

Aus der Klinik für Neurochirurgie mit Arbeitsbereich Pädiatrische
Neurochirurgie der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin
Berlin

DISSERTATION

**Der Effekt des Interleukin 6 auf Struktur und Permeabilität
der Blut-Hirn-Schranke im Rahmen der sekundären
Hirnschädigung nach Subarachnoidalblutung**

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Alexa Charlotte Luise Fries

aus Limburg a.d. Lahn

Datum der Promotion: 04.06.2021

Vorwort

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden am 10. Februar 2018 im Journal Translational Stroke Research unter dem Titel „Interleukin 6-Mediated Endothelial Barrier Disturbances Can Be Attenuated by Blockade of the IL6 Receptor Expressed in Brain Microvascular Endothelial Cells“ veröffentlicht. Die Publikation beinhaltet Daten des IL6-vermittelten Anstiegs der Blut-Hirn-Schranken-Permeabilität, namentlich der Abbildungen 7 und 9, die in dieser Monographie erneut publiziert werden.

Des Weiteren wurden Teilergebnisse der Arbeit am 18. Juni 2018 im German Medical Science GMS Publishing House unter dem Titel „The role of interleukin 6 for the molecular passage through the blood-brain barrier and endothelial-pericyte coverage in secondary brain injury after subarachnoid hemorrhage“ veröffentlicht. Die Publikation beinhaltet Daten der IL6-Genexpression, der Evans Blue- und Fitc Dextran-Passage, der Expression von Claudin-5, Occludin, TNF α und IL1 β sowie der perizytären Apoptose, namentlich der Abbildungen 6, 9, 10B, 13, 14, 17, 18, 23A, B, die in dieser Monographie erneut publiziert werden.

Des Weiteren wurden Teilergebnisse dieser Arbeit am 27. Oktober 2017 im Journal Fluids and Barriers of the CNS unter dem Titel „The role of IL6 in the dysregulation of the neurovascular unit and secondary brain injury after SAH“ veröffentlicht. Die Publikation beinhaltet Daten der IL6-Genexpression, der EB-Passage, der Occludin-, Claudin-5-, TNF α -, IL1 β -, MMP9-Genexpression sowie Daten der Collagen-Reduktion und perizytären Apoptose, namentlich der Abbildungen 6, 9, 13, 14, 17, 18, 19, 20A, B, 23A, B, die in dieser Monographie erneut publiziert werden.

Inhalt

1	Abkürzungsverzeichnis	5
2	Abbildungsverzeichnis	8
3	Tabellenverzeichnis	9
4	Abstrakt in deutscher Sprache	10
5	Abstract in english language	12
6	Einleitung	14
6.1	SAB: klinische Hintergründe.....	14
6.2	Blut-Hirn-Schranke.....	16
6.2.1	Funktion	16
6.2.2	Aufbau	16
6.2.3	BHS bei SAB.....	21
6.3	Neuroinflammation bei SAB	22
6.4	Interleukin 6	23
6.5	Zielsetzung	24
7	Material und Methoden	25
7.1	Materialien	25
7.2	Methodik	29
7.2.1	Versuchstiergruppe und SAB im Mausmodell	29
7.2.2	Magnetresonanztomographie.....	30
7.2.3	Extravasation molekularer Tracer.....	31
7.2.4	Bestimmung des Hirnwassergehalts	31
7.2.5	Anfertigung von Kryoschnitten.....	32
7.2.6	HE-Färbung	32
7.2.7	Immunhistochemische Analyse	32
7.2.8	Quantitative Bildanalyse.....	33
7.2.9	Analyse der Extravasation von Tracermolekülen in Homogenaten.....	33
7.2.10	Kapillarisolierung und Endothelzellpräparation.....	33
7.2.11	TUNEL-Färbung.....	34
7.2.12	Extraktion von Gesamt-RNA aus Kapillaren	35
7.2.13	Konzentrationsbestimmung von RNA.....	35
7.2.14	Reverse Transkription	35
7.2.15	Quantitative real-time PCR.....	36
7.2.16	Statistische Auswertung.....	36

8	Ergebnisse	37
8.1	Nachweis der SAB mittels HE-Färbung und MRT	37
8.2	Zeitabhängige Hochregulation der IL6-Genexpression im BHS-Endothel nach SAB.....	38
8.3	Dynamik des BHS-Zusammenbruchs	40
8.3.1	Größte BHS-Öffnung an Tag 4 nach SAB	40
8.3.2	IL6-vermittelter Anstieg der BHS-Permeabilität nach SAB.....	42
8.4	Einfluss einer IL6-Defizienz auf den Durchtritt fluoreszierender Tracer	43
8.4.1	IL6-Defizienz verhindert die Passage von EB 70 kDa	43
8.4.2	IL6-Defizienz kann die Passage von FD 4 kDa nicht unterbinden	44
8.5	IL6-Defizienz reduziert die Ausbildung eines Hirnödems nach SAB	46
8.6	Einfluss von IL6 auf die endotheliale Expression von Zell-Zell-Kontakten	48
8.6.1	Endotheliale Expression von Claudin-5	48
8.6.2	Endotheliale Expression von Occludin	49
8.6.3	Rekonstitution von Claudin-5 in IL6 KOs nach SAB	50
8.6.4	Keine signifikante Rekonstitution von Occludin in IL6 KOs nach SAB	51
8.7	Einfluss von IL6 auf die intravaskuläre Inflammation	53
8.7.1	IL6-Defizienz geht einher mit verminderter TNF α -Expression.....	53
8.7.2	IL6-Defizienz unterbindet Überexpression von IL1 β	54
8.8	SAB-induzierte Degradation von Extrazellulärer Matrix	55
8.8.1	IL6-vermittelte MMP9 Hochregulation	55
8.8.2	SAB-induzierte Collagen IV - Reduktion	56
8.9	SAB-induzierte Perizyten-Dissoziation	58
8.10	SAB-induzierte perizytäre Apoptose.....	59
9	Diskussion	61
9.1	Einfluss einer SAB unter IL6-Defizienz auf zelluläre und subzelluläre Strukturen der BHS 61	
9.2	Evaluation der BHS-Permeabilität nach SAB	62
9.3	Einfluss einer SAB unter IL6-Defizienz auf intravaskuläre Inflammation und Komponenten der NVU	66
9.4	IL6 im klinischen Kontext	68
9.5	IL6 als therapeutisches Target	70
10	Literaturverzeichnis	75
11	Eidesstattliche Versicherung	81
12	Anteilsklärung an etwaigen erfolgten Publikationen	82
13	Lebenslauf	85

14	Publikationsliste	89
15	Danksagung.....	90

1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACC	Arteria carotis communis
ACE	Arteria carotis externa
ACI	Arteria carotis interna
AJ	Adherens Junction
ANOVA	Analysis of variance
BHS	Blut-Hirn-Schranke
BM	Basalmembran
CBF	zerebraler Blutfluss
cCT	zerebrale Computertomographie
Cy	Cyanin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DSA	Digitale Subtraktionsangiographie
EB	Evans Blue
EZM	extrazelluläre Matrix
FD	Fluorescein Isothiocyanate-Dextran
FEM	Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GP	Glykoprotein
HPF	High-power field/Hauptsgesichtsfeld
HWG	Hirnwassergehalt

ICAM	Intercellular Adhesion Molecule
ICP	intrakranieller Druck
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
IL6R	IL6-Rezeptor
JAM	Junction adhesion molecule
KO	Knock out
LPS	Lipopolysaccharide
MMP	Matrixmetalloproteinase
MRP	Multidrug resistance-related protein
MRT	Magnetresonanztomographie
MW	Molekulargewicht
NVU	Neurovaskuläre Einheit
PBS	Phosphate-buffered Saline
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PECAM	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule
PFA	Paraformaldehyd
Pgp	P-Glykoprotein
qPCR	quantitative Polymerasekettenreaktion
rIL6	rekombinantes IL6
ROI	region of interest
RT	Raumtemperatur
SAB	Subarachnoidalblutung
TdT	Terminale Desoxyribonukleotidyltransferase
TJ	Tight Junction

TNF	Tumornekrosefaktor
TUNEL	terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling
VE-Cadherin	Vascular Endothelial Cadherin
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WT	Wildtyp
ZNS	zentrales Nervensystem
ZO	Zona occludens

2 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1** Aufbauschema der neurovaskulären Unit.
- Abbildung 2** Junktionaler Komplex benachbarter Endothelzellen.
- Abbildung 3** Makroskopischer und mikroskopischer Nachweis der stattgehabten SAB.
- Abbildung 4** Bildmorphologische Darstellung der SAB mittels MRT.
- Abbildung 5** IHC-Färbung von Hirnkapillaren mit kolokalisiertem IL6.
- Abbildung 6** Zerebrovaskuläre Expression von IL6 nach SAB.
- Abbildung 7** Extravasation von EB nach SAB.
- Abbildung 8** EB-Extravasation nach SAB in WT und IL6 KO-Tieren.
- Abbildung 9** Quantifizierung der EB-Extravasation in Hirnhomogenaten.
- Abbildung 10** FD-Extravasation nach SAB in WT und IL6 KO-Tieren.
- Abbildung 11** MRT-Aufnahmen an Tag 0 und Tag 4 nach SAB.
- Abbildung 12** Hirnwassergehalt in WT und IL6 KOs nach SAB.
- Abbildung 13** Zerebrovaskuläre Expression von Claudin-5 nach SAB.
- Abbildung 14** Zerebrovaskuläre Expression von Occludin nach SAB.
- Abbildung 15** Verhältnis des TJ-Proteins Claudin-5 zum ubiquitären Blutgefäßmarker PECAM1 nach SAB.
- Abbildung 16** Verhältnis des TJ-Proteins Occludin zum ubiquitären Blutgefäßmarker PECAM1 nach SAB.
- Abbildung 17** Zerebrovaskuläre TNF α -Expression nach SAB.
- Abbildung 18** Zerebrovaskuläre IL1 β -Expression nach SAB.
- Abbildung 19** Zerebrovaskuläre MMP9-Genexpression nach SAB.
- Abbildung 20** Degradation von Collagen IV nach SAB.
- Abbildung 21** SAB-induzierte Perizyten-Dissoziation.
- Abbildung 22** SAB-induzierte Reduktion des Perizyten-Coverages.
- Abbildung 23** Apoptotische Perizyten nach SAB.

3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Geräte
Tabelle 2	Software
Tabelle 3	Medikamente und Injektionslösungen
Tabelle 4	Chemikalien, Lösungen
Tabelle 5	Labor- und OP-Utensilien
Tabelle 6	Primärantikörper
Tabelle 7	Sekundärantikörper
Tabelle 8	Kits
Tabelle 9	qPCR Primer
Tabelle 10	Tiere

4 Abstrakt in deutscher Sprache

Der Effekt des Interleukin 6 auf Struktur und Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke im Rahmen der sekundären Hirnschädigung nach Subarachnoidalblutung

Zielsetzung

Der Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke (BHS) spielt eine bedeutende Rolle beim Verständnis der sekundären Hirnschädigung nach Subarachnoidalblutung (SAB). Im proinflammatorischen Milieu nach SAB wird Interleukin (IL) 6 ein entscheidender Effekt auf das zerebrovaskuläre Leakage und die Bestandteile der Neurovaskulären Unit (NVU) zugeschrieben. Diese Arbeit charakterisiert neben Ausmaß und Ursachen der BHS-Schädigung den Einfluss des IL6 auf die BHS-Integrität in einem SAB-Mausmodell.

Methoden

Die SAB wurde in Wildtyp (WT) und IL6 Knock Out (KO) Mäusen mittels Filament-Perforations-Methode induziert. SAB und scheinoperierte SHAM-Tiere (Kontrollen) wurden an Tag 4 nach stattgehabter Blutung getötet. Die BHS-Permeabilität wurde anhand der Extravasation fluoreszierender Tracer, Evans Blue (EB, 70 kDa) und Fluorescein Isothiocyanate- (FITC)-Dextran (FD, 4 kDa), eruiert. Der Hirnwassergehalt wurde über das Verhältnis des Nass- zu Trockengewichts ermittelt. Die endotheliale Expression von Tight Junctions (TJ), Zytokinen (IL6, IL1 β und Tumornekrosefaktor (TNF) α) und der Matrix-Metalloproteinase 9 (MMP9) wurde in isolierten Hirnkapillaren via qPCR untersucht. Die Verteilung von Collagen IV sowie apoptotische Desmin- und TUNEL-positive Perizyten wurden per Immunfluoreszenzmikroskopie ermittelt.

Ergebnisse

An Tag 4 nach SAB wurde eine signifikante IL6-Überexpression ($2,7 \pm 0,5$ -fach) in WT beobachtet. Während FD in beiden Gruppen (WT und IL6 KO) in das Parenchym extravasierte, konnte eine SAB-induzierte EB-Extravasation lediglich bei WT beobachtet werden. Der Hirnwassergehalt lag bei WT nach SAB signifikant um $2,66 \pm 0,47$ % höher als bei IL6 KOs. Eine signifikante Rekonstitution der Occludin- ($1,79 \pm 0,14$ -fach der Expression der SHAM-Tiere), jedoch nicht der Claudin-5-Expression ($0,86 \pm 0,56$ -fach) konnte in SAB-operierten IL6 KO-Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen beobachtet werden. Außerdem konnte eine Hochregulation von IL1 β und TNF α in WT nach SAB festgestellt werden (je $2,3 \pm 0,99$ -fach und $2,18 \pm 0,77$ -fach der SHAM-Kontrollgruppe), wohingegen in IL6 KOs eine geringere Expression bestimmt wurde. Abschließend wurde eine höhere Anzahl apoptotischer Perizyten in SAB WT-Tieren im Vergleich mit der IL6 KO-Gruppe detektiert.

Schlussfolgerung

Der Verlust der BHS-Integrität in WT-Mäusen nach SAB konnte anhand der EB-Extravasation sowie der verringerten TJ-Expression demonstriert werden. Die unterbundene EB-Passage, die partiell wiederhergestellte TJ-Expression und die weniger starke Beanspruchung von extrazellulärer Matrix sowie Endothel-Perizyten-Interaktion in IL6 KOs sind Indikatoren dafür, dass die BHS-Dichtigkeit in diesen Mäusen nach SAB besser erhalten wird. Der Einfluss des IL6 auf das zerebrovaskuläre Leakage sowie sein Effekt auf die NVU machen die zentrale Rolle dieses Zytokins bei der sekundären Hirnschädigung nach SAB deutlich.

5 Abstract in english language

The role of interleukin 6 on blood-brain barrier permeability and structure in secondary brain injury after subarachnoid hemorrhage

Objective

Studying disruption of the blood-brain barrier (BBB) is central for the understanding of secondary brain injury after subarachnoid hemorrhage (SAH). Interleukin (IL) 6 has been postulated to affect cerebrovascular leakage and neurovascular unit components (NVU) under proinflammatory conditions following SAH. The presented work focuses on investigating the extent and causes of BBB breakdown, along with the influence of IL6 on BBB integrity in a SAH mouse model.

Methods

Filament perforation model was used to induce SAH in wildtype (WT) and IL6 knock out (KO) mice. SAH- and SHAM-operated animals (controls) were sacrificed 4 days after the onset of the bleeding. By extravasation of fluorescents Evans Blue (EB, 70 kDa) and Fluorescein Isothiocyanate- (FITC)-Dextran (FD, 4 kDa) BBB permeability was assessed. Brain water content was determined applying the wet/dry weight method. Endothelial expressions of tight junctions (TJ), cytokines (IL6, IL1 β , tumor-necrosis factor (TNF) α and matrix metalloproteinase 9 (MMP9) were analyzed in isolated brain capillaries by applying qPCR. Apoptotic desmin- and TUNEL-double-positive pericytes and the distribution of Collagen IV were assessed by conducting immunofluorescence microscopy.

Results

On day 4 post-SAH, a significant IL6 overexpression (2.7 ± 0.5 -fold) was detected in WT. While FD extravasated in both groups, SAH-induced EB extravasation was noticed only in WT mice. In comparison to IL6KOs, WT mice showed significantly higher

brain water content after SAH ($2.66 \% \pm 0.47 \%$). A significant reconstitution of occludin (1.79 ± 0.14 -fold of SHAM) but not claudin-5 (0.86 ± 0.56 -fold) was detected in SAH-operated IL6KOs compared to WT. This study revealed IL1 β and TNF α to be upregulated in WT post SAH (2.3 ± 0.99 -fold and 2.18 ± 0.77 -fold of SHAM). This overexpression was attenuated in IL6KOs. Finally, degradation of extracellular matrix (ECM) and significantly more apoptotic pericytes were detected in SAH-WTs (3.1 ± 1.0 -fold) compared to IL6KOs.

Conclusion

The loss of BBB integrity in WT mice post SAH in terms of EB extravasation and lower TJ expression was demonstrated. Considering the constriction of EB extravasation, the partial reconstitution of TJ expression and the lower affection of ECM and endothelial-pericyte interaction, we deduce that BBB tightness could be obtained more effectively in IL6KOs. Due to its proinflammatory influence on cerebrovascular leakage and its effect on NVU components, we infer that IL6 is decisively involved in the presence of secondary brain injury post SAH.

6 Einleitung

6.1 SAB: klinische Hintergründe

Der aneurysmatischen Subarachnoidalblutung (SAB) kommt aufgrund ihrer schwerwiegenden Komplikationen (Rezidivblutungen, Liquorzirkulationsstörungen, Vasospasmen) und ihrer hohen Letalität (25% innerhalb der ersten 24 Stunden) besondere Aufmerksamkeit in Forschung und Klinik zu (1, 2). Sie ist ursächlich für 5 % aller Apoplexien insgesamt (3) und macht mit etwa 30 % einen bedeutenden Anteil der hämorrhagischen Schlaganfälle aus (4). Mit einer Inzidenz 6,3/100 000 Einwohnern in Europa sind in Deutschland jedes Jahr etwa 5200 Patientinnen und Patienten von einer aneurysmatischen SAB betroffen (3). Wichtig in diesem Zusammenhang zu erwähnen ist, dass das Durchschnittsalter dieser Personen bei 55 Jahren liegt und damit eine vergleichsweise jungen Patientengruppe betroffen ist (5). Da bis zu 30 % der Patientinnen und Patienten dauerhaft pflegebedürftig bleiben, stellt die SAB durch den Verlust an Arbeitskraft auch eine ernstzunehmende sozioökonomische Belastung dar. Trotz sinkender Mortalität in den letzten Jahren ist nur ein Drittel der Betroffenen wieder in der Lage, den Alltag auf Dauer selbstständig zu meistern (5, 6).

Eine SAB ist definiert als Blutung in den von Liquor umspülten subarachnoidalen Raum, das heißt der Raum zwischen Arachnoidea und Pia mater (7). Die häufigste Ursache der nicht- traumatischen SAB ist mit 85 % der Fälle die Ruptur eines intrakraniellen Aneurysmas, welches am häufigsten in der Arteria communicans anterior oder Arteria cerebri anterior lokalisiert ist. Nur 10 – 20 % der Aneurysmen befinden sich im hinteren Stromgebiet (8). Zu den Risikofaktoren für die Ruptur zerebraler Aneurysmen zählen arterielle Hypertonie, Alkohol-, Nikotin- oder Kokainabusus, Schwangerschaft und Geburt (1, 3). Klinisches Leitsymptom der SAB ist ein plötzlich auftretender, stärkster Kopfschmerz von unbekannter Intensität (sogenannter „Vernichtungskopfschmerz“). Des Weiteren imponieren Zeichen der meningealen Reizung (Meningismus, Lichtscheu) sowie Übelkeit, Erbrechen, Bewusstseinstörung bis Koma, die als Folge des erhöhten Hirndrucks zu deuten sind. Auch fokale-neurologische Defizite und Krampfanfälle können im Rahmen der SAB auftreten (1). Liegt bei beschriebener Symptomatik die Verdachtsdiagnose einer SAB vor, ist die native zerebrale Computertomographie (cCT) Methode der Wahl zum Nachweis der Blutung. Bei negativer cCT und bestehendem

klinischen Verdacht wird eine Lumbalpunktion durchgeführt, womit das Blut im Liquor nachgewiesen werden kann (9). Die Darstellung zerebraler Aneurysmen als Blutungsquelle erfolgt dann mittels digitaler Subtraktionsangiographie (DSA), die wichtige Aufschlüsse über Lokalisation, Größe und Konfiguration des Aneurysmas liefert (10). In der Notfalldiagnostik kommt zur Erfassung der Blutungsquelle auch die CT-Angiographie zum Einsatz (11). Das initiale Management beinhaltet Maßnahmen zur Senkung des intrakraniellen Drucks (ICP) (Sedierung, Analgesie, 30° Oberkörperhochlagerung, Erreichen von Normotonie, Normokapnie, Normothermie) sowie die Vasospasmusprophylaxe mit dem Calciumkanalblocker Nimodipin (12, 13). Die endgültige therapeutische Versorgung von Aneurysmen erfolgt abhängig von Konfiguration und Lokalisation entweder chirurgisch mittels Clipping oder interventionell mittels endovaskulärem Coiling (14).

Im Rahmen einer SAB werden grundsätzlich zwei Phasen der Schädigung unterschieden: die frühe bzw. primäre und die verzögerte bzw. sekundäre Hirnschädigung. Bezüglich der zeitlichen Eingrenzungen gibt es in der Literatur unterschiedliche Angaben. Der primäre Phase bezieht sich auf Schädigungen, die in der frühen Erkrankungsphase einsetzen, d.h. etwa innerhalb der ersten 72 Stunden nach Blutungsereignis (15). Durch den Anstieg des intrakraniellen Volumens und damit des intrakraniellen Drucks kommt es zu einer Minderung des zerebralen Blutflusses (CBF). Außerdem bewirken metabolische Veränderungen die Bildung eines zytotoxischen Hirnödems sowie die Apoptose von Hirnzellen. Durch die Schädigung der Blut-Hirn-Schranke (BHS) kann sich zudem ein vasogenes Hirnödem entwickeln, das durch die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine verstärkt wird. Aufgrund der Hirnschwellung und früh einsetzender Vasospasmen kommt es sukzessive zu einem weiteren Abfall des CBF, das Hirngewebe wird hypoxisch geschädigt (15, 16). Die sekundäre Hirnschädigung umfasst Prozesse, die sich ab dem vierten Tag nach der Blutung ereignen. Durch diffuse, verspätete Vasospasmen kommt es zu einer lokalen Minderperfusion und damit zu sekundären Ischämien, die häufig mit einem schlechten klinischen Outcome assoziiert sind (1, 17, 18). Auch der Zusammenbruch der BHS, kortikal wandernde Depolarisationen sowie neuroinflammatorische Prozesse stellen wichtige Faktoren der sekundären Hirnschädigung nach SAB dar (19).

6.2 Blut-Hirn-Schranke

6.2.1 Funktion

Mit dem Begriff BHS wird die von Endothelzellen gebildete, selektiv durchlässige Barriere zwischen den zerebralen Blutgefäßen und dem umliegenden Hirnparenchym bezeichnet. Sie trennt das variable Milieu der Blutzirkulation vom Hirngewebe und ist damit essentiell, um ein konstantes Milieu innerhalb des zentralen Nervensystems (ZNS) aufrechtzuerhalten. Denn nur unter homöostatischen Bedingungen kann der korrekte Ablauf neuronaler Funktionen gewährleistet werden (20). Die Endothelzellen übernehmen durch die Ausbildung besonders dichter Zell-Zell-Kontakte die eigentlich abdichtende Funktion der BHS (21). An dieser Stelle seien zweierlei Arten von Zell-Zell-Kontakten genannt, die zwischen benachbarten Endothelzellen ausgebildet werden: Occludenskontakte, sogenannte Tight Junctions (TJ), und Adhärenskontakte, Adherens Junctions (AJ). Durch passive Diffusion können kleine und lipidlösliche Stoffe die BHS überwinden. Die Diffusion polarer Teilchen wird jedoch unterbunden. Allerdings ist die BHS nicht nur eine physikalische Barriere, sondern übernimmt gleichzeitig immunologische und metabolische Aufgaben. Der Glucosebedarf des Gehirns wird über den GLUT-1 Transporter reguliert und gedeckt. Außerdem erfolgt der Transport von essentiellen Aminosäuren, Nukleosiden sowie Nukleobasen über Carrierproteine (22-24). Auch toxische Substanzen werden aktiv über sogenannte Effluxtransporter wie das P-Glycoprotein (Pgp) oder Multidrug resistance-related proteins (MRP) aus dem Parenchym eliminiert (23). Außerdem hilft die BHS, die Antwort des angeborenen Immunsystems zu regulieren. Sie ist im proinflammatorischen Milieu an der Rekrutierung und dem Durchtritt von Leukozyten aus der Blutzirkulation ins Gewebe beteiligt (25). Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die BHS als Barriere sowohl physikalische, enzymatisch/metabolische, immunologische als auch Transportfunktionen übernimmt. Ihre Eigenschaften sind nicht fix, sondern dynamisch, indem sie sich stets an das jeweilige Milieu anpassen kann (21, 22, 25).

6.2.2 Aufbau

Die Charakteristika der BHS beruhen nicht allein auf den Eigenschaften der Endothelzellen. Vielmehr agieren diese innerhalb eines zellulären Komplexes bestehend aus Basalmembran, assoziierten Perizyten, Astrozyten und Mikrogliazellen.

Diese kommunizieren als eine Einheit mit einer kleinen Gruppe von Neuronen und bilden die sogenannte neurovaskuläre Unit (NVU) (20). Das Konzept der NVU bezieht sich also auf die Kommunikation zwischen den verschiedenen Komponenten und stellt die Voraussetzung für die Aufrechterhaltung der Homöostase im ZNS dar. Falls die Signalwege auch nur eines Bestandteils der NVU gestört sind, wie es etwa bei Krankheiten oder Infektionen der Fall ist, kommt es zu einer Störung der Homöostase und damit der zentralnervösen Funktionalität (20, 23).

