

**Aus dem CharitéCentrum 15 Neurologie, Neurochirurgie und Psychiatrie
Klinik für Neurochirurgie mit Arbeitsbereich Pädiatrische Neurochirurgie**

eingereicht über

Freie Universität Berlin

Fachbereich Veterinärmedizin

Institut für Pharmakologie und Toxikologie

Titel der Arbeit:

**Die Rolle des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF) in Angiogenese und
Neurogenese mithilfe eines experimentellen Schlaganfall Maus-Modells**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Veterinärmedizin

an der

Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Clarissa Speer, geb. Ewald

Tierärztin aus Alsfeld, Deutschland

Berlin 2022

Journal-Nr.: 4178

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. Uwe Rösler

Erster Gutachter: Frau Prof. Dr. Heidrun Fink

Zweiter Gutachter: Herr Prof. Dr. Peter Vajkoczy

Dritter Gutachter: Frau Univ.-Prof. Dr. Johanna Plendl

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus): mice, animal models, laboratory animals, angiogenesis, cerebellum, growth factors, endothelium, blood vessels, polymerase chain reaction, magnetic resonance imaging, immunofluorescence

Tag der Promotion: 06.07.2022

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Der ischämische Schlaganfall	1
1.1.1. Epidemiologie	1
1.1.2. Pathophysiologie	3
1.1.3. Diagnose	6
1.1.4. Therapie	8
1.2. Das experimentelle Modell der distalen Okklusion der Arteria cerebri media	11
1.3. Angiogenese, Neurogenese und neurovaskuläre Nische	16
1.3.1. Angiogenese	16
1.3.2. Neurogenese	18
1.3.3. Neurovaskuläre Nische	21
1.4. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)	23
1.5. Zielstellung der Arbeit	26
1.6. Arbeitsprogramm	27
2. Material und Methoden	28
2.1. Material	28
2.1.1. Chemikalien, Medikamente und deren Hersteller	28
2.1.2. Geräte	29
2.1.3. Kits	29
2.1.4. Primer	30
2.1.5. Antikörper	30
2.1.6. Software	30
2.2. Methoden	32
2.2.1. Tiere und Tierhaltung	32
2.2.1.1. VEGF-GOF/LOF Mausmodell	32
2.2.2. Organentnahme und Aufbereitung	34
2.2.3. Isolation von RNA	34
2.2.4. Quantitative real-time PCR	35

2.2.5.	Permanente distale Okklusion der Arteria cerebri media	36
2.2.6.	Bildgebung mittels MRT und Auswertung der Läsionsgröße	40
2.2.7.	Immunfluoreszenz-Markierungen	41
2.2.8.	Histologische Auswertung	41
2.2.8.1.	Quantifizierung von Blutgefäßen und ihrer Dichtigkeit.....	41
2.2.8.2.	Quantifizierung der Proliferation	42
2.2.9.	Statistik	42
3.	Ergebnisse	43
3.1.	Charakterisierung der VEGF-Genexpression	43
3.2.	Magnetresonanztomographische Charakterisierung.....	45
3.3.	Immunhistochemische Charakterisierung.....	47
3.3.1.	Markierung des Cluster of Differentiation 31 und Desmin	48
3.3.2.	Markierung des Proteins Ki67.....	52
3.3.3.	Markierung des Ki67-Proteins mit dem Cluster of Differentiation 31	55
3.3.4.	Markierung neuronaler Nuklei und des Glial-Fibrillary-Acidic-Proteins.....	57
4.	Diskussion.....	59
4.1.	Der Einfluss von VEGF auf pathophysiologische Mechanismen bei zerebraler Ischämie	59
4.1.1.	Schlaganfallvolumen und Ödementwicklung.....	59
4.1.2.	Dichtigkeit der Blutgefäße und Angiogenese	61
4.1.3.	Neuronale Zellen	62
4.2.	Kritische Betrachtungen	64
4.3.	Ausblick.....	66
5.	Zusammenfassung.....	67
6.	Summary.....	69
7.	Literaturverzeichnis	71
8.	Danksagung.....	87
9.	Finanzierungsquellen	88
10.	Interessenskonflikte.....	88
11.	Selbstständigkeitserklärung.....	89

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1 Pathophysiologische Mechanismen bei zerebraler Ischämie.....	4
Abb. 1.2 Zeitliche Abfolge der pathophysiologischen Mechanismen bei zerebraler Ischämie	4
Abb. 1.3 Penumbra	5
Abb. 1.4 Zerebrale Blutversorgung.....	13
Abb. 1.5 Koagulation der distalen <i>Arteria cerebri media</i>	13
Abb. 1.6 HE-gefärbter Schnitt des Gehirns einer Maus nach distaler Okklusion der <i>Arteria cerebri media</i>	14
Abb. 1.7 Magnetresonanztomographie (MRT).....	14
Abb. 1.8 Time of flight (TOF) – Magnetresonanztomographie (MRT) Angiographie.....	15
Abb. 1.9 Mechanismen der Vaskulogenese und Angiogenese	17
Abb. 1.10 Adulte Neurogenese.....	19
Abb. 1.11 Neurovaskuläre Einheit	21
Abb. 1.12 VEGF im Nervensystem.....	25
Abb. 2.1 VEGF- GOF Maus-Modell	32
Abb. 2.2 VEGF- LOF Maus-Modell.....	33
Abb. 2.3 VEGF-Rezeptor.....	33
Abb. 2.4 Versuchsprotokoll VEGF-Messung.....	35
Abb. 2.5 dMCAO Hautinzision	37
Abb. 2.6 dMCAO Kraniotomie	37
Abb. 2.7 dMCAO Schädelöffnung.....	37
Abb. 2.8 dMCAO <i>Arteria cerebri media</i>	38
Abb. 2.9 dMCAO Koagulation.....	38
Abb. 2.10 dMCAO Verschluss.....	38
Abb. 2.11 Versuchsprotokoll.....	39
Abb. 3.1 VEGF-Expression gemessen mittels PCR (Zusammengefasste Daten ohne Berücksichtigung des Untersuchungszeitpunktes).....	43
Abb. 3.2 VEGF Genexpression gemessen mittels PCR (72 Stunden)	44
Abb. 3.3 VEGF-Expression gemessen mittels PCR (14 und 28 Tage).....	44
Abb. 3.4 MRT nach dMCAO.....	45
Abb. 3.5 Schlaganfallvolumen GOF.....	46
Abb. 3.6 Schlaganfallvolumen LOF	46
Abb. 3.7 Ödem nach Schlaganfall	47
Abb. 3.8 CD31/Desmin-Markierung.....	49
Abb. 3.9 CD31- Markierung.....	50
Abb. 3.10 CD31- Markierung.....	50

Abb. 3.11 Kolokalisation von CD31 mit Desmin (Perizytenbedeckung)	51
Abb. 3.12 Kolokalisation von CD31 mit Desmin (Perizytenbedeckung) Kortex und Striatum im Vergleich	52
Abb. 3.13 Ki67- Markierung	53
Abb. 3.14 Ki67- Markierung	53
Abb. 3.15 Ki67- Markierung Kortex.....	54
Abb. 3.16 Ki67- Markierung Striatum.....	54
Abb. 3.17 Ki67- Markierung Hippocampus	55
Abb. 3.18 Ki67/CD31- Markierung	56
Abb. 3.19 Konfokale Mikroskopie	57
Abb. 3.20 NeuN/GFAP- Markierung	58

Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin converting enzyme (Angiotensin-konvertierendes Enzym)
AMCA	Aminomethylcoumarin-Acetat
ANOVA	Einfaktorielle Varianzanalyse
ASS	Acetylsalizylsäure
BDNF	Brain derived neurotrophic factor (Neurotropher Faktor des Gehirns)
Ca ²⁺	Kalziumionen
CamKII α	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase type II alpha chain (Calcium/calmodulin abhängige Protein Kinase Typ II alpha Kette)
cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid (Komplementäre Desoxyribonukleinsäure)
CD31	Cluster of Differentation 31 (Thrombozyten-Endothelzellen- Adhäsionsmolekül (PECAM-1))
CT	Computertomographie
Cy3/Cy5	Cyanin-Farbstoff
DAPI	4´6-Diamidin-2-phenylindol
DGN	Deutsche Gesellschaft für Neurologie
dMCAO	Distal Middle Cerebral Artery Occlusion (Okklusion der distalen Arteria cerebri media)
DOAK	Direkte orale Antikoagulantien
ECASS III	European Cooperative Acute Stroke Study III (Europäische kooperative Studie des akuten Schlaganfalls III)
EKG	Elektrokardiografie
FDA	US Food and Drug Administration (US-amerikanische Zulassungsbehörde FDA)
FGF	Fibroblast growth factor (Fibroblasten-Wachstumsfaktor)
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FoV	Field of View (Gesichtsfeld)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFAP	Glial fibrillary acidic protein (saures Gliafaserprotein)
GOF	Gain of Function (Funktionsgewinn)
HIF 1	Hypoxia inducible factor 1 (Hypoxie-induzierbarer Faktor 1)
Ki67	Antigen Ki67
LOF	Loss of Function (Funktionsverlust)
MCA	Middle cerebral artery (Arteria cerebri media)
MCAO	Middle cerebral artery occlusion (Okklusion der Arteria cerebri media)

MRI (MRT)	Magnetic resonance imaging (Magnetresonanztomographie)
Na ⁺	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NeuN	Neuronal Nuclei (neuronale Zellkerne)
NGF	Nerve growth factor (Nerven-Wachstumsfaktor)
NO	Stickstoffmonoxid
NOAK	Neue orale Antikoagulantien
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase Kettenreaktion)
PDGF	Platelet derived growth factor (Thrombozytärer Wachstumsfaktor)
PLGF	Placental growth factor (Plazentärer Wachstumsfaktor)
RMS	Rostral migratory stream (Rostraler Migrationsstrom)
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
rt-PA	Recombinant tissue-type plasminogen activator (rekombinanter Gewebefibrinolyse-Aktivator)
SGZ	Subgranuläre Zone
STEMO	Stroke emergency mobiles (Schlaganfall-Notfall-Mobile)
SVZ	Subventrikuläre Zone
TE	Time to Echo (Echo-Zeit)
TIA	Transitorische ischämische Attacke
TR	Time to Repeat (Zeit zur Wiederholung)
tTA	Tetrazyklin-reguliertes Transaktivatorprotein
USD	US amerikanische Dollar
USP	United States Pharmacopeia
VEGF	Vascular endothelial growth factor (vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor)
VEGFR-1/R-2	Vascular endothelial growth factor Receptor-1/-2 (vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor Rezeptor 1/2)
WHO	World Health Organisation (Weltgesundheitsorganisation)

1. Einleitung

1.1. Der ischämische Schlaganfall

1.1.1. Epidemiologie

Der Schlaganfall stellt weltweit laut Daten der Weltgesundheitsorganisation (WHO) nach kardiovaskulären Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache dar. Im Jahr 2016 gingen laut WHO 10,02 % der weltweiten Todesfälle (5,78 Millionen) auf Schlaganfälle zurück (WHO, 2017). Sechzehn Jahre zuvor waren es noch 5,17 Millionen Todesfälle (WHO, 2018). Die Tendenz ist somit also steigend. Neben der hohen Mortalitätsrate führen Schlaganfälle bei 35-55 % der Betroffenen zu ausgeprägten und bleibenden Behinderungen (Winter *et al.*, 2008) und somit zur lebenslangen Abhängigkeit von Pflege, was neben dem individuellen Schicksal und negativen Folgen für das soziale Umfeld auch zu erheblichen Akut- sowie Langzeitbehandlungskosten führt. Allein in den USA erleiden jedes Jahr ca. 795.000 Menschen einen Schlaganfall. Daraus resultierend lagen 2010 die indirekten und direkten Kosten der Behandlungen bei 36,5 Milliarden USD (Go *et al.*, 2014).

In der Bundesrepublik Deutschland ist der Schlaganfall dritthäufigste Todesursache. Im Jahr 2017 gab es laut Gesundheitsberichterstattung des Bundes in Deutschland 504,76 Fälle von Schlaganfällen pro 100.000 Einwohner (Gesundheitsberichterstattung-Bund, 2019) Umgerechnet auf die Gesamteinwohnerzahl Deutschlands (Statistisches-Bundesamt, 2019) ergibt das eine Gesamtfallzahl von 417.902,67. Aus dieser Fallzahl errechnen sich allein in Deutschland jährliche Akutbehandlungskosten von 7,1 Milliarden Euro (Kolominsky-Rabas *et al.*, 2006) sowie jährliche Langzeitbehandlungskosten von ca. 3 Milliarden Euro (Winter *et al.*, 2008).

Am häufigsten treten Schlaganfälle im Alter ≥ 75 Jahren auf (European Registers of Stroke *et al.*, 2009, Zhang *et al.*, 2012). Männer zeigen eine erhöhte Mortalitätsrate und eine höhere altersspezifische Inzidenz einen Schlaganfall zu erleiden. Dennoch haben Frauen aufgrund einer höheren Lebenserwartung und einer erhöhten Schlaganfallinzidenz mit erhöhtem Alter häufiger einen Schlaganfall als Männer (Reeves *et al.*, 2008). Resultierend betrachtet werden die Kosten und auch die sozioökonomische Bedeutung der Erkrankung erwartungsgemäß aufgrund der stetig alternden Bevölkerung und dem direkten Zusammenhang von Schlaganfallinzidenz und Alter in den nächsten Jahrzehnten stetig ansteigen (Kolominsky-Rabas *et al.*, 2006, Moskowitz *et al.*, 2010, Wang *et al.*, 2015). Das Risiko einen Schlaganfall zu erleiden wird durch zehn Faktoren deutlich erhöht. Dazu

gehören Bluthochdruck, aktives Rauchen, ein erhöhter Taille-Hüft-Quotient, Diabetes mellitus, psychologischer Stress oder Depressionen, ein erhöhter Konsum von Alkohol, kardiologische Vorerkrankungen, das Fehlen physischer Aktivität, ein hohes Verhältnis von Apolipoprotein B zu A1 und eine ungesunde Ernährung (O'Donnell *et al.*, 2010).

Bei Haustieren, vor allem Hunden und Katzen, tritt ein Schlaganfall nur sehr selten auf. In bisherigen Studien werden nur Einzelfälle von meist postmortal diagnostizierten Tieren beschrieben und die aktuelle Häufigkeit der Erkrankung ist nicht bekannt (Bagley *et al.*, 1988, Swayne *et al.*, 1988, Berg *et al.*, 2003, Platt *et al.*, 2003, Cherubini *et al.*, 2007, Irwin *et al.*, 2007, Negrin *et al.*, 2009, Pretorius *et al.*, 2010). Doch durch die vermehrte Nutzung von Computertomographie (CT) und vor allem Magnetresonanztomographie (MRT) im Kleintierbereich werden immer mehr Fälle diagnostiziert (Garosi *et al.*, 2005a, Garosi *et al.*, 2006, Wessmann *et al.*, 2009).

Die menschlichen Risikofaktoren Diabetes mellitus, kardiologische Vorerkrankungen und Hypertension sind bei Haustieren ebenfalls vorhanden. Die Hypertension steht hier allerdings im Zusammenhang mit Hyperadrenokortizismus und chronischen Nierenerkrankungen (Garosi *et al.*, 2005a). Des Weiteren finden sich bei Hunden folgende Erkrankungen als Ursache für einen Schlaganfall: Emboli durch migrierende Parasiten wie *Dirofilaria immitis* und *Cuterebra*, Hyperthyreoidismus als weitere endokrine Erkrankung und metastatische Erkrankungen wie Neoplasien (Berg *et al.*, 2003, Garosi *et al.*, 2005b, Garosi, 2010, Hecht *et al.*, 2010). Im Gegensatz zum Menschen gibt es bei Haustieren keinen Zusammenhang zwischen der Häufigkeit von Schlaganfällen und dem Alter der Patienten (Garosi *et al.*, 2005a, Gredal *et al.*, 2013). Einer Studie von Garosi *et al.* (2005a) zufolge ist die Prädisposition einen Schlaganfall zu erleiden bei Cavalier King Charles Spaniels und Greyhounds erhöht.

Die akut auftretenden neurologischen Symptome sind meist unspezifisch und hängen von der Lokalisation und Größe der Läsion im Gehirn ab (Garosi *et al.*, 2005b, Wessmann *et al.*, 2009). Eine Therapie mit rekombinantem Gewebefibrinolyse-Aktivator (rt-PA) ist aufgrund des engen Zeitfensters der Anwendbarkeit und aufgrund des Risikos von intrakraniellen Blutungen für die Veterinärmedizin nicht möglich (Garosi, 2010).

Die Prognose kann den meisten Studien zufolge als mittel bis gut klassifiziert werden, da vor allem Hunde schon nach wenigen Wochen mit unterstützender Therapie symptomfrei sind oder sich die neurologischen Beschwerden deutlich verbessert haben (Garosi *et al.*, 2005a, Gredal *et al.*, 2013).

1.1.2. Pathophysiologie

Schlaganfälle lassen sich in ischämische und hämorrhagische Schlaganfälle unterteilen. Dabei sind 80-87 Prozent aller Schlaganfälle ischämischen und 13-20 % der vorkommenden Schlaganfälle hämorrhagischen Ursprungs (Donnan *et al.*, 2008, Davis *et al.*, 2012, Go *et al.*, 2014).

Ischämische Schlaganfälle werden durch eine transiente oder permanente Reduktion des Blutflusses im Gehirngewebe, durch embolische oder thrombotische Okklusion von zerebralen Arterien, verursacht (Dirnagl *et al.*, 1999, Kunz *et al.*, 2010). In den meisten Fällen sind die *Arteria cerebri media* (MCA) und das von ihr versorgte Gehirnareal betroffen (Bogousslavsky *et al.*, 1988, Kanemitsu *et al.*, 2002, Garosi *et al.*, 2006, Howells *et al.*, 2010, Engel *et al.*, 2011).

In der Kernregion des ischämischen Schlaganfalls ist der zerebrale Blutfluss um bis zu 80 % reduziert, was zu einer drastischen Energiebilanzabweichung mit nachfolgenden Schadenskaskaden, zu einem metabolischen Versagen und im Weiteren zu einer irreversiblen Gewebeschädigung sowie zum Zelltod führt (Amantea *et al.*, 2009). Als wichtigste Schadenskaskaden sind vor allem Exitotoxizität, oxidativer Stress und Peri-Infarkt-Depolarisation, gefolgt von apoptotischen und inflammatorischen Prozessen zu nennen, die in Abb. 1.1 dargestellt werden (Dirnagl *et al.*, 1999, Endres *et al.*, 2002, Kunz *et al.*, 2010). In Abb. 1.2 wird zudem die zeitliche Abfolge der pathologischen Mechanismen sowie auf der anderen Seite der Reparaturmechanismen dargestellt.

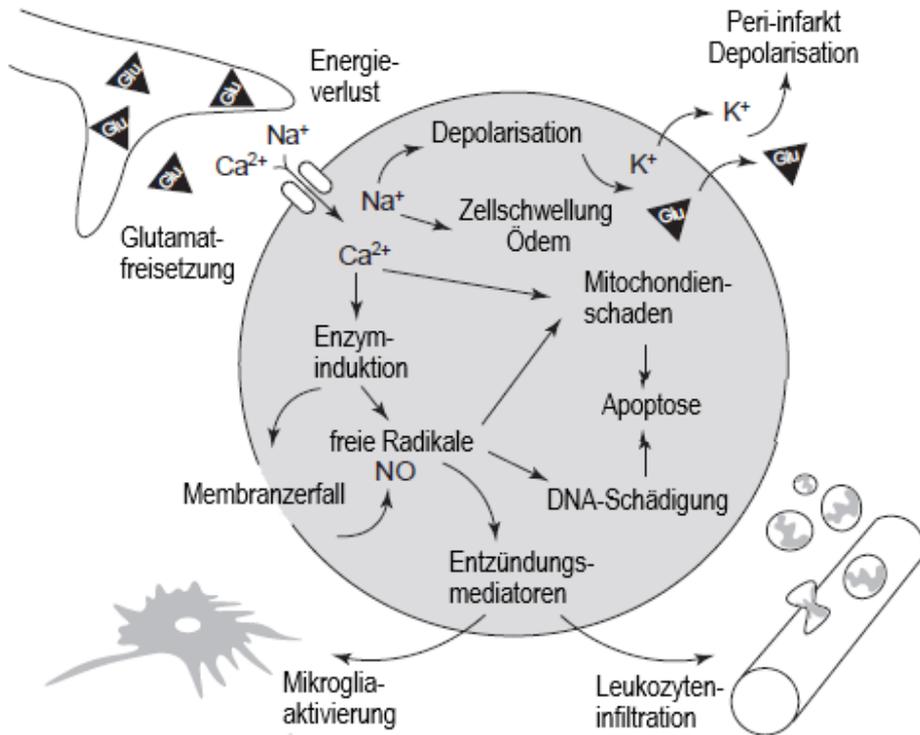


Abb. 1.1 Pathophysiologische Mechanismen bei zerebraler Ischämie

Vereinfachte Darstellung pathophysiologischer Mechanismen, die nach zerebraler Ischämie in neuronalen Zellen ablaufen. Durch einen gestörten Ionengradienten gelangen vermehrt Natriumionen (Na^+) in die Zelle. Diese führen zu einer Depolarisation und durch den entstehenden osmotischen Gradienten zu einer Zellschwellung. Eine Glutamatfreisetzung und Calciueinstrom (Ca^{2+}) führen durch eine vermehrte Enzymaktivität zur Bildung freier Radikale wie Stickstoffmonoxid (NO). Dadurch wird die Zellmembran sowie DNA und Mitochondrien geschädigt, was zur Apoptose der Zelle führt. Es werden vermehrt Entzündungsmediatoren aktiviert, über die eine Entzündungsreaktion ausgelöst wird. Abbildung nach Dirnagl *et al.* (1999).

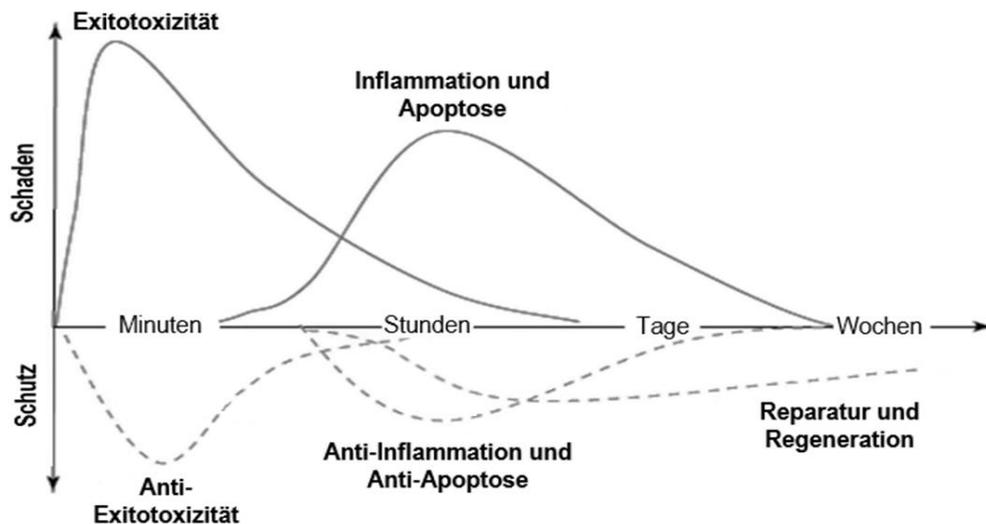


Abb. 1.2 Zeitliche Abfolge der pathophysiologischen Mechanismen bei zerebraler Ischämie

Vereinfachte Darstellung der zeitlichen Abfolge pathologischer Mechanismen nach zerebraler Ischämie nach Dirnagl *et al.* (2003).

Die Kernregion, in der ein vollständiger Untergang von Neuronen und Gliazellen zu beobachten ist, wird von der sogenannten Penumbra (griechisch: Halbmond) umgeben, in der der zerebrale Blutfluss durch kollaterale Versorgung aus Kapillaren weniger reduziert ist (Kuraoka *et al.*, 2009). Die neuronale Funktion ist dort zwar relevant beeinträchtigt, die zelluläre Struktur aber noch intakt. Das Gewebe dieser Zone kann durch eine Wiederherstellung des Blutflusses gerettet werden und ist deshalb das Ziel therapeutischer Ansätze, insbesondere rekanalisierender Interventionen (Kernie *et al.*, 2010). Je länger die Ischämie allerdings anhält, desto mehr zur Penumbra zählendes Gewebe kann in den Infarktkern mit übergehen (Hakim, 1998, Small *et al.*, 2000, Kunz *et al.*, 2010). Die Abb. 1.3 zeigt eine schematische Darstellung der pathologischen Mechanismen in der Penumbra nach einer fokalen zerebralen Ischämie.

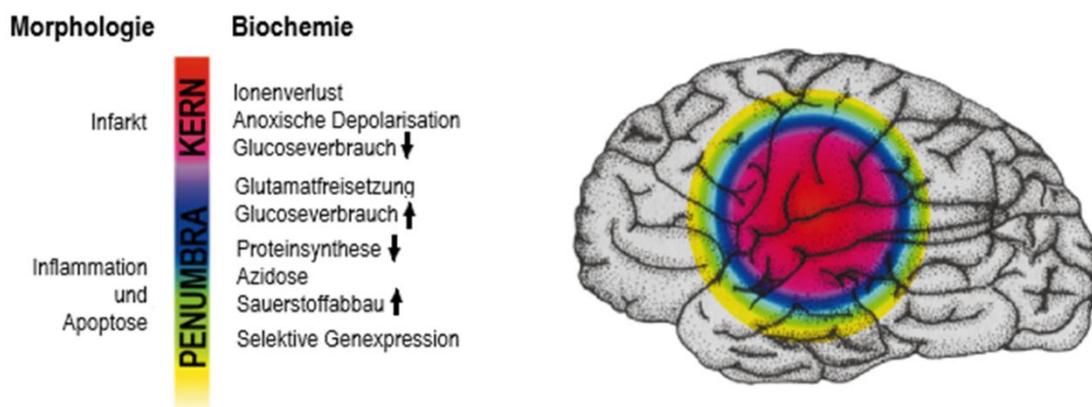


Abb. 1.3 Penumbra

Schematische Darstellung pathophysiologischer Mechanismen nach fokaler zerebraler Ischämie im Infarktkern und der umliegenden Penumbra. Abbildung adaptiert nach Dirnagl *et al.* (1999).

Zu klinisch apparenten, neurologischen Ausfällen kommt es, wenn die Ischämie und die daraus hervorgehende Schädigung des Gewebes ein kritisches Ausmaß erreichen. Persistieren diese neurologischen Symptome nicht länger als 24 Stunden und sind innerhalb dieser Zeit vollständig regredient, so definiert man dies als transitorische ischämische Attacke (TIA). Da jedoch auch innerhalb der ersten 24 Stunden schon erhebliche zelluläre Schäden auftreten können, wurde zusätzlich festgelegt, dass bei einer TIA keine Zeichen einer akuten Läsion in der Magnetresonanztomographie (MRT) sichtbar sein dürfen. Andernfalls spricht man von einem ischämischen Schlaganfall bzw. manifestem Infarkt (Easton *et al.*, 2009). Der Begriff Apoplex ist inzwischen obsolet. Nach einer TIA mit MR-morphologisch nachweisbarer Läsion ist das Risiko einen manifesten Schlaganfall mit permanenter neurologischer Symptomatik zu erleiden deutlich erhöht (Giles *et al.*, 2011).

1.1.3. Diagnose

Der Leitfaden der American Stroke Association sowie der Deutschen Gesellschaft für Neurologie (DGN) sieht den Schlaganfall immer als medizinischen Notfall, der so schnell wie möglich behandelt werden muss. Eine Stabilisierung der Vitalfunktionen des Patienten mit schneller Diagnosestellung und Therapieeinleitung innerhalb der ersten 60 Minuten nach Einlieferung des Patienten wird empfohlen (Jauch *et al.*, 2013). Neben der klinischen Diagnostik mit kompletter neurologischer Untersuchung, Elektrokardiografie (EKG) und labortechnischen Untersuchungen wie Blutbild, Glucose, Elektrolyte, Blutsenkungsgeschwindigkeit, Nierenwerte wie Harnstoff und Kreatinin, Gerinnungswerte wie die Prothrombinzeit und partielle Thromboplastinzeit zur Bestimmung der Ursache und Lokalisation des Schlaganfalls bei Patienten mit akuter Symptomatik, spielen insbesondere die bildgebenden Verfahren bei der Diagnose und Planung der weiteren Therapie von Schlaganfällen die größte Rolle. Dazu gehört die Gehirn- sowie Gefäßdiagnostik mittels Tomographie. Außerdem sollte ein Thorax-Röntgenbild erstellt werden. Die Computertomographie (CT) ist nach wie vor weiter verbreitet und findet eine größere Anwendung als die MRT, obwohl diese in der Diagnostik von Schlaganfällen der CT überlegen ist (Davis *et al.*, 2012, Gonzalez, 2012).

Die CT war sehr lange die diagnostische Methode der Wahl, um einen hämorrhagischen Infarkt von einem ischämischen Infarkt zu differenzieren und die Entscheidung für oder gegen eine thrombolytische Therapie mit rekombinantem Gewebeplasminogen-Aktivator (rt-PA) zu treffen (Audebert *et al.*, 2015, Lovblad *et al.*, 2015). Zur Darstellung eines hämorrhagischen Infarkts ist die MRT allerdings genauso gut geeignet (Ciccione *et al.*, 2007). Zusätzlich ist die MRT, vor allem die Diffusions-gewichtete MRT, zur Detektion einer ischämischen Läsion in der frühen, hyperakuten Phase bis zu 24 Stunden nach Auftreten von Symptomen sensitiver als die CT, bei der diese Stadien schwer zu differenzieren sind (Brazzelli *et al.*, 2009, Hsia, 2009, Ledezma *et al.*, 2009, Wessmann *et al.*, 2009, Lovblad *et al.*, 2015).

Diffusions-gewichtete und Perfusions-gewichtete MRT und deren Ungleichgewicht („Mismatch“) spielen eine besonders wichtige Rolle, da diese die aktuelle Größe der Läsion und deren Differenzierung in Kern, der durch die Ischämie irreversibel geschädigt ist, und Penumbra, die Region mit Hypoperfusion welche das Ziel einer rekanalisierenden Intervention ist (Moon *et al.*, 2005, Slevin *et al.*, 2006), auch schon wenige Stunden nach Beginn des Schlaganfalls mit hoher Spezifität und Sensitivität darstellen. So kann festgestellt werden, ob eine akute Therapie zur Wiederherstellung des Blutflusses noch sinnvoll ist (Albers, 1999, Hsia, 2009, Moskowitz *et al.*, 2010, Gonzalez, 2012).

