

**Diplomarbeit**

**Immunhistochemische Charakterisierung von NGAL/ Lipocalin-2 in  
einem Tiermodell des ischämischen Schlaganfalles**

Eingereicht von:

**Paul Kendlbacher**

Geb. Dat.: 14.09.1987

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktor der gesamten Heilkunde  
(Dr. med. univ.)**

an der

**Medizinischen Universität Graz**

ausgeführt an der

**Universitätsklinik für Neurologie**

betreut von

**Priv.-Doz. Dr. Thomas Seifert-Held**

und

**Priv.-Doz. DDr. Sonja Hochmeister**

Graz, im Juli 2013

  
(Unterschrift)

## Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am 2. Juli 2013



Unterschrift

# Danksagung

Ich möchte mich gerne bedanken bei...

**Priv.-Doz. Dr. Thomas Seifert-Held**

für die Betreuung der Arbeit.

**Priv.-Doz. DDr. Sonja Hochmeister**

für die Zusammenarbeit im Labor.

**Dr. sci. med. Thomas Pekar**

für die Einführung ins Labor und die weitere Unterstützung.

**Michaela Haindl**

für die gute Zusammenarbeit im Labor und die Unterstützung.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>1</b>
<b>2 Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>3</b>
<b>3 Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>3</b>
<b>4 Zusammenfassung</b> .....	<b>4</b>
<b>5 Abstract</b> .....	<b>5</b>
<b>6 Einleitung</b> .....	<b>6</b>
<b>7 Der Schlaganfall und seine Pathobiologie</b> .....	<b>9</b>
7.1 Die Penumbra .....	10
7.2 Entzündliche Kaskaden in der Frühphase .....	10
7.3 Ischämischer Zellschaden als Auslöser der Immunantwort .....	11
7.4 Pattern Recognition Rezeptoren und die Bedeutung von neuralem Zelltod für die Aktivierung von Mikrogliazellen .....	12
7.5 Exzitotoxizität .....	13
7.6 Periinfarktdepolarisation .....	14
7.7 Inflammation .....	15
7.7.1 Mikrogliazellen .....	15
7.7.2 Neutrophile Granulozyten .....	15
7.7.3 Makrophagen .....	16
7.7.4 Mastzellen .....	17
7.7.5 Dendritische Zellen .....	17
7.7.6 Lymphozyten .....	17
7.8 Apoptose .....	19
7.9 Rolle der Astrozyten im ischämischen Gewebsschaden .....	19
7.10 Systemische Immunität und Post-Strokeinfektionen .....	21
<b>8 NGAL</b> .....	<b>22</b>
<b>9 Der NGAL-Rezeptor: 24p3R</b> .....	<b>24</b>
<b>10 Material und Methoden</b> .....	<b>26</b>
10.1 Middle Cerebral Artery Occlusion in the Mouse (MCAO) .....	26
10.2 Immunhistochemie .....	28
10.3 IHC-Protokoll .....	29
10.4 IHC-Protokoll Doppelfärbungen .....	30
10.5 Reagenzien und Lösungen .....	31

10.6 Histologische Betrachtung .....	32
<b>11 Ergebnisse .....</b>	<b>33</b>
11.1 Map-2 .....	33
11.2 Mac3 .....	33
11.3 Ngal-NeuN-Doppelfärbungen .....	34
11.4 Ngal .....	35
11.5 Ngal-Rezeptor: 24p3R .....	37
11.6 Statistische Auswertung .....	38
<b>12 Diskussion .....</b>	<b>41</b>
12.1 Die Ergebnisse im Überblick .....	41
12.2 Ausblick .....	44
12.3 Conclusio .....	44
<b>13 Referenzen .....</b>	<b>45</b>
<b>14 Curriculum Vitae .....</b>	<b>52</b>

# 1 Abkürzungsverzeichnis

AIF: Apoptoseinduzierender Faktor  
AMPA:  $\alpha$ -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-Isoxazolpropionat  
ATP: Adenosintriphosphat  
DAMPs: Danger associated molecular patterns  
DNA: Desoxyribonukleinsäure  
EndoG: Endonuklease G  
GABA:  $\gamma$ -Aminobuttersäure  
GFP: Grün fluoreszierendes Protein  
ICAM-1: Intercellular Adhesion Molecule 1  
IFN- $\gamma$ : Interferon- $\gamma$   
IGF-1: Insulin like growth factor 1  
IHC: Immunhistochemie  
IL-1 $\beta$ : Interleukin-1 $\beta$   
IL-1ra: Interleukin-1Rezeptorantagonist  
IL-2: Interleukin-2  
IL-4: Interleukin-4  
IL-6: Interleukin-6  
IL-10: Interleukin-10  
IL-12: Interleukin-12  
LCN2: Lipocalin 2 (human)  
Lcn2: Lipocalin 2 (Maus)  
Map-2: Mikrotubuliassoziertes Protein 2  
MCAO: Middle Cerebral Artery Occlusion  
MHC II: Major Histocompatibility Complex II  
MMP-9: Matrix Metalloproteinase 9  
mRNA: Messenger Ribonukleinsäure  
NaCl: Natriumchlorid  
NeuN: Neuronal Nuclei  
NF- $\kappa$ B: Nuclear Factor kappaB  
NGAL: Neutrophile Gelatinase assoziiertes Lipocalin (human)  
Ngal: Neutrophile Gelatinase assoziiertes Lipocalin (Maus)  
NIHSS: National Institute of Health Stroke Scale

NMDA: N-Methyl-D-Aspartat

NO: Stickstoffmonoxid

p: Wahrscheinlichkeitsmaß

PFA: Paraformaldehyd

ROS: Reaktive Sauerstoffspezies

STAT3: Signal transducer and activator of transcription 3

SV-40: Simian-Virus 40

TGF- $\beta$ : transforming growth factor  $\beta$

TIA: Transiente ischämische Attacke

TLRs: Toll-like Receptors

TNF- $\alpha$ : Tumornekrosefaktor- $\alpha$

VCAM-1: Vascular cell adhesion Protein 1

ZNS: Zentrales Nervensystem

24p3: Neutrophile Gelatinase assoziiertes Lipocalin

24p3R: NGAL-Rezeptor

## 2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Map-2 und Mac3 IHC im Zeitverlauf .....	34
Abbildung 2: IHC-Doppelfärbungen mit Ngal und NeuN .....	35
Abbildung 3: Ngal IHC im Zeitverlauf .....	36
Abbildung 4: 24p3R IHC im Zeitverlauf .....	37
Abbildung 5: Statistische Auswertung der Anzahl Ngal-positiver Zellen pro Zeitpunkt .....	39
Abbildung 6: Statistische Auswertung der Anzahl 24p3R-positiver Zellen pro Zeitpunkt .....	40

## 3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Protokoll Zitadelle .....	27
Tabelle 2: Verwendete Antikörper .....	30

## 4 Zusammenfassung

Der ischämische Schlaganfall belegt Platz drei in der Statistik der häufigsten Todesursachen in Österreich und gilt als die häufigste Ursache für bleibende Behinderung. Trotz vieler in der Vergangenheit gewonnener Erkenntnisse gibt es noch immer viele ungeklärte Fragen bezüglich der Pathophysiologie des ischämischen Schlaganfalles. Ein tieferes Verständnis der komplexen molekularen sowie zellulären Prozesse, die durch den Verschluss eines wichtigen zerebralen Gefäßes ausgelöst werden, könnte zu neuen Therapieansätzen führen oder der Entwicklung neuer diagnostischer Werkzeuge dienen. NGAL ist ein Glykoprotein, das vor allem als Biomarker des akuten Nierenversagens bekannt ist und in Zusammenhang mit Entzündung und Gewebsschaden stehen soll. Auch im Plasma von Schlaganfallpatienten konnten erhöhte NGAL-Werte nachgewiesen werden. Über das Verhalten dieses Lipocalins im ischämischen Schlaganfall ist noch wenig bekannt, daher soll diese Arbeit das quantitative sowie qualitative Vorkommen von NGAL und dessen Rezeptor, 24p3R, in einem Modell der vorübergehenden Okklusion der Arteria Cerebri Media (MCAO) in der Maus untersuchen und in einen zeitlichen Kontext bringen. Zur Erlangung der interessierenden Daten wurden immunhistochemische Einzel- und Doppelfärbungen durchgeführt und die gefärbten Schnitte unter dem Mikroskop ausgewertet. Mit Hilfe von Map-2-Färbungen konnten die Infarktareale genau identifiziert werden und anhand von Mac3-Färbungen konnte die Anwesenheit von Makrophagen im ischämischen Gewebe nachgewiesen werden. Vorbekannt war, dass NGAL im gesunden Gehirn nicht anzutreffen ist. Eine Doppelmarkierung mit NGAL- und NeuN-Antikörpern zeigte jedoch überlebende NGAL-positive Neurone im ischämischen Gewebe. Das Vorkommen von NGAL sowie dessen Rezeptors konnte für die Zeitpunkte 1, 7 und 14 Tage nach Ischämie bestimmt werden. Dabei konnte ein Peak der NGAL-positiven Zellen im Infarkt 7 Tage nach Ischämie beobachtet werden. Außerdem war ipsilateral an allen Tagen eine größere Anzahl an NGAL-positiven Zellen zu beobachten als kontralateral. Die Rezeptorexpression verhielt sich genau gegenläufig. An allen untersuchten Tagen waren kontralateral mehr Rezeptor-positive Zellen zu zählen als ipsilateral. Im Infarktgewebe konnte eine Zunahme der Rezeptorexpression bis hin zum Tag 14 erkannt werden. Eine Aussage über die Funktion von NGAL und 24p3R im ischämischen Schlaganfall lassen diese Ergebnisse allerdings nicht zu.

## 5 Abstract

Ischemic stroke is the third leading cause of death in Austria and is considered the main cause of major disability. Despite tremendous efforts in the past many steps of the pathophysiologic cascade triggered by cerebral ischemia remain enigmatic. A more profound understanding of the complex molecular and cellular processes following the occlusion of a major cerebral artery could facilitate the research for new treatment options or even lead to the development of new diagnostic tools. Lately the glycoprotein NGAL has gained importance as a biomarker of acute renal failure and thus is thought to play a role in inflammation and tissue damage. Elevated levels of NGAL were detected in the plasma of patients after ischemic stroke. There is very little known about this lipocalin in the context of ischemic stroke. Therefore this paper tries to characterize NGAL and its receptor, 24p3R, qualitatively and quantitatively in a middle cerebral artery occlusion model (MCAO) of the mouse and investigates its changes over time. For these purposes immunohistochemical single and double stainings were applied. The specimens were then evaluated under the microscope. Good identification of the ischemic areas was achieved by Map2 stainings. Further stainings with Mac3 antibodies were applied to demonstrate the presence of macrophages in the ischemic brain. NGAL usually cannot be found in healthy brain tissue. Double stainings with both NGAL and NeuN antibodies showed NGAL positive neurons in the infarct. The expression of NGAL was investigated 1, 7 and 14 days after occlusion. Hereby a peak of NGAL positive cells could be observed 7 days after ischemia. All specimens showed more NGAL positive cells in the ischemic tissue than in the healthy brain. The expression of the receptor was observed to be vice versa. In all investigated days more 24p3R positive cells were found in the healthy brain tissue than in the ischemic area. However, the expression of the receptor was found to increase until day 14 in the ischemic tissue. Further information about the actual function of NGAL and 24p3R in ischemic stroke cannot be provided by this data.

*Keywords:* ischemic stroke, pathophysiology, NGAL, 24p3R, MCAO, immunohistochemistry, Map-2, Mac3, NeuN

## 6 Einleitung

In Österreich gelten die Erkrankungen des kardiovaskulären Systems als Todesursache Nummer eins. Der Schlaganfall im speziellen belegt Platz drei in der Statistik der häufigsten Todesursachen.(1) Außerdem stellt der Schlaganfall die häufigste Ursache für bleibende schwere Behinderung in Großbritannien dar.(2) Jährlich erleiden ungefähr 20000 Menschen in Österreich einen Schlaganfall, das heißt 1 Mensch alle 6 Minuten. In den letzten 30 Jahren gelang es die Sterblichkeit drastisch zu senken. Die Errichtung von Stroke Units etwa, bewirkte eine Reduktion der Mortalität von 10% und stellt somit die effektivste Methode dar um die Schlaganfallsterblichkeit zu senken.(1)

Trotz vieler in der Vergangenheit gewonnener Erkenntnisse über dieses so brutale Krankheitsbild gibt es noch viele ungeklärte Fragen in Bezug auf die pathophysiologischen Vorgänge beim ischämischen Schlaganfall. Ein tieferes molekularbiologisches Verständnis der Ursachen sowie der postischämischen Prozesse im geschädigten Gewebe können zu einer Optimierung der Therapie führen und das Outcome der Patienten verbessern.

Entzündliche Prozesse spielen eine bedeutende Rolle in der Pathogenese des ischämischen Insultes, denn das Gehirn reagiert auf ischämische Schädigung mit akuter und prolongierter Inflammation. Klinisch schlägt sich ein systemischer entzündlicher Prozess in Schlaganfallpatienten mit einem schlechteren Outcome nieder.(3) Eine spezielle Herausforderung in der Erforschung der postischämischen entzündlichen Prozesse stellt die Tatsache dar, dass das zentrale Nervensystem auf Grund seiner Abgeschlossenheit durch die Blut-Hirn-Schranke ein Kompartiment darstellt, das Abwehrzellen nicht ohne Hindernisse sofort zugänglich(4) ist und daher etablierte Prinzipien der systemischen Immunität nicht uneingeschränkt übertragbar sind.

Um den Schweregrad eines ischämischen Insultes zu beurteilen sowie Aussagen über das Outcome von Patienten treffen zu können, werden eine Vielzahl klinischer Variablen benutzt. Ein etabliertes Werkzeug für diesen Zweck ist die National Institute of Health Stroke Scale (NIHSS), die als standardisierte Skala zur Messung

des Schweregrades eines ischämischen Insultes herangezogen wird und eine Kurzzeitprognose zulässt. Aber auch dieses Instrument birgt seine Schwierigkeiten. Für die Verwendung der NIHSS ist eine spezielle Ausbildung notwendig.(5) Außerdem wurde in einer Untersuchung herausgefunden, dass die Ergebnisse vieler Ärzte nicht übereinstimmten und daher auch auf klinische Schlaganfallstudien einen Einfluss haben würden.(6) Ischämische Insulte der rechten Hemisphäre weisen niedrigere NIHSS Werte auf als diejenigen der linken und die Ergebnisse des NIHSS treffen exakter auf Syndrome des vorderen als des hinteren Stromgebietes zu.(7) Trotz etablierter Evaluationsmethoden fehlen für das Krankheitsbild des ischämischen Insultes noch immer passende Biomarker(5), die zusätzliche Informationen liefern können und die Therapieentscheidungen optimieren würden. Es werden vor allem die Erkenntnisse molekularbiologischer Untersuchungen sein, die ein besseres Verständnis der pathophysiologischen Hintergründe fördern und eventuell zur Entdeckung neuer Methoden zur Unterstützung von Therapieentscheidungen führen können.

