

Institut für Molekulare und Klinische Immunologie
der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg
in Kooperation mit dem Deutschen Institut für Neurodegenerative Erkrankungen e.V.
(DZNE) Magdeburg

**„Der neuroprotektive Effekt von Ly6G in
einem Schlaganfall-Modell - eine Phänotypisierung “**

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von Niklas Nolte
aus Brilon
Berlin 2021

Dokumentationsblatt

Bibliographische Beschreibung

Nolte, Niklas

„Der neuroprotektive Effekt von Ly6G in einem Schlaganfall-Modell - eine Phänotypisierung "

(2021, 16 Abbildungen, 3 Tabellen)

Kurzreferat

Mikroglia-Zellen erhalten die immunologische Integrität des Gehirns und schützen vor neuronaler Schädigung. Während ischämischer Gewebeschäden, wie sie beim Schlaganfall vorkommen, infiltrieren periphere Immunzellen in das ischämische Areal und fördern die Degeneration von Neuronen. Diese neuropathogene Funktion von Neutrophilen Granulozyten, auch Polymorphonukleare Neutrophile (PMN) genannt, bei neuro-immunologischen Prozessen wird in vielen Studien kontrovers diskutiert. Diese Studie identifiziert Ly6G, einen murinen neutrophilen Oberflächenmarker als einen wesentlichen Regulator bei der Interaktion zwischen Neutrophilen Granulozyten und Mikroglia-Zellen. Am transgenen Mausmodell Catchup^{IVM-red} konnten wir in einem Schlaganfall-Modell qualitativ und quantitativ die PMN-Infiltration, eine mikrogliale Phagozytose und das Ausmaß des daraus resultierenden parenchymalen Schadens in vitro und in vivo untersucht werden.

Die Beobachtungen zeigen, dass die neuroprotektive Funktion von Ly6G einen wesentlichen Einfluss auf das Outcome einer zerebralen Ischämie in einem Mausmodell hat. Eine Humanrelevanz ist bislang ungeklärt

Schlüsselwörter

Mikroglia, Neutrophile Granulozyten, Polymorphonukleare Neutrophile, PMN, Ly6G, ischämischer Schlaganfall, pMCAO

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	1
Zerebrale Ischämie und Penumbra.....	1
Neutrophile Granulozyten und die post-ischämische Neuroinflammation.....	3
Mikroglia-Zellen und Neutrophile Granulozyten	5
Ly6G – ein Protein unbekannter Funktion?	8
Zielvorstellungen.....	10
Material und Methoden	11
Versuchstiere.....	11
C57BL/6 Mäuse	11
Catchup ^{IVM-red} Mäuse.....	11
Transgene Mäuse.....	13
Catchup ^{IVM-red} Mäuse x CX3CR1-eGFP Mäuse	14
Catchup ^{IVM-red} Mäuse x C57BL/6 Mäuse	14
Mischkulturen	16
Isolierung von Mikroglia-Zellen	16
Isolierung von Neutrophilen Granulozyten	17
Mischkultur von PMN und Mikroglia-Zellen.....	18
Permanenter Verschluss der mittleren zerebralen Arterie (pMCAO).....	19
Photothrombose.....	19
Durchflusszytometrie.....	20
Histologische Untersuchung und Bestimmung des Infarktolumens	20
PMN-Verteilung.....	21
Immunhistologische Untersuchung	21
Konfokale Mikroskopie	22

Zwei-Photonen-Mikroskopie.....	23
Statistische Auswertung.....	23
Ergebnisse	24
Ly6G-Defizienz führt zu einer quantitativ vermehrten PMN-Infiltration in ischämisch verletztes Hirnparenchym in vivo.....	24
Ly6G-Defizienz führt zu einem größeren Parenchymschaden nach permanenter zerebraler Ischämie	25
Beeinträchtigte mikrogliale Phagozytose von Ly6G-defizienten PMN in vitro	27
Postischämische Beobachtung spezifischer Wechselwirkungen von PMN und Mikroglia-Zellen durch Phagozytose von PMN in vivo	29
Ly6G-Defizienz führt zu einer qualitativ vermehrten PMN-Infiltration in ischämisch verletztem Hirnparenchym ex vivo	31
Keine Änderung im Aktivitätsmuster des mikroglialen Transkriptoms nach Exposition mit Ly6G-defizienten Neutrophilen Granulozyten	33
Ly6G-positive Neurone in Catchup ^{IVM-red} -Mäusen	35
Medulläre Infiltration von Ly6G-defizienten PMN führt zu größeren Hirnparenchym- Schädigungen 24 Stunden nach pMCAO	36
Diskussion	38
Zusammenfassung	49
Ehrenerklärung	xi
Erklärung zur strafrechtlichen Verurteilung	xii
Literaturverzeichnis	xiii
Veröffentlichung	xxii
Danksagung	xxiii
Darstellung des Bildungsweges	xxiv

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 - Vereinfachte Übersicht der pathophysiologischen Mechanismen im fokal ischämischen Gehirn.....	2
Abbildung 2 - Schlaganfall-induzierte Rekrutierung und Wirkung von polymorphkernigen Neutrophilen-Granulozyten (PMN)	4
Abbildung 3 - Interaktion zwischen peripher infiltrierten PMN mit hirneigenen Mikroglia-Zellen.....	6
Abbildung 4 - Co-Lokalisation von Ly6G und $\beta 2$ -Integrinen auf der Oberfläche von Neutrophilen Granulozyten.....	9
Abbildung 5 - Targeting-Strategie für die Erzeugung des Catchup ^{IVM-red} -Mausmodell	12
Abbildung 6 - FACS-Analyse der Infiltration von Neutrophilen Granulozyten in das ischämisch geschädigte Gehirn.....	24
Abbildung 7 - Infarkt volumina bei Ly6G-defizienten Mäusen nach pMCAO in Abhängigkeit von der Zeit.....	26
Abbildung 8 - Mikrogliale Phagozytose von Ly6G-defizienten Neutrophilen Granulozyten in vitro	28
Abbildung 9 - Wechselwirkung zwischen Mikroglia-Zellen (CX3CR1-eGFP ⁺) und Neutrophilen Granulozyten (Catchup ^{IVM-red}) 24 Stunden nach induzierter Photothrombose.....	30
Abbildung 10 - Intravitale 2-Photonen-Mikroskopie von C57BL/6-Catchup ^{IVM-red} -Knochenmark-Chimären nach induzierter Photothrombose	31
Abbildung 11 - Räumliche Verteilung von infiltrierten Neutrophilen Granulozyten innerhalb des ischämisch geschädigten Gehirns.....	32
Abbildung 12 - Transkriptom-Analyse.....	34
Abbildung 13 - Catchup ^{IVM-red} -positive Neurone in verschiedenen Hirnregionen	35
Abbildung 14 - Infarkt volumina 24 Stunden nach pMCAO von Knochenmark-Chimären	37
Abbildung 15 – „Find-me“-/ „Eat-me“-Signale bei der Apoptose von Zellen.....	41
Abbildung 16 - Überlebensquoten von Ly6G ^{-/-} - und Ly6G ^{+/-} -Mäusen nach pMCAO über die Zeit.....	44

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 - Zusammensetzung der transgenen Tiere.....	13
Tabelle 2 - Eingesetzte primäre Antikörper	18
Tabelle 3 - Eingesetzte sekundäre Antikörper.....	18

Abkürzungsverzeichnis

1A8	Antikörper spezifisch für Ly6G
ANOVA	analysis of variance = Varianzanalyse
BBB	Blut-Hirn-Schranke (BHS)
CCAO	temporärer Verschluss der gemeinsamen Aa. carotis
CCL-2	CC-Chemokin-Ligand-2
CD	Cluster of differentiation
CMTMR	[5-(und-6)-((((4-Chlormethyl)benzoyl)amino)tetramethylrhodamin]
CPS	Kryoprotektionslösung
CSF1R	Kolonie-stimulierender Faktor-1-Rezeptor
CFSE	Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester
CTO	Cell Track Orange [5-(und-6)-((((4-Chlormethyl)benzoyl)-amino)tetramethylrhodamin]
CX3CL1	Fractalkin
CX3CR1	Fractalkin Rezeptor
CXCL-8	Chemokin (C-X-C-Motiv) Ligand-8
DAMP	damage-associated molecular pattern = Schaden-assoziiertes molekulares Muster
DAPI	4', 6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium, standardisiertes Nährmedium für Zellkulturen humaner und tierischer Zellen
DZNE	Deutsches Zentrums für Neurodegenerative Erkrankungen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFP	endogen Grün Fluoreszierendes Protein
ESL-1	E-Selektin-Ligand-1
et al.	<i>et alli</i>
FACS	Fluorescent Assisted Cell Sorting = Durchflusszytometrie
FBS	fetales Rinderserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
G-CSF	Granulocyte-colony-stimulating factor
GFAP	Saures Gliafaserprotein
GPI	Glykosylphosphatidylinositol
Gr-1	Antikörper mit Epitopen von Ly6G + Ly6C

HBSS	Hanks' balanced salt solution
HMGB-1	High-Mobility-Group-Protein B1
i.v.	intravenös
Iba1	Ionized calcium binding adaptor molecule 1
ICAM-1	Interzelluläres Adhäsionsmolekül-1
IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-6	Interleukin-6
IVM	Intravital-Mikroskopie
kDa	kilo Dalton
GlcNAc	Lektininhibitor N-Acetylglucosamin
LFA-1	Leukozyten-Funktions-assoziiertes Antigen 1 = CD11a
Ly6G ^{-/-}	Ly6G homozygot
Ly6G ^{-/+}	Ly6G heterozygot
Mac1	Makrophagen-1-Antigen/Komplementrezeptor 3 = CD11b
MACS	Magnetic assisted cell sorting
MAP2	Microtubule-associated protein 2
MCA	Arteria cerebri media
MMP-8/9	Matrix-Metallopeptidase-8/9
MPO	Myeloperoxidase
NET	Neutrophil extracellular Traps
NeuN	Neuronen-spezifisches nukleares Protein
P0-1	postnatal Tag 0 - 1
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PECAM-1	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1 = CD 31
PFA	Paraformaldehyd
pMCAO	permanenter Verschluss der mittleren Hirnarterie
PMN	polymorphonukleäre neutrophilen Granulozyten
PSGL-1	P-Selektin-Glykoprotein-Ligand-1
RGDS	Integrin-blockierendes Tetrapeptid
RNS	= ROS, reaktive Stickstoffspezies
STL	<i>Solanum tuberosum</i> Lecitin
tMCAO	transienter Verschluss der Arteria cerebri media
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
uPAR	Urokinase-Plasminogenaktivatoren-Rezeptor = CD87

VCAM-1	Gefäßzelladhäsionsprotein-1
VLA-4	Very-late-antigen-4
WT	Wildtyp
ZNS	Zentrales Nervensystem

Einleitung

Zerebrale Ischämie und Penumbra

Der Schlaganfall ist ein heterogenes Krankheitsbild, welches in zwei Subkategorien eingeteilt werden kann: der ischämische und der hämorrhagische Schlaganfall. Die Prävalenz des ischämischen Schlaganfalles ist rund 3% bei Menschen über 40 Jahren, 87% aller Schlaganfälle sind ischämisch¹⁻³. Weltweit ist der Schlaganfall nach den kardio-vaskulären Erkrankungen eine der Hauptursachen für eine erhöhte Mortalität in der industriellen Welt^{1,3-6}. Schlaganfälle gehen nicht selten mit gravierenden funktionellen Beeinträchtigungen einher. Am häufigsten sind motorische und kommunikative Einschränkungen die Folge. Die Symptome sind eine Hemiparese und Aphasie. Die hieraus resultierende Langzeitschädigung – auch sozioökonomisch – ist gravierend.

Ursächlich ist eine Unterbrechung des zerebralen Blutflusses, am häufigsten bedingt durch einen (thrombo-)embolischen Verschluss einer Hirnarterie, die mit einer unzureichenden Versorgung des Hirngewebes mit Sauerstoff und Glukose einhergeht^{4,7-9}. Das Hirngewebe ist zur Aufrechterhaltung der Energieproduktion auf diese Nährstoffe angewiesen. Abbildung 1 zeigt die unmittelbaren zellulären Folgen des einsetzenden Energiemangels. Es kommt zu Verschiebungen der Elektrolyt-Gradienten mit der Folge der Depolarisation von Neuronen. Hierüber kommt es zu einer Aktivierung von Glutamat-Rezeptoren, welche intrazelluläres Kalzium, Natrium und Chlorid drastisch ansteigen lassen. Zudem kommt es zur Diffusion von Glutamat und Kalium in den Extrazellularraum, was weitere Depolarisationswellen zur Folge hat. Begleitend von dem Natrium-Einstrom gelangt Wasser in die Zelle und führt zu einem Zellödem. Das intrazelluläre Kalzium überaktiviert multiple Enzyme wie Proteasen, Lipasen und Endonukleasen, welche wiederum freie Radikale freisetzen, was zur Degeneration des Zytoskeletts und der extrazellulären Matrix führt. Durch Schädigung der Mitochondrien-Membran kommt es zur Freisetzung von Cytochrom C mit Auslösung der Apoptose-Kaskade³.

Abbildung 1 - Vereinfachte Übersicht der pathophysiologischen Mechanismen im fokal ischämischen Gehirn

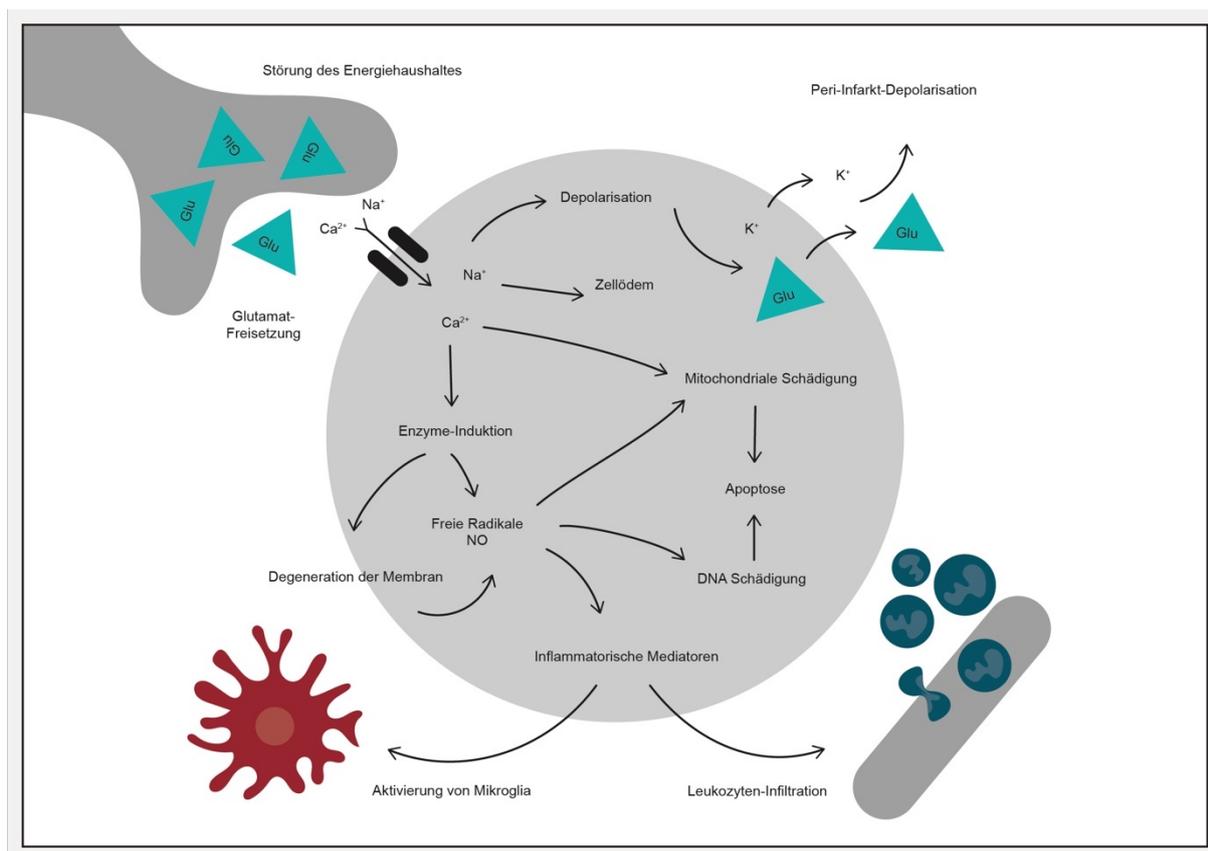


Illustration in Anlehnung an Dirnagel et al., 1999

Den zeitlich und räumlich begrenzten Zelltod im ischämisch geschädigten Gehirn beschrieb Astrup et al. 1981 mit dem Penumbra-Konzept¹⁰ (lateinisch paene umbra = schattenähnlich): Im Zentrum der Ischämie ist der zerebrale Blutfluss am geringsten. Dies hat multiple biochemische Prozesse zur Folge, welche in der Summe ohne eine Reperfusion in kürzester Zeit zu einem Stoffwechselfersagen und somit zum Zelltod führen. Peripher des Zentrums zeigt sich ein Bereich, welcher noch durch kollaterale Gefäße perfundiert wird, die sogenannte „ischämische Penumbra“⁴. Hier zeigt sich vitales Hirnparenchym mit eingeschränkter, aber erhaltener neuronaler Aktivität¹⁰. Das Penumbra-Konzept ist dynamisch. Getreu dem Motto „time is brain“ ist die neurologische Schädigung abhängig von der Rest-Perfusion, sowie der Dauer der Ischämie. Das Zentrum nimmt zu Lasten der ischämischen Penumbra über Minuten und Stunden zu. Aus diesem Grunde muss es sich zur obersten Priorität gemacht werden, eine schnelle Reperfusion zur Erzielung eines suffizienten zerebralen Blutflusses zur Rettung des Hirngewebes in der Penumbra zu schaffen⁴.

Neutrophile Granulozyten und die post-ischämische Neuroinflammation

Die freien Radikale, welche enzymatisch bei beginnendem Zelluntergang freigesetzt werden, fördern zusätzlich auch die Bildung von pro-inflammatorischen Molekülen wie $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ und IL-6 (Abbildung 1)¹¹. Abbildung 2 zeigt übersichtlich die pathophysiologischen Vorgänge der Schlaganfall-induzierten Neutrophilen-Rekrutierung. Apoptotische Neurone setzen passiv durch den Zelluntergang DAMPs (damage-associated molecular pattern) in den Extrazellularraum frei. Durch gliale Toll-like-Rezeptoren kommt es hier zur lokalen Aktivierung von hirneigenen, immun-kompetenten Mikroglia- und Astrogliazellen (a). Durch Freisetzung von pro-inflammatorischen Molekülen wird eine Kaskade der endothelialen Aktivierung von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1, VCAM, P- und E-Selectin und Integrine auf Endothelzellen und Neutrophilen Granulozyten angestoßen¹¹. Diese werden dann hämatogenen zirkulierenden PMN an der luminalen Gefäßwand präsentiert (b).

Die Neutrophilen Granulozyten werden von Selektinen erkannt und nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip an die Endothelwand gebunden. Durch Interaktion mit weiteren Adhäsionsmolekülen wird eine feste Bindung erreicht. Neumann et al. fanden unter anderem heraus, dass das Molekül VLA-4 für die Bindung von PMN an das Endothel postkapillärer Venolen und die Diapedese durch die Blut-Hirn-Schranke maßgeblich beteiligt ist¹². Im Rahmen der Chemotaxis „rollen“ die Neutrophilen Granulozyten entlang eines Chemokin-Gradienten in Richtung Endothelwand (c). Hier wandern sie durch die Blut-Hirn-Schranke und gelangen so in das Hirnparenchym und den perivaskulären Raum zum Ort der Inflammation⁸. Etwa 4-6 Stunden nach Ischämie beginnt die Infiltration und Akkumulation von Neutrophilen Granulozyten^{3,11}. Neben diesen tragen aber auch Monozyten, Makrophagen und Lymphozyten zum post-ischämischen Geschehen bei^{4,13,14}. Insbesondere in der Penumbra werden zudem die Hirn-eigenen immun-kompetenten Mikroglia- und Astrogliazellen aktiviert^{15,16}.

