstand abzentrifugiert und in 1 ml ZKM resuspendiert. 20 µl der Suspension wurden in einer Fuchs-Rosenthal-Kammer gegeben, gezählt und daraus die Gesamtzahl der kernhaltigen Zellen im geernteten Knochenmark berechnet. Die Knochenmarkzellen wurden in einer Konzentration von  $2 \times 10^6$  Zellen pro ml Zellkulturmedium (ZKM) mit 20 ng/ml rMuL-3, 50 ng/ml rHuL-6 und 50 ng/ml rSCF für 48 Stunden kultiviert.

---

<sup>1</sup> Die verwendeten Knochenmarkzellen wurden mit dem Gen für die verstärkte Variante des GFP (EGFP) transfiziert. Da es in der Literatur allgemein üblich ist, nicht die spezielle Variante des verwendeten GFP anzugeben, wird auch in dieser Arbeit im Folgenden von GFP die Rede sein, obwohl eigentlich EGFP korrekt wäre.



#### **2.2.1.4 Kultur der MGirL22Y-produzierenden GP+E86 Zelllinie und Vorbereitung der Kokultur**

Die ecotrope MGirL22Y-produzierende Zelllinie wurde freundlicherweise von Dr. Derek Persons zur Verfügung gestellt. Die Herstellung erfolgte durch die Transfektion des Vektors MGirL22Y in die Verpackungszelllinie GP+E86. Der Vektor MGirL22Y besteht aus dem murinen Stammzellvirus, in welches die cDNA für EGFP, die interne ribosomale Eingangsseite des Enzephalomyokarditisvirus und eine Mutante (L22Y) des Dihydrofolatreduktasegens integriert wurde. E86 ist eine immortalisierte Fibroblastenzelllinie, welche die für eine retrovirale Transduktion notwendigen viralen Helfergene *gag*, *pol* und *env* auf zwei verschiedenen Plasmiden enthält. Die Produktion von intakten Retroviren durch diese Zelllinie ist extrem unwahrscheinlich, da dazu drei unabhängige Rekombinationsereignisse notwendig wären. Deshalb gilt GP+E86 als „sichere“ Verpackungszelllinie (Markowitz et al., 1988).

In der Stammkultur wurden die Zellen in 75 cm<sup>3</sup> Flaschen kultiviert. Die Zellen wurden alle drei bis vier Tage umgesetzt. Eine Kulturflasche enthielt zu diesem Zeitpunkt etwa 35 x 10<sup>6</sup> Zellen.

Jeweils 24 Stunden vor der geplanten Kokultur wurden die Zellen umgesetzt, gezählt und eine dem erwarteten Verlauf der Prästimulationskultur entsprechend benötigte Teilmenge mit einer Dosis von 13 Gy aus einer Kobaltquelle bestrahlt (Kooperation Strahlenklinik der Charité), um den Zellzyklus zu arretieren.

Die 75 cm<sup>3</sup> Kulturflaschen wurden mit einer 0,1%-igen Gelatinelösung beschichtet, bevor darin 3,5 x 10<sup>6</sup> Zellen pro Kulturflasche 24 Stunden inkubiert wurden.

#### **2.2.1.5 Kokultur von Knochenmark und GP+E86-Zelllinie**

Die Knochenmarkzellen wurden aus dem Kulturmedium der Prästimulationskultur wie oben beschrieben abzentrifugiert. Die nach der Prästimulationskultur am Boden der Kulturflasche haftenden Zellen wurden in PBS mit einem Schaber vorsichtig abgelöst und zusammen mit dem Überstand aus der Prästimulationskultur erneut abzentrifugiert.

Anschließend wurde wiederum die Zahl der kernhaltigen Zellen ermittelt. Jeweils eine der am Tage zuvor ausgesäten GP+E86-Kulturen wurde mit einer Knochenmarkdosis von etwa 10 x 10<sup>6</sup> kernhaltigen Zellen in einem Volumen von 1 ml ZKM beimpft. Diese Kokultur wurde mit 20 ng/ml rMUL-3, 50 ng/ml rHUL-6, 50 ng/ml rSCF und 6 µg/ml Polybrene versetzt und für weitere 48 Stunden wie oben inkubiert.

#### **2.2.1.6 Bestrahlung der Empfängertiere**

Pro Kultur wurden, abhängig von der Zellzahl, ein oder zwei Mäuse einer fraktionierten  $\gamma$ -Ganzkörperbestrahlung von 2 x 5,5 Gy im Abstand von drei Stunden ausgesetzt

(Kooperation Strahlenklinik der Charité). Die Bestrahlung ist hochgradig myeloablativ, so dass nicht erfolgreich rekonstituierte Tiere nach ein bis zwei Wochen versterben, wie in Vorexperimenten gezeigt werden konnte.

### **2.2.1.7 Aufbereitung der Zellen aus der Kokultur und Transplantation**

Das Medium mit den suspendierten Zellen wurde der Kokultur entnommen und leicht adhärenente Zellen wurden durch Spülen der Kulturflaschen mit 2%-igem FCS abgelöst. Die Zellen wurden zentrifugiert und die Zahl der kernhaltigen Zellen wie oben beschrieben ermittelt. Jeweils  $4-5 \times 10^6$  Zellen wurden in einem Injektionsvolumen von 450  $\mu$ l 2%-igem FCS, versetzt mit 25 internationalen Einheiten Heparin, langsam in die Schwanzvene einer letal bestrahlten Maus injiziert. Nach der Transplantation wurden die Tiere einzeln mit jeweils autoklaviertem Einstreu, Futter und Wasser, welches mit 670 mg/l Cotrimoxazol versetzt war, in einem IVC-Regal gehalten, um das Infektionsrisiko zu minimieren. Nach zwei Wochen wurde Cotrimoxazol aus dem Trinkwasser entfernt. Die Tierschutzbestimmungen des Landes Berlin wurden eingehalten. Abb. 3 zeigt eine Übersicht über die verwendete Methodik.

## **2.2.2 Evaluation von Transduktion und Knochenmarktransplantation**

### **2.2.2.1 Methylzellulosekulturen**

Die Beurteilung des Transduktionserfolges erfolgte zunächst *in vitro* nach Kultur von 25 000 transduzierten Knochenmarkszellen auf 2 ml Methylzellulose.

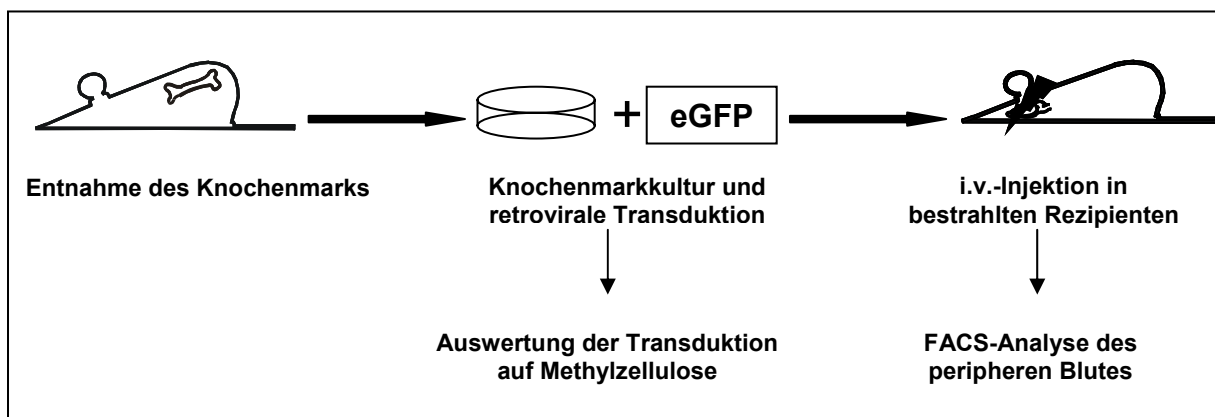
Die resultierenden koloniebildenden Einheiten wurden nach acht bis zehn Tagen mit Hilfe eines inversen Fluoreszenzmikroskops auf ihre GFP-Expression hin untersucht und ausgezählt.

### **2.2.2.2 Blutentnahme, Durchflusszytometrie und Zellsortierung**

Die durchflusszytometrischen Messungen und die Zellsortierung wurden am Deutschen Rheumaforschungszentrum in Zusammenarbeit mit Dr. Kaiser durchgeführt. Zu definierten Zeitpunkten, frühestens vier bis fünf Wochen nach der Knochenmarktransplantation (KMT), wurden den Tieren einige Tropfen Blut aus der Schwanzvene entnommen und jeweils in 500  $\mu$ l FACS-Puffer verdünnt und bei 4°C jeweils für drei Minuten bei 2000 U/min zentrifugiert. Die Erythrozyten wurden für 15 Minuten mit  $\text{KHCO}_3$  auf Eis lysiert und die verbleibenden Zellen wurden zweimal in jeweils 1 ml FACS-Puffer gewaschen und erneut abzentrifugiert. Die Zellsuspension wurde für 15 Minuten mit 20  $\mu$ l Antikörperlösung (anti-mac-1-Ak, Verdünnung 1:400) inkubiert, erneut in 1 ml FACS-Puffer gewaschen und schließlich in 500  $\mu$ l FACS-Puffer resuspendiert. Ungefärbte Proben dienten als Kontrollen.

Zum FACS-Ausschluß von toten Zellen wurde direkt vor der Messung jede Probe mit 1 µg/ml Propidiumiodid (PI) versetzt. PI kann die Zellmembran von toten Zellen passieren und wird in die DNA interkaliert, so dass die toten Zellen durch die Substanz markiert werden. Die FACS-Analyse erfolgte am BD FACS Calibur.

Von jeder Probe wurden mindestens 20 000 Ereignisse gemessen. Die Auswertung der Messwerte erfolgte mit den Programmen Cellquest und Excel. Für einen Vergleich der Messsysteme Durchflusszytometrie und Fluoreszenzmikroskopie wurden Blutzellen nach Hämolyse anhand des Ausmaßes ihrer relativen GFP-Fluoreszenz sortiert.



**Abb. 3: Übersicht über die Methodik der Chimärenherstellung.** Das Knochenmark wurde aus den Donormäusen entnommen und hämatopoetische Stammzellen wurden *in vitro* mit Hilfe eines Retrovirus mit GFP transduziert. Die Transduktionsrate wurde in klonogenen Kulturversuchen auf Methylzellulose bestimmt und das transduzierte Knochenmark in die vorher letal bestrahlte Empfängermaus transplantiert. Die Auswertung des Transplantationserfolges erfolgte durch die FACS Analyse (siehe Text).

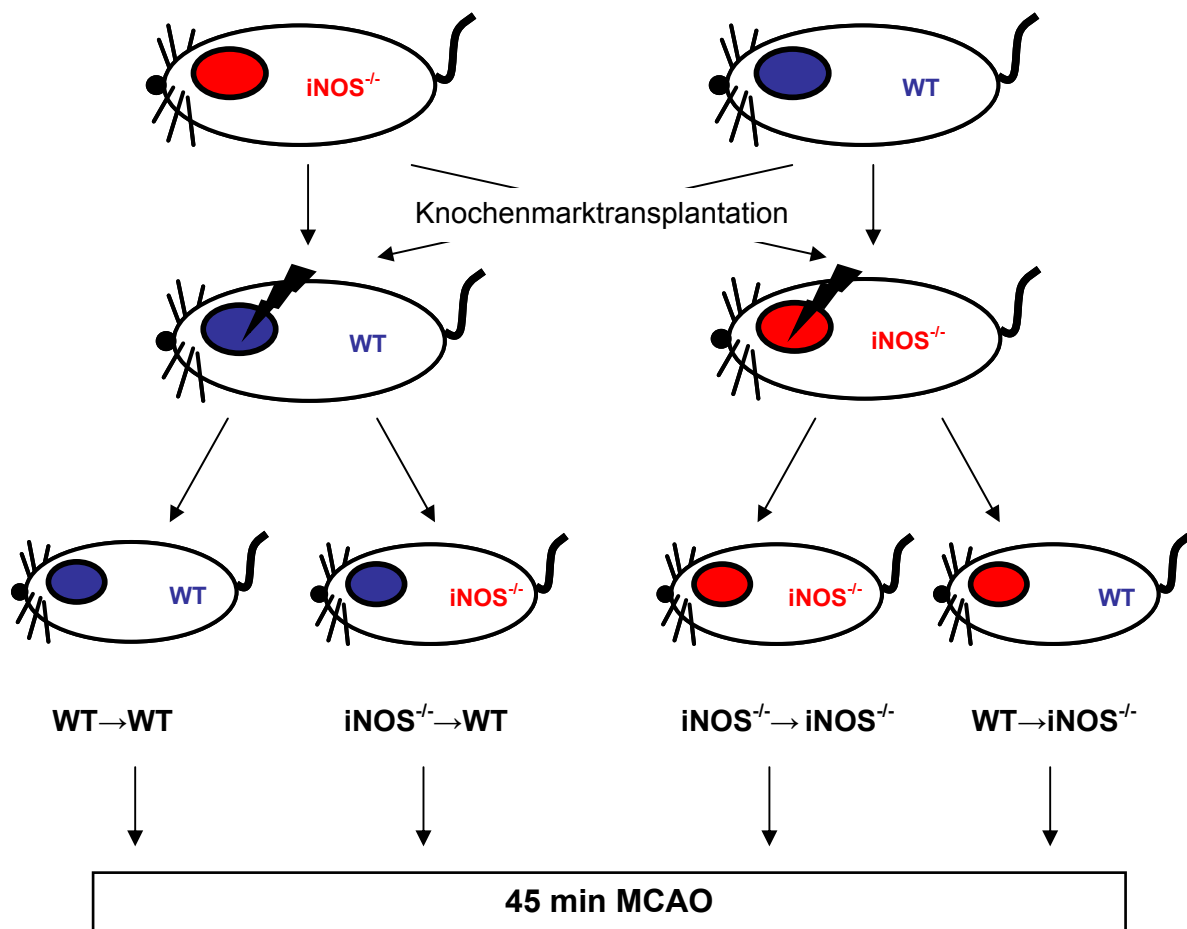
### 2.2.3 Chimärengenerierung ohne GFP-Markierung der hämatopoetischen Stammzellen

Für die Bestimmung der Infarktgrößen wurden Knochenmarkzellen ohne retrovirale Transduktion mit MGirL22Y für die Knochenmarktransplantation verwendet.

Die Knochenmarkentnahme erfolgte wie in Kapitel 2.2.1.2 beschrieben. Das gewonnene Knochenmark wurde wie in Kapitel 2.2.1.3 beschrieben aus der Spüllösung abzentrifugiert und die Zellzahl bestimmt. Anschließend wurden die Zellen in Dulbecco's Modified Eagle Medium resuspendiert und je bestrahltem Tier wurden  $10 \times 10^6$  Zellen in je 450 µl Medium in die Schwanzvene injiziert.

Insgesamt wurden vier Gruppen von Chimären (n=12-15 pro Gruppe) generiert. Als Kontrollgruppen wurden jeweils Chimären gewählt, bei denen Wildtyp-Knochenmark in Wildtyp-Mäuse injiziert wurde und iNOS<sup>-/-</sup>-Mäuse, die iNOS<sup>-/-</sup>-Knochenmark erhielten. Die für die Versuche besonders relevanten Gruppen bestanden aus Wildtyp-Mäusen, die iNOS-defiziente hämatopoetische Zellen erhielten und aus iNOS-defizienten Mäusen, die das

Knochenmark von Wildtyp-Mäusen erhalten. Abb. 4 zeigt eine Übersicht über den Versuchsaufbau.



**Abb. 4: Übersicht über den Versuchsaufbau.** Das Knochenmark wird aus den Knock-out- und Wildtyp-Mäusen entnommen und in die jeweiligen letal bestrahlten Empfängermäuse transplantiert. Hieraus entstanden die vier unterschiedlichen Transplantationsgruppen: wt→wt, iNOS<sup>-/-</sup>→wt, iNOS<sup>-/-</sup>→iNOS<sup>-/-</sup>, wt→iNOS<sup>-/-</sup>.

#### 2.2.4 Verschluss der Arteria cerebri media

Die Ischämieoperationen wurden von Dr. Konstantin Prass im Labor der experimentellen Neurologie, Charité, Berlin, nach der Methode von Hara et al. (1996) ausgeführt. Die Tiere wurden vier Wochen nach der Knochenmarkstransplantation einer 45-minütigen bzw. 60-minütigen fokalen cerebralen Ischämie zugeführt. Dazu wurden die Tiere mit 1% Halothan in einem Gemisch von 70% N<sub>2</sub>O und 30% O<sub>2</sub> anästhesiert. Nach entsprechender Präparation wurde ein mit Silikon beschichtetes Monofilament (Stärke 8-0) in die linke Arteria carotis interna eingeführt und bis zu Arteria cerebri anterior vorgeschoben und damit der Abgang der Arteria cerebri media verlegt. Der Beginn der Ischämie wurde durch Messung des regionalen zerebralen Blutflusses mit einem Blutflussmonitor dokumentiert. Nach 45 respektive 60 Minuten wurden die Tiere erneut kurz anästhesiert und das Monofilament

entfernt. Während der gesamten Prozedur wurde die Körpertemperatur der Tiere mit einem Heizkissen zwischen 37,0 und 37,5°C gehalten.

### **2.2.5 Perfusion, Organfixierung und Schneiden**

96 Stunden nach der Ischämie wurden die GFP-Chimären zur Fixierung transkardial perfundiert. Nach intraperitonealer Injektion von Chloralhydrat (250 µl einer 10%-igen Lösung) wurden die Tiere thorakotomiert, sobald sie nicht mehr auf Schmerzreize reagierten. Die linke Herzkammer wurde punktiert und nach Eröffnung des rechten Herzvorhofs mit eiskaltem PBS gespült, bis sich die Leber verfärbte. Anschließend wurden die Tiere mit eiskaltem 4% Paraformaldehyd (PFA, gelöst in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,4) perfundiert. Die Gehirne wurden vorsichtig nach Eröffnen der Kalotte entfernt und für 24 Stunden in 4% PFA nachfixiert. Mit Hilfe eines Vibratoms wurden 30 µm Schnitte des Großhirns gewonnen und die Schnitte bis zum Färben in 0,1 M Phosphatpuffer aufbewahrt.

Die unmarkierten Knochenmarkchimären wurden 96 Stunden nach Ischämie dekapitiert, die Hirne vorsichtig nach Eröffnung der Kalotte entnommen und in -80°C Methylbutan gefroren. Die Aufbewahrung erfolgte bei -20°C. Anschließend wurden die Hirne am Kryostaten in 20 µm-Schnitten aufgearbeitet, wobei die Aufnahme von jeweils fünf standardisierten Ebenen auf Objektträger erfolgte.

### **2.2.6 Immunhistochemie**

Die Vibratomschnitte wurden in 24-*well*-Platten gefärbt, wobei jeweils zwei oder drei Schnitte in einem *well* prozessiert wurden. Alle Inkubations- und Waschschrte erfolgten dabei auf einem Schüttler. Die Kryostatschnitte wurden auf Objektträgern gefärbt, wobei auf die Verwendung eines Schüttlers verzichtet wurde.

Die Schnitte wurden dreimal für je fünf Minuten in PBS gewaschen und für 30-45 Minuten mit 10% Serum, 1% BSA und 0,1% Triton-X in PBS inkubiert. Anschließend wurde der Primärantikörper aufgetragen und bei 4°C über Nacht inkubiert (siehe Tabelle 1). Die Schnitte wurden erneut dreimal für je fünf Minuten in PBS gewaschen und entweder für zwei Stunden mit einem Spezies-spezifischen biotinyliertem Sekundärantikörper inkubiert oder es wurde direkt der sekundäre Antikörper aufgetragen. Nach erneutem fünfminütigem Waschen in PBS erfolgte die Inkubation mit dem jeweiligen sekundären Antikörper (Verdünnung 1:500 in 2% Serum) oder mit dem ABC-Kit. Die Schnitte wurden in 0,1 M Phosphatpuffer getaucht, auf Objektträger aufgezogen und eingedeckelt. Als Negativkontrolle wurden Schnitte verwendet, bei denen der Inkubationsschritt mit dem jeweiligen Primärantikörper ausgelassen wurde. In diesen Schnitten fand sich kein Immunfluoreszenzsignal.

**Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Antikörper und Seren sowie deren Verdünnung**

Primärantikörper	Herkunftspezies	Verdünnung	Blocking-serum	Sekundärer Antikörper
Anti-Iba1	Kaninchen	1:70	NGS	Texas Red anti-Kaninchen
Anti-NeuN	Maus	1:100	NHS	Texas Red anti-Maus
Anti-GFAP	Kaninchen	1:500	NGS	Texas Red anti-Kaninchen
Anti-GFP	Kaninchen	1:250	NGS	Texas Red anti-Kaninchen
Anti-iNOS	Kaninchen	1:100	NGS	Texas Red anti-Kaninchen

Die Schnitte wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop untersucht, Tabelle 2 zeigt die Eigenschaften der verwendeten Filter. Die Bilder wurden mit einer Digitalkamera aufgenommen und mit Hilfe der Software Adobe®Photoshop nachbearbeitet.

