

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

DISSERTATION

Beeinflussung der Immunantwort nach Subarachnoidalblutung  
als Ansatz zur Vermeidung sekundärer Hirnschäden

Influencing the immune response after subarachnoid  
hemorrhage as an approach to prevent secondary brain  
damage

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Rebecca Heinz  
aus Düsseldorf

Datum der Promotion: 26.06.2022

Für meinen Opa  
Manfred Dürr

## **Vorwort**

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht in:

Rebecca Heinz, Susan Brandenburg, Melina Nieminen-Kelhä, Irina Kremenetskaia, Philipp Boehm-Sturm, Peter Vajkoczy and Ulf C. Schneider

Microglia as target for anti-inflammatory approaches to prevent secondary brain injury after subarachnoid hemorrhage (SAH)

J Neuroinflammation, 2021 Jan 30;18(1):36

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>6</b>
<b>Zusammenfassung</b>	<b>7</b>
<b>Abstract</b>	<b>8</b>
<b>1. Einleitung</b>	<b>9</b>
1.1 <i>Definition Subarachnoidalblutung, Epidemiologie</i>	9
1.2 <i>Pathophysiologie der Subarachnoidalblutung</i>	9
1.3 <i>Inflammation nach Subarachnoidalblutung</i>	10
1.4 <i>Die Rolle der Mikroglia in der Pathophysiologie der Subarachnoidalblutung</i>	11
1.5 <i>Der TLR4-Rezeptor</i>	12
<b>2. Zielsetzung</b>	<b>13</b>
<b>3. Material und Methodik</b>	<b>13</b>
3.1 <i>Tierexperimentelles Arbeiten</i>	13
3.2 <i>MRT-Untersuchung</i>	14
3.3 <i>Mikroglia-Isolierung</i>	14
3.4 <i>Durchflusszytometrie (FACS)</i>	15
3.5 <i>Histologische Methodik</i>	16
3.6 <i>Molekularbiologische Methodik</i>	16
3.7 <i>Statistische Auswertung</i>	17
<b>4. Ergebnisse</b>	<b>17</b>
4.1 <i>Akkumulation von Mikrogliazellen</i>	17
4.2 <i>Neuronaler Zelltod</i>	17
4.3 <i>Pro- und anti-inflammatorische Genexpression</i>	18
4.4 <i>Oberflächenexpression von TLR4 und CD115</i>	19
<b>5. Diskussion</b>	<b>19</b>
5.1 <i>Der TLR4-Rezeptor und die inflammatorische Präkonditionierung</i>	19
5.2 <i>CSF1-Rezeptor-Inhibierung führt zu einer verminderten Rezeptorexpression</i>	22
5.3 <i>Zusammenfassender Vergleich der Behandlungskonzepte und Ausblick</i>	22
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	<b>24</b>
<b>Eidesstattliche Versicherung</b>	<b>29</b>
<b>Anteilerklärung an der erfolgten Publikation</b>	<b>30</b>
<b>Auszug aus der Journal Summary List</b>	<b>31</b>
<b>Druckexemplar der Publikation</b>	<b>33</b>

<b>Lebenslauf</b>	<b>46</b>
<b>Publikationsliste</b>	<b>48</b>
<b>Danksagung</b>	<b>49</b>

## Abkürzungsverzeichnis

AVM	Arterio-venöse Malformation
BBB	blood-brain barriere
BSA	Bovines Serum-Albumin
CBF	cerebral blood flow
CD	Cluster of differentiation
cDNA	complementary DNA
COX2	Cyclooxygenase 2
CPP	Cerebral perfusion pressure
CSF1	Colony Stimulating Factor 1
CSF1R	Colony Stimulating Factor 1 Rezeptor
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DNA	desoxyribonucleid acid
ET	Endotoxin tolerance
FACS	fluorescence-activated cell scanning
FCS	Fetales Kälber-Serum
Iba1	Ionized calcium-binding adapter molecule 1
ICP	Intra-cranial pressure
IL	Interleukin
KG	Körpergewicht
LPS	Lipopolysaccharide
MACS	Magnetic-activated cell sorting
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PFA	Paraformaldehyd
SAB	Subarachnoidalblutung
TGF	Transforming growth factor
TLR	Toll-like receptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TUNEL	TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling
ZNS	Zentrales Nervensystem

## Zusammenfassung

Die Prognose von Patienten nach dem Erleiden einer Subarachnoidalblutung ist nach wie vor ungünstig. Ein wesentlicher Faktor besteht dabei aus der Neuroinflammation, die als Reaktion auf die Blutung folgt. Hauptinitiatoren dieser Immunantwort sind die ortsständigen Immunzellen des Gehirns, die Mikroglia.

In der vorliegenden Arbeit wird überprüft, ob eine Beeinflussung der Mikroglia-Aktivität durch a) inflammatorische Präkonditionierung mit LPS oder b) CSF1R-Inhibierung durch PLX3397 mit verminderter Inflammation und damit mit weniger neuronalem Zelltod einhergeht.

Es wurde ein Mausmodell zur in vivo Untersuchung der Inflammation verwendet.

Dabei bestand der Versuchsaufbau aus 4 Gruppen C57Bl/6-Mäusen: Sham-operierte Mäuse, SAB unbehandelt, SAB präkonditioniert und PLX3397-behandelte SAB. Zur Quantifizierung der Immunreaktion wurden Immunfluoreszenzfärbungen angefertigt, um die Anzahl der Mikroglia und den neuronalen Zelltod vergleichen zu können. Daneben erfolgte die Isolierung der Mikroglia mit anschließender Genexpressionsanalyse der inflammatorischen Zytokine TNFalpha, IL6 und IL1beta und der anti-inflammatorischen Zytokine TGFbeta, IL10 und IL4, sowie eine FACS-Färbung zur Untersuchung der Oberflächenmoleküle TLR4 und CSF1R.

Beide Behandlungsansätze zeigten eine signifikante Reduktion der Mikroglia-Akkumulation, die präkonditionierten Tiere wiesen weniger als die Hälfte der Mikroglia-Akkumulation auf, die PLX3397-behandelten Tiere zeigten eine Akkumulation auf Sham-Niveau. Auch der neuronale Zelltod konnte in beiden Behandlungsansätzen um etwa die Hälfte reduziert werden. Daneben wurde eine verminderte Genexpression inflammatorischer Zytokine wie IL6 und IL1beta in beiden behandelten Gruppen nachgewiesen. Die TLR4-Oberflächenexpression sowie die CSF1-Oberflächenexpression zeigten eine jeweils signifikante Reduktion in den behandelten Gruppen.

Eine Beeinflussung der Mikroglia-Funktion, ob nun über inflammatorische Präkonditionierung oder eine Inhibition des CSF1-Rezeptors, führt zu einer signifikanten Verminderung der Immunreaktion im Hirnparenchym nach Subarachnoidalblutung und damit verbunden auch zu vermindertem neuronalem Zelltod. Eine auf die Mikroglia abzielende Therapie könnte für Patienten nach einer Subarachnoidalblutung demnach ein vielversprechender Ansatz für die Vermeidung sekundärer Hirnschäden sein.

## Abstract

The prognosis of patients after suffering subarachnoid haemorrhage is still unfavourable. Partly responsible for the bad outcome is the immune reaction within the brain parenchyma following the bleeding. Microglia are the brain's resident immune cells, so we examined two different approaches targeting microglia activity after the bleeding to prevent secondary brain injury by diminishing inflammation: a) inflammatory preconditioning and b) using a CSF1R-Inhibitor, PLX3397.

4 groups of C57Bl/6-mice were used to induce SAH utilizing the endovascular perforation model: a) SAH, b) Sham, c) LPS-preconditioned SAH and d) PLX3397-treated SAH.

Immunofluorescent stainings were used to quantify the immune response by comparing the number of microglia and neuronal cell death. In addition, microglia were isolated from the brain tissue, followed by gene expression analysis of the inflammatory cytokines TNFalpha, IL6 and IL1beta and the anti-inflammatory cytokines TGFbeta, IL10 and IL4, as well as FACS staining was performed to study the surface molecules TLR4 and CD115.

Both treatment approaches showed a significant reduction in microglial accumulation. The preconditioned animals presented less than half of the microglial accumulation, the PLX3397 treated animals presented sham-level accumulation. Neuronal apoptosis was also reduced in both treatment approaches. In addition, a reduced gene expression of inflammatory cytokines such as IL6 and IL1beta could be detected in both treated groups. In order to obtain a more accurate picture of the mode of function of the two treatment approaches, TLR4 surface expression was investigated in inflammatory preconditioning and CSF1 surface expression in the PLX3397-treated group. A significant reduction in each of the treated groups was observed.

Influencing the microglial function, whether via inflammatory preconditioning or inhibition of the CSF1 receptor, leads to a significant reduction of the immune reaction within the brain parenchyma after subarachnoid hemorrhage, resulting in reduced neuronal apoptosis. Microglia-mediated therapy may therefore be a promising approach to prevent secondary brain damage in patients with subarachnoid hemorrhage.

# 1. Einleitung

## 1.1 Definition Subarachnoidalblutung, Epidemiologie

Die Subarachnoidalblutung (SAB) ist zu definieren als eine intrakranielle Blutung, welche nicht innerhalb des zentralen Nervensystems (ZNS) lokalisiert ist, sondern vielmehr im Bereich der Meningen. Sie gehört zum Formenkreis der Apoplexien, macht jedoch mit etwa 5 Prozent einen wesentlich geringeren Anteil aus als der ischämische Schlaganfall.

Bei der Subarachnoidalblutung kommt es zu einem Bluteinstrom in den mit Liquor cerebrospinalis gefüllten Subarachnoidalraum, welcher sich zwischen der Arachnoidea und der Pia mater befindet [1]. Als Auslöser für diese Art der Blutung können verschiedene Ursachen angeführt werden.

Bei etwa 85 Prozent der nicht-traumatischen SABs handelt es sich um eine aneurysmatische Subarachnoidalblutung (aSAB), bei der die Ruptur einer Aussackung der Hirnbasisarterien, meistens im Bereich des Circulus arteriosus Willisii dazu führt, dass Blut in den Subarachnoidalraum gelangt. Besonders an mechanisch stark beanspruchten Stellen wie etwa der Abzweigung der A. communicans anterior kann ein Aneurysma auftreten. Prädisponierend für eine solche Ruptur können zum Beispiel erworbene Gefäßveränderungen wie Arteriosklerose oder erbliche Bindegewebserkrankungen wie das Ehlers-Danlos Syndrom oder das Marfan-Syndrom sein. Weitere Risikofaktoren sind Nikotin- oder Alkoholabusus, arterieller Hypertonus oder das Einnehmen oraler Kontrazeptiva. Neben einer Aneurysmaruptur kann es auch noch andere, wesentlich seltenere Auslöser für eine nicht-traumatische SAB geben; zu nennen wären hier die arterio-venöse Malformation (AVM), Durafisteln oder eine Sinus-Venen-Thrombose [2].

Unter epidemiologischen Gesichtspunkten ist davon ausgehen, dass in den Industrienationen etwa jährlich 10-11/100000 Personen erkranken, der Erkrankungsgipfel liegt hier um das 50. Lebensjahr. Frauen sind etwas häufiger betroffen als Männer (Verhältnis 3:2) [3].

Die Prognose der Erkrankung ist nach wie vor nicht gut. So versterben etwa 40% der Betroffenen innerhalb der ersten 30 Tage nach Eintritt des Ereignisses. Von den überlebenden Patienten ist nur ca. ein Drittel im weiteren Verlauf wieder in der Lage, ein selbstständiges Leben zu führen, der übrige Teil überlebt nur mit maßgeblichen neurologischen Einschränkungen [4].

## 1.2 Pathophysiologie der Subarachnoidalblutung

Eines der Leitsymptome der SAB ist Kopfschmerz von einer bis dahin nicht gekannten Intensität, häufig kommt es zu Bewusstseinsstörungen, fokalen neurologischen Defiziten und einem Meningismus. Allerdings muss auch bei leichteren Kopfschmerzen und anderen, nicht unbedingt

spezifischen Symptomen wie Übelkeit, Erbrechen oder Schweißausbrüchen an eine SAB gedacht werden [1].

Während der Blutung kommt es zu einer Erhöhung des intrakraniellen Drucks (ICP), da eine Einblutung (zumeist arteriell) in einem knöchernen, unveränderlichen Raum stattfindet.

Als direkte Folge davon sinkt der zerebrale Blutfluss (CBF) und damit auch der zerebrale Perfusionsdruck (CPP) ab, wodurch es zu einer globalen, zerebralen Ischämie kommt [5].

Nicht nur der erhöhte ICP bedingt ein Absinken des CBF, auch die Funktion der zerebralen Autoregulation, welche den CPP normalerweise unabhängig vom mittleren arteriellen Druck in engen Grenzen hält, kann nach der SAB versagen. So wird keine optimale Perfusion mehr gewährleistet [6].

Daneben können bei Einstrom von Blut in die Ventrikel die Arachnoidalzotten verkleben und so ein Hydrocephalus aresorptivus entstehen [7].

Außerdem können zerebrale Vasospasmen auftreten, Häufigkeitsmaximum ist hier der Zeitraum zwischen Tag 4 und 14 nach der Blutung, 30-70% der Patienten sind betroffen [6].

### 1.3 Inflammation nach Subarachnoidalblutung

Das Auftreten inflammatorischer Prozesse im ZNS wurde mittlerweile bei vielen Erkrankungen nachgewiesen, Beispiele sind die Alzheimer-Erkrankung, Multiple Sklerose, verschiedene Hirntumore oder der ischämische Schlaganfall [8-10].

Hierbei liegt der Unterschied zur SAB jedoch in der Lokalisation der Pathologie. Ausgang nimmt diese sonst immer innerhalb des Hirnparenchyms. Bei der SAB findet der initiale Prozess außerhalb des Hirnparenchyms im Subarachnoidalraum statt, der das gesamte Hirn umgibt, es jedoch nicht infiltriert. Dennoch ist mittlerweile nachgewiesen, dass auch eine SAB eine Immunantwort im Hirngewebe nach sich zieht [11, 12].

Im Unterschied zu den Prozessen, die als direkte Konsequenz auf den Bluteinstrom folgen (erhöhter ICP, zerebrale Ischämie, Hydrocephalus) wird die Immunreaktion den sekundären Hirnschäden zugeordnet [11]. Diese entstehen nicht akut, sondern im Verlauf der Phase nach der SAB. Es existieren nach wie vor große Lücken in der Aufklärung des schlechten Outcomes von SAB-Patienten, denen man eine Behandlung jeglicher verstandenen Pathomechanismen zukommen lässt. Daher gerät die Immunantwort nach SAB und ihre Behandlung immer stärker in den Fokus [13].

Auf molekularer Ebene wird unter anderem vermutet, dass der Inflammation Blutabbauprodukte zugrunde liegen, welche sich im Subarachnoidalraum anhäufen. Nachdem diese Kontakt zu

Mikroglia gefunden haben, lösen sie eine Inflammation aus, welche auf diese danger associated molecular patterns (DAMPs) folgt. [14-17]

#### 1.4 Die Rolle der Mikroglia in der Pathophysiologie der Subarachnoidalblutung

Als ortsständige Immunzellen des zentralen Nervensystems (ZNS) sind die Mikroglia-Zellen Hauptakteure der Immunantwort [13]. Sie bilden die Repräsentanten der angeborenen Immunantwort als Vertreter der Makrophagen im ZNS. Es wird vermutet, dass ein Einwandern der Mikroglia als primitive myeloide Vorläuferzelle in der frühen Embryonalphase stattfindet. Wie sich dieser Prozess im Verlauf des weiteren Lebens gestaltet, ist noch nicht abschließend geklärt [18].

Morphologisch lassen sich Mikroglia in eine aktivierte und eine ruhende Form unterteilen.

Im nicht-aktivierten Zustand haben sie lange, zahlreich verzweigte Ausläufer, so können sie mit anderen Zellen Kontakt aufnehmen und ihre direkte Umgebung abtasten.

Werden Mikroglia jedoch aktiviert, ändert sich ihre Morphologie. Der Zellkörper nimmt eine amöboide Form an, die Ausläufer verkürzen sich [19].

Im intakten adulten Gehirn sind sie für ein Aufrechterhalten der Homöostase zuständig und ermöglichen ein schnelles Reagieren auf schädigende Einflüsse wie Pathogene oder Verletzungen. Daneben unterstützen sie die neuronale Plastizität und geben so die Möglichkeit für ein ständiges Anpassen an neue Umweltbedingungen. Kennzeichnend für Mikroglia ist ihre ausgeprägte Fähigkeit der Migration. So ist nach Prozessen im Hirnparenchym, die einer Immunreaktion bedürfen, eine Mikroglia-Akkumulation zu beobachten [20].

Als Immunzellen sind die Mikroglia mitverantwortlich für die neuronale Schädigung nach SAB. Es konnte bereits gezeigt werden, dass hier eine starke Mikroglia-Akkumulation vorliegt und diese mit der verstärkten Apoptose von neuronalen Zellen einhergeht. Dabei konnte im Mausmodell als Zeitpunkt der stärksten Akkumulation Tag 14 nach SAB identifiziert werden [13].

Wie genau die Funktion der Mikroglia nun einzuordnen ist, wie ihre neuroprotektive Funktion im Gegensatz zu der Inflammation und damit einhergehenden neuro-degenerativen Prozessen steht, bleibt bisher Gegenstand weiterer Forschung.

Man kann Mikroglia anhand ihres Zytokin-Expressionsverhaltens in einen pro-inflammatorischen (M1) und einen neuroprotektiven (M2) Phänotyp einteilen, welchen sie nach einem adäquaten Stimulus exprimieren. Dies kann für den M1-Phänotyp zum Beispiel eine Verletzung des Hirnparenchyms oder ein Pathogen sein [21, 22]. Charakteristisch für den pro-inflammatorischen

Phänotyp sind die klassischen inflammatorischen Zytokine IL1beta, IL6 und TNFalpha, ebenso zum Beispiel Enzyme wie COX2.

