

Aus der Abteilung für Experimentelle Neurologie
der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Inflammation und ischämischer Gewebsschaden bei
experimentellem Schlaganfall: Rolle von CD93, CD59 und
Mrp8/14**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum medicarum (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Denise Harhausen

aus Lübbecke

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. U. Dirnagl

2. Prof. Dr. med. G. Stoll

3. Prof. Dr. med. D. M. Hermann

Datum der Promotion: 04.02. 2011

Zusammenfassung

In der Pathophysiologie des ischämischen Schlaganfalls spielt die Inflammation eine wesentliche Rolle. Der Prozess der Inflammation setzt relativ zeitnah nach dem akuten Ereignis ein und dauert über mehrere Tage an, wobei sie sowohl an der Entstehung des Schadens als auch an der Regeneration beteiligt ist. Somit bietet die Inflammation einen guten Rahmen für multiple Therapieansätze.

Im Verlauf dieser Arbeit wurden drei unterschiedliche, sich auf die Inflammation auswirkende Proteine im Hinblick auf das funktionelle Endresultat nach zerebraler Ischämie untersucht: 1. **CD59**, das einzige endogene Inhibitorprotein des terminalen Komplement-Aktivierungsweges, 2. **CD93**, ein membrangebundenes Protein, welches in Genexpressionsanalysen gefunden worden war und dessen genaue Funktion noch nicht bekannt ist, und 3., die „Myeloid related Proteine“ 8 (**Mrp8**) und **Mrp14**, welche als endogene Toll-like Rezeptor 4 (TLR4) Agonisten beschrieben werden.

„Knockout“ (KO) Mäuse, bei denen diese Proteine (CD59, CD93-, und Mrp8/14-KO) nicht exprimiert werden, wurden in einem experimentellen Modell der fokalen zerebralen Ischämie untersucht. Das entstandene Läsionsvolumen der jeweiligen KO-Mäuse wurde mit dem Läsionsvolumen der Wildtyp-Mäuse verglichen. Zusätzlich wurde die Anzahl der CD11b-positiven Zellen (infiltrierende Monozyten/Makrophagen, aktivierte Mikrogliazellen) in der ischämischen Hemisphäre der verschiedenen Genotypen verglichen, da dies ein Maß für die Neuroinflammation darstellt. Um die Lokalisation des in seiner genauen Funktion noch unbekanntem inflammationsassoziierten CD93-Proteins zu ermitteln, wurden immunhistochemische Färbungen mit spezifischen Zellmarkern durchgeführt. Mittels einer Genexpressionsanalyse sollten CD93-abhängige Signalwege ermittelt werden.

In der ersten Studie, der Untersuchung von CD59a-KO Mäusen, konnte gezeigt werden, dass das Komplement-Inhibitorprotein neuroprotektiv nach zerebraler Ischämie wirkt. Die CD59a-KO Mäuse weisen sowohl ein größeres Läsionsvolumen als auch ein größeres neurologisches Defizit nach 30min Okklusion auf. Auch in den CD93-KO Tieren konnte ein größeres Läsionsvolumen im Vergleich zu den WT Tieren festgestellt werden. Das lässt vermuten, dass auch das Protein CD93, welches mit Endothelzellen kolokalisiert ist, neuroprotektive Eigenschaften nach zerebraler Ischämie besitzt. Die Genexpressionsanalyse ergab, dass das Chemokin CCL21, ein bekannter Trigger der Neuroinflammation, in den CD93-defizienten Mäusen erhöht exprimiert wird. Diese erhöhte Expression könnte der Grund für den größeren Schaden in den CD93-KO Tieren sein und zeigt damit einen neuen CD93-abhängigen Signalweg auf. Anhand der dritten Studie konnte gezeigt werden, dass das Fehlen der endogenen TLR4-Aktivatoren Mrp8 und-14 zu einem verkleinerten Läsionsvolumen und zu einer Verminderung der CD11b-positiven Zellen führt. Somit wird postuliert, dass Mrp8/14 die Aktivierung der Neuroinflammation verstärkt und dadurch zu einem schlechteren funktionellen Endresultat führt.

Die von uns erhobenen Befunde könnten nach weiteren Studien, z.B. zum Zusammenspiel dieser Proteine, eine Grundlage für die Entwicklung neuer Therapieansätze im Bereich der Neuroinflammation nach zerebraler Ischämie darstellen.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Zielstellung	3
3. Methoden	4
Tierstämme	4
Okklusion der mittleren zerebralen Arterie	4
Neurologischer Score	4
Analyse des Infarktvolumens	5
Genchip Analysen	5
PCR	5
Immunhistochemie	5
Konfokale Mikroskopie	5
Western Blot	5
TUNEL Assay	6
Statistik	6
4. Ergebnisse	6
Untersuchung des Proteins CD59 nach zerebraler Ischämie	6
Untersuchung des Proteins CD93 nach zerebraler Ischämie	7
Untersuchung von Mrp8/14 KO-Mäusen nach zerebraler Ischämie	8
5. Diskussion	9
6. Literaturverzeichnis	13
Anhang	
Anteilsklärung	17
Publikation 1	18
Publikation 2	19
Publikation 3	20
Erklärung	21
Danksagung	22
Lebenslauf	23
Publikationsliste	24

Abkürzungen

GFAP	glia filament acidic Protein
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
IBA1	ionized calcium-binding adaptor molecule 1
IL	Interleukin
KO	Knockout
MAC	Membrane Attack Complex
MCAO	Middle cerebral artery occlusion
Mrp	Myeloid related protein
NeuN	Neuron-specific Nuclear Protein
PCR	Polymerase Chain Reaktion
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor- α
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick-End-Labeling
WT	Wildtyp

1. Einleitung

Zerebrale Ischämie ist weltweit die zweithäufigste Todesursache nach kardiovaskulären Erkrankungen [1]. Ein häufiger Auslöser eines Schlaganfalls ist ein thrombotischer oder thromboembolischer Verschluss eines hirnversorgenden Gefäßes. Die sich daraus ergebende Reduktion des zerebralen Blutflusses führt zu einer Hypoxie und dem Verlust der ATP-Reserven in dem durch das Gefäß versorgten Hirnareal. Diese Ereignisse aktivieren sekundäre Schadenskaskaden und resultieren in Gewebsschaden [2]. Der zerebralen Ischämie folgt innerhalb von Minuten bis zu mehreren Tagen eine Kaskade zellulärer und molekularer Mechanismen (siehe Abb.1), welche letztendlich die Entwicklung ischämischer Gewebsschädigung fördern [3]. Eine bedeutende Rolle spielen inflammatorische Prozesse, die bereits wenige Stunden nach dem akuten Ereignis eintreten und bis zu mehreren Tagen andauern. Die Inflammation bietet für die Patientenversorgung einen guten zeitlichen Rahmen, um therapeutisch auf den Gewebsschaden nach der zerebralen Ischämie einwirken zu können.

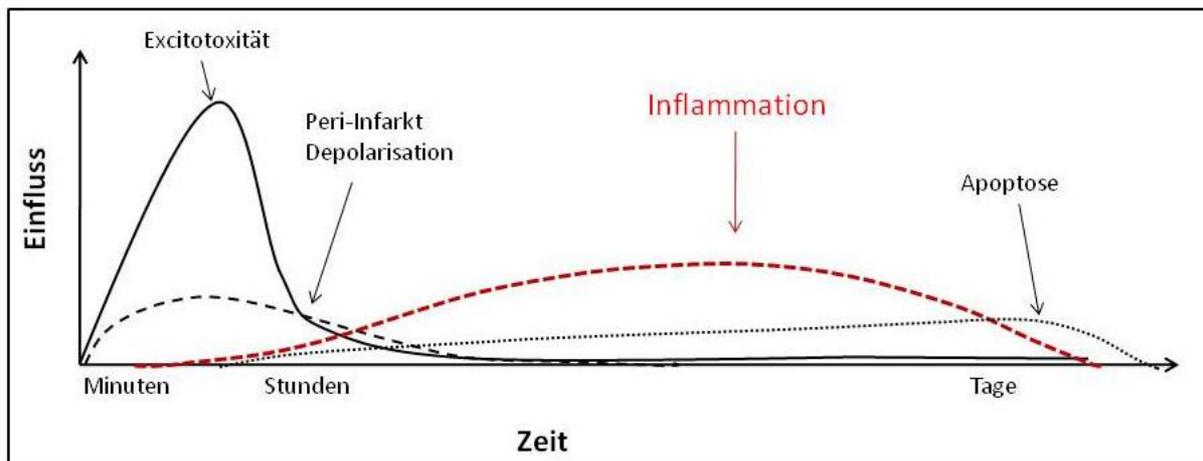


Abbildung 1: Intrazerebrale Reaktionskaskaden nach Verringerung des Blutflusses. (modifiziert nach Dirnagl et al. 1999)