Neutrophile Granulozyten spielen also eine Schlüsselrolle beim ischämischen Schlaganfall. Am Infektionsgeschehen angekommen, sezernieren sie Chemokine, Proteasen und zytotoxische ROS (reaktive Sauerstoff-Spezies)¹⁷. Dies führt zu weiteren Inflammationsherden und zur Aktivierung benachbarter Immunzellen (d). Proteasen, wie das MMP-9, führen zur weiteren Schädigung der Blut-Hirn-Schranke und ermöglichen so immer mehr die Infiltration von weiteren hämatogenen Immunzellen (e)^{18,19}. Neuere Forschungserkenntnisse zeigen, dass Neutrophile

Granulozyten netzartige Strukturen abgeben können, um extrazelluläre Pathogene „einzufangen“²⁰⁻²². Diese „Neutrophil extracellular Traps“ (NET) bestehen aus Chromatin der Neutrophilen Granulozyten vermischt mit Proteasen wie Cathepsin G und Elastase. Durch ROS-abhängige Freisetzung wird so ein mit Proteasen-besetztes Chromatinnetz zur Bekämpfung von Pathogenen abgegeben²³. Die Aktivierung und Freisetzung von NET wird auch als NETose bezeichnet²³⁻²⁵.

Im Bereich der Endothelwand kommt es mithilfe der NETose ebenso zu Blut-Hirn-Schranken-Störungen (f).

Abbildung 2 - Schlaganfall-induzierte Rekrutierung und Wirkung von polymorphkernigen Neutrophilen-Granulozyten (PMN)

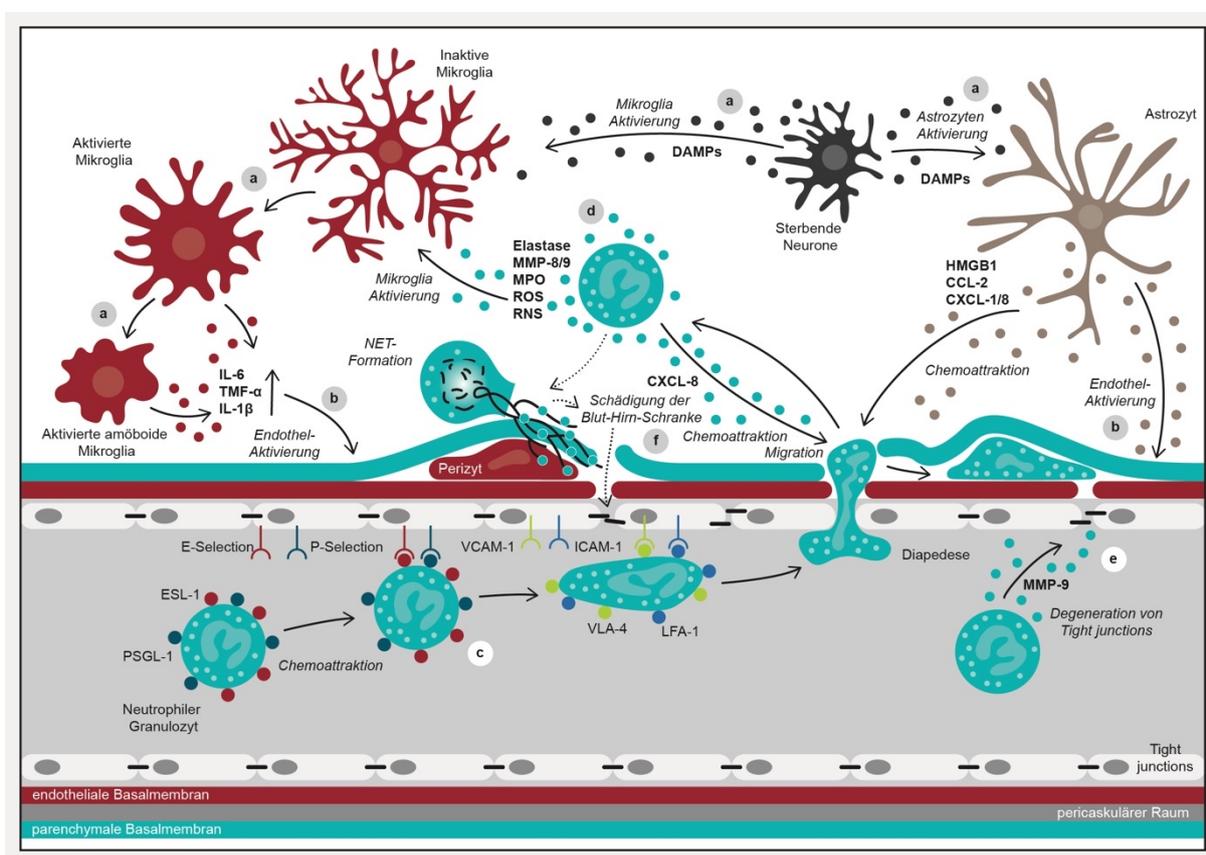


Illustration in Anlehnung an Strecker et al., 2017

Bei diesen Prozessen kommt es regelhaft zu Kollateralschäden, da die Neutrophilen Granulozyten nicht zwischen eigen und fremd unterscheiden können. Dies macht sie zu unberechenbaren Killerzellen mit neurotoxischer Komponente.

Die Rekrutierung von Neutrophilen Granulozyten führt sekundär zu einer Störung der Mikrozirkulation des bereits vulnerablen Hirngewebes in der ischämischen Penumbra

und verhindert so eine vollständige Reperfusion. Huang et al. 2006 beschreiben diesen Vorgang als „ischemic no-reflow-Phänomen“²⁶.

Das zentrale Nervensystem und das Immunsystem sind die beiden anpassungsfähigsten Systeme des Körpers. Zur Erhaltung der systemischen Gesundheit interagieren sie miteinander: Mediatoren des zentralen Nervensystems haben einen Einfluss auf die Funktion von Immunzellen, während Mediatoren des Immunsystems das Wachstum, die Differenzierung und das Überleben von Nervenzellen beeinflussen^{8,27}.

Neuroinflammation ist eine Antwort des Immunsystems auf eine akute Hirnverletzung, wie sie auch bei neuro-inflammatorischen Erkrankungen wie Meningitis, Multipler Sklerose oder auch neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer Demenz oder Morbus Parkinson zu beobachtet ist²⁸. Der Entzündungsprozess ist grundsätzlich geprägt durch eine Insuffizienz der Blut-Hirn-Schranke und der Invasion von Immunzellen in das ZNS^{16,29}.

Die zerebrale Ischämie ist also nicht nur eine neurologische Erkrankung des Hirngewebes, sondern eine systemische Erkrankung mit unzweifelhafter enger Verbindung zum Immunsystem^{4,7,8,24,29}.

Mikroglia-Zellen und Neutrophile Granulozyten

Die Studien von Neumann et al. geben Hinweise auf eine Interaktion von Mikroglia und Neutrophilen Granulozyten bei der zerebralen Ischämie^{12,30,31}. Abbildung 3 zeigt die pathophysiologischen Mechanismen der Neutrophilen-Mikroglia-Interaktion²⁴. Mikroglia-Zellen in unmittelbarer Umgebung der neuronalen Schädigung werden durch die extrazellulär freigesetzten DAMPs aktiviert (a). Aktivierung bedeutet, sie ändern ihre Morphologie von einem verzweigten Ruhe-Zustand in eine proliferierende Amöboide-Form, mit der sie in der Lage sind sich fortzubewegen (b)^{12,32,33}. Im Aktiv-Zustand ist es den Mikroglia-Zellen möglich, ihre Immunfunktion vollständig zu nutzen und Pathogene oder apoptotische Zellen zu phagozytieren.

Derweil sind bereits PMN durch pro-inflammatorische Signale in das ischämisch geschädigte Hirnparenchym infiltriert und sezernieren Zytokine und Chemokine. Diese aktivieren das Hirngefäßendothel, aber auch erneut Mikroglia-Zellen (d + e).

Die aktivierten Mikroglia-Zellen üben einen neuroprotektiven Effekt aus und phagozytieren die eindringenden Neutrophilen Granulozyten³¹. Hierbei formen sie zytoplasmatische, netzartige Ausläufer um so die PMN festzuhalten (f)¹².

Durch die DAMPs werden zusätzlich hirneigene Makrophagen aktiviert, welche wiederum pro-inflammatorische Proteine und Chemokine freisetzen (c). Abgesonderte Wachstumsfaktoren wie G-CSF und GM-CSF haben einen antiapoptotischen Effekt auf die Neutrophilen Granulozyten (g). Die sich in Apoptose befindenden PMN werden ebenfalls durch die aktivierten Mikroglia-Zellen phagozytiert (h). Zudem wurde beobachtet, dass Mikroglia durch die zytoplasmatischen Ausläufer endotheliale Leckagen abschirmen, umso periphere Immunzellen an deren Transmigration durch die Blut-Hirn-Schranke zu hindern(i)¹².

Abbildung 3 - Interaktion zwischen peripher infiltrierten PMN mit hirneigenen Mikroglia-Zellen

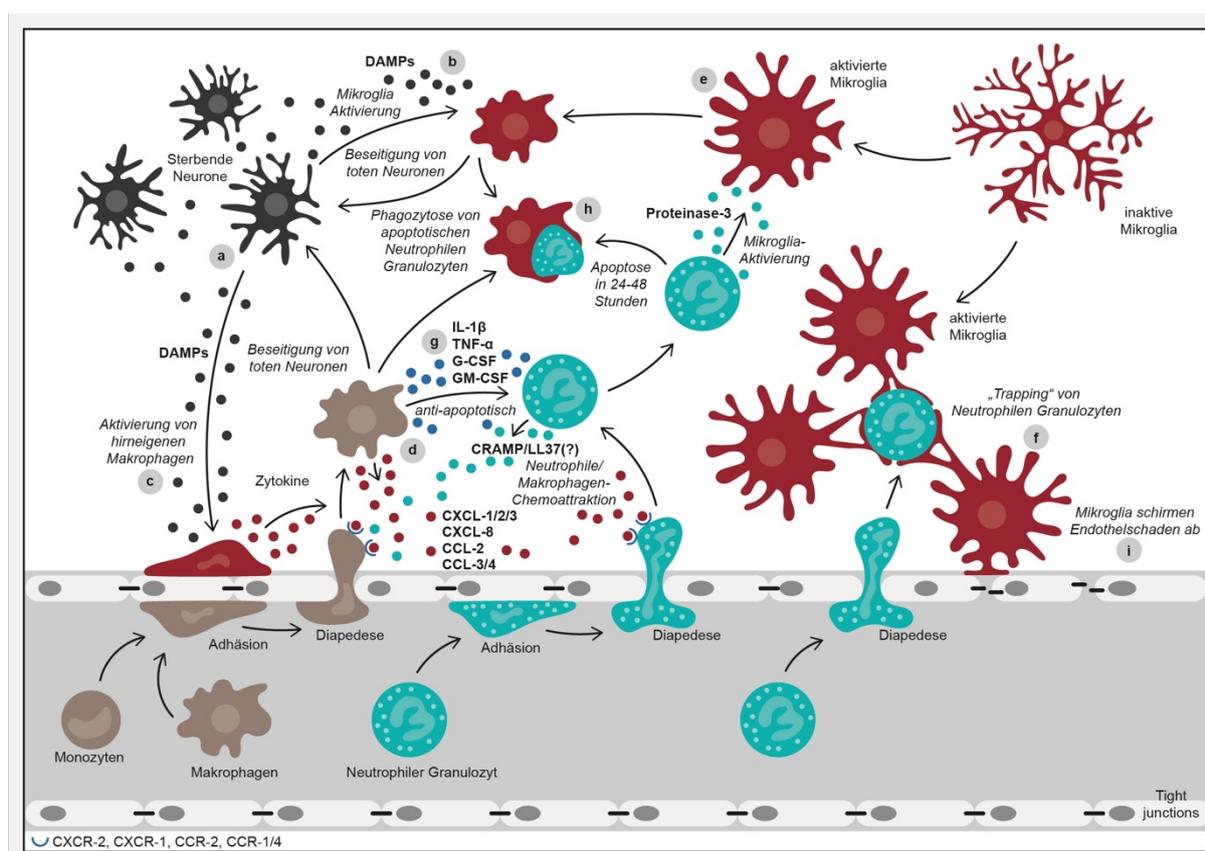


Illustration in Anlehnung an Strecker et al., 2017

Mikroglia und PMN sind die wichtigsten Zelltypen, die an der zellulären Entzündungsreaktion nach einer zerebralen Ischämie beteiligt sind. Nachfolgend an den anhaltenden Entzündungsprozess erfolgt die Rekrutierung von Monozyten und T-Zellen^{24,34}.

Mikroglia-Zellen erhalten die immunologische Integrität des gesunden Gehirns und üben einen neuroprotektiven Effekt aus^{16,35,36}. Im Gegensatz dazu erzielen Neutrophile Granulozyten durch neurotoxische Effekte eine Exazerbation der Entzündungen^{24,37}.

Eine Interaktion von Mikroglia und Neutrophilen Granulozyten sowie die Phagozytose dieser durch Mikroglia konnte durch Neumann et al. in vitro und in vivo beobachtet werden³⁰.

Trotz intensiver Forschung mit eindeutigem Nachweis intraparenchymal gelegener Neutrophiler Granulozyten nach stattgehabter Ischämie wird die Bedeutung von Mikroglia und PMN für die Pathogenese des Schlaganfalles weiterhin kontrovers diskutiert^{7,12,38}. Enzmann et al. machten die Beobachtungen, dass keine Neutrophilen Granulozyten nach einem induzierten Schlaganfall in das Hirnparenchym zum neuroinflammatorischen Geschehen migrieren und im perivaskulären Raum verbleiben³⁹. Somit zeigten sie keinen Einfluss auf die Pathogenese des Schlaganfalles. Durch den Gebrauch von intrakranieller Zwei-Photonen-Mikroskopie konnten Neumann et al. 2018 durch Etablierung eines neuartigen Mausmodells eine massive Infiltration von tdTomato⁺ Neutrophilen Granulozyten inmitten von eGFP⁺ Mikroglia/Makrophagen in der ischämischen Penumbra jenseits des perivaskulären Raums eindeutig nachweisen^{31,40,41}. Erstmals erfolgte so auch der Nachweis der Mikroglia-Neutrophilen-Interaktion in vivo.

Auf molekularer Ebene ist die Interaktion bislang noch ungeklärt. Zukünftige Studien müssen durchgeführt werden, um die molekularen Mechanismen weiter zu untersuchen, die der Interaktion zwischen Mikroglia und Neutrophilen Granulozyten beim ischämischen Schlaganfall und insbesondere bei der Phagozytose zugrunde liegen. Darüber hinaus ist es von therapeutischem Interesse zu untersuchen, ob es möglich ist, in den Entzündungsprozess einzugreifen, um neuronale Schäden beim Schlaganfall zu minimieren oder gar zu verhindern.

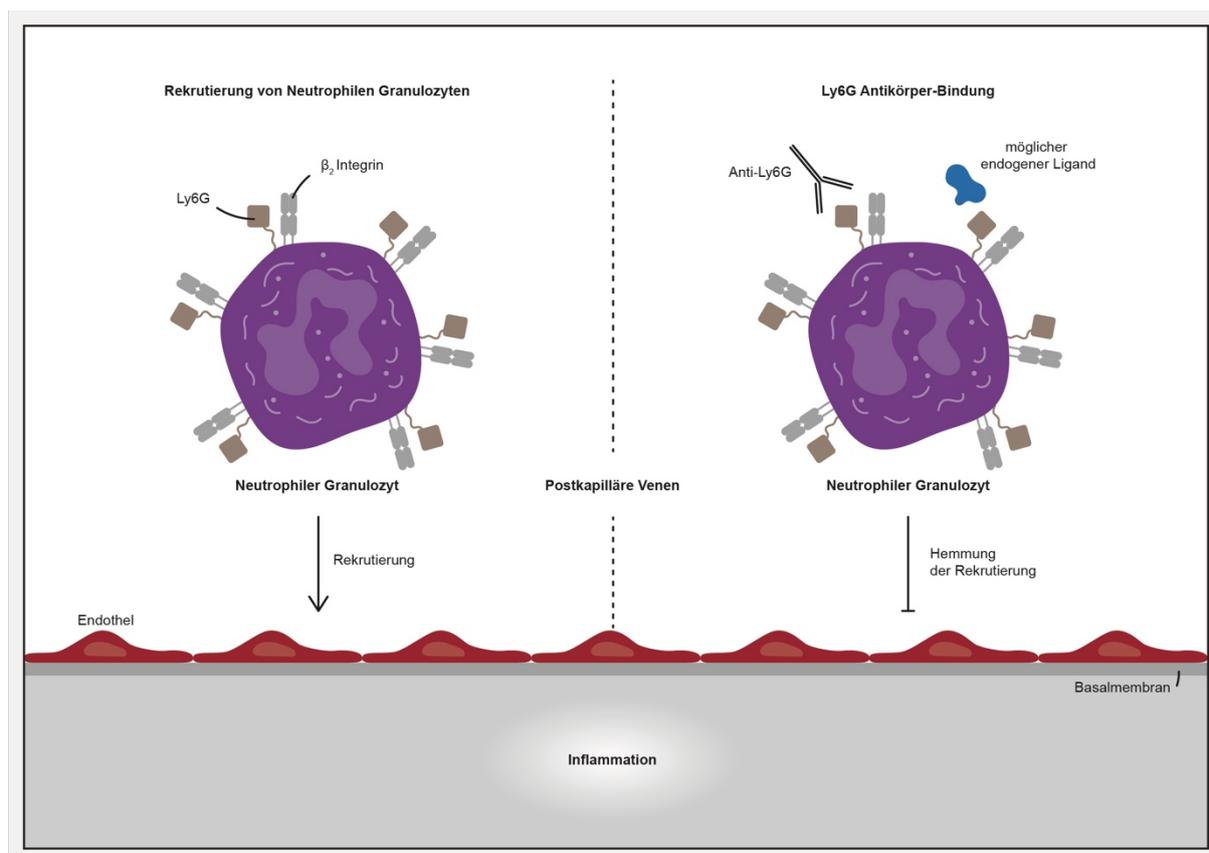
Ly6G – ein Protein unbekannter Funktion?

Ly6G ist ein sogenanntes Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Ankerprotein mit einer Größe von 25 kDa. Es ist ein spezifisches Oberflächenmolekül auf murinen Neutrophilen Granulozyten⁴²⁻⁴⁵ und gehört zur Familie der Ly6/Urokinase-Plasminogen-Aktivatoren, die an der Signaltransduktion beteiligt sind⁴⁶.

Bislang sind nur wenige Funktionen von Ly6G bekannt. Nach der Erstbeschreibung im Jahre 1993 wurde Ly6G vor allem in inflammatorischem Gewebe nachgewiesen⁴⁴.

Aktuelle Studien gehen davon aus, dass Ly6G ein wesentlicher Modulator der neutrophilen Migration bei inflammatorischen Prozessen sein könnte⁴⁷. Wang et al. untersuchten hier einen β 2-Integrin-abhängigen Mechanismus in einem Arthritis-Mausmodell. Hier zeigte sich durch eine spezifische Antikörperbindung von Anti-Gr1 an das Adhäsionsmolekül eine Hemmung der Neutrophilen Granulozyten-Rekrutierung in das entzündete Gewebe ohne Reduktion der peripher zirkulierenden Neutrophilen Granulozyten (Abbildung 4)⁴⁷. In vivo konnte beobachtet werden, dass Anti-Gr1 die Bindung der Neutrophilen Granulozyten an das Gefäßendothel unterbindet, indem die Expression der β 2-Integrine reduziert wird. Durch Konfokalmikroskopie zeigten sie eine Co-Lokalisation von Ly6G und den zwei β 2-Integrinen LFA-1 und Mac1 auf der Oberfläche von Neutrophilen Granulozyten, was den Rückschluss zulässt, dass Ly6G an der Rekrutierung von Neutrophilen Granulozyten bei inflammatorischen Prozessen beteiligt ist und β 2-Integrine hierbei eine wichtige Rolle spielen⁴³. Ein endogener Ligand von Ly6G ist bislang nicht entdeckt worden. Abbitt et al. entdeckte in vivo eine periphere Neutropenie auf Grund der Antikörperbindung von Gr-1 und 1A8 an Ly6G⁴⁸.