Ein Glykoprotein, das in den letzten Jahren vor allem als Biomarker des akuten Nierenversagens(8) einige Aufmerksamkeit erlangt hat und in Zusammenhang mit Entzündung(9) und Gewebsschaden(8) stehen soll, ist das neutrophile Gelatinase assoziierte Lipocalin, auch NGAL genannt. NGAL gilt als wichtiger bakteriostatischer Faktor des angeborenen Immunsystems, der an bakterielle Siderophore bindet und dadurch die bakterielle Eisenaufnahme hemmt. In Tiermodellen der systemischen Infektion(10) sowie unlängst in einem Rattenmodell der intrazerebralen Hämorrhagie(11) konnte ein quantitativer Anstieg dieses Vertreters der Familie der Lipocaline im geschädigten Gewebe beobachtet werden. Untersuchungen haben gezeigt, dass der NGAL-Wert sowohl nach einem ischämischen Insult als auch nach einer transitorischen ischämischen Attacke (TIA) im Plasma von Patienten erhöht ist.(12) Über die tatsächliche Funktion, die NGAL in nichtbakteriellen Entzündungs- und Reparaturvorgängen nach Gewebsschäden ausführt, ist jedoch noch sehr wenig bekannt.

Nun stellt sich die Frage: Wie verhält NGAL sich im ischämischen Schlaganfall?

Um sich der Antwort auf diese Frage zu nähern, soll in dieser Arbeit das Vorkommen von NGAL sowie auch dessen Oberflächenrezeptor 24p3R in einem Modell des ischämischen Schlaganfalles in der Maus untersucht werden. Dabei sollen vor allem folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

- Kann NGAL im ZNS nach ischämischer Schädigung nachgewiesen werden und wie verhält sich das Vorkommen dieses Glykoproteins im zeitlichen Verlauf?
- Ist der NGAL-Rezeptor 24p3R auch im ischämischen Gewebe auffindbar und lässt sich im zeitlichen Verlauf eine vermehrte Expression beobachten?
- Lässt NGAL sich in überlebenden Neuronen des Infarktareals nachweisen?

Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten sollen zum besseren Verständnis der im Rahmen eines ischämischen Insultes ablaufenden pathophysiologischen Vorgänge beitragen und Anstöße für weitere Forschung, neue Therapieansätze und die Entwicklung diagnostischer Werkzeuge darstellen.

## 7 Der Schlaganfall und seine Pathobiologie

Als ischämischer Schlaganfall wird eine vorübergehende oder permanente Abnahme des zerebralen Blutflusses im Versorgungsgebiet eines Hauptversorgungsgefäßes des Gehirns bezeichnet.(13) Kommt es zu einer Reduktion auf weniger als 20% der Normaldurchblutung, tritt ein Zusammenbruch der zellulären Energieversorgung ein.(14) Ursache des reduzierten Blutflusses stellt meist ein Embolus oder die Ausbildung eines lokalen Thrombus dar.(13) Fällt die allgemeine Hirndurchblutung, zum Beispiel bei einem Herz-Kreislauf-Stillstand, für 15 bis 20 Sekunden aus, kommt es zur Bewusstlosigkeit. Dauert dieser Zustand 7 bis 10 Minuten an, so sind irreversible Schäden des Organs die Folge.(15)

Die Ursache für diese Schäden bildet in erster Linie die durch die fehlende Durchblutung unterbundene Zufuhr von Sauerstoff und Glucose.(13) Ein verheerender Energiemangel ist die Konsequenz,(14) denn ohne die obengenannten Substrate wird die ATP-Synthese durch Glykolyse und oxidative Phosphorylierung verlangsamt oder gar zum Stillstand gebracht.(16) An Stelle von Glucose können auch Glykogen, Laktat oder Fettsäuren für die Energiebereitstellung verwendet werden. Anders verhält es sich mit Sauerstoff, einem unersetzlichen Antreiber der mitochondrialen Atmung, der bedeutendsten zellulären ATP-Quelle. Bei Sauerstoffmangel kommt es zu einem Halt der ATP-Synthese während der Energieverbrauch jedoch bestehen bleibt.(16) Dadurch kommt es zu einer rapiden Abnahme der zellulären ATP-Konzentration. Wird die laufende oxidative Phosphorylierung angehalten, beginnt die ATP-Synthase ihre Arbeit in entgegengesetzte Richtung auszuführen und verbraucht dabei ATP, das sie dem zellulären Energiestoffwechsel weiterhin entzieht.(16) Findet eine Unterbrechung der oxidativen Phosphorylierung zu einem späteren Zeitpunkt in der Atmungskette statt, etwa bei Komplex IV, dann verursacht der Verlust von Sauerstoff ein Elektronenleck, welches zu vorübergehender Zunahme der Entstehung von reaktiven Sauerstoff Spezies führt (ROS). (16)Schlussendlich kommt es zu einer Ansammlung von Laktat und Protonen durch die anaerobe Glykolyse, die bei fehlender Zellatmung den pH-Wert in der Zelle sinken lässt. Die starke Zunahme an ROS sowie der niedrige pH-Wert sind eine enorme Belastung für die Zellen. Am Ende ist es dann aber doch der ATP-Mangel, der verschiedenste für Gehirnzellen spezifische ATP-abhängige

Prozesse in ihrer Funktion beeinträchtigt und dieses Organ so sensibel auf Ischämie reagieren lässt.(16)

Ist einmal der Infarkt entstanden, finden anschließend eine Menge pathophysiologischer Prozesse im ischämischen Bezirk statt, die noch zu weiteren Gewebsschäden führen.

Die pathogenetischen Hauptmechanismen des postischämischen Schadens stellen die Exzitotoxizität, Periinfarktdepolarisationen, Inflammation und der programmierte Zelltod dar.(13)

## **7. 1 Die Penumbra**

Im Übergang vom Infarktkern zum gesunden zerebralen Gewebe befindet sich eine Zone ebenfalls verminderter Perfusion und intermittierend depolarisierter Zellen, die Penumbra. In dieser Zone ist der Zellschaden noch nicht irreversibel. Inflammation, Apoptose und eine Weiterverbreitung der Depolarisation können zu terminalen Schäden in der Penumbra führen. Es sind nun vor allem die Zellen in der Penumbra, die durch therapeutische Ansätze geschützt werden sollen.(13) Daher ist es von großer Bedeutung die Pathophysiologie der postischämischen entzündlichen Prozesse besser zu verstehen um neue Angriffspunkte der Therapie zur Reduktion von neuronalen Schäden zu entdecken und das bleibende neurologische Defizit der Patienten zu minimieren.

## **7.2 Entzündliche Kaskaden in der Frühphase**

Ist es einmal zum Verschluss eines zerebralen Gefäßes gekommen, findet eine komplexe Kaskade verschiedenster molekularer Ereignisse statt, die zu weiterer Gewebsschädigung führt. Einen dieser Prozesse stellt die Inflammation dar.

Der Startschuss für die postischämische Entzündung fällt intravasal. Gleich nachdem sich die Okklusion des Gefäßes ereignet hat, lösen Hypoxie, die Änderung in den Scherkräften und die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) die Gerinnungskaskade aus und führen so zur Aktivierung von Komplementsystem,

Thrombozyten und Endothelzellen.(17) Fibrin verklumpt intravasale Thrombozyten und Leukozyten und führt so zu weiteren mikrovaskulären Verschlüssen.(18) Oxidativer Stress in Endothelzellen senkt die Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid (NO), einem sehr wirksamen Vasodilatator sowie Hemmer der Thrombozytenaggregation und der Leukozytenadhäsion.(17) Der Mangel an NO verstärkt die intravasale Verklumpung und verhindert zusätzlich den Blutfluss zum ischämischen Gewebe.(17,19) Entzündungsmediatoren und oxidativer Stress führen außerdem zu einer Permeabilitätsstörung der Blut-Hirn-Schranke. Es kommt zur Ausschüttung von Proteasen durch Leukozyten und vaskuläre Zellen. Verbindungsproteine, die Endothelzellen abdichten, werden weniger exprimiert, wodurch die parazelluläre Extravasation von Proteinen und Zellen erleichtert wird.(17,20) Zusätzlich werden im perivaskulären Raum Makrophagen und Mastzellen aktiviert. Die Degranulation der Mastzellen setzt Histamin, Proteasen und TNF frei, während aktivierte Makrophagen proinflammatorische Zytokine ausschütten. Diese Signalkaskaden bilden die Basis für die weitere Aktivierung von Immunzellen.(17)

### **7.3 Ischämischer Zellschaden als Auslöser der Immunantwort**

Schon einige Minuten nach Eintreten der Ischämie steigt die extrazelluläre ATP-Konzentration an. Dies geschieht zum einen durch die Depolarisation von Neuronen und Gliazellen und zum anderen tritt das Molekül durch geschädigte Plasmamembranen aus.(17,21,22) Zusätzlich wird ATP von Zellen der Gefäße und des Blutes freigesetzt und begünstigt die intravaskuläre Gerinnung sowie die Plättchenaggregation.(23) Der Anstieg der ATP-Konzentration im Gewebe führt außerdem über die Aktivierung des P2x7 Rezeptors in Gliazellen zur Ausschüttung von pro-inflammatorischen Mediatoren. Die aktivierten Mikrogliazellen entwickeln nun viele Eigenschaften von Makrophagen. Sie präsentieren MHC Klasse II Antigene, nehmen amöboide Morphologie an, beginnen mit der Phagozytose und zeigen migratorische Tendenzen.(17) Neurotransmitter jedoch können der entstehenden Immunantwort entgegenwirken, denn Mikrogliazellen besitzen eine Reihe unterschiedlicher Neurotransmitterrezeptoren. Zu diesen gehören etwa AMPA-, Kainat-, adrenerge, GABA<sub>B</sub>-Opioid und Cannabinoidrezeptoren.(24) Die Aktivierung dieser Rezeptoren führt zu einer Abnahme der mikroglialen Zytokin-, ROS- und NO-Produktion(24) und unterdrückt außerdem die sekretorische Antwort von

Mastzellen.(25) Folglich stellt ATP ein neuronales Warnsignal dar, das die Entstehung einer Immunantwort begünstigt. Neurotransmitter hingegen dämpfen die entzündlichen Vorgänge im Gewebe.(17)

#### **7.4 Pattern Recognition Rezeptoren und die Bedeutung von neuronalem Zelltod für die Aktivierung von Mikrogliazellen**

Führt die andauernde Durchblutungsunterbrechung zum Zelltod, kommt es zur Aktivierung zusätzlicher Signalwege. Eine weite Bandbreite molekularer Signale wird aus dem intrazellulären Kompartiment freigesetzt oder durch lytische Enzyme erzeugt, die aus toten Zellen stammen.(17) Diese, auf Englisch, danger associated molecular patterns (DAMPs) genannten Moleküle aktivieren pattern recognition Rezeptoren, wie etwa toll like Rezeptoren (TLRs) und scavenger Rezeptoren, welche in größerer Zahl auf Mikrogliazellen, Makrophagen und Endothelzellen zu finden sind. Purine und DAMPs induzieren gemeinsam die Expression von pro-inflammatorischen Molekülen in Leukozyten und bereiten dendritische Zellen für die Antigenpräsentation vor.(17)

Der Tod neuronaler Zellen führt außerdem zur Auflösung wichtiger Zell-Zell-Interaktionen zwischen Neuronen und Mikrogliazellen und begünstigt weiterhin die Entstehung inflammatorischer Signale. Im gesunden Gewebe lässt der Kontakt mit Neuronen Mikrogliazellen in einem Ruhezustand verweilen.(17) Das von Neuronen exprimierte Oberflächenprotein CD200 zum Beispiel interagiert mit seinem Rezeptor CD200R, der auf Mikrogliazellen gefunden werden kann, und sorgt so für das Beibehalten eines Ruhezustandes dieser Zellen.(26) Der Untergang eines Neurons kann zum Verlust von CD200(27) und daher auch dieser Verbindung führen, was die Aktivierung von Mikrogliazellen begünstigen kann.

Ähnlich verhält es sich bei CX3CL1, einem an der Zelloberfläche gebundenen Chemokin, das normalerweise von Neuronen exprimiert wird.(17) Auch für dieses Molekül tragen Mikrogliazellen einen Rezeptor, den CX3CL1R. Bei bestehender Rezeptor-Ligand-Interaktion wird eine Aktivierung von Mikrogliazellen unterdrückt. Kommt es also zu neuronalem Schaden, entsteht ein CX3CL1-Mangel. Dieser kann zu vermehrter Aktivierung von Mikrogliazellen führen.(28) Zusätzlich aktiviert eine

zunehmende extrazelluläre Glutamatkonzentration metabotrope Glutamatrezeptoren auf Mikrogliazellen, was zur Entstehung des proinflammatorischen Phänotyps führt.(17) Während sich also der neuronale Schaden vom Infarktzentrum Richtung Penumbra ausbreitet, kann der Verlust des neurotransmittervermittelten und durch Neuron-Mikroglia-Interaktion bewerkstelligten immunsuppressiven Effekts die Entwicklung einer post-ischämischen Entzündung vorantreiben.(17)

In Anbetracht dieser Beobachtungen beginnt die Entzündungsantwort nach fokaler Ischämie also auf dem Gefäßlevel. Die Änderung in den Scherkräften, Hypoxie und die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies gelten als auslösende Faktoren.(17) Kommt es dann allmählich zu zerebralem Gewebsschaden, senden zuerst schwerst betroffene Zellen und anschließend bereits nekrotische Zellen Gefahrensignale aus. Im Zusammenwirken mit dem Verlust immunsuppressiver Mechanismen aktivieren diese Signale purinerge Rezeptoren und pattern recognition Rezeptoren.(17) Dieser Vorgang ruft eine inflammatorische Antwort von Zellen des Gehirns und eingewanderten Leukozyten hervor.(17)

## **7.5 Exzitotoxizität**

Das Gehirn benötigt eine große Menge an Glucose und Sauerstoff, denn seinen Energiebedarf deckt es fast ausschließlich aus oxidativer Phosphorylierung. Bei einem vorübergehenden fokalen Durchblutungsdefizit gelangen die obengenannten Substrate nicht mehr in ausreichender Menge zum Gewebe und ein Energiemangel stellt sich ein. Dieser macht es den Zellen unmöglich essentielle Ionengradienten aufrecht zu erhalten.(13) Der fortschreitende Energieverlust lässt den Aufbau von Membranpotentialen nicht mehr zu und führt zur Depolarisation von Neuronen und Gliazellen.(13) Diese Vorgänge haben eine Aktivierung von somato-dendritischen sowie präsynaptischen spannungsabhängigen  $Ca^{2+}$  Kanälen zufolge und exzitatorische Aminosäuren werden in den Extrazellulärraum abgegeben. Zur gleichen Zeit ist aber auch die energieabhängige präsynaptische Wiederaufnahme von exzitatorischen Aminosäuren nicht möglich. Dadurch kommt es noch zusätzlich zu einer Zunahme der Glutamat-Konzentration im extrazellulären Raum. Die Aktivierung von NMDA- und metabotropen Glutamat-Rezeptoren sorgt für eine Zunahme der Kalziumüberladung.(13,29) Als Ergebnis einer glutamatvermittelten

Überaktivität, kommt es über monovalente Kanäle zu einem Einstrom von  $\text{Na}^+$  und  $\text{Cl}^-$  in Nervenzellen. Wasser folgt dem  $\text{Na}^+$  und  $\text{Cl}^-$  Einstrom in das Zellinnere, da der  $\text{K}^+$  Efflux viel geringer ist. Es kommt zur Entwicklung eines Ödems, welches die Durchblutung der Zone um das Infarktzentrum noch zusätzlich negativ beeinflusst.(13)

Der Anstieg des Second Messenger  $\text{Ca}^{2+}$  aktiviert proteolytische Enzyme, die anschließend Bestandteile des Zytoskeletts sowie Proteine der Extrazellulärmatrix abbauen.(30) Die Aktivierung der Phospholipase  $\text{A}_2$  und der Cyclooxygenase führt zur Entstehung freier Radikale, die für Lipidperoxidation sorgen und Membranen schädigen. Freie Sauerstoffradikale wirken als wichtige Signalmoleküle, die Entzündung und Apoptose auslösen.(13)