Das Komplementsystem ist Teil des angeborenen Immunsystems und ein Aktivator der Inflammation. Im ersten Teil dieser Arbeit soll das Komplement-Regulatorprotein **CD59**, auch Protektin genannt, untersucht werden. CD59 ist das einzige Protein, das den terminalen Komplementweg hemmt [4]. Es verhindert die Bindung des Komplementfaktors C9 an den Komplementkomplex C5b-8, sodass C5b-9, der „Membran Attack Complex“ (MAC), nicht gebildet werden kann und die Lyse der Zellen verhindert wird [5]. Alle 3 Komplement-Aktivierungswege (klassischer, alternativer und MBL-Signalweg) können bis zu diesem Schritt ungehemmt ablaufen [4]. CD59 ist mittels Glycosylphosphatidylinositol (GPI) in der Zellmembran verankert und wird ausschließlich auf Zellen exprimiert, die in Kontakt mit dem Komplementsystem stehen. Hierzu gehören auch Zellen des zentralen Nervensystems [6]. Wir wurden in unserem Ansatz bestärkt, dieses Protein als ersten Teil dieser Arbeit zu untersuchen, da CD59 bereits in anderen tierexperimentellen Modellen neuroprotektive Eigenschaften aufgewiesen hat [5]. Im Rahmen einer Kollaboration wurde an ischämischen Gehirngewebe der Maus zu verschiedenen Zeitpunkten nach Okklusion eine „Whole Genome Genexpressionsanalyse“ durchgeführt. Wir beobachteten eine starke Induktion des

noch weitestgehend unbekanntes Gen **CD93**. Erste Publikationen zeigten, dass CD93 ein Rezeptor des klassischen Komplementsignalweges ist [7; 8; 9]. Die genaue Funktion dieses schweren O-glykosylierten Typ I transmembranen Proteins ist bisher noch unklar. Die Struktur dieses Proteins ähnelt dem des antikoagulatorischen Thrombomodulins [10], welches die Endothelzell-Funktion in der Inflammation reguliert [11]. Beide Proteine, CD93 und Thrombomodulin, weisen denselben Ursprung auf [12]. CD93 wird auf einer Reihe von verschiedenen Zellen exprimiert, wie Thrombozyten, Monozyten, Mikroglia und Endothelzellen [7; 13; 14]. Erst kürzlich hergestellte CD93-KO Mäuse ermöglichen die funktionelle Untersuchung dieses Proteins, die den zweiten Teil dieser Arbeit umfasst.

Weitere, nach dem Schlaganfall induzierte Gene, die bei dem „Whole Genome“-Projekt ermittelt wurden, sind **Mrp8** und **Mrp14**. Das „Myeloid related Protein“ 8 (Mrp8) und Mrp14 wurden als endogene Toll-like Rezeptor-4 (TLR4) Agonisten charakterisiert [15]. Die TLR-Kaskade ist eine weitere zentrale Aktivierungskaskade des angeborenen Immunsystems und somit auch maßgeblich an der Aktivierung und Ausschüttung proinflammatorischer Mediatoren, wie z.B. Zytokinen, beteiligt. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass TLR2 und TLR4 durch Aktivierung apoptotischer Signalwege und Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine [16-19] zur Vergrößerung des Gewebsschadens nach zerebraler Ischämie beitragen. Die Untersuchung der Bedeutung der endogenen TLR4-Agonisten bei der zerebralen Ischämie stellt den dritten Teil dieser Arbeit dar.

2. Zielstellung

In dieser Arbeit sollte die Auswirkungen verschiedener, inflammatorisch wirksamer Mediatoren auf den zerebralen Schaden nach Ischämie untersucht werden.

1. Ziel: Durch Verwendung einer genetisch modifizierten **CD59-Knockout (KO) Maus** sollte untersucht werden, ob das Fehlen des Komplementinhibitors einen Einfluss auf den zerebralen Schaden und das neuronale Defizit nach zerebraler Ischämie hat.

Daraus ergibt sich folgende Hypothese: Das Fehlen des Komplementinhibitors führt zu ungehinderter Zellyse nach Komplementaktivierung und somit zu einer Vergrößerung des zerebralen Gewebsschadens. Dies wirkt sich negativ auf das neuronale Defizit nach zerebraler Ischämie aus.

2. Ziel: Analyse des noch weitestgehend unbekanntem Proteins **CD93** auf dessen Funktion und Auswirkung nach der zerebralen Ischämie.

1. Analyse der Expression von CD93 im zerebral ischämischen Gewebe
2. Untersuchung der **CD93-defizienten Maus** nach zerebraler Ischämie in Hinblick auf die Läsionsgröße und die Auswirkungen auf die inflammatorische Antwort.
3. Untersuchung von CD93-abhängigen Signalwegen mittels Genexpressionsanalysen von CD93-defizienten Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen.

Erste Studien beschrieben CD93 als Rezeptor des klassischen Komplementweges. Daraus ergibt sich die Hypothese, dass das Fehlen von CD93 zu einer verminderten Aktivierung des klassischen Komplementweges führt und dies wiederum zu einer Verringerung des ischämischen Schadens .

3. Ziel: Untersuchung der im Schlaganfall-Modell noch nicht analysierten TLR4 Agonisten- **Mrp8/Mrp14** auf deren Funktion im zerebralen Gewebe und deren Auswirkungen auf den Gewebsschaden. Hierzu wurden **Mrp8/Mrp14 Knockout-Mäuse** verwendet.

Daraus ergibt sich folgende Hypothese: Eine verringerte Aktivierung des TLR4-Signalweges führt zu einer Verminderung des zerebralen Schadens nach Ischämie.

3. Methoden

Tierstämme

Für die Versuche wurden folgende Mäusestämme verwendet:

Bezeichnung	Bezugsquelle
Wildtyp (WT) (C57Bl6)	Charles River
CD93-knockout	Marina Botto; London [7]
CD59a-knockout	Paul B. Morgan; [20]
Mrp8 und 14 –knockout	Wolfgang Nacken; Münster [21].
Mrp8 und 14 -WT	Wolfgang Nacken; Münster [21].

Alle verwendeten Mäuse waren zwischen 8 und 12 Wochen alt und hatten ein Gewicht zwischen 23-28g.

Okklusion der Mittleren Zerebralen Arterie (MCAO)

Die Okklusion der mittleren zerebralen Arterie (MCA) (Middle cerebral artery occlusion (MCAO)) wurde durch Einführen eines 12mm langen mit silikonummantelten Filaments in die Arteria carotis interna induziert, welches zu einem Verschluss der MCA führt [22]. Die Mäuse wurden mit 1,5% Isofluran, 70% N₂O und 30% O₂ über eine Gesichtsmaske anästhesiert. Die Dauer der Anästhesie betrug nicht länger als 10min. Die Reperfusion wurde zu zwei verschiedenen Zeitpunkten nach Okklusion in einer kurzen Narkose durchgeführt. Das Filament wurde nach 30min Okklusion wieder entfernt, was zu einem selektiven neuronalen Zellschaden führte. In einem zweiten Modell wurde das Filament nach 60minütigen Verschluss der MCA entfernt, dies führte zur Pannekrose und somit zur Infarktbildung. Während aller Narkosen wurde die Körpertemperatur der Mäuse über eine Wärmeplatte mit Feedback-Temperaturregler konstant bei 37°C gehalten (siehe Publikationen 1-3).

Neurologischer Score

Der Grad der neurologische Dysfunktion der Mäuse wird anhand eines von Bederson et al. 1991 [23] entwickelten und von Hara et al. 1996 [22] modifizierten Scores direkt, 24h-, 48h und 72h nach Reperfusion, ermittelt.

Score	0	1	2	3	4
Verhalten	Keine Defizite	Streckdefizit der vorderen Extremitäten	Zirkeln zu der kontralaterale Seite	Verlust der posturalen Reflexe	Tod

(siehe Publikation 1)

Analyse des Infarktolumens

Die Mäuse wurden 48h bzw. 72h nach Induktion des Schlaganfalls in tiefer Narkose dekapitiert und die entnommenen Gehirne in eiskaltem Methylbutan schockgefroren. Von jedem Gehirn wurden coronale Schnitte an den interauralen Positionen 6.6, 5.3, 3.9, 1.9 und 0 mm angefertigt (Kryoschnitte). Diese Schnitte wurden mit Hämatoxylin gefärbt, um die Schlaganfallgröße zu ermitteln. Das direkte Schlaganfallvolumen berechnet sich aus der Addition der Flächen des ischämischen Gewebes. Das indirekte Infarktolumen berechnet sich aus der Fläche der kontralateralen Hemisphäre minus der Flächen des nicht geschädigten Gewebes der ipsilateralen Seite. Die Größe des Gehirnödem ergibt sich aus der Subtraktion des indirekten Schlaganfallvolumens von dem direkten Schlaganfallvolumens.