Unterschiedliche Forschungen zu β 2-Integrinen zeigten eine immun-regulierende Funktion bei der Rekrutierung und Migration von Immunzellen, Zell-Zell-Kontakten und Signaling⁴⁹.

Abbildung 4 - Co-Lokalisation von Ly6G und β_2 -Integrinen auf der Oberfläche von Neutrophilen Granulozyten

Wang et al. zeigten, dass eine Antikörperbindung an Ly6G die β_2 -Integrin-Expression hemmt und so die Rekrutierung von Neutrophilen Granulozyten reduziert ist. Illustration in Anlehnung an Kenneth X. Probst aus Hickey, 2012

Im Anschluss an die Arbeiten von Wang und Hickey wurde eine kontroverse Publikation von Yipp und Kubes et al. veröffentlicht, in der dessen Hypothesen widerlegt wurden. In ihrer Arbeit zeigten sie, dass Fluorchrom-konjugierte Antikörper gegen Ly6G die Leukozytenrekrutierung nicht beeinträchtigen⁵⁰. Ebenso wurde in transgenen LysM-eGFP-Mäusen eine Ly6G-Hemmung durch den Gr-1-Antikörper untersucht⁵¹. In einer Realzeit-Konfokalmikroskopie zeigte sich die komplette Neutrophilen-Rekrutierungskaskade in vivo trotz Antikörper-Hemmung mit Gr-1 intakt. Somit widersprechen die Forscher den vorangegangenen Erkenntnissen, dass Ly6G an der Rekrutierung Neutrophilen Granulozyten beteiligt ist.

Die kontroverse Diskussion macht deutlich, dass es weiterer Forschung bedarf, um die Funktion von Ly6G in Bezug auf Inflammation zu charakterisieren. Bisher ist es unklar, welche Rolle Ly6G physiologisch auf murinen Neutrophilen Granulozyten übernimmt⁵². Als ein humanes Analogon ist CD177 Gegenstand aktueller

Forschungen. Es kommt, wie das murine Ly6G, spezifisch auf humanen Neutrophilen Granulozyten vor und reguliert β 2-Integrin-abhängig die Migration von Neutrophilen Granulozyten⁵³⁻⁵⁵.

Zielvorstellungen

Die zerebrale Ischämie ist eine Hauptursache für lebenslange Morbidität und eine der Haupttodesursachen in den Industrieländern. Inflammatorische Prozesse spielen hierbei eine essenzielle Rolle in der Pathogenese. Diese sind sowohl durch einen akuten als auch einen anhaltenden Entzündungsprozess gekennzeichnet, der durch eine rasche Aktivierung der hirneigenen Mikroglia-Zellen die Produktion von proinflammatorischen Mediatoren und die frühe Infiltration von PMN in das betroffene Hirnparenchym mit nachfolgender Rekrutierung von Monozyten und T-Zellen gekennzeichnet ist^{24,34}.

Trotz intensiver Untersuchungen wird die Bedeutung von Mikroglia und PMN für die Schlaganfall-Pathogenese aufgrund kontroverser Befunde diskutiert^{12,30,31,39,56,57}.

In dieser Arbeit wird anhand verschiedener Genotypen die Phänotypisierung von Ly6G im Rahmen der zerebralen Ischämie untersucht. Hierzu wird ein neuartiges transgenes Mausmodell C57BL/6^{Ly6g(tm2621(Cre-tdTomato)Arte}, auch Catchup^{IVM-red} genannt, genutzt. Hierdurch wird durch einen Knock-in in den Ly6G-Locus, der das fluoreszierende Protein tdTomato exprimiert, eine intravitale Mikroskopie mit Ly6G-Knock-out-Mäusen ermöglicht⁴¹. Unter Durchführung eines permanenten Verschlusses der Arteria cerebri media (pMCAO) kann ein fokaler ischämischer Schlaganfall modelliert werden und so qualitativ und quantitativ die PMN-Infiltration eine mikrogliale Phagozytose und das Ausmaß des daraus resultierenden parenchymalen Schadens in vitro und in vivo untersucht werden.

Material und Methoden

Versuchstiere

C57BL/6 Mäuse

Insgesamt 63 adulte C57BL/6-Mäuse (WT) in einer Altersverteilung von 14 Wochen im Median wurden als Kontrollgruppe für die Experimente verwendet.

Catchup^{IVM-red} Mäuse

Die Catchup^{IVM-red}-Maus ist ein Tiermodell zur selektiven Untersuchung des Neutrophilen-spezifischen Ly6G-Oberflächenmoleküls, sowie dessen Funktion durch Visualisierung von Neutrophilen Granulozyten in vivo und in vitro⁴¹. Ly6G ist ein spezifischer Oberflächenrezeptor für myeloische murine Neutrophile Granulozyten⁴⁵⁻⁴⁷. Das Catchup^{IVM-red}-Mausmodell C57BL/6Ly6g^{tm2621(Cre-tdTomato)Arte} wurde erzeugt, indem die Catchup-Maus mit einer Reporter-tdTomato-Mauslinie gekreuzt wurde, die einen hohen Gehalt an rot fluoreszierendem tdTomato-Protein unter einem CAG-Promotor in dem ROSA26-Locus exprimiert⁴¹. Dazu wird die erste Exoncodierung für Ly6G durch ein Knock-In-Allel ersetzt, welches für eine Cre-Rekombinase und das rot fluoreszierende Protein tdTomato kodiert. Beide sind durch ein Peptid namens T2A getrennt, welches vom Insektenvirus *Thosea asigna* stammt und eine 2A-Sequenz für die Proteinspaltung verwendet^{41,58}.

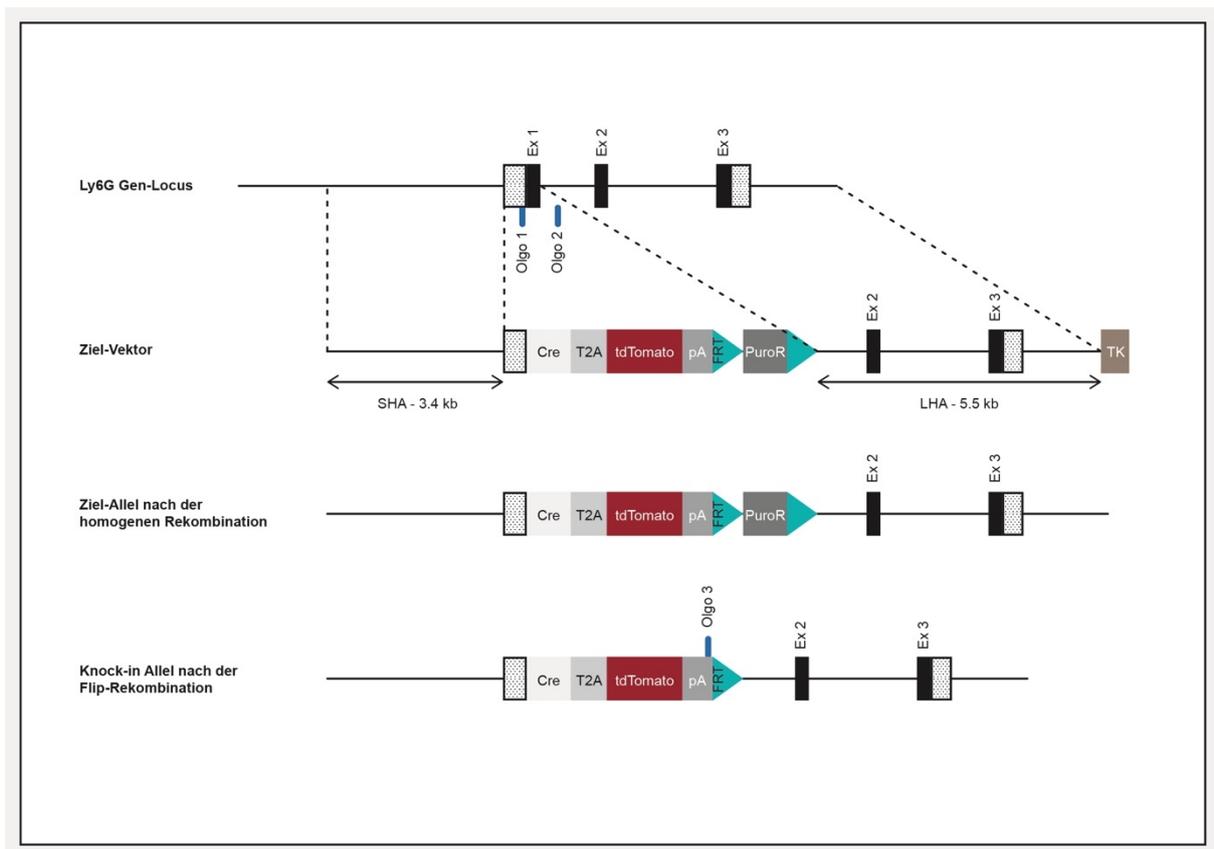
Abbildung 5 - Targeting-Strategie für die Erzeugung des Catchup^{IVM-red}-Mausmodell

Illustration in Anlehnung an Hasenberg et al., 2015

Phänotypisch zeigt sich durch den Knock-In im Exon 1 von Ly6G ein Funktionsverlust: Catchup^{IVM-red} heterozygote Mäuse (Ly6G^{+/-}) zeigen eine ~50%-ige Reduktion der Expression des Oberflächenproteins, während Catchup^{IVM-red} homozygote Mäuse (Ly6G^{-/-}) in der Ly6G-Proteinexpression einen vollständigen Mangel aufweisen⁴¹.

Dieses Modell ermöglicht die intravitale Mikroskopie von endogen rot gefärbten PMN und damit auch eine spezifische genetische Manipulation von Neutrophilen Granulozyten in vivo sowie den Knock-out von Ly6G.

Die transgene Aktivität wurde nur in sehr wenigen Eosinophilen und Basophilen Granulozyten entdeckt und war in Knochenmarkvorläufern, einschließlich granulomonozytärer Vorläufer, nicht nachweisbar⁴¹.

Transgene Mäuse

Um eine gute Visualisierung der Wechselwirkung zwischen Neutrophilen Granulozyten (PMN) und Mikroglia-Zellen für bildgebende Verfahren zu gewährleisten, haben wir Knochenmark-Chimären mit der etablierten Methode der toxischen Bestrahlung und Knochenmarkrekonstruktion hergestellt⁵⁹. Die Empfängermäuse werden durch eine intraperitoneale Injektion von 100 µl Ketamin / Rompun (3ml Ketamin (500mg/10ml Ratiopharm), 1,5ml Rompun (Bayer®), 5,5ml 0,9% NaCl (Braun)) pro 20g Körpergewicht betäubt. Die narkotisierten Mäuse werden in die Bestrahlungskammer (BioBeam 8000, Gamma-Service Medical GmbH, Leipzig) eingebracht. Durchgeführt wurde die Bestrahlung mit 13 Grey (Cäsium) für 4,54 Minuten. Im Anschluss wurden die bestrahlten Mäuse zurück in ihre Käfige gelegt.

Zur Isolierung des Knochenmarks werden die Hinterbeine von Spendermäusen aus dem umgebenden Muskelgewebe gereinigt, kurz in 70% Ethanol getaucht und dann in eiskaltes PBS überführt. Das Knochenmark wird mit RPMI (Gibco®) mit einer 21G-Kanülenspritze ausgewaschen und in einem neuen 50ml Falcon-Röhrchen gesammelt. Die Zellsuspension wird auf ein 40µm Zellsieb aufgetragen. 200µl der Knochenmarklösung werden pro Maus intravenös injiziert. Für die Injektion von homogenem Knochenmark werden 50 x 10⁶ Zellen und für heterogenes Knochenmark 63,3 x 10⁶ Zellen injiziert.

Donor	3 x C57BL/6	3 x C57BL/6	8 x Ly6G ^{+/-}	7 x Ly6G ^{-/-}	8 x Ly6G ^{-/-}
Host	10 x C57BL/6 1 x nicht auswertbar (fehlende Perfusion)	5 x Ly6G ^{-/-}	19 x C57BL/6 3x verstorben 2x nicht auswertbar (fehlende Perfusion)	10 x Ly6G ^{-/-} 1x verstorben	19 x C57BL/6 3x verstorben

Tabelle 1 - Zusammensetzung der transgenen Tiere

Alle Tiere wurden in Gruppen unter Standardbedingungen untergebracht (separat belüftete Käfige, Lichtzyklus 12:12 Stunden einschließlich 2 Stunden Dämmerungsphasen, Temperatur 22 - 24°C, Luftfeuchtigkeit 55% ± 10%). Nahrung und Wasser waren nach Belieben vorhanden. Die Versuche wurden gemäß den Richtlinien 86/609/EWG und 2010/63/EG des Rates der Europäischen

Gemeinschaften durchgeführt und von der zuständigen lokalen Behörde (Landesverwaltungsamt für Kultur, Bauwesen und Verbraucherschutz, Referat Verbraucherschutz, Veterinärangelegenheiten (DZNE 42502-2-1244)) formell genehmigt. Die Versuche wurden nach den ARRIVE-Richtlinien (Animal Research: Reporting In Vivo Experiments) gemeldet. Die Empfängerermäuse müssen vor Beginn der Analyse 6 Wochen ruhen.

Insgesamt wurden für alle Experimente 81 erwachsene transgene Mäuse erzeugt. Hierzu wurden weibliche Tiere bevorzugt.

Catchup^{IVM-red} Mäuse x CX3CR1-eGFP Mäuse

Um die Mikroglia-Neutrophilen-Interaktion erstmalig in vivo aufzuzeigen, verwendeten wir basierend auf dem obengenannten Prinzip der transgenen Tiere das neuartige genetische Mausmodell Catchup^{IVM-red} und übertrugen Spenderknochenmark von Catchup^{IVM-red}-Mäusen (Ly6G^{-/-}: n = 2, weiblich, mittleres Alter 53 Wochen) in zytotoxisch bestrahlte CX3CR1-eGFP-Mäuse (CX3CR1-eGFP^{+/-}: n = 7, zwei Mäuse starben nach der Bestrahlung, drei konnten histologisch nicht bewertet werden, Mischgeschlecht, mittleres Alter 21 Wochen). So erzeugten wir ein transgenes Mausmodell mit strahlenresistenten grün fluoreszierenden Mikroglia-Zellen und rot fluoreszierenden PMN.

Die im Anschluss durchgeführte Photothrombose ist das Verfahren der Wahl zur Generierung eines oberflächlich lokalisierten Infarktes. Intravital konnten wir so umfangreiche Zell-Zell-Kontakte zwischen eGFP+ Mikroglia-Zellen und tdTomato+ PMN beobachten (Abbildung 9).

Catchup^{IVM-red} Mäuse x C57BL/6 Mäuse

Basierend auf dem obengenannten Prinzip werden verschiedene Knochenmark-Chimären erzeugt, um die hirneigene Ly6G-Produktion zu untersuchen. Durch die Übertragung von Spenderknochenmark von Catchup^{IVM-red}-Mäusen in zytotoxisch bestrahlte Empfänger-C57BL/6-Mäuse konnten wir transgene Mäuse mit rot fluoreszierenden PMN erzeugen⁵⁹.

Um auszuschließen, dass andere Ly6G-positive Zellen durch die Knochenmark-Transplantation ins Gehirn einwandern, haben wir C57BL/6-Knochenmark-Chimären (n = 38, überwiegend weiblich, sechs Mäuse starben nach der Bestrahlung, drei konnten histologisch nicht bewertet werden, mittleres Alter 19 Wochen) mit Catchup^{IVM-red}-Spenderknochenmark (Ly6G^{+/-} : n = 8, Ly6G^{-/-} : n = 8, Mischgeschlecht, Alter 8 Wochen) entwickelt. Um den Einfluss der Radio-Resistenz von Ly6G-positiven Zellen im Knochenmark auszuschließen, haben wir heterozygote Catchup^{IVM-red}-Empfängermäuse (n = 5, weiblich, mittleres Alter 21 Wochen) mit C57BL/6-Spenderknochenmark (n = 3, weiblich, Alter 17 Wochen) entwickelt. Eine positive Kontrolle verwendeten wir homozygote Catchup^{IVM-red}-Mäuse (Spender Ly6G^{-/-} : n = 7, Mischgeschlecht, mittleres Alter 30 Wochen, Empfänger Ly6G^{-/-} : n = 9, Mischgeschlecht, mittleres Alter 32 Wochen, acht Mäuse starben nach der Bestrahlung). Als Negativkontrolle verwendeten wir C57BL/6-C57Bl/6-Knochenmark-Chimären (Spender n = 3, Mischgeschlecht, Alter 24 Wochen, Empfänger n = 9 Wochen, weiblich, Alter 16 Wochen, eine Maus konnte histologisch nicht bewertet werden).

Mischkulturen

Isolierung von Mikroglia-Zellen

Mikroglia-Zellen werden aus neugeborenen Wildtyp C57BL/6-Mäusen P 0-1 isoliert, welche durch die atlanto-okzipitale Dislokation getötet wurden. Das Gehirn wird unter Entfernung der Meningen freipräpariert und mit einem Skalpell grob zerkleinert. Die Hirnfragmente werden dann in ein gentleMACS™-Röhrchen (MACS Milenyi Biotech) transferiert. Die Hirnfragmente werden durch den gentleMACS™ (MACS Milenyi Biotech) in separaten Schritten mechanisch zerkleinert. Unter Hinzufügung einer Enzymlösung nach MACS® ((Magnetic Assisted Cell Sorting, Miltenyi Biotec, Deutschland) Neuralgewebe Dissoziation Kit (P) Standards) kommt es zu einer enzymatischen Dissoziation. Dabei wird die Enzymmischung auf 37°C schonend vorgewärmt und geschüttelt. Nach der enzymatischen Dissoziation wird ein 40µm-Zellsieb auf ein 50ml-Falkenröhrchen gesteckt und 3ml gekühlte Hanks' ausgewogene Salzlösung (HBSS) (Ca²⁺ und Mg²⁺, gibco® von life Technologies) in das Röhrchen gefüllt. Das entstandene Hirnhomogenat wird resuspendiert und auf das Zellsieb aufgetragen. Weitere 20ml gekühltes HBSS werden hinzugegeben. Anschließend werden die Zellen bei 300 x g für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5702 RH) und der Überstand wird aspiriert.

Abschließend werden die Zellen mit anti-CD11b Mikroperlen (MACS® Miltenyi Biotec GmbH) 15 Minuten lang bei 4°C inkubiert. CD11b ist ein spezifischer Oberflächenmarker, der von Mikroglia-Zellen exprimiert wird und eine effiziente Trennung von Mikroglia durch immunomagnetische CD11b-Perlen ermöglicht^{12,41}. Die Zelllösung wird dann in die gentleMACS™ Röhrchen gefüllt, um eine isolierte Zellpopulation zu erhalten. Die isolierten Mikroglia-Zellen wurden auf einer 24-Well-Kulturplatte auf Matrigel-Matrix (BD Biosciences) bei 37°C in DMEM (Biochrom GmbH) mit 10% FBS (Biochrom AG), 1% Pencicillin-Streptomycin (Biochrom AG), 1% Gentamycin (gibco® by life Technologies) und 0,5% L-Glutamin (Biochrom AG) kultiviert (~ 200 000 Zellen / Well).