Mitochondrien, die eine bedeutende Quelle für reaktive Sauerstoffspezies darstellen, werden in ihrer Funktion beeinträchtigt, da freie Radikale ihre innere Membran zerstören und Proteine beschädigen, die für den Elektronentransport, die  $\text{H}^+$ -Ausstoßung und die ATP-Produktion notwendig sind.(13) Die Mitochondrienmembran wird undicht, wodurch es zu mitochondrialer Schwellung, weiterer Abnahme der ATP-Produktion und enormer Entstehung von freien Sauerstoffradikalen kommt. Aus den Mitochondrien wird nun auch Cytochrom C frei und Apoptose ausgelöst.(13)

## **7.6 Periinfarktdepolarisation**

Der Energiemangel und die Freisetzung von  $\text{K}^+$  und Glutamat in den Extrazellulärraum lässt Neuronen und Gliazellen depolarisieren. Im Zentrum des Infarktareals kann es zu anoxischer Depolarisation kommen. Eine anschließende Repolarisation ist den Zellen dann nicht mehr möglich.(13) Die Zellen in der Penumbra jedoch, können unter Energieaufwand wieder repolarisieren. Auch hier führen die erhöhte extrazelluläre  $\text{K}^+$ - und Glutamatkonzentration zu weiteren Depolarisationen. Kommt es zu ständiger Ladung und Entladung der Zellen, so wird von periinfarkt Depolarisationen gesprochen.(13) Dieser Vorgang kann mehrere Male pro Stunde auftreten und sowie die Anzahl der Depolarisationen zunimmt, vergrößert sich auch der Infarkt. Während der pathophysiologische Prozess der Periinfarktdepolarisation in Schlaganfallmodellen von Mäusen, Ratten und Katzen

bereits nachgewiesen werden konnte, wurde dieses Phänomen aufgrund fehlender Messgeräte beim Menschen noch nicht nachgewiesen.(13)

## **7.7 Inflammation**

Nun einige der zuvor bereits genannten pathophysiologischen Vorgänge führen schlussendlich zur Entwicklung einer entzündlichen Antwort auf die ischämische oder mancher Orts auch nur hypoxische Gewebsschädigung.(13) Die  $Ca^{2+}$ -vermittelte Aktivierung von Second-Messenger-Systemen, die Vermehrung freier Sauerstoffradikale sowie die Hypoxie an sich lösen die Expression einiger proinflammatorischer Gene aus. Es kommt zur Synthese von Transkriptionsfaktoren wie etwa NF- $\kappa$ B, hypoxieinduzierter Faktor 1, interferon regulatorischer Faktor 1 und STAT3.(13)

### **7.7.1 Mikrogliazellen**

Schon innerhalb weniger Minuten nach Entstehung der Ischämie kommt es zur Aktivierung von lokalen Mikrogliazellen. Diese produzieren nun eine große Vielfalt an proinflammatorischen Mediatoren. Es kommt vor allem zur Herstellung von IL-1 $\beta$ , IL-6, ROS und TNF- $\alpha$  wodurch der Gewebsschaden zusätzlich verstärkt wird.(3,17) Allerdings fördern Mikrogliazellen später auch die Auflösung der inflammatorischen Reaktion und die Initiation von Gewebsreparaturmechanismen durch die Produktion von IL-10 und TGF- $\beta$ . Außerdem wird die Gewebsregeneration durch die Expression von Wachstumsfaktoren wie zum Beispiel IGF-1 von Mikroglia zusätzlich unterstützt.(17) Etwa 48 bis 72 Stunden nach dem Ereignen der Ischämie erreicht die Mikroglia proliferation schließlich ihren Höchstwert. Anschließend kommt es zu einer Rekrutierung von Immunzellen aus der Zirkulation in das Ischämiegebiet.(3)

### **7.7.2 Neutrophile Granulozyten**

Lange Zeit wurde angenommen, dass Neutrophile Granulozyten zu den ersten Immunzellen gehören würden, die in das Infarktareal einwandern(3) und dort zusätzlich zum fortschreitenden Gewebsschaden beitragen.(31) Laut jüngster Untersuchungen, kommt es jedoch zu gar keinem Übertritt von neutrophilen

Granulozyten in das geschädigte Gewebe.(31) Es wird angenommen, dass das zeitliche und örtliche Expressionsmuster der endothelialen Adhäsionsmoleküle P-Selectin, VCAM-1 und ICAM-1 im ischämischen Schlaganfall für eine erfolgreiche Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten in das zerebrale Parenchym gar nicht ausreichend ist. Größere Mengen dieser Immunzellen konnten viel eher in Gefäßlumina und im leptomeningealen Raum nachgewiesen werden. Die Rolle, die diese Zellen dort spielen ist jedoch weitaus unklar. (31)

### **7.7.3 Makrophagen**

Mikrogliazellen sind aus dem Blut stammenden Makrophagen in ihrer Funktion und Morphologie sehr ähnlich. Makrophagen können eine stark verzweigte Form annehmen, die es unmöglich macht sie von Mikrogliazellen zu unterscheiden. Reaktive ansässige Mikrogliazellen können im Gegenzug dazu einen phagozytischen Phänotyp entwickeln, der sie wie Makrophagen aussehen lässt.(3) Um eine zeitliche Unterscheidung des Vorkommens im Infarktgebiet beider Immunzelltypen durchführen zu können, werden chimerische Mäuse mit GFP Knochenmark eingesetzt. Auf diese Weise wurde ein Einwandern von Makrophagen hauptsächlich vom Tag 3 bis zum Tag 7 nach Ischämie festgestellt während Mikrogliazellen schon vom ersten Tag an nachgewiesen wurden.(3) Makrophagen sind unter anderem in dem Raum zwischen der vaskulären Basalmembran und der Oberfläche des Gehirns, der Glia limitans, anzutreffen. Im Gegensatz zu Mikrogliazellen werden sie ständig durch hämatogene Vorläuferzellen ersetzt.(17) Makrophagen können in zwei Gruppen unterteilt werden. Die Zellen der Gruppe M1 sind hauptsächlich für die Produktion von proinflammatorischen Mediatoren, Chemokinen, ROS und NO zuständig. Sie vermitteln somit eine von T-Helferzellen konzertierte Immunantwort. M2 Makrophagen stellen die antiinflammatorischen Zytokine IL-10 und TGF- $\beta$ , sowie IL-1ra und Arginase her.(17)

#### **7.7.4 Mastzellen**

Mastzellen können im Gehirn vor allem in der perivaskulären Umgebung angefounden werden und beinhalten potente schnellwirksame vasoaktive und proteolytische Substanzen.(3) Strbian et al. haben in einem transienten MCAO Rattenmodell gezeigt, dass Mastzellen die Ausbildung des Ödems in der Frühphase nach ischämischer Schädigung wesentlich regulieren.(3)

#### **7.7.5 Dendritische Zellen**

Dendritische Zellen sind antigenpräsentierende Zellen, die eine Verbindung von natürlichem und adaptivem Immunsystem darstellen.(17) Lange Zeit wurde angenommen, dass das zentrale Nervensystem eine immunprivilegierte Stellung inne hätte und keine eigenen professionellen antigenpräsentierenden Zellen besäße.(32) Im Jahr 2008 wurden von Felger et al. jedoch im ZNS ansässige dendritische Zellen nachgewiesen. In einem MCAO Modell wurde schließlich eine quantitative Zunahme von zerebralen dendritischen Zellen zu den Zeitpunkten 24 und 72 Stunden nach Ischämie gezeigt.(32) Außerdem wurde eine vermehrte Expression von MHC II und kostimulierenden Molekülen beobachtet. Die zerebralen dendritischen Zellen waren vor allem in der Grenzzone des Infarktes in der unmittelbaren Umgebung von invadierenden T-Zellen anzufinden. Dendritische Zellen aus der Zirkulation waren hingegen erst 72 Stunden post Ischämie und vor allem im Infarktkern nachzuweisen.(32)

#### **7.7.6 Lymphozyten**

Die Rolle, die Lymphozyten in der Pathogenese des ischämischen Schlaganfalles spielen ist noch relativ unklar. Einige Studien weisen darauf hin, dass eine antigenunspezifische inflammatorische Antwort von Lymphozyten vermittelt wird. Ob es jedoch auch zur Ausbildung einer adaptiven Immunantwort kommt ist ungewiss.(4) Eine Theorie beschäftigt sich mit der Ausbildung einer gegen zentralnervöse Antigene gerichteten Autoimmunantwort.

Damit T-Lymphozyten aktiviert werden müssen sie sowohl über MHC-Moleküle vermittelt den Kontakt mit einem Antigen erfahren als auch ein entsprechendes kostimulierendes Signal erhalten. Das zentrale Nervensystem (ZNS) ist normalerweise durch die Blut-Hirn-Schranke vom systemischen Immunsystem abgeschirmt.(4) Auf diese Weise werden Interaktionen mit zentralnervösen Antigenen vermieden. Kommt es jedoch zu einem ischämischen Schlaganfall, so ist die Blut-Hirn-Schranke gestört und das Immunsystem erfährt sowohl im Gehirn als auch in der Peripherie Kontakte mit Antigenen aus dem ZNS.(4) Wird einem T-Lymphozyten nun ein Antigen dargeboten und erreicht ihn gleichzeitig der entsprechende Stimulus so wird normalerweise eine T-Helferzellen vermittelte Reaktion des Typ 1 (Th1) ausgelöst. Bei dieser Immunantwort kommt es zur Sekretion der proinflammatorischen Zytokine IL-2, IL-12, TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  von denen die Ausbildung einer zellulären Immunantwort begünstigt wird.(4) Trifft ein Lymphozyt auf ein Antigen ohne dabei ein passendes kostimulatorisches Signal zu erhalten kann ihm dieses unbekannt bleiben oder es wird erkannt aber auch toleriert. Trifft ein T-Lymphozyt später auf ein toleriertes Antigen wird eine von T-Helferzellen vermittelte Antwort des Typs 2 oder 3 (Th2/Th3) ausgelöst. Bei dieser kommt es vor allem zur Ausschüttung der Zytokine IL-4, IL-10 und TGF- $\beta$ 1, welche die zelluläre Immunantwort modulieren.(4)

In Anbetracht dieser Mechanismen gäbe es zwei Arten der immunologischen Reaktion auf ZNS-Antigene nach ischämischem Schlaganfall. Treffen T-Lymphozyten nach einem Schlaganfall im Gehirn selbst oder im peripheren lymphatischen Gewebe auf ZNS-Antigene so wird eine Th2/Th3 Immunantwort ausgelöst.(4) Erleidet ein Patient eine Poststrokeinfektion so kann es durch die begleitende entzündliche Reaktion zusätzlich zur Sekretion von kostimulierenden Molekülen kommen die eine Th1 Immunantwort zur Folge hat. (4)

Obwohl sich diese Theorie mit Ergebnissen aus dem Labor untermauern lässt, gibt es dennoch einige Ungereimtheiten. Die Ausbildung einer adaptiven Immunantwort nimmt normalerweise 7 bis 10 Tage in Anspruch während aber schon 24 bis 48 Stunden nach der Entstehung der Ischämie das Einwandern von T-Zellen in das Infarktgebiet beobachtet werden kann.(17)

## 7.8 Apoptose

Die Apoptose zählt zu den am besten untersuchten Zelltodmechanismen. Unter diesem Begriff wird eine Summe von Vorgängen verstanden, an deren Ende die Verdichtung von Chromatin und die nukleäre Kondensation mit anschließender Pyknose und Fragmentation, stehen.(33)

Bei der fokalen zerebralen Ischämie kommt diese Form des programmierten Zelltodes vor allem im Penumbragebiet vor. In dieser Grenzzone des Infarktareals ist nämlich noch ausreichend Sauerstoff und Energie vorhanden um Apoptose stattfinden zu lassen. Verglichen mit dem zeitlichen Auftreten der Nekrose im Infarktkern führt diese Form des Zelltodes erst mit einer Verspätung von mehreren Stunden zum Untergang von Neuronen.(33)

Apoptose kann grundsätzlich auf intrinsischem sowie auf extrinsischem Wege ausgelöst werden. Der intrinsische Weg wird durch den Integritätsverlust von Mitochondrien ausgelöst, welcher zur Freisetzung von proapoptotischen Molekülen führt.(33) Extrazelluläre Signale, die über die Bindung von extrazellulären Proteinen an sogenannte Todesrezeptoren der Zellmembran den programmierten Zelluntergang vermitteln, aktivieren den extrinsischen Weg. Sowohl der intrinsische als auch der extrinsische Aktivierungsweg der Apoptose lösen eine Caspase-Aktivierung aus.(33) Es gibt jedoch auch einen caspase-unabhängigen Apoptosemechanismus, der über den apoptoseinduzierenden Faktor (AIF) und die Endonuklease G (EndoG) vermittelt wird. Diese beiden Enzyme stammen aus den Mitochondrien und wandern nach ihrer Freisetzung in den Nukleus. Dort sorgen sie anschließend für DNA-Aufspaltung.(33)

## 7.9 Rolle der Astrozyten im ischämischen Gewebsschaden

In der Vergangenheit wurde in der Erforschung der Pathophysiologie des ischämischen Schlaganfalls traditionell das Hauptaugenmerk auf die Rolle der Neuronen gelegt, da diese viel sensibler auf ischämische Zustände reagieren als Gliazellen. Tatsächlich sind jedoch auch Astrozyten wesentlich von der Ischämie betroffen und sind in die neuronale Reaktion auf die plötzliche Unterbrechung der Sauerstoff- und Glucosezufuhr involviert.(16) Astrozyten kommen viele Funktionen

im zentralen Nervensystem zu. Sie unterstützen die Aufrechterhaltung der Ionenhomöostase, die Aufnahme von Neurotransmittern und spielen eine Rolle im ZNS Immunsystem sowie der Neuromodulation. Eine weitere wichtige Funktion ist die Aufrechterhaltung der Gewebsintegrität nach einer Schädigung. Diese Aufgabe wird von aktivierten Astrozyten, den sogenannten reaktiven Astrozyten, bewerkstelligt. Reaktive Astrozyten sind durch Hypertrophie und Proliferation charakterisiert.(34) Ursprünglich wurde die Fähigkeit zur glutamatergen Transmission nur Neuronen zugeschrieben. Mittlerweile ist aber bekannt, dass auch Astrozyten unterschiedliche bedeutende Rollen in der glutamatergen Signalübertragung spielen.(16) So gelten etwa astrozytische Glutamattransporter als Hauptverantwortliche für die Aufrechterhaltung der extrazellulären Glutamatkonzentration. Außerdem besitzen Astrozyten eigene Glutamatrezeptoren und verfügen über Mechanismen zur Sekretion dieses Neurotransmitters.(16)

Im ischämischen Schlaganfall haben reaktive Astrozyten neuroprotektive Aufgaben. So können sie etwa die neuronale Energieproduktion unterstützen, denn da sie eine geringere Anzahl an Ionenkanälen besitzen, haben sie auch einen geringeren Energiebedarf. Außerdem ist das meiste Glycogen im ZNS in Astrozyten gespeichert. Dieses können sie zu Laktat weiterverarbeiten und anschließend an benachbarte Neuronen weitergeben um deren Metabolismus aufrechtzuerhalten.(16) Die exzessive Glutamatfreisetzung von ischämischen Neuronen gilt als wichtiger Schädigungsmechanismus. Auch hier könnten Astrozyten neuroprotektiv eingreifen.(16) Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass überaktive Astrozyten neurotoxische Wirkungen haben können.(35) Wie dieser Effekt vermittelt wird ist noch unklar. Kürzlich wurde jedoch Lipocalin 2 (Lcn 2) als möglicher Faktor identifiziert, der unter pathologischen Umständen von reaktiven Astrozyten produziert wird, ausgeschüttet wird und selektiv toxischen Einfluss auf Neuronen ausübt.(35)