**Tabelle 2: Eigenschaften der verwendeten Filterblöcke im Fluoreszenzmikroskop**

Bezeichnung	Farbstoff	Anregungsfilter	Teiler	Emissionsfilter
MS 2	GFP	470±20nm	Langpass 497nm	522±20nm
MS 4	Texas Red	581±5nm	Langpass 593nm	617±10nm

### 2.2.6.1 DAB-Färbung

Ausgewählte Kryostatschnitte wurden mit Diaminobenzidin (DAB) gefärbt, um zelluläre Veränderungen auch lichtmikroskopisch sichtbar zu machen. Die Schnitte wurden zunächst für zehn Minuten mit 4% PFA nachfixiert und anschließend dreimal für jeweils fünf Minuten mit 0,1 M PBS gewaschen. Das Blocken und Auftragen des ersten Antikörpers erfolgte wie in Kapitel 2.3.2 beschrieben. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS wurde der sekundäre Antikörper (biotinylierter anti-Kaninchen IgG aus Ziege, 1:200) aufgetragen und bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert. Anschließend wurde der ABC-Kit (Avidin-Biotin-Komplex) für eine Stunde bei Raumtemperatur aufgetragen. Hierfür wurde eine halbe Stunde zuvor 1/50 der Substanz A mit 1/50 der Substanz B in PBS gemischt. Zur eigentlichen DAB-Färbung wurde pro 2,5 ml Flüssigkeit 1 Tropfen DAB, 1 Tropfen Puffer, 1 Tropfen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und 1 Tropfen Nickel auf die Schnitte aufgetragen. Nach fünfminütiger Entwicklung wurden die Schnitte zweimal in destilliertem Wasser gewaschen, um die Reaktion zu stoppen. Das DAB wurde mit Natriumhydrochlorid neutralisiert. Die Schnitte wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und nach 5 Minuten Behandlung in

Xylol mit Vitroclud eingedeckelt. Anschließend wurden die Schnitte lichtmikroskopisch beurteilt.

### 2.2.6.2 Hämatoxylin-Färbung zur Infarkt volumenbestimmung

Die vorbereiteten Kryoschnitte wurden zunächst 1–2 Minuten in 80% Alkohol entwässert und anschließend mit Wasser gespült. Dann wurden die Objektträger für 5 Minuten in Hämatoxylin gelagert und erneut mit Wasser gespült, bevor sie fünf- bis zehnmal in 1% Azetalkohol eingetaucht wurden, um sie zu entfärben. Nach erneutem Spülen mit Wasser wurden die Schnitte nun einige Minuten in Lithiumcarbonat eingetaucht, bis sie wieder eine vollere Farbe erlangten. Anschließend wurden die Schnitte gespült, in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert, 10-15 Minuten in Xylol gelagert und schließlich mit Vitroclud eingedeckelt.

Je nach Material und Notwendigkeit konnten der Färbeschritt mit Hämatoxylin, der Entfärbeschritt mit Azetalkohol und der Nachfärbeschritt in Lithiumcarbonat variiert werden. Die Schnitte wurden anschließend eingescannt, mit dem Softwareprogramm Sigma Scan 4.0 weiterverarbeitet und die Infarktgrößen wie in Kapitel 2.2.7 beschrieben vermessen.

### 2.2.7 Berechnung der Infarktgrößen

Von ventral nach dorsal durch das Infarktgebiet wurden fünf standardisierte Ebenen (E0–E4) ausgewählt und für jede Ebene mit Sigma Scan die Infarktfläche, die Fläche der betroffenen Hemisphäre sowie die Fläche der kontralateralen Hemisphäre berechnet.

Anschließend wurden für jedes Tier folgende Summen gebildet:

**a) Direktes Infarktvolumen** [mm<sup>3</sup>] = 1. Schnitt + 2 x 2. Schnitt + 2 x 3. Schnitt + 2 x 4. Schnitt + 5. Schnitt = E0 + 2xE1 + 2xE2 + 2xE3 + E4.

**b) Indirektes Infarktvolumen** [mm<sup>3</sup>] = Formel siehe a), jedoch entspricht die Schnittfläche = gesunde Hemisphäre – intaktes Hemisphärenareal der betroffenen Seite.

**c) Ödemberechnung** [mm<sup>3</sup>] = direktes Infarktvolumen – indirektes Infarktvolumen.

Daraufhin wurden die Infarktflächen der einzelnen Ebenen für jedes Tier aufgetragen. Das Gesamtinfarktvolumen wurde entweder durch direkte Aufsummierung der Infarktareale oder aus der Differenz zwischen kontralateraler und nichtinfarzierter ipsilateraler Hemisphäre bestimmt. Die Differenz zwischen direktem und indirektem Infarktvolumen entspricht dem Hirnödem im Infarktareal.

Tiere des so genannten „embryonalen Versorgungstypus“ der Blutversorgung, bei denen die Arteria cerebri posterior über das vordere Stromgebiet mitversorgt ist, wurden aus der Statistik ausgeschlossen.

### 2.2.8 Western Blot

Die ungefärbten Natriumdodezylsulfat (SDS)-Gele wurden mit Semidryblotpuffer (5,8 g 48 mM Tris + 2,9 g 386 mM Glycin + 3,7 ml 10% SDS + 20% Methanol in 1000 ml; keine pH-Einstellung) in entsprechender Apparatur zwischen zwei bis vier Lagen Blotpapier für 30 Minuten bei etwa 200 mA pro Blot geblottet (ca.  $50 \text{ cm}^2 = 4 \text{ mA/cm}^2$ ). Von unten nach oben wurden die Schichten wie folgt aufgetragen: Blotpapier, Nitrocellulosemembran, Gel, Blotpapier.

Anschließend wurde der Aufbau kurz in TBS (24,2 g 200 mM TrisHCl + 87,7 g 1500 mM NaCl; pH 7,3 /1l) gewaschen. Es folgte ein 30-minütiges Blocken in 5% Magermilchpulver in TBS (Blockmilch). Der erste Antikörper wurde in Blockmilch über Nacht bei 4°C geschüttelt (z.B. Ziege-anti-GST von Pharmacia 1:1000). Danach wurde 3 x 10 Minuten in TBS-Tween (0,05% Tween 20 in TBS) gewaschen, woraufhin ein kurzes Waschen in AP-Puffer (6,06 g 100 mM Tris-Puffer + 2,92 g 100 mM NaCl + 5 ml 0,5 M Stamm 5 mM  $\text{MgCl}_2$ ; pH 9,5/500 ml) folgte. Zuletzt wurde der Substratansatz frisch hinzugegeben: 50  $\mu\text{l}$  NBT (75 mg NitroBlue Tetrazolium [ $+4^\circ\text{C}$ ] in 700  $\mu\text{l}$  Dimethylformamid/DMFA + 300  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$ ) + 37,5  $\mu\text{l}$  BCIP (50 mg 5-bromo-4-chloro-3-indolynphosphate p-toluidine Salz in 1 ml DMFA) in 10 ml AP-Puffer. Die Umsatzdauer wurde per Sichtkontrolle bestimmt. Abschließend wurde die Reaktion in destilliertem Wasser gestoppt, 10 Minuten gespült und mit Blotpapier getrocknet. Es wurde abgewartet, bis das Substrat sich vollständig umgesetzt hatte und dann vorschriftsgemäß entsorgt.

### 2.2.9 Statistik

Aus den erhaltenen Ergebnissen wurden mittels des Programms Excel der Mittelwert und die Standardabweichung bestimmt und in einem Balkendiagramm graphisch dargestellt. Anschließend wurden ein Kruskal-Wallis-Rangsummen-Test sowie ein gepaarter T-Test durchgeführt, um die Signifikanzen zu bestimmen. Zum Vergleich der unterschiedlichen Knock-out-Mäuse untereinander wurde zusätzlich ein  $\text{Chi}^2$ -Test durchgeführt. Als statistisch signifikant wurde ein  $p < 0,05$  gewertet.



### 3 Resultate

#### 3.1 Beurteilung des Transduktionserfolges der hämatopoetischen Zellen und des Transplantationserfolges

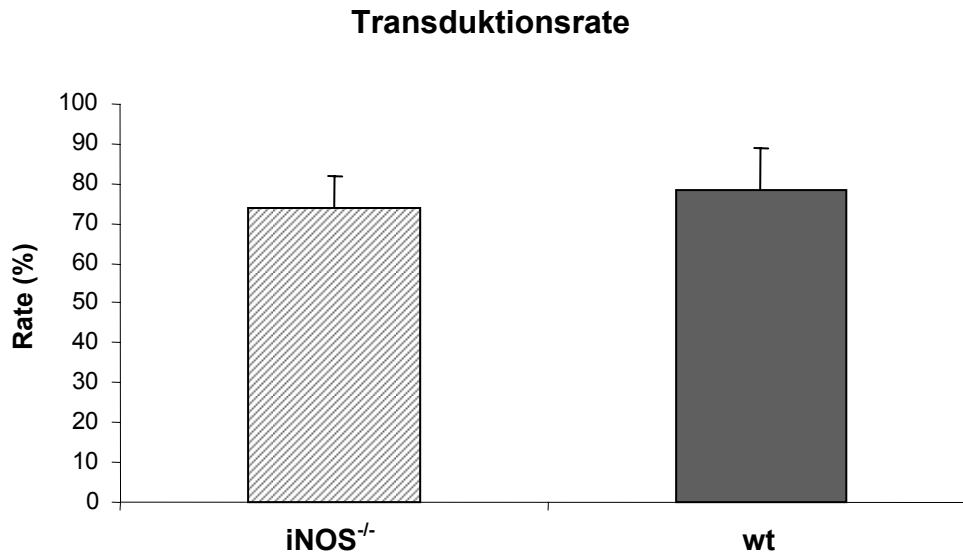
##### 3.1.1 Vergleichbare Transduktionsraten bei iNOS-Knock-out- und Wildtyp-Knochenmarkzellen

Als Donortiere wurden bei der Generierung der GFP-Chimären sowohl Wildtyp- als auch Knock-out-Tiere verwendet. Das Knochenmark wurde nach Gewinnung und Kultivierung mit dem EGFP-kodierenden Vektor MGirl22Y transduziert. Zur Beurteilung des Transduktionserfolges erfolgte eine quantitative Auswertung der Transduktionsrate in hämatopoetischen Assays auf Methylzellulose. Hierbei interessierte vor allem, ob eine Differenz des Transduktionserfolges zwischen dem Knochenmark aus iNOS-Knock-out-Tieren und den Wildtypen vorliegt.

Hierfür wurden nach der Inkubation mit dem Retrovirus Zellen entnommen und auf Methylzellulose ausgesät. Nach einer Inkubationszeit von zehn Tagen erfolgte die vergleichende Auszählung der lichtmikroskopisch sichtbar gewachsenen Zellkolonien sowie der Kolonien, die fluoreszenzmikroskopisch GFP exprimierten. Die Transduktionsrate entsprach dem prozentualen Verhältnis von fluoreszierenden Kolonien zur Gesamtzahl an gewachsenen Kolonien.

Die Transduktionsraten der Kokulturen lagen für das iNOS-Knock-out-Knochenmark bei  $74\% \pm 7,78$  ( $n=5$ ) und für das Wildtyp-Knochenmark bei  $78,2\% \pm 10,57$  ( $n=5$ ). Es fand sich also kein signifikanter Unterschied in der Transduktionsrate zwischen iNOS-Knock-out- und Wildtyp-Knochenmark. Insgesamt zeigte sich ein stabiler Transduktionserfolg mit einem minimalen Wert von 62% in beiden Gruppen und einem maximalen Wert von 81% in der iNOS-Knock-out-Gruppe sowie 91% in der Wildtyp-Gruppe.

Abb. 5 zeigt die Transduktionsraten im Vergleich, aufgetragen nach Genotyp des Donorknochenmarks. Es wird deutlich, dass kein Genotyp-assoziiertes Unterscheid des Transduktionserfolges vorliegt.

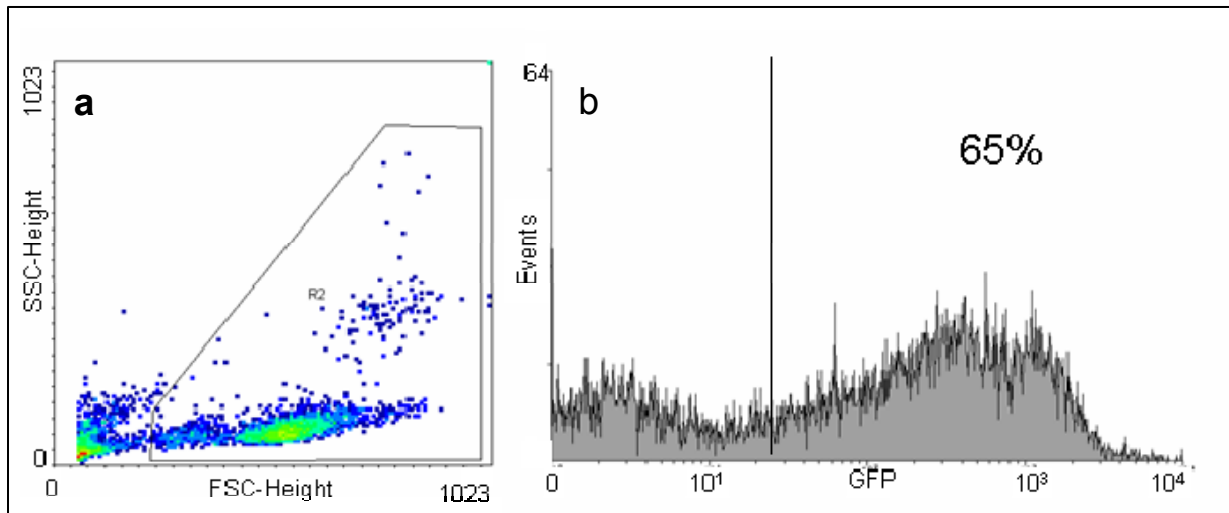


**Abb. 5: Darstellung der Transduktionsraten hämatopoetischer Zellen in Prozent, aufgetragen nach unterschiedlichen Genotypen.** Bewertet wurde der relative Anteil GFP-positiver Kulturen auf Methylzellulose zehn Tage nach Transduktion des Donorknochenmarkes aus iNOS-Knock-out- und Wildtyptieren (n=5). Es zeigte sich kein genotypabhängiger Unterschied des Transduktionserfolges.

### 3.1.2 Beurteilung des Transplantationserfolges mittels FACS-Untersuchung

Die retroviral transduzierten hämatopoetischen Zellen wurden anschließend in die letal bestrahlten Empfängerermäuse transplantiert. Um den Transplantationserfolg zu quantifizieren, wurde nach vier Wochen durchflusszytometrisch der Anteil an GFP-exprimierenden Leukozyten im peripheren Blut der transplantierten Tiere bestimmt. Zu diesem Zeitpunkt ist die Repopulation durch das transplantierte Knochenmark weitestgehend abgeschlossen (Spangrude et al., 1994).

Die Ergebnisse der FACS-Untersuchung zeigten durchgehend einen Anteil von mehr als 60% GFP-markierter Leukozyten im peripheren Blut. Abb. 6 zeigt ein Beispiel einer FACS-Analyse eines wt→wt-Tieres. Werden die Zellen im *Density-Plot* (Abb. 6a) nach Zellgröße und –granulierung abgebildet, ergeben sich mehrere Zellpopulationen, die den verschiedenen Populationen der Leukozyten im peripheren Blut (Monozyten, Granulozyten, Lymphozyten) entsprechen. Detritus bildet sich nahe dem Nullpunkt ab. Im Histogramm (Abb. 6b) sind die Ereignisse nach dem GFP-Signal geordnet. Die Ereignisse mit einer Fluoreszenz von mehr als  $10^1$  sind GFP-positiv, so dass sich zwei Gipfel darstellen: die GFP-positiven und die GFP-negativen Ereignisse. Die Rate der GFP-positiven Ereignisse lag bei diesem Tier bei 65%.



**Abb.6: FACS-Untersuchung eines wt→wt-Tieres vier Wochen nach der Transplantation mit GFP-transduzierten Knochenmarkzellen.** Dargestellt ist in Abb. 6a ein *density-plot, sideward-sideward-scatter* (SSC)-Height aufgetragen gegen *forward-sideward-scatter* (FSC)-Height. Es stellen sich mehrere Zellpopulationen dar. Der markierte Bereich beinhaltet die Zellen, die ausgewertet wurden. Es handelt sich hierbei um Leukozyten; Erythrozyten wurden zuvor lysiert. Bei den Zellen außerhalb des markierten Bereiches handelt es sich vor allem um Detritus. In Abb. 6b ist die GFP-Fluoreszenz in einem Histogramm gegen die Anzahl der Ereignisse aufgetragen. Die Ereignisse mit einer Fluoreszenz > 10<sup>1</sup> waren GFP-positiv (siehe Markierung). Es entstehen zwei Gipfel: die GFP-positiven und -negativen Ereignisse. Der Anteil der GFP-positiven Ereignisse lag bei diesem Tier bei 65%.

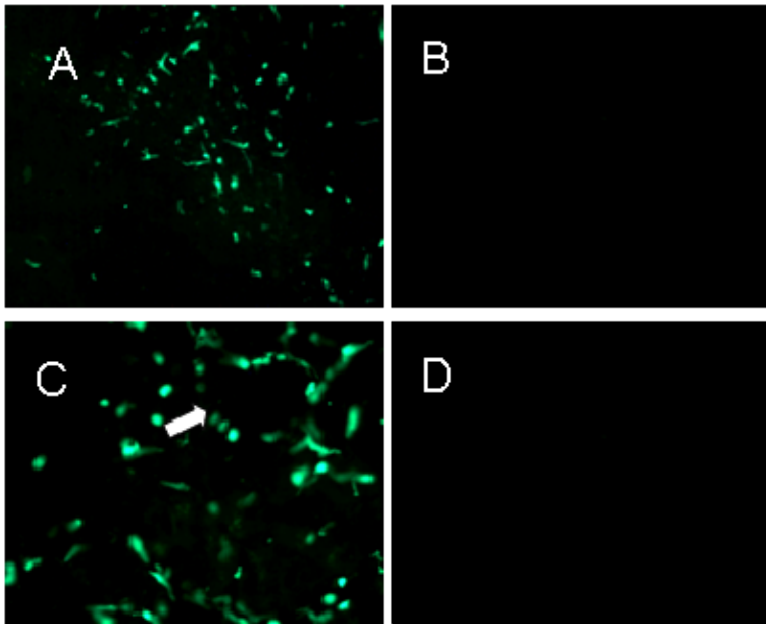
Zusammenfassend ließ sich eine erfolgreiche Rekonstitution aller Chimärengruppen (Chimärismus > 60%) feststellen. Die Tiere zeigten klinisch keine Anzeichen einer Abstoßungsreaktion.

### 3.2 Beurteilung der Einwanderung von Leukozyten in das Gehirn

#### 3.2.1 Einwanderung GFP-positiver Zellen in das ZNS 96 Stunden nach transienter fokaler zerebraler Ischämie

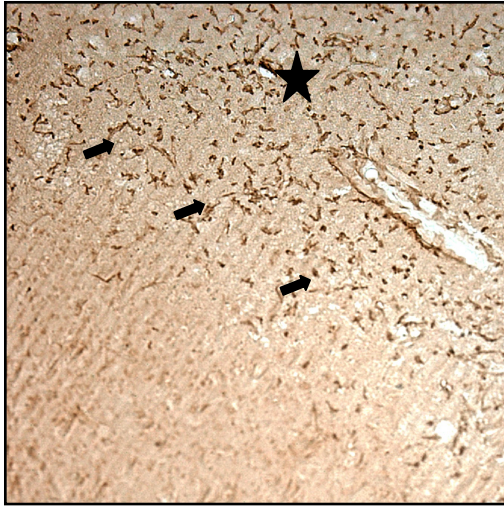
Die GFP-Knochenmarkchimären wurden vier Wochen nach der Transplantation einer 45-minütigen transienten fokalen zerebralen Ischämie durch Verschluss der A. cerebri media unterzogen, nach 96 Stunden Reperfusion getötet und perfusionsfixiert. Die Hirne wurden entnommen und weiterverarbeitet.

Fluoreszenzmikroskopisch wurde zunächst die Einwanderung der grün fluoreszierenden Zellen untersucht. Nach vier Wochen konnten GFP-markierte Zellen im ZNS nachgewiesen werden. Die Einwanderung beschränkte sich dabei vor allem auf die von der Ischämie betroffene Hemisphäre sowie den perivaskulären Raum beider Hemisphären. In der von der zerebralen Ischämie betroffenen Hemisphäre ließ sich eine ausgeprägte Einwanderung GFP-positiver Zellen vier Tage nach transienter fokaler zerebraler Ischämie nachweisen, während in der kontralateralen Hemisphäre nur vereinzelt schwache GFP-positive Signale zu sehen waren (Abb.7).



**Abb. 7: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der eingewanderten GFP-positiven Zellen nach 45-minütiger transienter fokaler zerebraler Ischämie an einem Hirnschnitt einer  $iNOS^{-/-}$   $\rightarrow$ wt-Chimäre.** Abbildungen A (10x vergrößert) und C (40x vergrößert) zeigen das Infarktareal. In Abbildung C ist ein Gefäßquerschnitt mit Anfärbung der perivaskulären Zellen zu sehen (Pfeil). In Abbildungen B und D stellen sich bei entsprechender Vergrößerung keine GFP-positiven Zellen in der kontralateralen Hemisphäre dar.

