

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

## DISSERTATION

Die Aktivierung von Mikrogliazellen nach experimentell induzierter  
Subarachnoidalblutung - eine intraparenchymatöse Reaktion auf  
eine extraparenchymatöse Erkrankung

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Anja-Maria Davids  
geb. Radon  
aus Mannheim

Datum der Promotion: 30.05.2015

## INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>ABSTRAKT (deutsch)</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>ABSTRAKT (englisch)</b>	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>5</b>
3.1	Definition und Epidemiologie der Subarachnoidalblutung	5
3.2	Die Pathophysiologie der Subarachnoidalblutung	6
3.2.1	Der intrakranielle Druck	6
3.2.2	Der zerebrale Blutfluss	6
3.2.3	CBF und cerebrale Autoregulation	7
3.2.4	Die akute Hirnschädigung	8
3.2.5	Die späte Hirnschädigung	11
3.3	SAB und inflammatorische Prozesse	13
3.3.1	Die Rolle der Mikrogliazellen im ZNS	14
3.3.2	Inflammatorische Zytokine und ihre Rolle im Zentralen Nervensystem	17
3.3.2.1	Interleukin 1 $\alpha$ und $\beta$	17
3.3.2.2	Interleukin 6	18
3.3.2.3	Tumor Nekrose Faktor	20
3.4	Zielsetzung	22
<b>4</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>23</b>
4.1	Material	23
4.2	Methoden	25
4.2.1	Tierexperimentelle Arbeiten	25
4.2.1.1	Mausstamm	25
4.2.1.2	Induktion der SAB bei der Maus	25
4.2.1.3	Intrakardiale Perfusion	26
4.2.2	Zellkultur	27
4.2.2.1	Gehirnzellsuspension	27
4.2.2.2	Restimulation und Fixierung von Zellen	28
4.2.2.3	Mikrogliazellisolierung	28
4.2.2.4	Zellzahlbestimmung	29
4.2.3	Durchflusszytometrie (FACS)	30
4.2.3.1	Prinzip der Durchflusszytometrie	30
4.2.3.2	Oberflächenfärbung	30
4.2.3.3	Intrazelluläre Färbung	31

4.2.4	Morphologische und Histologische Methoden	32
4.2.4.1	Vorbereitung / Fixierung der Gehirne und Anfertigung von Kryoschnitten	32
4.2.4.2	Immunhistologie	32
4.2.4.3	Immunfluoreszenzfärbung	33
4.2.4.4	Optimierung der Antigenerkennung (Antigen Retrieval)	34
4.2.5	Genexpressionsanalyse	35
4.2.5.1	RNA Extraktion	35
4.2.5.2	Herstellung der cDNA	35
4.2.5.3	Argarosegelelektrophorese	35
4.2.5.4	Semiquantitative Realtime-PCR (qRT-PCR)	36
4.2.6	Statistische Analyse	38
<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>39</b>
5.1	Charakterisierung der aSAB im zeitlichen Verlauf	39
5.1.1	Detektion intrakranieller Blutungen	39
5.1.2	Akkumulation verschiedener Zellpopulationen als Reaktion auf eine aSAB	40
5.1.2.1	Nachweis von APP als Hinweis auf axonale Schädigung	41
5.1.2.2	Akkumulation GFAP-positiver Zellen	43
5.1.2.3	Akkumulation Iba1-positiver Zellen	44
5.1.2.4	Vergleich der Akkumulation von APP, Iba1- und GFAP-positiven Zellen	46
5.2	Charakterisierung der Mikroglia/Makrophagenpopulation bei der aSAB	47
5.2.1	Mikroglia/Makrophagen-Isolierung und deren Anzahl in den aSAB-Hemisphären im zeitlichen Verlauf	47
5.2.1.1	Reinheit der Mikroglia/Makrophagen	47
5.2.1.2	Relative Anzahl der Mikroglia/Makrophagen im zeitlichen Verlauf nach Induktion einer aSAB	49
5.2.1.3	Absolute Zellzahl der Mikroglia/Makrophagen in der aSAB Hemisphäre	49
5.2.2	Expression inflammatorischer Zytokine und deren Rezeptoren in Mikroglia/Makrophagen nach aSAB	50
5.2.2.1	Mikroglia/Makrophagen exprimieren vermehrt pro-inflammatorische Zytokine nach aSAB auf RNA- und Proteinebene	50
5.2.2.2	Mikroglia/Makrophagen zeigen erhöhte Expression von Zytokinrezeptoren	55
<b>6</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>56</b>
6.1	Kinetik der zellulären Reaktion nach aSAB im Mausmodell	56
6.2	Mikroglia/Makrophagen akkumulieren im Anschluss an eine aSAB	58
6.2.1	Verteilung der Mikroglia/Makrophagen nach aSAB im Gehirngewebe	58
6.2.2	Trotz prozentualem Mikroglia/Makrophagen-Anstieg bleibt die absolute Mikroglia-Anzahl unbeeinflusst	58

6.2.3	Faktoren, die Mikrogliazellen im Anschluss an eine aSAB aktivieren können	58
6.3	Mikroglia und deren Expression pro-inflammatorischer Faktoren nach Induktion der aSAB	62
6.3.1	Ein kleiner Anteil von Mikroglia produziert signifikant vermehrt Interleukin 6 nach aSAB	62
6.3.2	Hochregulation von TNF und seiner Rezeptoren auf RNA- und Proteinebene nach aSAB	65
6.3.3	Hochregulation von Interleukin 1 nach aSAB	68
6.4	Nachweis axonalen Schadens in Verbindung mit Mikrogliazellakkumulation	71
6.5	Ausblick	73
<b>7</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>74</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>76</b>
<b>9</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>84</b>
<b>10</b>	<b>LEBENS LAUF</b>	<b>87</b>
<b>11</b>	<b>EIDESSTÄTTLICHE VERSICHERUNG</b>	<b>90</b>

## 1 ABSTRAKT (deutsch)

Ist eine Person von einer aneurysmatische Subarachnoidalblutung (aSAB) betroffen, so kann es auf bisher zum Teil ungeklärte Weise im Rahmen der sich anschließenden pathophysiologischen Veränderungen zu einer Entstehung neuronaler Schädigung kommen. Die Hypothese der vorliegenden Promotion ist, dass es zu einer zellulären Reaktion kommt, die in Zusammenhang mit der neuronalen Schädigung nach aSAB steht. Hierbei stand im Zentrum die Rolle der Mikrogliazellen zu charakterisieren.

### Methoden

Es erfolgte die Induktion einer aSAB bei C57Bl/6 Mäusen mittels des endovaskulären Fadenperforationsmodells. Zunächst wurden die Gehirne an den Tagen 2, 4, 7, 14 und 28 gewonnen und eine immunhistochemische Färbung von Iba-1, GFAP sowie APP durchgeführt.

Im nachfolgenden Schritt wurden die Gehirne an Tag 4, 14 und 28 und eine entsprechende Zellsuspension gewonnen. Anschließend erfolgte die Isolierung einer CD11b-positiven Zellfraktion mittels eines Magnetfelds und die Extraktion von RNA aus dieser. Nach dem Umschreiben in cDNA, erfolgte die Echtzeit-PCR zur relativen Quantifizierung der Zytokine IL1a, IL1b, IL6, TNF sowie der entsprechenden Rezeptoren. Die Produktion von TNF und IL6 auf Proteinebene wurde mittels FACS-Analyse untersucht.

### Ergebnisse

Im Rahmen der immunhistochemischen Färbungen zeigt sich eine Zunahme des Nachweises von GFAP, APP und Iba-1 im Zeitraum von Tag 2 bis 14.

Bezüglich der Zytokine IL1a und IL6 zeigt sich eine Zunahme der Expression im Zeitraum von Tag 5 bis 28, während die von IL1b konstant erhöht ist. Im Gegensatz dazu findet sich für TNF an Tag 5 und 14 eine Zunahme, an Tag 14 jedoch eine deutliche Abnahme der Expression. Für IL6 können wir das Ergebnis auf Proteinebene bestätigen.

Hinsichtlich der Zytokinrezeptoren, zeigt sich für IL1R1 keine Änderung der Expression. Die Expression von IL1R2 ist an Tag 5 maximal erhöht und fällt an Tag 14 auf ein

niedrigeres Niveau, welches mit Tag 28 vergleichbar ist. Der IL6R sowie TNFR2 werden im Zeitverlauf von Tag 5 bis 28 zunehmend exprimiert. Die Expression von TNFR2 nimmt ebenfalls bis Tag 14 zu und fällt an Tag 28 wieder ab.

#### Schlussfolgerung

Es zeigte sich eine signifikante Aktivierung und Akkumulation von Mikrogliazellen im Anschluss an eine aSAB. Zudem fand sich ein Hinweis auf einen Zusammenhang mit der neuronalen Schädigung. Des Weiteren erfolgte die Charakterisierung der Mikrogliazellaktivierung anhand der Erstellung eines mikroglialen Expressionsprofils inflammatorischer Zytokine. Dabei ließ sich eine veränderte Expression feststellen. Diese Promotion liefert damit weitere Hinweise für die einer frühen Hirnschädigung zugrunde liegenden Mechanismen im Anschluss an eine aSAB und bildet die Grundlage für weitere Experimente bzw. therapeutische Ansätze.

## 2 ABSTRAKT (englisch)

Within the last years different theories about early brain injury (EBI) following aneurysmatic subarachnoid hemorrhage (aSAH) were discussed. We focus on the theory considering inflammatory processes as cause respectively consequence of EBI. Therefore we first evaluated the activation of Microglia in murine brain slices following aSAH and subsequently characterized the activation by evaluating the production of inflammatory cytokines known to play an important role in the pathomechanism of a variety of CNS diseases.

### Methods

C57Bl/6 mice underwent a filament perforation procedure to induce SAH. First, the brains were harvested after day 2, 4, 7, 14 and 28 respectively and immunohistochemical staining was performed for Iba-1, GFAP as well as APP.

Secondly, the brains were harvested after day 5, 14 and 28 respectively and after having got a cell suspension, a CD11b positive cell fraction was isolated by magnetically activated cell sort (MACS). Subsequently the RNA was extracted. This RNA was transcribed into cDNA and realtime-PCR was performed to quantify the expression of the cytokines IL1a, IL1b, IL6, TNF as well as their receptors in a relative way. The production of TNF and IL6 on protein level was quantified by a FACS analysis.

### Results

Concerning murine brain slices there is an increase of GFAP, APP and IBA1 over a period of day 2 till 14.

Concerning IL1a and IL6, there is an increase in expression up regulation from day 5 till day 28 after aSAH whereas the expression of IL1b is constantly up regulated. The RNA production of TNF is down regulated on day 5 and 28, but up regulated on day 14.

A significant change in the expression couldn't be detected for the IL1R1 whereas the expression of the IL1R2 has its maximum on day 5 and rests on almost the same level concerning day 14 and 28. In case of the IL6R and TNFR1 an increase can be observed from day 5 till day 28. As to the TNFR2, its RNA production increases from day 5 to day 14 and is decreased again on day 28.

### Conclusion

The time elapsed of an intraparenchymal inflammatory reaction following an extraparenchymal aSAH can be observed.

There is an augmentation in activation of Microglia and APP being a marker for axonal injury a potential proof for a correlation between inflammation and brain damage after aSAH. Furthermore a significant change in the cytokine expression profile of Microglia can be observed.

The results provide an indication of the underlying molecular mechanisms of brain damage genesis after aSAH respectively an approach for scientific as well as therapeutic aims.

## 3 EINLEITUNG

### 3.1 Definition und Epidemiologie der Subarachnoidalblutung

Der Begriff Subarachnoidalblutung (SAB) bezeichnet eine arterielle Blutung in den Subarachnoidalraum (Cavum subarachnoidale), welcher sich im Bereich der Meningen, zwischen den Schichten Arachnoidea und Pia mater, und damit folglich außerhalb des Gehirnparenchyms befindet. Dieser ist mit Liquor cerebrospinalis gefüllt und steht in Höhe des vierten Ventrikels über die Foramina Luschkae sowie das Foramen Magendii mit den inneren Liquorräumen in Verbindung [1].

Die Subarachnoidalblutung zählt zu den hämorrhagischen Schlaganfällen. Ursache für diese Form der Blutung ist meist die Zerreißung eines zerebralen arteriellen Gefäßes in Folge eines Traumas. Dabei ist die traumatische Subarachnoidalblutung häufiger als die spontane, welche vorrangig (75-80%) aufgrund der Ruptur eines arteriellen Aneurysmas entsteht. Des Weiteren kann eine spontane Subarachnoidalblutung unter anderem in Folge einer arteriovenösen Malformation, Vaskulitis, Sinusvenenthrombose oder Gerinnungsstörung auftreten. Erfolgt eine spontane Subarachnoidalblutung aufgrund eines rupturierten Aneurysmas, wird diese auch als aneurysmatische Subarachnoidalblutung (aSAB) bezeichnet. Bei einem Aneurysma handelt es sich um eine Gefäßwandaussackung, welche sich im Rahmen eines multifaktoriellen Zusammenspiels entwickelt. Es ist nachgewiesen, dass unter anderem genetische Faktoren, Arteriosklerose, ein erhöhter Blutdruck oder ein Trauma eine Rolle bei der Entstehung spielen, aber auch seltenere Ursachen wie z.B. ein mykotisch oder inflammatorisch bedingtes Aneurysma sind möglich [2]. Ein Aneurysma entwickelt sich meist an mechanisch weniger stabilen Stellen des Circulus arteriosus Willisii, z.B. an Abzweigungen wie der A. communicans anterior. Auf Grund dessen nimmt eine Subarachnoidalblutung meist ihren Ausgang in den basalen Zisternen an der Schädelbasis [1]. Insgesamt liegt der Anteil der spontanen Subarachnoidalblutungen an allen Schlaganfällen bei ca. 7%, wobei in den meisten der westlichen Populationen 6-8% pro 100000 Einwohner im Jahr eine solche Form der Blutung erleiden [3]. Von den Patienten, die eine aSAB erleiden, sterben 10 bis 15% bevor sie in ein medizinisches Versorgungszentrum gelangen und insgesamt ca. 46% in den ersten 30 Tagen. Die Gesamtmortalität beträgt 45% [4]. Der Anteil an potentiellen Lebensjahren, die aufgrund

der aSAB verloren gehen, ist mit 25% vergleichbar mit dem, der bei einem ischämischen Schlaganfall und einer intrakraniellen Blutung erfasst wurde [2].

## **3.2 Die Pathophysiologie der Subarachnoidalblutung**

Voraussetzung für das Verständnis der Folgen einer aSAB ist das Zusammenspiel physikalischer Faktoren, welche in pathophysiologischer Weise eine verhängnisvolle Kaskade anstoßen. Die Grundlage bildet hierbei eine Zunahme des intrakraniellen Drucks (ICP) sowie die Abnahme des zerebralen Blutflusses (CBF) bzw. zerebralen Perfusionsdruckes (CPP).

### **3.2.1 Der intrakranielle Druck**

Der intrakranielle Druck (ICP) ist eine dynamische Größe und steigt an, wenn die Volumenzunahme einer der drei Komponenten Gehirn (80%), Blut (3-11%) und Liquor (5-15%) nicht mehr durch die anderen beiden kompensiert werden kann. Bei einer aSAB kommt es in Folge der arteriellen Blutung in den Subarachnoidalraum zu einer Volumenzunahme innerhalb der Liquorräume und in 60 Sekunden zu einer Druckspitze des ICP, welche diastolische Werte erreichen kann [5]. Da für Menschen frühe Änderungen des ICP nicht ausreichend dokumentiert sind, muss hier auf experimentelle Beobachtungen zurückgegriffen werden. Dabei zeigt sich, dass der ICP bereits circa 10 Minuten nach induzierter aSAB auf seinen Ausgangswert zurückfällt [6] und sich stabilisiert oder bis über eine Stunde hinweg erhöhte Werte aufweist [7], welche dann meist mit einem schlechteren *outcome* in Zusammenhang stehen [8]. Des Weiteren können deutlich erhöhte ICP-Werte mit Änderungen im zerebralen Metabolismus [9], Inflammation [10] und frühem sowie verzögertem Hirnschaden [11] in Verbindung gebracht werden.

### **3.2.2 Der zerebrale Blutfluss**

Der zerebrale Blutfluss (CBF) errechnet sich aus der Differenz von ICP und dem mittleren arteriellen Druck (MAP), welche dem zerebralen Perfusionsdruck (CPP) entspricht und im Anschluss geteilt wird durch den zerebralen Gefäßwiderstand (CVR). Er beträgt 15% des Herzminutenvolumens bzw. ungefähr 700ml/min. Durch die Erhöhung des ICP im Rahmen einer aSAB fällt folglich der CPP und damit der CBF ab.

Der direkte Zusammenhang zwischen dem ICP und CBF wird oft ebenfalls über die Theorie des „no-reflow“, erstmals von Ames 1968 erwähnt, hergestellt. Diese besagt, dass es in Folge der Steigerung des ICP zu einer verminderten Füllung der zerebralen Blutgefäße und damit zu einem reduzierten CBF kommt [12]. Im Anschluss an die Normalisierung des ICP nach dem Blutungsereignis kommt es dann jedoch zu einer Steigerung des CBF über die Norm hinaus in Form einer hyperämischen Phase bevor nach 60 Minuten ein relativ stabiler Wert erreicht wird [13]. Dieser Wert, der 60 Minuten nach einer aSAB erhoben wird, erlaubt einen Rückschluss auf das *outcome* der folgenden 24 Stunden. Beträgt der CBF zu diesem Zeitpunkt weniger als 40% des Normalwertes, liegt die Mortalität bei 100%. Bei Werten über 40% hingegen sinkt die Mortalität auf 19% [13]. Der Normalwert stellt sich wieder nach 48 Stunden ein [14]. Eine Abnahme des CBF ist mit einem reduzierten zerebralen Sauerstoffmetabolismus [15] und Zeichen klinischer Verschlechterung assoziiert [12].

### **3.2.3 CBF und cerebrale Autoregulation**

Der Anstieg des ICP ist jedoch nicht alleine verantwortlich für den Abfall des CBF. Ein weiterer Faktor liegt in der Dysfunktion der zerebrovaskulären Autoregulation, auch Bayliss-Effekt genannt, begründet [7]. Zerebrovaskuläre Autoregulation bezeichnet die Fähigkeit des Gehirns den CBF bei einem MAP von 50 bis 160 mmHg konstant zu halten. Änderungen des CPP werden hierbei über den Tonus der glatten Gefäßmuskulatur und damit den CVR kompensiert. Beispielsweise führt eine Zunahme des Blutdruckes zu einer Wanddehnung der kleinen Arterien sowie Arteriolen und letztlich über die Öffnung mechanosensitiver Kationenkanäle zum Einstrom von Kalziumionen mit nachfolgender Kontraktion der Gefäßwand. Werden die Grenzen jedoch überschritten sind die Gefäßmuskeln maximal kontrahiert oder dilatiert, eine weitere Kontraktion oder Dilatation ist nicht mehr möglich. Ein weiterer Mechanismus, über den der CVR reguliert wird, ist das Ansprechen der Gefäßmuskulatur auf metabolische Einflussfaktoren, im Besonderen auf CO<sub>2</sub>-Schwankungen. Eine Abnahme des pCO<sub>2</sub> führt zu einer Vasokonstriktion. Die Dysfunktion der zerebrovaskulären Autoregulation ist am stärksten ausgeprägt innerhalb der ersten 72 Stunden nach einer aSAB und korreliert mit deren Schwere [16]. Zudem wurde in einer Studie nachgewiesen, dass sowohl der chemo- als auch der mechanosensitive Weg beeinträchtigt werden [17], wobei diesbezüglich ein dissoziativer Charakter vorliegen

könnte. Es hat den Anschein, dass die Chemoregulation länger beeinträchtigt ist als die mechanische Autoregulation [17]. Zu den möglichen Ursachen, die im Rahmen einer aSAB eine Störung der zerebralen Autoregulation hervorrufen können, zählen ein saurer pH-Wert [18], Gefäßendothelschäden und ein Hydrocephalus [7]. Hinsichtlich der Prognose ist erwähnenswert, dass Patienten, bei welchen die Funktion der zerebrovaskulären Autoregulation initial erhalten bleibt, ein geringeres Risiko haben verzögerte ischämisch bedingte neurologische Defizite zu entwickeln als solche mit einer initialen Dysfunktion [19].

Weitere Faktoren, welche den CBF reduzieren sind das Blut im Subarachnoidalraum und eine Hypovolämie, bedingt durch das „cerebral salt wasting syndrom“ sowie exzessive Diurese. In tierexperimentellen Versuchen konnte zudem ein akuter Vasospasmus, insbesondere die Mikrozirkulation betreffend, beobachtet werden, der den CBF weiter reduziert. Diese Beobachtung ließ sich jedoch nicht in klinischen Studien bestätigen [2].

### **3.2.4 Die akute Hirnschädigung**

Aufgrund der Auswertung von vielen tierexperimentellen und wenigen humanen Autopsiestudien entwickelte sich eine Theorie darüber, dass es initial nach aSAB unter Berücksichtigung der oben genannten Faktoren zu einer Aktivierung von Prozessen kommt, die zu einer akuten Hirnschädigung (EBI) führen. Diese akute Hirnschädigung bedingt dann eine anschließende neurologische Verschlechterung unabhängig vom Vasospasmus und trägt damit folglich zu einem schlechten *outcome* bei [20]. Durch die Identifikation bzw. genaue Charakterisierung dieser Prozesse erhofft man sich neue Angriffspunkte für eine effektive Therapie zu finden. Der Begriff Early Brain Injury (EBI) bezeichnet die akute Hirnschädigung, welche bis zu 72 Stunden nach aSAB entsteht [21]. Im historischen Rückblick erfolgte die erste Beschreibung einer EBI wohl durch Bramwell im Jahr 1886. Während der Autopsie von Patienten, die bis zu 6 Stunden nach einer aSAB gestorben waren, stellte er eine neuronale Schädigung fest.

Ostrowski *et al.* diskutierten erstmals die Konsequenzen einer pathologischen Änderung der genannten physikalischen Größen und beschrieben theoretische sowie bereits bewiesene Mechanismen hinsichtlich der Entstehung einer EBI. In den Vordergrund stellten sie die Entstehung einer zerebralen Ischämie [20]. Als Ursache der EBI stellten 2012 Sehba *et al.* ebenfalls eine zerebrale Ischämie in den Mittelpunkt [21].

Die Beobachtungen beruhen jedoch weiterhin meist auf tierexperimentellen Versuchen, da typischerweise die medizinische Überwachung von Patienten, die eine aSAB erleiden, erst nach Stunden einsetzt.

Dennoch lassen sich Rückschlüsse auf den Menschen ziehen. Als Indikator für ein zerebrales Ischämieereignis wird das Verhältnis von zerebralem Laktat zu Pyruvat sowie die Glutamatkonzentration angesehen [22, 23]. In Tierversuchen unterschiedlicher Modelle kam es zu einer signifikanten Zunahme der Ratio sowie der Glutamatkonzentration innerhalb von 15 Minuten nach Induktion der aSAB. In klinischen Studien konnten bei Patienten ähnliche Beobachtungen 24 bis 48 Stunden nach aSAB gemacht und in Verbindung mit dem Auftreten neuer neurologischer Defizite sowie verzögertem Vasospasmus gebracht werden [24]. Im Umkehrschluss ließ sich bei asymptomatischen Patienten keine Erhöhung ischämieassoziierter Metaboliten nachweisen [24]. Zusammenfassend lässt sich konstatieren, dass zahlreiche Studien eine initiale Ischämie nach aSAB belegen und den Rückschluss auf eine Assoziation mit einer verminderten Überlebensrate erlauben.

Ischämie beschreibt nun denjenigen Zustand, in welchem der CBF nicht ausreicht, um die metabolischen Funktionen sicherzustellen. Ischämie kann vollständig (fehlender CBF) oder unvollständig (unzureichender CBF), global (das gesamte Gehirn betreffend) oder fokal (regional das Gehirn betreffend) sein. Zahlreiche tierexperimentelle Versuche und klinische Studien belegen die Theorie, dass zum Zeitpunkt der aSAB ein globaler ischämischer Insult vorliegt [20]. Jedoch ist dieser Insult pathophysiologisch von denjenigen abzugrenzen, die in Folge eines Gefäßverschlusses oder Herzstillstandes entstehen. Bei diesen liegt eine komplette Unterbrechung der Durchblutung des betreffenden Hirnareals vor. Im Rahmen einer aSAB beruht die akute zerebrale Ischämie jedoch auf einer Minderperfusion, die im wesentlichen von dem Ausmaß der CBF-Erniedrigung, ICP-Erhöhung sowie der autoregulatorischen Dysfunktion abhängt [20].

Weitere Mechanismen, welche die Ischämie verstärken oder über andere Mechanismen zur EBI beitragen, sind zum Beispiel Ionenverschiebungen, die zu einer Störung der elektrischen Aktivität des Gehirns führen können. Diese ist in Form einer kortikalen Streudepolarisierung (CSD) zu einem frühen und späten Zeitpunkt im Anschluss an eine aSAB nachweisbar. Unter physiologischen Bedingungen folgt der CSD eine Streuhyperämie, bei künstlichem SAB-Liquor eine Streuischämie, die zu kortikalen Infarkten führen kann [25].

Die Beeinträchtigung des Kalziumhaushaltes in Gehirnparenchym-, Gefäßendothel- und Muskelzellen im Rahmen einer SAB ist ein weiterer Faktor, der die Entstehung der EBI beeinflusst [26, 27].

Des Weiteren wurden auf molekularer Ebene verschiedene Prozesse identifiziert, deren Effekt hinsichtlich der Entstehung einer EBI im Verlauf der Jahre intensiv untersucht wurde. Pathologischen Veränderungen im NO/NOS-Signalweg zum Beispiel, induziert durch eine SAB, tragen zur EBI bei [28], aber auch zum DIND und verzögerten Vasospasmus bei [29]. Im Mittelpunkt zahlreicher Studien findet sich ebenfalls das Peptid Endothelin-1 (ET-1), welches vom Gefäßendothel, aus Neuronen, Astrozyten und Mikrogliazellen freigesetzt wird [30]. Erhöhte Spiegel von ET-1 sind im Serum und Liquor von Patienten bis zu 24 Stunden nach einer aSAB nachweisbar [31], tierexperimentell schon nach wenigen Minuten [32]. Die Erhöhung von ET-1 korreliert mit der Entstehung des verzögerten Vasospasmus. Des Weiteren wird der frühen Entstehung freier Sauerstoffradikale sowie oxidativem Stress Bedeutung bei der Entstehung von einer EBI im Anschluss an eine SAB beigemessen [33]. Sowohl klinische als auch experimentelle Studien belegen die frühe Aktivierung von Thrombozyten nach einer aSAB [34, 35]. Die Zellen werden für verschiedene Mechanismen verantwortlich gemacht. Sie führen durch eine Aggregation zu einer mechanischen Obstruktion des Gefäßvolumens [36] und fördern eine Vasokonstriktion durch die Freisetzung vasoaktiver Substanzen wie Serotonin, ADP und PDGF [37]. In Folge der Endothelabtragung wird eine weitere Thrombozytenaggregation begünstigt [34]. Des Weiteren werden wichtige Proteine der Zellwände durch freigesetzte Kollagenasen wie die Metalloproteinasen 2 und 9 geschädigt [34]. In aktuelleren Veröffentlichungen wird zudem demonstriert, dass es zu einer Verlagerung von Thrombozytenaggregaten in das Gehirnparenchym kommen kann, die wiederum eine Zunahme der EBI bedingen könnten [34].

Da die zerebrale Durchblutung eine wesentliche Rolle bei der Entstehung der EBI im Anschluss an eine aSAB spielt, machten es sich zahlreiche Studien zum Ziel, die Reaktion größerer und kleinerer parenchymatöser Gefäße auf das Blutungsereignis zu untersuchen bzw. zu charakterisieren. Im Rahmen von tierexperimentellen Studien stellte sich heraus, dass es zu einer Vasokonstriktion sowohl kleiner als auch großer Gefäße kommt, die eine signifikante Reduktion des CBF sowie Perfusionsdefizite bedingen [13, 37]. Es konnten zwei Phasen der Vasokonstriktion identifiziert werden, wobei die erste bereits 10 Minuten nach Induktion der aSAB nachweisbar ist und für ca.

6 Stunden anhält [13, 37]. Die zweite Phase tritt nach 48 bis 72 Stunden auf [38]. Diese Beobachtungen lassen sich zum Teil auch auf den Menschen übertragen [39]. Für die frühe Vasokonstriktion und ebenso für den verzögerten Vasospasmus wird eine Endotheldysfunktion verantwortlich gemacht [40]. Man geht davon aus, dass unter physiologischen Bedingungen das Endothel selber über die Freisetzung von Vasokonstringentien (Endothelin-1) und -relaxantien (NO, Prostaglandin 2) den Gefäßtonus kontrolliert [41]. Im Zuge einer SAB kommt es nun zum einen zu morphologischen und zum anderen zu funktionellen Veränderungen des Gefäßendothels. Die morphologischen Veränderungen sind dadurch charakterisiert, dass es zu einer Wellung der Gefäßmembran kommt und endotheliale zytoplasmatische Mikrovilli auftreten, die in das Gefäßlumen hineinragen und charakteristisch sind für eine zerebrale Ischämie sowie endotheliale Erosion [42-44]. Die funktionellen Veränderungen beinhalten folglich das verminderte Ansprechen auf Vasodilatoren und im Gegenzug dazu eine Hypersensibilität gegenüber Vasokonstriktoren [41]. Des Weiteren wurde beobachtet, dass kleinere parenchymatöse Gefäße früher und stärkere morphologische Veränderungen aufweisen [34]. Eine erhöhte Permeabilität auf der Ebene der Mikrozirkulation wurde sowohl in tierexperimentellen Studien als auch bei Analyse menschlicher Gewebeproben festgehalten [36, 45]. Diese erhöhte Permeabilität steht zudem in Zusammenhang mit der Entstehung von DINDs [45, 46] und einem schlechten klinischen *outcome* [46].

### **3.2.5 Die späte Hirnschädigung**

Neben der akuten Hirnschädigung ist eine verzögerte Hirnschädigung (DBI) zu definieren. Hierbei unterscheidet man eine zeitliche sowie eine inhaltliche Definition voneinander. Vor dem zeitlichen Hintergrund wird jede Schädigung, welche 78 Stunden nach dem Blutungsereignis auftritt, hinzugezählt. Der Vasospasmus mit und ohne verzögerten ischämischen neurologischen Defiziten (DINDs) gehört zur dieser Gruppe der DBI. Die inhaltliche Definition der DBI berücksichtigt Faktoren, die nicht initial durch das Blutungsereignis bedingt bzw. kausal auf dieses zurückzuführen sind, sondern wie die Rezidivblutung, d.h. wiederholte Blutung aus dem rupturierten Aneurysma, eine erneute zusätzliche Schädigung herbeiführen. Es handelt sich um die bedeutendsten Komplikationen im Anschluss an eine aSAB, da sie wesentlich die Prognose beeinflussen. Aus diesem Grund konzentriert sich seit vielen Jahren die Forschung auf

diese Komplikationen um therapeutische Konzepte zu entwickeln und die zum Teil sehr schlechte Prognose nach aSAB zu verbessern.

