

Aus der Klinik für Psychiatrie – Labor für Molekulare Psychiatrie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Rolle der Perizyten in der Modulation des kapillären Blutflusses
im zerebralen Kortex der Maus

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
der Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Francisco Fernández Klett
aus Madrid

Datum der Promotion: 25. Oktober 2013

A mis padres

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	v
Tabellenverzeichnis	vi
Abstract	vii
Zusammenfassung	viii
Abkürzungen	x
1 Einleitung	1
1.1 Grundsätzliche Eigenschaften des zerebralen Blutflusses und der neurovaskulären Kopplung.....	1
1.2 Die vaskuläre Lokalisation der neurovaskulären Kopplung	4
1.3 Hinweise für Vasoaktivität im Kapillarbett	6
<i>Der Perizyt als kontraktile Zelle der Kapillaren</i>	6
<i>Bisherige Hinweise auf Vasoaktivität im Kapillarbett in vitro</i>	8
<i>Hinweise auf kapilläre Vasoaktivität in vivo</i>	9
<i>Regulationsmechanismen des Blutflusses auf kapillarer Ebene</i>	11
1.4 Bildgebung von Kapillaren im ZNS	11
1.5 Herleitung einer Aufgabenstellung	12
2 Methodik.....	14
2.1 Tiere	14
2.2 Immunhistologie	14
<i>Gewinnung der Schnitte</i>	14
<i>Immunhistologische Färbung</i>	14
<i>Konfokale Mikroskopie</i>	15
2.3 Experimente im akuten Hirnschnitt	15
<i>Präparation der akuten Hirnschnitte</i>	15
<i>Versuchsaufbau am Zwei-Photonen Mikroskop</i>	16
2.4 Experimente <i>in vivo</i>	17
<i>Physiologische Präparation der Maus</i>	17
<i>Präparation des kranialen Fensters</i>	18
<i>Superfusion mit U46619</i>	19
<i>Infusion von Bicucullin</i>	19
<i>Auslösung der cortical spreading depolarization (CSD)</i>	20
2.5 Zwei-Photonen Mikroskopie.....	21
2.6 Bildanalyse.....	22
<i>Bestimmung der Kolokalisation von Perizyten und Konstriktionen</i>	22
<i>Ermittlung der Gefäßdurchmesser</i>	23
<i>Bestimmung der Erythrozytengeschwindigkeit und Flussrate</i>	24
2.7 Knochenmarkschimären und experimentelle zerebrale Ischämie.....	26
<i>Herstellung von Knochenmarkschimären</i>	26
<i>MCAO</i>	26
2.8 Histologie vom humanen Schlaganfall	26
2.9 Morphometrische Auswertung der immunhistologischen Färbungen nach zerebraler Ischämie	27
3.0 Statistik.....	28
3 Ergebnisse	29
3.1 Bildgebung von Perizyten im β -actin eGFP Tiermodell	29
<i>Färbung der Endothelzellen</i>	29
<i>Färbung der Perizyten</i>	30
<i>Färbung der vaskulären Extrazellulären Matrix (ECM) und der Astrozyten</i>	32
3.2 Vasoaktivität von kortikalen Perizyten <i>ex vivo</i>	34
<i>Reaktion auf das TXA2-Analagon U46619</i>	34
<i>Pharmakologische Charakterisierung der Reaktion auf U46619</i>	36

3.3	Vasoaktivität von kortikalen Perizyten <i>in vivo</i> : Superfusion mit U46619.....	38
	<i>Effekt von U46619 auf den Durchmesser und Fluss der Kapillaren in vivo</i>	39
	<i>Effekte von U46619 auf piale Arteriolen und LDF</i>	42
3.4	Rolle der Perizyten bei der funktionellen Hyperämie durch Mikroinfusion von Bicucullin.....	43
	<i>Charakterisierung der unterschiedlichen Gefäßkategorien</i>	44
	<i>Veränderungen im Durchmesser und in der Erythrozytengeschwindigkeit in den unterschiedlichen Gefäßtypen</i>	47
3.5	Rolle der Perizyten bei der <i>Cortical Spreading depolarization</i> (CSD).....	49
	<i>Reaktion der Kapillaren und Arteriolen</i>	49
	<i>Beobachtung von kapillärer Konstriktion während CSD</i>	53
6	Reaktion der Perizyten auf zerebrale Ischämie.....	54
	<i>Abnahme der Zahl von CD13⁺ Perizyten in Kapillaren nach fokaler zerebraler Ischämie</i>	54
	<i>Zunahme der Zahl von PDGFRβ⁺ stromalen Zellen nach fokaler zerebraler Ischämie</i>	55
	<i>Charakterisierung der neu gebildeten PDGFRβ⁺ Zellen</i>	57
	<i>Proliferation von PDGFRβ⁺ Zellen im humanen Schlaganfall</i>	59
4.	Diskussion	62
4.1	Bildgebung von Perizyten in der β -actin-eGFP Maus.....	62
4.2	Kontraktion der Perizyten auf U46619 und Modulation des Blutflusses.....	63
	<i>Kontraktion der Perizyten im akuten Hirnschnitt</i>	63
	<i>Kontraktion der Perizyten auf U46619 in vivo und Effekt auf den Blutfluss</i>	64
	<i>Rheologische Mechanismen der Minderperfusion durch kapilläre Konstriktion</i>	66
	<i>Relevanz der TXA2-induzierten perizytären Konstriktion für pathologische Szenarien</i>	67
4.3	Rolle der Perizyten bei der funktionellen Hyperämie.....	69
	<i>Bisherige Hinweise der Beteiligung von Kapillaren an der neurovaskulären Kopplung in vivo</i> ..	69
	<i>Mikroinfusion von Bicucullin als Modell der funktionellen Hyperämie</i>	74
	<i>Relevanz der Ergebnisse für die Blutfluss-basierende bildgebende Verfahren</i>	76
4.3	Reaktion der Perizyten auf zerebraler Ischämie.....	77
	<i>Sterben von Perizyten nach Schlaganfall</i>	77
	<i>Proliferation von stromalen Zellen und Generierung von Narbengewebe</i>	78
5.	Bibliographie	79
	Anhänge	88
	Eidesstattliche Versicherung.....	89
	Anteilsklärung an etwaigen erfolgten Publikationen.....	90
	Lebenslauf.....	91
	Publikationsliste.....	92
	Danksagung.....	93

Abbildungsverzeichnis

1. Kortikale neuronale Kolumnen und Domänen von penetrierenden Arteriolen.....	3
2. Morphologische Merkmale der Perizyten in den Kapillaren	5
3. Morphologisches Kontinuum der muralen Zellen.....	7
4. Zelluläre Mediatoren der neurovaskulären Kopplung.....	10
5. Inkubations- und Messkammer der akuten Hirnschnitte.....	16
6. Modelle des kranialen Fensters	17
7. Prinzip der zwei-Photonen-Mikroskopie.....	20
8. Lichtwege in der konfokalen und der Zwei-Photonen Mikroskopie.....	21
9. Ermittlung der Gefäßdurchmesser.....	23
10. Ermittlung von Geschwindigkeit und Perfusionsrate der Erythrozyten.....	25
11. Färbung von Endothelzellen und Perizyten bei der β -actin eGFP transgenen Maus	29
12. Detaillierte morphologische Darstellung eines GFP-positiven Perizyten	30
13. ECM und Laminin-Färbung der β -actin eGFP transgenen Maus.....	31
14. Bildfolge des Effektes von 100 nM U46619 auf Kapillaren im Hirnschnitt.....	33
15. Effekt der aufsteigenden Konzentrationen von U46619 auf eine Kapillare im Hirnschnitt	33
16. Kolokalisation von Perizytenkörper und Konstriktionen	34
17. Bildfolge des Effektes von U46619 und SQ 29,458 auf Kapillaren im Hirnschnitt	35
18. Pharmakologische Charakterisierung der Reaktion auf U46619 im Hirnschnitt	36
19. Superfusion von U46619 in vivo.....	38
20. Bildfolge der Gefäßreaktion auf U46619 in vivo: Beispiele von Konstriktionen an Perizyten	40
21. Quantifikation der Reaktion von U46619 auf Blutfluss und Kapillardurchmesser	41
22. Auslösung funktioneller hyperämischer Antworten durch Mikroinfusion von Bicucullin.....	43
23. Beispiele der Gefäße, die in der Bicucullin-Studie untersucht wurden.....	44
24. Charakterisierung von Durchmesser und Flussgeschwindigkeit der untersuchten Gefäße.....	45
25. Originale Aufnahmen von Bicucullin-induzierten Durchmesser- und Blutflussveränderungen	45
26. Ermittlung der durchschnittlichen Antwortes für einen Gefäßtyp	46
27. Durchschnittliche Reaktionen auf Bicucullin-induzierten IISs	47
28. Anklingszeit der Durchmesser- und Erythrozytengeschwindigkeitsreaktion	48
29. Anstoßzeit der Durchmesser- und Erythrozytengeschwindigkeitsreaktion	49
30. Induktion von cortical spreading depolarization (CSD) in Mäuse	50
31. Beispiel der Reaktion von Arteriolen und Kapillaren auf die Passage einer CSD.....	51
32. Zusammenfassung der Durchmesseränderungen nach CSD	51
33. Konstriktion eines Perizyten während der Passage einer CSD	52
34. Abnahme der Zahl von CD13 ⁺ Perizyten in Kapillaren des Infarktkerns	53
35. Morphologische Veränderungen und Apoptosis in Perizyten 1 Tag nach MCAO	55
36. Zunahme von PDGFR β ⁺ Zellen im Infarktkern	56
37. Proliferation von PDGFR β ⁺ Zellen in Gefäßen des Infarktkerns.....	57

38. Charakterisierung der PDGFR β^+ Zellen im Infarktkern	58
39. PDGFR β^+ Zellen in humanen Schlaganfall.....	60

Tabellenverzeichnis

1. Demografische Charakteristika der Subjekte mit Schlaganfall.....	61
---	----

Abstract

Introduction: Pericytes, the mural cells of capillaries, are most abundant in the central nervous system, where they regulate the blood-brain barrier. They are contractile in vitro and respond to neurotransmitters in organ preparations. Therefore, it has been proposed that they may mediate the coupling of blood flow to neuronal activity, and further provoke impairment to blood flow after ischemic lesions to the central nervous system. However, their ability to modulate blood flow in the brain in vivo has not been demonstrated and it is largely unknown how lesions to the neural tissue may affect pericytes over time. **Methods:** We used two-photon microscopy to study pericytes and the dynamic changes of capillary diameter and blood flow in the cortex of anesthetized β -actin eGFP mice in real time, as well as in brain slices. In order to determine the reaction of pericytes at different time points after cerebral ischemia, we have used histological samples obtained from an experimental stroke model or from human post-mortem stroke tissue. **Results:** Pericytes caused localized decreases in capillary diameter in acute brain slices and in the brain of anaesthetized mice, where they effected changes in capillary red blood cell flow. In contrast, during brief bursts of neuronal activity, capillary red blood cell flow increased without pericyte-induced capillary diameter changes. The analysis of immunohistological stains of murine or human ischemic tissue demonstrated an acute loss of capillary pericytes. At the same time, cells in larger vessels, sharing common cell markers with pericytes, proliferate and give rise to a stromal cell population associated to the deposition of fibrous extracellular matrix. **Conclusions:** Our data suggest that mural cells in precapillary and penetrating arterioles, rather than pericytes in capillaries, are responsible for the blood flow increase induced by neural activity. However, we also show that pericytes can modulate capillary blood flow in the brain in vivo, which may be important under pathological conditions. In an experimental stroke model as well as in humans, the immunohistological analysis suggests that capillary pericytes are affected and succumb largely after brain ischemia. Vascular cells of large vessels expressing pericyte markers participate in the generation of previously unrecognized stromal scar tissue, which is distinct from the classic astroglial scar. The stromal scar tissue represents a novel potential target for therapies aimed at increasing the regenerative potential of brain tissue after stroke.

Zusammenfassung

Einleitung: Perizyten sind murale Zellen in den Kapillaren, die im zentralen Nervensystem die Endothelzellen umfassen und die zunehmend als wichtige zelluläre Bestandteile der neurovaskulären Funktionseinheit anerkannt werden. Sie sind an der Bildung und Regulation der Bluthirnschranke beteiligt. Perizyten sind kontraktile Zellen, und reagieren in organotypischen Hirnpräparaten auf Neurotransmitter mit Konstriktionen und Dilatationen. Somit sind diese Zellen grundsätzlich in der Lage, die stete Kopplung des zerebralen Blutflusses an die neuronale Aktivität zu bewirken. Diese Funktion der Perizyten ist jedoch noch nicht eindeutig *in vivo* geklärt worden. Es ist ebenfalls weitgehend unbekannt, wie diese Zellen im Rahmen von pathologischen Veränderungen im zentralen Nervensystem reagieren. **Methoden:** Wir haben mittels eines transgenen Tiermodells (die β -actin eGFP Maus) und intravitaler Zwei-Photonen Mikroskopie die kontraktile Eigenschaften der Perizyten im zerebralen Kortex untersucht. Um einen weiteren Einblick in die Rolle von Perizyten in pathologischen Szenarien zu gewinnen, haben wir in einem Schlaganfallmodell und in humanem post-mortem Gewebe aus Patienten mit der neuropathologischen Diagnose eines Schlaganfalls die Reaktion von Perizyten histologisch charakterisiert. **Ergebnisse:** Perizyten in Kapillaren der β -actin eGFP Maus zeigten im Präparat des akuten Hirnschnitts oder *in vivo* kontraktile Fähigkeiten und modulierten *in vivo* wirksam den Blutfluss in einzelnen Kapillaren. Jedoch konnten wir in einem Modell von funktioneller Hyperämie keine Durchmesseränderungen durch kapilläre Perizyten detektieren. Im experimentellen Schlaganfallmodell wie auch im humanen Schlaganfall konnten wir zeigen, dass kapilläre Perizyten im Kern des Infarktes akut dezimiert werden, während Zellen um große Gefäße im Kern des Infarktes proliferieren und mit der Ablagerung von fibrotischer extrazellulärer Matrix assoziiert sind. **Schlussfolgerung:** Unsere Arbeit suggeriert, dass Perizyten in Kapillaren nicht Mediatoren der funktionellen Hyperämie während neuronaler Aktivierung sind. Jedoch sind sie in der Lage, den Blutfluss in Kapillaren durch Kontraktion zu beeinflussen, was während pathologischer Zustände des zentralen Nervensystems von Bedeutung sein könnte. Perizyten werden in Rahmen von Ischämie beschädigt und sterben im Kern des Infarktes akut ab. Murale Zellen in großen Gefäßen, die auch Perizytenmarker exprimieren, generieren im ischämischen Parenchym eine bisher unbekannt Population von stromalen Zellen, die zur Transformation des ischämischen Kerns in fibrotisches Narbengewebe beitragen. Das stromale Narbengewebe unterscheidet sich von der klassischen astroglialen Narbe

und bietet möglicherweise einen neuen therapeutischen Angriffspunkt, um das Regenerationspotential vom ischämischen Gewebe zu verbessern.

Abkürzungen

5-HT, *5-Hydroxytryptamin*

ACh, *Acetylcholin*

aCSF, *artificial cerebrospinal fluid*

AD, *analog-digital*

ANOVA, *analysis of the variance*

APN, *Aminopeptidase-N (= CD13)*

ATP, *Adenosintriphosphat*

BOLD, *blood oxygenation level dependent*

BSA, *bovine serum antigen*

cAMP, *Cyclisches Adenosinmonophosphat*

CD11b, *cluster of differentiation 11b*

CD13, *cluster of differentiation 13*

CD31, *cluster of differentiation 31*

CD105, *cluster of differentiation 105*

cGMP, *Cyclisches Guanosinmonophosphat*

CSD, *cortical spreading depolarization*

DAPI, *4',6-Diamidin-2-phenylindol*

DC-EEG, *direct current-corticoencephalogram*

ECM, *extracellular matrix*

eGFP, *enhanced green fluorescent protein*

ET-CO₂, *end-tidal CO₂*

fMRI, *functional magnetic resonance imaging*

GABA, *gamma-aminobutyric acid*

GFAP, *glial fibrillar acidic protein*

GFP, *green fluorescent protein*

IIS, *inter-ictal spikes*

IOS, *intrinsic optical imaging*

KM, *Knochenmark*

LDF, *Laser-Doppler flow*

LFP, *lokales Feldpotential*

MCAO, *middle cerebral artery occlusion*

MHC II, *major histocompatibility complex II*

n.a., *not available*

NA, *Noradrenalin*

NG2, *neuron-glia antigen 2*

NIH, *National Institute of Health*

NPY, *Neuropeptid Y*

NS, *normal serum*

PBS, *phosphate-buffered saline*

PDGFR- β , *platelet-derived growth factor- β*

PECAM-1, *platelet-endothelial adhesion molecule-1*

PET, *Positronen-Emissions-Tomographie*

PFA, *Paraformaldehyd*

PGE2, *Prostaglandin E2*

PGF, *Prostaglandin E2*

PGI2, *Prostaglandin I2*

PTFE, *Politetrafluorethilen*

rgs5, *regulator of G-signalling 5*

SMC, *smooth muscle cells*

TGF- β , *transforming growth factor- β*

tPA, *tissue plasminogen activator*

TRITC, *tetramethylrhodamine isothiocyanate*

TXA2, *Thromboxan A2*

VIP, *vasoaktives Peptid*

ZNS, *Zentrales Nervensystem*

1 Einleitung

1.1 Grundsätzliche Eigenschaften des zerebralen Blutflusses und der neurovaskulären Kopplung

Das Gehirn ist ein privilegiertes Organ, was seine Blutversorgung betrifft. Es wiegt nur 2% des gesamten Körpergewichts, aber seine Blutversorgung macht 18% des kardialen Outputs aus. Gleichzeitig zeichnet sich das Hirn durch einen hohen Energiebedarf aus, der bis zu 20% des gesamten Ruhemetabolismus des Menschen beträgt [1-3]. Die neuronale Aktivität verbraucht ~ 30 $\mu\text{mol ATP g/min}$, was ungefähr dem Energieverbrauch des Herzens oder der gestreiften Beinmuskulatur bei einem Marathon-Lauf entspricht [1-4]. Bis zu 80% des Energieverbrauchs entstehen dabei bei der Bewegung von Ladungen beim präsynaptischen Aktionspotential oder der postsynaptischen Depolarisierung [4]. Dieser hohe Metabolismus bedarf einer steten Zufuhr von Sauerstoff und energetischen Metaboliten. Das Gewebe im zentralen Nervensystem (ZNS) ist deswegen von einer ständigen Blutperfusion abhängig, damit die neuronale Funktion erhalten bleibt. Eine Verminderung des Blutflusses um 20% verursacht die Inhibition der Proteinsynthese; eine Reduktion um 50% verursacht die Akkumulation von Glutamat, Laktat und Wasser im extrazellulären Raum. Ist die Blutflussreduktion größer als ca. 50%, wird die ATP-Produktion blockiert. Ab einer Blutflussreduktion um 80% treten irreparable neuronale Schäden auf [5].

Entwicklungsgeschichtlich wurde die Größe des ZNS durch eine ausreichende Energiezufuhr limitiert [6]. Man könnte spekulieren, dass erst die Evolution des zirkulatorischen Systems —ein jüngeres Geschehen in der Evolutionsgeschichte— den explosiven Zuwachs des ZNS und die Entstehung eines Prominenten Gehirns bei den Wirbeltieren möglich gemacht hat. Tatsächlich beruht die Entwicklung des neuralen Parenchyms sowie seiner Gefäße auf einer engen Interaktion miteinander, die sich auf molekularer Ebene durch die gemeinsame Nutzung von Wachstumsfaktoren und morphogenetischer Signale (sogenannter „Angioneurine“) widerspiegelt [7].

Bei normaler Hirnfunktion ist die zerebrale Zirkulation einer strengen Regulation ausgesetzt. Die Autoregulation des zerebralen Blutflusses sorgt dafür, dass das Hirn noch bis zu einem Abfall des zentralen Perfusionsdrucks von ~60 mmHg eine ausreichende Blutversorgung bekommt. Dies wird durch die Adaptation der größeren pialen Gefäße bewirkt [8]. Es ist ebenfalls lange

bekannt, dass sich der zerebrale Blutfluss zeitlich und räumlich der unterliegenden neuronalen Aktivität anpasst. Der Italiener Angelo Mosso beschrieb 1881 das erhöhte Pulsieren des Kortex während mentaler Aktivität; auch Paul Broca studierte den Effekt von Hirnaktivität auf die Schädeltemperatur als Indikator des zerebralen Blutflusses. Roy und Sherrington erarbeiteten vor mehr als einem Jahrhundert die Theorie, dass der Metabolismus des Hirns stets eng an den Blutfluss gekoppelt ist.

Heutzutage geht man davon aus, dass die neurovaskuläre Kopplung das Ziel verfolgt, den energetischen Metabolismus des Hirnes bei Aktivität zu unterstützen, obwohl die funktionelle Hyperämie überproportional zum Verbrauch von Glukose und Sauerstoff in dem aktivierten Gewebe ist [9]. Deswegen wird vermutet, dass der neuronale Metabolismus nicht per Rückkopplungsschleife direkt den Blutfluss reguliert. Vielmehr scheint es, dass die funktionelle Hyperämie mechanistisch von der synaptischen Transmission und der postsynaptischen Depolarisation durch eine Vorwärtsregelung abhängig ist [9]. Die Freisetzung von Glutamat scheint dabei ein wichtiger Auslöser der Kaskade zu sein, die über einen Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration in den postsynaptischen Dendriten und den Astrozyten die hyperämische Antwort bewirkt [10,11]. Als vasoaktive Mediatoren der funktionellen Hyperämie könnten NO und PGE2 eine wichtige Rolle spielen [12]. Perivaskuläre Nervenendungen des Hirnstamms oder lokale GABAerge Interneuronen scheinen ebenfalls den Blutfluss zu modulieren, obwohl wenig bekannt ist, in wie fern sie an der neurovaskulären Kopplung beteiligt sind [13].

Die Bemühungen, die neuropsychologischen Fähigkeiten des Menschen an ein neuroanatomisches Substrat zu verankern, werden von Techniken unterstützt, die nicht-invasiv die kortikale und subkortikale Aktivität des menschlichen Gehirnes bildlich darzustellen vermögen. Die verbreiteten blutflussbasierenden Verfahren wie fMRI und PET leiten die Lokalisation und Intensität der neuronalen Aktivität von der Blutflussantwort ab [14]. Eine genaue Interpretation der gewonnenen neurofunktionellen Kartierungen setzt aber eine genaue Kenntnis des Verhältnisses von Blutfluss und neuronaler Aktivität voraus [15]. Dabei ist weiter unbekannt, wie stark eine zeitliche und räumliche Korrelation zwischen aktiviertem neuronalen Gewebe und den unterschiedlichen Parametern des Blutflusses (Blutflussanstieg, Volumenanstieg) besteht. Die Güte dieser Korrelation wird von der räumlichen und zeitlichen Auflösung der Blutflussantwort limitiert [15]. Die räumliche Granularität der Blutflussantwort wird einerseits von der geometrischen und topologischen Struktur des Gefässsystemes bedingt.

Andererseits wird sie auch dadurch bedingt, davon, wie die Stellen verteilt sind, an denen die Regulation geschieht. Die vorliegende Arbeit bemüht sich darum, diesen zweiten Aspekt der Blutflussregulation besser zu charakterisieren.

Neuropathologische Prozesse gehen mit einer Veränderung der neurovaskulären Kopplung einher. Ein solcher Zusammenhang ist besonders für Morbus Alzheimer und der neurovaskulären Demenz ergründet worden, wo die Dysregulation der neurovaskulären Kopplung in einem kausalen Zusammenhang zur Neurodegeneration stehen könnte [16]. Eine genauere Kenntnis der Regulationsmechanismen der neurovaskulären Kopplung und des involvierten vaskulären Kompartiments ist deswegen ebenfalls wichtig für unser Verständnis von solchen neurologischen Erkrankungen.

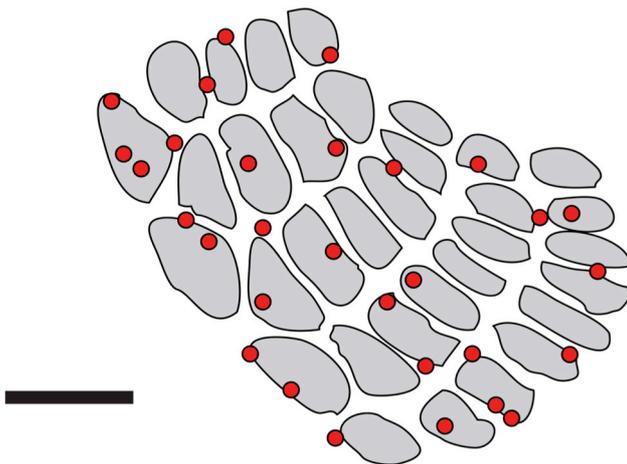


Abbildung 1: Kortikale neuronale Säulen und Domänen von penetrierenden Arteriolen am Beispiel des whisker-barrel Kortex in der Maus

Die grauen Flächen korrespondieren mit einzelnen kortikalen Säulen, die somatosensorischen Input aus einzelnen Barthaaren verarbeiten. Die roten Punkte entsprechen den Eintrittspunkten von penetrierenden Arteriolen. Es gibt keine 1:1 Zuordnung zwischen penetrierenden Gefäßen und einzelnen kortikalen Säulen, die jedoch lokalisierte Blutflussantworten aufweisen können. Modifiziert nach: Woolsey TA, Rovainen CM, Cox SB et al. Neuronal units linked to microvascular modules in cerebral cortex: response elements for imaging the brain. Cereb Cortex 1996;6:647-660. Skala: 500 µm

1.2 Die vaskuläre Lokalisation der neurovaskulären Kopplung

Die Blutversorgung im Gehirn erfolgt durch Verästelungen der Arteria vertebralis und Arteria carotis interna, die zum Willis-poligon in der Schädelbasis beitragen. Aus dieser entstehen die Arterien cerebri anterior, media und posterior, die die Versorgung des kortikalen Gewebes übernehmen. Die Verästelungen dieser Arterien (pialen Arteriolen) bilden zahlreiche Anastomosen auf der kortikalen Oberfläche [17]. Aus ihnen sprießen die penetrierenden Arteriolen, die orthogonal zur Oberfläche des Kortex ins Parenchym eintauchen. Die letzten sind bei der Ratte als "Flaschenhals" der zerebralen Zirkulation bezeichnet worden, da es stromabwärts nur geringfügige funktionelle Verbindungen zwischen den Versorgungsgebieten unterschiedlicher penetrierender Arteriolen gibt [18]. Aus den penetrierenden Arteriolen sprießen radiale präkapilläre Gefäße, die nach wenigen Teilungen in die terminalen Kapillaren übergehen, in denen Perfusionsdruck und Blutgeschwindigkeit minimiert sind und wo der Austausch von Gasen und Metaboliten geschieht [19].

Veränderungen des Blutflusses werden durch Veränderungen in der Konduktivität der Gefäße bewirkt (bei gleichbleibenden rheologischen Eigenschaften des Blutes und des systemischen arteriovenösen Blutdruckunterschiedes). Am ehesten wird die Konduktivität der Gefäße durch Veränderungen im Durchmesser der zerebralen Arterien und Arteriolen moduliert, da diese den größten Widerstand zum Blutfluss darstellen. Kanonisch zielen deswegen die Mechanismen der Regulation des zerebralen Blutflusses auf die glatte Muskelzelle der zerebralen Arterien und Arteriolen ab: ihre Relaxation durch Abnahme der Konzentration des zytosolischen Kalziums bewirkt eine Zunahme des Gefäßdurchmessers und eine Zunahme des Flusses im vom Gefäß perfundierten Gebiet. Entsprechend vermindert ihre Kontraktion die Perfusion. Die großen zerebralen Arterien und großen pialen Arteriolen tragen erheblich mehr zum gesamten Perfusionswiderstand bei als Arterien vergleichbaren Kalibers in anderen Organen [20]. Dies scheint ihre prominente Rolle bei der zerebralen Blutflussregulation als Antwort auf systemische Unterschiede im Perfusionsdruck (Autoregulation) zu unterstreichen [21,22]. Die kleinen pialen Arteriolen und die penetrierenden Gefäße dilatieren als Antwort auf die parenchymale neuronale Aktivität im experimentellen Tiermodell oder im isolierten Hirnschnitt. Jedoch scheinen, zumindest im Nagetier, die Domänen einzelner penetrierender Arteriolen mit den kortikalen neuronalen Kolumnen (funktionellen Einheiten des zerebralen Kortex) nicht überein zu stimmen (**Abb. 1** und [19]). Trotzdem zeigt der Blutfluss in einzelnen Kortikalen Kolumnen, in

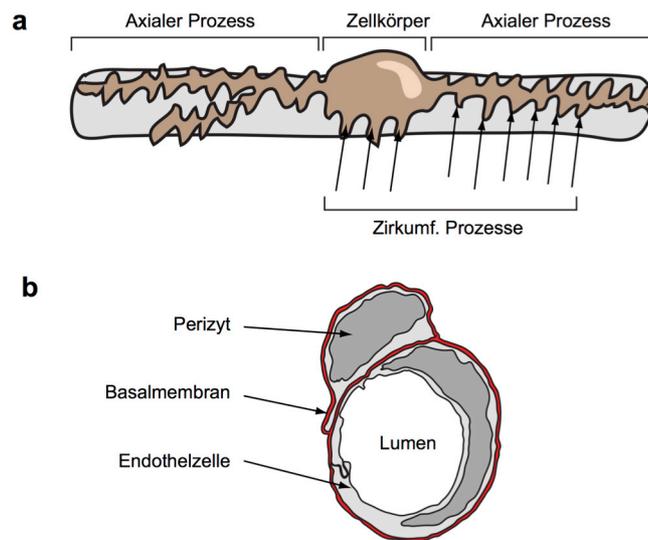


Abbildung 2: Morphologische Merkmale der Perizyten in den Kapillaren

a: Schematische Darstellung eines Perizyten. Diese Zellen zeichnen sich durch einen kleinen ovalen oder fusiformen Zellkörper aus, der axiale Prozesse erzeugt, die parallel zur Kapillaraxis verlaufen. Aus dem Zellkörper und den axialen Prozessen entspringen kleinere Prozesse, die die Endothelzelle in der Umfangsrichtung bedecken und strukturell die Basis für Durchmesseränderungen der Kapillare bilden könnten (Pfeile). b: Schematischer Querschnitt durch einen Perizytenkörper und eine Endothelzelle. Der Perizyt ist von der Basalmembran der Kapillare eingeschlossen, und durch sie von der Endothelzelle getrennt.

Abhängigkeit von der Dauer des hyperämischen Stimulus und der Art der Blutflussmessung, lokalisierte Antworten auf [23]. Dieser Befund deutet darauf hin, dass feinere Gefäße als die penetrierenden Arteriolen für eine Regulation des Blutflusses verantwortlich sein könnten¹. Langanhaltende Stimuli und die Stimulation mehrerer neuronaler Kolumnen führen zu einer Ausdehnung des hyperämischen Areals, das auf eine retrograde Rekrutierung größerer Arteriolen zurückzuführen ist [24,25]. Die zerebralen Kapillaren bilden das größte Kompartiment des zerebralen vaskulären Apparates, an dem der Stoff- und Gasaustausch

¹ Harrison et al. suggerieren, anhand einer Studie von Resinabgüssen des auditorischen Kortex der Chinchilla, dass kortikale kapilläre Netzwerke mit dem Areal der neuronalen Antwort *strukturell* korrelieren. Sie zeigen Lücken zwischen den Kapillarbetten unterschiedlicher neuronaler funktioneller Areale auf. Trotz der Meinung der Autoren ist die lückenlose Abbildung des kapillaren Netzwerkes durch die Methode der Resinabgüsse nicht sicherzustellen. Das ist an den publizierten Abbildungen ihrer Arbeit leicht ersichtlich, wo mehrere artifizielle vaskuläre „Sackgassen“, auch der größeren Gefäße, zu erkennen sind. Siehe Harrison RV, Harel N, Panesar J, Mount RJ. Blood capillary distribution correlates with hemodynamic-based functional imaging in cerebral cortex. *Cereb Cortex* 2002;12:225-233.

zwischen Blut und Parenchym geschieht. Strategisch liegen sie in unmittelbarem Kontakt zu dem Lokus der neuronalen und glialen Aktivität [26]. Die attraktive Hypothese, dass Kapillaren verschiedener Organe aktiv (d.h. mit Veränderung des Tonus analog zu dem der Arterien) den Blutfluss regulieren könnten, besitzt eine lange und kontroverse Geschichte. Hinweise, dass die kleinsten Blutgefäße des ZNS kontraktile Fähigkeiten besitzen, haben sich in den letzten Jahrzehnten angehäuft und werden im nächsten Absatz dargestellt. Diese Hinweise sind eng mit einem vermeintlich kontraktile Zelltypen im Kapillarnetz, dem Perizyt, verknüpft.

1.3 Hinweise für Vasoaktivität im Kapillarbett

Der Perizyt als kontraktile Zelle der Kapillaren

Die Konstriktion von Kapillaren ist schon von Golouev in 1868 dokumentiert worden [27] und wurde danach von Rouget, bekanntlich aber vom dänischen Physiologen A. Krogh, in verschiedenen Präparaten studiert [28,29]. Eine historische Darstellung der Kontroversen über die Vasoaktivität von Kapillaren kann man in einer Übersichtsarbeit finden [30]. Die Diskussion der kapillären Vasoaktivität geht mit der Entdeckung und Charakterisierung kontraktile Zellen in den Kapillaren, den Perizyten, einher.

Diese Zellen wurden erstmals von Eberth und Rouget beschrieben, und wurden zuerst Rougetzellen genannt [28,31]. Zimmermann prägte 1923 den endgültigen Namen *Perizyt* [32]. Perizyten sind eingebunden in die Basalmembran des Gefäßes, die sie von der Endothelzelle trennen (**Abb. 2**). Sie lassen sich in allen Organen der Säugetiere finden. In der Retina, gefolgt vom Hirn, befindet sich die größte Anzahl von Perizyten im Verhältnis zu Endothelzellen. Insgesamt wird das Verhältnis im ZNS als 1:1 beschrieben [33]. Jede Zelle besteht aus einem ovalen Zellkörper, deren Zellkern von einer schmalen Schicht Zytoplasma umhüllt wird. Die lange Achse des Zellkörpers ist parallel zum Verlauf der Kapillare orientiert. Von diesem Zellkörper gehen Fortsätze aus, die die Achse der Kapillaren verfolgen und aus denen sekundäre Fortsätze sprießen, die die Kapillare umschließen (**Abb. 2**). Ein Perizyt kann Fortsätze zu mehreren Blutkapillaren schicken [34]. Es besteht ein Kontinuum in der Morphologie der glatten Muskelzelle größerer Gefäße zum kapillären Perizyten, das schon in den ersten Arbeiten von Zimmerman beschrieben wurde [32]. Zellen in arteriolen Gefäßen weisen robuste zirkumferenzielle Prozesse auf, die auf eine stärkere kontraktile Funktion hinweisen. In der *rgs5^{GFP/GFP}* Maus, in der murale Zellen (Perizyten und glatte Muskelzellen) mit GFP markiert sind [35], lassen sich diese morphologischen Unterschiede gut feststellen (**Abb. 3**).

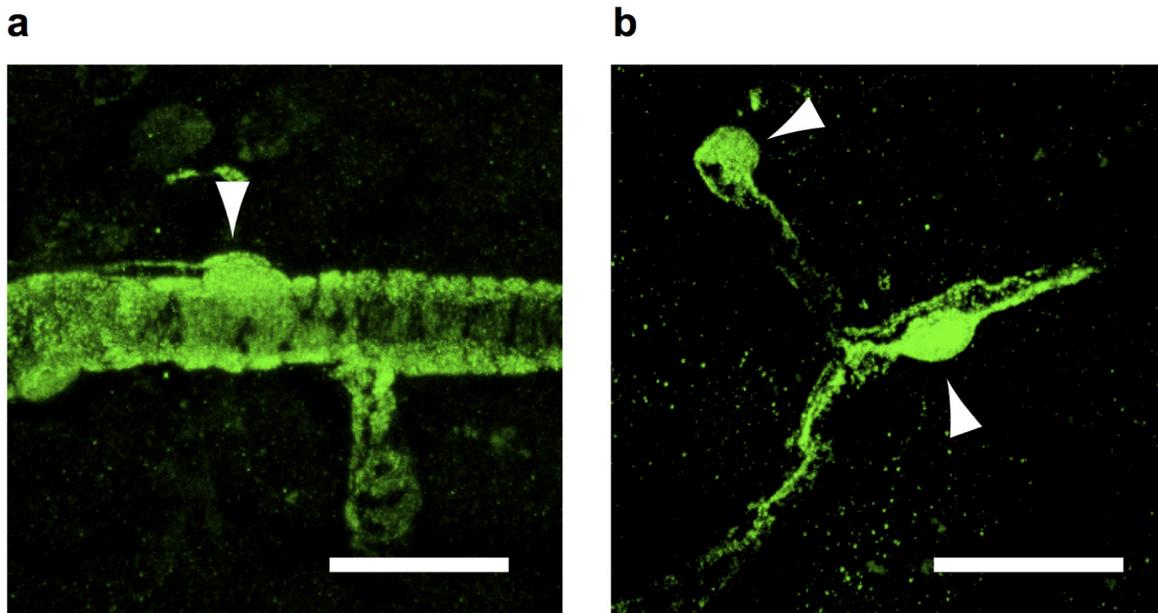


Abbildung 3: Morphologisches Kontinuum der muralen Zellen in Arteriolen und Kapillaren

a: In der *rgs5^{GFP/GFP}* Maus exprimieren glatte Muskelzellen (smooth muscle cells, SMCs) und die Perizyten GFP. Eine solche GFP-exprimierende murale Zelle in einer präkapillären Arteriole (Pfeilkopf) besitzt robuste zirkumferenzielle Prozesse, die auf einen kontraktile Phänotyp hinweisen. **b:** Perizyten in Kapillaren (Pfeilköpfe) besitzen lange axiale Prozesse, aber keine ausgeprägten zirkumferenziellen Prozesse. Skala: 20 μm

Dieses Kontinuum der Morphologie macht es schwierig, eine klare abgrenzende Definition von Perizyten zu erarbeiten. Vaskuläre Biologen benutzen den Namen „Perizyt“ nur für die prototypischen kleinen Zellen mit prominenten vaskulär-axialen Projektionen, die die terminalen Kapillaren populieren [36]. Wir werden grundsätzlich an diesem Gebrauch des Begriffs festhalten, und wenn notwendig werden wir die Subspezifikation „kapillare Perizyten“ benutzen, um kapillare Perizyten von Mischformen in den präkapillären Arteriolen zu unterscheiden.