## 7.10 Systemische Immunität und Post-Strokeinfektionen

Während es im ZNS nach erfolgter Ischämie zu bedeutenden inflammatorischen Reaktionen kommt, bleiben auch immunologische Veränderungen in Blut, dem Knochenmark, der Milz und dem lymphatischen Gewebe nicht aus.(17) Die Genomuntersuchung aus dem peripheren Blut von Schlaganfallpatienten kann anhand spezifischer Muster von Entzündungsmarkern zur Klärung der Ursache des ischämischen Insultes beitragen. Dies deutet auf die Spezifität der systemischen inflammatorischen Antwort auf eine ZNS-Schädigung hin. Schon kurze Zeit nach einem ischämischen Insult können sowohl im Nagetiermodell als auch in Patienten eine Zunahme der Leukozytenzahl und eine vermehrte Expression von Zytokinen und inflammatorischen Markern beobachtet werden.(17) Nach dieser Phase der akuten Antwort kommt es jedoch zu einer ausgeprägten Immunsuppression, die unter anderem mit Lymphopenie, reduzierter Monozytenaktivität, vermehrter Expression von antiinflammatorischen Zytokinen, Apoptose von Lymphozyten und Milzatrophy einhergeht. Besonders ausgeprägt ist dieses Phänomen in Patienten mit großen Infarkten zu beobachten.(17) Die eben genannte Immunsuppression lässt Patienten sehr anfällig für Infektionen der Atemwege und des Urogenitaltraktes werden. Diese Poststrokeinfektionen tragen zu erheblicher Morbidität und Mortalität von Schlaganfallpatienten bei.(17)

## 8 NGAL

Beim Neutrophile Gelatinase assoziierten Lipocalin (NGAL) handelt es sich um ein kleines Glykoprotein mit einer atomaren Masse von 25 kDa.(36) Es ist einer der mehr als 20 Vertreter der Lipocaline(10) und besteht aus 198 Aminosäuren.(9) NGAL ist auch unter dem Namen Lipocalin 2 (LCN2) und der Bezeichnung 24p3 bekannt, wobei die murine Form anders als die humane mit Kleinbuchstaben (Lcn2 und Ngal) geschrieben wird. Ursprünglich wurde Ngal aus mit SV-40 infizierten Nierenzellen von Mäusen sichergestellt. Es wurde gebunden an ein monomeres Molekül der Metalloproteinase-9 (MMP-9), einer Gelatinase, die von neutrophilen Granulozyten sezerniert wird und zahlreiche Komponenten von Basalmembran und Extrazellulärmatrix abbaut, isoliert.(9)

Ursprünglich galten Lipocaline vorwiegend als Transportproteine für kleine lipophile Moleküle, in den vergangenen Jahren konnten jedoch auch Funktionen in der Regulation der Zellteilung, Differenzierung, dem Überleben und der Zelladhäsion nachgewiesen werden.(9) Die verschiedenen Vertreter der Lipocalinfamilie haben nicht, wie es bei den meisten Proteinfamilien der Fall ist, etwa ihre Aminosäuresequenz gemeinsam, sondern sie gleichen sich in ihrer Sekundär- und Tertiärstruktur, der sogenannten „Lipocalin-Faltung“. Bei dieser handelt es sich um eine antiparallele Beta-Fass-Struktur, die aus 8 Beta-Faltblättern besteht und dem Molekül eine becherähnliche Form verleiht, die wiederum den Ort der Bindung für kleine hydrophobe Moleküle darstellt.(9)

NGAL ist ein Bestandteil des angeborenen Immunsystems, wird von neutrophilen Granulozyten sezerniert und ist ein bakteriostatischer Faktor(37), der seine Wirkung über die Bindung an bakterielle Siderophore entfaltet.(10) Siderophore sind Proteine die an zirkulierendes und intrazelluläres freies Eisen binden und so für die Bereitstellung des für Bakterien lebenswichtigen Stoffes sorgen.(9) Interessanterweise bindet NGAL nur an Eisen, das bereits einen Komplex mit Siderophoren eingegangen ist. Hat NGAL einmal an eine Siderophore gebunden, kann diese nicht mehr vom Bakterium aufgenommen werden und es geht zu Grunde.(38) Im Falle einer Infektion mit dem Mykobakterium tuberculosis etwa kommt es durch neutrophile Granulozyten und alveoläre Epithelzellen zu einer

gesteigerten Produktion von NGAL, welches durch mykobakterielle Eisensequestrierung das Bakterienwachstum anhält.(39) Es hat sich außerdem gezeigt, dass Mäuse, denen Lcn2 fehlt, viel anfälliger für bakterielle Infektionen sind als Wildtypmäuse.(40)

In der Nephrologie gilt NGAL als exzellenter Biomarker für das akute Nierenversagen, denn renale Tubuluszellen bilden als Antwort auf verschiedene Arten der Verletzung NGAL. Die Plasma- und Urinkonzentrationen des Glykoproteins steigen noch bevor Veränderungen in der Kreatininkonzentration auftreten an.(8) Auch für die chronische Nierenkrankheit hat NGAL große Bedeutung, denn ist diese Krankheit mit polyzystischen Nieren, Glomerulonephritis oder diabetischer Nephropathie vergesellschaftet, so reflektiert die NGAL-Plasmakonzentration den Nierenschaden. Außerdem steht dieser Wert in einem umgekehrt proportionalen und unabhängigen Zusammenhang mit der glomerulären Filtrationsrate.(8)

Mittlerweile wird NGAL auch schon im Zusammenhang mit der Tumorgenese untersucht. Für mehrere Karzinomarten (Lunge, Magen, Pankreas und Leber) konnte bereits eine Überexpression von LCN2 nachgewiesen werden.(39) Im Mammakarzinom soll NGAL den Übergang vom epithelialen zum mesenchymalen Typ induzieren. Dieser Vorgang führt zu einem aggressiveren Phänotyp, der aus motileren Zellen besteht und daher Metastasen erzeugt. Im Komplex mit MMP9 ist NGAL in großer Menge im Urin von Glioblastompatienten nachzuweisen und wurde daher auch schon als Biomarker für Gehirntumoren in Erwägung gezogen.(39) In Tumoren werden NGAL vor allem zwei Funktionen geschrieben. Zum einen soll es die Transition von epithelialen Zellen zu mesenchymalen induzieren und somit Metastase begünstigen. Zum anderen soll es das Überleben von Tumorzellen über Eisensequestrierung verbessern. Als Stimuli, die für die LCN2-Überexpression verantwortlich sein sollen, gelten unter anderem Hypoxie und Inflammation.(39)

Während NGAL die Rolle als bakteriostatischer Faktor zugeschrieben werden kann, sind weitere Funktionen dieses Glykoproteins noch eher unklar. Es gilt als Akutphaseprotein, pro-apoptotischer Faktor für Mikrogliazellen in der Maus, autokriner Mediator der reaktiven Astrozytose und stimuliert die Apoptose in hämatopoetischen Zellen.(10) Die Ergebnisse kürzlich durchgeführter

Untersuchungen weisen darauf hin, dass reaktive Astrozyten Lcn2 sezernieren und somit den neuronalen Zelltod beschleunigen und vorantreiben. Als autokriner Mediator stimuliert es weitere Astrozyten und Mikorgliazellen und lässt sie ebenfalls reaktiv werden.(35)

In einer Arbeit, die das Gewebe mit thrombotischen Läsionen vergesellschafteter aortaler Aneurysmen untersuchte, wurde eher überraschend eine starke Expression des NGAL/MMP9 Komplexes beobachtet. Dieser Komplex wurde nicht nur in den Thromben sondern auch am Übergang vom Thrombus zur Gefäßwand sowie in der Aneurysmawand selbst angefundnen. Als Quelle für das NGAL wurden schlussendlich neutrophile Granulozyten identifiziert.(8)

Eine Untersuchung ergab, dass in Fällen einer asymptomatischen Karotissklerose die mittlere Plasma-NGAL-Konzentration nicht erhöht ist, jedoch konnte eine leichte positive Korrelation mit dem Diastolischen Blutdruck und dem Alter beobachtet werden.(9) Versuche in einem Rattenmodell der Karotissklerose zeigten verstärkte Expression von Ngal mRNA nach Ballondilatation, während das unverletzte arterielle Gewebe diese gar nicht exprimiert.(9) Außerdem konnte in einem Tiermodell der vorübergehenden Okklusion der Arteria Cerebri Media eine Aufregulation von Ngal in der ischämischen Hemisphäre auf mRNA- und Proteinniveau festgestellt werden.(41) Immunhistochemische Daten über das Vorkommen von Ngal im ischämischen Schlaganfall existieren jedoch noch keine.

## 9 Der NGAL-Rezeptor: 24p3R

In den letzten Jahren konnten für NGAL zwei entsprechende Zelloberflächenrezeptoren gefunden werden. Einer davon, Megalin, wird hauptsächlich von proximalen Tubuluszellen, aber auch an der Zelloberfläche von Makrophagen und T-Zellen expremiert.(42) Den bisherigen Erkenntnissen zufolge spielt der zweite Rezeptor, der mit der Bezeichnung 24p3R versehen wurde, vor allem eine wichtige Rolle für die Aufnahme von NGAL in das Zellinnere.(43)

NGAL und 24p3R vermitteln möglicherweise einen wichtigen von Transferrin unabhängigen Eisentransportweg.(44) Mit Eisen beladenes NGAL wird als Holo-NGAL bezeichnet während die unbeladene Form des Glykoproteins als Apo-NGAL betitelt wird. Die Aufnahme von Holo-NGAL über 24p3R in die Zelle lässt die intrazelluläre Eisenkonzentration ansteigen und für die Apoptose zuständige Gene werden gehemmt. Wird jedoch Apo-NGAL in die Zelle über 24p3R aufgenommen, so bindet NGAL an mit Eisen beladene Siderophoren, transportiert diese in den Extrazellulärraum, senkt die intrazelluläre Eisenkonzentration und führt zu Apoptose.(45)

Eine jüngere Arbeit zweifelt jedoch die endogene Rolle von NGAL bezüglich der Apoptose an, da für einige der notwendigen Schritte dieser Kaskade keine verlässlichen Daten existieren.(46) Bisherige wissenschaftliche Arbeiten haben 24p3R im zentralen Nervensystem der Maus fast ausschließlich in Neuronen nachgewiesen. Eine hohe Konzentration an 24p3R RNA konnte außerdem im Plexus Choroideus festgestellt werden.(10)

## **10 Material und Methoden**

### **10.1 Middle Cerebral Artery Occlusion in the Mouse (MCAO)**

Zur Gewinnung des histologischen Materials für diese Arbeit kam das sogenannte MCAO-Modell zum Einsatz. Bei diesem Modell wird auf nachfolgend beschriebene Art und Weise eine fokale zerebrale Ischämie erzeugt. Die Mäuse wurden von der Arbeitsgruppe für experimentelle Neurologie an der Charité Berlin behandelt. Alle tierexperimentellen Untersuchungen wurden in Übereinstimmung mit den Vorschriften des Landesamtes für Gesundheit und Soziales Berlin durchgeführt.

Es wurden 11 Wochen alte, männliche C57/Bl6J Mäuse mit dem Genotyp XX verwendet. Die Tiere erhielten eine Inhalationsnarkose mit Isofluran, Distickstoffmonoxid und Sauerstoff. Anschließend wurde eine mediane Inzision am Hals der Mäuse vorgenommen, die linke A. Carotis communis sowie die A. Carotis externa dargestellt und fest mit einem Faden ligiert. Nun wurde eine Gefäßklemme an der A. Carotis interna angebracht und ein 12 mm langer silikonbeschichteter Faden in das Gefäß eingeführt. Der Faden wurde bis in die A. Cerebri media vorgeführt und mit einer Naht fixiert. Zur analgetischen Behandlung wurde Lidocaingel in die Wunde eingebracht. Die Mäuse wurden in einen Käfig mit einer Temperatur von 37°C übersiedelt und konnten dort aufwachen. Nach 60 Minuten wurden die Tiere wieder in Narkose versetzt, der Faden wurde aus der A. Carotis interna entfernt und das Gefäß vernäht. Anschließend wurde die Haut mit Nähten verschlossen. Sofort nach dem Eingriff erhielten die Mäuse 0,5 ml 0,9% NaCl subkutan und wurden für 2 Stunden in den geheizten Käfig zurückgegeben, bevor sie dann wieder in den normalen Käfig kamen. Nun wurden die Tiere nach verschiedenen Zeitpunkten euthanasiert. Danach wurden sie transkardial mit saliner Lösung und 4% Paraformaldehyd(PFA) perfundiert. Abschließend wurden die Gehirne entnommen und 24 Stunden lang in 4% Paraformaldehyd fixiert.

Die weitere Verarbeitung des Gewebes fand nun im immunhistochemischen Labor der Universitätsklinik für Neurologie Graz statt. Anhand von drei Schnitten entlang der Koronarebene wurden die Gehirne in drei Teile zerlegt und in Histokassetten

gegeben. Um einem möglichen Austrocknen zuvor zu kommen wurde das Gewebe in PBS-Puffer zwischengelagert. Die Histokassetten wurden über Nacht in einer Zitadelle (Citadell1000, Fa. Shandon) mit einer aufsteigenden Alkoholreihe dehydriert. Im Anschluss wurden die Gewebeproben mit der Schnittfläche parallel zur Oberfläche in Paraffin eingebettet. Mit einem Schlittenmikrotom wurden von den Paraffinblöcken 2µm dicke Gewebsschnitte erzeugt, diese zum Strecken in ein 39°C warmes Wasserbad gegeben und dann auf Objektträger aufgebracht. Um eine bessere Haftung der Schnitte auf den Objektträgern zu ermöglichen, wurden diese im letzten Arbeitsschritt über Nacht bei 57°C in einem Brutschrank gelagert.

Protokoll Zitadelle:

	<b>Lösung</b>	<b>Dauer</b>
<b>1</b>	50% Alkohol	60'
<b>2</b>	70% Alkohol	60'
<b>3</b>	80% Alkohol	60'
<b>4</b>	96% Alkohol	60'
<b>5</b>	96% Alkohol	60'
<b>6</b>	96% Alkohol	120'
<b>7</b>	100% Alkohol	120'
<b>8</b>	Xylol	120'
<b>9</b>	Xylol	120'
<b>10</b>	Xylol	120'
<b>11</b>	Paraffin	120'
<b>12</b>	Paraffin	120'

Tabelle 1: Protokoll Zitadelle

## 10.2 Immunhistochemie

Um zu den für diese Arbeit benötigten Informationen über das Gewebe zu gelangen, kam hauptsächlich die Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex-Methode (ABC-Methode) zum Einsatz. Hierbei handelt es sich um eine indirekte Färbemethode, bei der ein ungekoppelter Primärantikörper und ein mit Biotin (=Vitamin H) gekoppelter Sekundärantikörper verwendet werden. Avidin bzw. Streptavidin weisen eine hohe Affinität zu Biotin auf, daher kommt es zur Bindung eines großen enzymhaltigen Verstärkungskomplexes, bestehend aus Avidin und Biotin-Peroxidase-Konjugat, an Biotin. Daraus resultiert eine Bindung mehrerer Peroxidasemoleküle an jeweils ein Gewebsantigen, wodurch diese Methode eine sehr hohe Sensitivität aufweist.(47)

Im ersten Arbeitsschritt galt es die Infarktareale in ihrer Ausdehnung und Lokalisation in den jeweiligen Gewebsschnitten genau abzugrenzen. Dazu kam eine immunhistochemische Färbung mit Antikörpern gegen das Mikrotubuli-assoziierte-Protein 2 (Map-2) zum Einsatz. Es konnte in einer früheren Arbeit bereits an Ratten gezeigt werden, dass die Färbung mit Map-2 sich sehr gut eignet um das Infarktareal zu charakterisieren.(48) Diese Methode bewährte sich nun auch bei der Maus.