Das Risiko für eine Rezidivblutung ist in den ersten 24 Stunden am höchsten und beträgt 100% nach 6 Monaten. Insgesamt sterben 15-20% der Patienten an den Folgen einer Rezidivblutung, welche im Wesentlichen die frühe Mortalität bestimmt.

Dagegen ist ein Vasospasmus frühestens am dritten Tag nachweisbar und hält durchschnittlich bis Tag 12 nach aSAB an. Er ist für 7% der Todesfälle verantwortlich, führt bei weiteren 7% der Patienten zu einer schweren Behinderung und im Allgemeinen bei einem Drittel der Patienten zu einer Verschlechterung des *outcomes* [47]. Aufgrund dessen ist er hauptsächlich für die späte Mortalität sowie Morbidität der aSAB verantwortlich.

Die pathophysiologische Beziehung zwischen Vasospasmus und DINDs ist trotz einer großen Anzahl an experimentellen sowie klinischen Studien nicht geklärt [21]. Obwohl bei 70% der Überlebenden ein Vasospasmus nachweisbar ist, findet sich in dieser Gruppe nur bei 20-30% ein DIND [43]. Des Weiteren gibt es Patienten, die ein DIND aufweisen, jedoch keinen Vasospasmus. Die Vermutung, dass es sich um zwei unabhängig zu betrachtende Faktoren handelt, bestätigte sich ebenfalls in klinischen Studien, welche therapeutische Ansätze überprüften. Der Einsatz von Nimodipin - ein Kalziumkanalinhibitor - reduzierte die Inzidenz von DINDs und verbesserte das neurologische *outcome*, das Auftreten von mittels Angiographie nachweisbaren Vasospasmen jedoch nicht. Im Gegensatz dazu hatten Medikamente wie Clazosentan - ein ET-1 Antagonist -, welche die Inzidenz von Vasospasmen reduzieren, keinen Einfluss auf das neurologische *outcome*. Der Grund, weshalb man initial überhaupt die DINDs und den Vasospasmus in Verbindung miteinander brachte, bestand darin, dass beide in einem ähnlichen Zeitraum im Anschluss an ein Blutungsereignis auftreten.

Bei dem Begriff DIND handelt es sich um eine anhand rein klinischer Kriterien gestellte Diagnose, die 2010 von Vergouwen *et al.* vorgeschlagen und von Wong *et al.* im gleichen Jahr überarbeitet wurde [44, 48]. Die Diagnose ist aktuell definiert als „akutes oder subakutes neues fokales neurologisches Defizit (motorisch oder sprachlich), das sich nach einer aSAB entwickelt, oder Abnahme von  $\geq 2$  Punkten auf der Glasgow Coma Scale (GCS), welche  $>6$  Stunden andauert und nicht auf Behandlungskomplikationen, Rezidivblutung, progressiven Hydrozephalus, metabolische oder Elektrolytstörungen oder Infektion zurückzuführen ist [48]. DIND ist folglich eine Ausschlussdiagnose, die zu einer Verschlechterung der Prognose führt,

ohne dass die Ätiologie geklärt ist. Es ist kein Pathomechanismus bekannt, der alleine oder in Kombination zu diesem klinisch definierten Befund führen könnte [21]. Dies wäre jedoch gerade für eine effektive Therapie der Komplikationen nach aSAB notwendig.

Weitere späte Komplikationen sind kardial und pulmonal bedingt (neurogenes Lungenödem, neurogene myokardiale Erstarrung) und für 25% der Todesfälle verantwortlich [49].

Insgesamt behalten ungefähr 30% der Überlebenden eine moderate bis schwergradige Behinderung zurück und geben in 66% der Fälle an nicht mehr die gleiche Lebensqualität wie vor dem Ereignis der aSAB zu haben [4].

### **3.3 SAB und inflammatorische Prozesse**

Durch die Bluthirnschranke sowie Blutliquorschranke vom restlichen Kreislauf getrennt, wurde Jahre lang angenommen das Zentralnervensystem (ZNS) habe eine Sonderrolle inne das Immunsystem betreffend, eine klassische Immunantwort auf körperfremde Antigene finde nicht statt. Denn die aggressiven Mechanismen, die durch eine immunologische Reaktion angestoßen werden, hätten eine verheerende Auswirkung auf die empfindlichen Neuronen. Doch mittlerweile - durch zahlreiche Studien belegt - besteht nun die vorherrschende Meinung, dass eine immunologische Überwachung des ZNS vorliegt und Immunreaktionen sowie entzündliche Prozesse auch im Gehirn ablaufen. Diese werden als Antwort auf verschiedene Pathologien wie z.B. bei Infektionen, epileptischen Anfällen, der Alzheimer Erkrankung, ischämischen oder hämorrhagischen Schlaganfällen, bei Schädel-Hirn-Traumata, aber auch bei Autoimmunerkrankungen wie der Multiplen Sklerose beobachtet. Die Immunantworten im ZNS unterscheiden sich jedoch von denen im peripheren Kreislauf. Die inflammatorischen Prozesse im ZNS sind dadurch charakterisiert, dass zwar sowohl zirkulierende Immunzellen der peripheren Abwehr wie Neutrophile und Makrophagen die Blut-Hirn-Schranke überwinden und ins ZNS gelangen aber auch die residenten Zellen, d.h. Mikrogliazellen, Astrozyten und Endothelzellen aktiviert werden. Diese hirnspezifischen Zellen können alle proinflammatorischen Substanzen wie z.B. Zytokine exprimieren, freisetzen und ebenso auf diese über die entsprechenden Rezeptoren reagieren [50]. Die Immunantwort unterscheidet sich folglich von der im peripheren Kreislauf und ist Gegenstand zahlreicher experimenteller und klinischer Studien

geworden um die genauen Abläufe sowie Konsequenzen von Erkrankungen des ZNS zu verstehen. Im Mittelpunkt steht dabei vor allem die Frage ob und wenn ja, welche Faktoren dabei zu einer Schädigung von Neuronen im Sinne einer Degeneration führen und welche protektiv wirken.

Bei der aSAB zeigt sich diesbezüglich, dass eine frühe Erhöhung inflammatorischer Marker mit einem schlechten neurologischen Status, Fieber, Leukozytose, einer erhöhten Permeabilität der Bluthirnschranke, Hirnödemen, einer Thrombose der kleinen Gefäße, der Pathogenese des Vasospasmus sowie DINDS in Zusammenhang stehen [51, 52]. Diese löslichen Gewebemarker sind im Tiermodell nachweislich innerhalb von 24 Stunden nach aSAB erhöht [53], bei Patienten innerhalb von drei Tagen [54, 55]. Eine CRP-Erhöhung im Serum und Liquor von Patienten ist bis zu zwei oder drei Tage nachweisbar und korreliert mit einem niedrigen GCS Wert, hohem Hunt & Hess sowie Fisher Grad und dem Auftreten von verzögertem Vasospasmus [56]. Des Weiteren gibt es bereits mehrere Studien über den Nachweis pro-inflammatorischer Zytokine (IL-1 $\beta$ , TNF, IL-6) im Serum sowie Liquor von Patienten ein bis drei Tage nach aSAB [10, 54, 55]. Hier zeigte sich, dass die Zytokine unter anderem an der Modulation des Gefäßtonus beteiligt sind, indem sie die Synthese von Vasokonstriktoren wie ET-1 induzieren [57]. Zudem fördern sie die Leukozytenadhäsion durch die Expression von Adhäsionsmolekülen [58] und stören die Gefäßpermeabilität [59] sowie Funktion der Bluthirnschranke [60]. Sie sind assoziiert mit der Entstehung eines DIND und ungünstigem *outcome* [61].

### 3.3.1 Die Rolle der Mikrogliazellen im ZNS

Bis zum heutigen Tage gibt es noch keine Studie, in welcher eine Aktivierung von Mikrogliazellen im Anschluss an eine SAB untersucht wurde. Dennoch ist davon auszugehen, dass die Zellen, welche als Vertreter der Immunsystems im ZNS angesehen werden, nicht nur eine Rolle bei der Pathogenese neuronaler Schädigung in Folge eines ischämischen Infarktes spielen sondern ebenso bei der im Rahmen eines hämorrhagischen Infarktes, zu welcher die aSAB zählt.

Von Pio del Rio-Hortega verfasste 1932 eine Beschreibung von Mikrogliazellen, die noch immer äußerst zutreffend ist [62]:

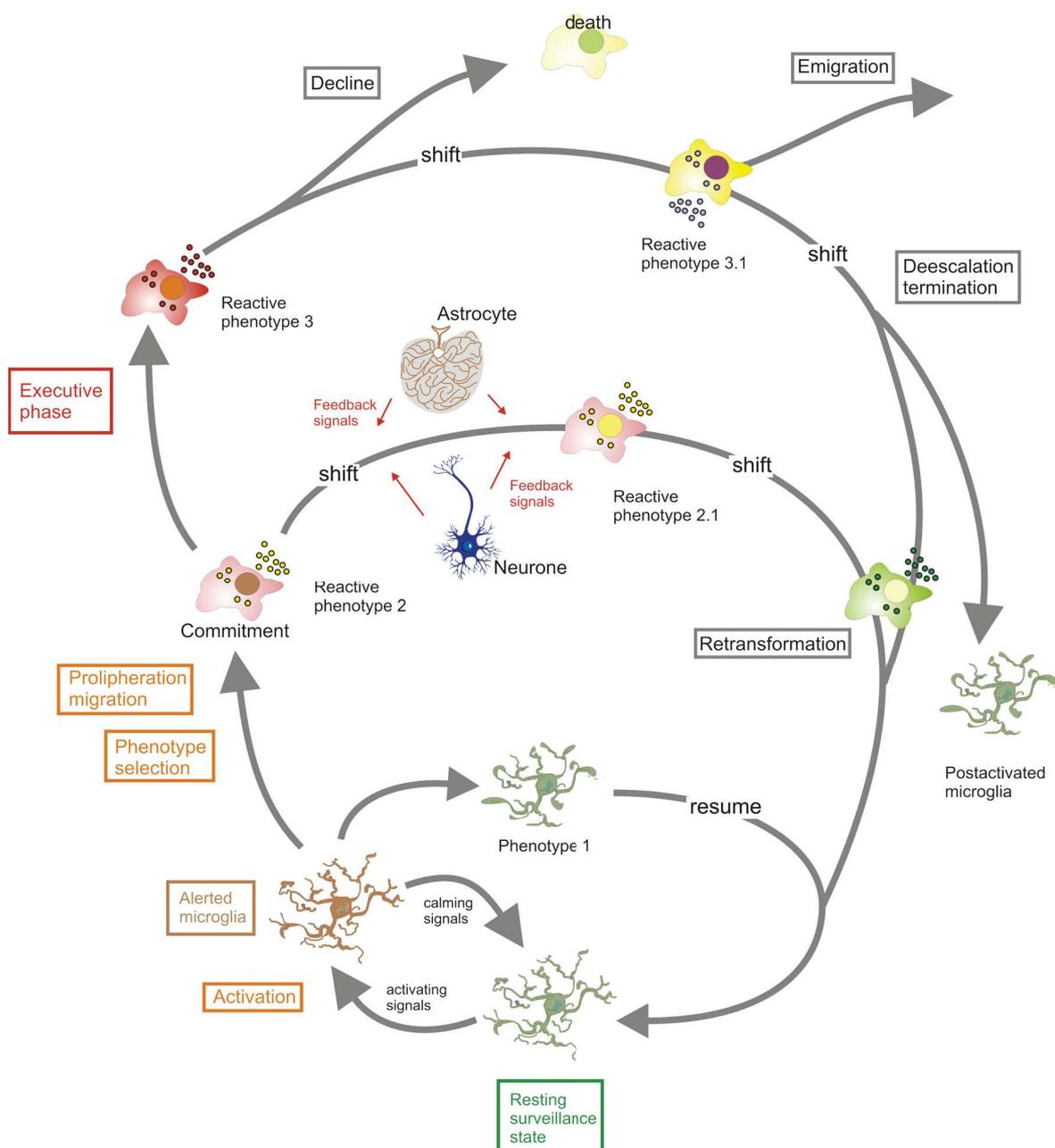
Mikrogliazellen wandern bereits während früher Entwicklungsstufen in das ZNS ein. Sie haben eine amöboide Morphologie und sind mesodermalen Ursprungs. Für ihre

Migration dienen Gefäße und Faserverbindungen als Leitstruktur. Im reifen Gehirn nehmen sie eine verzweigte, verästelte Form an. Im reifen Gehirn sind sie nahezu gleichmäßig über alle Regionen hinweg verteilt und weisen kaum Unterschiede auf. Jede Zelle scheint ein bestimmtes Territorium zu okkupieren. Im Anschluss an pathologische Ereignisse kommt es zu einer Transformation der Zellen. Nach einer Transformation weisen die Zellen eine amöboide Morphologie auf, die der während der frühen Entwicklungsstufen des ZNS ähnelt. Diese Zellen sind nun in der Lage zu migrieren, proliferieren und phagozytieren.

Hinsichtlich der Theorie über den Ursprung von Mikrogliazellen hat sich seit Pio del Rio-Hortega im Wesentlichen nichts geändert. Bei den Vorläuferzellen der Mikrogliazellen handelt es sich um Zellen mesenchymalen und mesodermalen Ursprungs. Jedoch finden sich Hinweise dafür, dass es daneben eine weitere Population von Mikrogliazellen gibt, die sich aus fetalen Makrophagen entwickelt und transformiert. Man spricht von einer Verwandtschaft der Mikrogliazellen mit Makrophagen [63]. Beide Populationen sind jedoch durch die Blut-Hirn-Schranke von einander getrennt. Ähnlich den Makrophagen bei der peripheren Abwehr nehmen Mikrogliazellen eine Funktion als Immunzellen im ZNS ein. Die zerebrale Immunabwehr hat jedoch zusätzlich die wichtige Aufgabe das ZNS vor überschießenden Reaktionen zu schützen. Daher unterliegt die Aktivität der Mikrogliazellen einer besonderen Kontrolle. Aus diesem Grund stehen Mikrogliazellen in ständigem Kontakt mit den Hirnzellen und dem Extrazellularraum ihrer Umgebung und „überwachen“ die strukturelle und funktionelle Integrität des Gehirns. Veränderungen oder Abweichungen führen zu einer Veränderung der Mikrogliazellaktivität, deren Konsequenz verschiedene Funktionszustände sein können. Es besteht folglich kein Aktivierungsmechanismus, den man mit einem Schalter für „An“ und „Aus“ vergleichen kann [64, 65]. Hanisch und Kettenmann beschreiben in einer Veröffentlichung über die Physiologie der Mikrogliazellen 2011 ausführlich die Theorie über ein Zusammenspiel von aktivierenden und hemmenden Faktoren, die als Summe dann über Rezeptoren den Aktivitäts- sowie Funktionszustand bestimmen [63]. Zu den aktivierenden Faktoren zählen sie unter anderem neu auftretende Moleküle wie z.B. Thrombin, das normalerweise intravaskulär vorliegt und sich im Rahmen einer aSAB durch die defekte Blut-Hirn-Schranke im Gehirngewebe anreichern kann. Unter einem hemmenden Faktor verstehen sie dagegen auch Signale, die z.B. von einem Neuron an die Mikrogliazelle gesendet werden und über die sie ständig in Verbindung bleiben. Eine Veränderung oder

Wegfallen dieser Signale würde damit zu einer Aktivitätsänderung führen. Die Liste möglicher Signale ist lang und vielseitig. Allgemein ist bekannt, dass es zu einer Aktivierung und Beteiligung von Mikrogliazellen im Rahmen von Infektion, Trauma, Ischämie, neurodegenerativen Erkrankungen sowie veränderter neuronaler Aktivität kommt. (Abb. 1)

Des Weiteren deuten neueste Ergebnisse darauf hin, dass die Aktivierung von Mikrogliazellen vom Auslöser abhängt. So unterscheidet sich die Mikrogliazellaktivierung durch Stress von einer, die durch eine Infektion oder Entzündung induziert ist [66].



**Abbildung 1:** Die verschiedenen Aktivitätszustände von Mikrogliazellen im Rahmen einer Aktivierung (Kettenmann *et al.* [63])

Momentan wird versucht anhand der Morphologie zu unterscheiden ob ein aktivierte oder ruhende Mikrogliazele vorliegt, da noch immer kein eindeutiger Marker identifiziert werden konnte, der die Aktivitätsunterschiede erkennbar macht.

### **3.3.2 Inflammatorische Zytokine und ihre Rolle im Zentralen Nervensystem**

Die Gruppe der Zytokine setzt sich aus Interferonen, Interleukinen, Tumornekrose Faktoren, Chemokinen und Wachstumsfaktoren zusammen. Es handelt sich um Polypeptide, die im Allgemeinen mit entzündlichen Prozessen, Immunreaktionen und Zelldifferenzierung oder -tod in Verbindung gebracht werden. Obwohl ihre Funktion im Ablauf von inflammatorischen Prozessen im peripheren Kreislauf bereits intensiv erforscht und charakterisiert wurde, ist ihre Rolle im Verlauf sowohl von akuten als auch chronischen ZNS-Erkrankungen nicht endgültig geklärt.

#### **3.3.2.1 Interleukin 1 $\alpha$ und $\beta$**

Die Familie des Interleukin-1 spielt eine wichtige Rolle beim Ablauf von inflammatorischen Prozessen sowie der Körperabwehr. Ursprünglich wurde das Interleukin 1 vor 50 Jahren als endogenes Pyrogen bezeichnet, da es im Versuch mit Hasen fieberähnliche Zustände hervorrief. Im Verlauf stellte sich jedoch heraus, dass das Interleukin aus zwei separaten Liganden bestand, dem Interleukin 1 $\alpha$  (IL1 $\alpha$ ) und  $\beta$  (IL1 $\beta$ ) [67], den beiden prominentesten Vertretern der Familie, die mittlerweile aus zehn Mitgliedern besteht [68]. Es handelt sich um die Produkte verschiedener Gene, die jedoch hinsichtlich ihrer Sequenz eine große Homogenität aufweisen. Abgesehen von Zellen der peripheren Immunabwehr wie den Leukozyten und Makrophagen, sind innerhalb des ZNS nicht nur Mikrogliazellen, Astrozyten sondern auch andere Gliazellen, Neuronen sowie vaskuläre Endothelzellen in der Lage, die beiden Zytokine zu exprimieren und freizusetzen [69].

Sowohl das IL1 $\alpha$  als auch das IL1 $\beta$  werden als Vorläuferproteine synthetisiert, wobei das pro-IL1 $\alpha$  gegenüber dem pro-IL1 $\beta$  bereits biologisch aktiv ist, in der Regel intrazellulär verbleibt und nur beim Zelltod freigesetzt wird [68]. Man geht davon aus, dass beide Zytokine auch unter physiologischen Bedingungen exprimiert werden [70]. Die Synthese selber wird auf den Ebenen der Transkription, Translation, der Proteinspaltung und Zellfreisetzung reguliert. Die Transkriptionsrate wird generell durch

pro-inflammatorische Stimuli erhöht wie bakterielle und virale Produkte, andere Zytokine (insbesondere TNF), Zellschädigung und Hypoxie [71, 72].

Die Wirkung entfalten IL1 $\alpha$  und IL1 $\beta$  über die Bindung an zwei Rezeptoren, IL1R1 und IL1R2. Bei dem IL1R2 handelt es sich jedoch um einen Scheinrezeptor, da ihm eine intrazelluläre Domäne fehlt und damit keine Signaltransduktion stattfinden kann. Er hat folglich eine antagonistische Funktion den IL1-Signalweg betreffend [73]. Binden IL1 $\alpha$  und IL1 $\beta$  jedoch an den IL1R1, kommt es zu einer Anlagerung des akzessorischen IL1R Proteins und zur Initiierung der Signaltransduktion, welche zu einer Aktivierung von MAPK und NF- $\kappa$ B sowie Freisetzung sekundär pro-inflammatorischer Substanzen wie PGE<sub>2</sub>, IL-6 und NO führt. Der IL1R1 ist auf allen Zelltypen, aus denen sich das ZNS zusammensetzt, d.h. sowohl auf Gliazellen, Neuronen als auch Endothelzellen nachweisbar [74].

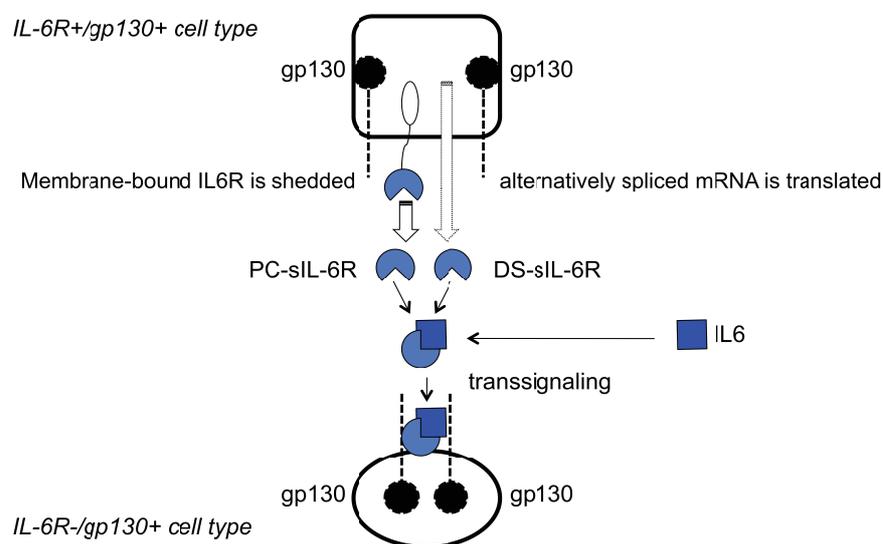
### **3.3.2.2 Interleukin 6**

Das Interleukin 6 (IL6) wurde initial von verschiedenen Forschungsgruppen gleichzeitig beschrieben. Daher ist das Zytokin unter den Bezeichnungen Interferon- $\beta$ 2, B-Zellstimulierender Faktor, B-Zell-Differenzierungs-Faktor und Leberzell-stimulierender Faktor bekannt. Eine Analyse der zugrunde liegenden Gene offenbarte, dass es sich um das gleiche Molekül handelte und die Bezeichnung IL6 setzte sich durch. Ebenso wie IL1 spielt auch IL6 eine zentrale Rolle bei der Regulation inflammatorischer Prozesse, insbesondere bei der antigenspezifischen Immunantwort. In seiner Schlüsselposition bei der Regulation der akuten Immunantwort induziert es die Expression der betreffenden Akute Phase Proteine in Leberzellen, den Abbau von Muskelproteinen und vermittelt eine endokrine Antwort im Rahmen der akuten Immunantwort [75].

Neben Fibroblasten, Endothelzellen, Keratinozyten, Monozyten/Makrophagen, T-Zellen und Mastzellen [75] sind speziell im ZNS die Astrozyten und Mikrogliazellen sowie Neuronen für die Produktion von IL6 verantwortlich [76]. Erhöhte Konzentrationen von IL6 im CSF und Serum werden bei Patienten nicht nur im Rahmen von neurodegenerativen Erkrankungen wie M. Alzheimer und M. Parkinson [77, 78] sondern ebenso in Folge ischämischer Ereignisse, Infektionen, generalisiert tonisch-klonischer Anfälle oder akuter Hirnschädigung beobachtet [76, 79-81]. Neuronen, welche im

Rahmen einer Exzitation geschädigt werden, zeigen in *in vivo* Experimenten eine Hochregulation von IL6 bevor sie degenerieren [82].

IL6 entfaltet seine Wirkung auf eine Zelle, indem es an seinen spezifischen Rezeptor IL6R bindet. Es handelt sich hierbei um das Glykoprotein gp80, das - durch die Bindung von IL6 aktiviert - die Signaltransduktion initiiert, indem es die Dimerisierung der Rezeptoruntereinheit, die von dem Glykoprotein gp130 gebildet wird, bewirkt[83]. Der IL6R wird im Bereich des ZNS hauptsächlich von Neuronen exprimiert [84]. Jedoch gibt es eine weitere Möglichkeit, wie IL6 auch solche Zellen beeinflussen kann, die nicht den spezifischen IL6R besitzen. Die Zellen, welche den IL6R exprimieren, können durch einen alternativen Splicevorgang oder durch Proteinasen die Domäne, welche für die transmembranäre Verankerung notwendig ist, abtrennen und den Rezeptor in löslicher Form freisetzen. Man spricht dann vom sIL6R. Bindet IL6 an den sIL6R, so kann der Komplex an das ubiquitär vorhandene gp130 binden und auch in den Zellen, welche nicht über den spezifischen IL6R verfügen, die für IL6 typische Signaltransduktion induzieren [85]. Bis jetzt ist jedoch noch nicht geklärt, welchen Anteil der sIL6R, der als wichtiger Cofaktor die Bioaktivität von IL6 erhöht, an der eigentlichen Wirkung von IL6 einnimmt.



**Abbildung 2:** IL6-transsignaling; Knüpfer and Preiss[86]

### 3.3.2.3 Tumor Nekrose Faktor

Beim Tumor Nekrose Faktor (TNF) handelt es sich um einen äußerst potenten Vertreter der pro-inflammatorischen Zytokine, welcher an lokalen und systemischen Entzündungen beteiligt ist und hauptsächlich von Makrophagen ausgeschüttet wird. TNF wurde ursprünglich identifiziert und isoliert aufgrund seiner Fähigkeiten eine hämorrhagische Nekrose bestimmter Tumore sowie Kachexie im Rahmen chronischer Entzündungszustände zu induzieren [87]. Mittlerweile wird TNF eine Schlüsselfunktion bei der Regulation der Immunantwort zugesprochen, insbesondere bei der Aktivität verschiedener Immunzellen. TNF ist des Weiteren in der Lage die Apoptose, Nekrose, Zellproliferation, Zellmigration, Zelldifferenzierung und Ausschüttung anderer Zytokine anzuregen [88]. Ferner kann TNF Einfluss auf den Fettstoffwechsel, die Blutgerinnung, die Insulinresistenz und die endotheliale Funktion nehmen [89].

Innerhalb des ZNS sind vor allem die Mikrogliazellen als Quelle des TNF bekannt, wobei andere Gliazellen, Neuronen und Endothelzellen ebenfalls zur Synthese von TNF in der Lage sind [90]. TNF wird als monomeres transmembranäres Protein synthetisiert und als Homotrimer in die Membran integriert (tmTNF). Durch Spaltung, vermittelt über das Matrix Metalloproteinase TNF alpha Konvertierungsenzym (TACE; ADAM 17), entsteht eine lösliche Form des TNF (solTNF). Sowohl die membrangebundene als auch die lösliche Form des TNF ist biologisch aktiv. Ob die lösliche oder die membrangebundene Form bei der TNF-Signaltransduktion überwiegt, hängt vom Zelltyp, der Zellaktivität, den stimulierenden Faktoren, der TACE-Aktivität und dem Vorhandensein von TACE-Inhibitoren ab [91]. Zu den endogenen Inhibitoren der TNF-Synthese zählen Prostaglandine, cAMP [92] und Glukokortikoide, welche produziert werden, wenn infolge hoher TNF-Spiegel die Hypothalamus-Hypophysen-Achse aktiviert wird [93]. Des Weiteren werden anti-inflammatorische Zytokine wie IL4, IL10 und IL13 der Gruppe der endogenen TNF-Inhibitoren zugeordnet [94-96]. In Mikrogliazellen wird die Freisetzung von TNF durch das Chemokin Fraktalkin (CX3CL1-Chemokin) gehemmt. Des Weiteren existiert eine negative Rückkopplung im Sinne einer Autoregulation durch TNF selber. Denn TNF induziert die Synthese von IL10 und wird durch Bindung an TNF-bindende Proteine inaktiviert, bei denen es sich um durch TACE abgespaltete Fragmente der TNF-Rezeptoren handelt.

Die verschiedenen Funktionen von TNF werden durch Bindung des Zytokins an seine spezifischen Rezeptoren vermittelt, den TNF Rezeptor 1 (TNFR1) sowie den TNF Rezeptor 2 (TNFR2). Es handelt sich um membrangebundene Glykoproteine, die sich

zu Trimeren anordnen müssen, bevor die Bindung von TNF erfolgen kann. Diese Trimerisierung wird durch eine cytoplasmatische Schwanzstruktur ermöglicht [97]. Der TNFR1 wird von fast allen Zellen exprimiert und weist eine erhöhte Affinität gegenüber soITNF auf. Dagegen wird der TNFR2 hauptsächlich von Zellen des Immunsystems, inklusive der Mikrogliazellen, von Endothelzellen sowie einigen Neuronenpopulationen synthetisiert und vorzugsweise durch tmTNF aktiviert [98].

Indem TNF den TNFR1 aktiviert sind gegensätzliche Szenarien möglich, Zellproliferation, -aktivierung oder aber Apoptose. Dies erschwert die Beurteilung der Rolle von TNF im Rahmen von akuten und chronischen neurodegenerativen Erkrankungen. Versuche mit Mäusen, die eine veränderte Form von TNF exprimieren, die von TACE nicht aus der Membran freigesetzt werden kann, lassen zumindest den Schluss zu, dass die primär inflammatorischen Reaktionen von TNF über den TNFR1 vermittelt werden [99].

Die Aktivierung von TNFR2 durch TNF induziert inflammatorische sowie überlebensfördernde Mechanismen. Zudem wurde in experimentellen Studien beobachtet, dass über die Bindung von TNF an TNFR2 ebenfalls Phosphatidylinositol 3 - Kinase abhängige Signalwege aktiviert werden, die direkt das Überleben von Neuronen vermitteln [100].

### **3.4 Zielsetzung**

Das Ziel der vorliegenden Promotion bestand darin im Rahmen eines Tierversuchmodells die zellulären Reaktionen und das Ausmaß der neuronalen Schädigung im Zeitverlauf im Anschluss an eine experimentell induzierte aneurysmatischen Subarachnoidalblutung darzustellen. Hierbei stand im Zentrum die Rolle der Mikrogliazellen zu charakterisieren.

In einem ersten Schritt wurde hierbei mit Hilfe von immunhistologischen Färbungen gezeigt, ob es zu einer Akkumulation von Mikrogliazellen und Astrozyten kommt und wie diese sich im zeitlichen Verlauf darstellte. Zudem wurde das Ausmaß der axonalen Schädigung von Neuronen im Zeitverlauf erfasst und in Bezug zum zellulären Akkumulationsmuster gesetzt.

In einem zweiten Schritt wurde die Aktivierung von Mikrogliazellen nach experimentell induzierter Subarachnoidalblutung genauer charakterisiert, indem ein Expressionsprofil inflammatorischer Zytokine erstellt wurde.

Zusammenfassend lässt sich somit festhalten, dass die vorliegende Promotion die inflammatorischen Reaktionen im Anschluss an eine experimentell induzierte Subarachnoidalblutung untersuchte und damit einen Beitrag dazu leistete die nachfolgenden Pathomechanismen mit der Entstehung verzögerter neurologischer Defizite besser zu verstehen.

## 4 MATERIAL UND METHODEN

### 4.1 Material

Die folgenden Tabellen enthalten alle verwendeten Chemikalien (Tab. 1), Puffer und Medien (Tab.2) sowie Reagenzien (Tab. 3).