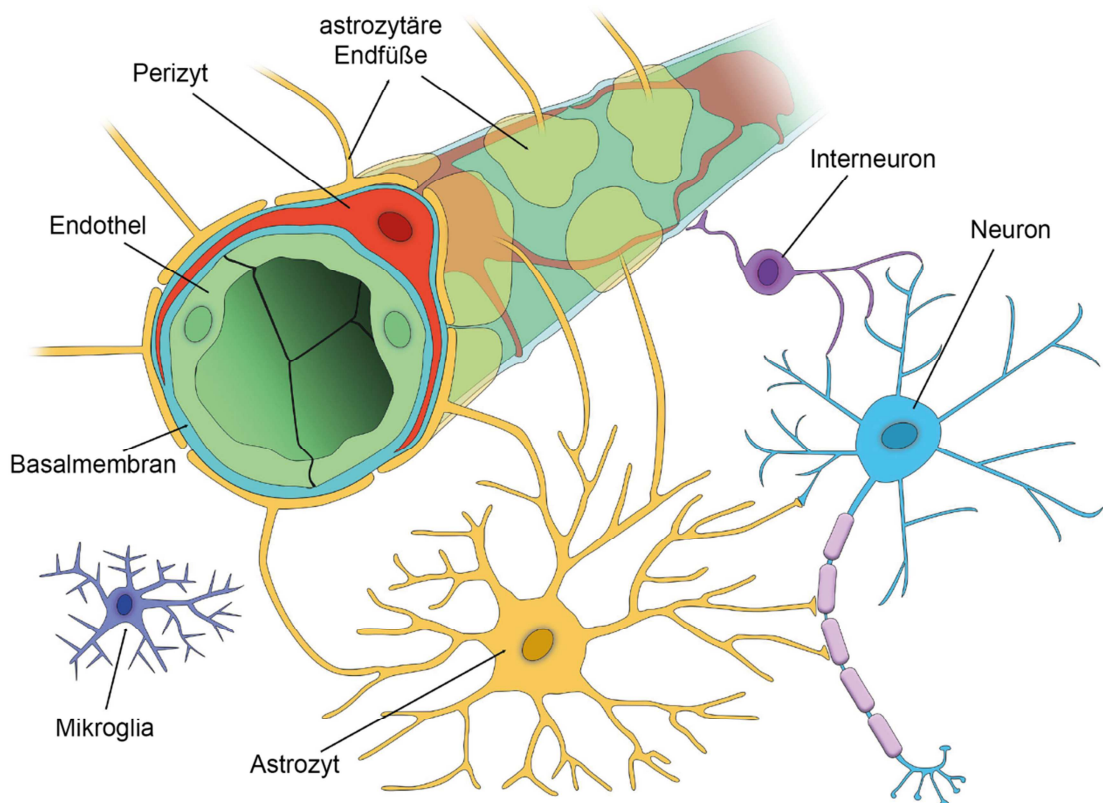


Abbildung 1: Aufbauschema der neurovaskulären Unit. Zerebrale Blutgefäße werden von Endothelzellen gebildet, die über TJ und AJ miteinander verbunden sind. Die Basalmembran umgibt Endothelzellen und Perizyten vollständig und wird selbst astrozytären Endfüßen umschlossen. Mikrogliazellen als wichtige Vermittler der Neuroinflammation befinden sich im Hirnparenchym. Außerdem bilden Neurone sowohl mit vasoaktiven Interneuronen als auch Astrozyten Synapsen aus, worüber Signale die Gefäße erreichen, den Blutfluss je nach metabolischem Bedarf zu variieren. (adaptiert nach Lachlan S. Brown, School of Medicine, College of Health and Medicine, University of Tasmania, Hobart, TAS, Australia (26))

Endothelien:

Das Besondere der zerebralen Endothelien ist die Ausbildung außergewöhnlich dichter Zell-Zell-Kontakte. Damit wird eine 100-fach niedrigere Permeabilität im Vergleich mit den Kapillarendothelien im nicht-neuronalen Gewebe erreicht (27). Da das Cholesterol und die Phospholipide der Endothelplasmamembran sehr dicht gepackt sind, können lediglich kleine Atemgasmoleküle (CO_2 und O_2) oder lipophile Stoffe und Pharmaka wie Barbiturate oder Ethanol diffundieren, während größeren und hydrophilen Molekülen die Passage verwehrt bleibt (20). Der parazelluläre Transportweg wird über die TJ und AJ, welche im junctionalen Komplex zusammengefasst werden, verschlossen (27). Die Zell-Zell-Kontakte werden grundsätzlich von verschiedenen Molekülen gebildet. In den an der lateralen Zirkumferenz liegenden TJ wird die Adhäsion hauptsächlich über die Transmembranproteine Claudine, Occludin und Vertreter des Junction Adhesion Molecules (JAM) vermittelt, die ihrerseits intrazellulär an membranassoziierte zytoplasmatische Proteine binden wie z. B. das Zona occludens Protein 1 (ZO1) (28). Claudin-5 als wichtigstem TJ-Transmembran-Protein kommt eine entscheidende Rolle zu. Allein dieses Claudin wäre zur Formation eines Zell-Zell-Kontakts ausreichend. Die Claudine-3 und -12 sowie Occludin übernehmen weitere wichtige Barrierefunktionen. All diese Proteine bilden perivaskuläre Reißverschlussstrukturen aus, womit der Interzellulärspalt verschlossen wird. Intrazellulär binden sie an die Zona occludens Proteine (ZO-1, -2 und -3), über die der Kontakt zum Zytoskelett der Zelle hergestellt wird. Die Verbindungen über AJ liegen der abluminalen Seite an und werden hauptsächlich von dem endothelzellspezifischen Vascular Endothelial-Cadherin (VE-Cadherin) gebildet. Dieses bindet intrazellulär an die Verbindungsmoleküle p120, β -Catenin und Plakoglobin, worüber es letztendlich mit den Aktin-Bindungsproteinen des Zytoskeletts verbunden ist (29). Außerhalb dieser spezialisierten Strukturen wird das Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 (PECAM-1 oder CD31) endothelzellspezifisch exprimiert, welches ebenfalls zur Zell-Zell-Adhäsion beiträgt (21, 22, 25, 28, 29). Die TJ und AJ übernehmen jedoch nicht nur Barrierefunktionen, sondern sind ebenfalls in den intrazellulären Signalweg der Apoptose sowie in Prozesse des Zellwachstums, der Angiogenese und der Genexpression involviert. Diverse Studien konnten außerdem belegen, dass zerebrovaskuläre Pathologien, wie etwa eine SAB, den komplexen Aufbau der BHS entscheidend beeinflussen (22, 25).

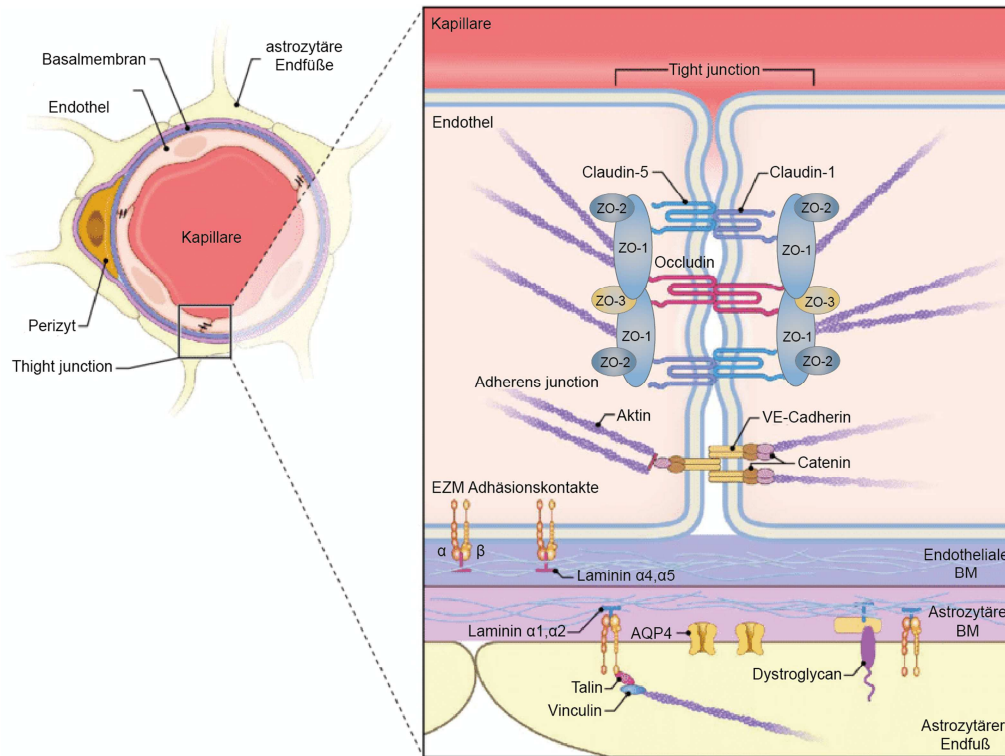


Abbildung 2: Junktionaler Komplex benachbarter Endothelzellen. Die barriereabdichtenden TJ werden von einer Vielzahl an Proteinen gebildet, hierunter Claudin-3, Claudin-5, Claudin-12, Occludin, ZO-1 und JAMs. Dadurch wird die Limitation der Passage von Molekülen und Stoffen aus dem Blut ins ZNS gewährleistet. Die TJ sind an das Aktin-Zytoskelett gebunden. Die Adhärenzkontakte werden von VE-Cadherin und Catenin gebildet, die ebenfalls an Aktinfilamente binden. Des Weiteren ist die endotheliale BM, die aus Laminin $\alpha 4$ und $\alpha 5$ besteht, der astrozytären BM bestehend aus Laminin $\alpha 1$ und $\alpha 2$ gegenübergestellt. Über die Integrine α und β können die Endothelzellen mit der Basalmembran interagieren. Gleichermäßen binden die astrozytären Endfüße über Integrine und Dystroglycan an die Basalmembran. (adaptiert nach Panagiotis Mastorakos und Dorian McGavern, Viral Immunology and Intravital Imaging Section, National Institute of Neurological Disorders and Stroke, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA (30))

Astrozyten:

Astrozyten sind spezialisierte Gliazellen, die unter Ausbildung netzartiger Strukturen die Hirnkapillaren fast vollständig mit ihren Endfüßen umgeben. Sie stehen im engen Kontakt sowohl zu Neuronen als auch zu zerebralen Blutgefäßen und fungieren zwischen diesen als eine Art Mediator (31). Sie kommunizieren untereinander mittels

Calcium-Signalen über Gap junctions und sind so partiell an der Regulierung der mikrovaskulären Permeabilität beteiligt (32). Zudem verstärken sie TJ-Strukturen (33). Sie können die Eigenschaften der BHS beeinflussen, indem sie durch Sekretion von Signalmolekülen wie Zytokinen, Neutrophilen und Transforming Growth Factor β (TGF β) die TJ-Expression steigern. Astrozyten können zudem Differenzierungsvorgänge in Endothelien induzieren (34, 35).

Perizyten:

Bei den Perizyten handelt es sich um perivaskuläre Zellen, die der abluminalen Seite des Endothels anliegen und eine diskontinuierliche Schicht bilden. Sie sind in die Basalmembranen eingebettet. Als wichtige Stabilisatoren der Gefäßstruktur spielen sie eine entscheidende Rolle in der Aufrechterhaltung der BHS-Integrität und der Regulierung des zerebralen Blutflusses (36, 37). Sie sekretieren darüber hinaus angiopoetische Faktoren wie Angiopoetin und Platelet-Derived-Growth-Factor-B (PDGF-B) und sind damit an Differenzierungs- sowie angiopoetischen Prozessen des Endothels beteiligt. Außerdem nehmen sie am Gefäßremodeling teil, was reaktive gewebliche Umbauvorgänge der Gefäßwand auf erhöhte physiologische oder pathologische Belastungen bezeichnet (38, 39).

Basalmembranen:

Die Basalmembranen (BM) bestehen aus einer komplexen Proteinstruktur, welche neben Collagen Typ IV, Nidogen, Laminin und Heparinsulfat-Proteoglykane beinhaltet. Sie bilden die extrazelluläre Matrix (EZM), die Kapillaren und Perizyten umgibt, und stehen im indirekten Kontakt zu den Endfüßen der Astrozyten (40, 41). Ultrastrukturell können zwei verschiedene Schichten unterschieden werden: die endotheliale Schicht bestehend aus $\alpha 4$ und $\alpha 5$ Lamininen sowie die astrogliale Schicht, die von Astrozyten sezerniert und aus $\alpha 1$ und $\alpha 2$ Lamininen gebildet wird (41). Im Rahmen inflammatorischer Prozesse sind beide Schichten an der Leukozytenmigration durch die BHS hindurch beteiligt (42). Die Basalmembranen übernehmen eine Art Ankerfunktion für die Kapillaren, indem Laminine und andere Proteine der EZM mit dem endothelialen Integrin-Rezeptor interagieren (43). Somit tragen die Basalmembranen ebenfalls zur strukturellen Stabilität der BHS bei.

Mikrogliazellen:

Neben Astro- und Perizyten beeinflussen auch die Mikrogliazellen Phänotyp und Funktion der zerebralen Endothelien (44). Sie sind mesodermalen Ursprungs und wandern früh während der embryonalen Entwicklung in das ZNS ein. Somit stellen sie hirneigene Immunzellen dar, die eng mit der BHS interagieren (45). In Folge inflammatorischer Stimuli werden sie bei Hirnschädigungen aktiviert und beeinflussen die BHS-Dichte (46). Über die Ausschüttung des Vascular Endothelial Growth Factors (VEGF) wirken sie proangiogen: Endotheliale Tip-Zellen werden entlang des VEGF-Gradienten geleitet und induzieren Gefäßsprossung (47) .

Neurone:

Auch Neurone können ihrerseits direkt und indirekt die BHS-Eigenschaften beeinflussen: Direkt geschieht dies über die Ausschüttung von Neurotransmittern (Dopamin, GABA) oder vasoaktiven Ionen (Kalium, Calcium), indirekt über die Interaktion mit Astro- und Perizyten. So geht erhöhte neuronale Aktivität bspw. mit einem erhöhten Calciumsignal astrozytärer Endfüße einher, was wiederum einen vasokonstriktorisches Effekt hat (48-50).

Zusammenfassend interagieren und kommunizieren Endothelzellen, Astrozyten, Basalmembranen, Perizyten, Mikroglia und Neurone in einem sich gegenseitig beeinflussenden Netzwerk. Dadurch beeinflussen sie entscheidend die BHS-Eigenschaften. Nur durch dieses gemeinsame Wirken innerhalb der NVU kann der korrekte Ablauf der neuronalen Signale gewährleistet werden.

6.2.3 BHS bei SAB

Die BHS wird im proinflammatorischen Milieu nach SAB entscheidend beeinflusst. Im akuten Stadium kommt es zu einer deutlichen Permeabilitätssteigerung bedingt durch eine veränderte Dynamik und molekulare Zusammensetzung endothelialer TJ-Proteine (51). Die erhöhte Permeabilität führt dazu, dass Ionen und nachfolgend Wasser das Gefäßsystem verlassen (kapilläres Leakage). Im Gewebe kommt es durch die Flüssigkeitsansammlung (vasogenes Ödem) zur Volumenexpansion im Parenchym und damit zur anhaltenden Erhöhung des ICP (1). Außerdem können aufgrund der

gesteigerten Permeabilität Immunzellen ins Hirngewebe immigrieren und inflammatorische Vorgänge initiieren (22). Auch wird durch apoptotische Prozesse der Endothelzellen sowie anderer Vertreter der NVU Einfluss auf die Dichte der BHS nach SAB genommen (1).

Vermittelt wird dies durch die Ausschüttung bestimmter Zytokine wie $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL1}\beta$ und IL6 . Hierzu lassen sich auch klinisch Korrelate finden: Zu einem frühen Zeitpunkt nach stattgehabter SAB konnten erhöhte Spiegel intrazerebral produzierten IL6 sowohl in Liquor als Serum der SAB-Patientinnen und Patienten detektiert werden. Höhere IL6 -Spiegel waren mit einem schlechteren klinischen Outcome assoziiert (52, 53). Damit wird die zentrale Rolle inflammatorischer Prozesse bei der Pathophysiologie zerebrovaskulärer Erkrankungen angedeutet.

6.3 Neuroinflammation bei SAB

Die zugrundeliegenden Mechanismen der primären und sekundären Hirnschädigung nach SAB sind noch nicht vollständig verstanden. Angenommen wird, dass neuroinflammatorischen Prozessen in diesem Kontext eine wichtige Rolle zukommt. Molekulare Akteure der Neuroinflammation sind die bereits erwähnten Zytokine $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL1}\beta$ und IL6 , die sowohl in Serum als auch Liquor freigesetzt werden und mit klinischen Befunden wie Neutrophilie, Fieber und zerebralem Ödem assoziiert sind (54). Außerdem tragen neuroinflammatorische Vorgänge zu der BHS-Dysfunktion nach SAB bei, wie in einem Review von Abbott ausführlich beschrieben. Hier wird deutlich, dass $\text{IL1}\beta$, $\text{TNF}\alpha$, Bradykinin und Arachidonsäure die BHS signifikant destabilisieren (55). Auch das Hämoglobinabbauprodukt Hämooxygenase-1 vermittelt über den BHS-Zusammenbruch neuronalen Zelltod (56). Weitere Faktoren, die zur BHS-Störung nach SAB beitragen, sind der Hypoxie-induzierbare Faktor 1α , das Aquaporin-4 sowie die MMP9, deren gesteigerte Expression post SAB tierexperimentell belegt werden konnte. Die Zugabe der jeweiligen Inhibitoren führt zu einer signifikanten Reduktion der SAB-induzierten Hirnschwellung (57). Betrachtet man die zellulären Mechanismen der Neuroinflammation nach SAB stellt man fest, dass weniger die Zellen des adaptiven Immunsystems als vielmehr die Bestandteile des angeborenen Immunsystems eine zentrale Rolle einnehmen. So wird eine erhöhte Anzahl an Natürlichen Killer Zellen, Neutrophilen und Makrophagen in der posthämorrhagischen zerebrospinalen

Flüssigkeit nach SAB detektiert. Zellen des angeborenen Immunsystems treten nicht nur passiv in den Liquor über, sie bewegen sich auch aktiv aus dem zerebralen Gefäßsystem und verursachen inflammatorische Prozesse im Subarachnoidalraum (58, 59). Alles in allem wird deutlich, dass der Verlust der BHS-Integrität nach SAB eine Reaktion auf eine Vielzahl inflammatorischer Stimuli ist. Die hauptsächlich betroffenen molekularen Mechanismen führen über veränderte TJ- und AJ-Strukturen zu einer relevanten BHS-Störung (22, 25). IL6, als einer der hauptverantwortlichen Mediatoren in diesem Zusammenhang, wird im Folgenden näher charakterisiert.

6.4 Interleukin 6

IL6 ist ein pleiotropes Zytokin, welches eine Vielzahl an Vorgängen moduliert, darunter Zellteilung, -differenzierung und Apoptose (60). Mit einer Molekularmasse von 21 – 28 kDa zählt es zu den eher kleineren Zytokinen (61). Der IL6-Rezeptor stellt ein Dimer bestehend aus zwei verschiedenen Untereinheiten dar: die IL6-Rezeptor (IL6R)-Untereinheit und das Glykoprotein 130 (GP130). Der IL6R, auch bekannt als Glykoprotein 80, existiert als membrangebundene und lösliche Form und ist vor allem an der Erkennung der Liganden beteiligt. Die GP130-Untereinheit ist für die Signaltransduktion verantwortlich: Wenn IL6 an den IL6R bindet, wird GP130 durch eine assoziierte Janus Kinase (JAK) phosphoryliert (60). Die Arbeitsgruppe um Ulf Schneider konnte zeigen, dass IL6 nach SAB von Mikrogliazellen produziert wird und entscheidend an Mechanismen der sekundären Hirnschädigung beteiligt ist. So konnte die Akkumulation von Mikrogliazellen mit neuronalem Zelltod assoziiert werden (62). Eine kürzlich veröffentlichte Arbeit unserer Gruppe konnte in *in vitro* Experimenten demonstrieren, dass zerebrale Endothelzellen selbst wichtige Produzenten von IL6 nach SAB sind. Sie exprimieren außerdem den IL6R selbst und sind damit in der Lage, auf das eigens produzierte IL6 zu reagieren. Die autokrin vermittelte Inflammation hat direkten Einfluss auf die BHS-Eigenschaften nach SAB. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der IL6R in zerebralen Kapillaren zum Teil die Aktionen seines Liganden vermittelt, ohne dabei auf die lösliche Form des Rezeptors angewiesen zu sein (63). Basierend auf diesen *in vitro* Daten würde sich die Blockade des IL6R, welcher spezifisch von zerebralen Endothelzellen exprimiert wird, als potentiell Target für die Reduktion der BHS-Störung nach SAB anbieten.

6.5 Zielsetzung

Grundsätzlich wurde die wichtige Rolle des IL6 als proinflammatorischer Mediator nach SAB bereits in *in vitro* Experimenten unserer Arbeitsgruppe beschrieben (63). In dieser Arbeit soll der Einfluss des IL6 auf die Barriereeigenschaften jedoch genauer charakterisiert werden. Die Kernfrage ist, in welchem Ausmaß dieses Zytokin zum Zusammenbruch der BHS beiträgt und über welche Mechanismen dies vermittelt wird? Grundlage der Studie bilden die *in vivo* Experimente in WT- und IL6 KO-Mäusen. Durch den Vergleich der Ergebnisse beider Versuchstiergruppen soll der Einfluss des IL6 auf die BHS-Integrität im SAB-Kontext verdeutlicht werden.

7 Material und Methoden

7.1 Materialien

Tabelle 1: Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Fluoreszenzreader	Microplate fluorescence reader Infinite M200	TECAN, Männedorf, Schweiz
Homogenisator	Dispomix Ultra Turrax	IKA, Staufen, Deutschland
Konfokalmikroskop	LSM5	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Kryostat	Microm	Leica, Wetzlar, Deutschland
Licht-/Fluoreszenzmikroskop	Axiotech Observer Stemi 2000CS + Axiocam 105 color	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Nagetier-MRT	Pharmascan 70 / 16 US HM 560	Bruker BioSpin, Ettlingen, Deutschland
Wärmeschrank	CS5000	Memmert, Schwabach, Deutschland
OP-Mikroskop	OPMlcs-NC Varioskop	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
qPCR-System	7900 fast real-time PCR System	Applied Biosystems, Foster City, USA
Rasierer	C1301B-230V	Wella, Darmstadt, Deutschland
Tiefkühler	Ultra light	Sanyo, Osaka, Japan
Tischzentrifuge	C1300 RT	Abimed, Langenfeld, Deutschland
Vortex	Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, USA
Waage	Contura	Ohaus, Nänikon, Schweiz
Waage	SBC 33	Scaltec, Göttingen, Deutschland
Wärmeplatte	14800	Medax, Neumünster, Deutschland
Zentrifuge	Ultra speed centrifuge	Heraeus, Hanau, Deutschland

Tabelle 2: Software

Programm	Verwendung
ABI PRISM 7300 SDS	qPCR
Axio Vision 4.6	Kamera
Endnote	Zitieren

GraphPad Prism 6.01	Statistische Analyse
ImageJ©	Bildanalyse
Small Animal Monitoring & Gating System, SA Instruments, Stony Brook	Ventilationsmonitoring MRT

Tabelle 3: Medikamente und Injektionslösungen

Medikament	Hersteller
Aqua	Braun, Frankfurt, Deutschland
Dexpanthenol 5% (Bepanthen®)	Bayer, Leverkusen, Deutschland
Isofluran Forene	Abbott, Chicago, USA
Ketamin (Ketanest®)	Pfizer Pharma, New York City, USA
Lidocainhydrochlorid 2% (Xylocain®)	AstraZeneca, Cambridge, England
NaCl 0,9%	Braun, Frankfurt, Deutschland
Penicillin 1 Mega 10 Vial	Grünenthal, Aachen, Deutschland
Tramadolhydrochlorid (Tramal®)	Grünenthal, Aachen, Deutschland
Xylozin (Rompun®)	Bayer, Leverkusen, Deutschland

Tabelle 4: Chemikalien, Lösungen

Substanz	Hersteller
Albumin bovine (BSA)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Casein from bovine milk	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
DAPI	Dianova, Hamburg, Deutschland
D-Saccharose	Roth, Graz, Österreich
Eosin Solution	Waldeck, Münster, Deutschland
Ethanol 70%, 96%	Roth, Graz, Österreich
Ethanol 80%	Chemsolute, Renningen, Deutschland
Ethylene glycol	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Evans Blue	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Fitc Dextran	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Gelantin from bovine	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Giemsa's Azur Eosin Methylene Blue Solution	Merck, Darmstadt, Deutschland
Mayers Hämalaumlösung	Sigma, St. Louis, USA
Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
N,N-Dimethylformamid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
PBS Tabletten	Gibco, Dublin, Irland
Saccharose	Roth, Graz, Österreich
Xylol >98%	Roth, Graz, Österreich

Tabelle 5: Labor- und OP-Utensilien

Substanz	Hersteller
23 Gauge Nadel Sterican®	Braun, Frankfurt, Deutschland
2-Propanol 70%	Braun, Frankfurt, Deutschland
96 well Platte	Greiner bio one, Leipzig, Deutschland
Dako Pen	Dako, Glostrup, Dänemark
Deckgläser	VWR, Dresden, Deutschland
Eppendorf Tubes 1.5ml	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Falcon Tubes 15ml	VWR, Dresden, Deutschland
Gefäßclips	Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland
gentleMACS Tubes	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
Mounting Medium	Dianova, Hamburg, Deutschland
Mounting Medium mit Dapi	Dianova, Hamburg, Deutschland
Objektträger	Roth, Graz, Österreich
Pinzette Dumostar®	Fine Science Tools, Heidelberg, Deutschland
Pipetten Research Plus	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland
Pipettenspitzen Biospheere Filter Tips	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Polyester Faden 4-0 Ethibond	Ethicon, Somerville, USA
Polypropylen Faden (8-0)	Ethicon, Somerville, USA
Schere	Fine Science Tools
Softasept®	Braun, Frankfurt, Deutschland
Spritze BD Discardit™ 5ml, 10ml 20ml	BD, Franklin Lakes, USA
Spritze BD Plastipak 1ml 26GA	BD, Franklin Lakes, USA
Sterilium® classic pure	Bode, Hamburg, Deutschland
Transpore® White Surgical Tape	3M, Saint Paul, USA
Vasco® Nitril white	Braun, Frankfurt, Deutschland
Vaskulärer Faden (3-0)	Ethicon, Somerville, USA
Wattestäbchen	HGV Verbandstoffe, Lindhorst, Deutschland

Tabelle 6: Primärantikörper

Antikörper	Konzentration	Hersteller
anti CD31 rat	01:50	BD Pharmingen, Franklin Lakes, USA
anti Claudin-5 mouse	01:100	Thermo Fisher scientific, Waltham, USA
anti Collagen rabbit	1:200	Thermo Fisher scientific
anti Desmin rabbit	1:100	Abcam, Cambridge, England

anti IL6	1:200	Abcam
anti Occludin rabbit	1:100	Abcam
anti ZO1 rabbit	1:100	Abcam

Tabelle 7: Sekundärantikörper

Antikörper	Konzentration	Hersteller
Alexa Fluor647-conjugated Donkey anti-Rat IgG	1:200	Dianova, Hamburg, Deutschland
Alexa488-conjugated Donkey anti-Rabbit IgG		Dianova
Alexa647-conjugated Donkey anti-Rabbit IgG		Dianova
Cy3-conjugated donkey anti-Rat IgG		Dianova
Fluorescein-conjugated Donkey Anti-Mouse IgG		Dianova
Fluorescein-conjugated Donkey Anti-Rabbit IgG		Dianova

Tabelle 8: Kits

Kit	Funktion	Hersteller
ApopTag® Red In Situ Apoptosis Detection Kit	Detektion Apoptose	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Onestep RT-PCR	cDNA Synthese	Qiagen, Hilden, Deutschland
Premix ex Taq Perfect Real time Kit	qPCR	Takara, Kusatsu, Japan
RNeasy Mini-Kit	RNA Isolation	Qiagen, Hilden, Deutschland

Tabelle 9: qPCR Primer

Gen	Forward Primer	Reverse Primer
Claudin-5	GTGGAACGCTCAGATTTTCAT	TGGACATTAAGGCAGCATCT
IL1 β	ATCACTCATTGTGGCTGTGG	CATCTCGGAGCCTGTAGTGC

IL6	GAGGATACCACTCCCAACAGACC	AAGTGCATCATCGTTGTTCATACA
MMP9	TGT CTG GAG ATT CGA CTT GAA GTC	TGA GTT CCA GGG CAC ACC A
Occludin	ATCCTGGGCATCATGGTGTTT	GGGCCGTCGGGTTCACT
TNF α	CACAGCCTTCCTCACAGAGC	GGAGGCAACAAGGTAGAGAGG

Tabelle 10: Tiere

Tiere	Beschreibung
Mäuse	Die C57BL/6 Wildtypmäuse wurden aus der hauseigenen Forschungseinrichtung für Experimentelle Medizin (FEM) der Charité Universitätsmedizin Berlin zur Verfügung gestellt. Die zum Einsatz gekommenen transgenen IL6 KO-Tiere wurden ebenfalls der Charité-eigenen Zucht entnommen und mit freundlicher Genehmigung von Herrn Prof. Dr. Harms (Experimentelle Neurologie) zur Verfügung gestellt. Aufgrund der knappen Verfügbarkeit musste auf beide Geschlechter zurückgegriffen werden. Alle Experimente wurden entsprechend den Richtlinien des Landesamtes für Gesundheit und Soziales Berlin durchgeführt.