Anschließend wurden die Schnitte mit NGAL- und NGAL-Rezeptor-Antikörpern gefärbt, um das jeweilige Antigen nachzuweisen, zu quantifizieren und im zeitlichen Verlauf darzustellen. Um das Vorkommen von NGAL einer bestimmten Zellpopulation zuordnen zu können wurden außerdem noch Doppelfärbungen vorgenommen. Alle immunhistochemischen Färbungen wurden nach dem folgenden Protokoll durchgeführt:

## 10.3 ICH–Protokoll

### Tag 1

1. Entparaffinieren: 2x 10 min Xylol  
2x 96% Alkohol  
30 min H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Methanol  
1x 96% Alkohol  
1x 70% Alkohol  
1x 50% Alkohol  
1x Aqua dest
2. Vorbehandlung: 1h Dampfgaren in Citratpuffer pH 6,0  
1h Abkühlen bei Raumtemperatur
3. 3 mal waschen mit PBS-Puffer pH 7,4
4. Gewebe mit Dako-Pen eingrenzen
5. Schnitte 20 Minuten mit 10% FCS (in Dako antibodydiluent) inkubieren
6. Antikörper auf Schnitte auftragen (AK 1:xxx<sup>4</sup> in 10% FCS)
7. Im Kühlschrank über Nacht inkubieren

### Tag 2

1. 3 mal waschen mit PBS-Puffer pH 7,4
2. Sekundärantikörper auftragen und 1h bei RT inkubieren  
(Sek-AK 1:200 in 10% FCS)
3. 3 mal waschen mit PBS-Puffer pH 7,4
4. Avidin auftragen und 1h bei RT inkubieren (Avidin 1:100 in 10% FCS)
5. Schnitte mit DAB-Lösung entwickeln
6. Gegenfärben mit Hämalaun: 5 min Hämalaun  
2x H<sub>2</sub>O  
in HCl – Alkohol differenzieren  
2x Aqua Dest  
5 min Shandon  
1x Aqua Dest  
aufsteigende Alkoholreihe  
n-Butylacetat
7. Eindecken mit Consul Mount (Fa. Shandon, Ref: 9990440)

## 10.4 ICH-Protokoll Doppelfärbungen

Für die Doppelfärbungen wurde grundsätzlich nach demselben Protokoll wie für die Einzelfärbungen vorgegangen. Allerdings wurden die Primärantikörper gleichzeitig angeboten und die Punkte 1-5 des zweiten Tages, zwei mal hintereinander mit unterschiedlichen Substraten durchgeführt.

Hier eine Übersicht der für die IHC Einzel- und Doppelfärbungen verwendeten Antikörper:

	<b>Verdünnung</b>	<b>Firma</b>	<b>Ref. Nr.</b>
<b>Anti Map-2</b>	1:1000	Abcam	Ab32454
<b>Anti Mac3</b>	1:100	Biosciences	553322
<b>Anti NGAL</b>	1:500	Bioss	Bs-1373R
<b>Anti 24p3R</b>	1:200	LSBio	LS-B3023
<b>Anti NeuN</b>	1:100	Millipore	MAB377
<b>Anti rabbit</b>	1:200	GE Healthcare	RPN1004V1
<b>Anti rat</b>	1:200	GE Healthcare	RPN1005V
<b>Anti sheep</b>	1:200	GE Healthcare	RPN1025V
<b>Anti mouse</b>	1:200	GE Healthcare	RPN1001V

Tabelle 2: Verwendete Antikörper

## 10.5 Reagenzien und Lösungen

- 50% Alkohol (Anstaltsapotheke)
- 70% Alkohol (Anstaltsapotheke)
- 80% Alkohol (Anstaltsapotheke)
- 96% Alkohol (Anstaltsapotheke)
- 100% Alkohol (Ethanol absolut) (Fa. Merck, Ref: 1.00983.1011)
- Avidin
  - 1g Avidin (Fa. Sigma, Ref: A 3151)
  - 0,5 ml Aqua Dest
- DAB
  - 1g DAB (Fa. Fluka, Ref: 32750)
  - 40ml PBS
- DAKO-Puffer
  - 4ml Dako Wash Buffer (Fa. Dako, Ref: S3006)
  - 36ml Aqua Dest
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30% (Fa. Merck, Ref: 1.07298.0250)
- Hämalaun (Anstaltsapotheke, Rezept LKH Graz)
- HCl-Alkohol
  - 100ml 70% Alkohol (Anstaltsapotheke)
  - 0,5ml HCl 37% (Fa. Merck, Ref: 1.0037.1000)
- Methanol (Fa. Merck, Ref: 1.06009.1011)
- N-Butylacetat (Fa. Merck, Ref: 1.09652.1000)
- PBS-Puffer
  - 2l von Stammlösung nach Sörensen (Anstaltsapotheke)
  - 6l Aqua Dest
  - pH einstellen auf 7,4
- Shandon Lösung (Fa. Thermo, Ref: 6769002)
- Zitronensäurepuffer
  - 10ml von Stammlösung (Anstaltsapotheke)
  - 990ml Aqua Dest
  - pH einstellen auf 6,0

## 10.6 Histologische Betrachtung

Am Beginn des Prozesses der histologischen Auswertung der angefertigten IHC-Färbungen stand die Identifikation des ischämischen Bereiches im jeweiligen Schnitt. Dazu wurden die Map-2-Schnitte unter dem Mikroskop (Fa. Zeiss) betrachtet und das Infarktareal bei 100facher Vergrößerung abgegrenzt. Zusätzlich wurden die Map-2-Schnitte makroskopisch beurteilt. Im Anschluss wurden die NGAL- und 24p3R-Schnitte über die Map-2-Schnitte gelegt und mit einem Stift wurde das Infarktareal gekennzeichnet.

Die quantitative Auswertung der NGAL- und 24p3R-Schnitte wurde bei 200facher Vergrößerung vorgenommen. Hierbei wurde die Anzahl der mit Antikörpern markierten Zellen im ischämischen Bereich sowie in der kontralateralen Hemisphäre unter dem Zähllokular im Großquadrat ( $A=0,49\text{mm}^2$ ) ermittelt. Mit der Axio Cam MRc 5 von der Firma Zeiss wurden die lichtmikroskopischen Bilder aufgenommen und mit der ebenso von Zeiss stammenden Software Axio Vision 4.7 für die weitere Benutzung digital verfügbar gemacht.

Für die Digitalisierung der Map-2-Schnitte wurde der Scanner und Drucker HP Officejet 6500 Wireless benutzt. Die Bildtafeln wurden dann in Microsoft Word zusammengestellt. Für die Durchführung der statistischen Berechnungen und das Erstellen der Diagramme wurde das Programm SigmaPlot 12.0 verwendet.

# 11 Ergebnisse

## 11.1 Map-2

Zu Beginn war es notwendig, die 2µm dicken Schnitte, auf das Vorkommen eines ischämischen Areals zu überprüfen und dieses genau zu lokalisieren. Dazu wurde das histologische Material von 9 Tieren untersucht. Schnitte aller Tage wurden mit Map-2-Antikörpern gefärbt. Dieser bindet an das Mikrotubuli-assoziierte-Protein 2, welches vor allem in die Aufrechterhaltung der strukturellen Integrität des neuronalen Zytoskeletts sowie die Modulation der synaptischen Plastizität involviert ist.(49) Map-2 hat sich in der Vergangenheit als sehr sensitiver Marker ischämischer Schädigung in Modellen der transienten globalen Ischämie erwiesen. Normalerweise ist dieses Protein eigentlich nur in Neuronen anzufinden. Aufgrund der eben genannten Eigenschaften bindet der Antikörper nur an Epitope im gesunden neuronalen Gewebe und das ischämische Areal zeigt eine Farbausparung.(49) Wie erwartet konnte anhand dieser Methode der Erfolg der Fadenbehandlung in den Versuchstieren nachgewiesen werden. Sowohl unter dem Mikroskop als auch makroskopisch gelang es das geschädigte Areal genau zu lokalisieren. Anschließend wurden die Objektträger der Map-2-Schnitte über die Objektträger der Ngal- sowie der 24p3R-Schnitte gelegt und das Ischämische Areal anhand eines Stiftes markiert.

## 11.2 Mac3

Außerdem wurde eine Färbung mit Anti-Mac3 vorgenommen um Makrophagen und Mikrogliazellen im geschädigten Gewebe nachzuweisen. Wie angenommen kam es zu einer Antikörperbindung im und um das Infarktareal. Dieser Befund beweist die Anwesenheit von Entzündungszellen im Sinne eines postischämischen inflammatorischen Prozesses. Am Tag 1 nach der Okklusion ist makroskopisch noch keine Bindung des Farbstoffes zu erkennen. An den Tagen 7 und 14 nach Fadenbehandlung ist das braune Farbsignal sowohl im als auch um den Ischämiebereich auch schon makroskopisch gut zu sehen. Als Referenz für die Lokalisation und Ausdehnung des Infarktes wurden hier die Map-2-Schnitte hergenommen. In der folgenden Bildtabelle sind jeweils ein Map-2- und ein Mac3-

Schnitt pro Zeitpunkt gegenübergestellt.

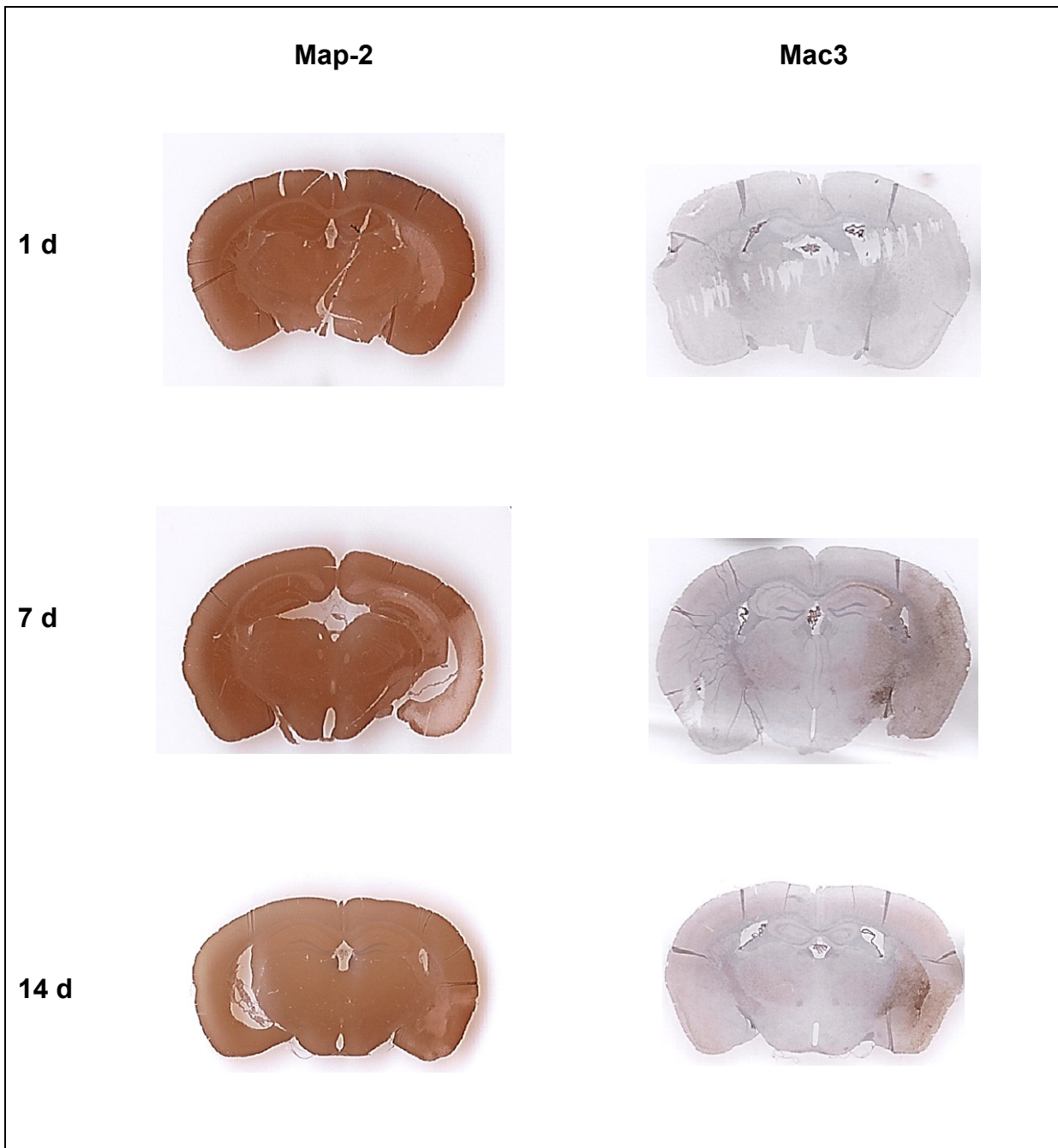


Abbildung 1: Map-2 und Mac3 IHC im Zeitverlauf (Map-2: Farbausparung zeigt Infarkt; Mac3: bräunliche Verfärbung zeigt Makrophagenlokalisierung)

### 11.3 Ngal-NeuN-Doppelfärbungen

Nachdem die Infarktareale identifiziert worden waren, galt es eine zelluläre Quelle für Ngal nachzuweisen. Aus der Literatur ist bekannt, dass Ngal im gesunden Gehirn eigentlich nicht vorkommt.(10) In dieser Arbeit wurde nun neuronales Gewebe nach

ischämischer Schädigung auf das Vorkommen von Ngal überprüft. Anhand von Doppelfärbungen wurden Neurone als potentielle Ngal-Träger untersucht. Dazu wurde eine Kolokalisation von Anti-NeuN mit Anti-Ngal geprüft. Unter dem Mikroskop wurden die Färberegebnisse schließlich ausgewertet und der Befund im Infarktareal mit dem kontralateral gespiegelten verglichen. Eine Antikörperkolokalisation konnte nur im ischämischen Gewebe festgestellt werden und zwar wurden zelluläre Strukturen mit Anti-NeuN und Anti-Ngal markiert. Im Infarktareal wurden also Ngal-positive Neurone nachgewiesen. Kontralateral wurde keine Kolokalisation dieser beiden Antikörper gefunden. In der anschließenden Bildtafel sind die Ergebnisse der Ngal-NeuN-Doppelfärbung dargestellt. Eine ipsilaterale Aufnahme ist der kontralateralen gegenübergestellt. NeuN-positive Strukturen tragen den grünen Farbstoff und Ngal-positive den braunen. Nur ipsilateral sind zelluläre Strukturen mit einer Farbstoffkolokalisation zu erkennen. Die Schnitte stammen vom Zeitpunkt 7 Tage nach Okklusion.