**Tabelle 1: Chemikalien und Zusätze**

<b>Puffer/ Medien</b>	<b>Firma</b>
Agarose	Sigma-Aldrich
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
Brefeldin A, (5µg/ml)	InvivoGen
BSA	Sigma-Aldrich
DAPI	Sigma-Aldrich
DPX	Sigma-Aldrich
Casein	Sigma-Aldrich
Ethanol	Merck Millipore
Fetales Kälberserum (FKS)	PAA Laboratories
Formaldehyd	Sigma-Aldrich
Hank Salt Solution (HBSS-), ohne Ca <sup>2+</sup> ; ohne Mg <sup>2+</sup>	Biochrom
Hank Salt Solution (HBSS+), mit Ca <sup>2+</sup> ; mit Mg <sup>2+</sup>	Biochrom
Natriumchlorid	Merck Millipore
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich
PBS; pH 7.4	Gibco®
Saponin	Sigma-Aldrich
Triton-X-100	Sigma-Aldrich
Trypanblau	Sigma-Aldrich

**Tabelle 2: Reagenzien**

Reagenz	Firma
Antigen Retrieval Reagent-Universal	R&D
Ethidiumbromidlösung 0,5mg/ml	Promega
DAB (3,3 Diaminobenzidine)	Sigma-Aldrich
Hyperladder™ II	Bioline
MACS® Neuronal Tissue Dissociation Kit	Miltenyi Biotec
NucleoSpin® RNA II	Fisher Scientific
QuantiTect® Reverse Transkription	Quiagen®
QuantiTect SYBR Green PCR Kit	Quiagen®
Streptavidin Horseradish Peroxidase Conjugate	Amersham

**Tabelle 3: Puffer und Medien**

Puffer/ Medien	Zusammensetzung	Firma
BSA/PBS 0,5%; pH 7.4	5g bovine serum albumin (BSA)/1l PBS	PAA Laboratories
Casein 1%	1g Casein/100ml PBS	Sigma-Aldrich
Casein 0,5%	0,5g Casein/100ml PBS	Sigma-Aldrich
DMEM +	DMEM (High Glucose, -L-Glutamin, -Pyruvat,-Phenolrot) + 100 U/ml Penicillin + 100 g/ml Streptomycin + 10% Fötale Kälberserum(FCS) + 50µM 2-Mercaptoethanol	Lonza PAA Laboratories PAA Laboratories Gibco® Invitrogen/ LifeTechnologies
Paraformaldehyd 2%	20g Paraformaldehyd/1l PBS	Sigma-Aldrich
Paraformaldehyd 4%	40g Paraformaldehyd/1l PBS	Sigma-Aldrich
Saponin 0,5%	5g Saponin/1l PBS/BSA	Sigma-Aldrich
Triton 0,3%	300µl Triton-X-100/100ml PBS	Sigma-Aldrich

## **4.2 Methoden**

### **4.2.1 Tierexperimentelle Arbeiten**

#### **4.2.1.1 Mausstamm**

Für die vorliegenden Versuche wurden Mäuse des Stammes C57BL/6N verwendet. Es handelte sich um Tiere weiblichen Geschlechts im Alter von 8-10 Wochen mit einem Gewicht von 20-23g. Die Tiere wurden in Polycarbonat-Käfigen im 12 Stunden-Hell-/Dunkelrhythmus zu maximal 6 Tieren pro Käfig gehalten. Futter und Trinkwasser waren in der Menge nicht beschränkt. Käfige und Trinkwasserflaschen wurden autoklaviert, wobei Wasser und Futter nicht autoklaviert wurden. Es wurde eine tägliche Kontrolle des körperlichen und Verhaltenszustandes der Versuchstiere über den kompletten Zeitraum des Versuchsaufbaus vorgenommen. Fress- und Bewegungsverhalten sowie der Gewichtsverlauf wurden beobachtet und dokumentiert. Bei Auftreten eines übermäßigen Gewichtsverlusts ( $\geq 20\%$ ) sowie bei einer Verschlechterung des Allgemeinzustandes wurden die betroffenen Tiere umgehend getötet, um Schmerzen und Leiden zu verhindern. Es wurden die von der Tierschutzkommission der Landesregierung Berlin genehmigten Rahmenbedingungen für Tierversuche unter der G0240/08 eingehalten.

#### **4.2.1.2 Induktion der SAB bei der Maus**

Die Mäuse sind durch intraperitoneale Injektion von 66mg/kg Ketavet<sup>®</sup> (50mg/ml Ketaminbase) und 3,3 mg/kg Rompun<sup>®</sup> (20mg/ml Xylazine-Hydrochlorid) in Narkose versetzt worden. Nachdem eine ausreichend tiefe Narkose erreicht wurde, wurde die Operation begonnen. Die Narkosetiefe wurde hierbei durch Überprüfung des Zwischenzehenreflexes und des Whisker-Reflexes beurteilt. Über eine rückkopplungsgesteuerte Heizplatte und rektale Temperaturmesssonde wurde die Körpertemperatur auf 36.7°C reguliert, um ein Auskühlen des Tieres während der operation zu verhindern. Zum Augenschutz während der Sedierung wurde Bepanthen<sup>®</sup> Augensalbe (Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) verwendet. Nach Rasur, Desinfektion und Abdecken des Operationsbereiches wurde über einen Mittellinienschnitt oberhalb des Jugulums der Präparationsschritt eingeleitet. Die anatomische Darstellung der so freigelegten A. carotis communis sowie der A. carotis interna und externa erfolgte unter einem Operationsmikroskop (Zeiss, Deisenhofen,

Deutschland). Im Anschluss wurde die A. carotis externa unterbunden und durchtrennt. Der Blutfluss wurde kurzzeitig durch Anbringen von Clips an die A. carotis communis und interna unterbrochen. Dies ermöglichte den Übergang in den Induktionsschritt für das Auslösen der SAB, welcher daraus bestand über den entstandenen A. carotis externa-Stumpf einen 13mm langen Polyethylen-Faden mit stumpfer Spitze (Monofiles Nahtmaterial [Stärke 5-0]) vorsichtig in die A. carotis interna vorzuschieben. Nach Durchtritt durch die Schädelbasis bei 5-6mm, wurde der Faden nach Abgang der A. cerebri media bei 8-9mm in die subarachnoidal verlaufende A. cerebri anterior geführt und damit die Gefäßwand perforiert. Das Auftreten einer charakteristischen Atemveränderung markierte die erfolgreiche Induktion einer Subarachnoidalblutung. Anschließend wurde zunächst der Stumpf der A. carotis externa und abschließend die Halsnarbe mittels Primärnaht der Haut verschlossen.

#### **4.2.1.3 Intrakardiale Perfusion**

Um die Gehirne für die nachfolgenden Versuche zu gewinnen, wurden die Mäuse in eine tiefe Narkose gelegt und eine intrakardiale Perfusion durchgeführt. Zunächst erfolgte hierbei die Eröffnung der Brust- und Bauchhöhle zur Darstellung des Herzens und der abdominellen Aorta sowie Vena cava. Im Anschluss wurde eine Kanüle ( $\varnothing 27\text{mm}$ ) in den linken Ventrikel des Herzens eingeführt. Der rechte Vorhof wurde inzidiert, um einen venösen Ausstrom zu gewährleisten. Daraufhin wurden die Mäuse langsam und mit konstanter Geschwindigkeit mittels einer Spritze perfundiert. Für die Perfusion wurden jeweils zwei unterschiedliche Lösungen verwendet. Um Zellen für die Mikrogliaaufreinigung bzw. FACS-Färbungen zu gewinnen wurden die Tiere mit eiskaltem PBS perfundiert, damit ein Überleben der Zellen gewährleistet wurde. Für die Analyse mittels Immunfluoreszenz bzw. für die Immunhistochemie hingegen wurden die Mäuse mit Paraformaldehyd (PFA) durchspült, um eine Vorfixierung des Gehirns zu erhalten.

Die Entnahme der Gehirne erfolgte an Tag 2, 4, 14 und 28 bzw. an Tag 5, 14 und 28 im Anschluss an die Induktion einer SAB. Für eine schonende Präparation wurde die Schädeldecke freigelegt und mit Hilfe einer mikrochirurgischen Klemme sowie Schere eröffnet. Daraufhin wurden die Gehirne jeweils mit einer mikrochirurgischen anatomischen Pinzette präpariert und entnommen.

## 4.2.2 Zellkultur

### 4.2.2.1 Gehirnzellsuspension

Im Anschluss an die intrakardiale Perfusion wurden die gewonnenen Gehirne für die Herstellung einer Gehirnzellsuspension in kleine Schälchen mit jeweils 1ml kaltem HBSS w/o Puffer überführt und auf Eis gelagert. Da laut Protokoll des Herstellers eine Gehirngewebeprobe das Gewicht von 400mg für die Homogenisierung nicht übersteigen durfte, wurden Cerebellum sowie Bulbus olfactorius entfernt. Für die Zellisolierung wurden jeweils zwei SAB Gehirnhälften zu einer Probe zusammen gefügt, um die Ausbeute an Zellen zu erhöhen. Als Kontrollen wurden die betreffenden Gehirnhälften aus naiven Mäusen verwendet. Bezüglich der FACS Analysen wurde jeweils eine Hemisphäre pro Probe bzw. Zellsuspension verwendet. Alle nachfolgenden Schritte mit dem Ziel der Gewinnung einer Zellsuspension wurden an einer sterilen Arbeitsbank und unter Verwendung des MACS<sup>®</sup> Neural Tissue Dissociation Kits (Miltenyi Biotec) durchgeführt. Zunächst erfolgte die mechanische Zerkleinerung der Gehirngewebeproben mit Hilfe eines Skalpells. Die Proben wurden in HBSS w/o Puffer gewaschen, in 15ml Falcon tubes überführt und bei 1300rpm für 2 Minuten bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Nach dem Absaugen des Überstandes wurde jeder Probe 1950µl des vorgewärmten Enzymmix 1 (nach Vorgaben des Herstellers) beigemischt. Anschließend wurden die Proben zehnmal invertiert und für 15 Minuten im Wasserbad bei 37°C inkubiert, wobei das zehnmahlige Invertieren alle 5 Minuten wiederholt wurde. Anschließend wurde der Enzymmix 2 (pro Probe: 20µl Solution 3 + 10µl Solution 4) hinzu gegeben. Auf ein fünfmaliges Invertieren erfolgte ein weiterer Schritt mechanischer Zerkleinerung. In diesem Fall wurden die Gewebeproben mit einer Glaspasteurpipette, dessen Öffnung durch Hitzeeinwirkung im Voraus sowohl abgerundet als auch geringfügig verkleinert wurde, vorsichtig resuspendiert. Daraufhin wurden die Proben wiederum für 10 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert und alle 5 Minuten zehnmal invertiert. Nachfolgend wurden die verbliebenen Zellklumpen in der Probe mit einer Pasteurpipette, deren Öffnung deutlich enger war, vollständig resuspendiert. Es erfolgte im Anschluss eine erneute Inkubation von 10 Minuten bei 37°C im Wasserbad sowie zehnmahliges Invertieren alle 5 Minuten. Nach Beendigung der Inkubation wurden die gewonnenen Zellsuspensionen mittels eines Pre-SepFilters (30µM) gefiltert, mit HBSS w Puffer gewaschen und bei 1300rpm (Raumtemperatur) für 10 Minuten zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstands folgten zwei Waschschr

Im Ersten wurden jeder Probe 10ml PBS/BSA hinzugefügt und das Pellet durch Anschpinsen resuspendiert. Daraufhin fand ein Zentrifugationsschritt, 1300rpm bei RT für 10 Minuten, statt. Im Anschluss an das Absaugen des Überstandes erfolgte der zweite Waschschrift mit 5ml kaltem PBS/BSA.

#### **4.2.2.2 Restimulation und Fixierung von Zellen**

Ein Teil der hergestellten Gehirnzellsuspensionen wurde für die Evaluation der Zytokinexpression auf Proteinebene mittels einer FACS Analyse verwendet. Hierfür wurden die gewonnenen Zellen in 1ml „DMEM+“ Medium unter Zusatz von 1µg/ml LPS sowie 5µg/ml Brefeldin A aufgenommen und für 5 Stunden bei 37°C inkubiert. Hierbei diente LPS als zusätzlicher Stimulus für die Zytokinproduktion, während Brefeldin A einen Sekretionsinhibitor darstellt und somit die in der Zelle produzierten Zytokine in der Zelle zurückgehalten werden. Alternativ wurde nur Brefeldin A den Zellen zugesetzt, d.h. die Zellen wurden keinem zusätzlichen Stimulus zur Zytokinproduktion ausgesetzt. Um die Zellen anschließend zu fixieren, wurden diese zunächst in PBS gewaschen, um Fremdproteine zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen in 2%iger Formaldehydlösung für 20 Minuten bei RT inkubiert, mit PBS/BSA gewaschen und dann in diesem Puffer bei 8°C gelagert. Diese Proben wurden für intrazelluläre Färbungen verwendet.

#### **4.2.2.3 Mikrogliazellisolierung**

Die Mikrogliazellisolierung aus den gewonnenen Zellsuspensionen beruhte auf dem Prinzip der Markierung CD11b-positiver Zellen mit magnetischen Partikeln, welche an Antikörper, die gegen CD11b gerichtet sind, gebunden sind. Die mit dem Antikörper verabreichte Zellsuspension wurde auf eine Säule geladen, deren Hals in einem magnetischen Feld platziert war. Auf diese Weise wurden die CD11b-positiven Zellen zurückgehalten, während die CD11b-negativen Zellen die Säule passierten. Im Anschluss an die Entfernung des Magnetfelds konnten die CD11b-positiven Zellen aus der Säule als positiv selektionierte Fraktion eluiert werden. Um ausreichend Ausgangsmaterial zu haben, wurden dabei jeweils Suspensionen aus sechs SAB-Hemisphären zusammengefasst. Die Kontrollgruppe bestand aus sechs Hemisphären naiver Mäuse. Vor Beginn der Zellisolierung wurden jeder Zellsuspension Zellen für

eine FACS-Analyse abgenommen. Anschließend erfolgte ein Zentrifugationsschritt bei 1300rpm und 4°C für 7 Minuten. Der Überstand wurde nicht vollständig verworfen, sondern es wurde ein Restüberstand erhalten, in welchem das Pellet resuspendiert wurde. Nun erfolgte die Markierung der Mikroglia/Makrophagen-Fraktion. Dies wurde durch Antikörper gegen CD11b ermöglicht, an die magnetische Nanopartikel (CD11b Microbeads) gekoppelt waren. Hierbei wurde die Zellsuspension auf 1350µl mittels kaltem PBS/BSA eingestellt und 150µl der CD11b Microbeads hinzugefügt. Die Zellen wurden für 15 Minuten im Kühlschrank inkubiert. Kurz zuvor wurde die Säule (LS) in die magnetische Halterung gespannt und mit 3ml PBS/BSA kalibriert. Die verwendeten Materialien waren bereits auf 4°C gekühlt worden. Die Zellsuspension wurde im Anschluss an die Inkubation auf die Säule gegeben. Die Säule wurde dreimal mit 500µl PBS/BSA gewaschen. Zur Elution wurde die Säule aus der Halterung entfernt und in ein 15ml Falcon® gestellt. Die Elution erfolgte mit 5ml PBS/BSA durch Herunterdrücken des durch den Hersteller beigefügten Stempels. Anschließend wurde eine weitere Säule (MS) in die passende magnetische Halterung gespannt und mit 500µl PBS/BSA kalibriert. Die zuvor eluierte Zellfraktion wurde auf die Säule gegeben. Es folgten wieder 3 Waschschriffe mit jeweils 500µl PBS/BSA. Die CD11b-positiven Zellen wurden mit 1ml PBS/BSA durch Herunterdrücken des Stempels eluiert. Nun stand eine CD11b positive Zellfraktion für die RNA-Isolierung zur Verfügung. Des Weiteren wurden Zellen für eine FACS-Analyse abgenommen, um die Reinheit der isolierten Zellen zu überprüfen.

#### **4.2.2.4 Zellzahlbestimmung**

Für die Bestimmung der Anzahl gewonnener CD11b-positiver Zellen wurde jeweils ein Aliquot von 10µl entnommen und mit 90µl Trypanblau vermenget. Trypanblau färbt hierbei die bereits abgestorbenen Zellen blau an, da sie den Farbstoff durch ihre zerstörte Plasmamembran aufgenommen haben. 10µl dieser Verdünnung wurden auf eine Neubauer-Zählkammer pipettiert und im Lichtmikroskop/Phasenkontrast mit 10-facher Vergrößerung 16 Felder, die in 4 Großquadrate unterteilt waren, ausgezählt. Dabei wurden nur die farblosen, lebenden Zellen ausgezählt. Die durchschnittliche Anzahl von Zellen eines Großquadrats wurde dann mit dem Kammerfaktor ( $\times 10^4$ ) multipliziert. Zusätzlich musste der Verdünnungsfaktor von 10 berücksichtigt werden. Die Formel zur Bestimmung der Zellzahl:  $\text{Anzahl} \times 10^4 \times 10 = \text{Zellzahl /ml}$ .

### **4.2.3 Durchflusszytometrie (FACS)**

#### **4.2.3.1 Prinzip der Durchflusszytometrie**

Die Durchflusszytometrie erlaubt es, Zellen auf Einzelzellebene zu analysieren, die zuvor mit Fluorochrom-Antikörperkonjugaten markiert worden sind. Daher wird diese Form der Durchflusszytometrie auch als FACS bzw. „fluorescence-activated cell sorting“ bezeichnet. Hierbei passieren die markierten Zellen nacheinander in einem hydrodynamisch fokussierten Flüssigkeitsstrom drei Laserstrahlen: einen blauen Argonlaserstrahl (488 nm, air-cooled), einen roten Helium-Neon-Laserstrahl (633nm) sowie einen violetten Halbleiterlasersrahl (405-nm). Zum einen werden dabei die Fluorochrome zur Emission von Fluoreszenzlicht angeregt und zum anderen das auf die Zellen treffende Licht gestreut. Die Streuungseigenschaften werden durch die Parameter FSC (Vorwärtsstreulicht) und SSC (Seitwärtsstreulicht) beschrieben. Das in einem geringen Winkel von 3°-10° gestreute Licht wird als Vorwärtsstreulicht bezeichnet und korreliert mit der Zellgröße, während das um 90° reflektierte Licht das Seitwärtsstreulicht darstellt und ein Maß für die Granularität der Zelle ist. Mit Hilfe von sieben Photovervielfältigerröhren (Photomultiplier tubes, PMT) werden Streulicht und emittierte Fluoreszenz in elektrische Signale umgewandelt und als Messdaten gespeichert. DAPI (4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid) wurde verwendet, um tote von lebenden Zellen unterscheiden und nachfolgend von der Analyse ausschließen zu können. Der Fluoreszenzfarbstoff bindet dabei an A-T reiche Regionen der DNA. Zudem korreliert die Intensität der Färbung mit der Permeabilität der Zell- sowie Kernmembran. Bei der Messung wurden FSC- und SSC-Signale mit linearer und Fluoreszenzsignale mit logarithmischer Verstärkung aufgenommen. Durch das Setzen von Analysefenstern konnten die gewünschten Zellpopulationen analysiert werden. Die Messungen wurden am BD FACSCanto II (BD Bioscience) durchgeführt und die Analyse der Daten erfolgte mit der FlowJo Software (Tree Star Inc. Ashland).

#### **4.2.3.2 Oberflächenfärbung**

Zum Färben von Oberflächenantigenen wurden die gewonnenen Einzelzellsuspensionen für 20 Minuten auf Eis mit den entsprechenden Antikörperkonjugaten in optimierter Konzentration inkubiert. Anschließend wurden die Zellen nach einem Waschschrift mit Puffer in 300-600µL PBS/BSA aufgenommen und standen fürs FACS zur Verfügung. Kurz vor der Messung wurden 10µl/ml DAPI

hinzugegeben, um die toten Zellen anzufärben und folglich von den lebenden Zellen unterscheiden zu können.

**Tabelle 4: Antikörper zum Färben von Obeflächenantigenen**

Epitop-Fluorochrom	Klon	Herkunft	Verdünnung	Bezugsquelle
<i>Primärantikörper</i>				
CD11b-FITC	M1/70	Ratte	1:100	BD Bioscience
CD45-APC	30-F11	Ratte	1:100	BioLegend
CD126 (IL-6 R $\alpha$ chain)-PE	D7715A7			BioLegend
<i>Sekundärantikörper</i>				
Cy3		Ratte	1:200	DIANOVA

#### 4.2.3.3 Intrazelluläre Färbung

Die Färbung von intrazellulären Molekülen erforderte die Permeabilisierung der Zellmembranen mit dem Detergenz Saponin (0,5% in PBS/BSA), um ein Eindringen der betreffenden Antikörper in den Intrazellulärraum zu ermöglichen. Auf Grund dessen wurden die restimulierten und fixierten Zellen mit Saponinpuffer gewaschen und anschließend mit der Antikörper-Saponinlösung für 20 Minuten bei RT inkubiert. Dann erfolgte ein erneuter Waschschrift mit dem Saponinpuffer, woraufhin die Zellen in 300-700 $\mu$ L PBS/BSA aufgenommen und anschließend durchflusszytometrisch analysiert wurden. Dabei ist zu beachten, dass in diesem Fall die Zelltrümmer nur durch das Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht ausgeschlossen werden konnten, da aufgrund der Fixierung alle Zellen als „tot“ zu deklarieren waren.

**Tabelle 5: Antikörper für die intrazelluläre Färbung**

Epitop-Fluorochrom	Klon	Herkunft	Verdünnung	Bezugsquelle
IL-6-PE	MP5-20F3			BD Bioscience
TNF-PE	MP6-XT22			BD Bioscience
Iba 1		Hase	1:100	Wako

#### 4.2.4 Morphologische und Histologische Methoden

##### 4.2.4.1 Vorbereitung / Fixierung der Gehirne und Anfertigung von Kryoschnitten

In Abhängigkeit von der Färbemethode erfolgte die Fixierung der Gehirne in zwei unterschiedlichen Verfahren. Für die immunhistologische Färbung von GFAP, APP und Iba1 wurden die Gehirne in Paraffin eingebettet und bei RT gelagert. Im Hinblick auf die Immunfluoreszenzfärbung von Iba 1 sowie von der Kolo-kalisation mit IL-6 wurden die Gehirne jedoch zunächst für 24 Stunden bei 4°C in 4%igem Paraformaldehyd/PBS fixiert. Durch osmotische Dehydrierung mit Hilfe einer 30%igen Saccharoselösung wurde der Entstehung gewebeschädigender Eiskristalle im Tiefkühlungsprozess mittels flüssigen Stickstoffs vorgebeugt. Die Lagerung der schockgefrorenen Gehirne erfolgte bei -80°C.

Für die Anfertigung von Schnitten am Kryostaten (Microm) wurden die Gehirne dann in einem Eindeckmedium (tissue tek®) eingebettet und auf eine Schneidetemperatur von -26°C äquilibriert. Die Schnittdicke betrug 10µm. Die Schnitte, welche auf „Menzel Superfrost plus“ - Objektträger aufgezogen wurden, sind aus folgenden Ebenen des Gehirns gewonnen worden:

(Bregma; Leitstruktur: Commissura anterior)

- E1 Bregma -0,6 bis -1,0mm; Leitstruktur: Thalamus, Hypothalamus
- E2 Bregma -1,2 bis -1,6mm; Leitstruktur: Beginn der Hippocampus-Formation, Hypothalamus, Thalamus
- E3 Bregma -2,1 bis -2,5mm; Leitstruktur: Hippocampus-Formation

##### 4.2.4.2 Immunhistologie

Das Prinzip der Immunhistologie besteht darin, dass definierte Strukturen einer Zelle mit Hilfe von markierten Antikörpern, welche spezifisch an ihr Antigen binden, sichtbar gemacht werden.

Hierfür wurden die Gehirnschnitte zunächst jeweils zweimal für 5 Minuten in Xylol und Aceton entparaffiniert. Die Blockierung der Peroxidaseaktivität erfolgte mittels 1%igem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/Methanol-Gemisch für 20 Minuten. Im Anschluss wurden die Schnitte mit Aqua bidest. gewaschen und 30 Minuten bei RT mit dem Blockierungspuffer 10%igem FKS/PBS inkubiert. Daraufhin erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper für 1 Stunde bei 37°C. Danach wurden zwei weitere Waschschrirte mit PBS durchgeführt, bevor die Inkubation mit dem Sekundärantikörper für eine Stunde bei RT erfolgte.

Anschließend wurde das Streptavidin-HP-Konjugat für 1 Stunde hinzugegeben und die Schnitte mit DAB für 3 Minuten gefärbt. Abschließend wurden diese mit Hämalaun gegengefärbt, dehydriert und mit DPX eingedeckelt.

**Tabelle 6: Antikörper für die Immunhisto-Analysen**

Epitop-Fluorochrom	Klon	Herkunft	Verdünnung	Bezugsquelle
<i>Primärantikörper</i>				
Iba 1		Hase	1:100	Dako
GFAP	polyklonal IgG	Hase	1:1000	Dako
APP	polyklonal IgG	Maus	1:800	Millipore
<i>Sekundärantikörper</i>				
Biotin-gek. anti-Hase AK	polyklonal IgG	Ziege	1:100	Sigma Aldrich
Biotin-gek. anti-Maus AK	polyklonal IgG	Ziege	1:100	Sigma Aldrich

#### 4.2.4.3 Immunfluoreszenzfärbung

Wird bei einer immunhistologischen Färbung ein Antikörper verwendet, an den ein Fluoreszenzfarbstoff gebunden ist, spricht man von einer Immunfluoreszenzfärbung. Der Fluoreszenzfarbstoff strahlt dabei Licht einer definierten Wellenlänge ab, sobald er im Rahmen der Immunfluoreszenz-Mikroskopie mit Licht einer bestimmten Wellenlänge beleuchtet wird. Auf diese Weise ist es ebenfalls möglich, definierte Strukturen sichtbar zu machen.

Als Vorbereitung auf die Färbung von Iba1 wurden die Gefrierschnitte zunächst für 5 bis 10 Minuten bei RT getrocknet und mit einem Fettstift (Dako-Pen) umrandet. Im Anschluss an einen Wachsritt mit PBS erfolgte die Inkubation für 30 Minuten bei RT mit dem Blockierungs- sowie Permeabilisierungspuffer, welcher aus 5%igem Eseserum und 0,1% Triton in PBS bestand. Danach erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper für 2 Stunden bei RT. Daraufhin wurden zwei weitere Waschschrte mit 1%igem Casein/PBS durchgeführt, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper für weitere 2 Stunden bei RT. Abschließend wurden zwei Waschschrte mit PBS und ein dritter mit Wasser durchgeführt, bevor die Schnitte mit DAPI-Eindeckmedium eingebettet wurden. Bis zur zeitnahen Analyse am Mikroskop wurden die Präparate lichtgeschützt bei 4°C gelagert.

**Tabelle 7: Antikörper für die Immunfluoreszenzfärbung**

Epitop-Fluorochrom	Klon	Herkunft	Verdünnung	Bezugsquelle
<i>Primärantikörper</i>				
Iba 1		Hase	1:150	Wako
<i>Sekundärantikörper</i>				
anti-Hase DyLight 488	polyklonal IgG	Esel	1:200	dianova

#### 4.2.4.4 Optimierung der Antigenerkennung (Antigen Retrieval)

Die Färbung der Koloaktion von Iba1 und IL6 erforderte eine hitzeinduzierte Freilegung der durch Querverbindungen des Paraformaldehyds fixierten Antigene. Nach einem initialen Waschschrift von 5min, wurden die Schnitte bei 95°C für 1,5min in einer „Antigen Retrieval Solution“ (R&D Systems) unter kontinuierlicher Kontrolle der Temperatur gekocht. Hatten die Schnitte im Anschluss wieder die Temperatur der Umgebung angenommen, wurden sie aus der Lösung in eine Küvette mit Aqua bidest. überführt und für 7 Minuten auf einem Schüttler inkubiert. Dieser Schritt wurde mit PBS wiederholt. Dann erfolgte die Blockierung mit einer 1%igen Casein-Lösung für 30min bei Raumtemperatur. Die Primärantikörper wurden zusammen in 0,5%igem Casein/PBS verdünnt. Die Inkubation erfolgte für 2 Stunden bei Raumtemperatur. Nach Abschluss der Inkubation wurden drei Waschschriffe mit PBS für jeweils 5 Minuten durchgeführt, bevor die Schnitte mit den jeweiligen Sekundärantikörpern, welche ebenfalls zusammen in 0,5%igem Casein/PBS verdünnt wurden, versetzt wurden. Nach 2 Stunden wurden die Schnitte wiederum dreimal mit PBS für jeweils 5min gewaschen und abschließend mit einem Eindeckmedium, welches den Zellkernfarbstoff DAPI enthielt, unter Glasplättchen versiegelt. Die Lagerung erfolgte lichtgeschützt bei 4°C.

**Tabelle 8: Antikörper für die Immunfluoreszenzfärbung mit Antigen Retrieval**

Epitop-Fluorochrom	Klon	Herkunft	Verdünnung	Bezugsquelle
<i>Primärantikörper</i>				
Iba 1	polyklonal IgG	Ziege	1:100	abcam
IL-6	polyklonal IgG	Hase	1:200	abcam
<i>Sekundärantikörper</i>				
anti-Hase DyLight 488	polyklonal IgG	Esel	1:200	dianova
anti-Ziege DyLight 594	polyklonal IgG	Esel	1:200	dianova

## **4.2.5 Genexpressionsanalyse**

### **4.2.5.1 RNA Extraktion**

Die RNA wurde mit Hilfe eines RNA Extraktions Kit (NucleoSpin® RNA II, Fisher Scientific, UK) aus der CD11b positiven Zellfraktion nach dem Protokoll des Herstellers extrahiert und anschließend bei -80°C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert. Die Menge der RNA wurde bestimmt, indem die Absorption bei 260nm und 280nm gemessen wurde. Die Reinheit der RNA wurde durch Überprüfung der 260/280 Ratio gewährleistet (Bereich 1,8-2,0).

### **4.2.5.2 Herstellung der cDNA**

Durch die Reverse Transkription wird mRNA in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben, die dann als Vorlage für eine quantitative Real-time PCR eingesetzt werden kann. Die cDNA wurde mittels des QuantiTec® Reverse Transcription Kit (Quiagen) hergestellt. Dieses Kit beinhaltet die Durchführung zweier Reaktionsschritte. Ein erster Schritt bewirkt die Eliminierung genomischer DNA. Der zweite Schritt besteht aus der Reversen Transkription, der Umschreibung der RNA in cDNA,. Jeweils 12µl der extrahierten RNA wurden zunächst zusammen mit 2µl „gDNA Wipeout Buffer“ für 2 Minuten bei 42°C im iCycler (Bio-Rad, München) inkubiert, um die eventuell noch vorhandene genomische DNA zu entfernen. Die Durchführung der Reversen Transkription erfolgte im Thermo-Cycler (Biometra), gemäß den Protokollen des Herstellers. Hierfür wurden 1µl „Quantiscript Reverse Transcriptase“, 4µl „Quantiscript RT Buffer“ sowie 1µl „RT Primer Mix“ hinzu gegeben. Das ergab ein Volumen von 20µl je Probe. Im iCycler erfolgte daraufhin die reverse Transkription der RNA zu cDNA nach folgendem Protokoll: 30 Minuten bei 42°C (Amplifikation) und 5 Minuten bei 95°C (Denaturierung). Nach Abschluss der Reaktion wurde die Temperatur auf dem Niveau von 4°C gehalten. Die cDNA wurde bei -20°C gelagert.