7.2 Methodik

7.2.1 Versuchstiergruppe und SAB im Mausmodell

Die Versuchstiergruppe umfasste sowohl Wildtyp-C57 BL6/J Mäuse als auch IL6 KO-Mäuse, welche aus der hauseigenen Tierhaltung (Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin (FEM) Charité Universitätsmedizin Berlin) zur Verfügung gestellt worden sind. Das durchschnittliche Alter der Tiere lag zwischen 8 und 12 Wochen, ihr durchschnittliches Gewicht zwischen 20 - 25 g. Während der Experimente wurden die Mäuse im Neurowissenschaftlichen Forschungszentrum an der Charité Campus Mitte gehalten und hatten zu jedem Zeitpunkt uneingeschränkten Zugang zu Wasser und Trockenfutter. Sie unterlagen einem Tag-Nacht-Zyklus von 12 Stunden bei einer

Temperatur von circa 22,5 °C. Die IL6 KO-Tiere ließen sich in Aussehen, Interaktion und Verhalten nicht von den WT-Mäusen unterscheiden. Außerdem boten sie intraoperativ einem der WT-Maus absolut vergleichbaren Phänotypus. Hieraus wurde auf eine nicht erhöhte Belastung dieser Tiergruppe geschlossen. Die Tierversuche erfolgten nach §8TierSchG in Übereinstimmung mit der Tierschutzgenehmigung des Landesamtes für Gesundheit und Soziales Berlin unter der Registriernummer G177/14.

Die SAB wurde mittels endovaskulärer Fadenperforationsmethode induziert, womit die Ruptur eines intrakraniellen Aneurysmas initiiert wurde. Zunächst wurden die Mäuse intraperitoneal mit einer Lösung aus Esketaminhydrochlorid (7,5 mg/kg Körpergewicht) und Xylazin (2,5 mg/kg Körpergewicht) gelöst in aqua ad iniectabilia narkotisiert. Anschließend erfolgte ein Halsschnitt entlang der Longitudinalachse. Die rechte Arteria carotis communis (ACC) wurde dargestellt. Die Arteria carotis externa (ACE) wurde freipräpariert, ligiert und distal der Ligatur durchtrennt. Über den entstandenen ACE-Stumpf wurde nun ein Filament aus nichtabsorbierbarem Polypropylene eingeführt, welches unter Umschlagen des Stumpfes in die Arteria carotis interna (ACI) hineingleitete. Unter bestehender Blutzirkulation wurde das Filament 8 mm nach kranial vorgeschoben, bis es mit der Spitze die Bifurkation der ACI in Arteria cerebri anterior und media perforierte. Nach erfolgter Perforation strömte Blut in den Subarachnoidalraum. Als Zeichen einer stattgehabten SAB wurde das kurze Aussetzen der Atmung bei den Mäusen gewertet. Diese normalisierte sich anschließend innerhalb weniger Sekunden. Die SHAM-Kontrolltiere wurden wie oben beschrieben operiert. Das Filament wurde allerdings nur 6 mm vorgeschoben, sodass es nicht zur vaskulären Perforation kam. Postoperativ wurde die OP-Narbe der Tiere mit einem Lokalanästhetikum (Lidocainhydrochlorid) versorgt. Außerdem erhielten sie zur Analgesie Tramadolhydrochlorid gelöst im Trinkwasser (2,5 mg/100 ml) für mindestens drei Tage post OP. Tiere, die eine Hemiparese aufwiesen, wurden von den Experimenten ausgeschlossen.

7.2.2 Magnetresonanztomographie

Zur Anfertigung der MRT-Aufnahmen wurde ein 7 Tesla Nagetier MRT verwendet. Um eine konstante Körpertemperatur von 37 °C zu gewährleisten, wurden die Mäuse auf eine durch warmes Wasser beheizte Vorrichtung gelegt. Die Anästhesie wurde mit

2,5%igem Isofluran initiiert und mit 2,0 – 1,5%igem Isofluran aufrechterhalten. Sie wurde den Mäusen in einem O₂/N₂O Gasgemisch (0,3/0,7 l/min) über eine Gesichtsmaske zugeführt. Das Ventilationsmonitoring erfolgte über die gesamte Zeit der Untersuchung. Die MRT-Aufnahmen wurden in einer T2 gewichteten 2D turbo spin-echo Sequenz durchgeführt.

7.2.3 Extravasation molekularer Tracer

Die Permeabilität der BHS wurde mit Hilfe der molekularen Tracer Evans Blue (EB), welches an Albumin bindet (Molekulargewicht (MW) 70 kDa), und Fitc Dextran (FD) (MW 3-5 kDa) bestimmt. 2%iges EB gelöst in 0,9%iger Kochsalzlösung wurde den Tieren über die Zungenvene injiziert (5 µl/g) und zirkulierte für zwei Stunden im Gefäßsystem. Nachfolgend wurden die Tiere mit 40 ml phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) über die linke Herzkammer perfundiert. Im Anschluss erfolgten Hirnentnahme, Schockfrierung in flüssigem Stickstoff und der Transfer zur Kryokonservierung bei minus 80 °C.

Um eine Aussage über die Passage kleinerer Moleküle treffen zu können, wurde die BHS hinsichtlich der Permeabilität von FD untersucht. 25 mg FD wurden in 1 ml 0,9%iger Kochsalzlösung gelöst und ebenfalls über die Zungenvene injiziert (10 µl/g). Die Lösung zirkulierte für 5 Minuten im Blut, bevor die Tiere mit 20 ml Paraformaldehyd (PFA) perfundiert wurden. PFA-perfundierte Hirne wurden über Nacht bei 4 °C in PFA nachfixiert. Am nächsten Tag erfolgte die Überführung der Hirne in 30%ige Sucrose-Lösung, bevor anschließend die Kryokonservierung erfolgte.

7.2.4 Bestimmung des Hirnwassergehalts

Zur Bestimmung des Hirnwassergehalts (HWG) wurden die Maushirne nach Entnahme bei einer Temperatur von 105 °C 24 Stunden lang in einem Universalwärmeschrank aufbewahrt. Das Gewicht der Hirne wurde sowohl vor als auch nach der Trocknung ermittelt. Mit folgender Formel konnte der Hirnwassergehalt berechnet werden:

$$\text{HWG [\%]} = (\text{Feuchtgewicht-Trockengewicht})/\text{Feuchtgewicht} * 100 \%$$

7.2.5 Anfertigung von Kryoschnitten

Die Maushirne wurden in 2%ige (w/v) in destilliertem Wasser gelöste Gelatine eingebettet. Mit dem Kryostat wurden bei $-16\text{ }^{\circ}\text{C}$ $14\text{ }\mu\text{m}$ dicke Koronarschnitte aus verschiedenen Regionen (nahe der Blutung, nahe der hippocampalen Region) aufgenommen.

7.2.6 HE-Färbung

Die Gefrierschnitte wurden zunächst über 3 Sekunden mit Haemalaun-Lösung angefärbt. Anschließend erfolgte die Differenzierung durch 2 - 5-minütiges Spülen mit Leitungswasser. Die Schnitte wurden folgend in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 80 %, 96 %, 100 % Ethanol) gewaschen. Zum Schluss wurden sie für 2 Minuten in Xylol eingelegt, bevor sie mit Mounting Medium eingedeckelt wurden.

7.2.7 Immunhistochemische Analyse

Mäuse, deren Hirne zur immunhistochemischen (IHC) Analyse verwendet werden sollten, wurden nach abgeschlossener MRT-Bildgebung mit 40 ml PBS über eine 23 Gauge Nadel transkardial perfundiert. PBS-perfundierte Kryoschnitte wurden mit Methanol für 8 Minuten bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ fixiert, im Anschluss für 5 Minuten bei Raumtemperatur (RT) gewaschen und mindestens 30 Minuten lang in 1%iger Caseinlösung in PBS geblockt. Die primären Antikörper (gegen Claudin-5, Occludin, PECAM1, Desmin, Collagen IV) wurden hinzugegeben. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nach dreimaligem Waschen mit 0,5%igem (w/v) Casein in PBS am nächsten Tag wurden die fluoreszierenden Sekundärantikörper FITC-Dextran, Cyanine 3 (Cy3), Cyanine 5 (Cy5) zugegeben und im Dunkeln bei RT über 90 Minuten inkubiert. Die Zellkerne wurden mit 4,6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) angefärbt. Nach wiederholtem Waschen mit PBS und zuletzt mit destilliertem Wasser wurden die Schnitte mit Immu-Mount-Medium eingedeckelt. Die Immunhistochemie-Schnitte wurden anschließend fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Die Anregungswellenlänge war hierbei abhängig vom eingesetzten Sekundärantikörper. Über die digitale Kamera des Mikroskops wurden jeweils Aufnahmen in 10- und 20-facher Vergrößerung angefertigt. Aufgrund ihrer Eigenfluoreszenz konnten die molekularen Tracer EB und FD im entsprechenden Kanal des Mikroskops detektiert werden.

7.2.8 Quantitative Bildanalyse

Das Programm Image J[®] des National Institutes of Health wurde zur quantitativen Analyse der Immunfluoreszenzbilder verwendet. Unter Bildung des Integrals der fluoreszierenden Bildpunkte wurde die Anzahl der Pixel pro Aufnahme berechnet.

7.2.9 Analyse der Extravasation von Tracermolekülen in Homogenaten

Um die Ergebnisse aus der qualitativen Bildanalyse zu bestätigen und eine genauere Quantifikation der molekularen Tracer im Hirngewebe zu erreichen, erfolgte die Analyse der Extravasation fluoreszierender Moleküle in Hirnhomogenaten. Die Hirne wurden entnommen, gewogen und mit Hilfe des Dispomix Homogenisators homogenisiert. Die Fixierung erfolgte in 600 µl N,N-Dimethylformamid, falls dem Tier EB injiziert wurde, bzw. in 500 µl PBS, falls es sich um ein FD-Hirn handelte. Anschließend wurde die Proben bei 21.000 U/min 30 Minuten lang zentrifugiert. Die Überstände wurden jeweils in Triplikaten à 100 µl in eine schwarze, lichtundurchlässige 96-well Platte überführt. Die EB-Fluoreszenzmessung erfolgte mit Hilfe des Tecan Microplate Reader[®] bei einer Exzitationswellenlänge von 620 nm und einer Emissionswellenlänge von 680 nm. Für FD wurde eine Exzitationswellenlänge von 490 nm und eine Emissionswellenlänge von 520 nm verwendet. Der EB bzw. FD-Gehalt wurde anhand der Standardkurve errechnet und bezogen auf das Hirngewicht als Mikrogramm pro Gramm angegeben.

7.2.10 Kapillarisolierung und Endothelzellpräparation

Die Kapillarisolierung der Maushirne wurde nach Protokoll und mit freundlicher Unterstützung der Arbeitsgemeinschaft Blasig des Forschungsinstituts für Molekulare Pharmakologie Berlin durchgeführt. Nach der Hirnentnahme wurden Cerebellum und olfaktorischer Bulbus entfernt. Die Gehirne wurden auf Filterpapier ausgerollt, um das Hirn von den Meningen zu trennen. Außerdem wurde die sichtbare weiße Substanz mit einer Pinzette abgetragen. Im Anschluss wurden die Hirne in 5 ml Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) getaucht und homogenisiert. Nachdem weitere 5 ml einer am Tag zuvor präparierten 32%igen Dextran in DMEM Lösung hinzugefügt wurden, wurden die Proben bei 4500 x g und 4 °C für 15 Minuten zentrifugiert. Die Myelinschicht sowie der Überstand konnten nachfolgend entfernt werden. Es erfolgte die erneute Lösung in 5 - 10 ml DMEM mit anschließender Zentrifugation bei 1500 x g bei 4 °C für 10 Minuten.

Nach erneuter Resuspension in DMEM konnte die Probe über einen 40 µm Nylon Filter filtriert werden. Der Filter wurde mit 5 ml DMEM gewaschen. Anschließend wurden die Kapillaren bei 1000 x g bei 4 °C über 10 Minuten pelletiert. Die kapillarenhaltigen Pellets wurden zum einen bei -80 °C kryokonserviert, sodass zum gegebenen Zeitpunkt die Aufarbeitung der Gesamt-RNA erfolgen konnte. Zum anderen wurden die Pellets mit 100%igem, eiskaltem Aceton auf Objektträgern fixiert, wonach eine immunhistochemische Markierung entsprechender Moleküle erfolgen konnte.

7.2.11 TUNEL-Färbung

Apoptotische Zellen wurden mittels terminal desoxynucleotidyl transferase -mediated dUTP-biotin nick end labeling (TUNEL)-Assay detektiert. Hierzu wurde das ApopTag® Red In Situ Apoptosis Detection Kit verwendet. Die Markierung apoptotischer Zellen erfolgte, indem die freien 3'-OH Enden der DNA-Strangbrüche enzymatisch mit modifizierten fluoreszierenden Nukleotiden versehen worden sind. Die Gefrierschnitte der Maushirne wurden hierzu mit 4%igem PFA über 10 Minuten bei RT fixiert. Im Anschluss erfolgte eine dreimalige Waschung über je fünf Minuten mit PBS. Nach einer weiteren Fixierung in einem 2:1 Gemisch aus eiskaltem Ethanol mit 100%iger Essigsäure über 5 Minuten und folgender dreimaliger Waschung mit PBS wurde den Schnitten zunächst 30 µl eines Equilibration Buffers über 10 Sekunden bei RT zugefügt. Für die enzymatische Reaktion wurde nach Absaugen die Working Strength Terminale Desoxyribonucleotidyltransferase (TdT) Enzyme-Lösung hinzugefügt, bestehend zu 77 % aus Reaction Buffer und zu 33 % aus TdT Enzymen. Die Inkubation erfolgte über die nächsten 24 Stunden bei 37 °C. Am nächsten Tag wurde die enzymatische Reaktion durch wiederholte Waschung mit PBS sowie einer Inkubation mit dem Stop/Wash Buffer und PBS Anti-Digoxigenin Konjugate gestoppt. Die Schnitte ließ man hierfür über 30 Minuten bei RT im Dunkeln inkubieren. Im Anschluss wurden sie viermalig mit PBS je 2 Minuten gewaschen. Zum Schluss wurde die DAPI-Kernfärbung und zur Sichtbarmachung apoptotischer Endothelien bzw. Perizyten die PECAM1- und Desmin-Färbung wie oben beschrieben fortgesetzt. Die Anzahl apoptotischer Zellen wurde pro region of interest (ROI) manuell anhand der Immunfluoreszenz-Bilder ausgezählt. Hierbei wurden die Zellen als apoptotisch gewertet, die sowohl für DAPI, den Apoptosemarker und den Zellmarker, d.h. Desmin für Perizyten, positiv waren.

7.2.12 Extraktion von Gesamt-RNA aus Kapillaren

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus den kryokonservierten Gehirnkapillaren wurde mit Hilfe des RNeasy-Mini-Kits durchgeführt. Die Präparation erfolgte bei RT. Die kryokonservierten Kapillaren-Pellets wurden hierfür zunächst im Guanidinthiocyanat-haltigem Homogenisierungspuffer lysiert (RLT-Puffer). Zur optimalen Homogenisierung wurde das gelöste Pellet durch eine 20 Gauge Nadel dreimal hindurchgezogen. Zur weiteren Verarbeitung wurde das Zellhomogenat in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, mit 70% (v/v) Ethanol (p.a) versetzt und durch Auf- und Abpipettieren vermischt. Nach Überführen des Homogenats auf eine Säule erfolgte 15-sekündiges Zentrifugieren bei 13000 UpM. Der Durchfluss wurde entfernt, die Säule mit Eluierungspuffer (RW1-Puffer) versetzt und bei 13000 UpM über weitere 15 Sekunden eluiert. Im Anschluss wurden zwei Waschschrte mit dem zuvor mit Ethanol versetzten RPE-Puffer durchgeführt. Die Säule wurde 2 Minuten lang leer bei 13000 UpM zentrifugiert und getrocknet. Es folgte zweifaches Eluieren mit je 20 µl RNase-freiem Wasser zur Lösung der Gesamt-RNA von der Säule.

7.2.13 Konzentrationsbestimmung von RNA

Die Konzentrationsbestimmung der Gesamt-RNA erfolgte gleich im Anschluss an die Isolierung photometrisch mit Hilfe des TECAN infinite M200. Hierzu wurde die Absorption bei 260 nm und 280 nm auf einer Platte gemessen. Der Absorptions-Quotient A260/A280 zeigte Verunreinigungen mit Proteinen an und lag optimalerweise zwischen 1,7 und 2,0.

7.2.14 Reverse Transkription

Die RNA wurde mit Hilfe des Onestep RT-PCR Kits in cDNA revers transkribiert. Zunächst wurde die zuvor gewonnene Gesamt-RNA denaturiert. Der reverse Transkriptions-Primer wurde im nächsten Schritt angelagert. Katalysiert durch die MultiScribe™ Reverse Transkriptase wurde anschließend die reverse Transkription durchgeführt. Dabei galten folgende Bedingungen: Die genomische DNA wurde über 2 Minuten bei 42 °C mit Hilfe des Whipeout Buffers entfernt. Nach Zugabe der Primer und der reversen Transkriptase lief die reverse Transkription über 30 Minuten bei 42 °C. Anschließend wurde sie bei 95 °C über eine Minute gestoppt.

7.2.15 Quantitative real-time PCR

Zunächst wurde ein Mastermix unter Verwendung des Premix ex Taq Perfect Real Time Kits hergestellt. Dieser beinhaltet die jeweiligen Primer (100 pmol/1,5 µl/Reaktion), ddH₂O (3,5 µl/Reaktion) und das SYBR Green (12,5 µl/ Reaktion). Je 20 µl des Mastermixes wurden in Triplets in die 96well Reaktionsplatte pipettiert und mit 5 µl cDNA (25 ng/µl) vermischt. Entsprechend der Programmierung des Standardprotokolls der real-time PCR-Maschine wurde die PCR-Reaktion über 40 Zyklen ausgeführt. Der threshold cycle (Ct) wurde mittels ABI PRISM 7300 SDS Software (relative quantification study) bestimmt.

Die Genexpression eines untersuchten Gens wurde auf die Expression des Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase-Gens (GAPDH) mit Hilfe folgender Formel normalisiert:

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT \text{ Target} - \Delta CT \text{ GAPDH.}$$

7.2.16 Statistische Auswertung

Zur statistischen Analyse wurde das Programm GraphPad Prism© verwendet. Die Daten wurden mittels One-Way Analysis of Variance (ANOVA)-Test analysiert und mittels Bonferroni bzw. Tukey's multiple comparisons test korrigiert. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte als Mittelwert \pm Standardabweichung. Ein p-Wert <0,05 (*) wurde als signifikant angenommen. Aus Gründen der knappen Verfügbarkeit der IL6 KO-Tiere wurde in den Experimenten der EB-Extravasation, der FD-Extravasation sowie der Analyse des Anteils von Claudin-5 bzw. Occludin pro PECAM1 auf eine IL6 KO-Kontrollgruppe verzichtet.

8 Ergebnisse

8.1 Nachweis der SAB mittels HE-Färbung und MRT

Nach der Operation wurde die SAB auf unterschiedliche Weise nachgewiesen. Zum einen war, wie in Abb. 3A zu sehen, bereits nach der Hirnentnahme ein Blut-Koagulat auf der basalen Seite des Maushirns zu erkennen. Um im Nachfolgenden zu bestätigen, dass eine SAB stattgefunden hatte, wurden HE-Färbungen durchgeführt. Wie in Abb. 3B dargestellt, war hierbei das Blut lichtmikroskopisch dunkel-rötlich im Subarachnoidalraum der koronaren Hirnschnitte erkennbar. Zur weiteren Sicherstellung einer SAB wurden MRT-Aufnahmen angefertigt, um die Blutung bildmorphologisch darzustellen (Abb. 4).

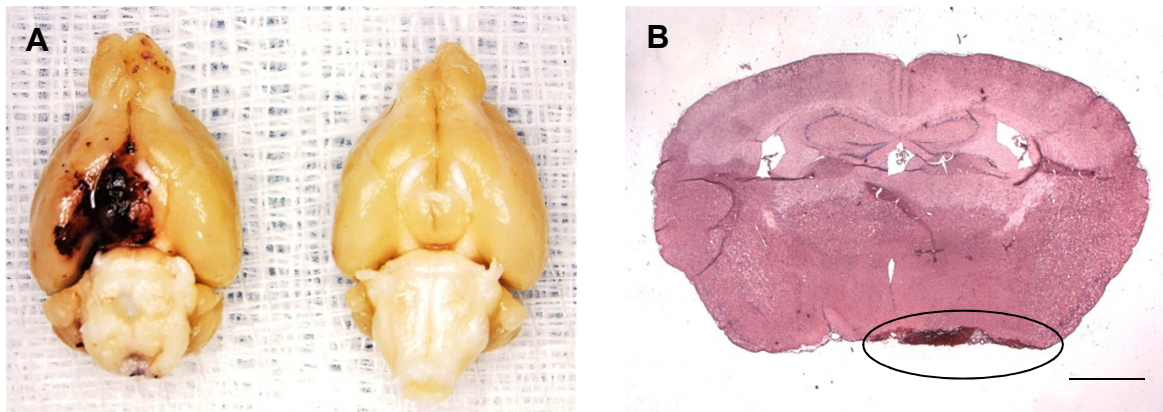


Abbildung 3: Makroskopischer und mikroskopischer Nachweis der stattgehabten SAB. **A** Die Hirnentnahme erfolgte an Tag 4 post OP. Links: Hirn einer WT-Maus nach SAB. Rechts: SHAM-Kontrolltier. **B** Histologischer Nachweis einer SAB mittels HE-Färbung im Koronarschnitt eines Maushirns. Die Blutung ereignete sich außerhalb des Hirnparenchyms im Subarachnoidalraum. Das Blut war hier basal als dunkelrötliche Struktur im subarachnoidalen Kompartiment erkennbar. Maßstab: 1mm.

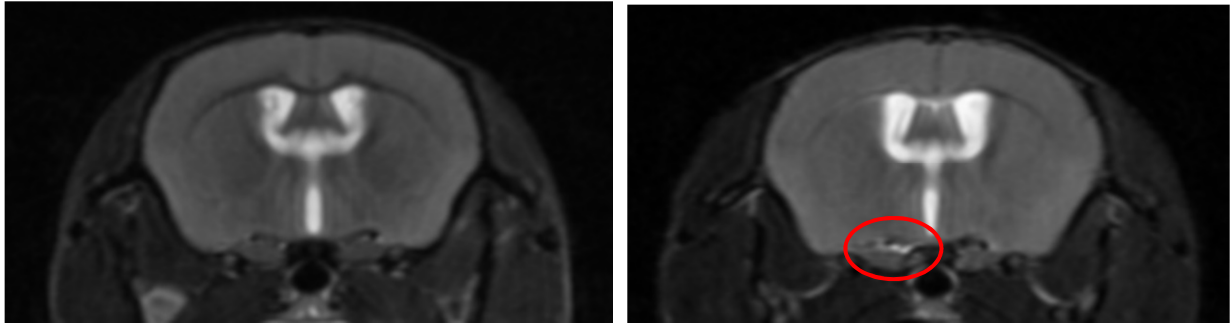


Abbildung 4: Bildmorphologische Darstellung der SAB mittels MRT. MRT-Aufnahmen eines SHAM Kontrolltiers (links) und eines WT SAB-Tiers 48 Stunden nach stattgehabter Blutung. Das Blut stellte sich in der MRT basal als hyperintense Struktur dar.

8.2 Zeitabhängige Hochregulation der IL6-Genexpression im BHS-Endothel nach SAB

Hirnkapillaren von WT-Mäusen wurden an Tag 1, 2 und 4 nach SAB isoliert und auf die Genexpression von IL6 mittels qPCR untersucht. Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen aus Abb. 5 zeigen die grünen IL6-Vesikel kolokalisiert an zerebralen Kapillaren (rot). Bereits auf den Bildern erkennt man deutlich mehr gefäßassoziierte IL6-Vesikel bei SAB-operierten Tieren als bei SHAM-Kontrollen. Wie in Abb. 6 dargestellt, nahm die Genexpression des Zytokins zeitabhängig nach SAB signifikant zu, wobei die stärkste Hochregulation 4 Tage nach der Operation festgestellt werden konnte. Bei SAB-operierten WT nahm sie im Vergleich zu SHAM an Tag 1 um das $1,2 \pm 0,85$ -fache, an Tag 2 um das $2,12 \pm 0,09$ -fache und an Tag 4 um das $2,66 \pm 0,47$ -fache zu. Um den Einfluss des IL6 auf die BHS-Eigenschaften näher zu charakterisieren, wurden die weiteren Experimente sowohl an WT als auch an IL6 KO-Mäusen durchgeführt.

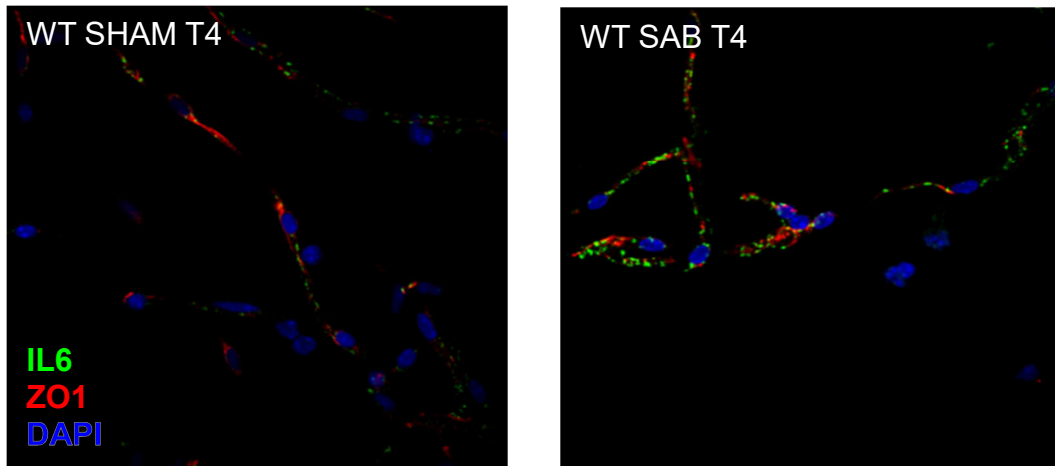


Abbildung 5: IHC-Färbung von Hirnkapillaren mit kolocalisiertem IL6. Die Kolokalisation der IL6-Vesikel (grün) an Hirnkapillaren (rot) war bei WT nach SAB erkennbar. Als Marker für Endothelien wurde das TJ-Protein ZO1 gewählt. Mit freundlicher Genehmigung zur Verfügung gestellt von Dr. Kinga Blecharz-Lang.