Die MRT ist allerdings durch höhere Kosten und eine geringere Verfügbarkeit der CT gegenüber benachteiligt (Kidwell *et al.*, 2010, Edlow, 2011). Der weitere Nachteil einer relativ langen Dauer der Bildanfertigung konnte in den letzten Jahren durch Einsatz neuerer MRT-Geräte und optimierter MRT-Sequenzen deutlich reduziert werden. Des Weiteren haben Studien gezeigt, dass die Wahl der Bildgebung (CT oder MRT) keinen signifikanten Unterschied im klinischen Resultat bewirkt (Veronel *et al.*, 2008, Hefzy *et al.*, 2013). Daher sollte immer die am schnellsten verfügbare und vom Personal am sichersten zu interpretierende Bildgebung bevorzugt werden, um die adäquate Behandlung von Schlaganfällen nicht zu verzögern (Ledezma *et al.*, 2009, Audebert *et al.*, 2015), denn das Hauptziel der Behandlung eines Schlaganfalls ist es, geschädigtes Gewebe vor einer irreversiblen Schädigung zu bewahren.

1.1.4. Therapie

Das Hauptaugenmerk bei der Therapie eines akuten ischämischen Schlaganfalls liegt auf der Beurteilung von neurologischen Symptomen in Zusammenhang mit den Vitalfunktionen des Patienten und der Einschätzung, ob eine Revaskularisierung des betroffenen Gefäßes und damit des betroffenen Hirnareals möglich und sinnvoll ist.

Die bisher einzigen durch Studien gefestigten und zugelassenen Therapien für den ischämischen Schlaganfall und zur Wiederherstellung des Blutflusses sind die Thrombolyse durch rt-PA und die mechanische endovaskuläre Thrombektomie (Hacke *et al.*, 2008, Moskowitz *et al.*, 2010, Bansal *et al.*, 2013). Erstere ist in den USA seit 1996 und in Europa seit 2002 für die intravenöse Anwendung innerhalb der ersten 3 Stunden nach Auftreten der ersten Symptome zugelassen (Wardlaw *et al.*, 2012). In Deutschland wird aufgrund von signifikanten Ergebnissen der *European Cooperative Acute Stroke Study III* (ECASS III) (Hacke *et al.*, 2008) ein Zeitfenster zur Behandlung mit rt-PA von 4,5 Stunden empfohlen (Ringleb *et al.*, 2015). Eine Verlängerung auf 6 Stunden wird diskutiert (Wardlaw *et al.*, 2012, Wardlaw *et al.*, 2014). In den USA wird die rt-PA nur bei ca. 5 % aller Schlaganfallpatienten genutzt, da es meist nicht möglich ist das enge Zeitfenster bei der erforderlichen engen Indikationsstellung, die notwendig sind, um intrakranielle Hämorrhagien auszuschließen, einzuhalten (California Acute Stroke Pilot Registry, 2005, Zhang *et al.*, 2009, Adeoye *et al.*, 2011). Alternativ zur Thrombolyse durch rt-PA wurden seit 1990 auch mechanische, endovaskuläre Rekanalisationsmethoden entwickelt und in Studien erprobt (Taqi *et al.*, 2012). In den ersten vorgeführten Studien 2013 konnte keine Überlegenheit dieser Methoden gegenüber der Standardtherapie mit rt-PA nachgewiesen werden (Hacke *et al.*, 2015). Doch durch neuere Rekanalisationsinstrumente und das Fokussieren auf sehr schwere Schlaganfälle, durch den Verschluss großer und proximal hirnversorgender Gefäße und deren Behandlung innerhalb von 6 Stunden nach Auftreten der ersten Symptome, konnte in mehreren Studien gezeigt werden, dass endovaskuläre Rekanalisationsmethoden, wie zum Beispiel die endovaskuläre Thrombektomie, in dieser Subgruppe ergänzend zur intravenösen Therapie mit rt-PA deutliche Vorzüge zeigen und eine signifikante Verbesserung der funktionellen Ergebnisse erbringen können. Deshalb ist sie seit kurzem durch die US Food and Drug Administration (FDA) als primäre Interventionsmaßnahme zugelassen. Ein Vergleich beider Therapien in alleiniger Anwendung ist aus ethischen Gründen nicht mehr möglich (Hacke *et al.*, 2015).

Neben der Akuttherapie ist die Schlaganfallprävention bei einer alternden Bevölkerungsstruktur und bei steigender Schlaganfallinzidenz ein enorm wichtiger Bereich. Zu unterscheiden sind die Primär- und die Sekundärprävention. Ziel der Primärprävention ist

es, dem Auftreten ischämischer Schlaganfälle bzw. einer TIA vorzubeugen. Im Fokus liegen dabei vor allem die Reduktion von Risikofaktoren wie kardiale Störungen, Hypertension, Nikotinabusus, Alkoholabusus, Adipositas, Diabetes und Hypercholesterinämie (Endres *et al.*, 2011). Die Sekundärprävention zielt darauf ab, nach einer stattgehabten TIA oder einem Schlaganfall das Auftreten eines erneuten Schlaganfalls zu verhindern (Donnan *et al.*, 2008, Diener *et al.*, 2010). Besonders hoch ist das Risiko eines Rezidivs nach einer vorangegangenen TIA innerhalb der ersten 90 Tage und am niedrigsten nach akuter, intensivmedizinischer Behandlung von Schlaganfallpatienten in speziellen, sogenannten *Stroke care units* (Giles *et al.*, 2007). Ferner zeigte sich in Studien eine signifikante Verringerung der Mortalität und Verbesserung der funktionellen Ergebnisse (Donnan *et al.*, 2008).

Zur Reduktion von Risikofaktoren in der akuten Sekundärprävention sind hauptsächlich drei Therapieansätze in Gebrauch, die bei fast allen Patienten anwendbar sind. Dazu gehören die Blutdrucksenkung mittels Hemmern des Angiotensin-konvertierenden Enzyms (ACE-Hemmer), Angiotensin-Rezeptor-Blockern und diuretischen Medikamenten, die Cholesterinreduktion mithilfe von Statinen sowie die Thrombozytenaggregationshemmung mit Acetylsalizylsäure (ASS), Clopidogrel und Dipyridamol (Easton, 2011, Davis *et al.*, 2012). Das Zeitfenster für die Medikation mit ASS liegt bei 48 Stunden nach den ersten Symptomen (Adams *et al.*, 2005, Donnan *et al.*, 2008). Bei Patienten mit Vorhofflimmern setzt man das antikoagulierende Medikament Warfarin ein und bei Stenosen der *Arteria Carotis* wird eine Revaskularisierung durch Endarteriektomie angestrebt (Sudlow, 2008, Davis *et al.*, 2012).

In Deutschland sind seit 2011 alternativ zu Warfarin die sogenannten neuen oralen Antikoagulantien (NOAK) oder auch direkte orale Antikoagulantien (DOAK) genannt zugelassen. Sie sind im Gegensatz zu Warfarin keine Vitamin K-Antagonisten, die die gesamte Gerinnungskaskade hemmen, sondern wirken spezifisch als Inhibitoren auf den Faktor Xa oder auf Thrombin (Faktor IIa). Da in Vergleichsstudien eine bessere Prävention von hämorrhagischen Schlaganfällen gezeigt wurde, werden NOAK aktuell bevorzugt verwendet (Kupper *et al.*, 2017).

Zusammenfassend ist zu sagen, dass der Schlaganfall von enormer epidemiologischer und sozioökonomischer Relevanz ist. Der Fokus therapeutischer Interventionen lag bisher vor allem auf der Beeinflussung der akuten Phase des Schlaganfalls und war somit auf ein sehr enges Zeitfenster begrenzt. Innerhalb der letzten Jahrzehnte wurden große Forschungsanstrengungen unternommen, doch trotz vieler neuer Erkenntnisse über die Pathophysiologie von Schlaganfällen stellen weiterhin die Thrombolyse mit rt-PA und die endovaskuläre Thrombektomie die einzigen in Studien gefestigten und zugelassenen Akuttherapien dar (Endres *et al.*, 2008). In Studien wurde versucht die Akuttherapie von

Schlaganfallpatienten durch sogenannte „Stroke emergency mobiles“ (STEMO) zu optimieren. Die Auswertungen zeigen, dass ein früher, prähospitaler Start der intravenösen Thrombolyse innerhalb der ersten Stunde nach einem akuten Schlaganfall zu deutlich besseren klinischen Ergebnissen führt als eine spätere Verabreichung (Ebinger *et al.*, 2014, Kunz *et al.*, 2016, Kunz *et al.*, 2017).

Um allerdings das Zeitfenster für Therapien zu vergrößern, verlagern aktuelle Forschungen den Fokus immer mehr auf das subakute und chronische Stadium des Schlaganfalls und dessen sogenannte neurorestorative Ereignisse wie zelluläre Mechanismen der Entzündung, Angiogenese und neuronale Regeneration sowie synaptische Plastizität (Chen *et al.*, 2006, Font *et al.*, 2010, Llovera *et al.*, 2014). Diese Forschungsanstrengungen sind ebenfalls immens wichtig, um die Diskrepanz zwischen der großen Bedeutung des ischämischen Schlaganfalls und den bisher sehr limitierten Therapieoptionen aufzulösen. Der Verlust der vaskulären Integrität stellt in der subakuten Phase nach Schlaganfall einen entscheidenden pathophysiologischen Prozess dar. Neuroprotektion und Regeneration durch Wiederherstellung und Stabilisierung der vaskulären Integrität stellen daher mit die vielversprechendsten Ansätze dar.

1.2. Das experimentelle Modell der distalen Okklusion der Arteria cerebri media

In der Schlaganfallforschung werden *in vitro* und *in vivo* Modelle gleichermaßen genutzt. Mit *in vitro* Modellen können zum Beispiel inflammatorische oder apoptotische Kaskaden in der Sauerstoff- bzw. Glukosedeprievation studiert werden. Für sehr viele Fragestellungen zum Thema Schlaganfall gibt es allerdings keine methodischen Alternativen zu tierexperimentellen *in vivo* Modellen. Zum Beispiel können mikrozirkulatorische und dynamische Aspekte nach Ischämie sowie die komplexen zeitlich und räumlichen Interaktionen verschiedener Zelltypen wie neuronaler und inflammatorischer Zellen oder auch vaskulärer Vorläuferzellen, die bei einer Ischämie zum Teil auch aus dem Knochenmark in das betroffene Areal einwandern, ausschließlich *in vivo* untersucht werden. *In vitro* Modelle können diese Aspekte lediglich in Teilen modellieren (Holloway *et al.*, 2016, Sommer, 2017). Darüber hinaus ist eine Langzeitbeobachtung zu Regeneration und klinischen Ergebnissen nach einem Schlaganfall, die für dieses Projekt wichtig ist, nicht möglich.

Forschungen mit *in vivo* Modellen sind daher vor allem dringend notwendig, um neue Therapien im Bereich des Schlaganfalls zu erforschen (Kuraoka *et al.*, 2009). Am häufigsten werden Ratten und Mäuse verwendet, da die Zucht, Haltung und Handhabung von Nagern einfach und kostengünstig ist und vor allem mit Mäusen eine Vielzahl von transgenen Modellen gezüchtet werden können (Krafft *et al.*, 2012). Weiterhin liegen eine Vielzahl von gut reproduzierbaren, funktionellen Modellen vor (Traystman, 2003).

Es gibt verschiedene Modelle, die entweder eine globale Ischämie oder fokale ischämische Schlaganfälle induzieren. Fokale Modelle erzeugen dem Menschen vergleichbare Schlaganfälle mit nekrotischer Kernregion, zu rettender Penumbra sowie normalem, unbeschädigtem Gewebe (Small *et al.*, 2000) und wurden aus diesem Grund für das beschriebene Projekt gewählt. Darüber hinaus gibt es permanente oder transiente Modelle (Howells *et al.*, 2010). Transiente Modelle ermöglichen zusätzlich die Studie der Reperfusion (Small *et al.*, 2000, Kuraoka *et al.*, 2009).

Das am häufigsten genutzte Schlaganfallmodell in der tierexperimentellen Forschung ist die proximale Okklusion der Arteria cerebri media (*middle cerebral artery occlusion*, MCAO), da diese, wie zuvor beschrieben, beim Menschen am häufigsten betroffen ist. In Abhängigkeit von der Ischämiedauer führt dieses Modell zu einem ischämischen Schlaganfall, der sowohl Kortex (Großhirnrinde) als auch Striatum (Teil der Basalganglien des Großhirns) betrifft (Engel *et al.*, 2011). Für Langzeitstudien ist dieses Modell allerdings schwierig anzuwenden, da eine erhöhte Mortalitätsrate verzeichnet wird.

Eine ebenfalls sehr häufig verwendete Methode ist die der permanenten Okklusion der *distalen Arteria cerebri media* (dMCAO), die in dieser Studie genutzt wurde. Die genannte Methode muss mittels einer Kraniotomie durchgeführt werden und resultiert in einer deutlich kleineren ischämischen Läsion ausschließlich in der Region des Kortex, da die Blutzufuhr erst distal der lentikulostriatalen Arterien unterbrochen wird (Engel *et al.*, 2011, Llovera *et al.*, 2014). Die Methode kann mittels verschiedener Techniken wie der Ligation (Crowell *et al.*, 1981, Chen *et al.*, 1986, Doyle *et al.*, 2014), der Elektrokoagulation (O'Brien *et al.*, 1973, Tamura *et al.*, 1981) oder der Photothrombose (Markgraf *et al.*, 1993, Defazio *et al.*, 2011) durchgeführt werden. Im bearbeiteten Projekt wurde die permanente Koagulation der distalen MCA benutzt. Die Abb. 1.4 und Abb. 1.5 verdeutlichen die zerebrale Gefäßversorgung und zeigen den Ort der Koagulation bei der dMCAO sowie die Darstellung der distalen *Arteria cerebri media* nach Durchführung der dMCAO. Die Abb. 1.6, Abb. 1.7 und Abb. 1.8 zeigen jeweils einen durch dMCAO entstandenen kortikalen Schlaganfall in verschiedenen darstellenden Verfahren.

Ein großer Vorteil der dMCAO ist, dass die Größe des Schlaganfalls in Korrelation zur Gehirngröße vergleichbar mit der durchschnittlichen Größe eines Schlaganfalls beim Menschen ist. Des Weiteren haben verschiedene Studien gezeigt, dass das Modell sehr gut zu reproduzieren ist und eine niedrige Mortalitätsrate mit sich bringt (Xi *et al.*, 2004, Kuraoka *et al.*, 2009). Auch deshalb ist das Modell gut geeignet, um Mittel- und Langzeitstudien zu Zelltod und Regeneration durchzuführen (Rosell *et al.*, 2013). Vorteilhaft ist auch eine sehr kurze Operationszeit von ca. 10-15 Minuten (Llovera *et al.*, 2014).

Eine ausführliche Beschreibung der dMCAO folgt im methodischen Teil.

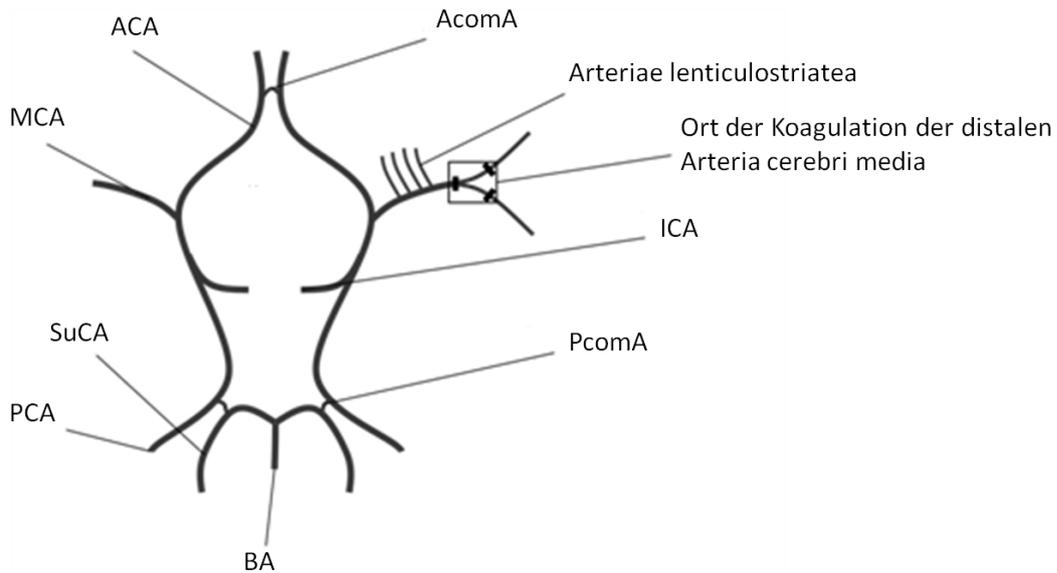


Abb. 1.4 Zerebrale Blutversorgung

Schematische Darstellung der zerebralen Blutversorgung (*Circulus arteriosus cerebri*) und Ort der Koagulation der *distalen Arteria cerebri media* (MCA).

(BA- Arteria basilaris, PCA- Arteria cerebri posterior, SuCA- Arteria superior cerebelli, ACA- Arteria cerebri anterior, AcomA- anteriore kommunizierende Arterie, ICA- Arteria carotis interna, PcomA- posteriore kommunizierende Arterien) nach Llovera *et al.* (2014).

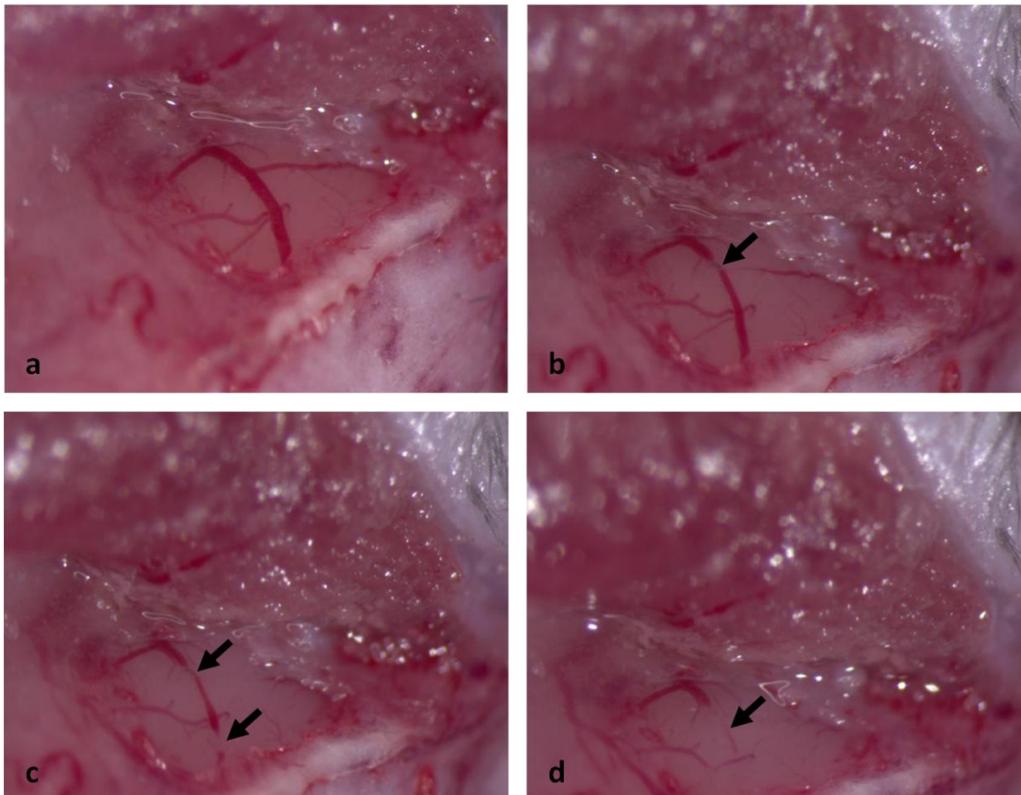


Abb. 1.5 Koagulation der distalen Arteria cerebri media

a Darstellung der Arteria cerebri media nach Eröffnung der Schädelkalotte durch Kraniektomie

b Der Pfeil markiert die erste Koagulation bei distaler Okklusion der Arteria cerebri media

c Darstellung der Arteria cerebri media nach 2. Koagulation bei distaler MCAO

d Darstellung der Arteria cerebri media nach vollständiger Koagulation

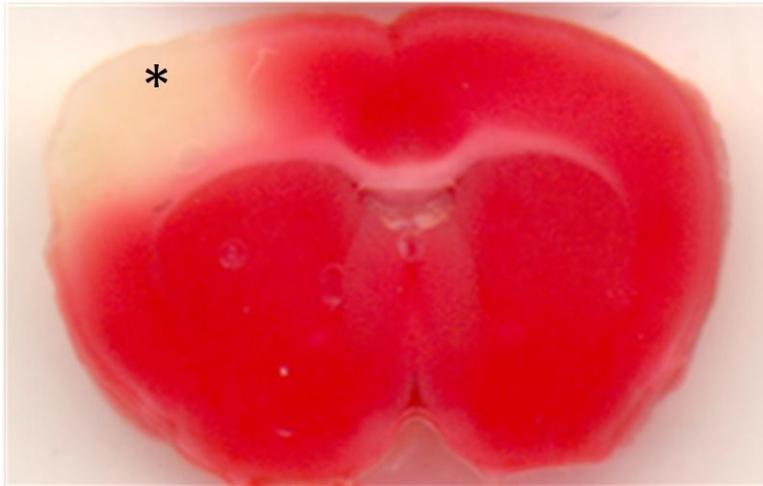


Abb. 1.6 HE-gefärbter Schnitt des Gehirns einer Maus nach distaler Okklusion der *Arteria cerebri media*
Kortikaler Schlaganfall (*), die linke Hemisphäre betreffend.

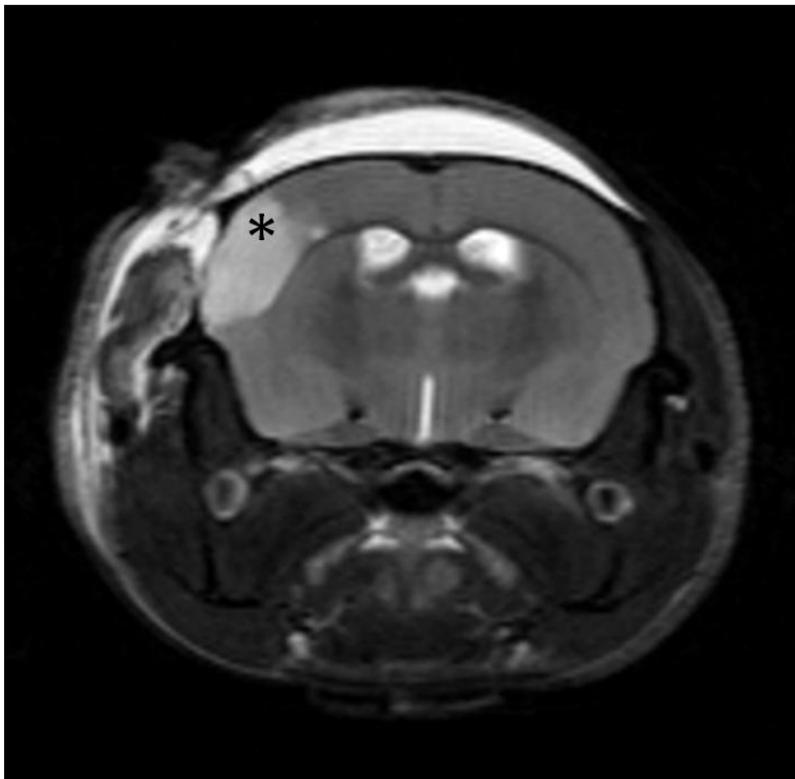


Abb. 1.7 Magnetresonanztomographie (MRT)
Exemplarische Abbildung einer T2 gewichteten MRT-Aufnahme eines durch distale Okklusion der *Arteria cerebri media* hervorgerufenen kortikalen Schlaganfalls im Mausmodell. Die ischämische Läsion stellt sich als T2-Hyperintensität gut abgrenzbar dar (*).



Abb. 1.8 Time of flight (TOF) – Magnetresonanztomographie (MRT) Angiographie

Abbildung einer 3D-*Time of flight* MRT Angiographie. Der Pfeil markiert das Areal des durch distale Okklusion der *Arteria cerebri media* hervorgerufenen kortikalen Schlaganfalls. Der okkludierte Ast der distalen *Arteria cerebri media* stellt sich im Vergleich zur kontralateralen Seite nicht dar.

1.3. Angiogenese, Neurogenese und neurovaskuläre Nische

1.3.1. Angiogenese

Die Versorgung des Gehirns erfolgt maßgeblich über ein großes Gefäßnetz, das sich ständig durch Angiogenese und weniger durch Vaskulogenese erneuert (Greenberg *et al.*, 2005). Die Angiogenese, bei der Kapillaren durch Sprossung und Spaltung aus bereits vorhandenen Blutgefäßen entstehen, ist von der Vaskulogenese zu unterscheiden, bei der neue Blutgefäße aus sich zu endothelialen Zellen differenzierenden Angioblasten (Endothel-Vorläuferzellen) gebildet werden (Harrigan, 2003, Greenberg *et al.*, 2005; Abb. 1.9). Zusammen mit rekrutierten Perizyten und glatten Muskelzellen zur Stabilisierung neu gebildeter Gefäße entsteht erst durch die Angiogenese ein funktionales Netzwerk (Risau, 1997, Bergers *et al.*, 2005, Carmeliet *et al.*, 2011).

Die Angiogenese wird hauptsächlich durch den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (*vascular-endothelial-growth-factor*, VEGF) und seine Rezeptoren reguliert (Hermann *et al.*, 2009). Genauere Erläuterungen dazu befinden sich unter Punkt 1.4.

Ischämische Ereignisse wie der Schlaganfall führen durch Hypoxie und Stickoxid zu einer Hochregulierung und vermehrten Ausschüttung von VEGF sowie anderen angiogenen Faktoren wie dem fibroblast growth factor (FGF) und dem platelet-derived growth factor (PDGF) aus Neuronen und Astrozyten bereits 1 Stunde nach einem Insult (Wei *et al.*, 2001, Hayashi *et al.*, 2003). Dies führt zu einer erhöhten Proliferation von den Schlaganfall umgebenden Endothelzellen bereits 12-24 Stunden später (Beck *et al.*, 2009). In der subventrikulären Zone (SVZ) wird die Proliferation in den ersten 14 Tagen um bis zu 13 % gesteigert (Zhang *et al.*, 2014). Dies führt zu einer vermehrten Neovaskularisation und einer signifikant erhöhten Anzahl an Gefäßen bereits 3 Tage nach einem Insult (Marti *et al.*, 2000, Harrigan, 2003, Hayashi *et al.*, 2003). Nicht nur die Anzahl von Blutgefäßen steigt, sondern auch ihre Morphologie wird temporär geändert. So vergrößert sich zunächst das Lumen bereits vorhandener Blutgefäße und die Wanddicke verringert sich. Dies ermöglicht eine erhöhte Permeabilität, den Abbau extrazellulärer Matrix und somit eine erleichterte Migration aktivierter Endothelzellen, um mit Hilfe von Wegweiser-molekülen wie Netrin, Semaphorin und Ephrin neue Gefäße zu bilden und ein funktionelles Netzwerk zu bauen (Conway *et al.*, 2001, Carmeliet *et al.*, 2005, Karamysheva, 2008, Hermann *et al.*, 2009). Später nimmt so die Anzahl großlumiger Gefäße ab, aber die Anzahl kurzer, kleinlumiger Gefäße nimmt stark zu (Morris *et al.*, 2003). Das Ziel ist unter anderem, den kollateralen Blutfluss zu erhöhen (Wei *et al.*, 2001, Font *et al.*, 2010) und so das Gehirngewebe mit Sauerstoff und Nährstoffen zu versorgen, um es letztendlich vor Schäden zu bewahren bzw. die funktionelle

Wiederherstellung zu unterstützen (Beck *et al.*, 2009). Des Weiteren sollen inflammatorische Zellen schneller zum geschädigten Gehirngewebe transportiert werden, um die Regeneration zu unterstützen (Hermann *et al.*, 2009).

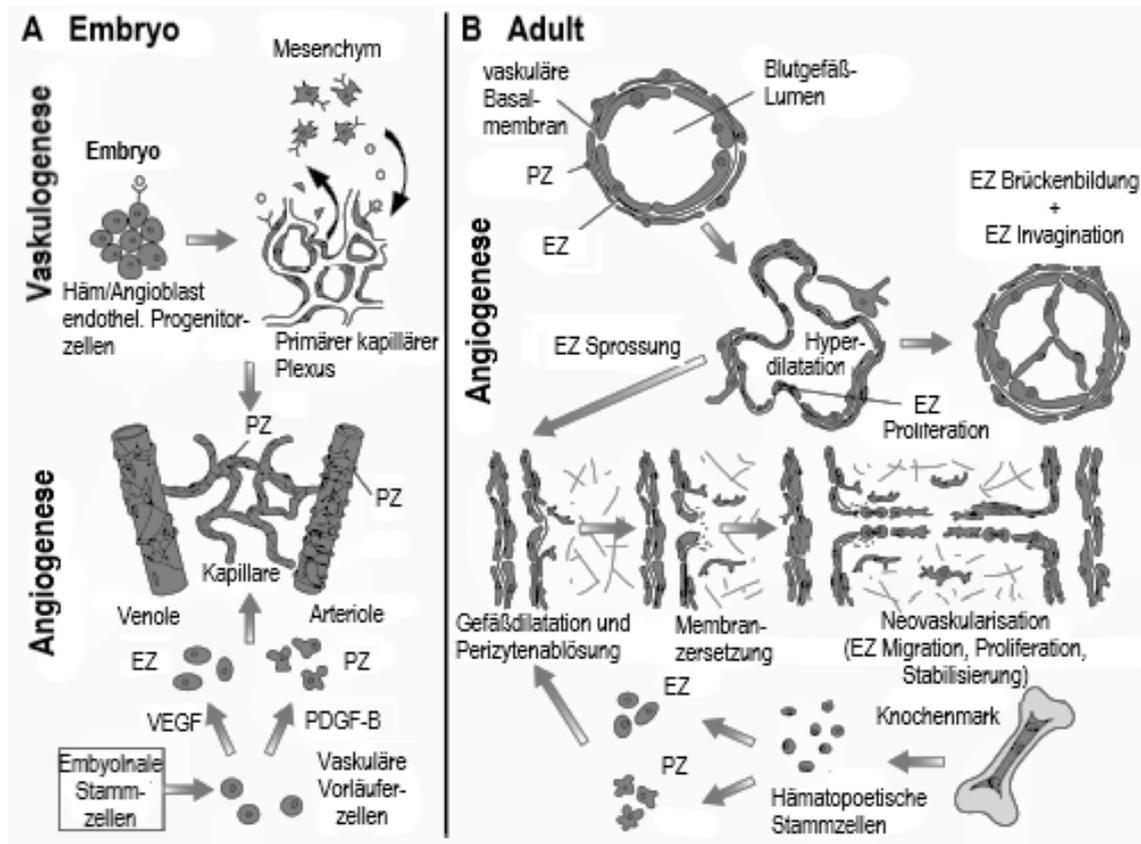


Abb. 1.9 Mechanismen der Vaskulogenese und Angiogenese

Vereinfachte Darstellung der Mechanismen bei der Bildung von Gefäßsystemen beim Embryo und Adulten adaptiert nach Bergers *et al.* (2005)

A: Endothelzellen (EZ) entstehen im Embryo, in Anwesenheit von VEGF (vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor), aus Angioblasten und Hämoblasten. Perizyten (PZ) werden in Anwesenheit von PDGF-B (thrombozytärer Wachstumsfaktor-B) aus mesenchymalen Stammzellen gebildet. EZ fügen sich zunächst zu einem primären kapillären Netzwerk zusammen (Vaskulogenese). Danach formen sie durch Sprossung und Verzweigung Gefäße, die durch PZ stabilisiert werden (Angiogenese).