Isolierung von Neutrophilen Granulozyten

Die Hinterbeine von Catchup^{IVM-red}-Mäusen Ly6G^{+/+} und Ly6G^{-/-} werden abgetrennt und der Oberschenkelknochen von Weichteilgewebe freipräpariert. Als Kontroll-Gruppen verwendeten wir C57BL/6-Mäuse. Die Isolation des Knochenmarks erfolgt durch Spülung des Knochens mit 1% FBS in PBS mit einer 21G-Kanülenspritze. Das Knochenmark wird in einem 15ml Falkenröhrchen aufgefangen und bei 300 x g für 5 Minuten bei 5°C zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt und das entstandene Zell-Pellet in 3ml Erythrozyten-Lysepuffer (20,73g NH₄Cl (Sigma), 2,50g KHCO₃ (Roth), 93mg EDTA, in das Endvolumen 250ml ddH₂O., Filter steril) resuspendiert. Die Gewebesuspension wird mit 1% FBS in PBS auf ein Endvolumen von 15ml aufgefüllt. Anschließend wird die Gewebesuspension durch ein 40µm-Zellensieb geleitet. Das Zellensieb wird mit 25ml 1% FBS in PBS gespült. Anschließend wird die Lösung 5 Minuten lang bei 300 x g und 5°C zentrifugiert. Das Zell-Pellet wird in 5ml 1% FBS in PBS resuspendiert. Abschließend werden die Zellen mikroskopisch gezählt.

Die weitere Aufbereitung beginnt mit einer 5-minütigen Zentrifugation bei 300 x g bei 5°C. Anschließend wird das Zell-Pellet in 100 µl Antikörperlösung / 107 Zellen (Tabelle 1) im MACS-Puffer (1 x PBS mit: 1% FBS (Biochrom AG), 0,32% EDTA (Biochrom GmbH) resuspendiert. Die Zellsuspension wird 10 Minuten lang bei 4°C inkubiert und dabei kontinuierlich geschüttelt. Nach einer weiteren 5-minütigen Zentrifugation bei 300 x g bei 5°C wird das Zell-Pellet in 100µl MACS-Puffer / 107 Zellen resuspendiert. 15µl Anti-Biotin-Perlen (MACS® Miltenyi Biotec) werden hinzugefügt. Es folgt eine Inkubation für 15 Minuten bei 4°C unter kontinuierlichem Schütteln. Anschließend werden 10ml MACS-Puffer hinzugegeben und die Lösung für 5 Minuten bei 300 x g und 5°C zentrifugiert. Das entstandene Zell-Pellet wird in 500µl MACS-Puffer resuspendiert. Anschließend werden 3ml MACS-Puffer in die gentleMACS™-Röhrchen gegeben und die filtrierte Zellsuspension hinzugefügt. Die Röhrchen des gentleMACS™ werden dreimal mit je 1ml MACS-Puffer und einmal mit 6ml MACS-Puffer gewaschen. Die Zellsuspension wird in einem neuen 15ml-Falkon-Röhrchen gesammelt. Ein weiterer Zentrifugationsschritt folgt für 5 Minuten bei 300 x g und 5°C. Das Pellet wird mit 10ml sterilem PBS gewaschen. Nach der abschließenden Zentrifugation für 5 Minuten bei 300 x g und 5°C wurde das Zellpellet im Medium resuspendiert und kann für weitere Experimente verwendet werden.

Antikörper	Klon	Spezies	Hersteller	Verdünnung
Anti-Iba1	-	Hase	Wako	1:500
Anti-NeuN	MAB377	Maus	Chemicon	1:500
Ani-MAP2	AP-20	Maus	Sigma	1:500

Tabelle 2 - Eingesetzte primäre Antikörper

Antikörper	Spezies	Wirt	Hersteller	Verdünnung
Cy2	Ziege	Maus	Dianova	1:500
Cy3	Ziege	Hase	Dianova	1:500

Tabelle 3 - Eingesetzte sekundäre Antikörper

Mischkultur von PMN und Mikroglia-Zellen

Die isolierten Mikroglia-Zellen werden vier Tage lang bei 37°C auf einer 24-Well-Kulturplatte auf Matrigel Matrix (BD Biosciences) in Kultur gehalten (~ 200 000 Zellen / Well), bestehend aus DMEM (Biochrom GmbH) mit 10% FBS (Biochrom AG), 1% Penicillin / Streptomycin (Biochrom AG), 1% Gentamycin (gibco® by life Technologies) und 0,5% L-Glutamin (Biochrom AG). Die aus C57BL/6^{Ly6g(tm2621(Cre-tdTomato))}Arte-Mäusen isolierten PMN werden dann vier Stunden lang unter kontrollierten Bedingungen (37°C, 5% CO₂) mit den Mikroglia-Zellen co-kultiviert. Als Kontroll-Kultur verwendeten wir PMN aus Wildtyp-Mäusen. Für die histologische Auswertung mittels konfokaler Mikroskopie werden die Mikroglia-Zellen mit CSFE und die PMN mit CMTMR markiert. Abschließend haben wir die Wellplatten mit 2% PFA fixiert und die Platten bis zur weiteren mikroskopischen Untersuchung bei 4°C gelagert. Die überständigen Neutrophilen Granulozyten aus der Zell-Suspension wurden extrahiert und separat für die Transkriptionsanalyse aufbereitet.

Die Bilder wurden als Z-Stack aufgenommen: 60 Bilder von 4 Wells der Ly6G^{-/-} Gruppe, 61 Bilder von 5 Wells der Ly6G^{-/-}-Gruppe und 25 Bilder von 2 Wells der Wildtyp-Gruppe. Es werden lediglich Bilder hinsichtlich der Anzahl der Mikroglia-Zellen untersucht, die pro Sichtfeld PMN phagozytiert haben. Die Phagozytose wurde definiert als die vollständige Umhüllung von PMN durch Mikroglia-Zellen.

Permanenter Verschluss der mittleren zerebralen Arterie (pMCAO)

Die fokale zerebrale Ischämie wurde durch den permanenten Verschluss der mittleren zerebralen Arterie (pMCAO) induziert⁶⁰. Die Maus wurde betäubt, indem 2,5% Isofluran (Baxter) über eine Pumpe (UNIVENTOR 400 Anästhesieeinheit) in ein geschlossenes Behältnis geleitet und dort von den Mäusen inhaliert wurde. Die Sauerstoffzufuhr wurde konstant bei 250ml/min gehalten. Die Rektaltemperatur der Mäuse wurde gemessen und über eine Wärmematte (Temperaturkontrolle, TSE-Systeme) konstant bei $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ gehalten. Die Mäuse wurden anschließend nach dem Protokoll von Kuraoka et al. vorbereitet.

Nach der Entfernung des Musculus temporalis mit einem Operationsmikroskop (Zeiss, OPMI1 FR pro) wurde die Kraniotomie mit einem Hochgeschwindigkeits-Mikrobohrer (NOUVAG, Nr. 1050) durch den über dem Gebiet der Arteria cerebri media (MCA) liegenden Schläfenbein über dem Jochbogen durchgeführt. Die MCA wurde mit einem Kauter (Fine Science Tools Inc., Heidelberg, Deutschland) elektrokoaguliert ohne das angrenzende Hirngewebe zu schädigen. Anschließend wurde die Maus unter aufrechtgehaltener anästhesiologischer Versorgung in Rückenlage gebracht und die Karotiden frei präpariert. Dabei ist zu beachten, dass der Nervus vagus anatomisch eng angrenzend ist. Jede Halsschlagader wird dann für 20 Minuten vorübergehend mittels einer Gefäßklemme verschlossen (temporärer Verschluss der gemeinsamen Karotisarterie, CCAO). Nach dem Vernähen der Präparationsstellen wurden die Mäuse in ihre Käfige zurückgeführt und bei $27\text{-}28^{\circ}\text{C}$ in einer zuvor beschrieben kontrollierten Umgebung gehalten. Die pMCAO wurde durch eine wissenschaftliche Mitarbeiterin der Arbeitsgruppe durchgeführt.

Photothrombose

Die Photothrombose führt zu einer fokalen zerebralen Ischämie und ist daher geeignet, hochreproduzierbare Größen- und Ortsfokusläsionen im Gehirn zu verursachen und intravital mit der Zwei-Photonen-Mikroskopie (s.u.) zu untersuchen⁶¹. Die betäubten Tiere wurden kranial in einer Rahmenhalterung befestigt. Zur Induktion der Photothrombose wurden $50\mu\text{l}$ von 0,1% Rosenbengal (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland) mittels retrobulbärer Injektion appliziert und das Gehirn für 60 bis 90 Sekunden mit einem Laser (532nm Wellenlänge, Leistung $<5\text{mW}$) durch das Schädelfenster beleuchtet.

Durchflusszytometrie

Ly6G-heterozygote und -homozygote Mäuse wurden 24 Stunden nach pMCAO durch intrakardiale Perfusion mit PBS/Heparin 1% getötet. Die Hirnhemisphären wurden mit einem Skalpell voneinander getrennt. Der makroskopisch deutlich zuerkennende ischämische Bereich (Abbildung 7 B) wurde mit einer 4-mm-Stanze isoliert. Als Vergleichsprobe diente eine gleichgroße Gewebsstanze aus dem kontralateralen äquivalenten Hirnareal. Die Gewebeproben wurden zuerst grob mit dem Skalpell zerkleinert, anschließend in den gentleMACS™-Tubus (MACS Miltenyi Biotech) transferiert und mit dem gentleMACS™-Dissoziator (MACS Miltenyi Biotech) dissoziiert. Das Homogenat wurde filtriert (40µm-Zellensieb) und die Zellsuspension durch eine 21G-Kanüle aspiriert. Anschließend wurde die Fluorescent Assisted Cell Sorting (FACS)-Analyse mit dem Durchflusszytometer (BD FACSAria tm III, BD Biosciences) durchgeführt⁶².

Histologische Untersuchung und Bestimmung des Infarktolumens

Zur Analyse des Infarktolumens wurden die Hirngewebeschnitte Ly6G-heterozygoter und -homozygoter Mäuse mit Toluidinblau (Sigma Aldrich) gefärbt. Dafür wurde das freipräparierte Gehirn mit Kryostat (Thermo Scientific, Cryostar NX70) koronar in 25-50µm dicke Scheiben geschnitten. Diese werden dann in eine 24-Well-Platte mit gekühltem Kryoschutzmittel (250ml Glycerin (Carl Roth GmbH & Co. KG), 250ml Ethylenglykol (Sigma Aldrich), 500ml PBS) eingebracht und bei 4°C eingelagert.

Zum Färben wurden die Schnittpräparate aus dem Kryoschutzmittel entfernt, indem sie 5 Minuten mit destilliertem Wasser umspült wurden. Anschließend wurden die Hirngewebeschnitte 10 Minuten lang in Toluidinblau inkubiert. Die Restfarbe wurde 5 Minuten lang in destilliertem Wasser ausgewaschen.

Zur Entfärbung wurden die Scheiben in einer Ethanol-Verdünnungsreihe gespült: zuerst in 50% Ethanol (Roth) für 5 Minuten, dann in 70% Ethanol (Roth) für ca. 10 Minuten, gefolgt von einer Inkubation über 5 Minuten in 90% Ethanol (Roth) und schließlich in 100% Ethanol (Roth) für 5 Minuten. Im Anschluss wurden die Hirngewebeschnitte 5 Minuten lang in 2-Propanol (Carl Roth GmbH + Co. KG) sowie zweimalig in Xylol (Roth) für jeweils 5 Minuten gespült. Für eine dauerhafte Präparation und Untersuchung wurden die Gewebeschnitte mit DAPI-haltigem Montagemedium (VECTASHIELD) zur Markierung aller Zellkerne und einem Deckglas abgedeckt. Die

Ränder wurden mit Nagellack verdichtet. Die Färbung wurde mit einem Fluoreszenz-Mikroskop (Zeiss Axiovert200) analysiert und das Infarktvolumen mit der Axiovision-Software (Zeiss) ermittelt.

PMN-Verteilung

Um die genaue Lokalisation der infiltrierten PMN 24 Stunden nach pMCAO zu demonstrieren, wurde die Fluoreszenzfärbung der Gefäße mit Fluorescein-gekoppeltem Solanum tuberosum lectin (FITC) durchgeführt. Das Gehirn von homozygoten und heterozygoten Catchup^{IVM-red}-Mäusen wurde 12, 24 und 72 Stunden nach Induktion der fokalen zerebralen Ischämie mittels pMCAO durch transkardiale Perfusion mit 4% Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Nach dem Schockfrostern in -20°C wurden die Gehirne in 50µm dicke Scheiben geschnitten.

Zur Quantifizierung von PMN im Gehirn wurde eine konfokale Analyse durchgeführt, bei der Z-Stapel in 5 region of interest (210,32 × 210,32 × 210,32 × 10µm, Z-Distanz 0,2µm) pro Tier erfasst wurden. Wie bereits beschrieben, wurde der Abstand zwischen PMN und dem nächsten Gefäß > 10µm als parenchymal, < 10µm als paravasal und 0µm als intravasal lokalisiert¹². Insgesamt wurden 284 Zellen aus 6 Mäusen analysiert.

Immunhistologische Untersuchung

Für die immunhistologische Untersuchung werden native Hirngewebescheiben der Catchup^{IVM-red}-Mäuse zur Phänotypisierung der Zellen mit MAP2, NeuN, STL und GFAP gefärbt. Daher werden die Hirngewebeschnitte aus dem Kryoschutzmittel entfernt und dreimal in 1 x PBS 0,3% Triton (Sigma) für 5 Minuten gespült. Anschließend werden die Schnitte für 30 Minuten und bei Raumtemperatur in 1 x PBS 0,3% Triton (Sigma) und einem halben Anteil von 100% Ethanol (50:50) inkubiert (Roth). Die Schnitte werden dreimal mit 1 x PBS 0,3% Triton (Sigma) für je 5 Minuten gewaschen. Anschließend wird die Blockierlösung zugegeben, bestehend aus 1 x PBS 0,3% Triton (Sigma) und 10 % Pferdeserum (Biochrom AG). Es folgt eine Inkubation bei Raumtemperatur für 1 Stunde. Im weiteren Schritt wird die Blockierlösung abgesaugt und die primäre Antikörperlösung aus 1 x PBS 0,3% Triton (Sigma) und 5% Pferdeserum (Biochrom AG) aufgetragen. Die Hirngewebeschnitte werden über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wird die primäre Antikörperlösung aspiriert und die Schnitte dreimalig in 1 x PBS 0,3% Triton (Sigma) für je 5 Minuten gespült. Es wird die sekundäre Antikörperlösung aufgetragen, die aus 1 x PBS 0,3% Triton (Sigma) und

5% Pferdeserum (Biochrom AG) hergestellt wurde. Die damit versetzten Schnitte werden 3 Stunden lang bei Raumtemperatur inkubiert. Die sekundäre Antikörperlösung wurde abgesaugt und die Schnitte dreimal in 1 x PBS 0,3% Triton (Sigma) für je 5 Minuten gewaschen.

Abschließend werden die Gewebeschnitte auf ein Deckglas gezogen und mit DAPI-haltigem Montagemedium (VECTASHIELD) zur Markierung aller Zellkerne präpariert. Die Ränder werden mit Nagellack verdichtet. Die Schnitte wurden anschließend mit einem Konfokal-Mikroskop untersucht.

Konfokale Mikroskopie

Die Konfokalmikroskopie ist eine etablierte lichtmikroskopische Technik zur Darstellung fluoreszenzmarkierter Proben mit signifikanter dreidimensionaler Struktur⁶³. Wir nutzten die immunfluoreszierenden Eigenschaften der Catchup^{IVM-red}-Maus und verschiedener fluoreszenzmarkierter Antikörper, um sowohl die Infiltration und Lokalisation von PMNs als auch deren Interaktion mit und Phagozytose durch Mikroglia-Zellen zu beobachten. Die Methode wurde ebenso in der Untersuchung der Mischkulturen verwendet.

Die histologische Untersuchung wurde mit einem Leica SP8 Konfokalmikroskop (Wetzlar, Deutschland) durchgeführt (Objektiv: 20x Wasser-Immersion, Anregung von FITC: 488nm, Catchup^{IVM-red}: 561nm). Für die Verarbeitung der Bilder wurde IMARIS (Bitplane, Zürich) verwendet.

Die immunhistologische Untersuchung wurde mit einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop (LSM 700, Zeiss) durchgeführt und mit der Software ZEN 2009 analysiert. Die Mischkulturen wurden mit einem Konfokalmikroskop, Objektiv Plan Neofluar 0,75 mit 40-facher Vergrößerung, einem Argonlaser (488nm) und einem Helium/Neonlaser (54 nm) untersucht. Multitracking wurde verwendet, um eine Interaktion zwischen den verschiedenen Kanälen zu vermeiden. Die Bilder wurden mit der Carl Zeiss-Software (Pascal; Carl Zeiss) analysiert.

Zwei-Photonen-Mikroskopie

Die intravitale Zwei-Photonen-Mikroskopie wurde 24 Stunden nach einer durch Photothrombose induzierten fokalen zerebralen Ischämie durchgeführt. Die Mäuse waren während dieser Experimente zwischen 3 und 7 Monate alt. Die narkotisierten Tiere wurden in einer kranialen Rahmenhalterung fixiert. Für die Zwei-Photonen-Mikroskopie verwendeten wir ein aufrechtstehendes MP7-Mikroskop von Zeiss (Jena, Deutschland) mit einem Coherent Chamäleon-Laser (Göttingen, Deutschland) und einem Zeiss 20x Wasser-Immersion-Objektiv (1,0 NA). Die Fluoreszenz wurde bei 500-550nm für eGFP und 565-610nm für tdTomato von nicht abgetasteten Detektoren nach Anregung mit 920 nm detektiert. Während der in vivo-Mikroskopie wurde der Laser je nach Abbildungstiefe mit einer Leistung zwischen 7-13% eingesetzt.

Um eine angemessene Abbildungstiefe zu gewährleisten, führten wir Z-Stapel mit SHG-Signal durch. Hierdurch konnte die Hirnhaut identifiziert werden. Im Anschluss legten wir die Abbildungstiefe unterhalb der Hirnhaut wie zuvor beschrieben fest. Nach der Bildgebung wurden die Mäuse durch eine Überdosierung von Isofluran getötet.

Statistische Auswertung

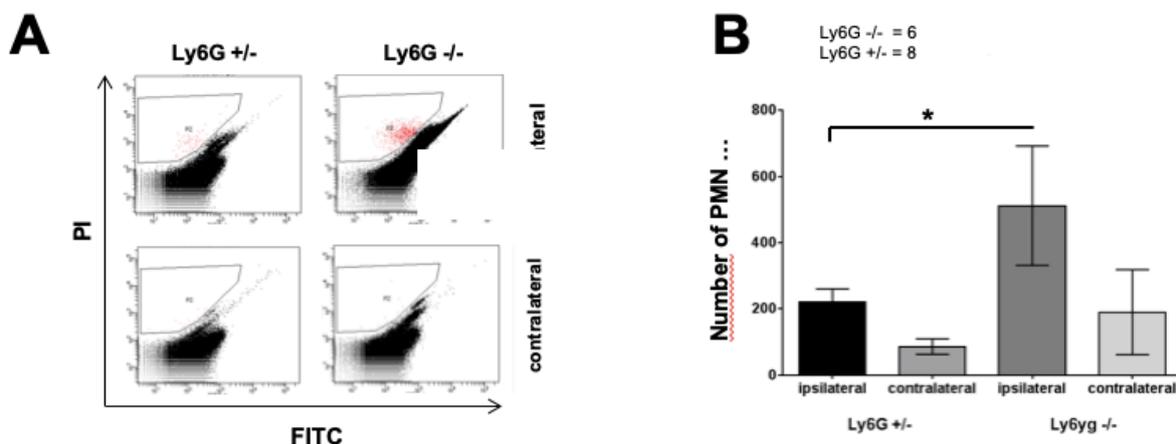
Die statistische Analyse wurde mit GraphPadPrism (LA Jolla, USA) durchgeführt. Alle Daten sind als Mittelwert \pm SD angegeben. Die statistische Analyse erfolgte mittels einseitiger ANOVA, gefolgt von einem post hoc Vergleich (Tukey-Test). Ein P-Wert $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen.