### **4.2.5.3 Argarosegelelektrophorese**

Der Nachweis der Genprodukte erfolgte in einem 2%igen Agarosegel in einer Horizontalelektrophorese. Nach Abwiegen von 3g Agarosepulver in einem Erlenmeyerkolben, wurden 150ml 1x TAE-Puffer hinzugefügt. Um die Agarose in Lösung zu bringen, musste der Gelansatz in der Mikrowelle aufgekocht werden. Der

heißen Lösung wurden 150µl Ethidiumbromidlösung (0,5mg/ml) beigemischt. Die entsprechende Gelform wurde an den offenen Seiten mit Gummienden verschlossen und je nach gewünschter Trennstrecke ein oder zwei Taschenformer in der Gelform platziert. Mit einer Wasserwaage wurde die Form ausgerichtet. Die etwas erkaltete Agaroselösung wurde in die vorbereitete Gelform gegossen. Das angefertigte Agarosegel wurde in die Elektrophoreseapparatur gelegt. Diese wurde mit 1x TBE-Puffer gefüllt, bis das Gel komplett bedeckt war. Die Proben wurden mit 5x Gelbeladungspuffer versetzt, so dass daraus eine einfache Pufferkonzentration resultierte. Durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren wurde die Probe gemixt und in die geformten Taschen des Gels gefüllt. Das aufgetragene Probenvolumen lag bei 10µl. Zur Bestimmung der Länge der Fragmente wurde ein Längenstandard (Hyperladder™ II, Bioline) verwendet. Während der Elektrophorese war anhand der Farbstoffe Bromphenolblau des Gelbeladungspuffers die zurückgelegte Strecke zu beobachten. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 110V für 20 Minuten durchgeführt.

#### 4.2.5.4 Semiquantitative Realtime-PCR (qRT-PCR)

Bei der Realtime-PCR handelt es sich um eine Methode zur Quantifizierung von Nukleinsäuren. Mit ihrer Hilfe wurde ein Zytokinexpressionsprofil von den aus den SAB-Gehirnen isolierten Mikrogliazellen erstellt im Vergleich zu naiven Kontrollen. Es wurde hierbei die Expression der Zytokine Interleukin 1 alpha, Interleukin 1 beta, Tumor Nekrose Faktor, Interleukin 6 sowie der zugehörigen Rezeptoren IL1R1, IL1R2, IL6R, TNFR1 und TNFR2 auf der Ebene der mRNA in der CD11b positiven Zellfraktion relativ im Vergleich zu einer Kontrollgruppe, welche aus naiven Gehirnen gewonnen wurde, quantifiziert. Die anhand der cDNA-Sequenz generierten Primer wurden nach Überprüfung der Spezifität durch „primer blast“ mit dem Programm „Primer3“ entworfen.

**Tabelle 9: Primer**

Spezifität		Sequenz	Bezugsquelle
IL-1 α	forward	5'-GGCTCACTTCATGAGACTTGC-3'	TIB MOLBIOL
	reverse	5'-AGGTGTAAGGTGCTGATCTGG-3'	
IL-1 β	forward	5'-ATCACTCATTGTGGCTGTGG-3'	
	reverse	5'-CATCTCGGAGCCTGTAGTGC-3'	
IL-1 R 1	forward	5'-GCAGAACCACCTCTGAGACC-3'	

	reverse	5'-GAGTAGGCAGAGATCGGAAGG-3'	
IL-1 R 2	forward	5'-GCGGACAATGTTTCATCTTGC-3'	
	reverse	5'-CTGGAGATGTCGGAGTGAGG-3'	
IL-6	forward	5'-GACTGATGCTGGTGACAACC-3'	
	reverse	5'-TTCTGCAAGTGCATCATCG-3'	
IL-6 R $\alpha$	forward	5'-ATAGCCTGTCCATGCTCTGC-3'	
	reverse	5'-ACTGTGGCTCTGTGGTCTCC-3'	
TNF	forward	5'-GACAGTGACCTGGACTGTGG-3'	
	reverse	5'-TCTGTGAGGAAGGCTGTGC-3'	
TNF R SF 1A	forward	5'-CTGTATGCTGTGGTGGATGG-3'	
	reverse	5'-CCACTACTTCCAGCGTGTCC-3'	
TNF R SF 1B	forward	5'-CAGTTGCAGGTCAAGTGAGG-3'	
	reverse	5'-CTGCAGTGTGAGCATTGAGG-3'	
GAPDH	forward	5'-CCAGCCGAGCCACATCGCTC-3'	
	reverse	5'-ATGAGCCCCAGCCTTCTCCAT-3'	

Nach Extrahierung der RNA und reverser Transkription zu cDNA unter Anwendung der bereits beschriebenen Protokolle wurde die Realtime PCR unter Einsatz des QuantiTect SYBR Green PCR Kits (Quiagen<sup>®</sup>) durchgeführt. Das Gesamtreaktionsvolumen betrug 25,5  $\mu$ l und setzte sich aus 12,5  $\mu$ l SYBR Green Mastermix, 5  $\mu$ l cDNA (50 g/ $\mu$ l), 1,25  $\mu$ M Forward Primer sowie 1,25  $\mu$ M Reverse Primer für die entsprechenden Gene zusammen. Der PCR-Zyklus bestand aus einer fünfzehnminütigen Denaturierung bei 95°C, gefolgt von 40 Zyklen fünfzehnsekündigen Denaturierungsschritten bei 95°C, einem dreißigsekündigen Annealingschritt bei 58°C und einem dreißigsekündigen Extensionsschritt bei 72°C. Alle SAB- sowie Kontroll-Proben wurden in Triplikaten durchgeführt um Pipettierfehler identifizieren zu können. Grundlage für die Quantifizierung während der Datenanalyse bildete die unspezifische Bindung des Fluoreszenzfarbstoffs SYBR Green an die doppelsträngige DNA und damit an die Amplifikate, d.h. die Intensität des Fluoreszenzfarbstoffs verhielt sich proportional zur neugebildeten DNA-Menge.

Damit eine semiquantitative Expressionsanalyse erfolgen konnte, wurde neben den zytokinspezifischen Primern ebenfalls eine PCR für jede Probe mit dem sogenannten

„housekeeping“ Gen durchgeführt. Dabei handelt es sich um ein Gen, welches in jeder Zelle exprimiert und als endogene Kontrolle bezeichnet wird. In diesem Fall wurde GAPDH verwendet. Die Grundlage für die semiquantitative Expressionsanalyse bildet letztlich dabei der durchschnittliche CT-Wert (Schwellenzyklus), also die Anzahl der Zyklen, innerhalb derer die Fluoreszenz des Reporters eine fixierte Schwelle oberhalb der Basiswerte erreicht und der durch den Computer ermittelt wird. Im Anschluss erfolgte die Bestimmung der Differenz ( $\Delta\text{CT}$ ) zwischen den durchschnittlichen CT-Werten der Proben und denen der endogenen Kontrolle:

$$\Delta\text{CT} = \text{CT (Probe)} - \text{CT (endogene Kontrolle)}$$

Daraufhin wurde für jedes Genprodukt die Differenz ( $\Delta\Delta\text{CT}$ ) zwischen den durchschnittlichen  $\Delta\text{CT}$ -Werten der SAB-Proben und den entsprechenden  $\Delta\text{CT}$ -Werten der Kontroll-Proben errechnet:

$$\Delta\Delta\text{CT} = \Delta\text{CT (SAB-Probe)} - \Delta\text{CT (Kontroll-Probe)}$$

Der relative Quantifizierungswert (RQ), welcher als  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  ausgedrückt wird, erlaubt nun eine Analyse der Expressionsverhältnisse der verschiedenen Genprodukte vor und nach dem Stattfinden einer SAB:

$$2^{-\Delta\Delta\text{CT}} = \text{RQ}$$

#### **4.2.6 Statistische Analyse**

Die statistische Analyse erfolgte mit dem zweiseitigen, ungepaarten Student's t-Test mittels Excel (Microsoft). Werte mit  $p < 0,05$  wurden als signifikant, Werte mit  $p < 0,01$  als hochsignifikant betrachtet.

## **5 ERGEBNISSE**

Es gibt bereits Literatur, die sich mit den pathophysiologischen Mechanismen im Anschluss an eine aSAB und der Entstehung einer frühen sowie verzögerten Hirnschädigung befassen. Hingegen ist die Rolle von Mikroglia und Astrozyten bei der aSAB bisher unzureichend analysiert worden.

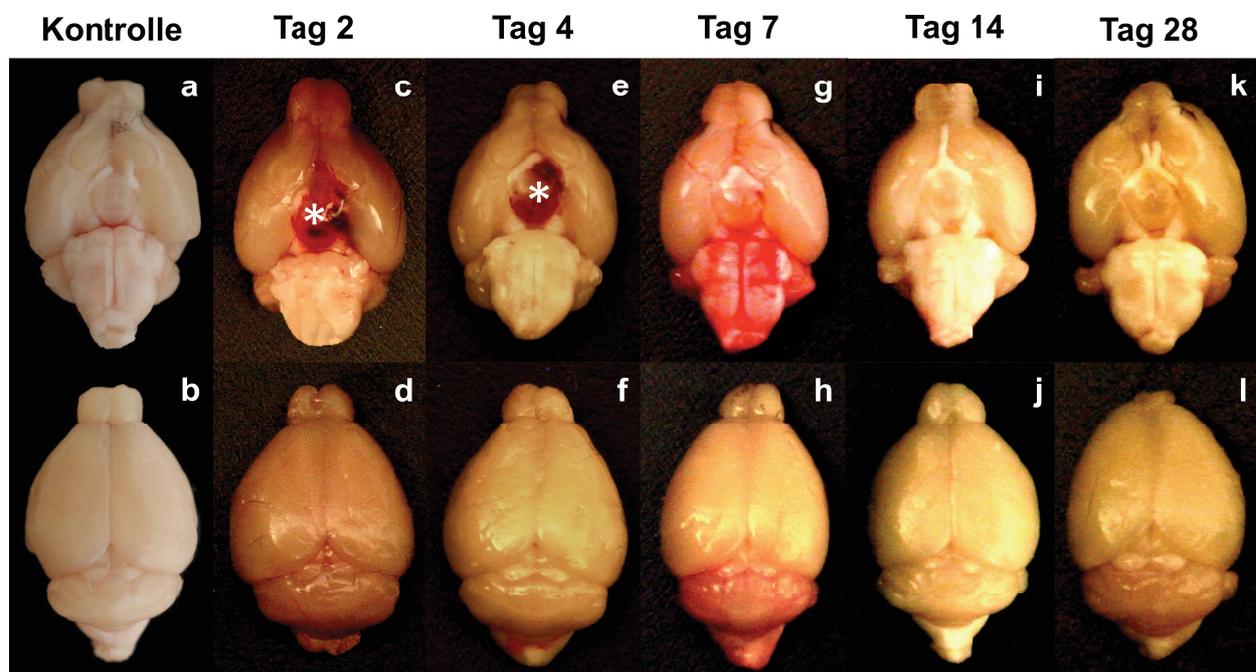
Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, die aSAB im Hinblick auf das zeitliche Verteilungsmuster des subarachnoidalen Blutes und die Aktivierung von beteiligten Zellen zu charakterisieren. Hierbei rückten die Mikrogliazellen, über deren Rolle im Rahmen einer aSAB bisher am wenigsten bekannt war, in den Vordergrund. Die Bedeutung der Mikrogliazellen hat im letzten Jahrzehnt eine neue Definition erfahren. Die zellulären Vertreter des cerebralen Immunsystems nehmen verschiedenste Funktionen ein, wobei eine entscheidende Rolle im Rahmen von pathologischen Zuständen des ZNS mehrfach nachgewiesen wurde. Im Anschluss an den Nachweis einer Mikrogliaakkumulation in dieser Arbeit erfolgte eine Analyse des Expressionsprofils der Mikrogliazellen hinsichtlich inflammatorischer Zytokine und deren Rezeptoren sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene um eine mögliche Beteiligung der Mikroglia an der Entstehung einer Hirnschädigung im Anschluss an die aSAB aufzuzeigen.

### **5.1 Charakterisierung der aSAB im zeitlichen Verlauf**

#### **5.1.1 Detektion intrakranieller Blutungen**

Grundlage aller Experimente im Rahmen dieser Arbeit bildete die Auslösung einer subarachnoidalen Blutung, die einer aneurysmatischen Subarachnoidalblutung (aSAB) nachempfunden ist. Denn die Besonderheit hierbei besteht darin, dass sich das Blut außerhalb des Gehirnparenchyms im Subarachnoidalraum befindet (siehe Einleitung 3.1). Es musste also zunächst ausgeschlossen werden, dass bei der Induktion der aSAB mit dem Faden nicht das Gehirngewebe verletzt wurde. Dies erfolgte letztlich bei der Anfertigung von Gehirnschnitten am Kryostaten sowie bei Zerkleinerung des Gehirns im Rahmen der Zellisolierung. Zeigte sich hierbei eine Verletzung des Gehirngewebes, so wurde das Gehirn verworfen und nicht weiter verwendet. Um den Verlauf einer induzierten aSAB zeitlich makroskopisch zu charakterisieren, wurden

nach Induktion mit der Fadenperforationsmethode die Gehirne zu bestimmten Zeitpunkten gewonnen und die Verteilung des Bluts im Subarachnoidalraum photographisch festgehalten. Hierbei zeigten sich keine makroskopischen Unterschiede für Tag zwei sowie vier nach erfolgter Operation. Das Hämatom ist jeweils im Bereich der basalen Zisternen, die zum Subarachnoidalraum zählen (Abb. 3) organisiert. An Tag sieben fand sich ein Ausschwemmen des Blutes im Subarachnoidalraum mit einer Anreicherung ventral des Hirnstamms. Es konnten weder an Tag 14 noch an Tag 28 makroskopisch Rückstände der Blutung gefunden werden. Daher kann davon ausgegangen werden, dass spätestens an Tag 14 nach induzierter aSAB das Blut aus makroskopischer Perspektive resorbiert ist.



**Abbildung 3: Makroskopische Ansicht der Gehirne vor und nach Induktion einer aSAB** (a,b) jeweilige Ansicht eines Gehirns einer naiven Maus (Kontrolle) zum Vergleich; (c,e,g,i,k) basale Ansicht der sanguinen Verteilung im Subarachnoidalraum an Tag 2, 4, 7, 14, 28 nach Induktion einer aSAB mittels endovaskulärer Fadenperforations-methode; (d,f,h,j,l) Ansicht von cranial; (\*) Organisation des Hämatoms im Bereich der basalen Zisternen

### 5.1.2 Akkumulation verschiedener Zellpopulationen als Reaktion auf eine aSAB

Um nun auf mikroskopischer Ebene die intraparenchymatösen Prozesse im Anschluss an die Induktion einer aSAB zu charakterisieren, wurden immunhistologische Färbungen an den Gehirnschnitten durchgeführt. Zunächst erfolgte eine Färbung von GFAP zum Nachweis einer intraparenchymatösen Aktivierung von Astrozyten nach aSAB. Da eine Aktivierung von Astrozyten im Anschluss an eine SAB bereits bekannt

ist, diene diese Färbung vorwiegend dazu das in dieser Arbeit angewandte Modell zu bestätigen und das Verteilungsmuster der Akkumulation dieser Zellen zu charakterisieren. Des Weiteren wurde APP angefärbt. Dabei handelt es sich um einen Marker für das Ausmaß neuronaler Schädigung. In der Literatur finden sich bereits Hinweise auf eine neuronale Schädigung, sodass im Rahmen dieser Arbeit im Vordergrund stand das Ausmaß und Verteilungsmuster dieser neuronalen Schädigung zu erfassen. Letztlich stand vor allem im Vordergrund die Mikrogliazellen darzustellen, da über die Aktivierung und Rolle dieser Zellen im Rahmen der Pathomechanismen im Anschluss an eine aSAB wenig bekannt ist.

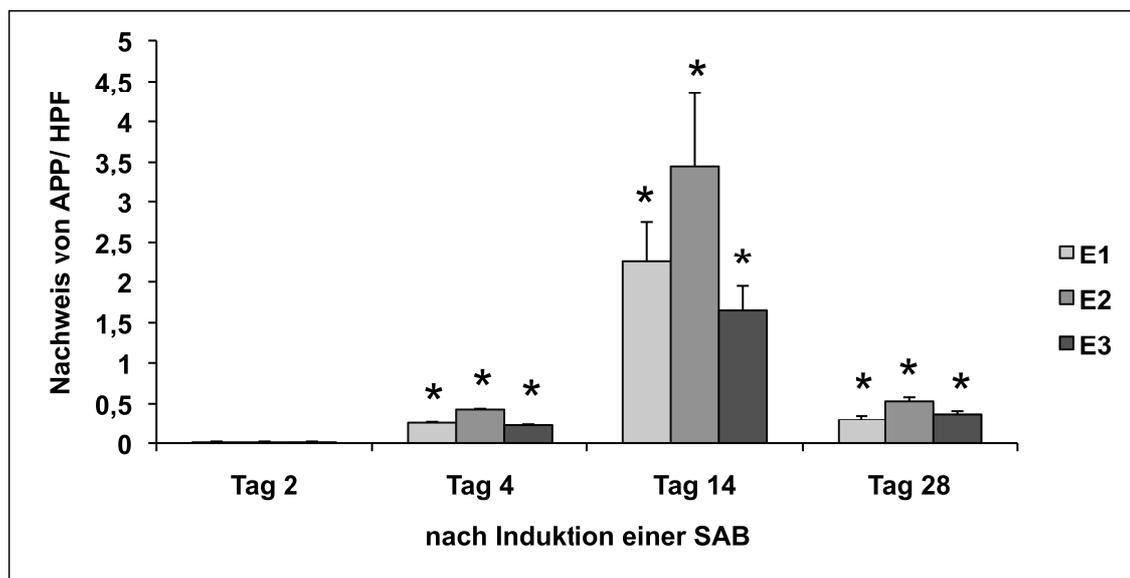
Der Nachweis von Iba1-positiven und GFAP-positiven Zellen bzw. APP erfolgte immunhistochemisch an Gehirnschnitten zu vier verschiedenen Zeitpunkten: an Tag 2, 4, 14 und 28 nach Induktion einer aSAB. Da das Ausmaß der zellulären Aktivierung sowie Akkumulation nicht im gleichen Maße reproduzierbar bzw. kontrollierbar ist, wurden gleiche Ebenen bestimmt, in welchen die Schnitte zu analysieren waren. Hierfür wurde an jedem Gehirn das Bregma eingestellt und in drei definierten Abständen, d.h. drei Ebenen, (siehe Material und Methoden 4.2.4.1) 20 Schnitte gewonnen. Letztlich wurden für jede Maus, n=3, pro Ebene zwei Schnitte gefärbt und mit Hilfe des Programms „imageJ“ ausgewertet. Die Daten wurden für Iba1-, GFAP- oder APP-positive Zellen pro *high power field* (HPF) bestimmt. Hierbei wurde die komplette Gehirnhälfte der Seite auf welcher die aSAB induziert wurde ausgewertet. Des Weiteren wurde festgehalten mit welchem Verteilungsmuster innerhalb einer Ebene die Färbung zur Darstellung kam (streng basal oder diffus über die Hemisphäre verteilt).

#### **5.1.2.1 Nachweis von APP als Hinweis auf axonale Schädigung**

Bei dem *amyloid precursor protein* (APP) handelt es sich um ein Protein, welches am axonalen Transport der Neuronen beteiligt ist. Kommt es zu einer Schädigung und damit zum Sterben von Neuronen, reichert sich APP an der Bruchstelle des Axons an und dient damit als Marker für das Ausmaß einer neuronalen bzw. axonalen Schädigung. Nach Induktion einer aSAB zeigte sich im Zeitverlauf von Tag 2 bis 14 eine signifikante Zunahme der Akkumulation von APP, wohingegen an Tag 28 wieder geringere Werte erreicht wurden (Abb. 4). Eine signifikante Erhöhung wurde erstmalig an Tag 4 nach induzierter aSAB streng basal in allen drei Ebenen detektiert. An Tag 14 fand sich das Maximum der Akkumulation und in Ebene 2 für alle Zeitpunkte der

deutlichste Nachweis von APP. Dabei war eine Akkumulation von APP über die Hemisphäre am ehesten basal bis zum Hippocampus reichend, d.h. in Ebene 2, nachweisbar (Abb. 4). Dieses Verteilungsmuster zeigte sich ebenfalls an Tag 28, wobei die Dichte der Akkumulation von APP deutlich geringer zur Darstellung kam.

Folglich kommt es im Anschluss an eine experimentell induzierte aSAB zu einer axonalen Schädigung, welche an Tag 4 basal erstmalig nachweisbar ist und an Tag 14 ihren Höhepunkt findet und hier insbesondere den Hippocampus, vor allem in Ebene 2, mit einbezieht (Abb. 5).



**Abbildung 4: Axonale Schädigung im zeitlichen Verlauf nach aSAB;** Zunahme der Akkumulation von APP im Zeitverlauf mit einem Maximum an Tag 14 nach aSAB; n=3; (\*  $p < 0,05$ , alle Werte im Vergleich zu den Ergebnissen von Tag 2)



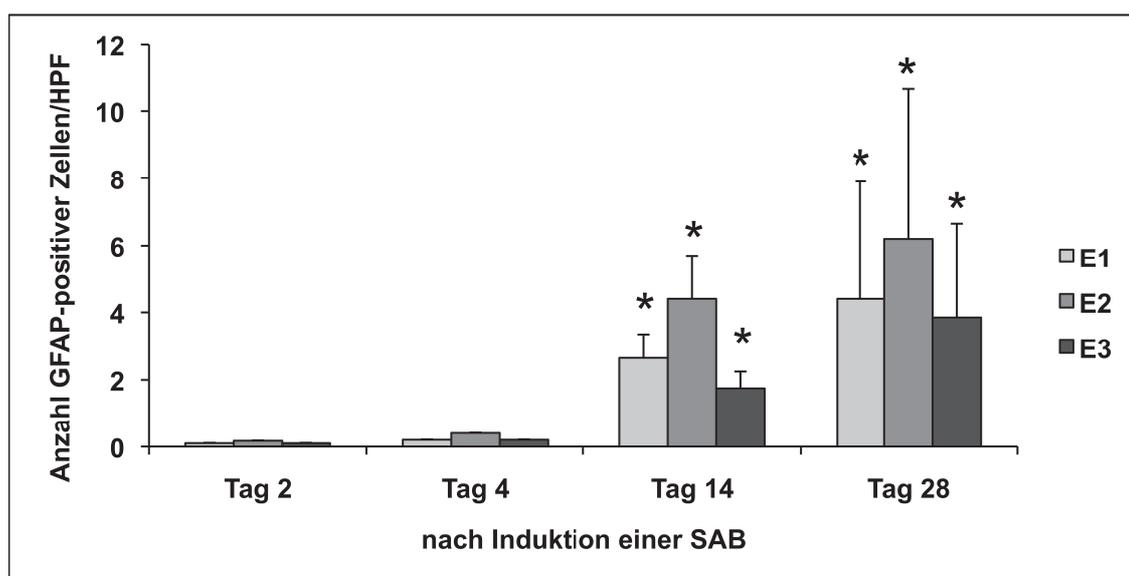
**Abbildung 5: Immunhistologische APP-Färbung an Tag 14 nach Induktion einer aSAB;** Akkumulation von APP in den 3 untersuchten Ebenen an Tag 14 nach Induktion der aSAB; 10-fach vergrößert

### 5.1.2.2 Akkumulation GFAP-positiver Zellen

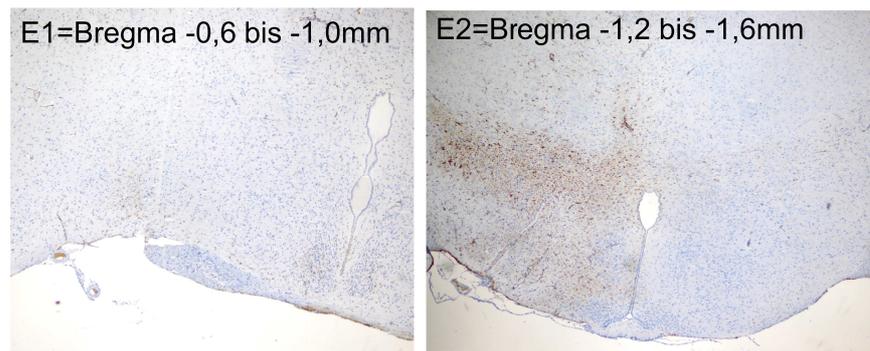
Das *glial fibrillary acidic protein* (GFAP) bildet den Hauptbestandteil der Intermediärfilamente im Zytoplasma von Gliazellen und findet sich im Zentralnervensystem größtenteils in Astrozyten. Die Funktion des Proteins ist nicht eindeutig geklärt, jedoch geht man davon aus, dass sie die Zellform kontrollieren und Bewegungen ermöglichen.

Hinsichtlich der Aktivierung und Akkumulation GFAP-positiver Zellen war festzustellen, dass es ebenfalls zu einer signifikanten Zunahme der Zellzahl kam. Die Akkumulation von GFAP-positiven Zellen nahm jedoch über den gesamten Zeitverlauf von Tag 2 bis 28 nach induzierter aSAB zu (Abb. 6). Der deutlichste Anstieg fand sich erneut in Ebene 2, wobei sich hinsichtlich des Verteilungsmusters der Schwerpunkt basal lokalisiert, d.h. im Bereich des Thalamus und Hypothalamus, befand (Abb. 7). An Tag 28 fällt zudem eine deutliche Varianz der Ergebnisse auf, sodass statistisch kein signifikanter Unterschied zu dem Ergebnis für Tag 14 besteht.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass es zu einer signifikanten Akkumulation von GFAP-positiven Zellen im Zeitverlauf bis zum Tag 14 nach aSAB kommt und diese bis Tag 28 anhält, jedoch an diesem Tag aufgrund einer hohen Varianz nicht signifikant ist. Die Akkumulation findet sich insbesondere in Ebene 2 im Bereich des Thalamus und Hypothalamus.



**Abbildung 6: GFAP-positive Zellen nach aSAB;** Zunahme der Akkumulation von GFAP-positiven Zellen im Zeitverlauf mit einem nicht signifikanten Maximum an Tag 28 nach aSAB im Vergleich zu Tag 2; n=3; (\*  $p < 0,05$ , alle Werte im Vergleich zu den Ergebnissen von Tag 2)



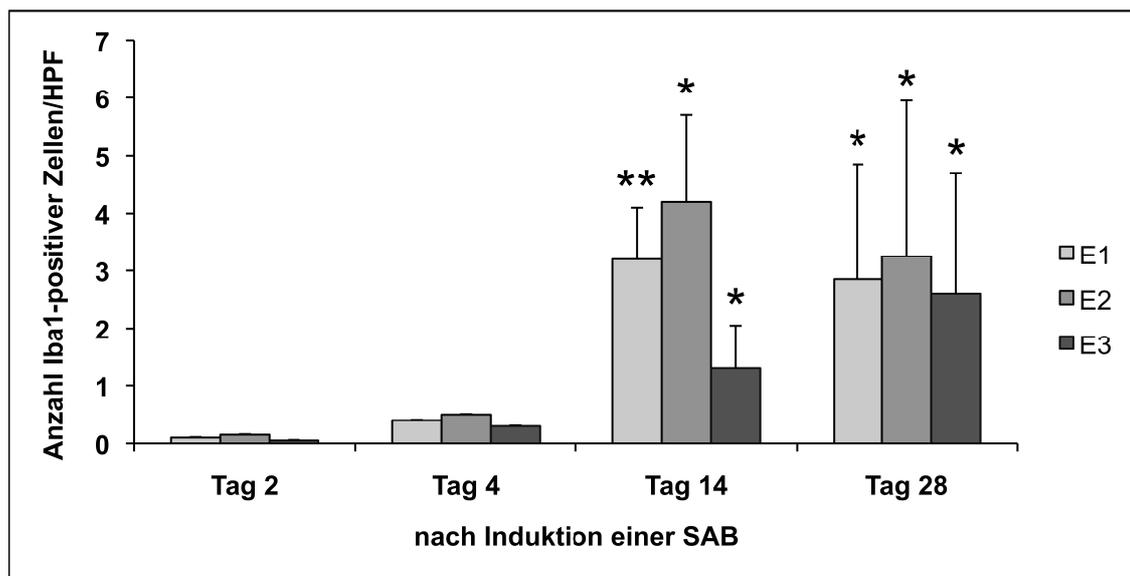
**Abbildung 7: Immunhistologische GFAP-Färbung an Tag 14 nach aSAB;** Akkumulation von GFAP-positiven Zellen in 2 der 3 untersuchten Ebenen an Tag 14 nach Induktion der aSAB; 10-fach vergrößert

### 5.1.2.3 Akkumulation Iba1-positiver Zellen

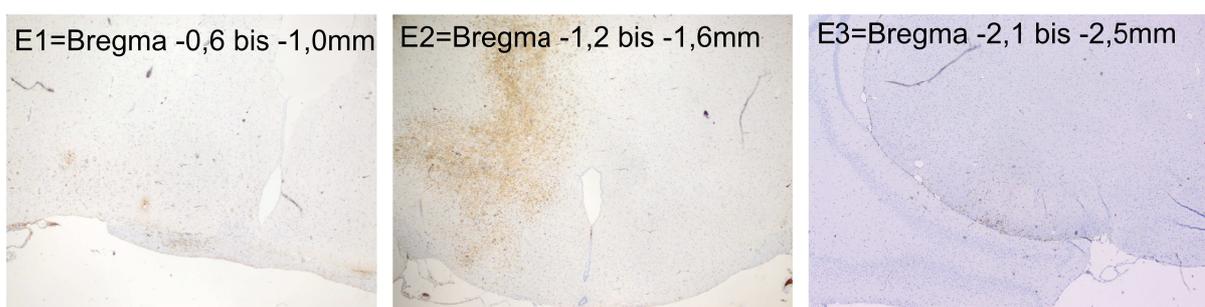
Das *ionized calcium binding adaptor molecule 1* (Iba1) wird spezifisch von Mikrogliazellen und Makrophagen exprimiert. Zudem geht eine vermehrte Aktivität der Mikrogliazellen mit einer vermehrten Produktion dieses Proteins einher, sodass die Zellen anhand dessen nachweisbar sind. Eine genaue Beurteilung des Aktivitätsgrads der Mikrogliazellen anhand der Expression von Iba1 ist bisher jedoch nicht möglich. Die genaue Funktion des Proteins ist nicht bekannt.