B: Im Adulten werden neue Gefäße durch EZ- Brückenbildung, Invagination sowie Sprossung aus bereits existierenden Blutgefäßen gebildet. Dies geschieht durch Hyperdilatation der Gefäße, Perizytenablösung und nachfolgender Membranzersetzung. Begleitet werden diese Prozesse durch EZ- Proliferation und Migration einem angiogenen Stimulus entgegen. EZ und PZ können aus dem Knochenmark rekrutiert werden.

1.3.2. Neurogenese

Entgegen des bisherigen Standpunkts, dass im adulten Gehirn keine neuen Zellen gebildet werden können, weiß man heute, dass es auch im adulten Gehirn zwei Areale gibt, Stammzell-Nischen genannt, in denen lebenslang Neurogenese stattfindet. Das bedeutet, dass neue Neurone aus multipotenten, saures Gliafaserprotein (GFAP)-exprimierenden Vorläuferzellen gebildet werden können (Ohab *et al.*, 2006, Kernie *et al.*, 2010). Diese Areale sind die so genannte Subventrikuläre Zone (SVZ) und die Subgranuläre Zone (SGZ) im *Gyrus dentatus* des Hippocampus (Hermann *et al.*, 2012, Licht *et al.*, 2013, Bostrom *et al.*, 2014). Zellen aus diesen Stammzell-Nischen können als Antwort auf externe Reize, wie zum Beispiel Gewebeschäden, die Stammzellaktivität durch parakrine Signalweiterleitung über benachbarte Blutgefäße steuern (Licht *et al.*, 2015).

Neu gebildete Neurone aus der SVZ, sogenannte Neuroblasten, wandern in Ketten über den sogenannten „rostralen Migrationsstrom“ (RMS, Rostral migratory stream) bis in den *Bulbus olfactorius*, wo sie abgespalten werden und die Ausdifferenzierung zu Interneuronen erfolgt (Altman, 1969, Parent *et al.*, 2002, Lledo *et al.*, 2008, Licht *et al.*, 2013). Für die Migration dieser Zellen ist ein komplexes Netz aus parallel, von caudal nach rostral angeordneten Blutgefäßen essentiell wichtig (Licht *et al.*, 2015). Im Gegensatz dazu wandern Neuroblasten aus der SGZ lediglich in die Körnerzellschicht des *Gyrus dentatus*, wo sie sich zu funktionellen Neuronen weiterentwickeln (van Praag *et al.*, 2002, Kernie *et al.*, 2010). Beide Orte der adulten Neurogenese werden in Abb. 1.10 dargestellt. Auch in der SGZ zeigt sich durch eine erhöhte Neurogenese bei einer gleichzeitig vermehrten Neovaskularisation, dass das vorhandene Gefäßsystem eine entscheidende Rolle spielt (Licht *et al.*, 2015). Genau wie Neuronen und Astrozyten in der Angiogenese schütten Endothelzellen wichtige Wachstumsfaktoren wie den nerve growth factor (NGF), den brain derived neurotrophic factor (BDNF) und VEGF aus und schützen die Neuronen vor pathologischen Einflüssen, regen die Selbsterneuerung an und verlängern ihre Überlebensdauer (Zhang *et al.*, 2008, Hermann *et al.*, 2009).

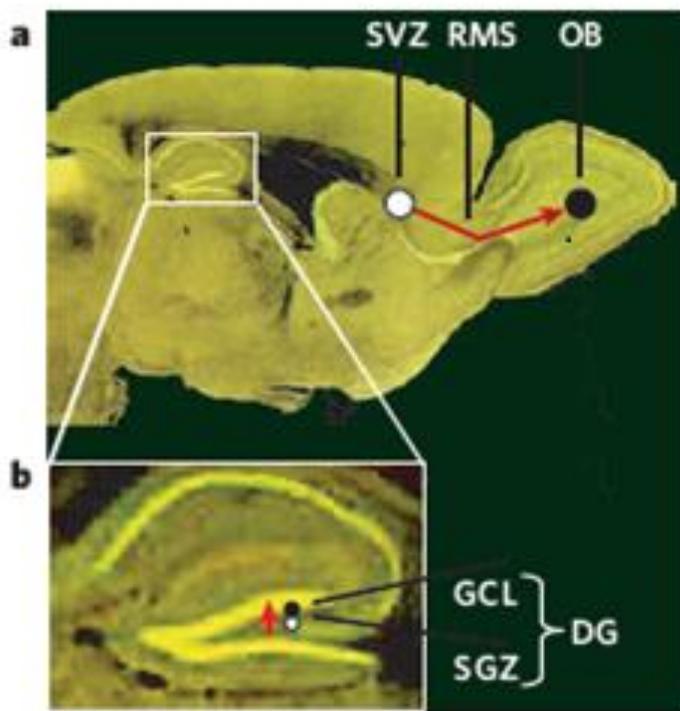


Abb. 1.10 Adulte Neurogenese

a Neurogenese in der subventrikulären Zone (SVZ) und Wanderung der Neuroblasten über den rostralen Migrationsstrom (RMS) bis in den *Bulbus olfactorius* (OB).

b Neurogenese im *Gyrus dentatus* (DG) und Wanderung der Neuroblasten aus der subgranuläre Zone (SGZ) in die Körnerzellschicht (GCL) (Greenberg *et al.*, 2005).

Neue Neurone der SGZ entwickeln sich in 6 Stadien zu reifen Körnerzellen. Aus GFAP- und Nestin-exprimierenden Stammzellen entwickeln sich zunächst proliferative Progenitorzellen, die sich schon 3 Tage später zu 2 verschiedenen Stadien postmitotischer neuronaler Vorläuferzellen entwickeln. Diese exprimieren überwiegend das Protein Doublecortin. Aus diesen Stadien entwickeln sich nach etwa 21 Tagen unreife, bereits NeuN-exprimierende Körnerzellen, die sich dann nach 28-30 Tagen zu reifen Körnerzellen ausdifferenzieren (Kernie *et al.*, 2010).

Hippokampale Neurone und die in der SGZ stattfindende Neurogenese scheinen laut Studien eine Rolle bei der Gedächtnisbildung und beim Lernen zu spielen (Gould *et al.*, 1999a, Wang *et al.*, 2005a). Bei intensiven Lernprozessen und vermehrter körperlicher Aktivität wird die neuronale Proliferation angeregt (van Praag *et al.*, 1999). Pathologische Ereignisse, wie zum Beispiel Ischämie oder Trauma, regen im Hippocampus und der SVZ ebenfalls die Proliferation, Neubildung und Migration von Neuronen in die von Ischämie betroffene Region an (Jin *et al.*, 2001, Arvidsson *et al.*, 2002, Parent *et al.*, 2002, Jin *et al.*, 2006, Macas *et al.*, 2006, Kernie *et al.*, 2010, Zhang *et al.*, 2014). Eine Studie von Thored *et al.* (2006), dass eine erhöhte Neurogeneserate nach Ischämie in der SVZ von Ratten nicht

nur kurzzeitig besteht, sondern über bis zu 4 Monate gleichbleibend erhalten bleibt. Ebenfalls haben mehrere Studien gezeigt, dass verschiedene Wachstumsfaktoren, wie zum Beispiel der fibroblast growth factor (FGF) die Neurogenese in der SVZ positiv beeinflussen (Zhang *et al.*, 2005, Kernie *et al.*, 2010). Einen gegenteiligen Effekt haben Stresshormone, wie Glukokortikoide, die die Proliferation im Hippocampus supprimieren (Gould *et al.*, 1999b, Palmer *et al.*, 2000, Gould *et al.*, 2002, Mirescu *et al.*, 2006, Licht *et al.*, 2015).

1.3.3. Neurovaskuläre Nische

Neuronale Stammzellen werden in neurogenen Arealen (Stammzell-Nischen) in Gruppen produziert und befinden sich in enger Nachbarschaft zu angiogenen Vorläuferzellen und Gefäßen. Daher nennt man diese neurogen aktiven Areale auch die neurovaskuläre Nische oder neurovaskuläre Einheit, zu der außer Neuronen und gefäßassoziierte Endothelzellen auch Perizyten, Astrozyten und Mikroglia gehören (Ohab *et al.*, 2006, Zlokovic, 2008, Hermann *et al.*, 2009, Tam *et al.*, 2010; Abb. 1.11). Dort gebildete Zellen autoregulieren ihre Erneuerung und Differenzierung (Palmer *et al.*, 2000, Tavazoie *et al.*, 2008, Bostrom *et al.*, 2014). Durch ein enges Zusammenspiel aller Zellen der neurovaskulären Nische wird eine optimale Kontrolle des Blutflusses und somit der Sauerstoff- und Nährstoffverteilung erreicht (Tam *et al.*, 2010).

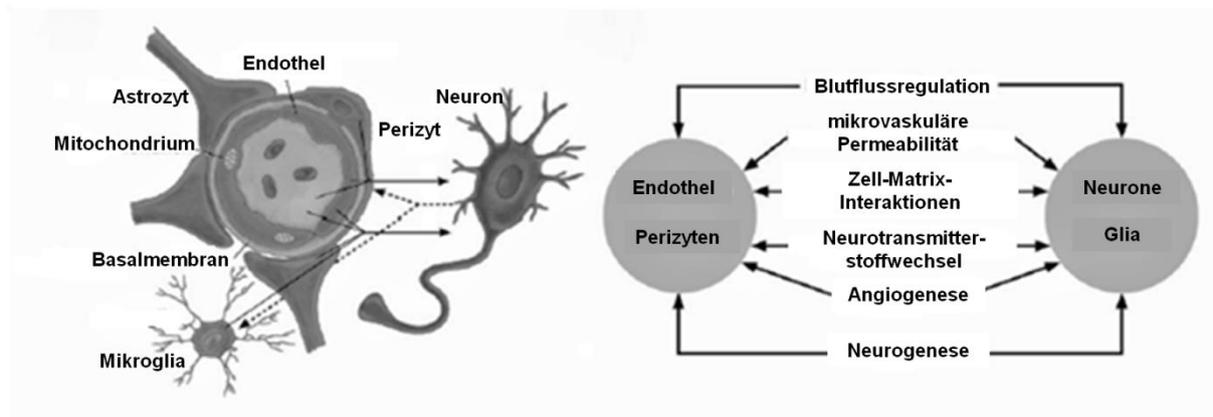


Abb. 1.11 Neurovaskuläre Einheit

Vereinfachte Darstellung des Zusammenspiels von gefäßassoziierten Endothelzellen, Perizyten, Astrozyten und Mikroglia nach Zlokovic (2008).

In beiden Nischen, sowohl der SGZ als auch der SVZ, sind sich teilende neuronale Stammzellen eng mit dem Gefäßnetz verbunden. Im Gegensatz zur SGZ, wo Angiogenese und Neurogenese parallel ablaufen (Palmer *et al.*, 2000), werden in der SVZ so gut wie keine neuen Endothelzellen gebildet. Dafür kontaktieren Stammzellen Blutgefäße in der SVZ direkt an Stellen, an denen keine Astrozytenkontakte oder Perizyten vorhanden sind, da eine direkte Signalweiterleitung aus der Blutbahn und von Endothelzellen maßgeblich die Neurogenese unterstützt (Tavazoie *et al.*, 2008).

Das vorhandene Gefäßsystem, welches aus Endothelzellen und Perizyten besteht, sorgt dabei für die notwendige Versorgung mit Nährstoffen, trophischen Faktoren und Matrixmolekülen. Darüber hinaus wird der Abtransport toxischer Moleküle, die Übernahme notwendiger enzymatischer Funktionen sowie die Expression vaskulärer Rezeptoren gewährleistet. Sowohl durch diese essentiellen Funktionen als auch durch Variabilität des

Blutflusses hat das Gefäßsystem einen direkten Einfluss auf die neuronale und synaptische Funktionalität, die Stammzellaktivität und die Neurogenese des Gehirns (Han *et al.*, 2005, Zlokovic, 2008, Font *et al.*, 2010, Villeda *et al.*, 2011, Licht *et al.*, 2015).

Angiogenese und Neurogenese laufen, wie bereits weiter oben erwähnt, zumindest in der SGZ parallel ab und formen das funktionelle Netzwerk aus Blutgefäßen und Neuronen. Beide Systeme könnten getrennt betrachtet werden. Neuere Erkenntnisse zeigen jedoch, dass Angiogenese und Neurogenese durch ähnliche Mechanismen reguliert werden und eng miteinander gekoppelt sind. Ihnen liegen ähnliche Signalwege zur Bildung und Wanderung neuer Zellen zugrunde. Darüber hinaus teilen sie die gleichen Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren (Palmer *et al.*, 2000, Zlokovic, 2008, Font *et al.*, 2010, Vissapragada *et al.*, 2014). Ein gut charakterisiertes Beispiel dafür ist der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor VEGF, der sowohl essentiell für die Angiogenese und die Überlebensdauer von Neuronen ist, als auch das Wachstum neuer Axone beeinflusst (Greenberg *et al.*, 2005, Hermann *et al.*, 2009).

Pathologische Ereignisse können die Angiogenese und Neurogenese sowohl induzieren als auch inhibieren (Bostrom *et al.*, 2014). Die Induktion von Angiogenese und somit die Bildung neuer, aktiver Blutgefäße spielt vor allem nach ischämischen Prozessen im Gehirn eine wichtige Rolle für die Versorgung des ischämischen Gewebes mit Sauerstoff und Nährstoffen. Ebenso ist sie durch die Ausschüttung von chemischen Lockstoffen aus aktivierten Endothelzellen (Schmidt *et al.*, 2009) wichtig für die Neurogenese und die Migration neuronaler Vorläuferzellen in geschädigte Gehirnregionen (Ohab *et al.*, 2006, Font *et al.*, 2010) und führt zu einer verbesserten Erholung der neuronalen Funktionalität (Zhang *et al.*, 2000, Beck *et al.*, 2009). Längere Überlebensraten von Schlaganfallpatienten korrelieren mit der Anzahl neu gebildeter Gefäße in der Penumbra (Krupinski *et al.*, 1994, Morris *et al.*, 2003). Eine Studie von Minger *et al.* (2007) zeigte, dass im menschlichen Gehirn Neurogenese zusammen mit Neovaskularisation und vermehrt VEGF-positive Zellen gezielt um das Gebiet eines Infarkts herum auftreten. Beide Prozesse werden also durch Hypoxie und VEGF vermehrt in Gang gesetzt (Carmichael, 2003).

1.4. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)

Die VEGF-Familie besteht beim Menschen aus fünf verschiedenen Homodimeren (Harrigan, 2003, Ma *et al.*, 2012). Zusammen mit anderen angiogenen Faktoren spielt vor allem der VEGF-A eine maßgebliche Rolle bei der Bildung und Funktion neuer Blutgefäße (Tammela *et al.*, 2005, Hermann *et al.*, 2009). Er reguliert auch die Migration, das Fortbestehen und die Proliferation von Endothelzellen (Gerhardt *et al.*, 2003, Carmeliet *et al.*, 2005, Karamysheva, 2008). Fehlt VEGF bei der embryonalen Entwicklung im RMS, führt dies zum Zusammenbruch des Gefäßsystems (Licht *et al.*, 2013). VEGF-A kommt beim Menschen in sechs verschiedenen Isoformen (121, 165, 189, 206, 145, 183) vor, bei Mäusen wurden mindestens drei Isoformen (120, 164 und 188, diese sind homolog zu 121,165 und 189 beim Menschen) isoliert. Zum Erlangen seiner Funktionalität ist die Bindung von VEGF-A unter anderem an die beiden Tyrosinkinase-Rezeptoren VEGFR-1 und VEGFR-2 (bei Mensch und Maus vorhanden), von denen VEGFR-2 die Angiogenese und Blutgefäßpermeabilität durch Signalübertragung an Endothelzellen stärker beeinflusst, entscheidend (Tammela *et al.*, 2005, Hermann *et al.*, 2009). In der hier beschriebenen Studie wurde das Augenmerk besonders auf die Funktion der VEGF-A Isoform-164 (im Folgenden als VEGF benannt) gelegt. VEGF wird im Gehirn, sowohl des Menschen als auch der Maus, vor allem von Endothelzellen, Astrozyten und mikroglialen Zellen exprimiert (Marti *et al.*, 2000, Reitmeir *et al.*, 2012, Licht *et al.*, 2013), wird aber nach pathologischen Ereignissen wie einem Schlaganfall auch an anderen Zellen des Gehirns, zum Beispiel Neuronen, hochreguliert (Stowe *et al.*, 2008, Beck *et al.*, 2009, Hermann *et al.*, 2009, Ma *et al.*, 2012). Der dazugehörige Rezeptor VEGFR-2 wird hauptsächlich in Endothelzellen der Gefäße sowie in Neuronen detektiert. Beim Vorliegen einer Ischämie wird VEGFR-2 in Glia- und Endothelzellen überexprimiert (Harrigan, 2003). Die angiogenetischen Effekte von VEGF wie die Proliferation, das Überleben und die Migration von Endothelzellen sowie die Beeinflussung von mikrovaskulärer Permeabilität werden hauptsächlich durch VEGFR-2 vermittelt. Versuche, bei welchen nach induziertem Schlaganfall der VEGFR-2 Signalweg und somit die Bindung an VEGF inhibiert wurde, zeigten deutlich größere Läsionen, einen vermehrten Zelltod, eine herabgesetzte Gefäßdichtigkeit sowie eine verminderte Proliferation von Endothelzellen (Bao *et al.*, 1999, Skold *et al.*, 2006, Shimotake *et al.*, 2010).

Beim Sprossen neuer Gefäße migrieren spezialisierte, an Gefäßspitzen lokalisierte Endothelzellen, die sog. Tip-Zellen, entlang eines VEGF-Gradienten, der die Richtung vorgibt. Tip-Zellen teilen sich nur wenig. Ihre Hauptaufgabe ist den Weg für andere Endothelzellen zu ebnet (Carmeliet *et al.*, 2005, Karamysheva, 2008). Die sogenannten Stalk-Zellen dagegen sind Endothelzellen, die hauptsächlich proliferieren. Die Proliferation

bzw. Migration beider Endothelzelltypen wird dabei durch die lokale VEGF-Konzentration gesteuert (Gerhardt *et al.*, 2003, Eichmann *et al.*, 2005, Tam *et al.*, 2010).

Induziert durch Hypoxie und den Transkriptionsfaktor HIF-1 (hypoxia-inducible-factor-1) wird VEGF nach einem ischämischen Schlaganfall vermehrt ausgeschüttet und induziert die Rekrutierung von Angioblasten aus dem Knochenmark und somit die Bildung neuer Gefäße (Marti *et al.*, 2000, Shimotake *et al.*, 2010, Liman *et al.*, 2012). Allerdings kann VEGF zwar die Angiogeneserate erhöhen aber nicht die Zeit verkürzen, die Blutgefäße zur Bildung brauchen (Wang *et al.*, 2005b). Dennoch haben experimentelle Arbeiten gezeigt, dass eine erhöhte Angiogeneserate und die dadurch erhöhte mikrovaskuläre Durchblutung durch eine späte Verabreichung von exogenem VEGF (48 Stunden nach Schlaganfall) eine deutlich schnellere neurologische Erholung und somit eine verbesserte Koordination sowie verbesserte kognitive und sensomotorische Fähigkeiten nach einem ischämischen Insult bewirken (Hermann *et al.*, 2009). Im Gegensatz dazu steht, dass in selbigen Studien auch nachteilige Effekte von VEGF festgestellt wurden. So führte die frühe Verabreichung von exogenem VEGF (innerhalb der ersten Stunde nach Schlaganfall) zu gesteigerten Läsionsgrößen, einer vermehrten Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke und einer verminderten Dichtigkeit von Blutgefäßen in der Penumbra, was das Entstehen von größeren Ödemen und inflammatorischen Prozessen nach einem Schlaganfall nach sich zieht (Zhang *et al.*, 2000, Sun *et al.*, 2003, Shimotake *et al.*, 2010). Der Vergleich verschiedener Studien zeigt, dass sowohl die oben genannten positiven als auch negativen Effekte von VEGF offensichtlich von der Applikationsroute, der Konzentration sowie vom Zeitpunkt der Applikation des endogenen VEGF abhängig sind (Hermann *et al.*, 2009).

Neuere Studien belegen, dass VEGF nicht nur maßgeblich die Angiogenese beeinflusst, sondern auch in der Neurogenese und in der Prävention neuronaler Schäden durch pathologische Ereignisse (Neuroprotektion) eine wichtige Rolle spielt (Greenberg *et al.*, 2005, Wang *et al.*, 2005b) und verdeutlichen, dass das Gehirngewebe auf pathologische Reize reagieren kann (Hermann *et al.*, 2009).

Es wurde gezeigt, dass nach einer durch VEGF induzierten vermehrten Neovaskularisation im *Gyrus dentatus* des *Hippocampus* und in der subventrikulären Zone gleichzeitig eine vermehrte Neurogenese stattfindet (Sun *et al.*, 2003, Licht *et al.*, 2011, Licht *et al.*, 2013). Zusätzlich beeinflusst VEGF das Überleben und die Neubildung von Neuronen, Astrozyten, funktionalen Axonen sowie die Aktivierung von neuronalen Vorläuferzellen. Es hat somit eine neuroprotektive Wirkung (Sondell *et al.*, 1999, Harrigan, 2003, Manoonkitiwongsa *et al.*, 2004, Greenberg *et al.*, 2005, Font *et al.*, 2010, Shimotake *et al.*, 2010, Ma *et al.*, 2012, Carmeliet *et al.*, 2013) und einen deutlichen positiven Effekt auf das Gedächtnis von Mäusen (Licht *et al.*, 2011). Mehrere Studien haben gezeigt, dass VEGF sowohl eine Reduktion der

Entzündungsreaktion als auch des ischämischen Infarkt volumens bewirkt (Hermann *et al.*, 2009, Reitmeir *et al.*, 2012, Zechariah *et al.*, 2013), in dem unter anderem Neurone, Astrozyten und Endothelzellen in der Penumbra deutlich hochreguliert werden (Issa *et al.*, 1999). Des Weiteren kann VEGF zusammen mit seinem Rezeptor VEGFR-2 Neurone des *Hippocampus* vor einer durch Glutamat induzierten Toxizität schützen (Matsuzaki *et al.*, 2001). Eine Zusammenfassung aller Wirkungen von VEGF im Nervensystem ist in Abb. 1.12 ersichtlich.

Aufgrund der Erkenntnisse über die Wirkung von VEGF aus bereits durchgeführten Studien, wird versucht sowohl das angiogenetische als auch das neuroprotektive Potential von VEGF zur Behandlung von neurodegenerativen Erkrankungen zu nutzen.

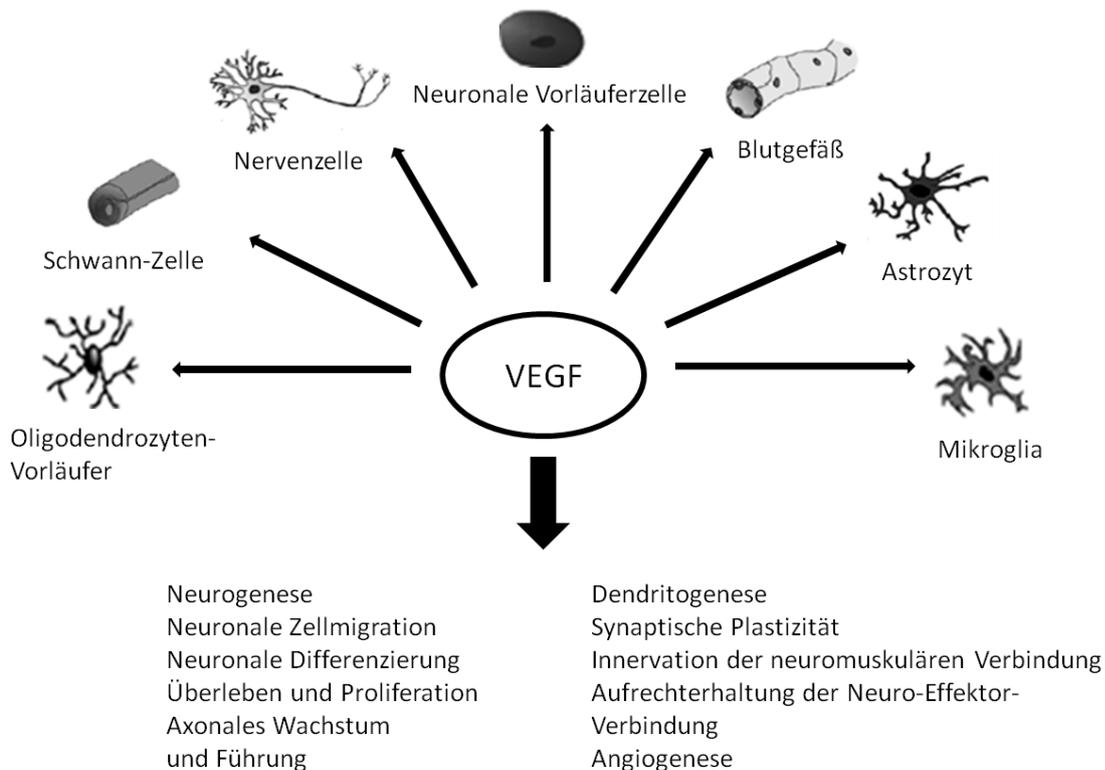


Abb. 1.12 VEGF im Nervensystem

Schematische Darstellung der verschiedenen Zelltypen im Nervensystem auf welche VEGF (vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor) einwirkt sowie eine Auflistung der Effekte von VEGF auf das Nervensystem nach Carmeliet *et al.* (2013).

1.5. Zielstellung der Arbeit

Jenseits rekanalisierender Maßnahmen sind jegliche Ansätze mit dem Ziel, in der Akutphase des Schlaganfalls medikamentös zu intervenieren, gescheitert. Daher konzentriert sich die Schlaganfallforschung zunehmend vor allem auf die subakute- und chronische Phase sowie die Regeneration nach einem Schlaganfall. Insbesondere die Schädigung der vaskulären Einheit stellt nach Schlaganfall einen entscheidenden Faktor dar. VEGF ist ein potenter proangiogener und neuroprotektiver Faktor. Jedoch wird beim Schlaganfall der Einfluss von VEGF, aufgrund der VEGF vermittelten Störung der Blut-Hirn-Schranke, dadurch gesteigerter Ödementwicklung und Inflammation sowie letztlich schlechterem Langzeitresultat, sehr ambivalent diskutiert. Sowohl der Zeitpunkt als auch die Route der VEGF Applikation scheinen hier eine entscheidende Rolle zu spielen.

Aus klinischer Sicht ist VEGF natürlich vor allem als Therapieansatz nach Schlaganfall hochinteressant, um in der subakuten- und chronischen Phase sekundäre neuronale Schäden zu reduzieren und die Regeneration zu unterstützen. Ziel der Arbeit war daher, die Wirkung von VEGF in der subakuten Phase auf das Schlaganfallvolumen und die Ödementwicklung sowie den Effekt auf die vaskuläre Umgestaltung in einem etablierten, experimentellen Schlaganfallmodell zu untersuchen.

1.6. Arbeitsprogramm

Methodisch wurde ein gut etabliertes distales MCAO-Modell genutzt (Llovera *et al.*, 2014). Ein bi-transgenes Mausmodell ermöglichte die konditionale und hirnspezifische VEGF Expression sogenannter *Gain of Function* (GOF) Tiere, sowie die Blockade von VEGF durch Expression eines Decoy-Receptors, sogenannter *Loss of Function* (LOF) Tiere (Licht *et al.*, 2011). In der Studie wurde VEGF in der subakuten Phase nach Schlaganfall induziert. Schlaganfallvolumen und Ödementwicklung wurden mittels MRT zum Zeitpunkt 24 h und 96 h distaler Okklusion der *Arteria cerebri media* bestimmt. Nach 14 bzw. 28 Tagen wurden die Versuchstiere getötet und die Gehirne zur weiteren histologischen Untersuchung entnommen. Mithilfe eines Kryotoms wurden histologische Schnitte angefertigt, die zur Darstellung von Blutgefäßen, Perizyten, Neuronen, proliferierenden Zellen sowie aktivierten Astrozyten mit verschiedenen Immunfluoreszenz-Färbungen behandelt wurden. Zur Quantifizierung der genannten Zellen wurden am Immunfluoreszenz-Mikroskop Bilder angefertigt und computergestützt ausgewertet.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien, Medikamente und deren Hersteller

<u>Chemikalie</u>	<u>Hersteller</u>
2-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich®, Darmstadt, Deutschland
Benuron Saft (Paracetamol)	Bene Arzneimittel GmbH, München, Deutschland
Casein (aus Kuhmilch)	Sigma Aldrich®™, Darmstadt, Deutschland
4'6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland
Esel-Serum	Jackson Immuno Research Laboratories, Inc. West Grove, Pennsylvania, USA
Gelatine	Sigma Aldrich®, Darmstadt, Deutschland
Isopentan (2-methylbutan)	Sigma Aldrich®, Darmstadt, Deutschland
Ketamin hydrochlorid	Bayer AG, Leverkusen, Deutschland
PBS Tabletten	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Rimadyl (Carprofen)	Zoetis Deutschland GmbH, Berlin, Deutschland
RNAse-freies Wasser	Qiagen®, Hilden, Deutschland
RNAseZAP®	Sigma Aldrich®, Darmstadt, Deutschland
Tetracyclin 500mg	Dr. August Wolff GmbH & Co. KG Arzneimittel, Bielefeld, Deutschland
Xylazin ®2 %	Pfizer, New York, USA
Xylocain Gel 2 %	AstraZeneca, Wedel, Deutschland

2.1.2. Geräte

<u>Gerät</u>	<u>Hersteller</u>
Axio Observer Z1 inverted immunofluorescence microscope	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Leica confocal microscope TCS SP5	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Mouse brain slicer matrix	Zivic Instruments, Pittsburgh, Pennsylvania, USA
Cryostat (HM560)	Microm GmbH, Neuss, Deutschland
MRT (7 Tesla)	Bruker Pharmascan, Billerica, Massachusetts, USA
Temperature control table (Wärmeplatte)	Medax GmbH & Co. KG, Neumünster, Deutschland
Operations-Mikroskop (Stemi 2000sc)	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland

2.1.3. Kits

<u>Kit</u>	<u>Hersteller</u>
RNeasy Mini Kit (50)	Qiagen, Hilden, Deutschland
SybR Premix Ex Taq	TaKaRa Bio Inc.; Kusatsu, Japan
Reverse Transcription Kit 205314	Qiagen, Hilden, Deutschland

2.1.4. Primer

VEGF 164	Forward Primer	5'-AACGATGAAGCCCTGGAGTG-3'
	Reverse Primer	5'-GACAAACAAATGCTTTCTCCG-3'
GAPDH	Forward Primer	5'-GGCCTTCCGTGTTCCCTACC-3'
	Reverse Primer	5'-AACCTGGTCCTCAGTGTAGCC-3'

2.1.5. Antikörper

<u>Antikörper</u>	<u>Wirtsspezies</u>	<u>Bezeichnung</u>	<u>Hersteller</u>	<u>Verdünnung</u>
Anti-CD31	Ratte monoklonal	550274	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA	1:50
Anti-Desmin	Kaninchen polyklonal	Ab-15200	Abcam, Cambridge, England	1:100
Anti-NeuN	Kaninchen polyklonal	ABN78	Millipore, Burlington, Massachusetts, USA	1:200
Anti-Ki67	Kaninchen monoklonal	RM-9106-S	Thermo Scientific, Walt- Ham, Massachusetts, USA	1:200
Anti-GFAP	Kaninchen polyklonal	ab48050	Abcam, Cambridge, England	1:1000
Anti-GFAP	Huhn polyklonal	ab4674	Abcam, Cambridge, England	1:1000

2.1.6. Software

Zur Auswertung von MRT-Bildern und Läsionsvolumetrie wurde das Programm Analyze 5.0 (AnalyzeDirect, Inc., Lenexa USA) genutzt.