Es wird vermutet, dass ein Stimulus die Aufnahme apoptotischer Zellen sein kann, ebenso die Exposition gegenüber anti-inflammatorischen Zytokinen wie IL4, IL10 oder TGFbeta [23-25].

Diese gelten dann auch kennzeichnend als typische Zytokine der M2-Mikroglia. Sie sind für ein Wiederherstellen der Homöostase und für die Phagozytose von Zelldebris zuständig [21].

Die Rolle und Funktion der Mikroglia nach der SAB wurde bereits eingehend untersucht; dass die Mikroglia wesentlich an der Inflammation nach SAB beteiligt sind, ist bewiesen [13].

In klinischen Studien konnte nun bereits bestätigt werden, dass ein Anstieg inflammatorischer Zytokine sowohl im Liquor als auch im Serum mit einem schlechteren klinischen Outcome korreliert [26].

### 1.5 Der TLR4-Rezeptor

Verschiedene Signalwege führen von der Mikroglia-Aktivierung aus zu einer Inflammation. Am besten und intensivsten untersucht wurde hier der NFκB-Signalweg ausgehend vom TLR4-Rezeptor [14, 27-30]. Der TLR4-Rezeptor kann damit nach der SAB durch viele neu entstehende Liganden, wie zum Beispiel Blutabbauprodukte wie Methämoglobin, Fibrinogen oder Häm die Inflammation initiieren [16]. Bewiesen werden konnte diese Hypothese schon im Rattenmodell, ebenso auch beim Menschen [31, 32]. Die Zellbestandteile und Blutabbauprodukte, welche sich nach einer SAB im Subarachnoidalraum anhäufen, bilden dabei die Liganden. Diese neu entstehenden Liganden binden an den TLR4-Rezeptor, welcher sich auf der Zelloberfläche vieler Immunzellen findet, insbesondere im Gehirn auf der Zelloberfläche von Mikroglia-Zellen [33].

Eine Aktivierung von TLR4 führt zu einer Signalkaskade, welche in ihrer letzten Konsequenz zu einer Inflammation führt, daneben werden auch zerebral auftretende Vasospasmen einer TLR4-Aktivierung in Kombination mit einer COX2-Hochregulation zugesprochen [34].

Der TLR4-Signalweg gilt inzwischen als gut untersucht und besteht grundsätzlich aus dem Rezeptor, unterschiedlichen Adapterproteinen und einem Zielmolekül. Von besonderem Interesse ist hier der Transkriptionsfaktor NFκB, welcher für die verstärkte Transkription proinflammatorischer Moleküle wie TNFalpha, IL1beta und IL6 verantwortlich ist [35, 36].

Interessant ist die Tatsache, dass der TLR4-Rezeptor nach Stimulation durch Liganden internalisiert wird. Dabei verschwindet er durch Endozytose von der Zelloberfläche [37].

## **2. Zielsetzung**

Das Ziel der vorliegenden Promotion besteht darin, einen Behandlungsansatz für die Immunreaktion nach Subarachnoidalblutung zu finden, um so eine neue Strategie zur Verhinderung des schlechten Outcomes nach SAB zu entwickeln.

Dabei wurden 2 mögliche Prinzipien untersucht.

Zum einen die inflammatorische Präkonditionierung, welche als ein immunmodulatorischer Ansatz verstanden werden kann. Unter der inflammatorischen Präkonditionierung versteht man eine milde Stimulation des Immunsystems durch eine geringe systemische Gabe von LPS, um es einem Priming zu unterziehen. Dabei ist das Ziel, dass es nachfolgend nicht in dem überschießenden, schädlichen Maße auf einen zweiten Stimulus, in diesem Fall die SAB, reagiert [38]. Es wird davon ausgegangen, dass sich bei der inflammatorischen Präkonditionierung eine Endotoxin-Toleranz (ET) aufbaut, bei der ein Stimulus vor der erwarteten Inflammation die Immunzellen, hier die Mikroglia, in eine Art Refraktärphase bringt, in der sie nicht mehr zu einer überschießenden Immunantwort in der Lage sind [39].

Zum anderen wurde durch einen CSF1-Rezeptor-Inhibitor PLX3397 ein immunsuppressiver Ansatz verfolgt. Mikroglia sind im adulten Hirn in ihrem Überleben abhängig vom Colony Stimulation Factor 1 (CSF1). Sie sind hirnweit die einzigen Zellen, die den CSF1-Rezeptor (CD115) exprimieren und somit auch die einzigen Zellen, die von einer Behandlung mit einem CSF1-Rezeptor Inhibitor beeinflusst werden können. Man kann die Mikroglia durch Applikation von PLX3397 dosis- und zeitpunktabhängig reduzieren, wenn nicht sogar eliminieren [40].

## **3. Material und Methodik**

### 3.1 Tierexperimentelles Arbeiten

Für alle in der vorliegenden Arbeit dargestellten Experimente wurden Wildtyp-Mäuse des Mausstamms C57BL/6J verwendet. Die Tiere waren zum Induktionszeitpunkt der SAB 8-12 Wochen alt, männlich und wogen 22-25 Gramm.

Sie wurden in der Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin, Charité Universitätsmedizin Berlin, in Polycarbonatkäfigen im 12-Stunden Hell-/Dunkelrhythmus gehalten und hatten uneingeschränkt Zugang zu Wasser und Futter. Es wurden die von der Tierschutzkommission des

Landes Berlin genehmigten Rahmenbedingungen für Tierversuche unter den Tierversuchsnummern G0177/14 und G0063/18 eingehalten.

Um der Maus eine SAB beizubringen, wurde das endovaskuläre Fadenperforationsmodell angewendet. Hier wird über einen vorab präparierten A.carotis externa-Stumpf ein 5.0-Prolene Faden in das Gefäß eingebracht und über die A.carotis interna hoch bis in den vorderen Bereich des Circulus arteriosus Willisii geschoben, wo eine Perforation erreicht werden soll. Durch dieses Modell wird die Ruptur eines Aneurysmas möglichst realitätsnah simuliert.

Bei der Sham-Gruppe wurde bis auf die abschließende Perforation dieselbe Vorgehensweise angewandt.

Um die inflammatorische Präkonditionierung zu initiieren, wurde der Maus einmalig eine Stunde nach der SAB LPS in der Dosis 0,6mg/kg Körpergewicht intraperitoneal appliziert. Als Medium diente hierfür 500 µl steriles PBS, in dem das LPS gelöst wurde. Die SAB-Kontrollgruppe erhielt ausschließlich 500µl PBS ohne zugesetztes LPS.

Die Behandlung mit dem CSF1-Rezeptor-Inhibitor PLX3397 erfolgte in der ersten Woche nach SAB täglich, in der zweiten Woche wechseltägig. Die Dosis betrug hier 30mg/kg Körpergewicht pro Tag, dabei diente wieder steriles PBS als Medium.

Um die Gehirne vor der Entnahme komplett von Blut zu befreien und für die nachfolgenden Versuche vorzubereiten, wurden die Mäuse entweder mit eiskaltem PBS oder PFA perfundiert.

### 3.2 MRT-Untersuchung

Zur Verifizierung der SAB wurde 24 Stunden nach der Induktion eine MRT-Aufnahme in T2\*-Wichtung zur Identifizierung von Blut und T2-Wichtung zum Ausschluss eines Hydrocephalus oder einer Ischämie angefertigt. Bei 3 repräsentativen Mäusen wurde außerdem eine TOF-MRA-Aufnahme angefertigt, unmittelbar vor dem Ereignis, 1 Stunde danach und 3 Tage danach.

### 3.3 Mikroglia-Isolierung

Nach Entnahme der PBS-perfundierten Hirne wurden sie in vorgekühlten HBSS w/o Puffer überführt und auf Eis gelagert; Cerebellum und Bulbus olfactorius wurden entfernt.

Um eine Zelldissoziation zu erreichen, erfolgte eine Zerkleinerung des Hirns in ca. 8 gleichgroße Gewebestücke. Anschließend wurden diese Stücke mit zwei vorbereiteten Enzymmischungen aus dem MACS® Neural Tissue Dissociation Kit (Miltenyi Biotech) zusammengeführt.

Die Herstellung der Gehirnzellsuspension konnte nun mit Hilfe eines automatisierten Zerkleinerungsprozesses durch den gentleMACS® Octo Dissociator (Miltenyi Biotech) innerhalb

von 30 Minuten erstellt werden. Anschließend wurde die Zellsuspension mit HBSS w Puffer gewaschen und durch ein 70µm dichtes Zellsieb gefiltert. Nach Zentrifugation (10 Minuten, 300g) in der bei 4° Celsius vorgekühlten Zentrifuge konnte der Überstand abgenommen und das Zellpellet in 500µl MACS-Puffer resuspendiert werden.

Um eine Isolierung der Mikroglia zu erreichen, mussten diese mit magnetischen Partikeln, welche an Antikörper gebunden sind, markiert werden. Diese Antikörper richten sich dabei gegen ein spezifisches Mikroglia-Oberflächenmolekül, CD11b. Nach 15-minütiger Inkubation bei 4° Celsius konnte die Zellsuspension mit MACS-Puffer gewaschen und zentrifugiert werden. Nach Verwerfung des Überstandes wurde das Zellpellet inklusive der markierten Mikroglia resuspendiert und über eine vorher kalibrierte Magnetsäule laufen gelassen. Mit Hilfe dieses Prinzips konnten die CD11b-positiven Zellen in der magnetischen Säule gehalten werden, während alle anderen Zellen der Zellsuspension die Säule ungehindert passierten.

Nach 3-maligen Waschschritten wurde die Säule aus dem Magnetfeld entfernt und die darin gebunden Zellen mittels eines Stempels und 5ml MACS-Puffer eluiert. Nach einem weiteren Zentrifugations-Schritt konnten die so gewonnen Mikroglia-Zellen in 1ml MACS-Puffer aufgenommen und in ein Eppendorf-Gefäß überführt werden.

### 3.4 Durchflusszytometrie (FACS)

Die gemessene Zellpopulation wurde mit dem Programm FlowJo (Tree Star Inc. Ashland) analysiert. Zum Anfärben der Zellen wurde einmal nach Herstellung der Hirnzellsuspension 10 µl als Probe abgenommen. Um die Reinheit der Mikroglia-Zellfraktion nach der Isolierung zu überprüfen, wurden nach der Isolierung erneut 60µl der Zellsuspension entnommen, dabei wurde eine Reinheit von >90% angestrebt.

Diese Proben wurden im Anschluss in PBS/BSA aufgenommen und nach einem Waschschriff 20 Minuten auf Eis mit den entsprechenden Antikörpern inkubiert. Nach einem weiteren Waschschriff mit PBS/BSA wurde die Probe bei 1600 rpm für 7 Minuten bei 4°Celsius zentrifugiert und der Überstand abgenommen.

Nun erfolgte die Aufnahme in 300µl PBS/BSA. Die Probe wurde in ein FACS-Tube überführt und 10µl/1ml DAPI hinzugefügt, um tote Zellen mit anzufärben.

### 3.5 Histologische Methodik

Nach Entwässerung der Hirne mit 30%iger Saccharose-Lösung und Fixierung in 4% PFA/PBS erfolgte das Aufbringen von Schnitten (10µm) auf Objektträger mithilfe eines Kryostat-Gerätes (Microm).

Für die Färbung von neuronalen Zellkernen (NeuN) und Mikroglia-Zellen (Iba1) wurden die Schnitte einige Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Nach 2-maligem Waschen in PBS und 8-minütiger Permeabilisierung mit 0,3%igem Triton erfolgte das Blocken mittels 1%igem Casein. Danach konnten die Primär-Antikörper aufgetragen werden. Nach 2 Stunden Inkubation und Waschen mit 0,5%igem Casein konnten die Schnitte mit den nun fluoreszierenden Sekundär-Antikörpern für 1,5 Stunden inkubiert werden.

Abschließend erfolgten 2 Waschschritte mit PBS und 1 Waschschritt mit Leitungswasser, eingedeckt wurden die Schnitte mit DAPI-Eindeckmedium. Die Lagerung erfolgte lichtgeschützt bei 4° Celsius.

Zur Identifikation apoptotischer Zellkerne wurde das ApopTaq®-Kit verwendet und das Hersteller-Protokoll umgesetzt [41].

Die gefärbten Schnitte wurden nach der Färbung zeitnah mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops immer nach einem einheitlichen Schema mit 20-facher Vergrößerung mikroskopiert und fotografiert. Dafür wurden 10 Bilder pro Hemisphäre angefertigt, 5 kortikal, 3 basal und 2 periventrikulär. Die Auswertung der Bilder wurde mit Hilfe der Software imageJ vorgenommen. Dabei wurden im Fall der Mikroglia die Zellen manuell gezählt. Auch die Kolokalisation von NeuN und TUNEL, welche apoptotische Neurone anzeigt, wurde manuell ausgewertet.

### 3.6 Molekularbiologische Methodik

Für die RNA-Isolierung wurde die zuvor isolierte CD11b-positive Zellfraktion verwendet. Mit Hilfe des RNeasy Mini Kits (Fisher Scientific) konnte die RNA nach Herstellerprotokoll aus der CD11b-positiven Zellfraktion isoliert werden. Anschließend wurde die Reinheit der gewonnenen RNA mittels TECAM-Gerät quantifiziert.

Das Umschreiben in cDNA erfolgte durch das PrimeScript RT Reagent Kit (TaKaRa), auch hier wurde das Herstellerprotokoll verwendet.

Für die Durchführung der Real-Time PCR wurde das SYBR®Premix Ex Taq-Kit (TaKaRa) verwendet, hier waren alle benötigten Bestandteile des Mastermixes, welcher für die PCR benötigt wird, bereits enthalten. Die zuvor umgeschriebene cDNA wurde mit einem Verhältnis von 1:5 verdünnt und anschließend mit einer Menge von 4µl pro well in eine 384-well Platte pipettiert.

5µl des Mastermixes aus dem Kit wurden mit 0,4µl Primer (bereits vorgemischter Ansatz aus forward- und reverse-Primern), 0,4µl RNase freiem Wasser und 0,2µl ROX dye vermischt und dem DNA-Ansatz hinzugegeben. Die DNA-Konzentration betrug 6 ng pro well. Für die vorliegenden Experimente wurde als Housekeeping-Gen 18s ausgewählt. Zur Analyse der gewonnenen Daten wurde die  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode verwendet [42].

### 3.7 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung der Ergebnisse wurde eine einfache Varianzanalyse (one-way ANOVA) mit post-hoc Tukey's multiple comparison für mehr als 2 zu vergleichende Gruppen verwendet. Für den Vergleich von 2 Gruppen wurde ein Student's t-test angewendet.

P-Werte mit  $\leq 0,5$  wurden dabei als statistisch signifikant, p-Werte mit  $\leq 0,1$  als hochsignifikant betrachtet. Die statistische Testung erfolgte dabei mit der Software GraphPad Prism Version 8.2.

## **4. Ergebnisse**

Für die grafische Darstellung der Ergebnisse verweise ich auf die Publikation *Heinz et al., 2021*.

### 4.1 Akkumulation von Mikrogliazellen

Nach der SAB ließ sich eine signifikante Zunahme der Iba1-positiven Zellen in allen Ebenen verzeichnen, diese ließen sich in ihrer Morphologie deutlich dem aktivierten Zustand zuordnen.

Nach der Behandlung mit dem CSF1-Rezeptor Inhibitor PLX3397 konnte ein Iba1-Signal in der Färbung nachgewiesen werden ( $11.16 \pm 1.54$  cells/HPF). Dennoch war die Anzahl gegenüber der SAB-Gruppe signifikant reduziert und bewegte sich in etwa auf Sham-Niveau ( $11.157 \pm 1.538$  cells/HPF). Morphologisch zeigten sich vergrößerte Zellen als Hinweis auf eine verstärkte phagozytische Aktivität.

Auch nach der inflammatorischen Präkonditionierung zeigte sich eine signifikante Reduzierung der Anzahl an Iba1-positiven Zellen ( $17.43 \pm 2.42$  cells/HPF) gegenüber der SAB-Gruppe ( $32.79 \pm 4.77$  cells/HPF).

### 4.2 Neuronaler Zelltod

Die SAB-Tiere zeigten eine deutlich erhöhte Anzahl an neuronalem Zelltod im Gegensatz zur Sham-Gruppe, was auf einen Hirnschaden als Folge der Inflammation hindeutet.

Bei den LPS-behandelten Tieren konnte eine erhöhte Anzahl apoptotischer Neurone ( $78.4 \pm 28.625$  apoptotische Neurone/Hemisphäre) im Gegensatz zu den Sham-Tieren festgestellt werden, jedoch eine signifikant verminderte Anzahl im Vergleich zu den unbehandelten Tieren ( $141,821 \pm 60,866$  apoptotische Neurone/Hemisphäre). Auch die mit dem CSF1-Rezeptor Inhibitor behandelten Tiere wiesen signifikant weniger apoptotische neuronale Zellkerne auf als die unbehandelten SAB-Tiere ( $92.5 \pm 37.267$  apoptotische Neurone/Hemisphäre), wenn auch mehr als die LPS-behandelten Tiere. Dieser Unterschied konnte nach statistischer Auswertung jedoch nicht als signifikant gewertet werden.

#### 4.3 Pro- und anti-inflammatorische Genexpression

Analog zu den Immunfluoreszenzfärbungen wurde eine Genexpressionsanalyse von isolierten Mikroglia-Zellen durchgeführt. Dabei wurden pro-inflammatorische Zytokine wie  $\text{TNF}\alpha$ , IL6 und IL1 $\beta$  sowie COX2 und anti-inflammatorische Zytokine wie IL4, IL10 und TGF $\beta$  analysiert. An Tag 4 zeigte sich kein signifikanter Anstieg der Zytokine nach SAB. Einzig die  $\text{TNF}\alpha$  Expression in der PLX3397-behandelten Gruppe war signifikant erhöht.