Die Anzahl der Iba1-positiv gezählten Zellen nahm im Zeitraum von Tag 2 bis 14 nach Induktion der aSAB vor allem in den Ebenen 1 und 2 signifikant zu, bevor es zu einem nicht signifikanten leichten Absinken der Zahlen an Tag 28 kam (Abb.8). Dabei fand sich der Höhepunkt der Akkumulation mit 4,2 Zellen/HPF an Tag 14 und ebenso wie zu den anderen Zeitpunkten in der Ebene 2, welche sich 1,2 - 1,6mm hinter dem Bregma befindet, also zu Beginn der Hippocampusstruktur. Innerhalb dieser Ebene war eine Ansammlung Iba1-positiver Zellen zudem überwiegend basal, im Bereich des Hypothalamus und Thalamus, nachweisbar (Abb. 9 und 10). Bei Betrachtung des Verteilungsmusters im Zeitverlauf fiel auf, dass sich an Tag 4 nach Induktion der aSAB erstmalig eine Ansammlung Iba1-positiver Zellen nur basal zeigte und an Tag 14 die ganze ipsilaterale Hemisphäre mit Betonung im Bereich des Hippocampus einbezog. An Tag 28 nach Induktion der aSAB zeigte sich ebenfalls eine Akkumulation die gesamten Hemisphäre betreffend, jedoch wirkten die Zellen deutlich aufgelockert. Ein signifikanter Unterschied bezüglich des Ausmaßes der Akkumulation im Vergleich zu Tag 14 bestand nicht.

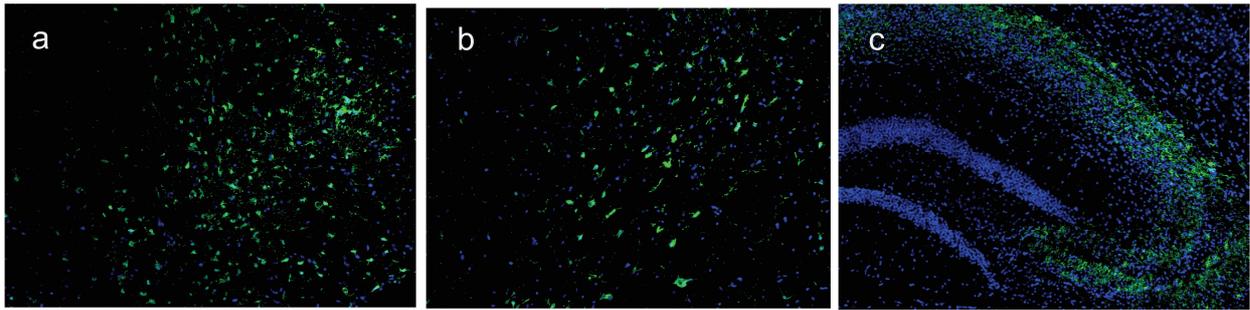
Diese Arbeit gehört folglich zu den ersten, die eine Akkumulation von Iba1-positiven Zellen, d.h. Mikrogliazellen bzw. Makrophagen, im Anschluss an die Induktion einer aSAB beschreibt. Hierbei ist festzuhalten, dass es zu einem signifikanten Anstieg der Akkumulation bis zu Tag 14 im Anschluss an eine aSAB kommt und die Zellen sich insbesondere in Ebene 2, d.h. im Bereich des Thalamus, Hypothalamus und Hippocampus finden lassen.



**Abbildung 8: Iba1-positive Zellen nach aSAB;** Zunahme der Akkumulation von Iba1-positiven Zellen im Zeitverlauf mit einem Maximum an Tag 14 nach aSAB im Vergleich zu Tag 2; n=3; (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , alle Werte im Vergleich zu den Ergebnissen von Tag 2)



**Abbildung 9: Immunhistologische Iba1-Färbung an Tag 14 nach aSAB;** Akkumulation von Iba1-positiven Zellen in den 3 untersuchten Ebenen an Tag 14 nach Induktion der aSAB; 10-fach vergrößert



**Abbildung 10: Immunfluoreszenzfärbung von Iba1-positive Zellen an Tag 14 nach aSAB;** Darstellung durch das Fluoreszenzmikroskop der Akkumulation von Iba1-positiven Zellen in der Ebene 2 (E2=Bregma -1,2 bis -1,6mm) an Tag 14 nach Induktion der aSAB, 10-fache Vergrößerung; (a) Hypothalamus; (b) Thalamus; (c) Hippocampus; Iba1=DyLight 488 (grün), DAPI (blau)

#### 5.1.2.4 Vergleich der Akkumulation von APP, Iba1- und GFAP-positiven Zellen

Vergleicht man nun die Akkumulation von APP, Iba1- und GFAP-positiven Zellen konnten hinsichtlich des Verteilungsmusters und des Zeitverlaufs verschiedene Beobachtungen festgehalten werden.

Es fiel auf, dass sowohl in Bezug auf APP als auch auf GFAP und Iba1 an Tag 4 nach aSAB zunächst eine Akkumulation basal stattfand. An Tag 4 bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den drei Ebenen. An Tag 14 zeigte sich für alle drei Zellpopulationen eine signifikante Zunahme der Akkumulation insbesondere in Ebene 2. Die APP und Iba1-positiven Zellen verteilten sich dabei über den Thalamus und Hypothalamus hinaus bis in den Hippocampus. Die Akkumulation GFAP-positiver Zellen reichte nicht bis zum Hippocampus heran. An Tag 28 war APP kaum mehr nachweisbar, wohingegen Iba1- und GFAP- positive Zellen über die Hemisphäre verteilt waren und sich nicht mehr streng in bestimmten Bereichen konzentrierten. Hierbei fiel bei beiden Zellpopulationen auf, dass zwischen den verschiedenen Ergebnissen eine hohe Varianz bestand. Es kann nur spekuliert werden, ob das Ausmaß der initialen Stärke der aSAB dafür verantwortlich sein könnte.

Zusammenfassend ist folglich festzuhalten, dass sich die verschiedenen Zellpopulationen hinsichtlich des Zeitverlaufs und Verteilungsmusters glichen und damit eine Interaktion, insbesondere von APP und Iba1- positiven Zellen, wahrscheinlich ist. Dies lässt den Schluss zu, dass Mikrogliazellen eine besondere Rolle im Rahmen der pathophysiologischen Mechanismen im Anschluss an eine aSAB einnehmen und einer neuronalen Schädigung sowie Astrozytenaktivierung vorausgehen könnten. Aus diesem

Grund konzentriert sich der nachfolgende Abschnitt mit der Charakterisierung der Mikrogliazellen im Anschluss an eine aSAB.

## **5.2 Charakterisierung der Mikroglia/Makrophagenpopulation bei der aSAB**

Im Anschluss an den Nachweis einer intraparenchymatösen Akkumulation Iba1-positiver Zellen nach experimentell induzierter Subarachnoidalblutung wurde in einem zweiten Abschnitt die Zellfraktion isoliert und versucht diese hinsichtlich ihrer Zytokinexpression sowie -produktion zu charakterisieren. Ziel dieser Experimente war es, die Rolle der Iba1-positiven Zellen bezüglich einer zytotoxischen oder -protektiven Funktion zu untersuchen.

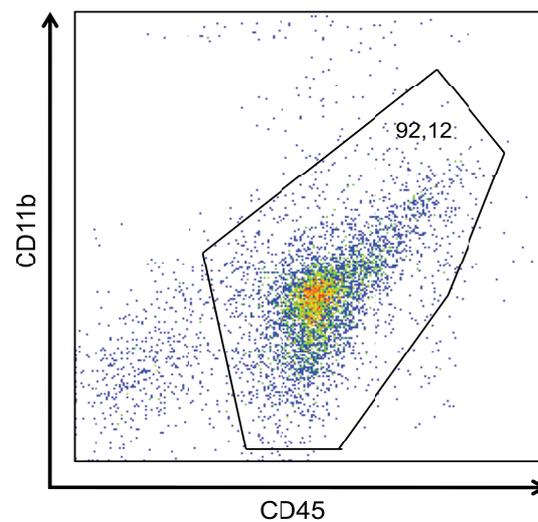
### **5.2.1 Mikroglia/Makrophagen-Isolierung und deren Anzahl in den aSAB-Hemisphären im zeitlichen Verlauf**

#### **5.2.1.1 Reinheit der Mikroglia/Makrophagen**

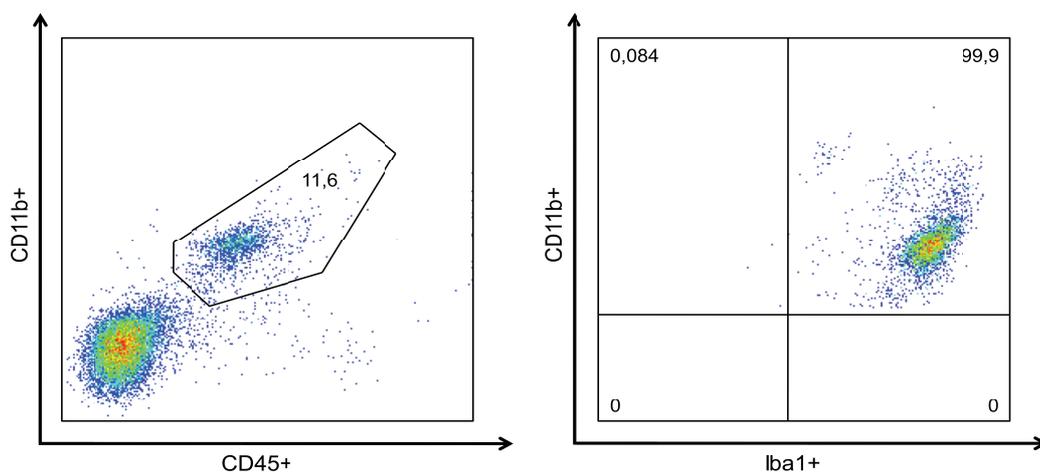
Um einen Hinweis auf eine zytotoxische oder -protektive Funktion der Mikroglia/Makrophagen nach aSAB zu erhalten, sollten pro-inflammatorische Moleküle durch RNA-Extraktion aus der isolierten Mikroglia/Makrophagen Population von aSAB-Mäusen untersucht werden. Hierbei ist eine hohe Reinheit der isolierten Zellfraktion notwendig um die Daten dann den Mikroglia zuordnen zu können. Aus diesem Grund erfolgte im Anschluss an die Zellisolierung die Darstellung der Zellfraktion im FACS. Betrug der Anteil von CD11b- und CD45-positiven Zellen weniger als 90%, so wurde die betreffende Zellfraktion verworfen (Abb. 11). Da letztlich die Oberflächenantigene CD11b sowie CD45 jedoch ebenso von Granulozyten exprimiert werden können, erfolgte zusätzlich die Färbung von Iba1. Hierbei konnte nachgewiesen werden, dass über 98% der CD11b- und CD45-positiven Zellen ebenfalls Iba1-positiv waren (Abb.12). Eine Verunreinigung durch die Granulozytenpopulation konnte damit ausgeschlossen werden. Eine Abgrenzung zu den ebenfalls Iba1-exprimierenden Makrophagen war in diesem Fall jedoch nicht möglich, sodass die isolierte Zellfraktion weiterhin als Mikroglia/Makrophagenpopulation bezeichnet werden muss.

Da der Anteil von Mikrogliazellen an den Zellen im ZNS lediglich 12% beträgt wurden die Gehirne gepoolt um ausreichend Material für die nachfolgenden

Isolierungsexperimente zu gewinnen. Vor dem Hintergrund, dass eine Akkumulation von Iba1-positiven Zellen hauptsächlich auf der Seite beobachtet wurde, auf welcher die Subarachnoidalblutung induziert wurde, wurde lediglich diese Hemisphäre in den Pool aufgenommen. Ein Pool bestand folglich aus den Hemisphären von sechs Tieren. Es wurden zwei Versuchsdurchläufe für jeden Zeitpunkt und die Kontrolle durchgeführt. Damit betrug die insgesamt analysierte Anzahl von aSAB Hemisphären 12 und die Kontrolle setzte sich aus 3 naiven Gehirnen zusammen (insgesamt n=6).



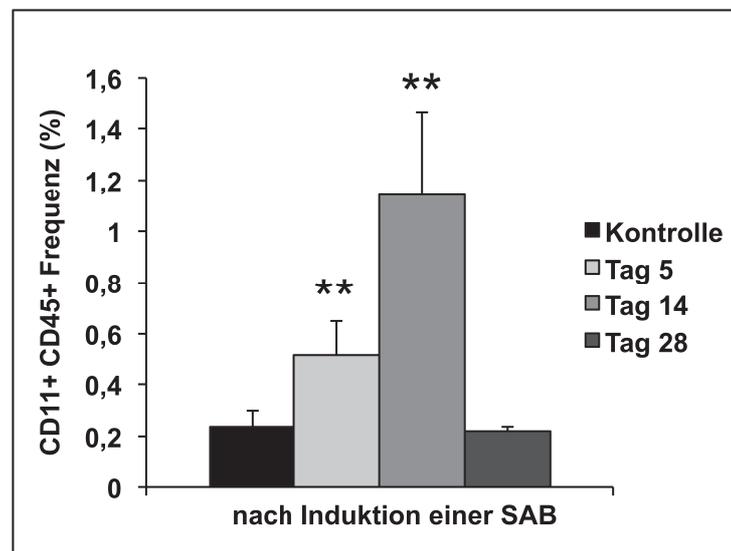
**Abbildung 11: Reinheit der CD11b+CD45+ Zellfraktion;** Mittels FACS-Analyse dargestellter Anteil der CD11b+CD45+ Zellsuspension nach Zellaufreinigung und -isolierung der Zellen aus den SAB-Hemisphären nach Induktion der aSAB als Nachweis der Reinheit der Zellfraktion



**Abbildung 12: Anteil von Iba1+ Zellen an der CD11b+CD45+ Zellfraktion;** Mittels FACS-Analyse dargestellter Anteil der CD11b+CD45+ Zellsuspension nach Zellaufreinigung der aSAB-Hemisphären nach Induktion einer Blutung mittels Fadenperforation als Nachweis der Übereinstimmung CD11b+ und Iba1+ Zellen

### 5.2.1.2 Relative Anzahl der Mikroglia/Makrophagen im zeitlichen Verlauf nach Induktion einer aSAB

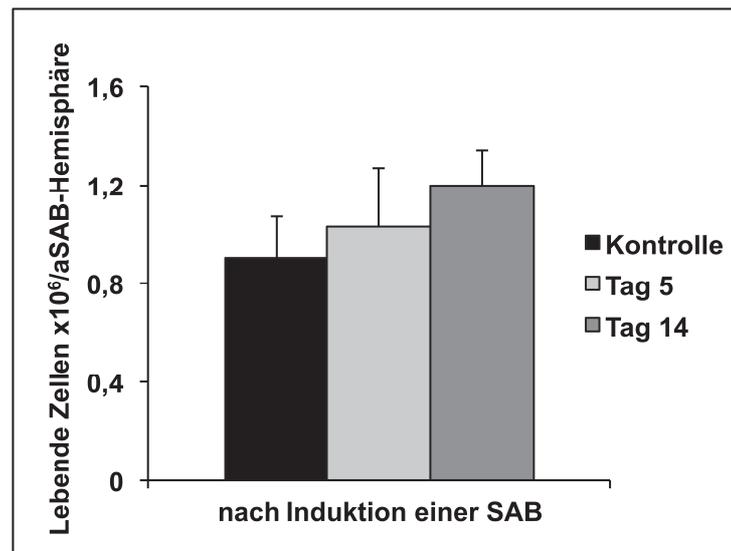
Neben der Reinheit der isolierten Zellfraktion wurde ebenfalls die Anzahl der isolierten Mikroglia/Makrophagen pro aSAB-Hemisphäre erfasst um zu beurteilen wie sich die Zellpopulation im Zeitverlauf gegenüber der Kontrollgruppe verhält. Dies erfolgte einmal mit Hilfe einer FACS-Analyse der Zellsuspension vor der Mikrogliaisolierung. Hierbei konnte der prozentuale Anteil der Mikroglia an allen in der Suspension befindlichen Zellen ermittelt werden. Gegenüber der Kontrolle kam es zu einer signifikanten Zunahme des prozentualen Anteils der Mikroglia im Zeitverlauf mit einem Maximum an Tag 14 ( $p < 0,01$ ) und einem nachfolgenden Absinken an Tag 28 auf ein mit dem Kontrollwert vergleichbares Niveau (Abb. 13).



**Abbildung 13: Prozentualer Anteil der Mikroglia in der aSAB Hemisphäre;** Prozentualer Anteil von CD11b+CD45+ Zellen in Zellsuspension nach Aufreinigung der aSAB-Hemisphäre; Zunahme der Zellzahl im Zeitverlauf bis Tag 14, danach Absinken auf Kontrollniveau; n=6, (\*\*  $p < 0,01$ , im Vergleich zur Kontrolle)

### 5.2.1.3 Absolute Zellzahl der Mikroglia/Makrophagen in der aSAB Hemisphäre

Des Weiteren wurde die Zellzahl der isolierten Mikroglia/Makrophagen im Anschluss an die Zellisolierung ebenfalls mittels einer Zellzählung bestimmt. Hier zeigte sich keine signifikante Änderung der absoluten Mikrogliazellzahl im Zeitverlauf (Abb. 14) bis Tag 14 nach aSAB. Da bis zu diesem Zeitpunkt kein Anstieg beobachtet wurde, entfiel die Analyse von Tag 28, bei dem sonst eine vorher erkennbare Erhöhung stets wieder abfiel.



**Abbildung 14: Absolute Mikrogliazellzahl in der aSAB Hemisphäre;** Anzahl der lebenden Zellen pro aSAB Hemisphäre im Anschluss an die Zellisolierung; keine signifikante Änderung der Mikrogliazellzahlen im Zeitverlauf; n=6

## 5.2.2 Expression inflammatorischer Zytokine und deren Rezeptoren in Mikroglia/Makrophagen nach aSAB

### 5.2.2.1 Mikroglia/Makrophagen exprimieren vermehrt pro-inflammatorische Zytokine nach aSAB auf RNA- und Proteinebene

Um erste Hinweise hinsichtlich der Rolle von Mikrogliazellen im Rahmen der pathophysiologischen Mechanismen, insbesondere bei der Entstehung neuronalen Schadens zu erhalten, wurde mit Hilfe der isolierten Mikrogliazellfraktion ein Zytokinexpressionsprofil erstellt. Die Auswahl der Zytokine erfolgte aufgrund von Publikationen über inflammatorische Prozesse im Anschluss an eine aSAB bzw. aufgrund von Erkenntnissen über die mikrogliale Zytokinexpression.

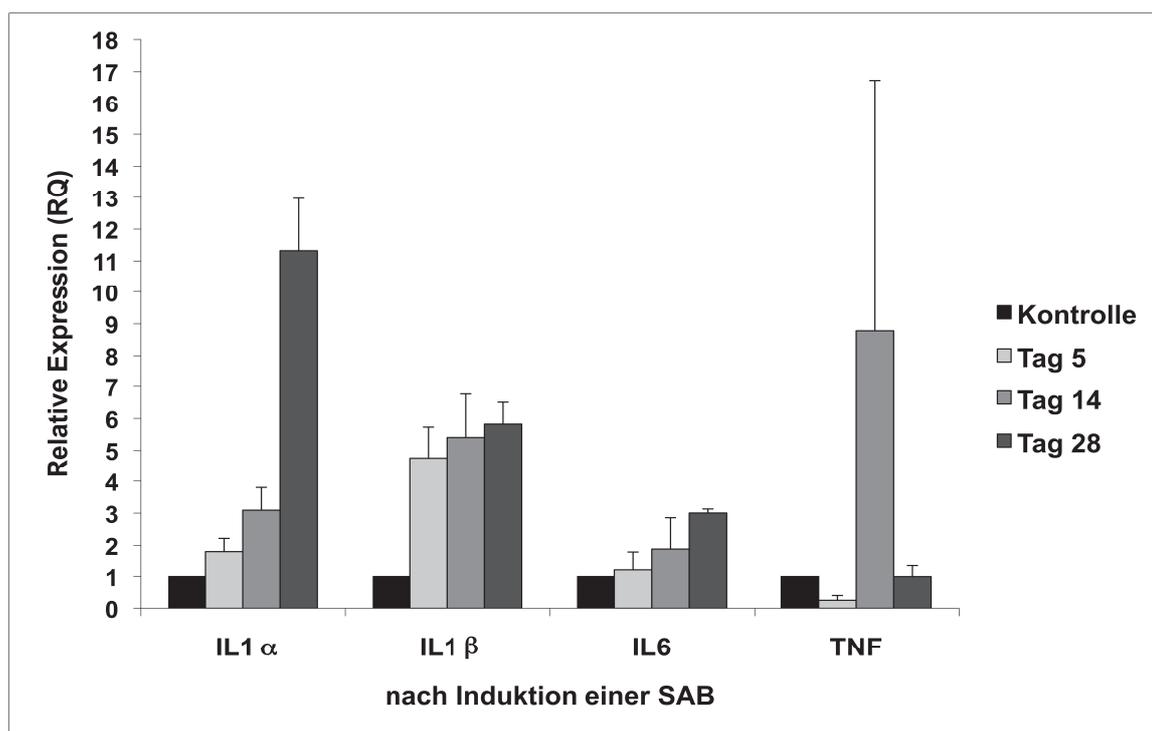
Zuerst wurde mittels PCR und anschließender Auftrennung im Agarosegel ermittelt, ob die isolierten Mikroglia/Makrophagen generell inflammatorische Zytokine exprimieren. Für die analysierten Moleküle IL1 $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL6 und TNF zeigte sich, dass diese tatsächlich in Mikroglia/Makrophagen nach aSAB vorhanden waren (nicht dargestellt). Daraufhin erfolgte die relative Quantifizierung der Zytokine mit Hilfe einer realtime-PCR (Abb. 15).

Für Interleukin 1 $\alpha$  (IL1 $\alpha$ ) zeigte sich eine Zunahme über den Zeitraum von Tag 5 bis Tag 28 mit einem Maximum an Tag 28 nach aSAB.

Die Expression von Interleukin 1 $\beta$  (IL1 $\beta$ ) war im Vergleich zur Kontrollgruppe an allen drei Zeitpunkten deutlich erhöht, wobei das Niveau relativ konstant blieb.

Hinsichtlich Interleukin 6 (IL6) war ebenfalls eine signifikante, jedoch weniger starke Zunahme im Zeitverlauf zu beobachten. Das maximale Niveau wurde wie bei IL6 an Tag 28 erreicht.

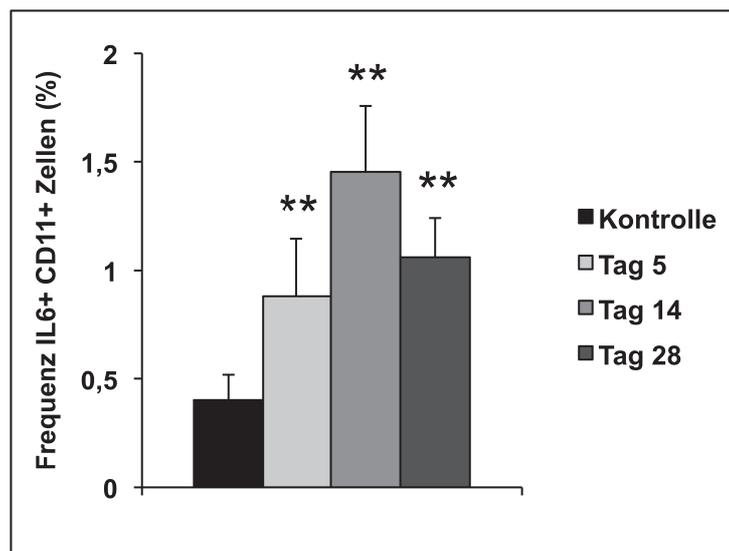
Für TNF wurde hingegen eine abweichende Kinetik festgestellt. Das Zytokin zeigte auf RNA-Ebene eine Reduktion an Tag 5 sowie 28 nach induzierter aSAB, wohingegen an Tag 14 eine deutliche Erhöhung ermittelt wurde. Hierbei muss jedoch eine hohe Standardabweichung berücksichtigt werden. Bei wiederholter Durchführung der Versuche unter identischen Bedingungen, fanden sich im Vergleich zu den anderen Zytokinen an Tag 28 nach aSAB die deutlichsten Schwankungen bei der Hochregulation der Expression auf RNA-Ebene.



**Abbildung 15: Mikrogliale Zytokinexpression nach aSAB;** mit Hilfe einer realtime PCR ermittelte relative Änderung der Expression von den Zytokinen IL1 $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL6 und TNF auf mRNA-Ebene an Tag 5, 14 und 28 nach Induktion der aSAB; n=2 (d5, d28), n=3 (d14), pro Ansatz Pool von 6 aSAB Hemsiphären; die Kontrolle bestand aus 6 naiven Hemsiphären

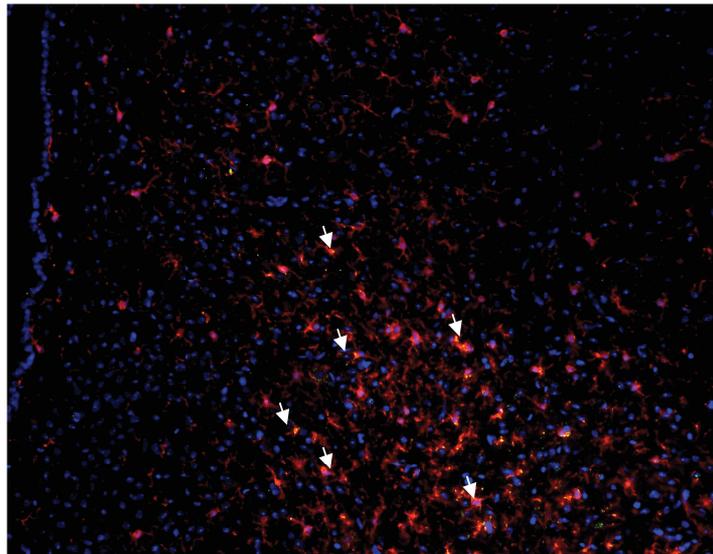
In einem weiteren Schritt wurde nachfolgend überprüft ob sich die veränderte Zytokinexpression auch auf Proteinebene für IL6 und TNF nachweisen lässt. Dies erfolgte mit Hilfe einer FACS-Färbung der intrazellulär akkumulierten Proteine. Die Zellen der homogenisierten Gehirne wurden in Kultur genommen und Brefeldin A zugesetzt, um die Proteinsekretion zu inhibieren.

IL6 wurde aus dem Grund ausgewählt, da es zum einen auf RNA-Ebene hochreguliert wird und nach dem aktuellen Stand der Forschung trotz der zentralen inflammatorischen Funktion relativ wenig bekannt ist über eine mögliche Rolle im Rahmen der pathophysiologischen Mechanismen im Anschluss an eine aSAB. Auf Proteinebene zeigte sich für die Produktion von Interleukin 6 eine hochsignifikante Zunahme im Vergleich zur Kontrolle von Tag 5 bis Tag 14 bevor sie an Tag 28 wieder ein niedrigeres Niveau erreichte ( $p < 0,01$ ) (Abb. 16). Damit spiegelt sich das Ergebnis, welches auf RNA-Ebene erzielt wurde, auf Proteinebene wieder. Insgesamt zeigte sich, dass nur ein geringer, aber dafür signifikanter Anteil der Mikrogliazellen IL6 exprimiert.



**Abbildung 16: Mikrogliale Produktion von IL6 nach aSAB;** mit Hilfe einer FACS Analyse ermittelte Änderung der Produktion von IL-6 auf Proteinebene an Tag 5, 14 und 28 nach Induktion der aSAB;  $n=5$ , (\*\*  $p < 0,01$ , im Vergleich zur Kontrolle)

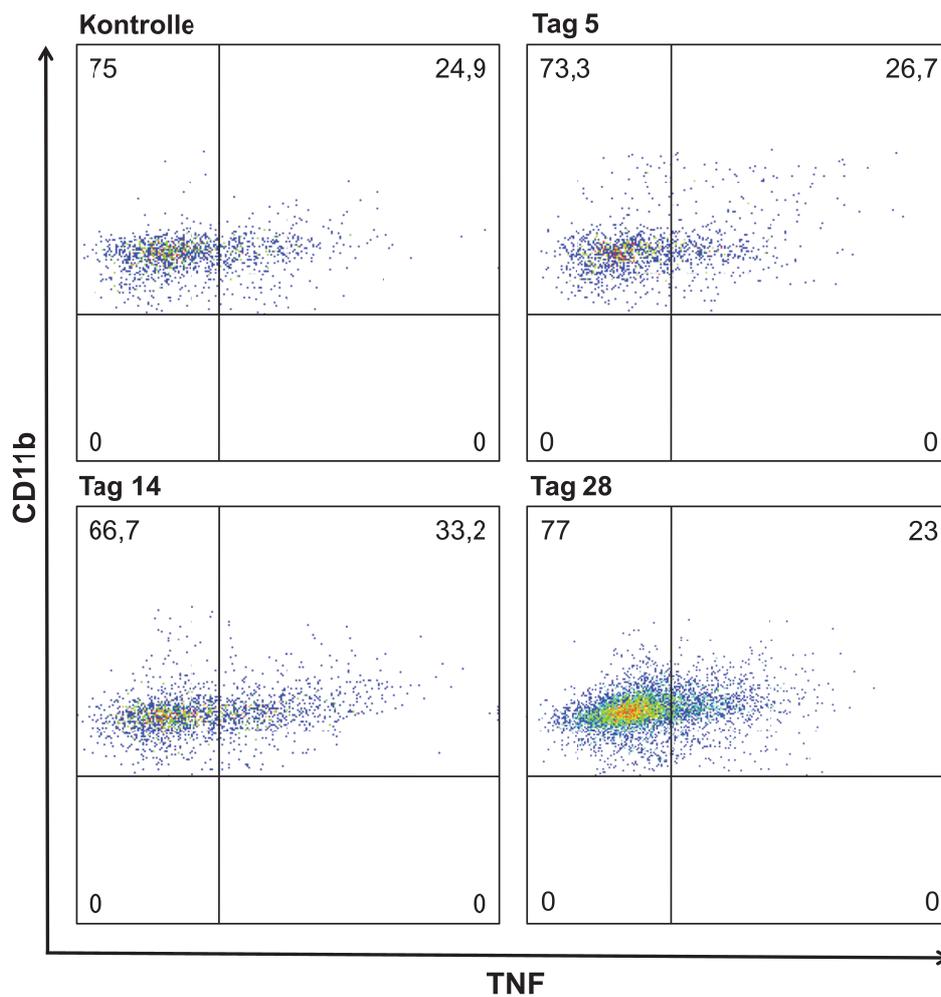
IL6 wurde zudem mittels einer Immunfluoreszenzfärbung auf Gehirnschnitten nachgewiesen, welche an Tag 14 nach Induktion einer aSAB von Mäusen gewonnen wurden (siehe Abb.17). Hier bestätigten sich die vorausgegangenen Ergebnisse vom FACS. IL6 wird nach aSAB fast ausschließlich in Mikroglia/Makrophagen produziert, wenn auch nur ein geringer Teil dieser Zellen eine IL6-Produktion zeigt.