Ähnlich zu der glatten Muskelzelle exprimieren Perizyten Proteine des kontraktile Apparats, wie Aktin und Myosin, so wie Tropomyosin und die cGMP-Proteinkinase [37-39]. Im Hirn und in der Retina ist das adhäsive Glycoprotein Fibronectin im Interstitium zwischen Endothelzellen und Perizyten detektiert worden, das dazu dienen könnte, beide Zellen mechanisch zu verankern [40]. Die Präsenz von kontraktile Proteinen in „echten“ mittleren Kapillaren –im Gegensatz zu postarteriellen oder prä-venösen Kapillaren— ist umstritten. Jedoch basieren diese Ergebnisse auf immunhistologischen Färbungen, die, wegen ihrer bekannten geringen Sensibilität, nicht eindeutig auf Abwesenheit von kontraktile Proteinen schließen lassen.

Neben der putativen Vasoaktivität üben die Perizyten im ZNS eine weitere Reihe von Funktionen aus, die in den letzten Jahren zunehmend bekannt geworden. Dazu gehören ihre obligate Beteiligung an der Bildung und Regulation der Bluthirnschranke [41-43], der Angiogenese und der Ausreifung und Stabilisierung neuer Gefäße [44], oder die Narbenbildung nach Läsionen im Hirn durch die Differenzierung in stromalen Zellen [45]. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass Perizyten in der Pathophysiologie des ZNS eine wesentliche Rolle spielen könnten, die weitgehend noch unbekannt ist. Ebenfalls ist weitgehend unbekannt, wie sich Pathologien des ZNS auf die Funktion von potenziell unterschiedlichen Populationen von Perizyten auswirken.

Perizyten aus dem Vorderhirn stammen aus der Neuralleiste [46]. Diese embryonale Zellschicht durchläuft eine Umwandlung von Ektoderm zu Mesoderm und bildet neben Perizyten im Vorderhirn auch glatte Muskelzellen, piale Hirnhäute und die Muskulatur und das Skelett der Schädelbasis und des Gesichts. Es ist beschrieben worden, dass Perizyten mesenchymale Stammzellen produzieren könnten bzw. die physiologische Nische der mesenchymalen Stammzellen *in vivo* darstellen könnten [47]. Auch eine Differenzierung von Knochenmarkszellen zu Perizyten bei *de novo* Vaskularisation nach Läsion, Ischämie oder Tumoren ist beschrieben worden: auch im Hirn, wobei Zellfusion eine Rolle spielen könnte [48-51]. In diesen Arbeiten wurden die Perizyten mit Oberflächenmarker identifiziert, die insbesondere bei der entzündlichen und regenerativen Vaskulatur durch andere Zellen wie z.B. Makrophagen exprimiert werden, wie NG2 [52] oder auch durch Makrophagen phagozytiert werden könnten [53]. Unsere eigenen Vorarbeiten haben gezeigt, dass in Modellen der Knochenmarkstransplantation, die auch in diesen Studien benutzt wurden, zahlreiche perivaskuläre Makrophagen aus dem Knochenmark schnell das native oder pathologisch veränderte Gewebe besiedeln, oder sogar Purkinje-Neuronen generieren (letzteres durch Zellfusion) [54-56]. Diese Tatsachen erschweren die Interpretation der Arbeiten, die eine Transdifferenzierung von Knochenmarkszellen zu Perizyten suggeriert haben.

Bisherige Hinweise auf Vasoaktivität im Kapillarbett *in vitro*

In den nächsten Abschnitten werden wir uns jedoch darauf konzentrieren, die bisherigen Hinweise auf Vasoaktivität im Kapillarbett durch Perizyten zu erörtern. Nachdem die Zellkultur der ZNS-Perizyten etabliert wurde [57], gab es erste Versuche *in vitro*, die die Kontraktilität der Perizyten demonstrierten. β -2 adrenerge Aktivierung, Histamin und Serotonin, Angiotensin II, Endothelin-1 und Hyperoxia führen zur Kontraktion, während β -1 adrenerge Aktivierung,

Hyperkapnie, NO und das *Atrial Natriuretic Peptide* zur Relaxation führen [58-62]. Perizyten reagieren ebenfalls als Antwort auf Autakoiden wie Thromboxan A2 (TXA2) oder Prostaglandin I2 (PGI2) [63]. Eine Kalzium-abhängige Kontraktion ist auch als Antwort auf die intrazelluläre Freisetzung von IP₃ beobachtet worden [63]. Der Tonus von Perizyten scheint zum Teil durch die intrazelluläre Konzentration von cAMP und cGMP reguliert zu sein [58]. Der Perizyt kann auch Aktionspotentiale als Antwort auf Histamin und Noradrenalin bilden [64]. In der Zellkultur konnte die Produktion von Prostanoiden durch Perizyten festgestellt werden (PGI, PGE, PGF und TXA2), die autokrin den Tonus der Perizyten und die Permeabilität der Gefäße beeinflussen können [65-68].

Ebenfalls wurden die kontraktile Fähigkeiten der Perizyten in isolierten Gefäßen und in organotypischen Präparationen untersucht. In einer Reihe von Arbeiten aus der Gruppe um D.G. Puro ist die Kontraktilität von Perizyten auf Stimuli wie ACh, ATP, Angiotensin II oder elektrische Stimulation in akut isolierten retinalen Kapillaren dokumentiert worden [65-68]. Die Retina ist ein attraktives Modell für die Studie der Perizyten, weil ihre Gefäße eine auffällig hohe Dichte an Perizyten haben und sich die Retina als Ganzes (inklusive komplettem Gefäßbaum) leicht präparieren lässt. Schönfelder et al. zeigten darin die Kontraktion von Perizyten auf Angiotensin II und Endothelin, und die Dilatation auf muscarinische Aktivierung, Bradikynin und Histamin [69]. Peppiatt et al. zeigten die Dilatation von retinalen bzw. zerebellären Kapillaren auf GABA und Glutamat, sowie Konstriktionen auf Noradrenalin und direkte elektrische Stimulation [70]. Die letzte Arbeit suggeriert, dass der Tonus von Kapillaren unter neuronaler Kontrolle steht, und die funktionelle Hyperämie teilweise ausführen könnte.

Hinweise auf kapilläre Vasoaktivität *in vivo*

Nachdem gezeigt wurde, dass sich die Durchmesser von mesenterialen Kapillaren in Abhängigkeit vom Perfusionsdruck verändern, wurde die Rigidität der Kapillaren angenommen [71]. Bald darauf gab es jedoch Beobachtungen, die darauf hinwiesen, dass sich der Durchmesser der Kapillaren im Gehirn verändern kann. Dieses Phänomen im fixierten Gewebe und *in vivo* beobachtet worden [72-76]. Jedoch ist es *in vivo* schwierig, aktive Kontraktilität der Kapillaren von passiven, elastischen Veränderungen des Kapillardurchmessers zu unterscheiden, da die physiologischen Manöver, die zu einer zerebralen Hyperämie und Dilatation der Kapillaren führen —wie bei den oben angeführten Arbeiten— die pialen und penetrierenden Gefäße ebenfalls beteiligen.

Andere Hinweise auf eine aktive Beteiligung des Kapillarnetzes am Blutfluss liefern die Studien mittels Abgüssen (*corrosion casts*). Bei dieser Technik wird ein Granulat in das fixierte Gewebe perfundiert, so dass nach der chemischen oder enzymatischen Zersetzung des Parenchyms ein Abguss des Gefäßsystems erhalten wird. Untersuchungen des ZNS verschiedener Organismen haben die Präsenz von „Sphinktern“ in den präkapillären Arteriolen so wie in den Kapillaren gezeigt, die meistens an den Abzweigungen liegen. Dies wurde konsistent in mehreren Publikationen gezeigt [71,77-83]. In einzelnen der oben erwähnten Studien wurde die Präsenz solcher Sphinkter nach der Behandlung *in vivo* mit vasoaktiven Substanzen gezeigt. Nichtsdestotrotz liefern solche Studien nur indirekte Evidenz, da die Gefäßwand nicht dargestellt wird. Ein komplettes Füllen des vaskulären Netzwerkes ist Voraussetzung für die Interpretation solcher Experimente, was nicht immer erreicht wird; auch lassen sich funktionelle Durchmesseränderungen von strukturellen, stabilen Unregelmäßigkeiten im Durchmesser nicht unterscheiden.

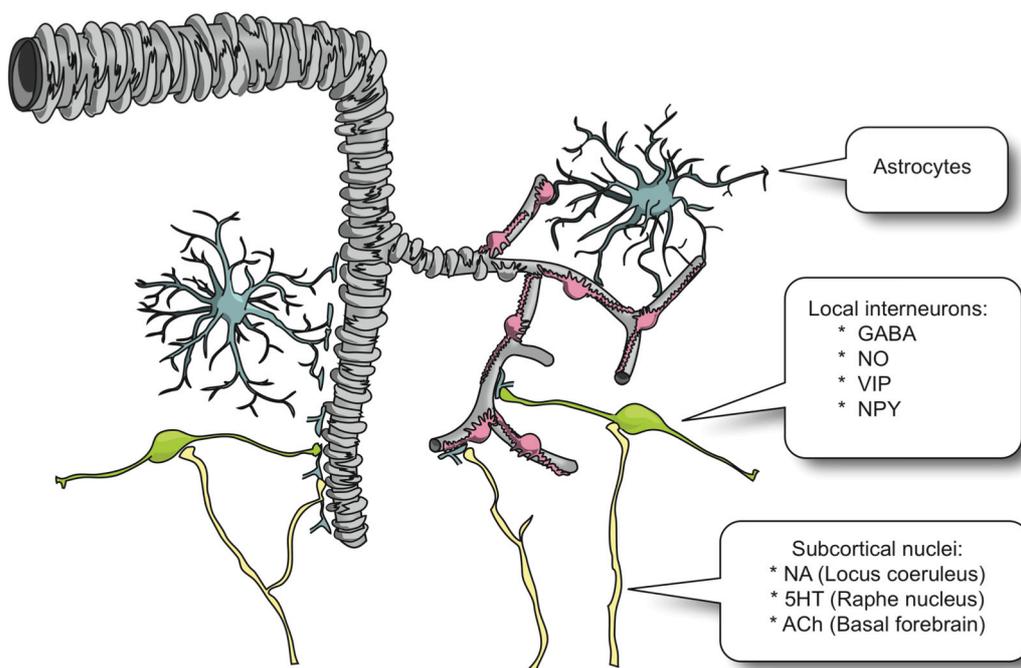


Abbildung 4: Zelluläre Mediatoren der neurovaskulären Kopplung

Zelluläre Elemente, die wahrscheinlich an der Regulation des zerebralen Blutflusses beteiligt sind, sind auf der Ebene der Kapillaren vorhanden. Dazu zählen Astrozyten, deren Endfüße als *glia limitans* das kapillare Netzwerk bedecken und somit eine zelluläre Interphase zwischen Neuronen und Gefäße bilden. Lokale GABAerge Interneurone und Terminale der subkortikalen Nuclei, haben ebenfalls Kontakt mit Kapillaren, direkt oder über die astrozitäre *glia limitans*. Sowohl Astrozyten als auch die benannten neuronalen Strukturen (über die aufgelisteten vasoaktiven Neurotransmitter oder Peptide) sind putative Modulatoren des Blutflusses auf kapillärer Ebene.

Regulationsmechanismen des Blutflusses auf kapillarer Ebene

Nicht nur könnte die Kapillare also über aktiven *Effektoren* der Blutflussregulation (die Perizyten) verfügen; auch mehrere bekannte Mechanismen der Regulation des Blutflusses konvergieren auf der Ebene der Kapillaren. Putative diffusionsfähige Mediatoren der neurovaskulären Kopplung wie ATP, Protonen oder Kaliumkationen entstehen im neuralen Parenchym und könnten somit von Kapillaren als erstes wahrgenommen werden. Aber auch zelluläre Effektoren der Blutflussregulation im Hirn sind auf der kapillaren Ebene präsent (**Abb. 4**). Astrozyten bedecken als Kernbestandteil der Bluthirnschranke die Endothelzellen, aber auch Perizyten werden von astrozytären Fortsätzen umhüllt [84]. Astrozyten können durch Cyclooxygenase-1-abhängige Mechanismen eine Vasodilatation in den größeren Gefäßen auslösen [85,86]. Auch perivaskuläre Nervenendungen sind auf kapillarer Ebene präsent. GABAerge Interneurone, die den Tonus von parenchymalen Arteriolen modulieren [13], strecken ihre Axonterminale auch zu den Kapillaren aus, wo sie häufig Kontakt zu den Endfüßen der Astrozyten bilden. Axonendungen aus subkortikalen Regionen bilden ebenfalls zahlreiche Kontakte zu kortikalen Kapillaren, entweder unmittelbar oder über astrozytäre Prozesse. Das ist in der Ratte für den *Locus coeruleus* (noradrenerge Terminale), die Raphe-Kerne (serotonerge Terminale) und das basale Vorderhirn (cholinerge Terminale) gezeigt worden. Diese subkortikalen Regionen sind allesamt in der Lage, den Blutfluss im zerebralen Kortex zu beeinflussen [13].

1.4 Bildgebung von Kapillaren im ZNS

Die klassischen Studien der kapillaren Vasoaktivität wurden in lichtdurchlässigen Präparationen isolierter Organe oder ganzen Organismen durchgeführt; meistens solche, die sich auf eine nahezu zweidimensionale Struktur reduzieren ließen, wie dem mesenterialen Netzwerk der Säugetiere, der Froschzunge, der Nickhaut, der Retina usw. Die Kapillaren im ZNS sind eingebettet in ein solides Medium, das sehr effektiv Licht streut und deswegen die direkte mikroskopische Beobachtung von Kapillaren im lebenden Gewebe schwierig macht. Mittels Infrarot-Interferenzkontrast lassen sich zelluläre Strukturen im isolierten Hirngewebe, z.B im akuten Hirnschnitt, beobachten; so auch parenchymale Arterien, Venen und Kapillaren [70]. Es lassen sich mittels dieser Technik alle Gefäße mit der notwendigen Auflösung darstellen. Allerdings ist die Auswahl oft auf die oberflächlichen Schichten des Präparates beschränkt. Eine Beobachtung der tieferen Gefäße wäre im akuten Hirnschnitt vorteilhaft, da diese nicht durch das

Schneiden traumatisiert worden sind. Für das Gehirn lässt sich diese Technik, die auf der Transluminatation mit infrarotem Licht basiert, nicht *in vivo* benutzen.

Für die mikroskopische Bildgebung im ZNS hat sich die Zwei-Photonen-Mikroskopie bewährt, die die zelluläre und subzelluläre Bildgebung im lebendigen, isolierten Organpräparat oder *in vivo* möglich macht. Diese mikroskopische Technik kann, dank der größeren Eindringtiefe des Infrarotlichts und der Nutzung des Zwei-Photonen Effektes für die Herstellung konfokaler Bilder, fluoreszent-markierte Strukturen in Tiefen von ca. 600 μm auflösen [87]. Diese Technik ist erfolgreich für die Erforschung des zerebralen Blutflusses *in vivo* benutzt worden, da es die Messung des Blutflusses und die Erfassung des Gefäßdurchmessers in Abhängigkeit von funktionellen Interventionen auf Gefäße, Neuronen oder Gliazellen erlaubt [18,76,85,86,88,89].

1.5 Herleitung einer Aufgabenstellung

Es gibt eine Reihe von Hinweisen, die auf eine mögliche Beteiligung von Kapillaren in der Regulation des zerebralen Blutflusses hindeuten (s. o.). Trotz etablierter Kenntnisse über die Kontraktilität von Perizyten in der Zellkultur, ist es nur vereinzelt gelungen, die Kontraktilität von Kapillaren in dem lebendigen Gewebe zu demonstrieren. Schönfelder *et al.* stellten die Kontraktilität in retinalen Kapillaren zu vasoaktiven Substanzen fest [69]. Peppiatt *et al.* haben in der isolierten Retina und im akuten zerebellären Hirnschnitt ebenfalls die Kontraktion und Dilatation von Kapillaren als Antwort auf verschiedene Neurotransmitter, direkte elektrische Stimulation oder Hypoxie zeigen können [70]. In ihrer Arbeit stellten sie auch die kausale Rolle von Perizyten bei der kapillaren Kontraktilität fest.

Jedoch ist die kapillare Kontraktilität im zerebralen Kortex nicht nachgewiesen. Obwohl Durchmesser- und Volumenveränderungen in den Kapillaren *in vivo* beobachtet worden sind, konnte die Präsenz eines aktiven, den Durchmesser bedingenden kapillaren Tonus *in vivo* nicht demonstriert werden. Dessen Beweis setzt die Beobachtung von selektiven Durchmesseränderungen einzelner Kapillaren *in vivo* voraus.

Die Zwei-Photonen Mikroskopie erlaubt die Beobachtung von vaskulären Strukturen in isolierten Organpräparationen oder im lebendigen, anästhesierten Tier. Voraussetzung dafür ist die Markierung dieser Strukturen mit einem fluoreszierenden Indikator. Wir haben in der β -actin-eGFP transgenen Maus ein Modell gefunden, in der sich Kapillaren dank ihrer höheren GFP-Expression mittels Fluoreszenz-basierenden bildgebenden Verfahren abbilden lassen. So

konnten wir mittels der Zwei-Photonen-Mikroskopie in akuten Hirnschnitten oder *in vivo* die Präsenz von aktiven Durchmesseränderungen der kortikalen Kapillaren untersuchen.

Des Weiterem haben sich in den letzten Jahren Hinweise angesammelt, die auf eine wichtige Funktion der Perizyten in der Regulation der Bluthirnschranke und in der Generation von Narbengewebe nach einer traumatischen Läsion des Rückenmarks hinweisen [43,45]. Diese Ergebnisse suggerieren, dass Perizyten in der pathophysiologischen Kaskade nach Schlaganfall eine wichtige Rolle spielen könnten, die sich sowohl durch eine Kompromittierung der Bluthirnschranke wie durch die Abkapselung des ischämischen Gewebes durch eine gliotische Narbe charakterisieren. Jedoch ist die Reaktion von Perizyten in humanem Schlaganfall oder in tierexperimentellen Modellen des Schlaganfalls bisher nicht beschrieben worden.

Aus diesen Überlegungen heraus sind wir den folgenden Fragen nachgegangen:

1. *Sind die kortikalen Perizyten kontraktile, und kann die Kontraktilität von Perizyten in vivo den Blutfluss modulieren?*
2. *Ist die Vasoaktivität durch Perizyten in Kapillaren relevant für die funktionelle Hyperämie?*
3. *Wie reagieren Perizyten und murale Zellen in einem Modell des Schlaganfalls?*

2 Methodik

2.1 Tiere

Als Objekt unserer Untersuchung haben wir die β -actin eGFP Maus benutzt [90]. In dieser Maus wird GFP in nahezu jeder Zelle unter dem β -actin Promotor exprimiert (die Maus wurde ursprünglich konzipiert, um als Quelle fluoreszent-markierter Zellen in Transplantationsexperimenten zu dienen). Die Tiere wurden in unserem Tierstall gezüchtet. Da die homozygoten Tiere die ersten postnatalen Wochen nicht überlebten, haben wir für unsere *in vitro* und *in vivo* Studien heterozygote Tiere benutzt. In die Studien wurden 2–8 Monate alte Tiere beider Geschlechter eingeschlossen. Alle Experimente wurden gemäß der Gesetze und Richtlinien für Tierversuche des Landes Berlin (Landesamt für Gesundheit und Soziales, Tierversuchsantrag Regs G006/06, G0064/10) und der Charité – Universitätsmedizin Berlin durchgeführt.

2.2 Immunohistologie

Gewinnung der Schnitte

Für die Immunohistologische Studie haben wir drei Tiere mit eiskaltem Kochsalz-haltigem Phosphatpuffer (PBS) und später einer eiskalten Paraformaldehyd-Lösung (PFA; 4% in PBS) nach Thorakotomie, Öffnung des rechten Atriums und Punktion des linken Ventrikels transkardial perfundiert. Nach einer weiteren Fixierung des Kopfes über Nacht in 4% PFA in PBS wurden die Hirne entnommen und zwei bis drei Tage lang in PBS gewaschen. Aus dem Material wurden mit einem Vibratom oder Kryostat (Micron, Deutschland) 20–30 μ m dicke koronale Schnitte hergestellt.

Immunohistologische Färbung

Die Schnitte wurden frei schwebend in Lösung gefärbt. Das Protokoll für die Immunofluoreszenz-Färbung vaskulärer Zellen bestand aus folgenden Schritten: 1) Waschen der Schnitte in PBS. 2) Zweistündiges Blockieren unspezifischer Antikörperbindstellen mit 10% Normalem Serum (NS) der Spezies, aus dem der Zweitantikörper stammt, 2% Bovine Serum Antigen (BSA) in PBS, dazu 0.5% Triton-X zur Permeabilisation des Gewebes. 3) Inkubation der Erstantikörperlösung über Nacht bei 4°C bestehend aus 5% NS, 2% BSA und 0.5% Triton-X. 4) Dreimaliges, 20-minütiges Waschen des Erstantikörpers mit 5% NS, 2% BSA, 0.5% Triton-X in PBS. 5) Inkubation des Zweitantikörpers (Verdünnung 1:500) über Nacht bei 4°C in

der gleichen Lösung wie bei Schritt 3. 6) Waschen wie bei Schritt 4. 7) Auftragen der Schnitte auf einen Objektträger und einbetten der Schnitte in ein Medium, das DAPI zur Färbung der Zellkerne beinhaltet. Wir benutzten folgende Erstantikörper: anti α -smooth muscle (SM)-Aktin (Maus, Merck Millipore), anti-CD105 (Kaninchen, Acris Antibodies), anti-CD13 (Ratte, Acris Antibodies), anti-CD31 (Kaninchen, BD Pharmingen), *anti-cleaved caspase-3* (CC3; Kaninchen, BD Pharmingen), anti-Fibronektin (Kaninchen, Dako, Glostrup, Denmark), anti-GFAP (Kaninchen, Dako), anti-GFP (Kaninchen, Invitrogen), anti-Iba-1 (Kaninchen, Wako), anti-Ki67 (Kaninchen, Abcam), anti-Laminin (Kaninchen, Sigma-Aldrich), anti-NG2 (Kaninchen, Merck Millipore), anti-PDGFR β (Ratte, eBioscience), anti-PDGFRb (Kaninchen, Novus Biologicals), oder anti-p65 (Kaninchen, Santa Cruz Biotechnology). Die entsprechenden sekundären Antikörper waren mit dem rot-emittierenden Alexa-568 oder grün-emittierenden Alexa-488 konjugiert.

Konfokale Mikroskopie

Die so gewonnenen Schnitte wurden mit einem konfokalen Mikroskop (Leica TCS SPE) untersucht, um die Immunreaktivität der GFP-exprimierenden vaskulären Zellen in der β -actin-eGFP Maus festzulegen. Für die Aufnahmen wurde ein 63 \times Öl-Immersionsobjektiv benutzt (Numerische Apertur 1,65). Konfokalität wurde durch das Benutzen des stets kleinstmöglichen *pinhole* erreicht. Bilderstapel wurden gewonnen, die ganze Gefäße einschließen. Der vertikale Abstand zwischen einzelnen Bildern betrug 0,3 bis 0,5 μ m. Die Bilder wurden mit der frei zugänglichen Software ImageJ (version 1.34, NIH Bethesda, USA) verarbeitet, um Projektionen der Maximalen Intensität in der vertikalen Achse und dreidimensionale Rekonstruktionen herzustellen.

2.3 Experimente im akuten Hirnschnitt

Präparation der akuten Hirnschnitte

β -actin-eGFP Mäuse wurden durch Inhalation von 4% Isofluran in O₂ in eine tiefe Narkose versetzt. Mit einem eisgekühlten Skalpell wurde der Kopf der Maus vom Rumpf abgetrennt und mit einer eisgekühlten Schere der Schädel geöffnet. Um eine schnelle Kühlung des Hirngewebes zu erreichen, wurde das Organ von diesem Zeitpunkt an ständig mit eiskalter künstlicher Zerebrospinalflüssigkeit (aCSF) übergossen. Die Lösung beinhaltete 125,8 mM NaCl, 3,1 mM KCl, 1,2 mM NaH₂PO₄, 1,3 mM MgSO₄, 32 mM NaHCO₃, 10 mM Glucose und 2,4 mM CaCl₂ und wurde stets mit Carbogen (5% CO₂, 95% O₂) begast. Koronale, 300 μ m dicke Hirnschnitte,

die den somatosensorischen Kortex beinhalteten, wurden mittels eines Vibratoms (Microm) geschnitten und in einer selbstgebauten sogenannten *interface*-Kammer bei Raumtemperatur zur Aufbewahrung gestellt (**Abb. 5a**). Die Schnitte lagen mindestens eine Stunde in der Kammer, bevor sie zur Messkammer am Zwei-Photonen Mikroskop geführt wurden.

Versuchsaufbau am Zwei-Photonen Mikroskop

Um die Schnitte zu fixieren und sie in die Messkammer zu transferieren, wurden sie auf poli-L-lysine beschichtete Deckgläschen gelegt (**Abb. 5b**). In der Messkammer wurden die Schnitte mit aCSF kontinuierlich superfundiert. Das aCSF wurde in der Messkammer auf eine Temperatur von 36–37 °C erwärmt. Es wurden Regionen im Hirnschnitt gewählt, die ungefähr in der neuronalen Schicht IV-V des sensorischen Kortex lagen. Darin wurden mittels Zwei-Photonen Mikroskopie Kapillaren identifiziert, die mindestens 80 µm unter der Schnittkante des Hirnschnittes lagen. Nach einer Akklimatisierung von 20 min in der Kammer wurden die Schnitte mit Pharmaka behandelt. U46619 (9,11-dideoxy-9 α ,11 α -methanoepoxy Prostaglandin F 2α) oder SQ 29,548 (Cayman Chemical) wurde den Protokollen entsprechend eingesetzt (siehe Ergebnisse). Bilder der Kapillaren wurden in 15-minütigen oder 1-minütigen Intervallen gemacht. Die Technik der Zwei-Photonen Mikroskopie und die Akquise von Bildern der Kapillaren wird im Abschnitt 2.4 vorgestellt.

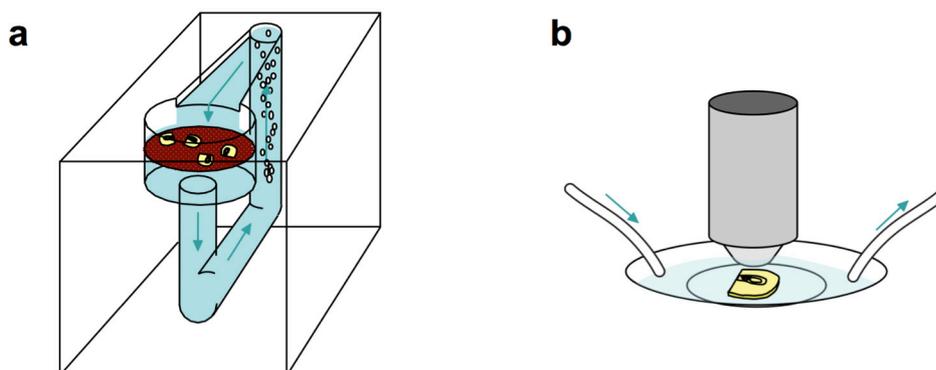


Abbildung 5: Inkubations- und Messkammer der akuten Hirnschnitte

a: Nach der Präparation der akuten Hirnschnitte wurden diese (bis zum Transfer in die Messkammer) in einer interface-Kammer aufbewahrt, in der sie bei Raumtemperatur kontinuierlich mit begastem aCSF superfundiert wurden. b: Für die Bildgebung wurden die Schnitte zwecks Fixierung auf poli-L-Lysine-beschichtete Objektträger plziert und in die auf 37°C aufgewärmte, kontinuierlich superfundierte Messkammer transferiert. Pharmaka wurden in aCSF gelöst und superfundiert.

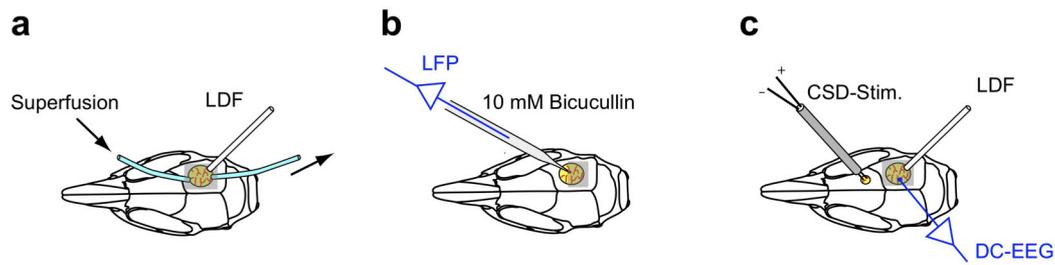


Abbildung 6: Modelle des kranialen Fensters

a: Für die Superfusion mit U46619 wurde ein geschlossenes Fenster präpariert, in dem durch zwei Röhren der Ein- und Abfluss von aCSF möglich gemacht wurde. Die *Dura mater* wurde in diesen Experimenten geöffnet. b: Um die Insertion einer Bicucullin-enthaltenden Mikropipette in den parietalen Kortex zu ermöglichen, wurde ein inkomplettes kraniales Fenster eingebaut, das nicht die ganze von Knochen befreite kortikale Oberfläche abdeckte, und dennoch ausreichende Stabilität für die Bildgebung gewährleistete. c: In den Cortical Spreading Depolarization (CSD)-Experimenten, wurde ein zweites frontales Fenster eingebaut, um die Stimulation der CSD zu ermöglichen. Das epidurale Cortico-Enzephalogramm (DC-EEG) wurde mit einer Elektrode im parietalen Fenster abgeleitet. Der Blutfluss wurde mittels Laser-Doppler Flowmetry (LDF) im parietalen Fenster gemessen. Das Zwei-Photonen Imaging erfolgte jeweils über das parietale Fenster.

2.4 Experimente *in vivo*

Physiologische Präparation der Maus

Die Narkose der β -actin-eGFP Mäuse wurde mittels Isofluran 4% in einem 70% O₂ – 30% N₂O Gasmisch in einer Narkosekammer eingeleitet. Daraufhin wurde während der weiteren Präparation –bis zum Übergang zu der Thiopenthal-Narkose– die ausreichende chirurgische Tiefe der Narkose mit 1,5–1,8 % Isofluran im selben Gasmisch über eine Gasmaske erreicht. Die Mäuse wurden auf einer homeothermischen Wärmeplatte gesetzt, die Körpertemperatur rektal kontinuierlich monitorisiert und auf 37–38 °C eingestellt. Die Arteria und Vena femoralis wurden zwischen dem Ligamentum inguinalis und dem Abgang der A. femoralis profunda kanüliert. Für die kontinuierliche Monitorisierung des Blutdruckes wurde die arterielle Kanüle an einem Druckmessfühler angeschlossen. Die Vene diente als Zugang für die Gabe von NaCl-Lösung, Thiopenthal, oder dem Fluoreszenz-Farbstoff TRITC-Dextran.

Nach der Präparation der Arterie und Vene wurde die Trachea frei präpariert. Ein PTFE-Tubus wurde in die Trachea eingeschoben und fixiert, durch den die Tiere mittels einer Beatmungsmaschine für kleine Nagetiere (CWI) künstlich beatmet wurden. Die Parameter der Beatmung wurden in Anlehnung an die Literatur gewählt, um eine lange Beobachtungszeit der Mäuse bei Aufrechterhaltung der Homöostase zu ermöglichen. Die Atemfrequenz schwebte zwischen 70 und 90 Atmungen/min; die Inspirationszeit betrug 75–90 ms, das Atemvolumen betrug 1–1,2 ml. Das end-expiratorische CO₂ (ET-CO₂) konnte durch einen Mikrocapnographen (Columbus Instruments) kontinuierlich detektiert werden; die Beatmungsparameter wurden justiert, bis sich das ET-CO₂ zwischen 27 und 35 mmHg einstellte.

Nach der Intubation wurde die Narkose auf Thiopental umgestellt (Einleitung 70 mg/kg Körpergewicht i.v.; Erhaltung 30 mg/kg Körpergewicht jede Stunde oder bei Bedarf). Die Tiefe der Narkose wurde durch Zwicken der Interdigitalmembran der vorderen Pfoten getestet, wobei es zu keinem Anstieg des Blutdrucks kommen sollte. Die Parameter Blutdruck, Herzfrequenz, Temperatur, Atemfrequenz und ET-CO₂ wurden kontinuierlich mittels eines AD-Wandlers (National Instruments) und der Software LabVIEW erfasst. Am Ende des Experimentes wurden die Tiere mit einer Überdosis Thiopental getötet.

Präparation des kranialen Fensters

Nach Umstellung der Narkose auf Thiopental wurde die Maus in einem maßgefertigten stereotaktischen Rahmen eingespannt, die Haut über der Kalotte geöffnet und eine zirkuläre Furche (ca. 1 mm Durchmesser) über den parietalen Knochen mit einem zahnmedizinischen Bohrer eingraviert. Nach Abtragen der Knocheninsel mit einer feinen Pinzette wurden drei unterschiedliche Typen des kranialen Fensters gebaut (**Abb. 6**): a) ein mit einem Deckglas geschlossenes Fenster, in das über einen Zufluss und einen Abfluss Lösungen über den parietalen Kortex (bei abgetragener Dura Mater) eingewaschen werden konnten b) ein mit Deckglas *halb* geschlossenes Fenster mit intakter Dura Mater, durch das über eine seitliche Öffnung eine Glas-Mikropipette eingeführt wurde, und c) ein mit Deckglas geschlossenes Fenster ohne Zu- und Abfluss und intakter Dura Mater. Während der Präparation des Fensters wurde darauf geachtet, die Oberfläche des Hirnes mechanisch nicht zu traumatisieren. Die offene Hirnoberfläche wurde kontinuierlich während der Präparation mit aCSF gespült. Bei manchen Tieren wurde ein zweites ipsilaterales offenes kraniales Fenster über dem frontalen Kortex plaziert. Nach geglückter Fenster-Präparation wurden 200 µl 2% TRITC-Dextran

(Molekulargewicht 60.000 kDa, Sigma-Aldrich) durch die Femoralvene injiziert, und das Tier zum Zwei-Photonen Mikroskop transferiert.

Superfusion mit U46619

Bei einem Teil der Tiere wurde 100 nM U46619 gelöst in aCSF oder ein Vehikel während der Beobachtung am Zwei-Photonen Mikroskop mittels eines geschlossenen, superfundierten Fensters (**Abb. 6a**) über den parietalen Kortex appliziert. In einer Versuchsgruppe wurden einzelne Kapillaren vor und nach der Superfusion mit U46619 oder dem Vehikel abgebildet, um deren Durchmesser zu ermitteln. In denselben Gefäßen wurden die Geschwindigkeit der Erythrozyten und deren Flussrate gemessen (siehe weiter unten für die Methodenbeschreibung). In einer weiteren Versuchsgruppe wurden während ca. einer Stunde alle zwei Minuten Kapillaren abgebildet; während der zweiten halben Stunde wurde 100 nM U46619 superfundiert. In allen Gruppen wurde der Effekt von U46619 oder vom Vehikel auf den zerebralen Blutfluss mittels Infrarot Laser-Doppler Blutflussmessung (LDF, Perimed, Schweden) ermittelt.

Infusion von Bicucullin

Um die Antwort unterschiedlicher vaskulärer Abschnitte (Blutfluss und Durchmesser) auf einen Anstieg der neuronalen Aktivität zu ermitteln, haben wir den GABA-Rezeptor Antagonisten Bicucullin (Sigma-Aldrich) in den Kortex infundiert [91]. Dazu wurde eine Glas-Mikropipette (Durchmesser 20–30 µm an der Spitze) mit 10 mM Bicucullin in aCSF gefüllt und in den parietalen Kortex durch ein halboffenes kraniales Fenster eingeschoben (**Abb. 6b**). Die Öffnung des Fensters wurde mit 15% Agarose in aCSF abgedichtet. Bicucullin diffundierte frei durch die Öffnung der Mikropipette. Die Mäuse waren mit einer Referenzelektrode über der Nackenmuskulatur ausgestattet. Das *lokale Feldpotential* (LFP) wurde durch eine AgCl-Elektrode in der Bicucullin-gefüllten Mikropipette erfasst. Das Signal wurde mit einem Cyberamp 380 (Axon Instruments) verstärkt und gefiltert (Bandpassfilter zwischen 0,1 und 1 kHz). Ein Analog-Digital Wandler tastete das Signal mit einer Frequenz von 5 kHz ab. Unmittelbar nach Einschub der Mikropipette stellten sich Salven neuronaler Aktionspotentiale ein, die als Depolarisationsspitzen weiter mit einer Frequenz von 0,1–0,3 Hz während des ganzen Experiments auftraten. Zwei-Photonen Bilder von unterschiedlichen Abschnitten der Mikrozirkulation (pialen, penetrierenden oder präkapillaren Arteriolen oder Kapillaren) wurden kontinuierlich während einer Minute mit einer Frequenz von 5–8 Hz aufgenommen, um Veränderungen des Gefäßdurchmessers zu ermitteln. In denselben Gefäßen wurde die Erythrozytengeschwindigkeit mittels Zwei-Photonen Mikroskopie ebenfalls während einer

Minute gemessen. Veränderungen dieser zwei Parameter wurden später mit der zeitgleich aufgenommenen neuronalen Aktivität korreliert.