Ergebnisse

Ly6G-Defizienz führt zu einer quantitativ vermehrten PMN-Infiltration in ischämisch verletztes Hirnparenchym in vivo

Aus eigenen Beobachtungen haben wir angenommen, dass eine vermehrte Infiltration von Ly6G-defizienter PMN nach zerebraler Ischämie zu einem größeren Infarktvolume führt. Um unsere Hypothese zu stützen, führten wir bei Ly6G^{+/-} und Ly6G^{-/-} von C57BL/6^{Ly6g(tm2621(Cre-tdTomato)Arte} eine permanente zerebrale Ischämie mittels pMCAO durch. 24 Stunden im Anschluss untersuchten wir die Gehirne in vitro auf die Anzahl infiltrierter PMN mittels FACS-Analyse. Dabei konnten Neutrophile Granulozyten aus C57BL/6^{Ly6g(tm2621(Cre-tdTomato)Arte}-Mäusen bei 640nm (PI) nachgewiesen werden. Der Ausschluss von autofluoreszierenden Zellen erfolgte bei 500-550nm (FITC). Im Vergleich zeigten sich im FACS-Plot signifikant mehr PMN bei Ly6G^{-/-} Mäusen in der ischämischen Hirnhälfte als bei Ly6G^{+/-}-Mäusen. (Abbildung 6 A). Nach quantitativer Analyse bestätigte sich das Ergebnis aus der FACS-Analyse: Ly6G-defiziente Mäuse weisen eine signifikant erhöhte PMN-Infiltration 24 Stunden nach pMCAO im Vergleich zu Ly6G-heterozygoten Mäusen auf (*p < 0,05 Ly6G^{+/-} n=12 vs. Ly6G^{-/-} n = 18, Abbildung 6 B).

Abbildung 6 - FACS-Analyse der Infiltration von Neutrophilen Granulozyten in das ischämisch geschädigte Gehirn



A: Repräsentative FACS-Plots von Ly6G^{+/-}- und Ly6G^{-/-}-Mäusen aus Catchup^{IVM-red} 24 Stunden nach pMCAO. tdtomato^{bright} PMN wurden bei 640 nm nachgewiesen. B: Quantifizierung der Infiltration von Neutrophilen Granulozyten (*p < 0,05 Ly6G^{+/-} n=12 vs. Ly6G^{-/-} n = 18).

Ly6G-Defizienz führt zu einem größeren Parenchymschaden nach permanenter zerebraler Ischämie

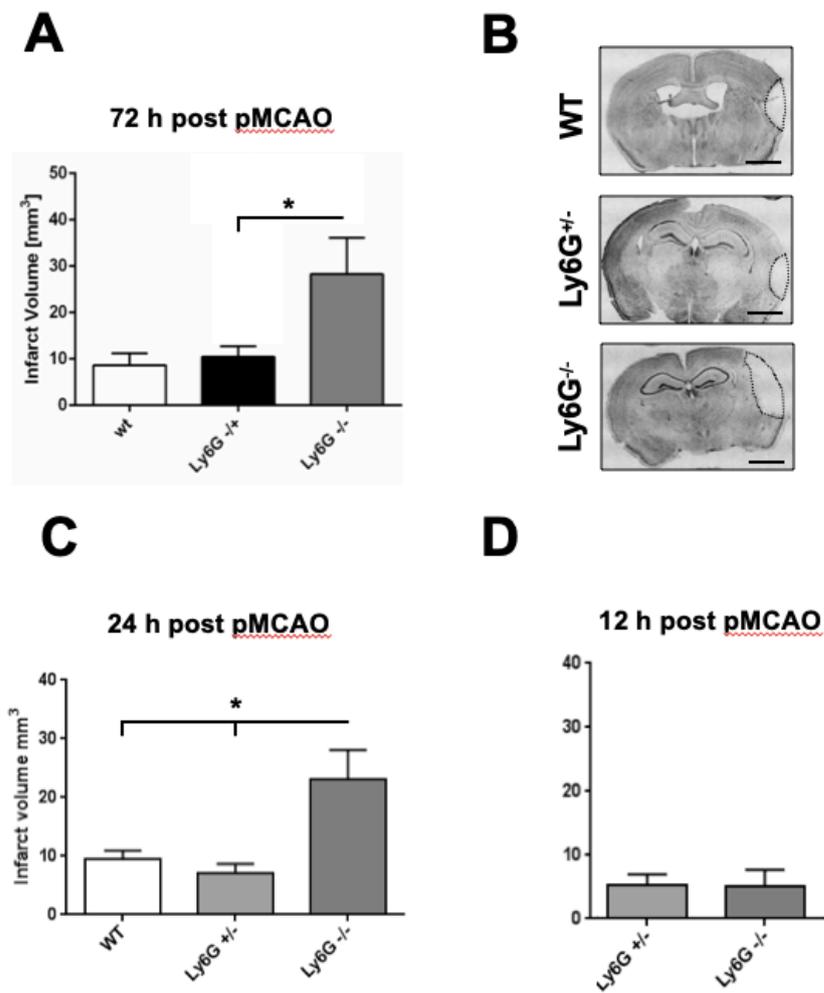
Da die Anhäufung von PMN im ischämisch verletzten Hirnparenchym bei Ly6G^{-/-}-Mäusen wie oben gezeigt verstärkt ist, haben wir die Folgen einer höheren PMN-Zahl am Hirnparenchym von Ly6G^{-/-}- und Ly6G^{+/-}-Mäusen gemessen über die Zeit untersucht. Hierzu wurden die Infarktareale post mortem mikroskopisch vermessen und das Infarktvolumen berechnet (Abbildung 7 B).

72 Stunden nach pMCAO war die Infarktgröße bei Ly6G^{-/-}-Mäusen signifikant größer als bei Ly6G^{+/-}-Mäusen und Wildtypen (größer (* $p < 0,05$ Ly6G^{-/-} vs. Ly6G^{+/-} vs. WT, Abbildung 7 A). Nach 12 Stunden nach pMCAO zeigte sich kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen (Abbildung 7 D). Nach 24 Stunden fanden wir bei Ly6G^{-/-}-Mäusen wieder signifikant größere Infarktvolumina als bei vergleichbaren Ly6G^{+/-}-Mäusen (* $p < 0,05$ Ly6G^{-/-} vs. Ly6G^{+/-} vs. WT, Abbildung 7 C).

Zusammengefasst zeigten sich bei einer ausgeprägten Infiltration von PMN bei Ly6G^{-/-}-Mäusen größere Infarkte. Zu früheren Zeitpunkten, zu denen die PMN gerade erst zu infiltrieren beginnen, konnte der Unterschied nicht erkannt werden. So deuten unsere Daten darauf hin, dass die Anzahl der PMN im geschädigten Gehirn positiv mit der Infarktgröße korreliert.

Diese Untersuchungsreihe zeigt, dass binnen der ersten 24 Stunden nach Ischämie das Infarktmaximum erreicht wird. Hier zeigt sich eine nicht signifikante Schadensvergrößerung. Eine Korrelation mit der Anzahl infiltrierter PMN mit Maximum nach 24 Stunden wird angenommen.

Abbildung 7 - Infarkt volumina bei Ly6G-defizienten Mäusen nach pMCAO in Abhängigkeit von der Zeit



A: 72 Stunden nach pMCAO wurde das Infarktvolumen gemessen. Das Infarktvolumen in Ly6G^{-/-}-Mäusen war signifikant größer (* $p < 0,05$ Ly6G^{-/-} vs. Ly6G^{+/-} vs. WT). B: Mikroskopisches Bild zur repräsentativen Veranschaulichung der Infarktgrößen der verschiedenen Gruppen in der linken Hemisphäre. C: Infarktvolumen 24 Stunden nach pMCAO (* $p < 0,05$ Ly6G^{-/-} vs. Ly6G^{+/-} vs. WT). D: 12 Stunden nach pMCAO wurde kein signifikanter Unterschied im Infarktvolumen zwischen Ly6G^{-/-}- und Ly6G^{+/-}-Mäusen festgestellt.

Maßstabsbalken: B: 20 μm .

Beeinträchtigte mikrogliale Phagozytose von Ly6G-defizienten PMN in vitro

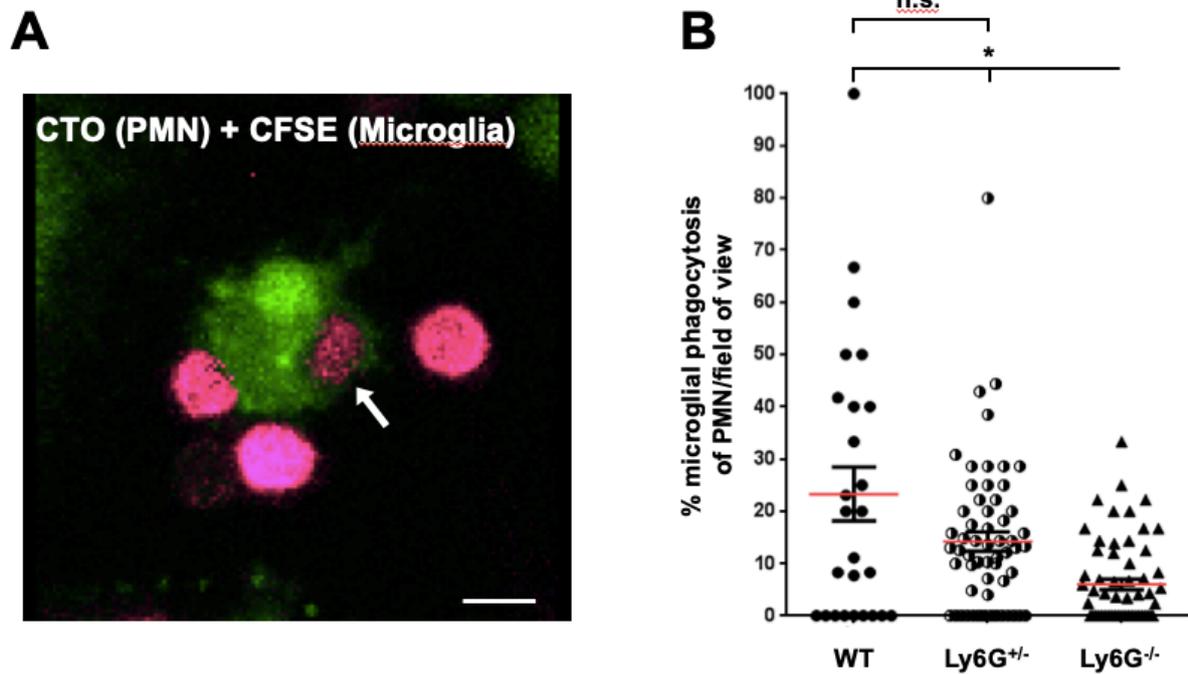
Um den Mechanismus der mikroglialen Phagozytose von Ly6G-defizienten PMN zu verdeutlichen, haben wir eine Mischkultur aufgebaut, indem wir frische PMN aus dem Knochenmark von Catchup^{IVM-red}-Mäusen isolierten und auf eine primäre Mikroglia-Zellkultur aus C57BL/6-Mäusen auftrugen. Zuvor wurden beide Zelltypen mit unterschiedlichen intrazellulären Farbstoffen markiert: CFSE verwendeten wir für die Mikroglia-Zellen, welche dem Spektrum 500-550nm [Grün] zugeordnet werden konnten. In Kontrast dazu markierten wir die PMN mittels CTO im Spektrum 548-576nm [Orange]. Dieser Ansatz ermöglichte die Erkennung der Phagozytose von PMN (Abbildung 8 A). Der Pfeil zeigt eine repräsentative Phagozytose eines PMN durch eine Mikroglia-Zelle in einer in vitro-Zellkultur nach 4 Stunden gemeinsamer Inkubation.

Das Säulen-Streu-Diagramm in Abbildung 8 B veranschaulicht den prozentualen Anteil der Phagozytose von PMN durch Mikroglia-Zellen pro Sichtfeld im Konfokalmikroskop. Hier zeigt sich, dass die Mikroglia-Zellen signifikant weniger Ly6G-defiziente (Ly6G^{-/-}) PMN im Vergleich zu Ly6G^{+/-} PMN und Wildtyp phagozytierten.

Diese Beobachtung könnte im Umkehrschluss bedeuten, dass Ly6G zur Herstellung einer Kontaktbildung zwischen murinen Mikroglia-Zellen und Neutrophilen Granulozyten essenziell ist und sogar am Kernmechanismus der Phagozytose beteiligt ist.

Bekräftigt wird dies durch die Tatsache, dass schon eine Reduktion der Ly6G-Synthese auf rund 50%, so wie es bei Ly6G^{+/-}-PMN ist, noch ausreichend ist, um eine Phagozytose-Rate ähnlich der von Wildtyp-PMN zu ermöglichen.

Abbildung 8 - Mikrogliale Phagozytose von Ly6G-defizienten Neutrophilen Granulozyten in vitro



A: Mikroglia-Zellen wurden mit CFSE (grün) und Neutrophile Granulozyten mit CTO (orange) markiert. Das Bild zeigt eine repräsentative Phagozytose eines Neutrophilen Granulozyten (Pfeil) durch eine Mikroglia-Zelle in einer In-vitro-Kokultur. B: Medulläre Neutrophile Granulozyten wurden nach oben genannter Zellfärbung zu einer primären Mikroglia-Zellkultur hinzugefügt. Die Ko-Kultur wurde nach 4-stündiger Inkubation konfokalmikroskopisch untersucht. Das Säulen-Streu-Diagramm zeigt den Prozentsatz der Mikroglia-Zellen, die pro Sichtfeld Neutrophile Granulozyten phagozytiert haben. Signifikante Werte sind oberhalb der Säulen dargestellt. Skalenbalken: A: 5 μ m.

Postischämische Beobachtung spezifischer Wechselwirkungen von PMN und Mikroglia-Zellen durch Phagozytose von PMN in vivo

Im oben erläuterten Experiment konnten wir eine Interaktion zwischen Mikroglia-Zellen und Neutrophilen Granulozyten in vitro nachweisen. Um die PMN-Mikroglia-Interaktion erstmalig in vivo aufzuzeigen, verwendeten wir das neuartige genetische Mausmodell Catchup^{IVM-red}, eine Kreuzung einer C57BL/6^{Ly6g(tm2621(Cre-tdTomato)Arte}-Maus mit einer tdTomato-Reportermaus. Durch dieses Mausmodell ist es uns möglich, endogen rot gefärbte PMN für die intravitale Zwei-Photonen-Bildgebung selektiv und spezifisch zu visualisieren. Zur Beobachtung einer mikroglialen Interaktion ist die Visualisierung der PMN allein nicht ausreichend.

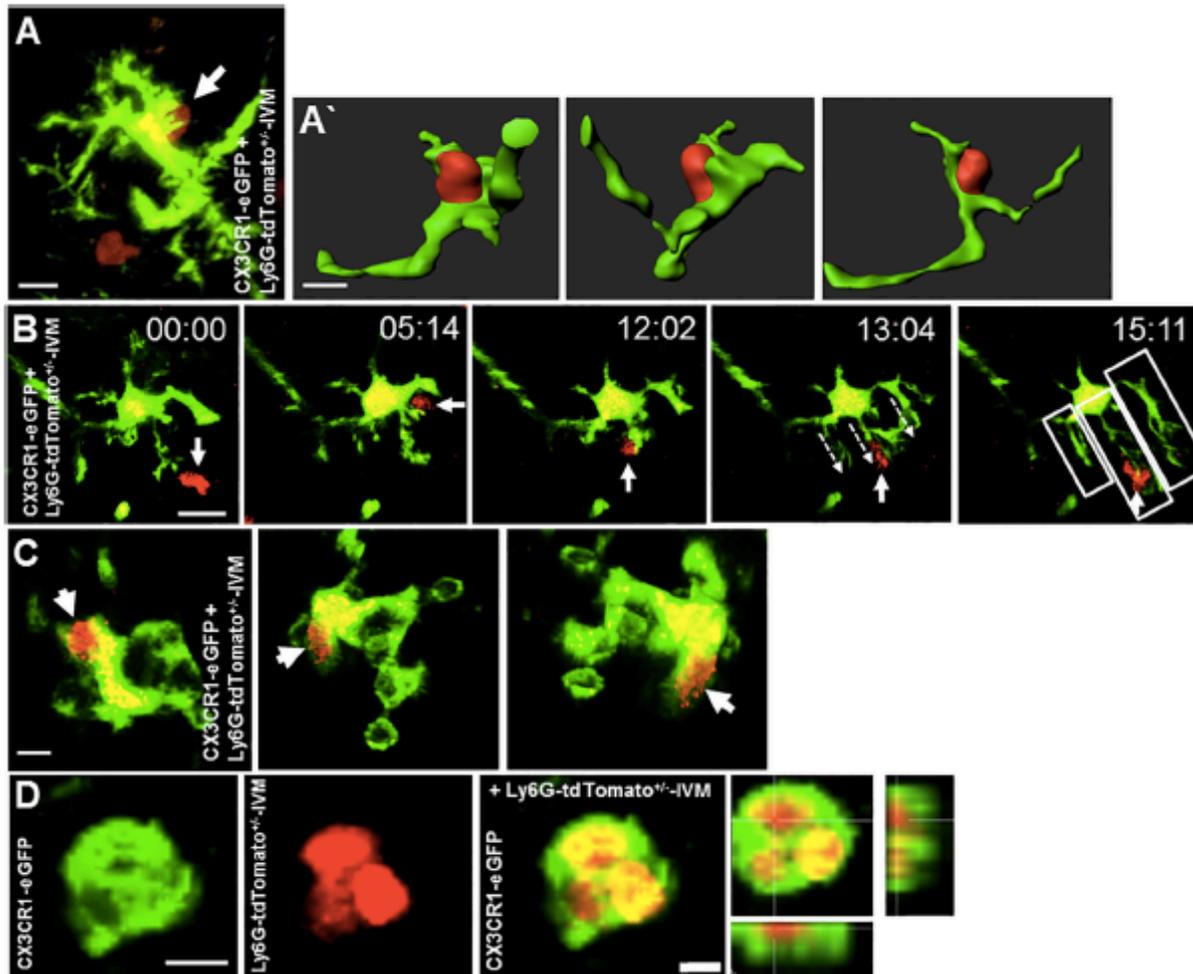
Daher machten wir uns das Prinzip der Knochenmark-Chimären zunutze und übertrugen das Knochenmark von zwei Catchup^{IVM-red}-Mäusen in sieben letal bestrahlte weibliche CX3CR1-eGFP-Mäuse. So erzeugten wir ein transgenes Mausmodell mit strahlenresistenten grün fluoreszierenden Mikroglia-Zellen und rot fluoreszierenden PMN.

Die im Anschluss durchgeführte Photothrombose ist das Verfahren der Wahl zur Generierung eines oberflächlich lokalisierten Infarktes. Intravital konnten wir so umfangreiche Zell-Zell-Kontakte zwischen eGFP⁺-Mikroglia-Zellen und tdTomato⁺-PMN beobachten (Abbildung 9 A und A'). Teilweise dauerte die Interaktion mehrere Minuten. In einigen Fällen beobachteten wir Mikroglia-Zellen, welche ihre Fortläufer aktiv in Richtung der PMN ausdehnten (Abbildung 9 B).

Schließlich zeigten sich im Hirnparenchym aktivierte Mikroglia-Zellen, die ein oder mehrere infiltrierte PMN eindeutig phagozytiert hatten (Abbildung 9 C und D).

Durch das Zusammenspiel eines suffizienten transgenen Mausmodells und einer leistungsstarken intravitalem Bildgebung ist es uns gelungen, eine spezifische Wechselwirkung zwischen postischämisch infiltrierte PMN und Mikroglia-Zellen nachzuweisen und sogar die Phagozytose von PMN durch Mikroglia-Zellen in vivo zu beobachten.