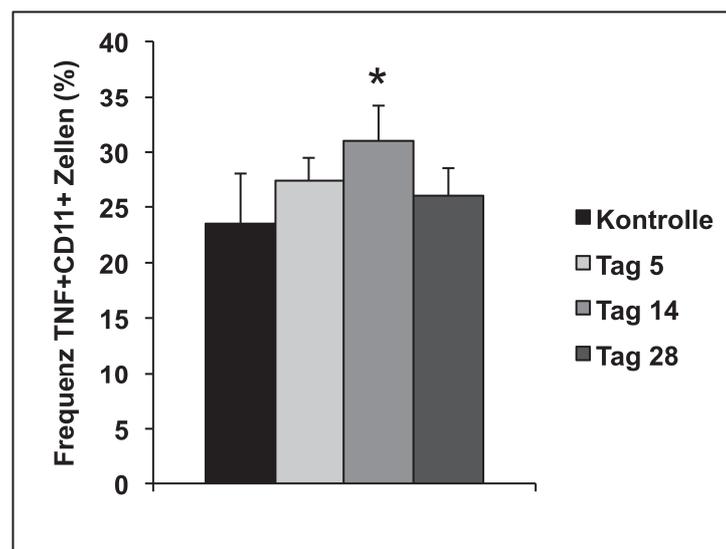
**Abbildung 17: IL6- und Iba1-positive Zellen nach aSAB;** Darstellung von IL6- und Iba1-positiven Zellen durch das Fluoreszenzmikroskop in der Ebene 2 (E2=Bregma -1,2 bis -1,6mm) an Tag 14 nach Induktion der aSAB, 20-fache Vergrößerung; IL6=DyLight 488 (grün), Iba1=DyLight 594 (rot), DAPI (blau)

Die quantitative Analyse von TNF auf Proteinebene erfolgte aufgrund der divergenten und im Vergleich zu den anderen Zytokinen abweichenden Ergebnisse hinsichtlich der Kinetik. Im Zeitverlauf wurde TNF auf Proteinebene an Tag 14 verstärkt bzw. signifikant erhöht produziert ( $p < 0,01$ ). An den Tagen 5 und 28 nach Induktion der aSAB befand sich die Produktion von TNF auf einem mit der Kontrollgruppe vergleichbarem Niveau (Abb. 18). Im Allgemeinen fiel im Vergleich zu IL6 auf, dass TNF von einem wesentlich größeren Anteil von Mikrogliazellen produziert wird und dies bereits von Zellen, die einer naiven Hemisphäre, d.h. ohne aSAB, entstammen.

a)



b)

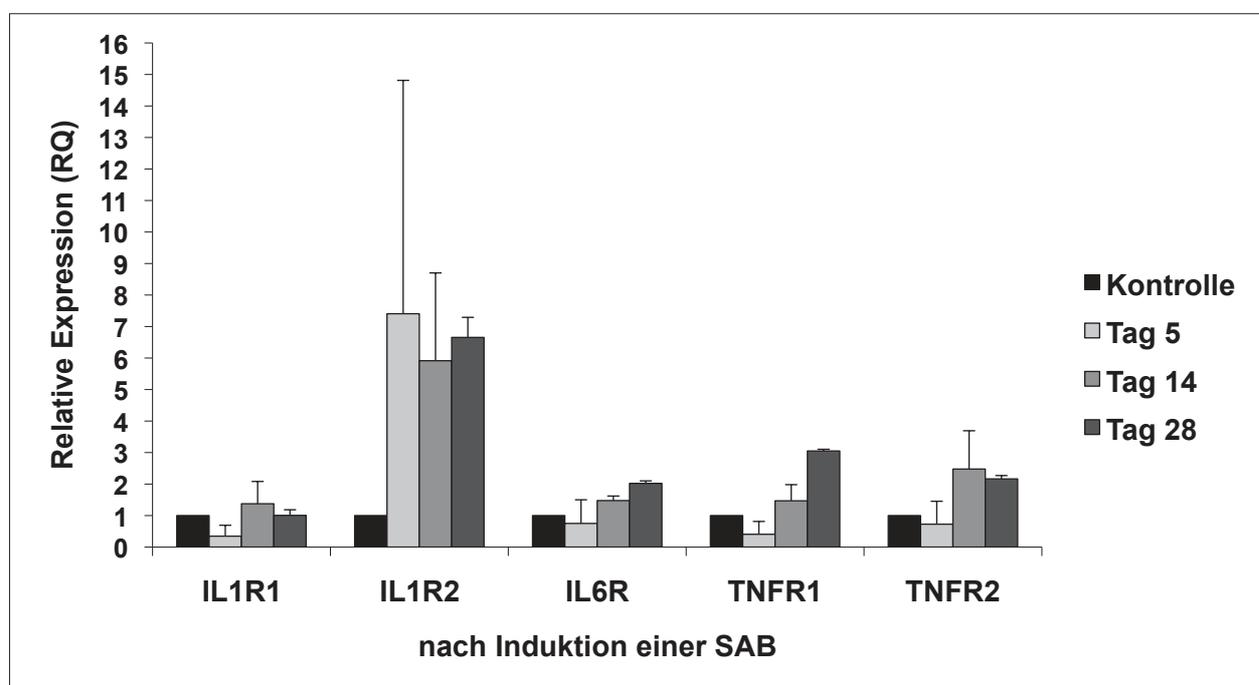


**Abbildung 18: Vermehrte mikrogliale Produktion von TNF nach aSAB; a)** Exemplarische Darstellung der CD11b<sup>+</sup>TNF<sup>+</sup> Zellpopulation mittels FACS- Analyse nach Zellaufreinigung der SAB-Hemisphären an Tag 5, 14 und 28 nach Induktion der aSAB; **b)** mit Hilfe einer FACS Analyse ermittelte Änderung der Produktion von TNF auf Proteinebene an Tag 5, 14 und 28 nach Induktion der aSAB; n=5, (\*  $p < 0,05$ , im Vergleich zur Kontrollgruppe)

### 5.2.2.2 Mikroglia/Makrophagen zeigen erhöhte Expression von Zytokinrezeptoren

Die Expression der Zytokinrezeptoren wurde analysiert, um zu ermitteln auf welche Zytokinsignale die Zellen potenziell reagieren können (Abb. 19).

Der Interleukin 1 Rezeptor Typ1 (IL1R1), der als Rezeptor für IL1 $\alpha$  und  $\beta$  dient, wurde in Bezug auf die verschiedenen Zeitpunkte nicht wesentlich verändert exprimiert. Im Gegensatz dazu zeigte sich für die Expression des Interleukin 1 Rezeptor Typ 2 (IL1R2), bei dem es sich um einen Scheinrezeptor ohne nachfolgende Signaltransduktion handelt, eine Erhöhung an Tag 5, die an Tag 14 und Tag 28 nach aSAB auf einem ähnlichen Niveau verblieb. Aus diesem Grund kann davon ausgegangen werden, dass es in Folge einer aSAB zur Inhibierung des IL1 $\alpha$  und  $\beta$ -Signalweges durch die Hochregulation des betreffenden Scheinrezeptor kommt. Hinsichtlich des Interleukin 6 Rezeptors (IL6R) fand sich eine Zunahme der Expression im zeitlichen Verlauf mit einem Maximum an Tag 28 nach Induktion der aSAB. Dies lies sich ebenfalls für den TNF Rezeptor Typ 1 (TNFR1) beobachten. Der TNF Rezeptor Typ 2 (TNFR2) wurde von Tag 5 zu 14 verstärkt exprimiert, wobei an Tag 28 die Expression wieder abnahm.



**Abbildung 19: Mikrogliale Expression von Zytokinrezeptoren nach aSAB;** mit Hilfe einer realtime PCR ermittelte relative Änderung der Expression von den Zytokinenrezeptoren IL1R1, IL1R2, IL6R, TNFR1 und TNFR2 auf mRNA-Ebene an Tag 5, 14 und 28 nach Induktion der aSAB; n=2 (d5, d28), n=3 (d14), pro Ansatz Pool von 6 SAB Hemsphären

## 6 DISKUSSION

Die aneurysmatische Subarachnoidalblutung bildet seit Jahrzehnten eine Herausforderung in der Forschung. Auf den ersten Blick erscheint der Mechanismus einfach und überschaubar. Es kommt zu einer arteriellen Blutung in den Subarachnoidalraum, begrenzt auf der einen Seite durch die Dura und auf der anderen durch die Pia mater. Der genaue Zusammenhang zwischen sich anschließenden pathophysiologischen Veränderungen und der Entstehung neuronaler Schädigung ist jedoch nicht verstanden. Lange Zeit stand der Vasospasmus im Vordergrund. Zuletzt hat ein Umdenken stattgefunden. Es wird nun davon ausgegangen, dass es in der frühen Phase nach einer aSAB zu einer Aktivierung verschiedener Wege kommt, welche unter dem Begriff der frühen Hirnschädigung zusammengefasst werden und in ungeklärter Weise einen verzögerten Hirnschaden nach sich ziehen, unabhängig von der Entstehung eines Vasospasmus.

In dieser Arbeit wurden zelluläre Reaktionen sowie inflammatorische Prozesse analysiert, die nun vor dem Hintergrund experimenteller Ergebnisse diskutiert werden sollen, in welchem Zusammenhang diese mit der Entstehung einer frühen bzw. verzögerten Hirnschädigung stehen könnten.

### 6.1 Kinetik der zellulären Reaktion nach aSAB im Mausmodell

Zunächst erfolgte im Rahmen der Analyse zellulärer Reaktionen im Anschluss an eine aSAB bei der Maus der Nachweis, dass es im Zeitverlauf zu einer Akkumulation von Mikrogliazellen und Astrozyten kommt. An Tag 2 nach aSAB fand sich noch keine signifikante Akkumulation wohingegen sich diese sowohl für Iba1 als auch GFAP an Tag 4 nach aSAB nachweisen ließ. Bei beiden Zellpopulationen steigerte sich diese Akkumulation im weiteren Zeitverlauf mit einem Maximum an Tag 14 nach aSAB. An Tag 28 nach aSAB fand sich für Iba1 sowie GFAP ein tendenzieller Rückgang dieser Akkumulation, jedoch mit auffällig hoher Standardabweichung. Der Grund für diese hohe Varianz ist unklar, sodass man aufgrund bisher fehlender Literatur nur spekulieren kann, dass das nicht erfassbare initiale Ausmaß der aSAB hierbei eine Rolle spielen könnte.

Vergleicht man die Kinetik der Mikroglia- und Astrozytenakkumulation sowie deren Zellzahl, kann man zwei Auffälligkeiten beobachten. Zum einen finden sich ähnliche Zellzahlen für jeden Zeitpunkt, obwohl es absolut mehr Astrozyten als Mikroglia im Gehirngewebe gibt. Wenn man sich die Zeitpunkte dann genauer anschaut fällt auf, dass an Tag 4 nach aSAB mehr Mikroglia akkumulieren als Astrozyten, an Tag 14 die Akkumulation von Astrozyten die der Mikrogliazellen zum Teil übersteigt und an Tag 28 nach aSAB übertrefft. Gerade im Hinblick auf die Ergebnisse von Tag 4 nach aSAB zeigte sich die Tendenz, dass die Aktivierung von Astrozyten zeitlich versetzt ist gegenüber der Mikrogliaakkumulation. Dies steht im Einklang mit dem aktuellen Stand der Forschung. In experimentellen Studien, welche die Interaktion von Mikrogliazellen mit Astrozyten untersuchten, wurde vermutet, dass Mikrogliazellen Astrozyten aktivieren, welche wiederum die Aktivierung von Mikrogliazellen erleichtern. Aktivierte Astrozyten sind dadurch charakterisiert, dass ihre intrazelluläre Kalziumkonzentration erhöht ist. Über die Diffusion von Inositoltriphosphat durch *gap junctions* und extrazelluläres ATP übermitteln sie sich gegenseitig Signale, die in einer Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration münden und als Kalziumwelle bezeichnet wird [101]. Eine erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentration führt zu einer Aktivierung verschiedener intrazellulärer Signaltransduktionswege, die kalziumabhängige Phospholipasen, Phosphatasen und Proteinkinasen mit einschließen. Dies führt unter anderem zu einer erhöhten Motilität sowie morphologischen Veränderungen von Astrozyten [102]. Man geht davon aus, dass diese Kalziumwelle auch benachbarte Mikrogliazellen beeinflussen kann [103]. In der Regel wird im experimentellen Rahmen zunächst eine Aktivierung von Mikrogliazellen, z.B. durch ATP beobachtet, während eine Aktivierung von Astrozyten erst im Verlauf beobachtet wird [104]. Andere experimentelle Studien stellten fest, dass IL1 eine wichtige Rolle bei der interzellulären Kommunikation zwischen der Aktivierung von Mikrogliazellen und Astrozyten zu spielen scheint.

## **6.2 Mikroglia/Makrophagen akkumulieren im Anschluss an eine aSAB**

### **6.2.1 Verteilung der Mikroglia/Makrophagen nach aSAB im Gehirngewebe**

Um die Aktivierung und Akkumulation von Mikrogliazellen im Anschluss an eine aSAB genauer zu charakterisieren, wurden nicht nur die Kinetik sondern ebenfalls drei verschiedene Hirnebenen analysiert um eine Vorstellung davon zu bekommen, inwieweit das Gehirnparenchym einbezogen ist. Hierbei fiel auf, dass es vor allem zu einer Akkumulation von Mikroglia in der Ebene kommt, die den Beginn der Hippocampusformation, den Hypothalamus sowie Thalamus beinhaltet. Des Weiteren ist zu betonen, dass die Akkumulation von Mikroglia lediglich in der Hemisphäre stattfand, wo die aSAB induziert wurde. Im Hinblick auf den zeitlichen Verlauf zeigte sich an Tag 4 nach aSAB zunächst eine Akkumulation streng basal. An Tag 14 nach aSAB dehnte sich diese Akkumulation bis einschließlich zum Hippocampus aus und an Tag 28 betraf sie die ganze Hemisphäre. Hierbei war jedoch zu sehen, dass die Zellen sich deutlich verteilten und keine dichte Akkumulation mehr zu beobachten war.

### **6.2.2 Trotz prozentualem Mikroglia/Makrophagen-Anstieg bleibt die absolute Mikroglia-Anzahl unbeeinflusst**

Wie bereits beschrieben, zeigte sich lediglich auf der Seite des Gehirns eine Akkumulation von Mikroglia, auf der die aSAB induziert wurde. Es stellt sich folglich die Frage, ob es zu einer Migration oder Proliferation von Mikroglia kam. Eine Beteiligung von Makrophagen kann ebenfalls nicht ausgeschlossen werden, da kein zuverlässiger Marker zur Differenzierung der beiden Zellpopulationen existiert. Im Rahmen der Zellisolierung zeigte sich nun ein signifikant erhöhter prozentualer Anteil der Mikroglia in der Zellsuspension, während die absolute Zellzahl im Anschluss an die Isolierung unverändert blieb. Diese Beobachtung lässt den Schluss zu, dass es zu einer Migration von Mikroglia zur aSAB Induktionsstelle kam und eher keine Proliferation stattfand.

### **6.2.3 Faktoren, die Mikrogliazellen im Anschluss an eine aSAB aktivieren können**

Die Mikrogliazellaktivierung nach aSAB ist eine neue Beobachtung, die viele Fragen mit sich bringt. Denn nicht nur die Konsequenzen, sondern auch die Ursache dieser Mikrogliazellaktivierung sollte untersucht werden. In der Literatur finden sich viele

Hinweise auf Faktoren, die Mikrogliazellen aktivieren können. Vergleicht man diese mit den in der Literatur beschriebenen pathophysiologischen Veränderungen nach einer aSAB kann man Mechanismen identifizieren, die ursächlich für eine Mikrogliazellaktivierung nach aSAB sein könnten.

Die Zusammensetzung der interstitiellen Flüssigkeit beeinflusst den Aktivitätszustand der Mikrogliazellen [63]. Unter physiologischen Bedingungen sind Mikrogliazellen durch die Blut-Hirn-Schranke von sanguinen Bestandteilen getrennt. Kommt es nun zu einer Schädigung der Blut-Hirn-Schranke treten Moleküle oder Proteine in das Parenchym über, die von Mikrogliazellen als fremd erkannt werden und zu einer Änderung des Aktivitätsstatus der Zellen führen. In verschiedenen Studien wurde nachgewiesen, dass Serumproteine wie Fibrinogen über die Rezeptoren CD11b und CD18 eine GTPase-abhängige Signaltransduktion vermitteln, welche im Sinne eines Gefahrensignals die Neuausrichtung des Zytoskeletts sowie vermehrte Phagozytose bedingt [66]. Bei dem tierexperimentellen Modell der Multiplen Sklerose (EAE) zeigte sich, dass eine Inhibition dieses Signalweges zu einer Reduzierung des Schweregrades der Erkrankung führte [105]. Im Rahmen einer aSAB kommt es zu einer morphologischen und funktionellen Veränderung von Kapillarendothelzellen [42]. Eine erhöhte Permeabilität auf der Ebene der Mikrozirkulation, d.h. eine Störung der Blut-Hirn-Schranke, ist sowohl in tierexperimentellen Studien als auch bei der Analyse von menschlichen Gewebeproben beobachtet worden [36, 45]. Ein Übertritt von Serumproteinen wie Fibrinogen ist damit im Anschluss an eine aSAB sehr wahrscheinlich und könnte für eine vermehrte Aktivierung von Mikrogliazellen mit verantwortlich gemacht werden.

Die gleiche Annahme kann für Thrombin getroffen werden, welches ebenfalls den Aktivitätszustand von Mikrogliazellen beeinflussen kann. Thrombin bindet an die Rezeptorenfamilie der PARs, die ebenfalls auf der Oberfläche von Mikrogliazellen nachweisbar sind [106]. Setzt man in experimentellen Studien Mikrogliazellen Thrombin aus, führt dies über einen G-Protein vermittelten Signaltransduktionsweg zur Freisetzung von NO, Zytokinen und Chemokinen wie TNF $\alpha$ , IL-12, KC, CXCL1, CCL2 (MCP-1), CCL3 und 4 (MIP1 $\alpha$  und  $\beta$ ) sowie CCL5 aus den Zellen [107-110]. Thrombin könnte folglich eine entscheidende Rolle bei der Regulation einer Mikrogliazellaktivierung stellen. Diesbezüglich fehlen jedoch wissenschaftliche Studien, so dass es sich um eine rein theoretische Überlegung handelt.

Eine weitere wichtige Rolle bei der Änderung des Aktivitätszustandes von Mikrogliazellen spielt das Glutamat. Dabei handelt es sich um einen exzitatorischen Neurotransmitter,

der - wenn in erhöhter Konzentration vorhanden - neurotoxisch wirkt. Die Konzentration kann entweder durch eine vermehrte Freisetzung aus Neuronen oder einen verminderten Abbau, v.a. über Astrozyten, erhöht sein. Mikrogliazellen verfügen über verschiedene Glutamatrezeptoren der Gruppe mGluRs. Diese Rezeptoren nehmen über einen Kalziumeinstrom in die Zelle (ionotrop) oder über den GPCR Signaltransduktionsweg Einfluss auf den Aktivitätststatus von Mikrogliazellen. Es ist unter anderem nachgewiesen, dass die Antwort von Mikrogliazellen auf einen akuten oder chronischen Schädigungsreiz von der selektiven Aktivierung von mGluRs abhängt und sowohl zu neurotoxischen als auch neuroprotektiven Mechanismen führen kann [66]. Erfolgt z.B. die Bindung von Glutamat an den Rezeptor mGluR2 auf Mikrogliazellen, so führt dies zu einer Aktivierung des GPCR/NF- $\kappa$ B - Signalweges, der eine vermehrte Synthese von TNF bewirkt und darüber hinaus in Zusammenhang mit der Schädigung von Neuronen steht. Jedoch regulieren extrinsische inflammatorische Stimuli die Expression der mGluRs und tragen damit zur Komplexität der Mikrogliazellaktivierung durch Glutamat bei [66]. Es ist folglich vor dem Hintergrund der aktuellen Forschungsergebnisse noch nicht möglich die Änderung des Aktivitätszustandes durch Glutamat genauer im Hinblick auf neuroprotektive oder neurotoxische Mechanismen zu charakterisieren. Im Anschluss an eine aSAB könnte Glutamat jedenfalls bei der Regulation des Aktivitätszustandes von Mikrogliazellen eine Rolle spielen. Denn zum einen wurden erhöhte intersitielle Glutamatkonzentrationen bei aSAB-Patienten nachgewiesen und zum anderen wurde eine Störung der elektrischen Aktivität des Gehirns in Form einer kortikalen Streudepolarisation, induziert durch SAB-Liquor, festgestellt. Die kortikale Streudepolarisation konnte zu einem frühen als auch späten Zeitpunkt beobachtet [25] und mit einer erhöhten Glutamatrezeptoraktivität in Verbindung gebracht werden [111]. Eine Änderung der Mikrogliazellaktivität durch eine erhöhte Glutamatkonzentration im Rahmen einer kortikalen Streudepolarisation erscheint logisch, wurde jedoch noch nicht wissenschaftlich untersucht. In jedem Fall weist die aktuelle Studienlage darauf hin, dass die Ionenverschiebungen, welche zur kortikalen Streudepolarisation führen, ebenfalls an der Entstehung von EBI und DINDs beteiligt sind.

Ein weiterer Faktor, der die Mikrogliazellaktivität im Anschluss an eine aSAB ändern könnte, ist ATP bzw. ADP, welches in diesem Fall vor allem aus geschädigten Neuronen freigesetzt wird. Bei ATP handelt es sich um einen purinergen Neurotransmitter, der an die Rezeptoren P2Y (ionotrop) oder P2X (metabotrop) auf

Mikrogliazellen bindet. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, wie der aktuelle Rezeptorstatus von Mikrogliazellen die zelluläre Antwort beeinflusst und dass auf einen identischen Stimulus verschiedene Reaktionen möglich sind. Über den Rezeptor P2Y<sub>12</sub> mit nachfolgendem GPCR-abhängigem Signatransduktionsweg fördert ATP z.B. die Größenzunahme der Mikrogliazellfortsätze [66, 112]. Im Gegensatz dazu kann UDP über Bindung an den Rezeptor P2Y<sub>6</sub> die Phagozytoseaktivität der Mikrogliazellen steigern [113].

Des Weiteren könnte die im Anschluss an eine aSAB erhöhte ET-1 Konzentration Auswirkungen auf die Mikrogliazellaktivität haben. Genaue Forschungsergebnisse diesbezüglich fehlen, jedoch ist bekannt, dass Mikrogliazellen auf ihrer Oberfläche den ET<sub>B</sub> Rezeptor tragen. Bindet ET-1 an diesen Rezeptor, so kommt es zu einer InsP<sub>3</sub>-induzierten Mobilisation von intrazellulärem Kalzium. Es wurde beobachtet, dass es zu einer Hochregulation dieses Rezeptors im Rahmen von ischämischen Ereignissen kommt [63].

Anhand der Literatur lassen sich also bereits Faktoren feststellen, die theoretisch nach einer aSAB zur Aktivierung von Mikrogliazellen beitragen und als Grundlage für weitere Experimente dienen könnten, um den tatsächlichen Auslöser bzw. eine Kombination aus verschiedenen auslösenden Faktoren zu identifizieren.

### **6.3 Mikroglia und deren Expression pro-inflammatorischer Faktoren nach Induktion der aSAB**

Das Ziel dieser Arbeit war, die Aktivierung von Mikrogliazellen nach aSAB genauer zu charakterisieren.

Im Allgemeinen sind Mikrogliazellen an dem Umbau der Synapsen beteiligt. Es wurde nachgewiesen, dass sie neuronale Wachstumsfaktoren produzieren. Zudem sind sie in der Lage die Apoptose von Neuronen zu induzieren sowie die Gefäßentwicklung zu beeinflussen[66].

Im Speziellen wurde bei Reaktionen auf Infektion und Verletzung festgestellt, dass die frühe schnelle Antwort der Mikrogliazellen der von Gewebemakrophagen entspricht[66]. MHC-Histokompatibilitätskomplex-Antigene, Marker für die Aktivierung von Lymphozyten und andere Immunzellantigene beginnen auf der Oberfläche der Mikrogliazellen zu erscheinen. Dies klassifiziert sie als antigenpräsentierende Zellen. Es wird ebenfalls eine Migration von Mikrogliazellen ins betroffene Areal, d.h. eine Chemotaxis, eine Phagozytose sowie eine Sekretion proinflammatorischer Faktoren, um andere Zellen zur Proliferation anzuregen, beschrieben. Des Weiteren können Mikrogliazellen die Gewebeheilung fördern, indem sie Wachstumsfaktoren ausschütten und letztlich zur Wiederherstellung der Gewebemhomöostase beitragen[114, 115]. Die Vielzahl an wissenschaftlichen Arbeiten über die Aktivierung von Mikrogliazellen bei unterschiedlichen Erkrankungen des ZNS lässt den Schluss zu, dass die Antwort der Mikrogliazellaktivierung zum einen von der Art des Stimulus und zum anderen vom Rezeptorstatus der Zellen, die sich in Nachbarschaft befinden, abhängt. Daher können die Beobachtungen nicht problemlos auf die Verhältnisse im Rahmen einer aSAB übernommen werden.

Durch die Erstellung eines Zytokinexpressionsprofils von Mikroglia nach aSAB sollte eine genauere Charakterisierung der Mikrogliaaktivierung im Rahmen dieser Erkrankung erfolgen.

#### **6.3.1 Ein kleiner Anteil von Mikroglia produziert signifikant vermehrt Interleukin 6 nach aSAB**

IL6 ist ein inflammatorisches Zytokin, das nicht nur an Entzündungsprozessen beteiligt ist. Es scheint eine Rolle bei dem emotionalen Verhalten sowie Stress von Mäusen zu spielen [116]. In einem weiteren tierexperimentellen Versuch zeigte sich zudem, dass

durch Verabreichung von IL6 Müdigkeit, Asthenie sowie eine verminderte Nahrungsaufnahme induziert werden können [117]. Auch im Bereich von neuroimmunologischen Interaktionen, bei denen das ZNS Einfluss auf die periphere Immunantwort nehmen kann, wurden IL6 wichtige Funktionen zugewiesen. In tierexperimentellen Studien mit Mäusen war eine signifikante Erhöhung der Körpertemperatur messbar, nachdem ihnen IL6 verabreicht wurde [117]. Im Umkehrschluss war es durch verschiedene Stimuli nicht möglich, bei IL6 defizienten Mäusen die Körpertemperatur zu erhöhen [118]. Des Weiteren nimmt IL6 eine Rolle bei der Regulation des Hormonhaushaltes ein, da es in der Lage ist, die Expression des Kortikotropin-freisetzenden Hormons (CRH) und folglich die Freisetzung von ACTH sowie Glukokortikoiden zu stimulieren [119].

Unter pathologischen Bedingungen bzw. im Rahmen von inflammatorischen Prozessen bei akuten oder chronischen neurodegenerativen Erkrankungen wird IL6 sowohl im Liquor als auch im Serum von Patienten sowie Versuchstieren in erhöhten Konzentrationen nachgewiesen. Im Rahmen einer prospektiven klinischen Studie wurden die Konzentrationen von IL6 im Liquor, extrazellulärem Kompartiment und Serum von Patienten, die eine aSAB erlitten, mittels zerebraler Mikrodialyse bestimmt. Die Autoren stellten erhöhte Konzentrationen von IL6 im Liquor sowie extrazellulären Kompartiment fest, dass es verschiedene Ursprünge dieser erhöhten IL6-Produktion geben könnte und, dass bei symptomatischen aSAB Patienten in allen drei Kompartimenten erhöhte Werte festgestellt wurden. Zudem hoben sie hervor, dass die cerebralen IL6-Spiegel, d.h. im extrazellulären Kompartiment und Liquor, und nicht der Plasmaspiegel von IL6 in Verbindung stehen mit der Entwicklung von verzögerten ischämischen Defiziten bei symptomatischen aSAB Patienten [120].

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die Mikroglia verantwortlich sind für die vermehrte Expression und Produktion von IL6 nach aSAB. Hierbei zeigte sich sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene im Zeitverlauf nach aSAB eine zunehmende mikrogliale IL6 Synthese, wobei nur ein kleiner Anteil, d.h. ca. 1%, der Mikroglia IL6 produziert. Durch die FACS-Analyse der Zellsuspensionen konnte zudem nachgewiesen werden, dass die Mikroglia nahezu die einzige Quelle von IL6 im Hirnparenchym sind. Durch eine Kontroll-Immunfluoreszenzfärbung bestätigte sich dieses Ergebnis. Es fanden sich lediglich Iba1 positive Zellen, die eine IL6-Expression zeigten. Die Frage besteht nun darin, ob dabei das IL6, unter anderem ein wichtiger

Regulator der akuten Immunreaktion, eine eher neuroprotektive oder Neuronenschädigende Funktion einnimmt.

Die Ergebnisse der bereits zitierten Studie [120] weisen eher auf eine Neuronenschädigende Wirkung der erhöhten IL6-Konzentration nach aSAB hin. In anderen klinischen Studien wird ebenfalls ein Zusammenhang zwischen einer erhöhten Körpertemperatur, die durch IL6 vermittelt wird, und dem schlechten outcome hergestellt. Es zeigte sich, dass eine Erhöhung der Körpertemperatur im Rahmen von ischämischen Schlaganfällen mit einem schlechten *outcome* bzw. Zunahme der ischämischen Schädigung [121] korreliert.

Man muss jedoch einseitige Schlussfolgerungen vermeiden. In experimentellen Versuchen wurde eine dosisabhängige Wirkung von IL6 beobachtet. Die systemische Verabreichung von IL6 sowie sIL6R führte zum Nachweis einer verstärkten Neurodegeneration, Gliose, Mikrogliazellaktivierung, vaskulären Proliferation und Beeinträchtigung der Blut-Hirn-Schranke [122]. Im Gegensatz dazu zeigten aber auch IL6 defiziente Mäuse eine erhöhte Empfindlichkeit der Neuronen gegenüber schädlichen Einflüssen, z.B. im Rahmen eines Traumas [123]. Loddik *et al.* zeigten in einer Versuchsreihe mit Ratten, dass die intrathekale Applikation von IL6 bis zu einer Menge von 500ng eine Schädigung von Neuronen nach fokaler Ischämie reduziert, während Mengen darüber zu einer Zunahme der Schädigung führten [124]. Weitere Argumente, die für eine primär neuroprotektive Wirkung von IL6 sprechen, sind, dass IL6 die Synthese von TNF inhibieren kann.

Die Wirkung von IL6 beschränkt sich jedoch nicht nur auf Neuronen. Es finden sich bereits einige Hinweise darauf, dass das Zytokin auch einen Einfluss auf die interzelluläre Informationsübertragung zwischen Neuronen und Astrozyten sowie Mikrogliazellen hat. März *et al.* stellten in ihrer Publikation von 1999 die Hypothese auf, dass IL6 die Antwort der Gliazellen auf eine Aktivierung oder Schädigung von Neuronen moduliert [125]. IL6 ist in der Lage die Synthese von neurotrophen Faktoren in Astrozyten, abhängig von der Lokalisation dieser innerhalb des ZNS, zu induzieren und die von TNF zu hemmen [125]. Folglich könnte IL6 eine entscheidende Rolle bei der interzellulären Kommunikation von Mikroglia mit Neuronen und Astrozyten sowie der Neuronenschädigung nach aSAB spielen und sollte das Ziel weiterer Experimente darstellen.

### 6.3.2 Hochregulation von TNF und seiner Rezeptoren auf RNA- und Proteinebene nach aSAB

Anhand der Ergebnisse zahlreicher experimenteller Studien lassen sich Hinweise auf entscheidende Funktionen von TNF innerhalb des ZNS sowohl unter physiologischen als auch unter pathologischen Bedingungen finden. Erhöhte Konzentrationen von TNF werden bei einer Reihe von akuten sowie chronischen neurodegenerativen Erkrankungen nachgewiesen, unter anderem bei ischämischen Schlaganfällen, akuten traumatischen Hirnschädigungen, Multipler Sklerose, M. Alzheimer und M. Parkinson. Es ist bis jetzt nicht geklärt, ob TNF im Rahmen dieser Erkrankungen zu einer Verstärkung oder Begrenzung der Neuronenschädigung beiträgt[88].