Genchip Analysen

Unbehandelten und ischämischen WT und CD93-KO Tieren wurde zu verschiedenen Zeitpunkten nach Induktion der zerebralen Ischämie das Gehirn entnommen; die RNA in Trizol isoliert und in cDNA transkribiert. Die Expression aller bekannten Transkripte nach zerebraler Ischämie wurde mittels „Whole Genome Expression Beadchips“ von Illumina oder mittels Affymetrix GeneChip Mouse Expression Set (Affymetrix, Santa Clara, CA) untersucht (siehe Publikation 2).

PCR

Zur Überprüfung der Genexpressionsanalyse-Daten wurden folgende Gene CD93 und CCL21 (Sequenzen und Gen-ID siehe Publikation 2), mit „LightCycler® FastStart DNA Master SYBR-Green I-real time PCR“ gemäß Hersteller Handbuch untersucht.

Immunhistochemie

Zur Überprüfung der Proteinexpression (CD93; CCL21; Mrp14,) sowie zur Analyse einer Kolokalisation mit Zellmarkern (IBA1; GFAP; CD31; NeuN; CD11b) wurden immunhistochemische Färbungen angefertigt. Hierzu wurden Kryoschnitte (siehe Analyse des Infarktolumens) oder Paraffinschnitte verwendet und laut Protokoll (siehe Publikationen 2 und 3) fixiert, blockiert und mit dem 1. und 2. Antikörper inkubiert. Die Auswertung erfolgte am Leica DMRA-Mikroskop. Das Auszählen der CD11b-positiven Zellen erfolgte mit Hilfe des Leica Stereo Investigator 7 (MicroBrightField Bioscience, Williston, USA)

Konfokale Mikroskopie

Die konfokale Mikroskopie der Doppelfärbungen (siehe Publikation 2) wurde mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (Leica DM LFS) durchgeführt.

Western Blot

Zur Überprüfung der CD93-Expression im ischämischen Gewebe im Vergleich zu nicht-ischämischem und unbehandeltem Gewebe wurde eine Western Blot-Analyse durchgeführt. Die ischämischen sowie die nicht-ischämischen und unbehandelten Hemisphären wurden in Lysepuffer homogenisiert. Mittels BCA Assays wurde die

Proteinkonzentration bestimmt und anschließend wurde eine definierte Proteinmenge der Größe nach mittels einer SDS-Elektrophorese getrennt. Im Anschluss wurden die Proteine auf eine Nitrozellulose Membran geblottet und mit primären und einem Meerrettich-Peroxidase-konjugierten sekundären Antikörper inkubiert. Zur Auswertung wurden die Proteine mittels Luminolreagenz sichtbar gemacht (siehe Publikation 2).

TUNEL Assay (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick-End-Labeling)

Der Nachweis geschädigter Zellen (Apoptose und Nekrose) in den CD59a-KO Mäusen im Vergleich zu WT Mäusen wurde mit einem des TUNEL Assay (In situ cell death detection kit, Fluorescein, Roche AG) bestimmt. Mittels eines mit Fluorescein markierten Nukleotides werden Doppelstrangbrüche der DNA detektiert und somit Apoptose sowie Nekrose der Zellen sichtbar gemacht. Alle Zellen wurden mit Hoechst 33258 gegengefärbt (Invitrogen). Ausgezählt wurden die markierten Zellen mit Hilfe des Leica Stereo Investigator 7 (MicroBrightField Bioscience, Williston, USA).

Statistik

Zur Analyse der Signifikanzen des Schlaganfallvolumens und der neurologischen Defizite wurde der Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Als signifikant wurden die Werte dann betrachtet, wenn sie den kritischen U-Wert unterschritten. Zur Ermittlung der Signifikanzen beim Auszählen der CD11b und TUNEL-positiven Zellen wurde der Student t-Test durchgeführt. Als signifikant wurden die Werte bei einem p-Wert kleiner als 0,05 bewertet.

4. Ergebnisse

Untersuchung des Proteins CD59 nach zerebraler Ischämie

Um den Effekt des Komplement-Inhibitorproteins CD59 auf das Schlaganfallvolumen und auf die neurologischen Defizite zu untersuchen, wurden CD59a Knockoutmäuse (CD59a-KO) verwendet. Im Modell der fokalen zerebralen Ischämie wurden beide Geschlechter untersucht. Nach 1h Ischämie und 48h Reperfusion war kein signifikanter Unterschied der Infarktgrößen zwischen CD59a-KO und WT-Mäusen erkennbar ($n_{WT} = 16$; $n_{CD59a} = 22$) (Publikation 1, Abb.1). Auch die von uns bestimmte Größe der Schwellung des Gehirns wies keine signifikanten Unterschiede auf. Im 30min Modell konnten allerdings 72h nach Reperfusion signifikant größere Läsionsvolumina in den CD59a-KO Mäusen ($n=22$) im Vergleich zu den WT Mäusen ($n=18$) gezeigt werden (Mediane: CD59a= 74mm^3 ; WT= 57mm^3). Auch der Grad der Schwellung des Gehirns war in den WT kleiner als in den CD59a-KO Mäusen. Ein signifikanter Größenunterschied existierte jedoch nur in männlichen Mäusen (Publikation 1, Abb.2). Des Weiteren wurde der Grad des neurologischen Defizits der Mäuse mittels eines neurologischen Scores (siehe Methoden) zu verschiedenen Zeitpunkten nach Okklusion bewertet. Auch hier ließ sich ein signifikanter Unterschied zwischen CD59a-KO und WT im 30min Okklusionsmodell erkennen

(Publikation 1, Abb.4 und 5). Publikation 1; Abb.5 zeigt, dass beide Geschlechter zusammen ($n_{WT} = 27$; $n_{CD59a} = 27$) zu allen Zeitpunkten nach Okklusion signifikante Unterschiede aufweisen. Die CD59a-KO Mäuse weisen im Vergleich zu den WT Mäusen ein statistisch signifikant größeres neurologisches Defizit auf (Publikation 1, Abb.5 A-C). In der Gruppe der männlichen Mäuse ist ein signifikanter Unterschied nach 48h und 72h zu sehen (Publikation 1, Abb.5 D-E).

Es wird angenommen, dass durch eine Inhibition des terminalen Lysekomplexes eine verminderte Zelllyse stattfindet. Deshalb wurde eine TUNEL-Färbung durchgeführt. 48h nach Okklusion konnten signifikant mehr TUNEL-positive Zellen in den CD59a-KO Tieren ($n=3$) im Vergleich zu den WT ($n=3$) gezählt werden (Publikation 1, Abb. 3). Signifikanzen wurden mittels *Student-t-Test* bestimmt. Weder 48h noch 72h nach Reperfusion wurden Unterschiede in der Anzahl der CD11b-positiven Zellen festgestellt (Daten nicht gezeigt).

Untersuchung des Proteins CD93 nach zerebraler Ischämie

Durch vorausgegangene Genexpressionsanalysen war eine Hochregulation des Gens CD93 zu verschiedenen Zeitpunkten nach Ischämie beschrieben worden. Diese Ergebnisse konnten mittels TaqMan-PCR bestätigt werden (Publikation 2, Tabelle 1A). Western Blot Analysen (Publikation 2, Tabelle 1B) und immunhistochemische Färbungen konnten eine erhöhte Translation des Proteins CD93 in der ipsilateralen Hemisphäre zeigen (Publikation 2, Abb.2). Es wurde festgestellt, dass dieses Proteins mit Endothelzellen und Mikrogliazellen kolokalisiert ist (Publikation 2, Abb.2A und B). Mittels konfokaler Mikroskopie konnten wir widerlegen, dass CD93 auch auf Astrozyten exprimiert wird, was aufgrund initialer immunhistologischer Färbungen vermutet wurde.

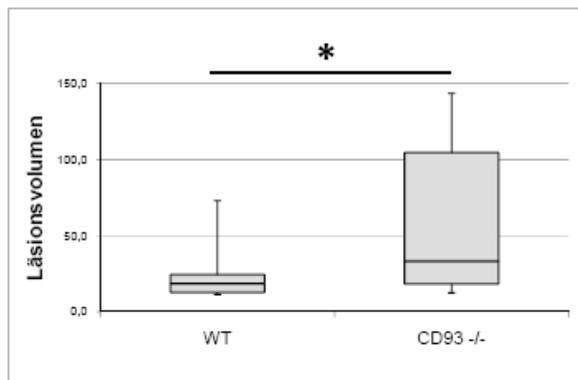


Abbildung 2: direktes Läsionsvolumen im Vergleich WT zu CD93-KO im 30 minütigen Ischämiemodell 72h nach Okklusion, analysiert wurden beide Geschlechter.