In der Genexpression zeigte sich an Tag 14 ein deutlicher Anstieg der Zytokine IL1 $\beta$  und IL6 in der SAB-Gruppe. In beiden behandelten Gruppen zeigte sich dagegen eine signifikante Verminderung der Genexpression der inflammatorischen Zytokine.

An Tag 4 zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Expression der drei anti-inflammatorischen Zytokine, weder bei der SAB-Gruppe, noch bei den beiden behandelten Gruppen.

An Tag 14 konnte ebenso keine signifikante Steigerung der getesteten anti-inflammatorischen Zytokine nachgewiesen werden. Allerdings zeigte sich eine signifikante Reduktion von IL10 und TGF $\beta$  nach der CSF1-Rezeptor-Inhibierung.

Die Genexpressionsanalyse an Tag 4 zeigte eine nicht signifikante Regulation von COX 2 in allen 4 Gruppen.

An Tag 14 hingegen zeigte sich eine Hochregulation der COX2 - Genexpression nach SAB und eine signifikante Herunterregulation nach Gabe des CS1-Rezeptor Inhibitors.

Nach inflammatorischer Präkonditionierung konnte zwar eine Herunterregulation von COX2 erreicht werden, diese stellte sich allerdings nicht als signifikant dar.

#### 4.4 Oberflächenexpression von TLR4 und CD115

Der TLR4-Rezeptor spielt in der Pathophysiologie der SAB eine entscheidende Rolle. Dementsprechend wurde in einem ersten Schritt die Genexpression von TLR4 untersucht.

Dabei zeigten sich weder an Tag 4 noch an Tag 14 signifikante Unterschiede der Genexpression des TLR4-Rezeptors in keiner der 4 Gruppen.

Durch eine FACS-Analyse konnte nachgewiesen werden, dass sich der Anteil der TLR4-positiven Mikroglia an Tag 4 nach inflammatorischer Präkonditionierung mit LPS signifikant verringert. Der Anteil TLR4-positiver Mikroglia nach SAB veränderte sich hingegen nicht signifikant im Gegensatz zur Sham-Gruppe.

Um zu testen, ob die Behandlung mit PLX3397 lediglich zu einer Inaktivierung der Rezeptoren führt, oder ob sie zusätzlich von der Zelloberfläche verschwinden, wurde auch hier an Tag 4 eine FACS-Analyse durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden die Zellen mit einem Antikörper gegen CD115 (CSF1R) gefärbt. Es zeigte sich eine signifikante Verminderung der CD115-Oberflächenexpression in der PLX3397-behandelten Gruppe, während man keinen Unterschied zwischen Sham- und SAB Gruppe beobachten konnte.

## **5. Diskussion**

In der vorliegenden Arbeit wurden 2 verschiedene Ansätze zur Behandlung der Immunantwort nach SAB untersucht; die inflammatorische Präkonditionierung und die pharmakologische Deaktivierung der Mikroglia durch einen CSF1R-Inhibitor (PLX3397).

### 5.1 Der TLR4-Rezeptor und die inflammatorische Präkonditionierung

Die Ergebnisse zeigen, dass das Konzept der inflammatorischen Präkonditionierung Wirkung zeigt, dennoch ist bis dato kein eindeutiger Wirkungsmechanismus beschrieben [43].

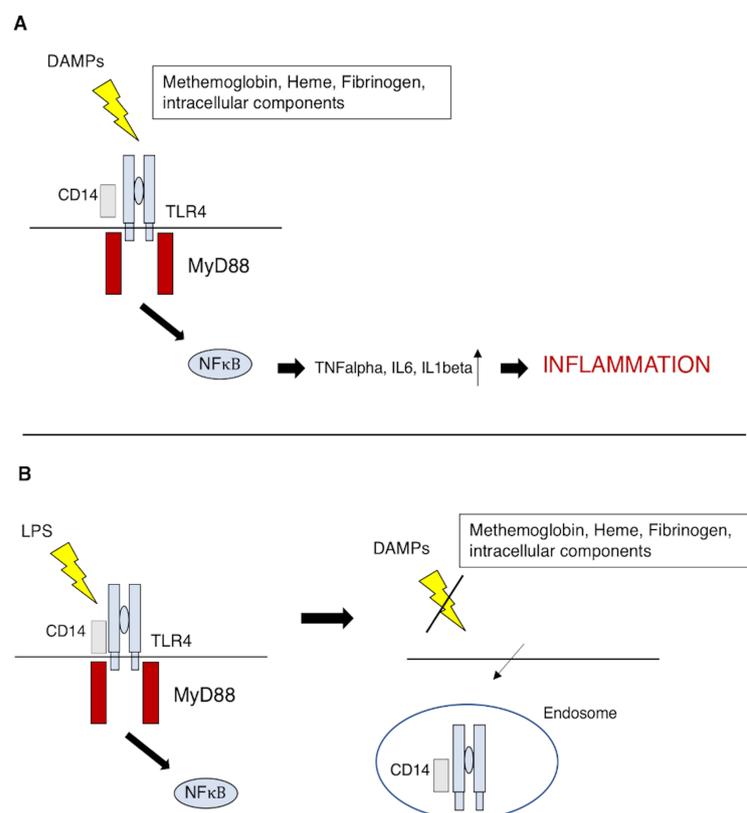
Ein Phänotyp-Wechsel der Mikroglia konnte zwar durch Testung der Genexpression anti-inflammatorischer Zytokine nicht ausgeschlossen werden, doch überzeugende, signifikante Ergebnisse ergaben sich nicht. Damit wurde diese Hypothese, welche als Erklärungsansatz generiert wurde, nicht bewiesen, obwohl sie bereits in Publikationen angeführt wurde [44, 45].

Die zweite Hypothese, welche einen Erklärungsansatz der inflammatorischen Präkonditionierung darstellt, zielt dabei nicht auf einen Phänotyp-Wechsel der Mikroglia sondern viel mehr auf den TLR4-Rezeptor ab. Dieser Rezeptor gilt, wie bereits beschrieben, als einer der Hauptinitiatoren für die Inflammation nach Subarachnoidalblutung. Gleichzeitig stellt LPS einen wichtigen

Liganden dieses Rezeptors dar. TLR4 kann also als Schnittpunkt der Immunreaktion nach SAB und der inflammatorischen Präkonditionierung begriffen werden.

Der TLR4-Signalweg wurde im Zusammenhang mit der Präkonditionierung aber auch im Hinblick auf den Pathomechanismus der Immunreaktion nach SAB schon genauer analysiert [39, 46-48]. Dabei wurde allerdings nicht der Rezeptor betrachtet, sondern viel mehr eine Änderung des Signalwegs und eine Regulation seiner potentiell pro- oder anti-inflammatorisch wirkender Bestandteile. In der vorliegenden Arbeit wurde nun die Genexpression des Rezeptors und die Oberflächenexpression auf den Mikroglia genauer analysiert.

Auf Genexpressionsebene fanden sich dabei keinerlei Hinweise auf eine Änderung der Expression nach Präkonditionierung. Die Oberflächenexpression des TLR4-Rezeptors wurde jedoch in der LPS-behandelten Gruppe signifikant herunterreguliert. Die Endozytose des TLR4-Rezeptors nach vorheriger Stimulation durch LPS konnte bereits in einigen Publikationen bewiesen werden [37, 49-51].



**Abbildung 1: Internalisierung von TLR4 nach inflammatorischer Präkonditionierung**

**A** Mechanismus der Inflammation nach SAB

**B** Die Stimulation von TLR4 durch LPS führt zu einer Internalisierung des Rezeptors, so steht er nur noch in vermindertem Maße auf der Zelloberfläche für potentielle DAMPs zur Verfügung

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass durch inflammatorische Präkonditionierung die TLR4-Dichte auf der Zelloberfläche signifikant abnimmt. So ergeben sich weniger Angriffspunkte für DAMPs, welche durch den Abbau des Blutes im Subarachnoidalraum entstehen. Eine verminderte Rezeptordichte auf der Zelloberfläche bedeutet so eine verminderte Down-Stream Aktivität des TLR4-Signalwegs, eine verminderte Aktivität des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B und damit eine verminderte Inflammation als Antwort auf die SAB (Abb. 1).

Für die Analyse der Oberflächenexpression des TLR4-Rezeptors via FACS wurde ausschließlich der Tag 4 nach SAB als Zeitpunkt herangezogen. Hier startet mutmaßlich erst die Immunreaktion nach SAB, da durch erhöhte Durchlässigkeit der BBB DAMPs das Hirnparenchym und somit die Mikroglia erreichen [52].

Ein anderer Aspekt, welcher sich im Hinblick auf TLR4 untersuchen lassen könnte, wäre im Gegensatz zu einer Herunterregulation der Rezeptorexpression auf der Zelloberfläche nach Präkonditionierung eine Hochregulation des Rezeptors nach SAB. Dabei ließe sich als Reaktion auf eine Ansammlung von DAMPs im Sinne einer sterilen Inflammation nach SAB eine gleichzeitige Hochregulation des Rezeptors durch positive Rückkopplung vermuten. In der vorliegenden Arbeit konnte diese Hypothese nicht bestätigt werden, allerdings wurde hier nur Tag 4 analysiert. Interessant für eine Beobachtung von TLR4 als Antwort auf eine SAB wäre die Phase, wo es auch nachweislich auf Genexpressionsebene zu einer Inflammation kommt, unseren Daten nach also Tag 14. Es konnte bereits bestätigt werden, dass es zu einer erhöhten TLR4-Expression nach SAB kommt [34, 53, 54].

Die LPS-Gabe erfolgte in der vorliegenden Arbeit nach Auslösen der SAB. In bisherigen Publikationen zur Präkonditionierung erfolgte die Gabe immer bereits vor dem Ereignis [38, 55]. Wir sahen es insbesondere mit Hinblick auf eine Anwendbarkeit im klinischen Setting als sinnvoller an, die LPS-Gabe eine Stunde nach dem Ereignis anzusetzen. Die Immunreaktion erfolgt nicht zeitgleich mit dem Ereignis, sondern entsteht erst im Verlauf nach Aktivierung der Mikroglia durch entstehende DAMPs. Daher ist es unserer Ansicht nach vertretbar, erst nach stattgefundenener SAB LPS zu verabreichen.

Durch die systemische Gabe von LPS kann eine systemische Immunantwort, wenn auch nur in einem geringen Maße, nicht ausgeschlossen werden. Blutuntersuchungen oder Verhaltenstestungen, genauso wie Temperaturmessungen der Tiere wurden in der vorliegenden Arbeit nicht durchgeführt. Daraus könnten sich neue interessante Ansatzpunkte für weitere Untersuchungen entwickeln.

## 5.2 CSF1-Rezeptor-Inhibierung führt zu einer verminderten Rezeptorexpression

Der CSF1-Rezeptor ist eine Tyrosinkinase, es findet bei normaler Rezeptor-Ligand-Bindung eine Dimerisierung mit anschließender Autophosphorylierung statt [56]. Nach bisherigem Kenntnisstand wird bei Inhibierung des Rezeptors ein Teilschritt dieser Aktivierungskaskade, die Autophosphorylierung, unterbunden [57]. Durch Testung der Oberflächenexpression des Rezeptors im FACS konnte nun nachgewiesen werden, dass es neben einer Inhibierung des Rezeptors auf molekularer Ebene außerdem zu einer signifikanten Herunterregulation der Oberflächenexpression nach Behandlung mit PLX3397 kommt.

In bisherigen Studien zu dem Einsatz von CSF1R-Inhibitoren im Zusammenhang mit bspw. intraparenchymalen Blutungen oder der Alzheimer-Erkrankung wurde eine nahezu komplette Mikroglia-Depletion nachgewiesen [58, 59]. Die komplette Depletion konnten wir nicht erreichen. Allerdings wurden in den vorliegenden Publikationen eine Verabreichung des Medikaments über einen längeren Zeitraum (3 Monate) vorgenommen. Die Gabe von 2 Wochen nach dem Ereignis sahen wir in unserem Setting als ausreichend an. Es erfordert nach einem Ereignis wie einer SAB durchaus eine gewisse Art der Immunantwort, um Zelledebris abzutransportieren und eine Homöostase des Milieus wiederherzustellen. Daher wäre unserer Ansicht nach eine zu lang andauernde Depletion der Immunantwort nicht abschließend zielführend.

## 5.3 Zusammenfassender Vergleich der Behandlungskonzepte und Ausblick

So unterschiedlich die beiden vorgestellten Behandlungskonzepte in ihrer Wirkungsweise auch sind, zeigten sie doch ein ähnliches Ergebnis: Eine Abschwächung der Immunreaktion nach Subarachnoidalblutung. Für die inflammatorische Präkonditionierung spricht dabei, dass hier nicht in einem solchen Ausmaß in das ortsständige Immunsystem des ZNS eingegriffen wird. Anti-inflammatorische Zytokine werden weiterhin exprimiert, die Mikroglia werden in ihrer Funktionsweise nicht komplett eingeschränkt. Man könnte eher von einer Immunmodulation als von einer Immunsuppression sprechen.

Allerdings wird durch die systemische Applikation von LPS ebenso eine systemische Inflammation in Kauf genommen. Die Dosierung der LPS-Gabe ist dabei gering, dennoch wurde in der vorliegenden Arbeit eine potentielle systemische Immunreaktion nicht untersucht. Hier bieten sich durchaus Möglichkeiten für weitere Untersuchungen, beispielsweise im Hinblick auf Verhaltenstestungen.

Der PLX3397-Ansatz dagegen unterbindet die Funktion der Mikroglia sehr viel umfassender. Sowohl die pro-als auch die anti-inflammatorischen Zytokine werden in ihrer Genexpression stark supprimiert. Damit sind die PLX3397-behandelten Mikroglia auch in ihren sich potentiell positiv auswirkenden Eigenschaften nach einer SAB (Aufrechterhaltung Homöostase, Beseitigung Zelldebris) inhibiert. Für diesen Ansatz spricht die effektivere Eliminierung der Mikroglia, es findet so gut wie keine Akkumulation an Tag 14 nach SAB statt. Allerdings zeigte sich ein Anstieg der TNFalpha-Expression an Tag 4 nach SAB, dieser Anstieg wurde von uns als Reaktion der Mikroglia auf die Behandlung mit PLX3397 interpretiert.

Dennoch ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen LPS-behandelten und PLX3397-behandelten Mäusen im Hinblick auf neuronalen Zelltod aufzeigen.

Eine abschließende Aussage über die Effektivität der Behandlung lässt sich nach tierexperimentellen Studien nur bedingt treffen. Das Tiermodell der SAB, so wie es hier angewandt wurde, kommt zwar nah an die pathophysiologischen Bedingungen einer aneurysmatischen SAB beim Menschen heran, dennoch lässt sich über eine direkte Vergleichbarkeit der molekularen Mechanismen nach SAB diskutieren.

## 6. Literaturverzeichnis

1. Greenberg, M., *Handbook of Neurosurgery*. 2010: Thieme.
2. van Gijn, J., R.S. Kerr, and G.J. Rinkel, *Subarachnoid haemorrhage*. *Lancet*, 2007. **369**(9558): p. 306-18.
3. Linn, F.H., G.J. Rinkel, A. Algra, and J. van Gijn, *Incidence of subarachnoid hemorrhage: role of region, year, and rate of computed tomography: a meta-analysis*. *Stroke*, 1996. **27**(4): p. 625-9.
4. Cahill, J. and J.H. Zhang, *Subarachnoid hemorrhage: is it time for a new direction?* *Stroke*, 2009. **40**(3 Suppl): p. S86-7.
5. Cahill, J., J.W. Calvert, and J.H. Zhang, *Mechanisms of early brain injury after subarachnoid hemorrhage*. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2006. **26**(11): p. 1341-53.
6. Perrein, A., L. Petry, A. Reis, A. Baumann, P. Mertes, and G. Audibert, *Cerebral vasospasm after traumatic brain injury: an update*. *Minerva Anestesiol*, 2015. **81**(11): p. 1219-28.
7. Siler, D.A., Y.A. Berlow, A. Kukino, C.M. Davis, J.W. Nelson, M.R. Grafe, H. Ono, J.S. Cetas, M. Pike, and N.J. Alkayed, *Soluble Epoxide Hydrolase in Hydrocephalus, Cerebral Edema, and Vascular Inflammation After Subarachnoid Hemorrhage*. *Stroke*, 2015. **46**(7): p. 1916-22.
8. Heppner, F.L., R.M. Ransohoff, and B. Becher, *Immune attack: the role of inflammation in Alzheimer disease*. *Nat Rev Neurosci*, 2015. **16**(6): p. 358-72.
9. Iadecola, C. and J. Anrather, *The immunology of stroke: from mechanisms to translation*. *Nat Med*, 2011. **17**(7): p. 796-808.
10. International Multiple Sclerosis Genetics, C., C. Wellcome Trust Case Control, S. Sawcer, G. Hellenthal, M. Pirinen, C.C. Spencer, N.A. Patsopoulos, L. Moutsianas, A. Dilthey, Z. Su, C. Freeman, S.E. Hunt, S. Edkins, E. Gray, D.R. Booth, S.C. Potter, A. Goris, G. Band, A.B. Oturai, A. Strange, J. Saarela, C. Bellenguez, B. Fontaine, M. Gillman, B. Hemmer, R. Gwilliam, F. Zipp, A. Jayakumar, R. Martin, S. Leslie, S. Hawkins, E. Giannoulatou, S. D'Alfonso, H. Blackburn, F. Martinelli Boneschi, J. Liddle, H.F. Harbo, M.L. Perez, A. Spurkland, M.J. Waller, M.P. Mycko, M. Ricketts, M. Comabella, N. Hammond, I. Kockum, O.T. McCann, M. Ban, P. Whittaker, A. Kempainen, P. Weston, C. Hawkins, S. Widaa, J. Zajicek, S. Dronov, N. Robertson, S.J. Bumpstead, L.F. Barcellos, R. Ravindrarajah, R. Abraham, L. Alfredsson, K. Ardlie, C. Aubin, A. Baker, K. Baker, S.E. Baranzini, L. Bergamaschi, R. Bergamaschi, A. Bernstein, A. Berthele, M. Boggild, J.P. Bradfield, D. Brassat, S.A. Broadley, D. Buck, H. Butzkueven, R. Capra, W.M. Carroll, P. Cavalla, E.G. Celius, S. Cepok, R. Chiavacci, F. Clerget-Darpoux, K. Clysters, G. Comi, M. Cossburn, I. Cournu-Rebeix, M.B. Cox, W. Cozen, B.A. Cree, A.H. Cross, D. Cusi, M.J. Daly, E. Davis, P.I. de Bakker, M. Debouverie, B. D'Hooghe M, K. Dixon, R. Dobosi, B. Dubois, D. Ellinghaus, I. Elovaara, F. Esposito, C. Fontenille, S. Foote, A. Franke, D. Galimberti, A. Ghezzi, J. Glessner, R. Gomez, O. Gout, C. Graham, S.F. Grant, F.R. Guerini, H. Hakonarson, P. Hall, A. Hamsten, H.P. Hartung, R.N. Heard, S. Heath, J. Hobart, M. Hoshi, C. Infante-Duarte, G. Ingram, W. Ingram, T. Islam, M. Jagodic, M. Kabesch, A.G. Kermod, T.J. Kilpatrick, C. Kim, N. Klopp, K. Koivisto, M. Larsson, M. Lathrop, J.S. Lechner-Scott, M.A. Leone, V. Leppa, U. Liljedahl, I.L. Bomfim, R.R. Lincoln, J. Link, J. Liu, A.R. Lorentzen, S. Lupoli, F. Macchiardi, T. Mack, M. Marriott, V. Martinelli, D. Mason, J.L. McCauley, F. Mentch, I.L. Mero, T. Mihalova, X. Montalban, J. Mottershead, K.M. Myhr,