Es besteht im Allgemeinen der Verdacht, dass eine potentiell neurotoxische oder neuroprotektive Wirkung von TNF davon abhängt, welche Zelle wo das Zytokin intrazerebral produziert bzw. freisetzt und wie sich das Expressionsmuster - die TNF-Rezeptoren - betreffend, zusammensetzt.

Sriram *et al.* geben in ihrem Review zumindest ansatzweise einen allgemeinen Überblick über die Mechanismen, durch welche TNF eine Toxizität und Protektivität vermitteln kann [126]. Dabei zählt zu den toxischen Mechanismen von TNF die Stimulation von Endothelzellen und Veränderung der Blut-Hirn-Schranke, die eine Adhäsion und Infiltration von Immunzellen ermöglicht. Dieser Vorgang wurde bereits im Anschluss an eine aSAB beobachtet [36]. Des Weiteren stimuliert TNF die Apoptose zerebraler Endothelzellen der Mikrogefäßzirkulation und bedingt die Zunahme des vaskulär bedingten Ödems. Beide Mechanismen wurden ebenfalls nach einer aSAB beobachtet. Zudem moduliert TNF die Ionenströme sowie die intrazelluläre Kalziumhomöostase und reguliert die Membranpotentiale sowie die Langzeitpotentierung. Dies könnte eine Rolle bei der Entstehung von kortikalen Streudepolarisationen nach aSAB spielen [25]. TNF kann weiterhin eine Glutamatvermittelte Toxizität durch Behinderung der Glutamataufnahme verstärken. Erhöhte Glutamatkonzentrationen wurden ebenfalls nach Induktion einer aSAB bzw. bei Patienten nach aSAB nachgewiesen. Schließlich wurde beschrieben, dass TNF Mikrogliazellen aktivieren kann als Schlüsselreiz in einem Teufelskreis mit oxidativen Prozessen sowie Freisetzung inflammatorischer Zytokine. TNF könnte damit ein Faktor sein, der die Mikrogliazellen nach aSAB aktiviert und ein Bindeglied darstellen zwischen der Mikrogliazellaktivierung und Neuronenschädigung nach aSAB.

Jedoch gibt es einige Mechanismen, durch welche TNF eine Protektivität vermitteln und damit eine Neuronenschädigung abwenden kann. Denn TNF kann Astrozyten aktivieren und stimuliert die Freisetzung neurotropher Faktoren. Des Weiteren aktiviert TNF reparative Prozesse von peripheren Nerven sowie der cerebralen Mikrogefäßzirkulation. Es stimuliert die synaptische Signalübertragung und fördert damit die neuronale Plastizität. Durch die Aktivierung des NF- $\kappa$ B - Signalwegs werden ebenfalls neuroprotektive Mechanismen vermittelt. Zudem induziert TNF anti-apoptotische Faktoren wie Bcl-2 und antioxidative Signalwege. TNF reguliert weiterhin das extrazelluläre Kalzium sowie das Kalzium-bindende Protein calbindin-D28K und wirkt darüber neuroprotektiv [126].

Im Speziellen kristallisiert sich anhand verschiedener Beispiele aus der Literatur die ambivalente Rolle von TNF sowie die Abhängigkeit der Wirkung von Umweltfaktoren heraus. Unter anderem ist TNF dafür verantwortlich, dass es im Rahmen von Neuronenschädigung zur Aktivierung von Mikrogliazellen und Astrozyten kommt. Des Weiteren kann TNF die Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke beeinflussen und ist an der Regulation der Fieberreaktion, glutamatergen Neurotransmission und synaptischen Skalierung sowie Plastizität beteiligt [88]. TNF ist in der Lage die Anzahl von AMPA-Rezeptoren an der Synapsenoberfläche zu erhöhen und die von GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren zu erniedrigen, wodurch das exzitatorische Signal verstärkt und das inhibitorische abgeschwächt wird [88]. Im gleichen Maß kann TNF jedoch ebenfalls Neuronen vor dem schädlichen Einfluss einer erhöhten Exzitation schützen, indem über den TNFR2 vermittelt, der NF- $\kappa$ B - Signalweg aktiviert wird [100]. Bei Versuchen mit hippocampalen Neuronen und TNF defizienten Mäusen zeigte sich zudem, dass TNF hier für eine regelrechte neuronale Entwicklung notwendig ist [127].

In experimentellen Studien mit dem Ischämie-Modell zeigte sich zum einen eine Induktion der TNF-Synthese und dass diese mit einer Exazerbation neurologischer Defizite und der Infarktgröße korreliert [88, 128]. Zum anderen konnte nachgewiesen werden, dass nach globaler transients cerebraler Ischämie eine frühe Synthese von TNF vor allem in Neuronen und eine im Zeitverlauf verzögerte Synthese in glialen Zellen stattfindet, wobei regionale Unterschiede intrazerebral bestehen [129]. Im Rahmen dieser Arbeit konnte ebenfalls eine mikrogliale TNF-Produktion nachgewiesen werden.

Weitere Ergebnisse von Studien, die sich mit der Inhibition der TNF-Wirkung befassten z.B. mittels Antikörpern, implizieren eine protektive Wirkung und finden sich in Einklang

mit den vorausgegangenen Erkenntnissen. Die beschriebene protektive Wirkung umfasst im Wesentlichen eine Reduzierung der Infarktgröße und der neurologischen Defizite [130]. Jedoch wurde erneut die ambivalente Rolle von TNF offenbart, da bei Verabreichung von anti-TNF Antikörpern die Regeneration hippocampaler Neurone im Anschluss an ein ischämisches Ereignis beeinträchtigt wird. Zudem zeigte sich eine Zunahme sowie Intensivierung epileptischer Anfälle, was ebenfalls auf eine relevante Rolle von TNF an der funktionalen hippocampalen Integrität im Anschluss an ein ischämisches Ereignis schließen lässt [131]. Unter Evaluation der aktuellen Studienlage geht man davon aus, dass TNF über den TNFR2 maßgeblich an der hippocampalen Erholung und Neurogenese im Anschluss an schädigende Ereignisse beteiligt ist [88]. Nichtsdestotrotz besteht der Verdacht, dass TNF, von Mikrogliazellen freigesetzt, an der Entstehung neuronalen Schadens beteiligt ist und dass dieser Effekt von der Lokalisation der betroffenen Neuronen bzw. dem Expressionsmuster dieser die TNF-Rezeptoren betreffend abhängt [129]. So wurde im Rahmen einer experimentellen Studie mit dem systemisch verabreichten dopaminergen Neurotoxin MPTP festgestellt, dass das von Mikrogliazellen exprimierte TNF im Striatum neuronenschädigend im Hippocampus jedoch neuroprotektiv wirkt [132]. Eine weitere experimentelle Studie, die sich mit der TNF-Expression von Mikrogliazellen nach einem fokalen ischämischen Ereignis beschäftigte, zeigte, dass hierbei sowohl Mikrogliazellen und Makrophagen hauptsächlich für die TNF-Synthese verantwortlich sind. Zudem wurde im Ischämiemodell nachgewiesen, dass Mikrogliazellen an der Stelle der ischämischen Schädigung vermehrt TNFRs exprimieren [88, 129]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ebenfalls nachgewiesen, dass es zur Hochregulation der mikroglialen TNFR-Expression auf RNA- sowie Proteinebene kommt. Hinsichtlich der mikroglialen Produktion von TNF auf Proteinebene zeigte sich eine Zunahme im Zeitverlauf mit einem Maximum an Tag 14 nach aSAB. Auf mRNA-Ebene finden sich dagegen andere Ergebnisse. Die mikrogliale Expression von TNF ist an Tag 5 und 28 reduziert und Tag 14 hochreguliert. Jedoch findet sich hierbei eine auffällig hohe Standardabweichung. Methodische Ursachen konnten durch Wiederholung der Experimente unter identischen Bedingungen ausgeschlossen werden, sodass hier ein Zusammenhang mit dem Ausmaß der induzierten aSAB vermutet werden muss. Denn das Fadenperforationsmodell zur Induktion einer aSAB bei der Maus hat zum Nachteil, dass man das Ausmaß der initialen Blutung nicht kontrollieren kann. Man kann lediglich durch bestmögliche Kontrolle der beeinflussenden Faktoren den Ablauf der Induktion konstant

halten. Zu diesen Faktoren zählt die Erfahrungheit des Operateurs sowie eine genaue Markierung des Perforationsfadens in Abhängigkeit von Alter, Gewicht und Geschlecht der Versuchsmäuse. Bei der Operation selber wurde der Faden langsam und in Milimeterschritten vorgeschoben bis es zu klinischen Zeichen wie Atemaussetzung, veränderter Atemfrequenz oder Miktion kam, die das Eintreten einer aSAB charakterisieren. Es durfte dabei nur ein Perforationsversuch erfolgen. Letztlich konnte erst bei der Aufarbeitung der Gehirne überprüft werden ob es zu einer Verletzung des Gehirns kam. Bei einer Parenchymverletzung wurde das Gehirn verworfen. Das Ausmaß der aSAB war jedoch auch hier nicht mehr zu ermitteln. Im Verlauf der Experimente wurde versucht mittels cMRT das Ausmaß der initialen aSAB zu erfassen. Es blieb jedoch nur bei einem Versuch, denn die MRT-Bildgebung benötigte eine längere Narkose der Versuchsmäuse, die zu einer erhöhten Mortalität beitrug. Man kann folglich weiterhin nur vermuten, dass das Ausmaß der initialen aSAB eine unterschiedlich starke Erhöhung der TNF-Expression an Tag 14 nach aSAB bedingt.

### **6.3.3 Hochregulation von Interleukin 1 nach aSAB**

Unabhängig von inflammatorischen Prozessen ist unter physiologischen Bedingungen im ZNS eine Beteiligung von IL1 an der Regulation des Tiefschlafs, der synaptischen Plastizität (Langzeitpotenzierung), des Appetits und neuroendokriner Funktionen festgestellt worden. Im Falle von pathologischen Bedingungen belegen einige klinische und tierexperimentelle Studien mittlerweile, dass es im Rahmen einer Neuronenschädigung zu einer Erhöhung der Expressionsrate auf mRNA-Ebene innerhalb von Minuten und auf Protein-Ebene innerhalb von Stunden kommt [50]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte ebenfalls eine signifikante Hochregulation sowohl von IL1 $\alpha$  als auch IL1 $\beta$  auf RNA-Ebene über den gesamten beobachteten Zeitverlauf von Tag 5 bis 28 nach aSAB gezeigt werden. Die Frage, ob IL1 dabei eine neuroprotektive oder neurotoxische Funktion einnimmt, ist jedoch nicht sicher geklärt. Studien, die auf in vitro Versuchen basieren, deuten auf eine neuroprotektive Wirkung durch Erhöhung von neuronalen Wachstumsfaktoren von IL1 hin. In in vivo Versuchen mit exogen zugeführtem IL1 zeigt sich dagegen, dass im Zusammenspiel mit anderen pro-inflammatorischen Substanzen [133] oder bei ischämisch, traumatisch und toxisch vorgeschädigtem Gewebe, eine Zunahme der Neuronenschädigung nachweisbar ist [134, 135]. Der Einsatz von endogenem IL1RA (Interleukin 1 Rezeptor Antagonist)

erbrachte hierbei eine zusätzliche Erkenntnis. In Versuchen mit Mäusen und Ratten konnte eine signifikante Reduktion des neuronalen Schadens in Folge eines ischämischen Ereignisses (global, fokal, permanent, temporär) durch die Verabreichung von endogenem IL1RA oder eine Erhöhung der Expression von IL1RA erzielt werden[136]. Dieses Ergebnis wurde ebenfalls beim Einsatz von spezifischen Antikörpern gegen IL1RA beobachtet, unter anderem nach Induktion einer aSAB in Mäusen mittels des ebenfalls in dieser Arbeit verwendeten Fadenperforationsmodells[137]. Zusammenfassend ist folglich festzuhalten, dass aufgrund der in vivo Ergebnisse IL1 eher neurotoxisch als neuroprotektiv wirkt und dass der Effekt von der Menge an freigesetztem IL1 und der Art der Verletzung abhängt.

Abgesehen von einer möglichen neurotoxischen Wirkung könnte das mikrogliale IL1 auch entscheidend an der interzellulären Kommunikation zwischen der Aktivierung von Mikrogliazellen und Astrozyten beteiligt sein. Innerhalb der Gruppe der Gliazellen scheinen die Astrozyten die Zellen zu sein, die gegenüber IL1 am empfindlichsten sind. IL1 stimuliert ihre Proliferation, dieser Prozess wird auch als Astrogliose bezeichnet. In vitro Experimente belegen, dass bei Exposition von Astrozytenkulturen gegenüber IL1 die Expression von nahezu 1400 Genen verändert wird[138]. Die Rolle der Zellen bezüglich einer Neuronenschädigung ist jedoch komplex, da sie zum einen die Neuronen unterstützen können, indem sie Ionen- sowie Transmitterkonzentrationen regulieren und zum anderen im gleichen Zug Quelle pro-inflammatorischer und damit potentiell neurotoxischer Proteine sind[139]. Das von Mikroglia produzierte IL1 könnte daher eine Rolle bei der zeitversetzten Aktivierung von Astrozyten im Anschluss an die Mikrogliaaktivierung spielen. Eine mögliche Neurotoxizität dieser IL1-vermittelten Aktivierung kann jedoch anhand der vorhandenen Literatur nicht geklärt werden.

Zuletzt stellt sich die Frage, ob das mikrogliale IL1 ebenfalls einen Effekt auf die Mikrogliazellen selbst haben könnte. Im Rahmen dieser Arbeit zeigte sich schließlich, dass es zu einer Hochregulation des IL1R2 kam. Dabei handelt es sich um einen Scheinrezeptor, der keine Signaltransduktion vermittelt und damit als Antagonist wirkt. Des Weiteren fiel auf, dass der IL1R1 als eigentlicher Vermittler des IL1-Signals unverändert bzw. tendenziell sogar vermindert exprimiert wurde. Folglich kann man aufgrund dieser Beobachtungen davon ausgehen, dass die Mikroglia anscheinend einer Autoaktivierung entgegenwirken. In experimentellen Studien, in denen Kulturen von Mikrogliazellen mit IL1 versetzt wurden, kann man beobachten, welche Effekte solch eine Exposition im Allgemeinen hat. Zum einen setzten die Zellen neurotoxische

Moleküle wie z.B. reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies, Eicosanoide (PGE<sub>2</sub>), pro-inflammatorische Zytokine (TNF) sowie Chemokine (CCL2)[140] aber auch neuroprotektive Substanzen frei[141].

Es muss jedoch darauf verwiesen werden, dass sich bei experimentellen Versuchen Hinweise bezüglich spezies-spezifischen Unterschieden bei der Expression des IL1R1 ergaben. Bei Mäusen ist in Mikrogliazellkulturen der IL1R1 im Vergleich zu Ratten kaum exprimiert, die IL1-Signaltransduktion nicht induzierbar[142]. Dies könnte folglich ebenfalls verantwortlich sein für die in dieser Arbeit beobachteten Expressionswerte von IL1R1 und IL1R2.

Unter den Wirkungen, die IL1 auf die zerebralen Gefäßendothelien entfaltet, wurde bis jetzt im Wesentlichen eine Erhöhung der Expression von Molekülen beobachtet, die eine Leukozytenadhäsion sowie -migration fördern[143]. Daher könnte IL1 ebenfalls eine Rolle bei der Leukozytenadhäsion und -migration im Anschluss an eine aSAB spielen.

## 6.4 Nachweis axonalen Schadens in Verbindung mit Mikrogliazellakkumulation

Neben einer Aktivierung und Akkumulation von Mikrogliazellen konnte des Weiteren nachgewiesen werden, dass es zu einer axonalen Schädigung von Neuronen nach aSAB kommt. Dies erfolgte mittels des Amyloid Vorläuferproteins (*engl.* amyloid precursor protein, APP). Dabei handelt sich um ein Protein, das konstant entlang des neuronalen Axons transportiert wird. Im Rahmen einer axonalen Schädigung kommt es folglich zu einer Akkumulation von APP im Bereich der Bruchstelle. In den immunohistologischen Färbungen zeigte sich hierbei, dass APP an Tag 4 nach aSAB erstmals nachgewiesen werden konnte und sich an Tag 14 das Maximum der Akkumulation befand bevor diese an Tag 28 wieder zurückging. Hinsichtlich der Verteilung und des Zeitverlaufs der APP-Akkumulation fiel eine große Ähnlichkeit zu der Mikrogliazellaktivierung auf. Dies ist ein wichtiger Hinweis darauf dass es im Anschluss an eine experimentell induzierte aSAB zu einer Interaktion zwischen Neuronen und Mikrogliazellen kommt. Jedoch erlaubt dies keine Rückschlüsse darauf, inwieweit die Mikrogliazellen an dem Ausmaß der axonalen Schädigung beteiligt sind und, ob die axonale Schädigung der Mikrogliazellaktivierung vorausgeht oder nachfolgt.

Ein Zusammenhang zwischen der Mikrogliazellaktivierung und Neuronenschädigung wurde bisher noch nicht beschrieben. In der Literatur wurde insbesondere die Evaluation von Neuronenschädigung und *outcome* der Patienten nach aSAB diskutiert. Hierbei spielte die Neuronenspezifische Enolase (NSE) eine entscheidende Rolle. Bei der NSE handelt es sich um ein Enzym, das unter anderem in Neuronen vorkommt und bei einer Zellschädigung ins Serum gelangt. Die NSE ist mittlerweile ein anerkannter Marker für Neuronenschädigung. Oertel *et al.* untersuchten in einer klinischen Studie mit 51 SAB-Patienten in den ersten drei Tagen die Serumkonzentrationen von NSE und konnten nachweisen, dass eine Erhöhung von NSE mit der subarachnoidalen Blutmenge, einem schlechten initialen neurologischen Status und der Entstehung von DINDs korreliert [144].

Abgesehen davon sind noch weitere Formen der Zellschädigung bzw. des Zelltodes im Anschluss an eine aSAB beschrieben worden. Die Erkenntnisse über den frühen Zelltod nach aSAB stammen - wie auch die meisten anderen Studien über die Entstehung von EBI nach aSAB - vorzugsweise aus Versuchen mit Tieren, in seltenen Fällen konnten Autopsiebefunde ausgewertet werden. In allen Studien wurden

verschiedene Formen des Zelltodes beobachtet. In tierexperimentellen Studien ist die Apoptose von Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten in den ersten 24 Stunden [145] und die Apoptose von glatten Muskelzellen sowie Endothelzellen 24 bis 72 Stunden nach aSAB nachweisbar [146]. Abgesehen von der Apoptose, wurden auch Nekrose und Autophagie als Mechanismen des Zelltodes dokumentiert [147, 148]. Bei der Analyse menschlicher Präparate, die im Rahmen von Autopsien gewonnen wurden, konnten ähnliche Beobachtungen gemacht werden. Es fand sich eine neuronale Apoptose im Bereich des Gyrus dentatus [149].

Weiterhin wurde in tierexperimentellen Versuchen ermittelt, über welche Wege die Apoptose nach aSAB induziert wird. Man unterscheidet einen extrinsischen von einem intrinsischen Signalweg. In dem Großteil der Studien zeigte sich, dass der Apoptose nach aSAB hauptsächlich eine Aktivierung des intrinsischen Kaspase-abhängigen Signalwegs zugrunde liegt. Der Kaspase-abhängige intrinsische Signalweg wird durch eine pathologische Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration aktiviert [150]. Es kommt dabei unter anderem zu einer Aktivierung von *calcium activated proteases* (calpains) und Kaspasen. Verschiedene Autoren wiesen in ihren Studien nach, dass es innerhalb von 40 Minuten nach induzierter aSAB in Hunden zu einer Aktivierung von calpains in der A. basilaris kommt [151] und dass durch Inhibierung der calpains die Entstehung von Vasospasmen [152], neurologischen Defiziten sowie die Öffnungswahrscheinlichkeit der Blut-Hirn-Schranke [153] reduziert wird. Ähnliche Effekte konnten beobachtet werden, nachdem man die Wirkung der Kaspasen gehemmt hatte [154]. Eine Apoptose - über den extrinsischen Signalweg, d.h. über einen Rezeptor mit einer Todesdomäne (DD) wie dem TNFR1, induziert - wurde lediglich in einer Studie sieben Tage nach Induktion der aSAB beschrieben [155].

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass im Rahmen dieser Arbeit nicht nur der Nachweis einer axonalen Neuronenschädigung nach aSAB bestätigt, sondern erstmals der zeitliche Verlauf und die Verteilung der Neuronenschädigung charakterisiert sowie ein Zusammenhang zwischen der Mikrogliazellaktivierung und Neuronenschädigung nach aSAB beobachtet wurde. Dies ist ein wichtiger Ansatz für weitere Experimente. Durch die Erfassung der mikroglialen Zytokinexpression und -produktion nach aSAB konnten bereits Faktoren identifiziert werden, die in der Lage sind Neuronenschädigung zu fördern oder abzuwenden.

## 6.5 Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Promotion konnte eine Aktivierung von Mikrogliazellen und Astrozyten sowie eine neuronale Schädigung im Anschluss an eine experimentell induzierte Subarachnoidalblutung nachgewiesen werden.

Eine wesentliche Frage besteht nun darin, ob es sich bei den Iba1-positiven Zellen wirklich um Mikrogliazellen handelt. Denn aktuell gibt es immer noch keinen Marker, der zuverlässig eine Mikrogliazelle von einem Makrophagen unterscheidbar macht. Um dies zu klären, könnte mit Hilfe des chimären Mausmodells das Knochenmark einer gentechnisch veränderten Maus, deren Proteine mit einem grün fluoreszierenden Protein verbunden sind (GFP), einer Maus vom Wildtyp transplantiert werden. Im Anschluss daran erfolgt die endovaskuläre Induktion einer aSAB und der Nachweis, ob sich im Gebiet der fraglichen Mikrogliazellaktivierung ebenfalls grün fluoreszierende Zellen, d.h. Makrophagen, befinden und welchen Anteil sie ausmachen.

Da sich eine Ähnlichkeit der neuronalen Schädigung gegenüber der Mikrogliazellaktivierung hinsichtlich des Zeitverlaufs und des Verteilungsmusters zeigte, wäre es interessant zu beleuchten, inwieweit die Mikrogliazellaktivierung das Ausmaß der neuronalen Schädigung beeinflusst. Diesbezüglich könnten CD11b-HSVTK-Mäuse eingesetzt werden. Dabei handelt es sich um gentechnisch veränderte Mäuse, deren Mikrogliazellen Genbestandteile des Herpes simplex Virus enthalten, das sie gegenüber Ganciclovir sensibel macht. Man hat bei diesem Modell folglich die Möglichkeit, im Anschluss an die endovaskulär induzierte aSAB die Mikrogliazellen mittels Ganciclovir auszuschalten und die neuronale Schädigung zu beurteilen. Auf diese Weise hätte man einen Anhaltspunkt, ob eine Mikrogliazellaktivierung im Anschluss an eine aSAB eher neuroprotektiver oder neurotoxischer Natur ist.

Des Weiteren zeigte sich, dass die Mikrogliazellen vermehrt inflammatorische Zytokine exprimieren. Um einen Schritt weiter zu gehen und zu klären welche Rolle einzelne Zytokine wie z.B. das Interleukin 6 auf das Ausmaß der Mikrogliazellaktivierung sowie Neuronenschädigung haben könnten, experimentelle Reihen mit entsprechenden Knock-out Mäusen Aufschluss bringen.

## 7 ZUSAMMENFASSUNG

Ist eine Person von einer aneurysmatische Subarachnoidalblutung (aSAB), d.h. von einer arteriellen Blutung in den Subarachnoidalraum, betroffen, so kann es auf bisher zum Teil ungeklärte Weise im Rahmen der sich anschließenden pathophysiologischen Veränderungen zu einer akuten Hirnschädigung (EBI), sowie im Verlauf zur Entstehung von verzögerten ischämischen neurologischen Defiziten (DINDs) kommen. Die Hypothese der vorliegenden Promotion ist, dass es zu einer zellulären Reaktion kommt, die in Zusammenhang mit der neuronalen Schädigung nach aSAB steht. Hierbei stand im Zentrum die Rolle der Mikrogliazellen zu charakterisieren.

In einem ersten Schritt wurde zunächst nachgewiesen, dass es zu einer signifikanten Akkumulation von Mikrogliazellen kommt, deren Maximum sich an Tag 14 nach experimentell induzierter aSAB befindet. In diesem Zusammenhang wurde eine im Zeitverlauf verzögerte, territorial vergleichbare Aktivierung sowie Akkumulation von GFAP-positiven Zellen beobachtet. Diese Ergebnisse fügen sich in den aktuellen Stand der Forschung ein. Denn in Veröffentlichungen, die detailliert Erkenntnisse über Faktoren des EBI zusammengetragen haben, wurde zwar noch nicht über eine Mikrogliazellaktivierung berichtet, jedoch finden sich zahlreiche Hinweise, die eine solche bedingen können. Ein Hinweis auf einen Zusammenhang der Mikrogliazellaktivierung und der neuronalen Schädigung konnte ebenfalls festgestellt werden. Denn im Zeitverlauf entspricht die Zunahme des Nachweises von APP, als Marker für eine axonale Schädigung, der Mikrogliazellaktivierung. Das Maximum befindet sich ebenfalls an Tag 14 nach induzierter aSAB. Damit ist eine besondere Rolle der Mikrogliazellen bewiesen.

In einem weiteren Schritt erfolgte eine Charakterisierung der Mikrogliazellaktivierung anhand der Erstellung eines mikroglialen Expressionsprofils inflammatorischer Zytokine. Dabei zeigte sich eine signifikante Hochregulation der Zytokine IL1 und IL6 sowie der Rezeptoren IL1R2, IL6R, TNFR1 und 2 auf RNA-Ebene. Für IL6 bestätigten wir das Ergebnis auf Proteinebene. Hinsichtlich TNF fiel ins besondere auf, dass es an Tag 5 und 28 zu einer Herunterregulation, an Tag 14 zu einer Hochregulation auf RNA-Ebene kommt. Diesbezüglich ist jedoch festzuhalten, dass die Hochregulation an Tag 14 nur für die Hälfte der Gruppen gilt. Da die Rolle der Zytokine jedoch nicht eindeutig

auf eine neurotoxische oder neuroprotektive Wirkung festgelegt werden kann, bleibt es letztlich weiterhin schwierig zu beurteilen ob eine Aktivierung von Mikrogliazellen zu neurotoxischen oder neuroprotektiven Mechanismen führt. Zudem verhalten sich Mikrogliazellen in einer Kultur, die oft Grundlage wissenschaftlicher Forschungsergebnisse ist, anders als im Zellverbund mit anderen Zellen, vor allem mit Neuronen. Ob der eine oder der andere Weg begünstigt wird hängt von der Art des Stresses und der Gefahrensignale, der Dauer sowie dem Zeitpunkt der Schädigung, der Mikroumwelt, von der Interaktion mit anderen Zelltypen und dem Alter des Organismus ab. Die vorliegende Promotion liefert damit wichtige Hinweise für die einer frühen Hirnschädigung zugrunde liegenden Mechanismen im Anschluss an eine aSAB und bildet die Grundlage für weitere Experimente bzw. therapeutische Ansätze.

## 8 LITERATURVERZEICHNIS

1. Bähr M, F.M., *Duus' Neurologisch-topische Diagnostik* 2003: Georg Thieme Verlag.
2. Greenberg, M.S., *Handbook of Neurosurgery*. 7 ed 2010, New York: Thieme Publishers.
3. Linn, F.H., et al., *Incidence of subarachnoid hemorrhage: role of region, year, and rate of computed tomography: a meta-analysis*. Stroke, 1996. **27**(4): p. 625-9.
4. Hop, J.W., et al., *Case-fatality rates and functional outcome after subarachnoid hemorrhage: a systematic review*. Stroke, 1997. **28**(3): p. 660-4.
5. Grote, E. and W. Hassler, *The critical first minutes after subarachnoid hemorrhage*. Neurosurgery, 1988. **22**(4): p. 654-61.
6. Bederson, J.B., I.M. Germano, and L. Guarino, *Cortical blood flow and cerebral perfusion pressure in a new noncraniotomy model of subarachnoid hemorrhage in the rat*. Stroke, 1995. **26**(6): p. 1086-91; discussion 1091-2.
7. Kamiya, K., H. Kuyama, and L. Symon, *An experimental study of the acute stage of subarachnoid hemorrhage*. J Neurosurg, 1983. **59**(6): p. 917-24.
8. Nagel, A., et al., *Relevance of intracranial hypertension for cerebral metabolism in aneurysmal subarachnoid hemorrhage. Clinical article*. J Neurosurg, 2009. **111**(1): p. 94-101.
9. Sarrafzadeh, A.S., et al., *Cerebral metabolism and intracranial hypertension in high grade aneurysmal subarachnoid haemorrhage patients*. Acta Neurochir Suppl, 2005. **95**: p. 89-92.
10. Graetz, D., et al., *High ICP as trigger of proinflammatory IL-6 cytokine activation in aneurysmal subarachnoid hemorrhage*. Neurol Res, 2010. **32**(7): p. 728-35.
11. Soehle, M., et al., *Predictive value of initial clinical status, intracranial pressure and transcranial Doppler pulsatility after subarachnoid haemorrhage*. Acta Neurochir (Wien), 2007. **149**(6): p. 575-83.
12. Ames, A., 3rd, et al., *Cerebral ischemia. II. The no-reflow phenomenon*. Am J Pathol, 1968. **52**(2): p. 437-53.
13. Bederson, J.B., et al., *Acute vasoconstriction after subarachnoid hemorrhage*. Neurosurgery, 1998. **42**(2): p. 352-60; discussion 360-2.
14. Jackowski, A., et al., *The time course of intracranial pathophysiological changes following experimental subarachnoid haemorrhage in the rat*. J Cereb Blood Flow Metab, 1990. **10**(6): p. 835-49.
15. Frykholm, P., et al., *Haemodynamic and metabolic disturbances in the acute stage of subarachnoid haemorrhage demonstrated by PET*. Acta Neurol Scand, 2004. **109**(1): p. 25-32.
16. Schmieder, K., et al., *Dynamic cerebral autoregulation in patients with ruptured and unruptured aneurysms after induction of general anesthesia*. Zentralbl Neurochir, 2006. **67**(2): p. 81-7.
17. Schatlo, B., et al., *Correlation of end-tidal CO<sub>2</sub> with transcranial Doppler flow velocity is decreased during chemoregulation in delayed cerebral vasospasm after subarachnoid haemorrhage--results of a pilot study*. Acta Neurochir Suppl, 2008. **104**: p. 249-50.
18. Voldby, B., E.M. Enevoldsen, and F.T. Jensen, *Cerebrovascular reactivity in patients with ruptured intracranial aneurysms*. J Neurosurg, 1985. **62**(1): p. 59-67.