Um die Spezifität des Fluoreszenzsignals zu verifizieren, erfolgte eine immunhistochemische Untersuchung der Schnitte unter Verwendung eines Antikörpers gegen GFP und einer Visualisierung mit DAB. Dabei konnte eine weitestgehende Beschränkung der GFP-Immunreaktivität auf Zellen im Infarktareal bis zur Infarktgrenze festgestellt werden. Abb. 8 zeigt repräsentativ einen Ausschnitt des Infarktandes eines Gehirns ( $wt \rightarrow iNOS^{-/-}$ ) vier Tage nach 45-minütiger MCAO. Der Schnitt wurde mit anti-GFP gefärbt und mit DAB visualisiert. Am oberen Bildausschnitt ist der Infarktkern dargestellt, der eine hohe GFP-Immunreaktivität aufweist. Im gesunden Gewebe zeigt sich hingegen kaum GFP-Immunreaktivität. Dies stützt Ergebnisse aus vorangehenden Arbeiten (Priller et. al, 2001a), die eine Einwanderung der HSZ vor allem in das Infarktgebiet zeigen konnten.



**Abb. 8:** Ausschnitt aus dem Gehirn eines  $wt \rightarrow iNOS^{-/}$ -Tieres 4 Tage nach 45-minütiger transientser fokaler zerebraler Ischämie, Immunhistochemie für GFP, visualisiert mit DAB, 20 $\mu$ m Kryostat-Schnitt, 20-fach vergrößert. Die Abbildung zeigt einen Ausschnitt des Infarktandes (Pfeile). Es stellte sich eine deutliche zelluläre GFP-Immunreaktivität im Infarktkern dar (Stern). Jenseits des Infarktandes ließ sich kaum GFP nachweisen.

### 3.2.2 GFP-positive Zellen im Infarktreal exprimieren Iba-1

Zur Charakterisierung der GFP-exprimierenden Zellen im Gehirn wurden verschiedene Antikörper-Färbungen an den Vibratomschnitten der transplantierten Tiere durchgeführt. Hierfür wurde NeuN als neuronaler Marker, Iba-1 als Makrophagen/Monozyten-Marker und GFAP als astrozytärer Marker verwendet. Die Auswertung erfolgte fluoreszenzmikroskopisch.

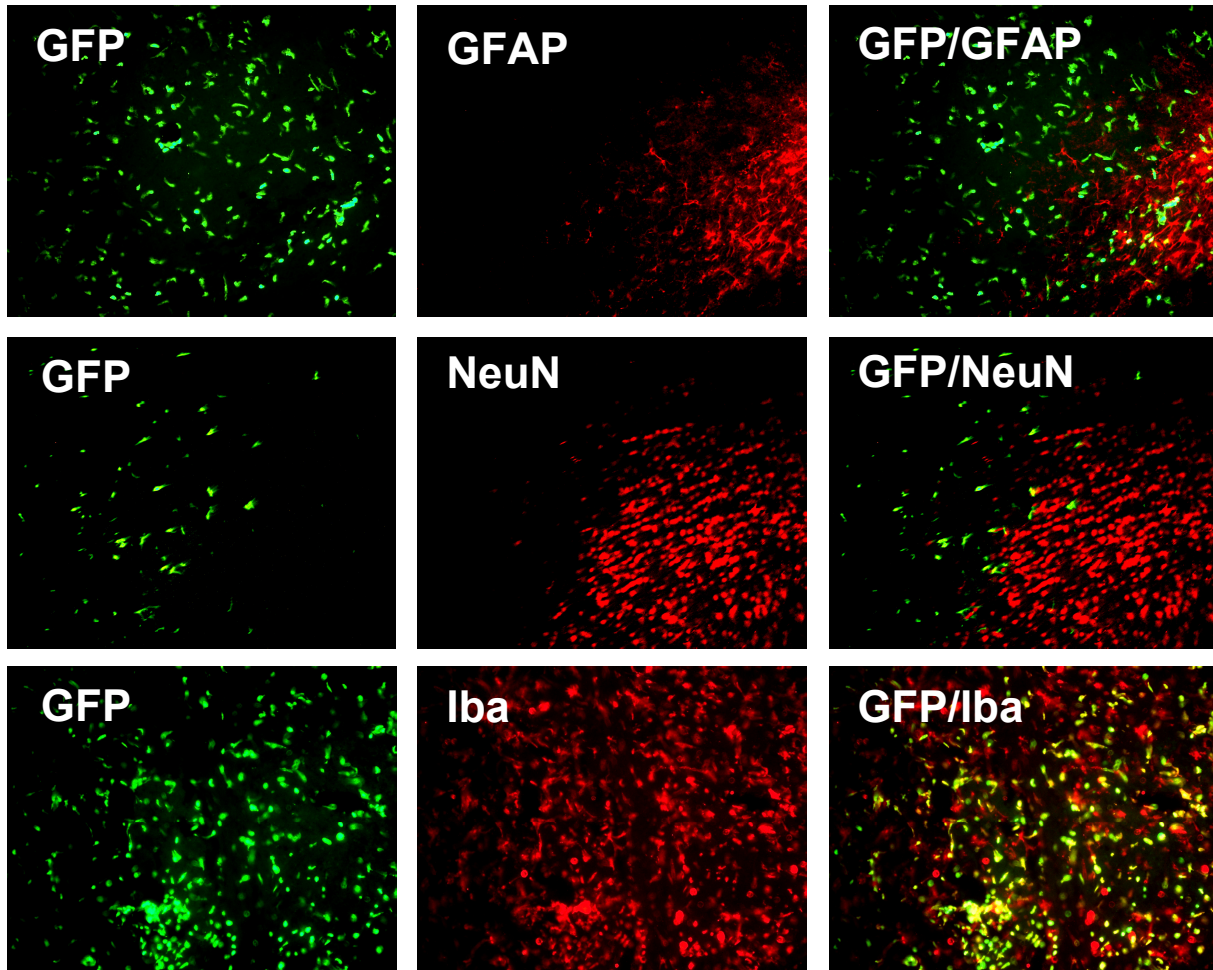
Es wurden von allen Transplantatgruppen (n=4 pro Gruppe) Schnitte in verschiedenen Ebenen geprüft und qualitativ ausgewertet. Zunächst wurde bei 470 nm die Verteilung der GFP-positiven Zellen (grün fluoreszierend) und anschließend am gleichen Ausschnitt bei 581 nm die immunhistochemisch markierten Zellgruppen (rot fluoreszierend) beurteilt. Die jeweiligen Ausschnitte wurden fotografiert und mit Hilfe der Computersoftware Adobe Photoshop® übereinander gelagert.

Durch das Überlagern der beiden Bildausschnitte erschienen die Zellen, die sowohl eine GFP-Markierung als auch die Markierung des jeweiligen Zelltyps aufwiesen, gelb. Alle anderen Zellen waren entweder rot oder die GFP-positiven Zellen nur grün. Abb. 9 zeigt die Färbungen exemplarisch an einem  $iNOS^{-/} \rightarrow iNOS^{-/}$ -Schnitt.

Bei der Auswertung der GFAP-Färbungen fiel auf, dass vier Tage nach MCAO eine sehr deutliche astrogliale Narbe am Infarktand gebildet wurde. Im Infarktkern war die NeuN-Immunreaktivität als Zeichen des Nervenzellunterganges massiv reduziert. Die Astrozytenmarkierung bildete einen sehr deutlichen Rand, wo die neuronale Markierung bereits verloren gegangen war.

Ein positives GFP-Signal konnte in sämtlichen Färbungen weder bei GFAP-immunreaktiven Zellen (Astrozyten) noch bei NeuN-immunreaktiven Zellen (Neuronen) festgestellt werden.

Jedoch fiel eine eindrucksvolle Kolo-kalisation von GFP mit der Immunreaktivität in Monozyten/Makrophagen und Mikroglia auf. Fast alle GFP-markierten Zellen waren Iba-positiv und bestätigen so die Beobachtung, dass vier Tage nach MCAO vor allem Monozyten/Makrophagen in das Infarktareal einwandern (Priller et al., 2001a).



**Abb. 9:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen aus einem Chimärenhirn nach 45-minütiger transientscher fokaler zerebraler Ischämie, 30µm Vibratomschnitte, 20-fach vergrößert. Die GFP-markierten, eingewanderten Zellen stellen sich grün dar (links). In der Mitte (von oben nach unten) sind die Texas-Red-gefärbten Astrozyten (GFAP), Neuronen (NeuN) und Mikroglia/Monozyten/Makrophagen (Iba-1) dargestellt. Rechts wurden die beiden links stehenden Bildausschnitte mittels Photoshop übereinander gelagert. Die Zellen, die sowohl GFP- als auch Iba-positiv sind, erscheinen gelb.

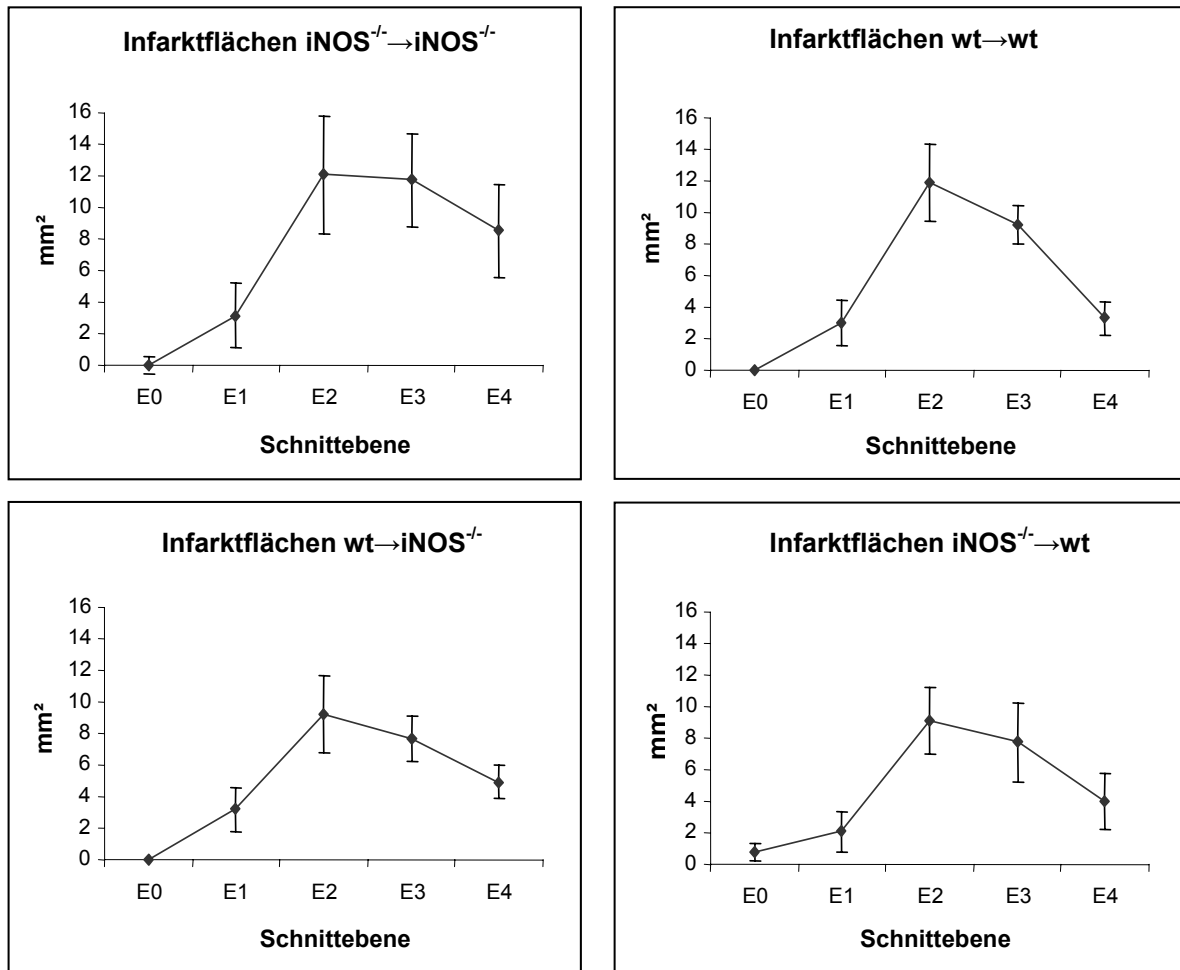
### 3.3 Infarktgrößen der Chimärengruppen

#### 3.3.1 Kein signifikanter Unterschied der Infarktgrößen in den vier Chimärengruppen

Die Chimären der vier Transplantationsgruppen wurden jeweils einer 45-minütigen MCAO unterzogen und die Infarktgrößen nach 96 Stunden mittels H-E-Färbung und Auswertung mit der Sigma Scan 4.0 Software bestimmt.

Zunächst wurden die Infarktflächen der einzelnen definierten Ebenen bestimmt und miteinander verglichen. In allen Chimärengruppen zeigte sich die größte Ausdehnung der Infarktfläche in der zweiten Schnittebene. Ein signifikanter Unterschied zwischen den

Infarktflächen konnte in keiner der einzelnen Ebenen zwischen den Gruppen festgestellt werden (Kruskal-Wallis  $p > 0,05$ ; T-Test  $p > 0,05$ ). Abb. 10 zeigt die Infarktflächen der vier Transplantationsgruppen.

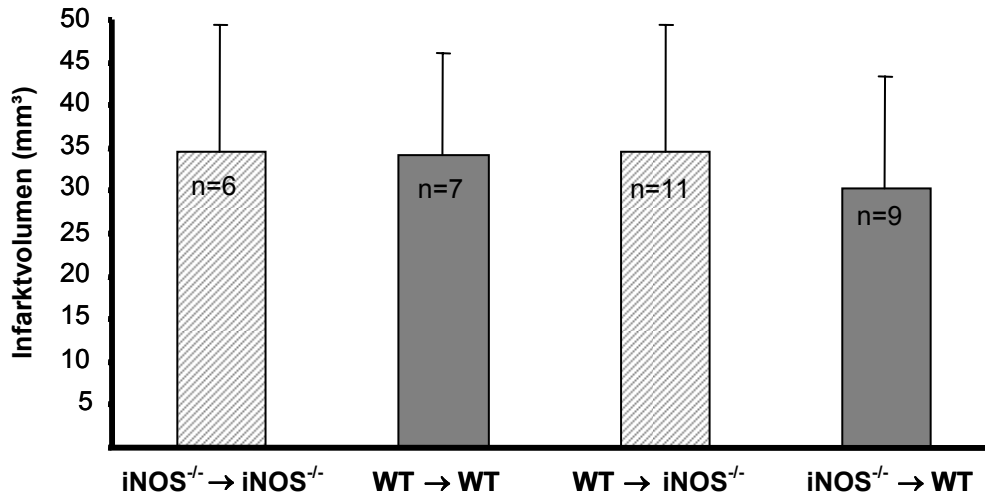


**Abb. 10:** Größe der Infarktflächen (mm<sup>2</sup>) in den vier Transplantationsgruppen nach 45-minütiger transienter fokaler zerebraler Ischämie, gemessen an fünf definierten Ebenen (E) an H.-E.-Schnitten (E0-E4). Zwischen den einzelnen Gruppen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in den Infarktgrößen/Schnittebenen.

Im nächsten Schritt wurden die Infarktvolumina der einzelnen Gruppen berechnet und diese gegeneinander aufgetragen. Die Infarktvolumina wurden 96 Stunden nach 45-minütiger transienter fokaler zerebraler Ischämie bestimmt und eine Ödemkorrektur vorgenommen (indirekte Infarktvolumina). In allen Gruppen wurden embryonale Versorgungstypen und vor Ablauf von 96 Stunden verstorbene Tiere von der Analyse ausgeschlossen.

Die indirekten Infarktvolumina betragen  $34,5 \pm 14,8$  mm<sup>3</sup> für  $iNOS^{-/-} \rightarrow iNOS^{-/-}$  (n=6),  $34,1 \pm 12$  mm<sup>3</sup> für  $wt \rightarrow wt$  (n=7),  $34,6 \pm 14,8$  mm<sup>3</sup> für  $wt \rightarrow iNOS^{-/-}$  (n=11) und  $30,3 \pm 13$  mm<sup>3</sup> für  $iNOS^{-/-} \rightarrow wt$ . Es ergab sich mittels Kruskal-Wallis- und T-Test kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

Signifikante Unterschiede der Infarktvolumina konnten auch nicht für die direkten Infarkte festgestellt werden. Abb. 11 zeigt die indirekten Infarktvolumina der vier Transplantationsgruppen.



**Abb. 11:** Darstellung der indirekten (ödemkorrigierten) Infarktvolumina (mm<sup>3</sup>) der vier Transplantationsgruppen nach 45-minütiger transienter fokaler zerebraler Ischämie. Zwischen den einzelnen Gruppen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (MW+SD).

### 3.3.2 Drei verschiedene Stämme von iNOS-Knock-out-Mäusen sind gegenüber transienter zerebraler Ischämie nicht geschützt

Aufgrund der in der Literatur existierenden Daten (Iadecola et al., 1997b) wurde ein signifikanter Unterschied zwischen Wildtyp- und iNOS-Knock-out-Mäusen nach fokaler zerebraler Ischämie erwartet, der sich in den vorangehenden Experimenten nicht darstellte. Um einen Effekt der Knochenmarktransplantation und des experimentellen Aufbaus auf die vorliegenden Ergebnisse auszuschließen, wurde ein Kontrollexperiment mit nicht transplantierten Tieren durchgeführt (Abb. 12). In dieser Serie wurde eine längere Ischämiezeit gewählt, um den Stimulus für eine mögliche iNOS-Expression zu vergrößern.

Es wurden je 13 männliche Wildtyp-Tiere (C57BL/6) gegen 12 männliche iNOS-Knock-out-Tiere (ursprünglich von Laubach et al. generiert, 1995) getestet. Beide Gruppen wurden unter oben beschriebenen Bedingungen jeweils einer 60-minütigen transienten fokalen zerebralen Ischämie mittels Verschluss der A. cerebri media unterzogen und die Infarktgrößen 96 Stunden nach MCAO ausgewertet. Der in der Literatur beschriebene Effekt einer signifikanten Protektion der iNOS-defizienten Mäuse konnte nicht bestätigt werden. Die beiden Gruppen unterschieden sich 96 Stunden nach fokaler zerebraler Ischämie nicht signifikant in den Infarktgrößen (Wildtyp: Infarktvolumen = 62,85 mm<sup>3</sup>±15,71; iNOS<sup>-/-</sup>: Infarktvolumen = 64,25 mm<sup>3</sup>±15,7).

Aufgrund dieses überraschenden Ergebnisses wurde das Experiment mit einem anderen iNOS-Knock-out-Stamm, den ursprünglich von MacMicking (1995) generierten Mäusen,

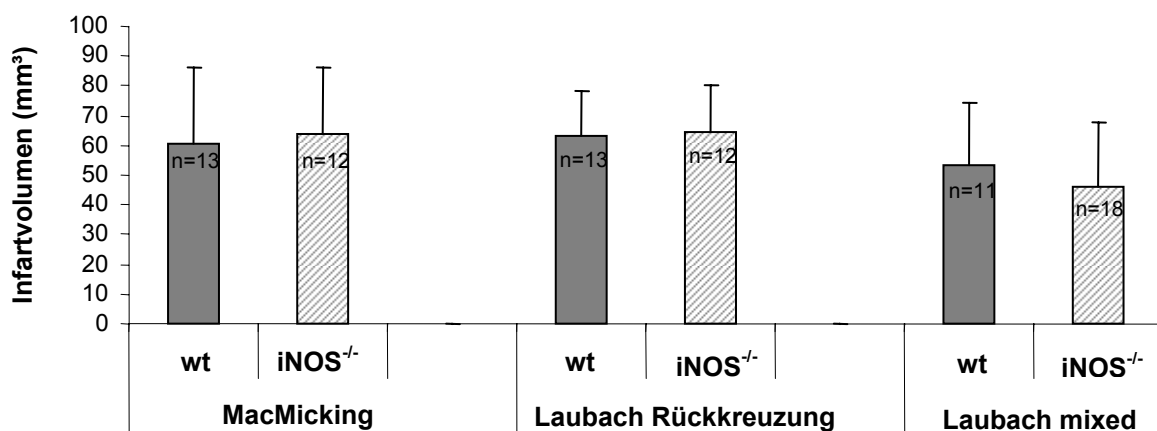


wiederholt (Abb.12). Dieser Knock-out-Stamm hatte in vorangehenden Publikationen eine signifikante Protektion im Vergleich mit dem Wildtyp gezeigt (Iadecola et al., 1997a; Loihl et al., 1999). Wie in den vorangehenden Experimenten wurden nur männliche Tiere und ihre entsprechenden Wildtypen verwendet. Die Tiere wurden ebenfalls einer 60-minütigen fokalen transienten zerebralen Ischämie unterzogen. Überraschenderweise stellten sich auch hier keine signifikanten Unterschiede in den Infarktgrößen der Wildtypen ( $n=13$ ;  $60,74 \text{ mm}^3 \pm 25,32$ ) gegenüber den iNOS-defizienten Mäusen ( $n=12$ ;  $64,14 \text{ mm}^3 \pm 22,29$ ) 96 Stunden nach MCAO dar.