- P. Naldi, W. Ollier, A. Page, A. Palotie, J. Pelletier, L. Piccio, T. Pickersgill, F. Piehl, S. Pobywajlo, H.L. Quach, P.P. Ramsay, M. Reunanen, R. Reynolds, J.D. Rioux, M. Rodegher, S. Roesner, J.P. Rubio, I.M. Ruckert, M. Salvetti, E. Salvi, A. Santaniello, C.A. Schaefer, S. Schreiber, C. Schulze, R.J. Scott, F. Sellebjerg, K.W. Selmaj, D. Sexton, L. Shen, B. Simms-Acuna, S. Skidmore, P.M. Sleiman, C. Smestad, P.S. Sorensen, H.B. Sondergaard, J. Stankovich, R.C. Strange, A.M. Sulonen, E. Sundqvist, A.C. Syvanen, F. Taddeo, B. Taylor, J.M. Blackwell, P. Tienari, E. Bramon, A. Tourbah, M.A. Brown, E. Tronczynska, J.P. Casas, N. Tubridy, A. Corvin, J. Vickery, J. Jankowski, P. Villoslada, H.S. Markus, K. Wang, C.G. Mathew, J. Wason, C.N. Palmer, H.E. Wichmann, R. Plomin, E. Willoughby, A. Rautanen, J. Winkelmann, M. Wittig, R.C. Trembath, J. Yaouanq, A.C. Viswanathan, H. Zhang, N.W. Wood, R. Zuvich, P. Deloukas, C. Langford, A. Duncanson, J.R. Oksenberg, M.A. Pericak-Vance, J.L. Haines, T. Olsson, J. Hillert, A.J. Ivinson, P.L. De Jager, L. Peltonen, G.J. Stewart, D.A. Hafler, S.L. Hauser, G. McVean, P. Donnelly and A. Compston, *Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis*. *Nature*, 2011. **476**(7359): p. 214-9.
11. Lucke-Wold, B.P., A.F. Logsdon, B. Manoranjan, R.C. Turner, E. McConnell, G.E. Vates, J.D. Huber, C.L. Rosen, and J.M. Simard, *Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage and Neuroinflammation: A Comprehensive Review*. *Int J Mol Sci*, 2016. **17**(4): p. 497.
  12. Miller, B.A., N. Turan, M. Chau, and G. Pradilla, *Inflammation, vasospasm, and brain injury after subarachnoid hemorrhage*. *Biomed Res Int*, 2014. **2014**: p. 384342.
  13. Schneider, U.C., A.M. Davids, S. Brandenburg, A. Muller, A. Elke, S. Magrini, E. Atangana, K. Turkowski, T. Finger, A. Gutenberg, C. Gehlhaar, W. Bruck, F.L. Heppner, and P. Vajkoczy, *Microglia inflict delayed brain injury after subarachnoid hemorrhage*. *Acta Neuropathol*, 2015. **130**(2): p. 215-31.
  14. Lu, Y.C., W.C. Yeh, and P.S. Ohashi, *LPS/TLR4 signal transduction pathway*. *Cytokine*, 2008. **42**(2): p. 145-151.
  15. Wei, S., C. Luo, S. Yu, J. Gao, C. Liu, Z. Wei, Z. Zhang, L. Wei, and B. Yi, *Erythropoietin ameliorates early brain injury after subarachnoid haemorrhage by modulating microglia polarization via the EPOR/JAK2-STAT3 pathway*. *Exp Cell Res*, 2017. **361**(2): p. 342-352.
  16. Kwon, M.S., S.K. Woo, D.B. Kurland, S.H. Yoon, A.F. Palmer, U. Banerjee, S. Iqbal, S. Ivanova, V. Gerzanich, and J.M. Simard, *Methemoglobin is an endogenous toll-like receptor 4 ligand-relevance to subarachnoid hemorrhage*. *Int J Mol Sci*, 2015. **16**(3): p. 5028-46.
  17. Bozza, M.T. and V. Jeney, *Pro-inflammatory Actions of Heme and Other Hemoglobin-Derived DAMPs*. *Front Immunol*, 2020. **11**: p. 1323.
  18. Boche, D., V.H. Perry, and J.A. Nicoll, *Review: activation patterns of microglia and their identification in the human brain*. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2013. **39**(1): p. 3-18.
  19. Kettenmann, H., U.K. Hanisch, M. Noda, and A. Verkhratsky, *Physiology of microglia*. *Physiol Rev*, 2011. **91**(2): p. 461-553.
  20. Cai, Z., M.D. Hussain, and L.J. Yan, *Microglia, neuroinflammation, and beta-amyloid protein in Alzheimer's disease*. *Int J Neurosci*, 2014. **124**(5): p. 307-21.
  21. Tang, Y. and W. Le, *Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases*. *Mol Neurobiol*, 2016. **53**(2): p. 1181-94.
  22. Orihuela, R., C.A. McPherson, and G.J. Harry, *Microglial M1/M2 polarization and metabolic states*. *Br J Pharmacol*, 2016. **173**(4): p. 649-65.
  23. Lima, R., S. Monteiro, J.P. Lopes, P. Barradas, N.L. Vasconcelos, E.D. Gomes, R.C. Assuncao-Silva, F.G. Teixeira, M. Morais, N. Sousa, A.J. Salgado, and N.A. Silva, *Systemic*

- Interleukin-4 Administration after Spinal Cord Injury Modulates Inflammation and Promotes Neuroprotection*. Pharmaceuticals (Basel), 2017. **10**(4).
24. Nakajima, M., C. Nito, K. Sowa, S. Suda, Y. Nishiyama, A. Nakamura-Takahashi, Y. Nitahara-Kasahara, K. Imagawa, T. Hirato, M. Ueda, K. Kimura, and T. Okada, *Mesenchymal Stem Cells Overexpressing Interleukin-10 Promote Neuroprotection in Experimental Acute Ischemic Stroke*. Mol Ther Methods Clin Dev, 2017. **6**: p. 102-111.
  25. Martinez-Canabal, A., *Potential neuroprotective role of transforming growth factor beta1 (TGFbeta1) in the brain*. Int J Neurosci, 2015. **125**(1): p. 1-9.
  26. Schneider, U.C., J. Schiffler, N. Hakiy, P. Horn, and P. Vajkoczy, *Functional analysis of Pro-inflammatory properties within the cerebrospinal fluid after subarachnoid hemorrhage in vivo and in vitro*. J Neuroinflammation, 2012. **9**: p. 28.
  27. Marsh, B.J., R.L. Williams-Karnesky, and M.P. Stenzel-Poore, *Toll-like receptor signaling in endogenous neuroprotection and stroke*. Neuroscience, 2009. **158**(3): p. 1007-20.
  28. Pawlowska, E., J. Szczepanska, K. Wisniewski, P. Tokarz, D.J. Jaskolski, and J. Blasiak, *NF-kappaB-Mediated Inflammation in the Pathogenesis of Intracranial Aneurysm and Subarachnoid Hemorrhage. Does Autophagy Play a Role?* Int J Mol Sci, 2018. **19**(4).
  29. Okada, T. and H. Suzuki, *Toll-like receptor 4 as a possible therapeutic target for delayed brain injuries after aneurysmal subarachnoid hemorrhage*. Neural Regen Res, 2017. **12**(2): p. 193-196.
  30. Takeuchi, O. and S. Akira, *Pattern recognition receptors and inflammation*. Cell, 2010. **140**(6): p. 805-20.
  31. Ma, C., W. Zhou, Z. Yan, M. Qu, and X. Bu, *Toll-like receptor 4 (TLR4) is correlated with delayed cerebral ischemia (DCI) and poor prognosis in aneurysmal subarachnoid hemorrhage*. J Neurol Sci, 2015. **359**(1-2): p. 67-71.
  32. Yin, D., S. Zhou, X. Xu, W. Gao, F. Li, Y. Ma, D. Sun, Y. Wu, Q. Guo, H. Liu, L. Han, Z. Wang, Y. Wang, and J. Zhang, *Dexmedetomidine attenuated early brain injury in rats with subarachnoid haemorrhage by suppressing the inflammatory response: The TLR4/NF-kappaB pathway and the NLRP3 inflammasome may be involved in the mechanism*. Brain Res, 2018.
  33. Fang, H., P.F. Wang, Y. Zhou, Y.C. Wang, and Q.W. Yang, *Toll-like receptor 4 signaling in intracerebral hemorrhage-induced inflammation and injury*. J Neuroinflammation, 2013. **10**: p. 27.
  34. Kawakita, F., M. Fujimoto, L. Liu, F. Nakano, Y. Nakatsuka, and H. Suzuki, *Effects of Toll-Like Receptor 4 Antagonists Against Cerebral Vasospasm After Experimental Subarachnoid Hemorrhage in Mice*. Mol Neurobiol, 2017. **54**(8): p. 6624-6633.
  35. Kawai, T. and S. Akira, *Toll-like receptor downstream signaling*. Arthritis Res Ther, 2005. **7**(1): p. 12-9.
  36. Zaman, M. and I. Toth, *Immunostimulation by synthetic lipopeptide-based vaccine candidates: structure-activity relationships*. Front Immunol, 2013. **4**: p. 318.
  37. Kagan, J.C., T. Su, T. Horng, A. Chow, S. Akira, and R. Medzhitov, *TRAM couples endocytosis of Toll-like receptor 4 to the induction of interferon-beta*. Nat Immunol, 2008. **9**(4): p. 361-8.
  38. Smithason, S., S.K. Moore, and J.J. Provencio, *Low-dose lipopolysaccharide injection prior to subarachnoid hemorrhage modulates Delayed Deterioration associated with vasospasm in subarachnoid hemorrhage*. Acta Neurochir Suppl, 2013. **115**: p. 253-8.

39. Wang, P.F., X.Y. Xiong, J. Chen, Y.C. Wang, W. Duan, and Q.W. Yang, *Function and mechanism of toll-like receptors in cerebral ischemic tolerance: from preconditioning to treatment*. J Neuroinflammation, 2015. **12**: p. 80.
40. Elmore, M.R., A.R. Najafi, M.A. Koike, N.N. Dagher, E.E. Spangenberg, R.A. Rice, M. Kitazawa, B. Matusow, H. Nguyen, B.L. West, and K.N. Green, *Colony-stimulating factor 1 receptor signaling is necessary for microglia viability, unmasking a microglia progenitor cell in the adult brain*. Neuron, 2014. **82**(2): p. 380-97.
41. Darzynkiewicz, Z., D. Galkowski, and H. Zhao, *Analysis of apoptosis by cytometry using TUNEL assay*. Methods, 2008. **44**(3): p. 250-4.
42. Schmittgen, T.D. and K.J. Livak, *Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method*. Nat Protoc, 2008. **3**(6): p. 1101-8.
43. Sangaran, P.G., Z.A. Ibrahim, Z. Chik, Z. Mohamed, and A. Ahmadiani, *LPS Preconditioning Attenuates Apoptosis Mechanism by Inhibiting NF-kappaB and Caspase-3 Activity: TLR4 Pre-activation in the Signaling Pathway of LPS-Induced Neuroprotection*. Mol Neurobiol, 2021.
44. Qin, Y., X. Sun, X. Shao, M.X. Hu, J. Feng, Z. Chen, J. Sun, Z. Zhou, Y. Duan, and C. Cheng, *Lipopolysaccharide Preconditioning Induces an Anti-inflammatory Phenotype in BV2 Microglia*. Cell Mol Neurobiol, 2016. **36**(8): p. 1269-1277.
45. Hayakawa, K., R. Okazaki, K. Morioka, K. Nakamura, S. Tanaka, and T. Ogata, *Lipopolysaccharide preconditioning facilitates M2 activation of resident microglia after spinal cord injury*. J Neurosci Res, 2014. **92**(12): p. 1647-58.
46. Vartanian, K.B., S.L. Stevens, B.J. Marsh, R. Williams-Karnesky, N.S. Lessov, and M.P. Stenzel-Poore, *LPS preconditioning redirects TLR signaling following stroke: TRIF-IRF3 plays a seminal role in mediating tolerance to ischemic injury*. J Neuroinflammation, 2011. **8**: p. 140.
47. Marsh, B., S.L. Stevens, A.E. Packard, B. Gopalan, B. Hunter, P.Y. Leung, C.A. Harrington, and M.P. Stenzel-Poore, *Systemic lipopolysaccharide protects the brain from ischemic injury by reprogramming the response of the brain to stroke: a critical role for IRF3*. J Neurosci, 2009. **29**(31): p. 9839-49.
48. Piao, W., C. Song, H. Chen, M.A. Diaz, L.M. Wahl, K.A. Fitzgerald, L. Li, and A.E. Medvedev, *Endotoxin tolerance dysregulates MyD88- and Toll/IL-1R domain-containing adapter inducing IFN-beta-dependent pathways and increases expression of negative regulators of TLR signaling*. J Leukoc Biol, 2009. **86**(4): p. 863-75.
49. Zanoni, I., R. Ostuni, L.R. Marek, S. Barresi, R. Barbalat, G.M. Barton, F. Granucci, and J.C. Kagan, *CD14 controls the LPS-induced endocytosis of Toll-like receptor 4*. Cell, 2011. **147**(4): p. 868-80.
50. Tan, Y., I. Zanoni, T.W. Cullen, A.L. Goodman, and J.C. Kagan, *Mechanisms of Toll-like Receptor 4 Endocytosis Reveal a Common Immune-Evasion Strategy Used by Pathogenic and Commensal Bacteria*. Immunity, 2015. **43**(5): p. 909-22.
51. Roy, S., M. Karmakar, and E. Pearlman, *CD14 mediates Toll-like receptor 4 (TLR4) endocytosis and spleen tyrosine kinase (Syk) and interferon regulatory transcription factor 3 (IRF3) activation in epithelial cells and impairs neutrophil infiltration and Pseudomonas aeruginosa killing in vivo*. J Biol Chem, 2014. **289**(2): p. 1174-82.
52. Blecharz-Lang, K.G., J. Wagner, A. Fries, M. Nieminen-Kelha, J. Rosner, U.C. Schneider, and P. Vajkoczy, *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): p. 631-642.

53. Hanafy, K.A., *The role of microglia and the TLR4 pathway in neuronal apoptosis and vasospasm after subarachnoid hemorrhage*. J Neuroinflammation, 2013. **10**: p. 83.
54. Ma, C.X., W.N. Yin, B.W. Cai, J. Wu, J.Y. Wang, M. He, H. Sun, J.L. Ding, and C. You, *Toll-like receptor 4/nuclear factor-kappa B signaling detected in brain after early subarachnoid hemorrhage*. Chin Med J (Engl), 2009. **122**(13): p. 1575-81.
55. Rosenzweig, H.L., N.S. Lessov, D.C. Henshall, M. Minami, R.P. Simon, and M.P. Stenzel-Poore, *Endotoxin preconditioning prevents cellular inflammatory response during ischemic neuroprotection in mice*. Stroke, 2004. **35**(11): p. 2576-81.
56. Lemmon, M.A. and J. Schlessinger, *Cell signaling by receptor tyrosine kinases*. Cell, 2010. **141**(7): p. 1117-34.
57. Krause, D.S. and R.A. Van Etten, *Tyrosine kinases as targets for cancer therapy*. N Engl J Med, 2005. **353**(2): p. 172-87.
58. Spangenberg, E., P.L. Severson, L.A. Hohsfield, J. Crapser, J. Zhang, E.A. Burton, Y. Zhang, W. Spevak, J. Lin, N.Y. Phan, G. Habets, A. Rymar, G. Tsang, J. Walters, M. Nespi, P. Singh, S. Broome, P. Ibrahim, C. Zhang, G. Bollag, B.L. West, and K.N. Green, *Sustained microglial depletion with CSF1R inhibitor impairs parenchymal plaque development in an Alzheimer's disease model*. Nat Commun, 2019. **10**(1): p. 3758.
59. Li, M., Z. Li, H. Ren, W.N. Jin, K. Wood, Q. Liu, K.N. Sheth, and F.D. Shi, *Colony stimulating factor 1 receptor inhibition eliminates microglia and attenuates brain injury after intracerebral hemorrhage*. J Cereb Blood Flow Metab, 2017. **37**(7): p. 2383-2395.

## Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Rebecca Heinz, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Beeinflussung der Immunantwort nach Subarachnoidalblutung als Ansatz zur Vermeidung sekundärer Hirnschäden“/„Influencing the immune response after subarachnoid hemorrhage as an approach to prevent secondary brain damage“ 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.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; [www.icmje.org](http://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

## **Anteilserklärung an der erfolgten Publikation**

Rebecca Heinz hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1:

Rebecca Heinz, Susan Brandenburg, Melina Nieminen-Kelhä, Irina Kremenetskaia, Philipp Boehm-Sturm, Peter Vajkoczy and Ulf C. Schneider

Microglia as target for anti-inflammatory approaches to prevent secondary brain injury after subarachnoid hemorrhage (SAH)

J Neuroinflammation, 2021 Jan 30;18(1):36

### Beitrag im Einzelnen:

Planung und Durchführung der Immunfluoreszenzfärbungen und -auswertungen, Mikrogliaisolierung mit PCR-Analyse und -Auswertung und FACS-Versuche.

Betreuung, Operation, Spritzen und Perfundieren der Mäuse, Präparation der entnommenen Hirne, Schneiden der Hirne.

Kritische Auseinandersetzung mit den erhobenen Daten und Ausarbeiten von Limitationen.

Hauptanteil an der Aufarbeitung und statistischen Auswertung der erhobenen Daten in Zusammenarbeit mit PD Dr. Ulf Schneider.

Selbstständige graphische Darstellung der Ergebnisse in Abbildungen.

Erarbeitung des zur Publikation führenden Manuskripts gemeinsam mit PD Dr. Ulf Schneider.

---

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

## Auszug aus der Journal Summary List

Journal Data Filtered By: **Selected JCR Year: 2019** Selected Editions: SCIE,SSCI  
 Selected Categories: **"NEUROSCIENCES"** Selected Category Scheme: WoS  
**Gesamtanzahl: 271 Journale**

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
1	NATURE REVIEWS NEUROSCIENCE	42,809	33.654	0.055400
2	NATURE NEUROSCIENCE	62,933	20.071	0.144390
3	BEHAVIORAL AND BRAIN SCIENCES	9,395	17.333	0.008170
4	TRENDS IN COGNITIVE SCIENCES	27,705	15.218	0.036050
5	JOURNAL OF PINEAL RESEARCH	10,537	14.528	0.009430
6	NEURON	95,056	14.415	0.199640
7	ACTA NEUROPATHOLOGICA	21,908	14.251	0.040740
8	TRENDS IN NEUROSCIENCES	20,011	12.891	0.021220
9	Annual Review of Neuroscience	13,215	12.547	0.012740
10	MOLECULAR PSYCHIATRY	22,227	12.384	0.054730
11	Nature Human Behaviour	2,457	12.282	0.014190
12	BIOLOGICAL PSYCHIATRY	44,016	12.095	0.053910
13	BRAIN	53,282	11.337	0.067050
14	SLEEP MEDICINE REVIEWS	8,077	9.613	0.013000
15	Molecular Neurodegeneration	4,933	9.599	0.011840
16	PROGRESS IN NEUROBIOLOGY	12,791	9.371	0.011250
17	FRONTIERS IN NEUROENDOCRINOLOGY	4,491	9.059	0.007050
18	ANNALS OF NEUROLOGY	37,304	9.037	0.044120
19	NEUROSCIENCE AND BIOBEHAVIORAL REVIEWS	28,873	8.330	0.051900
20	Neurology-Neuroimmunology & Neuroinflammation	2,232	7.724	0.008400
21	NEUROPATHOLOGY AND APPLIED NEUROBIOLOGY	3,992	7.500	0.005960

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
22	Neurobiology of Stress	1,055	7.197	0.003840
23	NEUROPSYCHOPHARMACOLOGY	26,281	6.751	0.040680
24	npj Parkinsons Disease	662	6.750	0.002500
25	BRAIN BEHAVIOR AND IMMUNITY	16,285	6.633	0.028560
26	Brain Stimulation	6,537	6.565	0.015580
27	NEUROSCIENTIST	5,188	6.500	0.007220
28	Acta Neuropathologica Communications	4,070	6.270	0.014730
29	CURRENT OPINION IN NEUROBIOLOGY	14,959	6.267	0.028730
30	Alzheimers Research & Therapy	3,876	6.116	0.011650
31	Neurotherapeutics	4,998	6.035	0.009520
32	GLIA	14,220	5.984	0.017250
33	NEUROIMAGE	102,632	5.902	0.125360
34	Annual Review of Vision Science	601	5.897	0.003700
35	Molecular Autism	2,510	5.869	0.007450
36	Journal of Neuroinflammation	13,709	5.793	0.025870
37	Translational Stroke Research	2,274	5.780	0.004520
38	JOURNAL OF CEREBRAL BLOOD FLOW AND METABOLISM	19,492	5.681	0.024230
39	JOURNAL OF NEUROSCIENCE	167,114	5.673	0.181170
40	BRAIN PATHOLOGY	5,308	5.568	0.007020
41	Translational Neurodegeneration	1,030	5.551	0.002790
42	NEURAL NETWORKS	14,065	5.535	0.018910
43	PAIN	37,753	5.483	0.035730

RESEARCH

Open Access

## Microglia as target for anti-inflammatory approaches to prevent secondary brain injury after subarachnoid hemorrhage (SAH)



Rebecca Heinz<sup>1</sup>, Susan Brandenburg<sup>1</sup>, Melina Nieminen-Kelhä<sup>1</sup>, Irina Kremenetskaia<sup>1</sup>, Philipp Boehm-Sturm<sup>2,3</sup>, Peter Vajkoczy<sup>1,2,4</sup> and Ulf C. Schneider<sup>1,4\*</sup>

### Abstract

**Background:** Microglia-driven cerebral spreading inflammation is a key contributor to secondary brain injury after SAH. Genetic depletion or deactivation of microglia has been shown to ameliorate neuronal cell death. Therefore, clinically feasible anti-inflammatory approaches counteracting microglia accumulation or activation are interesting targets for SAH treatment. Here, we tested two different methods of interference with microglia-driven cerebral inflammation in a murine SAH model: (i) inflammatory preconditioning and (ii) pharmacological deactivation.

**Methods:** 7T-MRI-controlled SAH was induced by endovascular perforation in four groups of C57Bl/6 mice: (i) Sham-operation, (ii) SAH naïve, (iii) SAH followed by inflammatory preconditioning (LPS intraperitoneally), and (iv) SAH followed by pharmacological microglia deactivation (colony-stimulating factor-1 receptor-antagonist PLX3397 intraperitoneally). Microglia accumulation and neuronal cell death (immuno-fluorescence), as well as activation status (RT-PCR for inflammation-associated molecules from isolated microglia) were recorded at day 4 and 14. Toll-like receptor4 (TLR4) status was analyzed using FACS.

**Results:** Following SAH, significant cerebral spreading inflammation occurred. Microglia accumulation and pro-inflammatory gene expression were accompanied by neuronal cell death with a maximum on day 14 after SAH. Inflammatory preconditioning as well as PLX3397-treatment resulted in significantly reduced microglia accumulation and activation as well as neuronal cell death. TLR4 surface expression in preconditioned animals was diminished as a sign for receptor activation and internalization.

(Continued on next page)

\* Correspondence: [ulf.schneider@charite.de](mailto:ulf.schneider@charite.de)

<sup>1</sup>Experimental Neurosurgery, Charité – Universitätsmedizin Berlin, corporate member of Freie Universität Berlin, Humboldt-Universität zu Berlin, and Berlin Institute of Health, Berlin, Germany

<sup>4</sup>Department of Neurosurgery, Charité – Universitätsmedizin Berlin, 10117 Berlin, Germany

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2021 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

(Continued from previous page)

**Conclusions:** Microglia-driven cerebral spreading inflammation following SAH contributes to secondary brain injury. Two microglia-focused treatment strategies, (i) inflammatory preconditioning with LPS and (ii) pharmacological deactivation with PLX3397, led to significant reduction of neuronal cell death. Increased internalization of inflammation-driving TLR4 after preconditioning leaves less receptor molecules on the cell surface, providing a probable explanation for significantly reduced microglia activation. Our findings support microglia-focused treatment strategies to overcome secondary brain injury after SAH. Delayed inflammation onset provides a valuable clinical window of opportunity.

**Keywords:** Subarachnoid hemorrhage, Inflammation, Microglia, Secondary brain injury, Inflammatory preconditioning, CSF1-Receptor

## Introduction

Aneurysmal subarachnoid hemorrhage (SAH) leads to devastating outcomes, resulting in severe neurological deficits for survivors [1].

Many different factors contributing to brain injury after SAH have been identified for the early and for the late phase. Early brain injury occurs with the initial bleeding, leading to rise of intracranial pressure, disturbance of the blood-brain barrier, cerebral edema, decrease of cerebral perfusion, and early ischemic brain injury with subsequent neuronal cell death [2, 3]. In contrast, secondary brain injury describes a number of pathologies that occur in the later course of SAH, leading to additional brain damage like cortical spreading depolarization, cerebral vasospasm, or post hemorrhagic hydrocephalus [1, 4, 5]. Immune reactions following SAH contribute significantly to secondary brain injury [6–8]. Inflammatory cell invasion and accumulation have been described in a variety of other pathologies like Alzheimer's disease, ischemic stroke, or traumatic brain injury with detrimental effects [9–11]. Cerebral spreading inflammation after SAH has been described previously by our group and others. Microglia accumulate within the brain tissue between day 4 and 14 after SAH and inflict additional neuronal cell death [6, 12, 13]. The time interval before initiation of secondary brain injury gives rise for potential treatment options.

Microglia, the brain's innate immune system, originating from the yolk sac [14] get activated upon interaction with pathogens. Once activated, they act through pathogen presentation, production of cytokines/chemokines, and phagocytosis [14]. Microglia activation contributes to neuronal cell death after SAH [6]. An important downstream pathway is Toll-like-receptor 4 (TLR4) [15–17]. TLR4 is a common pattern recognition receptor on the surface of immune cells like microglia. Upon blood-appearance in the subarachnoid space, it recognizes danger-associated molecular patterns like blood components and cell debris and initiates inflammation via intracellular MyD88 and NFκB [18–20].

Considering this cascade of inflammation-driven secondary brain injury, therapeutic strategies targeting

microglia activation seem promising. In this study, we describe two different ways of altering microglia activation to overcome neuronal cell death: (a) inflammatory preconditioning and (b) pharmacological deactivation of microglia using colony-stimulating factor 1 receptor (CSF1-R) inhibitor.

Preconditioning is the confrontation of a system with a mild stimulus of the same kind as a subsequently expected noxa with the idea of reprogramming the system's reaction to that noxa. The commonly best-described type of preconditioning is hypoxic preconditioning, e.g., in cardiac or cerebral ischemia [21]. Mild activation of microglia by low-dose exposure to lipopolysaccharides (LPS) prior to subarachnoid hemorrhage is supposed to reprogram inflammatory signaling after the bleeding. Here, TLR4-signaling and its possible alteration via preconditioning might play an important role [22, 23]. Inflammatory preconditioning has also been investigated in contexts of inflammation after stroke or spinal cord injury where neuroprotective effects have been shown [24–26].

Our second approach to prevent secondary inflammation-driven brain injury is pharmacological deactivation of microglia using a selective CSF1-R/c-kit inhibitor, which acts as a tyrosine-kinase-inhibitor [27]. Within the central nervous system (CNS), microglia exclusively are CSF1-R-signalling-dependent. Blocking the receptor results in a loss of function of microglia [28–30]. Therefore, this pathway is a selective way to reduce microglia activation.

To determine if inflammatory preconditioning or pharmacological deactivation of microglia lead to a reduction of microglia-induced cerebral spreading inflammation and secondary brain injury respectively, we took advantage of a murine model of experimental SAH.

## Materials and methods

### Animal experiments

All experiments were approved by the local authorities (Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin, Germany, RegNr. G0177/14, G0063/18) and committed

in conformity with German law of animal protection and the National Institute of Health guidelines for care and use of laboratory animals.

C57Bl/6 wild-type mice (Charles River Laboratories, 12–14 weeks old, body weight app. 21–24 g) were kept at the Forschungszentrum für Experimentelle Medizin, Charité-Universitätsmedizin Berlin.

#### Animal model of experimental SAH

A filament perforation model was used for experimental SAH as described elsewhere [31].

Sham-operated animals underwent the same procedure (insertion and advancement of the filament within the internal carotid), but without vessel puncture.

All animals underwent MRI-scans 24 h after SAH using a 7-Tesla rodent scanner (Pharmascan 70/16, Bruker, Ettlingen, Germany) equipped with a 20-mm-diameter transmit/receive volume coil (RAPID Biomedical, Rimpfing, Germany). T2\*-imaging was performed to assure occurrence of the bleeding. T2-imaging ruled out ischemia or intraparenchymal bleeding (Fig. 1a). MRA-TOF images showed the puncture site of the filament and illustrated dynamic change of the physiological blood flow conditions during the time course of SAH. This procedure was performed with 3 representative animals directly, 24 h and 72 h after SAH-induction (Fig. 1b). Scan sequence details can be provided on demand. Image processing was performed using OsiriX (Pixmeo, Switzerland).

The experiments comprised 4 groups: Sham-operated animals, untreated SAH-animals, LPS-preconditioned SAH-animals, and CSF1R-inhibitor-treated SAH-animals.

A total of 86 animals were included and divided in these 4 groups: 17 Sham-operated animals (mortality rate: 0%), 20 untreated SAH-animals (mortality rate: 10%), 24 preconditioned SAH-animals (mortality rate: 12.5%), and 23 CSF1R-inhibitor treated SAH-animals (mortality rate 8.7%). Group sizes were estimated under statistical supervision, taking readouts from our former studies into account.

Application and dosing were chosen according to prior publications with or without internal modifications. LPS (Sigma-Aldrich) was applied intraperitoneally (0.6 mg/kg) as described before [23, 32]. The preferred application of CSF1R-inhibitor, further referred to as PLX3397 (Plexxikon Inc.), is enteral application with the following variations: mixed into chow, applied via gavage, or mixed into some appealing agent (e.g., corn oil or Nutella\*) [33–36]. Parenteral application has been used before, when enteral application seemed inappropriate [37]. Dosing varies substantially between 20 and 50 mg/kg in these studies. Animals after SAH lose weight within the first days. This is why we decided against oral

administration, but for intraperitoneal injection. The dose was 30 mg/kg, according to internal communications in our lab and aiming at the mid-range of the aforementioned published data.

LPS was given 1 h after SAH induction. The term “preconditioning” is considered as LPS-administration before inflammation occurs and not before SAH takes place. PLX3397 was applied daily with first application one hour after SAH induction. After 4 and 14 days, animals were perfused with either ice-cold PBS or 4%PFA under deep anesthesia and decapitated (Fig. 1c).

#### Immunofluorescence analyses

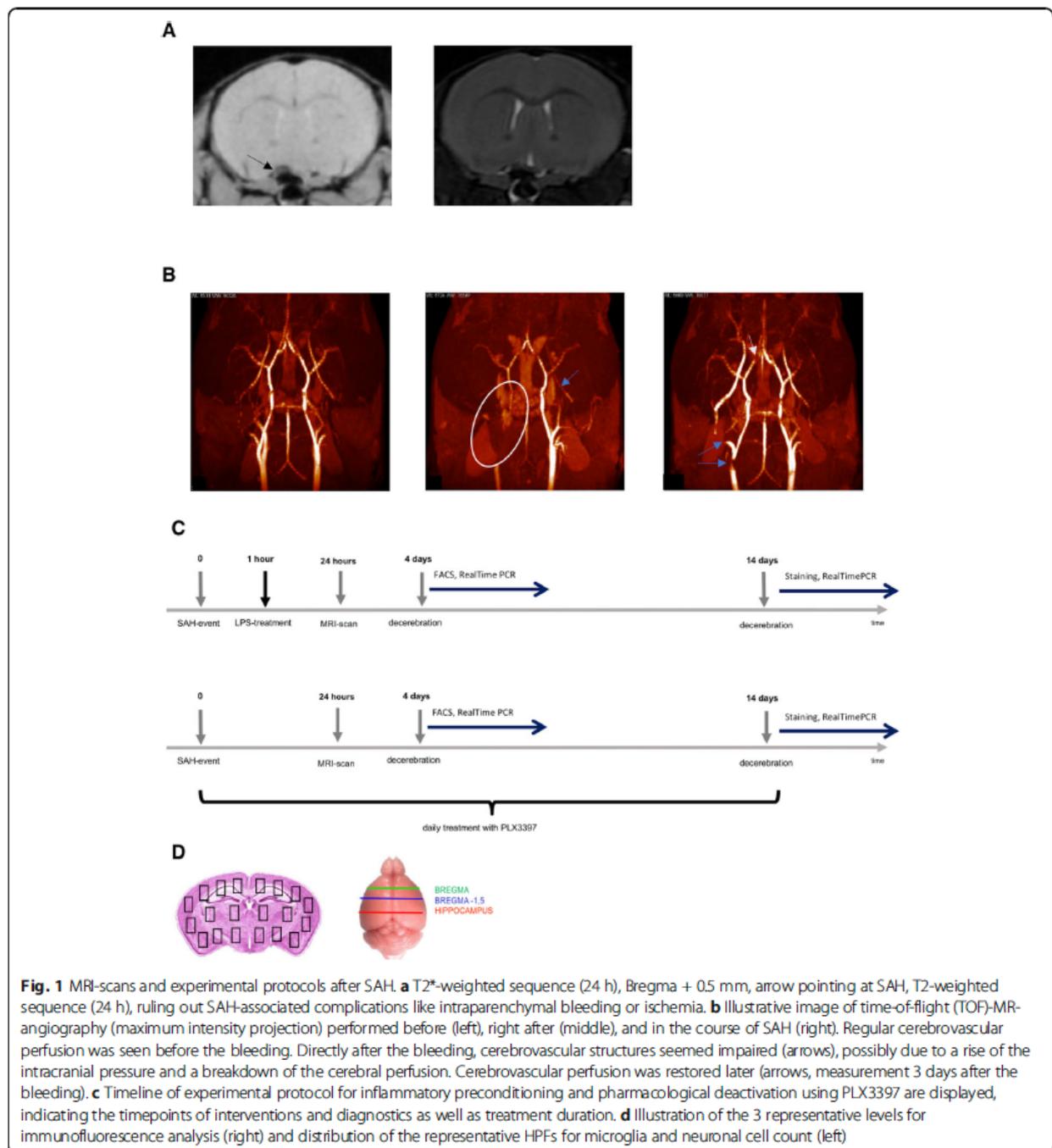
For immunofluorescence analysis, brains of 20 mice (5 animals per group) were fixed in 4%PFA for 24 h, dehydrated in 30% saccharose for another 24 h, and cut into 10 µm coronal sections.