19. Lam, J.M., et al., *Predicting delayed ischemic deficits after aneurysmal subarachnoid hemorrhage using a transient hyperemic response test of cerebral autoregulation*. Neurosurgery, 2000. **47**(4): p. 819-25; discussions 825-6.
20. Ostrowski, R.P., A.R. Colohan, and J.H. Zhang, *Molecular mechanisms of early brain injury after subarachnoid hemorrhage*. Neurol Res, 2006. **28**(4): p. 399-414.
21. Sehba, F.A., et al., *The importance of early brain injury after subarachnoid hemorrhage*. Prog Neurobiol, 2012. **97**(1): p. 14-37.
22. Gewirtz, R.J., et al., *Lactate and free fatty acids after subarachnoid hemorrhage*. Brain Res, 1999. **840**(1-2): p. 84-91.
23. Schubert, G.A., et al., *Hypothermia reduces early hypoperfusion and metabolic alterations during the acute phase of massive subarachnoid hemorrhage: a laser-Doppler-flowmetry and microdialysis study in rats*. J Neurotrauma, 2008. **25**(5): p. 539-48.
24. Sarrafzadeh, A.S., et al., *Bedside microdialysis: a tool to monitor cerebral metabolism in subarachnoid hemorrhage patients?* Crit Care Med, 2002. **30**(5): p. 1062-70.
25. Dreier, J.P., et al., *Delayed ischaemic neurological deficits after subarachnoid haemorrhage are associated with clusters of spreading depolarizations*. Brain, 2006. **129**(Pt 12): p. 3224-37.
26. Sakaki, S., et al., *Impairment of vascular reactivity and changes in intracellular calcium and calmodulin levels of smooth muscle cells in canine basilar arteries after subarachnoid hemorrhage*. Neurosurgery, 1989. **25**(5): p. 753-61.
27. Hubschmann, O.R. and D. Kornhauser, *Effect of subarachnoid hemorrhage on the extracellular microenvironment*. J Neurosurg, 1982. **56**(2): p. 216-21.
28. Sehba, F.A., et al., *Effects of S-nitrosoglutathione on acute vasoconstriction and glutamate release after subarachnoid hemorrhage*. Stroke, 1999. **30**(9): p. 1955-61.
29. Ng, W.H., et al., *Nitric oxide and subarachnoid hemorrhage: elevated level in cerebrospinal fluid and their implications*. Neurosurgery, 2001. **49**(3): p. 622-6; discussion 626-7.
30. Levin, E.R., *Endothelins*. N Engl J Med, 1995. **333**(6): p. 356-63.
31. Kobayashi, H., et al., *Endothelin-1 levels in plasma and cerebrospinal fluid following subarachnoid haemorrhage*. J Clin Neurosci, 1995. **2**(3): p. 252-6.
32. Wang, X., et al., *Changes of endothelin during cerebral vasospasm after experimental subarachnoid hemorrhage*. Chin Med J (Engl), 1995. **108**(8): p. 586-90.
33. Schulz, M.K., et al., *Cerebral microdialysis monitoring: determination of normal and ischemic cerebral metabolisms in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage*. J Neurosurg, 2000. **93**(5): p. 808-14.
34. Friedrich, V., et al., *Escape of intraluminal platelets into brain parenchyma after subarachnoid hemorrhage*. Neuroscience, 2010. **165**(3): p. 968-75.
35. Clower, B.R., et al., *Pathological changes in cerebral arteries following experimental subarachnoid hemorrhage: role of blood platelets*. Anat Rec, 1988. **220**(2): p. 161-70.
36. Friedrich, V., et al., *Luminal platelet aggregates in functional deficits in parenchymal vessels after subarachnoid hemorrhage*. Brain Res, 2010. **1354**: p. 179-87.
37. Sehba, F.A., et al., *Acute cerebral vascular injury after subarachnoid hemorrhage and its prevention by administration of a nitric oxide donor*. J Neurosurg, 2007. **106**(2): p. 321-9.
38. Ono, S., et al., *Time course of the diameter of the major cerebral arteries after subarachnoid hemorrhage using corrosion cast technique*. Neurol Res, 2003. **25**(4): p. 383-9.

39. Pennings, F.A., G.J. Bouma, and C. Ince, *Direct observation of the human cerebral microcirculation during aneurysm surgery reveals increased arteriolar contractility*. Stroke, 2004. **35**(6): p. 1284-8.
40. Miller, A.A., K. Budzyn, and C.G. Sobey, *Vascular dysfunction in cerebrovascular disease: mechanisms and therapeutic intervention*. Clin Sci (Lond), 2010. **119**(1): p. 1-17.
41. Andresen, J., N.I. Shafi, and R.M. Bryan, Jr., *Endothelial influences on cerebrovascular tone*. J Appl Physiol, 2006. **100**(1): p. 318-27.
42. Inagawa, T., *What are the actual incidence and mortality rates of subarachnoid hemorrhage?* Surg Neurol, 1997. **47**(1): p. 47-52; discussion 52-3.
43. Alaraj, A., F.T. Charbel, and S. Amin-Hanjani, *Peri-operative measures for treatment and prevention of cerebral vasospasm following subarachnoid hemorrhage*. Neurol Res, 2009. **31**(6): p. 651-9.
44. Wong, G.K., et al., *Plasma magnesium concentrations and clinical outcomes in aneurysmal subarachnoid hemorrhage patients: post hoc analysis of intravenous magnesium sulphate for aneurysmal subarachnoid hemorrhage trial*. Stroke, 2010. **41**(8): p. 1841-4.
45. Germano, A., et al., *Time-course of blood-brain barrier permeability changes after experimental subarachnoid haemorrhage*. Acta Neurochir (Wien), 2000. **142**(5): p. 575-80; discussion 580-1.
46. Scholler, K., et al., *Characterization of microvascular basal lamina damage and blood-brain barrier dysfunction following subarachnoid hemorrhage in rats*. Brain Res, 2007. **1142**: p. 237-46.
47. Kassell, N.F., et al., *Cerebral vasospasm following aneurysmal subarachnoid hemorrhage*. Stroke, 1985. **16**(4): p. 562-72.
48. Vergouwen, M.D., et al., *Definition of delayed cerebral ischemia after aneurysmal subarachnoid hemorrhage as an outcome event in clinical trials and observational studies: proposal of a multidisciplinary research group*. Stroke, 2010. **41**(10): p. 2391-5.
49. Solenski, N.J., et al., *Medical complications of aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a report of the multicenter, cooperative aneurysm study. Participants of the Multicenter Cooperative Aneurysm Study*. Crit Care Med, 1995. **23**(6): p. 1007-17.
50. Allan, S.M., P.J. Tyrrell, and N.J. Rothwell, *Interleukin-1 and neuronal injury*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(8): p. 629-40.
51. Kubo, Y., et al., *Serum inflammatory adhesion molecules and high-sensitivity C-reactive protein correlates with delayed ischemic neurologic deficits after subarachnoid hemorrhage*. Surg Neurol, 2008. **69**(6): p. 592-6; discussion 596.
52. Barone, F.C. and G.Z. Feuerstein, *Inflammatory mediators and stroke: new opportunities for novel therapeutics*. J Cereb Blood Flow Metab, 1999. **19**(8): p. 819-34.
53. Friedrich, V., et al., *Reduction of neutrophil activity decreases early microvascular injury after subarachnoid haemorrhage*. J Neuroinflammation, 2011. **8**: p. 103.
54. Fassbender, K., et al., *Inflammatory cytokines in subarachnoid haemorrhage: association with abnormal blood flow velocities in basal cerebral arteries*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2001. **70**(4): p. 534-7.
55. Gruber, A., et al., *Ventricular cerebrospinal fluid and serum concentrations of sTNFR-I, IL-1ra, and IL-6 after aneurysmal subarachnoid hemorrhage*. J Neurosurg Anesthesiol, 2000. **12**(4): p. 297-306.

56. Fountas, K.N., et al., *Serum and cerebrospinal fluid C-reactive protein levels as predictors of vasospasm in aneurysmal subarachnoid hemorrhage. Clinical article.* Neurosurg Focus, 2009. **26**(5): p. E22.
57. Marsden, P.A. and B.M. Brenner, *Transcriptional regulation of the endothelin-1 gene by TNF-alpha.* Am J Physiol, 1992. **262**(4 Pt 1): p. C854-61.
58. Handa, Y., et al., *Expression of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) on the cerebral artery following subarachnoid haemorrhage in rats.* Acta Neurochir (Wien), 1995. **132**(1-3): p. 92-7.
59. McKeating, E.G. and P.J. Andrews, *Cytokines and adhesion molecules in acute brain injury.* Br J Anaesth, 1998. **80**(1): p. 77-84.
60. Sozen, T., et al., *Role of interleukin-1beta in early brain injury after subarachnoid hemorrhage in mice.* Stroke, 2009. **40**(7): p. 2519-25.
61. Mathiesen, T., et al., *Cerebrospinal fluid interleukin-1 receptor antagonist and tumor necrosis factor-alpha following subarachnoid hemorrhage.* J Neurosurg, 1997. **87**(2): p. 215-20.
62. P., D.R.-H., *Microglia.* Cytology and Cellular Pathology of the Nervous System, 1932: p. 482-1924-534.
63. Kettenmann, H., et al., *Physiology of microglia.* Physiol Rev, 2011. **91**(2): p. 461-553.
64. Hanisch, U.K. and H. Kettenmann, *Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain.* Nat Neurosci, 2007. **10**(11): p. 1387-94.
65. Graeber, M.B., *Changing face of microglia.* Science, 2010. **330**(6005): p. 783-8.
66. Ransohoff, R.M. and V.H. Perry, *Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses.* Annu Rev Immunol, 2009. **27**: p. 119-45.
67. March, C.J., et al., *Cloning, sequence and expression of two distinct human interleukin-1 complementary DNAs.* Nature, 1985. **315**(6021): p. 641-7.
68. Huising, M.O., et al., *The molecular evolution of the interleukin-1 family of cytokines; IL-18 in teleost fish.* Dev Comp Immunol, 2004. **28**(5): p. 395-413.
69. Boutin, H., et al., *The expanding interleukin-1 family and its receptors: do alternative IL-1 receptor/signaling pathways exist in the brain?* Mol Neurobiol, 2003. **27**(3): p. 239-48.
70. Vitkovic, L., J. Bockaert, and C. Jacque, *"Inflammatory" cytokines: neuromodulators in normal brain?* J Neurochem, 2000. **74**(2): p. 457-71.
71. Hsu, H.Y. and M.H. Wen, *Lipopolysaccharide-mediated reactive oxygen species and signal transduction in the regulation of interleukin-1 gene expression.* J Biol Chem, 2002. **277**(25): p. 22131-9.
72. Perregaux, D.G., et al., *Antimicrobial peptides initiate IL-1 beta posttranslational processing: a novel role beyond innate immunity.* J Immunol, 2002. **168**(6): p. 3024-32.
73. Subramaniam, S., C. Stansberg, and C. Cunningham, *The interleukin 1 receptor family.* Dev Comp Immunol, 2004. **28**(5): p. 415-28.
74. Srinivasan, D., et al., *Cell type-specific interleukin-1beta signaling in the CNS.* J Neurosci, 2004. **24**(29): p. 6482-8.
75. Van Snick, J., *Interleukin-6: an overview.* Annu Rev Immunol, 1990. **8**: p. 253-78.
76. Juttler, E., V. Tarabin, and M. Schwaninger, *Interleukin-6 (IL-6): a possible neuromodulator induced by neuronal activity.* Neuroscientist, 2002. **8**(3): p. 268-75.
77. Strauss, S., et al., *Detection of interleukin-6 and alpha 2-macroglobulin immunoreactivity in cortex and hippocampus of Alzheimer's disease patients.* Lab Invest, 1992. **66**(2): p. 223-30.

78. Muller, T., et al., *Interleukin-6 levels in cerebrospinal fluid inversely correlate to severity of Parkinson's disease*. Acta Neurol Scand, 1998. **98**(2): p. 142-4.
79. Hans, V.H., et al., *Experimental axonal injury triggers interleukin-6 mRNA, protein synthesis and release into cerebrospinal fluid*. J Cereb Blood Flow Metab, 1999. **19**(2): p. 184-94.
80. Suzuki, S., et al., *Temporal profile and cellular localization of interleukin-6 protein after focal cerebral ischemia in rats*. J Cereb Blood Flow Metab, 1999. **19**(11): p. 1256-62.
81. De Simoni, M.G., et al., *Inflammatory cytokines and related genes are induced in the rat hippocampus by limbic status epilepticus*. Eur J Neurosci, 2000. **12**(7): p. 2623-33.
82. Acarin, L., B. Gonzalez, and B. Castellano, *Neuronal, astroglial and microglial cytokine expression after an excitotoxic lesion in the immature rat brain*. Eur J Neurosci, 2000. **12**(10): p. 3505-20.
83. Heinrich, P.C., et al., *Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway*. Biochem J, 1998. **334 ( Pt 2)**: p. 297-314.
84. Hibi, M., et al., *Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp130*. Cell, 1990. **63**(6): p. 1149-57.
85. Lust, J.A., et al., *Isolation of an mRNA encoding a soluble form of the human interleukin-6 receptor*. Cytokine, 1992. **4**(2): p. 96-100.
86. Knupfer, H. and R. Preiss, *sIL-6R: more than an agonist?* Immunol Cell Biol, 2008. **86**(1): p. 87-91.
87. Beutler, B. and A. Cerami, *The biology of cachectin/TNF--a primary mediator of the host response*. Annu Rev Immunol, 1989. **7**: p. 625-55.
88. McCoy, M.K. and M.G. Tansey, *TNF signaling inhibition in the CNS: implications for normal brain function and neurodegenerative disease*. J Neuroinflammation, 2008. **5**: p. 45.
89. Locksley, R.M., N. Killeen, and M.J. Lenardo, *The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology*. Cell, 2001. **104**(4): p. 487-501.
90. Hanisch, U.K., *Microglia as a source and target of cytokines*. Glia, 2002. **40**(2): p. 140-55.
91. Gearing, A.J., et al., *Processing of tumour necrosis factor-alpha precursor by metalloproteinases*. Nature, 1994. **370**(6490): p. 555-7.
92. Corti A, G.P., *Tumor Necrosis Factor: Methods and Protocols*. Totowa, New Jersey: Humana Press, 2004. **First edition**.
93. Sharp, B.M., et al., *Tumor necrosis factor-alpha is a potent ACTH secretagogue: comparison to interleukin-1 beta*. Endocrinology, 1989. **124**(6): p. 3131-3.
94. Gerard, C., et al., *Interleukin 10 reduces the release of tumor necrosis factor and prevents lethality in experimental endotoxemia*. J Exp Med, 1993. **177**(2): p. 547-50.
95. de Waal Malefyt, R., et al., *Effects of IL-13 on phenotype, cytokine production, and cytotoxic function of human monocytes. Comparison with IL-4 and modulation by IFN-gamma or IL-10*. J Immunol, 1993. **151**(11): p. 6370-81.
96. Gautam, S., J.M. Tebo, and T.A. Hamilton, *IL-4 suppresses cytokine gene expression induced by IFN-gamma and/or IL-2 in murine peritoneal macrophages*. J Immunol, 1992. **148**(6): p. 1725-30.
97. Aggarwal BB, S.A., Feldmann M, ed. *TNF Receptors*. Cytokine Reference, ed. O. JJaFM2000, Academic Press: London. 2000: 1620-1632.
98. Grell, M., *Tumor necrosis factor (TNF) receptors in cellular signaling of soluble and membrane-expressed TNF*. J Inflamm, 1995. **47**(1-2): p. 8-17.

99. Ruuls, S.R., et al., *Membrane-bound TNF supports secondary lymphoid organ structure but is subservient to secreted TNF in driving autoimmune inflammation*. *Immunity*, 2001. **15**(4): p. 533-43.
100. Marchetti, L., et al., *Tumor necrosis factor (TNF)-mediated neuroprotection against glutamate-induced excitotoxicity is enhanced by N-methyl-D-aspartate receptor activation. Essential role of a TNF receptor 2-mediated phosphatidylinositol 3-kinase-dependent NF-kappa B pathway*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(31): p. 32869-81.
101. Haydon, P.G., *GLIA: listening and talking to the synapse*. *Nat Rev Neurosci*, 2001. **2**(3): p. 185-93.
102. Scemes, E., R. Dermietzel, and D.C. Spray, *Calcium waves between astrocytes from Cx43 knockout mice*. *Glia*, 1998. **24**(1): p. 65-73.
103. Schipke, C.G., et al., *Astrocyte Ca<sup>2+</sup> waves trigger responses in microglial cells in brain slices*. *FASEB J*, 2002. **16**(2): p. 255-7.
104. Griffin, W.S., *Inflammation and neurodegenerative diseases*. *Am J Clin Nutr*, 2006. **83**(2): p. 470S-474S.
105. Adams, R.A., et al., *The fibrin-derived gamma377-395 peptide inhibits microglia activation and suppresses relapsing paralysis in central nervous system autoimmune disease*. *J Exp Med*, 2007. **204**(3): p. 571-82.
106. Shpacovitch, V., et al., *Protease-activated receptors: novel PARTners in innate immunity*. *Trends Immunol*, 2007. **28**(12): p. 541-50.
107. Kim, K.Y., et al., *Thrombin induces IL-10 production in microglia as a negative feedback regulator of TNF-alpha release*. *Neuroreport*, 2002. **13**(6): p. 849-52.
108. Moller, T., U.K. Hanisch, and B.R. Ransom, *Thrombin-induced activation of cultured rodent microglia*. *J Neurochem*, 2000. **75**(4): p. 1539-47.
109. Suo, Z., et al., *Persistent protease-activated receptor 4 signaling mediates thrombin-induced microglial activation*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(33): p. 31177-83.
110. Ryu, J., et al., *Thrombin induces NO release from cultured rat microglia via protein kinase C, mitogen-activated protein kinase, and NF-kappa B*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(39): p. 29955-9.
111. Petzold, G.C., et al., *Increased extracellular K<sup>+</sup> concentration reduces the efficacy of N-methyl-D-aspartate receptor antagonists to block spreading depression-like depolarizations and spreading ischemia*. *Stroke*, 2005. **36**(6): p. 1270-7.
112. Haynes, S.E., et al., *The P2Y12 receptor regulates microglial activation by extracellular nucleotides*. *Nat Neurosci*, 2006. **9**(12): p. 1512-9.
113. Koizumi, S., et al., *UDP acting at P2Y6 receptors is a mediator of microglial phagocytosis*. *Nature*, 2007. **446**(7139): p. 1091-5.
114. Wang, J., et al., *Regulation of CC chemokine receptor 5 and CD4 expression and human immunodeficiency virus type 1 replication in human macrophages and microglia by T helper type 2 cytokines*. *J Infect Dis*, 2002. **185**(7): p. 885-97.
115. Kreutzberg, G.W., *Microglia: a sensor for pathological events in the CNS*. *Trends Neurosci*, 1996. **19**(8): p. 312-8.
116. Butterweck, V., S. Prinz, and M. Schwaninger, *The role of interleukin-6 in stress-induced hyperthermia and emotional behaviour in mice*. *Behav Brain Res*, 2003. **144**(1-2): p. 49-56.
117. Schobitz, B., E.R. De Kloet, and F. Holsboer, *Gene expression and function of interleukin 1, interleukin 6 and tumor necrosis factor in the brain*. *Prog Neurobiol*, 1994. **44**(4): p. 397-432.

118. Chai, Z., et al., *Interleukin (IL)-6 gene expression in the central nervous system is necessary for fever response to lipopolysaccharide or IL-1 beta: a study on IL-6-deficient mice.* J Exp Med, 1996. **183**(1): p. 311-6.
119. Ruzek, M.C., et al., *Characterization of early cytokine responses and an interleukin (IL)-6-dependent pathway of endogenous glucocorticoid induction during murine cytomegalovirus infection.* J Exp Med, 1997. **185**(7): p. 1185-92.
120. Sarrafzadeh, A., et al., *Relevance of cerebral interleukin-6 after aneurysmal subarachnoid hemorrhage.* Neurocrit Care, 2010. **13**(3): p. 339-46.
121. Corbett, D. and J. Thornhill, *Temperature modulation (hypothermic and hyperthermic conditions) and its influence on histological and behavioral outcomes following cerebral ischemia.* Brain Pathol, 2000. **10**(1): p. 145-52.
122. Campbell, I.L., et al., *Neurologic disease induced in transgenic mice by cerebral overexpression of interleukin 6.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(21): p. 10061-5.
123. Penkowa, M., et al., *Interleukin-6 deficiency reduces the brain inflammatory response and increases oxidative stress and neurodegeneration after kainic acid-induced seizures.* Neuroscience, 2001. **102**(4): p. 805-18.
124. Loddick, S.A., A.V. Turnbull, and N.J. Rothwell, *Cerebral interleukin-6 is neuroprotective during permanent focal cerebral ischemia in the rat.* J Cereb Blood Flow Metab, 1998. **18**(2): p. 176-9.
125. Marz, P., et al., *Role of interleukin-6 and soluble IL-6 receptor in region-specific induction of astrocytic differentiation and neurotrophin expression.* Glia, 1999. **26**(3): p. 191-200.
126. Sriram, K. and J.P. O'Callaghan, *Divergent roles for tumor necrosis factor-alpha in the brain.* J Neuroimmune Pharmacol, 2007. **2**(2): p. 140-53.
127. Golan, H., et al., *Involvement of tumor necrosis factor alpha in hippocampal development and function.* Cereb Cortex, 2004. **14**(1): p. 97-105.
128. Hallenbeck, J.M., *The many faces of tumor necrosis factor in stroke.* Nat Med, 2002. **8**(12): p. 1363-8.
129. Kraft, A.D., C.A. McPherson, and G.J. Harry, *Heterogeneity of microglia and TNF signaling as determinants for neuronal death or survival.* Neurotoxicology, 2009. **30**(5): p. 785-93.
130. Nawashiro, H., D. Martin, and J.M. Hallenbeck, *Neuroprotective effects of TNF binding protein in focal cerebral ischemia.* Brain Res, 1997. **778**(2): p. 265-71.
131. Bruce, A.J., et al., *Altered neuronal and microglial responses to excitotoxic and ischemic brain injury in mice lacking TNF receptors.* Nat Med, 1996. **2**(7): p. 788-94.
132. Sriram, K., D.B. Miller, and J.P. O'Callaghan, *Minocycline attenuates microglial activation but fails to mitigate striatal dopaminergic neurotoxicity: role of tumor necrosis factor-alpha.* J Neurochem, 2006. **96**(3): p. 706-18.
133. Hu, S., P.K. Peterson, and C.C. Chao, *Cytokine-mediated neuronal apoptosis.* Neurochem Int, 1997. **30**(4-5): p. 427-31.
134. Lawrence, C.B., S.M. Allan, and N.J. Rothwell, *Interleukin-1beta and the interleukin-1 receptor antagonist act in the striatum to modify excitotoxic brain damage in the rat.* Eur J Neurosci, 1998. **10**(3): p. 1188-95.
135. Yamasaki, Y., et al., *Interleukin-1 as a pathogenetic mediator of ischemic brain damage in rats.* Stroke, 1995. **26**(4): p. 676-80; discussion 681.
136. Relton, J.K. and N.J. Rothwell, *Interleukin-1 receptor antagonist inhibits ischaemic and excitotoxic neuronal damage in the rat.* Brain Res Bull, 1992. **29**(2): p. 243-6.
137. Loddick, S.A., et al., *Endogenous interleukin-1 receptor antagonist is neuroprotective.* Biochem Biophys Res Commun, 1997. **234**(1): p. 211-5.

138. John, G.R., et al., *IL-1-regulated responses in astrocytes: relevance to injury and recovery*. *Glia*, 2005. **49**(2): p. 161-76.
139. Chen, Y. and R.A. Swanson, *Astrocytes and brain injury*. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2003. **23**(2): p. 137-49.
140. Basu, A., J.K. Krady, and S.W. Levison, *Interleukin-1: a master regulator of neuroinflammation*. *J Neurosci Res*, 2004. **78**(2): p. 151-6.
141. Aloisi, F., *Immune function of microglia*. *Glia*, 2001. **36**(2): p. 165-79.
142. Pinteaux, E., et al., *Expression of interleukin-1 receptors and their role in interleukin-1 actions in murine microglial cells*. *J Neurochem*, 2002. **83**(4): p. 754-63.
143. Proescholdt, M.G., et al., *Intracerebroventricular but not intravenous interleukin-1beta induces widespread vascular-mediated leukocyte infiltration and immune signal mRNA expression followed by brain-wide glial activation*. *Neuroscience*, 2002. **112**(3): p. 731-49.
144. Oertel, M., et al., *S-100B and NSE: markers of initial impact of subarachnoid haemorrhage and their relation to vasospasm and outcome*. *J Clin Neurosci*, 2006. **13**(8): p. 834-40.
145. Prunell, G.F., et al., *Delayed cell death related to acute cerebral blood flow changes following subarachnoid hemorrhage in the rat brain*. *J Neurosurg*, 2005. **102**(6): p. 1046-54.
146. Friedrich, V., R. Flores, and F.A. Sehba, *Cell death starts early after subarachnoid hemorrhage*. *Neurosci Lett*, 2012. **512**(1): p. 6-11.
147. Lee, J.Y., et al., *Activated autophagy pathway in experimental subarachnoid hemorrhage*. *Brain Res*, 2009. **1287**: p. 126-35.
148. Matz, P.G., et al., *Increased cytochrome c-mediated DNA fragmentation and cell death in manganese-superoxide dismutase-deficient mice after exposure to subarachnoid hemolysate*. *Stroke*, 2001. **32**(2): p. 506-15.
149. Nau, R., et al., *Neuronal apoptosis in the dentate gyrus in humans with subarachnoid hemorrhage and cerebral hypoxia*. *Brain Pathol*, 2002. **12**(3): p. 329-36.
150. Broughton, B.R., D.C. Reutens, and C.G. Sobey, *Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia*. *Stroke*, 2009. **40**(5): p. e331-9.
151. Yamaura, I., et al., *Calpain-calpastatin system of canine basilar artery in vasospasm*. *J Neurosurg*, 1993. **79**(4): p. 537-43.
152. Cappelletto, B., et al., *Attenuation of vasospasm and hemoglobin-induced constriction in the rabbit basilar artery by a novel protease inhibitor*. *Neurosurg Focus*, 1997. **3**(4): p. e2.
153. Germano, A., et al., *Systemic administration of a calpain inhibitor reduces behavioral deficits and blood-brain barrier permeability changes after experimental subarachnoid hemorrhage in the rat*. *J Neurotrauma*, 2002. **19**(7): p. 887-96.
154. Gules, I., et al., *Apoptosis, blood-brain barrier, and subarachnoid hemorrhage*. *Acta Neurochir Suppl*, 2003. **86**: p. 483-7.
155. Zhou, C., et al., *Caspase inhibitors prevent endothelial apoptosis and cerebral vasospasm in dog model of experimental subarachnoid hemorrhage*. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2004. **24**(4): p. 419-31.

## 9 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A.	Arteria
Aa.	Arteriae
ADAM	<i>engl.</i> a disintegrin and metalloproteinase
ADP	Adenosindiphosphat
AMPA	<i>engl.</i> $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid = Aminomethylphosphonsäure
APP	<i>engl.</i> amyloid precursor protein = Amyloid Vorläuferprotein
ATP	Adenosintriphosphat
aSAB	aneurysmatische Subarachnoidalblutung
BDI	<i>engl.</i> Bcl-2 interacting domain
bzw.	beziehungsweise
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CBF	<i>engl.</i> cerebral blood flow = zerebraler Blutfluss
CD	<i>engl.</i> cluster of differentiation
clAP	<i>engl.</i> cellular inhibitor of apoptosis protein
CPP	<i>engl.</i> cerebral perfusion pressure = zerebraler Perfusionsdruck
CRH	<i>engl.</i> corticotropin releasing hormone = Corticotropin freisetzendes Hormon
CRID	<i>engl.</i> cytokine release inhibitory drug
CRP	reaktives Protein C
CSD	<i>engl.</i> cortical spreading depression = kortikale Streudepolarisation
CVR	<i>engl.</i> cerebral vascular resistance = zerebraler Gefäßwiderstand
DIND	<i>engl.</i> delayed ischemic neurological deficit = verzögertes ischämisch bedingtes neurologisches Defizit
DISC	<i>engl.</i> death inducing signaling complex
DNA	<i>engl.</i> deoxyribonucleic acid = Desoxyribonukleinsäure
EBI	<i>engl.</i> early brain injury = akute Hirnschädigung
EDTA	Ethylenediamine tetra-acetic acid
ERK	<i>engl.</i> Extracellular-signal Regulated Kinases
ET-1	Endothelin-1

FADD	<i>engl.</i> Fas associated death domain
FITS	Fluorescein-isothiocyanat
GABA	<i>engl.</i> Gamma-aminobutyric acid = $\gamma$ -Aminobuttersäure
GSTO1	<i>engl.</i> Glutathione S-transferase-- $\omega$ 1-1
GCS	Glasgow Coma Scale
gp	Glykoprotein
GPCR	<i>engl.</i> G protein-coupled receptor = G-Protein-gekoppelte Rezeptoren
GTP	Guanosintriphosphat
HSF	<i>engl.</i> heat shock factor protein
Iba1	<i>engl.</i> ionized calcium-binding adapter molecule 1
ICAM	<i>engl.</i> intercellular adhesion molecule
ICP	<i>engl.</i> intracranial pressure = intrakranieller Druck
IL	Interleukin
INF	Interferon
ITIM	<i>engl.</i> immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif
JAK	<i>engl.</i> c-Jun N-terminal kinase
LPS	Lipopolysaccharid
m	membrangebunden
M.	Morbus
MAP	<i>engl.</i> middle arterial pressure = mittlerer arterieller Druck
MAPK	<i>engl.</i> mitogen-activated protein kinase
MHC	<i>engl.</i> Major Histocompatibility Complex
MPTP	1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin
NF	<i>engl.</i> nuclear factor
NFAT	<i>engl.</i> nuclear factor of activated T-cells
NGF	<i>engl.</i> nerve growth factor = neuronaler Wachstumsfaktor
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NSE	Neuronen spezifische Enolase
PAR	Protease-aktivierte Rezeptoren
PDGF	<i>engl.</i> Platelet-derived growth factor
PG	Prostaglandin
PI	Propidiumiodid
RIP	<i>engl.</i> receptor-interacting-protein
RNA	<i>engl.</i> Ribonucleic acid = Ribonukleinsäure

SAB	Subarachnoidalblutung
SODD	<i>engl.</i> silencer of death domains
sol	löslich
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
TACE	<i>engl.</i> matrix metalloprotease TNF alpha converting enzyme; ADAM 17
TATA	Thymin-Adenin-Thymin-Adenin = DNA Sequenz
TBP	<i>engl.</i> TNF binding protein = TNF-bindendes Protein
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TNFR1	TNF Rezeptor 1
TNFR2	TNF Rezeptor 2
TRADD	<i>engl.</i> TNF receptor associated death domain
TRAF	<i>engl.</i> TNF receptor associated factor
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem

## **10 LEBENS LAUF**

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





## 11 EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

„Ich, Anja-Maria Davids, geb. Radon, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: *Die Aktivierung von Mikrogliazellen nach experimentell induzierter Subarachnoidalblutung - eine intraparenchymatöse Reaktion auf eine extraparenchymatöse Erkrankung* 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](http://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