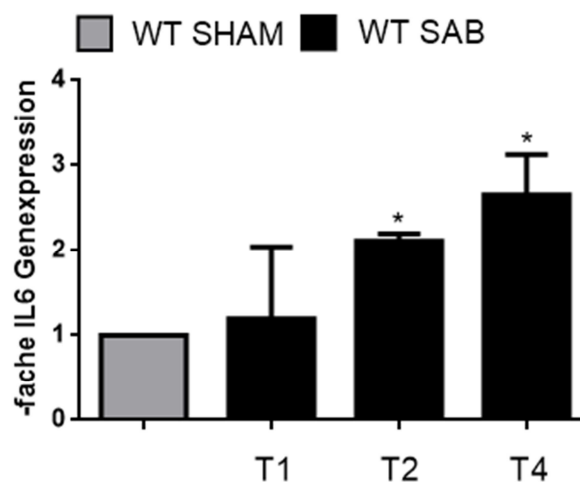


Abbildung 6: Zerebrovaskuläre Expression von IL6 nach SAB. Hirnkapillaren wurden nach SAB in WT-Mäusen isoliert und mittels qPCR auf die Expression von IL6 untersucht. Die endothelzellspezifische Genexpression des IL6 stieg in WT zeitabhängig nach SAB an im Vergleich zur SHAM-Kontrolle. One-way ANOVA. * $p < 0.05$. $n = 3$ pro experimentelle Gruppe.

Anhand der hier dargestellten Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass eine experimentell induzierte SAB die Expression des proinflammatorischen Zytokins IL6 in WT-Mäusen zeitabhängig nach der Blutung hochreguliert.

8.3 Dynamik des BHS-Zusammenbruchs

8.3.1 Größte BHS-Öffnung an Tag 4 nach SAB

Um den Einfluss des SAB-induzierten IL6-Anstiegs auf den Zusammenbruch der BHS nachzuweisen, wurden neben WT- auch IL6 KO-Mäuse in die Experimente eingeschlossen. WT SHAM-Mäuse wurden als Kontrollgruppe operiert. Mittels Injektion von zwei Fluoreszenz-gekoppelten Tracern unterschiedlicher Molekulargröße (4 und 70 kDa) wurde die Permeabilität der BHS untersucht. Um eine Übersicht über das Ausmaß des BHS-Zusammenbruchs zu gewinnen, wurde die Extravasation dieser Moleküle zu unterschiedlichen Zeitpunkten gemessen. Dabei wurde der Austritt der Tracer zunächst qualitativ anhand fluoreszenzmikroskopischer Aufnahmen, dann quantitativ in Hirnhomogenaten ausgewertet. Die Injektion der Extravasationsmarker EB und FD erfolgte vor der Hirnentnahme. Nach der Aufarbeitung der Gehirne wurden die jeweiligen IHC-Färbungen durchgeführt. Bei WT-Mäusen ließen die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen erkennen, dass EB aus den Blutgefäßen in das umliegende Gewebe an Tag 1, 2, 4 und 7 nach SAB übertrat (Abb. 7). Die Extravasation stieg vom ersten bis zum vierten Tag hin an. Zu diesem Zeitpunkt konnte die stärkste Extravasation des Tracers in das umliegende Hirnparenchym beobachtet werden. An Tag 7 post SAB nahm sie wiederum ab. Bei den entsprechenden SHAM-Tieren war hingegen kein Austritt von EB aus dem Blutgefäßsystem zu sehen (Abb. 7).

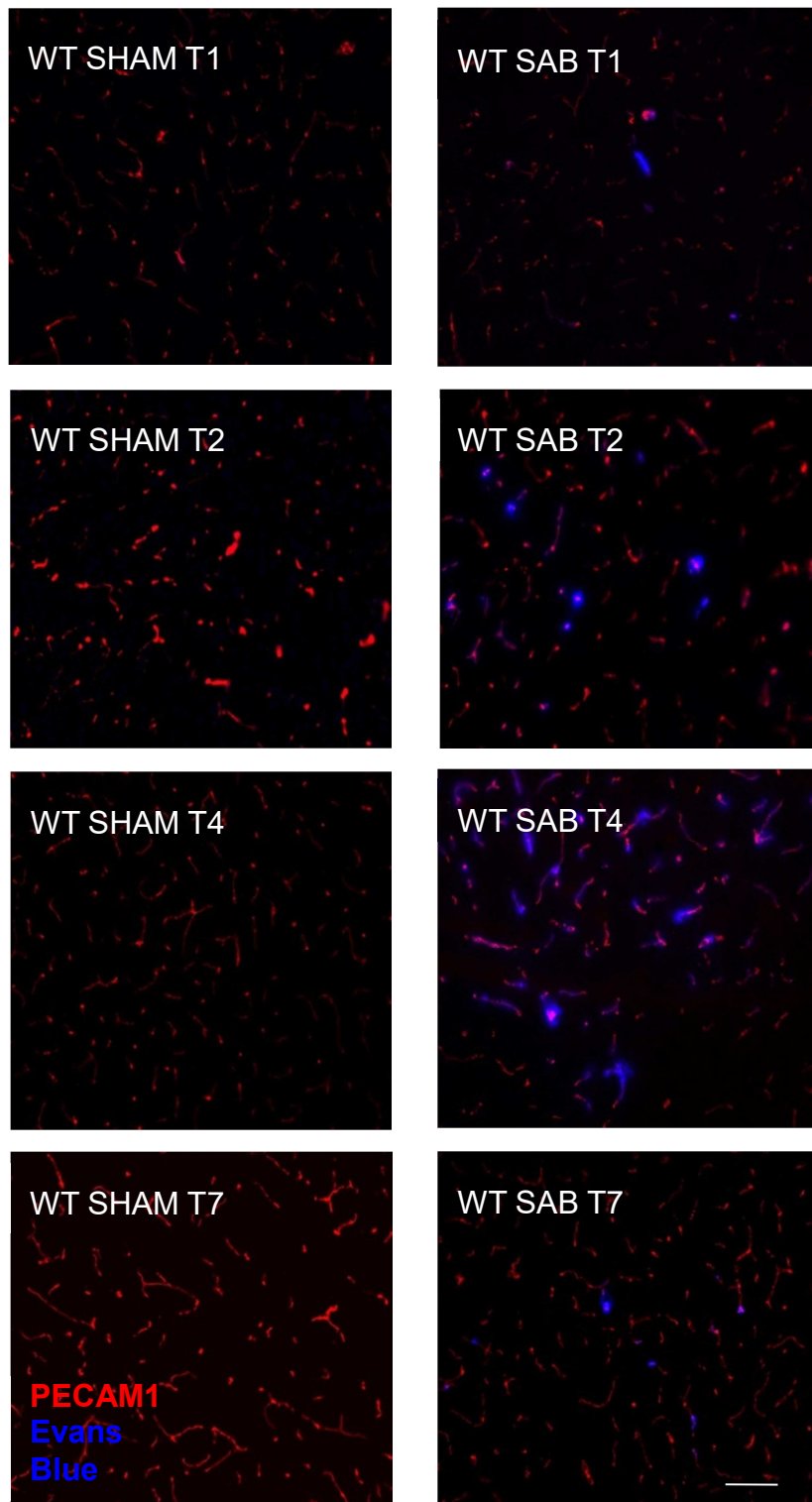


Abbildung 7: Extravasation von EB nach SAB. IHC-Aufnahmen des Blutgefäßspezifischen PECAM1 (rot) sowie des Tracers EB (blau). Links die Aufnahmen der SHAM-Tiere, rechts die der SAB-Mäuse. Die EB-Extravasation war an Tag 1 nach SAB gering, während sie an Tag 2 deutlich anstieg. An Tag 4 erreichte sie ihr Maximum, wohingegen sie an Tag 7 nahezu auf das Level von Tag 1 fiel. EB war bei SHAM-operierten Tieren nicht im Hirngewebe erkennbar. Maßstab: 70 µm.

8.3.2 IL6-vermittelter Anstieg der BHS-Permeabilität nach SAB

Während WT SAB-Mäuse eine erhöhte Permeabilität der BHS aufwiesen, konnte die Extravasation von EB bei IL6 KO-Mäusen mittels Fluoreszenzmikroskopie nur in geringem Ausmaß beobachtet werden. Repräsentativ dargestellt sind IHC-Aufnahmen von Tag 4 nach SAB, da an diesem Tag bei WT die stärkste Extravasation beobachtet werden konnte. Das blaumarkierte Tracermolekül stellte sich beim WT-Tier deutlich perivaskulär dar. Beim IL6 KO war dies nicht zu beobachten (Abb. 8).

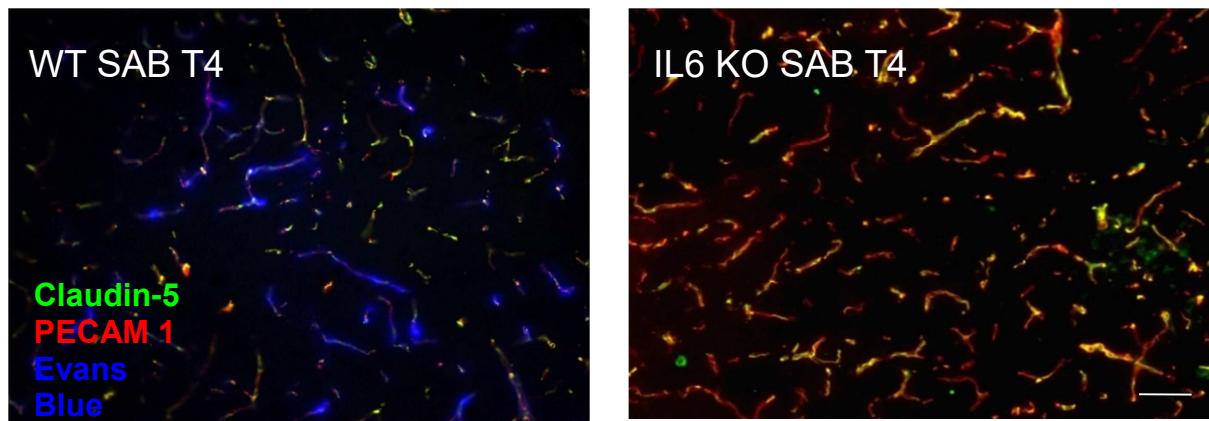


Abbildung 8: EB-Extravasation nach SAB in WT und IL6 KO-Tieren. Repräsentative IHC-Aufnahmen des Blutgefäß-spezifischen PECAM1 (rot), des TJ-Moleküls Claudin-5 (grün) sowie EB (blau) an Tag 4 nach SAB. Links die Aufnahme eines WT SAB-Tiers an Tag 4, worauf das in Hirngewebe extravasierende EB zu sehen ist. Rechts im Vergleich die Aufnahme eines IL6 KO SAB-Tiers an Tag 4. EB ist hier kaum im Hirngewebe erkennbar. Maßstab: 50µm.

8.4 Einfluss einer IL6-Defizienz auf den Durchtritt fluoreszierender Tracer

8.4.1 IL6-Defizienz verhindert die Passage von EB 70 kDa

Um die mikroskopisch beobachteten Ergebnisse zu quantifizieren, wurden Fluoreszenzmessungen an Hirnhomogenaten durchgeführt. Hierbei wurde der Gehalt an EB pro Gramm Hirngewicht detektiert und ins Verhältnis zu der in WT SHAM-Tieren gemessenen EB-Fluoreszenz gesetzt. Die Ergebnisse sind in Abb. 9 dargestellt. An Tag 1 nach SAB konnte bei WT ein $1,8 \pm 0,57$ -facher Anstieg im Vergleich zur Kontrolle, an Tag 2 ein $1,74 \pm 0,78$ -facher, an Tag 4 ein $2,73 \pm 1,43$ -facher und an Tag 7 ein $1,74 \pm 1,13$ -facher Anstieg der EB-Extravasation beobachtet werden. Bei den IL6 KO-Tieren zeigten sich lediglich geringe Unterschiede bezüglich der Extravasation im Vergleich zur entsprechenden Kontrolle. An Tag 1 ein $0,85 \pm 0,28$ -facher, an Tag 2 ein $1,14 \pm 0,27$ -facher, an Tag 4 ein $1,18 \pm 0,31$ -facher und an Tag 7 ein $0,71 \pm 0,03$ -facher Anstieg.

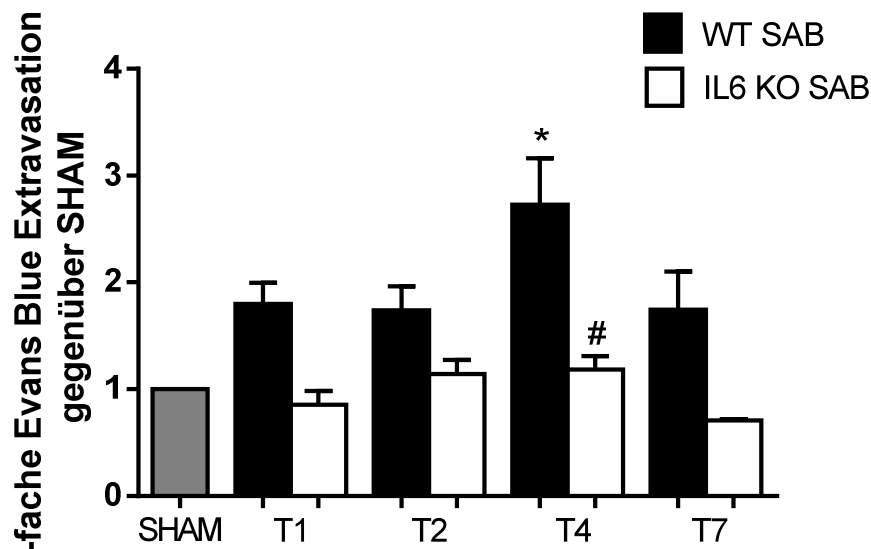
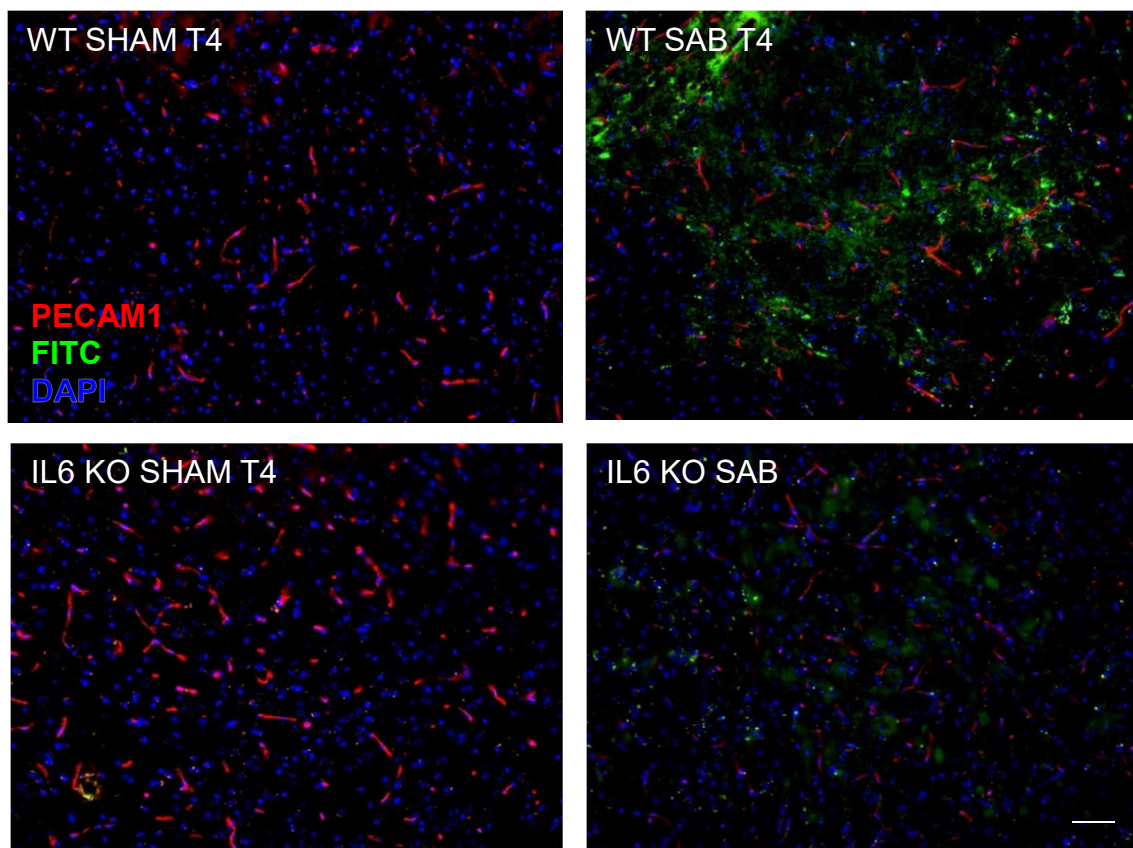


Abbildung 9: Quantifizierung der EB-Extravasation in Hirnhomogenaten. Die Extravasation von EB wurde im Verhältnis zur WT-Kontrollgruppe angegeben. Bei WT-SAB Tieren konnte im Vergleich zur Kontrollgruppe an Tag 4 eine um ein $2,73$ -fach gestiegene Extravasation post SAB festgestellt werden. Diese EB-Extravasation wurde in IL6 KO-Tieren nahezu unterbunden. One-way ANOVA. * $p < 0.05$. * Signifikanz bezogen auf SHAM. # Signifikanz bezogen auf WT SAB. WT: T1 n = 8, T2 n = 12, T4 n = 11, T7 n = 10, IL6KO T1 n = 5, T2 n = 4, T2 n = 5, T4 n = 6, T7 n = 4.

8.4.2 IL6-Defizienz kann die Passage von FD 4 kDa nicht unterbinden

Die Extravasation des 4 kDa großen Moleküls FD wurde ebenfalls fluoreszenzmikroskopisch in Hirnschnitten von WT und IL6 KO-Mäusen an Tag 4 post SAB untersucht, da sich dieser Zeitpunkt in vorangegangenen Experimenten (s.o.) als der Tag der stärksten BHS-Öffnung herausgestellt hatte. Abb. 10A zeigt die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der FD-Extravasationsexperimente. Hier ist zu sehen, dass FD besonders stark bei WT SAB-Mäusen in das Hirngewebe übergetreten ist. Jedoch konnte auch bei IL6 KO SAB-Tieren eine gewisse Menge FD im Hirnparenchym detektiert werden. Diese fiel allerdings geringer aus als bei den WT-Tieren. Bei WT wurde an Tag 4 nach SAB eine $1,38 \pm 0,22$ -fach höhere, bei IL6 KOs eine $1,27 \pm 0,23$ -fach höhere FD-Extravasation im Vergleich zur SHAM-Kontrollgruppe festgestellt (vgl. Abb. 10B).

A



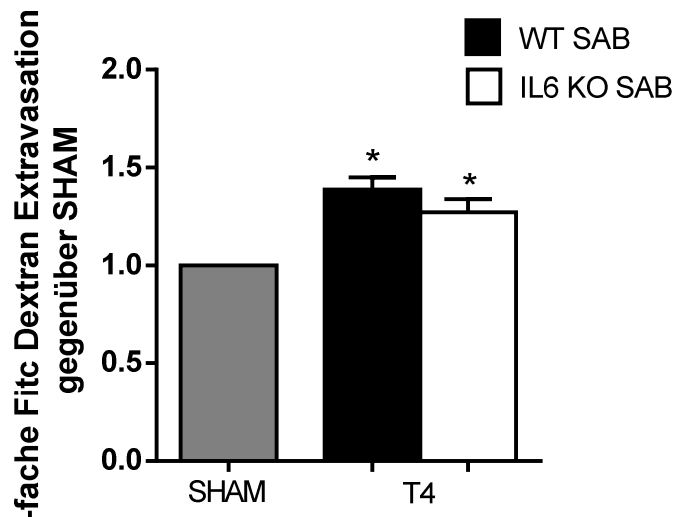
B

Abbildung 10: FD-Extravasation nach SAB in WT und IL6 KO-Tieren. **A** IHC-Aufnahmen des molekularen Tracers FD (grün) sowie der zerebralen Blutgefäße gefärbt mit PECAM1 (rot). Obere Zeile: Die Aufnahmen zeigen die Extravasation von FD in das Hirngewebe an Tag 4 nach SAB bei WT-Tieren (rechts) im Vergleich zur SHAM-Kontrolle. Untere Zeile: Auch bei IL6 KO-Mäusen ist FD im umliegenden Gewebe zu erkennen, jedoch in geringeren Mengen als bei WT. Sowohl WT als auch IL6 KO SHAM-Tiere weisen kaum FD-Extravasation auf. Maßstab: 50 μ m. **B** Quantifizierung der FD-Extravasation in Hirnhomogenaten. Die Extravasation von FD wurde im Verhältnis zur WT-Kontrollgruppe angegeben. Sowohl bei WT als auch bei IL6 KO-Tieren konnte nach SAB eine signifikant erhöhte Extravasation im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden. One-way ANOVA. * $p < 0.05$. * Signifikanz bezogen auf SHAM. WT und IL6 KO n = 6 pro experimentelle Gruppe.

Die dargestellten Ergebnisse zeigen, dass IL6 im Rahmen der SAB-induzierten Permeabilitätssteigerung eine wichtige Rolle spielt. Unter Ausschaltung dieses Zytokins im proinflammatorischen Milieu nach SAB wird die Extravasation von Makromolekülen unterbunden, während kleinere Moleküle von 4 kDa die BHS weiterhin passieren können.

8.5 IL6-Defizienz reduziert die Ausbildung eines Hirnödems nach SAB

Im Folgenden wurde analysiert, ob aufgrund der BHS-Störung auch die Ausbildung eines Hirnödems bei WT stärker ausfällt. Die in Abb. 11 dargestellten MRT-Aufnahmen zeigen die Ausprägung des Hirnödems in WT- und IL6 KO-Tieren. WT wiesen am vierten postoperativen Tag ein deutlich stärker ausgeprägtes Hirnödem auf als IL6 KOs. Mit der in der Methodik erwähnten Formel wurde der Hirnwassergehalt ermittelt, womit die Ausprägung des Hirnödems quantifiziert werden konnte (Abb. 12). WT-SAB Tiere wiesen an Tag 4 einen Hirnwassergehalt von $79,04 \pm 1,44$ % auf im Vergleich zu WT SHAM-Tieren mit $75,26 \pm 1,12$ %. Dies entspricht einer Steigerung des Hirnwassergehalts von $3,79 \pm 0,46$ %. Bei IL6 KO-Tieren lag der Hirnwassergehalt nach SAB bei $76,39 \pm 0,48$ %, bei IL6 KO SHAM-Tieren bei $74,96 \pm 0,34$ %. Dies entspricht einer Steigerung von $1,43 \pm 0,5$ %.

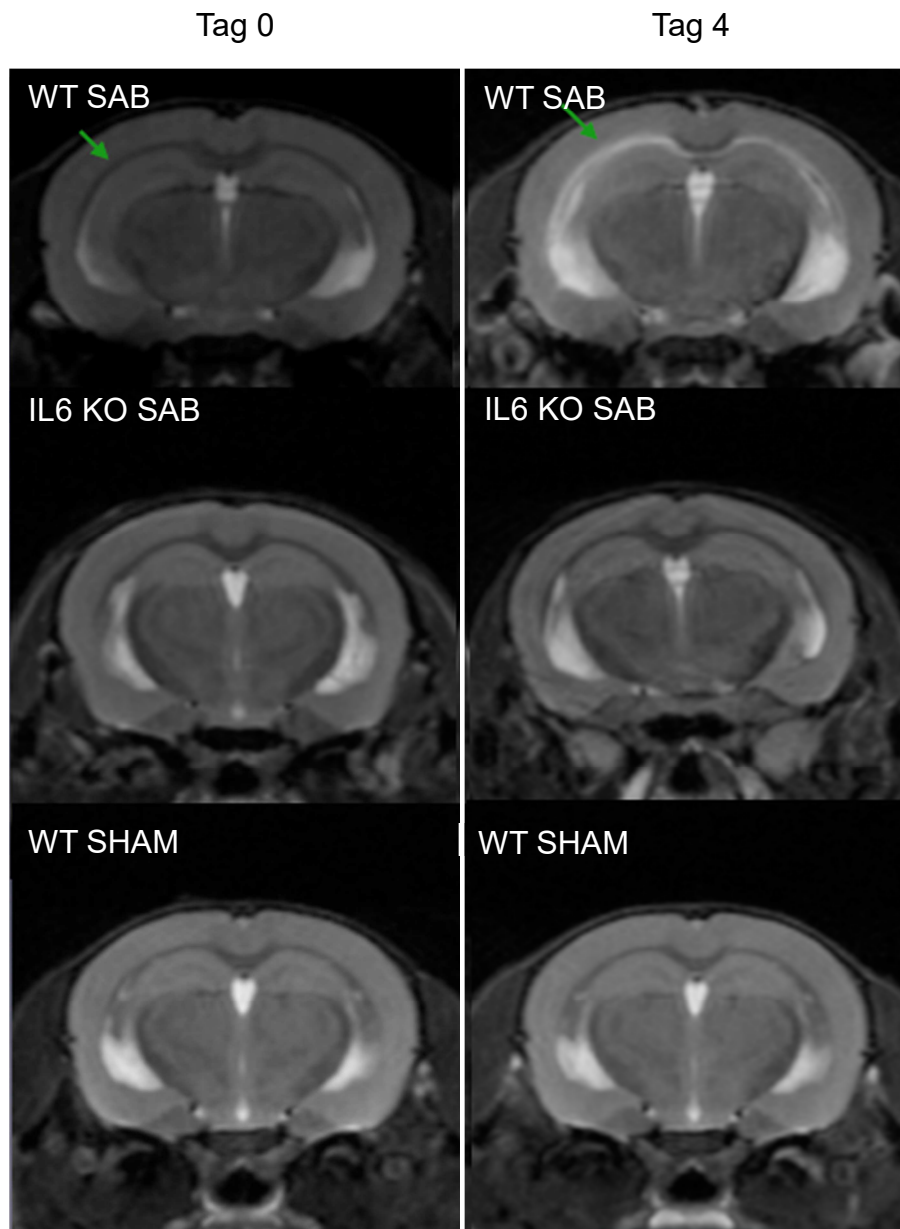


Abbildung 11: MRT-Aufnahmen an Tag 0 und Tag 4 nach SAB. Bei WT-Tieren ist das Hirnödem an Tag 4 deutlich ausgeprägt gewesen (grüner Pfeil). Die IL6 KO-Tiere sowie die Kontrollgruppe wiesen ein weniger stark ausgeprägtes Ödem auf.