Immunofluorescence staining was performed for microglia (Iba-1) and neuronal cell death (NeuN/TUNEL co-staining). In previous experiments, we showed that Iba1-positive cells are microglia exclusively, and not secondarily invaded macrophages/lymphocytes [6]. Slides were mounted and nuclei labeled with DAPI mounting medium in all protocols (Dianova). Primary antibodies were applied at 4 °C overnight. Secondary antibodies were incubated for 2 h at room temperature. Antibodies used included rabbit anti-Iba-1 (1:250 WAKO), mouse anti-NeuN (1:200 Millipore), DyLight 488 donkey anti-rabbit (1:200 Jackson), and FITC donkey anti mouse (1:100 Jackson). Neuronal cell death was detected by TUNEL (ApopTag® Red In Situ, Millipore), according to manufacturer's protocol.

For quantitative analysis, whole sections were mounted and analyzed under a fluorescence microscope (Zeiss, Axio Observer Z1, Carl Zeiss GmbH, Munich, Germany) equipped with a digital camera (AxioCam MRc). Immunofluorescence sections were divided into 20 standardized high-power fields (HPFs, allowing for total cell counts per brain section on three different sections of the brain (bregma + 0 mm, bregma + 1.5 mm, bregma + 3 mm). Mean values and standard deviation were calculated per animal from 20 HPF/section (× 3 sections) (Fig. 1d).

#### Isolation of microglia from murine brains

In a separate set of experiments, murine brains from a total of 33 animals were harvested on day 4 ( $n = 17$ ) or day 14 ( $n = 16$ ) after the bleeding. Group sizes were 3 sham, 4 SAH, 5 LPS-preconditioned, and 5 PLX3397-treated on day 4 and 3 sham, 3 SAH, 5 LPS-preconditioned, and 5 PLX3397-treated on day 14, respectively. The brains were brought into suspension, taking advantage of the MACS® Neural Tissue Dissociation Kit, according to manufacturer's recommendation, using



gentleMACS Octo Dissociator. To this suspension, a magnetic microbead-labeled CD11b-antibody (all Miltenyi Biotec) was added. After incubation at 4° for 15 min, the respective cell pools were added to a pre-cooled column placed within a magnet. This procedure was repeated twice to achieve higher purity. The purity of this CD11b-positive microglia cell fraction

was evaluated by FACS, using antibodies against CD11b and CD45 (BD Bioscience, FITC-coupled, M1/70, APC-coupled 30-F11). DAPI (1:100, Sigma Aldrich) was added to the cell suspension to exclude dead cells before samples were measured using FACS (BD FACS Canto II, BD Bioscience, Germany), getting an overall purity of 90%.

### Molecular analysis of the isolated microglia

RNA extraction was performed from the isolated microglia cell fraction, using RNA Extraction Kit (NucleoSpin® RNA II, Fisher Scientific, UK). The amount of RNA was evaluated at 260 nm filter range. From RNA, cDNA was reversely transcribed using PrimeScript™ RT Reagent Kit with gDNA Eraser (TaKaRa Bio Inc.), according to manufacturer's recommendation.

Quantitative real-time PCR (RTq-PCR) was then performed for the inflammatory cytokines TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$  and IL6, the anti-inflammatory cytokines IL4, IL10, and TGF $\beta$ , and the receptor TLR4 using SYBR® Premix Ex Taq (TaKaRa Bio Inc.). All primers were produced by TIB MOLBIOL (Berlin, Germany, primer sequences provided in [suppl table](#)). Results are displayed as relative quantity normalized to sham values (RQ, delta-delta CT model). Hence, statistical comparison to sham values was considered mathematically incorrect.

### Staining for FACS analysis

For FACS analysis, the brains of 24 animals were used ( $n = 6$  per group). CD115 and TLR4 staining was realized using the following antibodies: FITC anti-CD11b (M1/70, Bio-Legend), PerCP anti-CD45 (30-F11, BD Biosciences), PE anti-CD115 (T38-320, BD Biosciences), and APC anti-TLR4 (SA15-21, Bio-Legend). Here, CD11b<sup>+</sup> CD45<sup>+</sup> cells were gated and afterwards the percentage of TLR4-positive and CD115-positive cells was calculated. DAPI (1:100, Sigma Aldrich) was added to the cell suspension to exclude dead cells.

All samples were measured using FACS and evaluated with FlowJo software (Tree Star).

### Statistical analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad PRISM (GraphPad Software, version 8.2). All data were analyzed by one-way ANOVA with Bonferroni correction for multiple comparisons to detect statistical differences. All cell count values are displayed as means  $\pm$  standard deviation. Statistical significance was defined at  $p < 0.05$ , \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , and \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

## Results

### Inflammatory preconditioning and PLX3397-treatment both reduce SAH-dependent microglia accumulation

As in our previous experiments, SAH led to significant microglia accumulation within the brain parenchyma until day 14 after the bleeding, compared to sham-operated animals (SAH:  $32.79 \pm 4.77$  vs. Sham  $11.157 \pm 1.538$  cells/HPF,  $p < 0.0001$ ). Our current data show that both treatments, inflammatory preconditioning ( $17.43 \pm 2.42$  cells/HPF), as well as PLX3397-treatment ( $11.16 \pm 1.54$  cells/HPF) significantly reduced

microglia accumulation within the time course of SAH compared to untreated SAH animals (both  $p < 0.0001$ , Fig. 2).

### Inflammatory preconditioning and PLX3397-treatment both reduce SAH-driven neuronal cell death

Microglia accumulation within the brain tissue has previously been found to initiate neuronal cell death. In line with these previous results, we confirmed a significantly increased amount of dying neurons in animals after SAH as compared to sham-operated animals (dying neurons/brain section SAH:  $141,821 \pm 60,866$  vs. Sham:  $12.2 \pm 4.453$ ,  $p < 0.0001$ ). In animals in both treatment groups, significantly less neuronal cell death was detected (dying neurons/brain section LPS preconditioning:  $78.4 \pm 28.625$ ,  $p < 0.01$  vs. SAH, PLX3397 treatment:  $92.5 \pm 37.267$ ,  $p < 0.05$  vs. SAH). However, we saw no significant difference between the two treatment groups (Fig. 3).

### Inflammatory preconditioning and PLX3397-treatment both modify pro- and anti-inflammatory gene-expression of microglia after SAH

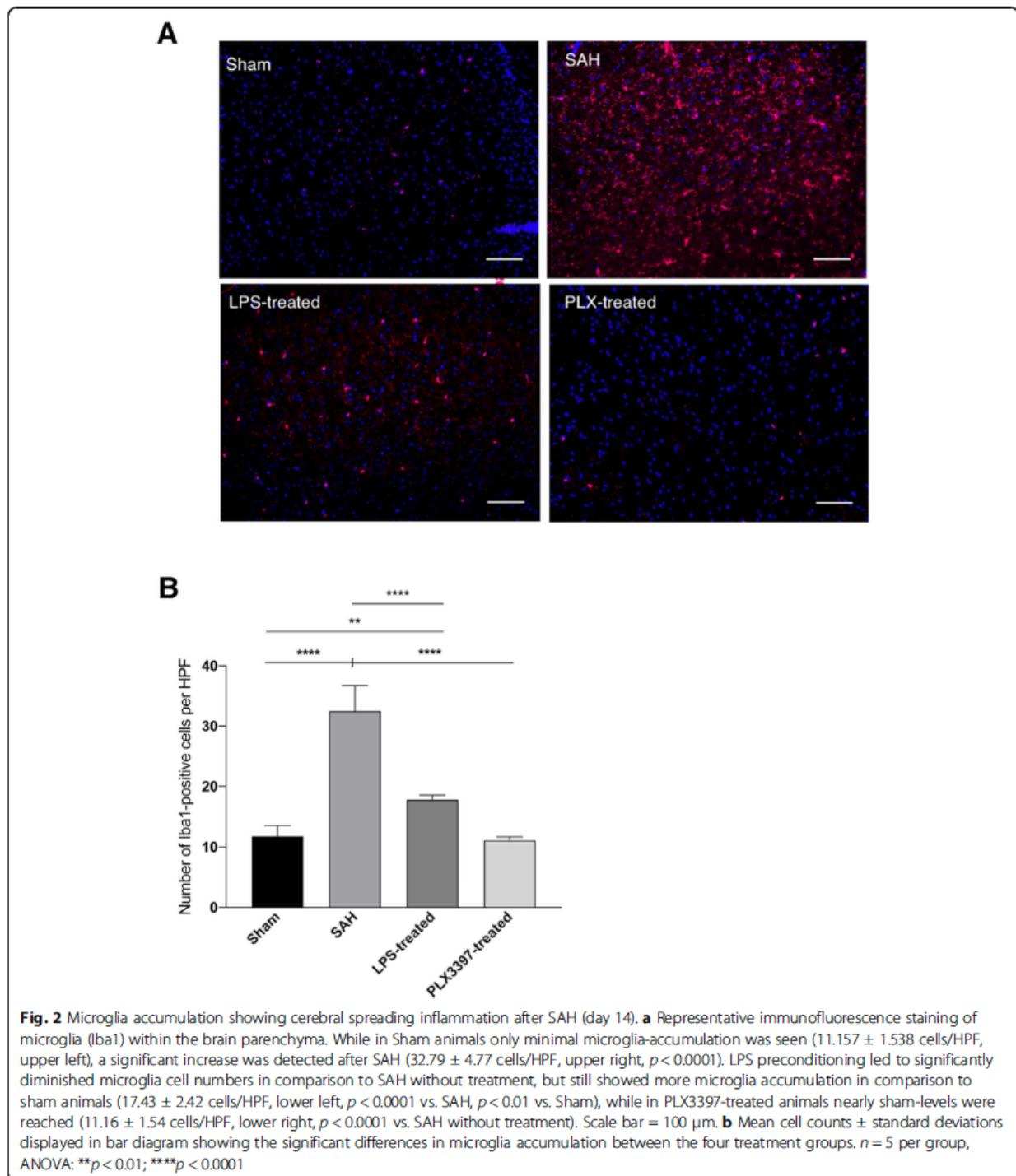
We analyzed the pro- and anti-inflammatory gene-expression profiles of microglia isolated from the brains of our four treatment groups.

In pro-inflammatory genes, at day 4, no significant difference in the untreated SAH-group as well as in the preconditioned group was detected in comparison to sham-operated animals, indicating no significant inflammatory activation of microglia in these groups. However, the PLX3397-treated group showed a significant increase of TNF $\alpha$  gene-expression at this early time point as compared to the other groups (PLX3397 treatment vs. SAH  $p < 0.01$ , PLX3397 treatment vs. LPS preconditioning  $p < 0.05$ , Fig. 4a, left).

At day 14, an increase of IL6 and IL1 $\beta$  was seen in the SAH-group, as compared to sham-operated animals, but not in TNF $\alpha$  anymore. In animals after inflammatory preconditioning, gene-expression of IL6 and IL1 $\beta$  was significantly lower than in SAH animals without treatment and comparable to Sham-level. In PLX3397-treated animals, even lower gene expression levels for these two molecules were seen (IL1 $\beta$  and IL6: LPS preconditioning vs. SAH  $p < 0.01$ , PLX3397 treatment vs. SAH  $p < 0.001$ , Fig. 4a, right).

Concerning anti-inflammatory genes (IL4, IL10, and TGF $\beta$ ), a slight but not significant upregulation of IL4 was seen in the LPS preconditioned group at day 4 and 14 (n.s.).

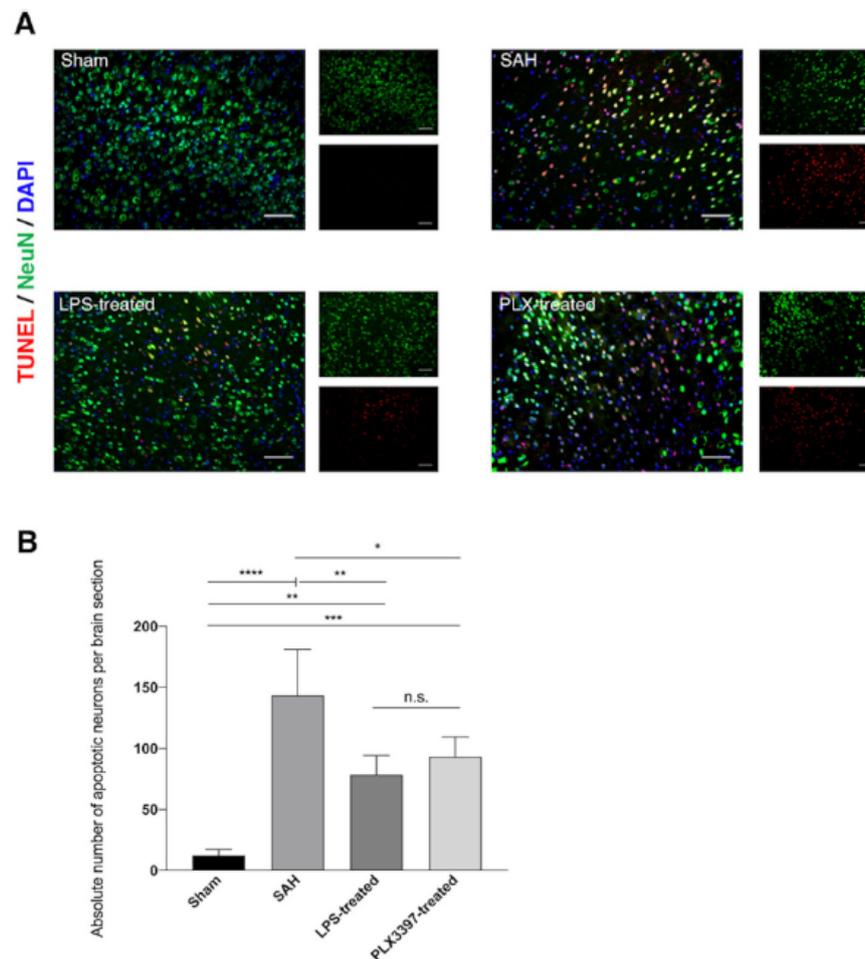
Furthermore, at day 14 in PLX3397-treated animals, significantly lower levels of anti-inflammatory cytokines were found, while no significant changes were seen after LPS preconditioning (PLX3397 treatment vs. SAH:  $p <$



0.05, LPS preconditioning vs. SAH n.s., Fig. 4b, right). PLX3397 treatment thus seems to initiate a more complex downstream cascade than LPS preconditioning, allowing for an early increase in TNF $\alpha$  and a later increase of the two other inflammatory cytokines, while

showing inhibitory potential in the expression of anti-inflammatory cytokines at day 14 after the bleeding.