Mithilfe des Programms ImageJ (NIH) bzw. Fiji.app wurden Immunfluoreszenzmikroskopie-Bilder analysiert.

Mittels der Software LCF AF von Leica Microsystems (Wetzlar, Germany) wurden Immunfluoreszenz-Bilder am konfokalen Mikroskop angefertigt.

Für Statistik und Graphen wurde das Programm Graphpad Prism 6.01 (GraphPad, San Diego, CA) verwendet.

Für die Messung von RNA-Konzentrationen wurde das Tecan-Lichtspektrometer mit integrierter i.control 1.11-Software genutzt.

Mithilfe des Programms ZEN 2 (Carl Zeiss) wurden am Operationsmikroskop gefertigte Fotos bearbeitet.

2.2. Methoden

2.2.1. Tiere und Tierhaltung

Alle Tierexperimente wurden vom Landesamt für Gesundheit und Soziales (LaGeSo) genehmigt und unter der Versuchsnummer G0298/13 bzw. T0159/09 sowie unter strenger Einhaltung von tierschutzrechtlichen Bestimmungen durchgeführt.

Für die Versuche wurden 46 bitransgene Bl6CamKII α tTA \cdot mVEGF/VEGFR2-FC *gain of function* (GOF) oder *loss of function* (LOF) Mäuse im Alter zwischen 12 und 20 Wochen verwendet. Siebenundvierzig einfach transgene Wurfgeschwister dienten als Kontrolltiere. Die Mäuse wurden von Prof. Dr. E. Keshet aus Jerusalem (Hebrew University) zur Verfügung gestellt und in den Forschungseinrichtungen für Experimentelle Medizin der Charité Berlin (FEM) gehalten und gezüchtet. Während der Versuchsperiode von bis zu 28 Tagen hatten alle Mäuse *ad libitum* Zugang zu Wasser und Futter und wurden in einer konstanten Umgebung, bei einer Temperatur von 22 °C, einer Luftfeuchtigkeit von ca. 50 % und einem Tag/Nacht-Rhythmus von 12 Stunden gehalten.

2.2.1.1. VEGF-GOF/LOF Mausmodell

Es handelt sich bei dem genutzten Bl6J.CamKII α -tTA \cdot mVEGF/VEGFR2-FC Mausmodell um ein doppelt-transgenes, durch Tetracyclin gesteuertes VEGF GOF- bzw. LOF-Modell (Licht *et al.*, 2011).

Für beide Mausmodelle wurde, um eine gezielte VEGF-Steuerung im Gehirn erreichen zu können, eine transgene Driver-Maus generiert, die ein Tetracyclin-reguliertes Transaktivator Protein (tTA) exprimiert, welches von einem CamKII α Promotor betrieben wird (Mayford *et al.*, 1996).

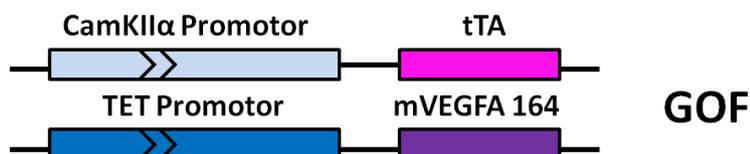


Abb. 2.1 VEGF- GOF Maus-Modell

Schematische Darstellung der Genmanipulation der Versuchstiere für das VEGF-GOF-Modell: Tetracyclin-reguliertes Transaktivator Protein (tTA) betrieben durch einen CamKII α Promotor gepaart mit einer Tetracyclin-abhängigen VEGF164 Responder-Linie

Für das GOF-Modell wurde diese Driver-Maus mit einer Tetracyclin-abhängigen VEGF164 Responder-Linie gepaart (Dor *et al.*, 2002).

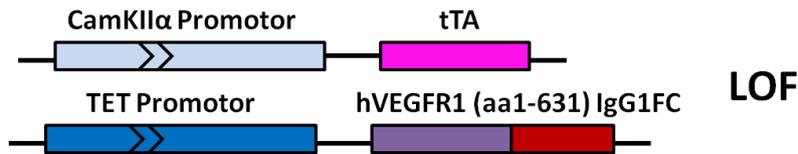


Abb. 2.2 VEGF- LOF Maus-Modell

Schematische Darstellung der Genmanipulation der Versuchstiere für das VEGF-LOF-Modell: Tetracyclin-reguliertes Transaktivator Protein (tTA) betrieben durch einen CamKII α Promotor, gepaart mit einer Tetracyclin-abhängigen VEGFR-1 Responder-Linie, welche die Bindung von VEGF-A, VEGF-B und PLGF an VEGF-Rezeptoren inhibiert.

Für das LOF-Modell wurde die genannte Driver-Maus mit einer Responder-Maus gepaart, deren Transgen ein Tetracyclin-abhängiges, chimäres Protein codiert, welches die VEGF-Rezeptor-Domäne VEGFR-1 beinhaltet. Dieser VEGFR-1 ähnliche Rezeptor wird vermehrt exprimiert und bindet an VEGF-A, VEGF-B und PLGF und verhindert deren Bindung an die eigentlichen VEGF-Rezeptoren und somit deren Signaltransduktion (Abb. 2.3) (May *et al.*, 2008).

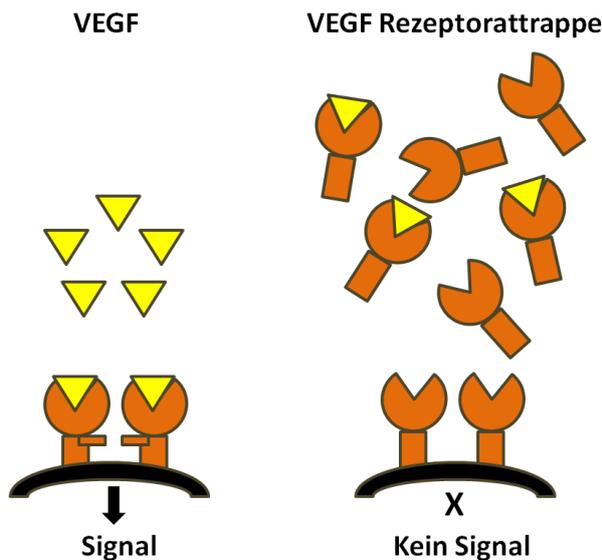


Abb. 2.3 VEGF-Rezeptor

Schematische Darstellung der Blockade der VEGF-Signalübertragung durch VEGF-R1.

Die Genotypisierung der gezüchteten Nachkommen dieser Paarungen erfolgte mittels Polymerase Kettenreaktion (PCR) und Mäuse mit nur einem der beiden Transgene dienten als Kontrolle. Die VEGF- Expression bei doppelt transgenen Nachkommen wurde durch die Gabe von Tetracyclin-haltigem Trinkwasser (500 mg Tetracyclin zusammen mit 40 g Zucker pro Liter Wasser) (off-Mode) oder reinem Leitungswasser (on-Mode) gesteuert. Die Wiederherstellung der normalen VEGF-Expression durch die Wiedereinführung von Tetracyclin-haltigem Wasser (on > off Mode) war dabei auch möglich (May *et al.*, 2008, Licht *et al.*, 2011).

2.2.2. Organentnahme und Aufbereitung

Für die Isolierung von RNA aus Gehirnmaterial und die anschließende Durchführung von quantitativer real-time-PCR wurden die Mäuse nach 3, 14 bzw. 28 Tagen ohne Tetracyclin-Zufuhr über das Trinkwasser (d.h. im „on“-Mode) zunächst durch eine *intraperitoneale* Injektionsnarkose mit Xylazin und Ketamin narkotisiert und dann mittels Dekapitation getötet. Nach der Dekapitation wurde die Schädeldecke vorsichtig entfernt und das Gehirn heraus präpariert. Anschließend musste mittels einer Mouse brain slicer matrix (Zivic Instruments, Pittsburgh, USA) das Kleinhirn entfernt und das restliche Gehirn in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C aufbewahrt werden.

Mäuse, welche zur Herstellung histologischer Schnitte gehalten wurden, wurden nach 14 bzw. 28 Tagen (ohne Tetracyclin-Zufuhr über das Trinkwasser) dahingegen *post operationem* nach Injektionsnarkotisierung zunächst durch eine *intrakardiale* Injektion von Phosphatpuffer (PBS) in die linke Herzkammer perfundiert. Erst danach konnten die Mäuse dekapitiert und das Gehirn aus der Schädelhöhle heraus präpariert werden. Die Gehirne wurden dann in auf Trockeneis gelagertem Isopentan (2-Methylbutan, Sigma-Aldrich) schockgefroren, danach in 2 %-ige Gelatine gebettet und mit einem Mikrotom (Cryostat HM560, Microm GmbH) in 20 µm dicke Koronarschnitte im Abstand von 60 bis 100 µm im Bereich der ischämischen Läsion geschnitten.

2.2.3. Isolation von RNA

Die in Stickstoff gefrorenen und bei -80 °C aufbewahrten Gehirne der an Tag 3, 14 bzw. 28 der Periode ohne Tetracyclin-Zufuhr dekapitierten Mäuse wurden nun mithilfe eines Mörsers in flüssigem Stickstoff pulverisiert. Die RNA-Isolierung erfolgte mithilfe des RNeasy Mini Kit (Qiagen) nach vorgegebenem Kit-Protokoll der Firma. Um eine Kontamination mit RNase zu vermeiden, mussten für alle Schritte entsprechend RNase-freie Eppendorf Reaktionsgefäße, Lösungen und Filterspitzen verwendet sowie alle Gegenstände und Oberflächen vor Arbeitsbeginn mit RNase-Inhibitor-Tüchern (RNase-Zap, Sigma Aldrich) gereinigt werden.

2.2.4. Quantitative real-time PCR

Die reverse Transkription von 1 µg RNA in cDNA wurde mittels QuantiTect Reverse Transcription Kit 205314 (Qiagen) nach Firmenprotokoll durchgeführt.

Für die quantitative real-time PCR kam das SybR Premix Ex Taq Kit (TaKaRa) ebenfalls nach dem Firmenprotokoll und mit dem 7900 fast real-time PCR System (Applied Biosystems) zum Einsatz. Zur relativen Quantifizierung der Genexpression von VEGF-A (Isoform 164) und des Referenzgens Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase (GAPDH) wurden die in Punkt 2.1.4. beschriebene Primer-Sequenzen verwendet.

Die PCR durchlief 45 Zyklen mit einer Annäherungs-Temperatur von 58 °C. Die Ergebnisse wurden als relative Expression im Vergleich zu den Kontrollen nach der „delta-delta-CT“ Methode dargestellt.

Insgesamt wurden 11 Mausgruppen (n=5) untersucht. Alle Mäuse mussten am Tag 0 von Tetracyclin-haltigem Wasser abgesetzt werden, wodurch die VEGF-Expression bei den VEGF-LOF-Mäusen ausgeschaltet und bei den VEGF-GOF-Mäusen angeschaltet wurde. Jeweils eine Gruppe LOF, GOF sowie Kontrolle wurde an Tag 3 dekapitiert und die ganzen Gehirne, jedoch ohne Cerebellum, als Material zur PCR-Untersuchung gewonnen. Für die Tage 14 und 28 wurde zusätzlich je eine eigene Kontrollgruppe für LOF und GOF verwendet und ebenso mittels quantitativer real-time PCR analysiert.

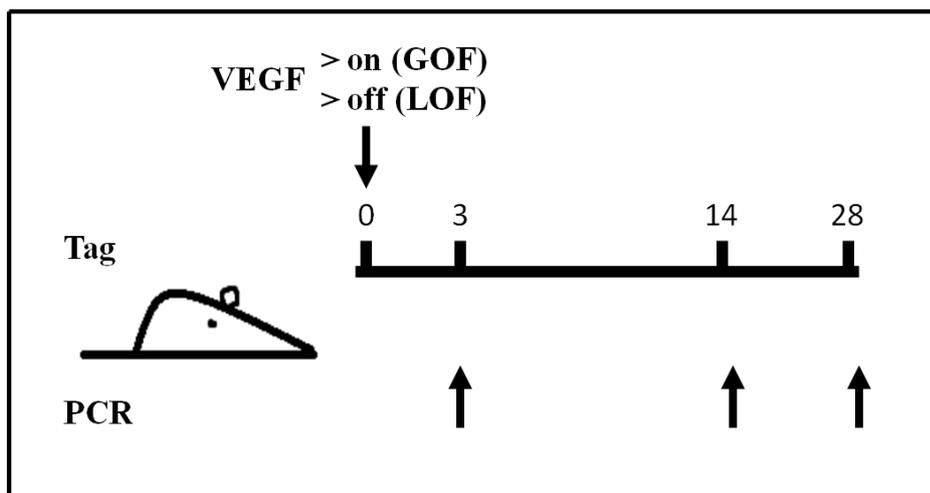


Abb. 2.4 Versuchsprotokoll VEGF-Messung

Schematische Darstellung über Entnahmezeitpunkt von Gehirnen zur VEGF-Messung mittels real-time PCR. Alle Mäuse wurden am Tag 0 von Tetracyclin abgesetzt und dann entweder an Tag 3, 14 oder 28 euthanasiert und die Gehirne entnommen.

2.2.5. Permanente distale Okklusion der Arteria cerebri media

Die permanente Elektrokoagulation der linken *Arteria cerebri media* (MCA) wurde wie in Llovera *et al.* (2014) beschrieben durchgeführt.

Die Anaesthesierung der Tiere erfolgte zunächst mit 2,0 % Isofluran (Forene, Abbot, Wiesbaden, Deutschland) in einer Sauerstoff-Stickstoff-Mischung (30/70 %) über eine konstant ventilierte Atemmaske. Zur Erhaltung der Anästhesie wurde das Isofluran auf 1,3-1,8 % reduziert.

Bepanthen-Augensalbe bedeckte die Augen der Mäuse während der Operation und hielt diese feucht.

Die Körpertemperatur wurde mithilfe eines Temperatur-Kontroll-Tisches (Medax, Germany) konstant gehalten.

Nach Einsetzen der Narkose wurden die Tiere in rechter Seitenlage unterhalb des OP-Mikroskops (Zeiss Stemi 2000sc) fixiert und das Operationsfeld am Kopf rasiert. Danach erfolgte eine etwa 1 cm lange Inzision der Kopfhaut zwischen dem äußeren Augenwinkel und dem Ohr, sodass der *Musculus temporalis* darunter zur Darstellung kam. Dieser wurde dann mittels einer bipolaren Elektrokoagulationspinzette bis auf ein kleines Stück abpräpariert und zur Seite gelegt. Als nächstes erfolgte unter ständiger Sichtkontrolle durch das Mikroskop und mithilfe eines Mikrobohrers unter wiederholtem Spülen mit NaCl 0,9 % eine Kraniotomie direkt oberhalb der Bifurkation der MCA bis man die noch vorhandene dünne Knochenschicht mit einer Pinzette entfernen konnte. Nach Identifikation der Bifurkation der MCA wurde diese distal und proximal der Bifurkation mit der Pinzette elektrokoaguliert. Nach 30 Sekunden erfolgte eine Kontrolle, in der die MCA auf spontane Rekanalisation kontrolliert und eventuell noch einmal verödet wurde. Danach wurde der temporale Muskel reponiert und nach einer Applikation des Lokalanästhetikums Lidocainhydrochlorid (Lidocain-Gel 2 %, AstraZeneca) auf die Wunde mit einem Einzelheft aus USP 4-0 nichtresorbierbarem Faden (Ethibond Excel, Ethicon) vernäht, ebenso die Kopfhaut.

Für das Schmerzmanagement wurde den Tieren während der Operation 5 mg/kg Carprofen (Rimadyl, Zoetis Deutschland GmbH) subcutan injiziert und *post operationem* erhielten sie 5 Tage lang 10 mg/kg Paracetamol (Benuron Saft, Bene Arzneimittel GmbH) über das Trinkwasser.

Die Tiere verblieben nach der Operation zur Beobachtung für mindestens 2 Stunden in Wärmekäfigen, bevor sie zurück in die Tierhaltungsräumlichkeiten verbracht wurden.

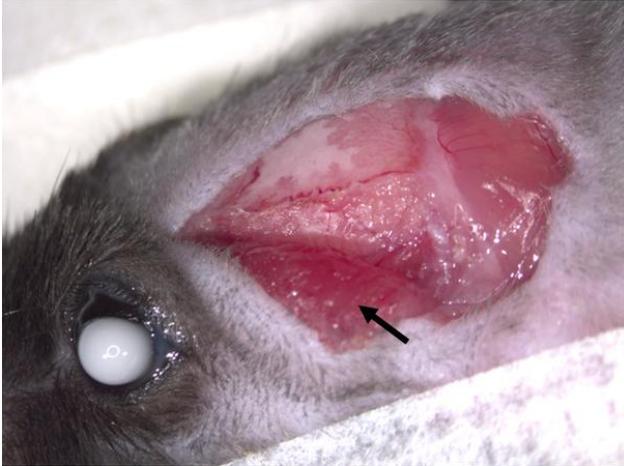


Abb. 2.5 dMCAO Hautinzision

Hautinzision zwischen Auge und Ohr und anschließende Entfernung des *Musculus temporalis* aus dem Operationsfeld.

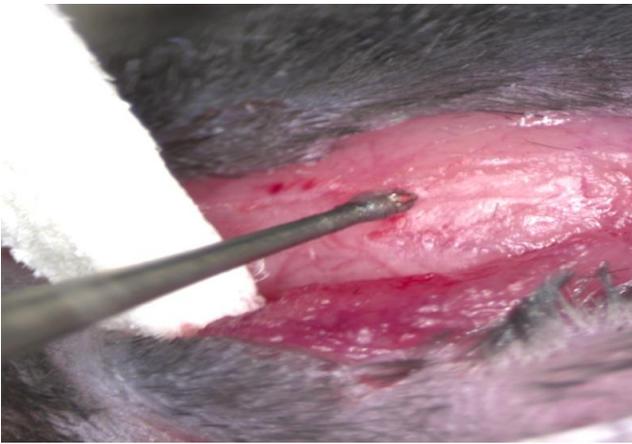


Abb. 2.6 dMCAO Kraniotomie

Kraniotomie (Ausdünnung der Schädelkalotte) mit Hilfe eines Mikrobohrers.



Abb. 2.7 dMCAO Schädelöffnung

Öffnen des cranialen Fensters oberhalb der *Arteria cerebri media*.

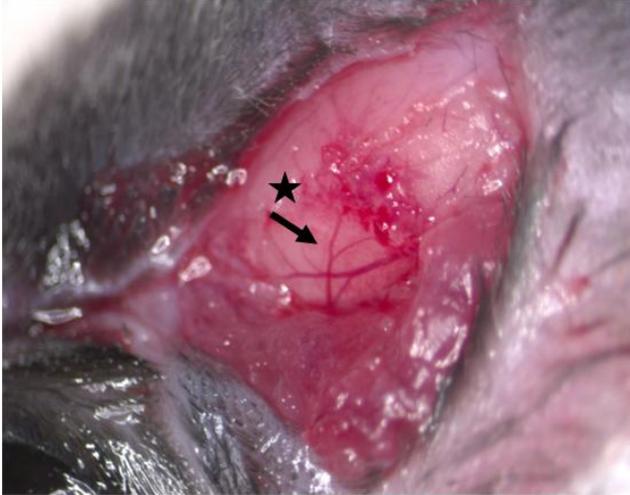


Abb. 2.8 dMCAO Arteria cerebri media
Ansicht der *Arteria cerebri media durch das craniale Fenster.



Abb. 2.9 dMCAO Koagulation
*Arteria cerebri media nach permanenter Koagulation.



Abb. 2.10 dMCAO Verschluss
Reposition und Fixation des temporalen Muskels mittels Einzelheftnaht.

Zur Durchführung des Versuchs kamen insgesamt 8 Gruppen (n=6) von Tieren zur Anwendung. Für die Gruppen LOF und GOF wurde dabei jeweils eine eigene Kontrollgruppe verwendet. Alle Tiere wurden am Tag 0 von Tetracyclin-haltigem Wasser abgesetzt und nach dem Protokoll der permanenten distalen MCAO operiert. Nach 24 Stunden und nach 96 Stunden *post operationem* erfolgte bei allen Tieren eine MRT-Bildgebung mit einer T2-Sequenz zum Nachweis und der Messung der Größe des Infarkts.

Nach 14 bzw. 28 Tagen wurden die Mäuse getötet und das Gehirn für immunhistochemische Untersuchungen gewonnen.

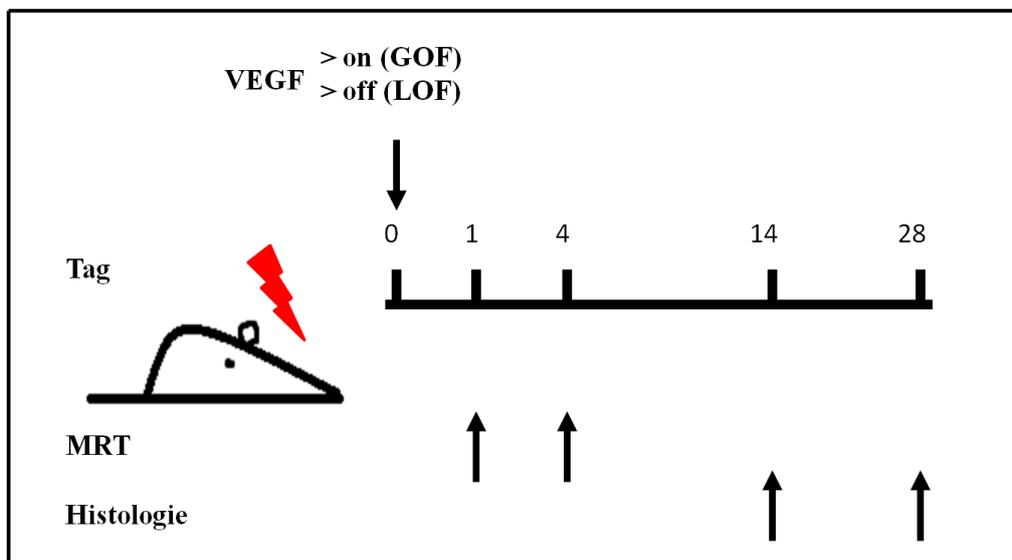


Abb. 2.11 Versuchsprotokoll

Alle Mäuse wurden am Tag 0 von Tetracyclin abgesetzt und es wurde eine permanente Okklusion der distalen *Arteria cerebri media* durchgeführt. Am Tag 1 und 4 *post operationem* erfolgten T2-MRT-Messungen des Gehirns. Die Mäuse wurden entweder an Tag 14 oder 28 *post operationem* dekapitiert und die Gehirne gewonnen.

2.2.6. Bildgebung mittels MRT und Auswertung der Läsionsgröße

Die operierten Mäuse wurden 24 h und 96 h *post operationem* mit einem 7Tesla Rodent/Kleintier Scanner (Pharmascan 70/16 AS, Bruker BioSpin, Ettlingen, Deutschland) untersucht. Die Messungen erfolgten mittels eines 9 cm abgeschirmten Gradienten mit einer H-Resonanz-Frequenz von 300 MHz, einer maximalen Gradientenstärke von 300 mT/m und einem Magneten von 16 cm Durchmesser. Zur Bildgebung wurde ein 1H-RF Quadratur-Volumen-Resonator (Bruker) mit einem inneren Durchmesser von 20 mm verwendet. Zur Erfassung von Daten und Verarbeitung von Bildern diente die Bruker Software Paravision 5.1.

Zur Anfertigung von Bildern fand die T2-gewichtete 2D turbo spin-echo Sequenz Anwendung.

Folgende Parameter wurden für diese eingestellt:

TR/TE = 4200/36 ms, Seltenheitsfaktor 8,4 Mittelwerte

32 koronale Schnitte mit einer Dicke von 0,5 mm; FoV (*field of view*) 2,56 x 2,56 cm und einer Matrix von 256 x 256

Während der Untersuchungen wurden die Mäuse mit 2,0 % Isofluran (Forene, Abbot, Wiesbaden, Deutschland) in einer Sauerstoff-Stickstoff-Mischung (30/70 %) über eine konstant ventilierte Atemmaske anästhesiert. Die Ventilation und somit Atemfrequenz und Puls wurden konstant über einen mit dem Computer verbundenen und auf dem Tier befestigten Respirationssensor (Small Animal Monitoring and Gating System, SA Instruments, StonyBrook, New York, USA) erfasst und überwacht. Die Narkose wurde dementsprechend angepasst. Die Körpertemperatur der Mäuse musste während der Messungen durch Lagerung auf einer mit warmem Wasser betriebenen Wärmematte konstant auf 37 °C gehalten werden.

Die Auswertung der MRT-Bilder und somit die Bestimmung des Läsionsvolumens erfolgte mit dem Programm Analyze 5.0 (AnalyzeDirect, Inc., Lenexa USA).

Mit einem „Region of Interest Tool“ wurden die hyperintensiven, ischämischen Gebiete in allen T2-gewichteten Bildern umrandet. Das „Region of Interest tool“ erlaubt durch die Auswahl eines beliebigen Pixels eine auf einen Schwellenwert basierte Segmentierung durch die automatische Verbindung aller sich in der spezifischen Schwellenwertspanne befindenden Pixel und somit die Erstellung einer 3-dimensionalen Objekt-Mappe der gesamten Schlaganfallregion. Das totale Volumen des Schlaganfalls in der 3D-Objekt-Mappe wird im Anschluss durch das Programm automatisch berechnet (Rocha *et al.*, 2014).

2.2.7. Immunfluoreszenz-Markierungen

Es wurden 20 µm dicke Schnitte von gefrorenem Gehirngewebe am Kryostat (HM560, Microm GmbH) angefertigt. Zum Entfernen von Nässe wurden die auf Objektträgern platzierten Kryoschnitte ca. 10 Minuten lang luftgetrocknet und danach zur Fixierung für 10 Minuten bei -20 °C in Methanol eingelegt, um anschließend für 3 mal 5 Minuten in PBS gewaschen und anschließend für mindestens 30 Minuten in 1 % (w/v) Casein beinhaltenender PBS-Lösung zum Blockieren unspezifischer Antigene inkubiert zu werden. Anschließend mussten die, in Punkt 2.1.5. beschriebenen, primären Antikörper in 0,5 % (w/v) Casein in PBS-Lösung aufgetragen und bei 4 °C über Nacht bzw. 2 Stunden lang bei Raumtemperatur inkubiert werden.

Nach dreimaligem Waschen mit 0,5 % (w/v) Casein in PBS wurden die Schnitte mit dem sekundären Antikörper Cy3, Cy5, AMCA oder FITC (1:200, Dianova) konjugiert, für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und abschließend noch einmal mit PBS gewaschen und dann mit DAPI-haltigem Mounting Medium (Dianova) eingedeckt.

2.2.8. Histologische Auswertung

Zur Mikroskopie der Immunfluoreszenz-gefärbten Schnitte und Anfertigung von Bildern wurde ein Carl Zeiss Axio observer Z1 inverted Immunfluoreszenz-Mikroskop mit den Filtern für DAPI, Cy3, Cy5 und FITC genutzt.

Zur Quantifizierung von Blutgefäßen sowie proliferierenden Zellen war die Anfertigung von 200x Feld-Bildern (i.e. 20x Objektiv Linse und 10x Okular; 0.7386 mm² pro Feld) nötig.

2.2.8.1. Quantifizierung von Blutgefäßen und ihrer Dichtigkeit

Zur Quantifizierung von Blutgefäßen wurden jeweils 3 Bilder des Kortex im ischämischen Bereich des Schlaganfalls, des kontralateralen Kortex und des Striatums, sowohl ipsilateral als auch kontralateral mit der manuellen Zählfunktion (Plugin >Cell Counter) des Programms ImageJ (NIH) ausgezählt. Es wurden zunächst alle CD31-positiven Zellen nach den bei Weidner et al. beschriebenen Regeln gezählt (Weidner *et al.*, 1993, Tynninen *et al.*, 2002).

Für die Bestimmung der Perizytenbedeckung und somit der Dichtigkeit der gezählten Gefäße mussten danach alle Zellen gezählt werden, die sowohl CD31 positiv als auch Desmin positiv waren.

2.2.8.2. Quantifizierung der Proliferation

Der Proliferationsmarker KI67 diente der Quantifizierung proliferierender Zellen nach dem Schlaganfall. Es wurden jeweils 3 Bilder des ipsilateralen Kortex, des kontralateralen Kortex, des ipsilateralen Striatums, des kontralateralen Striatums sowie des Hippocampus beider Hemisphären mit der manuellen Zählfunktion des Programms ImageJ (NIH) ausgezählt.

2.2.9. Statistik

Die Daten wurden mithilfe der Software Graphpad Prism als Mittelwert mit zugehörigem Standardfehler erhoben. Zum Vergleich und zur Feststellung eines Unterschieds zweier bzw. mehrerer normalverteilter Gruppen wurde der t-Test bzw. der ANOVA-Test mit anschließendem Bonferronis multiplen Vergleichs-Test verwendet. Bei nicht normalverteilten Gruppen wurden zur Feststellung von Unterschieden der Mann-Whitney-Test bzw. der Kruskal-Wallis-Test angewendet. Als statistisch signifikant wurde $p \leq 0,05$ angesehen.

3. Ergebnisse

3.1. Charakterisierung der VEGF-Genexpression

Zu untersuchen galt die Prävalenz von VEGF nach An- bzw. Abschaltung der VEGF-Expression in der entsprechenden bi-transgenen Maus im Vergleich zu Kontrollmäusen ohne Beeinflussung der VEGF-Expression nach 14 beziehungsweise 28 Tagen (d).

Bei zusammenfassender Betrachtung aller GOF-Tiere ohne Berücksichtigung der Untersuchungszeitspanne konnte eine ungefähr 2,5-fache Erhöhung der VEGF-Genexpression bei GOF im Vergleich zu den Kontrolltieren gezeigt werden. Bei LOF zeigte sich numerisch eine etwas niedrigere VEGF-Genexpression im Vergleich zu den Kontrollen (Abb. 3.1).

Bereits nach 72 h konnte eine ungefähr 1,5-fache Erhöhung der VEGF-Genexpression bei GOF-Tieren gezeigt werden (Abb. 3.2).