Abbildung 9 - Wechselwirkung zwischen Mikroglia-Zellen (CX3CR1-eGFP⁺) und Neutrophilen Granulozyten (Catchup^{IVM-red}) 24 Stunden nach induzierter Photothrombose



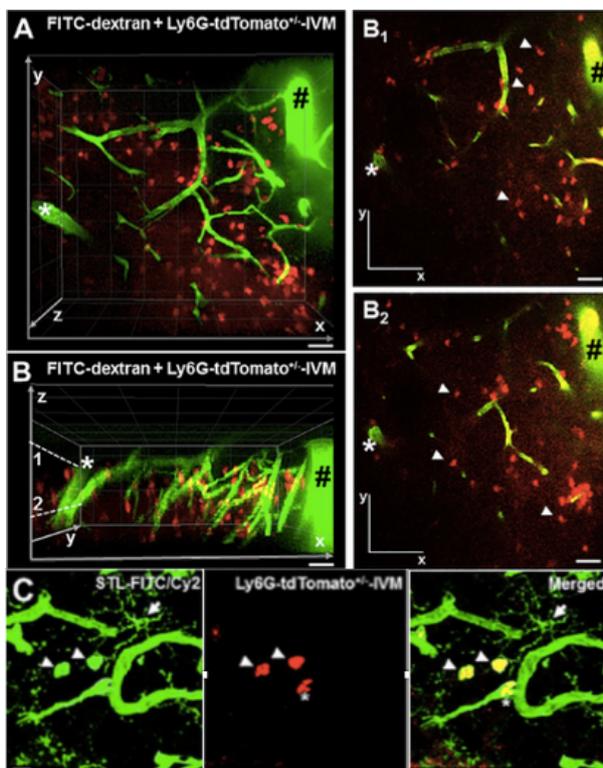
A: direkter physischer Kontakt, Rekonstruktion in verschiedenen Winkeln in A' dargestellt. B: Zeitreihe einer Reaktion einer Mikroglia-Zelle auf einen vorbeiziehenden Neutrophilen Granulozyten mit Ausdehnung der mikroglialen Ausläufer in Richtung des Neutrophilen Granulozyten. Die Pfeile markieren die rot-gefärbten Neutrophilen Granulozyten, die gestrichelten Pfeile zeigen die Richtung der Ausläufer und die Kästchen markieren die drei ausgedehnten mikroglialen Ausläufer. C: intrazellulär lokalisierter Neutrophiler Granulozyt in einer Mikroglia-Zelle aus verschiedenen Winkeln. D: Phagozytose mehrerer Neutrophiler Granulozyten durch eine Mikroglia-Zelle. Messbalken: A, C: 10 μm , B, B', D, E: 5 μm .

Ly6G-Defizienz führt zu einer qualitativ vermehrten PMN-Infiltration in ischämisch verletztem Hirnparenchym ex vivo

Um die in vivo-Beobachtungen zu untermauern und auszuschließen, dass die roten Zellen aus dem Gehirn stammen, wurde zusätzlich das Knochenmark von drei Catchup^{IVM-red}-Spendertieren in drei letal bestrahlte C57BL6-Empfängertiere transferiert, um die postischämische PMN-Infiltration in das Gehirnparenchym nach zerebraler Ischämie qualitativ zu untersuchen. Die exakte Lokalisation der PMN in Bezug auf die Kapillaren im Hirnparenchym konnte durch eine Färbung der Endothelzellen mit FITC-gekoppeltem STL bestimmt werden. So ließen sich die PMN und Endothelzellen eindeutig voneinander abgrenzen und visualisieren. 24 Stunden nach pMCAO entdeckten wir tdTomato⁺-PMN im Kapillarbett des betroffenen Hirnparenchyms (Abbildung 10 A und B).

Die Auswertung zeigt, dass die Lokalisation der beweglichen PMN vornehmlich intraparenchymal und nicht perivaskulär ist (Abbildung 10 C). So konnten wir erstmals mit dem Catchup^{IVM-red}-Modell eindeutig lebende und bewegliche Neutrophile Granulozyten intraparenchymal im ischämisch geschädigten Gehirn nachweisen.

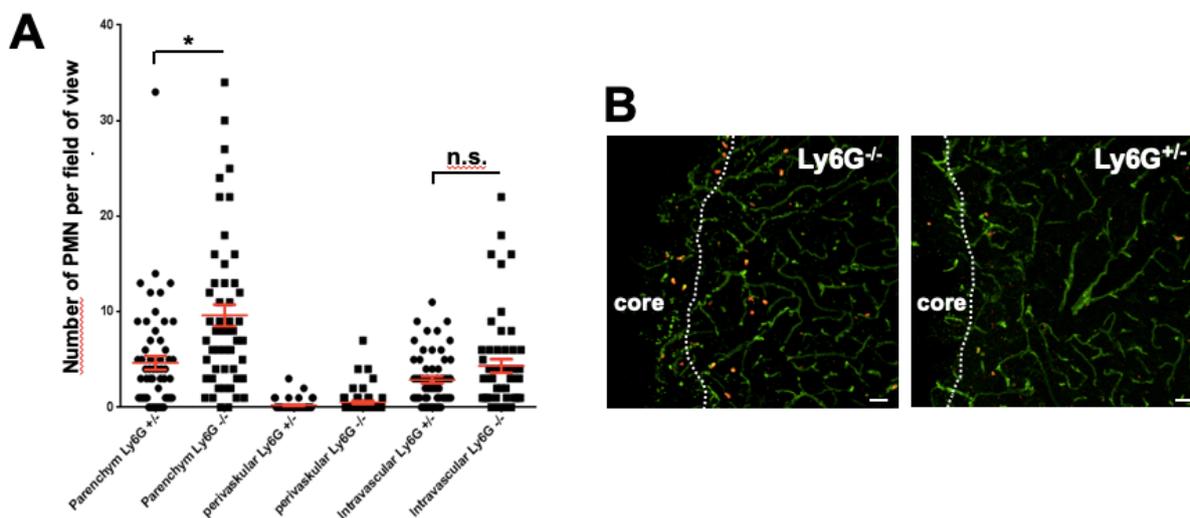
Abbildung 10 - Intravitale 2-Photonen-Mikroskopie von C57BL/6-Catchup^{IVM-red}-Knochenmark-Chimären nach induzierter Photothrombose



A: Infiltrierte tdTomato⁺-Neutrophile Granulozyten (rot) intraparenchymal zwischen FITC-Dextran⁺-Kapillaren (grün) im 2D-Querschnitt (x-y-Orientierung). B: 3D-Rekonstruktion von Abbildung A (x-y-z-Orientierung). B1 und B2 zeigen infiltrierte tdTomato⁺-Neutrophile Granulozyten (rot, weiße Pfeile) innerhalb der Infarktzone inmitten von FITC-Dextran⁺-Kapillaren (grün) im 2D-Querschnitt (x-y-Orientierung) mit unterschiedlichen Tiefen von Abbildung B. C: Färbung eines 50 µm dicken Hirnschnitts mit infiltrierten tdTomato⁺-Neutrophilen Granulozyten (rot, Pfeilspitzen) im Parenchym und einem Neutrophilen Granulozyten in einer Kapillare (Sternchen) Darstellung von Kapillaren und einer Mikroglia-Zelle (grün, Pfeilspitze) mit FITC-Dextran. Die schwarzen Rauten und weißen Sterne zeigen zwei kortikal durchdringende Gefäße mit dazwischenliegendem Kapillarbett mit Nachweis einer angemessenen Darstellungs- und Infiltrationstiefe. Skalenbalken: A, B, B1, B2: 10 µm und C 5 µm.

Diese Beobachtung bestärkt die quantitative FACS-Messung, bei der wir bei Ly6G^{-/-}-Mäusen im ischämisch verletzten Hirnparenchym mehr PMN im Vergleich zu Ly6G^{+/-}-Mäusen entdeckten (*p<0,05 Ly6G^{-/-} vs. Ly6G^{+/-}). Lediglich die Verteilung von PMN in intra- und perivaskuläre Lokalisation 24 Stunden nach pMCAO unterschied sich nicht signifikant zwischen den Gruppen (Abbildung 11 A). Abbildung 11 B zeigt Aufnahmen der PMN-Infiltration mit mehr PMN (rot) an der Grenze des infarzierten Gewebes bei Ly6G^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu PMN von Ly6G^{+/-}-Mäusen.

Abbildung 11 - Räumliche Verteilung von infiltrierten Neutrophilen Granulozyten innerhalb des ischämisch geschädigten Gehirns



Die Gefäße wurden mit FITC-Dextran (grün) angefärbt. Die Entfernung der Neutrophilen Granulozyten zu den Gefäßen wurde abgemessen und dann zwischen parenchymaler, perivaskulärer und intravasculärer Lokalisation unterschieden. Der Abstand zwischen Neutrophilen Granulozyten und dem nächstgelegenen Gefäß > 10µm wurde als parenchymal, < 10µm als perivaskulär und 0µm als intravasculär gelegen betrachtet. A: Die Quantifizierung der Neutrophilen Granulozyten-Verteilung zeigt signifikant mehr Neutrophile Granulozyten innerhalb des Parenchyms von Ly6G^{-/-}-Mäusen (*p<0,05 Ly6G^{-/-} vs. Ly6G^{+/-}), während Neutrophile Granulozyten peri- und intravasculär gleichmäßig verteilt sind. B: Histologisch repräsentative Darstellung der Neutrophilen-Infiltration mit mehr Neutrophilen Granulozyten am Rand des ischämischen Gewebes bei Ly6G^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu Neutrophilen Granulozyten von Ly6G^{+/-}-Mäusen. Maßstabsbalken: B: 20 µm.

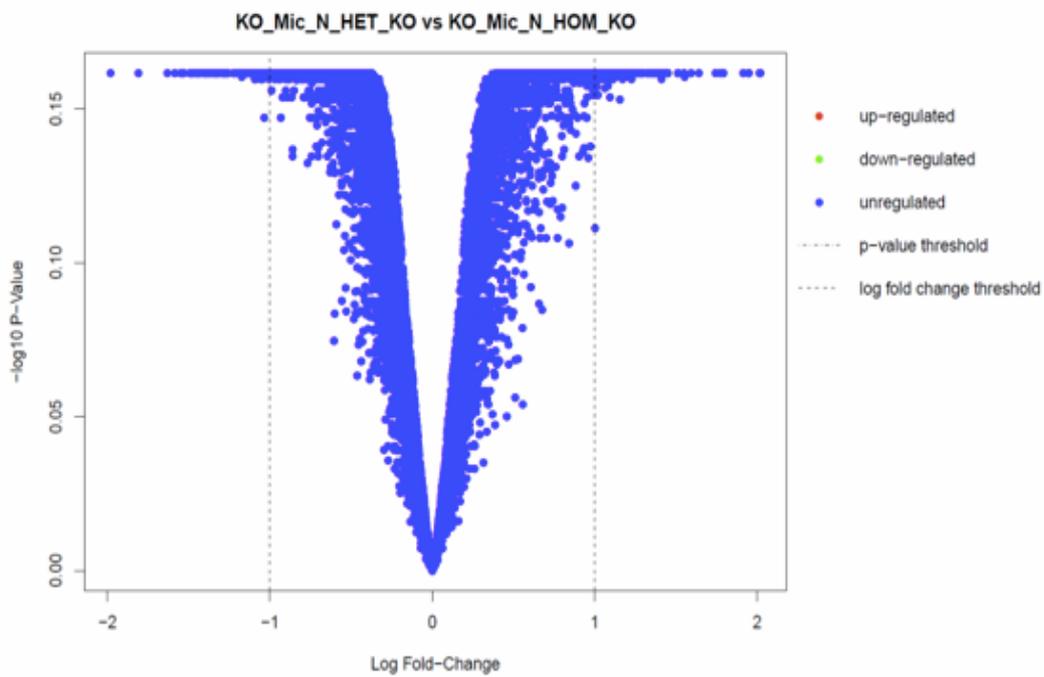
Keine Änderung im Aktivitätsmuster des mikroglialen Transkriptoms nach Exposition mit Ly6G-defizienten Neutrophilen Granulozyten

Elementare Prozesse der Phagozytose sind das Auffinden der bestimmten Zelle durch lösliche "find-me"-Signale und die Interaktion mit "eat-me"-Signalen auf der von Phagozyten erkannten Oberfläche^{64,65}.

Da Ly6G ein GPI-verankertes Protein⁴⁷ auf der PMN-Oberfläche ist und Teil der Zell-Zell-Kommunikation und sogar auch an der Phagozytose beteiligt ist, verdichtete sich die Vermutung, dass es einen Bindungspartner im Rahmen dieser Wechselwirkungen gibt. Frühere Experimente haben gezeigt, dass Mikroglia-Zellen aktiv an der Phagozytose von infiltrierten PMNs nach einem Schlaganfall und damit an der Neuroprotektion beteiligt sind^{12,30,31}. In dieser Arbeit konnten wir zeigen, dass Ly6G dabei eine wichtige Rolle spielt. Um eine Beteiligung der Mikroglia-PMN-Interaktion auf Molekularebene festzustellen, haben wir das genetische Aktivitätsmuster der Mikroglia-RNA nach der Interaktion mit Ly6G^{-/-}- und Ly6G^{+/-}-PMN untersucht. Zu diesem Zweck haben wir die überstehende PMN-Suspension der Mixkulturen nach 4 Stunden isoliert. Anschließend wurde die RNA der Mikroglia-Zellen extrahiert und dann in der Genomikplattform des Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung GmbH in Braunschweig mit Hilfe der Transkriptomanalyse untersucht⁶⁶.

Ziel dieser Analyse ist eine Aktivitätsänderung auf mRNA-Basis und damit auf Proteinbasis zu identifizieren. Eine Änderung des Transkriptoms beeinflusst in der Folge auch den Oberflächenmolekül-Besatz. Eine Differenz zwischen dem Transkriptom von inaktiven und aktiven Mikroglia-Zellen könnte so hinweisend auf einen potenziellen Liganden von Ly6G sein. Das Ergebnis der Analyse von Mikroglia-Zellen, die mit Ly6G^{+/-}-PMN und Ly6G^{-/-}-PMN exponiert wurden, zeigte keinen Unterschied auf RNA-Ebene und somit in ihren Aktivierungszuständen (Abbildung 12). Bislang ist der Bindungspartner von Ly6G weiterhin unbekannt.

Abbildung 12 - Transkriptom-Analyse



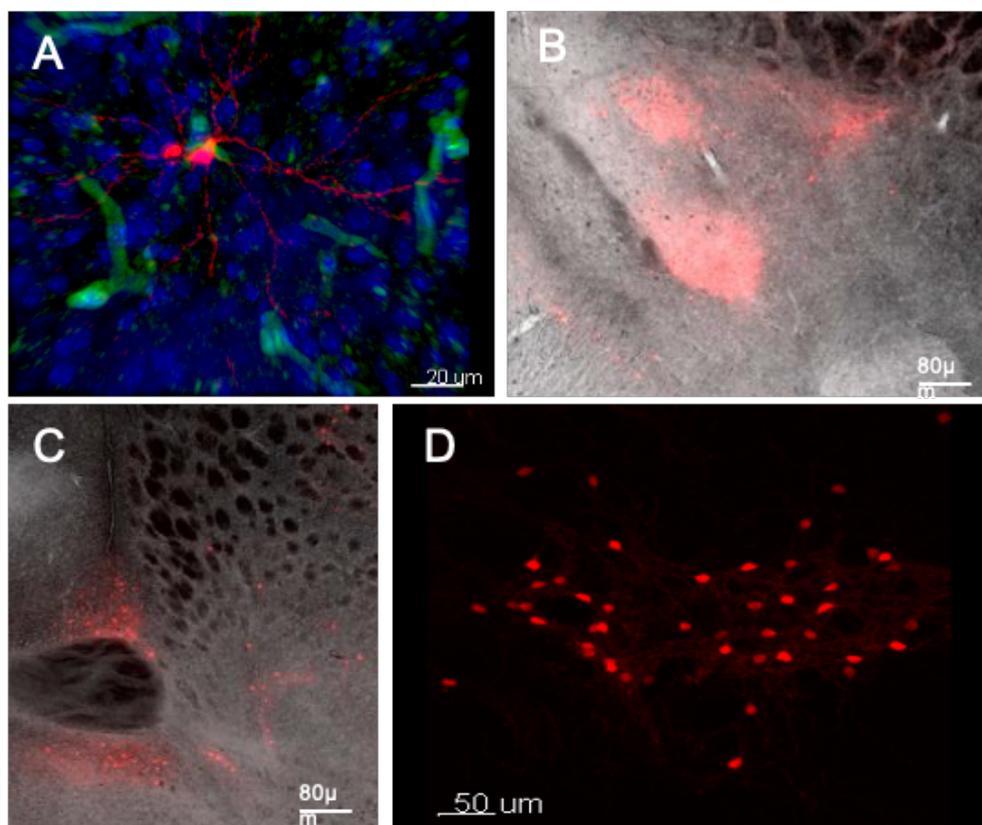
Vergleich des genetischen Aktivitätsmusters der Mikroglia-RNA nach Interaktion mit Ly6G^{-/-} (KO_Mic_N_HOM_KO- und Ly6G^{-/-}-(KO_Mic_N_HET_KO) Neutrophilen Granulozyten. Das Diagramm zeigt keine Änderungen des Aktivitätsmusters auf RNA-Ebene nach Interaktion mit Ly6G-defizienten Neutrophilen Granulozyten.

Ly6G-positive Neurone in Catchup^{IVM-red}-Mäusen

Überraschenderweise haben wir histologisch im Gehirn von Catchup^{IVM-red}-Mäusen rot fluoreszierende Zellen in der Amygdala, Nucleus accumbens und Striatum nachgewiesen (Abbildung 13). Immunhistologische Färbungen mit MAP und NeuN deuteten eindeutig auf das Vorhandensein von Neuronen hin. Erste unveröffentlichte Experimente schließen GABA-erge und Dopamin-erge Neurone aus. Diese Neuronenpopulationen kommen vornehmlich in den oben genannten Hirnregionen vor. Die Rolle von Ly6G in diesen neuronalen Populationen ist derzeit völlig unbekannt und bedarf einer weiterführenden Erforschung.

Die tdTomato-Expression könnte auch durch irreversible tdTomato-Expression in Neuronen aufgrund von LysM-Cre-getriebener Rekombination in neuronalen Vorläuferzellen während der Entwicklung verursacht werden und nicht durch die eigentliche LysM-Promotor-Aktivität.

Abbildung 13 - Catchup^{IVM-red}-positive Neurone in verschiedenen Hirnregionen



A: Catchup^{IVM-red}-positives Neuron (rot), Anfärbung der Zellkerne mit DAPI (blau) und der Kapillaren mit FITC Dextran (grün), B: Catchup^{IVM}-positive Neuronen-Population in der Amygdala, C: der Commissura anterior und dem Nucleus accumbens, sowie D: dem Striatum

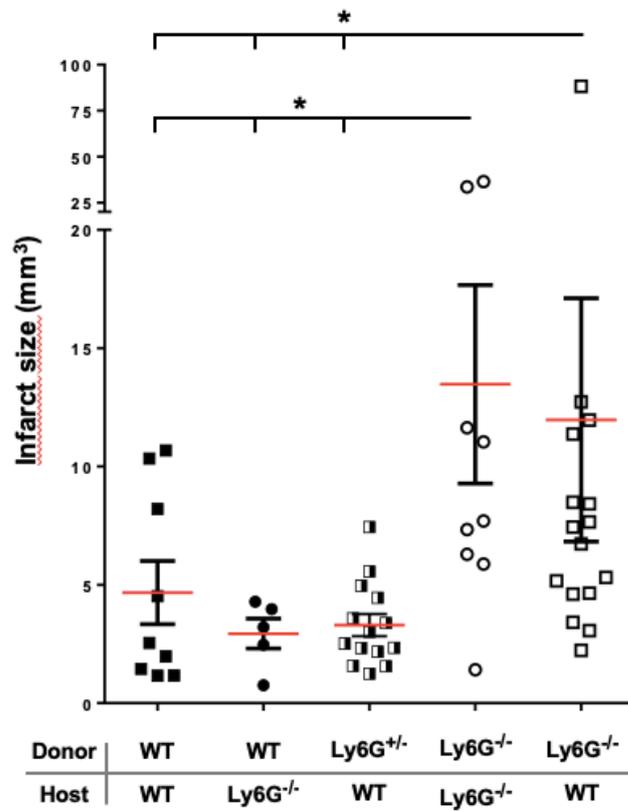
Medulläre Infiltration von Ly6G-defizienten PMN führt zu größeren Hirnparenchym-Schädigungen 24 Stunden nach pMCAO

Bei den vorherigen Ergebnissen sind wir stets davon ausgegangen, dass Ly6G ausschließlich aus der Peripherie in das zerebrale Ischämie-Parenchym infiltriert. Als Zufallsbefund zeigten sich in der Mikroskopie einer unbehandelten Catchup^{IVM-red}-Maus Ly6G-positive Zellen, welche immunhistologisch Neuronen zuzuordnen sind (Abbildung 6). Dies lässt natürlich den Zweifel offen, ob die oben beschriebenen postischämischen Ly6G-abhängigen Effekte ausschließlich und allein den infiltrierten Ly6G-defizienten PMN zu zuschreiben sind. Die hirneigene Ly6G-Produktion ist letztlich genauso wenig geklärt, wie der Einfluss der Ly6G-positiven Zellen darauf.