COX2 upregulation as consequence of high levels of inflammatory cytokines (IL6, IL1 $\beta$ ) has been described before [38], following a similar time course. At day 4, we



**Fig. 3** Neuronal cell death after SAH (day 14). **a** Representative immunofluorescence staining of neuronal nuclei (NeuN, green) and cell death (TUNEL, red). Images of each group are displayed as single staining results for NeuN and TUNEL in a smaller scale and a fused image in large scale displaying both cells (green or red) and co-staining (yellow), as well as nuclei (DAPI, blue). Scale bar = 100  $\mu$ m. In Sham animals (upper left), dying neurons could only scarcely be detected ( $12.2 \pm 4.453$  dying neurons/brain section). SAH induced significant neuronal cell death, as documented before ( $141,821 \pm 60,866$  dying neurons/brain section, upper right,  $p < 0.0001$  vs. Sham). Preconditioning by LPS successfully prevented neuronal cell death ( $78.4 \pm 28.625$  dying neurons/brain section, lower left,  $p < 0.01$  vs. SAH), as did PLX3397 treatment ( $92.5 \pm 37.267$  dying neurons/brain section, lower right,  $p < 0.05$  vs. SAH). Still, more neuronal cell death was documented in both treatment groups, when compared to sham animals ( $p < 0.01$  LPS vs. Sham,  $p < 0.001$  PLX3397 vs. Sham). **b** Mean cells counts and standard deviations displayed in bar diagram showing the significant differences in neuronal cell death between the four treatment groups as described above.  $n = 5$  per group, ANOVA: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$

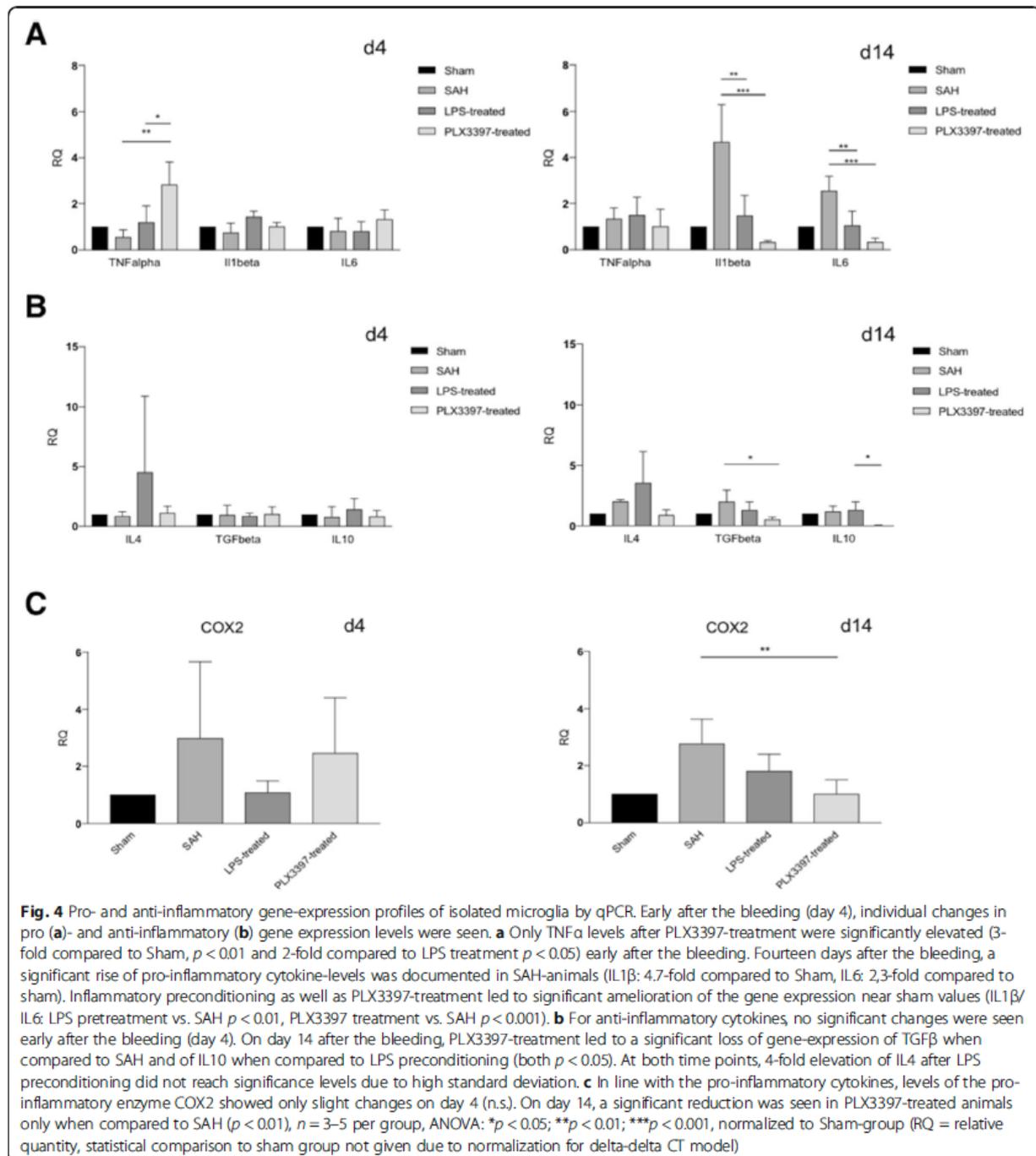
saw no significant increase in any of our groups, whereas at day 14 an increase of COX2 gene-expression in the SAH group with lower levels in both treatment groups was documented. However, only PLX3397-treatment led to significant changes (LPS preconditioning vs. SAH: n.s., PLX3397 treatment vs. SAH:  $p < 0.01$ , Fig. 4c).

#### Inflammatory preconditioning and PLX3397-treatment both lead to altered TLR4-receptor expression on microglia after SAH

In a next step, we addressed whether there is a regulation in the expression of TLR4. Baseline qPCR

measurements of the gene expression of TLR4 in isolated microglia after inflammatory preconditioning did not show any significant difference in any of the groups (Fig. 5a).

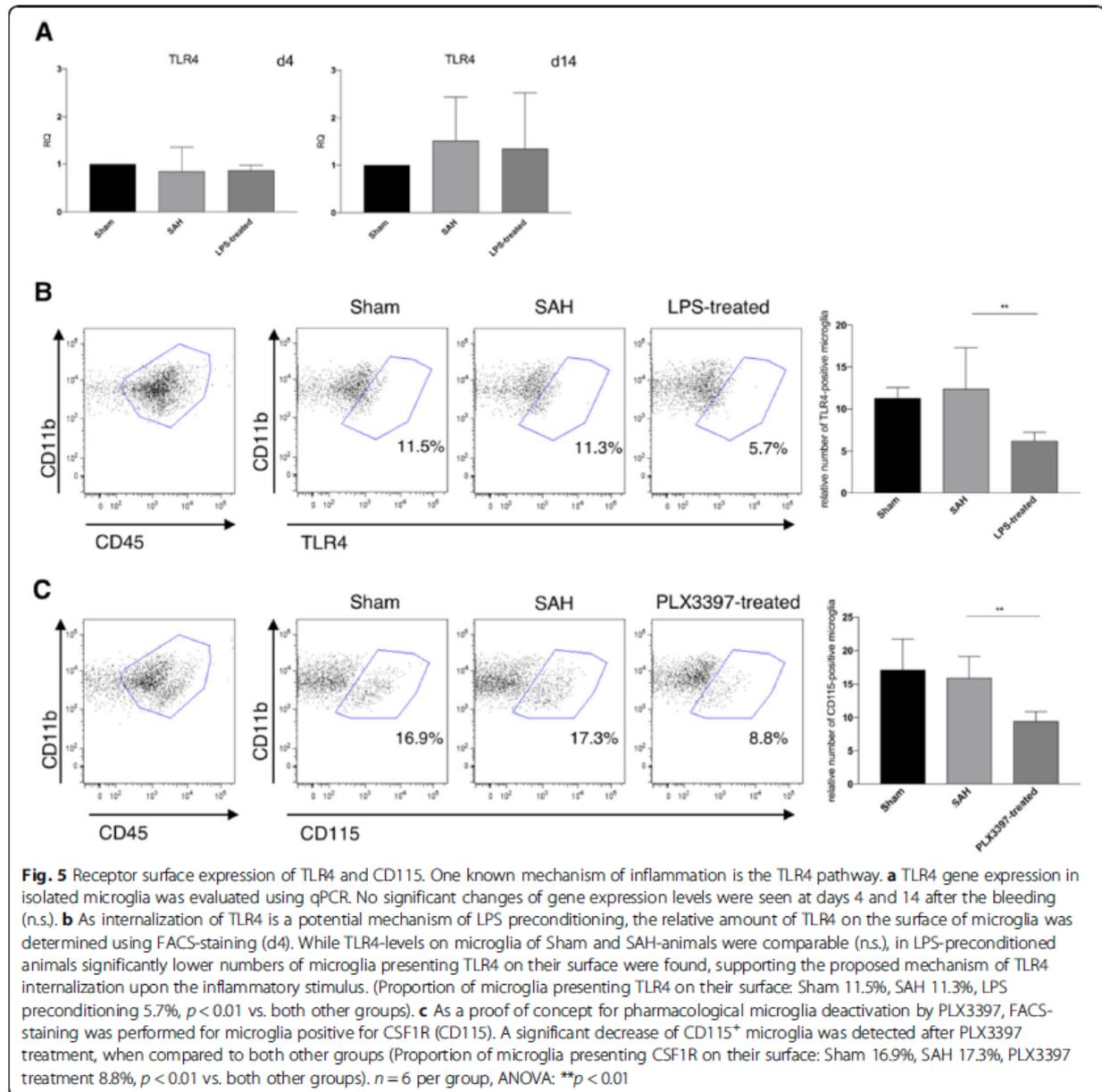
As TLR4 is located on the cellular surface, internalization of the receptor after preconditioning with LPS is a supposed mechanism to explain the anti-inflammatory effect of inflammatory preconditioning. Thus, we analyzed the cellular expression of TLR4 using FACS at day 4 after SAH. The results showed a significant decrease of TLR4 surface expression after inflammatory LPS preconditioning, while values were comparable between the



other groups (proportion of microglia presenting TLR4 on their surface: Sham 11.5%, SAH 11.3%, LPS preconditioning 5.7%,  $p < 0.01$  vs. both other groups, Fig. 5b).

PLX3397 is an inhibitor of CSF1-R (CD115). The survival signaling of CSF1-dependent cells is less effective after PLX3397 treatment. We therefore investigated the

density of the CSF1R on microglia using FACS and found that inhibition of the receptor resulted in a decrease of its surface expression as well (proportion of microglia presenting CSF1R on their surface: Sham 16.9%, SAH 17.3%, PLX3397 treatment 8.8%,  $p < 0.01$  vs. both other groups, Fig. 5c).



### Discussion

In our current study, we compared two ways to interact with microglia accumulation and activation within the brain tissue after experimental SAH in mice to overcome secondary neuronal cell death.

Both treatment methods significantly altered microglia accumulation and their activation status, respectively, leading to a significant reduction of neuronal cell death that compared favorably to our previous data [6].

Inflammatory cells within the CNS do not only comprise microglia, but also peripheral monocytic cells (e.g., macrophages or lymphocytes) that may secondarily

invade the brain from the periphery through an altered or even disrupted blood brain barrier. We have addressed this topic in prior studies. Using a chimeric mouse model, we showed that peripheral cell invasion into the brain did not occur after experimental SAH. Since our current experiments followed the same protocol, we assume that the Iba1-positive cells detected here are brain resident microglia as well and not peripheral monocytic cells [6].

In our current study, we focused on day 14 after the bleeding. This is the time point of maximum intention of inflammation and neuronal injury, as we have

determined in earlier studies [6]. Especially the time interval between occurrence of the bleeding and first documented occurrence of cellular inflammation within the brain tissue, associated with neuronal injury respectively, offers a target for treatment or prevention. Unlike in ischemic stroke or intracerebral hemorrhage, where the time interval for treatment comprises only the first few hours, the possible time interval for SAH according to our data is much longer.

In the context of intracerebral hemorrhage, PLX3397 treatment has been investigated before. In that study, a 14-day pre-treatment led to a 90% reduction of microglia and to favorable outcomes, respectively [39]. Yet, any kind of pre-treatment does not resemble a realistic clinical situation. In our experiments, PLX3397-treatment was started 1 h after induction of SAH, resembling a quite realistic possibility of a clinical setting. Still, treatment resulted in significantly (yet not 90%) reduced microglia cell count and less neuronal cell death 14 days later, underlining the favorable window of opportunity for treatment. The fact that PLX3397 treatment needs several days (in some literature up to weeks [28, 40]) for maximum depletion of microglia might exhibit a potential weakness in this “realistic” treatment scenario, as compared to a pre-treatment scenario. Although we have not performed microglia staining at day 4 after the bleeding—as done in our previous studies that showed only minimal accumulation, repetitively—we discuss two possible theories for our documented significant elevation of TNF $\alpha$  gene expression after PLX3397 treatment on day 4. Given the time course of depletion of microglia under PLX3397 treatment, we hypothesize that on day 4 after the bleeding, there is still a sufficient amount of microglia that remains or becomes activated in the early phase after the bleeding to explain this rise in TNF $\alpha$  gene expression which later is ameliorated, when depletion by PLX3397 progresses (day 14). Nevertheless, this finding remains controversial, as neither IL1 $\beta$  nor IL6 gene expression levels are elevated at day 4. A second possible explanation is another (unknown) contributor. Inflammatory gene expression has been measured in isolated microglia (purity > 90%). Within the residual 10%, we might speculate on another potential contributor to cerebral spreading inflammation that has not been addressed by our experiments. Yet, in light of the existing literature on PLX3397 depletion kinetics, we favor the first option and have to state that early administration of PLX3397 substantially ameliorates inflammatory secondary brain injury following eSAH, but due to long-term depletion kinetics harbors potential drawbacks in the early phase.

The concept of inflammatory preconditioning is new. It has been previously evaluated only recently in ischemic stroke [41] or spinal cord injury [26], but not in

SAH. Here, we show marked effects on inflammation itself and the consecutive downstream pathways. Regarding these downstream mechanisms, our first hypothesis was a change in microglia phenotype from inflammatory to anti-inflammatory (M1/M2 shift). However, the cytokine expression profile of our microglia did not completely support this hypothesis. Furthermore, established markers or contributing factors for an M1/M2 shift were not evaluated in our study (e.g., mTOR, CX3CR1, or electrophysiological features) [42, 43]. An additional pathway influencing microglia phenotype is an alteration of TLR4 on the cell surface, that is known to significantly contribute to pro- as well as anti-inflammatory changes in ischemia or traumatic CNS injury [44, 45]. In our experiments, preconditioning with LPS leads to a reduced surface expression of TLR4, but unchanged relative quantity in qPCR. Internalization (due to activation) of the receptor is the only suitable explanation for this constellation, although intracellular staining has not been done. The receptor is further not available for signaling when potential danger-associated molecular patterns (DAMPs) like hem, methemoglobin, and other already described ligands are presented in the course of hemorrhage [17, 46, 47]. Given that microglia are phagocytic cells fulfilling their task as edaphic macrophages, the TLR4 pathway is essential for the immune response mediated by microglia [15, 16, 48–50]. Various components of this pathway have already been investigated in anti-inflammatory approaches regarding SAH; antagonizing inflammatory cytokines, especially IL1 $\beta$  or inhibition of the adapter protein MyD88 [51]. Our current results in accordance with these previous results support the significance of the TLR4 pathway in cerebral spreading inflammation after SAH. Influence by preconditioning seems to be rather easy—and rather cheap—in comparison to the previously published molecular approaches, that mostly also target the intracellular compartment.

The systemic—and thus very easy—application of LPS intraperitoneally in our animals leads to a marked CNS effect. While we have not taken further effort in verifying the transfer steps from peripheral administration to cerebral inflammation, the mechanisms seem to be well-established and have been sufficiently described by other groups. In 2005 and 2007, basic research showed for the first time that peripherally administered LPS causes inflammation effects within the brain (also via TNF-alpha) [52, 53]. The first group to describe intracerebral effects of peritoneally applied LPS in SAH setting were Provenzio and co-workers, who also speculated on the TLR4-pathway as downstream mechanism [32, 54]. Wang and collaborators also used LPS to initiate cerebral inflammation [55]. With its molecular size of 50–100 kDa, LPS is able to pass the blood-brain barrier (BBB) in minimal

amounts only—if properly closed yet [56], disruption or even pre-sensitization of the BBB through SAH might lead to much larger amounts of LPS to enter the brain [57].

The animal model we applied was the intravascular filament perforation model. Although other models exist, that allow more homogeneous sizes of the bleeding or also more severe bleeding situations (like the autologous blood injection model), we appreciate that the perforation model inflicts vascular rupture at the site of the bleeding, therefore contributing to vessel wall shear stress with the subsequent molecular stress mechanisms. In a previous work, we showed the necessity of intravascular inflammation as precursor of intracerebral inflammation and therefore used the perforation model in the current experiments as well [8].

Although it would be interesting—especially in the clinical situation—if systemic administration of CSF1R antagonists elicits effects on the peripheral immune system, we have not investigated this in detail. We had no deaths in the PLX3397 group that were obviously infection-triggered and drop-out rates did not differ significantly from the other SAH groups.

Behavioral or neurocognitive testing would have been favorable to support our structural read-out by functional data. The general lack of neurocognitive testing in mice in this certain model of SAH is most likely due to the rather mild type of bleeding and the narrow threshold for intracranial compensation in mice compared to rats. While in rats, neuro-testing following SAH has been well-established and extensively reported, reliable and reproducible testing methods for this particular model in mice are still lacking. In various testing methods—including extensive catwalk testing, anxiety test, and depression scales, we could not detect any robust significant differences in mice after SAH induced by filament perforation (own data not published). Like in humans, only subtle neurocognitive decline might follow milder hemorrhage patterns. Using the existing testing battery, these are easily overseen in animals.

As a proof of concept for PLX3397-treatment, we investigated the surface expression of CSF1R (CD115), which is inhibited as shown by FACS analysis (Fig. 5c). The current understanding is that CSF1R is a tyrosine-kinase which is inhibited by PLX3397 in its autophosphorylation-ability [27]. In addition, our data show a lower surface expression. Yet it remains unclear if this is just an indirect sign of receptor deactivation, or an additional effect caused by loss of function of deactivated microglia [58].

We acknowledge that a direct comparison of our two models lacks a methodological similarity.

While LPS-preconditioning “pre-sensitizes” the brain’s immune system, PLX3397 treatment effectively inhibits

microglia in their function, thus leading to *immuno-suppression*. LPS-preconditioning alters microglia function and might therefore even elicit even more beneficial effects than categorical immuno-suppression by PLX3397, especially in light of the prolonged time to depletion of PLX3397, that we discussed above. Also, anti-inflammatory genes were significantly suppressed after PLX3397 treatment, while they remained on baseline levels after LPS preconditioning.

Interestingly, this was not supported by our findings for neuronal cell death. Although the number of dying neurons was higher after PLX3397 treatment than after LPS preconditioning, no statistically significant difference was found ( $p = 0.2$ ).

Nevertheless, both treatment options effectively counter microglia-mediated secondary brain injury following SAH. Although their mechanisms of action do significantly differ, both offer promising clinical potential, through easy application, low costs, and wide availability. Both treatment options directly act through change in microglia activation, which are the shared detrimental agent for neuronal cell injury. We therefore feel that thorough discussion of the differing mechanisms, but common target and purpose, makes comparison of the results of our two treatment options feasible.

## Conclusion

Increasing evidence shows the crucial role of microglia-driven cerebral spreading inflammation in secondary brain injury after SAH. We have shown before that the phenomenon is not restricted to experimental animal models but observed in humans as well [6]. Here, we evaluated two possible ways of countering the inflammatory response, that both prevent secondary neuronal injury. Due to the easy (and cheap) way of application, and the clinically highly valuable window of opportunity for treatment, inflammatory preconditioning as well as microglia-deactivation through a CSF1R-antagonist both have become valuable clinical treatment options and should be further evaluated in clinical trials.