Im Vergleich der VEGF-Genexpression zwischen 14 d und 28 d nach Absetzen von Tetracyclin konnten weder signifikante Unterschiede zwischen GOF 14 d und GOF 28 d noch zwischen LOF 14 d und LOF 28 d gefunden werden (Abb. 3.3).

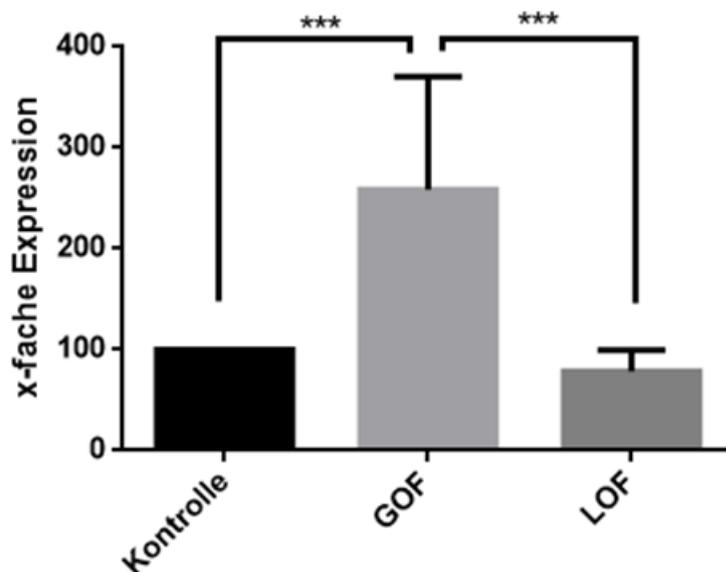


Abb. 3.1 VEGF-Expression gemessen mittels PCR (Zusammengefasste Daten ohne Berücksichtigung des Untersuchungszeitpunktes)

Verglichen wurden Kontrolltiere mit GOF und LOF. Die Genexpression von Kontrolle und LOF ist signifikant unterschiedlich zu der in den GOF-Tieren ($P = 0,0006$).

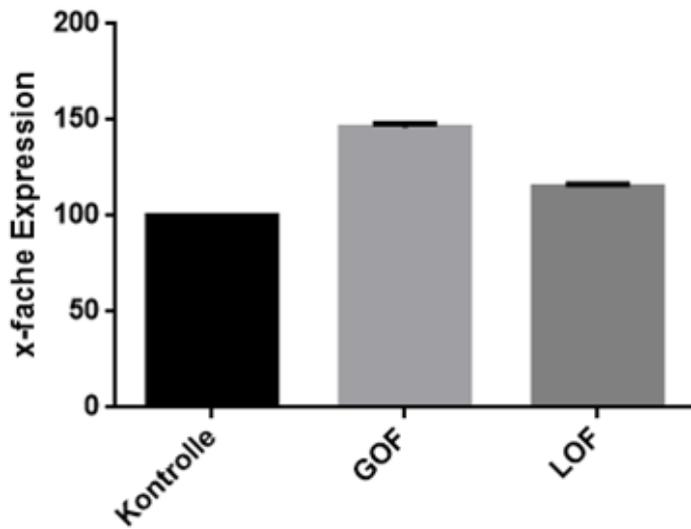


Abb. 3.2 VEGF Genexpression gemessen mittels PCR (72 Stunden)
 Es zeigt sich eine etwa 1,5 (+/-)-fache Erhöhung der VEGF-Genexpression bei GOF.

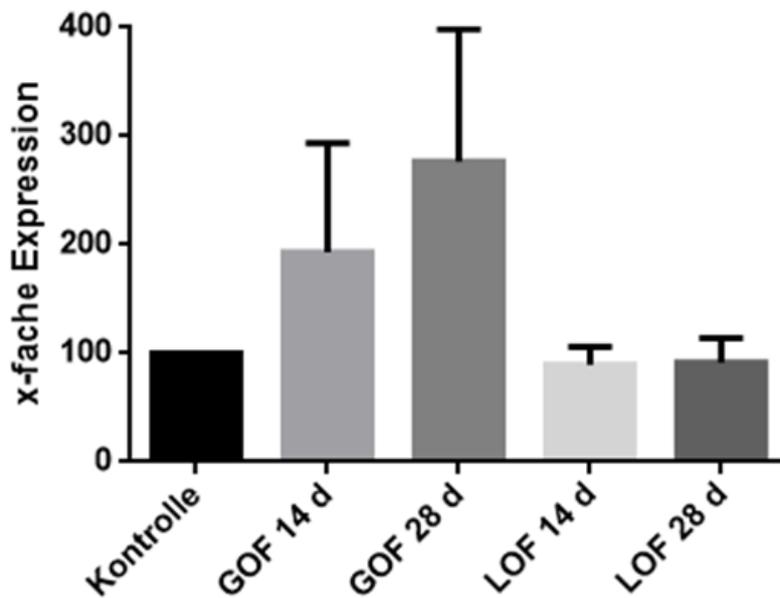


Abb. 3.3 VEGF-Expression gemessen mittels PCR (14 und 28 Tage)
 Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen 14 und 28 Tagen.

3.2. Magnetresonanztomographische Charakterisierung

Es wurde an je einer Gruppe (n=12) LOF-, GOF- und Kontroll-Mäusen an Tag 0 eine permanente Koagulation der distalen *Arteria cerebri media* durchgeführt. Dazu mussten 24 und 96 Stunden nach der Operation jeweils eine T2-Map-MRT-Aufnahme des Gehirns der untersuchten Mäuse angefertigt werden. Zu ermitteln war hierbei die Größe des kortikalen Infarkts und die Größe des Ödems im Vergleich zwischen den Gruppen und deren Entwicklung mit der Zeit.

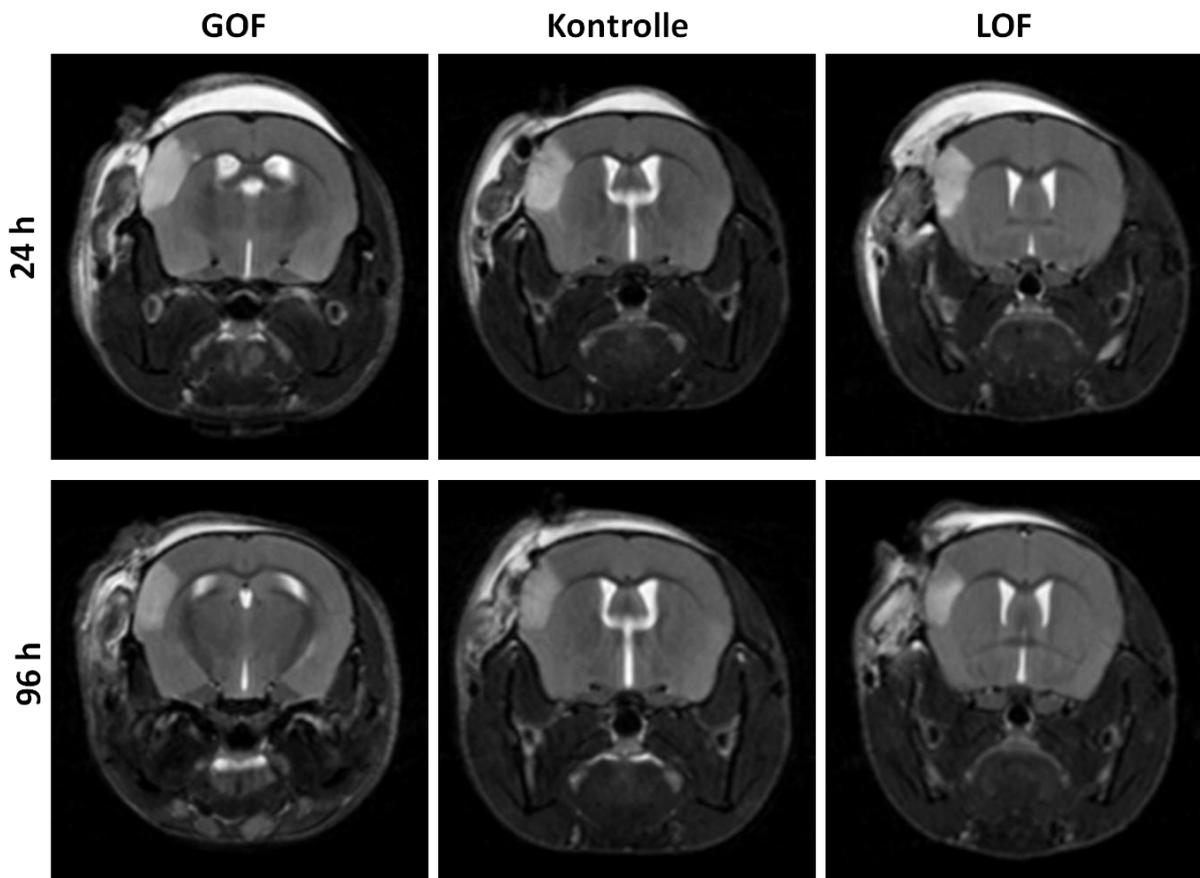


Abb. 3.4 MRT nach dMCAO

Alle Tiere wurden 24 und 96 h *post* dMCAO einer MRT-Bildgebung mittels T2-Sequenz unterzogen. Die Abbildung zeigt Aufnahmen des linksseitigen, kortikalen Infarkts beider Zeitpunkte von GOF-, Kontroll- und LOF-Mäusen im Vergleich.

Die aus der permanenten Okklusion der distalen *Arteria cerebri media* resultierenden Infarkte sind, wie in Abb. 3.4 zu sehen, scharf begrenzte kortikale, in der T2-Wichtung hyperintense Läsionen, die sich bei den verschiedenen Gruppen in Form und Größe nicht signifikant unterscheiden.

Nach Auswertung aller T2-hyperintensiven Areale in allen koronalen Schnitten einer MRT-Aufnahmen mit dem Programm Analyze 5.0 ergaben sich in den folgenden Grafiken dargestellte direkte Läsionsvolumina der Infarkte (Abb. 3.5 und Abb. 3.6). Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den bitransgenen Mausgruppen und ihrer jeweiligen Kontrollgruppen. Generell zeigen aber die LOF-Tiere numerisch etwas größere Infarktvolumina.

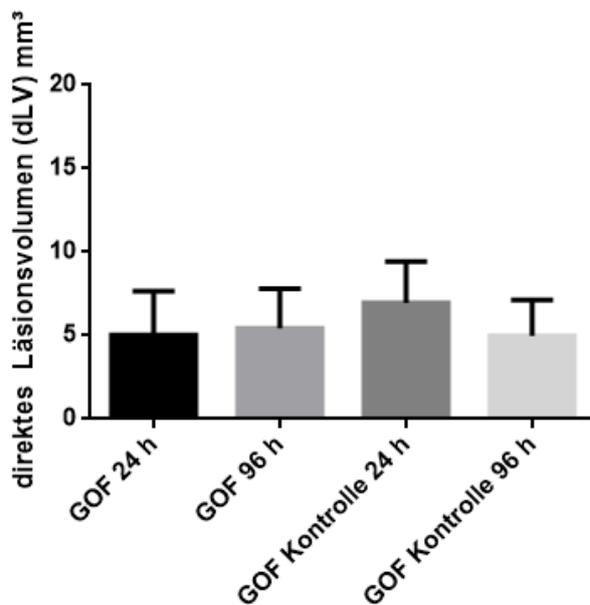


Abb. 3.5 Schlaganfallvolumen GOF

Es werden GOF- mit Kontrolltieren verglichen, jeweils zum Zeitpunkt 24 h und 96 h *post dMCAO*.

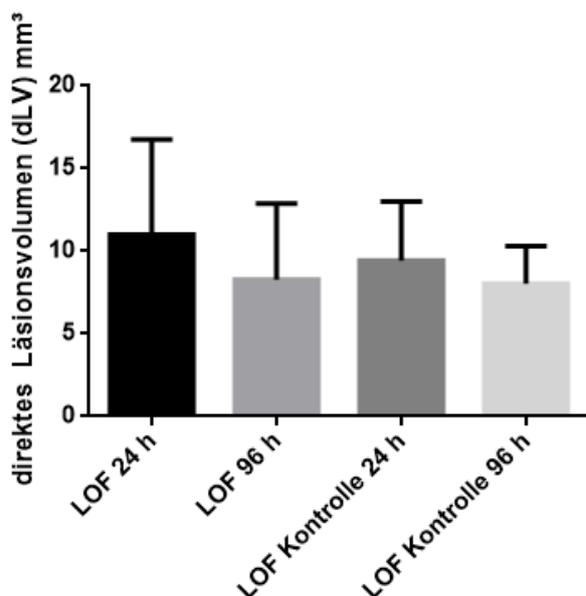


Abb. 3.6 Schlaganfallvolumen LOF

Es werden LOF- mit Kontrolltieren verglichen, jeweils zum Zeitpunkt 24 h und 96 h *post dMCAO*.

Im Anschluss wurden die jeweiligen Ödemvolumina aller Infarkte berechnet. In der Auswertung ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen (Abb. 3.7). Insbesondere bei den GOF Tieren zeigte sich eine konstante Läsion zu den Zeitpunkten 24 h und 96 h nach Ischämie.

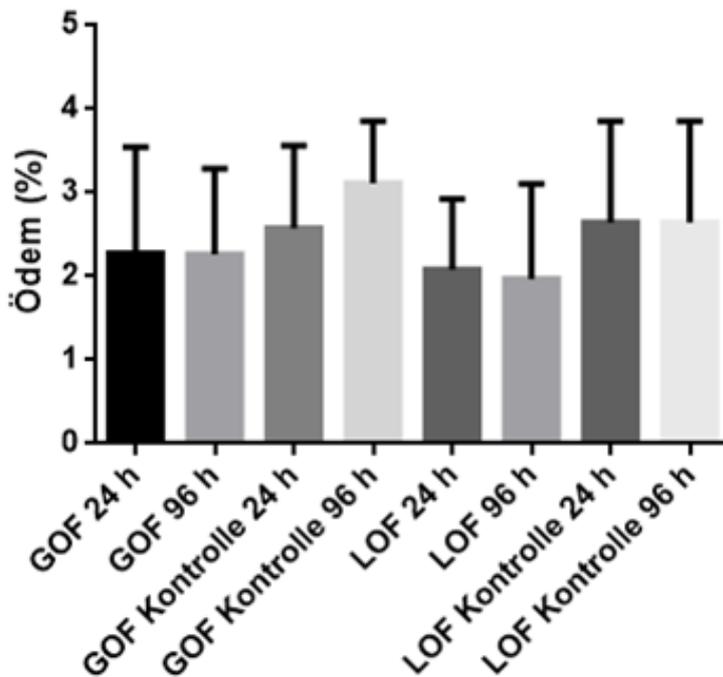


Abb. 3.7 Ödem nach Schlaganfall

Angegeben werden Ödemvolumina in % des gesamten Läsionsvolumens. Es ist kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen zu erkennen.

3.3. Immunhistochemische Charakterisierung

Nach permanenter Okklusion der distalen *Arteria cerebri media* wurden jeweils eine Gruppe LOF-, GOF- und Kontroll-Mäuse (n=6-12) 14 bzw. 28 Tage *post operationem* und ohne Zusatz von Tetracyclin-haltigem Wasser euthanasiert, die Gehirne entnommen, Gehirnschnitte angefertigt und diese mit den Antikörpern gegen NeuN, GFAP, Ki67, CD31 und Desmin markiert. Bei der Auswertung interessierten die Populationen der positiv, mit den jeweiligen Antikörpern, markierten Zellen im Bereich des Infarktes, des kontralateralen Kortex, des Striatums, des Hippocampus und der subventrikulären Zone beider Gehirnhälften.

3.3.1. Markierung des Cluster of Differentiation 31 und Desmin

Die CD31-Markierung kennzeichnet das CD31-Molekül (Cluster of Differentiation 31) oder auch PECAM-1 (Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül-1) genannt, welches auf der Oberfläche von Endothelzellen, Thrombozyten, neutrophilen Granulozyten, Leukozyten und T-Zellen exprimiert wird. Es interessierte die Anzahl von Blutgefäßen mit CD31-positiv markierten Endothelzellen in den verschiedenen Gehirnregionen und im Vergleich der unterschiedlichen Gruppen nach distaler MCAO. Wie die repräsentativen Immunfluoreszenzaufnahmen in Abb. 3.8 und die dazugehörige Quantifizierung in Abb. 3.9 zeigen, wurde in den GOF-Tieren verglichen mit den LOF- und Kontroll-Tieren sowohl am Tag 14 als auch Tag 28 nach der Operation eine signifikant erhöhte Anzahl von Blutgefäßen dokumentiert ($P < 0,0001$). Zwischen Kontroll- und LOF-Tieren gab es zu beiden Zeitpunkten keine erkennbaren Unterschiede (Abb. 3.9).

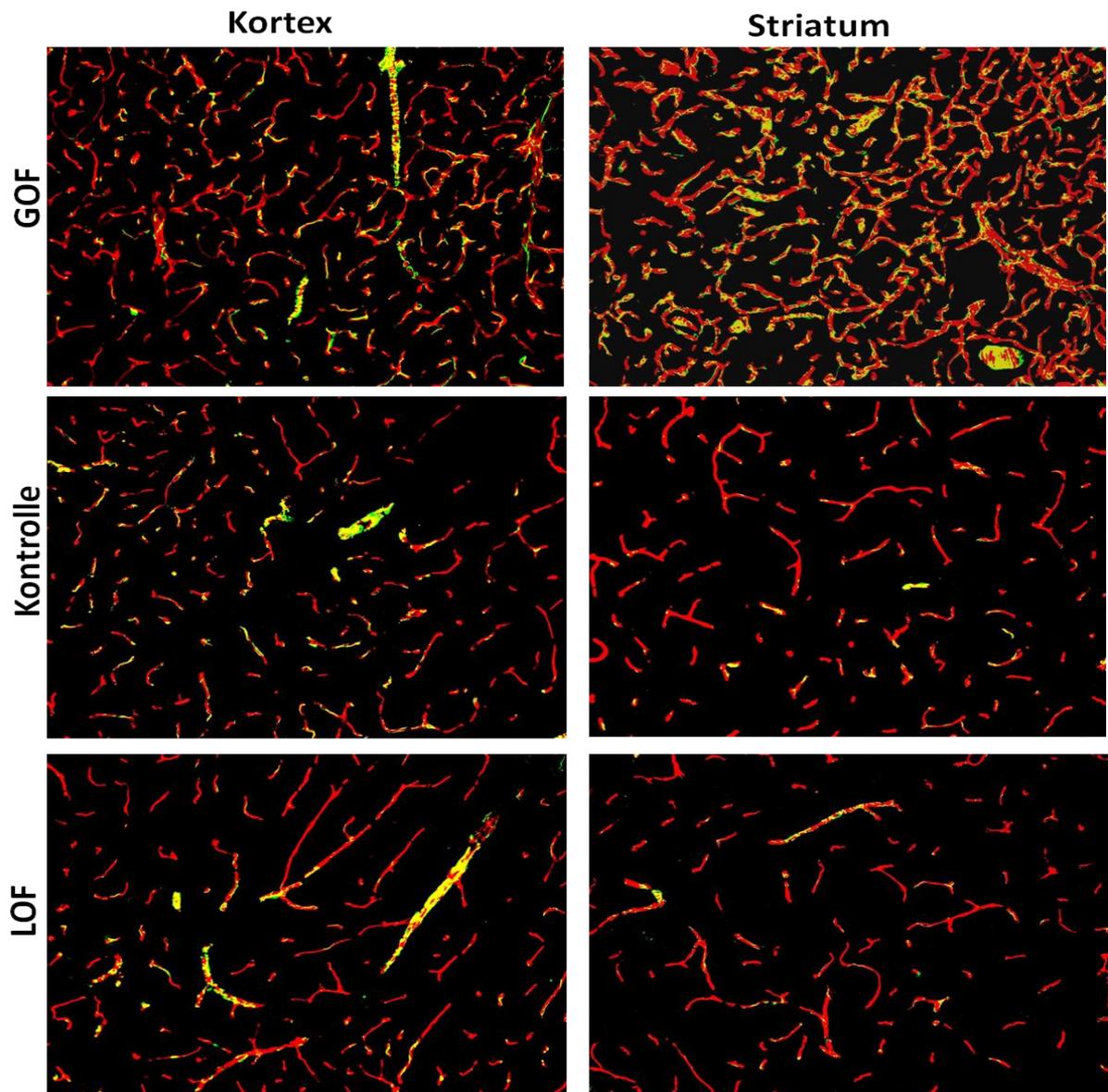


Abb. 3.8 CD31/Desmin-Markierung

Die Abbildung zeigt immunhistologische Bilder in 20facher Vergrößerung von Kortex und Striatum von GOF-, Kontroll- und LOF-Mäusen im Vergleich. (Rot= CD31, Gelb= Desmin)

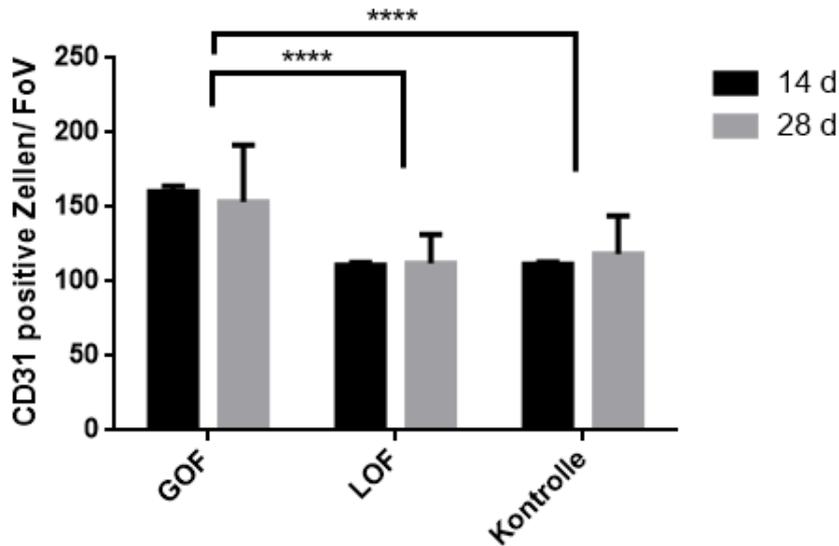


Abb. 3.9 CD31- Markierung

Verglichen wird in dieser Grafik die jeweilige Gesamtanzahl (aus Striatum und Kortex) von CD31 positiven Endothelzellen in Blutgefäßen pro Gesichtsfeld in der 20fachen Vergrößerung. Signifikante Unterschiede stellten sich zwischen der GOF-, der LOF- und Kontrollgruppe sowohl an Tag 14 als auch Tag 28 dar ($P < 0,0001$).

Abb. 3.10 zeigt den Vergleich zwischen Kortex und Striatum. Es konnte zu beiden untersuchten Zeitpunkten lediglich in den Gehirnschnitten der GOF-Tiere eine erhöhte Anzahl von Blutgefäßen im Striatum festgestellt werden ($P < 0,0001$).

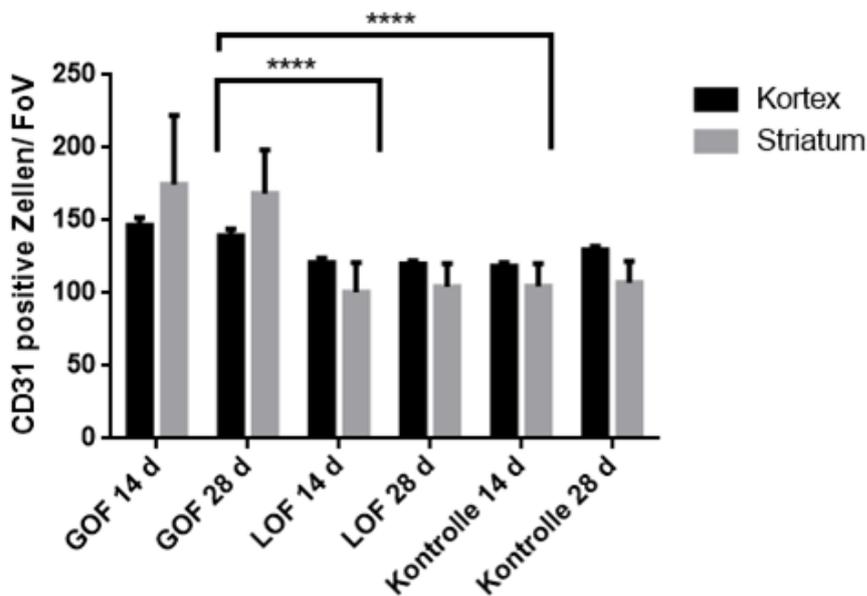


Abb. 3.10 CD31- Markierung

Die Grafik zeigt CD31-positive Zellen pro Gesichtsfeld (FoV) in der Kortex und im Striatum der verschiedenen Gruppen. Ein signifikanter Unterschied ist sowohl in der Kortex als auch im Striatum zwischen GOF und LOF sowie Kontrollen an Tag 14 und 28 zu erkennen ($P < 0,0001$).

Die Desmin-Markierung kennzeichnet Perizyten, welche durch die Stabilisierung der Kapillarstruktur sowie die Sekretion Barriere-abdichtender Moleküle einen wichtigen Teil der Blut-Hirn-Schranke darstellen und des Weiteren eine Rolle bei der Angiogenese spielen (Allt *et al.*, 2001, Bergers *et al.*, 2005). Ohne die Interaktion mit Perizyten weisen Blutgefäße eine gestörte Barrierefunktion auf und sind somit „undicht“. Darüber hinaus markiert Desmin Typ-3 Intermediärfilamente, welche in Zellen der glatten Muskulatur vorkommen und durch die Bildung eines fibrösen Netzwerkes Myofibrillen miteinander vernetzen (Li *et al.*, 1997).

Zu untersuchen war, wie viele der gezählten Blutgefäße mit Perizyten bedeckt waren und ob eine Störung der Gefäßbarriere nach distaler MCAO vorlag. Die Abb. 3.11 und Abb. 3.12 zeigen, dass sich zwischen den Gruppen keine signifikanten Unterschiede feststellen ließen.

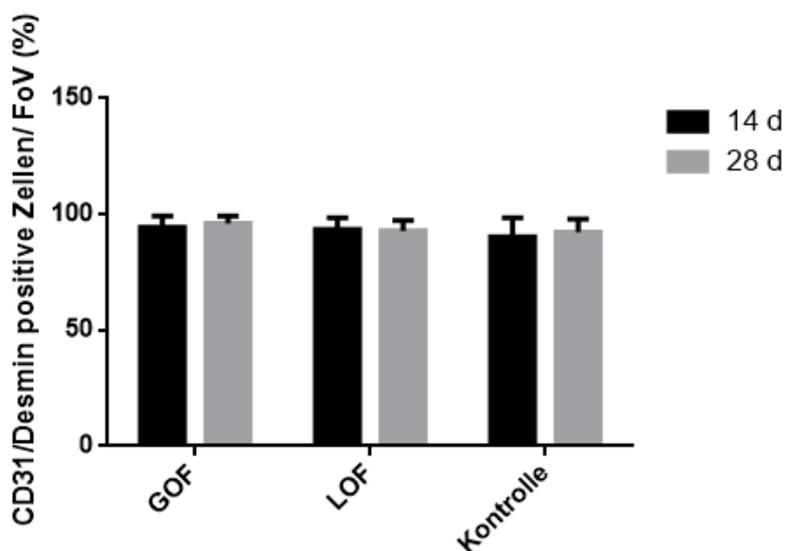


Abb. 3.11 Kolokalisation von CD31 mit Desmin (Perizytenbedeckung)

Dargestellt sind die CD31- und Desmin-positiven Zellen pro Gesichtsfeld in % der Gesamtanzahl CD31-positiver Zellen. Zwischen den einzelnen Gruppen und zwischen den Zeitpunkten 14 und 28 Tagen ist kein signifikanter Unterschied zu erkennen.

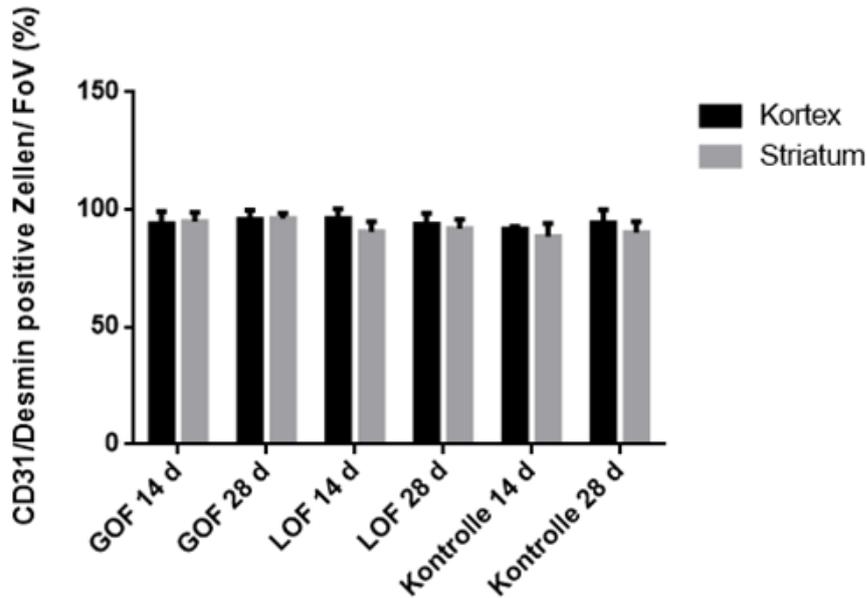


Abb. 3.12 Kolokalisation von CD31 mit Desmin (Perizytenbedeckung) Kortex und Striatum im Vergleich

Die Grafik zeigt den zusätzlichen Vergleich der Anzahl von CD31/Desmin-positiven Zellen pro Gesichtsfeld in % zwischen Kortex und Striatum der einzelnen Gruppen. Es sind keine signifikanten Unterschiede erkennbar.

3.3.2. Markierung des Proteins Ki67

Mit dieser Markierung wird das Zellkernprotein Ki67 gekennzeichnet, welches in sich teilenden Zellen, vor allem in der G1-, S-, M- und G2-Phase des Zellzyklus, exprimiert wird. In der G0-Phase (Ruhephase) des Zellzyklus wird das Protein nicht exprimiert, wodurch die sich in dieser Phase befindenden Zellen nicht markiert werden können. Die Fragestellung war, ob nach distaler MCAO und in den verschiedenen Mausgruppen eine vermehrte oder verringerte Zellproliferation zu beobachten ist.

Auf immunhistologischen Aufnahmen der Infarkte in der 20-fachen Vergrößerung ist eine Proliferation von Zellen ausschließlich in der Periinfarktregion zu erkennen (Abb. 3.13). Eine erhöhte Anzahl Ki67-positiver Zellen wurde in Kortex, Striatum und Hippocampus aller untersuchten Gehirnareale in GOF-Mäusen sowohl nach 14 Tagen als auch nach 28 Tagen *post operationem*, verglichen mit LOF- und Kontroll-Mäusen, gefunden (Abb. 3.14).