Auslösung der *cortical spreading depolarization* (CSD)

Bei einem Teil der Tiere wurde die Antwort des Gefäßdurchmessers auf einen länger anhaltenden neuronalen Stimulus überprüft. CSD wurde durch eine bipolare Elektrode ausgelöst, die über den ipsilateralen frontalen Kortex epidural platziert wurde (**Abb. 6c**). Typischerweise wurden 5 Strompulse (1 mA, 100 ms, 1 Hz) mit einem Stimulator (Isoflex) appliziert. Die Pulsenergie wurde von einem Master8 betrieben. Eine Referenzelektrode wurde über die Nackenmuskulatur platziert und eine AgCl Ballelektrode wurde über der Dura Mater im Kortalen Fenster platziert, um das *direct current* (DC)-Potential und das epidurale Kortiko-Enzephalogram (EEG) darzustellen und das Durchziehen der CSDs zu erfassen. Das Signal wurde ähnlich wie bei den Bicucullin-Experimenten amplifiziert und abgetastet. Der zerebrale Blutfluss wurde im parietalen Fenster durch eine Laser-Doppler Sonde gemessen. Zwei-Photonen Bilder der Gewebevolumina, die mindestens eine Arteriole und die dazugehörigen Kapillaren flussabwärts enthalten haben, wurden in Abständen von einer Minute aufgenommen. Somit wurden die Veränderungen im Durchmesser mehrerer Gefäße gleichzeitig erfasst; die Messung der Erythrozytengeschwindigkeit oder -flussrate in einzelnen Kapillaren war jedoch nicht möglich. Typischerweise wurden Gefäße 10 Minuten *vor* und 20 Minuten *nach* der CSD abgebildet.

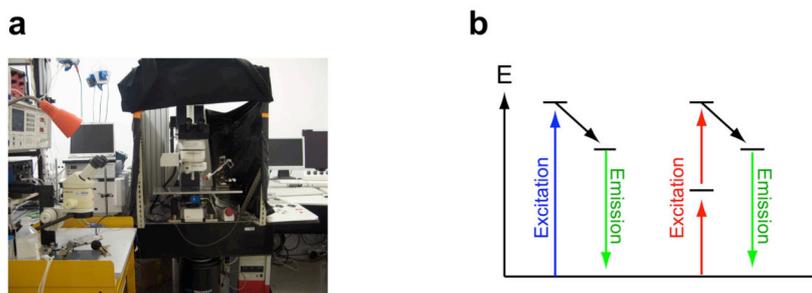


Abbildung 7: Prinzip der zwei-Photonen-Mikroskopie

a: Aufnahme unseres zwei-Photonen Mikroskopie und in vivo-Setups. b: Prinzip der Multiphotonen-exzitation eines Fluoreszenzfarbstoffs. Links wird die Exzitation/Emission bei der konventionellen Fluoreszenz dargestellt. Das Emissionslicht, das einen Farbstoff zur Fluoreszenz anregt (blau), ist energiereicher und hat eine kürzere Wellenlänge als das Emissionslicht (grün). Rechts wird die Multiphotonen-Fluoreszenz dargestellt: zwei energieärmere Photonen von ungefähr doppelter Wellenlänge (rot) bringen die notwendige Energie auf, um den Quantensprung des Fluorophors zu erreichen.

2.5 Zwei-Photonen Mikroskopie

Die Zwei-Photonen Mikroskopie basiert auf der *gleichzeitigen* Exzitation eines Fluorophors durch zwei oder mehrere Lichtquanten geringerer Energie (**Abb. 7**). Die Benutzung längerer, energieärmerer Wellenlängen mit geringerer Phototoxizität und höherer Eindringtiefe macht sie vorteilhaft für das Mikroskopieren lebendiger Präparate (**Abb. 8**) [87,92]. Wir haben ein kommerzielles Zwei-Photonen Mikroskop (Leica TCS SP2) benutzt, das an einen Titanium-Saphir Laser (Tsunami, Spectraphysics) angekoppelt war. Um GFP und TRITC-Dextran gleichzeitig anzuregen, wurde das Emissionsspektrum des Lasers auf eine Höhe von 840 nm eingestellt. Fluoreszenzlicht wurde mit einem dichroischen Spiegel (560 nm) aufgeteilt und mit

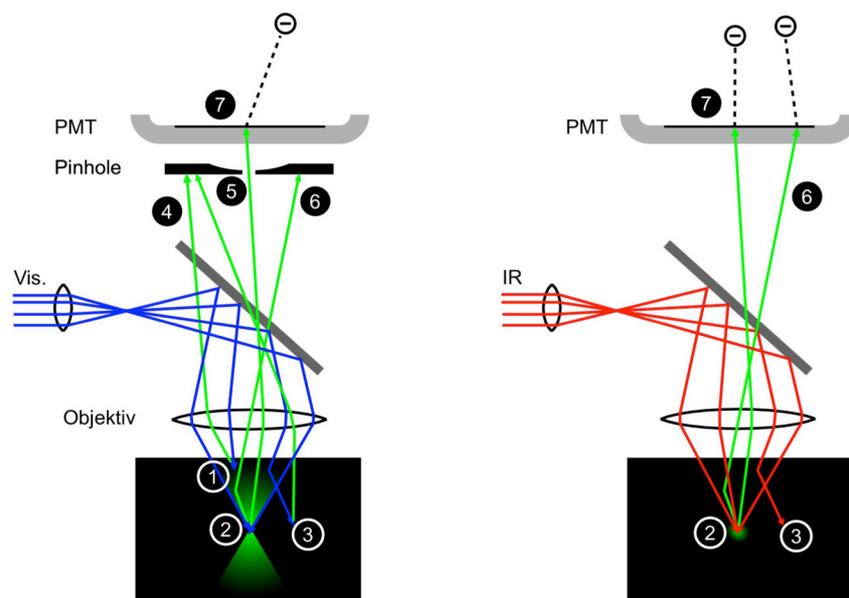


Abbildung 8: Lichtwege in der konventionellen konfokalen Mikroskopie und der Zwei-Photonen Mikroskopie

In diesem Schema werden die wichtigsten Unterschiede zwischen den optischen Wegen bei der konventionellen konfokalen Mikroskopie (links) und der Multiphotonen-Mikroskopie (rechts) dargestellt. Das Präparat entspricht einem homogen fluoreszierenden Objekt. Bei der konfokalen Mikroskopie wird das Exzitationslicht in höherem Maß vom Präparat gestreut (1 und 3), weil es typischerweise eine kürzere Wellenlänge hat. Das „Pinhole“ ist notwendig, um Emissionslicht herauszufiltern, das nicht aus dem fokalen Volumen stammt (4 und 5); aber auch Emissionslicht, das durch das Präparat gestreut wurde und aus dem Fokus stammt (6), wird abgewendet. Es kommt zur Fluoreszenz innerhalb des ganzen fokalen Konus, was dazu führt, dass trotz „Pinhole“ Fluoreszenzlicht aus den Ebenen oberhalb und unterhalb des Fokus detektiert wird, und nicht nur die ballistischen Photonen aus dem Fokus (7). Im Fall der Multiphotonen-Mikroskopie (rechts) erreicht mehr Exzitationslicht die fokale Ebene, da es energieärmer ist und weniger gestreut wird. (2). Innerhalb des fokalen Konus ergibt sich keine Fluoreszenz, da eine erhöhte Dichte des Exzitationslichts am Fokus erforderlich ist (3). Gestreutes Emissionslicht (3) produziert keine Fluoreszenz. Sowohl die ballistischen Photonen aus dem Fokus (7) wie solche, die zerstreut werden (6), werden detektiert, da auf ein „Pinhole“ verzichtet werden kann. P: Präparat, Obj: Objektiv, DS: dichroischer Spiegel, PMT: Photomultiplikator. Modifiziert nach: Denk W, Svoboda K. Photon upmanship: why multiphoton imaging is more than a gimmick. Neuron 1997;18:351-357.

zwei Breitpassfiltern (525/50 und 610/75 nm) gefiltert, um das Signal von GFP und TRITC-Dextran zu unterscheiden. Ein 40× (NA 0,8) oder 20× (NA 0,5) Wasserimmersionsobjektiv wurde für diese Studie eingesetzt.

Die Gefäßabschnitte wurden vollständig abgebildet, indem Gewebevolumenta (typischerweise 100×100×40 µm) in vertikalen Schnitten von ungefähr 0,8 µm gescannt wurden. In den ersten Hirnschnitt-Experimenten wurden drei Bilder pro Ebene akquiriert und gemittelt. Unter manchen Bedingungen, die eine höhere zeitliche Auflösung (und deswegen ein schnelles Abbilden der gezielten Struktur) erfordert haben, wurde die räumliche Auflösung geopfert und es wurden weniger Bilder in einem Gewebevolumen oder gar nur eine Ebene gescannt. In diesem Fall wurde das 20× Objektiv, mit geringerer Auflösung auf der vertikalen Axis, gewählt. Eine weitere Möglichkeit um die Geschwindigkeit der Bilderakquisition zu erhöhen bestand darin, die Anzahl der gescannten Pixel pro Bild zu verringern.

Für die Messung der Erythrozyten-Geschwindigkeit wurde mit einer hohen Frequenz (1 oder 2 kHz) eine Linie parallel zum Plasmafluss einzelner Gefäße kontinuierlich gescannt, so dass planare Bilder entstanden, auf der in einer Dimension die Zeit dargestellt wurde. Die Passage von Erythrozyten konnte *ex negativo* aus dem TRITC-Dextran gefärbten Plasma ermittelt werden.

2.6 Bildanalyse

Die Bildanalyse wurde mit dem frei zugänglichen Programm ImageJ, Versionen 1.34 bis 1.46 (Wayne Rasband, National Institute of Health, Bethesda USA) und selbst geschriebener java-plugins, oder mit MATLAB Version 7.4 und selbst geschriebener Routinen durchgeführt.

Bestimmung der Kollokalisierung von Perizyten und Konstriktionen

Wir wollten das Verhältnis zwischen Perizyten-Zellkörpern und der Konstriktion von Kapillaren im akuten Hirnschnitt nach der Behandlung mit U46619 bestimmen. Die Anzahl von Perizyten, die Fraktion der Perizytenkörper an den Konstriktionen, die Anzahl und Länge der konstringierenden Segmente und schließlich die Gesamtlänge der Kapillaren wurden für jedes geprüfte Beobachtungsfeld ermittelt. Die gefundene Fraktion der Perizytenkörper, die Kontakt zu Konstriktionen hatten, wurde mit dem der Fraktion verglichen, die zu erwarten wäre, wenn

die Perizytenkörper stochastisch über konstringierenden und nicht-konstringierenden Segmente verteilt wären. Diese zufällige Kolo-kalisation wurde nach der Formel

$$\text{zufällige Kolo-kalisation} = p \times \frac{l_{konstr} + n_{konstr} \times 10 \mu m}{l_{total}}$$

berechnet, wobei p die Anzahl von Perizyten, l_{konstr} die Länge der konstringierenden Segmente, n_{konstr} die Anzahl der Konstriktionen und l_{total} die Gesamtlänge der Kapillaren auf dem Bild ist. $10\mu m$ entsprechen der mittleren Länge eines Perizytenkörpers.

Ermittlung der Gefäßdurchmesser

Wenn die Gefäßbilder als Stapel aufgenommen wurden (allgemein bei Experimenten im akuten Hirnschnitt und bei der U46619 *in vivo*-Studie), wurden mittels orthogonalen

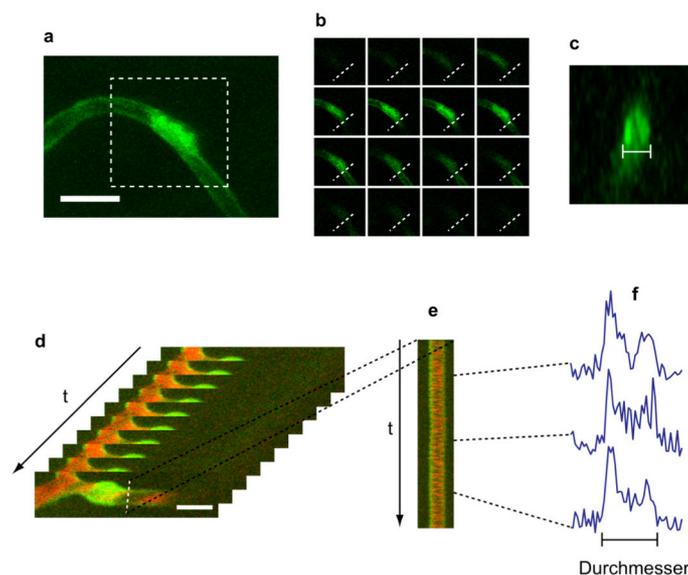


Abbildung 9: Ermittlung der Gefäßdurchmesser

a-c: Manuelle Messung des Durchmessers. Das Bild einer Kapillare (a, maximale Projektion) besteht aus einzelnen Bildern in unterschiedlichen fokalen Ebenen (b). Die orthogonale Rekonstruktion einer bestimmten Ebene (dargestellt durch die diskontinuierliche Linie in b) ergibt eine optische orthogonale Sektion des Gefäßes (c), aus der der Durchmesser manuell mittels ImageJ gemessen wurde. d-e: Automatische Messung. Wenn Bilder einer Kapillare in hoher zeitlicher Auflösung aufgenommen wurden und als Stapel dargestellt wurden (d), ließ sich ebenfalls durch eine orthogonale Rekonstruktion einer bestimmter Ebene (diskontinuierliche Linie in d) der Durchmesser eines Segmentes der Kapillare im Zeitverlauf abbilden (e). Die daraus resultierenden Intensitätskurven wurden automatisch mittels einer MATLAB-Routine bewertet, um den Durchmesser zu jedem Zeitpunkt zu ermitteln. Skala: $10 \mu m$.

Maximalprojektionen zunächst die vaskulären Segmente einzelner Gefäßabschnitte identifiziert, in der die maximalen Unterschiede im Durchmesser nach der jeweiligen Behandlung bestanden. In den 3D-Bilderstapeln wurden dann an diesen bestimmten Ebenen orthogonale Rekonstruktionen der Gefäßwände durchgeführt. Aus diesen Rekonstruktionen wurden manuell für ein bestimmtes Gefäß, Segment und Zeitpunkt der Durchmesser bestimmt (**Abb. 9a–c**)

Wenn die Anzahl der Gefäße oder der Messpunkte eine manuelle Messung nicht möglich machte, wurde eine andere Strategie verfolgt. Einzelne Bilder (Bicucullin-Studie) oder orthogonale Maximalprojektionen (CSD-Studie) wurden mit ImageJ *registriert* (die Bilder wurden automatisch zueinander aufgerichtet, um Bewegungen des Präparats auszugleichen). Aus den einzelnen Bildern wurde ein 3D-Stapel generiert, in dem die orthogonale Dimension unterschiedliche Zeitpunkte der Aufnahme dargestellt hat. Aus diesen Stapeln wurden dann in bestimmten Segmenten orthogonale Schnitte rekonstruiert, um so Bilder zu generieren, in denen der Gefäßdurchmesser im Zeitverlauf dargestellt wurde. Aus solchen Bildern wurde mit einer selbst geschriebenen MATLAB-Routine für jeden Zeitpunkt die Lage der äußeren Gefäßwand bestimmt. Dies geschah, indem aus der räumlichen Verteilungskurve die GFP-Fluoreszenzintensität, die zwei lokale Maxima für die Gefäßwand aufwies, und jeweils die äußeren Punkte bei halber Maximalintensität (*full width at half maximum*) bestimmt wurden. Durch dieses Verfahren ließen sich die Durchmesser im zeitlichen Verlauf automatisch bestimmen (**Abb. 9d–f**).

Bestimmung der Erythrozytengeschwindigkeit und Flussrate

Für diese Bestimmung wurden die Bilder ausgewertet, bei der eine Linie inmitten des Gefäßlumens (Kapillare oder Arteriole) mit hoher Frequenz wiederholt gescannt wurde (siehe oben). Weil das Blutplasma, aber nicht die Erythrozyten, mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert ist, wird auf den sogenannten xt-Bildern die Passage der Erythrozyten als dunkle, geneigte Streifen abgebildet (**Abb. 10a–c**). Aus dem Neigungswinkel der Streifen lässt sich die Geschwindigkeit einzelner Erythrozyten, aus der Anzahl der Streifen lässt sich die Anzahl an Erythrozyten, die innerhalb eines bestimmten Zeitraums das Gefäß durchlaufen (Flussrate), ableiten (**Abb. 10d,e**). Eine MATLAB-Routine wurde geschrieben, die aus den xt-Bildern diese Parameter automatisch entnommen hat. Die Routine durchlief folgende Schritte: 1) automatische *Segmentierung* der Bilder (Diskrimination zwischen Signal und Hintergrund), 2) automatische Erkennung, Trennung und Zählung der einzelnen Erythrozyten-Streifen, und 3) Berechnung der Neigung durch lineare Regression der Pixel, die einem Streifen zugeordnet wurden. In Kapillaren

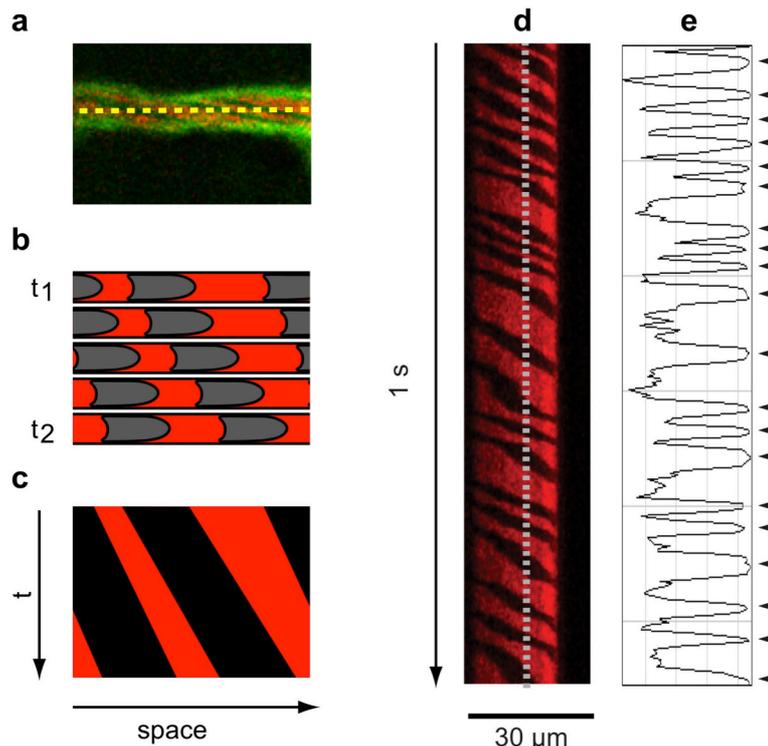


Abbildung 10: Ermittlung von Geschwindigkeit und Perfusionsrate der Erythrozyten

a: Um die sogenannten „Linescans“ herzustellen, wird eine einzelne Linie inmitten des kapillaren Lumens einer Kapillare mit einer hohen Frequenz (1-2 kHz) gescannt (gelbe diskontinuierliche Linie). **b:** Die Abbildung der Passage von Erythrozyten (die nicht fluoreszieren, da nur das Plasma gefärbt ist, erzeugt dunkle Streifen, wenn die zeitlich versetzten Linien aufeinander gestapelt werden. **c:** Die Neigung der Streifen kann ermittelt werden, und aus ihr ergibt sich die Strecke, die ein Erythrozyt in einer bestimmten Zeit durchläuft. **d:** „Linescan“ durch das Gefäß in (a). **e:** Aus der Anzahl lokaler Minima in einem Intensitätsplot eines „Linescans“ lässt sich die Anzahl der Erythrozyten, die in einer bestimmten Zeit durch die Kapillare fließen, ermitteln.

mit langsamem Blutfluss konnte somit die Geschwindigkeit einzelner Erythrozyten und ihre momentanen Flussrate bestimmt werden.

In größeren Gefäßen (Arteriolen) mit schnellerem Fluss lassen sich die Streifen nicht eindeutig einzelnen Erythrozyten zuordnen. Eine andere Analysestrategie wurde hier verfolgt, die auf der Berechnung der Separabilität der Bilder in horizontale und vertikale Elemente basiert [17]. Die Bilder der Erythrozytenpassage wurden rotiert, bis ein Maximum der Separabilität erreicht wurde, und somit wurde der Neigungswinkel der Streifen und die Geschwindigkeit der Erythrozyten ermittelt. Die MATLAB-Routine für die Ermittlung der Geschwindigkeit von Erythrozyten in schnellen Gefäßen wurde uns freundlicherweise von C. Schaffer und N.

Nishimura zur Verfügung gestellt. Mit Hilfe dieser Routine konnten auch die Ergebnisse unserer eigenen Auswertung validiert werden.

2.7 Knochenmarkschimären und experimentelle zerebrale Ischämie

C57 Bl/6 Mäuse (8-10 Wochen alt) wurden mit retroviral transduzierten, GFP exprimierenden Knochenmark(KM)-zellen transplantiert, um in den Schnitten die Präsenz von KM-stammenden Perizyten nach experimenteller zerebraler Ischämie (*middle cerebral artery occlusion*, MCAO) zu überprüfen.

Herstellung von Knochenmarkschimären

Die Gewinnung von KM-Zellen geschah durch das Ausspülen von Tibiae und Femora aus *rgs5^{GFP}* Donor-Tieren. Ca. 5×10^6 KM-Zellen wurden in die Schwanzspitzenvene von 10 Empfänger-Tieren, die davor mit 11 Gy bestrahlt wurden, injiziert. Nach der Transplantation wurden die Tiere in sterilen Käfigen gehalten und prophylaktisch mit Antibiotika behandelt. 4 Wochen nach der Transplantation werden der Chimären MCAO ausgesetzt.

MCAO

Eine transiente, fokale Ischämie des Hirnes wurde experimentell durch die Okklusion der *Arteria cerebri media* verursacht. Die Tiere wurden während des chirurgischen Eingriffes durch die Gabe von 1.0–1.5% Isofluran in einem 70% N₂O / 30% O₂-Gasgemisch in Narkose gehalten. Die *Arteria cerebri media* der Mäuse wurde mit einem Silikon-beschichteten Filament verschlossen, das durch eine Inzision in der linken Arteria carotis interna vorgeschoben wurde und in dieser Position für 60 Minuten blieb, während der die Mäuse aufwachten. In einem zweiten Eingriff mit erneuter Narkose wurde das Filament entfernt, um die Reperfusion des Hirngewebes zu ermöglichen. Die Mäuse wurden nach 1, 3, 5, 7, 14 oder 28 Tage getötet. Dabei wurden sie wie oben beschrieben mit PFA perfundiert, um das Hirngewebe zu fixieren und weiter für die Immunhistologie zu verarbeiten.

2.8 Histologie vom humanen Schlaganfall

Wir haben humanes Material von Menschen analysiert, bei denen eine Autopsie in der Abteilung für Neuropathologie der Charité-Universitätsmedizin in Berlin vorgenommen wurde. Die Benutzung von humanem Material wurde durch die Ethikkommission der Charité genehmigt und

gemäß der ethischen Standards durchgeführt, die in der Deklaration von Helsinki niedergelegt sind.

Gewebeblöcke von unterschiedlichen Hirnregionen wurden in 4% PFA fixiert und in Paraffin eingebettet. Mittels eines Mikrotoms wurden 3 μm dicke Schnitte hergestellt. Nach Deparaffinization und Demaskierung der Antigene (durch Kochen in Zitratpuffer, pH 6,0 oder Boratpuffer, pH 8,0) wurde eine Immunofluoreszenzfärbung wie oben beschrieben durchgeführt. DAB oder HE-Färbungen wurden in einem Automaten durchgeführt. Wir haben folgende Antikörper benutzt: anti-PDGFR β (Kaninchen, Novus Biologicals), anti-GFAP (Kaninchen, Dako), anti-Fibronektin (Kaninchen, Dako), anti-Kollagen VI (Kaninchen, Merck Millipore).

2.9 Morphometrische Auswertung der immunhistologischen Färbungen nach zerebraler Ischämie

Um die Dichte von PDGFR β ⁺ Zellen oder CD13⁺ Perizyten zu messen, und um ihre Kolokalisation mit Zellmarker (CD13, CD105, α -SM-Aktin, Fibronektin, NG2, Iba-1) oder Proliferationsmarker (Ki67) zu analysieren, haben wir Bilder von den Färbungen akquiriert, sowohl vom Infarktkern als auch von der entsprechenden kontralateralen Region, oder von beiden Hemisphären in Kontrollen (5–10 Bilder von 0.15 mm² Fläche für jede Maus und Hemisphäre). Immunoreaktive, kernhaltige Zellen wurden gezählt. CD13⁺ Perizyten wurden gezählt, die eine typische Morphologie gezeigt haben (ovaler oder fusiformer Zellkörper, ca 10 μm lang und mit zellulären Prozessen um die Kapillare). Die Länge der CD31⁺ vaskulären Segmente wurde in einem Areal von 0.15 mm² per Maus und Hemisphäre ermittelt, indem die Konturen der CD31⁺ Immunoreaktivität manuell aufgezeichnet wurden. Die Messungen wurden auf die kontralateralen Ergebnisse normalisiert. Von den humanen Proben wurden 10–15 Bildern per Subjekt analysiert, sowohl aus dem Infarktkern wie aus dem Kontrollgewebe.

Die Dichte von Laminin⁺ und Kollagen-VI⁺ Fasern wurde in 10–15 Bildern per Subjekt und Kondition analysiert, indem die Kreuzungen von immunoreaktiven Strukturen mit einem Gitter (50 μm) aufgezählt wurden.

Um die Entwicklung der Lesionsgröße nach MCAO zu analysieren, wurde in koronalen Sektionen (ca. 0,5 mm anterior zu Bregma) die Fläche des Infarktes gemessen. Die Fläche des Defektes wurde ermittelt, indem die Fläche des gesunden Parenchyms ipsilateral zur Läsion von der Gesamtfläche der kontralateralen Hemisphäre abgezogen wurde. Der Quotient von

Läsionsfläche zu Defektfläche wurde dann für jede Maus kalkuliert, um die Kontraktion des Infarktgewebes zu ermitteln.

3.0 Statistik

Die Normalität der Verteilung jedes erhobenen Parameters wurde mittels des Shapiro-Wilk Tests ermittelt. Dort wo Verteilung nicht signifikant von einer Normalverteilung unterschiedlich war, werden die Daten als Mittelwert \pm Standardabweichung vorgestellt, sonst wurde der Median angegeben. Um Unterschiede auf Signifikanz zu untersuchen, wurde bei Normalverteilungen ein Student-t-Test, einfaktorielle ANOVA oder einfaktorielle ANOVA für wiederholte Messungen mit Bonferroni-Korrektur gewählt. Wenn die Verteilung der Daten signifikant von einer Normalverteilung abwich, wurden nichtparametrische Tests wie der Mann-Whitney-Wilcoxon-Test oder der Wilcoxon-Rangsummentest für wiederholte Messungen gewählt. Die statistischen Berechnungen wurden mit SPSS Version 12.0 oder SigmaStat Version 2.0 (beides SPSS Inc.) oder MATLAB durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Bildgebung von Perizyten im β -actin eGFP Tiermodell

In PFA-fixierten, ungefärbten histologischen Präparaten von β -actin eGFP transgenen Mäusen wiesen die vaskulären Strukturen eine erhöhte GFP-Fluoreszenz auf, verglichen mit dem umgebenden Hirnparenchym. Um die Zellen mit einer erhöhten GFP Expression eindeutig zu identifizieren, haben wir Immunofluoreszenzfärbungen mit Markern für vaskuläre Zellen (Endothelzellen, Perizyten) und für ECM (Laminin) durchgeführt. Wir wollten somit die Frage beantworten, ob im nativen Hirngewebe der β -actin eGFP transgenen Maus die Endothelzellen und Perizyten mittels fluoreszenzbasierten bildgebenden Verfahren identifizierbar sind; und somit, ob sich diese Maus für die intravitale Darstellung von Vasoaktivität im Kapillarnetz eignen würde.

Färbung der Endothelzellen

Wir haben den weit verbreiteten endothelialen Marker PECAM-1 (Platelet Endothelial Cell

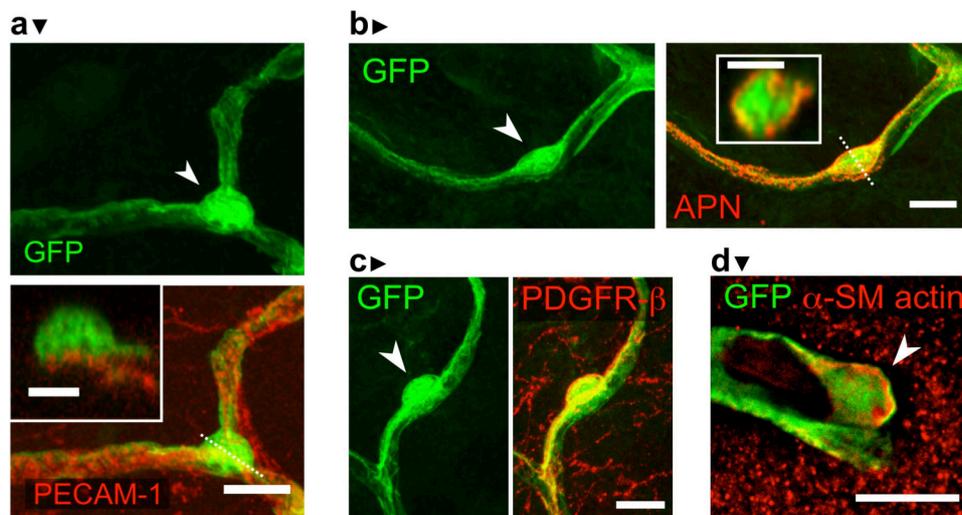


Abbildung 11: Färbung von Endothelzellen und Perizyten bei der β -actin eGFP transgenen Maus

In der β -actin eGFP transgenen Maus können vaskuläre Zellen aufgrund der hohen GFP-Expression abgebildet werden. a: Ein Teil der GFP-positiven Zellen ist immunopositiv für den endothelialen Marker PECAM-1 (rot). Es fanden sich auch runde oder fusiforme vaskuläre GFP-positive Zellen, die negativ für den endothelialen Marker PECAM-1 waren (Pfeilkopf, orthogonale Rekonstruktion in dem Inset). Solche Zellen (markiert durch Pfeilköpfe) waren immunopositiv für den Perizytenmarker APN (rot in b) oder PDGFR- β (rot in c). Die runden, perivaskulären, Perizyt-ähnlichen Somata in größeren Gefäßen zeigten detektierbare zytoplasmatische Immunoreaktivität für das kontraktile Protein Aktin (Pfeilkopf). Skala: 10 μ m, Inset in a: 5 μ m.

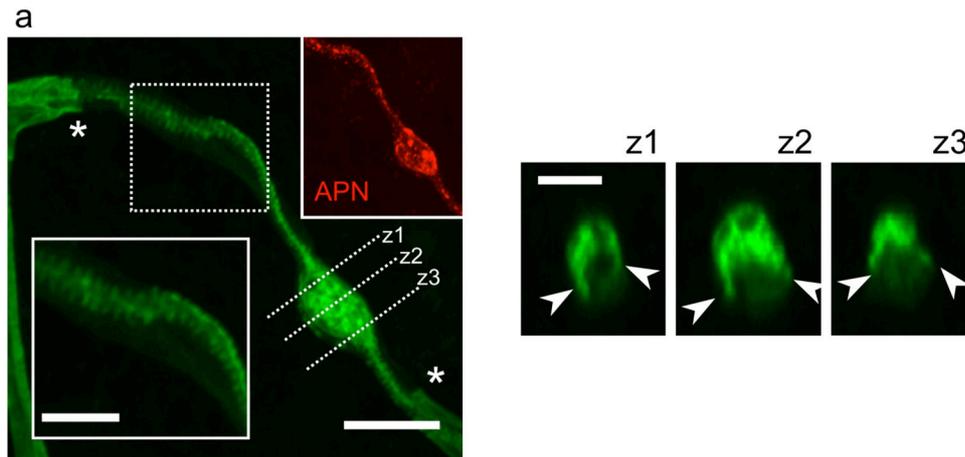


Abbildung 12: Detaillierte morphologische Darstellung eines GFP-positiven Perizyten

a: Durch die schwache GFP-Expression einer Endothelzelle (abgegrenzt durch Sternchen) lässt sich die Morphologie eines einzelnen GFP-positiven, APN-immunopositiven Perizyten darstellen. Aus dem fusiformen Zellkörper spreizen sich zwei primäre Prozesse, die entlang der Kapillare kleinere, sekundäre Prozesse abgeben (unterer rechter Einsatz in a). Die orthogonalen Rekonstruktionen der konfokalen Bilder (z1–3) zeigen längere sekundäre Prozesse, die auf der Höhe des Perizytenkörpers die Kapillare umschließen (Pfeilköpfe), und so das morphologische Substrat für Konstriktionen darstellen könnten. Skala: a: 10 μm (Inset 5 μm). z1–z3: 5 μm .

Adhesion Molecule 1, CD31) benutzt, um zu prüfen, ob sich Endothelzellen in der β -actin eGFP Maus darstellen lassen. Konfokale Aufnahmen PECAM-1-gefärbter Schnitte zeigten, dass GFP-positiv vaskuläre Strukturen immunopositiv für PECAM-1 waren (**Abb. 11a**). Manche Zellen der vaskulären Wand zeichneten sich durch eine erhöhte GFP-Fluoreszenz aus, waren aber immunonegativ für PECAM-1. Die Präsenz solcher Zellen warf die Frage auf, ob Perizyten auch zu den GFP-positiven vaskulären Zellen gehören.

Färbung der Perizyten

Wir haben Perizyten in dem Hirn der β -actin-eGFP Maus mittels der Färbung von APN (Aminopeptidase N, CD13) markiert. APN ist eine etablierte Färbung für Perizyten im ZNS [43,93]. Alle Kapillaren zeigten sich immunopositiv für den Perizyten-Marker. Es ließen sich somit Zellen mit typischer Perizytenmorphologie identifizieren: kleine, ovale oder spindelförmige Zellkörper mit Fortsätzen entlang der Gefäßachse (**Abb. 11b**). Die meisten Perizyten waren durch eine erhöhte Fluoreszenz gegenüber dem Parenchym ausgezeichnet. GFP-exprimierende Zellen an der vaskulären Wand waren auch positiv für den Perizytenmarker

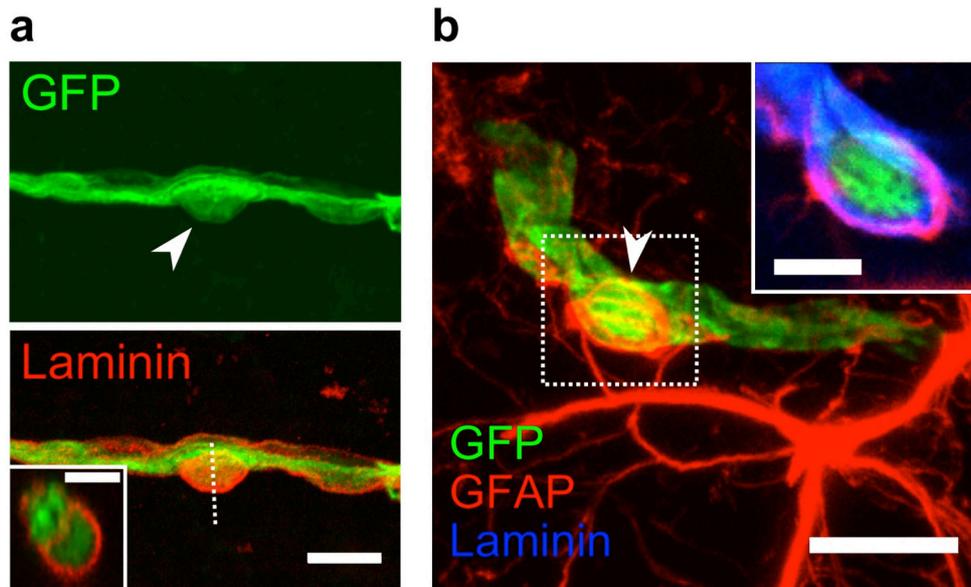


Abbildung 13: ECM und Laminin-Färbung der β -actin eGFP transgene Maus

a: Die GFP-positiven vaskulären Zellen (grün) werden von der Laminin-immunopositiven Basalmembran der Kapillare (rot) eingeschlossen und vom umliegenden Hirnparenchym getrennt. Der fusiforme, abstehende Zellkörper eines Perizyten (Pfeilkopf) ist von der darunterliegenden Endothelzelle ebenfalls durch einen Laminin-immunopositiven Lappen getrennt (Inset in a). b: Der fusiforme, GFP-positiv Zellkörper eines Perizyts (grün, Pfeilkopf) wird von mehreren Prozessen eines GFAP-positiven Astrozyten (rot) umhüllt, ist aber von ihm durch die Basalmembran (Laminin-färbung, blau in den Inset) getrennt. Skala: 10 μ m, Insets: 5 μ m

PDGFR- β (Abb. 11c). In größeren Gefäßen wiesen GFP-positiv murale Zellen die Expression von kontraktilen α -actin auf (Abb. 11d).

Die perizytären Fortsätze waren in der Regel wegen der engen Apposition zu den hell fluoreszierenden Endothelzellen nicht sichtbar. In einzelnen Fällen wiesen diese jedoch eine niedrigere GFP-Fluoreszenz als die Perizyten auf, die mit hohem morphologischen Detail dargestellt waren (Abb. 12). Es ließen sich dann die primären Fortsätze abbilden, aus denen sekundäre Fortsätze entsproßen, die die Endothelzellen teilweise umschlungen haben. Diese sekundären Fortsätze könnten die strukturelle Grundlage der Vasoaktivität durch Perizyten darstellen. Diese Ergebnisse zeigen allesamt, dass im nativen Hirn der β -actin eGFP Maus die Darstellung von Endothelzellen und Perizyten mittels Fluoreszenz-basierten bildgebenden Verfahren wie der Zwei-Photonen Mikroskopie möglich ist.

Färbung der vaskulären Extrazellulären Matrix (ECM) und der Astrozyten

Im Gewebe des ZNS beschränkt sich die Präsenz von ECM- Proteinen wie Kollagen, Laminin und Fibronectin auf die Basalmembran der Gefäße. Ein wichtiges Merkmal von Perizyten ist es, dass sie in der Basalmembran der Kapillaren miteingeschlossen und von den Endothelzellen durch einen Lappen der Basalmembran getrennt sind. Wir haben Gewebe der β -actin eGFP Maus mit einem anti-Laminin Antikörper gefärbt. Die GFP-positiven vaskulären Strukturen waren komplett von der Laminin-immunoreaktiven Basalmembran umschlossen. Die kleinen, ovalen oder fusiformen Zellkörper waren ebenfalls komplett von der Basalmembran umschlossen und durch sie von den darunterliegenden Endothelzellen getrennt (**Abb. 13a**) Dies ist ein weiterer Beweis dafür, dass Perizyten in dem nativen Gewebe der β -actin eGFP -Maus abgebildet werden können. GFAP-immunopositive Astrozyten, zelluläre Bestandteile der Bluthirnschranke, kontaktierten häufig den Perizytenkörper. Sie waren aber von diesem durch die Basalmembran getrennt (**Abb. 13b**).