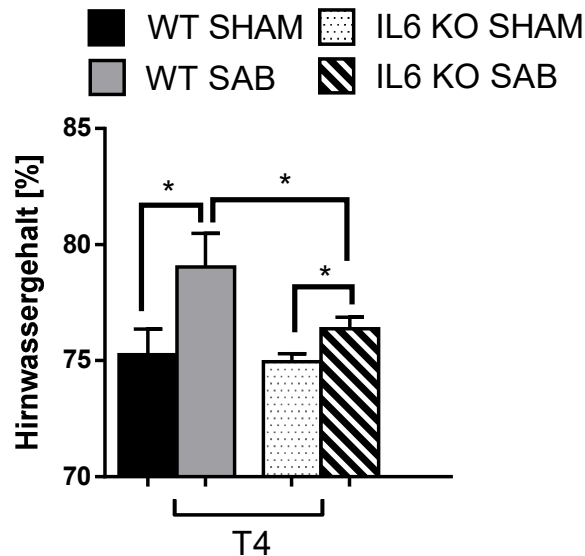


Abbildung 12: Hirnwassergehalt in WT und IL6 KOs nach SAB. Die WT-Tiere zeigten nach SAB einen um $3,78 \pm 0,46$ %, IL6KO-Tiere einen um $1,43 \pm 0,5$ % Punkte höheren Hirnwassergehalt im Vergleich zur respektiven Kontrolle. One-way ANOVA. * $p < 0,05$. WT $n = 5$, IL6 KO $n = 4$ pro experimentelle Gruppe.

Die hier dargestellte Analyse des Hirnwassergehalts macht deutlich, dass IL6 einen verstärkenden Effekt auf die Ausprägung des Hirnödems nach SAB hat.

8.6 Einfluss von IL6 auf die endotheliale Expression von Zell-Zell-Kontakten

8.6.1 Endotheliale Expression von Claudin-5

Um zu überprüfen, ob die Extravasation der molekularen Tracer mit einem veränderten TJ-Expressionsmuster einhergeht, wurden Hirnkapillaren der WT und IL6 KOs isoliert und mittels qPCR auf die Genexpression der wichtigen TJ-Proteine Claudin-5 und Occludin untersucht. Da die vorangegangenen Experimente bestätigten, dass die Permeabilität der BHS an Tag 4 nach SAB am größten war, konzentrierten sich die folgenden Experimente auf diesen Zeitpunkt. Wie Abb. 13 verdeutlicht, konnte bei WT-Mäusen eine $0,68 \pm 0,16$ -fache Reduzierung der Claudin-5-Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden. Bei IL6 KO-Mäusen konnten keine signifikanten Unterschiede bezüglich eines veränderten Expressionsmusters festgestellt werden.

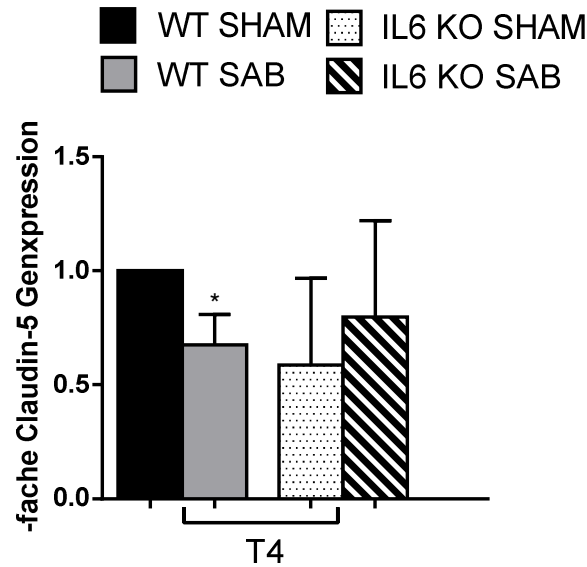


Abbildung 13: Zerebrovaskuläre Expression von Claudin-5 nach SAB. An Tag 4 nach SAB wurde die Claudin-5 Expression in WT-Mäusen nach SAB herunterreguliert. In IL6 KO-Mäusen konnte keine signifikante Reduzierung beobachtet werden. One-way ANOVA. * $p < 0,05$. * Signifikanz bezogen auf WT SHAM. WT $n = 4$, IL6 KO $n = 3$ pro experimentelle Gruppe.

8.6.2 Endotheliale Expression von Occludin

Auch die Occludin-Expression reduzierte sich bei WT an Tag 4 nach SAB um das $0,55 \pm 0,22$ -fache bezogen auf die Kontrollgruppe. Die IL6 KO-Tiere wiesen nach SAB eine $1,79 \pm 0,14$ -fache Steigerung der Occludin-Expression im Vergleich zur IL6 KO SHAM- Kontrolle auf (Abb.14). Verglichen mit den WT-Tieren war die Occludin-Expression bei IL6 KO-Tieren nach SAB um $2,25 \pm 0,18$ -fach erhöht.

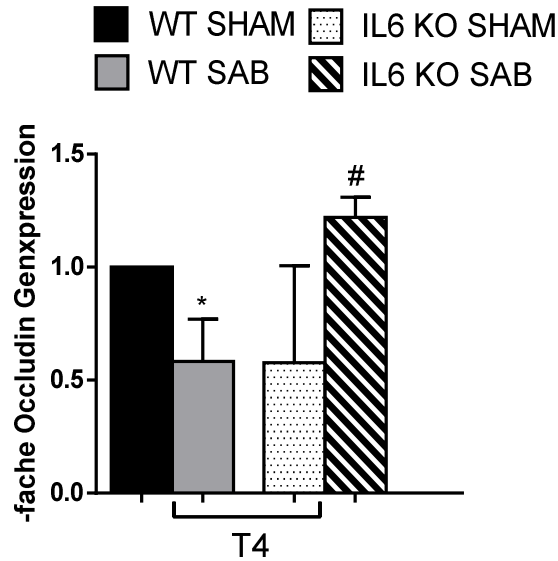
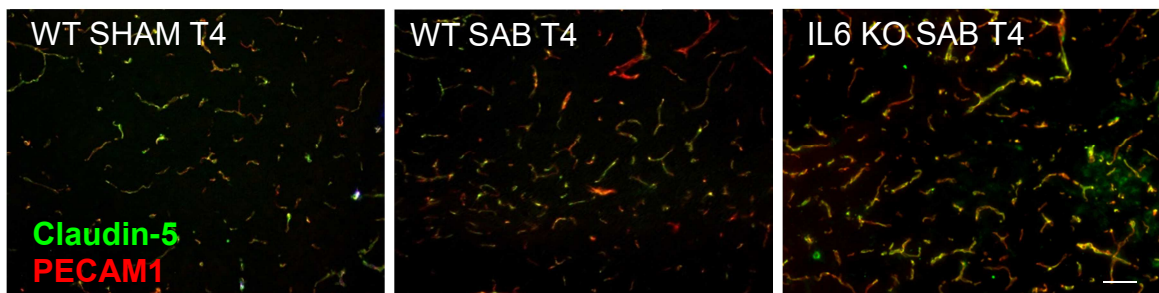


Abbildung 14: Zerebrovaskuäre Expression von Occludin nach SAB. Bei WT-Mäusen wurde Occludin nach SAB signifikant herunterreguliert. Bei IL6 KO-Mäusen kam es nach SAB zu einer vermehrten Occludin-Expression im Vergleich zur respektiven Kontrolle. One-way ANOVA. $^{*/#}p < 0,05$. * Signifikanz bezogen auf WT SHAM. # Signifikanz bezogen auf WT SAB. WT n = 4, IL6 KO n = 3 pro experimentelle Gruppe.

8.6.3 Rekonstitution von Claudin-5 in IL6 KOs nach SAB

Um diese Ergebnisse auf Proteinebene zu bestätigen, wurden IHC-Färbungen von Claudin-5 und Occludin (jeweils grün) an Hirnschnitten durchgeführt (Abb. 15A und 16A). Die detektierten Fluoreszenzen wurden mit Hilfe des Programms ImageJ ins Verhältnis zum ubiquitären Gefäßmarkers PECAM1 (rot) gesetzt und analysiert (Abb. 15B und 16B). Bei SHAM-operierten Mäusen wurde das Claudin-5/PECAM1-Verhältnis gleich 1 gesetzt. Bei WT konnte nach SAB eine signifikante Minderung des Claudin-5/PECAM1-Verhältnisses beobachtet werden. In WT reduzierte sich das Claudin-5/PECAM1-Verhältnis je signifikant an Tag 2 auf $61,52 \% \pm 14,66 \%$, an Tag 4 post SAB auf $67,5 \% \pm 14,66 \%$ und an Tag 7 auf $47,19 \% \pm 16,84 \%$ im Vergleich zur SHAM-Kontrolle. Bei den IL6 KO-Tieren zeigte sich an Tag 2 ein Claudin-5/PECAM1-Verhältnis von $85,28 \% \pm 31,48 \%$, an Tag 4 betrug es $70,31 \% \pm 16,09 \%$ und an Tag 7 $97,02 \% \pm 9,83 \%$.

A



B

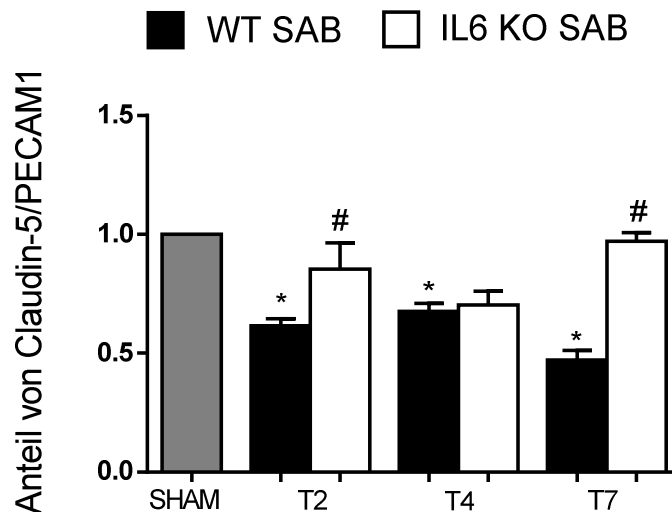
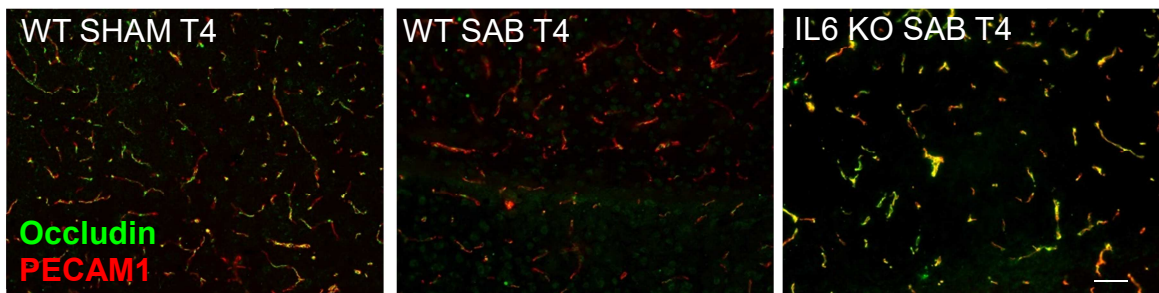


Abbildung 15: Verhältnis des TJ-Proteins Claudin-5 zum ubiquitären Blutgefäßmarker PECAM1 nach SAB. **A** Repräsentative IHC-Bilder von Claudin-5 (grün) und PECAM1 (rot) in WT und IL6 KO-Tieren. Maßstab: 70µm. **B** Bei WT konnte an Tag 2, 4 und 7 nach SAB ein signifikant reduziertes Claudin-5/PECAM1-Verhältnis festgestellt werden. Bei IL6 KOs zeigte sich an Tag 2 und 7 ein im Vergleich zu WT SAB-Tieren signifikant erhöhtes Claudin-5/PECAM1-Verhältnis. Das Verhältnis von Claudin-5/PECAM1 der SHAM-Kontrollgruppe wurde auf 1 normalisiert. One-way ANOVA. */#p<0,05. * Signifikanz bezogen auf SHAM. # Signifikanz bezogen auf WT SAB. WT n = 6, IL6 KO n = 4 pro experimentelle Gruppe.

8.6.4 Keine signifikante Rekonstitution von Occludin in IL6 KOs nach SAB

Auch die Occludin-Expression zeigte sich durch die SAB beeinflusst. Bei WT reduzierte sich das Occludin/PECAM1-Verhältnis auf 83,62 % ± 27,66 % an Tag 2, auf 72,2 ± 25,24 % an Tag 4 und auf 85,23% ±24,34 % an Tag 7 nach SAB im Vergleich zur SHAM-Kontrolle. Bei IL6 KO-Tieren wurde an Tag 2 ein Occludin/PECAM1-Verhältnis von 86,32 % ± 32,56 %, an Tag 4 von 73,13 % ± 14,33 % und an Tag 7 von 84,5 % ± 26,69 % im Vergleich zur SHAM-Kontrolle detektiert. Die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant.

A



B

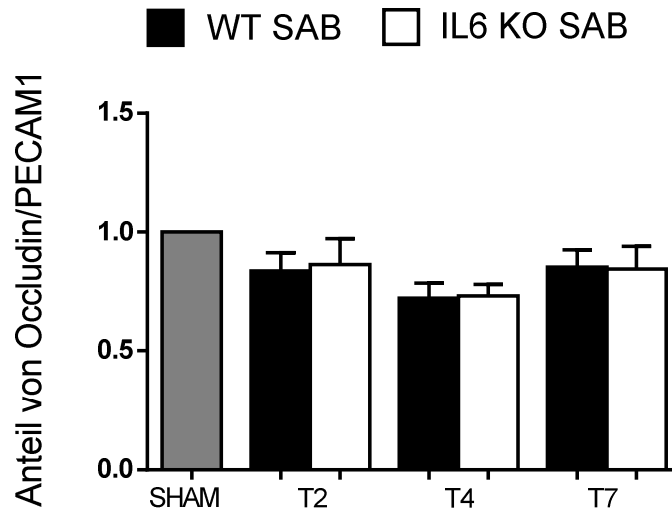


Abbildung 16: Verhältnis des TJ-Proteins Occludin zum ubiquitären Blutgefäßmarker PECAM1 nach SAB. **A** Repräsentative IHC-Bilder von Occludin (grün) und PECAM1 (rot) in WT und IL6 KO-Tieren. Maßstab: 70µm **B** Bei WT wurde im Zeitverlauf nach SAB ein reduziertes Occludin/PECAM1-Verhältnis beobachtet. Bei IL6 KOs konnte an Tag 2 nach SAB ein erhöhtes Occludin/PECAM1-Verhältnis im Vergleich zur SHAM-Kontrolle festgestellt werden. Das Verhältnis Claudin-5/PECAM1 der Kontrollgruppe wurde gleich 1 gesetzt. One-way ANOVA. * $p < 0,05$. * Signifikanz bezogen auf SHAM. WT $n = 6$, IL6 KO $n = 4$ pro experimentelle Gruppe.

Die in diesem Abschnitt demonstrierten Ergebnisse veranschaulichen die SAB-induzierte Herabregulation wichtiger TJ-Proteine am vierten Tag nach stattgehabter Blutung in WT. In IL6 KO-Tieren konnte eine signifikante SAB-assoziierte Reduzierung der TJ-Proteine nicht beobachtet werden.

8.7 Einfluss von IL6 auf die intravaskuläre Inflammation

8.7.1 IL6-Defizienz geht einher mit verminderter TNF α -Expression

Um den Einfluss des IL6 auf die gefäßassoziierte Inflammation zu untersuchen, wurde die endothelzellspezifische Expression von weiteren wichtigen Zytokinen (TNF α und IL1 β) im proinflammatorischen Milieu nach SAB mittels qPCR an isolierten Hirnkapillaren analysiert. Abb. 17 stellt die SAB-induzierte Genexpression von TNF α dar. WT wiesen an Tag 4 eine $2,18 \pm 0,77$ -fach höhere TNF α -Genexpression im Vergleich zur WT-Kontrollgruppe auf. Die IL6 KO SAB-Tiere zeigten zudem eine signifikant niedrigere TNF α -Expression im Vergleich zur IL6 KO-Kontrollgruppe.

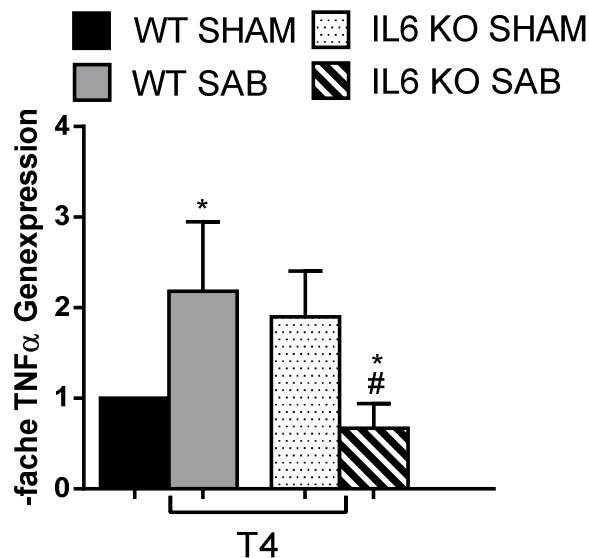


Abbildung 17: Zerebrovaskuläre TNF α -Expression nach SAB. SAB-induziert kam es bei WT zur einer Hochregulation von TNF α . Bei IL6 KO-Mäusen wurde die TNF α -Expression nach SAB hingegen signifikant herunterreguliert. One-way ANOVA. */# $p < 0,05$. * Signifikanz bezogen auf respektive SHAM-Kontrolle. # Signifikanz bezogen auf WT SAB. WT $n = 5$, IL6 KO $n = 3$ pro experimentelle Gruppe.

8.7.2 IL6-Defizienz unterbindet Überexpression von IL1 β

Auch die Genexpression von IL1 β an Tag 4 post SAB wurde durch IL6 beeinflusst. Es konnte eine $2,3 \pm 0,99$ -fache höhere IL1 β -Expression in WT im Vergleich zur WT-Kontrollgruppe beobachtet werden (Abb. 18). In den IL6 KO-Tieren konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontroll- und SAB-Gruppe beobachtet werden.

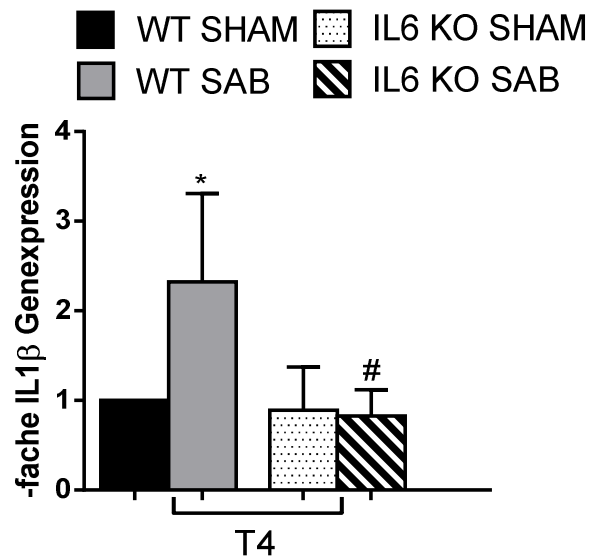


Abbildung 18: Zerebrovaskuläre IL1 β -Expression nach SAB. SAB-induziert kam es bei WT zur einer Hochregulation von IL1 β . IL6 KO-Tiere zeigten bzgl. der IL1 β -Expression nach SAB keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe. One-way ANOVA. */# $p < 0,05$. * Signifikanz bezogen auf respektive SHAM-Kontrolle. # Signifikanz bezogen auf WT SAB. WT $n = 4$; IL6KO $n = 3$ pro experimentelle Gruppe.

Mit den hier dargestellten Ergebnissen wurde demonstriert, dass eine experimentell induzierte SAB die verstärkte Genexpression anderer proinflammatorischer Zytokine in WT bewirkt. In der IL6 KO-Maus konnte eine SAB-vermittelter Anstieg der Genexpression dieser Zytokine nicht beobachtet werden.

8.8 SAB-induzierte Degradation von Extrazellulärer Matrix

8.8.1 IL6-vermittelte MMP9 Hochregulation

Neben einer veränderten TJ-Expression können auch Veränderungen in Komposition und Struktur der extrazellulären Matrix zu einer Permeabilitätssteigerung der BHS beitragen. Die Degradation von EZM im Hirngewebe wird hauptsächlich über die Endopeptidase MMP9 reguliert (64). Abb. 19 stellt die Ergebnisse der MMP9-Genexpressionsanalyse isolierter Hirnkapillaren nach SAB dar. Die MMP9-Expression war bei WT SAB-Tieren an Tag 4 nach SAB signifikant erhöht ($3,06 \pm 0,55$ –fach der WT SHAM-Kontrolle). Bei den IL6 KOs lag keine signifikante Erhöhung der Expression im Vergleich zu der IL6 KO-Kontrollgruppe vor. Verglichen mit der WT SAB-Gruppe war die MMP9-Expression der IL6 KOs nach SAB signifikant erniedrigt ($0,45 \pm 0,12$ –fach der WT SAB-Gruppe).

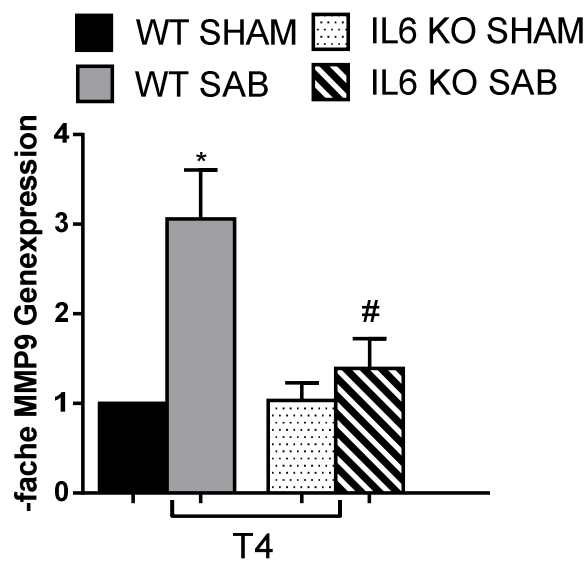
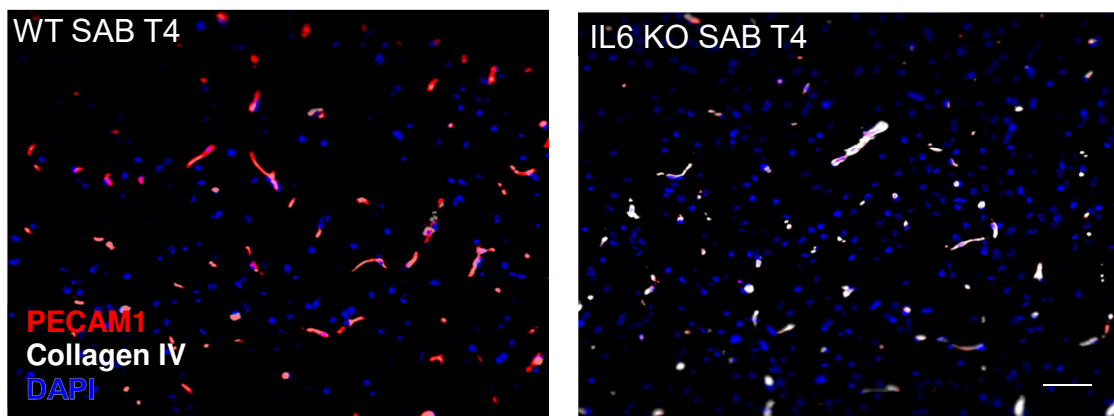


Abbildung 19: Zerebrovaskuläre MMP9-Genexpression nach SAB. SAB-induziert konnte eine signifikante Hochregulierung der MMP9-Expression in WT-Mäusen beobachtet werden. Bei IL6 KOs lag keine gesteigerte Expression vor. One-way ANOVA. $^{*}/\#p < 0,05$. * Signifikanz bezogen auf respektive SHAM-Kontrolle. # Signifikanz bezogen auf WT SAB. WT n = 4, IL6KO n = 3 pro experimentelle Gruppe.

8.8.2 SAB-induzierte Collagen IV - Reduktion

Collagen IV ist nicht nur ein wichtiges Substrat der MMP9, sondern trägt als Bestandteil der BM entscheidend zur Dichtigkeit der BHS bei (40). Abb. 20A zeigt die Aufnahmen zerebraler Kapillaren, bei denen Collagen IV sowie der Gefäßmarker PECAM1 immunhistochemisch angefärbt wurden. Im Folgenden wurde mittels ImageJ das Verhältnis der Collagen IV-Bildpunkte zu PECAM1 ermittelt und graphisch dargestellt (Abb. 20B). Hierbei zeigte sich, dass das Collagen IV/PECAM1-Verhältnis bei WT SAB-Mäusen an Tag 4 signifikant erniedrigt war im Vergleich zur SHAM-Kontrolle ($0,57 \pm 0,14$ -fach). IL6 KO-Tiere wiesen nach SAB keine signifikante Reduzierung des Collagen IV/PECAM1-Verhältnisses im Vergleich zur IL6 KO SHAM-Kontrolle auf.

A



B

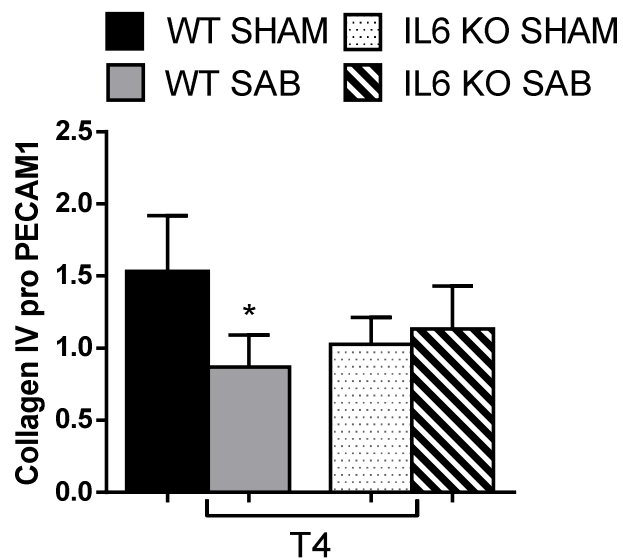


Abbildung 20:

Degradation von Collagen IV nach SAB. **A** Repräsentative IHC-Bilder von zerebralen Blutgefäßen gefärbt mit PECAM1 (rot) und Collagen IV (weiß). Maßstab: 50µm. **B** SAB-induzierte Reduktion von Collagen IV im Verhältnis zu PECAM1 bei WT. Eine Collagen IV-Reduktion konnte in IL6 KO-Mäusen nach SAB nicht festgestellt werden. One-way ANOVA. ^{*/#}p<0,05. * Signifikanz bezogen auf respective SHAM-Kontrolle. n = 4 pro experimentelle Gruppe.