Um sicherzustellen, dass größere Infarkte ausschließlich durch den Ly6G-Knock-out in PMN vermittelt werden, haben wir eine Versuchsreihe mit Knochenmark-Chimären vom Wildtyp (C57BL/6) oder Ly6G^{-/-}-Wirten generiert, die mit Knochenmark vom Wildtyp, Ly6G^{+/-} oder Ly6G^{-/-}-Mäusen rekonstituiert wurden. Das Infarktvolumen wurde 24 Stunden nach pMCAO ermittelt.

Ähnlich wie bei den vorherigen Ergebnissen zeigt die Beurteilung der Infarktvolumina deutlich größere Volumina bei transgenen Tieren, die Ly6G^{-/-}-Spender-Knochenmark erhielten im Vergleich zu denen die Ly6G^{+/-} und Wildtyp-Knochenmark erhielten (*p<0,05 Ly6G^{-/-} vs. Ly6G^{+/-} vs. WT, Abbildung 14). Dieses Ergebnis zeigt eindeutig, dass ein Einfluss von Ly6G-positiven Zellen auf die Entwicklung der Infarkte ausgeschlossen werden kann. Da Ly6G ausschließlich in PMN innerhalb der Knochenmarkzellpopulationen exprimiert wird, unterstützen die Daten weiterhin die These, dass ein größeres Infarktvolumen durch einen Ly6G-Knock-out in PMN vermittelt wird.

Abbildung 14 - Infarkt volumina 24 Stunden nach pMCAO von Knochenmark-Chimären



Die Bewertung der Infarktgrößen ergab signifikant größere Infarkte von Chimären, die Ly6G^{-/-}-Neutrophile Granulozyten enthielten (*p<0,05 zwischen verschiedenen Chimären). Die Kombination von Wirt und Spender ist auf der x-Achse dargestellt.

Diskussion

In den vergangenen Jahren etablierte sich die Hypothese, dass Neutrophile Granulozyten eine essenzielle Rolle in der Pathophysiologie der zerebralen Ischämie spielen. Es zeigte sich, dass Neutrophile Granulozyten primär in die ischämische Penumbra infiltrieren und an den neurodegenerativen Prozessen beteiligt sind. Im Umkehrschluss wird angenommen, dass eine Reduktion der infiltrierten PMN mit einer Verringerung der neuronalen ischämischen Schädigung bei Ischämie verbunden ist.

Der Beitrag der früh infiltrierenden PMN an der Infarktentstehung und damit zur neuronalen Toxizität wird immer noch intensiv diskutiert^{39,56}. Darüber hinaus ist der Mechanismus der mikroglialen Phagozytose von lebensfähigen Neutrophilen Granulozyten im ischämischen Hirnparenchym nach wie vor nicht vollends geklärt^{30,31}.

Die Phagozytose wurde ursprünglich als Mechanismus zur Nahrungsaufnahme bei Einzellern beobachtet⁸¹. Als Teil unserer angeborenen Immunabwehr dient sowohl der Entfernung von Krankheitserregern als auch von apoptotischen Zellen aus unserem Körper durch professionelle Phagozyten^{82,83}. Unter Phagozyten werden alle Zellen zusammengefasst, die fähig sind, eine Phagozytose durchzuführen. Hierunter fallen Monozyten/Makrophagen, Neutrophile Granulozyten, dendritische Zellen sowie Mikroglia-Zellen⁸³. Die Initiierung der Phagozytose erfolgt durch die direkte Erkennung eines Liganden oder über opsonierende Moleküle.

Durch eine Liganden-Rezeptor-Bindung wird eine intrazelluläre Signalkaskade ausgelöst^{84,85} mit Folge der Remodellierung des Aktin-Zytoskeletts und Ausdehnung der Zellmembran um das Partikel herum⁸⁶⁻⁸⁸. Nach vollständiger Umschließung des Partikels bildet sich das Phagosom, welches sich in Richtung intrazellulärer Vesikel bewegt und dort mit ihnen verschmilzt. Die Vesikel sind mit zytotoxischen Substanzen gefüllt, die die phagozytierten Partikel zerstören⁸⁹. Zwei Rezeptoren sind die am häufigsten beteiligten Rezeptoren an der Phagozytose mit Auslösung unterschiedlicher Kaskaden: Der Fcγ-Rezeptor (FcγR) führt zu einer stark proinflammatorischen Signalkaskade, meist induziert durch Pathogene und der Komplementrezeptor 3 (CR3) führt zu einer antiinflammatorischen Signalkaskade⁹⁰⁻⁹².

Es wurden Arbeiten veröffentlicht, in denen die Migration von Neutrophilen Granulozyten in das ischämische Hirnparenchym blockiert wurde, was zu einer Neuroprotektion führte^{7,24,67}. Diese Studien deuten auf eine neurotoxische Rolle der Neutrophilen Granulozyten bei der zerebralen Ischämie hin. Ihre Bedeutung und vor allem ihre Interaktion mit anderen Zellen innerhalb des ischämischen Gehirns ist bislang noch nicht vollständig verstanden^{7,17,24,67-70}. Ein Schwerpunkt bei der Zellinteraktion während der zerebralen Ischämie liegt auf Mikroglia-Zellen den hirneigenen Immunzellen innerhalb des zentralen Nervensystems^{12,30,31,71,72}. Mikroglia reagieren auf eine neuronale Schädigung und wandern in ihrer aktiven Form in die geschädigte Hirnregion, um dort Krankheitserreger, apoptotische Neurone oder Neutrophile Granulozyten zu phagozytieren und neurotrophe Stimulanzen zur Unterstützung der neuronalen Regeneration abzugeben^{28,33,73}.

Neumann et al. konnten ex vivo an hippocampalen Gewebekulturen nach pMCAO nachweisen, dass Mikroglia-Zellen die Neuroinflammation nach ischämischer Schädigung durch Phagozytose infiltrierender Neutrophiler Granulozyten innerhalb der ischämischen Penumbra reduzieren und die Gewebereparatur weiter fördern. Hier wurde erstmalig auf die Bedeutung der PMN-Reduktion durch Mikroglia-Zellen hingewiesen^{16,30}.

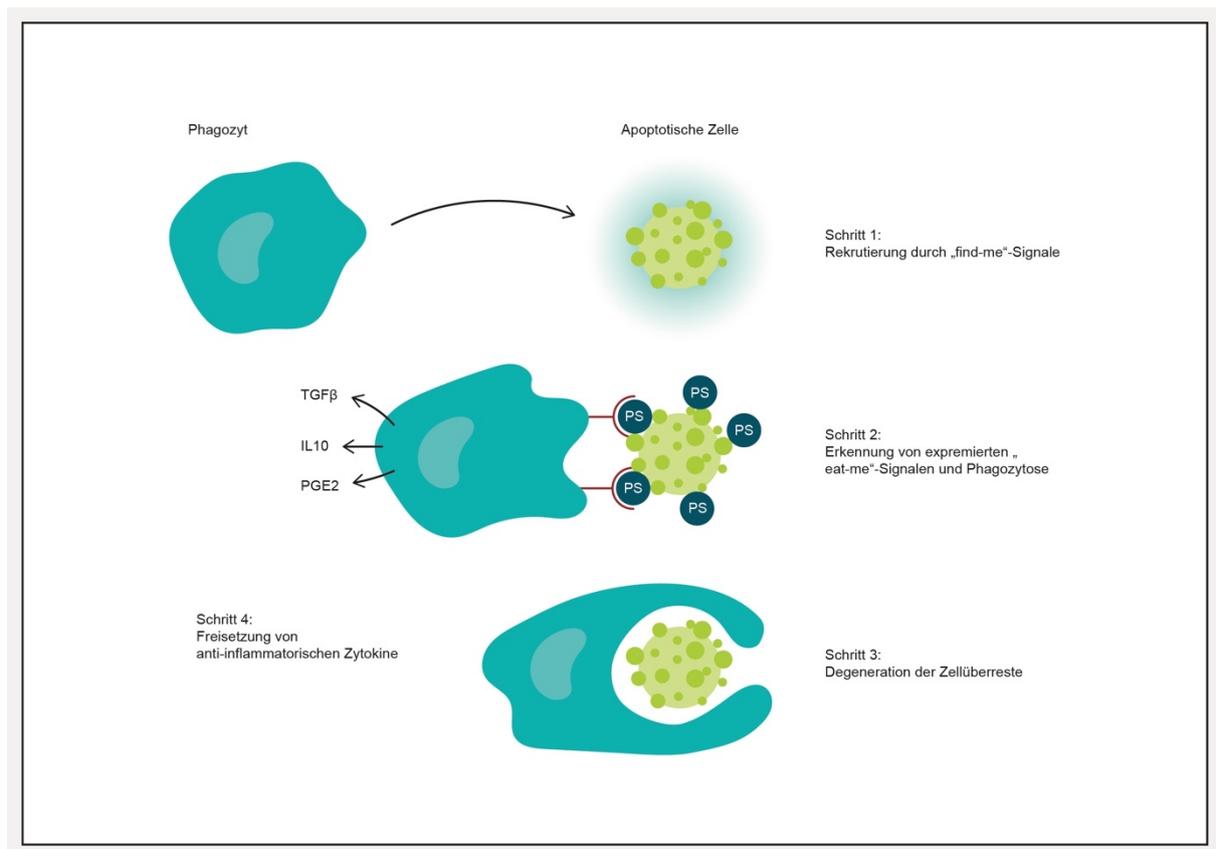
In vitro-Experimente zeigten eine Hemmung der Mikroglia-vermittelten PMN-Phagozytose durch ein Integrin-blockierendes Tetrapeptid namens RGDS (Arg-Gly-Asp-Ser) und den Lektin-Inhibitor N-Acetylglucosamin (GlcNAc). Diese zeigten sich aber unspezifisch und zielten auf ein breites Spektrum von Adhäsionsmolekülen ab^{30,69}. Eine Identifizierung aller molekularen Interaktionen zwischen Mikroglia und Neutrophilen Granulozyten steht weiterhin im Mittelpunkt der zu klärenden Hypothese. Hier konnte bereits gezeigt werden, dass das Very-Late-Antigen-4 (VLA-4) an der Infiltration von Neutrophilen Granulozyten als auch an der Interaktion von mit Mikroglia-Zellen beteiligt ist. Eine Blockade von VLA-4 zeigte eine verringerte Neutrophilen-Infiltration und eine daraus resultierende verminderte Hirnschädigung¹². Eine wesentliche Rolle sollen Integrine bei der Interaktion von Mikroglia und Neutrophilen Granulozyten spielen^{30,47,69,74,75}. Integrine sind α - β -heterodimere Transmembran-Adhäsionsproteine, die die Zell-Zell-Adhäsion und -kommunikation ermöglichen. Sie werden von verschiedenen Zelltypen exprimiert, darunter neuronale Zellen und auch Leukozyten. Die α -Untereinheit bestimmt die Spezifität der Liganden,

während die β -Untereinheit mit dem Zytoskelett und anderen intrazellulären Molekülen verbunden ist, um Signalwege zu vermitteln^{76,77}. Savill et al. zeigten, dass Integrine eine wesentliche Rolle während der Phagozytose spielen. Die Zelloberfläche von apoptotischen Zellen unterscheidet sich von derer gesunder Zellen. Hier zeigten sie, dass Integrine dies erkennen und die Phagozytose apoptotischer Zellen durch Makrophagen vermitteln können^{64,78}.

Die Forschung zur Phagozytose ist in den letzten Jahren immer populärer geworden. Hierbei zeigte sich, dass das Auffinden der sich in Apoptose befindenden Zelle durch lösliche "find-me"-Signale und die Interaktion mit "eat-me"-Signalen auf der von Phagozyten erkannten Oberfläche realisiert wird^{64,65,93-96}.

Die Beteiligung von Ly6G an der Phagozytose von Neutrophilen Granulozyten durch Mikroglia-Zellen könnte ein Hinweis darauf sein, dass Ly6G ein Baustein des „eat-me“-Signals auf Neutrophilen Granulozyten ist. „Eat-me“-Signale sind extrazellulär auf der Oberfläche präsentierte Moleküle, die eine sich in Apoptose befindenden Zelle markieren und von Phagozyten erkannt werden⁹⁴. Das häufigste Molekül ist Phosphatidylserin, ein Bestandteil der inneren Zellmembran der Phospholipid-Doppelschicht. Weitere bekannte „eat-me“-Signale sind Calreticulin, ICAM-3 und ICAM-1^{96,87,88,91}.

Abbildung 15 – „Find-me“-/ „Eat-me“-Signale bei der Apoptose von Zellen



Sich in Apoptose befindende Zellen setzen „find-me“-Signale (z.B. ATP und UTP, Fractalkin, Lysophosphatidylcholin oder Sphingosin-1-phosphat) frei um Phagozyten anzulocken (Schritt 1). Die Phagozyten übertragen Rezeptor-vermittelt „eat-me“- Signale auf apoptotische Zellen. Dies führt zu einer Freisetzung von antiinflammatorischen Zytokinen wie TGF-β, IL-10 und Prostaglandin E2 (Schritt 2). Das intrazelluläre Signal, das durch die Ligand-Rezeptor-Interaktionen innerhalb der Phagozyten induziert wird, führt zu zytoskelettalen Umlagerungen und zur Internalisierung der sterbenden Zelle (Schritt 3)⁹⁵.

Illustration in Anlehnung an Ravichandran et al. 2010.

Es wird diskutiert, ob an der Rezeptorbindung auf dem Phagozyten ein zweites Signal zur Ko-Stimulation notwendig ist⁹⁵. Ly6G könnte ein möglicher Ko-Ligand in der Pathophysiologie der Phagozytose von Neutrophilen Granulozyten bei der zerebralen Ischämie darstellen.

Die Studien von Wang et al. (2012) stellten die Hypothese auf, dass der murine neutrophile Oberflächenmarker Ly6G ebenfalls an der Rekrutierung von Neutrophilen Granulozyten bei Inflammationen beteiligt sein könnte. Sie beobachteten, dass die Antikörperbindung an Ly6G zu einer Hemmung der Neutrophilen-Infiltration in Arthritis-Gewebe führt⁴⁷. Diese Erkenntnis führte zu einer kontroversen Diskussion über die Funktion der Neutrophilen Granulozyten^{24,41,50}. Hasenberg et al. stellten ein

Mausmodell vor, das als Catchup^{IVM-red} bezeichnet wird. Sie ersetzen den Neutrophilen-spezifischen Genlocus Ly6G durch ein Knock-in-Allel, das eine Cre-Rekombinase und das fluoreszierende Protein tdTomato exprimiert⁴¹. So zeigen heterozygote Catchup^{IVM-red}-Mäuse (Ly6G^{+/-}) eine um etwa 50 % reduzierte Expression von Ly6G, während homozygote Catchup^{IVM-red}-Mäuse (Ly6G^{-/-}) für die Ly6G-Expression defizient sind. Dieses neue Mausmodell erlaubt eine gezielte funktionelle Untersuchung der Neutrophilen Granulozyten in vivo. Ihre Studien haben gezeigt, dass weder Heterozygotie noch Ly6G-Defizienz einen signifikanten Einfluss auf die Funktion der Neutrophilen Granulozyten haben und Ly6G somit nicht die Rekrutierung von Neutrophilen Granulozyten in entzündetes Gewebe beeinflusst⁴¹.

Das Rätsel seiner physiologischen Funktion ist noch nicht gelöst. Ly6G ist beim Menschen nicht vorhanden, hat aber eine gewisse Homologie mit dem menschlichen CD177, das zur gleichen Genfamilie gehört^{47,53}. Der aktuelle Forschungsstand zeigt eine Überschneidung der Funktionalität, denn sowohl Ly6G als auch CD177 sind an der Rekrutierung von Neutrophilen Granulozyten beteiligt^{47,54}. CD177 bindet an PECAM-1 und erleichtert dadurch die transendotheliale Migration von Neutrophilen Granulozyten, aber PECAM-1 ist kein Bindungspartner für Ly6G^{30,41,53-55}.

Daher bleibt die Funktion von Ly6G weiterhin umstritten.

Diese Promotionsarbeit wurde in erster Linie konzipiert, um die Interaktion zwischen der mikroglialen Phagozytose von Neutrophilen Granulozyten nach zerebraler Ischämie im Hinblick auf das Neutrophilen-spezifische Oberflächenmolekül Ly6G erstmalig in vivo zu untersuchen und Ly6G anhand dessen zu phänotypisieren^{30,31,79,80}. Dabei wurde der Vorteil des von Hasenberg 2015 neu etablierten Mausmodells Catchup^{IVM-red} mit seiner Möglichkeit zur intravitalem Mikroskopie genutzt^{41,57}.

Wir begannen unsere Forschung mit der Hypothese, dass eine Ly6G-Defizienz mit einer vermehrten Infiltration von Neutrophilen Granulozyten in das ischämische Areal im Vergleich zu Heterozygoten (Ly6G^{+/-}) einhergeht. Um unsere Hypothese zu stützen, führten wir bei Ly6G^{+/-}- und Ly6G^{-/-}-Mäusen eine permanente zerebrale Ischämie mittels pMCAO durch. In vitro konnten so mittels FACS-Analyse quantitativ signifikant mehr Ly6G-defiziente (Ly6G^{-/-}) Neutrophile Granulozyten nach 24 Stunden festgestellt werden im Vergleich zu Ly6G^{+/-}-Neutrophile Granulozyten (Abbildung 6). Somit

können wir unsere Hypothese bestätigen und einer Ly6G-Defizienz eine vermehrte PMN-Infiltration in ischämische Hirnparenchym-Areale zuschreiben. Somit scheint Ly6G eine neuroprotektive Eigenschaft zu haben, da es Neutrophile Granulozyten aus bislang unklaren Gründen an deren Infiltration bei Neuroinflammation hindert.

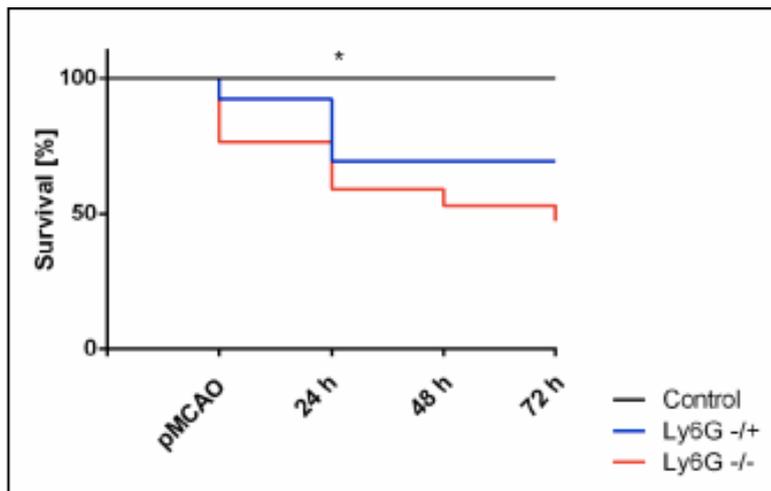
Ergänzend zu unserer initialen Hypothese, postulierten wir schlussfolgernd aus den bislang beobachteten Ergebnissen, dass eine vermehrte Infiltration von Ly6G^{-/-}-PMN auch zu einem größeren Parenchymschaden nach pMCAO führt.

Hierzu haben wir das ischämische Hirnparenchym von Ly6G^{-/-}- und Ly6G^{+/-}-Mäusen gemessen über die Zeit untersucht (Abbildung 7). 12 Stunden nach pMCAO zeigte sich kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Bereits 24 Stunden nach pMCAO zeigten sich bei Ly6G^{-/-}-Mäusen signifikant größere Infarkt volumina als bei vergleichbaren Ly6G^{+/-}-Mäusen. Auch 72 Stunden nach pMCAO war die Infarktgröße bei Ly6G^{-/-}-Mäusen signifikant größer als bei Ly6G^{+/-}-Mäusen und Wildtypen.