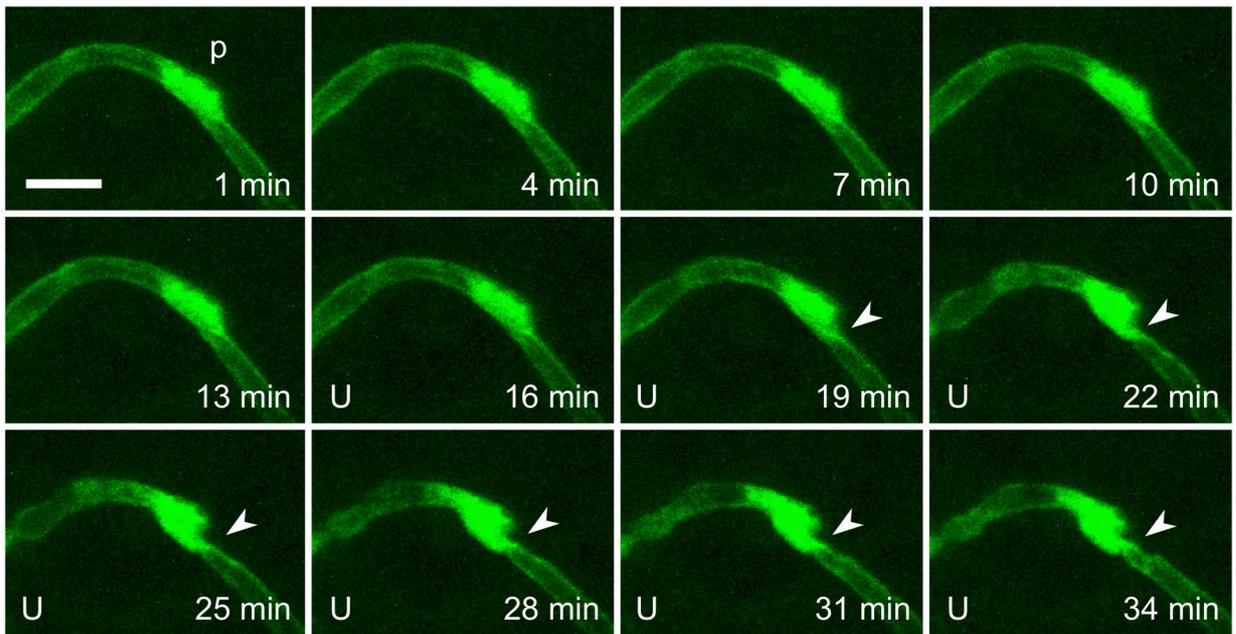


Abbildung 14: Bildfolge des Effektes von 100 nM U46619 auf Kapillaren im Hirnschnitt

Auf dem ersten Bild ($t = 1$ min) ist die Position eines Perizytenkörpers markiert. Nach 15 min wird U46619 (100 nM, U) superfundiert. Eine Konstriktion in der Nähe des Perizyten wird sichtbar (Pfeilköpfe), sowie die Ausbeulung des Perizytenkörpers. Skala: 10 μm .

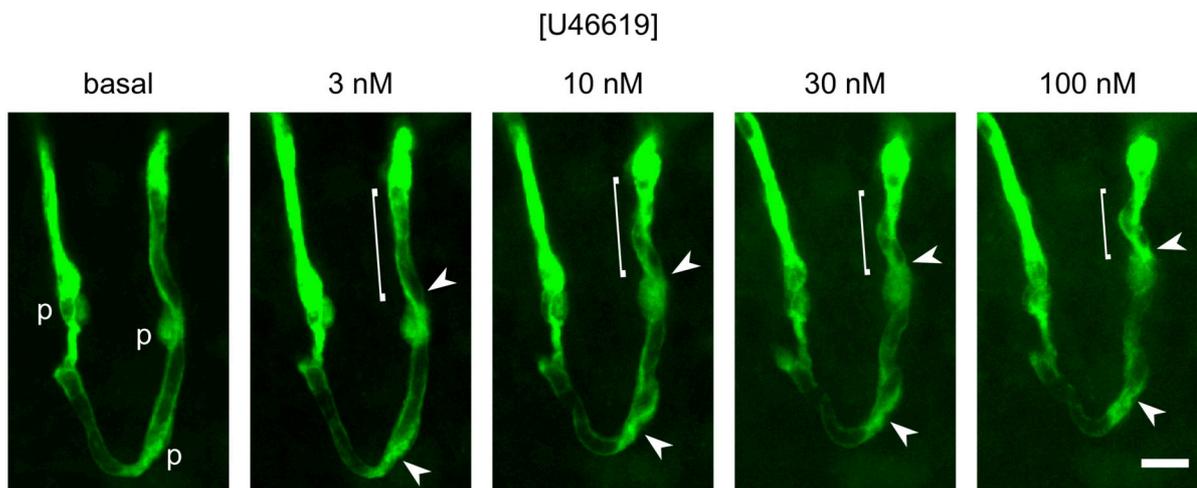


Abbildung 15: Effekt der aufsteigenden Konzentrationen von U46619 auf eine Kapillare im Hirnschnitt

Die Perizytenkörper im linken Bild sind mit p markiert. Pfeilköpfe markieren die Stellen, an denen sich Konstriktionen bilden. Eine Kontraktion des Gefäßes entlang der Gefäßachse wird sichtbar (eckige Klammer). Diese Kontraktion ist durch das Zusammenziehen der primären perizytenären Prozesse (siehe Abb. 3a) erklärbar.

3.2 Vasoaktivität von kortikalen Perizyten ex vivo

Als nächsten Schritt haben wir getestet, ob kortikale Perizyten im isolierten akuten Hirnschnitt den Durchmesser kapillarer Gefäße aktiv verändern können. Im akuten Hirnschnitt ist jede passive Dilatation und jeder Kollaps der Kapillaren aufgrund einer Veränderung des intraluminalen Perfusionsdruckes ausgeschlossen. Wir haben den potenten Vasokonstriktor U46619, ein stabiles Analogon des endogenen Thromboxan A2 (TXA2), gewählt, um die Kontraktilität der Kapillaren des sensorischen Kortex der β -actin eGFP Maus mittels Zwei-Photonen Mikroskopie zu überprüfen.

Reaktion auf das TXA2-Analogon U46619

Die Mehrzahl der Hirnschnitte (ca. 80 % von 25) zeigten offensichtliche Konstriktionen nach der Behandlung mit 100 nM U46619. In den restlichen ~20 % konnte keine Reaktion festgestellt werden. Die Konstriktionen waren nicht homogen auf dem longitudinalen Verlauf der Kapillaren verteilt, sondern konzentrierten sich auf diskrete Segmente der Kapillaren. In 53% der Fälle nahmen sie die Form von Sphinktern an (Länge des konstringierten Gefäßes < 10 μ m). Sie schienen eine Präferenz für die kapillaren Verzweigungen zu haben; in 57 % der Fälle waren sie dort lokalisiert. Es war möglich, die Zellkörper der Perizyten mittels morphologischen Kriterien

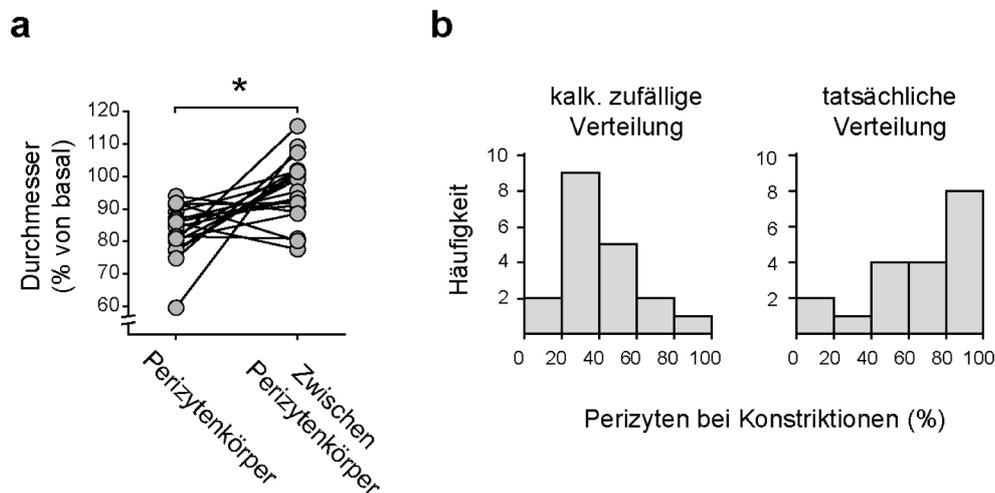


Abbildung 16: Kolokalisation von Perizytenkörpern und Konstriktionen

a: in U46619-reaktiven Kapillaren sind die Konstriktionen an Perizytenkörpern signifikant größer als in Segmenten zwischen benachbarten Perizytenkörpern (*: $p < 0,005$) b: Verteilung für einzelne Experimente der Fraktion von Perizytenkörpern, die an U46619-induzierten Konstriktionen liegen. Rechts ist die aufgrund von Perizytenzahlen und Länge der konstringierten Segmente ermittelte kalkulierte zufällige Verteilung abgebildet. Links ist die tatsächlich gefundene Verteilung dargestellt, aus der ersichtlich wird, dass die meisten Perizyten an Konstriktionen saßen. Beide Verteilungen unterscheiden sich signifikant ($p < 0,01$).

zu identifizieren (kleiner, ovaler oder fusiformer Zellkörper). Die Konstriktionen kolokalisierten oft mit perizytären Zellkörpern, was ein Hinweis auf die kausale Rolle dieser Zellen für die Konstriktionen ist. In einzelnen Fällen war eine Ausbeulung des Perizytenkörpers während der Etablierung der Konstriktionen offenkundig (**Abb. 14**). Zusammen mit der Entstehung von luminalen Konstriktionen ereignete sich eine mehr oder minder ausgeprägte longitudinale Kontraktion von Kapillaren, die oft einen irregulären, schlingenden Verlauf annahm (**Abb. 15**). Die longitudinale Kontraktion ist vereinbar mit der Kontraktion der primären perizytären Fortsätze, die parallel zur longitudinalen Achse der Kapillaren verlaufen (siehe **Abb. 2a**).

Es wäre möglich, dass die diskreten Konstriktionen der Kapillaren zufällig mit den von Perizytenkörpern besetzten Segmenten kolokalisiert haben. Wir haben versucht, die beobachtete Kolokalisation der Konstriktionen mit Perizytenzellkörpern quantitativ und statistisch zu überprüfen. Wir haben dafür 19 Hirnschnitte analysiert, die eine offensichtliche Reaktion auf 100 nM U46619 aufwiesen. Die Konstriktion der Gefäße war ausgeprägter an Perizytenkörpern als in kapillaren Segmenten, die frei von Perizytenkörpern waren (Median 84% vs. 95% des basalen Durchmessers, $p < 0,005$, Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test, $n=18$, **Abb. 16a**). In einem zweiten Ansatz haben wir die Anzahl der Perizytenkörper gezählt, die mit Konstriktionen kolokalisiert haben. In denselben Schnitten haben wir die Wahrscheinlichkeit einer zufälligen

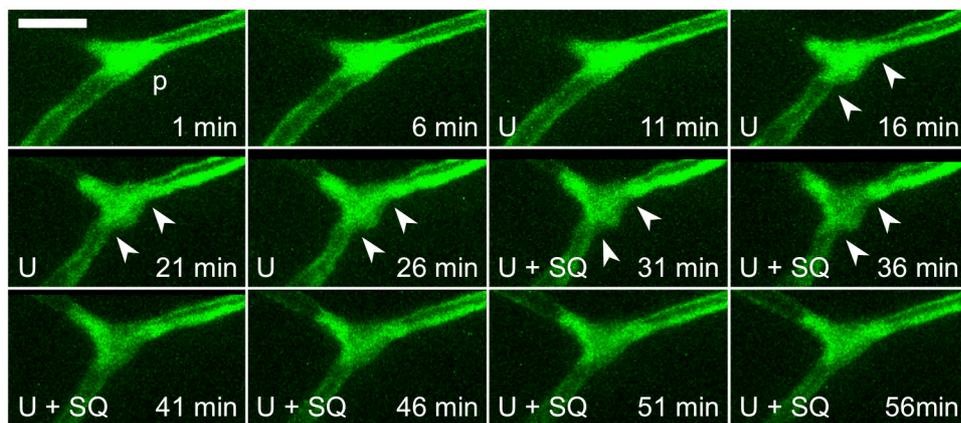


Abbildung 17: Bildfolge des Effektes von U46619 und SQ 29,458 auf Kapillaren im Hirnschnitt

Auf dem ersten Bild ($t = 1$ min) ist die Position eines Perizytenkörpers markiert. Nach 10 min wird U46619 (100 nM) superfundiert. Konstriktionen in der Nähe des Perizyts werden sichtbar (Pfeilköpfe), so wie die Ausbeulung des Perizytenkörpers. Nach 30 min wird der TXA2-Rezeptorantagonist SQ29,548 (1 μ M) superfundiert, was zu einer teilweisen Rückbildung des U46619-induzierten Effektes führt. Skala: 10 μ m.

Kolokalisation bestimmt, die sich aus der Anzahl der Perizyten und der Anzahl und Länge der konstringierenden Segmente ergab. Die tatsächlich gefundene Kolokalisation war statistisch signifikant von der zu unterscheiden, die sich stochastisch aus der Verteilung der Perizytenkörper und der konstringierenden Segmente ergeben würde (Median 75% der Perizyten lagen auf Konstriktionen *vs.* erwartete zufällige 35%, $n=19$, $p=0,001$, Wilcoxon-Mann-Whitney-Test, **Abb. 16b**). Diese Ergebnisse weisen auf eine kausale Beteiligung der Perizyten an den kapillaren Konstriktionen hin.

Pharmakologische Charakterisierung der Reaktion auf U46619

Wir haben die Reaktion der Kapillaren auf U46619 quantifiziert. In dieser Berechnung wurden alle Hirnschnitte berücksichtigt, die mit 100 nM U46619 behandelt wurden. In den Experimenten in denen die Reaktion auf U46619 im Zeitraffer beobachtet wurde, konnte ein rasches Einsetzen der Reaktion nach Einsetzen der Superfusion festgestellt werden, bis ein stabiles Plateau von ca. 80% des Ausgangsdurchmessers erreicht wurde (**Abb. 18c**). In separaten Experimenten ergaben sich an den Segmenten mit maximaler Ausprägung des Effektes Konstriktionen von $78 \pm 9\%$ des Ausgangswertes ($n=15$, **Abb. 18b**). In Kontrollexperimenten, in denen die Hirnschnitte mit Vehikeln behandelt wurden, erreichten die Durchmesser $103 \pm 7\%$ der Ausgangswerte ($n=8$, **Abb. 18b**). Bei Vorbehandlung mit dem selektiven TXA_2 -Rezeptor-Antagonisten SQ 29,548 (1 μM) wurde der Effekt von 100 nM U46619 vollständig blockiert, und erreichte $100 \pm 7\%$ des Ausgangswertes ($n=5$, **Abb. 18b**). Der Unterschied des Effektes zwischen der U46619-behandelten ($n=11$) und den Vehikel- ($n=7$) oder SQ29,548 ($n=5$)

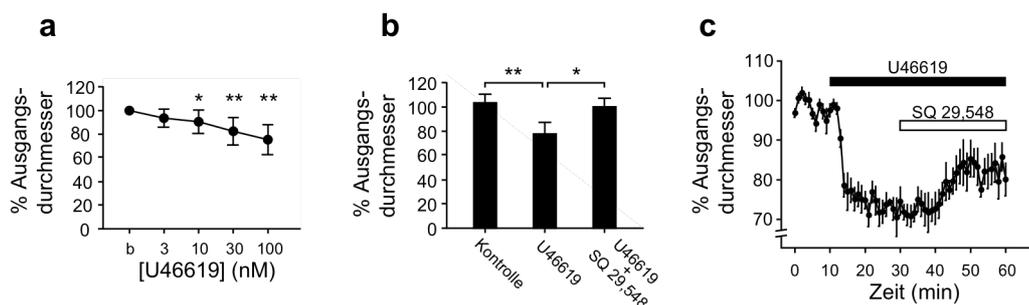


Abbildung 18: Pharmakologische Charakterisierung der Reaktion auf U46619 im Hirnschnitt

a: Die Konstriktion der Gefäße auf U46619 war konzentrationsabhängig im Bereich zwischen 3 und 100 nM (b: basal, *: $p < 0,05$; **: $p < 0,001$). b: die U46619-induzierten Konstriktionen konnten durch Vorinkubation der Hirnschnitte mit dem TXA_2 -Rezeptorantagonisten SQ29,548 (1 μM) komplett inhibiert werden (*: $p < 0,0001$; **: $p < 0,00001$). c: Die Superfusion von SQ29,548 (1 μM) dilatiert U46619-vorkonstringierte Gefäße.

behandelten Gruppen war statistisch signifikant (respektive $p < 0,00001$ und $p < 0,0001$; einfaktorielle ANOVA mit Bonferroni-Korrektur, **Abb. 18b**). In Zeitraffer-Experimenten konnte eine unvollständige Aufhebung der U46619-eingeleiteten Konstriktion durch die Nachbehandlung der Hirnschnitte mit SQ29,548 festgestellt werden (**Abb. 17** und **18c**). Die Effekte von U46619 und SQ29,548, konnten nicht durch die Superfusion des Vehikels (aCSF) ausgewaschen werden, wahrscheinlich weil es sich um zwei sehr lipophile Substanzen handelt.

In einer weiteren Gruppe haben wir die Reaktion auf aufsteigende Konzentrationen von U46619 getestet, um die Konzentrationsabhängigkeit der Konstriktion zu ermitteln. Die Hirnschnitte wurden 3 nM, 10 nM, 30 nM und 100 nM U46619 ausgesetzt (in zeitlichen Abständen von jeweils 30 min). Die Kapillaren erreichten eine maximale Konstriktion von $75 \pm 12\%$ der Ausgangswerte ($p < 0,001$, einfaktorielle ANOVA mit Bonferroni-Korrektur, $n=11$, **Abb. 15** und **18a**). Die Mittelwerte der Konstriktion korrelierten negativ-linear mit dem dekadischen Logarithmus der Konzentrationen von U46619 ($r=0,99$; $p < 0,05$).

Diese Ergebnisse zeigen allesamt, dass Perizyten der Kapillaren im kortikalen Gewebe der Maus auf die selektive Aktivierung von TXA2 Rezeptoren mit Konstriktion reagieren. Somit ist bewiesen, dass kortikale Perizyten grundsätzlich die Fähigkeit zur Kontraktion besitzen.

3.3 Vasoaktivität von kortikalen Perizyten *in vivo*: Superfusion mit U46619

Wir haben versucht, die aktive Kontraktilität der Kapillaren in dem Zerebralen Kortex der lebendigen, anästhesierten Maus und ihren Effekt auf den Blutfluss, auch bei der funktionellen Hyperämie, zu überprüfen. Dazu haben wir Veränderungen im Durchmesser der Kapillaren und Arteriolen unter drei verschiedenen experimentellen Bedingungen gemessen: die Superfusion des TXA₂ Agonisten U46619, die Auslösung neuronaler Aktivität mittels der Infusion von Bicucullin, und die Auslösung einer *cortical spreading depolarization* (CSD). Somit haben wir versucht, die Wirkung der Kontraktilität durch Perizyten für die Blutperfusion des Hirnes unter physiologischen und pathologischen Bedingungen näher zu charakterisieren.

Der TXA₂-Agonist U46619 wurde für die ersten *in vivo*-Experimente gewählt, da er im akuten Hirnschnitt zu einer ausgeprägten kapillaren Vasokonstriktion geführt hatte. Wir haben das Pharmakon durch ein geschlossenes superfundiertes Fenster über den parietalen Kortex appliziert. *In vivo* wurde eine 100-fache Konzentration als im Hirnschnitt (10 μ M) gewählt, da erfahrungsgemäß die Verfügbarkeit des Pharmakons nach topischer Applikation auf der Hirnoberfläche durch den Auswasch-Effekt des Blutflusses vermindert ist. Um die Bildung von

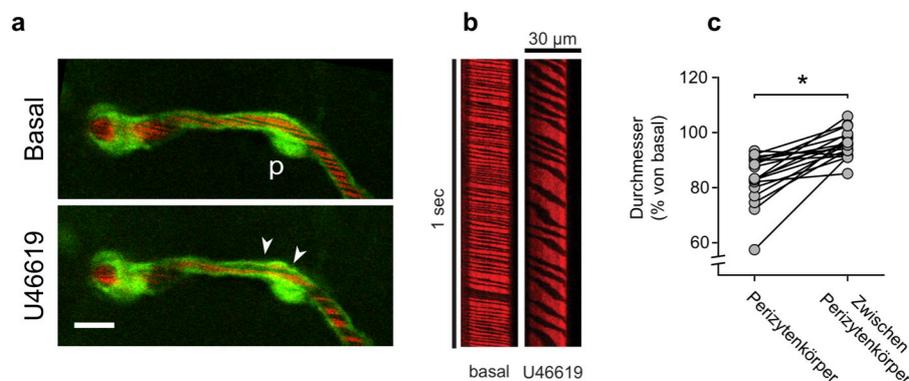


Abbildung 19: Superfusion von U46619 *in vivo*

a: Bei einigen Kapillaren rief die Superfusion von 10 μ M U46619 Konstriktionen hervor (Pfeilköpfe). Das rote Signal stammt aus dem TRITC-Dextran markierten Blutplasma. Die Passage von Erythrozyten erscheint in a und b als dunkle Banden. p: Perizyt, Skala: 10 μ m. b: Beispiele von „Linescans“ vor und nach der Superfusion mit U46619. Weniger und steilere schwarze Banden deuten auf einen langsamen Fluss und eine geringe Anzahl von Erythrozyten hin. c: In den Kapillaren, die konstringiert haben (n=19), war der Durchmesserabfall an den Perizytenkörper signifikant größer als an den Segmenten, die zwischen dem Perizytenkörper lagen. Dies weist auf eine Beteiligung der Perizyten an den Konstriktionen hin.*: p<0,0005.

Thromben nach der Gabe von U46619 zu verhindern, haben wir den Tieren Heparin zugeführt. Nach der topischen Applikation von U46619 wurde in den Kapillaren keine Aggregation von Blutelementen beobachtet.

Effekt von U46619 auf den Durchmesser und Fluss der Kapillaren *in vivo*

Um die Effekte der Superfusion von U46619 auf blutperfundierten Kapillaren *in vivo* dynamisch zu erfassen, haben wir in 5 Tieren Bilder von Kapillaren im Zeitraffer (alle 2 Minuten) während der Superfusion von U46619 aufgenommen. Typischerweise wurden kapilläre Netzwerke kontinuierlich eine halbe Stunde vor und eine halbe Stunde nach dem Start der Superfusion von 10 μ M U46619 abgebildet. Erneut setzte der Effekt von U46619 8-10 Minuten nach Start der Superfusion ein; diese Zeit dauerte es, bis U46619 das Fenster erreicht hatte. Eine abrupte Reduktion der kapillären Durchmesser konnte dann in der Hälfte der Kapillaren (7 von 14) beobachtet werden. In einem Fall haben wir eine Dilatation beobachtet, in den restlichen 6 Kapillaren ergab sich kein Effekt. Jedoch konnten Konstriktionen bei allen 5 Tieren detektiert werden. Sie haben die morphologischen Eigenschaften der Konstriktionen im Hirnschnitt reproduziert. In ~70% der Fälle waren sie sphinkterförmig; ~85 % der Konstriktionen geschahen in unmittelbarer Nähe zu Perizytenkörpern (**Abb. 19a** und **20a,b**). Der Durchmesserabfall an den Perizytenkörper war signifikant größer als an den Segmenten, die zwischen den Perizytenkörpern lagen (**Abb. 19c**). Dies weist auf eine Beteiligung der Perizyten an den Konstriktionen hin. Wenn mehrere zusammenhängende Kapillaren analysiert wurden, konnte man ebenfalls die räumliche Heterogenität der Konstriktionen beobachten. Benachbarte Kapillaren reagierten nicht gleichmäßig (**Abb. 20**). Diese Ergebnisse weisen auf eine aktive Konstriktion einzelner kapillärer Segmenten durch die kontraktile Aktivität von Perizyten hin.

In einer weiteren Gruppe von Tieren haben wir den Effekt von U46619 auf den Kapillardurchmesser und den kapillaren Blutfluss quantitativ untersucht. Den Tieren wurde entweder das Vehikel oder 10 μ M U46619 über das Fenster für 30-45 min appliziert. Mehrere Kapillaren (typischerweise 6–8) wurden *vor* und *nach* der Behandlung mit dem Zwei-Photonen Mikroskop untersucht. Dabei wurden Bilderstapel für jede Kapillare akquiriert, um Durchmesseränderungen zu ermitteln. Auch wurden Linienscans des plasmatischen Flusses erhoben, um Veränderungen in der Erythrozytengeschwindigkeit bzw. Erythrozytenflussrate zu ermitteln (Beispiele in der **Abb. 19b**). Insgesamt wurden so 44 Kapillaren aus 5 Tieren in der Vehikel-behandelten Gruppe und 37 Kapillaren aus 5 Tieren in der U46619-behandelten Gruppe untersucht. Der Effekt der U46619-Applikation wurde mittels LDF-Messung im selben kranialen

Fenster unabhängig kontrolliert, und sank in der Kontrollgruppe auf $75\pm 18\%$ des Ausgangswertes (n=9).

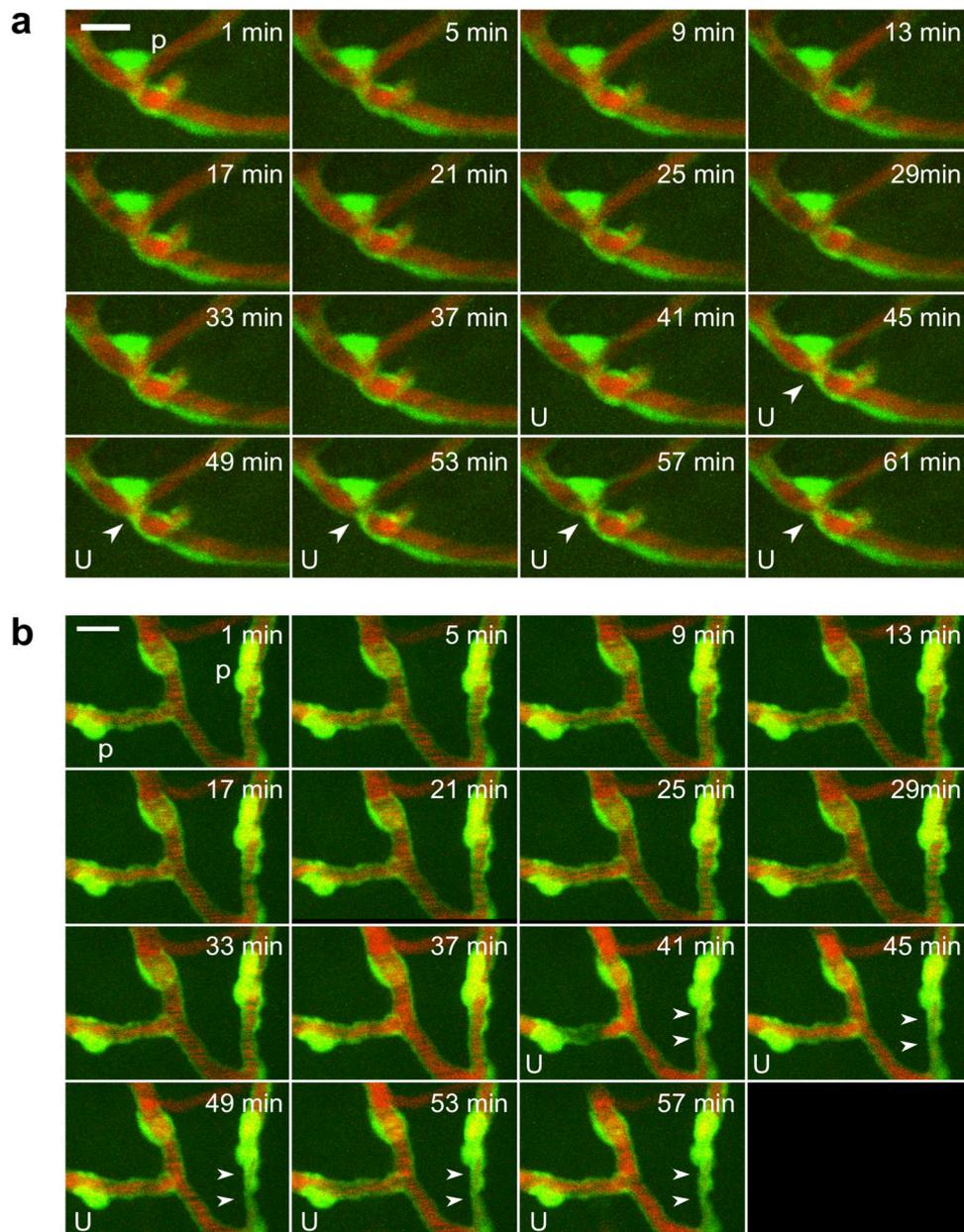


Abbildung 20: Bildfolge der Gefäßreaktion auf U46619 in vivo: Beispiele von Konstriktionen an Perizyten

Das rote Signal stammt aus dem mit TRITC-Dextran markierten Blutplasma. Die einzelnen Bilder entsprechen Maximalprojektionen, so dass die Passage einzelner Erythrozyten nicht immer erkennbar ist. Das TXA2-Analagon U46619 wurde ungefähr zum Zeitpunkt „t=40 min“ in den Kortex eingewaschen (U). In a ist die Entstehung einer sphinkterartigen Konstriktion am Perizyten zu sehen (p, siehe Pfeilköpfe in t=45–61). In b entsteht eine Konstriktion über ein längeres Segment, das z.T. mit Perizytenkörpern besetzt ist (siehe Pfeilköpfe in t=41–57). Die zwei unmittelbar benachbarten Kapillarsegmente reagieren nicht gleichmäßig. Skala: 10 µm.

In der Vehikel-Gruppe konnte eine leichte Dilatation festgestellt werden (Median 104% der Ausgangswerte). In der U46619-behandelten Gruppe konnte eine leichte Konstriktion festgestellt werden (Median 96% der Ausgangswerte). Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen war statistisch signifikant ($p < 0,0001$; Mann-Whitney-Wilcoxon Test, **Abb. 21a**). Trotz des kleinen Gesamteffektes von U46619 auf den kapillaren Durchmesser ließen sich in dieser Gruppe vereinzelt größere Abnahmen des Durchmessers feststellen (um 10-20%), die nicht in der Vehikel-Gruppe vorhanden waren. Die Superfusion mit U46619 hatte ebenfalls einen signifikanten Effekt auf die Erythrozytengeschwindigkeit (Median 27% vs. 97% in der Vehikel-Gruppe; $p < 0,001$; Mann-Whitney-Wilcoxon Test, **Abb. 21b**). Auch die Erythrozytenflussrate sank in der U46619-behandelten Gruppe (Median 17% vs. 101% in der Vehikel-Gruppe; $p < 0,0001$; Mann-Whitney-Wilcoxon Test, **Abb. 21c**). Als alle Kapillaren beider Gruppen zusammengefasst wurden, ergab sich eine leichte, aber signifikante Korrelation der absoluten Flussparameterunterschiede mit den absoluten Unterschieden der Kapillardurchmesser ($r = 0,49$ mit $p < 0,001$; $r = 0,38$ mit $p < 0,001$ für Erythrozytenflussrate bzw. Erythrozytengeschwindigkeit, **Abb. 21d,e**). Die absoluten Unterschiede der Erythrozytengeschwindigkeit korrelierten stark mit den Unterschieden in der Erythrozytenflussrate ($r = 0,84$ mit $p < 0,001$, **Abb. 21f**).

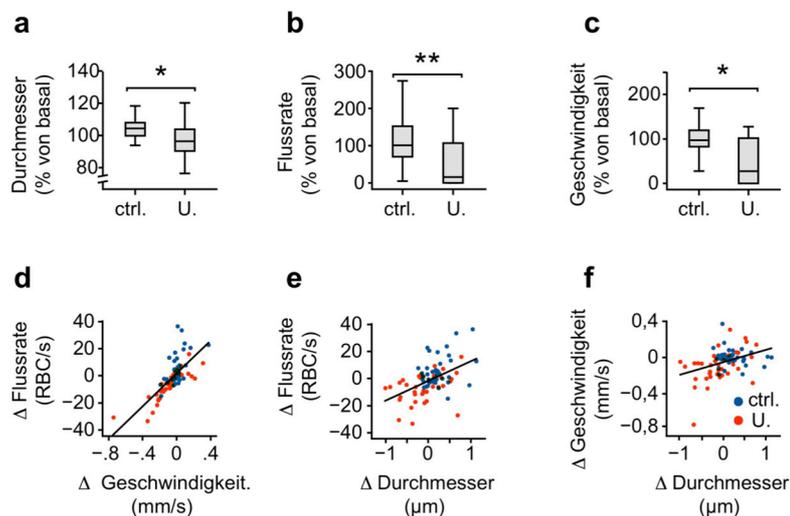


Abbildung 21: Quantifikation der Reaktion von U46619 auf Blutfluss und Kapillardurchmesser

a–c: Die Boxplots zeigen die unterschiedlichen Reaktionen von Durchmesser, Erythrozyten-Flussrate und Erythrozyten-Geschwindigkeit in Kapillaren nach der Behandlung mit Vehikel oder U46619 (10 μM). Es ergibt sich ein signifikanter Unterschied bei allen drei Parametern. *: $p < 0,001$; ** $p < 0,0001$. d–f: Korrelation zwischen den Parametern Durchmesser, Erythrozyten-Flussrate und Erythrozyten-Geschwindigkeit in einzelnen Kapillaren (absolute Unterschiede). Vehikel-behandelte Kapillaren sind blau, U46619-behandelte Kapillaren sind rot.

Effekte von U46619 auf piale Arteriolen und LDF

In beiden vorangegangenen Versuchsgruppen haben wir Bilder von pialen Arteriolen vor und nach der Behandlung mit 10 μ M U46619 aufgenommen, so wie den Effekt von U46619 auf den kortikalen Blutfluss (gemessen mit einer LDF-Sonde auf dem kranialen Fenster). Die LDF Werte fielen konsistent in allen Tieren, denen U46619 appliziert wurde (durchschnittlich $75 \pm 8\%$ der basalen Werte; n=9, das LDF-Signal eines Tieres konnte aus technischen Gründen nicht ausgewertet werden). Im Gegensatz dazu ließ sich kein einheitlicher Effekt von U46619 auf den pialen arteriellen Durchmesser erkennen. Gemessen an den Segmenten mit dem größten Durchmesserunterschied (mit beliebiger Richtung gegenüber dem basalen Wert) konstingierten 5 (durchschnittlich $75 \pm 10\%$ des Ausgangwertes) und dilatierten 4 Arteriolen (durchschnittlich $130 \pm 19\%$ des Ausgangwertes). Bei einer Arteriole konnte kein Unterschied ihres Durchmessers detektiert werden.

Die Ergebnisse zeigen, dass der TXA2-Agonist U46619 im lebendigen Kortex der Maus zu Konstriktionen der Kapillaren führt, die einer Abnahme der kapillären Flussparameter entsprechen. Die Anzahl der reaktiven Kapillaren ist hier jedoch wesentlich kleiner als die, die *in vitro* auf U46619 konstingieren. Die Heterogenität der kapillären Reaktion (die unterschiedliche Segmente der Kapillaren und unterschiedliche Kapillaren betrifft), und der Mangel einer einheitlichen Reaktion der pialen Arteriolen, untermauern die Hypothese eines vasoaktiven Lokus in einzelnen Kapillaren. Die Konstriktionen *in vivo* wiesen eine ähnliche Morphologie auf wie die, die wir im akuten Hirnschnitt beobachtet hatten. Dies weist zusätzlich auf eine Beteiligung von Perizyten bei der Reaktion hin.

3.4 Rolle der Perizyten bei der funktionellen Hyperämie durch Mikroinfusion von Bicucullin

Wir haben versucht zu überprüfen, ob ähnliche lokalisierte Durchmesseränderungen, die man der Aktion von Perizyten zuordnen könnte, in einem Modell funktioneller kortikaler Hyperämie zum Blutflussanstieg beitragen. Dazu führten wir im sensorischen Kortex eine Mikropipette ein, die mit dem GABAergen Antagonisten Bicucullin (1 mM) gefüllt war (**Abb. 22a**) Dies führt zu salvenartigen Depolarisationen des neuronalen Gewebes (*interictal spikes*, IIS), die sich über einen längeren Zeitraum in Abständen von einigen Sekunden ereignen und zu einem zeitlich begrenzten Blutflussanstieg führen. Dies ermöglichte, die Antworten in denselben Tieren seriell in mehreren Gefäßen und Gefäßtypen zu untersuchen.

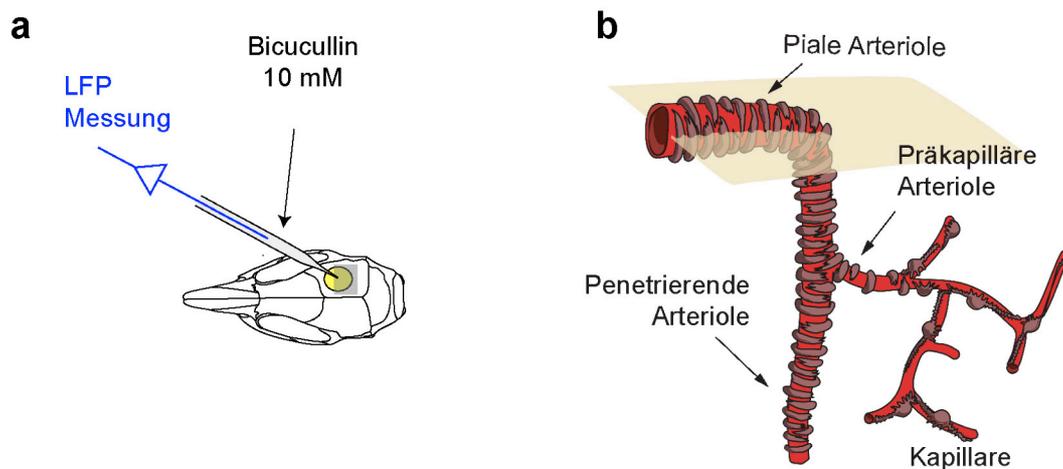


Abbildung 22: Auslösung funktioneller hyperämischer Antworten durch Mikroinfusion von Bicucullin

a: Bicucullin wurde in den parietalen Kortex durch eine Mikropipette infundiert, die gleichzeitig der Ableitung des lokalen Feldpotentials (LFP) diente. b: Schema der Arborisierung der Arteriolen in dem kortikalen Gewebe und der unterschiedlichen Gefäßarten, die wir untersucht haben. Piale Arteriolen liegen auf der Kortexoberfläche. Penetrierende Arteriolen tauchen orthogonal zur Oberfläche in den Kortex ein. Die präkapillären Arteriolen sprießen aus penetrierenden Gefäßen heraus und geben direkt oder nach 1–2 Teilungen Kapillaren heraus, die sich durch dünnere Wände und kleinere Durchmesser charakterisieren (siehe die nächste Abbildung für originale Beispiele).