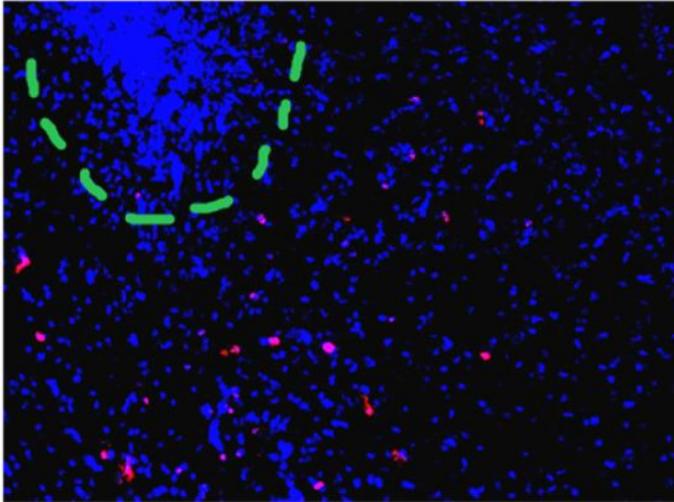


Abb. 3.13 Ki67- Markierung

Grün umrandet ist das Infarktareal zu erkennen. In blau stellen sich jegliche Zellkerne dar. Rot angefärbt werden Ki67-positive Zellen. Es sind nur in der Periinfarktregion Ki67-positive Zellen zu erkennen.

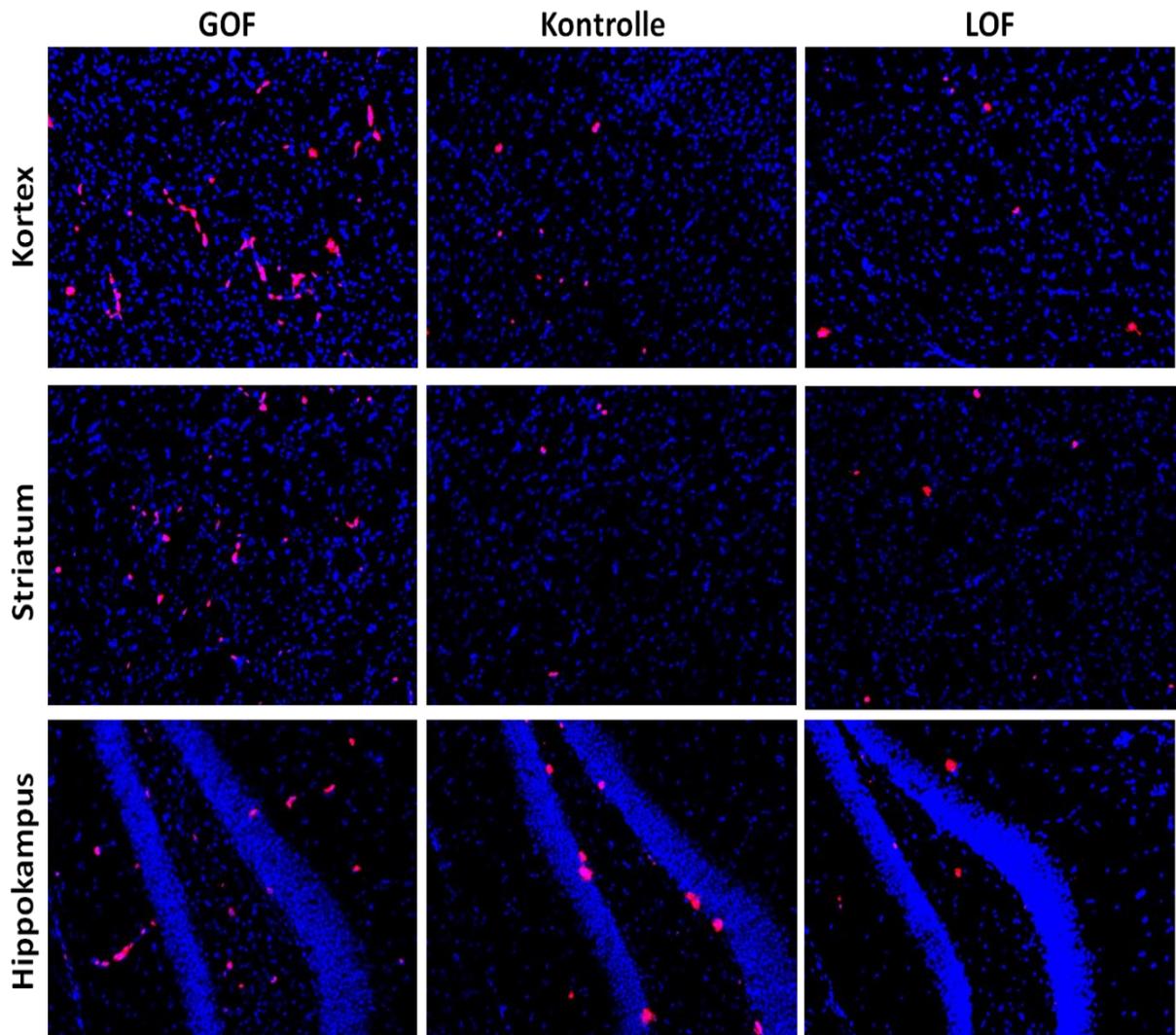


Abb. 3.14 Ki67- Markierung

Dargestellt werden Aufnahmen des Mikroskops in 20facher Vergrößerung. In GOF Tieren ist in allen untersuchten Hirnarealen eine signifikant höhere Anzahl an Ki67-positiven Zellen zu erkennen. (Blau = DAPI, Rot = Ki67)

Die Auszählung mittels ImageJ zeigte in allen Regionen eine signifikant erhöhte Anzahl Ki67-positiver Zellen bei GOF-Mäusen verglichen zu LOF- und Kontroll-Mäusen sowohl 14 als auch 28 Tage nach der distalen MCAO Operation ($P < 0,0001$) (Abb. 3.15, Abb. 3.16 und Abb. 3.17).

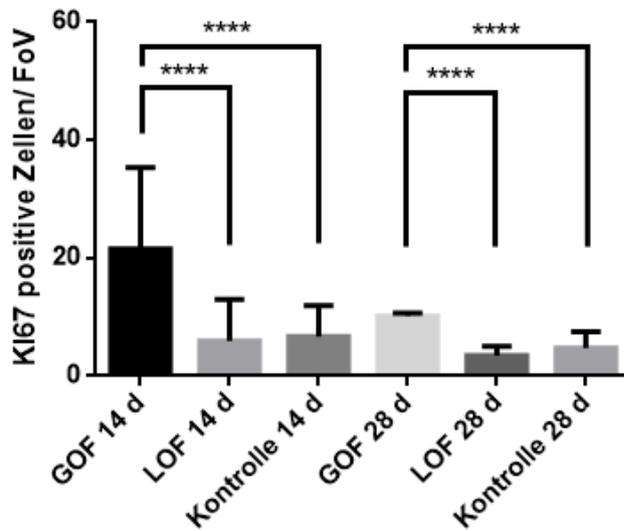


Abb. 3.15 Ki67- Markierung Kortex

Dargestellt wird die Anzahl von Ki67-positiven Zellen des Kortex von GOF-, LOF- und Kontroll-Tieren. Die Anzahl von positiven Zellen ist in den GOF-Tieren signifikant erhöht ($P < 0,0001$).

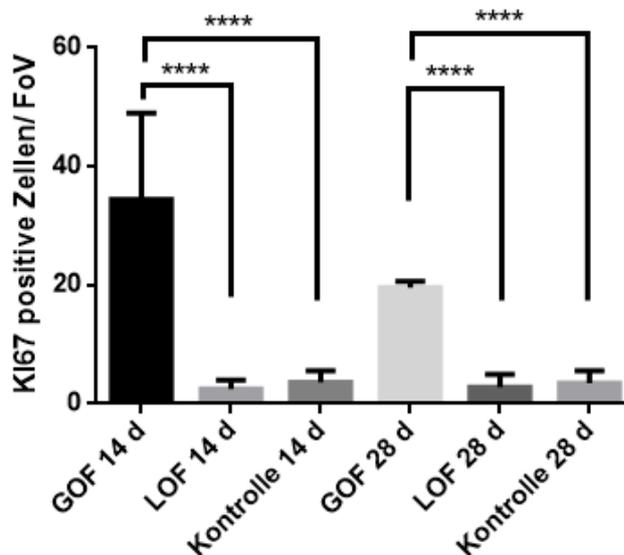


Abb. 3.16 Ki67- Markierung Striatum

Dargestellt wird die Anzahl von Ki67-positiven Zellen des Striatums von GOF-, LOF- und Kontroll-Tieren. Die Anzahl von positiven Zellen ist in den GOF-Tieren signifikant erhöht ($P < 0,0001$).

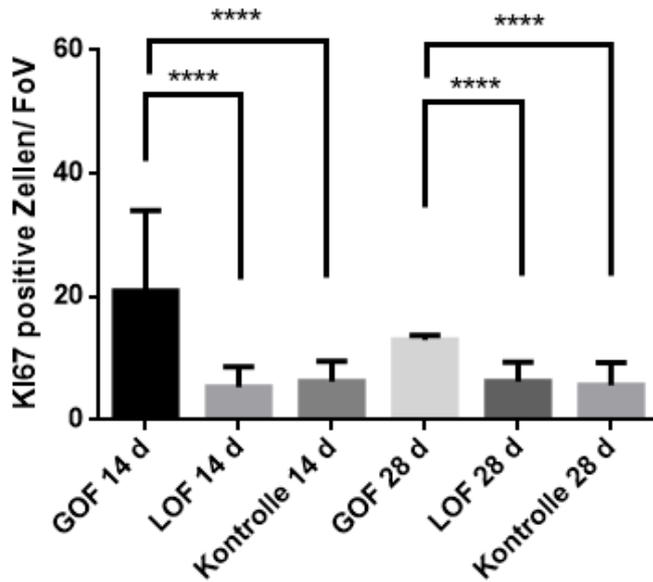


Abb. 3.17 Ki67- Markierung Hippocampus

Dargestellt wird die Anzahl von Ki67-positiven Zellen des Hippocampus von GOF-, LOF- und Kontroll-Tieren. Die Anzahl von positiven Zellen ist in den GOF-Tieren signifikant erhöht ($P < 0,0001$).

3.3.3. Markierung des Ki67-Proteins mit dem Cluster of Differentiation 31

Um festzustellen welcher Zelltyp vor allem bei den GOF-Mäusen vermehrt proliferiert, wurde eine Doppelmarkierung von Blutgefäßen mittels CD31- und Ki67- Markierung angefertigt. Eine Kolo-kalisation beider Marker wurde in der Auswertung der immunhistochemischen Aufnahmen in der 20-fachen Vergrößerung als proliferierende Endothelzellen identifiziert. Die immunhistologischen Färbungen zeigten eine signifikant erhöhte Anzahl doppelmarkierter Zellen, also proliferierender Endothelzellen bei GOF-Mäusen verglichen zu LOF- und Kontroll-Mäusen (Abb. 3.18). Um auszuschließen, dass nicht andere Endothel-assoziierte Zellen, wie zum Beispiel Perizyten, mit Ki67 markiert wurden, wurden die entsprechend gekennzeichneten Gehirnschnitte am konfokalen Setup mikroskopiert. Anhand der hochauflösenden Z-Stacks konnte eine Lokalisation von Ki67 in CD31-positiven Zellen, nicht jedoch in Desmin-positiven Perizyten festgemacht werden (Abb. 3.19).

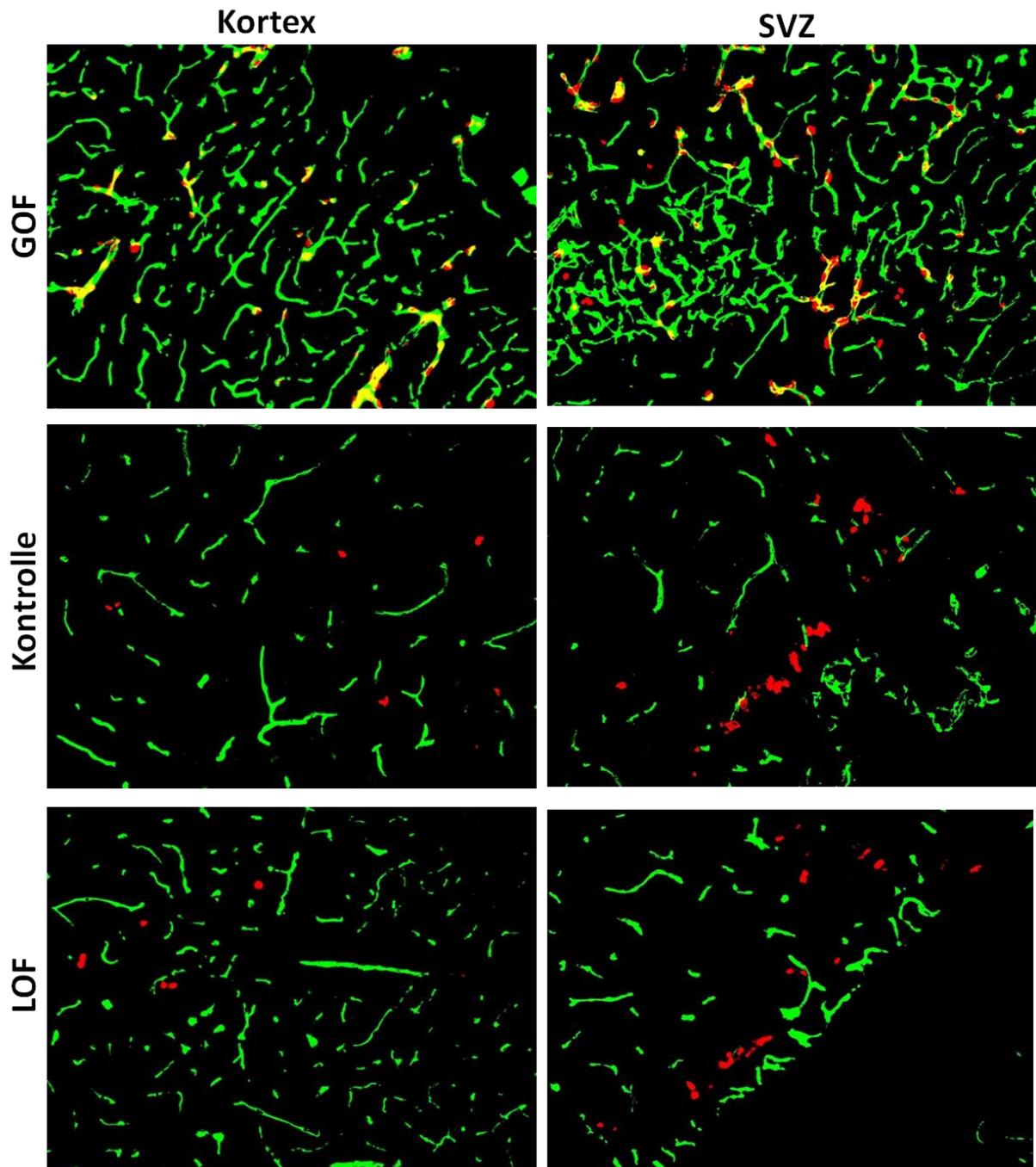


Abb. 3.18 Ki67/CD31- Markierung

Die immunhistochemischen Aufnahmen in der 20fachen Vergrößerung zeigen eine signifikant erhöhte Anzahl an CD31/Ki67-positiven Zellen in GOF-Tieren verglichen zu LOF und Kontrolle. (Grün=CD31, Rot=Ki67, Gelb=Kokalisation)

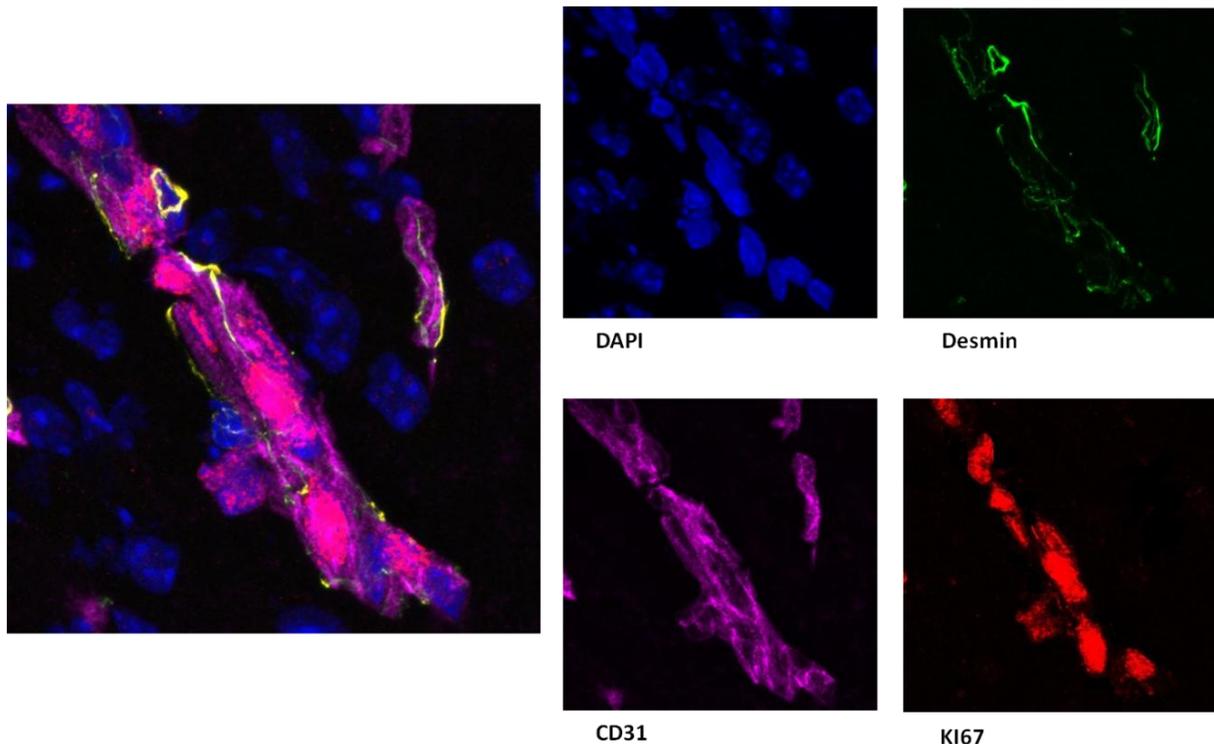


Abb. 3.19 Konfokale Mikroskopie

Links ist die Aufnahme eines Blutgefäßes unter dem konfokalen Mikroskop dargestellt. Die vier Bilder rechts daneben stellen dieselbe Aufnahme dar, allerdings unter Ausblendung der jeweiligen Kofärbungen.

3.3.4. Markierung neuronaler Nuklei und des Glial-Fibrillary-Acidic-Proteins

Die NeuN-Markierung kennzeichnet Nuklei aller adulten Neurone. Es sollte beobachtet werden, ob nach distaler MCAO die Anzahl adulter Neurone verändert wird oder ob Unterschiede in der Anzahl von Neuronen zwischen den Gruppen GOF, LOF und Kontrolle zu erkennen sind. Wie Abb. 3.20 zeigt, wird die Anzahl NeuN-positiver Zellen in der Infarktregion stark verringert. In allen anderen Gehirnregionen sind jedoch keine sichtbaren Beeinträchtigungen oder Unterschiede zwischen den Gruppen zu beobachten.

Die GFAP- Markierung kennzeichnet das Glial-Fibrillary-Acidic-Protein, welches vor allem von aktivierten Astrozyten exprimiert wird. Es interessierte, ob ein Anstieg von GFAP-positiven Astrozyten nach distaler MCAO zu beobachten ist. Wie in Abb. 3.20 zu sehen ist, stieg die Anzahl von aktivierten Astrozyten in der Infarktregion und in der subventrikulären Zone stark an. Im kontralateralen Kortex waren so gut wie keine GFAP-positiven Astrozyten zu detektieren. Es gab keine visuellen Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen.

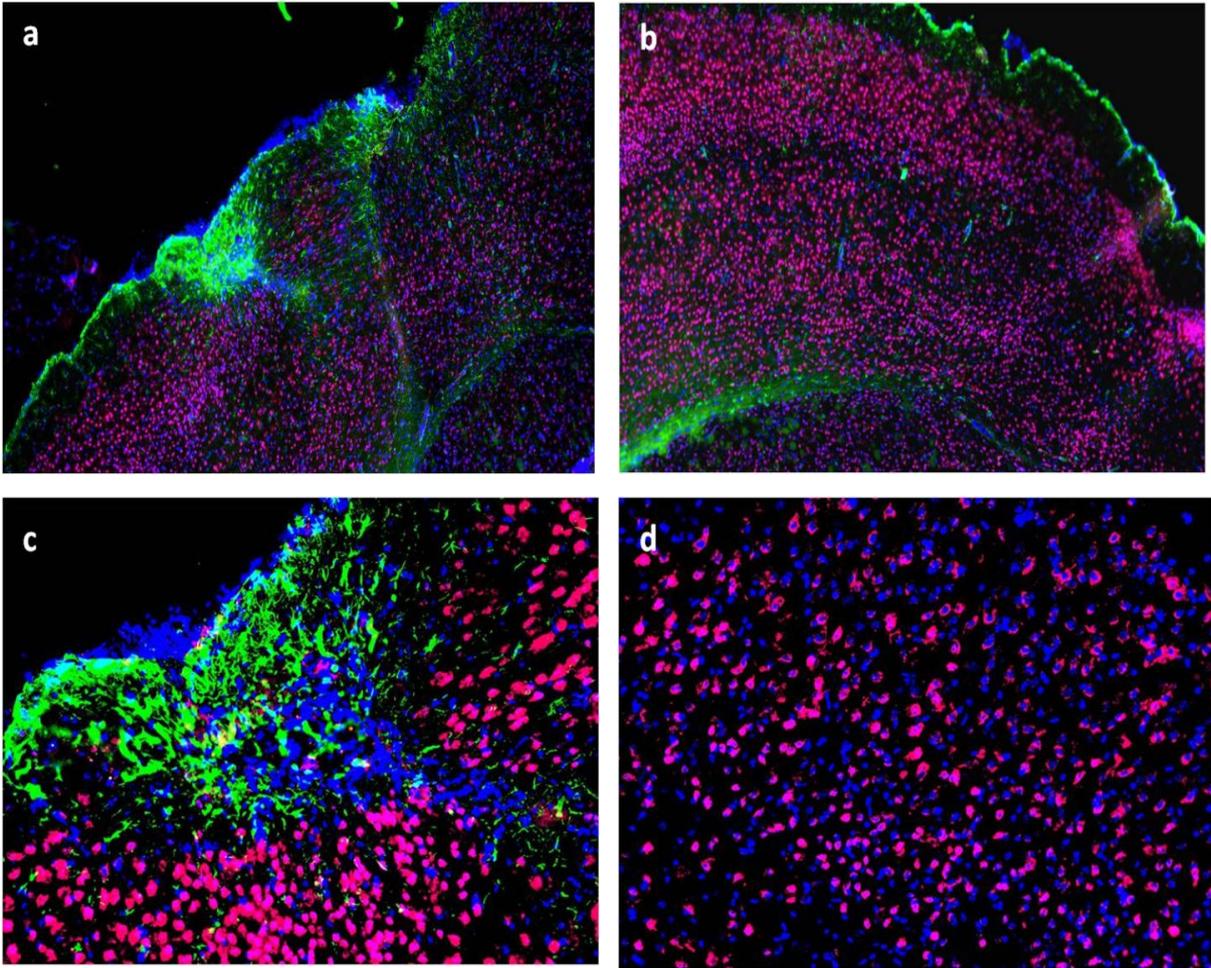


Abb. 3.20 NeuN/GFAP- Markierung

a Die Abbildung zeigt eine Mosaik-Aufnahme (mehrere zusammengefügte Aufnahmen) in 20-facher Vergrößerung des ipsilateralen Kortex mit Schlaganfall

b Die Abbildung zeigt eine Mosaik-Aufnahme (mehrere zusammengefügte Aufnahmen) in 20-facher Vergrößerung des kontralateralen Kortex ohne Schlaganfall

c Einzelaufnahme des Schlaganfalls in 20-facher Vergrößerung

d Einzelaufnahme des kontralateralen Kortex in 20-facher Vergrößerung
(blau=DAPI, grün=GFAP, rot=NeuN)

4. Diskussion

4.1. Der Einfluss von VEGF auf pathophysiologische Mechanismen bei zerebraler Ischämie

Der Schlaganfall stellt weltweit beim Menschen eine der häufigsten Todesursachen dar und ist die Hauptursache für lebenslange Behinderung und Pflegebedürftigkeit im Erwachsenenalter, was die sehr hohe sozioökonomische Bedeutung dieses Krankheitsbildes bedingt. Am häufigsten entstehen ischämische Hirninfarkte durch embolische oder thrombotische Okklusion der MCA. Insbesondere die Schädigung der vaskulären Einheit stellt nach Schlaganfall einen entscheidenden Faktor dar. Neuroprotektion und Regeneration durch Wiederherstellung und Stabilisierung der vaskulären Integrität ist daher sicherlich einer der vielversprechendsten Ansätze, um das Langzeitresultat von Schlaganfallpatienten zu verbessern. Aus klinischer Sicht ist zu sagen, dass VEGF natürlich vor allem als ein therapeutischer Ansatz nach Schlaganfall hochinteressant wäre.

Ziel dieser experimentellen Studie war es die Wirkung von VEGF auf das Schlaganfallvolumen und die Ödementwicklung sowie den Effekt auf die vaskuläre Umgestaltung nach Schlaganfall zu untersuchen. Dementsprechend wurde ein etabliertes Maus-Modell zur Okklusion der distalen MCA angewendet. Hierbei wurde in der subakuten Phase nach Schlaganfall die hirnspezifische VEGF-Expression in GOF- Tiere stimuliert, während diese in LOF-Tieren inhibiert wurde. Die erfolgreiche Genmanipulation der GOF-Mäuse konnte mittels Real-time PCR nachgewiesen werden, welche eine 2,5-fache Erhöhung der VEGF-Genexpression zeigte. Die VEGF-Expression in LOF-Mäusen war dahingegen nicht verändert oder nur geringgradig erniedrigt. Dies widerspricht jedoch nicht dem Züchtungserfolg da nicht die Expression von VEGF blockiert wird, sondern dessen Signalübertragung durch Bindung an einen VEGFR-1 ähnlichen Rezeptor (May *et al.*, 2008).

4.1.1. Schlaganfallvolumen und Ödementwicklung

Beim ischämischen Schlaganfall wurde über eine VEGF vermittelte Störung der Blut-Hirn-Schranke und eine dadurch gesteigerte Ödementwicklung und Inflammation berichtet. Dies birgt die Gefahr einer schwereren Erkrankung und somit einer schlechteren Prognose. Der Zeitpunkt sowie die Route der VEGF Applikation scheinen hier unter anderem eine entscheidende Rolle zu spielen (Hermann *et al.*, 2009, Geiseler *et al.*, 2018). In der vorliegenden Studie konnte im Hinblick auf Veränderungen des Schlaganfallvolumens jedoch

kein Unterschied zwischen GOF- und Kontrolltieren gefunden werden. Im direkten Vergleich der Volumina zum Zeitpunkt 24 und 96 h, konnte außerdem kein Unterschied im Hinblick auf die MRT- morphologische Ödementwicklung festgestellt werden. Auch bei den LOF-Tieren konnte hinsichtlich beider Parameter kein relevanter Unterschied gefunden werden, wenn auch numerisch ein etwas größeres Schlaganfallvolumen bei den LOF-Tieren zu erkennen war, jedoch nicht signifikant. Dies steht im Widerspruch zu den Ergebnissen verschiedener experimenteller Schlaganfall-Studien welche zeigten dass die Administration von VEGF eine Reduktion der Infarktgröße sowie ein verbessertes neurologisches Resultat vermitteln kann (Hermann *et al.*, 2009). Die gegensätzlichen Ergebnisse beruhen wahrscheinlich auf unterschiedlichen Applikationsrouten und insbesondere verschiedenen Applikationszeitpunkten. So wurde ein VEGF vermittelter, protektiver Effekt in früheren Untersuchungen nur gezeigt, wenn VEGF lokal über einen längeren Zeitraum (bis zu mehreren Wochen) vor Induktion des ischämischen Schlaganfalls appliziert bzw. in der postakuten Phase lokal appliziert wurde (Zechariah *et al.*, 2013, Geiseler *et al.*, 2018). Die akute, systemische Applikation von VEGF führt jedoch zu einem schwereren Krankheitsverlauf in experimentellen Studien (Hermann *et al.*, 2009, Geiseler *et al.*, 2018), am Ende bedingt durch einen negativen Effekt von VEGF auf die Blut-Hirn-Schranke mit konsekutiv gesteigerter Ödementwicklung und Inflammation. In der vorliegenden Studie wurde VEGF in der subakuten Phase durch Absetzen von Tetrazyklin induziert bzw. geblockt. Wie die PCR-Ergebnisse sowie die Studien von Kooperationspartnern (Licht *et al.*, 2011) zeigen, kommt es in dem in dieser Studie verwendeten bi-transgenen Mausmodell zu einer starken VEGF-Überexpression, beginnend 48-72 h nach Absetzen von Tetrazyklin. Somit ist davon auszugehen, dass in der hochakuten Phase nach Ischämieinduktion VEGF noch nicht relevant erhöht ist. Die unveränderten Infarktvolumina sowie fehlende Unterschiede in der Ödementwicklung unterstützen diesen Ansatz. Weiterhin belegen die Ergebnisse der MRT-Untersuchungen die gute Reproduzierbarkeit des verwendeten distalen MCAO-Modells. Das oben genannte Vorgehen wurde gewählt, um einen protektiven Effekt von VEGF durch Präkonditionierung auszuschließen. Tatsächlich ist ein protektiver Effekt durch Präkonditionierung mit VEGF und dadurch verbessertem Kollateralgefäßnetzwerk und konsekutiv kleinerem Schlaganfallvolumen nicht überraschend (Zechariah *et al.*, 2013). Aus klinischer Sicht ist VEGF somit insbesondere als potentieller, therapeutischer Ansatz nach Schlaganfall hoch interessant.

Nach Induktion von VEGF gebildete Blutgefäße sind oft übermäßig durchlässig, was zu einer vermehrten Ödematisierung des Gehirns führt (Beck *et al.*, 2009, Hermann *et al.*, 2009). Dies konnte bei der Auswertung der magnetresonanztomographischen Aufnahmen im beschriebenen Versuch nicht bestätigt werden. VEGF-Überexpression in der subakuten

Phase nach Schlaganfall verursacht bei dMCAO somit keine signifikant größeren Hirnödeme. Im Allgemeinen sind die Ödeme mit 2-3 % des gesamten Läsionsvolumens als gering zu bezeichnen.