Anhand der in diesem Abschnitt präsentierten Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass es IL6-vermittelt zur Hochregulation der MMP9 nach SAB kommt. Die SAB-induzierte Reduktion des MMP9-Substrats Collagen IV konnte in WT, nicht aber in IL6 KO-Mäusen beobachtet werden.

8.9 SAB-induzierte Perizyten-Dissoziation

Auch Perizyten nehmen als Vertreter der NVU eine abdichtende Funktion innerhalb der BHS ein (36). Um deren Rolle näher zu charakterisieren, wurde der Perizytenmarker Desmin in Hirnschnitten immunhistochemisch angefärbt und ins Verhältnis zu dem Blutgefäßmarker PECAM1 gesetzt. Aus dem Quotient Desmin/PECAM1 ließ sich ableiten, inwieweit Perizyten die Blutgefäße bedecken. Abb. 21 zeigt die konfokalmikroskopischen Aufnahmen, auf denen bei WT am vierten Tag nach SAB eine Dissoziation der Perizyten (grün) von den Blutgefäßen (rot) zu beobachten ist. Bei WT SHAM- sowie IL6 KO SAB-Tieren blieben die Perizyten den Gefäßen assoziiert. Abb. 22 stellt die Analyse des Desmin/PECAM1-Quotienten graphisch dar. Es konnte festgestellt werden, dass WT nach SAB eine $0,65 \pm 0,29$ -fache Reduzierung des Desmin/PECAM1-Verhältnisses aufwies im Vergleich zur WT-Kontrollgruppe. Bei IL6 KO-Tieren konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen SAB- und Kontrollgruppe beobachtet werden. Das Desmin/PECAM1-Verhältnis lag in etwa auf dem Niveau der WT SHAM-Gruppe.

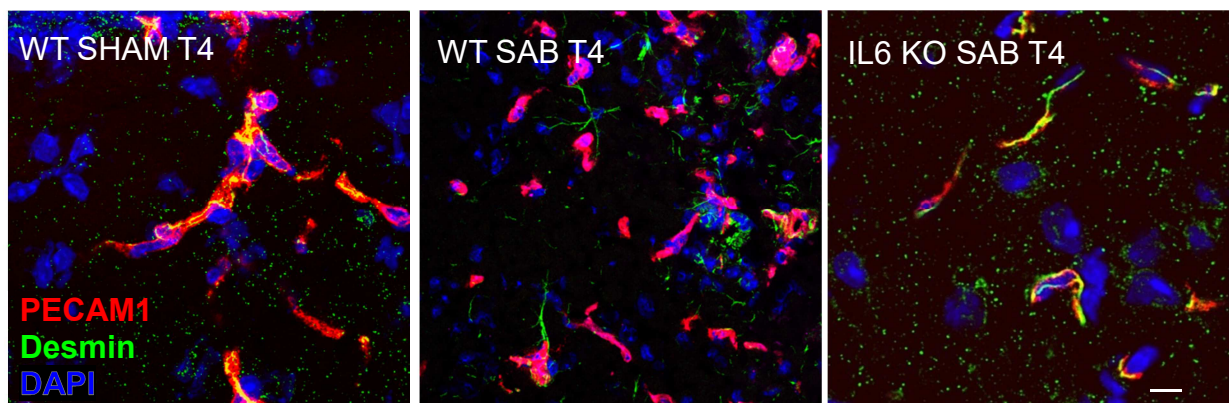


Abbildung 21: SAB-induzierte Perizyten-Dissoziation. Repräsentative Konfokalmikroskopie-Bilder von zerebralen Blutgefäßen (angefärbt mit PECAM1 (rot)) und assoziierten Perizyten (angefärbt mit Desmin (grün)). Die mittlere Aufnahme zeigt die Dissoziation der Perizyten von zerebralen Blutgefäßen in WT-Mäusen am vierten Tag nach SAB. Maßstab: 20µm.

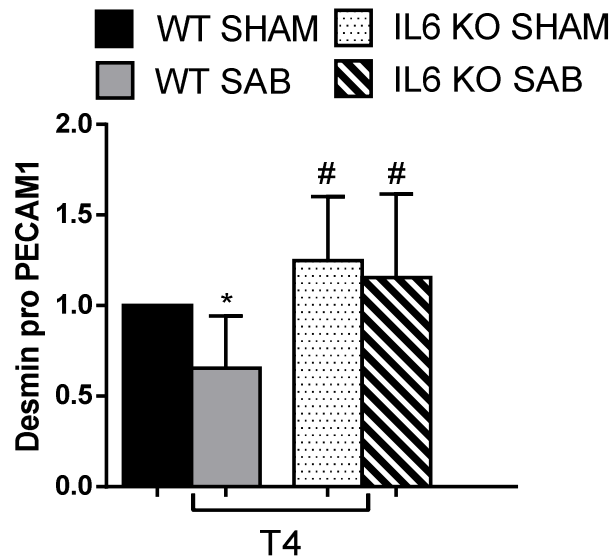
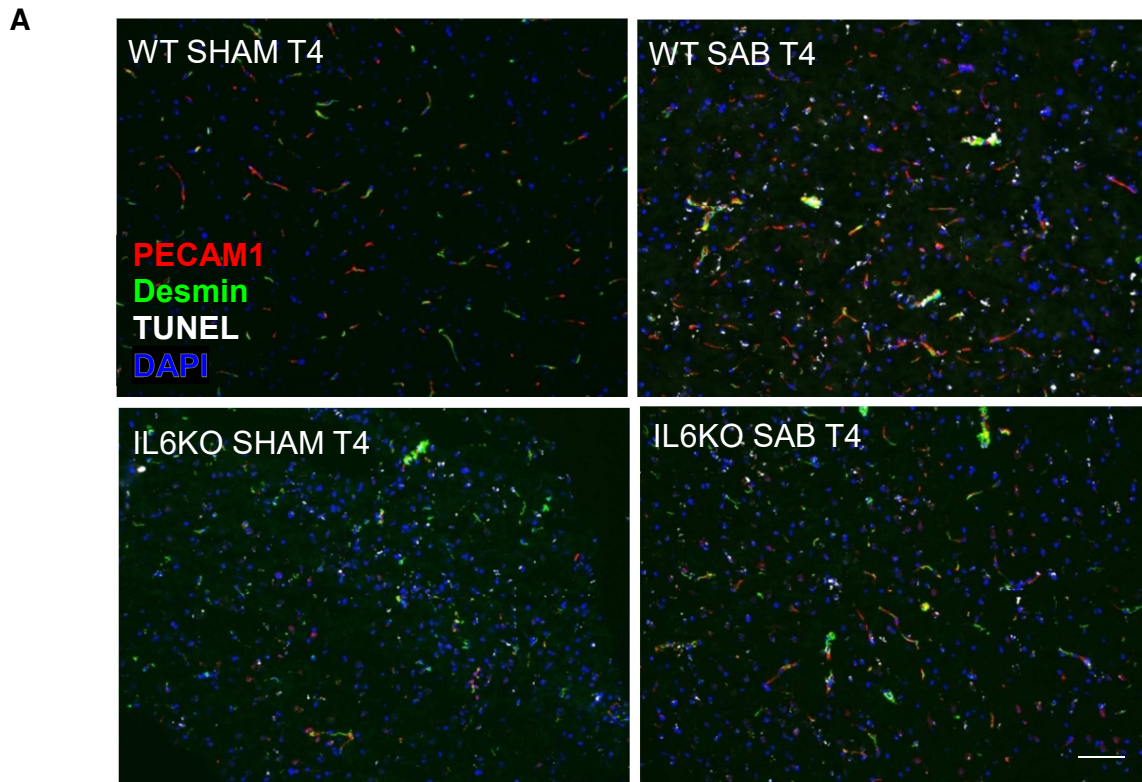


Abbildung 22: SAB-induzierte Reduktion des Perizyten-Coverages. Bei WT konnte eine signifikante Reduzierung des Desmin/PECAM1-Verhältnisses festgestellt werden. Bei IL6 KOs lag nach SAB keine Reduzierung des Desmin/PECAM1-Verhältnisses im Vergleich zur IL6 KO-Kontrolle vor. One-way ANOVA. */#p<0,05. * Signifikanz bezogen auf WT SHAM. # Signifikanz bezogen auf WT SAB. n = 3 pro experimentelle Gruppe.

Die dargestellten Ergebnisse verdeutlichen, dass es IL6-vermittelt nach SAB zu einer Dissoziation der Perizyten von zerebralen Blutgefäßen kommt.

8.10 SAB-induzierte perizytäre Apoptose

Als mögliche Ursache der verminderten Perizyten-Blutgefäß-Verankerung kommen apoptotische Prozesse in Erwägung. Um dies zu überprüfen, wurden IHC-Färbungen mit dem TUNEL-Kit durchgeführt, welches apoptotische Zellen anfärbt. Auf den IHC-Aufnahmen, die in Abb. 23A dargestellt sind, konnte eine erhöhte Anzahl apoptotischer Perizyten in WT nach SAB festgestellt werden. Abb. 23B stellt die Ergebnisse der Auszählung graphisch dar. WT SAB-Mäuse wiesen im Vergleich zu IL6 KO-Tieren an Tag 4 eine signifikant erhöhte Anzahl apoptotischer Perizyten auf. Bei WT SHAM-Tieren wurden pro High-power field (HPF) $1,83 \pm 1,12$, bei WT- SAB Tieren $14,25 \pm 4,4$, bei IL6 KO SHAM-Tieren $2,58 \pm 0,79$ und bei IL6 KO SAB-Tieren $4,57 \pm 1,45$ apoptotische Perizyten detektiert.



B

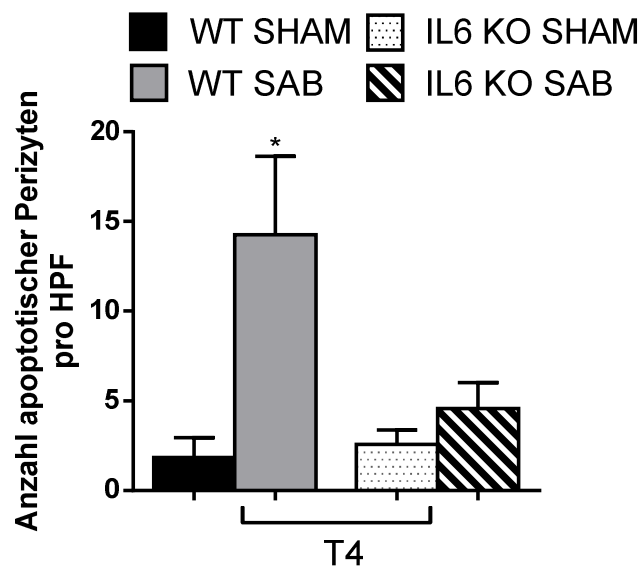


Abbildung 23 Apoptotische Perizyten nach SAB. **A** Repräsentative IHC-Bilder zerebraler Blutgefäße gefärbt mit PECAM1 (rot), Desmin (grün) und TUNEL (weiß). Maßstab: 50µm. **B** WT wiesen nach SAB eine hochsignifikant erhöhte Anzahl apoptotischer Perizyten auf. One-way ANOVA. *p < 0,05. * Signifikanz bezogen auf WT SHAM. n = 4 pro experimentelle Gruppe.

Aufgrund der hier dargestellten Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass die perizytäre Apoptose nach SAB IL6-vermittelt induziert wird.

9 Diskussion

9.1 Einfluss einer SAB unter IL6-Defizienz auf zelluläre und subzelluläre Strukturen der BHS

Neuroinflammatorische Prozesse im Rahmen zerebraler Erkrankungen werden durch wichtige Messengermoleküle wie IL6 vermittelt. Dass IL6 in dem proinflammatorischen Milieu zerebrovaskulärer Pathologien eine wichtige Rolle zukommt, wurde bereits in Vorarbeiten beschrieben. So ist es an der Regulierung der BHS-Permeabilität, der Aktivierung von Mikroglia und an angiopoetischen Vorgängen beteiligt (27, 62, 63, 65). Auch im Rahmen der SAB trägt es entscheidend zu Prozessen der primären und sekundären Hirnschädigung bei (15, 16, 62, 66). In welchem Ausmaß und über welche Mechanismen es die Permeabilität der BHS nach SAB beeinflusst, wurde in dieser Arbeit analysiert.

Zunächst konnte eine SAB-induzierte, zeitabhängige Hochregulation der IL6-Genexpression im BHS-Endothel von WT-Mäusen demonstriert werden. Es wurde gezeigt, dass eine IL6-Defizienz im Rahmen der experimentell induzierten SAB die Extravasation von Makromolekülen (EB, 70 kDa), nicht aber die von Mikromolekülen (FD, 4 kDa) verhindert. Die erhöhte Durchlässigkeit der BHS in WT ging einher mit einer verminderten Expression von Claudin-5 und Occludin, während es in IL6 KOs zu einer partiellen Wiederherstellung der Expression dieser TJ-Proteine circa auf das Niveau von WT-Kontrollmäusen kam. Entsprechend der gesteigerten BHS-Permeabilität konnte in WT ein stärker ausgeprägtes Hirnödem als bei IL6 KOs nach SAB festgestellt werden. Auch die SAB-induzierte proinflammatorische Antwort hinsichtlich der Expression weiterer Zytokine (TNF α und IL1 β) fiel bei WT stärker aus als bei IL6 KO-Tieren. Außerdem wurde die Expression der durch ein inflammatorisches Milieu getriggerten Protease MMP9 analysiert. Hierbei konnte eine signifikante MMP9-Überexpression an Tag 4 post SAB bei WT festgestellt werden, welche unter eine IL6-Defizienz nicht zu beobachten war. Die Untersuchung des wichtigen MMP9-Substrates und EZM-Bildners Collagen IV im Verhältnis zum Gefäßmarker PECAM1 ergab in WT eine Reduktion der Collagen IV/PECAM1-Ratio. Dies ließ auf die IL6-vermittelte Degradation von EZM nach SAB rückschließen. Abschließend wurde gezeigt, dass es

im IL6-beeinflussten inflammatorischen Milieu nach SAB zu einer Endothelzell-Perizyten-Dissoziation sowie einer verstärkten perizytären Apoptose kam.

9.2 Evaluation der BHS-Permeabilität nach SAB

Aus der Literatur sind bereits viele Beispiele bekannt, in denen der deutlichen BHS-Permeabilitätssteigerung nach SAB eine entscheidende Rolle in Pathophysiologie und klinischem Outcome zugeschrieben wird (67-69). Um den Zusammenbruch der BHS zu evaluieren, wurde mit fluoreszierenden Tracermolekülen gearbeitet, die aus dem Blutgefäßsystem ins umliegende Gewebe extravasieren. Das Makromolekül EB kann unter physiologischen Bedingungen die BHS nicht passieren. Ist es jedoch im Hirngewebe detektierbar, weist dies auf eine erhebliche Störung der BHS hin (56). Eine Limitation der Arbeit sei an dieser Stelle erwähnt: Die Extravasationsexperimente wurden mit nur einem Protein der jeweiligen Größe (EB 70 kDa und FD 4 kDa) durchgeführt. Die Permeabilitätseigenschaften von Proteinen hängen jedoch nicht nur von der Größe, sondern auch von anderen Charakteristika wie beispielsweise der Lipophilie ab. Es wäre daher nicht auszuschließen, dass sich ein 70 kDa großes Protein, welches sich in seinen molekularen Eigenschaften von EB unterscheidet, in Bezug auf die BHS-Passage anders verhält. Wie in Abb. 7 zu sehen, konnte EB aufgrund der SAB-induzierten BHS-Störung in WT ins umliegende Parenchym gelangen. Am vierten Tag nach stattgehabter Blutung konnte die größte Menge EB im Hirnparenchym festgestellt werden. Dies steht zum Teil in Widerspruch zu vorherigen Studien, u.a. einer Veröffentlichung der Arbeitsgruppe um *Li et al.*, die zeigten, dass die deutlichste Öffnung der BHS nach 3 und 72 Stunden post SAB auftritt (66), wobei nicht klar ist, ob Messungen der BHS-Permeabilität zu späteren Zeitpunkten überhaupt stattgefunden haben. Abb. 8 zeigt, dass die EB-Extravasation in IL6 KO-Tieren, also für Moleküle bis zu einer Größe von ca. 70 kDa, unterbunden wird. Das 4 kDa große Molekül FD war bei WT-Tieren nach SAB, wie erwartet, in großen Mengen im Hirngewebe detektierbar. Interessanterweise konnte FD auch bei IL6 KO-Tieren im Hirnparenchym nachgewiesen werden, was dafür spricht, dass die BHS der IL6 KO-Maus für die Passage kleinerer Moleküle nicht komplett undurchlässig ist. Eine Deletion des proinflammatorischen IL6 wirkt den Ergebnissen dieser Arbeit zu Folge also

protektiv auf die Beschaffenheit der BHS. Es gilt hierbei jedoch genau zu definieren, dass eine IL6-Defizienz die Beschaffenheit der BHS so beeinflusst, dass nur Moleküle der Größe bis ca. 70 kDa am Durchtritt gehindert werden. Es wäre aufschlussreich, derartige Extravasationsexperimente mit Molekülen durchzuführen, deren Molekülgröße zwischen 4 und 70 kDa liegt, beispielsweise 10, 20 oder 40 kDa, um so die Permeabilität der BHS genauer charakterisieren zu können. Die Arbeitsgruppe um *Armulik et al.* testete die BHS-Integrität in Perizyten-defizienten Mäusen mit verschiedenen Tracermolekülen, darunter die 44 kDa große *Horseradish peroxidase* (70). Deren Analyse erfolgte mittels Transmissionselektronenmikroskopie, also einem aufwendigen Verfahren, was zudem sehr kostenintensiv ist. Hinzu kommt, dass die Etablierung solcher Extravasationsexperimente komplex ist und größtenteils weder von den Herstellern noch in der Literatur im Detail beschrieben wird. Die Messgenauigkeit solcher Experimente hängt zudem von einer Vielzahl an Faktoren ab: der Durchtrittsdauer der molekularen Tracer, der Art der Perfusion, der Gewebefixierung sowie der Evaluierung der Extravasation, je nachdem ob die Beurteilung anhand immunhistochemischer Färbungen oder anhand der Konzentrationsbestimmung in Hirnhomogenaten erfolgt. Insgesamt ist das experimentelle Setup also aufwändig, sodass es fortführend zu dieser Arbeit weiterer Studien bedarf, um eine exakte Charakterisierung des BHS-Zusammenbruchs nach SAB vornehmen zu können.

Abschließend sei jedoch betont, dass die BHS unter IL6-Defizienz im SAB-Kontext eine selektiv permeable Barriere für Moleküle unterschiedlicher Größe darstellt: Der Durchtritt von Makromolekülen bis zu einer Größe von 70 kDa wird verhindert, kleinere Moleküle von ca. 4 kDa Größe können die BHS ungehindert passieren.

Bei einer BHS-Störung ist nicht nur die Passage von Proteinen möglich, wie sie in den oben beschriebenen EB-Extravasationsexperimenten untersucht wurde. Auch Wassermoleküle und Elektrolyte können die BHS in einem solchen Fall übertreten. Klinisch äußert sich dies in der Entwicklung eines Hirnödems. Mit der Bestimmung des Hirnwassergehaltes der Tiere ließ sich Rückschluss auf die Ausprägung des Hirnödems ziehen. Die MRT-Aufnahmen von Abb. 11 verdeutlichen, dass es nach SAB zur Ausbildung eines globalen Ödems gekommen ist. Wie in Abb. 12 graphisch dargestellt war das Ödem in beiden SAB-Gruppen (WT und IL6 KO) im Vergleich mit der

jeweiligen Kontrollgruppe signifikant größer. Bei WT-Tieren lag der Hirnwassergehalt um $2,66 \% \pm 0,47 \%$ höher als bei den IL6 KOs. Diese Ergebnisse bestätigten die IL6-vermittelte Permeabilitätssteigerung der BHS nach SAB. Das beschriebene Hirnödeme setzt sich sowohl aus einer zytotoxischen als auch einer vasogenen Komponente zusammen, wobei der vasogene Anteil auf die Permeabilitätssteigerung der BHS zurückzuführen ist (71). Diese Ergebnisse sind im klinischen Kontext durchaus interessant. Vorarbeiten zeigen, dass 8 – 67 % der SAB-Patientinnen und Patienten zum Aufnahmezeitpunkt ein Hirnödeme aufweisen. Die Entwicklung des Ödems kann in Zusammenhang mit einem schlechten klinischen Outcome gebracht werden (72). Da das Hirnödeme einen prognostischen Faktor darstellt, könnte eine darauf abzielende effektive Therapie zu einer besseren klinischen Situation der Betroffenen beitragen (73). In der klinischen Praxis wird versucht, das Hirnödeme zu reduzieren bzw. den intrakraniellen Druck zu kontrollieren. Dies geschieht medikamentös mit hyperosmolaren Lösungen oder als ultima ratio mittels dekompressiver Kraniektomie (74). Die Wirksamkeit dieser therapeutischen Optionen ist jedoch nicht abschließend geklärt. Da in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass das Ödeme in IL6 KO-Tieren weniger stark ausgeprägt war, würde sich dieses Zytokin als mögliches Target für neuartige Therapieansätze anbieten.

Des Weiteren wurde festgestellt, dass die gesteigerte BHS-Permeabilität nach SAB mit einem veränderten TJ-Expressionsmuster einherging. Die Expressionsanalyse der isolierten BHS-Kapillaren mittels qPCR ergab, dass WT-Mäuse nach SAB weniger Claudin-5 und Occludin exprimierten im Vergleich mit der Kontrollgruppe. IL6 KO-Tiere zeigten nach SAB eine verminderte Claudin-5-Expression, jedoch eine erhöhte Occludin-Expression verglichen mit der IL6 KO-Kontrollgruppe. Die fluoreszenzmikroskopische Analyse ergab bei WT nach SAB ein vermindertes Claudin-5/PECAM1- sowie Occludin/PECAM1-Verhältnis, was bei IL6KO-Tieren nach SAB nicht beobachtet werden konnte. Hier zeigten sich keine signifikanten Veränderungen des Claudin-5 bzw. Occludin zu PECAM1 Verhältnisses verglichen mit der Kontrollgruppe.

Eine mögliche Ursache für eine gesteigerte BHS-Permeabilität ist der Untergang abdichtender TJ-Proteine, da diese endotheliale Zellen fest miteinander verbinden.

Vorherige Studien beschrieben bereits in *in vitro* Modellen eine IL6-vermittelte Herunterregulation wichtiger TJ und AJ (Claudin-5, Occludin, VE-Cadherin) (75). Auch gibt es bereits *in vivo* Daten, die eine verminderten Occludin- sowie Claudin-5-Genexpression im WT-Mausmodell nach SAB aufzeigen (76). Der konkrete Einfluss des IL6 nach SAB in einem *in vivo* Modell wurde bisher jedoch nur marginal beschrieben.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine IL6-Defizienz die signifikante Herunterregulation von Claudin-5 nach SAB verhindert, die Genexpression von Occludin nach SAB war in IL6KO Tieren im Vergleich mit der WT-Kontrollgruppe sogar über das Basallevel hinaus erhöht. Da in diesem Experiment eine Gruppengröße von 3 Tieren in der IL6 KO-Gruppe vorlag, bedarf es weiterer Experimente, um die Ergebnisse zu bestätigen. Es zeichnet sich allerdings ab, dass unter einer IL6-Defizienz wichtige TJ-Proteine weniger stark in ihrer Genexpression herunterreguliert werden.

Fazit zur BHS Permeabilität:

Die Funktion der BHS wird hauptsächlich bestimmt durch die Dichtigkeit der TJ- und AJ-Proteine sowie die Interaktion zwischen Endothelzellen und anderen Komponenten der NVU. Unter pathologischen Konditionen, wie beispielsweise nach stattgehabter SAB, können schädliche Stoffe wie Thrombin und Fibrinogen aus dem Intravasalraum ins Hirnparenchym gelangen, sodass das Gewebe direkt gegenüber toxischen Substanzen exponiert ist (93). Außerdem bewirkt die erhöhte BHS-Permeabilität die Migration von Immunzellen ins Parenchym, die dort unter Ausschüttung von Zytokinen, Chemokinen, reaktiven Sauerstoffspezies und Proteasen weitere pathophysiologische Prozesse verstärken (94). Würde es gelingen die Permeabilitätssteigerung einzudämmen, könnte sich dies positiv auf die Klinik von SAB-Patientinnen und Patienten auswirken. Es gibt mittlerweile Ansätze, die BHS-Dysfunktion nach der Injektion von Gadolinium-DTPA-Kontrastmittel MRT-morphologisch zu erfassen (95). Dies zeigt, dass auch in der klinischen Forschung die Eruiierung der BHS-Störung nach SAB immer mehr Bedeutung gewinnt.

9.3 Einfluss einer SAB unter IL6-Defizienz auf intravaskuläre Inflammation und Komponenten der NVU

Im Rahmen zerebraler Erkrankungen tragen neben IL6 v.a. IL1 β und TNF α zu einem veränderten TJ-Expressionsmuster bei und nehmen somit Einfluss auf die BHS-Permeabilität (75, 77, 78). Die Analyse isolierter BHS-Kapillaren zeigte, dass WT nach SAB signifikant mehr TNF α und IL1 β produzieren verglichen mit der SHAM-Kontrollgruppe. IL6 KO-Mäuse wiesen hingegen nach SAB eine signifikant erniedrigte TNF α -Expression auf, während es bezüglich der IL1 β -Expression keine signifikanten Unterschiede zwischen IL6 KO SAB- und Kontrollgruppe gab. Der Fokus der Arbeit wurde auf IL6 gelegt, da zahlreiche Publikationen seine wichtige Rolle als Vermittler der inflammatorischen Antwort nach SAB beschreiben (53, 79). Dennoch ist es wichtig zu erwähnen, dass die entzündliche Antwort weitaus komplexer ist, als dass man sie allein anhand eines Zytokins bewerten könnte. Wir haben gesehen, dass in der IL6 KO-Maus auch die Expression anderer Zytokine herunterreguliert ist. Dies verdeutlicht die gegenseitige Beeinflussung und Wechselwirkung der Zytokine untereinander.