Wir zeigten erstmals, dass CD93-KO Mäuse im dreißigminütigen Ischämiemodell ein signifikant kleineres Läsionsvolumen und eine signifikant kleinere Schwellung des Gehirns aufwiesen ($n_{WT} = 16$; $n_{CD93} = 21$). Die CD93-KO Tiere (gemischte Geschlechter) hatten ein durchschnittliches direktes Läsionsvolumen von $60,8 \pm 52,2 \text{ mm}^3$ und die WT Mäuse von $23,9 \pm 16,6 \text{ mm}^3$ ($p=0,022$) (Abb.2 und Publikation 2, Abb.4). Ebenfalls konnte ein signifikant

größeres Läsionsvolumen in den männlichen CD93-KO Mäusen im Vergleich zu den männlichen WT Mäusen gezeigt werden ($p=0,02$). Der Vergleich der weiblichen Tiergruppen ließ nur eine Tendenz, jedoch keinen signifikanten Unterschied erkennen. Die statistischen Signifikanzen wurden mittels Mann-Whitney-U-Test ermittelt (siehe Abb.2; Publikation 2; Abb.4). Im Modell mit einer Okklusionszeit von 60min und einer Reperusionszeit von 48h konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen CD93-KO und WT detektiert werden ($n_{WT} = 18$; $n_{CD93} = 15$). Weder in den

weiblichen noch in den männlichen Mausgruppen zeigte sich ein Unterschied im direkten und indirekten Infarkt volumen oder in der Größe der Schwellung des Gehirns (Publikation 2, Abb.3).

Eine mögliche Funktion von CD93 ist die Regulation der Leukozytenextravasation [11; 24]. Dies führte zu der Fragestellung, ob CD93 einen Einfluss auf die Zahl der CD11b-positiven Zellen im ischämischen Gewebe hat. In Publikation 2, Abb. 5A, konnten wir einen signifikanten Anstieg an CD11b-positiven Zellen in den CD93-KO Mäusen im Vergleich zu den WT darstellen. Der signifikante Anstieg 48h nach Reperfusion war unabhängig von der Größe des Infarkt volumens (Publikation 2, Abb.5C). In Publikation 2; Abb.5B (72h Reperfusion) sind ebenfalls signifikant mehr CD11b-positive Zellen in den CD93-KO Mäusen vorhanden, jedoch existiert zu diesem Reperusionszeitpunkt eine Korrelation mit der Größe des Läsions volumens (Publikation 2, Abb.5D). Ein größeres Volumen in den CD93-KO Mäusen führt zu mehr CD11b-positiven Zellen im Vergleich zu der WT Gruppe (n=4).

Daraufhin sollte das 1997 erstmals klonierte [9], aber noch wenig auf seine Funktion hin charakterisierte CD93-Protein mittels einer Genexpressionsanalyse näher untersucht werden. Hierfür wurden ischämische und nicht-ischämische Gehirne von CD93-KO und WT Tieren verwendet. Wir verglichen die Expressionsmuster der ischämischen Hemisphären (CD93-KO und WT; jeweils n=3) miteinander und analysierten die differentielle Expression von 46.000 Genen. Es konnte gezeigt werden, dass es in den CD93-KO Tieren zu einer mehr als zweifach erhöhten Induktion von 18 Genen nach 48h und 58 Genen nach 72h kommt. Auch beim Vergleich der unbehandelten Tiere wurden Gene gefunden, die in den CD93-KO Mäusen erhöht exprimiert sind (Publikation 2, Tabelle 1). Das zu allen Zeitpunkten am stärksten in den CD93-KO Tieren induzierte und mittels drei unterschiedlicher Gensequenzen detektierte Gen kodiert für das Chemokin CCL21. Im Vergleich zwischen unbehandelten Tieren ist es 9,7-fach, nach 48h Reperfusion 14,3 fach und nach 72h Reperfusion 12,3 fach hochreguliert. Bestätigend wurde eine CYBRgreen realtime PCR durchgeführt (Daten nicht gezeigt). In Publikation 2, Abb.7 konnten wir mittels immunhistologischer Färbungen zeigen, dass auch das Protein CCL21 in den CD93-KO Tieren vermehrt gebildet wird. Dies war nicht nur im Gehirn und speziell in der ipsilateralen Hemisphäre, sondern auch im bekannten Syntheseort dieses Proteins - in der Milz - zu erkennen.

Untersuchung von Mrp8/14 KO-Mäusen nach zerebraler Ischämie

Weitere induzierte Gene, die durch eine vorausgehende Genexpressionsanalyse von Ischämiegewebe aus dem Maushirn identifiziert worden waren, sind die S100A-Gene. 12h nach Okklusion konnte ein Expressionsmaximum (4,3-fache) des Gens S100A8 (Mrp8) in der ipsilateralen Hemisphäre gezeigt werden (Publikation 3, Tab.1). Auch 24h nach Ischämie ist noch eine 3,8-fache Induktion erkennbar. Das Gen S1009 (Mrp14) zeigte ebenfalls eine erhöhte Expression nach 12h-24h. Das Protein Mrp14 weist ebenfalls 48h nach Reperfusion eine erhöhte Expression in der ischämischen Hemisphäre auf (Publikation 3, Abb.1). In immunhistochemischen Doppelfärbungen mit verschiedenen Zellmarkern konnte, wie in Publikation 3, Abb.2 zu sehen, eine Kolokalisation von Mrp14 mit Mikroglia oder infiltrierten Myeloid

Zellen/ Makrophagen-Markern festgestellt werden. Es wurden keine Kolo­kalisatio­nen mit Neuronen oder Endothelzellen gefunden. In dem MCAO-Modell mit 1h Okklusion und 48h Reperfusion zeigten Mrp8/14 KO-Mäuse (n=11), wie in Publikation 3; Abb.3 zu sehen, ein signifikant kleineres Infarkt­volumen und eine signifikant kleinere Schwellung des Gehirns im Vergleich zu ihren WT-Geschwistertieren (n=11).

Auch in dieser Studie wurde die Anzahl der CD11b-positiven Zellen in den Knockoutmäusen (n=3) und ihren WT-Geschwistertieren (n=3) bestimmt. Es wurden aus beiden Genotypgruppen Tiere mit ähnlich großen Infarkt­volumen untersucht. Mrp8/14+/+ Mäuse weisen trotz gleichen Schlaganfall­volumens signifikant mehr CD11b-positive Zellen als Mrp8/14-/- Mäuse auf (Publikation 3, Abb.4).

5. Diskussion

Die Erkenntnisse dieser Arbeit bieten möglicherweise die Grundlage für ein neues anti-inflammatorisches Therapie­konzept, mit dem Ziel der Minderung des sekundären Gewebsschadens nach zerebraler Ischämie.

Studie 1:

In der durchgeführten Studie wurde das Fehlen des Komplementinhibitors CD59a auf die Auswirkungen nach MCAO im Mausmodell untersucht. Mehrere Studien zeigten, dass die Aktivierung des Komplementsystems die Inflammation und die Schädigung des Gewebes nach zerebraler Ischämie beeinflussen [25-27].

In dieser Studie konnten wir zeigen, dass CD59a-defiziente Mäuse im 30min MCAO-Modell ein größeres Läsions­volumen und eine vergrößerte Schwellung des Gehirns im Vergleich zu den WT Mäusen aufweisen. Des Weiteren konnten wir anhand eines Testes zur Bestimmung des neurologischen Defizites feststellen, dass das Fehlen von CD59a zu stärkeren neurologischen Defiziten führt. Diese Ergebnisse sind analog zu den Ergebnissen aus einem experimentellen Traumamodell [5] und ähnlichen MCAO-Modellen an C9-KO Mäusen [28]. Unsere Daten zeigen, dass die signifikanten Unterschiede geschlechtsspezifisch und nur in männlichen Mäusen festzustellen sind. Dies könnte durch zu geringe Tierzahlen bei den weiblichen Mäusen erklärt werden. Jedoch zeigen viel weitere tierexperimentelle Studien, dass Unterschiede in funktionellen Ergebnissen zwischen den Geschlechtern auftreten. Dies ist vor allem durch hormonelle Unterschiede erklärbar [29-31]. In dem MCAO-Modell mit der längeren, 60 minütigen Okklusionsdauer fanden wir weder einen Unterschied in der Größe des Infarkt­volumens noch in dem Ausmaß des neurologischen Defizits, im Vergleich zwischen CD59a-KO und WT-Tieren. Wir konnten jedoch in diesem Modell einen signifikanten Anstieg an TUNEL-positiven Zellen in den CD59a-KO Tieren im Vergleich zu den WT feststellen. Damit bestätigten wir die Ergebnisse von Turnberg et al. [32], welche ebenfalls eine Steigerung an TUNEL-positiven Zellen im renalen Ischämie­modell bei CD59a-KO Mäusen zeigten.