Um die Bedeutung des jeweiligen Mausstammes in der Protektion von iNOS-defizienten Mäusen während transientser fokaler zerebraler Ischämie einschätzen zu können, untersuchten wir die von Laubach et al. (1995) generierten Knock-out-Mäuse mit einem gemischten Hintergrund aus C57BL/6- sowie SV129-Mäusen (Abb.12). 96 Stunden nach 60-minütiger Ischämie zeigten die männlichen iNOS-Knock-out-Mäuse ( $n=18$ ;  $46,4 \text{ mm}^3 \pm 21,8$ ) keine signifikante Protektion gegenüber ihren entsprechenden Wildtypen ( $n=11$ ;  $53,27 \text{ mm}^3 \pm 21,33$ ). Dabei ist anzumerken, dass aus der Wildtyp-Gruppe neun Tiere früher als 96 Stunden nach Reperfusion verstarben, gegenüber nur einem Tier aus der iNOS-Knock-out-Gruppe, und somit nicht in die Auswertung mit eingingen. Das entspricht einer Mortalitätsrate von 45% in der Wildtyp-Gruppe gegenüber 5% in der Knock-out-Gruppe. Dieser Unterschied war statistisch signifikant (Chi<sup>2</sup>-Test,  $p < 0,05$ ).

Weiterhin fiel auf, dass das Infarktvolumen der iNOS-Knock-out-Mäuse mit gemischtem Hintergrund signifikant kleiner war als das der iNOS-Knock-out-Mäuse mit reinem C57BL/6-Hintergrund, während zwischen den Infarktgrößen der entsprechenden Wildtypen kein signifikanter Unterschied festzustellen war (T-Test,  $p < 0,05$ ).

**Infarktgrößen der unterschiedlichen Knock-out-Mäuse**



**Abb. 12:** Darstellung der indirekten (ödemkorrigierten) Infarktvolumina der drei unterschiedlichen iNOS-Knock-out-Mausstämme gegenüber ihren jeweiligen Wildtypen nach 60-minütiger transientser fokaler zerebraler Ischämie. Keine der drei verschiedenen iNOS-Knock-out-Mausstämme war gegenüber dem jeweiligen Wildtyp vor transientser Ischämie geschützt.

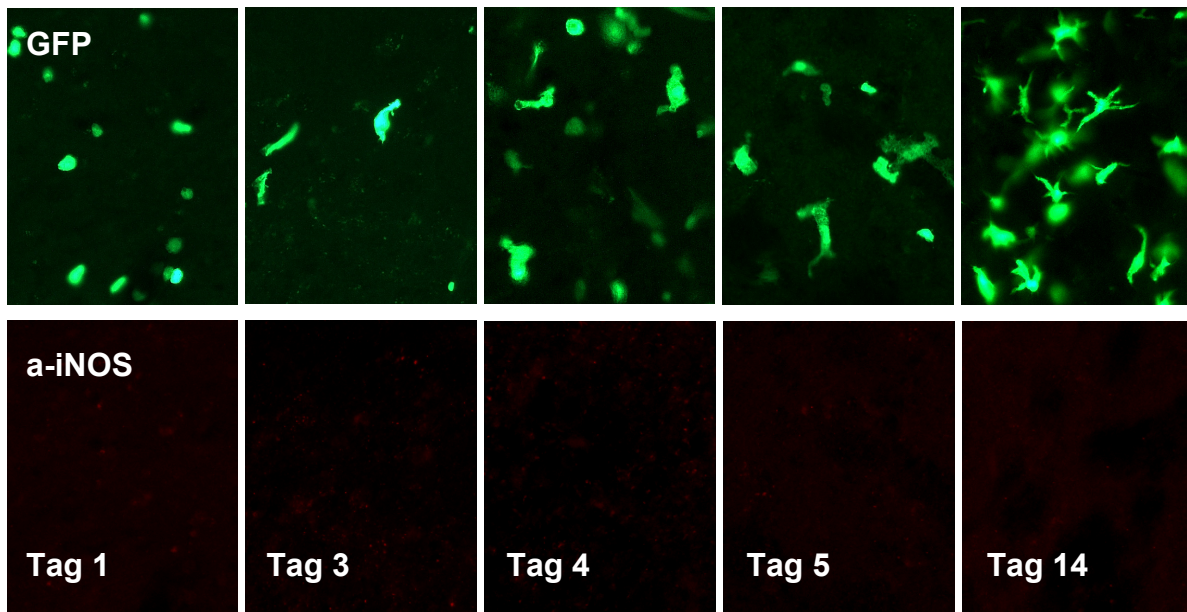
### 3.4 iNOS-Immunhistochemie

#### 3.4.1 Keine iNOS-Expression in GFP-Chimären nach transientser fokaler Ischämie

Die GFP-Chimären wurden einer 45-minütigen transienten fokalen zerebralen Ischämie unterzogen. Hierauf folgte eine unterschiedlich lange Reperfusionzeit von ein bis fünf oder 14 Tagen. Die Hirne wurden nach PFA-Perfusion entnommen und auf die Expression von iNOS in den einwandernden Leukozyten und der residenten Glia immunhistochemisch untersucht.

Hierzu wurden mehrere polyklonale Antikörper gegen iNOS (Chemicon, Transduction Laboratories, Upstate) verwendet. Mit allen drei Antikörpern wurden Schnitte aus allen vier Transplantationsgruppen und verschiedenen Reperfusionzeitpunkten auf die Expression von iNOS im Gehirn hin untersucht.

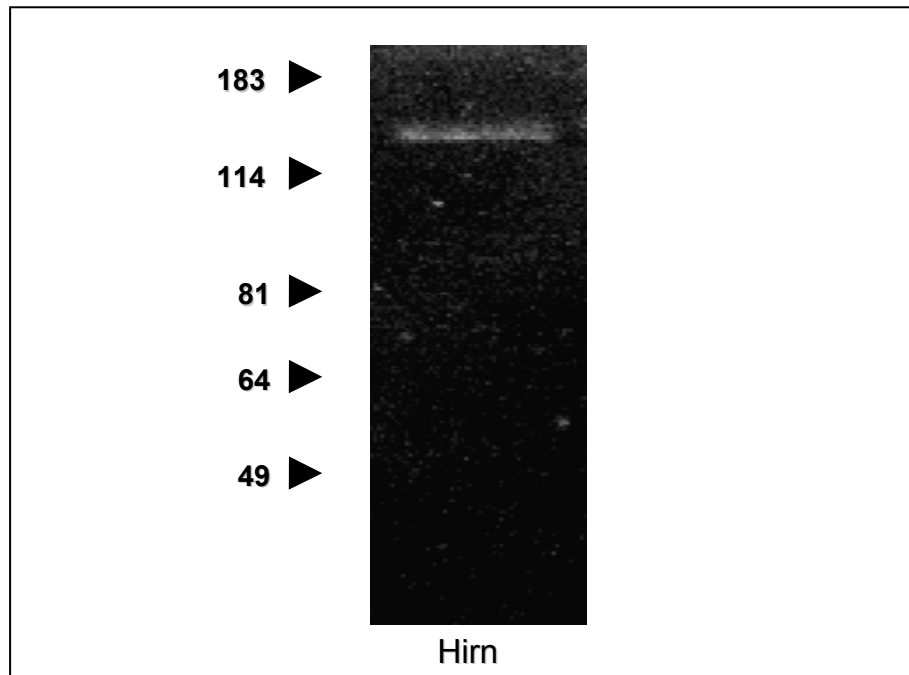
Abbildung 13 zeigt die Ergebnisse der Färbungen mit dem anti-iNOS-Antikörper der Firma Chemicon an Chimärenhirnen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach MCAO. Es zeigte sich eine über die Zeit zunehmende Infiltration GFP-positiver Leukozyten in das Infarktareal. Zu späteren Zeitpunkten nach der MCAO war eine Ramifizierung der eingewanderten GFP-positiven Zellen als Ausdruck der Differenzierung zu Mikroglia zu beobachten (siehe auch Priller et al., 2001a). Zu keinem Zeitpunkt konnte eine iNOS-Immunreaktivität nachgewiesen werden. Auch mit den beiden anderen anti-iNOS-Antikörpern ließ sich keine iNOS-Immunreaktivität im Gehirn 1-14 Tage nach MCAO in eingewanderten Zellen oder in residenten Gliazellen detektieren.



**Abb. 13:** Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der immunhistochemischen Färbung auf iNOS mit Chemicon anti-iNOS an Chimärenhirnen 1d, 3d, 4d, 5d und 14d nach transientser fokaler zerebraler Ischämie. Die einwandernden, GFP-positiven Zellen (obere Reihe) zeigten eine über die Zeit zunehmende Infiltration und Ramifizierung. Weder die eingewanderten Zellen noch die residenten ZNS-Zellen zeigten iNOS-Immunreaktivität (untere Reihe).

Um die Sensitivität und Spezifität der Antikörper zu untersuchen, wurden mehrere Kontrollexperimente durchgeführt (exemplarisch gezeigt am Chemicon Antikörper).

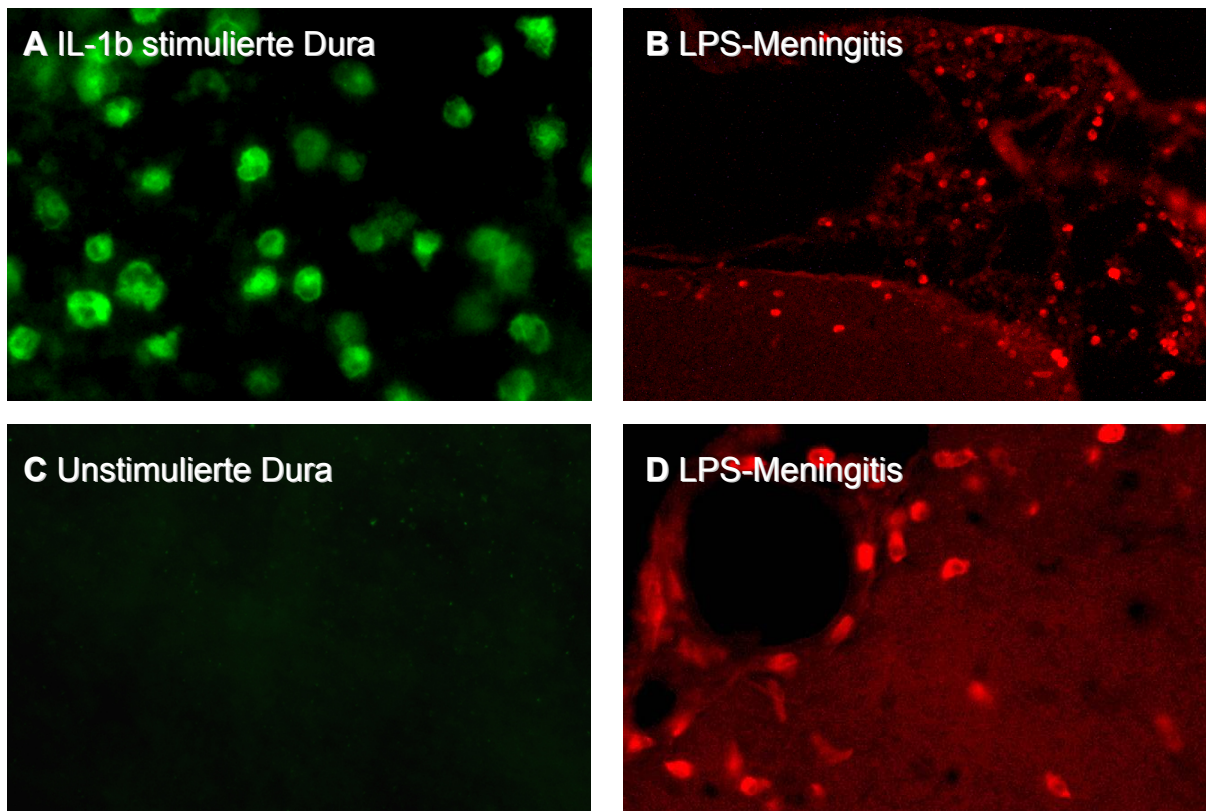
Im Western-Blot von Wildtyp-Maus-Hirn-Homogenat erkannte der Chemicon Antikörper eine einzelne Bande von ca. 130 kDa, welche der Größe von iNOS entspricht (Abb.14). Hiermit konnte ein nicht funktionierender Antikörper als Erklärung für das negative Ergebnis der iNOS-Immunhistochemie ausgeschlossen werden.



**Abb. 14: Western-Blot-Analyse der Expression von iNOS im Mausgehirn.** Der anti-iNOS-Antikörper (Chemicon) erkennt eine spezifische Bande von 130 kDa.

Als Positivkontrolle für die Immunhistochemie wurde ein Modell der Ratten-Meningitis verwendet. Nach lokaler Applikation des proinflammatorischen Zytokins von Interleukin 1-beta auf die Ratten-Dura (PD Dr. U. Reuter, Neurologische Klinik, Charité) war eine deutliche iNOS-Immunreaktivität in meningealen Leukozyten nachweisbar (Abb.15). In der unstimulierten Ratten-Dura der kontralateralen Hemisphäre zeigte sich hingegen keine Anfärbung mit dem Chemicon-Antikörper.

In einem Induktionsmodell der Meningitis durch LPS (PD Dr. U. Reuter, Neurologische Klinik, Charité) fiel eine deutliche iNOS-Expression in meningealen Leukozyten und einwandernden Neutrophilen auf. In den Kontroll-Tieren konnte keine Immunreaktivität nachgewiesen werden (Abb. 15).



**Abb. 15: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung von iNOS-Immunreaktivität im Meningitis-Modell der Ratte unter Verwendung des anti-iNOS-Antikörpers (Chemicon), 40-fach vergrößert.** Abbildung A zeigt einen Schnitt einer mit IL-1b stimulierten Ratten-Dura. Es zeigte sich nach IL-1b-Stimulation eine deutliche iNOS-Immunreaktivität in meningealen Leukozyten. Abbildung C zeigt die entsprechende Kontrolle ohne Stimulation. In Abbildung B und D stellt sich nach Induktion einer Meningitis durch LPS in einem Ratten-Modell eine deutliche iNOS-Immunreaktivität in meningealen Leukozyten und neutrophilen Granulozyten dar. Die Negativkontrolle zeigte keine iNOS-Immunreaktivität (nicht dargestellt).

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit trotz ausreichender Sensitivität und Spezifität des verwendeten anti-iNOS-Antikörpers keine iNOS-Expression nach transienter fokaler zerebraler Ischämie der Maus nachgewiesen werden.

## 4 Diskussion

Der induzierbaren NO-Synthetase (iNOS) wird eine wichtige Rolle im Rahmen der Entzündungsreaktion nach fokaler zerebraler Ischämie zugeschrieben. Mehrere Studien konnten eine Expression von iNOS in der späten Phase nach zerebraler Ischämie und die Produktion großer Mengen von toxischem NO nachweisen. Durch Blockierung der iNOS, entweder durch spezifische iNOS-Hemmer oder iNOS-defiziente Mäuse, konnte eine Reduktion des ischämischen Schadens erreicht werden. Diese Ergebnisse stützen die Hypothese, dass iNOS eine Rolle in der Schadensvermittlung nach zerebraler Ischämie spielt (Iadecola et al., 1997a, 1995c; Loihl et al., 1999).

Es ist jedoch weiterhin unklar, welche Zellpopulation nach zerebraler Ischämie für die Expression von iNOS verantwortlich ist. Abhängig vom verwendeten Modell und dem Zeitpunkt der Untersuchung nach dem Schlaganfall gibt es unterschiedliche, sich zum Teil widersprechende Ergebnisse verschiedener Studien. Einige Arbeitsgruppen konnten die Expression von iNOS in einwandernden Leukozyten nachweisen. Die Expression der iNOS erreichte hier vor allem zu einem späteren Zeitpunkt ihr Maximum. Die Zeitkinetik der iNOS-Expression entsprach dabei dem zeitlichen Einwanderungsmuster von neutrophilen Granulozyten. Dieses führte zu der Annahme, dass iNOS von einwandernden Granulozyten exprimiert wird (Iadecola et al., 1997a).

Eine andere Studie konnte jedoch das Protein zusätzlich in residenter Mikroglia nachweisen. Die Autoren stellten die Hypothese auf, dass das Expressionsmuster der iNOS und ihr Expressionsort vom Ausmaß des Schadens abhängen (Loihl et al., 1999).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es die Frage zu untersuchen, von welchen Zellen die iNOS nach transientser fokaler zerebraler Ischämie exprimiert wird und welche Rolle diese Zellpopulationen in der Vermittlung des iNOS-spezifischen Schadens spielen.

Zur Beantwortung der Frage, ob die iNOS vor allem von einwandernden Leukozyten exprimiert wird oder von der residenten Glia, wurde das bereits etablierte Modell der GFP-Knochenmarkchimäre verwendet. Dieses Modell ermöglicht es, ortständige Zellen des ZNS von einwandernden Blutzellen zu unterscheiden.

### 4.1 Chimärengenerierung

Die vorliegende Arbeit war der erste Versuch, den Anteil der Expression eines bestimmten Gens in residenten Hirnzellen gegenüber hämatogenen Zellen nach einem experimentellen Schlaganfall zu differenzieren.

Die Generierung von Knochenmarkchimären ist ein etabliertes Modell. In Vorarbeiten konnten Priller et al. nach Transplantation von retroviral transduzierten Knochenmarkzellen, die GFP exprimierten, die Einwanderung der transplantierten Zellen in das ZNS nachweisen

(Priller et al., 2001a; Priller et al. 2001b). Auch die Einwanderung in andere Organsysteme konnte anhand von GFP-exprimierenden Zellen nachgewiesen werden. So konnten beispielsweise Orlic et al. (2001) die Einwanderung von GFP-markierten Zellen in infarziertes Myokardgewebe zeigen. GFP eignet sich aufgrund seiner hohen Sensitivität als Marker besonders gut (Persons et al., 1997).

Die GFP-Knochenmarkchimäre erlaubt die Identifizierung hämatogener Zellen im ZNS. Durch Transplantation von Knochenmarkzellen aus iNOS-Knock-out-Mäusen in Wildtyp-Mäuse (und umgekehrt) wurden quasi-„konditionale“ Knock-outs geschaffen, d.h. Tiere, bei denen je nach Zeitpunkt entweder nur Zellen des ZNS oder nur periphere Blutzellen das relevante Gen exprimierten. Yu und Mitarbeiter konnten in einem ähnlichen Modell den Beitrag von hämatopoetischen Zellen zur Expression eines Adenosin-Rezeptors nach zerebraler Ischämie definieren. Mäuse, deren periphere Blutzellen das Adenosin-Rezeptor-Gen nicht exprimierten, hatten signifikant kleinere Schlaganfälle nach transientser Ischämie als die Wildtyp-Kontrollen (Yu et al., 2004).

Nach Transplantation von Knochenmarkstammzellen in letal bestrahlte Tiere konnte eine Chimäre generiert werden, deren Zellen im peripheren Blut eine andere genetische Information trugen als die zerebralen Zellen. In der durchgeführten FACS-Untersuchung zeigten alle vier Versuchsgruppen ( $wt \rightarrow wt$ ,  $iNOS^{-/-} \rightarrow iNOS^{-/-}$ ,  $iNOS^{-/-} \rightarrow wt$ ,  $wt \rightarrow iNOS^{-/-}$ ) stabile Chimärismusraten von mehr als 60% nach GFP-Transduktion. Im Falle der Verwendung GFP-markierter hämatopoetischer Stammzellen (HSZ) aus iNOS-Knock-out-Mäusen ließ sich keine signifikante Differenz der Chimärismusrate im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen feststellen. Die Transduktionsraten, die bei beiden Genotypen über 70% betragen, sind vergleichbar mit anderen Modellen (Wehner et al., 2003; Priller et al., 2001 a+b; Bechmann et al., 2001). Dies macht deutlich, dass die Ergebnisse reproduzierbar und die transplantierten Tiere untereinander gut vergleichbar sind. Die niedrigen Verlustraten nach Transplantation zeigen deutlich, dass die Tiere ausreichend rekonstituiert wurden.

Zusammengefasst konnte das etablierte Modell der GFP-Knochenmarkchimäre auf Chimären aus Knock-out-Tieren zum einen und Wildtyp-Tieren zum anderen erweitert und somit weitergeführt werden.

## 4.2 Einwanderung und Differenzierung

Eine wichtige Kontrolle zur Aussagekraft und Anwendbarkeit des verwendeten Modells der Knochenmarkchimäre war die Einwanderung der GFP-markierten peripheren Blutzellen in das ZNS.