Darüber hinaus wurde in Vorarbeiten dargestellt, dass die Degradation von EZM im Rahmen von Erkrankungen des Gehirns, wie beispielsweise Morbus Alzheimer, zu Störungen der BHS-Integrität führt (80). MMPs sind zinkabhängige Endopeptidasen, die die Degradation von EZM vermitteln, indem sie BM sowie umgebende Zellen der BHS abhauen. Außerdem interagieren sie direkt mit interendothelialen TJ, Zelloberflächen und EZM-gebundenen Wachstumsfaktoren. Wie in vorherigen Studien beschrieben, kommt es unter entzündlichen Konditionen zur einer Hochregulation der MMP9-Expression vermittelt durch proinflammatorische Zytokine (81, 82). Somit regulieren sie sowohl unter physiologischen als auch pathologischen Konditionen die strukturellen Eigenschaften der BHS (64, 83). Im Hirngewebe spielt v.a. die MMP9 eine wichtige Rolle beim Abbau struktureller Bestandteile der BHS. Hauptsächlich wird sie von Perizyten, aber auch von Endothelzellen und Astrozyten sezerniert (84). Die Analyse isolierter Hirnkapillaren ergab eine gesteigerte MMP9-Genexpression bei WT SAB-Mäusen, die bei IL6 KO-Tieren nach SAB nicht beobachtet werden konnte. Weiterhin wurde das Verhältnis von Collagen IV, als wichtigem Bestandteil der BM und Substrat der MMP9, zum Gefäßmarker PECAM1 bestimmt. Hier zeigte sich bei WT nach SAB ein verringertes Collagen IV/PECAM1-Verhältnis. Die IL6 KO-Tiere zeigten sowohl in

der SAB- als auch in der Kontroll-Gruppe nahezu ein 1:1 Verhältnis von Collagen IV zu PECAM1. Die Arbeitsgruppe um *Vikman et al.* konnte zeigen, dass die MMP9 ebenfalls in der Gefäßwand der Hirnkapillaren nach experimentell induzierter SAB hochreguliert wird (85). Auch hier kann ein potentiell neuer Ansatz für die Therapie der SAB gesucht werden. Wird die MMP9 blockiert, wird die Degradation der BM verhindert, was wiederum die Wiederherstellung für TJ-Protein-Bindungsstellen stärken würde. Hiermit könnte letztendlich der BHS-Zusammenbruch eingedämmt werden. Diese Ergebnisse verdeutlichen eine weitere Ursache der SAB-induzierten BHS-Permeabilitätssteigerung: die Degradation extrazellulärer Matrix.

Da Perizyten innerhalb der NVU entscheidend zur Dichtigkeit der BHS beitragen, wurden deren strukturelle Eigenschaften nach SAB untersucht (36). Aufgrund ihrer Lokalisation üben diese Zellen eine entscheidende Stützfunktion für zerebrale Blutgefäße aus. Sie befinden sich auf der abluminalen Seite der Endothelzellen und liegen luminal der Parenchymzellen (vgl. Abb. 1). Damit stellen sie eine Art Wandstruktur für die Hirnkapillaren dar (36). Interessanterweise ist das Perizyten-Coverage von Gefäßen in der zerebralen Vaskulatur des ZNS am höchsten (86). Dies erscheint logisch, da hier das Milieu liegt, welches am empfindlichsten auf Störfaktoren reagiert. Neben ihrer abdichtenden Funktion sind sie außerdem an der Regulierung des Blutflusses, der Angiopoese sowie dem Gefäßremodeling beteiligt (39, 70). Insgesamt sind diese Zellen also maßgeblich dafür verantwortlich, dass die Integrität der BHS gewährleistet wird. In dieser Arbeit konnte auf konfokalmikroskopischen Aufnahmen eine Dissoziation der Perizyten von Endothelzellen in WT nach SAB festgestellt werden. Die Untersuchung der Perizytenmarkers Desmin im Verhältnis zu PECAM1 ergab in WT nach SAB eine deutliche Reduktion, was bei IL6 KO-Tieren nicht beobachtet werden konnte. Auch zeigten WT nach SAB eine signifikant erhöhte Anzahl apoptotischer Perizyten. Dies macht deutlich, dass nicht ein verändertes TJ-Expressionsmuster allein, sondern vielmehr Änderungen in Interaktion und Struktur der NVU die BHS-Integrität nach SAB entscheidend beeinflussen. Daher ist es wichtig bei der Bewertung des BHS-Zusammenbruchs nicht nur endotheliale Prozesse, sondern auch perizytären Zelluntergang im Blick zu haben.

Zusammenfassend vermittelt IL6 nach SAB intravaskuläre Inflammation, die über ein verändertes TJ-Expressionsmuster und Zytokinprofil, die Degradation von EZM sowie apoptotische Prozesse entscheidend zur Permeabilitätssteigerung nach SAB beiträgt.

9.4 IL6 im klinischen Kontext

Auch im klinischen Kontext wurde die wichtige Rolle des IL6 als inflammatorischer Mediator nach SAB bestätigt. So konnte es beispielsweise mit der Entwicklung von Komplikationen (wie Vasospasmen, neurologischen Defizite etc.) assoziiert werden (52, 53). Erhöhte IL6-Level wurden sowohl im Serum als auch in der zerebrospinalen Flüssigkeit von SAB-Patientinnen und Patienten entdeckt, was mit einem schlechteren klinischen Outcome und der Entwicklung später zerebraler Ischämien korrelierte (53, 87). Auch in der klinischen Diagnostik gibt es bereits Ansätze, IL6 als Marker zu etablieren. So entwickelten *Dengler et al.* einen Bedside-Test, der erhöhte IL6-Spiegel im Liquor von SAB-Patientinnen und Patienten quantifiziert (88). Damit wurde versucht, dieses Zytokin in die klinische Diagnostik zu implementieren. Allerdings sollte man die Korrelation zwischen erhöhter Zytokinkonzentration und klinischem Outcome differenziert betrachten. Denn bei IL6 handelt es sich um ein pleiotropes Zytokin, das in eine Vielzahl inflammatorischer, proliferatorischer, angiopoetischer und apoptotischer Prozesse involviert ist. Als Marker für den Zusammenbruch der BHS ist es somit nicht sehr spezifisch. In der Literatur findet man viele Arbeiten, die die IL6-vermittelten Aktionen je nach zellulärem Kontext und je nach Pathologie beschreiben. *Gertz et al.* beleuchteten seine entscheidende Rolle bei der Angiopoese nach ischämischem Schlaganfall. In IL6-defizienten Tieren war die Expression Angiogenese-assoziiierter Gene ebenso wie die Anzahl endothelialer Progenitorzellen nach zerebraler Ischämie vermindert. In diesen Tieren konnten ebenfalls größere Infarkt volumina und eine erhebliche BHS-Störung beobachtet werden (54). Weitere Beispiele für die pathophysiologische Bedeutung dieses Zytokins im Rahmen zerebraler Erkrankungen finden sich in den Arbeiten von *Strauss et al. und Müller et al.* Diese Arbeitsgruppen entdeckten, dass eine erhöhte neuronale IL6-Produktion Teil der inflammatorischen Antwort bei neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer und Morbus Parkinson ist (89, 90). Auch bei traumatischer Hirnschädigung oder tonisch-klonischen

Krampfanfällen konnte eine IL6-Überexpression in neuronalen Zellen festgestellt werden (91, 92).

Neben Neuronen stellen Gliazellen eine weitere wichtige Quelle zerebralen IL6 dar. *Schneider et al.* konnten Mikrogliazellen als wichtige Produzenten dieses Zytokins nach SAB identifizieren. Im so erzeugten proinflammatorischen Milieu kam es zur Akkumulation eben jener Mikrogliazellen, welche wiederum neuronale Apoptose induzierten (62). Auch zerebrale Endothelzellen sind zur Produktion von IL6 in der Lage. Es gilt dabei die Annahme, dass die IL6-Expression der Hirnkapillaren relativ gering ist und erst in Folge inflammatorischer Stimuli drastisch ansteigt (93). Eine aktuelle Arbeit unserer Arbeitsgruppe konnte in einem *in vitro* Modell zeigen, dass Endothelzellen hoch sensitiv auf das von ihnen eigens produzierte IL6 nach SAB reagieren, was einen Zusammenbruch der BHS mit sich führte: Endotheliale Zellen verloren ihre Integrität nach Zugabe von rekombinantem IL6. Dieser Effekt konnte durch die Blockade des IL6R zum Teil abgeschwächt werden (63).

Eine weitere wichtige Aufgabe, die IL6 als Vermittler intravaskulärer Inflammation nach SAB zukommt, ist die Aktivierung von Leukozyten und hirneigenen Immunzellen, den Mikroglia. *Atangana et al.* demonstrierten, dass nach SAB Adhäsionsmoleküle wie P-selectin und Intercellular Adhesion Molecule-1 (ICAM-1) vermehrt von isolierten Hirnkapillaren exprimiert wurden. Dennoch wurde Leukozyten die BHS-Passage nach SAB verwehrt, trotz deren Rekrutierung über eben jene Adhäsionsmoleküle. In Folge der intravaskulären Inflammation kam es allerdings zur Rekrutierung von zirkulierenden Neutrophilen gefolgt von einer Mikrogliazellakkumulation, was wiederum zur neuronalen Apoptose führte (94). Es ist folglich anzunehmen, dass der intrazerebralen Entzündungsreaktion nach SAB eine intravaskuläre Inflammation vorausgeht. In diesem Kontext stellt die BHS eine wichtige Verbindung zwischen intravaskulärem und intrazerebralem Kompartiment dar.

In wie weit endothelial produziertes IL6 für die strukturellen Veränderungen der BHS nach SAB verantwortlich ist, ist in dem hier verwendeten *in vivo* Tiermodell schwierig zu eruieren. Es standen nur globale KO-Tiere zu Verfügung, die bereits von Geburt an eine IL6-Defizienz aufwiesen. Daher ist nicht sicher auszuschließen, dass diese Mäuse im

Laufe der Zeit kompensatorische Mechanismen zum Schutz der BHS entwickeln konnten. Aus diesem Grund wäre es sinnvoll, diese Experimente in einer konditionalen endothelzellspezifischen KO-Maus zu verifizieren. Bereits in den 1980ern wurden Versuche beschrieben, in denen mittels des Cre/loxP-Rekombinations-Systems spezifische Zellen oder Gewebe genetisch modifiziert worden sind (95). Heutzutage findet dieses System zur Herstellung gewebsspezifischer KO-Mäuse breite Anwendung. Um zu verhindern, dass ein wichtiges Gen schon früh während der Embryonalentwicklung ausgeschaltet wird, konzipierte man eine Methode, die Rekombinase Cre zu einem beliebigen Zeitpunkt auszuschalten. Hierzu wurde eine Bindungsstelle für den synthetisierten selektiven Östrogenrezeptor-Modulator Tamoxifen entwickelt. Wird den Tieren Tamoxifen verabreicht, bindet dieses an den modifizierten Östrogenrezeptor, das assoziierte Cre-Enzym wird dann in den Zellkern gebracht, wo es die entsprechenden („geflochten“) Gene ausschneiden kann (96). Die Arbeitsgruppe um *Quintana et al.* etablierte mit Hilfe dieses Systems Experimente mit Astrozyten-spezifischen IL6 KO-Mäusen (97). Endothelzellspezifische IL6 KOs sind bisher in der Literatur noch nicht beschrieben. Die Etablierung einer solchen Mauszelllinie wäre ein relativ aufwändiges und kostspieliges Unterfangen, während die hier beschriebenen Ergebnisse schon einen ersten Überblick über wichtige Zusammenhänge der IL6-vermittelten BHS-Störung geben.

9.5 IL6 als therapeutisches Target

In den letzten Jahren lag das Hauptaugenmerk der Erforschung neuer SAB-Therapieverfahren auf der Behandlung des zerebralen Vasospasmus. Dennoch führten pharmakologische Ansätze zur Vasospasmusprophylaxe und –therapie mit dem Kalziumkanalblocker Nimodipin zu keiner relevanten Besserung des klinischen Outcomes (98). Die Blockade des Endothelin-Rezeptors mittels Clazosentan konnte zwar nachweislich Vasospasmen reduzieren, dennoch gelang es nicht die klinischen Resultate zu verbessern (99). Die aktuellen Therapieoptionen der späten Hirnschädigung beinhalten neben den oben erwähnten Medikamenten die Einhaltung von Normovolämie, Normothermie und Normokapnie, außerdem permissive Hypertonie sowie mögliche endovaskuläre Interventionen bei Patientinnen und Patienten, die sich

refraktär gegenüber der permissiven Hypertonie zeigen (100). Damit ist das therapeutische Spektrum relativ schnell ausgeschöpft. Es gilt also andere Pathomechanismen in den Fokus zu rücken, die entscheidend an der Hirnschädigung nach SAB beteiligt sind und denen möglicherweise pharmakotherapeutisch begegnet werden kann. Hierzu zählen neuroinflammatorische Vorgänge.

Aufgrund der besonderen Bedeutung des IL6 als Vermittler des BHS-Zusammenbruchs nach SAB würde es sich lohnen therapeutisch einen Blick auf dieses Zytokin zu werfen. Denkbar wäre in diesem Zusammenhang eine Blockade des IL6R mittels Antikörpern. Eine Publikation unserer Gruppe konnte zeigen, dass der IL6R unter proinflammatorischen Bedingungen nach SAB auch im Hirnendothel exprimiert wird (63). Bisher galt die Annahme, dass das Hirnendothel auf die „Bereitstellung“ der löslichen Form des IL6R von anderen Zellen, wie beispielsweise Neutrophilen, angewiesen ist, ein Prozess der als sogenanntes *transsignaling* beschrieben wird (101, 102). Auch in Vorarbeiten wurde deutlich, dass die Expression des IL6R sowohl in Hirnendothelien als auch Endothelien anderer Lokalisation abhängig von physiologischen bzw. pathologischen Konditionen ist. So demonstrierte die Arbeitsgruppe um *Vallières et al.*, dass die IL6R-mRNA unter physiologischen Bedingungen im Hirngefäßsystem von Ratten nicht vorhanden ist, während sie nach der intravenösen Injektion von Lipopolysacchariden (LPS) oder IL1 β signifikant ansteigt (103). *Nilsson et al.* zeigten, dass der IL6R im ovariellen Gefäßsystem auf einem Basallevel im physiologischen Milieu exprimiert wird und es zu einer massiven Steigerung der Expression in humanen Ovarialkarzinom-Species kommt (104). Darüber hinaus verweisen weitere Arbeiten auf den Effekt des rekombinanten IL6 (rIL6) auf die Hirnendothelien, ohne dass der lösliche IL6R mit hinzugegeben wurde. Dies suggeriert, dass Endothelien auch den klassischen Signalweg des IL6 über den membrangebundenen Rezeptor nutzen können (75, 105, 106). Geht man nun davon aus, dass der Rezeptor in der BHS selbst, sprich in den Endothelien des Gehirns, vorhanden ist, und die Expression im inflammatorischen Milieu nach SAB ansteigt, macht es Sinn, den IL6R-Block als BHS „stabilisierenden“ therapeutischen Ansatz zu verfolgen. Wie es sich in anderen Endothelien, wie beispielsweise dem myokardialen, verhält, müsste in weiteren Experimenten getestet werden. Es gibt bereits Ansätze, den IL6R mit dem humanisierten monoklonalen Antikörper Tocilizumab zu antagonisieren.

Dieser findet u.a. in der Therapie der rheumatoiden Arthritis Verwendung (107). Vorstellbar wäre es, dieses Medikament tierexperimentell intrathekal oder intravenös zu applizieren und somit den Effekt einer IL6-Neutralisierung in Bezug auf die BHS-Eigenschaften testen zu können. Sicherlich sind *in vivo* Systeme weitaus komplexer. Selbst die Ausschaltung des IL6R würde nicht endgültig ausschließen, dass es nicht doch zu einer inflammatorischen Signaltransduktion kommt, beispielsweise über Aktivierung des löslichen IL6-Rezeptors. Ob eine Neutralisierung des IL6 in der Therapie der SAB tatsächlich von Nutzen wäre, bedarf somit einer genauen Evaluierung in weiteren *in vivo* Modellen. Die Ergebnisse aus *in vitro* Experimenten bieten allerdings schon einen ersten Anhalt dafür, dass eine Blockade des IL6R einen BHS-stabilisierenden Effekt hat. Wie in der Publikation unserer Arbeitsgruppe ersichtlich, verhinderte ein IL6R-Block in der zerebralen Endothelzelllinie die Herunterregulierung von VE-Cadherin, Claudin-5 sowie Occludin, allesamt wichtige barriereabdichtende TJ-Proteine (63).

Vlachogiannis et al. konnten in einem 2019 veröffentlichten Paper zeigen, dass das im Liquor gemessene IL6-Level bei SAB-Patientinnen und Patienten stark erhöht ist und einem zeitlichen Verlauf folgt. Die höchsten Spiegel konnten am vierten und zehnten Tag nach der Blutung gemessen werden. Im Serum der Betroffenen wurden weniger hohe IL6-Spiegel detektiert, außerdem konnte hier keine zeitliche Dynamik beobachtet werden (79). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die intrathekale Antwort in Bezug auf das IL6 weitaus stärker ausfällt als die systemische. Dies wird vor allem interessant, wenn man die Zellen betrachtet, die den Großteil des IL6 produzieren: ZNS-eigene Mikroglia, aber auch hirneigene Kapillaren. Auf der einen Seite findet eine endogene Produktion dieses inflammatorischen Zytokins nach SAB innerhalb des ZNS statt. IL6 kann dann über die geschädigte BHS in den Blutstrom gelangen und eine systemische inflammatorische Antwort auslösen. Auf der anderen Seite konnte gezeigt werden, dass Endothelzellen selbst IL6 produzieren und darüber Einfluss auf die BHS-Permeabilität nach SAB nehmen. Beide Mechanismen gilt es bei möglichen therapeutischen Ansätzen im Auge zu behalten.

In wie weit Patientinnen und Patienten tatsächlich von der Ausschaltung inflammatorischer Stimuli profitieren, müsste in klinischen Studien genauer bestimmt

werden. In der Literatur gibt es hierzu bereits unterschiedliche Angaben. In einigen Arbeiten konnten Tendenzen erkannt werden, dass sich eine Modulation der Neuroinflammation nach SAB günstig auf das Outcome auswirkt (108). Andere Studien hingegen konnten keinerlei Korrelation zwischen inflammatorischer Antwort und negativem klinischen Outcome erkennen (109). Möglicherweise ist der Zeitpunkt post SAB, an dem die inflammatorische Antwort beeinflusst wird, sowie die Art der involvierten Zellen entscheidend, ob eine neuroinflammatorische Modulation in einen protektiven oder schädlichen Effekt mündet.

Ein weiterer Ausblick in Bezug auf therapeutische Überlegungen sei an letzter Stelle erwähnt. Wie anfangs beschrieben, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die BHS unter IL6-Defizienz im SAB-Kontext eine selektiv permeable Barriere für Moleküle unterschiedlicher Größe darstellt. Die Porengröße des durch eine SAB verursachten Schadens scheint in IL6 KO-Tieren nicht groß genug zu sein, um Makromolekülen, wie dem 70 kDa großen EB, die BHS-Passage zu ermöglichen. Es bedarf weiterer Extravasationsexperimente, um die Porengröße des SAB-induzierten Schadens konkret definieren zu können. Das Wissen um die exakte Größe kann perspektivisch von therapeutischem Interesse sein. In der Literatur sind bereits Experimente zur absichtlichen BHS-Öffnung beschrieben. Hierbei geht es um einen bewusst induzierten BHS-Schaden, der die Permeabilität steigert. Dadurch können Medikamente (z. B. Chemotherapeutika), denen normalerweise der Durchtritt ins Hirnparenchym verwehrt ist, nun ins Hirngewebe an den Ort des pathologischen Geschehens (z. B. Tumor, Metastase) gelangen. Die BHS-Öffnung kann auf unterschiedliche Weisen erreicht werden: mittels osmotisch aktiver Teilchen wie z. B. dem hypertonen Mannitol, mittels vasoaktiver Substanzen wie Bradykinin oder mittels fokussierter Ultraschallwellen (110-113). Um ein Beispiel zu nennen: In einer Phase-I-Studie bei Kindern mit Hirntumoren konnte gezeigt werden, dass das hydrophile Carboplatin in Kombination mit Lobradimil, einem synthetischen Bradykinin, das weitere Fortschreiten der Erkrankung verhinderte und bei einigen Probandinnen und Probanden zu einer Reduzierung des Tumolvolumens führte (114).

Man darf jedoch nicht außer Acht lassen, dass eine dauerhafte BHS-Öffnung zu Änderungen des sonst so strikt regulierten ZNS-Milieus führt, da nicht nur Therapeutika,

sondern auch für das Hirngewebe schädliche Stoffe die BHS passieren könnten. Dies würde eine Gefahr für den korrekten Ablauf des neuronalen Signalings darstellen und letztendlich in dauerhaften neurologischen Schäden resultieren.

Zusammenfassend gibt diese Arbeit wichtige Hinweise auf die Funktion des IL6 als Mediator einer BHS-Schädigung nach experimentell induzierter SAB. Es wird jedoch weitere Forschung benötigt, um die genauen Prozesse des BHS-Zusammenbruchs sowie den klinischen Wert dieser Ergebnisse näher definieren zu können.

10 Literaturverzeichnis

1. Chen S, Feng H, Sherchan P, Klebe D, Zhao G, Sun X, Zhang J, Tang J, Zhang JH. Controversies and evolving new mechanisms in subarachnoid hemorrhage. *Prog Neurobiol.* 2014;115:64-91.
2. Le Roux AA, Wallace MC. Outcome and cost of aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Neurosurg Clin N Am.* 2010;21(2):235-46.
3. Etmnan N, Chang HS, Hackenberg K, de Rooij NK, Vergouwen MDI, Rinkel GJE, Algra A. Worldwide Incidence of Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage According to Region, Time Period, Blood Pressure, and Smoking Prevalence in the Population: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Neurol.* 2019;76(5):588-97.
4. Martin CO, Rymer MM. Hemorrhagic stroke: aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Mo Med.* 2011;108(2):124-7.
5. Rinkel GJ, Algra A. Long-term outcomes of patients with aneurysmal subarachnoid haemorrhage. *Lancet Neurol.* 2011;10(4):349-56.
6. Kundra S, Mahendru V, Gupta V, Choudhary AK. Principles of neuroanesthesia in aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *J Anaesthesiol Clin Pharmacol.* 2014;30(3):328-37.
7. Sacco RL, Kasner SE, Broderick JP, Caplan LR, Connors JJ, Culebras A, Elkind MS, George MG, Hamdan AD, Higashida RT, Hoh BL, Janis LS, Kase CS, Kleindorfer DO, Lee JM, Moseley ME, Peterson ED, Turan TN, Valderrama AL, Vinters HV, American Heart Association Stroke Council CoCSaA, Intervention CoCRa, Nursing CoCaS, Prevention CoEa, Disease CoPV, Council on Nutrition PyAaM. An updated definition of stroke for the 21st century: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke.* 2013;44(7):2064-89.
8. Wiebers DO, Whisnant JP, Huston J, Meissner I, Brown RD, Piegras DG, Forbes GS, Thielen K, Nichols D, O'Fallon WM, Peacock J, Jaeger L, Kassell NF, Kongable-Beckman GL, Torner JC, Investigators ISoUIA. Unruptured intracranial aneurysms: natural history, clinical outcome, and risks of surgical and endovascular treatment. *Lancet.* 2003;362(9378):103-10.
9. Marcolini E, Hine J. Approach to the Diagnosis and Management of Subarachnoid Hemorrhage. *West J Emerg Med.* 2019;20(2):203-11.
10. de Oliveira Manoel AL, Mansur A, Murphy A, Turkel-Parrella D, Macdonald M, Macdonald RL, Montanera W, Marotta TR, Bharatha A, Effendi K, Schweizer TA. Aneurysmal subarachnoid haemorrhage from a neuroimaging perspective. *Crit Care.* 2014;18(6):557.
11. Sanelli PC, Pandya A, Segal AZ, Gupta A, Hurtado-Rua S, Ivanidze J, Kesavabhotla K, Mir D, Mushlin AI, Hunink MG. Cost-effectiveness of CT angiography and perfusion imaging for delayed cerebral ischemia and vasospasm in aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2014;35(9):1714-20.
12. Diringer MN, Bleck TP, Claude Hemphill J, 3rd, Menon D, Shutter L, Vespa P, Bruder N, Connolly ES, Jr., Citerio G, Gress D, Hagggi D, Hoh BL, Lanzino G, Le Roux P, Rabinstein A, Schmutzhard E, Stocchetti N, Suarez JI, Treggiari M, Tseng MY, Vergouwen MD, Wolf S, Zipfel G, Neurocritical Care S. Critical care management of patients following aneurysmal subarachnoid hemorrhage: recommendations from the Neurocritical Care Society's Multidisciplinary Consensus Conference. *Neurocrit Care.* 2011;15(2):211-40.
13. Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie - Subarachnoidalblutung (SAB) [Internet]. AWMF. 2012. Available from: <https://www.awmf.org/leitlinien/detail/II/030-073.html>.
14. Michelozzi C, Cognard C. [The role of interventional neuroradiology in treatment of hemorrhagic stroke]. *Presse Med.* 2019;48(6):684-95.
15. Ostrowski RP, Colohan AR, Zhang JH. Molecular mechanisms of early brain injury after subarachnoid hemorrhage. *Neurol Res.* 2006;28(4):399-414.
16. Sabri M, Lass E, Macdonald RL. Early brain injury: a common mechanism in subarachnoid hemorrhage and global cerebral ischemia. *Stroke Res Treat.* 2013;2013:394036.

17. Fujii M, Yan J, Rolland WB, Soejima Y, Caner B, Zhang JH. Early brain injury, an evolving frontier in subarachnoid hemorrhage research. *Transl Stroke Res.* 2013;4(4):432-46.
18. Wang Q, Luo Q, Zhao YH, Chen X. Toll-like receptor-4 pathway as a possible molecular mechanism for brain injuries after subarachnoid hemorrhage. *Int J Neurosci.* 2020:1-19.
19. Macdonald RL. Delayed neurological deterioration after subarachnoid haemorrhage. *Nat Rev Neurol.* 2014;10(1):44-58.
20. Obermeier B, Daneman R, Ransohoff RM. Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier. *Nat Med.* 2013;19(12):1584-96.
21. Abbott NJ, Patabendige AA, Dolman DE, Yusof SR, Begley DJ. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis.* 2010;37(1):13-25.
22. Abbott NJ, Friedman A. Overview and introduction: the blood-brain barrier in health and disease. *Epilepsia.* 2012;53 Suppl 6:1-6.
23. Abbott NJ. Blood-brain barrier structure and function and the challenges for CNS drug delivery. *J Inher Metab Dis.* 2013;36(3):437-49.
24. Ohtsuki S, Terasaki T. Contribution of carrier-mediated transport systems to the blood-brain barrier as a supporting and protecting interface for the brain; importance for CNS drug discovery and development. *Pharm Res.* 2007;24(9):1745-58.
25. Coisne C, Engelhardt B. Tight junctions in brain barriers during central nervous system inflammation. *Antioxid Redox Signal.* 2011;15(5):1285-303.
26. Brown LS, Foster CG, Courtney JM, King NE, Howells DW, Sutherland BA. Pericytes and Neurovascular Function in the Healthy and Diseased Brain. *Front Cell Neurosci.* 2019;13:282.
27. Almutairi MM, Gong C, Xu YG, Chang Y, Shi H. Factors controlling permeability of the blood-brain barrier. *Cell Mol Life Sci.* 2016;73(1):57-77.
28. Luissint AC, Artus C, Glacial F, Ganeshamoorthy K, Couraud PO. Tight junctions at the blood brain barrier: physiological architecture and disease-associated dysregulation. *Fluids Barriers CNS.* 2012;9(1):23.
29. Dejana E. Endothelial cell-cell junctions: happy together. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004;5(4):261-70.
30. Mastorakos P, McGavern D. The anatomy and immunology of vasculature in the central nervous system. *Sci Immunol.* 2019;4(37).
31. Stanness KA, Westrum LE, Fornaciari E, Mascagni P, Nelson JA, Stenglein SG, Myers T, Janigro D. Morphological and functional characterization of an in vitro blood-brain barrier model. *Brain Res.* 1997;771(2):329-42.
32. Braet K, Paemeleire K, D'Herde K, Sanderson MJ, Leybaert L. Astrocyte-endothelial cell calcium signals conveyed by two signalling pathways. *Eur J Neurosci.* 2001;13(1):79-91.
33. Wolburg H, Neuhaus J, Kniesel U, Krauss B, Schmid EM, Ocalan M, Farrell C, Risau W. Modulation of tight junction structure in blood-brain barrier endothelial cells. Effects of tissue culture, second messengers and cocultured astrocytes. *J Cell Sci.* 1994;107 (Pt 5):1347-57.
34. Igarashi Y, Utsumi H, Chiba H, Yamada-Sasamori Y, Tobioka H, Kamimura Y, Furuuchi K, Kokai Y, Nakagawa T, Mori M, Sawada N. Glial cell line-derived neurotrophic factor induces barrier function of endothelial cells forming the blood-brain barrier. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;261(1):108-12.
35. Ridet JL, Malhotra SK, Privat A, Gage FH. Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. *Trends Neurosci.* 1997;20(12):570-7.
36. Dore-Duffy P. Pericytes: pluripotent cells of the blood brain barrier. *Curr Pharm Des.* 2008;14(16):1581-93.
37. Berthiaume AA, Hartmann DA, Majesky MW, Bhat NR, Shih AY. Pericyte Structural Remodeling in Cerebrovascular Health and Homeostasis. *Front Aging Neurosci.* 2018;10:210.
38. Daneman R, Zhou L, Kebede AA, Barres BA. Pericytes are required for blood-brain barrier integrity during embryogenesis. *Nature.* 2010;468(7323):562-6.