In der Literatur ist beschrieben, dass die komplementaktivierte Zellyse zu einer Ausschüttung von Adhäsions­molekülen und Chemokinen führt [33; 24]. Dies leitet uns zu der Hypothese, dass eine ungehinderte Zellyse eine verstärkte

Ausschüttung, und dieses wiederum ein vermehrtes Leukozytenhoming zur Folge hat. Demnach müsste die Anzahl der CD11b-positiven Zellen in den CD59a-KO Mäusen erhöht sein. Wir konnten jedoch keinen Unterschied in der Anzahl an CD11b-positiven Zellen im ischämischen Gewebe der CD59a-KO im Vergleich zu den WT feststellen. Diese Ergebnisse könnten durch eine zu geringe Anzahl an ausgezählten Gehirnschnitten zustande kommen. Durch eine Erhöhung der n-Zahl wäre eventuell ein signifikanter Unterschied erkennbar. Wahrscheinlicher ist allerdings, dass die vermehrte Lyse der Zellen durch die Aktivierung der Komplementkaskade anscheinend keinen bzw. nur einen geringen Einfluss auf das Leukozytenhoming hat. Die Bildung der Anaphylatoxine C3a und C5a in der Signalkaskade oberhalb vom MAC scheinen in der Komplementaktivierungskaskade die bedeutenderen Faktoren in Bezug auf die Inflammation darzustellen. Dies sollte in weiterführenden Studien näher untersucht werden.

Ein weiteres Protein, welches als Komplementrezeptor deklariert wurde, wird in der zweiten Studie näher analysiert.

Studie 2:

Im StrokeGen-EU Projekt wurde mittels Affymetrix-Genchipanalysen entdeckt, dass das Gen CD93 nach zerebraler Ischämie in der ipsilateralen Hemisphäre eine signifikant höhere Expression aufweist. Auch das Protein CD93 ist erhöht im ischämischen Gewebe exprimiert. Die exakte Funktion dieses Proteins ist jedoch noch unklar. Wir untersuchten erstmals den Einfluss dieses Proteins im Krankheitsmodell des Schlaganfalls. Hierzu wurden CD93-KO Mäuse und WT-Mäuse nach zerebraler Ischämie verglichen. Im 30min MCAO-Modell, mit selektivem neuronalen Zelltod in Kombination mit schwerer neuroinflammatorischer Antwort [35], konnten wir eine signifikante Vergrößerung des Läsionsvolumens und der Schwellung des Gehirns feststellen. Um potentielle CD93-abhängige Mechanismen zu entschlüsseln, führten wir Genexpressionsanalysen von CD93-KO im Vergleich zu WT durch. Hierbei konnte ermittelt werden, dass das Chemokin CCL21 zu verschiedenen Zeitpunkten nach Ischämie in den CD93-KO Tieren im Vergleich zu den WT erhöht exprimiert wird. Anhand dieser Ergebnisse ergibt sich ein neuer Aspekt, der uns zu der Hypothese führt, dass das Chemokin CCL21 eine zentrale Rolle in der CD93-abhängigen Neuroprotektion spielt. Jedoch sind all diese Ergebnisse unter dem Aspekt zu betrachten, dass wir keine Wildtyp Wurfgeschwister sondern extern erworbene WT-Mäuse zum Vergleich nutzten. Ausgeschlossen werden kann, dass es durch die Deletion von CD93 und dem damit verbundenen Einfügen von neuen Gensequenzen zu einer erhöhten Transkription von CCL21 kommt. Dies begründet sich dadurch, dass beide Proteine auf unterschiedlichen Chromosomen lokalisiert sind (CD93 auf Chromosom 2; CCL21 auf Chromosom 4). Die genaue molekulare Funktion von CD93 wurde noch nicht ermittelt. Die ersten *in vitro* Ergebnisse, die vermuten ließen, dass CD93 ein Rezeptor des klassischen Komplementweges ist [8], wurden in neueren *in vivo* Studien widerlegt [36]. Weitere Publikationen zeigen, dass CD93 *in vivo* eine wichtige Rolle in der Phagozytose von sterbenden Zellen spielt [7]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass CD93 von den Zelloberflächen nach zellulärer Aktivierung ausgeschüttet wird, ähnlich wie die

Adhäsionsmoleküle L-Selektin und CD44 oder der Tumor Nekrose Faktor- α (TNF- α) und andere Zytokine [37]. All diese Ergebnisse könnten Erklärungen für unsere Ergebnisse der neuroprotektiven Wirkung von CD93 nach zerebraler Ischämie liefern. McGreal et al. [36] publizierten Ergebnisse über eine spezifische Bindung des löslichen, rekombinanten CD93-Fc chimären Proteins an vaskuläre Endothelzellen in inflammatorischen Tonsillen, was auf ein Vorhandensein eines CD93-Liganden an dieser Stelle hinweist. Bezogen auf diese Daten können wir nicht ausschließen, dass das CD93-positive Endothelzell-Signal, welches wir zeigten, nicht von löslichem CD93 (sCD93) stammt. Falls es tatsächlich zu einer Abspaltung von CD93 nach zerebraler Ischämie kommt und sCD93 als anti-Adhäsionsmolekül eine anti-inflammatorische Wirkung hat, sollte das lösliche CD93 näher auf mögliche Therapiekonzepte hin untersucht werden.

Die erhöhte Induktion von CCL21 in CD93-defizienten Mäusen kann zum einen eine Protektion mittels CD93 nach zerebraler Ischämie erklären und zum anderen Aufschluss auf CD93-abhängige Signalwege geben. Da CD93-KO einen dramatischen Anstieg an CCL21-Expression im Gehirn zeigten (siehe Publikation 2; Abb.7 und Tabelle1), postulieren wir, dass die verstärkte Regulation dieses Chemokins zu einem verstärkten Leukozytenhoming ins Gehirn führt. Es ist bekannt, dass CCL21 die Leukozyteninfiltration vom Blut ins Gewebe kontrolliert [39]. Weiter gehend wurde gezeigt, dass CCL21 in der Signalkaskade zwischen geschädigten Neuronen und Mikrogliazellen eine wichtige Rolle spielt [40; 41]. Geschädigte Neuronen induzieren sofort die Ausschüttung von CCL21 und aktivieren dadurch, mittels des Rezeptors CXCR3, Mikrogliazellen. Dies konnte sowohl in *in vivo*- wie auch in *in vitro* Versuchen gezeigt werden [40-42]. Die erhöhte Mikrogliaaktivierung führt somit zu einer verstärkten postischämischen Inflammation. Die von uns beobachtete erhöhte Expression von CCL21 könnte auch durch Artefakte des Genchips entstanden sein. Davon gehen wir allerdings nicht aus. Die erhöhte Anzahl an CD11b-positiven Zellen in den CD93-KO, die wir in Publikation 2; Abb.5 zeigen, stützt die Hypothese der erhöhten Mikrogliaaktivierung und der damit erhöhten postischämischen Inflammation. Die CD93-KO Mäuse wiesen trotz gleichem Läsionsvolumens mehr CD11b-positive Zellen im Vergleich zu den WT-Tieren auf. Des Weiteren konnten die Genexpressionsdaten mittels realtime PCR bestätigt werden und es konnte ebenfalls eine Hochregulation des Proteins CCL21 gezeigt werden. Da weitere Chemokine nicht oder nur marginal im ischämischen Gewebe der CD93-KO Mäuse exprimiert waren (Publikation 2, siehe Tabelle 2), postulieren wir, dass CCL21 der Hauptmediator von Leukozyten-Extravasation und Mikrogliaaktivierung in den CD93-KO Mäusen ist. Es konnte gezeigt werden, dass CD93-defiziente Mäuse eine normale Antwort nach Immunisierung mit Serum IgG zeigen, allerdings zu späteren Zeitpunkten einen Abfall des IgG Gehaltes aufwiesen [38]. Es kann spekuliert werden, dass diese Beobachtungen ebenfalls auf die erhöhte Expression von CCL21 in CD93-KO-Mäusen zurückzuführen ist. In weiteren Experimenten, z.B. durch Injektion von sCD93 oder durch die Gabe von CCL21-Inhibitoren, könnte die Zusammenhänge dieser beiden Proteine näher analysiert werden.