4.1.2. Dichtigkeit der Blutgefäße und Angiogenese

VEGF stand im Fokus dieser Arbeit, da er als wichtigster und hochpotenter Faktor die Neubildung und Migration von Endothelzellen zur Ausbildung eines funktionalen Gefäßsystems beiträgt. Licht *et al.* (2011) zeigte bereits in einer Studie, dass nach VEGF-Überexpression (VEGF-GOF) signifikant mehr neue Blutgefäße gebildet werden und somit eine deutlich höhere Dichte an Blutgefäßen im Bereich des Hippocampus nachgewiesen werden kann. Die Ki67 plus CD31 Kofärbung zeigte, dass es sich bei vielen der neu proliferierenden Zellen um Endothelzellen handelt (Licht *et al.*, 2011). Dies geht mit unseren erlangten Ergebnissen konform. Immunhistologisch zeigte die Färbung mit dem Proliferationsmarker Ki67, dass es bei VEGF GOF-Tieren nach dMCAO in allen untersuchten Hirnarealen eine signifikant erhöhte Proliferationsrate als bei LOF- und Kontrolltieren gab. Dabei zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den Zeitpunkten 14 und 28 Tagen. Die Kofärbung von Ki67 mit CD31 ergab, dass es sich bei einem sehr großen Anteil der bei den GOF-Tieren vermehrt proliferierenden Zellen um Endothelzellen handelt.

Aus der vermehrten Endothelzellproliferation resultierend lässt sich bei GOF-Tieren eine deutlich höhere Dichte an Blutgefäßen als bei LOF- und Kontrolltieren nachweisen. Dies war nicht nur im Bereich des Hippocampus, sondern auch im Bereich des Kortex und des Striatums beider Hemisphären zu erkennen. Die Auswertung der verschiedenen Areale zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen ipsilateraler Hemisphäre und kontralateraler Hemisphäre. Des Weiteren war eine signifikant erhöhte Anzahl an Blutgefäßen, vor allem im Striatum beider Hemisphären zu beobachten. Wie die Auswertung der Färbungen für Desmin und CD31 zeigen, weisen die signifikant vermehrt neugebildeten Gefäße in den GOF-Tieren eine hohe Perizytenbedeckung auf, was belegt, dass es sich um reife Gefäße handelt. Dies entspricht bereits publizierten Erkenntnissen, welche von signifikant größeren Läsionen, Zelluntergang und Durchlässigkeit der Blutgefäße bei reduzierter Endothelproliferation nach VEGF-Inhibition berichten (Bao *et al.*, 1999, Skold *et al.*, 2006, Shimotake *et al.*, 2010).

Es kann davon ausgegangen werden, dass eine gesteigerte Angiogenese und somit eine höhere Anzahl von Blutgefäßen einen positiven Effekt auf die Regeneration nach einem Schlaganfall hat. Mehrere Studien beschreiben die wichtige Rolle von neuen Blutgefäßen im Bereich eines ischämischen Insults zur Versorgung mit Sauerstoff, Nährstoffen und

inflammatorischen Zellen und somit zur Bewahrung vor Schäden durch eine bessere neuronale Plastizität, eine gesteigerte Überlebensrate von Neuronen und eine schnellere neurologische Regeneration (Hayashi *et al.*, 2003, Beck *et al.*, 2009, Hermann *et al.*, 2009). Dies deutet auf einen wichtigen positiven Effekt von VEGF in unserem GOF-Schlaganfall-Modell hin.

Eine gestörte Funktion von VEGFR-2 *in utero* führt zu schweren Fehlbildungen des Gefäßsystems bis hin zum Tod des Fötus (Hermann *et al.*, 2009, Shimotake *et al.*, 2010). Genauer führt die Störung von Perizyten-Endothelzell-Interaktion durch VEGF-Inhibition bei unreifen Blutgefäßen zu einem Verlust von Gefäßen, abnormer Umgestaltung dieser sowie einem Rückgang der Dichtigkeit. Dies passiert allerdings bei reifen Blutgefäßen nicht (Benjamin *et al.*, 1998). Ein bereits ausgereiftes Blutgefäßsystem bleibt auch ohne VEGF-Signale erhalten (Licht *et al.*, 2013). Daher wird angenommen, dass bei Blockade der VEGF-Signalwege (VEGF-LOF) zwar weniger neue, funktionierende Blutgefäße gebildet werden, das bestehende Gefäßnetz allerdings erhalten bleibt. Dieses Konzept wird durch Untersuchungen von Licht *et al.* (2011) als auch durch die in dieser Studie gewonnenen Ergebnisse voll bestätigt. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Anzahl an vorhandenen Blutgefäßen zwischen LOF- und Kontrollmäusen. Des Weiteren zeigte die Kofärbung von CD31 mit Desmin, dass in allen Gruppen zu allen Zeitpunkten Blutgefäße keine signifikant geringere oder höhere Perizytenbedeckung und somit keine signifikant unterschiedliche Dichtigkeit aufweisen. Dieses Ergebnis erhielten auch Licht *et al.* (2011) nach intravenöser FITC-Dextran Injektion. Es wurde gezeigt, dass alle vermehrt gebildeten Blutgefäße gut perfundiert werden und funktional, das heißt nicht undicht sind (Licht *et al.*, 2011). Dies erklärt ebenfalls wieso im durchgeführten Versuch keine vermehrte Ödematisierung des Gehirns nach Schlaganfall festgestellt werden konnte. Wie die Ergebnisse unserer durchgeführten Färbungen für Desmin und CD31 deutlich zeigen, weisen die in den GOF Tieren signifikant vermehrt neu gebildeten Gefäße eine Perizytenbedeckung von nahezu 100 Prozent auf und sind somit als reife Gefäße anzusehen.

4.1.3. Neuronale Zellen

VEGF hat des Weiteren Einfluss auf das Überleben und die Neubildung von Neuronen und Astrozyten sowie die Aktivierung neuronaler Vorläuferzellen und besitzt somit auch eine neuroprotektive Wirkung (Licht *et al.*, 2011). Entgegen der Erwartungen zeigt sich kein signifikanter Unterschied in der neuronalen Dichte sowie in der Proliferation neuer Neurone zum Zeitpunkt 14 Tage bzw. 28 Tage nach dem ischämischen Insult einhergehend mit der VEGF Induktion. Die immunhistochemischen Färbungen der ipsilateralen Gehirnhälften (den

kortikalen Schlaganfall beinhaltend) verdeutlichen einen Untergang von Neuronen im Infarktkern in allen Mausgruppen gleichermaßen. Eine Proliferation neuer Zellen (Ki67-positive Zellen) war in diesem Bereich nicht zu erkennen. Direkt angrenzend, in der sogenannten Perinfarktregion befand sich jedoch eine sichtbare Proliferation sowie eine deutlich erhöhte Anzahl an aktivierten Astrozyten. Im Bereich des Infarktes konnte ein Untergang von Neuronen und somit eine reduzierte Dichte festgestellt werden. Bei allen Tieren wies der Bereich des Schlaganfalls eine erhöhte Dichte an aktivierten Astrozyten auf. In anderen Hirnarealen war jedoch kein Unterschied zu erkennen. In einer Studie von Licht *et al.* (2011) war neben des ausgeprägten proangiogenetischen Effekts von VEGF auch eine signifikant erhöhte Neurogenese in den GOF-Tieren gezeigt worden. In den Untersuchungen von Licht *et al.* (2011) wurde die erhöhte Neurogenese jedoch erst nach mehr als 40 Tagen nach VEGF Induktion gemessen, so dass in der hier präsentierten Studie das Zeitfenster vermutlich zu kurz war. Unabhängig von VEGF ist darüber hinaus zu sagen, dass experimentelle Daten von Huttner *et al.* (2014) zeigen, dass eine hippocampale Neurogenese nach proximaler Ischämie stattfindet, es jedoch keine Hinweise für eine adulte Neurogenese im Kortex nach kortikaler Ischämie gibt.

4.2. Kritische Betrachtungen

Allgemeine Kritikpunkte

Die durch Tiermodelle gewonnenen Erkenntnisse lassen sich nur eingeschränkt auf die Pathophysiologie und den klinischen Verlauf beim Menschen übertragen. Das liegt vor allem an nicht beeinflussbaren Speziesunterschieden. Weiterhin wurde in der vorliegenden Studie ein bi-transgenes Mausmodell verwendet, was sicherlich die Vergleichbarkeit mit der humanen, klinischen Situation zusätzlich erschwert.

Neben allgemeinen Speziesunterschieden kann das dMCAo Modell in der Maus einen thromboembolischen Verschluss beim Menschen nicht vollständig abbilden (Krafft *et al.*, 2012). Darüber hinaus treten Schlaganfälle beim Menschen mit gehäufter Inzidenz bei älteren Menschen mit Komorbiditäten auf (O'Donnell *et al.*, 2010). In der durchgeführten Studie wurden allerdings lediglich junge Tiere ohne bekannte Grund- oder Begleiterkrankungen verwendet.

Im Folgenden sollen die Schwächen der vorliegenden Studien diskutiert werden:

Magnetresonanztomographische Auswertung

Die Induktion der distalen MCAO ist eine sensible Operationsmethode und kleine Veränderungen bzw. Abweichungen führen zu unterschiedlich ausgeprägten Infarkten und somit Untersuchungsergebnissen. Daher muss sichergestellt werden, dass alle Schritte der dMCAO standardisiert und eingehalten werden, worauf in der hier dargestellten Untersuchung großer Wert gelegt wurde. Mittels MRT-Aufnahmen und der Auswertung der Infarktvolumina konnte gezeigt werden, dass kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Versuchstieren der jeweiligen Gruppen besteht und die Methode der dMCAO gut reproduzierbar ist. Unterschiede zwischen GOF und LOF (dLV) könnten zum Teil auf eine nicht gleichzeitige Operationsdurchführung zurückgeführt werden.

Aufgrund einer eingeschränkten, im Vergleich aber exzellenten Auflösung der genutzten MRT ist eine genaue Abgrenzung aller Strukturen des Gehirns nicht vollständig möglich. Die Lagerung und Positionierung der Mäuse im MRT kann zum Teil zu asymmetrischen Bildaufnahmen führen. Da sich der Infarkt nach dMCAO nur auf die ipsilaterale Seite beschränkt, ist somit ein Hemisphärenvergleich nur eingeschränkt möglich.

In der durchgeführten Studie konnte kein Effekt von VEGF auf die Infarktgröße nachgewiesen werden. Wie bereits weiter oben diskutiert, sind die Applikationsart sowie die Konzentration und der Zeitpunkt der Einwirkung von VEGF auf den Organismus

entscheidend für den Effekt von VEGF. Diese Annahme wurde bereits 2003 in einer Arbeit diskutiert (Sun *et al.*, 2003). Im durchgeführten Versuch wurde das transgene VEGF-Modell GOF oder LOF erst am Tag der dMCAO aktiviert, sodass an Tag 1 und 4 der Untersuchung mittels MRT von noch keiner signifikanten Beeinflussung des Gewebes durch VEGF auszugehen ist.

Immunhistochemische Auswertung

Bei der Anfertigung von histologischen Schnitten mit dem Kryotom gewährleistet die Schnitttechnik keine absolute Symmetrie, sodass ein Vergleich der Hemisphären nur eingeschränkt möglich ist. Des Weiteren war eine Identifizierung der Infarktregion sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch teilweise nur schwer möglich, da trotz sehr geringer Schichtdicke keine eindeutigen Infarktgrenzen zu den Zeitpunkten 14 und 28 Tage nach zerebraler Ischämie ersichtlich waren. Dies kann zum Teil durch kleine Infarktvolumina und der bereits eingesetzten regenerativen Prozesse des Gehirngewebes am Tag 14 bzw. 28 erklärt werden.

4.3. Ausblick

Präkonditionierung

In der durchgeführten Arbeit wurden bei den bi-transgenen Mäusen am selben Tag wie die Induktion eines kortikalen Schlaganfalls durch dMCAO in den VEGF-LOF bzw. GOF Modus gebracht. Um die Wirkung von VEGF auf die Angiogenese, Neurogenese und Neuroprotektion nach dMCAO weiter zu untersuchen, sollen in einem weiteren Projekt VEGF-LOF bzw. GOF als Präkonditionierung schon Tage bis Wochen vor dem ischämischen Insult induziert werden. Damit die Ergebnisse vergleichbar sind, soll der restliche Versuchsaufbau dem hier durchgeführten Projekt angepasst sein. Des Weiteren sind Modelle der Präkonditionierung mit VEGF off-on-off Intervallen denkbar bei denen sowohl die VEGF Überexpression, als auch die Blockade von VEGF in den LOF-Tieren über bestimmte Zeiträume an oder aus reguliert werden können. Dadurch wäre es möglich, den VEGF vermittelten proangiogenetischen Effekt bei normaler VEGF Expression zu untersuchen.

Verhaltenstests

Die Ergebnisse der Untersuchungen sowie die Auswirkung von VEGF auf die Erholung des Gehirns und die körperliche Funktionalität nach einem Schlaganfall soll darüber hinaus durch eine Reihe von Verhaltenstests wie zum Beispiel Ganganalysen, Rotarod-Test, Pole-Test, Leitersprossen-Test usw. genauer untersucht werden. Einschränkend muss dazu jedoch gesagt werden, dass bereits durchgeführte Studien gezeigt haben, dass Mäuse Verhaltenstests in der akuten bis subakuten Phase nach proximaler MCAO deutlich schlechter bewältigen als Mäuse ohne Schlaganfall. Bei Langzeitstudien in der chronischen Phase nach proximaler MCAO ergaben etablierte Verhaltenstests jedoch keine signifikanten Unterschiede. Außerdem ist die Sensitivität von Verhaltenstests bei distaler MCAO aufgrund des vergleichsweise kleinen Infarktvolumens eingeschränkt und daher sowohl in Kurzzeit- als auch in Langzeitstudien nicht jeder Test geeignet (Freret *et al.*, 2009, Balkaya *et al.*, 2013a, Balkaya *et al.*, 2013b, Rosell *et al.*, 2013).

Schädelfenster (Cranial Window)

Zur näheren Charakterisierung und Untersuchung der Wirkung von VEGF auf die Morphologie und Funktionalität der Gefäße im Gebiet des Schlaganfalls sowie in der Penumbra wird von einem weiteren Projekt die sogenannte *Cranial Window* Methode angewendet. Hierbei ermöglicht ein Schädelfenster im Bereich des kortikalen Schlaganfalls die Intravitalmikroskopie. Über das Schädelfenster kann vitales Gewebe mikroskopiert und so Veränderungen im Gefäßnetz sowie der Gefäßfunktionalität untersucht werden.

5. Zusammenfassung

Die Rolle des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF) in Angiogenese und Neurogenese mithilfe eines experimentellen Schlaganfall-Maus-Modells.

Der Schlaganfall stellt weltweit eine der häufigsten Todesursachen dar und führt häufig zu einer lebenslangen Behinderung und Hilfsbedürftigkeit im Erwachsenenalter, was die hohe sozioökonomische Bedeutung des Schlaganfalls bedingt.

Jenseits rekanalisierender Maßnahmen sind jegliche Ansätze mit dem Ziel, in der Akutphase des Schlaganfalls medikamentös zu intervenieren gescheitert. Daher konzentriert sich die Schlaganfallforschung aktuell vor allem auf die subakute- sowie chronische Phase nach Schlaganfall (Endres *et al.*, 2008). Insbesondere die Schädigung des Gefäßsystems spielt nach Schlaganfall eine entscheidende Rolle. Neuroprotektion und Regeneration durch Wiederherstellung und Stabilisierung der vaskulären Integrität stellen dabei sicherlich einen der vielversprechendsten Ansätze dar.

Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF) ist bekanntermaßen ein hochpotenter proangiogener und neuroprotektiver Faktor. Jedoch wird beim Schlaganfall der Einfluss von VEGF aufgrund der VEGF vermittelten Störung der Blut-Hirn-Schranke, dadurch gesteigerter Ödementwicklung, erhöhter Inflammation und letztlich schlechterer Prognose sehr ambivalent diskutiert. Der Zeitpunkt sowie die Route der VEGF-Applikation scheint hier unter anderem eine entscheidende Rolle zu spielen (Hermann *et al.*, 2009, Geiseler *et al.*, 2018). Aus klinischer Sicht ist VEGF v.a. als Therapieansatz nach Schlaganfall hochinteressant.

Ziel der Studie war daher, die Wirkung von VEGF auf das Schlaganfallvolumen und die Ödementwicklung sowie den Effekt auf die vaskuläre Umgestaltung nach Schlaganfall zu untersuchen.

Methodisch wurde ein etabliertes Modell zur Okklusion der distalen *Arteria cerebri media* (dMCAO) benutzt. Ein einzigartiges bi-transgenes Mausmodell ermöglichte die konditionale und hirnspezifische VEGF-Expression, sog. GOF- Tiere sowie eine Inhibition von VEGF durch Expression eines Decoy-Rezeptors, sog. LOF- Tiere (Licht *et al.*, 2011). VEGF wurde in der subakuten Phase nach Schlaganfall induziert bzw. geblockt. Das Schlaganfallvolumen wurde mittels MRT zum Zeitpunkt 24 h und 96 h bestimmt, die immunhistochemische Auswertung erfolgte zum Zeitpunkt 14 und 28 Tage nach Schlaganfall.

Die Auswertung der MRT Untersuchungen zeigte weder Unterschiede in der Infarktgröße noch der Ödementwicklung zwischen den GOF- und LOF-Tieren. Die immunhistochemischen Auswertungen mit Ki67/CD31 zeigten dahingegen in den GOF-Tieren in allen Hirnarealen und unabhängig von der Hemisphäre einen signifikanten Anstieg

an proliferierenden Endothelzellen und somit eine signifikant erhöhte Dichte an Blutgefäßen. In LOF-Tieren blieb das Gefäßnetz trotz VEGF- Blockade erhalten und so fanden sich zu den Kontrolltieren keine signifikanten Unterschiede in der Gefäßdichte. Die Auswertung von CD31- sowie Desmin-positiven Zellen zeigte sowohl kortikal, als auch striatal eine hohe Perizyten-Endothelzell-Interaktion und somit Dichtigkeit der Gefäße. Unterschiede zwischen den Zeitpunkten 14 und 28 Tage nach Schlaganfall zeigten sich nicht.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Studie, dass die VEGF Überexpression in der subakuten Phase nach Schlaganfall weder die Läsionsgröße noch Ödementwicklung negativ beeinflusst. Mit dem hier vorgestellten multimodalen Ansatz konnte gezeigt werden, dass VEGF zu einem robusten proangiogenen Effekt führt, einhergehend mit einer hohen Perizyten-Endothelzell-Interaktion. Die Gabe von VEGF in der subakuten Phase nach Schlaganfall kann daher als ein vielversprechender therapeutischer Ansatz angesehen werden.

6. Summary

The role of the vascular endothelial growth factor (VEGF) in angiogenesis and neurogenesis following distal middle cerebral artery occlusion in mice.

Stroke is among the most common causes of death and morbidity worldwide. As stroke very often leads to lifelong disability, its socioeconomic burden is highly relevant.

So far, beyond actions for recanalization, any type of approach going on for drug intervention in the acute phase of stroke failed. Therefore, stroke research is currently concentrating on the subacute and chronic phase after stroke (Endres *et al.*, 2008). The damage and impairment of the vascular system plays an important role after stroke. Thus, neuroprotection and regeneration via restoration and stabilisation of the vascular integrity are certainly among the most promising approaches.

The vascular endothelial growth factor (VEGF) is a well known highly potent proangiogenic and neuroprotective factor. However, VEGF may also cause disturbances of the blood brain barrier, increased edema development, aggravate inflammation and finally may be associated with a poorer outcome in ischemic stroke. This causes conflicting discussions about the effects of VEGF. The time point as well as the route of VEGF application seem to play an important role for VEGF mediated effects (Hermann *et al.*, 2009, Geiseler *et al.*, 2018). From a clinical point of view, VEGF is highly interesting as a therapeutic approach especially after stroke.

The aim of the study was to investigate the effect of VEGF on stroke volume, edema development as well as the effect on vascular remodelling in the subacute phase after stroke.

A unique bi-transgenic mouse model enabled the conditional and brain specific VEGF expression in so called GOF animals while the inhibition of VEGF through the expression of a decoy receptor in so called LOF animals (Licht *et al.*, 2011). Distal middle cerebral artery occlusion (dMCAO) was induced using a well established murine model. VEGF was induced or blocked in the subacute phase after stroke. The stroke volume was assessed by magnetic resonance imaging (MRI) 24 and 96 hours after ischemia. Immunohistochemical analysis was performed 14 and 28 days after stroke.

The analysis of the MRI studies showed neither a difference between the infarct size nor the evolution of edema between GOF and LOF animals. The immunohistochemical analysis with Ki67/CD31 in GOF animals revealed a significant increase in proliferating endothelial cells in all brain areas and a significant higher number of vessels. Despite the VEGF-blockage in LOF animals the vascular network maintained unchanged comparing the number of vessels from LOF and control animals. Analysis of CD31 and desmin positive cells showed very high

pericyte and endothelial cell interaction and thus no leaky vessels. This was observed in the cortex as well as in the striatum. There were no differences between the time points 14 and 28 days after stroke.

In summary the results of this study show that VEGF overexpression in the subacute phase after stroke does neither influence the size of the ischemic lesion nor the evolution of edema in a negative way. With the presented multimodal approach it was possible to clearly show that VEGF induces a robust proangiogenic effect. The administration of VEGF in the subacute phase after stroke is a promising therapeutical approach.

7. Literaturverzeichnis

- Adams, H., Adams, R., Del Zoppo, G., Goldstein, L.B., Stroke Council of the American Heart, A. and American Stroke, A. (2005). Guidelines for the early management of patients with ischemic stroke: 2005 guidelines update a scientific statement from the Stroke Council of the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke* **36**, 916-923.
- Adeoye, O., Hornung, R., Khatri, P. and Kleindorfer, D. (2011). Recombinant Tissue-Type Plasminogen Activator Use for Ischemic Stroke in the United States: A Doubling of Treatment Rates Over the Course of 5 Years. *Stroke* **42(7)**, 1952-1955.
- Albers, G.W. (1999). Expanding the window for thrombolytic therapy in acute stroke. The potential role of acute MRI for patient selection. *Stroke* **30**, 2230-2237.
- Allt, G. and Lawrenson, J.G. (2001). Pericytes: cell biology and pathology. *Cells Tissues Organs* **169**, 1-11.
- Altman, J. (1969). Autoradiographic and histological studies of postnatal neurogenesis. 3. Dating the time of production and onset of differentiation of cerebellar microneurons in rats. *J Comp Neurol* **136**, 269-293.
- Amantea, D., Nappi, G., Bernardi, G., Bagetta, G. and Corasaniti, M.T. (2009). Post-ischemic brain damage: pathophysiology and role of inflammatory mediators. *FEBS J* **276**, 13-26.
- Arvidsson, A., Collin, T., Kirik, D., Kokaia, Z. and Lindvall, O. (2002). Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nat Med* **8**, 963-970.
- Audebert, H.J. and Fiebich, J.B. (2015). Brain imaging in acute ischemic stroke-MRI or CT? *Curr Neurol Neurosci Rep* **15**, 6.
- Bagley, R.S., Anderson, W.I., de Lahunta, A., Kallfelz, F.A. and Bowersox, T.S. (1988). Cerebellar infarction caused by arterial thrombosis in a dog. *J Am Vet Med Assoc* **192**, 785-787.
- Balkaya, M., Krober, J., Gertz, K., Peruzzaro, S. and Endres, M. (2013a). Characterization of long-term functional outcome in a murine model of mild brain ischemia. *J Neurosci Methods* **213**, 179-187.
- Balkaya, M., Krober, J.M., Rex, A. and Endres, M. (2013b). Assessing post-stroke behavior in mouse models of focal ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* **33**, 330-338.

- Bansal, S., Sangha, K.S. and Khatri, P. (2013). Drug treatment of acute ischemic stroke. *Am J Cardiovasc Drugs* **13**, 57-69.
- Bao, W.L., Lu, S.D., Wang, H. and Sun, F.Y. (1999). Intraventricular vascular endothelial growth factor antibody increases infarct volume following transient cerebral ischemia. *Zhongguo yao li xue bao = Acta pharmacologica Sinica* **20**, 313-318.
- Beck, H. and Plate, K.H. (2009). Angiogenesis after cerebral ischemia. *Acta Neuropathol* **117**, 481-496.
- Benjamin, L.E., Hemo, I. and Keshet, E. (1998). A plasticity window for blood vessel remodelling is defined by pericyte coverage of the preformed endothelial network and is regulated by PDGF-B and VEGF. *Development (Cambridge, England)* **125**, 1591-1598.
- Berg, J.M. and Joseph, R.J. (2003). Cerebellar infarcts in two dogs diagnosed with magnetic resonance imaging. *J Am Anim Hosp Assoc* **39**, 203-207.
- Bergers, G. and Song, S. (2005). The role of pericytes in blood-vessel formation and maintenance. *Neuro Oncol* **7**, 452-464.
- Bogousslavsky, J., Van Melle, G. and Regli, F. (1988). The Lausanne Stroke Registry: analysis of 1,000 consecutive patients with first stroke. *Stroke* **19**, 1083-1092.
- Bostrom, M., Hellstrom Erkenstam, N., Kaluza, D., Jakobsson, L., Kalm, M. and Blomgren, K. (2014). The hippocampal neurovascular niche during normal development and after irradiation to the juvenile mouse brain. *Int J Radiat Biol* **90**, 778-789.
- Brazzelli, M., Sandercock, P.A., Chappell, F.M., Celani, M.G., Righetti, E., Arestis, N., *et al.* (2009). Magnetic resonance imaging versus computed tomography for detection of acute vascular lesions in patients presenting with stroke symptoms. *Cochrane Database Syst Rev*, CD007424.
- California Acute Stroke Pilot Registry, I. (2005). Prioritizing interventions to improve rates of thrombolysis for ischemic stroke. *Neurology* **64**, 654-659.
- Carmeliet, P. and Jain, R.K. (2011). Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* **473**, 298-307.
- Carmeliet, P. and Ruiz de Almodovar, C. (2013). VEGF ligands and receptors: implications in neurodevelopment and neurodegeneration. *Cell Mol Life Sci* **70**, 1763-1778.

- Carmeliet, P. and Tessier-Lavigne, M. (2005). Common mechanisms of nerve and blood vessel wiring. *Nature* **436**, 193-200.
- Carmichael, S.T. (2003). Gene expression changes after focal stroke, traumatic brain and spinal cord injuries. *Curr Opin Neurol* **16**, 699-704.
- Chen, J. and Chopp, M. (2006). Neurorestorative treatment of stroke: cell and pharmacological approaches. *NeuroRx* **3**, 466-473.
- Chen, S.T., Hsu, C.Y., Hogan, E.L., Maricq, H. and Balentine, J.D. (1986). A model of focal ischemic stroke in the rat: reproducible extensive cortical infarction. *Stroke* **17**, 738-743.
- Cherubini, G.B., Rusbridge, C., Singh, B.P., Schoeniger, S. and Mahoney, P. (2007). Rostral cerebellar arterial infarct in two cats. *J Feline Med Surg* **9**, 246-253.
- Ciccone, A., Sterzi, R., Munari, L., Angelucci, F., Anticoli, S., Arciprete, F., *et al.* (2007). MRI versus CT in acute stroke. *Lancet* **369**, 1342-1343.
- Conway, E.M., Collen, D. and Carmeliet, P. (2001). Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovasc Res* **49**, 507-521.
- Crowell, R.M., Marcoux, F.W. and DeGirolami, U. (1981). Variability and reversibility of focal cerebral ischemia in unanesthetized monkeys. *Neurology* **31**, 1295-1302.
- Davis, S.M. and Donnan, G.A. (2012). Clinical practice. Secondary prevention after ischemic stroke or transient ischemic attack. *N Engl J Med* **366**, 1914-1922.
- Defazio, R.A., Levy, S., Morales, C.L., Levy, R.V., Dave, K.R., Lin, H.W., *et al.* (2011). A protocol for characterizing the impact of collateral flow after distal middle cerebral artery occlusion. *Transl Stroke Res* **2**, 112-127.
- Diener, H.C., Aichner, F., Bode, C., Bohm, M., Eckstein, H.H., Einhaupl, K., *et al.* (2010). Primary and secondary prevention of cerebral ischemia Joint Guidelines of the German Society of Neurology (DGN) and German Stroke Society (DSG). *Aktuelle Neurologie* **37**, E2-E22.
- Dirnagl, U., Iadecola, C. and Moskowitz, M.A. (1999). Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* **22**, 391-397.
- Dirnagl, U., Simon, R.P. and Hallenbeck, J.M. (2003). Ischemic tolerance and endogenous neuroprotection. *Trends Neurosci* **26**, 248-254.

- Donnan, G.A., Fisher, M., Macleod, M. and Davis, S.M. (2008). Stroke. *Lancet* **371**, 1612-1623.
- Dor, Y., Djonov, V., Abramovitch, R., Itin, A., Fishman, G.I., Carmeliet, P., *et al.* (2002). Conditional switching of VEGF provides new insights into adult neovascularization and pro-angiogenic therapy. *EMBO J* **21**, 1939-1947.
- Doyle, K.P. and Buckwalter, M.S. (2014). A mouse model of permanent focal ischemia: distal middle cerebral artery occlusion. *Methods Mol Biol* **1135**, 103-110.
- Easton, J.D. (2011). Antithrombotic management for transient ischemic attack and ischemic stroke (other than atrial fibrillation). *Curr Atheroscler Rep* **13**, 314-320.
- Easton, J.D., Saver, J.L., Albers, G.W., Alberts, M.J., Chaturvedi, S., Feldmann, E., *et al.* (2009). Definition and evaluation of transient ischemic attack: a scientific statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association Stroke Council; Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia; Council on Cardiovascular Radiology and Intervention; Council on Cardiovascular Nursing; and the Interdisciplinary Council on Peripheral Vascular Disease. The American Academy of Neurology affirms the value of this statement as an educational tool for neurologists. *Stroke* **40**, 2276-2293.
- Ebinger, M., Winter, B., Wendt, M., Weber, J.E., Waldschmidt, C., Rozanski, M., *et al.* (2014). Effect of the use of ambulance-based thrombolysis on time to thrombolysis in acute ischemic stroke: a randomized clinical trial. *Jama* **311**, 1622-1631.
- Edlow, J.A. (2011). Evidence-based guideline: the role of diffusion and perfusion MRI for the diagnosis of acute ischemic stroke: report of the Therapeutics and Technology Subcommittee of the American Academy of Neurology. *Neurology* **76**, 2036; author reply 2038.
- Eichmann, A., Le Noble, F., Autiero, M. and Carmeliet, P. (2005). Guidance of vascular and neural network formation. *Curr Opin Neurobiol* **15**, 108-115.
- Endres, M. and Dirnagl, U. (2002). Ischemia and stroke. *Adv Exp Med Biol* **513**, 455-473.
- Endres, M., Engelhardt, B., Koistinaho, J., Lindvall, O., Meairs, S., Mohr, J.P., *et al.* (2008). Improving outcome after stroke: overcoming the translational roadblock. *Cerebrovasc Dis* **25**, 268-278.