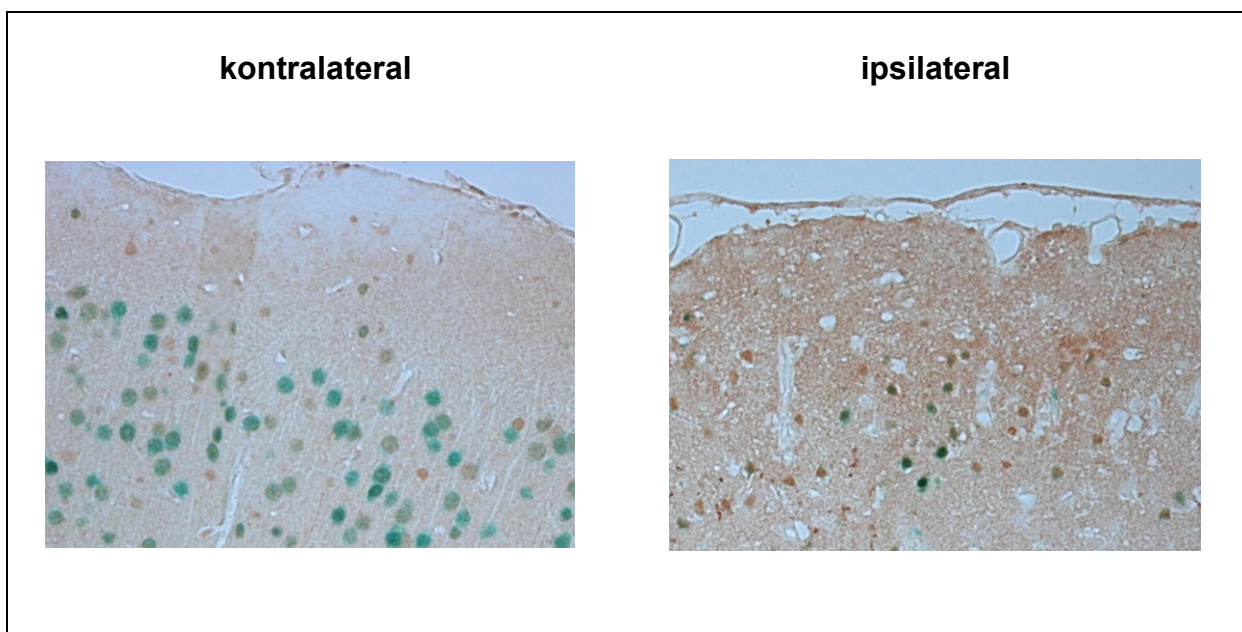


Abbildung 2: IHC-Doppelfärbungen mit Ngal und NeuN (links gesundes Gewebe; rechts ischämisches Gewebe; grün: NeuN, braun: Ngal)

## 11.4 Ngal

Im Anschluss an den qualitativen Nachweis wurde das quantitative Vorkommen von Ngal im ischämischen Mausmodell untersucht. Für diesen Arbeitsschritt wurden

Ngal-Einzelfärbungen von jeweils 2 Schnitten der Tage 1 und 14 nach Ischämie sowie von 3 Schnitten des Tages 7 nach Induktion der fokalen vaskulären Versorgungsunterbrechung bei 200facher Vergrößerung unter dem Zählkular ausgewertet. Es wurde die Anzahl der Ngal-positiven Zellen jeweils im ischämischen Bereich sowie kontralateral gespiegelt im nicht geschädigten Areal für eine Fläche von 0,49mm<sup>2</sup> ermittelt.

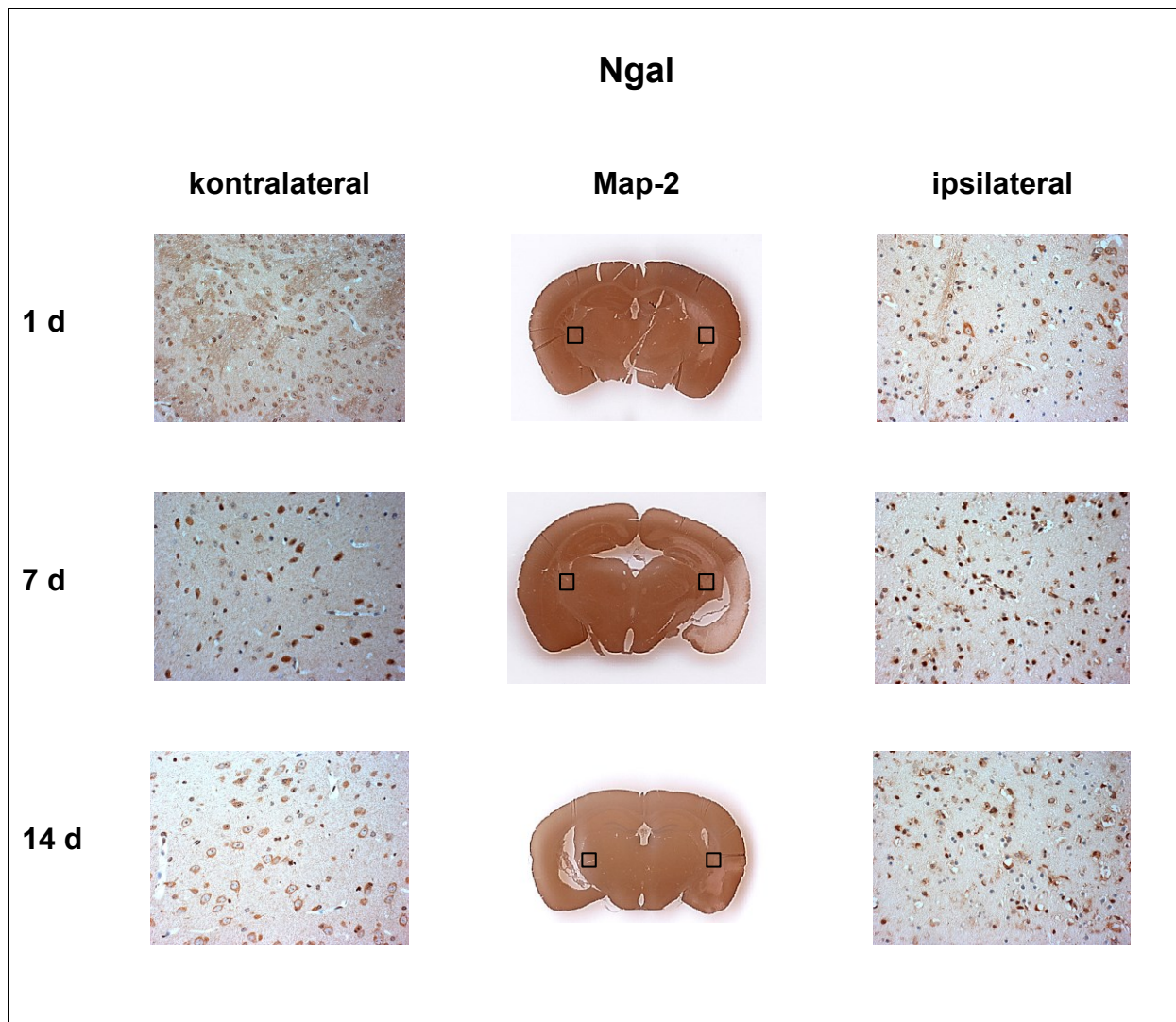


Abbildung 3: Ngal IHC im Zeitverlauf (Mitte: Map-2 IHC, Kästchen zeigen ausgezählten Bereich; links: Ngal IHC kontralateral vergrößert; rechts: Ngal IHC ipsilateral vergrößert; deutlich braun: Ngal)

Aus der Literatur ist bekannt, dass Ngal im gesunden Gehirn eigentlich nicht vorkommt.(10) Interessanterweise konnte bei der Auswertung des ischämischen Mausmodelles jedoch an allen untersuchten Tagen auch kontralateral der Schädigung eine geringe Anzahl Ngal-positiver Strukturen gefunden werden. Klar zu erkennen war jedoch, dass an allen untersuchten Tagen deutlich mehr Ngal-positive

Zellen im ischämischen Bereich anzufinden waren. Am Tag 7 konnte ein signifikanter Unterschied an Ngal-positiven Zellen im Ischämieareal gegenüber dem gesunden Gewebe festgestellt werden. In der nachfolgenden Bildtafel sind kontralaterale Gewebsausschnitte ipsilateralen aller untersuchten Tage gegenübergestellt. Ngal-positive Zellen zeigen eine intensive Färbung mit dem braunen Farbstoff.

### 11.5 Ngal-Rezeptor: 24p3R

Analog der Auswertung für Ngal wurden auch die 24p3R-Schnitte untersucht. Allerdings konnten hier jeweils 3 Schnitte für die Tage 1, 7 und 14 nach Ischämie ausgewertet werden. Anders als das Glykoprotein Ngal wird sein Rezeptor, 24p3R, auch im gesunden Gehirn exprimiert.(10) Dies konnte in den Einzelfärbungen bestätigt werden.

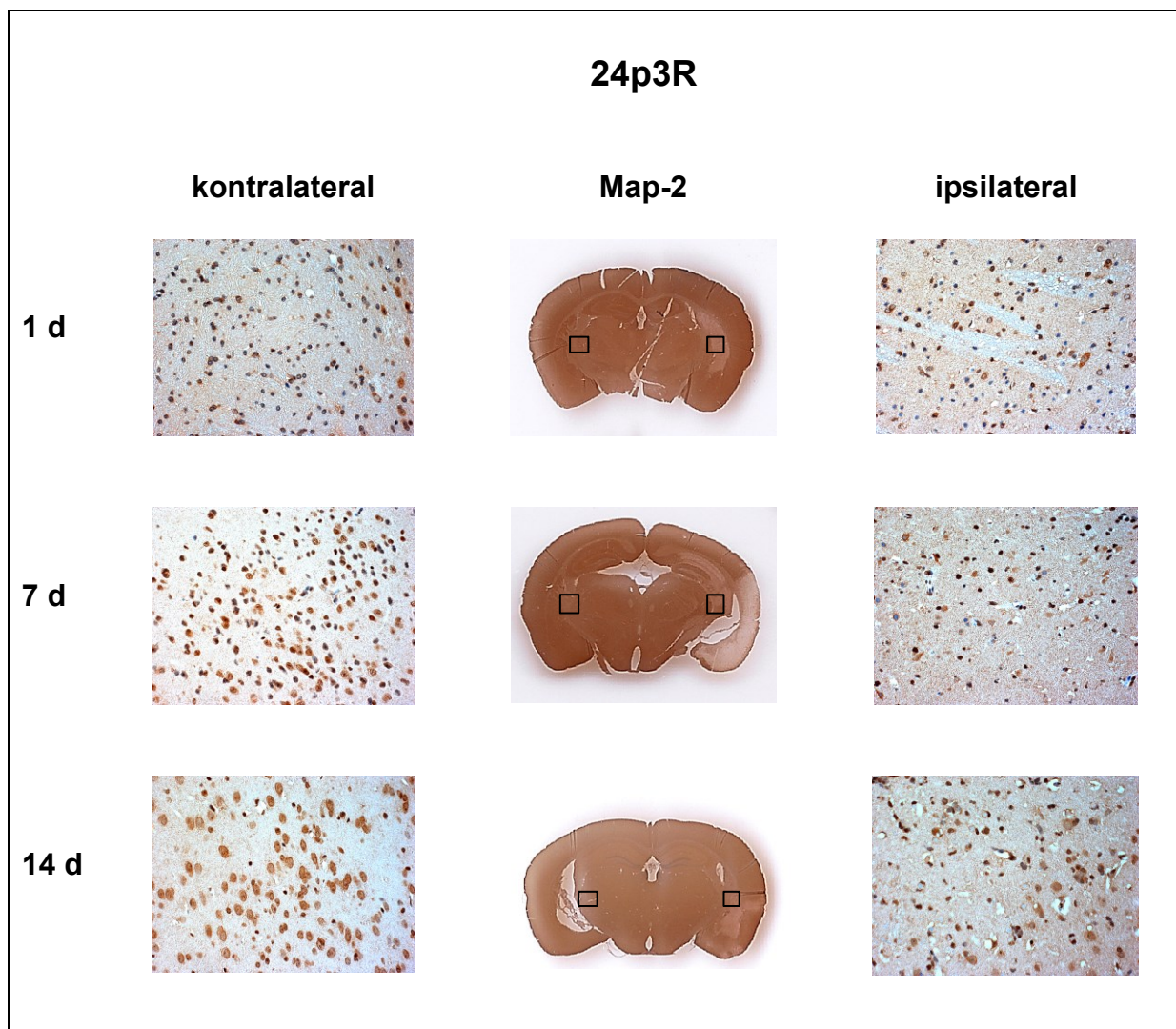


Abbildung 4: 24p3R IHC im Zeitverlauf (Mitte: Map-2 IHC, Kästchen zeigen ausgezählten Bereich; links: 24p3R IHC kontralateral vergrößert; rechts: 24p3R IHC ipsilateral vergrößert; braun: 24p3R)

An allen untersuchten Tagen war die Anzahl 24p3R-positiver Zellen im gesunden Gewebe höher. Am Tag 7 nach Ischämie konnte ein signifikanter Unterschied der ipsilateralen und der kontralateralen Hemisphäre festgestellt werden. Außerdem unterschieden sich die Tage 7 und 14 in der Anzahl 24p3R-positiver Zellen im ischämischen Bereich signifikant vom Tag 1. In der Bildtafel sind vergrößerte Aufnahmen aus dem Gewebe nach Zeitpunkt und Lokalisation geordnet dargestellt.

## 11.6 Statistische Auswertung

Abschließend wurde eine statistische Auswertung der erhobenen Daten vorgenommen. Die aus den Ngal- und 24p3R-Schnitten ermittelten Zellzahlen wurden in Excel-Tabellen eingetragen. Ein Mittelwert, der Anzahl mit Antikörpern markierter Zellen für den jeweiligen Zeitpunkt nach Okklusion und die jeweilige Lokalisation wurde gebildet und die Standardabweichung berechnet. Für die Durchführung der statistischen Tests wurde die Anzahl antikörperpositiver Zellen pro  $\text{mm}^2$  verwendet.

An allen untersuchten Tagen waren ipsilateral mehr Ngal-positive Zellen als kontralateral zu finden, wobei ein Peak am Tag 7 nach Fadenbehandlung beobachtet wurde. Die Auswertung der Rezeptoruntersuchung zeigte ein genau gegenläufiges Ergebnis. Hier war die Anzahl der mit Anti-24p3R markierten Zellen kontralateral höher als ipsilateral. Dies entspricht auch den bisherigen Kenntnissen, denn in der Literatur wird beschrieben, dass Neurone den Ngal-Rezeptor tragen.<sup>(10)</sup> Hier wurde kontralateral ein Peak am Tag 7 nach Fadenbehandlung festgestellt. Ipsilateral wurde eine Zunahme der Rezeptorexpression von Tag 1 bis Tag 14 beobachtet. Nun sollte untersucht werden ob sich die Anzahl Ngal- bzw. 24p3R-positiver Zellen ipsilateral verglichen mit kontralateral an den Zeitpunkten 1, 7 und 14 Tage nach Okklusion signifikant voneinander unterscheidet. Dazu wurden die Mittelwerte von ipsilateral und kontralateral der unterschiedlichen Zeitpunkte mit Hilfe eines T-Tests überprüft. Für diese Testung wurde  $p < 0,05$  gewählt. Anhand dieser statistischen Untersuchung wurde festgestellt, dass am Tag 7 ipsilateral eine signifikant höhere Anzahl Ngal-positiver Zellen anzufinden war. Der Rezeptor hingegen wurde am Tag 7 kontralateral stärker exprimiert. An den restlichen untersuchten Tagen konnte keine statistische Signifikanz gefunden werden.