Es darf jedoch nicht vergessen werden, dass es noch weitere inflammatorische Signalwege oder Faktoren gibt, die nach zerebraler Ischämie aktiviert werden, wie

z.B. TLR-abhängige Wege oder andere Zytokine (z.B. IL-1 β) [43; 44]. Endogene Faktoren der TLR-Wege wurden ebenfalls als erhöht exprimiert gefunden und in der 3. Studie dieser Arbeit näher analysiert.

Studie 3:

In der 3. Studie zeigten wir, dass sich das Fehlen der Proteine Mrp8/14 neuroprotektiv nach zerebraler Ischämie auswirkt. Mrp8/14-Ko Mäuse wiesen ein kleineres Läsionsvolumen, eine geringere Schwellung des Gehirns und weniger CD11b-positive Zellen im ischämischen Gewebe auf.

Studien belegen, dass Mrp8 und -14 die Integrität von Endothelzellen beeinflussen. Es wurde gezeigt, dass sie den Schaden der Endothelzellen begünstigen und dass Mrp8 einer der wichtigsten chemotaktischen Faktoren ist [45-47]. In Studien der inflammatorischen Gicht konnte gezeigt werden, dass die Freisetzung von Mrp8/14 zu einer verstärkten Infiltration von Neutrophilen führt [48]. Demzufolge könnte das von uns beobachtete geringere Infarktvolume und die reduzierte Schwellung des Gehirns nach zerebraler Ischämie auf eine geringere Inflammation zurückzuführen sein. Bestätigt wurde dies durch unsere weiteren Ergebnisse: Mrp8/14-KO Mäuse weisen signifikant weniger CD11b-positive Zellen als ihre Mrp8/14+/- Wurfgeschwister auf. Die Resultate unserer Doppelfärbungen bestätigen ebenfalls Daten aus der Literatur, die zeigen, dass Mrp8 und Mrp14 auf aktivierten Makrophagen und Mikrogliazellen exprimiert werden [49; 50].

Viele Publikationen belegen, dass TLR-Aktivierungswege eine relevante Rolle beim Outcome nach der zerebralen Ischämie spielen [17; 51]. Mrp8/14 sind laut Vogl et al. endogene Faktoren des TLR4-Signalweges, welche einen letalen endogenen Schock begünstigen [15]. Der sich aus unseren Studien ergebene Einfluss von Mrp8/14 auf den neurologischen Schaden nach zerebraler Ischämie steht im Einklang mit Daten, die den Beitrag von TLR4 zur Neuroinflammation belegen [51; 52]. Somit kann vermutet werden, dass Mrp8/14 beim postischämischen Hirnschaden über TLR4 proinflammatorisch wirkt. Mrp8/14 aktiviert nicht nur TLR4 sondern auch andere Wege [45]. Es kann also nicht ausgeschlossen werden, dass auch andere Aktivierungswege an dem Mrp8/14 abhängigen Schaden nach zerebraler Ischämie beteiligt sind. Hier wären weitere Experimente mit Mrp8/14-TLR4 Doppelknockout-Mäusen denkbar.

Diese Arbeit belegt den Nutzen der Verwendung von Genexpressionsanalysen in der Schlaganfallforschung. Wie hier erkennbar ist, können neue Gene wie CD93 und Mrp8/14 ermittelt und deren Funktion nach zerebraler Ischämie analysiert werden. In dieser Arbeit konnten mittels einer zweiten Genchipanalyse CD93-abhängige Signalwege im zerebralen Gewebe ermittelt und somit die Abhängigkeit von CD93 an der Inflammation festgestellt werden. Diese Ergebnisse können Grundlagen für neue Therapieansätze in der Schlaganfall-Therapie liefern. Zum Beispiel kann auch die Kombination dieser drei Proteine in weiteren Studien untersucht werden. Im Fokus sollte aber immer der Therapieeinsatz beim Menschen stehen.

6. Literaturverzeichnis

1. Murray CJ, Lopez AD (1997) Mortality by cause for eight regions of the world: Global Burden of Disease Study, *Lancet* 349, 1269-1276
2. Endres M, Laufs U, Liao KL, Moskowitz MA (2004) Targeting eNOS for stroke protection. *Trends Neurosci* 27: 283-289
3. Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA (1999) Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view, *Trends Neurosci* 22, 391-397
4. Meri S, Morgan BP, Davies A, Daniels RH, Olavesen MG, Waldmann H, Lachmann PJ: Human protectin (CD59), an 18,000-20,000 MW complement lysis restricting factor, inhibits C5b-8 catalysed insertion of C9 into lipid bilayers. *Immunology*. 1990, 71: 1-9.
5. Stahel P, Flierl M, Morgan BP, Persigehl I, Stoll C, Conrad C, Touban B, Smith W, Beauchamp K, Schmidt O, Ertel W, Leinhase I: Absence of the complement regulatory molecule CD59a leads to exacerbated neuropathology after traumatic brain injury in mice. *J. Neuroinflammation*. 2009, 6, 2.
6. Morgan BP: Complement membrane attack on nucleated cells: resistance, recovery and non-lethal effects. *Biochem. J* 1999, 264: 1-14.
7. Norsworthy, P. J., L. Fossati-Jimack, J. Cortes-Hernandez, P. R. Taylor, A. E. Bygrave, R. D. Thompson, S. Nourshargh, M. J. Walport, and M. Botto. 2004. Murine CD93 (C1qRp) contributes to the removal of apoptotic cells in vivo but is not required for C1q-mediated enhancement of phagocytosis. *J. Immunol.* 172: 3406-14.
8. Løvik, G., J. T. Vaage, E. Dissen, C. Szpirer, J. C. Ryan, and B. Rolstad. 2000. Characterization and molecular cloning of rat C1qRp, a receptor on NK cells. *Eur. J. Immunol.* 30: 3355-3362
9. Nepomuceno, R. R., Henschen-Edman, A. H., Burgess, W. H., and A. J. Tenner. 1997. cDNA cloning and primary structure analysis of C1qR(P), the human C1q/MBL/SPA receptor that mediates enhanced phagocytosis in vitro. *Immunity* 6: 119-29
10. Marchler-Bauer, A., J. B. Anderson, M. K. Derbyshire, C. DeWeese-Scott, N. R. Gonzales, M. Gwadz, L. Hao, S. He, D. I. Hurwitz, J. D. Jackson, Z. Ke, D. Krylov, C. J. Lanczycki, C. A. Liebert, C. Liu, F. Lu, S. Lu, G. H. Marchler, M. Mullokandov, J. S. Song, N. Thanki, R. A. Yamashita, J. J. Yin, D. Zhang, and S. H. Bryant. 2007. CDD: a conserved domain database for interactive domain family analysis. *Nucleic Acids Res.* 35: D237-40.
11. Dean, Y. D., E. P. McGreal, and P. Gasque. 2001. Endothelial cells, megakaryoblasts, platelets and alveolar epithelial cells express abundant levels of the mouse AA4 antigen, a C-type lectin-like receptor involved in homing activities and innate immune host defense. *Eur. J. Immunol.* 31: 1370-81
12. Dean, Y. D., E. P. McGreal, H. Akatsu, and P. Gasque. 2000. Molecular and cellular properties of the rat AA4 antigen, a C-type lectin-like receptor with structural homology to thrombomodulin. *J. Biol. Chem.* 275: 34382-92.
13. Fonseca, M. I., P. M. Carpenter, M. Park, G. Palmarini, E. L. Nelson, and A. J. Tenner. 2001. C1qR(P), a myeloid cell receptor in blood, is predominantly expressed on endothelial cells in human tissue. *J. Leukoc. Biol.* 70: 793-800.
14. Nepomuceno, R. R., and A. J. Tenner. 1998. C1qRP, the C1q receptor that enhances phagocytosis, is detected specifically in human cells of myeloid lineage, endothelial cells, and platelets. *J. Immunol.* 160: 1929-35