Charakterisierung der unterschiedlichen Gefäßkategorien

Wir haben während der Experimente am zwei-Photonen Mikroskop die Gefäße in vier Kategorien eingeteilt: piale Arteriolen, penetrierende Arteriolen, präkapilläre Arteriolen und Kapillaren (**Abb. 22b**). Die Einteilung erfolgte aufgrund der Lage der Arterien (piale Arteriolen sind oberflächlich, die penetrierenden verlaufen senkrecht zur kortikalen Oberfläche), die Topologie (die präkapillären Arteriolen entspringen den penetrierenden) und die Morphologie (die präkapillären Arteriolen besitzen einen größeren Durchmesser und durchgehend dickere Wände als die Kapillaren, siehe **Abb. 23**). Wir haben in 8 unterschiedlichen Tieren insgesamt 17 piale, 13 penetrierende, 35 präkapilläre Arteriolen und 60 Kapillaren identifizieren können. Wir haben kontinuierlich mit hoher zeitlicher Auflösung (6-8 Hz) während einer Minute Bilder einer Schnittebene aufgenommen, die durch die Gefäße ging, um Durchmesseränderungen zu erfassen. Unmittelbar darauf haben wir während einer Minute Linienscans der gleichen Gefäße (bis auf penetrierende Gefäße) aufgenommen, um IIS-assoziierte Veränderungen der Erythrozytengeschwindigkeit zu erfassen. So war es möglich, in 14, 27 und 54 der pialen, präkapillären und kapillären Gefäße die Erythrozytengeschwindigkeit während der wiederkehrenden IISs zu bestimmen.

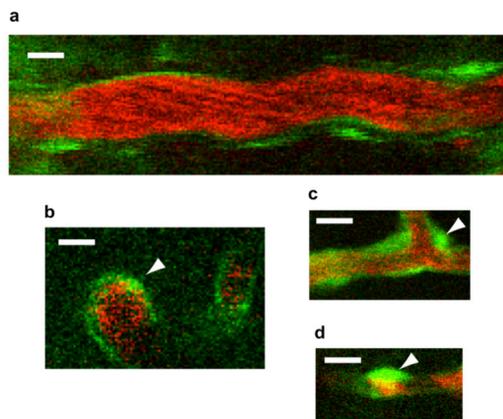


Abbildung 23: Beispiele der Gefäße, die in der Bicucullin-Studie untersucht wurden

a: Piale Arteriole (Durchmesser ca. 20 μm). b: Querschnitt durch eine penetrierende Arteriole (Durchmesser ca. 17 μm). Eine präkapilläre Arteriole ist rechts abgebildet. c: Präkapilläre Arteriole (Durchmesser ca. 8–10 μm). d: Kapillare (Durchmesser ca. 6 μm). Murale Zellen/Perizyten sind mit Pfeilköpfen markiert. Skala: 10 μm .

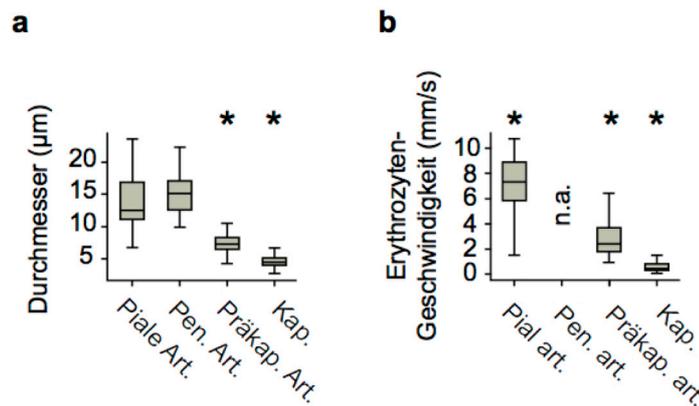


Abbildung 24: Charakterisierung von Durchmesser und Flussgeschwindigkeit der untersuchten Gefäße

Die untersuchten Gefäßtypen besitzen unterschiedliche Durchmesser (a) und Flussgeschwindigkeiten (b). Es besteht eine Überlappung in den Durchmessern der präkapillären Arteriolen und der Kapillaren. Bei der Erythrozyten-Geschwindigkeit ist die Überlappung viel geringer, was die Validität unserer Einteilung in funktioneller Hinsicht unterstreicht. Die Flussgeschwindigkeit kann in penetrierenden Gefäße nicht direkt gemessen werden (n.a.: not available). *:p<0,0001.

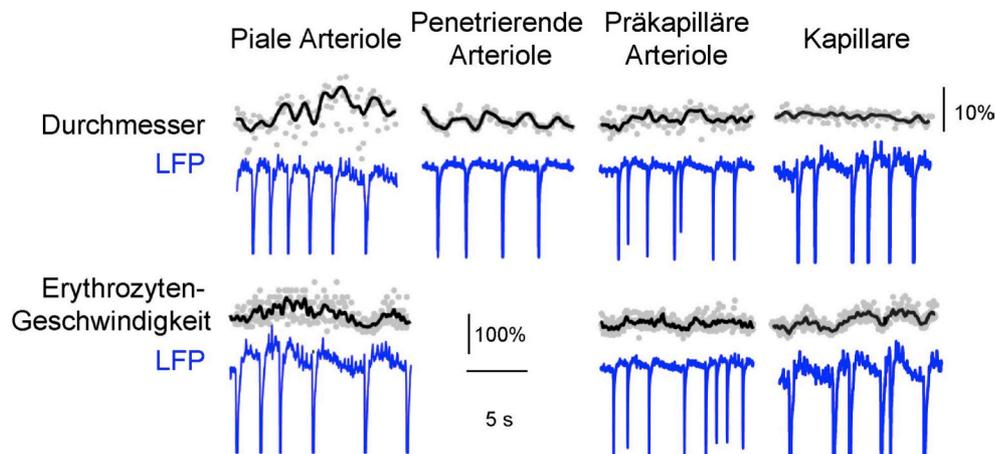


Abbildung 25: Originale Aufnahmen von Bicucullin-induzierten Durchmesser- und Blutflussveränderungen

Die blauen Aufzeichnungen zeigen die wiederkehrenden Bicucullin-induzierten Depolarisationen im LFP (inter ictal spikes, IIS). Bei pialen, penetrierenden und präkapillären Arteriolen, jedoch nicht bei Kapillaren, konnte man IIS-assoziierte Durchmesseränderungen erkennen. Bei den selben Gefäßen konnte man Veränderungen in der Erythrozytengeschwindigkeit erkennen, die mit den IISs assoziiert waren. (Außer bei den penetrierenden Arteriolen, bei denen man keine direkte Messung des Blutflusses mit unserer Methode durchführen kann).

Wir haben die basalen Durchmesser und die Erythrozytengeschwindigkeit in Abhängigkeit unserer Einteilung in den unterschiedlichen Gefäßtypen charakterisiert. Piale und penetrierende Arteriolen (deren Einteilung unkontrovers ist) zeigten ähnliche Durchmesser; auch präkapilläre Gefäße und Kapillaren wiesen untereinander und zu den anderen Gefäßtypen signifikante Unterschiede auf, obwohl die Durchmesser von Kapillaren und präkapillären Gefäßen zum Teil überlappten. Präkapilläre und kapilläre Gefäße zeigten aber einen großen Unterschied in der Geschwindigkeit der Erythrozyten, die sie durchflossen (Abb. 24) Diese Ergebnisse unterstützen unsere Einteilung der zerebralen Gefäße.

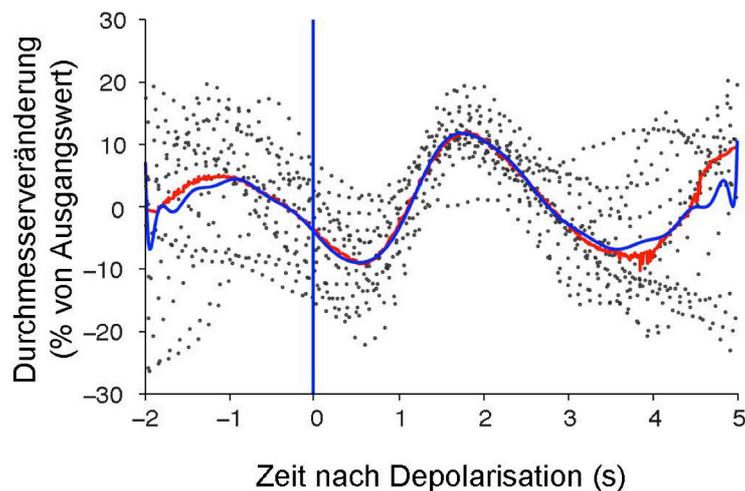


Abbildung 26: Ermittlung der durchschnittlichen Antwort für einen Gefäßtyp

Die Aufzeichnungen von Durchmesser- bzw. Erythrozytengeschwindigkeit wurden für alle IIS überlappt, die mindestens 2 Sekunden Abstand von der vorausgehenden bzw. nachfolgenden IIS aufzeigten. Die rote Linie zeigt den laufenden Mittelwert auf. Für die Ermittlung der Anstoß- bzw. Anklingzeit wurde eine polynomiale Regressionskurve (blaue Linie) ermittelt, aus der sich lokale Maxima und Minima errechnen ließen.

Veränderungen im Durchmesser und in der Erythrozytengeschwindigkeit in den unterschiedlichen Gefäßtypen

Veränderungen im Durchmesser und in der Erythrozytengeschwindigkeit wurden für jedes Gefäß erfasst (Abb. 25); durchschnittliche Antworten der jeweiligen Gefäßtypen wurden ermittelt (Abb. 26 und 27). Die maximalen Antworten der pialen, penetrierenden, präkapillären und kapillären Gefäße erreichten durchschnittlich $2,4 \pm 3,3\%$; $3,4 \pm 3,5\%$; $2,3 \pm 5\%$ respektive $0,1 \pm 2,5\%$ über die basalen Werte vor der Depolarisationsspitze hinaus. Es konnte somit kein relevanter Effekt der Bicucullin-induzierten Depolarisationen auf den Kapillardurchmesser festgestellt werden, in denen aber dennoch ein Anstieg des Blutflusses festgestellt wurde. Wir haben alle Kapillaren auf der Suche nach dilatatorischen Antworten untersucht, und fanden nur in 3 von 60 eine Antwort. Diese dilatierenden Kapillaren haben alle Erythrozyten mit hoher, für echte Kapillaren untypischer Geschwindigkeit geführt. Sie waren auch direkt mit Arteriolen verbunden. Es liegt deswegen nahe, dass die Kapillaren, die mit einer dilatatorischen Antwort reagiert haben, zu einer arteriellen Untergruppe der Kapillaren gehört haben.

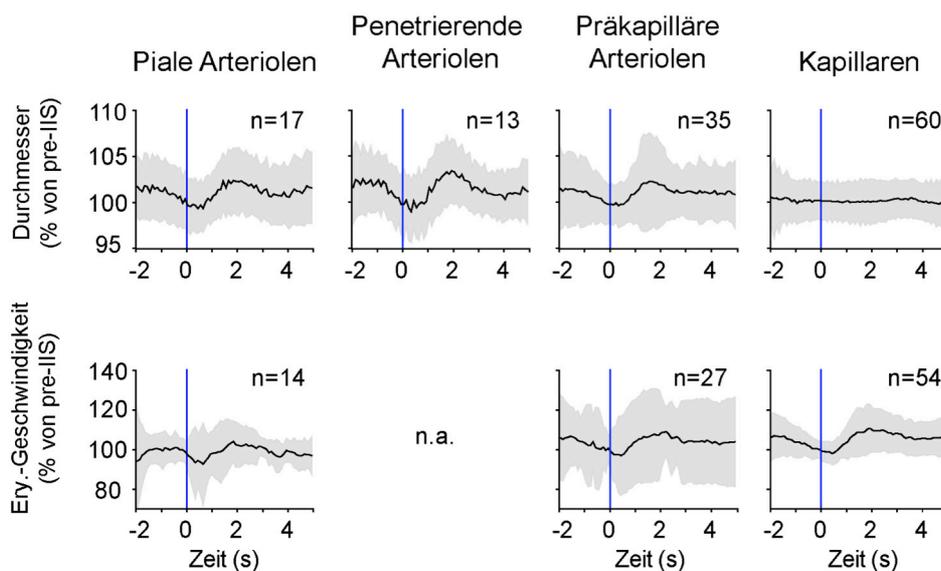


Abbildung 27: Durchschnittliche Reaktionen der unterschiedlichen Gefäßtypen auf Bicucullin-induzierten IIS

Durchschnittliche Reaktionen aller Gefäße, unterteilt nach Gefäßtypen. Die schwarze Linie repräsentiert der Mittelwert, die graue Fläche repräsentiert ± 1 Standardabweichung. Piale, penetrierende und präkapilläre Arteriolen zeigen robuste Durchmesseränderungen auf, nicht aber Kapillaren. Alle ermittelten Gefäßtypen weisen Veränderungen in dem Blutflussparameter Erythrozytengeschwindigkeit auf, inklusive der Kapillaren.

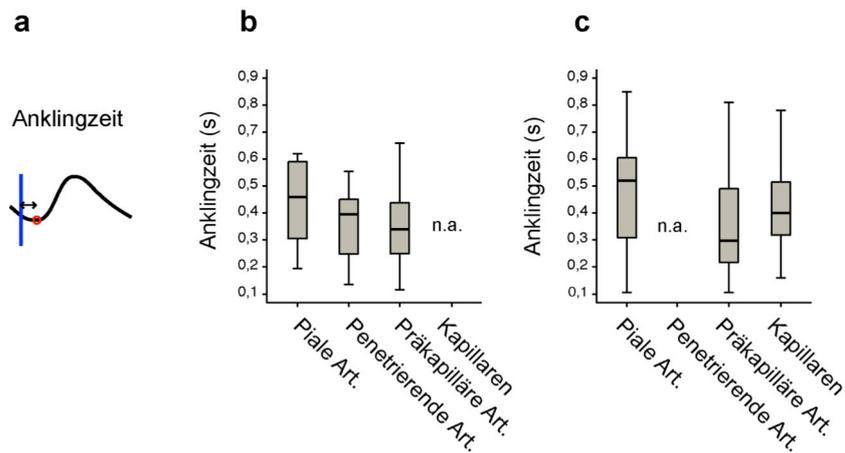


Abbildung 28: Anklingszeit der Durchmesser- und Erythrozytengeschwindigkeitsreaktion

a: Die Anklingszeit wurde aus den Kurven ermittelt, die durch polynomiale Regression aus der Zusammenfassung einzelner Reaktionen (siehe Abb. 26) hergestellt wurden, und korrespondiert zeitlich mit dem lokalen Minimum nach der IIS. Weder in dem Durchmesser (b), noch in der Flussgeschwindigkeit (c) ergaben sich signifikante Unterschiede. Bei den Kapillaren konnten keine Durchmesseranklingszeiten erhoben werden. n.a.: nicht erhältlich.

Ein Hinweis für eine aktive Beteiligung von Kapillaren in der funktionellen Hyperämie könnte dennoch bestehen, wenn die Blutflussmodulation in den Kapillaren schneller zustande kommen würde als in den präkapillären Arteriolen. Wir haben deswegen versucht, die Anklingszeit (Latenz zwischen Depolarisationsspitze und Beginn der Antwort) und die Stoßzeit (Latenz zwischen Depolarisationsspitze und Maximum der Antwort) der Durchmesser- und Blutflussantwort für jeden Gefäßtyp zu charakterisieren. Dazu haben wir eine polynomiale Regression der zusammengelegten Antworten für jedes Gefäß und jede Antwort durchgeführt. Die lokalen Minima und Maxima der Regressionsfunktion wurden ermittelt. Daraus ergaben sich die Zeitpunkte des Anfanges und des Maximums der Reaktion. Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen der Anklingszeit der Blutflussantwort unterschiedlicher Gefäßtypen gefunden werden (**Abb. 28**). Die schnellsten Blutflussreaktionen schienen jedoch in den parenchymalen Arteriolen, und nicht in den Kapillaren, zu entstehen. Die Durchmesserantwort schien ebenfalls früher in den präkapillären als in den penetrierenden und pialen Gefäßen aufzutreten. Die Stoßzeiten der Durchmesser- oder Blutflussreaktionen wiesen ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gefäßtypen auf (**Abb. 29**). Unsere Ergebnisse suggerieren, dass die aktive kapilläre Vasodilatation nicht wesentlich für die Entstehung der funktionellen Hyperämie ist. Penetrierende Gefäße zeigten robuste dilatatorische Reaktionen; präkapilläre Arteriolen scheinen die kleinsten Gefäße zu sein, die zur Hyperämie

aktiv beitragen und somit die räumliche Ausbreitung des Blutflussanstieges nach neuronaler Aktivierung bestimmen.

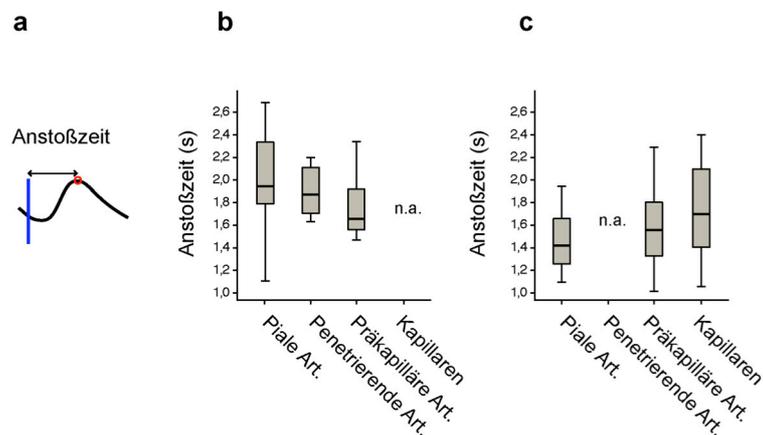


Abbildung 29: Anstoßzeit der Durchmesser- und Erythrozytengeschwindigkeitsreaktion

a: Die Anstoßzeit wurde aus den Kurven ermittelt, die durch polynomiale Regression aus der Zusammenfassung einzelner Reaktionen (siehe Abb. 27) hergestellt wurden, und korrespondiert zeitlich mit dem lokalen Maximum nach der IIS. Weder bei der Reaktion der Durchmesser (b), noch der Flussgeschwindigkeit (c) ergaben sich signifikante Unterschiede. In den Kapillaren konnten keine Durchmesseranklingzeiten erhoben werden. n.a.: nicht erhältlich.

3.5 Rolle der Perizyten bei der *Cortical Spreading depolarization* (CSD)

Reaktion der Kapillaren und Arteriolen

Es blieb zu bestimmen, ob ein länger anhaltender vasodilatatorischer Stimulus kapilläre Dilatationen hervorrufen könnte. Zu diesem Zweck haben wir in 8 Tieren 15 einzelne Events der Cortical spreading depolarization (CSD) ausgelöst und deren Effekte auf die Durchmesser der Kapillaren und der präkapillären Arteriolen untersucht. CSD besteht aus einer Depolarisationswelle, die sich mit einer Geschwindigkeit von ca. 3 mm/min über den Kortex ausbreitet und mit einer ausgedehnten hyperämischen Reaktion einhergeht (Abb. 30b). Die CSD kooptiert vermutlich die Mechanismen der neurovaskulären Kopplung.

Wir haben CSD elektrisch durch Stimulation mit einer bipolaren Elektrode an dem frontalen Kortex ausgelöst (**Abb. 30a**). Der LDF stieg während der Passage der CSD bis zu einem Maximum von durchschnittlich $157 \pm 51\%$ der basalen Werte an. Eine Dilatation der Arteriolen konnte beobachtet werden, so wie eine simultane Dilatation der Kapillaren (**Abb. 31 und 32a,b**). Jedoch betrafen die Dilatationen homogen die Kapillaren, ungleich der Konstriktionen während der Superfusion von U46619. Die Dilatation erreichte $122 \pm 16\%$ der basalen Werte in den Segmenten, die mit Perizytenkörpern besetzt waren; die Perizytenkörper-freien Segmente dilatierten mehr und erreichten $130 \pm 27\%$ der basalen Werte. Der Unterschied dieser zwei Werte erreichte keine statistische Signifikanz ($p=0,12$; **Abb. 32c**). Diese Ergebnisse suggerieren, dass Kapillaren während der massiven Hyperämie unter CSD passiv dilatieren. Diese Dilatation basiert wahrscheinlich auf einem Anstieg des Perfusionsdrucks, der durch die aktive Dilatation der parenchymalen (und wahrscheinlich penetrierenden und pialen) Arteriolen bewirkt wird.

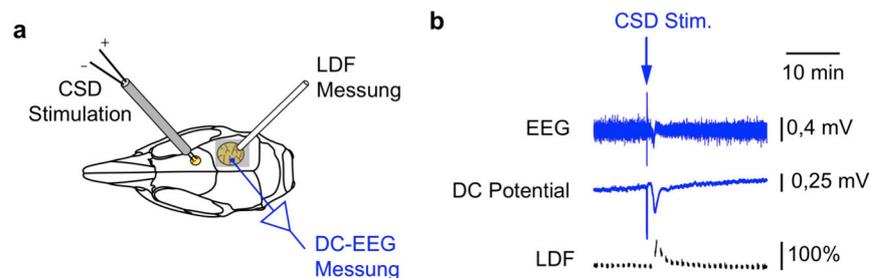


Abbildung 30: Induktion von cortical spreading depolarization (CSD) in Mäuse

a: Schema der Präparation. CSD wurde durch ein frontales Fenster elektrisch ausgelöst. LDF und das DC-EEG wurden durch das parietale Fenster abgeleitet. b: Aufnahme der Passage einer CSD nach Stimulation (Pfeil). Das EEG wird flacher und erholt sich nach ca. 10–20 min. Das DC-Potential zeigt eine transiente Depolarisation. Der LDF steigt während der Depolarisationswelle über den parietalen Kortex.

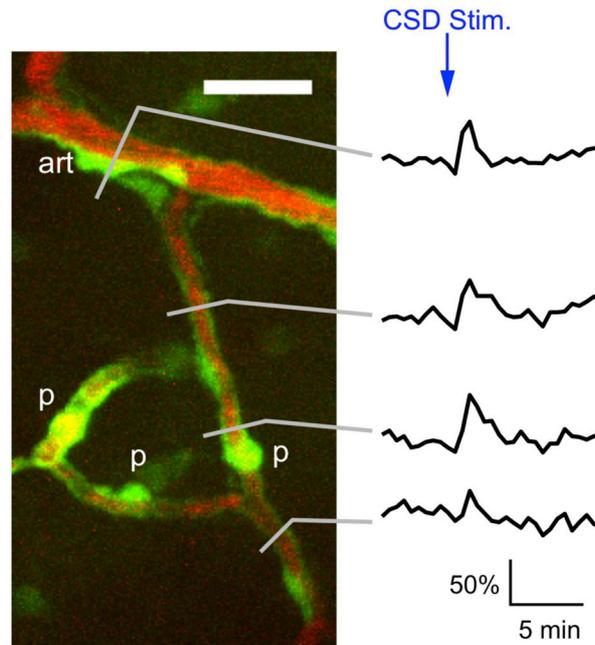


Abbildung 31: Beispiel der Reaktion von Arteriolen und Kapillaren auf die Passage einer CSD

Kurz nach der Auslösung der CSD ergab sich eine Dilatation der präkapillaren Arteriole (art) und der Kapillaren, wie in den Aufnahmen (rechts) ersichtlich ist. Die Dilatationen geschehen sowohl in kapillaren Segmenten an Perizytenkörpern (p), als auch an Segmenten ohne Perizytenkörper.

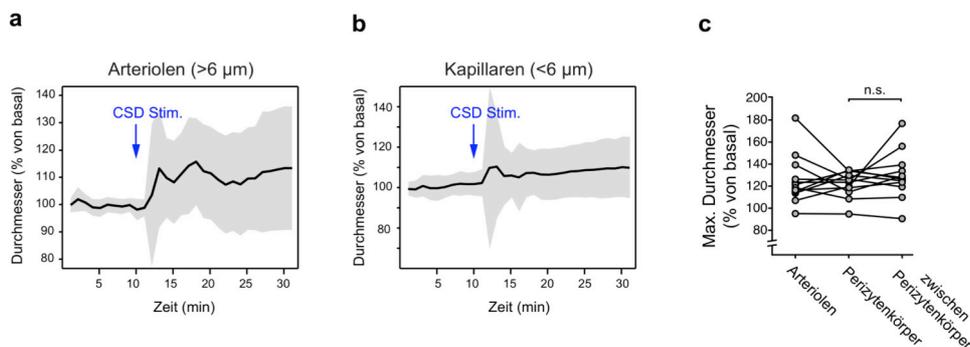


Abbildung 32: Zusammenfassung der Durchmesseränderungen nach CSD

a: Durchschnittliche Durchmesseränderungen in Arteriolen (graue Fläche: $\pm 1SD$). b: Durchschnittliche Durchmesseränderungen an Kapillaren. c: Maximale Durchmesseränderungen in Arteriolen, Perizytenkörpern (Kapillaren) und zwischen Perizytenkörpern in Kapillaren. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden letzten, was auf eine passive Dilatation der Kapillaren hinweist. n.s.: nicht signifikant.

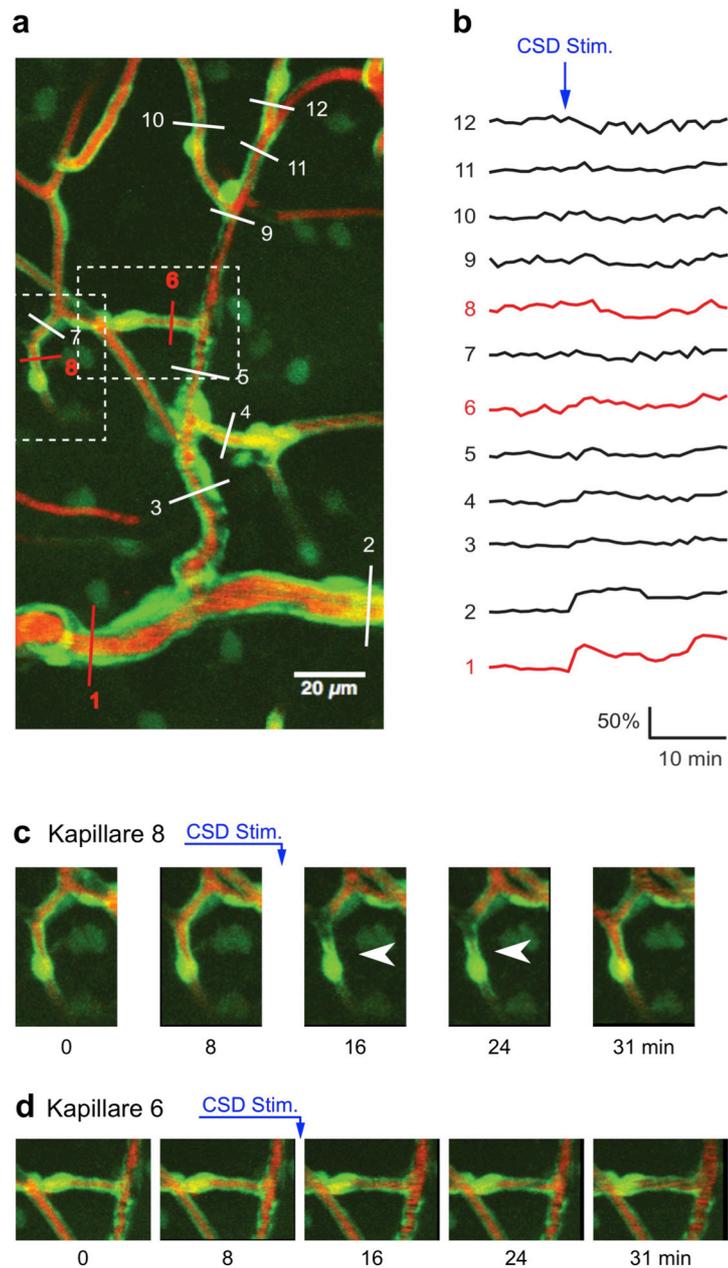


Abbildung 33: Konstriktion eines Perizyten während der Passage einer CSD

a: Gefäßbaum mit präkapillären Arteriolen (1, 2, 3, 5) und Kapillaren. b: Durchmesseränderungen an den in (a) mit Zahlen markierten vaskulären Gefäßdurchmessern. Eine allgemeine Dilatation nach der Auslösung der CSD ist bemerkbar, jedoch konstringiert die Kapillare Nr. 8. in der Nähe des Perizyten zeitgleich zur Dilatation der vorangehenden arteriellen Gefäße. c–d: Bildfolge der Kapillaren Nr. 8 und 6, die Konstriktion bzw. Dilatation aufweisen

Beobachtung von kapillärer Konstriktion während CSD

In zwei Fällen ließen sich spontane, lokalisierte Konstriktionen feststellen, die während der allgemeinen Dilatation infolge der Passage von CSD geschahen. In dem angeführten Beispiel geschah eine Konstriktion in unmittelbarer Nähe eines Perizyten, während die vorgeschalteten Segmente dilatierten (**Abb. 33**). Die Konstriktion bildete sich während einer zweiten dilatatorischen Welle zurück. Das wiederholte Auftreten von spontanen Konstriktionen beweist weiter, dass Kapillaren in der Lage sind, *in vivo* aktiv zu konstringieren. Der Zweck dieser Konstriktionen bleibt unbekannt; die kapilläre Vasoaktivität scheint beim Mechanismus der neurovaskulären Kopplung keine notwendige oder relevante Rolle zu spielen.

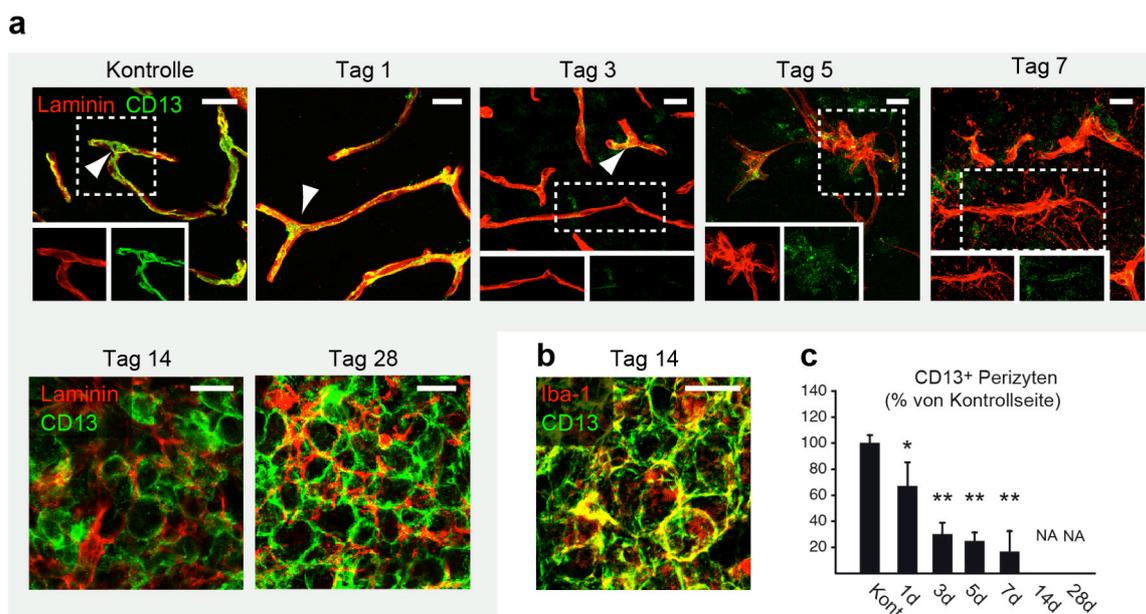


Abbildung 34: Abnahme der Zahl von CD13⁺ Perizyten in Kapillaren des Infarktkerns

a: Serie von typischen Beispielen aus dem Infarktkern, gefärbt für CD13 (Perizyten) und Laminin (Basalmembran). Alle Bilder stellen Maximalprojektionen von konfokalen Stapeln dar. Ab Tag 1 und bis Tag 7 nach Schlaganfall lässt sich eine Abnahme der Anzahl von CD13⁺ Perizyten (Pfeilköpfe) in den Kapillaren im Infarktkern feststellen. **b**: Ab dem Tag 14 nach Schlaganfall besteht im Infarktkern ein massives Infiltrat mit Iba-1⁺ Makrophagen, die ebenfalls CD13 exprimieren. **c**: Die Quantifizierung der Perizytenzahl im Infarktkern zeigt, dass 7 Tage nach dem Insult bloß noch ca. 20% der Perizyten bestehen. *: $p < 0,01$; **: $p < 0,0001$ gegenüber Kontrollen. NA: nicht verfügbar, ND: nicht detektiert. Skala: 20 μ m.

6 Reaktion der Perizyten auf zerebrale Ischämie

Wir haben in einem Modell der fokalen zerebralen Ischämie mittels immunohistologischen Färbungen die Reaktion von Perizyten und anderen muralen Zellen charakterisiert. Dazu haben wir sowohl immunohistologische Marker (PDGFR β , CD13) wie auch transgene Mäuse benutzt, die selektiv in Perizyten und muralen Zellen GFP exprimieren (*rgs5*^{GFP} Mäuse).

Abnahme der Zahl von CD13⁺ Perizyten in Kapillaren nach fokaler zerebralen Ischämie

Um den Verbleib von Perizyten nach Schlaganfall zu charakterisieren, haben wir im Infarktkern von Mäusen 1, 3, 5, 7, 14, 28 Tage nach MCAO oder in Kontrollmäusen die Anzahl an CD13⁺ Zellen in den Kapillaren gezählt, die eine typische perizytäre Morphologie aufgewiesen haben. Die Ergebnisse sind in der **Abb. 34a,c** dargestellt. Ab Tag 1 nach MCAO stellte sich eine Abnahme der CD13⁺ Kapillaren Perizyten mit normaler Morphologie ein, sodass am Tag 7 nach MCAO nur noch ca. 20% solcher Zellen zu zählen waren. An den Tagen 14 und 28 nach MCAO wurde der Infarktkern von CD13⁺ Iba-1⁺ Makrophagen infiltriert (**Abb. 34b**), sodass die Analyse der Perizytenzahl erschwert und nicht durchgeführt wurde.

Am Tag 1 nach MCAO zeigten die Perizyten im Infarktkern morphologische Veränderungen, die auf eine Kompromittierung seiner zellulären Integrität hinwiesen, wie a) Austritt von CD13⁺ immunoreaktives Material aus dem Zellkörper und seiner umfassenden Basalmembran, siehe **Abb. 35a**; und b) Fragmentierung der CD13⁺ zellulären Fortsätze, siehe **Abb. 35b**. Ebenfalls waren am Tag 1 nach MCAO häufig TUNEL⁺ CD13⁺ im Infarktkern zu finden. In *rgs5*^{GFP} Mäuse, den eine 45 min. MCAO durchgeführt wurde, wurden im Infarktkern ebenfalls weniger GFP⁺ Zellen als auf dem kontralateralen Hirngewebe detektiert (43±10 vs. 100±15 Zellen/mm²; p<0,05; n = 3). Diese Ergebnisse zeigen, dass Perizyten in Kapillaren zu einem frühen Zeitpunkt nach Schlaganfall sterben. In Knochenmarkschimären, denen Knochenmark von *rgs5*^{GFP} Mäusen transplantiert wurde, fanden wir nach 45 min. MCAO und 7 (n=3), 14 (n=4), oder 28 Tage (n=3) Reperfusion keine GFP positiven Zellen im Infarktgebiet. Dies suggeriert, dass es zu keine Einwanderung von Perizyten aus einem hämatogenen Reservoir kommt.

Wir haben die Länge der vaskulären Segmente quantifiziert, die immunoreaktiv für den endothelialen Marker CD31 waren. Am Tag 5 und 7 nach MCAO waren die Unterschiede zu den Kontrollen signifikant (62±34 und 51±10% der kontralateralen Seite vs. 104±9% in Kontrollen; p<0,05). Diese Ergebnisse suggerieren zudem, dass das Absterben der Perizyten der Abnahme der Endothelzellen im Infarktkern vorausgeht.

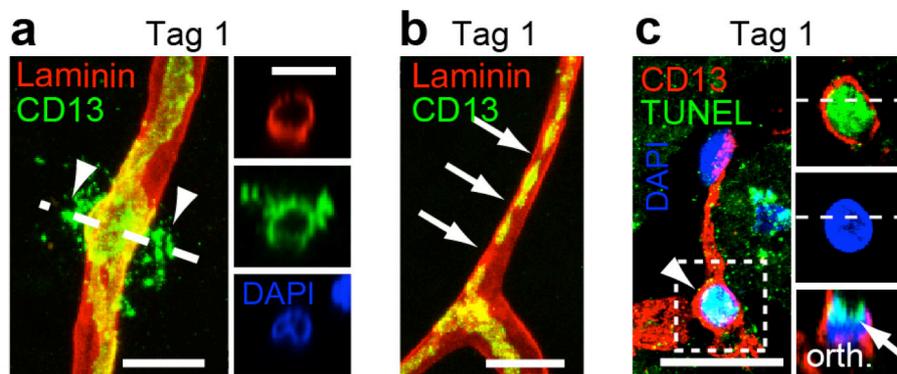


Abbildung 35: Morphologische Veränderungen und Apoptosis in Perizyten 1 Tag nach MCAO

a: Austritt von CD13-Immunoreaktivem Material eines Perizyten außerhalb der Laminin⁺ Basalmembran (Pfeilköpfe). b: Fragmentierung der CD13-Immunoreaktiven Fortsätze eines Perizyten (Pfeile). c: CD13⁺ Perizyt (Pfeilköpfe) mit TUNEL⁺ nucleus (Pfeil). Die Insets (orth.) zeigen orthogonale Rekonstruktionen der konfokalen Stapel an den mit diskontinuierlichen Linien markierten Ebenen. Sonst werden Maximalprojektionen der Stapel gezeigt. Skala: 20 µm.