Vier Wochen nach der Knochenmarktransplantation waren mehr als 70% der Zellen in der FACS-Analyse des peripheren Blutes GFP-positiv. Nach Auslösen einer fokalen zerebralen Ischämie vier Wochen nach der Transplantation durch MCAO für 45 Minuten, waren GFP-

markierte Zellen im gesamten ischämischen Gebiet der betroffenen Hemisphäre nachzuweisen. Diese Zellen konnten fluoreszenzmikroskopisch durch das starke Signal des GFPs sichtbar gemacht werden. Als Kontrolle diente eine Färbung mit anti-GFP, welche das gleiche Verteilungsmuster der GFP-positiven Zellen zeigte.

In der kontralateralen nicht betroffenen Hemisphäre ließen sich GFP-markierte Zellen lediglich in den perivaskulären Räumen und nur vereinzelt im ZNS-Parenchym nachweisen. Diese Beobachtung bestätigt Ergebnisse anderer Arbeiten, die eine erste Infiltration der hämatopoetischen Zellen in die perivaskulären Räume bereits zwei Wochen nach der Transplantation nachweisen konnten (Bechmann et al., 2001; Priller et al., 2001a).

In früheren Arbeiten konnte vier Wochen nach der Transplantation noch keine signifikante Einwanderung von Mikroglia in Striatum und Cortex nachgewiesen werden. Auf einen pathogenen Stimulus hin wanderten Zellen aus dem Blut in das betroffene Gebiet ein (Priller et al., 2001a). So fand 24 Stunden nach MCAO eine massive Infiltration von GFP-markierten, runden Zellen in den ischämischen Kortex, das Striatum und den Hippocampus statt (Priller et al., 2001a). Die Einwanderung GFP-markierter Zellen in das geschädigte Gebiet fand nicht nur nach zerebraler Ischämie, sondern auch nach anderen ZNS-Pathologien, wie zum Beispiel der Transektion der Fimbria-Fornix oder der Axiotomie des Fazialisnervs, statt (2001a).

Auch in anderen Organsystemen wurde eine ähnliche Einwanderung beobachtet. So konnte beispielsweise die Einwanderung GFP-markierter Zellen in Leber oder auch Lunge nach traumatischen Schäden nachgewiesen werden (Lagasse et al., 2000; Lama und Phan, 2006).

Darüber hinaus wurde in der vorliegenden Arbeit die Morphologie der einwandernden Zellen untersucht und eine immunhistochemische Charakterisierung durchgeführt.

Vier Wochen nach der Transplantation GFP-markierter Zellen zeigte sich auf den eingewanderten Zellen im ZNS vor allem eine Expression des Monozyten/Makrophagen-Markers Iba-1 (Imai et al., 1996). Ein signifikanter Teil der Iba-positiven Zellen war GFP-positiv. Auch wiesen einige GFP-positive Zellen die für Mikroglia typische Morphologie auf. Hieraus lässt sich schließen, dass ein reger Austausch zwischen den peripheren Blutzellen und der ortständigen Mikroglia stattfindet. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass Zellen aus dem peripheren Blut an den Ort der Schädigung wandern und zu Mikroglia differenzieren bzw. von dieser nicht mehr zu unterscheiden sind.

Der ortständigen Mikroglia wird vor allem eine Rolle in der Abwehr des Hirnparenchyms gegen Infektionen, Trauma, Inflammation, Tumore und Degeneration zugeschrieben (Kreutzberg et al., 1996). So wird eine signifikante Differenzierung hämatopoetischer Zellen in Mikroglia vor allem nach Ischämie, Inflammation und Trauma des ZNS beschrieben (Priller et al., 2001a; Mezey et al., 2000). In Versuchen mit GFP-Chimären konnte gezeigt werden,

dass 15 Wochen nach Transplantation bis zu einem Viertel der regionalen Mikroglia-Population von Donorzellen gestellt wird (Priller et al., 2001a).

Zur Darstellung der Astrozytenpopulation der untersuchten Hirnschnitte wurde der Marker *glial fibrillary acidic protein* (GFAP) verwendet, der gegen ein intermediäres Filament in reifen Astrozyten gerichtet ist (Eng et al., 2000). Die in den untersuchten Hirnschnitten nachgewiesenen GFAP-markierten Astrozyten bildeten vor allem den Infarkttrandsaum. Auch in Vergleichen mit Hämatoxylin-Eosin(H.-E.)-gefärbten Schnitten entsprach die fluoreszenzmikroskopisch sichtbare Astrozytenrandzone dem histologisch sichtbaren Randgebiet der neuronalen Zellschädigung.

Eine Expression von GFAP konnte in den GFP-positiven Zellen in dem vorgegebenen Beobachtungszeitraum von bis zu fünf Wochen nach Transplantation nicht nachgewiesen werden. Somit lässt sich aus diesen Ergebnissen schließen, dass eine Differenzierung der hämatopoetischen Zellen zu Astrozyten in dem verwendeten Modell nicht stattfindet. In der Literatur gibt es hierzu widersprüchliche Angaben. Während einige Autoren beschreiben, dass 0,5% aller ZNS-Astrozyten ihren Ursprung im Knochenmark haben (Eglitis und Mezey, 1997; Eglitis et al., 1999), beobachten andere Autoren keine Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen zu Astrozyten (Wehner et al., 2003; Brazelton et al., 2000; Nakano et al., 2001; Hess et al., 2002).

Zur Untersuchung einer möglichen Differenzierung der hämatopoetischen Zellen zu Neuronen wurde als neuronaler Marker NeuN verwendet. Zu keinem Zeitpunkt konnte in einem der untersuchten Tiere eine Expression von NeuN in GFP-positiven Zellen nachgewiesen werden. Dieses spricht gegen eine Differenzierung der GFP-markierten Zellen zu Neuronen in dem verwendeten Modell. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass über einen längeren Beobachtungszeitraum von sechs Monaten eine Differenzierung zu Neuronen möglich sein könnte (Nakano et al., 2001; Eglitis and Mezey et al., 1997; Kopen et al., 1999; Brazelton et al., 2000; Mezey et al., 2000).

Zusammengefasst wird deutlich, dass die Einwanderung hämatopoetischer Zellen bevorzugt an den Ort der Schädigung stattfindet. Dies suggeriert, dass vom Ort der Schädigung spezielle Botenstoffe ausgeschüttet werden, welche die Rekrutierung von myeloiden Zellen in das geschädigte Gebiet lenken. Hieraus ergibt sich eventuell die interessante Möglichkeit, Gen-modifizierte hämatopoetische Zellen als Vehikel für Gentherapie im zentralen Nervensystem zu nutzen. Weitere Versuche sind notwendig, um das Potential einer möglichen klinischen Anwendung hämatopoetischer Stammzellen in verschiedenen ZNS-Pathologien zu untersuchen.



### 4.3 Die Rolle einwandernder Leukozyten im Schlaganfall

In mehreren Arbeiten wird angenommen, dass einwandernde Leukozyten einen wichtigen Beitrag zur Vergrößerung des späten ischämischen Schadens leisten. Im Rahmen der Entzündungsreaktion wurde vor allem in der späten Phase nach zerebraler Ischämie eine ausgedehnte Einwanderung neutrophiler Granulozyten in das Infarktgebiet festgestellt (Barone et al., 1992; Clark et al., 1994; Matsuo et al., 1994; Schroeter et al., 1994).

In verschiedenen Versuchsansätzen konnte durch Strategien, welche die Einwanderung von Leukozyten verringern oder verhindern, eine Verkleinerung des ischämischen Schadens erzielt werden. Durch Verwendung von Antikörpern gegen neutrophile Granulozyten, wie dem monoklonalen Anti-Neutrophilen-Antikörper RP3, konnte das Infarktvolumen um 30-60% reduziert werden (Matsuo et al., 1994). Auch bei Verwendung selektiver Antikörper gegen einzelne Komponenten des Immunsystems, wie ICAM-1 (Bowes et al., 1993; Chopp et al., 1996) oder anti-CD11/CD18-Antikörper, konnte der ischämische Schaden verkleinert werden (Chen et al., 1994; Mori et al., 1992). Ebenso konnte durch Ausschaltung wichtiger Gene der Neutrophilen-Aktivierung oder –Migration eine signifikante Abnahme der Schlaganfallgröße erzielt werden. Als Knock-out-Tiere wurden hierbei CD-18-defiziente Mäuse (Prestigiacomo et al., 1999) oder ICAM-1-Knock-out-Mäuse verwendet (Kitagawa et al., 1998).

Es wird angenommen, dass einwandernde Leukozyten zu einer Vergrößerung des ischämischen Schadens durch die Expression von zytotoxischem NO durch iNOS beitragen (Iadecola et al., 1997a). In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob einwandernde Leukozyten die Hauptquelle der NO-Synthese durch iNOS darstellen. Hierzu wurde eine GFP-Chimäre generiert, die eine verlässliche Markierung einwandernder Blutzellen ermöglicht. Vier Wochen nach Transplantation der GFP-markierten Knochenmarkszellen wurden die Chimären einer 45-minütigen MCAO unterzogen und die Hirne zur immunhistochemischen Untersuchung aufgearbeitet. Nach Ischämie zeigte sich eine unmittelbar einsetzende und anhaltende Einwanderung GFP-positiver Zellen in das gesamte Infarktgebiet (siehe Kapitel 4.2). Allerdings war in den eingewanderten, GFP-exprimierenden Zellen keine iNOS-Immunreaktivität nachweisbar. Diese Ergebnisse sprechen gegen eine Vergrößerung des ischämischen Schadens durch eine NO-Produktion einwandernder Leukozyten im vorliegenden Modell. Dies stützt die Ergebnisse neuerer Arbeiten, die gegen eine herausragende Rolle einwandernder Leukozyten bei der Vergrößerung des ischämischen Schadens sprechen (Übersicht siehe Emerich, 2002).

So führte eine experimentelle Neutropenie mit einer Reduktion der Leukozyten-Infiltration von über 60% in einem Modell der schweren Ischämie der Ratte zu keiner Reduktion des Infarktvolumens oder des oxidativen Stresses (Beray-Berthat et al., 2003). Eine durch LPS verstärkte Einwanderung von Leukozyten in das Infarktgebiet führte sogar zu einer

Verkleinerung des ischämischen Schadens (Ahmed et al., 2000). Weiterhin entwickelten Myeloperoxidase-defiziente Mäuse größere Infarkte als ihre Wildtypen (Takizawa et al., 2002). Myeloperoxidase ist ein Enzym, welches in neutrophilen Granulozyten und Monozyten produziert wird und häufig auch als Marker für die Neutrophilen-Aktivität verwendet.

Auch spricht der beobachtete zeitliche Verlauf der Einwanderung von Leukozyten gegen eine Rolle der Leukozyten in der Vergrößerung des ischämischen Schadens. Die Einwanderung der Leukozyten findet erst zu einem sehr späten Zeitpunkt statt (Maximum frühestens 24-48 Stunden, im verwendeten Modell erst ca. drei bis fünf Tage nach Ischämie). Zu diesem Zeitpunkt ist die Ausbildung des endgültigen Infarktolumens weitgehend abgeschlossen (Iadecola et al., 1997a) und die Expression von iNOS hat ihr Maximum in einigen Modellen bereits überschritten (Lerouet et al., 2002). Bisher konnte eine Zunahme des Infarktolumens oder eine Verschlechterung des neurologischen Defizits nach 24 Stunden nicht nachgewiesen werden, während die Infiltration durch Entzündungszellen weit über diesen Zeitpunkt hinaus anhält (Übersicht siehe Emerich et al., 2002).

Eine tragende Rolle einwandernder Leukozyten kann jedoch für die permanente Ischämie nicht ausgeschlossen werden. Vorangehende Ergebnisse zeigten eine iNOS-Expression in einwandernden Leukozyten vor allem in der permanenten Ischämie (Iadecola et al., 1995a; Iadecola et al., 1997b). In der transienten Ischämie hingegen wird angenommen, dass Blutgefäße den Hauptexpressionsort der iNOS darstellen (Iadecola et al., 1996; siehe 4.4.2). Diese Befunde ließen sich in der vorliegenden Arbeit allerdings nicht bestätigen (siehe Resultate).

Andere Arbeiten konnten eine Expression der iNOS auch in der residenten Glia nachweisen. Dies führte zu der Annahme, dass die residente Mikroglia eine wesentliche Rolle in der post-ischämischen Entzündungsreaktion spielt (Loihl et al., 1999). In einer Untersuchung der Einwanderung von Leukozyten an GFP-Chimären nach transientser fokaler zerebraler Ischämie konnten überraschend wenige hämatopoetische Zellen im Infarktgebiet nachgewiesen werden. Die Hauptpopulation der Entzündungszellen wurde vor allem in der frühen Phase mehrheitlich von residenter Mikroglia gestellt (Schilling et al., 2003). Eine eventuelle Überlegenheit lokaler Abwehrmechanismen gegenüber hämatopoetischen Zellen zeigte sich auch in der phagozytischen Aktivität. So betrieb die Mikroglia deutlich mehr Phagozytose nach einem ischämischen Schaden als die einwandernden Zellen (Schilling et al., 2005).

#### **4.4 Bedeutung der iNOS im Schlaganfall**

Unabhängig von der Expression in einwandernden Leukozyten sollte die Frage beantwortet werden, ob die iNOS eine Rolle in der Vermittlung des späten Schadens nach fokaler

zerebraler Ischämie spielt und welche Bedeutung die NO-Freisetzung durch iNOS in diesem Zusammenhang spielt.

Durch die Transplantation von Knochenmark aus iNOS-Knock-out-Mäusen in Wildtyp-Tiere und umgekehrt wurden Chimären geschaffen, die entweder nur in Zellen des peripheren Blutes oder hauptsächlich in Zellen des ZNS iNOS exprimierten. Eine Fragestellung der vorliegenden Arbeit war, ob sich die Infarktgrößen dieser Knochenmarkchimären 96 Stunden nach 45-minütiger MCAO unterscheiden. Hiermit sollte beantwortet werden, ob einwandernde Leukozyten oder die ortständige Mikroglia über die Expression von iNOS den späten ischämischen Schaden vergrößern können.

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede der Infarktgrößen zwischen den  $iNOS^{-/-}$  →  $iNOS^{-/-}$  und  $wt$  →  $iNOS^{-/-}$ -Tieren. Auch zwischen den  $iNOS^{-/-}$  →  $wt$ -Chimären und  $iNOS^{-/-}$  →  $iNOS^{-/-}$ -Tieren war kein signifikanter Unterschied festzustellen. Die Versuchsgruppen boten allesamt nahezu identische Infarktgrößen. Auch zwischen den  $wt$  →  $wt$ - und  $iNOS^{-/-}$  →  $iNOS^{-/-}$ -Tieren, welche als Kontrollgruppen dienten, zeigte sich überraschenderweise kein signifikanter Unterschied. Dieses widerspricht Ergebnissen aus vorangehenden Arbeiten (Iadecola et al., 1997a; Loihl et al., 1999).

Um zu überprüfen, ob nicht die Prozedur der Knochenmarktransplantation und Bestrahlung einen Einfluss auf die Schlaganfallgröße hatte, wurden die Infarktgrößen von nicht transplantierten Wildtyp- gegen iNOS-Knock-out-Tiere nach 60-minütiger MCAO bestimmt.

Bei gleichem Versuchsaufbau wurden verschiedene iNOS-Knock-out-Stämme bezüglich ihrer Protektion gegenüber transienter fokaler zerebraler Ischämie untersucht. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Laubach-Mäuse (Laubach et al., 1995), die nach Rückkreuzung einen reinen C57BL/6-Hintergrund aufweisen, zeigten nach 60-minütiger transienter Ischämie keine signifikant kleineren Infarktgrößen im Vergleich zu ihren Wildtypen. Zur Kontrolle wurden die von MacMicking et al. (1995) generierten iNOS-Knock-out-Mäuse, bei denen in vorangegangenen Arbeiten eine Protektion nach zerebraler Ischämie beschrieben wurde (Iadecola et al., 1997a; Loihl et al., 1999), bezüglich ihrer Protektion nach transienter zerebraler Ischämie untersucht. Um einen größeren Stimulus für die Expression von iNOS zu setzen wurde eine längere Ischämiezeit gewählt. Auch diese Tiere wiesen keine signifikante Differenz des Infarktvolumens nach 60-minütiger MCAO im Vergleich zu ihren Wildtypen auf. Um einen möglichen Einfluss des Mausstammes auf die Infarktgröße zu untersuchen, wurden die ursprünglich generierten Laubach-Mäuse mit gemischtem Hintergrund (C57/SV129) einer 60-minütigen transienten zerebralen Ischämie unterzogen und die Infarktgrößen ausgewertet. Die Knock-out-Tiere zeigten wiederum keine signifikanten Unterschiede des indirekten Infarktvolumens im Vergleich zu den Wildtypen.

Anschließend wurde eine immunhistochemische Färbung des iNOS-Proteins an Schnitten der GFP-Chimären nach 45-minütiger transienter fokaler zerebraler Ischämie und

unterschiedlich langer Reperfusion (Tag eins bis fünf, Tag 14) vorgenommen. Entgegen den Ergebnissen vorangehender Arbeiten (Iadecola et al., 1997a; Loihl et al., 1999) war das iNOS-Protein in den untersuchten Tieren immunhistochemisch weder in den einwandernden Zellen noch in der residenten Glia zu keinem Zeitpunkt nach fokaler zerebraler Ischämie nachzuweisen.

Zusammengefasst konnte in dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten Modell einer transienten zerebralen Ischämie der Maus weder eine iNOS-Expression in ortständigen Zellen noch eine Einwanderung iNOS-positiver Zellen in das geschädigte Gewebe gezeigt werden. Dies widerspricht Forschungsergebnissen, welche die Bedeutung von iNOS in der Vermittlung des verzögerten Schadens nach dem Schlaganfall herausstellen und eine Protektion des Gehirns und seiner Zellen durch die Hemmung von iNOS beschreiben. In mehreren Studien kam es zu einem Anstieg der iNOS-Expression sowohl in einem Modell der permanenten (Iadecola et al., 1995c) als auch in einem Modell der transienten Ischämie (Iadecola et al., 1996; Grandati und Vercchia, 1997). Die Blockierung der iNOS mittels Aminoguanidin, einem wenig selektiven iNOS-Hemmstoff, führte zu einer Verkleinerung des ischämischen Infarktes und zu einer Abnahme der iNOS-mRNA (Iadecola et al., 1995c; 1996; Zhang, F. et al., 1996). Die spezifische Hemmung der iNOS durch die Gabe von 1400 W ergab den gleichen Effekt (Parmentier et al., 1999; Willmot et al., 2005).

Eine Protektion vor zerebraler Ischämie konnte in vorangehenden Arbeiten auch durch Ausschaltung des iNOS-Gens nachgewiesen werden. iNOS-Knock-out-Mäusen zeigten 96 Stunden nach permanenter zerebraler Ischämie 30% kleinere Infarkte als ihre Wildtypen (Iadecola et al., 1997a; Loihl et al., 1999).

Allerdings stellen einige jüngere Daten diese Rolle der iNOS im Mausmodell der Ischämie in Frage (Schroeter et al., 2003; Cash et al., 2001; Lerouet et al., 2005). Eine iNOS-Immunreaktivität wurde bisher von unterschiedlichen Arbeitsgruppen in einwandernden Entzündungszellen, in zerebralen Gefäßen im ischämischen Gebiet (Galea et al., 1998; Hirabayashi et al., 2000; Iadecola et al., 1995c), aber auch in autopsierten Gehirnen von Patienten nach akutem Schlaganfall nachgewiesen (Forster et al., 1999). Insgesamt weist die vorliegende Literatur auf eine wichtige Rolle der iNOS in der Vermittlung des späten ischämischen Schadens hin (Iadecola et al., 1996). Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Ergebnisse können diese Annahme im transienten Ischämiemodell der Maus nicht bestätigen und stehen auf den ersten Blick in einem deutlichen Gegensatz zu bisherigen Forschungsergebnissen. Eine Vielzahl von Faktoren könnte dafür verantwortlich sein, dass im vorliegenden Modell die iNOS keine Auswirkung auf das Ausmaß des ischämischen Schadens hat und ihre Expression nicht nachzuweisen ist. Es fällt auf, dass deutliche Unterschiede zwischen den eingesetzten Modellen sowohl hinsichtlich der

verwendeten Knock-out-Tiere, der Spezies, dem jeweiligen Schadensmodell als auch im Alter und Geschlecht der verwendeten Versuchstiere bestehen.

#### 4.4.1 Bedeutung des Ischämie-Modells

Eine Vielzahl der beschriebenen Untersuchungen zur Rolle der iNOS nach Ischämie sind an Modellen der permanenten Ischämie durchgeführt worden (Iadecola et al., 1995 a-c, 1997b; Loihl et al. 1999; Zhang et al., 1996, 1998). Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Modell ist jedoch ein transientes Modell des Schlaganfalls. Es führt somit zu einer anderen Art von Begleitreaktion, da in den Modellen der transienten Ischämie auf die Ischämiezeit eine Phase der Reperfusion folgt. Metaboliten, die den Zellen während der Ischämie vorenthalten waren, werden mit der Reperfusion wieder zur Verfügung gestellt, so dass auch die Art der Entzündungsreaktion eine andere ist. Die Studien, welche die iNOS-Expression an Modellen der transienten Ischämie studiert haben, verwendeten entweder ein sehr schweres Ischämie-Modell (Okklusion beider Aa. cerebri mediae sowie einer A. carotis communis – Parmentier et al., 1999) oder ein Modell der transienten Ischämie, in dem die gesetzte Ischämiezeit eine Dauer von zwei Stunden (Zhu et al., 2002; Suzuki et al., 2002; Iadecola et al., 1997a) oder zumindest 90 Minuten nicht unterschreitet (Zhu et al., 2003).