## Supplementary Information

The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1186/s12974-021-02085-3>.

**Additional file 1: Table S1** Primer sequences

## Abbreviations

SAH: Subarachnoid hemorrhage; TLR4: Toll-like receptor 4; CSF1R: Colony-stimulating factor 1 receptor; LPS: Lipopolysaccharide; CNS: Central nervous system; BBB: Blood-brain barrier; DAMP: Danger-associated molecular pattern

## Acknowledgements

Susanne Mueller is acknowledged for technical support in MRI experiments and data interpretation.

**Authors' contributions**

UCS, PV, and RH designed research studies. RH, SB, MNK, and IK performed the experiments and harvested the tissue; performed qRT-PCR, FACS-staining, tissue staining, and analyzed the data. RH, MNK, and PBS performed MRI-measurements. UCS, PV, and RH drafted the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

**Funding**

Funding was received by the German Research Foundation (DFG) by transregional grant SFB TRR43 to PV and the German Government (Bundesministerium für Bildung und Forschung, Center for Stroke Research Berlin) to PV. Funding to PBS was provided by the German Federal Ministry of Education and Research (BMBF) under the ERA-NET NEURON scheme (01EW1811) and the DFG (research grant BO 4484/2-1 and EXC NeuroCure). Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

**Availability of data and materials**

All data generated or analyzed during this study are included in this published article (and its supplementary information files).

**Ethics approval and consent to participate**

All experiments were approved by the local authorities (Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin, Germany, RegNr. G0177/14, G0063/18) and committed in conformity with German law of animal protection and the National Institute of Health guidelines for care and use of laboratory animals.

**Consent for publication**

Not applicable.

**Competing interests**

The authors declare that they have no competing interests.

**Author details**

<sup>1</sup>Experimental Neurosurgery, Charité – Universitätsmedizin Berlin, corporate member of Freie Universität Berlin, Humboldt-Universität zu Berlin, and Berlin Institute of Health, Berlin, Germany. <sup>2</sup>Department of Experimental Neurology and Center for Stroke Research, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany. <sup>3</sup>NeuroCure Cluster of Excellence and Charité Core Facility 7T Experimental MRIs, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany. <sup>4</sup>Department of Neurosurgery, Charité – Universitätsmedizin Berlin, 10117 Berlin, Germany.

Received: 30 September 2020 Accepted: 14 January 2021

Published online: 30 January 2021

**References**

- Cahill J, Zhang JH. Subarachnoid hemorrhage: is it time for a new direction? *Stroke*. 2009;40(3 Suppl):S86–7.
- 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.
- Kusaka G, Ishikawa M, Nanda A, Granger DN, Zhang JH. Signaling pathways for early brain injury after subarachnoid hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2004;24(8):916–25.
- Caner B, Hou J, Altay O, Fujii M, Zhang JH. Transition of research focus from vasospasm to early brain injury after subarachnoid hemorrhage. *J Neurochem*. 2012;123(Suppl 2):12–21.
- Cahill J, Calvert JW, Zhang JH. Mechanisms of early brain injury after subarachnoid hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2006;26(11):1341–53.
- Schneider UC, Davids AM, Brandenburg S, Müller A, Elke A, Magrini S, et al. Microglia inflict delayed brain injury after subarachnoid hemorrhage. *Acta Neuropathol*. 2015;130(2):215–31.
- Schneider UC, Xu R, Vajkoczy P. Inflammatory events following subarachnoid hemorrhage (SAH). *Curr Neuropharmacol*. 2018;16(9):1385–95. <https://doi.org/10.2174/1570159X16666180412110919>.
- Atangana E, Schneider UC, Blecharz K, Magrini S, Wagner J, Nieminen-Kelha M, et al. 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.
- Heppner FL, Ransohoff RM, Becher B. Immune attack: the role of inflammation in Alzheimer disease. *Nat Rev Neurosci*. 2015;16(6):358–72.
- Iadecola C, Anrather J. The immunology of stroke: from mechanisms to translation. *Nat Med*. 2011;17(7):796–808.
- Karve IP, Taylor JM, Crack PJ. The contribution of astrocytes and microglia to traumatic brain injury. *Br J Pharmacol*. 2016;173(4):692–702.
- Sabri M, Kawashima A, Ai J, Macdonald RL. Neuronal and astrocytic apoptosis after subarachnoid hemorrhage: a possible cause for poor prognosis. *Brain Res*. 2008;1238:163–71.
- Lucke-Wold BP, Logsdon AF, Manoranjan B, Turner RC, McConnell E, Vates GE, et al. Aneurysmal subarachnoid hemorrhage and neuroinflammation: a comprehensive review. *Int J Mol Sci*. 2016;17(4):497.
- Kettenmann H, Hanisch UK, Noda M, Verkhratsky A. Physiology of microglia. *Physiol Rev*. 2011;91(2):461–553.
- Hanafy KA. The role of microglia and the TLR4 pathway in neuronal apoptosis and vasospasm after subarachnoid hemorrhage. *J Neuroinflammation*. 2013;10:83.
- Fang H, Wang PF, Zhou Y, Wang YC, Yang QW. Toll-like receptor 4 signaling in intracerebral hemorrhage-induced inflammation and injury. *J Neuroinflammation*. 2013;10:27.
- Kwon MS, Woo SK, Kurland DB, Banerjee U, et al. Methemoglobin is an endogenous toll-like receptor 4 ligand-relevance to subarachnoid hemorrhage. *Int J Mol Sci*. 2015;16(3):5028–46.
- Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*. 2010;140(6):805–20.
- Ma C, Zhou W, Yan Z, Qu M, Bu X. Toll-like receptor 4 (TLR4) is correlated with delayed cerebral ischemia (DCI) and poor prognosis in aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *J Neurosci*. 2015;35(9):3591–2:67–71.
- Sozen T, Tsuchiyama R, Hasegawa Y, Suzuki H, Jadhav V, Nishizawa S, et al. Role of interleukin-1beta in early brain injury after subarachnoid hemorrhage in mice. *Stroke*. 2009;40(7):2519–25.
- Hausenloy DJ, Candilio L, Evans R, Ariti C, Jenkins DP, Kolevkar S, et al. Remote ischemic preconditioning and outcomes of cardiac surgery. *N Engl J Med*. 2015;373(15):1408–17.
- Vartanian KB, Stevens SL, Marsh BJ, Williams-Kamesky R, Lessov NS, Stenzel-Poore MP. LPS preconditioning redirects TLR signaling following stroke: TRIF-IRF3 plays a seminal role in mediating tolerance to ischemic injury. *J Neuroinflammation*. 2011;8:140.
- Schaafsma W, Zhang X, van Zomeren KC, Jacobs S, Georgieva PB, Wolf SA, et al. Long-lasting pro-inflammatory suppression of microglia by LPS-preconditioning is mediated by RelB-dependent epigenetic silencing. *Brain Behav Immun*. 2015;48:205–21.
- Rosenzweig HL, Minami M, Lessov NS, Coste SC, Stevens SL, Henshall DC, et al. Endotoxin preconditioning protects against the cytotoxic effects of TNFalpha after stroke: a novel role for TNFalpha in LPS-ischemic tolerance. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2007;27(10):1663–74.
- Yu S, Liu X, Zhang N, Yang S, Mao C, Feng S, et al. Protection of lipopolysaccharide (LPS) preconditioning against endotoxin-induced uveitis (BU) in rats is associated with overexpression of interleukin-1 receptor-associated kinase M (IRAK-M). *Ocul Immunol Inflamm*. 2018;26(6):943–50.
- Li WC, Jiang R, Jiang DM, Zhu FC, Su B, Qiao B, et al. Lipopolysaccharide preconditioning attenuates apoptotic processes and improves neuropathologic changes after spinal cord injury in rats. *Int J Neurosci*. 2014;124(8):585–92.
- Smith CC, Zhang C, Lin KC, Lasater EA, Zhang Y, Massi E, et al. Characterizing and Overriding the Structural Mechanism of the Quizartinib-Resistant FLT3 "Gatekeeper" F691L Mutation with PLX3397. *Cancer Discov*. 2015;5(6):668–79.
- Spangenberg EE, Lee RJ, Najafi AR, Rice RA, Elmore MR, Blurton-Jones M, et al. Eliminating microglia in Alzheimer's mice prevents neuronal loss without modulating amyloid-beta pathology. *Brain*. 2016;139(Pt 4):1265–81.
- Elmore MR, Najafi AR, Koike MA, Dagher NN, Spangenberg EE, Rice RA, et al. Colony-stimulating factor 1 receptor signaling is necessary for microglia viability, unmasking a microglia progenitor cell in the adult brain. *Neuron*. 2014;82(2):380–97.
- Olmos-Alonso A, Schetters ST, Sri S, Askew K, Mancuso R, Vargas-Caballero M, et al. Pharmacological targeting of CSF1R inhibits microglial proliferation and prevents the progression of Alzheimer's-like pathology. *Brain*. 2016;139(Pt 3):891–907.
- Buhler D, Schuller K, Plesnila N. Protocol for the induction of subarachnoid hemorrhage in mice by perforation of the Circle of Willis with an endovascular filament. *Transl Stroke Res*. 2014;5(6):653–9.

32. Smithson S, Moore SK, Provencio JJ. Low-dose lipopolysaccharide injection prior to subarachnoid hemorrhage modulates delayed deterioration associated with vasospasm in subarachnoid hemorrhage. *Acta Neurochir Suppl.* 2013;115:253–8.
33. Groh J, Klein D, Berve K, West B, Martini R. Targeting microglia attenuates neuroinflammation-related neural damage in mice carrying human PLP1 mutations. *Glia.* 2019;67(2):277–90.
34. Berve K, West B, Martini R, Groh J. Sex- and region-biased depletion of microglia/macrophages attenuates CLN1 disease in mice. *J Neuroinflammation.* 2020;17(1):323.
35. Park S, Kim M, Zhu J, Lee W, Altan-Bonnet G, Meltzer P, Cheng S. Inflammation suppression prevents tumor cell proliferation in a mouse model of thyroid cancer. *Am J Cancer Res.* 2020;10(6):1857–70.
36. Spiller K, Restrepo C, Khan T, Dominique M, Fang T, Canter R, Roberts C, Miller K, Ransohoff R, Trojanowski J, Lee V. Microglia-mediated recovery from ALS-relevant motor neuron degeneration in a mouse model of TDP-43 proteinopathy. *Nat Neurosci.* 2018;21(3):329–40.
37. Kuse Y, Ohuchi K, Nakamura S, Hara H, Shimazawa M. Microglia increases the proliferation of retinal precursor cells during postnatal development. *Mol Vis.* 2018;24:536–45.
38. Ayer R, Jadhav V, Sugawara T, Zhang JH. The neuroprotective effects of cyclooxygenase-2 inhibition in a mouse model of aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Acta Neurochir Suppl.* 2011;111:145–9.
39. Li M, Li Z, Ren H, Jin WN, Wood K, Liu Q, et al. Colony stimulating factor 1 receptor inhibition eliminates microglia and attenuates brain injury after intracerebral hemorrhage. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2017;37(7):2383–95.
40. Rice RA, Spangenberg EE, Yamate-Morgan H, Lee RJ, Arora RP, Hernandez MX, et al. Elimination of microglia improves functional outcomes following extensive neuronal loss in the hippocampus. *J Neurosci.* 2015;35(27):9977–89.
41. Gesuete R, Stevens SL, Stenzel-Poore MP. Role of circulating immune cells in stroke and preconditioning-induced protection. *Acta Neurochir Suppl.* 2016; 121:39–44.
42. Li D, Wang C, Yao Y, Chen L, Liu G, Zhang R, et al. mTORC1 pathway disruption ameliorates brain inflammation following stroke via a shift in microglia phenotype from M1 type to M2 type. *FASEB J.* 2016;30(10):3388–99.
43. Kronenberg G, Uhlemann R, Richter N, Klempin F, Wegner S, Staerck L, et al. Distinguishing features of microglia- and monocyte-derived macrophages after stroke. *Acta Neuropathol.* 2018;135(4):551–68.
44. Zanoni I, Ostuni R, Marek LR, Barresi S, Barbalat R, Barton GM, et al. CD14 controls the LPS-induced endocytosis of Toll-like receptor 4. *Cell.* 2011; 147(4):868–80.
45. Di Gioia M, Zanoni I. Toll-like receptor co-receptors as master regulators of the immune response. *Mol Immunol.* 2015;63(2):143–52.
46. Boche D, Perry VH, Nicoll JA. Review: activation patterns of microglia and their identification in the human brain. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2013; 39(1):3–18.
47. Schneider UC, Schiffler J, Haky N, Hom P, Vajkoczy P. Functional analysis of Pro-inflammatory properties within the cerebrospinal fluid after subarachnoid hemorrhage in vivo and in vitro. *J Neuroinflammation.* 2012;9: 28.
48. Okada T, Suzuki H. Toll-like receptor 4 as a possible therapeutic target for delayed brain injuries after aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *Neural Regen Res.* 2017;12(2):193–6.
49. Kawakita F, Fujimoto M, Liu L, Nakano F, Nakatsuka Y, Suzuki H. Effects of Toll-Like Receptor 4 Antagonists Against Cerebral Vasospasm After Experimental Subarachnoid Hemorrhage in Mice. *Mol Neurobiol.* 2017;54(8): 6624–33.
50. Yin D, Zhou S, Xu X, Gao W, Li F, Ma Y, et al. Dexmedetomidine attenuated early brain injury in rats with subarachnoid haemorrhage by suppressing the inflammatory response: The TLR4/NF-kappaB pathway and the NLRP3 inflammasome may be involved in the mechanism. *Brain Res.* 2018;1698:1–10. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2018.05.040> Epub 2018 May 26.
51. Yan H, Zhang D, Wei Y, Ni H, Liang W, Zhang H, et al. Inhibition of myeloid differentiation primary response protein 88 provides neuroprotection in early brain injury following experimental subarachnoid hemorrhage. *Sci Rep.* 2017;7(1):15797.
52. Qin L, Wu X, Block ML, Liu Y, Breese GR, Hong JS, et al. Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration. *Glia.* 2007; 55(5):453–62.
53. Qin L, Li G, Qian X, Liu Y, Wu X, Liu B, et al. Interactive role of the toll-like receptor 4 and reactive oxygen species in LPS-induced microglia activation. *Glia.* 2005;52(1):78–84.
54. Smithson S, Moore SK, Provencio JJ. Systemic administration of LPS worsens delayed deterioration associated with vasospasm after subarachnoid hemorrhage through a myeloid cell-dependent mechanism. *Neurocrit Care.* 2012;16(2):327–34.
55. Wang YW, Zhou Q, Zhang X, Qian QQ, Xu JW, Ni PF, et al. Mild endoplasmic reticulum stress ameliorates lipopolysaccharide-induced neuroinflammation and cognitive impairment via regulation of microglial polarization. *J Neuroinflammation.* 2017;14(1):233.
56. Banks WA, Robinson SM. Minimal penetration of lipopolysaccharide across the murine blood-brain barrier. *Brain Behav Immun.* 2010;24(1):102–9.
57. Blecharz-Lang KG, Wagner J, Fries A, Nieminen-Kelha M, Rosner J, Schneider UC, et al. 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.
58. Spangenberg E, Severson PL, Hohsfield LA, Crasper J, Zhang J, Burton EA, et al. Sustained microglial depletion with CSF1R inhibitor impairs parenchymal plaque development in an Alzheimer's disease model. *Nat Commun.* 2019;10(1):3758.

### Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more [biomedcentral.com/submissions](https://biomedcentral.com/submissions)



## **Lebenslauf**

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

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

## **Publikationsliste**

**Rebecca Heinz**, Susan Brandenburg, Melina Nieminen-Kelhä, Irina Kremenetskaia, Philipp Boehm-Sturm, Peter Vajkoczy and Ulf C. Schneider

Microglia as target for anti-inflammatory approaches to prevent secondary brain injury after subarachnoid hemorrhage (SAH)

J Neuroinflammation, 2021 Jan 30;18(1):36

Impact Factor: 5,793

## Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei meinem Doktorvater Ulf Schneider bedanken. Ich weiß, dass es in Ihrer Position nicht immer einfach ist, eine experimentelle Doktorarbeit zu betreuen. Und dennoch hätte ich mir im Großen und Ganzen keine bessere Betreuung wünschen können. Vielen Dank für Ihre Unterstützung bei all meinen Ideen und danke für die Überlassung dieses faszinierenden Themas, das mir dabei geholfen hat, meine Begeisterung für die Forschung zu entdecken.

Außerdem danke ich Melina Nieminen-Kelhä, deine beeindruckenden Operations-Fähigkeiten an sämtlichen Mäuse-Körperteilen suchen ihresgleichen. Danke, dass du mich immer in meinen Ideen bestärkt hast, danke für die unzähligen Tees/Colas/Kekse und die lustigen Gespräche.

Ebenso möchte ich mich bei Susan Brandenburg bedanken. Es gibt in der Wissenschaft nichts Wichtigeres als das stete Hinterfragen und kritische Beleuchten der eigenen Ergebnisse. Das hast du mir beigebracht und ohne dich wäre diese Doktorarbeit nicht zustande gekommen.

Auch Irina Kremenetskaia und Sabine Seidlitz bin ich zu Dank verpflichtet, danke für eure Geduld, eure Expertise und eure aufbauenden Worte, egal zu welcher Gelegenheit.

Selbstverständlich danke ich auch meinen Mitdoktoranden für eine tolle Zeit innerhalb und außerhalb des Labors.

Zu guter Letzt danke ich all den wunderbaren Menschen in meinem Leben, die immer und bedingungslos für mich da sind, mir helfen, mich ertragen und ohne die ich niemals das Durchhaltevermögen und Selbstvertrauen gehabt hätte, diese Arbeit zu beenden.