Zunahme der Zahl von PDGFR β ⁺ stromalen Zellen nach fokaler zerebraler Ischämie

Wir haben das Infarktgewebe mit einem weiteren Perizyten-Marker, PDGFR β , gefärbt. PDGFR β markiert Perizyten und andere murale Zellen, auch Fibroblasten und Myofibroblasten [94] sowie mesenchymale Stammzellen (MSCs) [47]. Im Gegensatz zu der Färbung für CD13, konnten wir ab dem dritten Tag nach MCAO einen kontinuierlichen Anstieg der Zahl von PDGFR β ⁺ Zellen feststellen, der bis zu dem Tag 14–28 nach MCAO bestand (**Abb. 36a,b**). Ab Tag 5 nach MCAO zeigten PDGFR β ⁺ Zellen eine ramifizierte, amöboide Morphologie, und erzeugten einen kontinuierlichen Netz in dem infarktierten Gewebe. Die PDGFR β ⁺ Zellen wurden von der GFAP⁺ astrogliotischen Narbe umfasst und bevölkerten ein Areal im Kern des Infarktes, der sich ab dem 7 Tag nach MCAO bedeutend zusammensog (**Abb. 36c,d**). Wir haben mittels Färbung für den Proliferationsmarker Ki67, der von Zellen während der Interphase und Mitosis exprimiert wird, die Proliferation von PDGFR β ⁺ Zellen analysiert. PDGFR β ⁺ Ki67⁺ Zellen wurden ab den 3. Tag nach MCAO in der Gefäßwand und danach auch im Parenchym detektiert (**Abb. 37a,b**). Am Tag 3 nach MCAO tauchten proliferative PDGFR β ⁺ Ki67⁺ vermehrt um größere Gefäße auf (**Abb. 37c**).

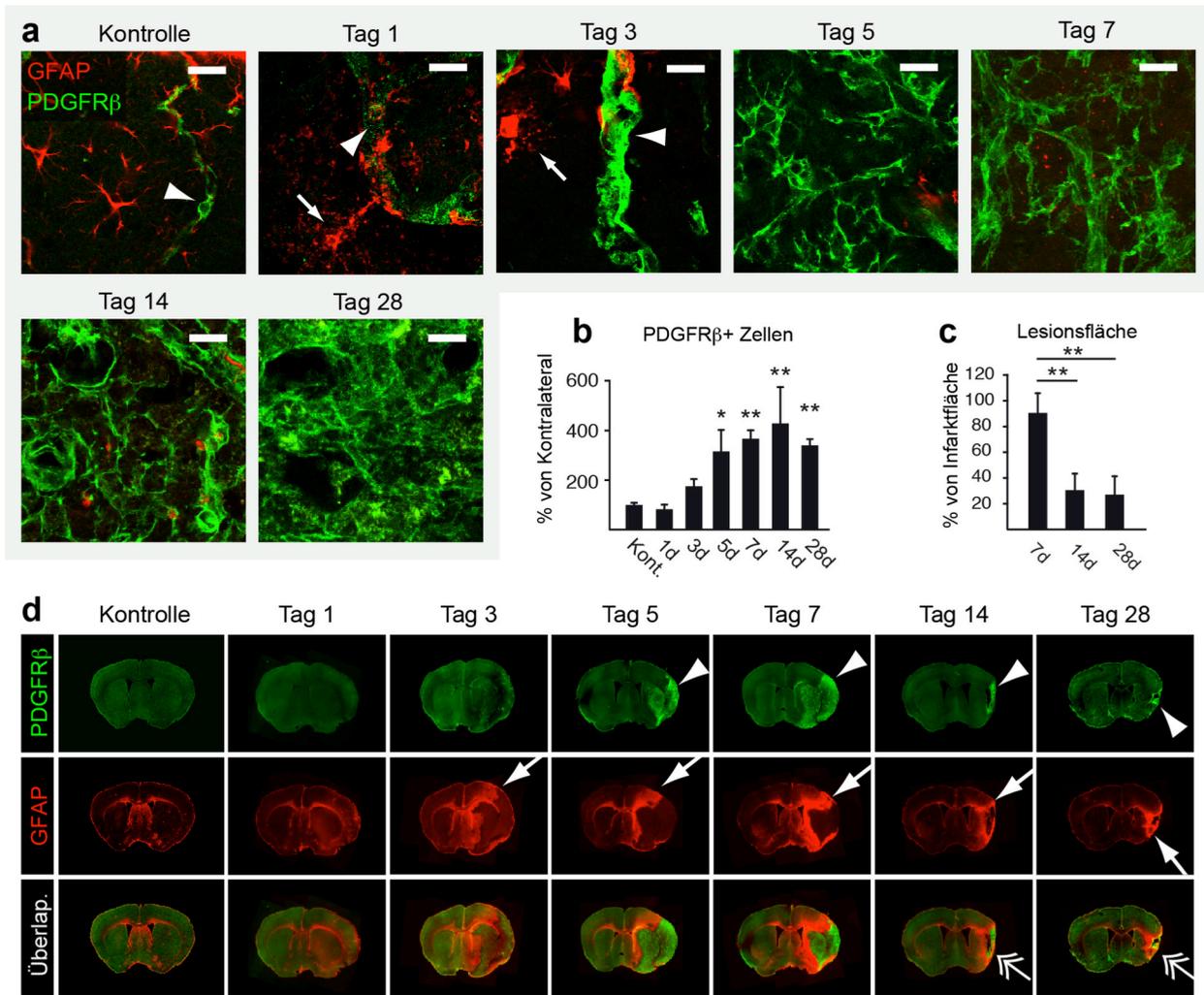


Abbildung 36: Zunahme von PDGFR β^+ Zellen im Infarktkern

a: Serie von typischen Beispielen aus dem Infarktkern, gefärbt für PDGFR β^+ (Perizyten/stromale Zellen) und GFAP (Astrozyten). Die Bilder stellen maximale Projektionen von konfokalen Stapeln dar. In Kontrollgewebe sind Perizyten sichtbar (Pfeilkopf). 1 oder 3 Tage nach MCAO deckt die Färbung für PDGFR β^+ Perizyten/murale Zellen im Infarktkern auf (Pfeilköpfe). Disintegrierte GFAP Immunoreaktivität weist auf sterbende Astrozyten hin (Pfeile). Ab dem 5. Tag nach MCAO sind amöboide PDGFR β^+ Zellen im Infarktkern nachweisbar, die bis Tag 28 nach MCAO ein kontinuierliches stromales Netzwerk bilden. **b**: Quantifizierung von PDGFR β^+ Zellen im Infarktkern. **c**: Quantifizierung der Läsionsfläche im Bezug auf die Fläche des infarctierten Gewebes. 14 und 28 Tage nach MCAO ist eine Schrumpfung der Läsion nachweisbar. **d**: Serie von typischen Beispielen, die die Evolution der PDGFR β^+ stromalen Narbe (Pfeilkopf) und der GFAP $^+$ gliotischen Narbe (Pfeil) darstellen. PDGFR β^+ stromale Zellen sind in der gliotischen Narbe eingekapselt. Das Infarktgewebe schrumpft allmählich. An den Tage 14 und 28 nach MCAO entstehen im Infarktkern Kavitationen (doppelte Pfeile). *: $p < 0,05$; **: $p < 0,0005$. Skala: 20 μm (a), 200 μm (d).

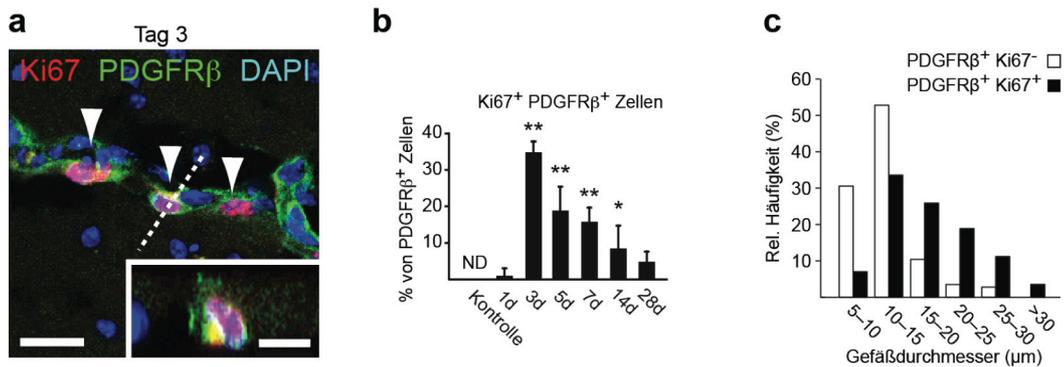
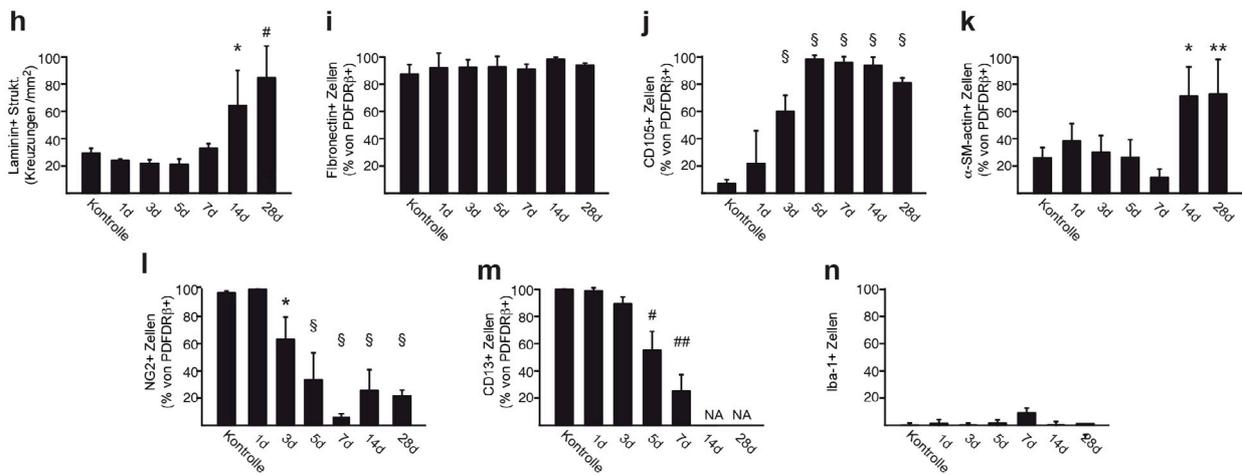
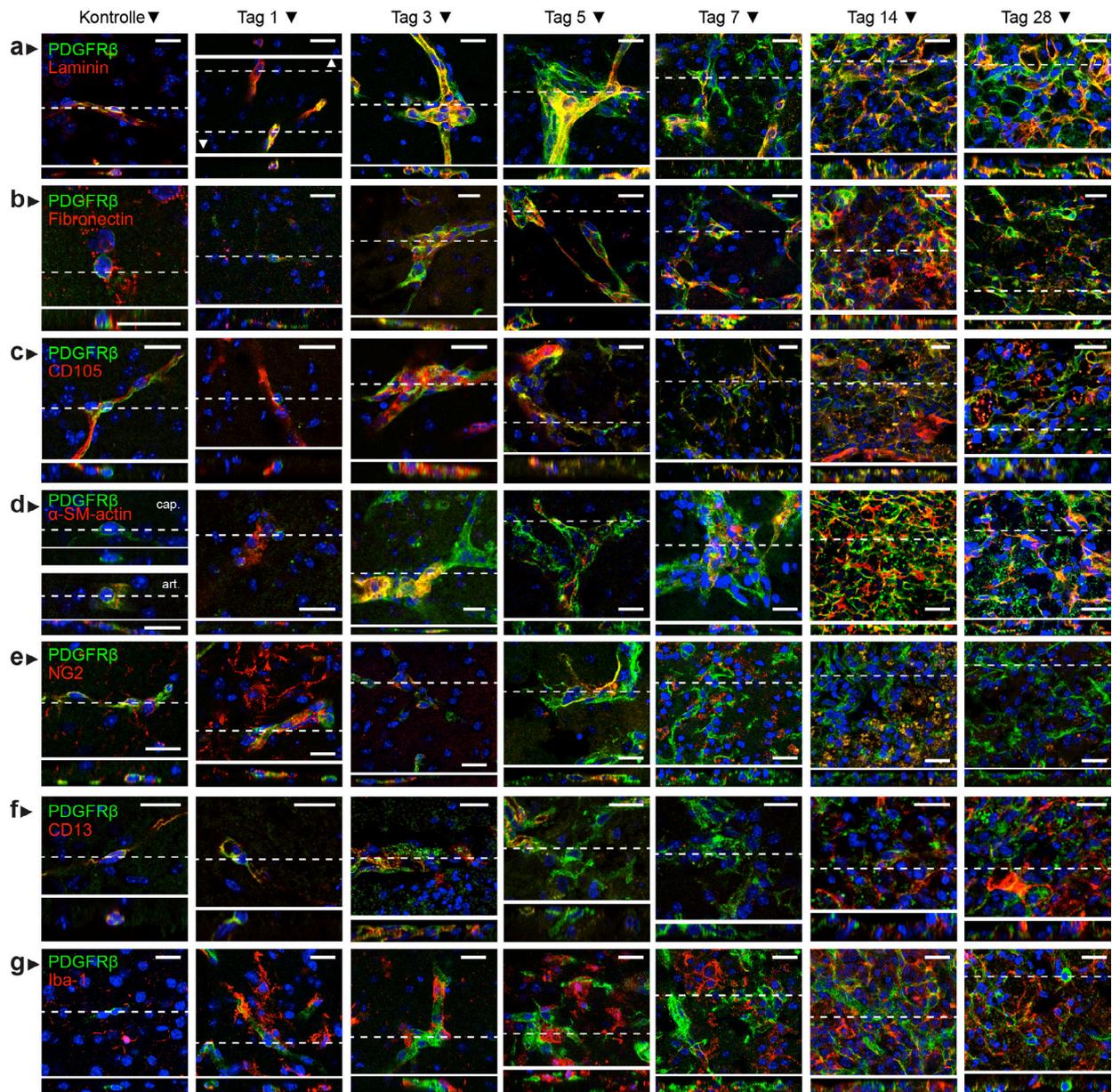


Abbildung 37: Proliferation von PDGFRβ⁺ Zellen in Gefäßen des Infarktkerns

a: 3 Tage nach MCAO sind doppelpositive PDGFRβ⁺ Ki67⁺ in der Gefäßwand nachweisbar, was auf lokale Proliferation der Zellen hinweist (Pfeile). Das Bild stellt eine Maximalprojektion des konfokalen Stapels dar. Das Inset zeigt die orthogonale Rekonstruktion des konfokalen Stapels an der mit diskontinuierlichen Linien markierten Ebene. **b**: Quantifizierung der doppelpositiven PDGFRβ⁺ Ki67⁺ Zellen. Am Tag 3 nach MCAO besteht ein massiver Anstieg der proliferierenden PDGFRβ⁺ Zellen. **c**: Frequenzhistogramme der Durchmesser von Gefäßen, an den jeweils PDGFRβ⁺ Ki67⁺ und PDGFRβ⁺ Ki67⁻ Zellen am Tag 3 nach MCAO zu finden sind. Proliferierenden Zellen häufen sich an größeren Gefäßen. *: p<0,05; **: p<0,0005. Skala: 20 μm (a), 10 μm (Inset in a). ND: nicht detektiert.

Charakterisierung der neu gebildeten PDGFRβ⁺ Zellen

Im Infarktkern wurde die Immunoreaktivität für Laminin und Fibronectin, Komponenten der ECM, hochreguliert. Laminin und Fibronectin-Immunoreaktivität kolokalisierten mit den PDGFRβ⁺-Zellen, oder lokalisierten nah zueinander (**Abb. 38a,b,h,i**). CD105 (Endoglin) ist ein Protein, das mit dem *transforming growth factor* (TGF)-β Rezeptor assoziiert ist, von MSCs und Fibroblasten exprimiert wird, und während Fibrose hochreguliert wird [95]. CD105 wurde in PDGFRβ⁺-Zellen ab dem 3. Tag nach MCAO hochreguliert (**Abb. 5c,j**). Ab dem 14. Tag, während der Kontraktion des Infarktgewebes, exprimierten ca. 80% der PDGFRβ⁺-Zellen *α-smooth muscle* (SM) Aktin (**Abb. 5d,k**). Insgesamt exprimierten die Zellen Marker, die in stromalen Zellen oder Myofibroblasten vorhanden sind, während sie Perizytenmarker wie CD13 oder NG2 herunterregulierten. (**Abb. 5e,f,l,m**). Die Mehrzahl der PDGFRβ⁺-Zellen waren negativ für Iba-1, ein Marker für Makrophagen.



Proliferation von PDGFR β ⁺ Zellen im humanen Schlaganfall

Wir haben histologische Proben von 16 Subjekten mit der neuropathologischen Diagnose eines Schlaganfalls. Je nach Befund in der Hämatoxylin-Eosin-Färbung wurden die Subjekte in akute (n=5), subakute (n=6) oder chronische Fälle (n=5) unterteilt (**Abb. 39a** und **Tabelle 1**). In nicht-ischämischem Kontrollgewebe von den selben Subjekten und Hirnregionen lokalisierte die Immunoreaktivität für PDGFR β ⁺ in Perizyten und murale Zellen, während Immunoreaktivität für Kollagen-VI⁺ die fibrilläre ECM um den großen Gefäßen markierte (**Abb. 39b,c**). Akute Läsionen zeigten eine signifikante Abnahme der Dichte von PDGFR β ⁺ Zellen (**Abb. 39b,f**). Amöboide PDGFR β ⁺ Zellen tauchten in den subakuten Läsionen und in der Mehrzahl der chronischen Läsionen auf (**Abb. 39b,f**). Die erhöhte PDGFR β ⁺-Immunoreaktivität war limitiert auf die zentrale Läsion im Schlaganfallgebiet und umschlossen von GFAP⁺ hypertrophen Astrozyten (**Abb. 39e**). Die dichte von Kollagen VI⁺-Faser veränderte sich nicht gegenüber Kontrollen in den akuten Läsionen, aber erhöhte sich beachtlich in den subakuten und in den meisten chronischen Läsionen (**Abb. 39c,g**). Die Dichte der PDGFR β ⁺-Zellen und der Kollagen VI-Fasern korrelierten stark miteinander (**Abb. 39c,h**), und Kollagen VI-Immunoreaktivität kolokalisierte mit PDGFR β ⁺-Zellen (**Abb. 39d**). Im Allgemeinen suggerieren unsere Ergebnisse, dass es im humanen wie im experimentellen Schlaganfall zu einer Abnahme der Perizytenzahl und der Proliferation von einer neuen Population von stromalen Zellen kommt, die im Infarktkern Narbengewebe bilden.

VORHERIGE SEITE

Abbildung 38: Charakterisierung der PDGFR β ⁺ Zellen im Infarktkern

a–g: Typische Beispiele, für alle untersuchte Zeitpunkte nach MCAO, von Doppelfärbungen für PDGFR β ⁺ und Laminin, Fibronectin, CD105, α -SM-Aktin, NG2, CD13 und Iba-1. Die Bilder stellen einzelne konfokale Ebenen dar, die Insets stellen orthogonale Rekonstruktionen des konfokalen Stapels an den mit diskontinuierlichen Linien markierten Ebenen dar. h–n: Quantifizierung der Laminin⁺-Strukturen und der Expression von Fibronectin, CD105, α -SM-Aktin, NG2, CD13 und Iba-1 von PDGFR β ⁺ Zellen im Infarktkern für alle untersuchte Zeitpunkte *: p<0,005, **: p<0,001, #: p<0,0001, ##: p<0,00001, §: p<0,000001. NA: nicht durchführbar. Skala: 20 μ m.

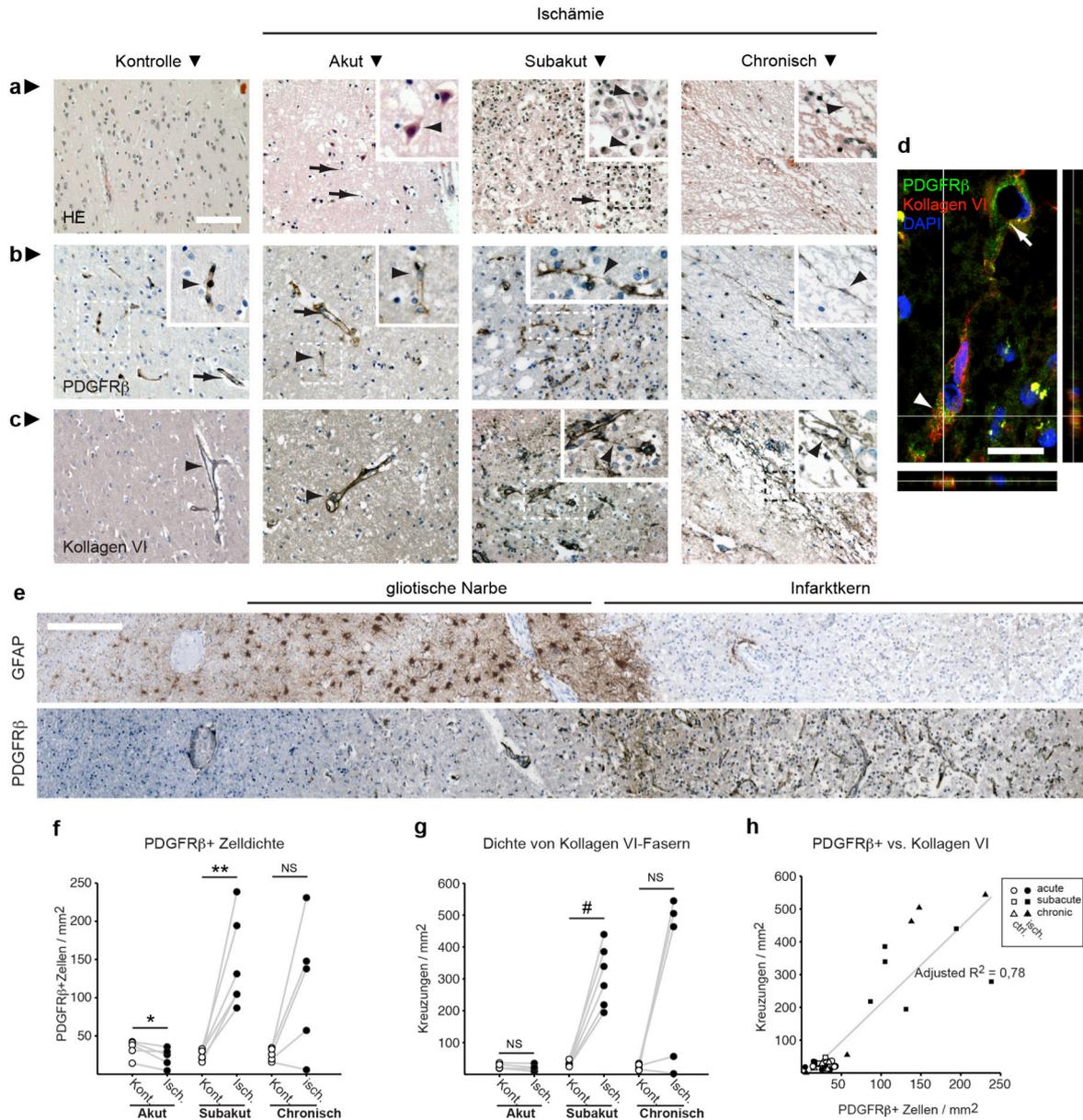


Abbildung 39: PDGFR β ⁺ Zellen in humanen Schlaganfall

a: Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung von typischen Beispielen aus Kontrollen und akuten, subakuten und chronischen Schlaganfallpatienten. Akute Läsionen sind charakterisiert durch Ödem, pyknotische Nuklei (Pfeile) und eosinophile Neuronen (Pfeilköpfe). In subakuten Läsionen sind Pseudozysten (Pfeile) und entzündliche Zellen (Pfeilköpfe) typisch. Chronische Läsionen zeigen Kavitationen und Septen auf (Pfeilköpfe). b: Färbung für PDGFR β ⁺. In Kontrollen und akuten Läsionen, Perizyten (Pfeilköpfe) und murale Zellen (Pfeile) sind immunopositiv. In subakuten und chronischen Läsionen, amöboide PDGFR β ⁺ Zellen (Pfeilköpfe) verbinden unterschiedliche Gefäße. c: Die Färbung für Kollagen VI zeigt immunoreaktive Fasern im Parenchym bei subakuten und chronischen Läsionen (Pfeilköpfe), im Gegensatz zu den Kontrollen. d: Das konfokale Bild einer Doppelfärbung für PDGFR β und Kollagen VI aus einem subakuten Schlaganfall zeigt Kolokalisation von beiden Signalen in einer PDGFR β ⁺ Zelle (Pfeilkopf). Die Fasern sind mit einem Gefäß (Pfeil) verbunden. e: PDGFR β ⁺ Zellen proliferieren innerhalb der gliotischen Narbe mit hypertrophen GFAP⁺ Astrozyten. f: Quantifikation der PDGFR β ⁺ Zellen in akuten, subakuten und chronischen Läsionen vs. Kontrollgewebe. PDGFR β ⁺ Zellen nehmen in akuten Infarkten drastisch zu, und proliferieren in subakuten Läsionen. g: Quantifikation der Kollagen VI⁺ Fasern. In subakuten Läsionen nimmt die Dichte von Fasern drastisch zu. h: Korrelation der Zelldichte von PDGFR β ⁺ Zellen und der Dichte von Kollagen VI⁺ Fasern in allen Subjekten. *: p<0,03, **: p<0,005, #: p<0,0008 vs. Kontrollgewebe. NS: nicht signifikant. Skala: 100 μ m (a–c), 20 μ m (d), 250 μ m (e).

Subjekt	Alter	Geschlecht	Stadium	Lokalisation des Infarktes
1	73	m	akut	Cerebellum
2	72	f	akut	Cortex cerebri
3	85	f	akut	Cerebellum
4	78	f	akut	Cortex cerebri
5	71	m	akut	Cortex cerebri
6	53	m	subakut	Cortex cerebri
7	40	f	subakut	Basalganglien
8	64	m	subakut	Cortex cerebri
9	83	m	subakut	Cortex cerebri
10	77	m	subakut	Cerebellum
11	62	f	subakut	Basalganglien
12	77	m	chronisch	Cerebellum
13	73	f	chronisch	Basalganglien
14	73	m	chronisch	Capsula interna
15	82	f	chronisch	Cortex cerebri
16	65	m	chronisch	Cortex cerebri

Tabelle 1: Demografische Charakteristika der Subjekte mit Schlaganfall

4. Diskussion

4.1 Bildgebung von Perizyten in der β -actin-eGFP Maus

Der Hauptgegenstand der vorliegenden Arbeit war es, zu überprüfen, ob Kapillaren im zerebralen Kortex der Maus mit kontraktile Fähigkeiten ausgestattet sind, die sie dazu befähigen, den Blutfluss auf kapillärer Ebene unabhängig von dem Effekt der größeren Arteriolen zu regulieren. Um diesen Zweck zu erfüllen, haben wir ein transgenes Mausmodell benutzt, in dem die Endothelzellen und Perizyten mittels Zwei-Photonen Mikroskopie in vitalen ZNS-Gewebepräparaten oder im lebendigen Tier beobachtet werden können.

In der transgenen β -actin eGFP Maus exprimieren alle Zellen das fluoreszierende Protein GFP. Da GFP unter der Kontrolle des β -actin-Promotors exprimiert wird, liegt die Vermutung nahe, dass die hohe GFP-Expression in vaskulären Zellen an einer höher regulierten Expression von β -actin liegt. Endothelzellen besitzen bekanntlich ein robustes Aktin-Zytoskelett, das für die Bindung von Zellen und die Erhaltung der Funktion als Barriere notwendig ist; Aktin macht bis zu 15 % des Proteingehalts von Endothelzellen aus [96]. Kontraktile Zellen wie Perizyten könnten ebenfalls eine höhere Expression von β -actin als das ZNS-Parenchym aufweisen. Quantitative Daten der Expression von β -actin in unterschiedlichen Zellen im ZNS liegen nicht vor und somit bleibt diese Erklärung spekulativ. Nichtsdestotrotz hat unsere histologische Charakterisierung gezeigt, dass kortikale Endothelzellen und Perizyten eine höhere Expression von GFP aufweisen, die sie mit konventioneller oder Zwei-Photonen Fluoreszenzmikroskopie detektierbar machen.

Die unspezifische, ubiquitäre Expression von GFP, die eine selektive Bildgebung von Perizyten ausschließt, stellt eine offensichtliche Limitation dieses Modells dar [36]. Die Generierung einer Maus, in der die Sequenz des GFP ins Gen des Perizytenmarkers RGS5 rekombiniert wurde, wurde vor kurzem publiziert [35]. Die $rgs5^{GFP/GFP}$ mutante Maus, in der spezifisch Perizyten mit GFP-markiert sind, eignet sich aufgrund der geringen GFP-Expression nicht für die intravitale Mikroskopie. Weiterhin sind diese Mäuse defizient für das Gen des rgs5-Protein. Die homozygoten $rgs5^{GFP/GFP}$ Mäuse besitzen einen geringeren Blutdruck als Wildtyp-Mäuse, was auf einen kardiovaskulären Phänotyp hinweist. Die Generierung transgener Mäuse durch selektive Expression der Cre-Rekombinase unter dem PDGFR- β -Promotor, der hauptsächlich in muralen Zellen exprimiert wird, mag in der Zukunft ein solches Werkzeug zur Verfügung stellen.

Trotzdem bietet diese Maus für vaskuläre Fragestellungen einige Vorteile. In dieser Maus sind Perizyten *und* Endothelzellen gefärbt, was die Messung der Gefäßlumina möglich macht. Die Abbildung von Perizyten allein würde für diesen Zweck nicht reichen. Die immunhistologischen Färbungen haben zudem gezeigt, dass in diesem Modell Perizyten aufgrund ihrer markanten morphologischen Merkmale im akuten Hirnschnitt-Präparat und *in vivo* erkennbar sind. Gleichzeitig bleibt ein Detektionskanal für einen weiteren Farbstoff frei, was für die parallele Messung von Durchmesser und Blutfluss notwendig ist. Folglich handelt es sich bei der beta-actin GFP Maus um ein nützliches Modell, um die Vasoaktivität von Perizyten in organotypischen Präparationen oder *in vivo* zu erforschen.

4.2 Kontraktion der Perizyten auf U46619 und Modulation des Blutflusses

Kontraktion der Perizyten im akuten Hirnschnitt

Im akuten Hirnschnitt ergab sich in ca. 80% der Experimente eine kontraktile Reaktion auf U46619. Die Blockade der Reaktion durch den selektiven TXA₂-Antagonisten SQ29,548 und die Konzentrationsabhängigkeit der Reaktion beweisen, dass die Kontraktion durch die selektive Aktivierung von TXA₂-Rezeptoren geschah. Dadurch wurde ausgeschlossen, dass die Konstriktion als Artefakt infolge eines präparationsbedingten Schadens entstand. Das Fehlen von Blutperfusion und Perfusionsdruck in dem von der Zirkulation entkoppelten akuten Hirnschnitt stellt sicher, dass die Konstriktion der Kapillaren *aktiv* und nicht passiv infolge einer Abnahme des Perfusionsdrucks entstand. Perizyten in der Zellkultur reagieren auf U46619. Es ist deswegen naheliegend, dass sie den TXA₂-Rezeptor besitzen [63]. Unsere Hirnschnitt-Experimente weisen darauf hin, dass Perizyten zelluläre Effektoren der TXA₂-Rezeptor-vermittelten Konstriktion sind. Wir haben beobachtet, dass die Konstriktionen oft mit Perizytenkörpern assoziiert waren; diese Assoziation war statistisch signifikant. Obwohl Perizyten im ZNS der Maus nahezu das ganze kapilläre Netzwerk bedecken, scheint es möglich, dass Kontraktionen nur in einem spezifischen subzellulären Bereich des Perizyten geschehen. Tatsächlich weist der Perizyt in der Abb. 15 lange zirkumferenzielle Fortsätze nur unterhalb des Perizytenkörpers auf. Diese Fortsätze umfassen die Endothelzelle und könnten somit das strukturelle Substrat der Konstriktionen darstellen. In den klassischen Abbildungen von Zimmermann scheinen Perizyten ebenfalls unter dem Soma diese robusten zirkumferenziellen Fortsätze zu besitzen. In der Retina ereignet sich die kontraktile Antwort auf direkte elektrische Stimulation der Perizyten ebenfalls in Segmenten in der Nähe des Perizytenkörpers [70]. Die Tatsache, dass wir auch Konstriktionen in Segmenten fernab von Perizytenkörpern gefunden haben, zeigt jedoch, dass Kontraktilität

auch in anderen zellulären Regionen des Perizyts vorhanden sein könnte. Weitere morphologische Hinweise für eine kausale Rolle von Perizyten in den beobachteten kapillären Konstriktionen stellen die gelegentlich beobachteten Kontraktionen und die Verformung des Perizytenkörpers dar, die wir in einzelnen Experimenten beobachten konnten. Die Kontraktion der primären Prozesse könnte zudem der Hintergrund für die oft beobachtete Deformation des Verlaufs der Kapillare sein.

Diese Ergebnisse stehen daher in Konsonanz mit früheren Darlegungen der Kontraktilität von Perizyten des ZNS, sei es in der Zellkultur [97], in isolierten Kapillaren [65] oder in organotypischen Präparaten [69,70]. Diese Arbeiten waren bisher mit einer Ausnahme auf retinales Gewebe beschränkt, das (obwohl der Entwicklung nach zum ZNS gehörend) einen besonderen Aufbau besitzt. Peppiatt et al. untersuchten auch zerebrale Hirnschnitte. Unsere Arbeiten erweitern die Evidenz für kapilläre Kontraktilität auf den zerebralen Kortex. Der Beweis der Kontraktilität von Perizyten im isolierten zerebralen kortikalen Gewebe ist von Bedeutung, da die Perizyten im Hirn keine homogene Population darstellen: die Perizyten im Telencephalon stammen aus der neuroektodermalen Neuralleiste, während Perizyten im Zerebellum eine mesodermale Herkunft aufweisen [46] und somit potenziell unterschiedliche Merkmale besitzen könnten.

Kontraktion der Perizyten auf U46619 *in vivo* und Effekt auf den Blutfluss

Wir untersuchten die Kontraktilität der Kapillaren auch im lebendigen, mit Blut perfundierten Gewebe des anästhesierten Tieres. Hier war von Bedeutung zu überprüfen, ob kapilläre Konstriktionen einen Effekt auf den Blutfluss ausüben. Trotz der erhöhten Konzentration von U46619 im Superfusat *in vivo* fiel die Antwort insgesamt kleiner als im Hirnschnitt aus: der Anteil von reaktiven Perizyten war geringer, und die allgemeine Magnitude des Effektes war ebenfalls kleiner (Median <5% *in vivo* gegenüber durchschnittlich ca. 20% im akuten Hirnschnitt). Mehrere Gründe sind für diesen Unterschied möglich. Erstens könnte die Konstriktion *in vivo* durch das Bestehen eines transluminalen Blutdrucks verhindert werden. Doch dieser Effekt ist wegen des kleinen Perfusionsdrucks im kapillären Netzwerk eher unwahrscheinlich. Im Gegensatz zum akuten Hirnschnitt, in dem die Homöostase des Gewebes durch das Superfusat garantiert wird, kommt es *in vivo* durch die Aktion des U46619 zu einer Minderperfusion des Gewebes kommt. Diese Minderversorgung könnte gegenregulatorische Mechanismen ausgelöst haben, die die Vasodilatation der Arteriolen und Kapillaren hervorgerufen haben könnten. Dafür sprechen die paradoxen Dilatationen der pialen Arteriolen,

die in ca. der Hälfte der Fälle nach der Behandlung eintraten. Dieses Phänomen kann analog zur Hyperperfusion sein, die nach zerebraler Ischämie und Reperfusion eintritt. Diese wird durch die Akkumulation von Laktat und Adenosin bedingt und durch NO vermittelt [98-101]. Eine Reduktion des LDF auf bis zu ~80% der Ausgangswerte mag moderat erscheinen und somit ungenügend, um eine reaktive Hyperämie durch die oben genannten Mechanismen auszulösen. Jedoch könnte Die LDF-Messung, die ein Gewebvolumen von ca. 1 mm³ erfasst, die tatsächliche Blutflussreduktion an der Oberfläche des Kortex, die der Aktion des U46619 exponiert ist, unterbewerten. Gemessen an der Geschwindigkeit der Erythrozyten oder ihrer Flussrate, verminderte sich die Blutperfusion an den oberen 100 µm erheblich (zu ca. 20-40% der basalen Werte; in einzelnen Kapillaren stoppte der Erythrozytenfluss gänzlich). Es ist deswegen denkbar, dass im U46619-superfundiertem Gebiet, das wir mit dem Zwei-Photonen Mikroskop erfasst haben, eine effektive Minderblutung entstanden sein könnte, die die Entstehung von Konstriktionen inhibiert haben könnte.

Eine alternative Erklärung für die kapilläre Blutflussverminderung *in vivo* könnte in der Entstehung von Thromben und Okklusionen der Gefäße durch U46619 liegen. Wir haben diesen Effekt durch die Administration von Heparin antagonisiert. Im Blut der β -actin eGFP Maus zeigen aber Plättchen eine sehr hohe GFP-Expression, die sie im Zwei-Photonen Mikroskop detektierbar machen. Wir haben in der β -actin eGFP Maus Photothromboseexperimente durchgeführt, in denen mittels der Injektion des Photosensitizers Rose Bengal und fokaler Anregung mit grünem Licht Thromben in den Arteriolen ausgelöst wurden (siehe [102] für eine Beschreibung des Modells). Die Thromben waren durch fluoreszierende Plättchen sichtbar. In den U46619-Experimente haben wir keine Akkumulation GFP positiver Blutplättchen beobachtet, was zur Annahme führt, dass U46619 in unseren Experimenten nicht zur Thrombenbildung geführt hat.