Im Vergleich hierzu war die Ischämiezeit des in der vorliegenden Arbeit verwendeten Modells mit 60 Minuten kürzer. Ebenso ist der Verschluss der A. cerebri media mittels intra-arterieller Okklusion durch ein Filament deutlich weniger traumatisch, da die Tiere vorher nicht einer Kraniotomie mit damit möglicherweise einhergehender zerebraler Schädigung unterzogen werden. Das Silikon-beschichtete Filament wird relativ atraumatisch über die Arteria carotis interna vorgeschoben und führt zu keiner nennenswerten Umgebungsreaktion (Übersicht siehe Carmichael, 2005).

Dem iNOS-Protein wird vor allem eine Bedeutung im Rahmen von Entzündungsreaktionen zugeschrieben. Es wird daher auch inflammatorische NO-Synthetase genannt. Neben einer gesteigerten Expression der iNOS in der permanenten Ischämie konnte eine minimale Expressionsrate auch in Sham-operierten Ratten festgestellt werden, die bei nicht-operierten Tieren nicht vorhanden war (Iadecola et al., 1995c). Dieser Effekt wurde bisher in der transienten Ischämie nicht beschrieben, wirft jedoch die Frage auf, inwiefern das Trauma des Eingriffes an sich schon zu einer Expression von iNOS führen kann. Modelle von schweren Ischämien mit traumatischer Kraniotomie zur Vorbereitung könnten somit schon allein durch den Eingriff zu einer gesteigerten Expression des iNOS-Proteins führen. Ein im Vergleich hierzu weniger traumatisches Modell einer transienten Ischämie übt möglicherweise keinen ausreichend großen Reiz für die Expression der iNOS aus.

In Modellen der Neuro-Traumatologie kommt es zu einer gesteigerten Expression von iNOS. So wurde die iNOS nach Neurotrauma in Ratten bereits nach sechs Stunden hochreguliert

und die Expression hielt bis zu 72 Stunden an. Dies zeigt, dass iNOS nicht nur nach ischämischem Schaden, sondern nach neuronalem Schaden an sich verstärkt exprimiert wird. Im Gegensatz zu den erwähnten Studien der Ischämie führte die Expression der iNOS in diesem Traumamodell paradoxerweise zu einer Protektion der Tiere. iNOS-defiziente Tiere zeigten einen größeren Schaden als ihre Wildtypen (Sinz et al., 1999).

Dieses ist die erste Arbeit, die die Expression der iNOS im beschriebenen transienten Ischämie-Modell und verwendeten Versuchsaufbau untersucht hat. In einem Modell der transienten Ischämie der Ratte konnten Iadecola et al. (1996) einen viel früheren Anstieg des iNOS-Proteins mit einem Maximum der iNOS-Expression bereits nach 24 Stunden zeigen. Im Gegensatz hierzu erreicht die Expression der iNOS in der permanenten Ischämie erst nach 96 Stunden ihr Maximum (Iadecola et al., 1997a). Zu diesem Zeitpunkt ist die iNOS in der transienten Ischämie in den Untersuchungen von Iadecola et al. (1996) schon gar nicht mehr nachweisbar.

Eine weitere Studie bestätigt den frühen Anstieg der iNOS in der transienten Ischämie (Zhu et al., 2003). Bereits sechs Stunden nach einer 90-minütigen transienten Ischämie war ein Anstieg der iNOS nachzuweisen. Die Expression erreichte ihr Maximum nach zwei Tagen. Nach vier Tagen war das iNOS-Protein nicht mehr nachweisbar. Allerdings ergaben die Messungen lediglich einen 2,6-fachen Anstieg der iNOS-Aktivität. Aufgrund der großen biologischen Varianz ist das Ausmaß des Anstieges durchaus anfällig für Störungen und Messfehler.

Dies verdeutlicht die große Abhängigkeit der iNOS-Expression vom verwendeten Ischämie-Modell und den jeweiligen Ischämiezeiten.

#### **4.4.2 Spezies-spezifische Unterschiede der iNOS-Expression**

Es fällt auf, dass sich Expressionsmuster und -stärke der iNOS abhängig von der untersuchten Spezies unterscheiden. Während in den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen bei Mäusen keine iNOS-Expression nach transienter zerebraler Ischämie oder LPS-induzierter Meningitis festzustellen war, zeigte sich eine deutliche Expression in Ratten nach intrathekalen LPS- oder Interleukin-Stimulation.

Diese Ergebnisse stützen Daten anderer Arbeitsgruppen, die im Vergleich der Expression von Entzündungsmediatoren wie Interleukin-3 (IL-3), TNF- $\alpha$  aber auch iNOS deutliche Spezies-Unterschiede zwischen Maus und Ratte nach permanenter Ischämie zeigen konnten (Schroeter et al., 2003). Während es in der Ratte auf den Reiz der Ischämie hin zu einer deutlichen Entzündungsreaktion mit ausgeprägter Expression von oben genannten Proteinen kam, war in der Maus allenfalls eine sehr abgeschwächte Reaktion festzustellen. Ebenso stellten sich deutliche Unterschiede in der Quantität der Expression dar. Während die iNOS-Aktivität in der Maus lediglich ungefähr 3-fach gesteigert war, konnte in der Ratte

eine bis zu 70-fach erhöhte Aktivität nachgewiesen werden. In der Ratte zeigte sich ein deutliches immunpositives Signal am Infarkttrand, während bei der Maus nach 14 Tagen nur einzelne iNOS-positive Zellen nachzuweisen waren (Schroeter et al., 2003).

Dies bestätigt die Ergebnisse vorangehender Studien. In einer biochemischen Analyse der iNOS-Aktivität nach permanenter zerebraler Ischämie zeigte sich eine deutliche Expression in Ratten, jedoch nicht in Mäusen (Yoshida et al., 1995). In Ratten wurde ein schnelles Maximum der iNOS-Expression 48 Stunden nach permanenter Ischämie nachgewiesen (Iadecola et al., 1995a), während die Expression in Mäusen verzögert verlief und erst nach 96 Stunden ihr Maximum erreichte (Iadecola et al., 1997a).

Ähnliche Unterschiede zwischen Ratte und Maus zeigten sich auch in anderen ZNS-Pathologien, wie z.B. in einem Modell des Neurotraumas. In der Maus war nach Neurotrauma ein Anstieg der iNOS-Expressionsrate erst nach 24 Stunden messbar, während die iNOS-Expression in der Ratte bereits nach sechs Stunden hochreguliert wurde (Sinz et al., 1999).

Der Grund für die deutlichen Unterschiede zwischen Ratte und Maus bleibt unklar. Die unterschiedlichen iNOS-Expressionsmuster auf inflammatorische Stimuli zwischen Maus und Ratte deuten darauf hin, dass mögliche Unterschiede in der Immunantwort der Tiere bestehen. Weitere Studien sind notwendig, um die Bedeutung der Spezies-spezifischen Unterschiede der iNOS Expression zu klären.

#### **4.4.3 Die Auswirkung der Knock-out-Maus auf die Infarktgröße**

Weiterhin scheint die Art der Knock-out-Maus an sich eine Rolle bei der Protektion nach zerebraler Ischämie durch Ausschaltung der iNOS zu spielen. In der vorliegenden Arbeit wurden iNOS-Knock-out-Mäuse verwendet, die von Laubach et al. (1995) generiert wurden. In diesen Mäusen wurden die Exone 12-13 durch Einsatz eines Neomycin-Resistenz-Gens ersetzt. Diese Exone kodieren normalerweise die Calmodulin-Bindungs-Domäne, welche für die Expression der iNOS unerlässlich ist (Laubach et al., 1995).

Die von uns verwendeten Laubach-Mäuse zeigten 96 Stunden nach transientser Ischämie keine signifikante Protektion gegenüber ihren Wildtypen. In den im Anschluss durchgeführten Versuchen zeigten zwei weitere Knock-out-Mäuse keine Protektion gegenüber einer 60-minütigen zerebralen Ischämie im Vergleich zu ihren Wildtypen. Jedoch fiel einerseits eine signifikant erhöhte Mortalitätsrate der Laubach-iNOS-Knock-out-Mäuse mit gemischtem Hintergrund gegenüber ihren Wildtypen auf. Andererseits wiesen diese Knock-out-Mäuse signifikant kleinere Infarkte als die Laubach-Mäuse mit reinem C57BL/6-Hintergrund auf.

Dies steht in deutlichem Gegensatz zu den Ergebnissen anderer Studien, die 96 Stunden nach permanenter Ischämie eine signifikante Reduktion des Infarktvolumens der iNOS-Knock-out-Mäuse von MacMicking et al. (1995) gegenüber ihren Wildtypen zeigten (Iadecola

et al., 1997a; Loihl et al., 1999). Im Gegensatz zur Laubach-iNOS-Knock-out-Maus wurden in der MacMicking-Knock-out-Maus nicht die Exone 12-13, sondern die Exone 1-4 und die Promoter-Region der iNOS ausgeschaltet.

Bemerkenswerterweise zeigen beide Knock-out-Typen auch Unterschiede bezüglich ihrer Empfindlichkeit gegenüber einem durch LPS induzierten Zelltod. Während die Laubach-iNOS<sup>-/-</sup>-Maus in einem Modell des septischen Schocks keinen Unterschied im Vergleich zu ihren Wildtypen aufwies (Laubach et al., 1995), war die MacMicking iNOS<sup>-/-</sup>-Maus relativ geschützt gegenüber LPS-induzierter Hypotension und Tod (MacMicking et al., 1995). Die Autoren sahen hier bei gleichem Versuchsaufbau den unterschiedlichen Stamm der verwendeten Mäuse als Ursache für die angegebenen Unterschiede (Laubach et al., 1995).

Dass die Verwendung unterschiedlicher Mausstämmen in unterschiedlichen Infarktgrößen nach zerebraler Ischämie resultieren kann, ist hinreichend bekannt. Mehrere Studien konnten zeigen, dass C57BL/6-Mäuse größere Infarkte aufweisen als SV129-Mäuse (Maeda et al., 1999; Fujii et al., 1997). Man nimmt an, dass hierfür unterschiedliche Kollateralkreisläufe der verschiedenen Maus-Typen verantwortlich sind. C57BL/6-Mäuse haben einen hypoplastisch ausgebildeten hinteren Circulus willisi (Yang et al., 1997), was die größeren Infarkte der C57BL/6-Mäuse über die schlechtere Kollateralversorgung erklären könnte. Weiterhin gibt es Daten, die dafür sprechen, dass die Produktion von TNF nach fokaler zerebraler Ischämie in Mikroglia/Makrophagen des Infarktandes vom verwendeten Mausstamm abhängig ist. BALB/c-Mäuse wiesen die geringste Menge an TNF-produzierender Mikroglia auf und entwickelten hierunter die größten Infarkte verglichen mit C57BL/6-Mäusen und SJL-Mäusen (Lambertsen et al., 2002).

Ob und in wie fern Spezies und Hintergrund-assoziierte Unterschiede zu einer unterschiedlichen iNOS-Produktion beitragen, bleibt zum jetzigen Zeitpunkt ungeklärt. In weiterführenden Versuchen wurde die Induktion der unterschiedlichen Exone untersucht und eine leichte Induktion vor allem der ersten Exone (Exone 2-3) des iNOS-Gens nach Schlaganfall festgestellt (Pruess et al., Manuskript zur Veröffentlichung eingereicht). Genau diese Exone sind jedoch bei der MacMicking-iNOS<sup>-/-</sup>-Maus ausgeschaltet. Dies könnte eine Erklärung dafür sein, dass verschiedene Arbeiten eine Protektion der MacMicking-Knock-out-Maus gegenüber fokaler zerebraler Ischämie zeigen konnten (Iadecola et al., 1997a; Loihl et al., 1999).

#### **4.4.4 Alter und Geschlecht der Mäuse beeinflussen die iNOS-Expression**

Es gibt Hinweise darauf, dass sowohl das Alter als auch das Geschlecht die Ausprägung der ischämischen Schädigung beeinflussen. Zwischen Wildtyp und iNOS-Knock-out-Mäusen ist der Unterschied der Infarktgrößen in jungen Mäusen (vier oder acht Wochen alt) größer als in 16 - 24 Wochen alten Mäusen (Nagayama et al., 1999). Dies zeigt, dass bei jungen



Mäusen die iNOS möglicherweise einen größeren Beitrag zur Entstehung des post-ischämischen Schaden leistet.

Weibliche iNOS-Knock-out-Mäuse sind nicht wie ihre männlichen Artgenossen gegenüber zerebraler Ischämie geschützt (Loihl et al., 1999). Hierfür könnten weibliche Hormone wie Progesteron verantwortlich sein. Die Gabe von Progesteron nach zerebraler Ischämie führt zu kleineren Infarkt volumina und zu einer verbesserten funktionellen Erholung der Tiere (Gibson und Murphy, 2004). Interessanterweise scheint Progesteron die iNOS-Expression direkt zu beeinflussen. Progesteron-behandelte Mäuse zeigten eine signifikante Reduktion der iNOS-Expression. Hieraus lässt sich schließen, dass die iNOS wahrscheinlich eine Rolle in der Vermittlung der Neuroprotektion durch Progesteron spielt (Coughlan et al., 2005). Dies wird dadurch gestützt, dass weibliche Mäuse nach Ovariectomie einen Anstieg der iNOS-Expression aufwiesen. Dieser Effekt konnte durch die Gabe von Östrogenen wieder aufgehoben werden (Park et al., 2006).

Diese Studien zeigen, dass bestimmte weibliche Hormone einen Einfluss auf die Expression der iNOS haben. Inwiefern unterschiedliche Mäuse einen unterschiedlichen Östrogen/Progesteron-Spiegel und daher auch eine unterschiedliche iNOS-Expression aufweisen, ist bisher nicht ausreichend geklärt. Um den Einfluss von Hormonen auf die iNOS-Expression und die Infarktgrößen soweit wie möglich auszuschalten, wurden in den durchgeführten Experimenten nur 8 – 12 Wochen alte männliche Mäuse verwendet.

#### **4.4.5 Die Auswirkung der Calcium-Konzentration auf die iNOS-Aktivitäts-Bestimmung**

Im Gegensatz zu den beiden Calcium-abhängigen NOS-Isoformen, der eNOS und der nNOS, ist die iNOS Calcium-unabhängig. In vielen Arbeiten wurde die Bestimmung der Aktivität einer Calcium-unabhängigen-NOS mit der iNOS gleichgesetzt. Das Prinzip der verwendeten Methode basierte auf der Bindung des freien Calciums mittels 0,5-0,6 mM Ethylendiamin-Tetracetat (EDTA) (Galea et al., 1998; Yoshida et al., 1995; Zhu et al., 2002). Die zerebrale Ischämie ist jedoch ein Schadensmechanismus, der zur Ausschüttung von Calcium und somit zur Erhöhung des freien Calciums führt (Lerouet et al., 2005). So lässt sich nicht ausschließen, dass bei der Aktivitätsmessung vieler Kits, die nach Herstellerangaben nur die Calcium-unabhängige NOS zu bestimmen, aufgrund der hohen Calcium-Konzentrationen nach Ischämie die Calcium-abhängige NOS mitbestimmt wird. So konnte gezeigt werden, dass die weitere Senkung der Calcium-Konzentration durch eine höhere Konzentration des Calcium-Chelators EDTA die vorher gezeigten Unterschiede in der iNOS-Expression aufhebt. Lerouet und Mitarbeiter nehmen an, dass die iNOS-Aktivität und deren Bedeutung im Schlaganfall höchstwahrscheinlich überschätzt werden. Da das Ausmaß der Calcium-Ausschüttung auch durch die Schwere und Dauer der Ischämie

bedingt ist, stellen die Autoren die Hypothese auf, dass die iNOS-Aktivität vor allem auch von dem Schadensausmaß des verwendeten Schlaganfallmodells abhängt (Lerouet et al., 2005).

#### **4.4.6 Aminoguanidin - ein unselektiver Hemmstoff der iNOS**

Eine Vielzahl von Studien verwendete zur Bestätigung der postulierten schadensvergrößernden Wirkung der iNOS Aminoguanidin. Die Gabe von Aminoguanidin, einem unspezifischen iNOS-Hemmstoff, führte in einigen Fällen zu einer Reduktion des ischämischen Schadens (Zhang und Iadecola, 1998; Iadecola et al., 1996). Das späte Wirkungsmaximum von Aminoguanidin scheint ebenfalls für eine Hemmung der iNOS zu sprechen (Zhang und Iadecola, 1998).

Aus neueren Studien ist jedoch bekannt, dass nur eine partielle Selektivität des Aminoguanidins gegenüber der iNOS im Vergleich zur eNOS und nNOS existiert (Übersicht siehe Alderton et al., 2001). Weiterhin besitzt Aminoguanidin neuroprotektive Effekte, welche unabhängig von einer iNOS-Hemmung sind (Iadecola et al., 1996). So hemmt Aminoguanidin neben der iNOS auch die Diaminoxidase (Beaven et al., 1969) und die Bildung von Glykosilierungs-Endprodukten (Übersicht siehe Brownlee, 1986). Darüber hinaus zeigte die Gabe von Aminoguanidin in neueren Publikationen keinen Einfluss auf die Infarktgröße oder die NO-Konzentration (Cash et al., 2001).

Die genaue Wirkung von Aminoguanidin auf die iNOS bleibt unklar und eine direkte Modulation der iNOS ist schwer nachzuweisen, so dass einige Daten im Zusammenhang von iNOS und Aminoguanidin kritisch zu bewerten sind.

#### **4.5 Ausblick**

Die Fragestellungen, die sich aus der vorliegenden Arbeit ergeben, sind vielfältig. Die vergleichende Untersuchung der iNOS-Expression in verschiedenen Ischämie-Modellen mit unterschiedlichen Ischämiezeiten könnte Aufschluss über die Abhängigkeit der iNOS vom pathologischen Stimulus geben.

Weiterhin bleibt die Frage zu beantworten, inwiefern Unterschiede in Spezies und Stamm Einfluss auf die iNOS-Expression haben. In unserer Arbeitsgruppe wurde untersucht, ob unterschiedliche Splicing-Varianten der iNOS-Knock-out-Mäuse zu einer unterschiedlichen iNOS-Expression führen (Pruess et al., zur Veröffentlichung eingereicht). Auch sind noch viele Aspekte bezüglich der komplizierten Regulationsmechanismen im Rahmen von inflammatorischen Reaktionen, an denen auch die iNOS beteiligt ist, unbeantwortet.

## 5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit diente der Untersuchung der iNOS-Expression in einwandernden Leukozyten sowie ortständiger Mikroglia nach transientser zerebraler Ischämie. Der iNOS wird eine wichtige Rolle in der Vermittlung des späten ischämischen Schadens durch Produktion toxischer Mengen an NO zugeschrieben. Der Expressionsort des iNOS-Proteins ist jedoch bisher ungeklärt. Es gibt Hinweise darauf, dass während und nach dem ischämischen Ereignis einwandernde Leukozyten iNOS exprimieren und somit zu einer Vergrößerung des Infarkts führen. Jedoch ist auch eine Expression der iNOS in residenten Gliazellen beschrieben worden.

Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurde in der vorliegenden Arbeit ein GFP-Chimären-Modell verwendet, welches eine Unterscheidung zwischen einwandernden Zellen und residenter Glia zulässt. Durch die Transplantation von Knochenmark aus iNOS-defizienten (iNOS<sup>-/-</sup>) Mäusen in Wildtyp(wt)-Tiere und umgekehrt wurden Chimären geschaffen, die entweder nur in Zellen des peripheren Blutes oder nur in Zellen des ZNS iNOS exprimierten. Zwischen den vier untersuchten Transplantationsgruppen (wt→wt, iNOS<sup>-/-</sup>→iNOS<sup>-/-</sup>, iNOS<sup>-/-</sup>→wt, wt→iNOS<sup>-/-</sup>) war kein Unterschied in der Infarktgröße nach 45-minütiger transientser fokaler zerebraler Ischämie festzustellen. Es war keine Expression der iNOS in den Wildtyp-Mäusen und auch keine Protektion der drei verwendeten unterschiedlichen iNOS-Knock-out-Mäuse gegenüber ihren Wildtypen im verwendeten Modell der transientsen Ischämie nachzuweisen.

Nach den gewonnenen Daten muss die Rolle der iNOS nach zerebraler Ischämie kritisch betrachtet werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und die verschiedener anderer Studien weisen darauf hin, dass die iNOS nicht generell als Mediator der schadensvergrößernden Inflammationsreaktion nach zerebraler Ischämie zu sehen ist.