15. Vogl T, Tenbrock K, Ludwig S, Leukert N, Ehrhardt C, van Zoelen MA, Nacken W, Foell D, van der Poll T, Sorg C and Roth J, Mrp8 and Mrp14 are endogenous activators of Toll-like receptor 4, promoting lethal, endotoxin-induced shock, *Nat. Med.* 13 (2007), pp. 1042–1049
16. Kariko K, Weissman D and Welsh FA, Inhibition of toll-like receptor and cytokine signaling-a unifying theme in ischemic tolerance, *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 24 (2004), pp. 1288–1304G.
17. Ziegler G, Harhausen D, Schepers C, Hoffmann O, Röhr C, Prinz V, König J, Lehrach H, Nietfeld W and Trendelenburg G, TLR2 has a detrimental role in mouse transient focal cerebral ischemia, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 359 (2007), pp. 574–579
18. J.R. Caso JR, J.M. Pradillo JM, O. Hurtado O, J.C. Leza JC, M.A. Moro MA and Lizasoain I, Toll-like receptor 4 is involved in subacute stress-induced neuroinflammation and the worsening of experimental stroke, *Stroke* 39 (2008), pp. 1314–1320.
19. Cao C, Yang Q, Lv F, Jie C, Fu H and Wang J, Reduced cerebral ischemia-reperfusion injury in Toll-like receptor 4 deficient mice, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 353 (2007), pp. 509–514
20. Holt DS, Botto M, Bygrave AE, Hanna SM, Walport MJ, Morgan BP: Targeted deletion of the CD59 gene causes spontaneous intravascular hemolysis and hemoglobinuria. *Blood.* 2001, 98: 442-449
21. Manitz MP, Horst B, Seeliger S, Strey A, Skryabin BV, Gunzer M, Frings W, Schönlau F, Roth J, Sorg C and Nacken W, Loss of S100A9 (MRP14) results in reduced interleukin-8-induced CD11b surface expression, a polarized microfilament system, and diminished responsiveness to chemoattractants in vitro, *Mol. Cell. Biol.* 23 (2003), pp. 1034–1043
22. Hara, H., P. L. Huang, N. Panahian, M. C. Fishman, and M. A. Moskowitz. 1996. Reduced brain edema and infarction volume in mice lacking the neuronal isoform of nitric oxide synthase after transient MCA occlusion. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 16: 605-11.
23. Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, Nishimura MC, Davis RL, Bartkowski H: Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke.* 1986, 17: 472-476
24. Jordan, C. T., C. M. Astle, J. Zawadzki, K. Mackarehtschian, I. R. Lemischka, and D. E. Harrison. 1995. Long-term repopulating abilities of enriched fetal liver stem cells measured by competitive repopulation. *Exp. Hematol.* 23: 1011-5
25. Lucas SM, Rothwell NJ, Gibson RM: The role of inflammation in CNS injury and disease. *Br. J. Pharmacol.* 147 Suppl 2006, 1: 232-40.
26. Arumugam TV, Magnus T, Woodruff TM, Proctor LM, Shiels IA, Taylor SM: Complement mediators in ischemia-reperfusion injury. *Clinica Chimica Acta* 2006, 374: 33-45.
27. Arumugam TV, Woodruff TM, Lathia JD, Selvaraj PK, Mattson MP, Taylor SM: Neuroprotection in stroke by complement inhibition and immunoglobulin therapy. *Neuroscience.* 2009, 158: 1074-1089
28. Imm MD, Feldhoff PW, Feldhoff RC, Lassiter HA: The administration of complement component C9 augments post-ischemic cerebral infarction volume in neonatal rats. *Neurosci. Lett.* 2002, 325: 175-178.
29. Chen CH, Toung TJ, Hurn PD, Koehler RC, Bhardwaj A: Ischemic neuroprotection with selective kappa-opioid receptor agonist is gender specific. *Stroke.* 2005, 36: 1557-61.

30. Nijboer CH, Groenendaal F, Kavelaars A, Hagberg HH, van Bel F, Heijnen C: Gender-specific neuroprotection by 2-iminobiotin after hypoxia-ischemia in the neonatal rat via a nitric oxide independent pathway. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2007, 27: 282-92.
31. Palmon SC, Williams MJ, Littleton-Kearney MT, Traystman RJ, Kosk-Kosicka D, Hurn PD: Estrogen increases cGMP in selected brain regions and in cerebral microvessels. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1998, 18: 1248-52.
32. Turnberg D, Botto M, Lewis M, Zhou W, Sacks SH, Morgan BP, Walport MJ, Cook HT: CD59a Deficiency Exacerbates Ischemia-Reperfusion Injury in Mice. *Am. J. Pathol.* 2004, 165: 825-832
33. Kilgore KS, Flory CM, Miller BF, Evans VM, Warren JS: The membrane attack complex of complement induces interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1 secretion from human umbilical vein endothelial cells. *Am. J. Pathol.* 1996, 149: 953-61
34. Tramontini N, Kuipers P, Huber C, Murphy K, Naylor K, Broady A, Kilgore K: Modulation of Leukocyte Recruitment and IL-8 Expression by the Membrane Attack Complex of Complement (C5b-9) in a Rabbit Model of Antigen-Induced Arthritis. *Inflammation.* 2002, 26: 311-319.
35. Katchanov, J., C. Waeber, C., K. Gertz, A. Gietz, B. Winter, W. Brück, U. Dirnagl, R. W. Veh, and M. Endres. 2003. Selective neuronal vulnerability following mild focal brain ischemia in the mouse. *Brain Pathol.* 13: 452-64
36. McGreal, E. P., N. Ikewaki, H. Akatsu, B. P. Morgan, and P. Gasque. 2002. Human C1qRp is identical with CD93 and the mNI-11 antigen but does not bind C1q. *J. Immunol.* 168: 5222-5232
37. Zhang, M., S. S. Bohlsion, M. Dy, and A. J. Tenner. 2005. Modulated interaction of the ERM protein, moesin, with CD93. *Immunology* 115: 63-73
38. Chevrier, S., C. Genton, A. Kallies, A. Karnowski, L. A. Otten, B. Malissen, M. Malissen, M. Botto, L. M. Corcoran, S. L. Nutt, and H. Acha-Orbea. 2009. CD93 is required for maintenance of antibody secretion and persistence of plasma cells in the bone marrow niche. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 106: 3895-900
39. Babcock, A.A., W. A. Kuziel, S. Rivest, and T. Owens. 2003. Chemokine expression by glial cells directs leukocytes to sites of axonal injury in the CNS. *J. Neurosci.* 23: 7922-30.
40. de Haas, A. H., H. R. J. van Weering, E. K. de Jong, H. W. G. M. Boddeke, and K. P. H. Biber. 2007. Neuronal chemokines: versatile messengers in central nervous system cell interaction. *Mol. Neurobiol.* 36: 137-151.
41. Biber, K., A. Sauter, N. Brouwer, S. Copray, and H. Boddeke. 2001. Ischemia-induced neuronal expression of the microglia attracting chemokine secondary lymphoid-tissue chemokine (SLC). *Glia* 34: 121-133.
42. de Jong, E.K., I. M. Dijkstra, M. Hensens, N. Brouwer, M. van Amerongen, R. S. Liem, H. W. Boddeke, and K. Biber. 2005. Vesicle-mediated transport and release of CCL21 in endangered neurons: a possible explanation for microglia activation remote from a primary lesion. *J. Neurosci.* 25: 7548-57
43. Tang, S. C., T. V. Arumugam, X. Xu, A. Cheng, M. R. Mughal, D. G. Jo, J. D. Lathia, D. A. Siler, S. Chigurupati, X. Ouyang, T. Magnus, S. Camandola, and M. P. Mattson. 2007. Pivotal role for neuronal Toll-like receptors in ischemic brain injury and functional deficits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 104: 13798-803
44. Trendelenburg, G. 2008. Acute neuroinflammation and the inflammasome: central processor for danger signals and the inflammatory response *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 28: 867-81.