39. Lindahl P, Johansson BR, Levéen P, Betsholtz C. Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice. *Science*. 1997;277(5323):242-5.
40. Hawkins BT, Davis TP. The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol Rev*. 2005;57(2):173-85.
41. Sharif Y, Jumah F, Coplan L, Krosser A, Sharif K, Tubbs RS. Blood brain barrier: A review of its anatomy and physiology in health and disease. *Clin Anat*. 2018;31(6):812-23.
42. Owens T, Bechmann I, Engelhardt B. Perivascular spaces and the two steps to neuroinflammation. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2008;67(12):1113-21.
43. Hynes RO. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*. 1992;69(1):11-25.
44. Kettenmann H, Hanisch UK, Noda M, Verkhratsky A. Physiology of microglia. *Physiol Rev*. 2011;91(2):461-553.
45. Chan WY, Kohsaka S, Rezaie P. The origin and cell lineage of microglia: new concepts. *Brain Res Rev*. 2007;53(2):344-54.
46. Kreutzberg GW. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci*. 1996;19(8):312-8.
47. Fantin A, Vieira JM, Gestri G, Denti L, Schwarz Q, Prykhozij S, Peri F, Wilson SW, Ruhrberg C. Tissue macrophages act as cellular chaperones for vascular anastomosis downstream of VEGF-mediated endothelial tip cell induction. *Blood*. 2010;116(5):829-40.
48. Vaucher E, Tong XK, Cholet N, Lantin S, Hamel E. GABA neurons provide a rich input to microvessels but not nitric oxide neurons in the rat cerebral cortex: a means for direct regulation of local cerebral blood flow. *J Comp Neurol*. 2000;421(2):161-71.
49. Banerjee S, Bhat MA. Neuron-glia interactions in blood-brain barrier formation. *Annu Rev Neurosci*. 2007;30:235-58.
50. Koide M, Wellman GC. SAH-induced suppression of voltage-gated K(+) (K (V)) channel currents in parenchymal arteriolar myocytes involves activation of the HB-EGF/EGFR pathway. *Acta Neurochir Suppl*. 2013;115:179-84.
51. Peterson JW, Roussos L, Kwun BD, Hackett JD, Owen CJ, Zervas NT. Evidence of the role of hemolysis in experimental cerebral vasospasm. *J Neurosurg*. 1990;72(5):775-81.
52. Graetz D, Nagel A, Schlenk F, Sakowitz O, Vajkoczy P, Sarrafzadeh A. High ICP as trigger of proinflammatory IL-6 cytokine activation in aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Neurol Res*. 2010;32(7):728-35.
53. Sarrafzadeh A, Schlenk F, Gericke C, Vajkoczy P. Relevance of cerebral interleukin-6 after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Neurocrit Care*. 2010;13(3):339-46.
54. Sozen T, Tsuchiyama R, Hasegawa Y, Suzuki H, Jadhav V, Nishizawa S, Zhang JH. Immunological response in early brain injury after SAH. *Acta Neurochir Suppl*. 2011;110(Pt 1):57-61.
55. Abbott NJ. Inflammatory mediators and modulation of blood-brain barrier permeability. *Cell Mol Neurobiol*. 2000;20(2):131-47.
56. Greenhalgh AD, Brough D, Robinson EM, Girard S, Rothwell NJ, Allan SM. Interleukin-1 receptor antagonist is beneficial after subarachnoid haemorrhage in rat by blocking haem-driven inflammatory pathology. *Dis Model Mech*. 2012;5(6):823-33.
57. Wang Z, Meng CJ, Shen XM, Shu Z, Ma C, Zhu GQ, Liu HX, He WC, Sun XB, Huo L, Zhang J, Chen G. Potential contribution of hypoxia-inducible factor-1alpha, aquaporin-4, and matrix metalloproteinase-9 to blood-brain barrier disruption and brain edema after experimental subarachnoid hemorrhage. *J Mol Neurosci*. 2012;48(1):273-80.
58. Clatterbuck RE, Gailloud P, Ogata L, Gebremariam A, Dietsch GN, Murphy KJ, Tamargo RJ. Prevention of cerebral vasospasm by a humanized anti-CD11/CD18 monoclonal antibody administered after experimental subarachnoid hemorrhage in nonhuman primates. *J Neurosurg*. 2003;99(2):376-82.

59. Pradilla G, Wang PP, Legnani FG, Ogata L, Dietsch GN, Tamargo RJ. Prevention of vasospasm by anti-CD11/CD18 monoclonal antibody therapy following subarachnoid hemorrhage in rabbits. *J Neurosurg.* 2004;101(1):88-92.
60. Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Müller-Newen G, Schaper F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J.* 2003;374(Pt 1):1-20.
61. Stenzen JA, Poschenrieder AJ. Bioanalytical chemistry of cytokines--a review. *Anal Chim Acta.* 2015;853:95-115.
62. Schneider UC, Davids AM, Brandenburg S, Müller A, Elke A, Magrini S, Atangana E, Turkowski K, Finger T, Gutenberg A, Gehlhaar C, Brück W, Heppner FL, Vajkoczy P. Microglia inflict delayed brain injury after subarachnoid hemorrhage. *Acta Neuropathol.* 2015;130(2):215-31.
63. Blecharz-Lang KG, Wagner J, Fries A, Nieminen-Kelhä M, Rösner J, Schneider UC, Vajkoczy P. Interleukin 6-Mediated Endothelial Barrier Disturbances Can Be Attenuated by Blockade of the IL6 Receptor Expressed in Brain Microvascular Endothelial Cells. *Transl Stroke Res.* 2018;9(6):631-42.
64. Qin W, Li J, Zhu R, Gao S, Fan J, Xia M, Zhao RC, Zhang J. Melatonin protects blood-brain barrier integrity and permeability by inhibiting matrix metalloproteinase-9 via the NOTCH3/NF- κ B pathway. *Aging (Albany NY).* 2019;11(23):11391-415.
65. Gertz K, Kronenberg G, Kälin RE, Baldinger T, Werner C, Balkaya M, Eom GD, Hellmann-Regen J, Kröber J, Müller KR, Lindauer U, Laufs U, Dirnagl U, Heppner FL, Endres M. Essential role of interleukin-6 in post-stroke angiogenesis. *Brain.* 2012;135(Pt 6):1964-80.
66. McMahon CJ, Hopkins S, Vail A, King AT, Smith D, Illingworth KJ, Clark S, Rothwell NJ, Tyrrell PJ. Inflammation as a predictor for delayed cerebral ischemia after aneurysmal subarachnoid haemorrhage. *J Neurointerv Surg.* 2013;5(6):512-7.
67. Westermaier T, Stetter C, Raslan F, Vince GH, Ernestus RI. Brain edema formation correlates with perfusion deficit during the first six hours after experimental subarachnoid hemorrhage in rats. *Exp Transl Stroke Med.* 2012;4(1):8.
68. Zhang C, Jiang M, Wang WQ, Zhao SJ, Yin YX, Mi QJ, Yang MF, Song YQ, Sun BL, Zhang ZY. Selective mGluR1 Negative Allosteric Modulator Reduces Blood-Brain Barrier Permeability and Cerebral Edema After Experimental Subarachnoid Hemorrhage. *Transl Stroke Res.* 2019.
69. Ayer R, Zhang J. Connecting the early brain injury of aneurysmal subarachnoid hemorrhage to clinical practice. *Turk Neurosurg.* 2010;20(2):159-66.
70. Armulik A, Genové G, Mäe M, Nisancioglu MH, Wallgard E, Niaudet C, He L, Norlin J, Lindblom P, Strittmatter K, Johansson BR, Betsholtz C. Pericytes regulate the blood-brain barrier. *Nature.* 2010;468(7323):557-61.
71. *Wallesch C-W, Unterberg A, Dietz V. Neurotraumatologie: Thieme; 2005.*
72. Suzuki H, Fujimoto M, Kawakita F, Liu L, Nakatsuka Y, Nakano F, Nishikawa H, Okada T, Kanamaru H, Imanaka-Yoshida K, Yoshida T, Shiba M. Tenascin-C in brain injuries and edema after subarachnoid hemorrhage: Findings from basic and clinical studies. *J Neurosci Res.* 2020;98(1):42-56.
73. Suzuki H, Nakano F. To Improve Translational Research in Subarachnoid Hemorrhage. *Transl Stroke Res.* 2018;9(1):1-3.
74. de Oliveira Manoel AL, Goffi A, Zampieri FG, Turkel-Parrella D, Duggal A, Marotta TR, Macdonald RL, Abrahamson S. The critical care management of spontaneous intracranial hemorrhage: a contemporary review. *Crit Care.* 2016;20:272.
75. Rochfort KD, Collins LE, Murphy RP, Cummins PM. Downregulation of blood-brain barrier phenotype by proinflammatory cytokines involves NADPH oxidase-dependent ROS generation: consequences for interendothelial adherens and tight junctions. *PLoS One.* 2014;9(7):e101815.
76. Li Z, Liang G, Ma T, Li J, Wang P, Liu L, Yu B, Liu Y, Xue Y. Blood-brain barrier permeability change and regulation mechanism after subarachnoid hemorrhage. *Metab Brain Dis.* 2015;30(2):597-603.
77. Mark KS, Miller DW. Increased permeability of primary cultured brain microvessel endothelial cell monolayers following TNF-alpha exposure. *Life Sci.* 1999;64(21):1941-53.

78. Wang Y, Jin S, Sonobe Y, Cheng Y, Horiuchi H, Parajuli B, Kawanokuchi J, Mizuno T, Takeuchi H, Suzumura A. Interleukin-1 β induces blood-brain barrier disruption by downregulating Sonic hedgehog in astrocytes. *PLoS One*. 2014;9(10):e110024.
79. Vlachogiannis P, Hillered L, Khalil F, Enblad P, Ronne-Engström E. Interleukin-6 Levels in Cerebrospinal Fluid and Plasma in Patients with Severe Spontaneous Subarachnoid Hemorrhage. *World Neurosurg*. 2019;122:e612-e8.
80. Reed MJ, Damodarasamy M, Banks WA. The extracellular matrix of the blood-brain barrier: structural and functional roles in health, aging, and Alzheimer's disease. *Tissue Barriers*. 2019;7(4):1651157.
81. Nagase H, Woessner JF. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem*. 1999;274(31):21491-4.
82. Lischper M, Beuck S, Thanabalasundaram G, Pieper C, Galla HJ. Metalloproteinase mediated occludin cleavage in the cerebral microcapillary endothelium under pathological conditions. *Brain Res*. 2010;1326:114-27.
83. Takata F, Dohgu S, Matsumoto J, Takahashi H, Machida T, Wakigawa T, Harada E, Miyaji H, Koga M, Nishioku T, Yamauchi A, Kataoka Y. Brain pericytes among cells constituting the blood-brain barrier are highly sensitive to tumor necrosis factor- α , releasing matrix metalloproteinase-9 and migrating in vitro. *J Neuroinflammation*. 2011;8:106.
84. Zozulya A, Weidenfeller C, Galla HJ. Pericyte-endothelial cell interaction increases MMP-9 secretion at the blood-brain barrier in vitro. *Brain Res*. 2008;1189:1-11.
85. Vikman P, Beg S, Khurana TS, Khurana T, Hansen-Schwartz J, Edvinsson L. Gene expression and molecular changes in cerebral arteries following subarachnoid hemorrhage in the rat. *J Neurosurg*. 2006;105(3):438-44.
86. Mathiisen TM, Lehre KP, Danbolt NC, Ottersen OP. The perivascular astroglial sheath provides a complete covering of the brain microvessels: an electron microscopic 3D reconstruction. *Glia*. 2010;58(9):1094-103.
87. Ahn SH, Savarraj JPJ, Parsha K, Hergenroeder GW, Chang TR, Kim DH, Kitagawa RS, Blackburn SL, Choi HA. Inflammation in delayed ischemia and functional outcomes after subarachnoid hemorrhage. *J Neuroinflammation*. 2019;16(1):213.
88. Dengler J, Schefold JC, Graetz D, Meisel C, Splettstösser G, Volk HD, Schlosser HG. Point-of-care testing for interleukin-6 in cerebro spinal fluid (CSF) after subarachnoid haemorrhage. *Med Sci Monit*. 2008;14(12):BR265-8.
89. Strauss S, Bauer J, Ganter U, Jonas U, Berger M, Volk B. Detection of interleukin-6 and alpha 2-macroglobulin immunoreactivity in cortex and hippocampus of Alzheimer's disease patients. *Lab Invest*. 1992;66(2):223-30.
90. Müller T, Blum-Degen D, Przuntek H, Kuhn W. Interleukin-6 levels in cerebrospinal fluid inversely correlate to severity of Parkinson's disease. *Acta Neurol Scand*. 1998;98(2):142-4.
91. Hans VH, Kossmann T, Lenzlinger PM, Probstmeier R, Imhof HG, Trentz O, Morganti-Kossmann MC. Experimental axonal injury triggers interleukin-6 mRNA, protein synthesis and release into cerebrospinal fluid. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1999;19(2):184-94.
92. De Simoni MG, Perego C, Ravizza T, Moneta D, Conti M, Marchesi F, De Luigi A, Garattini S, Vezzani A. Inflammatory cytokines and related genes are induced in the rat hippocampus by limbic status epilepticus. *Eur J Neurosci*. 2000;12(7):2623-33.
93. Jüttler E, Tarabin V, Schwaninger M. Interleukin-6 (IL-6): a possible neuromodulator induced by neuronal activity. *Neuroscientist*. 2002;8(3):268-75.
94. Atangana E, Schneider UC, Blecharz K, Magrini S, Wagner J, Nieminen-Kelhä M, Kremenetskaia I, Heppner FL, Engelhardt B, Vajkoczy P. Intravascular Inflammation Triggers Intracerebral Activated Microglia and Contributes to Secondary Brain Injury After Experimental Subarachnoid Hemorrhage (eSAH). *Transl Stroke Res*. 2017;8(2):144-56.
95. Sternberg N. Bacteriophage P1 site-specific recombination. III. Strand exchange during recombination at lox sites. *J Mol Biol*. 1981;150(4):603-8.

96. Feil S, Valtcheva N, Feil R. Inducible Cre mice. *Methods Mol Biol.* 2009;530:343-63.
97. Quintana A, Erta M, Ferrer B, Comes G, Giralt M, Hidalgo J. Astrocyte-specific deficiency of interleukin-6 and its receptor reveal specific roles in survival, body weight and behavior. *Brain Behav Immun.* 2013;27(1):162-73.
98. Raabe A, Beck J, Berkefeld J, Deinsberger W, Meixensberger J, Schmiedek P, Seifert V, Steinmetz H, Unterberg A, Vajkoczy P, Werner C, Intensivmedizin DGfAu. [Recommendations for the management of patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage]. *Zentralbl Neurochir.* 2005;66(2):79-91.
99. Macdonald RL. Endothelin antagonists in subarachnoid hemorrhage: what next? *Crit Care.* 2012;16(6):171.
100. Serrone JC, Maekawa H, Tjahjadi M, Hernesniemi J. Aneurysmal subarachnoid hemorrhage: pathobiology, current treatment and future directions. *Expert Rev Neurother.* 2015;15(4):367-80.
101. Peters M, Muller AM, Rose-John S. Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptor: direct stimulation of gp130 and hematopoiesis. *Blood.* 1998;92(10):3495-504.
102. Juttler E, Tarabin V, Schwaninger M. Interleukin-6 (IL-6): a possible neuromodulator induced by neuronal activity. *Neuroscientist.* 2002;8(3):268-75.
103. Vallieres L, Rivest S. Regulation of the genes encoding interleukin-6, its receptor, and gp130 in the rat brain in response to the immune activator lipopolysaccharide and the proinflammatory cytokine interleukin-1beta. *J Neurochem.* 1997;69(4):1668-83.
104. Nilsson MB, Langley RR, Fidler IJ. Interleukin-6, secreted by human ovarian carcinoma cells, is a potent proangiogenic cytokine. *Cancer Res.* 2005;65(23):10794-800.
105. Rochfort KD, Collins LE, McLoughlin A, Cummins PM. Tumour necrosis factor-alpha-mediated disruption of cerebrovascular endothelial barrier integrity in vitro involves the production of proinflammatory interleukin-6. *J Neurochem.* 2016;136(3):564-72.
106. Duchini A, Govindarajan S, Santucci M, Zampi G, Hofman FM. Effects of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 on fluid-phase permeability and ammonia diffusion in CNS-derived endothelial cells. *J Investig Med.* 1996;44(8):474-82.
107. Rubbert-Roth A, Furst DE, Nebesky JM, Jin A, Berber E. A Review of Recent Advances Using Tocilizumab in the Treatment of Rheumatic Diseases. *Rheumatol Ther.* 2018;5(1):21-42.
108. Chaichana KL, Pradilla G, Huang J, Tamargo RJ. Role of inflammation (leukocyte-endothelial cell interactions) in vasospasm after subarachnoid hemorrhage. *World Neurosurg.* 2010;73(1):22-41.
109. Rasmussen R, Bache S, Stavngaard T, Møller K. Plasma Levels of IL-6, IL-8, IL-10, ICAM-1, VCAM-1, IFN γ , and TNF α are not Associated with Delayed Cerebral Ischemia, Cerebral Vasospasm, or Clinical Outcome in Patients with Subarachnoid Hemorrhage. *World Neurosurg.* 2019;128:e1131-e6.
110. Shin BJ, Burkhardt JK, Riina HA, Boockvar JA. Superselective intra-arterial cerebral infusion of novel agents after blood-brain disruption for the treatment of recurrent glioblastoma multiforme: a technical case series. *Neurosurg Clin N Am.* 2012;23(2):323-9, ix-x.
111. Weiss CK, Kohnle MV, Landfester K, Hauk T, Fischer D, Schmitz-Wienke J, Mailänder V. The first step into the brain: uptake of NIO-PBCA nanoparticles by endothelial cells in vitro and in vivo, and direct evidence for their blood-brain barrier permeation. *ChemMedChem.* 2008;3(9):1395-403.
112. Patrick JT, Nolting MN, Goss SA, Dines KA, Clendenon JL, Rea MA, Heimbürger RF. Ultrasound and the blood-brain barrier. *Adv Exp Med Biol.* 1990;267:369-81.
113. Elliott PJ, Hayward NJ, Huff MR, Nagle TL, Black KL, Bartus RT. Unlocking the blood-brain barrier: a role for RMP-7 in brain tumor therapy. *Exp Neurol.* 1996;141(2):214-24.
114. Warren KE, Patel MC, Aikin AA, Widemann B, Libucha M, Adamson PC, Neuwirth R, Benziger D, O'Toole T, Ford K, Patronas N, Packer RJ, Balis FM. Phase I trial of lobradimil (RMP-7) and carboplatin in children with brain tumors. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2001;48(4):275-82.

11 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Alexa Charlotte Luise Fries, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Der Effekt des Interleukin 6 auf Struktur und Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke im Rahmen der sekundären Hirnschädigung nach Subarachnoidalblutung / The role of interleukin 6 on blood-brain barrier permeability and structure in secondary brain injury after SAH“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

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

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

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

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

Datum

Unterschrift

12 Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Alexa Charlotte Luise Fries hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1: Fries A, Blecharz K, Wagner J, Winkler L, Schneider UC, Vajkoczy P. The role of IL6 in the dysregulation of the neurovascular unit and secondary brain injury after SAH. *Fluids and Barriers of the CNS*, 2017.

Frau Fries führte im experimentellen Bereich der oben genannten Publikation alle Operationen der induzierten Subarachnoidalblutung mittels Fadenperforationsmethode eigenständig durch. Sie übernahm die histologischen Untersuchungen der Gewebeproben sowie die statistische Auswertung der in der Publikation enthaltenen Experimente. Die Isolation zerebraler Kapillaren erfolgt in Kooperation mit Herrn Lars Winkler des Leibniz-Forschungsinstitut für Molekulare Pharmakologie. Die schriftliche Verfassung der Publikation wurde ausschließlich von Frau Fries angefertigt, ohne Inanspruchnahme der Hilfe weiterer Personen.

Der Abstrakt enthält erhobene Daten aus folgenden Kapiteln dieser Dissertation: 8.2 Zeitabhängige Hochregulation der IL6-Genexpression im BHS-Endothel nach SAB, 8.4.1 IL6-Defizienz verhindert die Passage von EB 70kDa, 8.6.1 Endotheliale Expression von Claudin-5, 8.6.2 Endotheliale Expression von Occludin, 8.7.1 IL6-Defizienz geht einher mit verminderter TNF α -Expression, 8.7.2 IL6-Defizienz unterbindet Überexpression von IL1 β , 8.8.1 IL6-vermittelte MMP9 Hochregulation, 8.8.2 SAB-induzierte Collagen IV – Reduktion, 8.10 SAB-induzierte perizytäre Apoptose.

Publikation 2: Fries A, Blecharz-Lang KG, Nieminen-Kelhä M, Winkler L, Schneider UC, Vajkoczy P. The role of interleukin 6 for the molecular passage through the blood-brain barrier and endothelial-pericyte coverage in secondary brain injury after subarachnoid hemorrhage. 69. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie (DGNC) Münster, 03.-06.06.2018, German Medical Science GMS Publishing House, 2018.

Frau Fries führte in der oben genannten Publikation alle Operationen der induzierten Subarachnoidalblutung mittels Fadenperforationsmethode durch. Sie übernahm die histologischen Untersuchungen der Gewebeproben sowie die statistische Auswertung der in der Publikation enthaltenen Experimente. Die schriftliche Verfassung der Publikation sowie die Ausarbeitung der Präsentation und deren Vorstellung auf der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie wurden ausschließlich von Frau Fries angefertigt, ohne Inanspruchnahme der Hilfe weiterer Personen

Der Abstrakt enthält erhobene Daten aus folgenden Kapiteln dieser Dissertation: 8.2 Zeitabhängige Hochregulation der IL6-Genexpression im BHS-Endothel nach SAB, 8.4.1 IL6-Defizienz verhindert die Passage von EB 70kDa, 8.4.2 IL6-Defizienz kann die Passage von FD 4 kDa nicht unterbinden 8.6.1 Endotheliale Expression von Claudin-5, 8.6.2 Endotheliale Expression von Occludin, 8.7.1 IL6-Defizienz geht einher mit verminderter TNF α -Expression, 8.7.2 IL6-Defizienz unterbindet Überexpression von IL1 β , 8.10 SAB-induzierte perizytäre Apoptose.

Publikation 3: Blecharz-Lang KG, Wagner J, Fries A, Nieminen-Kelhä M, Rösner J, Schneider UC, Vajkoczy P. Interleukin 6-Mediated Endothelial Barrier Disturbances Can Be Attenuated by Blockade of the IL6 Receptor Expressed in Brain Microvascular Endothelial Cells. Translational Stroke Research, 2018.

Frau Fries führte in der oben genannten Publikation einen Großteil der Operationen der induzierten Subarachnoidalblutung mittels Fadenperorationsmethode eigenständig durch. Die immunhistochemische Analyse der Gewebeproben bezüglich Evans Blue und CD31 sowie deren Aufarbeitung erfolgte durch Frau Fries. Die Visualisierung und die Datenauswertung der Figures 1A und B wurde von Frau Fries angefertigt. Frau Fries leistete einen wesentlichen Teil der Literaturrecherche und trug zu der Erarbeitung des Manuskripts bei. Namentlich finden sich in der oben genannten Publikation Daten aus folgenden Kapiteln der Dissertation: 8.3.1 IL6-vermittelter Anstieg der BHS-Permeabilität nach SAB, 8.4.1 IL6-Defizienz verhindert die Passage von EB 70 kDa nach SAB.

Unterschrift, Datum und Stempel des erstbetreuenden Hochschullehrers

Unterschrift der Doktorandin

13 Lebenslauf

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

14 Publikationsliste

Fries A, Blecharz K, Wagner J, Winkler L, Schneider UC, Vajkoczy P. The role of IL6 in the dysregulation of the neurovascular unit and secondary brain injury after SAH. *Fluids and Barriers of the CNS*, 2017.

Fries A, Blecharz-Lang KG, Nieminen-Kelhä M, Winkler L, Schneider UC, Vajkoczy P. The role of interleukin 6 for the molecular passage through the blood-brain barrier and endothelial-pericyte coverage in secondary brain injury after subarachnoid hemorrhage. 69. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Neurochirurgie (DGNC) Münster, 03.-06.06.2018, German Medical Science GMS Publishing House, 2018.

Blecharz-Lang KG, Wagner J, Fries A, Nieminen-Kelhä M, Rösner J, Schneider UC, Vajkoczy P. Interleukin 6-Mediated Endothelial Barrier Disturbances Can Be Attenuated by Blockade of the IL6 Receptor Expressed in Brain Microvascular Endothelial Cells. *Translational Stroke Research*, 2018.

15 Danksagung

An erster Stelle gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Vajkoczy für die Möglichkeit, meine Promotion in der experimentellen Neurochirurgie durchzuführen, für seine Unterstützung und fortwährende Hilfestellung bei wissenschaftlichen Problemen. Besonders möchte ich mich bei meiner Betreuerin Frau Dr. Kinga Blecharz-Lang bedanken, die dieses Projekt über all die Jahre mit viel Engagement leitete und mich mit ihren Anregungen, Ideen und ihrer ehrlichen Kritik stets weiterbrachte. Mein Dank gilt außerdem den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Labors für die gute Zusammenarbeit, insbesondere Frau Melina Nieminen-Kelhä für die Einarbeitung und die Unterstützung bei der Durchführung der Experimente. Ein besonderer letzter Dank gilt meinen lieben Freunden, meiner Familie, allen voran meiner Mutter, und meinem Freund Matthias für ihre Geduld, ihr Vertrauen und ihre Unterstützung.