## Literaturverzeichnis

- Ahmed, S. H.; He, Y. Y.; Nassief, A.; Xu, J.; Xu, X. M.; Hsu, C. Y. und Faraci, F. M. (2000): Effects of lipopolysaccharide priming on acute ischemic brain injury, *Stroke* (Band 31), Nr. 1, Seite 193-199.
- Alderton, W. K.; Cooper, C. E. und Knowles, R. G. (2001): Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition, *Biochem.J.* (Band 357), Nr. Pt 3, Seite 593-615.
- Astrup, J.; Symon, L.; Branston, N. M. und Lassen, N. A. (1977): Cortical evoked potential and extracellular K<sup>+</sup> and H<sup>+</sup> at critical levels of brain ischemia, *Stroke* (Band 8), Nr. 1, Seite 51-57.
- Babu, B. R. und Griffith, O. W. (1998): Design of isoform-selective inhibitors of nitric oxide synthase, *Curr.Opin.Chem.Biol.* (Band 2), Nr. 4, Seite 491-500.
- Barone, F. C.; Schmidt, D. B.; Hillegass, L. M.; Price, W. J.; White, R. F.; Feuerstein, G. Z.; Clark, R. K.; Lee, E. V.; Griswold, D. E. und Sarau, H. M. (1992): Reperfusion increases neutrophils and leukotriene B4 receptor binding in rat focal ischemia, *Stroke* (Band 23), Nr. 9, Seite 1337-1347.
- Beaven, M. A.; Gordon, J. W.; Jacobsen, S. und Severs, W. B. (1969): A specific and sensitive assay for aminoguanidine: its application to a study of the disposition of aminoguanidine in animal tissues, *J.Pharmacol.Exp.Ther.* (Band 165), Nr. 1, Seite 14-22.
- Bechmann, I.; Kwidzinski, E.; Kovac, A. D.; Simburger, E.; Horvath, T.; Gimsa, U.; Dirnagl, U.; Priller, J. und Nitsch, R. (2001): Turnover of rat brain perivascular cells, *Exp.Neurol.* (Band 168), Nr. 2, Seite 242-249.
- Becker, A. J.; McCulloch, E. A. und Till, J. E. (1963): Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells, *Nature* (Band 197), Seite 452-454.
- Becker, K. J. (2001): Targeting the central nervous system inflammatory response in ischemic stroke, *Curr.Opin.Neurol.* (Band 14), Nr. 3, Seite 349-353.
- Beray-Berthat, V.; Palmier, B.; Plotkine, M. und Margail, I. (2003): Neutrophils do not contribute to infarction, oxidative stress, and NO synthase activity in severe brain ischemia, *Exp.Neurol.* (Band 182), Nr. 2, Seite 446-454.
- Berlit, P. (2000): [Stroke. Options for primary prevention], *Nervenarzt* (Band 71), Nr. 4, Seite 231-236.
- Bowes, M. P.; Zivin, J. A. und Rothlein, R. (1993): Monoclonal antibody to the ICAM-1 adhesion site reduces neurological damage in a rabbit cerebral embolism stroke model, *Exp.Neurol.* (Band 119), Nr. 2, Seite 215-219.
- Brazelton, T. R.; Rossi, F. M.; Keshet, G. I. und Blau, H. M. (2000): From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice, *Science* (Band 290), Nr. 5497, Seite 1775-1779.
- Brownlee, M.; Vlassara, H.; Kooney, A.; Ulrich, P. und Cerami, A. (1986): Aminoguanidine prevents diabetes-induced arterial wall protein cross-linking, *Science* (Band 232), Nr. 4758, Seite 1629-1632.

- Buttery, L. D.; Springall, D. R.; Chester, A. H.; Evans, T. J.; Standfield, E. N.; Parums, D. V.; Yacoub, M. H. und Polak, J. M. (1996): Inducible nitric oxide synthase is present within human atherosclerotic lesions and promotes the formation and activity of peroxynitrite, *Lab Invest* (Band 75), Nr. 1, Seite 77-85.
- Buttini, M.; Sauter, A. und Boddeke, H. W. (1994): Induction of interleukin-1 beta mRNA after focal cerebral ischaemia in the rat, *Brain Res.Mol.Brain Res.* (Band 23), Nr. 1-2, Seite 126-134.
- Carmichael, S. T. (2005): Rodent models of focal stroke: size, mechanism, and purpose, *NeuroRx*. (Band 2), Nr. 3, Seite 396-409.
- Cash, D.; Beech, J. S.; Rayne, R. C.; Bath, P. M.; Meldrum, B. S. und Williams, S. C. (2001): Neuroprotective effect of aminoguanidine on transient focal ischaemia in the rat brain, *Brain Res.* (Band 905), Nr. 1-2, Seite 91-103.
- Chao, C. C.; Hu, S.; Molitor, T. W.; Shaskan, E. G. und Peterson, P. K. (1992): Activated microglia mediate neuronal cell injury via a nitric oxide mechanism, *J.Immunol.* (Band 149), Nr. 8, Seite 2736-2741.
- Chen, H.; Chopp, M.; Schultz, L.; Bodzin, G. und Garcia, J. H. (1993): Sequential neuronal and astrocytic changes after transient middle cerebral artery occlusion in the rat, *J.Neurol.Sci.* (Band 118), Nr. 2, Seite 109-6.
- Chen, H.; Chopp, M.; Zhang, R. L.; Bodzin, G.; Chen, Q.; Rusche, J. R. und Todd, R. F., III (1994): Anti-CD11b monoclonal antibody reduces ischemic cell damage after transient focal cerebral ischemia in rat, *Ann.Neurol.* (Band 35), Nr. 4, Seite 458-463.
- Chen, J.; Li, Y.; Wang, L.; Lu, M.; Zhang, X. und Chopp, M. (2001): Therapeutic benefit of intracerebral transplantation of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats, *J.Neurol.Sci.* (Band 189), Nr. 1-2, Seite 49-57.
- Chopp, M.; Li, Y.; Jiang, N.; Zhang, R. L. und Probst, J. (1996): Antibodies against adhesion molecules reduce apoptosis after transient middle cerebral artery occlusion in rat brain, *J.Cereb.Blood Flow Metab* (Band 16), Nr. 4, Seite 578-584.
- Clark, R. K.; Lee, E. V.; White, R. F.; Jonak, Z. L.; Feuerstein, G. Z. und Barone, F. C. (1994): Reperfusion following focal stroke hastens inflammation and resolution of ischemic injured tissue, *Brain Res.Bull.* (Band 35), Nr. 4, Seite 387-392.
- Clark, R. S.; Kochanek, P. M.; Schwarz, M. A.; Schiding, J. K.; Turner, D. S.; Chen, M.; Carlos, T. M. und Watkins, S. C. (1996): Inducible nitric oxide synthase expression in cerebrovascular smooth muscle and neutrophils after traumatic brain injury in immature rats, *Pediatr.Res.* (Band 39), Nr. 5, Seite 784-790.
- Clark, W. M.; Madden, K. P.; Rothlein, R. und Zivin, J. A. (1991): Reduction of central nervous system ischemic injury by monoclonal antibody to intercellular adhesion molecule, *J.Neurosurg.* (Band 75), Nr. 4, Seite 623-627.
- Cockroft, K. M.; Meistrell, M., III; Zimmerman, G. A.; Risucci, D.; Bloom, O.; Cerami, A. und Tracey, K. J. (1996): Cerebroprotective effects of aminoguanidine in a rodent model of stroke, *Stroke* (Band 27), Nr. 8, Seite 1393-1398.
- Cohen, M.; Mohanakumar, T.; Mackinnon, S. E. und Tung, T. H. (2006): Chimerism after vascularized limb versus bone marrow transplantation, *J.Reconstr.Microsurg.* (Band 22), Nr. 5, Seite 375-384.

- Coughlan, T.; Gibson, C. und Murphy, S. (2005): Modulatory effects of progesterone on inducible nitric oxide synthase expression in vivo and in vitro, *J.Neurochem.* (Band 93), Nr. 4, Seite 932-942.
- Davalos, A. (2005): Thrombolysis in acute ischemic stroke: successes, failures, and new hopes, *Cerebrovasc.Dis.* (Band 20 Suppl 2), Seite 135-139.
- Dawson, V. L.; Brahmabhatt, H. P.; Mong, J. A. und Dawson, T. M. (1994): Expression of inducible nitric oxide synthase causes delayed neurotoxicity in primary mixed neuronal-glial cortical cultures, *Neuropharmacology* (Band 33), Nr. 11, Seite 1425-1430.
- De, Caterina R.; Libby, P.; Peng, H. B.; Thannickal, V. J.; Rajavashisth, T. B.; Gimbrone, M. A., Jr.; Shin, W. S. und Liao, J. K. (1995): Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines, *J.Clin.Invest* (Band 96), Nr. 1, Seite 60-68.
- Ding, M.; Wong, J. L.; Rogers, N. E.; Ignarro, L. J. und Voskuhl, R. R. (1997): Gender differences of inducible nitric oxide production in SJL/J mice with experimental autoimmune encephalomyelitis, *J.Neuroimmunol.* (Band 77), Nr. 1, Seite 99-106.
- Dirnagl, U.; Iadecola, C. und Moskowitz, M. A. (1999): Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view, *Trends Neurosci.* (Band 22), Nr. 9, Seite 391-397.
- Donnou, S.; Fisson, S.; Mahe, D.; Montoni, A. und Couez, D. (2005): Identification of new CNS-resident macrophage subpopulation molecular markers for the discrimination with murine systemic macrophages, *J.Neuroimmunol.* (Band 169), Nr. 1-2, Seite 39-49.
- Douglas, S. A.; Vickery-Clark, L. M. und Ohlstein, E. H. (1994): Functional evidence that balloon angioplasty results in transient nitric oxide synthase induction, *Eur.J.Pharmacol.* (Band 255), Nr. 1-3, Seite 81-89.
- Eglitis, M. A. und Mezey, E. (1997): Hematopoietic cells differentiate into both microglia and macroglia in the brains of adult mice, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (Band 94), Nr. 8, Seite 4080-4085.
- Eglitis, M. A.; Dawson, D.; Park, K. W. und Mouradian, M. M. (1999): Targeting of marrow-derived astrocytes to the ischemic brain, *Neuroreport* (Band 10), Nr. 6, Seite 1289-1292.
- Emerich, D. F.; Dean, R. L., III und Bartus, R. T. (2002): The role of leukocytes following cerebral ischemia: pathogenic variable or bystander reaction to emerging infarct?, *Exp.Neurol.* (Band 173), Nr. 1, Seite 168-181.
- Eng, L. F.; Ghirnikar, R. S. und Lee, Y. L. (2000): Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000), *Neurochem.Res.* (Band 25), Nr. 9-10, Seite 1439-1451.
- Forster, C.; Clark, H. B.; Ross, M. E. und Iadecola, C. (1999): Inducible nitric oxide synthase expression in human cerebral infarcts, *Acta Neuropathol.(Berl)* (Band 97), Nr. 3, Seite 215-220.
- Fujii, M.; Hara, H.; Meng, W.; Vonsattel, J. P.; Huang, Z. und Moskowitz, M. A. (1997): Strain-related differences in susceptibility to transient forebrain ischemia in SV-129 and C57black/6 mice, *Stroke* (Band 28), Nr. 9, Seite 1805-1810.
- Galea, E.; Golanov, E. V.; Feinstein, D. L.; Kobylarz, K. A.; Glickstein, S. B. und Reis, D. J. (1998): Cerebellar stimulation reduces inducible nitric oxide synthase expression and protects brain from ischemia, *Am.J.Physiol* (Band 274), Nr. 6 Pt 2, Seite H2035-H2045.

- Garvey, E. P.; Oplinger, J. A.; Furfine, E. S.; Kiff, R. J.; Laszlo, F.; Whittle, B. J. und Knowles, R. G. (1997): 1400W is a slow, tight binding, and highly selective inhibitor of inducible nitric-oxide synthase in vitro and in vivo, *J.Biol.Chem.* (Band 272), Nr. 8, Seite 4959-4963.
- Gehrmann, J.; Bonnekoh, P.; Miyazawa, T.; Oshlies, U.; Dux, E.; Hossmann, K. A. und Kreutzberg, G. W. (1992): The microglial reaction in the rat hippocampus following global ischemia: immuno-electron microscopy, *Acta Neuropathol.(Berl)* (Band 84), Nr. 6, Seite 588-595.
- George, R. und Griffin, J. W. (1994): Delayed macrophage responses and myelin clearance during Wallerian degeneration in the central nervous system: the dorsal radiclotomy model, *Exp.Neurol.* (Band 129), Nr. 2, Seite 225-236.
- Gibson, C. L. und Murphy, S. P. (2004): Progesterone enhances functional recovery after middle cerebral artery occlusion in male mice, *J.Cereb.Blood Flow Metab* (Band 24), Nr. 7, Seite 805-813.
- Giulian, D.; Li, J.; Li, X.; George, J. und Rutecki, P. A. (1994): The impact of microglia-derived cytokines upon gliosis in the CNS, *Dev.Neurosci.* (Band 16), Nr. 3-4, Seite 128-136.
- Grandati, M.; Verrecchia, C.; Revaud, M.L.; Allix, M.; Boulu, R.G.; Plotkine, M. (1997): Calcium-independent NO-synthase activity and nitrites/nitrates production in transient focal cerebral ischemia in mice, *Br J Pharmacol* (Band 122), Seite 625-30.
- Gross, S. S. und Wolin, M. S. (1995): Nitric oxide: pathophysiological mechanisms, *Annu.Rev.Physiol* (Band 57), Seite 737-769.
- Hara, H.; Huang, P. L.; Panahian, N.; Fishman, M. C. und Moskowitz, M. A. (1996): Reduced brain edema and infarction volume in mice lacking the neuronal isoform of nitric oxide synthase after transient MCA occlusion, *J.Cereb.Blood Flow Metab* (Band 16), Nr. 4, Seite 605-611.
- Hess, D. C.; Hill, W. D.; Martin-Studdard, A.; Carothers, J.; Brailer, J. und Carroll, J. (2002): Blood into brain after stroke, *Trends Mol.Med.* (Band 8), Nr. 9, Seite 452-453.
- Hewett, S. J.; Csernansky, C. A. und Choi, D. W. (1994): Selective potentiation of NMDA-induced neuronal injury following induction of astrocytic iNOS, *Neuron* (Band 13), Nr. 2, Seite 487-494.
- Hickey, W. F. und Kimura, H. (1988): Perivascular microglial cells of the CNS are bone marrow-derived and present antigen in vivo, *Science* (Band 239), Nr. 4837, Seite 290-292.
- Hirabayashi, H.; Takizawa, S.; Fukuyama, N.; Nakazawa, H. und Shinohara, Y. (2000): Nitrotyrosine generation via inducible nitric oxide synthase in vascular wall in focal ischemia-reperfusion, *Brain Res.* (Band 852), Nr. 2, Seite 319-325.
- Ho, A. D. und Punzel, M. (2003): Hematopoietic stem cells: can old cells learn new tricks?, *J.Leukoc.Biol.* (Band 73), Nr. 5, Seite 547-555.
- Hossmann, K. A. (1994): Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia, *Ann.Neurol.* (Band 36), Nr. 4, Seite 557-565.

- Huang, Z.; Huang, P. L.; Panahian, N.; Dalkara, T.; Fishman, M. C. und Moskowitz, M. A. (1994): Effects of cerebral ischemia in mice deficient in neuronal nitric oxide synthase, *Science* (Band 265), Nr. 5180, Seite 1883-1885.
- Huang, Z.; Huang, P. L.; Ma, J.; Meng, W.; Ayata, C.; Fishman, M. C. und Moskowitz, M. A. (1996): Enlarged infarcts in endothelial nitric oxide synthase knockout mice are attenuated by nitro-L-arginine, *J.Cereb.Blood Flow Metab* (Band 16), Nr. 5, Seite 981-987.
- Iadecola, C.; Zhang, F.; Xu, S.; Casey, R. und Ross, M. E. (1995): Inducible nitric oxide synthase gene expression in brain following cerebral ischemia, *J.Cereb.Blood Flow Metab* (Band 15), Nr. 3, Seite 378-384.
- Iadecola, C.; Zhang, F. und Xu, X. (1995): Inhibition of inducible nitric oxide synthase ameliorates cerebral ischemic damage, *Am.J.Physiol* (Band 268), Nr. 1 Pt 2, Seite R286-R292.
- Iadecola, C.; Xu, X.; Zhang, F.; el-Fakahany, E. E. und Ross, M. E. (1995): Marked induction of calcium-independent nitric oxide synthase activity after focal cerebral ischemia, *J.Cereb.Blood Flow Metab* (Band 15), Nr. 1, Seite 52-59.
- Iadecola, C.; Zhang, F.; Casey, R.; Clark, H. B. und Ross, M. E. (1996): Inducible nitric oxide synthase gene expression in vascular cells after transient focal cerebral ischemia, *Stroke* (Band 27), Nr. 8, Seite 1373-1380.
- Iadecola, C.; Zhang, F.; Casey, R.; Nagayama, M. und Ross, M. E. (1997): Delayed reduction of ischemic brain injury and neurological deficits in mice lacking the inducible nitric oxide synthase gene, *J.Neurosci.* (Band 17), Nr. 23, Seite 9157-9164.
- Iadecola, C. (1997): Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury, *Trends Neurosci.* (Band 20), Nr. 3, Seite 132-139.
- Iadecola, C.; Salkowski, C. A.; Zhang, F.; Aber, T.; Nagayama, M.; Vogel, S. N. und Ross, M. E. (1999): The transcription factor interferon regulatory factor 1 is expressed after cerebral ischemia and contributes to ischemic brain injury, *J.Exp.Med.* (Band 189), Nr. 4, Seite 719-727.
- Imai, Y.; Iбата, I.; Ito, D.; Ohsawa, K. und Kohsaka, S. (1996): A novel gene *iba1* in the major histocompatibility complex class III region encoding an EF hand protein expressed in a monocytic lineage, *Biochem.Biophys.Res.Commun.* (Band 224), Nr. 3, Seite 855-862.
- Joly, G. A.; Schini, V. B. und Vanhoutte, P. M. (1992): Balloon injury induces nitric oxide synthase activity in rat carotid arteries, *J.Cardiovasc.Pharmacol.* (Band 20 Suppl 12), Seite S151-S154.
- Kennedy, D. W. und Abkowitz, J. L. (1997): Kinetics of central nervous system microglial and macrophage engraftment: analysis using a transgenic bone marrow transplantation model, *Blood* (Band 90), Nr. 3, Seite 986-993.
- Khan, B. V.; Harrison, D. G.; Olbrych, M. T.; Alexander, R. W. und Medford, R. M. (1996): Nitric oxide regulates vascular cell adhesion molecule 1 gene expression and redox-sensitive transcriptional events in human vascular endothelial cells, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (Band 93), Nr. 17, Seite 9114-9119.
- Kitagawa, K.; Matsumoto, M.; Mabuchi, T.; Yagita, Y.; Ohtsuki, T.; Hori, M. und Yanagihara, T. (1998): Deficiency of intercellular adhesion molecule 1 attenuates microcirculatory



- disturbance and infarction size in focal cerebral ischemia, *J.Cereb.Blood Flow Metab* (Band 18), Nr. 12, Seite 1336-1345.
- Kopen, G. C.; Prockop, D. J. und Phinney, D. G. (1999): Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (Band 96), Nr. 19, Seite 10711-10716.
- Krall, W. J.; Challita, P. M.; Perlmutter, L. S.; Skelton, D. C. und Kohn, D. B. (1994): Cells expressing human glucocerebrosidase from a retroviral vector repopulate macrophages and central nervous system microglia after murine bone marrow transplantation, *Blood* (Band 83), Nr. 9, Seite 2737-2748.
- Kreutzberg, G. W. (1996): Microglia: a sensor for pathological events in the CNS, *Trends Neurosci.* (Band 19), Nr. 8, Seite 312-318.
- Lagasse, E.; Connors, H.; Al-Dhalimy, M.; Reitsma, M.; Dohse, M.; Osborne, L.; Wang, X.; Finegold, M.; Weissman, I. L. und Grompe, M. (2000): Purified hematopoietic stem cells can differentiate into hepatocytes in vivo, *Nat.Med.* (Band 6), Nr. 11, Seite 1229-1234.
- Lama, V. N. und Phan, S. H. (2006): The extrapulmonary origin of fibroblasts: stem/progenitor cells and beyond, *Proc.Am.Thorac.Soc.* (Band 3), Nr. 4, Seite 373-376.
- Lambertsen, K. L.; Gregersen, R. und Finsen, B. (2002): Microglial-macrophage synthesis of tumor necrosis factor after focal cerebral ischemia in mice is strain dependent, *J.Cereb.Blood Flow Metab* (Band 22), Nr. 7, Seite 785-797.
- Lassmann, H.; Schmied, M.; Vass, K. und Hickey, W. F. (1993): Bone marrow derived elements and resident microglia in brain inflammation, *Glia* (Band 7), Nr. 1, Seite 19-24.
- Laubach, V. E.; Shesely, E. G.; Smithies, O. und Sherman, P. A. (1995): Mice lacking inducible nitric oxide synthase are not resistant to lipopolysaccharide-induced death, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* (Band 92), Nr. 23, Seite 10688-10692.
- Lerouet, D.; Beray-Berthet, V.; Palmier, B.; Plotkine, M. und Margaill, I. (2002): Changes in oxidative stress, iNOS activity and neutrophil infiltration in severe transient focal cerebral ischemia in rats, *Brain Res.* (Band 958), Nr. 1, Seite 166-175.
- Lerouet, D.; Jafarian-Tehrani, M.; Louin, G.; Palmier, B.; Bonnefont-Rousselot, D.; Plotkine, M. und Margaill, I. (2005): Lack of iNOS induction in a severe model of transient focal cerebral ischemia in rats, *Exp.Neurol.* (Band 195), Nr. 1, Seite 218-228.
- Li, Y.; Chopp, M.; Zhang, Z. G. und Zhang, R. L. (1995): Expression of glial fibrillary acidic protein in areas of focal cerebral ischemia accompanies neuronal expression of 72-kDa heat shock protein, *J.Neurol.Sci.* (Band 128), Nr. 2, Seite 134-142.
- Lipton, S. A. (1993): Prospects for clinically tolerated NMDA antagonists: open-channel blockers and alternative redox states of nitric oxide, *Trends Neurosci.* (Band 16), Nr. 12, Seite 527-532.
- Loihl, A. K.; Asensio, V.; Campbell, I. L. und Murphy, S. (1999): Expression of nitric oxide synthase (NOS)-2 following permanent focal ischemia and the role of nitric oxide in infarct generation in male, female and NOS-2 gene-deficient mice, *Brain Res.* (Band 830), Nr. 1, Seite 155-164.
- MacMicking, J. D.; Nathan, C.; Hom, G.; Chartrain, N.; Fletcher, D. S.; Trumbauer, M.; Stevens, K.; Xie, Q. W.; Sokol, K.; Hutchinson, N. und . (1995): Altered responses to