Schließlich wurde noch das quantitative Vorkommen des Ngal-Rezeptors im ischämischen Gewebe am Tag 1 jeweils mit dem Tag 7 und dem Tag 14 verglichen. Hierfür wurde eine Varianzanalyse (ANOVA) vorgenommen. Für diese Untersuchung wurde  $p < 0,01$  festgelegt. Im ischämischen Bereich war die Anzahl 24p3R-positiver Zellen am Tag 7 als auch am Tag 14 signifikant höher verglichen mit dem Tag 1. Dieser Befund spricht für eine Aufregulation des Rezeptors im geschädigten Gewebe in den ersten zwei Wochen nach Infarkt. Die nachstehenden Diagramme illustrieren die statistische Auswertung.

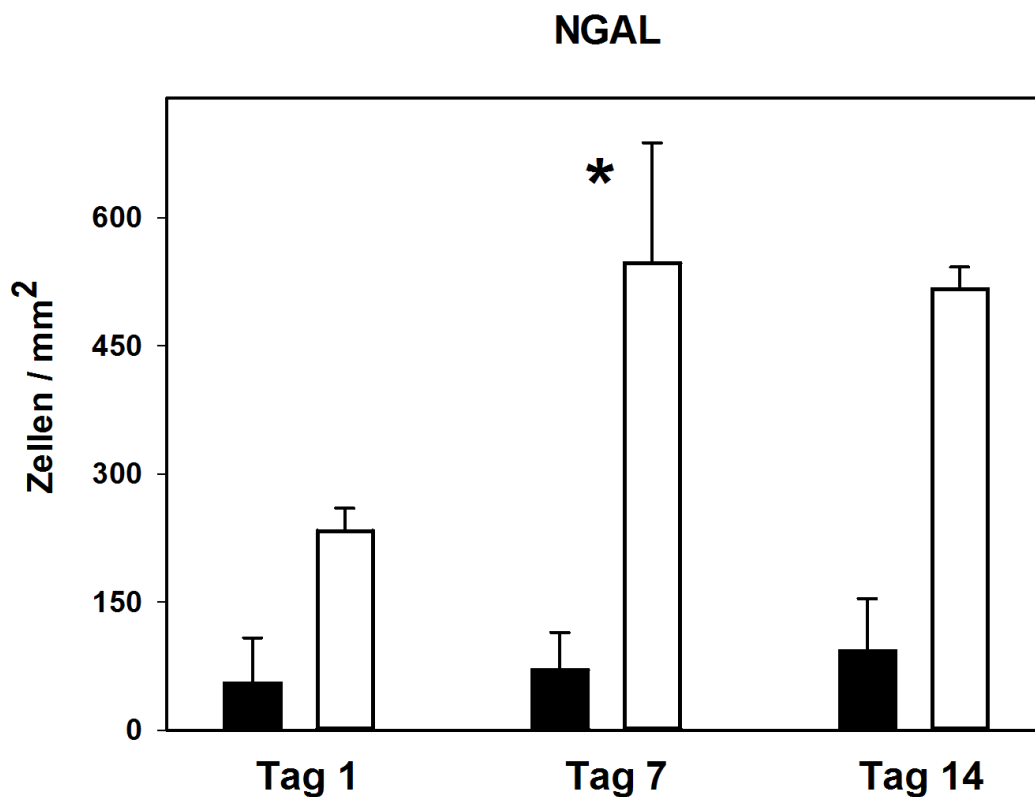


Abbildung 5: Statistische Auswertung der Anzahl Ngal-positiver Zellen pro Zeitpunkt

schwarze Balken: kontralateral; weiße Balken: ipsilateral

\* $p < 0,05$  ipsilateral vs. kontralateral (t-Test)

## 24p3R

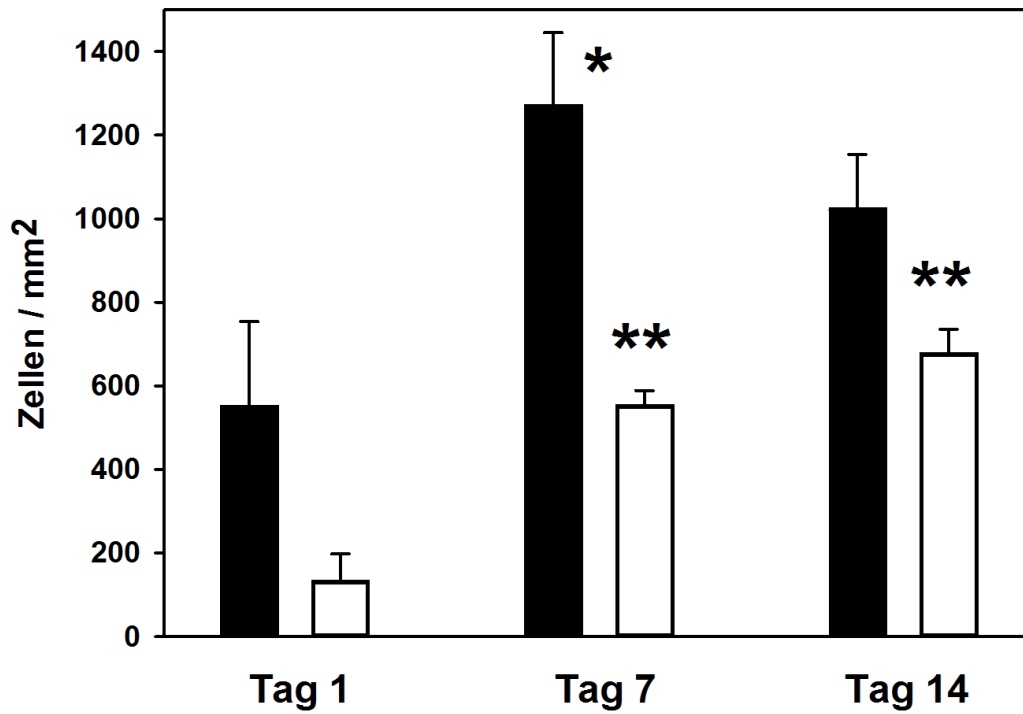


Abbildung 6: Statistische Auswertung der Anzahl 24p3R-positiver Zellen pro Zeitpunkt  
schwarze Balken: kontralateral; weiße Balken: ipsilateral

\* $p < 0,05$  ipsilateral vs. kontralateral (t-Test); \*\*  $p < 0,01$  Tag 7/14 vs. Tag 1 (ANOVA, t-Test)

## 12 Diskussion

### 12.1 Die Ergebnisse im Überblick

Anhand der Färbungen mit Anti-Map-2 konnten die ischämischen Areale in den Versuchstieren genau lokalisiert und eingegrenzt werden. Außerdem lieferte diese Methode einen sicheren Nachweis für das Vorhandensein des zu erwartenden fokalen ischämischen Infarktes nach Okklusion der A. Cerebri media mit einem Faden. Zusätzlich konnte die Markierung mit Anti-Mac3 die Anwesenheit von Makrophagen im geschädigten Areal anzeigen. Diese Information bestätigt das Vorhandensein eines lokalen entzündlichen Prozesses, wie er im Anschluss an eine fokale zerebrale Ischämie zu erwarten ist.

Die Auswertung der Daten, die aus den immunhistochemisch gefärbten Schnitten gewonnen wurden, bestätigte die Ausgangshypothese.

Wie ursprünglich vermutet gelang es Ngal im ischämisch geschädigten Gehirn der Maus nachzuweisen. Das Glykoprotein wurde vor allem im durch vorübergehende Gefäßokklusion geschädigten Bereich des Gehirnes vorgefunden. Aber auch kontralateral konnte an allen Tagen eine geringe Menge an Ngal-positiven Zellen gezählt werden. An allen untersuchten Tagen war die Anzahl der Ngal-positiven Zellen im ischämischen Areal größer als im gesunden Gewebe, wobei am Tag 7 nach Schädigung ein Peak beobachtet wurde. Ein signifikanter Unterschied im quantitativen Vorkommen von Ngal zwischen ischämischem und gesundem Gewebe konnte am Tag 7 festgestellt werden. Die Doppelfärbungen bestätigten eine Kolo-kalisation von Anti-Ngal und Anti-NeuN im geschädigten Gewebe. Diese Beobachtung konnte kontralateral nicht gemacht werden. Im ischämischen Areal konnte demnach Ngal an Neuronen nachgewiesen werden. Dieser Umstand stellt eine interessante Beobachtung dar, da ein Vorkommen von Ngal in Neuronen im gesunden Gehirn bisher nicht beschrieben wurde. Aus vorherigen Arbeiten ist eher ein Vorkommen von Ngal in Endothelzellen, Mikrogliazellen und dem Plexus Choroideus bekannt.(10)

In der Literatur wurde das Vorhandensein von 24p3R, dem Ngal-Rezeptor, auf Neuronen schon vorbeschrieben.(10) Dementsprechend wurde im gesunden Gewebe auch eine hohe Expression beobachtet. Die Anzahl der Rezeptor-positiven Zellen im ischämischen Bereich nahm von Tag 1 ausgehend bis hin zu Tag 14, an dem sie einen Peak erreichte, kontinuierlich zu. Am Tag 7 unterschieden sich das geschädigte und das gesunde Gewebe signifikant in ihrer Anzahl Anti-24p3R-positiver Zellen. Die Rezeptorexpression im ischämischen Areal war an den Tagen 7 und 14 signifikant höher als am Tag 1 nach Okklusion. Es konnte also eine Zunahme der Rezeptorexpression bis hin zum Tag 14 nach fokaler Ischämie beobachtet werden.

Lange Zeit wurden neutrophile Granulozyten zu den ersten Entzündungszellen gezählt, die in das ischämische Gewebe einwandern.(3) Unter anderem sind sie ein wichtiger Produzent von Ngal(39) und könnten daher als Quelle für das im Infarktgebiet angefundene Lipocalin2 gehalten werden. Vor kurzem wurde jedoch in einer Arbeit untersucht, warum Therapieansätze, welche den Übertritt von polymorphonukleären Granulozyten in das Infarktareal verhindern sollten, keine Wirkung zeigten und es stellte sich heraus, dass neutrophile Granulozyten gar nicht in das geschädigte Parenchym einwandern. Sie konnten hauptsächlich in Gefäßlumina sowie im leptomeningealen Raum nachgewiesen werden.(31) In Anbetracht dieser Ergebnisse ist es eher unwahrscheinlich, dass in den Infarkt eingewanderte neutrophile Granulozyten Ngal sezernieren.

Im ischämischen Schlaganfall sowie in vielen pathologischen Prozessen im Gehirn kommt es zur Aktivierung von Astrozyten.(35) Reaktive Astrozyten haben viele Aufgaben im geschädigten neuronalen Gewebe(16) und können bei Überaktivität auch zur Neurotoxizität beitragen.(35) Die Ergebnisse einer neueren Arbeit weisen stark darauf hin, dass reaktive Astrozyten Ngal sekretieren und dieses Molekül bedeutend zum neuronalen Zelltod beiträgt.(35) Daher könnten auch im ischämischen Mausmodell reaktive Astrozyten maßgeblich an der Sekretion von Ngal in das Infarktgebiet beteiligt sein. Diese Hypothese im Labor zu überprüfen ließen die Rahmenbedingungen dieser Arbeit leider nicht zu.

Ein interessantes Ergebnis dieser Arbeit war es, dass mit dem Ngal-Antikörper überlebende Neuronen im Infarktgebiet markiert wurden. Eine Aussage darüber ob diese Neurone Lcn2 selbständig exprimieren oder ob es von ihnen nur aufgenommen wird kann anhand der Daten dieser Arbeit leider nicht getroffen werden. Es wurde jedoch bereits in einem Tiermodell der systemischen Lipopolysaccharidadministration beobachtet, dass Neuronen Ngal aktiv aufnehmen.(10)

Als Hauptakteur der aus dem Blut stammenden inflammatorischen Zellen im ischämischen Schlaganfall gelten Makrophagen.(50) Obwohl die Datenlage bezüglich der Ngal-Produktion sowie der -Sekretion durch diese Zellreihe noch eher bescheiden ist, konnte mit In Situ Hybridisierung ein Vorkommen von Lcn2 in zirkulierenden Makrophagen nachgewiesen werden.(9) Auch diese Zellreihe könnte daher als Quelle für Ngal im ischämischen Insult in Frage kommen. Interessanterweise erreicht die Einwanderung von Makrophagen aus dem Blut analog der Zunahme von Ngal im Infarktreal am Tag 7 nach Ischämie ihren Höhepunkt.(3)

Die beobachtete Zunahme der 24p3R-Expression im geschädigten Gewebe suggeriert eventuell einen rezeptorvermittelten Prozess. Hier könnte die eisenabhängige Interaktion von Ngal mit 24p3R in der Regulation des Zellüberlebens von Bedeutung sein, da diese Einfluss auf das Zustandekommen von Apoptose haben soll.(45) Die Hypothese der Ngal- und Siderophorenvermittelten Induktion von Apoptose ist jedoch umstritten, da diese Kaskade bisher eigentlich noch nicht nachhaltig untersucht wurde.(46) Wie allerdings weiter oben schon erwähnt wurde ist jedoch durchaus bekannt, dass Ngal selektiv Apoptose in Neuronen hervorrufen kann.(35)

Da an allen Tagen eine größere Anzahl rezeptorpositiver Zellen in der gesunden Hemisphäre beobachtet wurde als in der geschädigten, wäre es denkbar, dass der quantitative Unterschied durch zugrunde gehende Neurone zustande kommt, da diese ja bekanntlich den Ngal-Rezeptor tragen.(10) Nun warum nimmt die Anzahl rezeptorpositiver Zellen im Infarktreal dann bis zum Tag 14 wieder zu? Diese Zunahme könnte zum einen durch einwandernde Entzündungszellen(51)

bewerkstelligt werden, zum anderen könnte es auch durch die Ligandenstimulation zu einer vermehrten Expression von 24p3R durch bereits anwesende Zellen kommen. Am wahrscheinlichsten ist eine Kombination aus diesen beiden Effekten.

## **12.2 Ausblick**

Weiterführend wäre es interessant gewesen, die Plasma-Ngal-Konzentration der Versuchstiere zu bestimmen und auf eine mögliche Korrelation mit den zerebralen Prozessen zu untersuchen. Zu klären wäre außerdem welche Zellreihen im ischämischen Gewebe nun tatsächlich Ngal sowie dessen Rezeptor 24p3R tragen. Für diese Untersuchung würden sich Doppelmarkierungen sowie auch immunhistochemische Fluoreszenzfärbungen gut eignen. Es müssten Antikörper gegen Neuronen, Astrozyten, Makrophagen/Mikrogliazellen, Oligodendrozyten und eventuell Lymphozyten eingesetzt werden um das Expressionsmuster des Proteins sowie seines Rezeptors besser den Zellreihen zuordnen zu können. Außerdem wäre eine Versuchsanordnung mit mehreren Tieren wünschenswert um durch die größere Fallzahl mehr und repräsentativere Daten zu erhalten.