- Endres, M., Heuschmann, P., Laufs, U. and Hakim, A.M. (2011). Primary prevention of stroke: blood pressure, lipids, and heart failure. *Eur Heart J* **32**, 545–555.
- Engel, O., Kolodziej, S., Dirnagl, U. and Prinz, V. (2011). Modeling stroke in mice - middle cerebral artery occlusion with the filament model. *J Vis Exp* **47**, e2423.
- European Registers of Stroke, I., Heuschmann, P.U., Di Carlo, A., Bejot, Y., Rastenyte, D., Ryglewicz, D., *et al.* (2009). Incidence of stroke in Europe at the beginning of the 21st century. *Stroke* **40**, 1557-1563.
- Font, M.A., Arboix, A. and Krupinski, J. (2010). Angiogenesis, neurogenesis and neuroplasticity in ischemic stroke. *Curr Cardiol Rev* **6**, 238-244.
- Freret, T., Bouet, V., Leconte, C., Roussel, S., Chazalviel, L., Divoux, D., *et al.* (2009). Behavioral deficits after distal focal cerebral ischemia in mice: Usefulness of adhesive removal test. *Behav Neurosci* **123**, 224-230.
- Garosi, L. (2010). Cerebrovascular Disease in Dogs and Cats. *Vet Clin Small Anim* **40**, 65–79.
- Garosi, L., McConnell, J.E., Platt, S.R., Barone, G., Baron, J.C., de Lahunta, A. and Schatzberg, S.J. (2005a). Results of diagnostic investigations and long-term outcome of 33 dogs with brain infarction (2000-2004). *J Vet Intern Med* **19**, 725-731.
- Garosi, L., McConnell, J.F., Platt, S.R., Barone, G., Baron, J.C., de Lahunta, A. and Schatzberg, S.J. (2006). Clinical and topographic magnetic resonance characteristics of suspected brain infarction in 40 dogs. *J Vet Intern Med* **20**, 311-321.
- Garosi, L.S. and McConnell, J.F. (2005b). Ischaemic stroke in dogs and humans: a comparative review. *J Small Anim Pract* **46**, 521-529.
- Geiseler, S.J. and Morland, C. (2018). The Janus Face of VEGF in Stroke. *Int J Mol Sci* **19**.
- Gerhardt, H., Golding, M., Fruttiger, M., Ruhrberg, C., Lundkvist, A., Abramsson, A., *et al.* (2003). VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J Cell Biol* **161**, 1163-1177.
- Gesundheitsberichterstattung-Bund (2019). Gesundheitsberichterstattung Bund: Indikator 25 der ECHI shortlist: Fallrate von Schlaganfällen (tödlich und nicht-tödlich) je 100.000 Einwohner http://www.gbe-bund.de/oowa921-install/servlet/oowa/aw92/dboowasys921.xwdevkit/xwd_init?gbe.isgbetol/xs_start_ne

u/&p_aid=3&p_aid=22207672&nummer=803&p_sprache=D&p_indsp=-
&p_aid=46684503 [abgerufen am 10.09.2019].

- Giles, M.F., Albers, G.W., Amarenco, P., Arsava, E.M., Asimos, A.W., Ay, H., *et al.* (2011). Early stroke risk and ABCD2 score performance in tissue- vs time-defined TIA: a multicenter study. *Neurology* **77**, 1222-1228.
- Giles, M.F. and Rothwell, P.M. (2007). Risk of stroke early after transient ischaemic attack: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Neurol* **6**, 1063-1072.
- Go, A.S., Mozaffarian, D., Roger, V.L., Benjamin, E.J., Berry, J.D., Blaha, M.J., *et al.* (2014). Heart disease and stroke statistics--2014 update: a report from the American Heart Association. *Circulation* **129**, e28-e292.
- Gonzalez, R.G. (2012). Clinical MRI of acute ischemic stroke. *J Magn Reson Imaging* **36**, 259-271.
- Gould, E., Beylin, A., Tanapat, P., Reeves, A. and Shors, T.J. (1999a). Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. *Nat Neurosci* **2**, 260-265.
- Gould, E. and Gross, C.G. (2002). Neurogenesis in adult mammals: some progress and problems. *J Neurosci* **22**, 619-623.
- Gould, E. and Tanapat, P. (1999b). Stress and hippocampal neurogenesis. *Biol Psychiatry* **46**, 1472-1479.
- Gredal, H., Toft, N., Westrup, U., Motta, L., Gideon, P., Arlien-Søborg, P., *et al.* (2013). Survival and clinical outcome of dogs with ischaemic stroke. *Vet J* **196**, 408–413.
- Greenberg, D.A. and Jin, K. (2005). From angiogenesis to neuropathology. *Nature* **438**, 954-959.
- Hacke, W. and Diener, H.C. (2015). Mechanische Thrombektomie bei akutem ischämischem Schlaganfall: Wo stehen wir nach den jüngsten Studienergebnissen? *Nervenarzt* **86**, 719–724.
- Hacke, W., Kaste, M., Bluhmki, E., Brozman, M., Davalos, A., Guidetti, D., *et al.* (2008). Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. *N Engl J Med* **359**, 1317-1329.
- Hakim, A.M. (1998). Ischemic penumbra: the therapeutic window. *Neurology* **51**, 44-46.

- Han, H.S. and Suk, K. (2005). The function and integrity of the neurovascular unit rests upon the integration of the vascular and inflammatory cell systems. *Curr Neurovasc Res* **2**, 409-423.
- Harrigan, M.R. (2003). Angiogenic factors in the central nervous system. *Neurosurgery* **53**, 639-660; discussion 660-631.
- Hayashi, T., Noshita, N., Sugawara, T. and Chan, P.H. (2003). Temporal profile of angiogenesis and expression of related genes in the brain after ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* **23**, 166-180.
- Hecht, S. and Adams, W.H. (2010). MRI of Brain Disease in Veterinary Patients Part 2: Acquired Brain Disorders. *Veterinary Clinic Small Animals* **40**, 39–63.
- Hefzy, H., Neil, E., Penstone, P., Mahan, M., Mitsias, P. and Silver, B. (2013). The Addition of MRI to CT Based Stroke and TIA Evaluation Does Not Impact One year Outcomes. *Open Neurol J* **7**, 17-22.
- Hermann, D.M. and Chopp, M. (2012). Promoting brain remodelling and plasticity for stroke recovery: therapeutic promise and potential pitfalls of clinical translation. *Lancet Neurol* **11**, 369-380.
- Hermann, D.M. and Zechariah, A. (2009). Implications of vascular endothelial growth factor for postischemic neurovascular remodeling. *J Cereb Blood Flow Metab* **29**, 1620-1643.
- Holloway, P.M. and Gavins, F.N.E. (2016). Modeling Ischemic Stroke In Vitro: The Status Quo and Future Perspectives. *Stroke* **47(2)**, 561–569.
- Howells, D.W., Porritt, M.J., Rewell, S.S., O'Collins, V., Sena, E.S., van der Worp, H.B., *et al.* (2010). Different strokes for different folks: the rich diversity of animal models of focal cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* **30**, 1412-1431.
- Hsia, A.W. (2009). 10 questions about acute stroke imaging: CT versus MRI--"the controversy". *Neurologist* **15**, 105-107.
- Huttner, H.B., Bergmann, O., Salehpour, M., Rácz, A., Tatarishvili, J., Lindgren, E., *et al.* (2014). The age and genomic integrity of neurons after cortical stroke in humans. *Nat Neurosci* **17**, 801-803.
- Irwin, J.C., Dewey, C.W. and Stefanacci, J.D. (2007). Suspected cerebellar infarcts in 4 dogs. *J Vet Emerg Crit Car* **17**, 268-274.

- Issa, R., Krupinski, J., Bujny, T., Kumar, S., Kaluza, J. and Kumar, P. (1999). Vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, in human brain tissue after ischemic stroke. *Lab Invest* **79**, 417-425.
- Jauch, E.C., Saver, J.L., Adams, H.P., Jr., Bruno, A., Connors, J.J., Demaerschalk, B.M., *et al.* (2013). Guidelines for the early management of patients with acute ischemic stroke: a guideline for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke* **44**, 870-947.
- Jin, K., Minami, M., Lan, J.Q., Mao, X.O., Bateur, S., Simon, R.P. and Greenberg, D.A. (2001). Neurogenesis in dentate subgranular zone and rostral subventricular zone after focal cerebral ischemia in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 4710-4715.
- Jin, K., Wang, X., Xie, L., Mao, X.O., Zhu, W., Wang, Y., *et al.* (2006). Evidence for stroke-induced neurogenesis in the human brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 13198-13202.
- Kanemitsu, H., Nakagomi, T., Tamura, A., Tsuchiya, T., Kono, G. and Sano, K. (2002). Differences in the extent of primary ischemic damage between middle cerebral artery coagulation and intraluminal occlusion models. *J Cereb Blood Flow Metab* **22**, 1196-1204.
- Karamysheva, A.F. (2008). Mechanisms of angiogenesis. *Biochemistry (Mosc)* **73**, 751-762.
- Kernie, S.G. and Parent, J.M. (2010). Forebrain neurogenesis after focal Ischemic and traumatic brain injury. *Neurobiol Dis* **37**, 267-274.
- Kidwell, C.S. and Wintermark, M. (2010). The role of CT and MRI in the emergency evaluation of persons with suspected stroke. *Curr Neurol Neurosci Rep* **10**, 21-28.
- Kolominsky-Rabas, P.L., Heuschmann, P.U., Marschall, D., Emmert, M., Baltzer, N., Neundorfer, B., *et al.* (2006). Lifetime cost of ischemic stroke in Germany: results and national projections from a population-based stroke registry: the Erlangen Stroke Project. *Stroke* **37**, 1179-1183.
- Krafft, P.R., Bailey, E.L., Lekic, T., Rolland, W.B., Altay, O., Tang, J., *et al.* (2012). Etiology of stroke and choice of models. *Int J Stroke* **7**, 398-406.
- Krupinski, J., Kaluza, J., Kumar, P., Kumar, S. and Wang, J.M. (1994). Role of angiogenesis in patients with cerebral ischemic stroke. *Stroke* **25**, 1794-1798.

- Kunz, A., Dirnagl, U. and Mergenthaler, P. (2010). Acute pathophysiological processes after ischaemic and traumatic brain injury. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol* **24**, 495-509.
- Kunz, A., Ebinger, M., Geisler, F., Rozanski, M., Waldschmidt, C., Weber, J.E., *et al.* (2016). Functional outcomes of pre-hospital thrombolysis in a mobile stroke treatment unit compared with conventional care: an observational registry study. *Lancet Neurol* **15**, 1035-1043.
- Kunz, A., Nolte, C.H., Erdur, H., Fiebach, J.B., Geisler, F., Rozanski, M., *et al.* (2017). Effects of Ultraearly Intravenous Thrombolysis on Outcomes in Ischemic Stroke: The STEMO (Stroke Emergency Mobile) Group. *Circulation* **135**, 1765-1767.
- Kuraoka, M., Furuta, T., Matsuwaki, T., Omatsu, T., Ishii, Y., Kyuwa, S. and Yoshikawa, Y. (2009). Direct experimental occlusion of the distal middle cerebral artery induces high reproducibility of brain ischemia in mice. *Exp Anim* **58**, 19-29.
- Küpper, C., Kellert, L., Tiedt, S. and Wollenweber, F.A. (2017). [New oral anticoagulants (NOAC) in stroke treatment]. *Fortschr Neurol Psychiatr* **86(2)**, 117-124.
- Ledezma, C.J., Fiebach, J.B. and Wintermark, M. (2009). Modern imaging of the infarct core and the ischemic penumbra in acute stroke patients: CT versus MRI. *Expert Rev Cardiovasc Ther* **7**, 395-403.
- Li, Z., Mericskay, M., Agbulut, O., Butler-Browne, G., Carlsson, L., Thornell, L.E., *et al.* (1997). Desmin is essential for the tensile strength and integrity of myofibrils but not for myogenic commitment, differentiation, and fusion of skeletal muscle. *J Cell Biol* **139**, 129-144.
- Licht, T., Goshen, I., Avital, A., Kreisel, T., Zubedat, S., Eavri, R., *et al.* (2011). Reversible modulations of neuronal plasticity by VEGF. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 5081-5086.
- Licht, T. and Keshet, E. (2013). Delineating multiple functions of VEGF-A in the adult brain. *Cell Mol Life Sci* **70**, 1727-1737.
- Licht, T. and Keshet, E. (2015). The vascular niche in adult neurogenesis. *Mechanisms of development* **138 Pt 1**, 56-62.
- Liman, T.G. and Endres, M. (2012). New vessels after stroke: postischemic neovascularization and regeneration. *Cerebrovasc Dis* **33**, 492-499.

- Lledo, P.M., Merkle, F.T. and Alvarez-Buylla, A. (2008). Origin and function of olfactory bulb interneuron diversity. *Trends Neurosci* **31**, 392-400.
- Llovera, G., Roth, S., Plesnila, N., Veltkamp, R. and Liesz, A. (2014). Modeling stroke in mice: permanent coagulation of the distal middle cerebral artery. *J Vis Exp* **e51729**.
- Lovblad, K.O., Altrichter, S., Mendes Pereira, V., Vargas, M., Marcos Gonzalez, A., Haller, S. and Sztajzel, R. (2015). Imaging of acute stroke: CT and/or MRI. *J Neuroradiol* **42**, 55-64.
- Ma, Y., Zechariah, A., Qu, Y. and Hermann, D.M. (2012). Effects of vascular endothelial growth factor in ischemic stroke. *J Neurosci Res* **90**, 1873-1882.
- Macas, J., Nern, C., Plate, K.H. and Momma, S. (2006). Increased generation of neuronal progenitors after ischemic injury in the aged adult human forebrain. *J Neurosci* **26**, 13114-13119.
- Manoonkitiwongsa, P.S., Schultz, R.L., McCreery, D.B., Whitter, E.F. and Lyden, P.D. (2004). Neuroprotection of ischemic brain by vascular endothelial growth factor is critically dependent on proper dosage and may be compromised by angiogenesis. *J Cereb Blood Flow Metab* **24**, 693-702.
- Markgraf, C.G., Kraydieh, S., Prado, R., Watson, B.D., Dietrich, W.D. and Ginsberg, M.D. (1993). Comparative histopathologic consequences of photothrombotic occlusion of the distal middle cerebral artery in Sprague-Dawley and Wistar rats. *Stroke* **24**, 286-292; discussion 292-283.
- Marti, H.J., Bernaudin, M., Bellail, A., Schoch, H., Euler, M., Petit, E. and Risau, W. (2000). Hypoxia-induced vascular endothelial growth factor expression precedes neovascularization after cerebral ischemia. *Am J Pathol* **156**, 965-976.
- Matsuzaki, H., Tamatani, M., Yamaguchi, A., Namikawa, K., Kiyama, H., Vitek, M.P., *et al.* (2001). Vascular endothelial growth factor rescues hippocampal neurons from glutamate-induced toxicity: signal transduction cascades. *FASEB J* **15**, 1218-1220.
- May, D., Gilon, D., Djonov, V., Itin, A., Lazarus, A., Gordon, O., *et al.* (2008). Transgenic system for conditional induction and rescue of chronic myocardial hibernation provides insights into genomic programs of hibernation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 282-287.

- Mayford, M., Bach, M.E., Huang, Y.Y., Wang, L., Hawkins, R.D. and Kandel, E.R. (1996). Control of memory formation through regulated expression of a CaMKII transgene. *Science* **274**, 1678-1683.
- Minger, S.L., Ekonomou, A., Carta, E.M., Chinoy, A., Perry, R.H. and Ballard, C.G. (2007). Endogenous neurogenesis in the human brain following cerebral infarction. *Regen Med* **2**, 69-74.
- Mirescu, C. and Gould, E. (2006). Stress and adult neurogenesis. *Hippocampus* **16**, 233-238.
- Moon, W.J., Na, D.G., Ryoo, J.W., Roh, H.G., Byun, H.S., Chon, Y.H. and Chung, E.C. (2005). Assessment of tissue viability using diffusion- and perfusion-weighted MRI in hyperacute stroke. *Korean J Radiol* **6**, 75-81.
- Morris, D.C., Yeich, T., Khalighi, M.M., Soltanian-Zadeh, H., Zhang, Z.G. and Chopp, M. (2003). Microvascular structure after embolic focal cerebral ischemia in the rat. *Brain Res* **972**, 31-37.
- Moskowitz, M.A., Lo, E.H. and Iadecola, C. (2010). The science of stroke: mechanisms in search of treatments. *Neuron* **67**, 181-198.
- Negrin, A., Gaitero, L. and Anor, S. (2009). Presumptive caudal cerebellar artery infarct in a dog: clinical and MRI findings. *J Small Anim Pract* **50**, 615-618.
- O'Brien, M.D. and Waltz, A.G. (1973). Transorbital approach for occluding the middle cerebral artery without craniectomy. *Stroke* **4**, 201-206.
- O'Donnell, M.J., Xavier, D., Liu, L., Zhang, H., Chin, S.L., Rao-Melacini, P., *et al.* (2010). Risk factors for ischaemic and intracerebral haemorrhagic stroke in 22 countries (the INTERSTROKE study): a case-control study. *Lancet* **376**, 112-123.
- Ohab, J.J., Fleming, S., Blesch, A. and Carmichael, S.T. (2006). A neurovascular niche for neurogenesis after stroke. *J Neurosci* **26**, 13007-13016.
- Palmer, T.D., Willhoite, A.R. and Gage, F.H. (2000). Vascular niche for adult hippocampal neurogenesis. *J Comp Neurol* **425**, 479-494.
- Parent, J.M., Vexler, Z.S., Gong, C., Derugin, N. and Ferriero, D.M. (2002). Rat forebrain neurogenesis and striatal neuron replacement after focal stroke. *Ann Neurol* **52**, 802-813.

- Platt, S.R. and Garosi, L. (2003). Canine cerebrovascular disease: do dogs have strokes? *J Am Anim Hosp Assoc* **39**, 337-342.
- Pretorius, E., Windberger, U.B., Oberholzer, H.M. and Auer, R.E. (2010). Comparative ultrastructure of fibrin networks of a dog after thrombotic ischaemic stroke. *Onderstepoort J Vet Res* **77**, E1-4.
- Reeves, M.J., Bushnell, C.D., Howard, G., Gargano, J.W., Duncan, P.W., Lynch, G., *et al.* (2008). Sex differences in stroke: epidemiology, clinical presentation, medical care, and outcomes. *Lancet Neurol* **7**, 915-926.
- Reitmeir, R., Kilic, E., Reinboth, B.S., Guo, Z., ElAli, A., Zechariah, A., *et al.* (2012). Vascular endothelial growth factor induces contralesional corticobulbar plasticity and functional neurological recovery in the ischemic brain. *Acta Neuropathol* **123**, 273–284.
- Ringleb, P.A. and Veltkamp, R. (2015) Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie: Akuttherapie des ischämischen Schlaganfalls – Ergänzung 2015 - Rekanalisierende Therapie. Kommission Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Neurologie.
- Risau, W. (1997). Mechanisms of angiogenesis. *Nature* **386**, 671-674.
- Rocha, S.F., Schiller, M., Jing, D., Li, H., Butz, S., Vestweber, D., *et al.* (2014). Esm1 modulates endothelial tip cell behavior and vascular permeability by enhancing VEGF bioavailability. *Circ Res* **115**, 581-590.
- Rosell, A., Agin, V., Rahman, M., Morancho, A., Ali, C., Koistinaho, J., *et al.* (2013). Distal occlusion of the middle cerebral artery in mice: are we ready to assess long-term functional outcome? *Transl Stroke Res* **4**, 297-307.
- Schmidt, N.O., Koeder, D., Messing, M., Mueller, F.J., Aboody, K.S., Kim, S.U., *et al.* (2009). Vascular endothelial growth factor-stimulated cerebral microvascular endothelial cells mediate the recruitment of neural stem cells to the neurovascular niche. *Brain Res* **1268**, 24-37.
- Shimotake, J., Derugin, N., Wendland, M., Vexler, Z.S. and Ferriero, D.M. (2010). Vascular endothelial growth factor receptor-2 inhibition promotes cell death and limits endothelial cell proliferation in a neonatal rodent model of stroke. *Stroke* **41**, 343-349.

- Skold, M.K., Risling, M. and Holmin, S. (2006). Inhibition of vascular endothelial growth factor receptor 2 activity in experimental brain contusions aggravates injury outcome and leads to early increased neuronal and glial degeneration. *Eur J Neurosci* **23**, 21-34.
- Slevin, M., Kumar, P., Gaffney, J., Kumar, S. and Krupinski, J. (2006). Can angiogenesis be exploited to improve stroke outcome? Mechanisms and therapeutic potential. *Clin Sci (Lond)* **111**, 171-183.
- Small, D.L. and Buchan, A.M. (2000). Animal models. *Br Med Bull* **56**, 307-317.
- Sommer, C.J. (2017). Ischemic stroke: experimental models and reality. *Acta Neuropathol* **133**, 245–261.
- Sondell, M., Lundborg, G. and Kanje, M. (1999). Vascular endothelial growth factor has neurotrophic activity and stimulates axonal outgrowth, enhancing cell survival and Schwann cell proliferation in the peripheral nervous system. *J Neurosci* **19**, 5731-5740.
- Statistisches-Bundesamt (2019). Einwohnerzahl Deutschlands vom 31.12.2017 <https://www-genesis.destatis.de/genesis/online/link/tabelleErgebnis/12411-0001> [abgerufen am 10.09.2019].
- Stowe, A.M., Plautz, E.J., Nguyen, P., Frost, S.B., Eisner-Janowicz, I., Barbay, S., *et al.* (2008). Neuronal HIF-1 alpha protein and VEGFR-2 immunoreactivity in functionally related motor areas following a focal M1 infarct. *J Cereb Blood Flow Metab* **28**, 612-620.
- Sudlow, C. (2008). Preventing further vascular events after a stroke or transient ischaemic attack: an update on medical management. *Pract Neurol* **8**, 141-157.
- Sun, Y., Jin, K., Xie, L., Childs, J., Mao, X.O., Logvinova, A. and Greenberg, D.A. (2003). VEGF-induced neuroprotection, neurogenesis, and angiogenesis after focal cerebral ischemia. *J Clin Invest* **111**, 1843-1851.
- Swayne, D.E., Tyler, D.E. and Batker, J. (1988). Cerebral infarction with associated venous thrombosis in a dog. *Vet Pathol* **25**, 317-320.
- Tam, S.J. and Watts, R.J. (2010). Connecting vascular and nervous system development: angiogenesis and the blood-brain barrier. *Annu Rev Neurosci* **33**, 379-408.
- Tammela, T., Enholm, B., Alitalo, K. and Paavonen, K. (2005). The biology of vascular endothelial growth factors. *Cardiovasc Res* **65**, 550-563.

- Tamura, A., Graham, D.I., McCulloch, J. and Teasdale, G.M. (1981). Focal cerebral ischaemia in the rat: 1. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab* **1**, 53-60.
- Taqi, M.A., Vora, N., Callison, R.C., Lin, R. and Wolfe, T.J. (2012). Past, present, and future of endovascular stroke therapies. *Neurology* **79**, 213–220.
- Tavazoie, M., Van der Veken, L., Silva-Vargas, V., Louissaint, M., Colonna, L., Zaidi, B., *et al.* (2008). A specialized vascular niche for adult neural stem cells. *Cell stem cell* **3**, 279-288.
- Thored, P., Arvidsson, A., Cacci, E., Ahlenius, H., Kallur, T., Darsalia, V., *et al.* (2006). Persistent production of neurons from adult brain stem cells during recovery after stroke. *Stem cells (Dayton, Ohio)* **24**, 739-747.
- Traystman, R.J. (2003). Animal models of focal and global cerebral ischemia. *ILAR J* **44**, 85-95.
- Tynninen, O., Sjöstrom, J., von Boguslawski, K., Bengtsson, N.O., Heikkila, R., Malmstrom, P., *et al.* (2002). Tumour microvessel density as predictor of chemotherapy response in breast cancer patients. *Br J Cancer* **86**, 1905-1908.
- van Praag, H., Christie, B.R., Sejnowski, T.J. and Gage, F.H. (1999). Running enhances neurogenesis, learning, and long-term potentiation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 13427-13431.
- van Praag, H., Schinder, A.F., Christie, B.R., Toni, N., Palmer, T.D. and Gage, F.H. (2002). Functional neurogenesis in the adult hippocampus. *Nature* **415**, 1030-1034.
- Veronel, D., Ringelstein, A., Cohnen, M., Yong, M., Siebler, M. and Seitz, R.J. (2008). Systemic thrombolysis based on CT or MRI stroke imaging. *J Neuroimaging* **18**, 381-387.
- Villeda, S.A., Luo, J., Mosher, K.I., Zou, B., Britschgi, M., Bieri, G., *et al.* (2011). The ageing systemic milieu negatively regulates neurogenesis and cognitive function. *Nature* **477**, 90-94.
- Vissapragada, R., Contreras, M.A., da Silva, C.G., Kumar, V.A., Ochoa, A., Vasudevan, A., *et al.* (2014). Bidirectional crosstalk between periventricular endothelial cells and

- neural progenitor cells promotes the formation of a neurovascular unit. *Brain Res* **1565**, 8-17.
- Wang, G., Joo, H., Tong, X. and George, M.G. (2015). Hospital costs associated with atrial fibrillation for patients with ischemic stroke aged 18-64 years in the United States. *Stroke* **46**, 1314-1320.
- Wang, S., Kee, N., Preston, E. and Wojtowicz, J.M. (2005a). Electrophysiological correlates of neural plasticity compensating for ischemia-induced damage in the hippocampus. *Exp Brain Res* **165**, 250-260.
- Wang, Y., Kilic, E., Kilic, U., Weber, B., Bassetti, C.L., Marti, H.H. and Hermann, D.M. (2005b). VEGF overexpression induces post-ischaemic neuroprotection, but facilitates haemodynamic steal phenomena. *Brain : a journal of neurology* **128**, 52-63.
- Wardlaw, J.M., Murray, V., Berge, E., del Zoppo, G., Sandercock, P., Lindley, R.L. and Cohen, G. (2012). Recombinant tissue plasminogen activator for acute ischaemic stroke: an updated systematic review and meta-analysis. *Lancet* **379**, 2364-2372.
- Wardlaw, J.M., Murray, V., Berge, E. and del Zoppo, G.J. (2014). Thrombolysis for acute ischaemic stroke. *Cochrane Database Syst Rev* **7**, CD000213.
- Wei, L., Erinjeri, J.P., Rovainen, C.M. and Woolsey, T.A. (2001). Collateral growth and angiogenesis around cortical stroke. *Stroke* **32**, 2179-2184.
- Weidner, N., Carroll, P.R., Flax, J., Blumenfeld, W. and Folkman, J. (1993). Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma. *Am J Pathol* **143**, 401-409.
- Wessmann, A., Chandler, K. and Garosi, L. (2009). Ischaemic and haemorrhagic stroke in the dog. *Vet J* **180**, 290-303.
- WHO (2017). Projections of mortality and causes of death, 2016-2060 https://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/projections/en/ [abgerufen am 12.09.2019].
- WHO (2018). The top 10 causes of death https://www.who.int/gho/mortality_burden_disease/causes_death/top_10/en/ [abgerufen am 12.09.2019].

- Winter, Y., Wolfram, C., Schoffski, O., Dodel, R.C. and Back, T. (2008). [Long-term disease-related costs 4 years after stroke or TIA in Germany]. *Nervenarzt* **79**, 918-920, 922-914, 926.
- Xi, G.M., Wang, H.Q., He, G.H., Huang, C.F. and Wei, G.Y. (2004). Evaluation of murine models of permanent focal cerebral ischemia. *Chin Med J* **17**, 389-394.
- Zechariah, A., ElAli, A., Doepfner, T.R., Jin, F., Hasan, M.R., Helfrich, I., *et al.* (2013). Vascular endothelial growth factor promotes pericyte coverage of brain capillaries, improves cerebral blood flow during subsequent focal cerebral ischemia, and preserves the metabolic penumbra. *Stroke* **44**, 1690-1697.
- Zhang, R.L., Chopp, M., Roberts, C., Liu, X., Wei, M., Nejad-Davarani, S.P., *et al.* (2014). Stroke increases neural stem cells and angiogenesis in the neurogenic niche of the adult mouse. *PLoS One* **9**, e113972.
- Zhang, R.L., Zhang, Z.G. and Chopp, M. (2005). Neurogenesis in the adult ischemic brain: generation, migration, survival, and restorative therapy. *Neuroscientist* **11**, 408-416.
- Zhang, R.L., Zhang, Z.G. and Chopp, M. (2008). Ischemic stroke and neurogenesis in the subventricular zone. *Neuropharmacology* **55**, 345-352.
- Zhang, Y., Chapman, A.M., Plested, M., Jackson, D. and Purroy, F. (2012). The Incidence, Prevalence, and Mortality of Stroke in France, Germany, Italy, Spain, the UK, and the US: A Literature Review. *Stroke Res Treat* **2012**.
- Zhang, Z.G. and Chopp, M. (2009). Neurorestorative therapies for stroke: underlying mechanisms and translation to the clinic. *Lancet Neurol* **8**, 491-500.
- Zhang, Z.G., Zhang, L., Jiang, Q., Zhang, R., Davies, K., Powers, C., *et al.* (2000). VEGF enhances angiogenesis and promotes blood-brain barrier leakage in the ischemic brain. *J Clin Invest* **106**, 829-838.
- Zlokovic, B.V. (2008). The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron* **57**, 178-201.

8. Danksagung

Herzlich danken möchte ich Herrn Prof. Dr. Peter Vajkoczy, dem Leiter der Klinik für Neurochirurgie der Universitätsmedizin Charité Berlin für das Ermöglichen, Fördern und Unterstützen dieser Arbeit. Frau Prof. Dr. Heidrun Fink vielen Dank für die bereitwillige Übernahme meiner Erstbetreuung am Fachbereich für Veterinärmedizin der FU Berlin. Frau Prof. Dr. Melanie Hamann besonders lieben Dank für die weitere Betreuung trotz ihres Wechsels an die Justus-Liebig-Universität Gießen.

Besonders großer Dank gilt auch Dr. Vincent Prinz für die Betreuung des gesamten Projekts, die Korrekturen der schriftlichen Arbeit sowie die unzähligen fachlichen Diskussionen. Dr. Adnan Ghorri und Dr. Kinga Blecharz-Lang danke ich für die großartige Unterstützung und die fachlichen Anregungen während des praktischen Teils, die maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Melina Nieminen-Kelhä und Irina Kremenetskaia vielen Dank für die intensive Einarbeitung in die Labortechnik, für die Hilfe bei der Versuchsdurchführung und den Umgang mit den Versuchstieren sowie die Handhabung des MRT.

Meiner besten Freundin Eva-Maria Saliu gilt ein großer Dank für die Beihilfe bei der finalen Korrektur sowie die andauernde moralische Unterstützung.

Meiner Familie und meinem Mann Rainer Speer danke ich für die bedingungslose Unterstützung, die unerschöpfliche Geduld und das Verständnis.

9. Finanzierungsquellen

Die Studie wurde durch Zuschüsse der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG: VA 244/10-1) FOR 2325 NVI (Interactions at the Neurovascular interface) und durch die Einstein Foundation (A-2012-153) Role of VEGF for the post-stroke vascular repair, angiogenesis and neural recovery unterstützt.

10. Interessenskonflikte

Es besteht kein Interessenskonflikt durch finanzielle Unterstützung der Arbeiten.

11. Selbstständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Neuenbürg, den 06.07.2022

Clarissa Speer