Im lebendigen Tier ist die Blutperfusion in einem einzelnen Abschnitt nicht unabhängig von Ereignissen in anderen Segmenten des Netzwerkes zu betrachten. Es ist *a priori* deswegen schwierig, den Effekt von U46619 auf den Durchmesser und den Blutfluss der Kapillaren von dem Effekt auf den Durchmesser und den Blutfluss größerer Gefäße zu unterscheiden. Eine weitere Kritik könnte deswegen sein, dass die Abnahme des kapillären Durchmessers einen passiven Kollaps wegen des verminderten Perfusionsdrucks infolge der Konstriktion von Arteriolen stromauf darstellt. An bestimmten Segmenten der Kapillaren mit einem erhöhten konstitutiven Tonus (etwa durch die Präsenz von Perizyten) könnte der Kollaps größer als an

anderen Stellen sein, wie wir beschrieben haben. Dieses Szenario ist jedoch nicht kongruent mit der Heterogenität des Effektes von U46619 auf die Kapillaren. In den U46619-behandelten Kapillaren koexistierten (innerhalb eines einzelnen Experimentes) Kapillaren mit vermindertem Blutfluss mit anderen, in denen die Perfusion mit Erythrozyten stieg. Wie in Abbildung 22 zu sehen ist, waren komplett geschlossene Kapillaren mit offenen, perfundierten Kapillaren direkt verbunden. Diese Ergebnisse beweisen, dass die Konstriktion der Kapillaren in den U46619-behandelten Tieren auf aktive Konstriktion der Kapillaren zurückzuführen ist.

Wir konnten eine signifikante lineare Korrelation zwischen der Veränderung im Durchmesser und der Veränderung im Blutfluss feststellen. Der Korrelationswert fiel mit $r=0,38$ (Erythrozytengeschwindigkeit) und $r=0,49$ (Erythrozytenflussrate) für beide Faktoren schwach aus. Dies kann dadurch erklärt werden, dass auch hier der Effekt von U46619 in einem bestimmten Gefäß Wirkung auf andere Segmente des Netzwerkes hat. Aus diesem Grund, und zusammen mit der inhärenten Variabilität des kapillären Blutflusses, unterliegen diese Werte möglicherweise einer Abschwächung der tatsächlichen Korrelation und weisen auf einen kausalen Zusammenhang zwischen Veränderungen des kapillären Durchmessers und der Verminderung des Blutflusses hin.

Ähnlich wie in akuten Hirnschnitten haben wir beobachtet, dass die Konstriktion auf U46619 *in vivo* auch präferenziell in der Nähe von Perizytenkörpern geschah. Wir haben eine signifikant größere Konstriktion an den Zellkörpern der Perizyten als zwischen den Perizytenkörpern messen können. Zusammen weisen diese Ergebnisse darauf hin, dass Perizyten auch im lebendigen, mit Blut perfundierten kortikalen Gewebe den Durchmesser von Kapillaren verändern und so den kapillären Blutfluss wirksam modulieren können.

Rheologische Mechanismen der Minderperfusion durch kapilläre Konstriktion

Die rheologischen Bestimmungen in den Kapillaren führen zur Annahme, dass kleine Verminderungen des Durchmessers einen großen Effekt auf den Blutfluss haben könnten. Die Rheologie im Kapillarbett ist dadurch gekennzeichnet, dass das Blut sich nicht wie eine newton'sche Flüssigkeit verhält. Die zellulären Bestandteile des Blutes (vor allem die Erythrozyten) und das Plasma fließen inhomogen. Es treten Interaktionen zwischen der Kapillarwand, dem Plasma und den Blutzellen auf, die den Fluss bestimmen. Die Scheinviskosität des Blutes (gemessen als die Geschwindigkeit, mit dem Blut unter einem bestimmten Druck durch eine Kapillare avanciert) verhält sich *in vitro* bei Durchmessern bis zu

7µm indirekt proportional zu dem Durchmesser, ab 7µm kehrt sich das Verhältnis um und die Scheinviskosität steigt. Dieser Effekt ist seit mehr als 70 Jahren bekannt und wurde nach ihren Entdeckern als Fåhræus-Lindqvist-Effekt benannt [103]. Als Erklärung hierfür gilt, dass sich die Erythrozyten bei kleinem Durchmesser zunehmend in der Mitte der Kapillare einordnen und von einer schnellen Plasmaschicht umhüllt werden, die ihr Gleiten ermöglicht. Wenn der Durchmesser der Kapillare sich aber der Größe eines Erythrozyten nähert, können die Erythrozyten nicht mehr den Platz im Zentrum der Kapillare besetzen und die schnelle Plasmaschicht bildet sich nicht aus. Pries et al. leiteten, in einer Metaanalyse verschiedener *in vitro* Ergebnisse, aus den empirischen Daten die Kurve der Beziehung zwischen Durchmesser und Scheinviskosität her [104]. Es ergibt sich *in vitro* ein Minimum der Scheinviskosität für Durchmesser zwischen 6 und 7 µm; darunter steigt die Kurve der Viskosität exponentiell und es zeigt sich, dass bei Kapillardurchmessern um die 5 µm kleine Veränderungen des Durchmessers zu großen Veränderungen der Scheinviskosität führen. *In vivo* tritt der Fåhræus-Lindqvist-Effekt schon bei kleineren Kapillaren ein, weil der Glycocalyx der Endothelzellen eine zähflüssige Schicht aus Proteoglycanen bildet, die das Lumen der Kapillaren effektiv um 1 bis 2 µm verringert [105-107]. Es ist auch bekannt, dass die Wahrscheinlichkeit des Eintritts von Erythrozyten in die Kapillaren stark mit der Impedanz an den Aufzweigungen korreliert [108]. Wir haben *in vitro* und *in vivo* Veränderungen des Durchmessers an den Aufzweigungen beobachtet, die funktionell zu einem solchen Öffnen und Schließen der Kapillaren und damit zur Veränderung des Erythrozytenflusses führen könnten, im Sinne der funktionellen Kapillaren-Rekrutierung. Die leichten Veränderungen im Kapillardurchmesser, die wir nach der Behandlung mit U46619 beobachtet haben, scheinen deswegen mit dem von uns beobachteten dramatischen Effekt von U46619 auf den Erythrozytenfluss vereinbar zu sein.

Relevanz der TXA₂-induzierten perizytären Konstriktion für pathologische Szenarien

TXA₂ vermittelt die Konstriktion von Arteriolen nach Aktivierung von Purkinje-Zellen in zerebellären Hirnschnitten, und könnte deswegen als ein Mediator der neurovaskulären Kopplung betrachtet werden [109]; jedoch ist die Beteiligung von TXA₂ bei der vaskulären Pathologie und Inflammation prominent [110]. Es ist bekannt, dass während Ischämie –sowie während der *transient ischemic attac* und intrazerebralen Blutung– TXA₂ aus aktivierten Thrombozyten freigesetzt wird [111]. Acetylsalicylsäure, welches die Produktion von TXA₂ durch Hemmung der Zyklooxygenase-1 in den Thrombozyten bewirkt, hat einen kleinen aber signifikanten Effekt auf den langfristigen Ausgang des Infarktes [112]. *In vitro* Experimente

legen nahe, dass im Parenchym des ZNS unter pathologischen Bedingungen TXA₂ durch aktivierte Mikroglia und nicht durch Astrozyten produziert wird [113]. Die Beteiligung von einwandernden Leukozyten an der Produktion von TXA₂ ist ebenfalls wahrscheinlich [114]. Nach ZNS-Trauma steigt die Konzentration von Abbauprodukten von TXA₂ im Liquor und im Urin [115]. Diese Ergebnisse legen nahe, dass TXA₂ ein wichtiger Mediator der pathophysiologischen Kaskade nach zerebraler Ischämie sein könnte. Die ausgedehnte Reaktion der Kapillaren im akuten Hirnschnitt zu U46619 suggeriert eine Implikation der Kapillaren im hämostatischen Mechanismus, der auf eine Beschränkung der Extravasation von Blutkomponenten abzielen könnte. Es kann spekuliert werden, dass Perizyten somit selektiv das Schließen von beschädigten Kapillaren im ZNS hervorrufen, um der Bildung des vasogenen Ödems in pathologischen Szenarien entgegenzuwirken.

Im Verlauf der experimentellen Ischämie kommt es nach erfolgter Reperfusion zu einer Hyperperfusion, die nach einiger Zeit in eine Hypoperfusion mündet. Diese zweiphasige Antwort wurde von Hossmann beschrieben und ist seither in verschiedenen Tiermodellen der globalen und fokalen Ischämie beobachtet worden [116,117]. Die Dauer und das Ausmaß der Hypoperfusion sind von der Schwere der Ischämie abhängig [118]. Auch in einem Modell von permanenter fokaler Ischämie in Ratten konnte eine verzögerte Hypoperfusion gezeigt werden, die möglicherweise zur Progression des Schadens beiträgt [119]. Dieses „no-reflow“ Phänomen konnte durch Inhibition der TXA₂ Rezeptors gemildert werden [120]. In der Klinik konnte dieses Phänomen nach der Reperfusion mit *tissue plasminogen activator* (tPA) eintreten und zum Teil für eine klinische Irresponsivität auf die Behandlung verantwortlich sein [121].

Als Grund der späten Hypoperfusion steht in erster Linie ein erhöhter Tonus der Arteriolen [117], aber eine Obstruktion des Flusses in den Kapillaren ist ebenfalls möglich. Es sind strukturelle Veränderungen der Kapillaren nachgewiesen worden, die für eine Verkleinerung des Lumens aufkommen könnten. Dazu zählen das Ödem der Endothelzellen, die Formation von endothelialen microvilli oder das Ödem der perivaskulären Endfüße der Astrozyten [122-124]. Die Obstruktion der Kapillaren durch adhärierende Leukozyten nach Reperfusion ist postuliert worden, obwohl dieses Phänomen eher an den postkapillären Venolen lokalisiert zu sein scheint und in vivo nicht beobachtet werden konnte [125-127]. Fibrin-Ablagerungen könnten ebenfalls zur Verhinderungen des Flusses führen [128]. Hauck et al. fanden nach 15-minütiger globaler Ischämie und einer Stunde Reperfusion eine signifikante Reduktion des kapillären Durchmessers von ungefähr 1 µm, die zu einer Reduktion der Flussgeschwindigkeit bis zum Stopp der

erythrozytären Perfusion führte, und ebenfalls zu einer Zunahme der Variabilität der Geschwindigkeit führte [129]. Bei der Untersuchung von *Hirnabgüssen* nach globaler Ischämie und Reperfusion sind Konstriktionen in den Kapillaren gefunden worden, die in unmittelbarer Nähe von Perizyten geschahen, so dass den Autoren neben strukturellen Veränderungen des Kapillarbets auch eine funktionelle Konstriktion derselben möglich erschien [81].

Es gibt zudem eine Arbeit, die jüngst eine Beteiligung von Perizyten an dem “no-reflow” Phänomen nach zerebraler Ischämie beschrieben hat [130]. Diese Arbeit beschreibt *ex vivo* mittels immunhistologischen Färbungen von Perizyten die Abnahme des Durchmessers von Kapillaren nach experimenteller transientscher Ischämie, und *in vivo* die Minderperfusion von Kapillaren während der Reperfusion des ischämischen Gewebes. Für diesen Effekt wurde der oxidativer Stress verantwortlich gemacht. Dennoch ist diese Arbeit mit dem Verweis auf methodologischen Schwächen kritisiert worden, und es bleibt kontrovers, ob die Kontraktion von Perizyten tatsächlich zur Verhinderung des Blutflusses nach zerebraler Ischämie führt [131].

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass Kapillaren *in vivo* auf das potente TXA₂-Analogon U46619 mit Konstriktionen reagieren, die mit einer Abnahme der Flussparameter einzelner Kapillaren einhergehen. Diese Ergebnisse suggerieren, dass aktive kapilläre Konstriktionen für zerebrale pathophysiologische Zustände eine Rolle spielen könnten, die mit parenchymalem Schaden, Inflammation und Störung der vaskulären Funktion auftreten.

4.3 Rolle der Perizyten bei der funktionellen Hyperämie

Bisherige Hinweise der Beteiligung von Kapillaren an der neurovaskulären Kopplung *in vivo*

Die Geschichte um das Konzept der Kontraktilität von Perizyten in den Kapillaren wurde in der Einleitung angerissen und soll hier nicht wiederholt werden. Im nächsten Absatz möchten wir die Hinweise für die Beteiligung von Perizyten an der funktionellen Hyperämie diskutieren, die sich in der Literatur gesammelt haben.

Die funktionelle kapilläre Rekrutierung (das heißt die Erhöhung des Blutflusses in Kapillaren, die unter basalen Umständen weniger Blut führen), ist bei direkter Hirnstimulation untersucht worden. Vogel und Kuschinsky zeigten eine Homogenisierung der Plasma-Perfusion in Abhängigkeit von der Frequenz des Stimulus im *whisker barrel*-Kortex [132]. Schulte et al. konnten, mittels intravitalem mikroskopischen Aufzeichnungen von fluoreszenz-markierten Erythrozyten, ebenfalls einen Anstieg der Zahl der perfundierenden Erythrozyten von 110%

gegenüber dem Ruhezustand zusammen mit einem 30%-Anstieg des momentanen Hämatokrits in der Kapillare messen [133]. Matsuura et al. haben eine Blutflussmodulation mit Laser-Doppler Flussmessung 0,5 Sekunden nach der direkten Stimulation des somatosensorischen Kortex messen können [134]. Es ergaben sich die gleichen Latenzzeiten für die Volumen- und Geschwindigkeits-Antwort; dies führte bei den Autoren zu der Schlussfolgerung, dass die Antwort der Arteriolen und die der Kapillaren gleichzeitig geschieht – da die Volumenantwort, wenn die Laser-Doppler Probe keine großen Gefäße miteinbezieht, am ehesten als kapilläre Rekrutierung zu interpretieren ist. Barfod et al. untersuchten ebenfalls die Geschwindigkeitsantwort und die Volumenantwort auf direkte Stimulation des somatosensorischen Kortex und beschrieben ebenfalls eine kurze Latenzzeit zwischen Stimulus und Blutflussantwort, die auf eine lokale Regulierung hindeuten könnte [135]. Geschwindigkeit und Volumen stiegen simultan an, aber nach Abklingen des Stimulus fiel die Geschwindigkeit schneller ab als das Volumen der passierenden Erythrozyten. Die Abhängigkeit von der Frequenz der direkten Hirnstimulation war auch unterschiedlich: gegenüber 20 Hz erhöhte sich bei 30 Hz das Volumen – gegenüber 30 Hz erhöhte sich bei 75 Hz die Geschwindigkeit, und das Volumen änderte sich nicht. Diese Ergebnisse unterstützen weiter die Auffassung, dass dem Anstieg der Perfusionsgeschwindigkeit und dem Anstieg des Volumens der perfundierenden Erythrozyten zwei unterschiedliche Mechanismen unterliegen, die unabhängig voneinander eintreten könnten; für den Volumenanstieg könnte die Dilatation von Kapillaren verantwortlich sein.

Der Anstieg der Konzentration von CO₂ im Blut ist ein potenter physiologischer Stimulus für die Erhöhung des zerebralen Blutflusses (obwohl er nicht die neuronale Aktivität zu beeinflussen scheint). In verschiedenen Arbeiten konnte demonstriert werden, dass Hyperkapnie zur Vasodilatation auf der Ebene der Kapillaren führt. Atkinson et al. konnten bei der Katze *ex vivo* einen Anstieg von ungefähr 7,5 auf 10 µm während Hyperkapnie messen [72]. Duelli und Kuschinsky konnten bei der Ratte ebenfalls *ex vivo* einen Anstieg von ungefähr 5 auf 6 µm zeigen [73]. Diese Gruppen interpretierten ihre Ergebnisse als eine passive, elastische Dilatation der Kapillaren aufgrund des steigenden Perfusionsdrucks unter Hyperkapnie. Die Untersuchung von perfusions-fixiertem Gewebe kann aber Perfusionsartefakte nicht ausschließen. *In vivo* Untersuchungen von Villringer et al. ermittelten einen kleineren Anstieg des kapillären Durchmessers von ungefähr 0,25 µm unter leichter Hyperkapnie [136]. Keyeux et al. untersuchten die Blutflussantwort und das zerebrale Blutvolumen, Plasmavolumen und Erythrozyten-Volumen mittels Isotop-Markierung [137]. Während schwerer Hyperkapnie fanden

sie eine Erhöhung des Blutflusses, die mit einem leichten (9%) Anstieg des kapillären Blutvolumens einherging. Mittels Zwei-Photonen-Mikroskopie konnte nach milder Hyperkapnie ebenfalls ein Anstieg des kapillären Volumens um durchschnittlich ~15% festgestellt werden [75]. Dabei trugen die im Ruhezustand kleinsten Kapillaren mehr als die größeren zum Volumenanstieg bei.

Unsere Experimente mit CSD haben ebenfalls gezeigt, dass Kapillaren bei großen und langandauernden hyperämischen Stimuli aufgrund einer inhärenten Compliance und des erhöhten Perfusionsdrucks passiv dilatieren können. Die oben genannten hyperämischen Ansätze (anhaltende funktionelle Stimulation, Hyperkapnie) könnten deswegen ein ähnliches Phänomen darstellen. Die Homogenisierung des Blutflusses in den Kapillaren unter solchen Bedingungen ist am ehesten durch passive Mechanismen aufgrund des nicht-newtonschen rheologischen Verhaltens des Blutes in den Kapillaren zu erklären [138].

Einen weiteren methodologischen Ansatz, um Blutflussveränderungen im Gehirn zu erkunden ist die Messung des Intrinsischen Optischen Signals (IOS). Diese Methode beruht auf der Erkundung der optischen Reflektionseigenschaften des Hirngewebes; durch die Analyse verschiedener Wellenlängen lassen sich Aussagen über die Konzentrationen vom gesamten sowie oxygeniertem und deoxygeniertem Hämoglobin (oxy- und deoxy-Hb) im Gewebe mit einer hohen zeitlichen Auflösung machen. Ein Anstieg des Gesamthämoglobins lässt sich als eine Volumen-Antwort deuten, der Anstieg des Oxyhämoglobins –ein Korrelat des Hauptanteils des *blood oxygenation level dependent* (BOLD)-Signals– lässt sich mit dem Anstieg des Blutflusses interpretieren, der durch die arteriolare Dilatation erfolgt. Bei der funktionellen Stimulation gibt es typischerweise eine Latenzzeit von einer Sekunde zwischen Stimulus und Anstieg des Oxyhämoglobins. Malonek et al. erkannten mittels IOS einen Anstieg des deoxy-Hb nach funktioneller neuronaler Stimulation, das dem Anstieg des oxy-Hb vorausging. Da gleichzeitig zum deoxy-Hb Anstieg kein paralleler Abfall des oxy-Hb zu erkennen war, spekulierten die Autoren mit der Möglichkeit eines Volumenanstiegs in den Kapillaren noch vor der Dilatation der Arteriolen und dem oxy-Hb-Anstieg. Die Autoren konnten dies einzig durch aktive Dilatation der Kapillaren vor der Reaktion der Arteriolen erklären [139]. Weitere Arbeiten von der Gruppe um Boas haben die frühe Deoxygenierung nach funktioneller Stimulation ebenfalls detektieren können. Dabei wurde ein Abfall des deoxy-Hb gemessen, so dass die Annahme eines *sinks* in den Kapillaren abgelehnt wurde [140]. Arbeiten von Sheth et al. haben gezeigt, dass die Veränderungen des optischen Signals (sei es die Konzentration von

Oxyhämoglobin, sei es die totale Hämoglobin-Konzentration) umso enger mit den Orten der elektrischen Stimulation zusammenfallen, je früher sie nach der Stimulation gemessen werden [23,141]. Diese Autoren haben zweidimensionale Spektroskopie benutzt, um den räumlichen und zeitlichen Verlauf der Antwort zu charakterisieren. Sie stellten fest, dass der Anstieg des totalen und oxygenierten Hämoglobins sich in späteren Zeitpunkten stromauf- und abwärts fortsetzt, indem Arteriolen und Venolen sich an den Veränderungen beteiligen. Die engere räumliche Kopplung der frühen Antwort im Parenchym ließ die Autoren vermuten, dass es eine initiale Beteiligung der Kapillaren geben könnte. Unsere Ergebnisse bringen die Schlussfolgerung nahe, dass die Dilatation der präkapillären Arteriolen für die kolumnare Spezifität der Antwort in den ersten Sekunden nach Stimulation verantwortlich sein könnte.

Chaigneau et al. untersuchten mittels Zwei-Photonen Mikroskopie die Antwort einzelner Kapillaren einzelner olfaktorischer Glomeruli, die spezifisch auf unterschiedliche Gerüche reagieren [89]. Kapillaren in Glomeruli, die nicht einzeln von unterschiedlichen Arteriolen versorgt werden, wiesen trotzdem unterschiedliche Reaktionen zu unterschiedlichen Stimuli auf. Dies leitete die Autoren dazu, einen Regulationsmechanismus des Blutflusses auf kapillärer Ebene anzunehmen, um Glomerulus-spezifische Blutflussantworten zu erklären. Diese Annahme beruhte auf einer geringen Zahl von Beobachtungen. In einer Nachfolge-Veröffentlichung aus denselben Laboratorien wurde gezeigt, dass die Blutflussantwort nicht spezifisch einzelne Glomeruli betrifft, sondern immer kleine Ensembles benachbarter Glomeruli [142]. Es scheint also, dass auch in diesem Kontext die Annahme von aktiver kapillärer Regulation nicht mehr notwendig ist.

Die Volumen-Antwort unterschiedlicher Abschnitte der zerebralen kortikalen Vaskulatur auf funktionelle Stimulation ist mittels Zwei-Photonen Mikroskopie ermittelt worden [76]. Die Autoren benutzten einen 1-minütigen funktionellen Stimulus, um die hyperämische Reaktion während eines *steady state* abzubilden, da die Abtastung größerer Gewebelumina zeitaufwändig ist. Neben dem zu erwartenden Anstiegs der Erythrozytengeschwindigkeit, Homogenisierung des Erythrozytenflusses und Minderung der Durchgangszeit fanden sie eine Erhöhung des kapillären Volumens um ca. 10%, die für ca. 20% des gesamten Volumenanstiegs des Blutes während der Stimulation verantwortlich sein könnte. Es konnte in dieser Arbeit bestimmt werden, dass kleinere Gefäße (<10 µm Durchmesser) mehr zu der Volumenantwort beitragen als größere. Da die Autoren keine Perizyten abbilden konnten und die Durchmesserunterschiede nicht in Abhängigkeit von der Präsenz der Perizyten erhoben wurden,

konnte in dieser Studie kein Hinweis für oder gegen die aktive Beteiligung der Perizyten an der Dilatation gewonnen werden. Angesichts der längeren Stimulationszeiten, die in dieser Studie angewandt wurden, kann man eine passive Dilatation der Kapillaren nicht ausschließen.

Die bisher stärksten Hinweise für eine aktive Beteiligung der Kapillaren an der neurovaskulären Kopplung kamen aus einer *ex vivo* Arbeit, in der gezeigt wurde, dass Perizyten in Netzhaut-Präparaten oder akuten zerebellären Hirnschnitten mit Dilatationen und Konstriktionen nach der Gabe von unterschiedlichen Neurotransmittern reagieren [70]. So konstringierten 25% der Kapillaren in der Retina auf ATP und 50 % auf Noradrenalin (NA) im Zerebellum. Der exzitatorische Neurotransmitter Glutamat konnte die NA-induzierten Konstriktionen aufheben. Elektrische Stimulation der Inneren Plexiformen Schicht der Retina oder GABA-Inhibition konstringierten ebenfalls eine Fraktion der Perizyten. Direkte elektrische Stimulation der Perizyten führte in nahezu alle Fällen zu Konstriktionen der Gefäße. In dieser Studie wurden Gefäße mittels Infrarot-Videomikroskopie abgebildet, und Kapillaren wurden als Gefäße ohne eine durchgängige Schicht glatter Muskelzellen und kleiner als 11 μm Durchmesser identifiziert. Die muralen Zellen in diesen Gefäßen wurden als Perizyten identifiziert.

Die oben geschilderte *in vitro* Ergebnisse von Peppiatt et al. scheinen in Widerspruch zu unserem negativen Befund zu stehen, da wir keine Beteiligung der Kapillaren bei der funktionellen Hyperämie haben feststellen können. Für dieses unterschiedliche Ergebnis mag der Umstand verantwortlich sein, dass wir im Allgemeinen kleinere Gefäße ($\sim 6 \mu\text{m}$ maximales Durchmesser) untersucht haben. Es scheint denkbar, dass die Fraktion der Gefäße in der Studie von Peppiatt et al., die auf die Applikation von Neurotransmittern reagiert haben, den präkapillären Arteriolen in unserer Studie entsprechen. Es ist unmöglich, eine klare Demarkationslinie zwischen Perizyten in den kleinsten Kapillaren und glatten Muskelzellen in Arteriolen zu ziehen. Dennoch sind unterschiedliche kontraktile Phänotypen von diesen Zellen, je nach ihrer Position im Gefäßbaum, durchaus denkbar. Die Geschwindigkeit und Stärke der kontraktilen Reaktion könnte von der Menge an kontraktilen Proteinen in den muralen Zellen abhängig sein, und diese nimmt in Richtung Kapillaren stark ab. Anders als in der Arbeit von Peppiatt et al. haben wir die Gefäße funktionell und topologisch charakterisiert. Die präkapillären Arteriolen haben durchschnittlich einen nur leicht größeren Durchmesser als Kapillaren gezeigt, ihre Durchflussgeschwindigkeit war aber wesentlich höher. Diese Geschwindigkeit ist untypisch für Gefäße, in denen der Austausch von Gasen und Metaboliten geschieht [143]. Aufgrund dieser Charakterisierung kommen wir zu dem Ergebnis, dass eine

Beteiligung der Perizyten bei der funktionellen Hyperämie in unserem Modell kein generelles Merkmal von terminalen Kapillaren ist.

Mikroinfusion von Bicucullin als Modell der funktionellen Hyperämie

Das Phänomen der funktionellen Hyperämie stellt einen räumlich und zeitlich begrenzten Anstieg des zerebralen Blutflusses während neuronaler Aktivität dar. Gängige Modelle, um funktionelle Hyperämie in der Maus oder in der Ratte zu erforschen, sind die pneumatische Stimulation der Barthaare oder die elektrische Stimulation der Vorderpfote und die Messung des Blutflusses in den dazugehörigen somatosensorischen kortikalen Arealen. Wir haben versucht, beide Modelle für unseren Zweck zu benutzen. Wir waren in der Lage, funktionelle Blutflussanstiege in beiden Modellen auszulösen, die mittels Laser Speckle Durchflussmessung detektiert wurden; ebenfalls konnten wir die Dilatation von Arteriolen mittels zwei-Photonen Mikroskopie ermitteln. Jedoch waren die Antworten stets variabel und im Verlauf des Experimentes nicht immer reproduzierbar. Da wir vorhatten, die Antwort von unterschiedlichen vaskulären Segmenten in langwierigen Sequenzen zu überprüfen, konnten wir die unzuverlässigen Blutflussantworten bei Barthaar- oder Vorderpfotenstimulation nicht für unsere Fragestellung mit Aussicht auf Erfolg benutzen.

Hinzu kommt noch, dass in diesem Stimulationsparadigma typischerweise zeitlich ausgedehnte Stimuli notwendig waren (ca. 30 s), um detektierbare vaskuläre Antworten auszulösen. Je länger die Stimulation dauert, desto größere Arteriolen werden rekrutiert. Die Dilatation von Arteriolen könnte die aktive Dilatation von Perizyten maskieren, da diese unter Umständen schwer von der passiven, elastischen Dehnung der Kapillaren zu unterscheiden ist. Wir haben spekuliert, dass, wenn die kapilläre Dilatation einen signifikanten Beitrag zur funktionellen Hyperämie leisten würde, sich dieser in einer frühzeitigen Beteiligung an der vaskulären Dilatation (eher als die Arteriolen) zeigen müsste. Für unsere Zwecke würde sich deswegen am besten ein Modell der funktionellen Hyperämie eignen, in dem zeitlich limitierte Stimuli zu robusten, reproduzierbaren Antworten führen würden.

Bicucullin ist ein kompetitiver Antagonist von GABA_A Rezeptoren. In kortikalen Neuronen führt GABA durch die Bindung an GABA_A-Rezeptoren zum Einfluss von Chlorid-Ionen in die Zelle und somit zur Hyperpolarisation des Neurons. Da es im kortikalen Gewebe eine tonische Freisetzung von GABA durch inhibitorische Interneurone gibt, führt die Inhibition von GABA_A

Rezeptoren zur neuronalen Depolarisation und senkt die Schwelle des Aktionspotentials. In unserem Modell bewirkt die Insertion einer mit 10 mM Bicucullin gefüllten Mikropipette die spontane Diffusion des Bicucullins in das Hirnparenchym, und dies wiederum führt zur Entstehung eines epileptogenen Fokus. Kurz nach der Einführung der Pipette entstehen salvenartige neuronale Aktionspotentiale, die im lokalen Feldpotential erfassbar sind. Solche kommen mit einer Frequenz von ca. 0,2–0,3 Hz auf, dauern ca. 100 ms, und werden von einer Hyperpolarisation gefolgt. Die kurze Dauer der neuronalen Aktivierung stellt optimale Bedingungen für die Untersuchung subtiler Blutflussveränderungen dar. Dieser Versuchsaufbau bietet deswegen ein geeignetes Modell für die Erfassung der perizytären Komponente der funktionellen Hyperämie.

Trotz dieser Voraussetzungen haben wir keine Dilatation von Kapillaren (gemessen an den perizytären Körper) feststellen können, während größere Gefäße (piale, penetrierende und präkapilläre Arteriolen) mit Dilatationen reagiert haben. Diese Ergebnisse zeigen, dass Perizyten in den Kapillaren des zerebralen Kortex der Maus nicht bedeutend zur Dilatation bei der funktionellen Hyperämie beitragen.

Eine Limitation unseres Modells der funktionellen Hyperämie ist sicherlich, dass wir keine physiologische neuronale Stimulation benutzt haben, um eine Reaktion der Gefäße auszulösen. Es gibt Hinweise, die auf eine Mediation GABAerger Interneurone bei der funktionellen Hyperämie hindeuten, und Bicucullin könnte potenziell diese Mediation unterbrochen haben. *Ex vivo* beeinflusst GABA den Tonus kortikaler Gefäße [144], und *in vivo* vermittelt GABA die Hyperämie aufgrund der Stimulation des cholinergen Nucleus basalis [145]. Jedoch ist eine Beteiligung von GABA an der funktionellen Hyperämie *in vivo* bisher nicht eindeutig gezeigt worden. Die GABAerge Inhibition besitzt keinen Effekt auf den zellebellären Blutfluss, weder basal noch während der funktionellen Stimulation [146,147]. Jedoch konstringieren zellebelläre Perizyten auf GABA [70]. Bei GABAerger Inhibition durch Bicucullin konnten wir unter gleichen Bedingungen wie oben die funktionelle Dilatation von präkapillären Arteriolen feststellen, die direkt der nicht reagierenden Kapillaren vorgeschaltet waren. Damit Bicucullin die Dilatation von Kapillaren selektiv inhibiert haben könnte, müsste GABA auf kapillärer Ebene der einzige regulatorische Mechanismus sein. Dies wäre bei einer prominenten Beteiligung von Perizyten in Kapillaren ein sehr unwahrscheinliches Szenario. Aus diesem Grund halten wir es für unwahrscheinlich, dass die Inhibition GABAerger Signalwege das spezifische Fehlen einer funktionellen Dilatation von Perizyten erklären kann.

Unser negatives Ergebnis stimmt mit Daten einer anderen Studie überein, bei der mittels Zwei-Photonen Mikroskopie Ca^{2+} in Astrozyten durch Photolyse eines Ca^{2+} -bindenden Moleküls freigesetzt wurde. Wie bereits in der Einleitung diskutiert, ist der Ca^{2+} -Anstieg in den perivaskulären Astrozyten ein wichtiger Mediator der funktionellen Hyperämie. Die Freisetzung von Ca^{2+} aus Astrozyten führte zur Dilatation benachbarter Gefäße. Die Kapillaren dilatierten bei entsprechender Stimulation von perikapillären Astrozyten nicht [86].

Relevanz der Ergebnisse für die Blutfluss-basierende bildgebende Verfahren

Die Blutfluss-basierenden Bildgebenden Verfahren haben, vor allem seit der Verwendung des fMRI, den Einblick in die kognitiven Prozesse des Menschen ermöglicht gemacht und sind in der Anwendung weit verbreitet [148]. Abgesehen von anderen technischen Limitationen dieser Verfahren, bleibt es für eine korrekte Interpretation der Daten wichtig, die Beziehung zwischen der neuronalen Aktivität und dem funktionellen Blutflussanstieg zu kennen. Dies beinhaltet viele Aspekte, die schon in der Einleitung angerissen worden sind. Ein solcher Aspekt ist die Frage, an welchen Stellen im vaskulären Netzwerk die Blutflussantwort aktiv gesteuert wird [149]. Die topologische und geometrische Lokalisation dieser Stellen diktiert die Präzision der Blutflussantworten auf neuronale Aktivität. Da die Kapillaren in menschlichen Gehirn durchschnittlich ca. 50 μm voneinander getrennt sind, beträgt diese Zahl die hypothetische äußerste Grenze der Auflösung der Blutfluss-basierenden bildgebenden Verfahren [148]. Die Messung der positiven Phase des BOLD-Signals hat schon eine Auflösung von 500 μm im Menschen und 200 μm im Tierexperiment erreicht [150]. Durch technischen Verbesserungen, wie z.B. eine größere Stärke der Magnetfelder [150], könnten die bildgebenden Verfahren bald die hypothetische Grenze von 50 μm erreichen, und somit potentiell Blutflussveränderungen in einzelnen Kapillaren erfassen.

Unsere Ergebnisse suggerieren, dass die Kapillaren, in den der Austausch von Gas und Metaboliten stattfindet, nicht zur funktionellen Hyperämie im Sinne einer aktiver Dilatation beitragen. Präkapilläre Arteriolen bleiben die kleinsten Gefäße, die als Antwort zu einer Erhöhung der neuronalen Aktivität mit Dilatation reagieren, und diktiert damit die größtmögliche Auflösung der Blutflussantwort. Es ist unter Umständen nicht gegeben, dass die präkapillären Strukturen mit den funktionellen Einheiten im ZNS (etwa Laminae im Kortex) korrelieren. Eine genaue Kenntnis der Disposition von präkapillären Arteriolen im neuronalen Gewebe des Menschen scheint erforderlich zu sein, um diese biologische Grenze zu erfassen und

die Ausbreitung der neuronalen Aktivität korrekt aus den Blutfluss-basierenden Karten zu ermitteln.

4.3 Reaktion der Perizyten auf zerebraler Ischämie

Die robuste kontraktile Reaktion von Perizyten auf den TXA₂-Analogon U46619, ein Mediator von Inflammation und Hämostase, weist darauf hin, dass die Funktion von Perizyten in pathologischen Szenarien relevant sein könnte. Wir haben mittels immunohistologischen Färbungen die Reaktion von Perizyten in einem Schlaganfallmodell in der Maus und in humanem Gewebe nach Schlaganfall charakterisiert. Dabei ist herausgekommen, dass a) Perizyten akut nach dem Schlaganfall sterben, und b) murale Zellen im Infarktkern proliferieren und zur Generierung vom Narbengewebe beitragen.

Sterben von Perizyten nach Schlaganfall

Unsere Ergebnisse zeigen, dass Perizyten in Kapillaren nach einem Schlaganfall akut dezimiert werden. Der Verlust von Perizyten schien der Degeneration von Gefäßen vorausgehen. Es ist gezeigt worden, dass die Viabilität von Perizyten während Hypoxie und im Kontakt mit reaktiven Sauerstoffspezies kompromittiert ist [151,152]. ATP, das nach Infarkt von nekrotischen Zellen ausgeschüttet wird, könnte zur Apoptosis von Perizyten durch die Aktivierung von purinergischen P2X₇ Rezeptoren führen [153]. Weitere Ergebnisse aus unserem Labor zeigten, dass ein Tag nach zerebraler Ischämie die Translokation von NF- κ B zum Nukleus von Perizyten erhöht ist [154], was ebenfalls zur Apoptosis von Perizyten führen kann [155].

Es ist bisher unbekannt, welche Auswirkung der Verlust von Perizyten auf die Schadenskaskade nach zerebraler Ischämie hat. Es ist denkbar, dass die Abwesenheit von Perizyten zur Fehlregulation und Kompromittierung der Blut-Hirn-Schranke führen könnte, wie es in transgenen Mausmodellen mit defizitärer Abdeckung der Kapillaren durch Perizyten gezeigt worden ist [43]. Perizyten sind ebenfalls durch die Ausschüttung von Wachstumsfaktoren an der Stabilisierung der Gefäße beteiligt [156]. Zellulärer Stress der Perizyten nach Ischämie könnte auch Auswirkung auf ihren kontraktilen Tonus haben, und die Reperfusion von Kapillaren trotz der Öffnung der nährenden Arterien nach Ischämie erschweren [130]. Daraus folgt, dass therapeutische Interventionen, die das Überleben von Perizyten fördern, eine positive Wirkung auf den Verlauf des Schlaganfalls haben könnten.

Proliferation von stromalen Zellen und Generierung von Narbengewebe

Unsere Ergebnisse suggerieren, dass im Infarktkern eine bisher unbekannte PDGFR β ⁺CD105⁺ Zellpopulation aus PDGFR β , CD13, RGS5 exprimierenden Zellen in größeren Gefäßen entsteht und einen zellulärer Hauptbestandteil des Narbengewebes innerhalb der astrogliotischen Narbe darstellt. Die Vorläufer der PDGFR β ⁺CD105⁺ Zellen sind wahrscheinlich identisch mit den PDGFR β ⁺CD13⁺ „Typ A“ Perizyten, die zur Narbenbildung bei experimentellen Läsionen des Rückenmarks beitragen [45]. In vielen Organen sind multipotente MSCs als Perizyten oder murale Zellen identifiziert worden [47,157,158]. PDGFR β ⁺CD105⁺ Zellen bildeten ein dichtes Netzwerk aus fibrillärer ECM, die im Infarktkern ca. eine Woche nach der Läsion besteht. Sie waren ebenfalls räumlich und zeitlich mit der Infiltration von Iba-1⁺ Makrophagen assoziiert, die die Fibrose durch die Ausschüttung von Interleukinen und Wachstumsfaktoren wie PDGF and TGF- β fördern [159]. Obwohl die Narbenbildung im Allgemeinen die Funktion der betroffenen Organe beeinträchtigt, ist die Auswirkung von Fibrose auf die Regeneration von neuronalem Gewebe wenig bekannt. Im defektem ZNS könnten Fibroblasten durch die Expression von semaphorin3 das Wachstum von Axonen inhibieren [160], und Astrozyten durch ephrin-B2/EphB2 Signale segregieren [161]. Insofern könnten die PDGFR β ⁺CD105⁺ stromalen Zellen zu einem zellulären und molekularen Milieu im Infarktgebiet beitragen, in denen die Regeneration von neuronalen Strukturen verhindert ist. Weitere Arbeit mit transgenen Tiermodellen, in den die Expression von Genen in stromalen Zellen experimentell modulierbar ist, wird zukünftig die Frage nach der Funktion und Auswirkung von stromalen Zellen auf die pathophysiologische Kaskade nach Läsionen des ZNS klären, und ihr Potenzial als therapeutische Zielsetzung überprüfen.