## **12.3 Conclusio**

Diese Arbeit liefert erste immunhistochemische Daten über das Vorkommen von Ngal in einem Modell des ischämischen Schlaganfalles. Es konnte eine starke Expression dieses Proteins im Infarktareal nachgewiesen werden. Auch über das Vorkommen und das quantitative Verhalten des Ngal-Rezeptors, 24p3R, im Modell des ischämischen Schlaganfalles liefert diese Arbeit die ersten verfügbaren immunhistochemischen Daten. Anhand von Doppelmarkierungen konnte Immunreaktivität mit Ngal-Antikörpern von überlebenden Neuronen im Infarkt nachgewiesen werden. Welche Funktion Ngal nun tatsächlich im ischämischen Schlaganfall zukommt ist noch unklar. Alle Ergebnisse dieser Arbeit deuten jedoch darauf hin, dass Ngal eine wichtige Rolle in postischämischen Entzündungsprozessen spielt.

## 13 Referenzen

1. Österreichische Gesellschaft für Schlaganfallforschung - Zahlen und Fakten [Internet]. [zitiert 27. März 2013]. Verfügbar unter: <http://www.oegsf.at/aerzte/index.php?page=zahlen-und-fakten-2>
2. McKay J, Mensah GA, Greenlund K. The atlas of heart disease and stroke [Internet]. World Health Organization; 2004 [zitiert 29. März 2013]. Verfügbar unter: <http://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=JagK-qIWaZoC&oi=fnd&pg=PA16&dq=%22also+occurs+in+about+8%25%22+%22in+young%22+%22or+by+narrowing+or%22+%22placing+a+burden%22+%22and+tobacco+use+the%22+%22if+its+flow+is%22+%225+million+die+and%22+%22&ots=2kZUbUOWTu&sig=iBNLzsydbiN-oH9Lb8oLOz3WMI8>
3. Jin R, Yang G, Li G. Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: role of inflammatory cells. *Journal of Leukocyte Biology*. 3. Februar 2010;87(5):779–89.
4. Gee JM, Kalil A, Shea C, Becker KJ. Lymphocytes: Potential Mediators of Postischemic Injury and Neuroprotection. *Stroke*. 18. Januar 2007;38(2):783–8.
5. Tu W-J, Dong X, Zhao S-J, Yang D-G, Chen H. Prognostic value of plasma neuroendocrine biomarkers in patients with acute ischemic stroke. *Journal of Neuroendocrinology*. Mai 2013;n/a–n/a.
6. Josephson SA, Hills NK, Johnston SC. NIH Stroke Scale Reliability in Ratings from a Large Sample of Clinicians. *Cerebrovascular Diseases*. 2006;22(5-6):389–95.
7. Sato S, Toyoda K, Uehara T, Toratani N, Yokota C, Moriwaki H, u. a. Baseline NIH Stroke Scale Score predicting outcome in anterior and posterior circulation strokes. *Neurology*. 2008;70(24 Part 2):2371–7.
8. Bolignano D, Coppolino G, Lacquaniti A, Buemi M. From kidney to cardiovascular diseases: NGAL as a biomarker beyond the confines of nephrology. *European Journal of Clinical Investigation*. März 2010;40(3):273–6.

9. Chakraborty S, Kaur S, Guha S, Batra SK. The multifaceted roles of neutrophil gelatinase associated lipocalin (NGAL) in inflammation and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. August 2012;1826(1):129–69.
10. Ip JP, No\ccon AL, Hofer MJ, Lim SL, Müller M, Campbell IL. Lipocalin 2 in the central nervous system host response to systemic lipopolysaccharide administration. *Journal of Neuroinflammation*. 2011;8(1):124.
11. Dong M, Xi G, Keep RF, Hua Y. Role of iron in brain lipocalin 2 upregulation after intracerebral hemorrhage in rats. *Brain Research [Internet]*. Februar 2013 [zitiert 6. März 2013]; Verfügbar unter: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000689931300200X>
12. Cruz DN, Gaião S, Maisel A, Ronco C, Devarajan P. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a biomarker of cardiovascular disease: a systematic review. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine [Internet]*. 1. Januar 2012 [zitiert 25. Juni 2013];50(9). Verfügbar unter: <http://www.degruyter.com/view/j/cclm.2012.50.issue-9/cclm-2012-0307/cclm-2012-0307.xml>
13. Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends in neurosciences*. 1999;22(9):391–7.
14. Böcker W, Denk H, Heitz PU, Moch H. *Pathologie*. 4. Aufl. München: Elsevier GmbH; 2008.
15. Silbernagl S, Lang F. *Taschenatlas der Pathophysiologie*. 2. Aufl. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG; 2005.
16. Rossi DJ, Brady JD, Mohr C. Astrocyte metabolism and signaling during brain ischemia. *Nature Neuroscience*. November 2007;10(11):1377–86.
17. Iadecola C, Anrather J. The immunology of stroke: from mechanisms to translation. *Nature Medicine*. 7. Juli 2011;17(7):796–808.

18. Del Zoppo GJ, Schmid-Schonbein GW, Mori E, Copeland BR, Chang CM. Polymorphonuclear leukocytes occlude capillaries following middle cerebral artery occlusion and reperfusion in baboons. *Stroke*. 1. Oktober 1991;22(10):1276–83.
19. Atochin DN, Wang A, Liu VWT, Critchlow JD, Dantas APV, Looft-Wilson R, u. a. The phosphorylation state of eNOS modulates vascular reactivity and outcome of cerebral ischemia in vivo. *Journal of Clinical Investigation*. 2. Juli 2007;117(7):1961–7.
20. Engelhardt B, Sorokin L. The blood–brain and the blood–cerebrospinal fluid barriers: function and dysfunction. *Seminars in Immunopathology*. 25. September 2009;31(4):497–511.
21. Melani A, Turchi D, Vannucchi MG, Cipriani S, Gianfriddo M, Pedata F. ATP extracellular concentrations are increased in the rat striatum during in vivo ischemia. *Neurochemistry International*. November 2005;47(6):442–8.
22. Schock SC, Munyao N, Yakubchyk Y, Sabourin LA, Hakim AM, Ventureyra ECG, u. a. Cortical spreading depression releases ATP into the extracellular space and purinergic receptor activation contributes to the induction of ischemic tolerance. *Brain Research*. September 2007;1168:129–38.
23. Bune LT, Thaning P, Johansson PI, Bochsén L, Rosenmeier JB. Effects of nucleotides and nucleosides on coagulation. *Blood Coagulation & Fibrinolysis*. Juli 2010;21(5):436–41.
24. Pocock JM, Kettenmann H. Neurotransmitter receptors on microglia. *Trends in Neurosciences*. Oktober 2007;30(10):527–35.
25. Peachell P. Regulation of mast cells by  $\beta$ -agonists. *Clinical reviews in allergy & immunology*. 2006;31(2-3):131–41.
26. Hoek RM. Down-Regulation of the Macrophage Lineage Through Interaction with OX2 (CD200). *Science*. 1. Dezember 2000;290(5497):1768–71.

27. Matsumoto H, Kumon Y, Watanabe H, Ohnishi T, Takahashi H, Imai Y, u. a. Expression of CD200 by macrophage-like cells in ischemic core of rat brain after transient middle cerebral artery occlusion. *Neuroscience Letters*. Mai 2007;418(1):44–8.
28. Cardona AE, Pioro EP, Sasse ME, Kostenko V, Cardona SM, Dijkstra IM, u. a. Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor. *Nature Neuroscience*. 18. Juni 2006;9(7):917–24.
29. Park CK, Nehls DG, Teasdale GM, McCulloch J. Effect of the NMDA Antagonist MK-801 on Local Cerebral Blood Flow in Focal Cerebral Ischaemia in the Rat. *J Cereb Blood Flow Metab*. Oktober 1989;9(5):617–22.
30. Furukawa K, Fu W, Li Y, Witke W, Kwiatkowski DJ, Mattson MP. The actin-severing protein gelsolin modulates calcium channel and NMDA receptor activities and vulnerability to excitotoxicity in hippocampal neurons. *The Journal of neuroscience*. 1997;17(21):8178–86.
31. Enzmann G, Mysiorek C, Gorina R, Cheng Y-J, Ghavampour S, Hannocks M-J, u. a. The neurovascular unit as a selective barrier to polymorphonuclear granulocyte (PMN) infiltration into the brain after ischemic injury. *Acta Neuropathologica*. 27. Dezember 2012;125(3):395–412.
32. Felger JC, Abe T, Kaunzner UW, Gottfried-Blackmore A, Gal-Toth J, McEwen BS, u. a. Brain dendritic cells in ischemic stroke: Time course, activation state, and origin. *Brain, Behavior, and Immunity*. Juli 2010;24(5):724–37.
33. Puyal J, Ginet V, Clarke PGH. Multiple interacting cell death mechanisms in the mediation of excitotoxicity and ischemic brain damage: A challenge for neuroprotection. *Progress in Neurobiology* [Internet]. April 2013 [zitiert 14. April 2013]; Verfügbar unter: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0301008213000166>
34. Ridet JL, Privat A, Malhotra SK, Gage FH. Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. *Trends in neurosciences*. 1997;20(12):570–7.

35. Bi F, Huang C, Tong J, Qiu G, Huang B, Wu Q, u. a. Reactive astrocytes secrete Icn2 to promote neuron death. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 19. Februar 2013;110(10):4069–74.
36. Borregaard N, Cowland JB. Neutrophil Gelatinase-associated Lipocalin, a Siderophore-binding Eukaryotic Protein. *BioMetals*. April 2006;19(2):211–5.
37. Bolignano D, Coppolino G, Lacquaniti A, Buemi M. From kidney to cardiovascular diseases: NGAL as a biomarker beyond the confines of nephrology. *European Journal of Clinical Investigation*. März 2010;40(3):273–6.
38. Goetz DH, Holmes MA, Borregaard N, Bluhm ME, Raymond KN, Strong RK. The neutrophil lipocalin NGAL is a bacteriostatic agent that interferes with siderophore-mediated iron acquisition. *Molecular cell*. 2002;10(5):1033–43.
39. Rodvold JJ, Mahadevan NR, Zanetti M. Lipocalin 2 in cancer: When good immunity goes bad. *Cancer Letters*. März 2012;316(2):132–8.
40. Berger T, Togawa A, Duncan GS, Elia AJ, You-Ten A, Wakeham A, u. a. Lipocalin 2-deficient mice exhibit increased sensitivity to *Escherichia coli* infection but not to ischemia-reperfusion injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006;103(6):1834–9.
41. MacManus JP, Graber T, Luebbert C, Preston E, Rasquinha I, Smith B, u. a. Translation-State Analysis of Gene Expression in Mouse Brain After Focal Ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. Juni 2004;657–67.
42. Schroll A, Eller K, Feistritz C, Nairz M, Sonnweber T, Moser PA, u. a. Lipocalin-2 ameliorates granulocyte functionality. *European Journal of Immunology*. Dezember 2012;42(12):3346–57.

43. Miyamoto T, Asaka R, Suzuki A, Takatsu A, Kashima H, Shiozawa T. Immunohistochemical detection of a specific receptor for lipocalin2 (solute carrier family 22 member 17, SLC22A17) and its prognostic significance in endometrial carcinoma. *Experimental and Molecular Pathology*. Oktober 2011;91(2):563–8.
44. Richardson DR. 24p3 and Its Receptor: Dawn of a New Iron Age? *Cell*. Dezember 2005;123(7):1175–7.
45. Devireddy LR, Gazin C, Zhu X, Green MR. A Cell-Surface Receptor for Lipocalin 24p3 Selectively Mediates Apoptosis and Iron Uptake. *Cell*. Dezember 2005;123(7):1293–305.
46. Correnti C, Richardson V, Sia AK, Bandaranayake AD, Ruiz M, Rahmanto YS, u. a. Siderocalin/Lcn2/NGAL/24p3 Does Not Drive Apoptosis Through Gentisic Acid Mediated Iron Withdrawal in Hematopoietic Cell Lines. Chandra D, Herausgeber. *PLoS ONE*. 21. August 2012;7(8):e43696.
47. Büttner R, Thomas C, Fend F, Mennel H-D, Moll R, Schmid KW, u. a. *Allgemeine Pathologie/ Spezielle Pathologie/ Histopathologie. Set/ Allgemeine Pathologie* [Internet]. 3. Aufl. Stuttgart: Schattauer GmbH; 2003 [zitiert 19. März 2013]. Verfügbar unter:  
[http://books.google.at/books?id=LAPjjEgLOekC&pg=PA12&lpg=PA12&dq=ABC-Methode&source=bl&ots=hcnRB9jv0c&sig=z3OpcU8DuTA1e3P47FxFxYg6\\_F5tE&hl=de&sa=X&ei=V55IUfbLBMiC4gTVxYBA&ved=0CHMQ6AEwDQ#v=onepage&q=ABC-Methode&f=false](http://books.google.at/books?id=LAPjjEgLOekC&pg=PA12&lpg=PA12&dq=ABC-Methode&source=bl&ots=hcnRB9jv0c&sig=z3OpcU8DuTA1e3P47FxFxYg6_F5tE&hl=de&sa=X&ei=V55IUfbLBMiC4gTVxYBA&ved=0CHMQ6AEwDQ#v=onepage&q=ABC-Methode&f=false)
48. Popp A, Jaenisch N, Witte OW, Frahm C. Identification of ischemic regions in a rat model of stroke. *PLoS One*. 2009;4(3):e4764.
49. Dawson DA, Hallenbeck JM. Acute focal ischemia-induced alterations in MAP2 immunostaining: description of temporal changes and utilization as a marker for volumetric assessment of acute brain injury. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 1996;16(1):170–4.

50. Shichita T, Ago T, Kamouchi M, Kitazono T, Yoshimura A, Ooboshi H. Novel therapeutic strategies targeting innate immune responses and early inflammation after stroke. *Journal of Neurochemistry*. November 2012;123:29–38.

51. Bachman MA, Miller VL, Weiser JN. Mucosal Lipocalin 2 Has Pro-Inflammatory and Iron-Sequestering Effects in Response to Bacterial Enterobactin. Isberg RR, Herausgeber. *PLoS Pathogens*. 16. Oktober 2009;5(10):e1000622.

# 14 Curriculum Vitae

## Persönliche Daten

Name, Vorname: Kendlbacher, Paul

Geburtsdatum: 14.09.1987

Geburtsort: Graz

Familienstand: ledig



## Schulbildung

Volksschule: VS Waltendorf Graz von 1994 bis 1998

Gymnasium: Bischöfliches Gymnasium Graz von 1998 bis 2006 (Matura Juni 2006)

## Präsenz-/ Zivildienst

Zivildienst: Österreichisches Rotes Kreuz von Juli 2006 bis März 2007

Art der Tätigkeit/ Ausbildung: Rettungssanitäter

## Hochschulausbildung

Studium der Humanmedizin (O 202) an der Medizinischen Universität Graz seit Oktober 2007,

Erasmus Studienaufenthalt an der Universidad del Pais Vasco in San Sebastian 2010/2011

## Fremdsprachenkenntnisse

Englisch: fließend in Wort und Schrift, Auslandserfahrung

Spanisch: fließend in Wort und Schrift, Auslandserfahrung

Französisch: gute Grundkenntnisse, Auslandserfahrung

Baskisch: Grundkenntnisse, Auslandserfahrung

### **Berufliche Erfahrung**

Ferialpraktika:

Pathologie der Salzburger Landeskliniken (2004)

Spar (2005)

Briefzusteller Österreichische Post AG (2008)

Personaldienstleistungen Fa. KLS (2007-2010)

Geringfügig Beschäftigter:

Hervis (Jänner 2012-April 2013)

### **Auslandsfamulaturen:**

Spital Männedorf: Chirurgie, Schweiz (2010)

Southern General Hospital Glasgow: Neurochirurgie, Schottland (2013)

### **Hobbies und Interessen**

Shotokan Karatedo (Prüfung zum 1. Dan 2010)

Taiji Quan

Laufen

Fremdsprachen und Literatur