- bacterial infection and endotoxic shock in mice lacking inducible nitric oxide synthase, *Cell* (Band 81), Nr. 4, Seite 641-650.
- Maeda, K.; Hata, R. und Hossmann, K. A. (1999): Regional metabolic disturbances and cerebrovascular anatomy after permanent middle cerebral artery occlusion in C57black/6 and SV129 mice, *Neurobiol.Dis.* (Band 6), Nr. 2, Seite 101-108.
- Markowitz, D.; Goff, S. und Bank, A. (1988): A safe packaging line for gene transfer: separating viral genes on two different plasmids, *J.Virol.* (Band 62), Nr. 4, Seite 1120-1124.
- Matsuo, Y.; Onodera, H.; Shiga, Y.; Nakamura, M.; Ninomiya, M.; Kihara, T. und Kogure, K. (1994): Correlation between myeloperoxidase-quantified neutrophil accumulation and ischemic brain injury in the rat. Effects of neutrophil depletion, *Stroke* (Band 25), Nr. 7, Seite 1469-1475.
- Mezey, E. und Chandross, K. J. (2000): Bone marrow: a possible alternative source of cells in the adult nervous system, *Eur.J.Pharmacol.* (Band 405), Nr. 1-3, Seite 297-302.
- Mori, E.; del Zoppo, G. J.; Chambers, J. D.; Copeland, B. R. und Arfors, K. E. (1992): Inhibition of polymorphonuclear leukocyte adherence suppresses no-reflow after focal cerebral ischemia in baboons, *Stroke* (Band 23), Nr. 5, Seite 712-718.
- Morioka, T.; Kalehua, A. N. und Streit, W. J. (1992): Progressive expression of immunomolecules on microglial cells in rat dorsal hippocampus following transient forebrain ischemia, *Acta Neuropathol.(Berl)* (Band 83), Nr. 2, Seite 149-157.
- Moro, M. A.; Cardenas, A.; Hurtado, O.; Leza, J. C. und Lizasoain, I. (2004): Role of nitric oxide after brain ischaemia, *Cell Calcium* (Band 36), Nr. 3-4, Seite 265-275.
- Nagafuji, T.; Sugiyama, M.; Muto, A.; Makino, T.; Miyauchi, T. und Nabata, H. (1995): The neuroprotective effect of a potent and selective inhibitor of type I NOS (L-MIN) in a rat model of focal cerebral ischaemia, *Neuroreport* (Band 6), Nr. 11, Seite 1541-1545.
- Nagayama, M.; Aber, T.; Nagayama, T.; Ross, M. E. und Iadecola, C. (1999): Age-dependent increase in ischemic brain injury in wild-type mice and in mice lacking the inducible nitric oxide synthase gene, *J.Cereb.Blood Flow Metab* (Band 19), Nr. 6, Seite 661-666.
- Nakano, K.; Migita, M.; Mochizuki, H. und Shimada, T. (2001): Differentiation of transplanted bone marrow cells in the adult mouse brain, *Transplantation* (Band 71), Nr. 12, Seite 1735-1740.
- Nathan, C. (1997): Inducible nitric oxide synthase: what difference does it make?, *J.Clin.Invest* (Band 100), Nr. 10, Seite 2417-2423.
- Orlic, D.; Kajstura, J.; Chimenti, S.; Jakoniuk, I.; Anderson, S. M.; Li, B.; Pickel, J.; McKay, R.; Nadal-Ginard, B.; Bodine, D. M.; Leri, A. und Anversa, P. (2001): Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium, *Nature* (Band 410), Nr. 6829, Seite 701-705.
- Park, E. M.; Cho, S.; Frys, K. A.; Glickstein, S. B.; Zhou, P.; Anrather, J.; Ross, M. E. und Iadecola, C. (2006): Inducible nitric oxide synthase contributes to gender differences in ischemic brain injury, *J.Cereb.Blood Flow Metab* (Band 26), Nr. 3, Seite 392-401.
- Parmentier, S.; Bohme, G. A.; Lerouet, D.; Damour, D.; Stutzmann, J. M.; Margaiil, I. und Plotkine, M. (1999): Selective inhibition of inducible nitric oxide synthase prevents ischaemic brain injury, *Br.J.Pharmacol.* (Band 127), Nr. 2, Seite 546-552.

- Peng, H. B.; Spiecker, M. und Liao, J. K. (1998): Inducible nitric oxide: an autoregulatory feedback inhibitor of vascular inflammation, *J.Immunol.* (Band 161), Nr. 4, Seite 1970-1976.
- Perry, V. H.; Andersson, P. B. und Gordon, S. (1993): Macrophages and inflammation in the central nervous system, *Trends Neurosci.* (Band 16), Nr. 7, Seite 268-273.
- Persons, D. A.; Allay, J. A.; Allay, E. R.; Smeyne, R. J.; Ashmun, R. A.; Sorrentino, B. P. und Nienhuis, A. W. (1997): Retroviral-mediated transfer of the green fluorescent protein gene into murine hematopoietic cells facilitates scoring and selection of transduced progenitors in vitro and identification of genetically modified cells in vivo, *Blood* (Band 90), Nr. 5, Seite 1777-1786.
- Poeck, K.; Hacke, W.: *Neurologie*, Springer Verlag, 11. Auflage.
- Prestigiacomo, C. J.; Kim, S. C.; Connolly, E. S., Jr.; Liao, H.; Yan, S. F. und Pinsky, D. J. (1999): CD18-mediated neutrophil recruitment contributes to the pathogenesis of reperfused but not nonreperfused stroke, *Stroke* (Band 30), Nr. 5, Seite 1110-1117.
- Priller, J.; Flugel, A.; Wehner, T.; Boentert, M.; Haas, C. A.; Prinz, M.; Fernandez-Klett, F.; Prass, K.; Bechmann, I.; de Boer, B. A.; Frotscher, M.; Kreutzberg, G. W.; Persons, D. A. und Dirnagl, U. (2001): Targeting gene-modified hematopoietic cells to the central nervous system: use of green fluorescent protein uncovers microglial engraftment, *Nat.Med.* (Band 7), Nr. 12, Seite 1356-1361.
- Priller, J.; Persons, D. A.; Klett, F. F.; Kempermann, G.; Kreutzberg, G. W. und Dirnagl, U. (2001): Neogenesis of cerebellar Purkinje neurons from gene-marked bone marrow cells in vivo, *J.Cell Biol.* (Band 155), Nr. 5, Seite 733-738.
- Pruess, H.; Ghaeni, L.; Milosevic, M.; Muselmann, C.; Prass, K.; Freyer, D.; Dirnagl, U.; Meisel, A.; Priller, J. (2006): Role of iNOS after murine transient cerebral ischemia; zur Veröffentlichung eingereicht.
- Radomski, M. W.; Palmer, R. M. und Moncada, S. (1990): Characterization of the L-arginine:nitric oxide pathway in human platelets, *Br.J.Pharmacol.* (Band 101), Nr. 2, Seite 325-328. Ridet, J.L.; Malhotra, S.K.; Privat, A.; Gage, F.H.; (1997): Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function, *Trends Neuroscience* (Band 20), Seite 570-577.
- Ridet, J.L.; Malhotra, S.K.; Privat, A.; Gage, F.H.; (1997): Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function, *Trends Neuroscience* (Band 20), Seite 570-577.
- Samdani, A. F.; Dawson, T. M. und Dawson, V. L. (1997): Nitric oxide synthase in models of focal ischemia, *Stroke* (Band 28), Nr. 6, Seite 1283-1288.
- Schellinger, P. D.; Fiebach, J.; Ringleb, P. A.; Jansen, O. und Hacke, W. (2001): [Thrombolysis in cerebral ischemia. An overview], *Nervenarzt* (Band 72), Nr. 8, Seite 590-599.
- Schilling, M.; Besselmann, M.; Leonhard, C.; Mueller, M.; Ringelstein, E. B. und Kiefer, R. (2003): Microglial activation precedes and predominates over macrophage infiltration in transient focal cerebral ischemia: a study in green fluorescent protein transgenic bone marrow chimeric mice, *Exp.Neurol.* (Band 183), Nr. 1, Seite 25-33.
- Schilling, M.; Besselmann, M.; Muller, M.; Strecker, J. K.; Ringelstein, E. B. und Kiefer, R. (2005): Predominant phagocytic activity of resident microglia over hematogenous macrophages following transient focal cerebral ischemia: an investigation using green

- fluorescent protein transgenic bone marrow chimeric mice, *Exp.Neurol.* (Band 196), Nr. 2, Seite 290-297.
- Schroeter, M.; Jander, S.; Witte, O. W. und Stoll, G. (1994): Local immune responses in the rat cerebral cortex after middle cerebral artery occlusion, *J.Neuroimmunol.* (Band 55), Nr. 2, Seite 195-203.
- Schroeter, M.; Schiene, K.; Kraemer, M.; Hagemann, G.; Weigel, H.; Eysel, U. T.; Witte, O. W. und Stoll, G. (1995): Astroglial responses in photochemically induced focal ischemia of the rat cortex, *Exp.Brain Res.* (Band 106), Nr. 1, Seite 1-6.
- Schroeter, M.; Kury, P. und Jander, S. (2003): Inflammatory gene expression in focal cortical brain ischemia: differences between rats and mice, *Brain Res.Mol.Brain Res.* (Band 117), Nr. 1, Seite 1-7.
- Shimomura, O.; Johnson, F. H. und Saiga, Y. (1962): Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*, *J.Cell Comp Physiol* (Band 59), Seite 223-239.
- Siminovitch, L.; McCulloch, E. A. und Till, J. E. (1963): The distribution of colony-forming cells among spleen colonies, *J.Cell Physiol* (Band 62), Seite 327-336.
- Sinz, E. H.; Kochanek, P. M.; Dixon, C. E.; Clark, R. S.; Carcillo, J. A.; Schiding, J. K.; Chen, M.; Wisniewski, S. R.; Carlos, T. M.; Williams, D.; DeKosky, S. T.; Watkins, S. C.; Marion, D. W. und Billiar, T. R. (1999): Inducible nitric oxide synthase is an endogenous neuroprotectant after traumatic brain injury in rats and mice, *J.Clin.Invest* (Band 104), Nr. 5, Seite 647-656.
- Spangrude, G. J. (1994): Biological and clinical aspects of hematopoietic stem cells, *Annu.Rev.Med.* (Band 45), Seite 93-104.
- Suzuki, M.; Tabuchi, M.; Ikeda, M. und Tomita, T. (2002): Concurrent formation of peroxynitrite with the expression of inducible nitric oxide synthase in the brain during middle cerebral artery occlusion and reperfusion in rats, *Brain Res.* (Band 951), Nr. 1, Seite 113-120.
- Takizawa, S.; Aratani, Y.; Fukuyama, N.; Maeda, N.; Hirabayashi, H.; Koyama, H.; Shinohara, Y. und Nakazawa, H. (2002): Deficiency of myeloperoxidase increases infarct volume and nitrotyrosine formation in mouse brain, *J.Cereb.Blood Flow Metab* (Band 22), Nr. 1, Seite 50-54.
- Tsao, P. S.; Wang, B.; Buitrago, R.; Shyy, J. Y. und Cooke, J. P. (1997): Nitric oxide regulates monocyte chemotactic protein-1, *Circulation* (Band 96), Nr. 3, Seite 934-940.
- Tsien, R. Y. (1998): The green fluorescent protein, *Annu.Rev.Biochem.* (Band 67), Seite 509-544.
- Van, Roessel P. und Brand, A. H. (2002): Imaging into the future: visualizing gene expression and protein interactions with fluorescent proteins, *Nat.Cell Biol.* (Band 4), Nr. 1, Seite E15-E20.
- Warlow, C. und Wardlaw, J. (2003): Therapeutic thrombolysis for acute ischaemic stroke, *BMJ* (Band 326), Nr. 7383, Seite 233-234.
- Wehner, T.; Bontert, M.; Eyupoglu, I.; Prass, K.; Prinz, M.; Klett, F. F.; Heinze, M.; Bechmann, I.; Nitsch, R.; Kirchhoff, F.; Kettenmann, H.; Dirnagl, U. und Priller, J. (2003): Bone marrow-derived cells expressing green fluorescent protein under the control of the

- glial fibrillary acidic protein promoter do not differentiate into astrocytes in vitro and in vivo, *J.Neurosci.* (Band 23), Nr. 12, Seite 5004-5011.
- Willmot, M.; Gibson, C.; Gray, L.; Murphy, S. und Bath, P. (2005): Nitric oxide synthase inhibitors in experimental ischemic stroke and their effects on infarct size and cerebral blood flow: a systematic review, *Free Radic.Biol.Med.* (Band 39), Nr. 3, Seite 412-425.
- Winquist, R. J. und Kerr, S. (1997): Cerebral ischemia-reperfusion injury and adhesion, *Neurology* (Band 49), Nr. 5 Suppl 4, Seite S23-S26.
- Yang, G.; Kitagawa, K.; Matsushita, K.; Mabuchi, T.; Yagita, Y.; Yanagihara, T. und Matsumoto, M. (1997): C57BL/6 strain is most susceptible to cerebral ischemia following bilateral common carotid occlusion among seven mouse strains: selective neuronal death in the murine transient forebrain ischemia, *Brain Res.* (Band 752), Nr. 1-2, Seite 209-218.
- Yoshida, T.; Waeber, C.; Huang, Z. und Moskowitz, M. A. (1995): Induction of nitric oxide synthase activity in rodent brain following middle cerebral artery occlusion, *Neurosci.Lett.* (Band 194), Nr. 3, Seite 214-218.
- Yu, A. C. und Lau, L. T. (2000): Expression of interleukin-1 alpha, tumor necrosis factor alpha and interleukin-6 genes in astrocytes under ischemic injury, *Neurochem.Int.* (Band 36), Nr. 4-5, Seite 369-377.
- Yu, L.; Huang, Z.; Mariani, J.; Wang, Y.; Moskowitz, M. und Chen, J. F. (2004): Selective inactivation or reconstitution of adenosine A2A receptors in bone marrow cells reveals their significant contribution to the development of ischemic brain injury, *Nat.Med.* (Band 10), Nr. 10, Seite 1081-1087.
- Zhang, F.; Casey, R. M.; Ross, M. E. und Iadecola, C. (1996): Aminoguanidine ameliorates and L-arginine worsens brain damage from intraluminal middle cerebral artery occlusion, *Stroke* (Band 27), Nr. 2, Seite 317-323.
- Zhang, F. und Iadecola, C. (1998): Temporal characteristics of the protective effect of aminoguanidine on cerebral ischemic damage, *Brain Res.* (Band 802), Nr. 1-2, Seite 104-110.
- Zhang, Z. G.; Reif, D.; Macdonald, J.; Tang, W. X.; Kamp, D. K.; Gentile, R. J.; Shakespeare, W. C.; Murray, R. J. und Chopp, M. (1996): ARL 17477, a potent and selective neuronal NOS inhibitor decreases infarct volume after transient middle cerebral artery occlusion in rats, *J.Cereb.Blood Flow Metab* (Band 16), Nr. 4, Seite 599-604.
- Zhu, D. Y.; Deng, Q.; Yao, H. H.; Wang, D. C.; Deng, Y. und Liu, G. Q. (2002): Inducible nitric oxide synthase expression in the ischemic core and penumbra after transient focal cerebral ischemia in mice, *Life Sci.* (Band 71), Nr. 17, Seite 1985-1996.
- Zhu, D. Y.; Liu, S. H.; Sun, H. S. und Lu, Y. M. (2003): Expression of inducible nitric oxide synthase after focal cerebral ischemia stimulates neurogenesis in the adult rodent dentate gyrus, *J.Neurosci.* (Band 23), Nr. 1, Seite 223-229.

## Publikationen

Aus dieser Arbeit sind folgende Publikationen hervorgegangen:

### Originalarbeiten:

**Inducible nitric oxide synthase does not mediate brain damage after transient focal cerebral ischemia in mice.**

Pruess H, Prass K, **Ghaeni L**, Milosevic M, Muselmann C, Freyer D, Royl G, Reuter U, Baeva N, Dirnagl U, Meisel A, Priller, J; *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* (2008); 28: 526-539.

**Estrogen increases bone marrow-derived endothelial progenitor cell production and diminishes neointima formation.**

Strehlow K, Werner N, Berweiler J, Link A, Dirnagl U, Priller J, Laufs K, **Ghaeni L**, Milosevic M, Bohm M, Nickenig G; *Circulation* (2003); 107(24): 3059-65.

### Kongressbeiträge

**Role of iNOS in leukocytes and resident glia after focal cerebral ischemia.**

Priller J, **Ghaeni L**, Milosevic M, Prass K, Dirnagl U  
*Meeting of the Society of Neuroscience* (2003), Posterbeitrag.

**Role of iNOS in leukocytes and resident glia after focal cerebral ischemia.**

**Ghaeni L**, Milosevic M, Priller J, Prass K, Dirnagl U  
*European Students Conference, Charité Berlin* (2003), Vortrag.

## **Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die Dissertation selbst und ohne unzulässige Hilfe Anderer verfasst habe. Sie stellt keine Kopie anderer Arbeiten dar. Soweit fremde Abbildungen zur Illustration kopiert wurden, sind die Quellen angegeben, wie auch bei sonst verwendeten Hilfsmitteln und Literaturangaben.

Berlin im Juni 2008

Leyli Ghaeni



## Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. J. Priller für die Überlassung des Themas, die hervorragende Betreuung und seine stetige persönliche Unterstützung und Motivation, auch während kritischer Diskussionen und Fragestellungen.

Herrn Prof. Dr. med. U. Dirnagl möchte ich für die ausgezeichneten Arbeitsmöglichkeiten und die angenehme Arbeitsatmosphäre in der Experimentellen Neurologie danken.

Für unsere gute Zusammenarbeit und viele Stunden voller Freud und Leid möchte ich meinem Mitdoktoranden und guten Freund Milan Milosevic danken. Er hat großen Anteil am Gelingen dieser Arbeit gehabt.

Für die Durchführung der Ischämien und seinen fachlichen Rat bei der Infarktauswertung möchte ich Herrn Dr. med. K. Prass herzlich danken. Ebenso danke ich Frau R. Gusinda und Frau Dr. rer. nat. D. Freyer für die kompetente Einarbeitung in die Zellkulturarbeit. Herr Dr. med. T. Kaiser war mir eine große Hilfe bei der Durchführung und Auswertung der FACS-Analyse, wofür ich ihm dankbar bin. PD Dr. med. U. Reuter danke ich für die Durchführung der Meningitis-Stimulationen.

Dr. med. H. Pruess gilt mein spezieller Dank. Er hat mir mit viel Engagement, vor allem beim immunhistologischen Teil dieser Arbeit, mit Rat und Tat zur Seite gestanden. Die fachlichen Diskussionen mit ihm haben mir zahlreiche Anregungen gegeben.

Francisco Fernando-Klett möchte ich ganz herzlich für die hervorragende Einarbeitung in die Methodik dieser Arbeit sowie für seine kleinen Tipps und Tricks im Umgang mit den Tieren danken.

Sonja Blumenau und Anna Hegele danke ich für die große Hilfe und für die nette und persönliche Zusammenarbeit bei der Ausführung des experimentellen Teils dieser Arbeit.

Gesa Jeuthe war mir bei den letzten Korrekturschritten behilflich, wofür ich ihr sehr dankbar bin.

Lars Neeb bin ich für seine unendliche Geduld und große Unterstützung während der Entstehung dieser Arbeit dankbar, für unermüdliche Korrekturen und vieles mehr.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich immer unterstützt und gefördert haben. Ohne sie wäre diese Arbeit nie zustande gekommen.