5. Bibliographie

- [1] Kety S. The general metabolism of the brain in vivo. London: Pergamon Press; 1957.
- [2] Rolfe D, Brown G. Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. *Physiol Rev* 1997;77:731–58.
- [3] Sokoloff L, Field J, Magoun H, Hall V. The metabolism of the central nervous system in vivo. 1960.
- [4] Attwell D, Laughlin SB. An energy budget for signaling in the grey matter of the brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 2001;21:1133–45.
- [5] Hossmann K. Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia. *Ann Neurol* 1994;36:557–65.
- [6] Aiello L, Wheeler P. The expensive tissue hypothesis: the brain and the digestive system in human and primate evolution. *Curr Anthropol* 1995;36:199–221.
- [7] Quaegebeur A, Lange C, Carmeliet P. The neurovascular link in health and disease: molecular mechanisms and therapeutic implications. *Neuron* 2011;71:406–24.
- [8] Harper S, Bohlen H, Rubin M. Arterial and microvascular contributions to cerebral cortical autoregulation in rats. *Am J Physiol* 1984;246:H17–24.
- [9] Attwell D, Iadecola C. The neural basis of functional brain imaging signals. *Trends Neurosci* 2002;25:621–5.
- [10] Petzold GC, Murthy VN. Role of astrocytes in neurovascular coupling. *Neuron* 2011;71:782–97.
- [11] Lauritzen M. Reading vascular changes in brain imaging: is dendritic calcium the key? *Nat Rev Neurosci* 2005;6:77–85.
- [12] Drake C, Iadecola C. The role of neuronal signaling in controlling cerebral blood flow. *Brain and Language* 2007;102:141–52.
- [13] Hamel E. Perivascular nerves and the regulation of cerebrovascular tone. *J Appl Physiol* 2006;100:1059–64.
- [14] Raichle M. Behind the scenes of functional brain imaging: A historical and physiological perspective. *Proc Natl Acad Sci* 1998;95:765–72.
- [15] Lauritzen M. Relationship of spikes, synaptic activity, and local changes of cerebral blood flow. *J Cereb Blood Flow Metab* 2001;21:1367–83.
- [16] Iadecola C. The overlap between neurodegenerative and vascular factors in the pathogenesis of dementia. *Acta Neuropathologica* 2010;120:287–96.
- [17] Schaffer C, Friedman B, Nishimura N, Schroeder L, Tsai P, Ebner F, Lyden P, Kleinfeld D. Two-photon imaging of cortical surface microvessels reveals a robust redistribution in blood flow after vascular occlusion. *PLoS Biol* 2006;4:e22.
- [18] Nishimura N, Schaffer C, Friedman B, Lyden P, Kleinfeld D. Penetrating arterioles are a bottleneck in the perfusion of neocortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:365–70.
- [19] Woolsey T, Rovainen C, Cox S, Henegar M, Liang G, Liu D, Moskalenko Y, Sui J, Wei L. Neuronal units linked to microvascular modules in cerebral cortex: response elements for imaging the brain. *Cereb Cortex* 1996;6:647–60.
- [20] Faraci F, Heistad D. Regulation of large cerebral arteries and cerebral microvascular pressure. *Circ Res* 1990;66:8–17.
- [21] Kontos H, Wei E, Navari R, Lévassieur J, Rosenblum W, Patterson J. Responses of cerebral arteries and arterioles to acute hypotension and hypertension. *Am J Physiol* 1978;234:H371–83.
- [22] Mchedlishvili G, Mitagvaria N, Ormotsadze L. Vascular mechanisms controlling a

- constant blood supply to the brain (“autoregulation”). *Stroke* 1973;4:742–50.
- [23] Sheth S, Nemoto M, Guiou M, Walker M, Pouratian N, Hageman N, Toga A. Columnar specificity of microvascular oxygenation and volume responses: implications for functional brain mapping. *J Neurosci* 2004;24:634–41.
- [24] Erinjeri J, Woolsey T. Spatial integration of vascular changes with neural activity in mouse cortex. *J Cereb Blood Flow Metab* 2002;22:353–60.
- [25] Hirano Y, Stefanovic B, Silva AC. Spatiotemporal evolution of the functional magnetic resonance imaging response to ultrashort stimuli. *J Neurosci* 2011;31:1440–7.
- [26] Abbott N, Ronnback L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci* 2006;7:41–53.
- [27] Debono L. La médecine en Russie de 1801 à 1917. Faculté de Medecine de Besançon, 1997.
- [28] Rouget C. Memoire sur le developpement, la structure et les propriétés physiologiques des capillaires sanguins et lymphatiques. *Arch Phys Normale Pahol* 1873;5:603–61.
- [29] Krogh A. The anatomy and physiology of capillaries. 1924.
- [30] Sims D. The pericyte--a review. *Tissue Cell* 1986;18:153–74.
- [31] Eberth C. Handbuch der Lehre von den Geweben des Menschen und der Thiere, 1871.
- [32] Zimmermann K. Der feinere Bau der Blutkapillaren. *A Anat Entwicklungsgesch* 1923;68:29–109.
- [33] Shepro D, Morel N. Pericyte physiology. *Faseb J* 1993;7:1031–8.
- [34] Williamson J, Tilton R, Kilo C Y. Immunofluorescent imaging of capillaries and pericytes in human skeletal muscle and retina. *Microvasc Res* 1980;20:233–41.
- [35] Nisancioglu MH, Mahoney WM, Kimmel DD, Schwartz SM, Betsholtz C, Genové G. Generation and characterization of rgs5 mutant mice. *Mol. Cell. Biol.* 2008;28:2324–31.
- [36] Armulik A, Genové G, Betsholtz C. Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises. *Developmental Cell* 2011;21:193–215.
- [37] Herman I, D'Amore P. Microvascular pericytes contain muscle and nonmuscle actins. *J Cell Biol* 1985;101:43–52.
- [38] Joyce N, Haire M, Palade G. Contractile proteins in pericytes. I. Immunoperoxidase localization of tropomyosin. *J Cell Biol* 1985;100:1379–86.
- [39] Joyce N, Haire M, Palade G. Contractile proteins in pericytes. II. Immunocytochemical evidence for the presence of two isomyosins in graded concentrations. *J Cell Biol* 1985;100:1387–95.
- [40] Courtoy P, Boyles J. Fibronectin in the microvasculature: localizatiion in the pericyte-endothelial interstitium. *J Ultrastruct Res* 1983;83:258–73.
- [41] Daneman R, Zhou L, Kebede AA, Barres BA. Pericytes are required for blood-brain barrier integrity during embryogenesis. *Nature* 2010;468:562–6.
- [42] Bell RD, Winkler EA, Sagare AP, Singh I, Larue B, Deane R, Zlokovic BV. Pericytes control key neurovascular functions and neuronal phenotype in the adult brain and during brain aging. *Neuron* 2010;68:409–27.
- [43] Armulik A, Genové G, Mäe M, Nisancioglu MH, Wallgard E, Niaudet C, He L, Norlin J, Lindblom P, Strittmatter K, Johansson BR, Betsholtz C. Pericytes regulate the blood-brain barrier. *Nature* 2010;468:557–61.
- [44] Gaengel K, Genové G, Armulik A, Betsholtz C. Endothelial-mural cell signaling in vascular development and angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009;29:630–8.
- [45] Göritz C, Dias DO, Tomilin N, Barbacid M, Shupliakov O, Frisén J. A pericyte origin

- of spinal cord scar tissue. *Science* 2011;333:238–42.
- [46] Etchevers H, Vincent C, Le Douarin N, Couly G. The cephalic neural crest provides pericytes and smooth muscle cells to all blood vessels of the face and forebrain. *Development* 2001;128:1059–68.
- [47] Crisan M, Yap S, Casteilla L, Chen C, Corselli M, Park T, Andriolo G, Sun B, Zheng B, Zhang L, Norotte C, Teng P, Traas J, Schugar R, Deasy B, Badylak S, Buhring H, Jacobino J, Lazzari L, Huard J, Peault B. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell* 2008;3:301–13.
- [48] Rajantie I, Ilmonen M, Alminaitte A, Ozerdem U, Alitalo K, Salven P. Adult bone marrow-derived cells recruited during angiogenesis comprise precursors for periendothelial vascular mural cells. *Blood* 2004;104:2084–6.
- [49] Ozerdem U. Contribution of Bone Marrow-Derived Pericyte Precursor Cells to Corneal Vasculogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46:3502–6.
- [50] Kokovay E, Li L, Cunningham LA. Angiogenic recruitment of pericytes from bone marrow after stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 2006;26:545–55.
- [51] Piquer-Gil M, García-Verdugo JM, Zipancic I, Sánchez MJ, Alvarez-Dolado M. Cell fusion contributes to pericyte formation after stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 2009;29:480–5.
- [52] Moransard M, Dann A, Staszewski O, Fontana A, Prinz M, Suter T. NG2 expressed by macrophages and oligodendrocyte precursor cells is dispensable in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain* 2011;134:1315–30.
- [53] Galimi F, Summers RG, van Praag H, Verma IM, Gage FH. A role for bone marrow-derived cells in the vasculature of noninjured CNS. *Blood* 2005;105:2400–2.
- [54] Priller J, Flugel A, Wehner T, Boentert M, Haas CA, Prinz M, Fernandez-Klett F, Prass K, Bechmann I, de Boer BA, Frotscher M, Kreutzberg GW, Persons DA, Dirnagl U. Targeting gene-modified hematopoietic cells to the central nervous system: use of green fluorescent protein uncovers microglial engraftment. *Nat Med* 2001;7:1356–61.
- [55] Bechmann I, Priller J, Kovac A, Bontert M, Wehner T, Klett FF, Bohsung J, Stuschke M, Dirnagl U, Nitsch R. Immune surveillance of mouse brain perivascular spaces by blood-borne macrophages. *Eur J Neurosci* 2001;14:1651–8.
- [56] Priller J, Persons DA, Klett FF, Kempermann G, Kreutzberg GW, Dirnagl U. Neogenesis of cerebellar Purkinje neurons from gene-marked bone marrow cells in vivo. *J Cell Biol* 2001;155:733–8.
- [57] Gitlin J, D'Amore P. Culture of retinal capillary cells using selective growth media. *Microvasc Res* 1983;26:74–80.
- [58] Kelley C, D'Amore P, Hechtman H, Shepro D. Vasoactive hormones and cAMP affect pericyte contraction and stress fibres in vitro. *J Muscle Res Cell Motil*. 1988;9:184–94.
- [59] Chakravarthy U, Gardiner T, Anderson P, Archer T, Trimble E. The effect of endothelin 1 on the retinal microvascular pericyte. *Microvasc Res* 1992;43:241–54.
- [60] Haefliger I, Zschauer A, Anderson D. Relaxation of retinal pericyte contractile tone through the nitric oxide cyclic-guanosine monophosphate pathway. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994;35:991–7.
- [61] Zschauer A, Davis E, Anderson D. Glaucoma, capillaries and pericytes. 4. Beta-adrenergic activation of cultured retinal pericytes. *Ophthalmologica* 1996;210:276–9.
- [62] Matsugi T, Chen Q, Anderson DR. Adenosine-induced relaxation of cultured bovine retinal pericytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997;38:2695–701.
- [63] Dodge A, Hechtman H, Shepro D. Microvascular endothelial-derived autacoids regulate pericyte contractility. *Cell Motil Cytoskeleton* 1991;18:180–8.
- [64] Helbig H, Kornacker S, Berweck S, Stahl F, Lepple-Wienhues A, Wiederholt M. Membrane potentials in retinal capillary pericytes: excitability and effect of vasoactive

- substances. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1992;33:2105–12.
- [65] Wu DM, Kawamura H, Sakagami K, Kobayashi M, Puro DG. Cholinergic regulation of pericyte-containing retinal microvessels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;284:H2083–90.
- [66] Kawamura H, Sugiyama T, Wu DM, Kobayashi M, Yamanishi S, Katsumura K, Puro DG. ATP: a vasoactive signal in the pericyte-containing microvasculature of the rat retina. *The Journal of Physiology* 2009;551:787–99.
- [67] Kawamura H, Kobayashi M, Li Q, Yamanishi S, Katsumura K, Minami M, Wu D, Puro D. Effects of angiotensin II on the pericyte-containing microvasculature of the rat retina. *J Physiol* 2004;561:671–83.
- [68] Wu DM, MINAMI M, Kawamura H, Puro DG. Electrotonic Transmission Within Pericyte-Containing Retinal Microvessels. *Microcirculation* 2006;13:353–63.
- [69] Schonfelder U, Hofer A, Paul M, Funk R. In situ observation of living pericytes in rat retinal capillaries. *Microvasc Res* 1998;56:22–9.
- [70] Peppiatt CM, Howarth C, Mobbs P, Attwell D. Bidirectional control of CNS capillary diameter by pericytes. *Nature* 2006;443:700–4.
- [71] Rodriguez-Baeza A, Reina-De La Torre F, Ortega-Sanchez M, Sahuquillo-Barris J. Perivascular structures in corrosion casts of the human central nervous system: a confocal laser and scanning electron microscope study. *Anat Rec* 1998;252:176–84.
- [72] Atkinson J, Anderson R, Sundt T. The effect of carbon dioxide on the diameter of brain capillaries. *Brain Res* 1990;517:333–40.
- [73] Duelli R, Kuschinsky W. Changes in brain capillary diameter during hypocapnia and hypercapnia. *J Cereb Blood Flow Metab* 1993;13:1025–8.
- [74] Mchedlishvili G, Varazashvili M, Mamaladze A, Momtselidze N. Blood flow structuring and its alterations in capillaries of the cerebral cortex. *Microvasc Res* 1997;53:201–10.
- [75] Hutchinson E, Stefanovic B, Koretsky A, Silva A. Spatial flow-volume dissociation of the cerebral microcirculatory response to mild hypercapnia. *Neuroimage* 2006;32:520–30.
- [76] Stefanovic B, Hutchinson E, Yakovleva V, Schram V, Russell J, Belluscio L, Koretsky A, Silva A. Functional reactivity of cerebral capillaries. *J Cereb Blood Flow Metab* 2008;28:961–72.
- [77] Anderson B, Anderson W. Scanning electron microscopy of microcorrosion casts; intracranial and abdominal microvasculature in domestic animals. *Am J Anat* 1978;153:523–36.
- [78] Nakai K, Imai H, Kamei I, Itakura T, Komari N, Kimura H, Nagai T, Maeda T. Microangioarchitecture of rat parietal cortex with special reference to vascular “sphincters.” Scanning electron microscopic and dark field microscopic study. *Stroke* 1981;12:653–9.
- [79] Nakai K, Naka Y, Yokote H, Ikatura T, Imai H, Komai N, Maeda T. Vascular “sphincter” and microangioarchitecture in the central nervous system: constriction of intraparenchymal blood vessels following a treatment of vasoconstrictive neurotransmitter. *Scanning Microsc* 1989;3:337–41.
- [80] Sbarbati A, Pietra C, Baldassarri A, Guerrini U, Ziviani L, Reggiani A, Boicelli A, Osculati F. The microvascular system in ischemic cortical lesions. *Acta Neuropathol (Berl)* 1996;92:56–63.
- [81] Takahashi A, Park HK, Melgar MA, Alcocer L, Pinto J, Lenzi T, Diaz FG, Rafols JA. Cerebral cortex blood flow and vascular smooth muscle contractility in a rat model of ischemia: a correlative laser Doppler flowmetric and scanning electron microscopic study. *Acta Neuropathol* 1997;93:354–68.

- [82] Reina-De La Torre F, Rodriguez-Baeza A, Sahuquillo-Barris J. Morphological characteristics and distribution pattern of the arterial vessels in human cerebral cortex: a scanning electron microscope study. *Anat Rec* 1998;251:87–96.
- [83] Harrison R, Harel N, Panesar J, Mount R. Blood capillary distribution correlates with hemodynamic-based functional imaging in cerebral cortex. *Cereb Cortex* 2002;12:225–33.
- [84] Mathiisen T, Lehre K, Danbolt N, Ottersen O. The perivascular astroglial sheath provides a complete covering of the brain microvessels: an electron microscopic 3D reconstruction. *Glia* 2010;58:1094–103.
- [85] Petzold GC, Albeanu DF, Sato TF, Murthy VN. Coupling of neural activity to blood flow in olfactory glomeruli is mediated by astrocytic pathways. *Neuron* 2008;58:897–910.
- [86] Takano T, Tian G-F, Peng W, Lou N, Libionka W, Han X, Nedergaard M. Astrocyte-mediated control of cerebral blood flow. *Nature Publishing Group* 2005;9:260–7.
- [87] Denk W, Strickler J, Webb W. Two photon microscopy. *Science* 1990;248:73–6.
- [88] Kleinfeld D, Mitra P, Helmchen F, Denk W. Fluctuations and stimulus-induced changes in blood flow observed in individual capillaries in layers 2 through 4 of rat neocortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:15741–6.
- [89] Chaigneau E, Oheim M, Audinat E, Charpak S. Two-photon imaging of capillary blood flow in olfactory bulb glomeruli. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:13081–6.
- [90] Okabe M, Ikawa M, Kominami K, Nakanishi T, Nishimune Y. “Green mice” as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett* 1997;407:313–9.
- [91] Hirase H, Creso J, Buzsaki G. Capillary level imaging of local cerebral blood flow in bicuculline-induced epileptic foci. *Neuroscience* 2004;128:209–16.
- [92] Denk W, Svoboda K. Photon upmanship: why multiphoton imaging is more than a gimmick. *Neuron* 1997;18:351–7.
- [93] Alliot F, Rutin J, Leenen P, Pessac B. Pericytes and periendothelial cells of brain parenchyma vessels co-express aminopeptidase N, aminopeptidase A, and nestin. *J Neurosci Res* 1999;58:367–78.
- [94] Fabian SL, Penchev RR, St-Jacques B, Rao AN, Sipilä P, West KA, McMahon AP, Humphreys BD. Hedgehog-Gli Pathway Activation during Kidney Fibrosis. *Am J Pathol* 2012;180:1441–53.
- [95] López-Novoa JM, Bernabeu C. The physiological role of endoglin in the cardiovascular system. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010;299:H959–74.
- [96] Prasain N, Stevens T. The actin cytoskeleton in endothelial cell phenotypes. *Microvasc Res* 2009;77:53–63.
- [97] Kelley C, D'Amore P, Hechtman H, Shepro D. Microvascular pericyte contractility in vitro: comparison with other cells of the vascular wall. *J Cell Biol* 1987;104:483–90.
- [98] Winn H, Rubio R, Berne R. Brain adenosine production in the rat during 60 seconds of ischemia. *Circ Res* 1979;45:486–92.
- [99] Rehncrona S, Rosen I, Siesjo B. Brain lactic acidosis and ischemic cell damage: 1. Biochemistry and neurophysiology. *J Cereb Blood Flow Metab* 1981;1:297–311.
- [100] Greenberg R, Helfaer M, Kirsch J, Traystman R. Effect of nitric oxide synthase inhibition on postischemic cerebral hyperemia. *Am J Physiol* 1995;269:H341–7.
- [101] Pinard E, Engrand N, Seylaz J. Dynamic cerebral microcirculatory changes in transient forebrain ischemia in rats: involvement of type I nitric oxide synthase. *J Cereb Blood Flow Metab* 2000;20:1648–58.
- [102] Nishimura N, Schaffer CB, Friedman B, Tsai PS, Lyden PD, Kleinfeld D. Targeted insult to subsurface cortical blood vessels using ultrashort laser pulses: three models of stroke. *Nat Methods* 2006;3:99–108.

- [103] Fahraeus R, Lindqvist T. The viscosity of the blood in narrow capillary tubes. *Am J Physiol* 1932;96.
- [104] Pries A, Neuhaus D, Gaehtgens P. Blood viscosity in tube flow: dependence on diameter and hematocrit. *Am J Physiol* 1992;263:H1770–8.
- [105] Vink H, Duling B. Identification of distinct luminal domains for macromolecules, erythrocytes, and leukocytes within mammalian capillaries. *Circ Res* 1996;79:581–9.
- [106] Pries AR, Secomb TW, Gessner T, Sperandio MB, Gross JF, Gaehtgens P. Resistance to blood flow in microvessels in vivo. 1994;75:904–15.
- [107] Pries AR, Secomb TW, Jacobs H, Sperandio M, Osterloh K, Gaehtgens P. Microvascular blood flow resistance: role of endothelial surface layer. 1997;273:H2272–9.
- [108] Pries A, Ley K, Claassen M, Gaehtgens P. Red cell distribution at microvascular bifurcations. *Microvasc Res* 1989;38:81–101.
- [109] Cauli B, Tong X, Rancillac A, Serluca N, Lambolez B, Rossier J, Hamel E. Cortical GABA interneurons in neurovascular coupling: relays for subcortical vasoactive pathways. *J Neurosci* 2004;24:8940–9.
- [110] Ogletree M. Overview of physiological and pathophysiological effects of thromboxane A₂. *Fed Proc* 1987;46:133–8.
- [111] Koudstaal P, Ciabattini G, van Gijn J, Nieuwenhuis H, de Groot P, Sixma J, Patrono C. Increased thromboxane biosynthesis in patients with acute cerebral ischemia. *Stroke* 1993;24:219–23.
- [112] Sandercock P, Gubitz G, Foley P, Counsell C. Antiplatelet therapy for acute ischaemic stroke. *Cochrane Database Syst Rev* 2003:CD000029.
- [113] Giulian D, Corpuz M, Richmond B, Wendt E, Hall E. Activated microglia are the principal glial source of thromboxane in the central nervous system. *Neurochem Int* 1996;29:65–76.
- [114] Higgs G, Moncada S, Salmon J, Seager K. The source of thromboxane and prostaglandins in experimental inflammation. *Br J Pharmacol* 1983;79:863–8.
- [115] Westcott J, Murphy R, Stenmark K. Eicosanoids in human ventricular cerebrospinal fluid following severe brain injury. *Prostaglandins* 1987;34:877–87.
- [116] Hossmann K, Lechtape-Gruter H. Blood flow and recovery of the cat brain after complete ischemia for 1 hour. *Eur Neurol* 1971;6:318–22.
- [117] Hossmann K. Reperfusion of the brain after global ischemia: hemodynamic disturbances. *Shock* 1997;8:95–101; discussion102–3.
- [118] Huang J, Kim L, Poisik A, Pinsky D, Connolly E. Titration of postischemic cerebral hypoperfusion by variation of ischemic severity in a murine model of stroke. *Neurosurgery* 1999;45:328–33.
- [119] Dawson D, Ruetzler C, Hallenbeck J. Temporal impairment of microcirculatory perfusion following focal cerebral ischemia in the spontaneously hypertensive rat. *Brain Res* 1997;749:200–8.
- [120] Itoh Y. Blockade of thromboxane A₂ receptor ameliorates delayed postischemic hypoperfusion of the brain in cats. *Keio J Med* 1994;43:88–93.
- [121] Alexandrov A, Hall C, Labiche L, Wojner A, Grotta J. Ischemic stunning of the brain: early recanalization without immediate clinical improvement in acute ischemic stroke. *Stroke* 2004;35:449–52.
- [122] Paljarvi L, Rehncrona S, Soderfeldt B, Olsson Y, Kalimo H. Brain lactic acidosis and ischemic cell damage: quantitative ultrastructural changes in capillaries of rat cerebral cortex. *Acta Neuropathol (Berl)* 1983;60:232–40.
- [123] Okumura Y, Sakaki T, Hiramatsu K, Tominaga M, Yabuno T. Microvascular changes associated with postischemic hypoperfusion in rats. *Acta Neurochir (Wien)*

- 1997;139:670–6; discussion676–7.
- [124] Melgar M, Rafols J, Gloss D, Diaz F. Postischemic reperfusion: ultrastructural blood-brain barrier and hemodynamic correlative changes in an awake model of transient forebrain ischemia. *Neurosurgery* 2005;56:571–81.
- [125] del Zoppo G, Schmid-Schonbein G, Mori E, Copeland B, Chang C. Polymorphonuclear leukocytes occlude capillaries following middle cerebral artery occlusion and reperfusion in baboons. *Stroke* 1991;22:1276–83.
- [126] Groggaard B, Schurer L, Gerdin B, Arfors K. Delayed hypoperfusion after incomplete forebrain ischemia in the rat. The role of polymorphonuclear leukocytes. *J Cereb Blood Flow Metab* 1989;9:500–5.
- [127] Dirnagl U, Niwa K, Sixt G, Villringer A. Cortical hypoperfusion after global forebrain ischemia in rats is not caused by microvascular leukocyte plugging. *Stroke* 1994;25:1028–38.
- [128] Okada Y, Copeland B, Fitridge R, Koziol J, del Zoppo G. Fibrin contributes to microvascular obstructions and parenchymal changes during early focal cerebral ischemia and reperfusion. *Stroke* 1994;25:1847–53; discussion1853–4.
- [129] Hauck E, Apostel S, Hoffmann J, Heimann A, Kempfski O. Capillary flow and diameter changes during reperfusion after global cerebral ischemia studied by intravital video microscopy. *J Cereb Blood Flow Metab* 2004;24:383–91.
- [130] Yemisci M, GURSOY-OZDEMIR Y, VURAL A, CAN A, TOPALKARA K, DALKARA T. Pericyte contraction induced by oxidative-nitrative stress impairs capillary reflow despite successful opening of an occluded cerebral artery. *Nat Med* 2009;15:1031–7.
- [131] Vates GE, Takano T, Zlokovic B, Nedergaard M. Pericyte constriction after stroke: the jury is still out. *Nat Med* 2010;16:959–9.
- [132] Vogel J, Kuschinsky W. Decreased heterogeneity of capillary plasma flow in the rat whisker-barrel cortex during functional hyperemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 1996;16:1300–6.
- [133] Schulte M, Wood J, Hudetz A. Cortical electrical stimulation alters erythrocyte perfusion pattern in the cerebral capillary network of the rat. *Brain Res* 2003;963:81–92.
- [134] Matsuura T, Fujita H, Seki C, Kashikura K, Kanno I. Hemodynamics evoked by microelectrical direct stimulation in rat somatosensory cortex. *Comp Biochem Physiol a Mol Integr Physiol* 1999;124:47–52.
- [135] Barfod C, Akg oren N, Fabricius M, Dirnagl U, Lauritzen M. Laser-Doppler measurements of concentration and velocity of moving blood cells in rat cerebral circulation. *Acta Physiol Scand* 1997;160:123–32.
- [136] Villringer A, Them A, Lindauer U, Einhaupl K, Dirnagl U. Capillary perfusion of the rat brain cortex. An in vivo confocal microscopy study. *Circ Res* 1994;75:55–62.
- [137] Keyeux A, Ochrymowicz-Bemelmans D, Charlier A. Induced response to hypercapnia in the two-compartment total cerebral blood volume: influence on brain vascular reserve and flow efficiency. *J Cereb Blood Flow Metab* 1995;15:1121–31.
- [138] Vogel J, Waschke K, Kuschinsky W. Flow-independent heterogeneity of brain capillary plasma perfusion after blood exchange with a Newtonian fluid. *Am J Physiol* 1997;272:H1833–7.
- [139] Malonek D, Dirnagl U, Lindauer U, Yamada K, Kanno I, Grinvald A. Vascular imprints of neuronal activity: relationships between the dynamics of cortical blood flow, oxygenation, and volume changes following sensory stimulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:14826–31.
- [140] Devor A, Dunn A, Andermann M, Ulbert I, Boas D, Dale A. Coupling of total hemoglobin concentration, oxygenation, and neural activity in rat somatosensory

- cortex. *Neuron* 2003;39:353–9.
- [141] Sheth S, Nemoto M, Guiou M, Walker M, Toga A. Spatiotemporal evolution of functional hemodynamic changes and their relationship to neuronal activity. *J Cereb Blood Flow Metab* 2005.
- [142] Chaigneau E, Tiret P, Lecoq J, Ducros M, Knöpfel T, Charpak S. The relationship between blood flow and neuronal activity in the rodent olfactory bulb. *J Neurosci* 2007;27:6452–60.
- [143] Rosenblum W. Erythrocyte velocity and a velocity pulse in minute blood vessels on the surface of the mouse brain. *Circ Res* 1969;24:887–92.
- [144] Fergus A, Lee K. GABAergic regulation of cerebral microvascular tone in the rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 1997;17:992–1003.
- [145] Kocharyan A, Fernandes P, Tong X, Vaucher E, Hamel E. Specific subtypes of cortical GABA interneurons contribute to the neurovascular coupling response to basal forebrain stimulation. *J Cereb Blood Flow Metab* 2008;28:221–31.
- [146] Li J, Iadecola C. Nitric oxide and adenosine mediate vasodilation during functional activation in cerebellar cortex. *Neuropharmacology* 1994;33:1453–61.
- [147] Thomsen K, Offenhauser N, Lauritzen M. Principal neuron spiking: neither necessary nor sufficient for cerebral blood flow in rat cerebellum. *J Physiol* 2004;560:181–9.
- [148] Logothetis NK. What we can do and what we cannot do with fMRI. *Nature* 2008;453:869–78.
- [149] Vanzetta I, Grinvald A. Coupling between neuronal activity and microcirculation: implications for functional brain imaging. *Hfsp J* 2008;2:79–98.
- [150] Mangia S, Giove F, Tkác I, Logothetis NK, Henry P-G, Olman CA, Maraviglia B, Di Salle F, Uğurbil K. Metabolic and hemodynamic events after changes in neuronal activity: current hypotheses, theoretical predictions and in vivo NMR experimental findings. *J Cereb Blood Flow Metab* 2009;29:441–63.
- [151] Yu X, Radulescu A, Chen C-L, James IO, Besner GE. Heparin-Binding EGF-Like Growth Factor Protects Pericytes from Injury. *J. Surg. Res.* 2010;172:165–76.
- [152] Shojaee N, Patton WF, Hechtman HB, Shepro D. Myosin translocation in retinal pericytes during free-radical induced apoptosis. *J. Cell. Biochem.* 1999;75:118–29.
- [153] Sugiyama T, Kobayashi M, Kawamura H, Li Q, Puro DG, Kobayashi M. Enhancement of P2X(7)-induced pore formation and apoptosis: an early effect of diabetes on the retinal microvasculature. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:1026–32.
- [154] Fernández-Klett F, Potas JR, Hilpert D, Blazej K, Radke J, Huck J, Engel O, Stenzel W, Genové G, Priller J. Early loss of pericytes and perivascular stromal cell-induced scar formation after stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 2013;33:428–39.
- [155] Geraldès P, Hiraoka-Yamamoto J, Matsumoto M, Clermont A, Leitges M, Marette A, Aiello LP, Kern TS, King GL. Activation of PKC-delta and SHP-1 by hyperglycemia causes vascular cell apoptosis and diabetic retinopathy. *Nat Med* 2009;15:1298–306.
- [156] Carmeliet P, Jain RK. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. *Nature* 2011;473:298–307.
- [157] Kang S-G, Shinjima N, Hossain A, Gumin J, Yong RL, Colman H, Marini F, Andreeff M, Lang FF. Isolation and perivascular localization of mesenchymal stem cells from mouse brain. *Neurosurgery* 2010;67:711–20.
- [158] Paul G, Özen I, Christophersen NS, Reinbothe T, Bengzon J, Visse E, Jansson K, Dannaes K, Henriques-Oliveira C, Roybon L, Anisimov SV, Renström E, Svensson M, Haegerstrand A, Brundin P. The Adult Human Brain Harbors Multipotent Perivascular Mesenchymal Stem Cells. *PLoS ONE* 2012;7:e35577.
- [159] Wynn T. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol* 2008;214:199–210.
- [160] Pasterkamp RJ, De Winter F, Holtmaat AJ, Verhaagen J. Evidence for a role of the

- chemorepellent semaphorin III and its receptor neuropilin-1 in the regeneration of primary olfactory axons. *J. Neurosci.* 1998;18:9962–76.
- [161] Bundesen LQ, Scheel TA, Bregman BS, Kromer LF. Ephrin-B2 and EphB2 regulation of astrocyte-meningeal fibroblast interactions in response to spinal cord lesions in adult rats. *J Neurosci* 2003;23:7789–800.

Anhänge

Eidesstattliche Versicherung	89
Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen	90
Lebenslauf	91
Publikationsliste	92
Danksagung	93

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Francisco Fernández, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: *Rolle der Perizyten in der Modulation des kapillären Blutflusses im zerebralen Kortex der Maus* selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

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

Datum

Unterschrift

Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Francisco Fernández Klett hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1:

Fernández-Klett F, Offenhauser N, Dirnagl U, Priller J, Lindauer U. Pericytes in capillaries are contractile in vivo, but arterioles mediate functional hyperemia in the mouse brain. Proc Natl Acad Sci U S A 2010;107:22290–5.

Beitrag im Einzelnen: Planung und Durchführung der Experimente, Analysis der Daten, Schreiben des Manuskripts.

Publikation 2 :

Fernández-Klett F, Potas JR, Hilpert D, Blazej K, Radke J, Huck J, Engel O, Stenzel W, Genové G, Priller, J. Early loss of pericytes and perivascular stromal cell-induced scar formation after stroke. J Cereb Blood Flow Metab 2013;33:428–39.

Beitrag im Einzelnen: Planung und Durchführung der Experimente, Analysis der Daten, Schreiben des Manuskripts.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

Lebenslauf

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

Publikationsliste

- Fernández-Klett F**, Potas JR, Hilpert D, Blazej K, Radke J, Huck J, Engel O, Stenzel W, Genové G, Priller J. Early loss of pericytes and perivascular stromal cell-induced scar formation after stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 2013;33:428–39.
- Dreier JP, Victorov IV, Petzold GC, Major S, Windmüller O, **Fernández-Klett F**, Kandasamy M, Dirnagl U, Priller J. Electrochemical failure of the brain cortex is more deleterious when it is accompanied by low perfusion. *Stroke*. 2013;44(2):490–6.
- Coquery N, Blesch A, Stroh A, **Fernández-Klett F**, Klein J, Winter C, Priller J. Intrahippocampal transplantation of mesenchymal stromal cells promotes neuroplasticity. *Cytherapy*. 2012;14(9):1041–53
- Pruss H, Dewes M, Derst C, **Fernandez-Klett F**, Veh RW, Priller J. Potassium channel expression in adult murine neural progenitor cells. *Neuroscience*. 2011 Apr 28;180:19–29.
- Fernández-Klett F**, Offenhauser N, Dirnagl U, Priller J, Lindauer U. Pericytes in capillaries are contractile in vivo, but arterioles mediate functional hyperemia in the mouse brain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107:22290–5.
- Wehner T, Böntert M, Eyüpoglu I, Prass K, Prinz M, **Klett FF**, Heinze M, Bechmann I, Nitsch F, Kirchhoff F, Kettenmann H, Dirnagl U, Priller J. Bone marrow-derived cells expressing green fluorescent protein under the control of the glial fibrillary acidic protein promoter do not differentiate into astrocytes in vitro and in vivo. *J Neurosci*. 2003 Jun 15;23(12):5004–11.
- Priller J, Persons DA, **Klett FF**, Kempermann G, Kreutzberg GW, Dirnagl U. Neogenesis of cerebellar Purkinje neurons from gene-marked bone marrow cells in vivo. *J Cell Biol* 2001;155:733–8.
- Priller J, Flugel A, Wehner T, Boentert M, Haas CA, Prinz M, **Fernández-Klett F**, Prass I, Bechmann I, de Boer BA, Frotscher F, Kreutzberg GW, Persons DA, Dirnagl U. Targeting gene-modified hematopoietic cells to the central nervous system: use of green fluorescent protein uncovers microglial engraftment. *Nat Med* 2001;7:1356–61.
- Bechmann I, Priller J, Kovac A, Bontert M, Wehner T, **Klett FF**, Bohsung J, Stuschke M, Dirnagl U, Nitsch R. Immune surveillance of mouse brain perivascular spaces by blood-borne macrophages. *Eur J Neurosci* 2001;14:1651–8.
- Hirata H, Albillos A, **Fernández F**, Medrano J, Jurkiewicz A, García AG. omega-Conotoxins block neurotransmission in the rat vas deferens by binding to different presynaptic sites on the N-type Ca²⁺ channel. *Eur J Pharmacol* 1997;321:217–23.

Danksagung

Ein herzlicher Dank gebührt Herrn Prof. Dr. Josef Priller für die langjährige, vertrauensvolle Zusammenarbeit; für die Möglichkeit, die Promotionsarbeit in dem Labor für Molekulare Psychiatrie der Abteilung für Neuropsychiatrie abzuschließen, sowie die wissenschaftliche Arbeit über die Perizyten dort weiterführen zu können.

Ebenfalls bin ich Prof. Dr. Ute Lindauer und Prof. Dr. Ulrich Dirnagl aus der Abteilung für Experimentelle Neurologie dafür dankbar, dass sie mich mit ihrem frühen Interesse an den Perizyten angesteckt haben. Und auch dafür, dass sie mir die Methoden der physiologischen Präparation der Maus beigebracht haben.

Dr. med. Nikolas Offenhauser bin ich für die fruchtbaren Diskussionen und die tatkräftige, freundschaftliche, optimistische Unterstützung während der Experimente am Zwei-Photonen Mikroskop verpflichtet.

Dr. med. Josefine Radke und Dr. med. Werner Stenzel, Dr. Jozanneke Huck, Dr. Katja Blazej, Dr. Odilo Engel und Dr. Guillem Genové, bin ich für ihre Zusammenarbeit verpflichtet.

Ich bedanke mich ebenfalls bei allen Mitarbeitern des Labors für Molekulare Psychiatrie und der Abteilung für Experimentelle Neurologie der Charité für Ihre Unterstützung während der Entstehung dieser Arbeit.

Meine tiefste Dankbarkeit gebührt meiner Frau Renate Brodowsky und meinen Eltern, denen diese Arbeit gewidmet ist, für ihren unermüdlichen Beistand.