45. Heizmann CW, Ackermann GE and Galichet A, Pathologies involving the S100 proteins and RAGE, *Subcell. Biochem.* 45 (2007), pp. 93–138
46. Viemann D, Barczyk K, Vogl T, Fischer U, Sunderkötter C, Schulze-Osthoff K and Roth J, MRP8/MRP14 impairs endothelial integrity and induces a caspase-dependent and-independent cell death program, *Blood* 109 (2007), pp. 2453–2460
47. Harrison CA, Raftery MJ, Walsh J, Alewood P, Iismaa SE, Thliveris S and Geczy CL, Oxidation regulates the inflammatory properties of the murine S100 protein S100A8, *J. Biol. Chem.* 274 (1999), pp. 8561–8569.
48. Liu-Bryan R, Scott P, Sydlaske A, Rose DM and Terkeltaub R, Innate immunity conferred by Toll-like receptors 2 and 4 and myeloid differentiation factor 88 expression is pivotal to monosodium urate monohydrate crystal-induced inflammation, *Arthritis Rheum.* 52 (2005), pp. 2936–2946.
49. Engel S, Schluesener H, Mittelbronn M, Seid K, Adjodah D, Wehner HD and Meyermann R, Dynamics of microglial activation after human traumatic brain injury are revealed by delayed expression of macrophage-related proteins MRP8 and MRP14, *Acta Neuropathol.* 100 (2000), pp.
50. Passey RJ, Williams E, Lichanska AM, Wells C, Hu S, Geczy CL, Little MH and Hume DA, A null mutation in the inflammation-associated S100 protein S100A8 causes early resorption of the mouse embryo, *J. Immunol.* 163 (1999), pp. 2209–2216.
51. Lehnardt S, Massillon L, Follett P, Jensen FE, Ratan R, Rosenberg PA, Volpe JJ and Vartanian T, Activation of innate immunity in the CNS triggers neurodegeneration through a Toll-like receptor 4-dependent pathway, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 (2003), pp. 8514–8519.
52. Marsh BJ, Williams-Karnesky RL and Stenzel-Poore MP, Toll-like receptor signaling in endogenous neuroprotection and stroke, *Neuroscience* 158 (2009), pp. 1007–1020

Anteilerklärung

Berlin, 20.05.2010

Der selbstständige Anteil, den ich, Denise Harhausen, geb. am 09.11.1981, an der Erstellung der im Anhang der Dissertationsschrift aufgeführten Publikationen habe, setzt sich prozentual wie folgt zusammen:

Referenz #1: 80%

Harhausen D, Khojasteh U, Stahel PF, Morgan BP, Nietfeld W, Dirnagl U, Trendelenburg G (2010) Membrane attack complex inhibitor CD59a protects against focal cerebral ischemia, *Journal of Neuroinflammation* 7:15

Beitrag im Einzelnen: Planung und Durchführung der operativen Ischämieinduktion im Mausmodell; Gewebentnahme, HE Standardfärbung und Infarktauswertung; Untersuchung des Neurologischen Defizits; Durchführung und Auswertung der Quantifizierung der TUNEL und CD11b-positiven Zellen; Erstellung der Daten für das Manuskript und Erstellung des Manuskriptes.

Referenz #2: 80%

Harhausen D, Prinz V, Ziegler G, Gertz K, Endres M, Lehrach H, Gasque P, Botto M, Stahel PF, Dirnagl U, Nietfeld W, Trendelenburg G (2010) CD93/AA4.1 – a novel regulator of inflammation in murine focal cerebral ischemia, *The Journal of Immunology*, 184

Beitrag im Einzelnen: Planung, Durchführung und Auswertung aller Immunhistochemischer Färbungen; Durchführung des Western Blots; Planung und Durchführung der Tierexperimente für die Genchipanalysen und die immunhistochemischen Färbungen; Gewebentnahme und Aufarbeitung der Proben für die Genchipanalyse und PCR; Auswertung und Analyse der Genchipdaten; Etablierung der Primer und Durchführung der PCR; sowie das Erstellung der Daten für das Manuskript

Referenz #3: 10%

Ziegler G, Prinz V, Albrecht MW, **Harhausen D**, Khojasteh U, Nacken W, Endres M, Dirnagl U, Nietfeld W, Trendelenburg G. (2009) Mrp-8 and -14 mediate CNS injury in focal cerebral ischemia. *BBA - Molecular Basis of Disease* 2009 Oct 14;

Beitrag im Einzelnen: Durchführung der immunhistochemischen Färbungen; Analyse und Auswertung der Daten; Hilfe bei der Erstellung des Manuskriptes

Denise Harhausen

Prof. Dr. med. Ulrich Dirnagl

Publikation 1

Harhausen D, Khojasteh U, Stahel PF, Morgan BP, Nietfeld W, Dirnagl U, Trendelenburg G (2010) Membrane attack complex inhibitor CD59a protects against focal cerebral ischemia, *Journal of Neuroinflammation* 7:15

Publikation 2

Harhausen D, Prinz V, Ziegler G, Gertz K, Endres M, Lehrach H, Gasque P, Botto M, Stahel PF, Dirnagl U, Nietfeld W, Trendelenburg G (2010) CD93/AA4.1 – a novel regulator of inflammation in murine focal cerebral ischemia, *Journal of Immunology*

Publikation 3

Ziegler G, Prinz V, Albrecht MW, **Harhausen D**, Khojasteh U, Nacken W, Endres M, Dirnagl U, Niefeld W, Trendelenburg G. (2009) Mrp-8 and -14 mediate CNS injury in focal cerebral ischemia. BBA - Molecular Basis of Disease 2009 Oct 14

Erklärung

Ich, Denise Harhausen, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

„Inflammation und ischämischer Gewebsschaden bei experimentellem Schlaganfall: Rolle von CD93, CD59 und Mrp8/14“

selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

08.12.2010 Denise Harhausen

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei meinem Doktorvater **Herrn Prof. Dr. med. Ulrich Dirnagl** für die Möglichkeit im Institut für Experimentelle Neurologie meine Dissertation anzufertigen und für die Betreuung der thematischen Fragestellung bedanken.

Mein besonderer Dank gilt **Herrn Dr. med. George Trendelenburg** für die Überlassung des Promotionsthemas sowie die sehr gute Betreuung und stetige Förderung meiner Arbeit. Ebenso danke ich ihm für die kritische Diskussion der Ergebnisse und seine aktive Unterstützung beim Verfassen der Publikationen.

Weiterhin gilt mein Dank **Dr. rer. nat. Wilfried Nietfeld** vom Max Plank Institut für molekulare Genetik für die Bereitstellung der Genexpressions-Chips sowie **Herrn Marcus Albrecht** für die hervorragende Unterstützung bei der Auswertung dieser Daten.

Danken möchte ich ebenfalls **Frau Prof. Dr. Marina Botto**, **Herrn Prof. Dr. Paul B. Morgan** und **Herrn Dr. rer. nat. Wolfgang Nacken** für die Bereitstellung der Knockout-Mäuse und **Herrn PD Dr. med. Philip Stahel** für die sehr guten fachlichen Diskussionen bei dem Verfassen der Publikationen.

Ein sehr großes Dankeschön gilt meinen Kollegen. Ich danke **Janett König** für ihr geduldiges Einarbeiten in die Tierexperimente und für die technische Mitarbeit in den Projekten. Ich danke **Gina Ziegler**, an deren Projekten ich teilhaben konnte und die mich mit ihrem fachlichen Rat unterstützt hat. Sehr bedanken möchte ich mich bei **Uldus Khojasteh und Martina Füchtemeier**, die mich nicht nur fachlich, sondern auch freundschaftlich immer unterstützt und aufgebaut haben.

Nicht vergessen möchte ich meine Familie und Freunde, die mir immer zur Seite standen und mich in meinem Vorhaben bestärkt und unterstützt haben.

Lebenslauf

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

Publikationen

Harhausen D, Prinz V, Ziegler G, Gertz K, Endres M, Lehrach H, Gasque P, Botto M, Stahel PF, Dirnagl U, Nietfeld W, Trendelenburg G.: CD93/AA4.1 – a novel regulator of inflammation in murine focal cerebral ischemia, *The Journal of Immunology*; 2010 184.

Harhausen D, Khojasteh U, Stahel PF, Morgan BP, Nietfeld W, Dirnagl U, Trendelenburg G.: Membrane attack complex inhibitor CD59a protects against focal cerebral ischemia; *Journal of Neuroinflammation*; .2010 Feb. 22

Ziegler G, Prinz V, Albrecht MW, **Harhausen D**, Khojasteh U, Nacken W, Endres M, Dirnagl U, Nietfeld W, Trendelenburg G.: Mrp-8 and -14 mediate CNS injury in focal cerebral ischemia. *Biochim Biophys Acta*. 2009 Oct 14

Ziegler G, **Harhausen D**, Schepers C, Hoffmann O, Röhr C, Prinz V, König J, Lehrach H, Nietfeld W, Trendelenburg G: TLR2 has a detrimental role in mouse transient focal cerebral ischemia. *Biochem Biophys Res Commun*. 2007 Aug 3;359(3):574-9. Epub 2007 May 30.

Leinhase I, Rozanski M, **Harhausen D**, Thurman JM, Schmidt OI, Hossini AM, Taha ME, Rittirsch D, Ward PA, Holers VM, Ertel W, Stahel PF: Inhibition of the alternative complement activation pathway in traumatic brain injury by a monoclonal anti-factor B antibody: a randomized placebo-controlled study in mice. *J Neuroinflammation*. 2007 May 2;4:13

Leinhase I, Holers VM, Thurman JM, **Harhausen D**, Schmidt OI, Pietzcker M, Taha ME, Rittirsch D, Huber-Lang M, Smith WR, Ward PA, Stahel PF: Reduced neuronal cell death after experimental brain injury in mice lacking a functional alternative pathway of complement activation. *BMC Neuroscience* 2006, 7:55