Die Daten deuten darauf hin, dass die Anzahl der infiltrierten PMN positiv mit der Infarktgröße korreliert. Das Vorhandensein von akkumulierten Neutrophilen Granulozyten im Infarktgebiet wurde bereits diskutiert⁶⁷. Daher gehen wir davon aus, dass Neutrophile Granulozyten in das Gehirn infiltrieren und sich im verletzten Gewebe anreichern und so die Neurodegeneration fördern, was zu größeren Infarkt volumina führt. In unserem Experiment konnten wir zeigen, dass Ly6G einen neuroprotektiven Effekt auf die Infarktgröße hat.

Diese Beobachtung korreliert mit den verringerten Überlebensquoten bei Ly6G^{-/-}-Mäusen, welche ebenfalls nach 24 Stunden post pMCAO (Abbildung 16). Daraus schließen wir, dass die verringerten Überlebensquoten auf die erhöhten Infarkt volumina zurückzuführen sind.

Im Umkehrschluss lässt sich annehmen, dass wenn Ly6G^{-/-}-Mäuse 72 Stunden nach pMCAO überleben würden, würde das Infarktvolumen für diesen Zeitpunkt voraussichtlich weiter zunehmen würde.

Abbildung 16 - Überlebensquoten von Ly6G^{-/-}- und Ly6G^{+/-}-Mäusen nach pMCAO über die Zeit

C57BL/6-Kontrollmäuse (N = 5) zeigen eine 100-prozentige Überlebensrate vom Tag der Operation bis 3 Tage nach der Operation (schwarz). Ly6G^{+/-} (N = 13, blau) und Ly6G^{-/-} (N = 16, rot) Mäuse zeigen im Vergleich zu den Kontrollen signifikant verminderte Überlebensanteile (Logrank-Test für Trend, p-Wert 0,0309, *).

Etwa 60% der Ly6G^{-/-}-Mäuse überlebten 24 Stunden nach der Operation nicht.

(Mit freundlicher Genehmigung aus Richter, Interaction of Microglia and Neutrophils in Cerebral Ischemia: Role of Ly6G, 2016)

Um die mikrogliale Phagozytose von Ly6G-defizienten Neutrophilen Granulozyten *in vitro* zu untersuchen, haben wir eine Mischkultur aus medullären Catchup^{IVM-red}-PMN und Mikroglia-Zellen aus C57BL/6-Mäusen erstellt, welche zuvor mit unterschiedlichen intrazellulären Farbstoffen markiert wurden. Dies ermöglicht uns die Phagozytose von PMN *in vitro* via Konfokalmikroskopie beobachten zu können.

Es zeigte sich, dass die Mikroglia-Zellen signifikant weniger Ly6G-defiziente (Ly6G^{-/-}) Neutrophile Granulozyten im Vergleich zu Ly6G^{+/-}- und Wildtyp-Neutrophilen Granulozyten phagozytierten.

In Anbetracht einer Phänotypisierung von Ly6G zeigt diese Beobachtung, dass Ly6G an der Interaktion zwischen Mikroglia-Zellen und Neutrophilen Granulozyten und auch an der Phagozytose von PMN beteiligt ist. Bereits eine 50%-ige Ly6G-Syntheserate reicht aus, um eine nahezu gleichwertige Phagozytoserate wie beim Wildtyp zu erreichen.

Nachdem wir nun eine Mikroglia-PMN-Interaktion *in vitro* nachweisen konnten, verwendeten wir das neuartige genetische Mausmodell Catchup^{IVM-red}, um diese Interaktion erstmalig *in vivo* zu zeigen. Durch dieses Mausmodell ist es uns erstmalig möglich endogen rot gefärbte PMN für die intravitale Zwei-Photonen-Mikroskopie selektiv und spezifisch zu visualisieren.

Zum Ausschluss jeglicher Störfaktoren erstellten wir Knochenmark-Chimären mit aus Catchup^{IVM-red}-Mäusen und CX3CR1-eGFP-Mäusen. So erzeugten wir ein transgenes Mausmodell mit strahlenresistenten grün fluoreszierenden Mikroglia-Zellen und rot fluoreszierenden Neutrophilen Granulozyten.

Nach erfolgter Photothrombose zur Induktion einer fokal-lokalen Ischämie zeigten sich intravital umfangreiche Zell-Zell-Kontakte von bis zu mehreren Minuten zwischen eGFP-positiven Mikroglia-Zellen und tdTomato-positiven Neutrophilen Granulozyten (Abbildung 9 A und A'). Auch eine aktive Ausdehnung der mikroglialen Ausläufer in Richtung PMN konnte beobachtet werden (Abbildung 9 B). Im Hirnparenchym konnten mehrere aktivierte Mikroglia-Zellen, die ein oder mehrere infiltrierte PMN eindeutig phagozytiert haben beobachtet werden (Abbildung 9 C und D).

Entgegen der kontrovers diskutierten Infiltration von Neutrophilen Granulozyten bei Neuroinflammation^{57,39,50} konnten wir durch das Zusammenspiel eines suffizienten transgenen Mausmodells und einer leistungsstarken intravitalem Bildgebung eine spezifische Interaktion in vivo zwischen postischämisch infiltrierte PMN und Mikroglia-Zellen nachweisen und sogar die Phagozytose von PMN durch Mikroglia-Zellen beobachten.

Um die in vivo Beobachtungen qualitativ zu untermauern, wurden zusätzliche Knochenmark-Chimären aus Catchup^{IVM-red}-Mäusen und C57BL6-Mäusen erstellt. Nach erfolgter pMCAO konnte so die postischämische PMN-Infiltration in das ischämische Hirnparenchym qualitativ untersucht werden. Die Kollegen um Enzmann et al. bezweifeln eine Infiltration der Neutrophilen Granulozyten in das Hirnparenchym und beobachteten eher eine Akkumulation intra- und perivaskulär³⁹. Um den Nachweis zu erbringen, dass Neutrophile Granulozyten nach intraparenchymal migrieren, erfolgte die Bestimmung der exakten Lokalisation der PMN durch eine Anfärbung der Endothelzellen mit FITC-gekoppeltem STL ex vivo. So ließen sich die PMN und Endothelzellen eindeutig voneinander abgrenzen und visualisieren. 24 Stunden nach pMCAO entdeckten wir tdTomato-positive PMN im Kapillarbett des betroffenen Hirnparenchyms (Abbildung 10 A und B).

Die Auswertung ergibt vornehmlich eine Lokalisation der beweglichen PMN intraparenchymal und nicht perivaskulär (Abbildung 10 C). Wir konnten erstmals mit dem Catchup^{IVM-red}-Mausmodell vitale Neutrophile Granulozyten intraparenchymal im ischämisch geschädigten Gehirn nachweisen. Diese Beobachtung bestärkt unsere

quantitative FACS-Messung, bei der wir mehr PMN-Infiltration bei Ly6G^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu Ly6G^{+/-}-Mäusen 24 Stunden nach pMCAO entdecken konnten.

Da Ly6G ein GPI-verankertes Protein⁴⁷ auf der PMN-Oberfläche ist und Teil der Zell-Zell-Kommunikation und auch an der Phagozytose beteiligt ist, wird der Gedanke an einen molekularen Interaktionspartner immer stärker^{42-44,47,50,52}.

In dieser Arbeit konnten wir Ly6G im Rahmen der mikroglialen Phagozytose von postinflammatorisch infiltrierten PMN phänotypisieren. Dabei ist eine Beteiligung als Interaktionspartner immer mehr in den Vordergrund gerückt. Um diese Beteiligung auf Molekularebene festzustellen, haben wir das genetische Aktivitätsmuster der Mikroglia-RNA nach der Interaktion mit Ly6G^{-/-}- und Ly6G^{+/-}-Neutrophilen Granulozyten durch eine Transkriptom-Analyse untersucht⁶⁶. Eine Differenz zwischen dem Transkriptom von inaktiven und aktiven Mikroglia-Zellen könnte so einen Hinweis auf einen potentiellen Liganden von Ly6G geben.

Das Ergebnis der Analyse von Mikroglia-Zellen, die mit Ly6G^{+/-} PMN und Ly6G^{-/-} PMN exponiert wurden, zeigte jedoch keinen signifikanten Unterschied auf RNA-Ebene und somit in ihren Aktivierungszuständen (Abbildung 12). Bislang bleibt der Bindungspartner von Ly6G weiterhin unbekannt.

Überraschenderweise entdeckten wir bei den histologischen Untersuchungen von Hirngewebsschnitten einer nativen Catchup^{IVM-red}-Maus Ly6G-positive Zellen in der Amygdala, im Nucleus accumbens und im Striatum, welche immunhistologisch Neuronen zuzuordnen sind. Die Funktion von Ly6G in diesen Zellen ist nicht bekannt. Um Zweifel an einer hirneigenen Ly6G-Produktion zu beseitigen, welche wiederum die von uns postulierten postischämischen Ly6G-abhängigen Effekte infrage stellen könnten, wurden verschiedene Knochenmark-Chimären generiert, wodurch der Einfluss einer hirneigenen Ly6G-positiven Zellpopulation auf die Infarktentstehung ausgeschlossen werden konnte. 24 Stunden nach pMCAO wurde das Infarktvolumen gemessen.

Die Bewertung der Infarktgrößen ergab ähnlich wie in den Vorexperimenten signifikant größere Infarkte von transgenen Tieren, die Ly6G^{-/-}-Spender-Knochenmark erhielten im Vergleich zu denen die Ly6G^{+/-}- und Wildtyp-Knochenmark erhielten (Abbildung 14).

Dieses Ergebnis zeigt eindeutig, dass ein Einfluss von intrazerebralen Ly6G-positiven Zellen auf die Entwicklung der Infarkte ausgeschlossen werden kann. Da Ly6G ausschließlich auf Neutrophilen Granulozyten innerhalb der Knochenmarkzellpopulationen exprimiert wird, unterstützen diese Ergebnisse weiterhin die These, dass ein größeres Infarktvolumen durch einen Ly6G-Knock-out in PMN vermittelt wird.

Die Transkriptom-Analyse in unseren Experimenten lieferte leider keinen Hinweis auf eine de novo-Proteinsynthese in den Mikroglia-Zellen während der Phagozytose von Neutrophilen Granulozyten. Somit haben wir weiterhin keinen Hinweis auf einen möglichen Bindungspartner von Ly6G gefunden.

Zukünftige Studien sollten darauf abzielen, Ly6G als mögliches „eat-me“-Signal in der Phagozytose von Neutrophilen Granulozyten aus Mikroglia oder Neutrophilen zu identifizieren. Hierzu könnte die Einzelzell-RNA-Sequenzierung (scRNA-Seq) herangezogen werden⁹⁷. Diese kostengünstige, spezifische Untersuchung der Einzelzellgenomik ermöglicht eine neuartige Identifizierungsmöglichkeit (sub-) zellulärer Regulatormoleküle biologischer Prozesse. Hierzu werden mRNA-Expressionsmuster einzelner Zellen genutzt, um unterschiedliche Zelltypen, Zellzustände oder Phänotypen innerhalb einer Zellpopulation aufzudecken.

Mit der scRNA-Seq könnten selektive Untersuchungen der Mikroglia-Zellen mit Neutrophilen-Phagozytose und der ohne Phagozytose auf RNA-Ebene erfolgen. Der Idee nach könnten so Regulatorproteine der aktiven Mikroglia-Zellen nach Phagozytose von PMN im Vergleich zu den nicht-aktiven Mikroglia-Zellen ohne Phagozytose aufgezeigt und ein möglicher Bindungspartner von Ly6G identifiziert werden.

Erstmals konnte das murine neutrophile Oberflächenmolekül Ly6G anhand des neuartigen transgenen Mausmodells C57BL/6^{Ly6g(tm2621(Cre-tdTomato)Arte}, auch Catchup^{IVM-red} genannt, phänotypisiert werden. Die Experimente konnten eindeutig eine Beteiligung an der mikroglialen Phagozytose von PMN während einer zerebralen Ischämie belegen.

Zweifellos sind die Ergebnisse in dieser Studie wegweisend in der Physiologie von Ly6G in Zusammenhang mit neuroinflammatorischen Prozessen. Die Ergebnisse der in vitro und in vivo- Experimente konnten eindeutig eine Beteiligung von Ly6G an der

Mikroglia-Neutrophilen-Interaktion belegen. Leider konnte bislang kein suffizienter Hinweis auf einen möglichen Bindungspartner für Ly6G erbracht werden. Hierzu sind weitere Studien notwendig, um das Gegenstück von Ly6G auf Molekularebene zu identifizieren.

Die Darstellung der Ly6G-abhängigen Mikroglia-Neutrophilen-Interaktion auf molekularer Ebene könnte den Weg zu neuen Behandlungsmöglichkeiten des Schlaganfalls ebnen und so das Outcome nach einem Schlaganfall verbessern.

Zusammenfassung

Im Laufe eines Jahrzehnts hat sich die Pathophysiologie der zerebralen Ischämie zu einem umfangreichen Forschungsgebiet entwickelt. Bis heute zeigen die meisten Studien, dass Neutrophile Granulozyten zur Schädigung neuronalen Gewebes beitragen und dadurch eine neuropathogene Funktion bei zerebraler Ischämie einnehmen.

Diese Studie identifiziert Ly6G einen charakteristischen Oberflächenmarker für Neutrophile Granulozyten als einen wesentlichen Regulator, der die Interaktion zwischen Neutrophilen Granulozyten und Mikroglia-Zellen vermittelt. Diese Zell-Zell-Interaktion beeinflusst die neurologische Schädigung durch den Schlaganfall.

Unter der Verwendung von C57BL/6^{Ly6g(tm2621(Cre-tdTomato)Arte}-Mäusen konnten wir qualitativ und quantitativ die PMN-Infiltration, eine mikrogliale Phagozytose und das Ausmaß des daraus resultierenden parenchymalen Schadens *in vitro* und *in vivo* untersuchen.

Zunächst zeigen unsere Studien, dass Mikroglia und Neutrophile Granulozyten *in vitro* miteinander in Kontakt treten (Abbildung 9). Wir konnten zeigen, dass Mikroglia Neutrophile Granulozyten *in vitro* und *in vivo* phagozytieren (Abbildung 8).

Hieraus schlussfolgerten wir, dass Ly6G eine wesentliche Rolle bei der Interaktion zwischen Mikroglia-Zellen und Neutrophilen Granulozyten spielt, und wir gehen davon aus, dass diese Beobachtung eine Erklärung für den schwerwiegenden Verlauf der zerebralen Ischämie bei Ly6G-Mangel bei Mäusen liefern könnte. *In vitro*-Ergebnisse zeigten qualitativ und quantitativ eine vermehrte intraparenchymale Infiltration von Ly6G-defizienten PMN, was mit einem größeren Parenchymschaden und einer hiermit verbundenen erhöhten Letalität einhergeht. Es konnte ausgeschlossen werden, dass intrazerebrale Ly6G-positive Zellpopulationen einen Einfluss auf diesen Phänotyp hatten.

Insgesamt identifiziert diese Arbeit Ly6G als einen Schlüsselakteur für die Interaktion zwischen Mikroglia-Zellen und Neutrophilen Granulozyten, die eine wesentliche Rolle in der Pathogenese der zerebralen Ischämie bei Mäusen spielt.

Die Beobachtungen gehen davon aus, dass die neuroprotektive Funktion von Ly6G einen wesentlichen Einfluss auf das Outcome einer zerebralen Ischämie hat.

Ehrenerklärung

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

**„Der neuroprotektive Effekt von Ly6G in
einem Schlaganfall-Modell - eine Phänotypisierung "**

im Institut für Molekulare und Klinische Immunologie
der Medizinischen Fakultät

der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

in Kooperation mit dem Deutschen Institut für Neurodegenerative Erkrankungen e.V.
(DZNE) Magdeburg

mit Unterstützung durch Frau Dr. Monika Riek-Burchardt und Prof. Dr. sc. Andreas Müller

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Berlin, den 01.07.2021



Niklas Nolte

Erklärung zur strafrechtlichen Verurteilung

Ich erkläre hiermit, nicht wegen einer Straftat verurteilt worden zu sein, die Wissenschaftsbezug hat.

Berlin, den 01.07.2021

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Nolte' with a stylized flourish at the end.

Niklas Nolte

Literaturverzeichnis

1. Virani SS, Alonso A, Benjamin EJ, Bittencourt MS, Callaway CW, Carson AP, Chamberlain AM, Chang AR, Cheng S, Delling FN and others. Heart Disease and Stroke Statistics-2020 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation* 2020;141(9):e139-e596.
2. Rosamond W, Flegal K, Friday G, Furie K, Go A, Greenlund K, Haase N, Ho M, Howard V, Kissela B and others. Heart disease and stroke statistics--2007 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation* 2007;115(5):e69-171.
3. Doyle KP, Simon RP, Stenzel-Poore MP. Mechanisms of ischemic brain damage. *Neuropharmacology* 2008;55(3):310-8.
4. Kunz A, Dirnagl U, Mergenthaler P. Acute pathophysiological processes after ischaemic and traumatic brain injury. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol* 2010;24(4):495-509.
5. Norrving B, Kissela B. The global burden of stroke and need for a continuum of care. *Neurology* 2013;80(3 Suppl 2):S5-12.
6. Lopez AD, Mathers CD, Ezzati M, Jamison DT, Murray CJL. Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data. *The Lancet* 2006;367(9524):1747-1757.
7. Perez-de-Puig I, Miro-Mur F, Ferrer-Ferrer M, Gelpi E, Pedragosa J, Justicia C, Urra X, Chamorro A, Planas AM. Neutrophil recruitment to the brain in mouse and human ischemic stroke. *Acta Neuropathol* 2015;129(2):239-57.
8. Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* 1999;22(9):391-7.
9. Lee Y, Lee SR, Choi SS, Yeo HG, Chang KT, Lee HJ. Therapeutically targeting neuroinflammation and microglia after acute ischemic stroke. *Biomed Res Int* 2014;2014:297241.
10. Astrup J, Siesjö BK, Symon L. Thresholds in cerebral ischemia - the ischemic penumbra. *Stroke* 1981;12(6):723-5.
11. Wang Q, Tang XN, Yenari MA. The inflammatory response in stroke. *J Neuroimmunol* 2007;184(1-2):53-68.
12. Neumann J, Riek-Burchardt M, Herz J, Doeppner TR, König R, Hutten H, Etemire E, Mann L, Klingberg A, Fischer T and others. Very-late-antigen-4

- (VLA-4)-mediated brain invasion by neutrophils leads to interactions with microglia, increased ischemic injury and impaired behavior in experimental stroke. *Acta Neuropathol* 2015;129(2):259-77.
13. Hurn PD, Subramanian S, Parker SM, Afentoulis ME, Kaler LJ, Vandenberg AA, Offner H. T- and B-cell-deficient mice with experimental stroke have reduced lesion size and inflammation. *J Cereb Blood Flow Metab* 2007;27(11):1798-805.
 14. Ross AM, Hurn P, Perrin N, Wood L, Carlini W, Potempa K. Evidence of the Peripheral Inflammatory Response in Patients With Transient Ischemic Attack. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases* 2007;16(5):203-207.
 15. Tarozzo G, Campanella M, Ghiani M, Bulfone A, Beltramo M. Expression of fractalkine and its receptor, CX3CR1, in response to ischaemia-reperfusion brain injury in the rat. *Eur J Neurosci* 2002;15(10):1663-8.
 16. Neumann J, Gunzer M, Gutzeit HO, Ullrich O, Reymann KG, Dinkel K. Microglia provide neuroprotection after ischemia. *FASEB J* 2006;20(6):714-6.
 17. Kubes P. The enigmatic neutrophil: what we do not know. *Cell Tissue Res* 2018.
 18. Matsuo Y, Onodera H, Shiga Y, Nakamura M, Ninomiya M, Kihara T, Kogure K. Correlation between myeloperoxidase-quantified neutrophil accumulation and ischemic brain injury in the rat. Effects of neutrophil depletion. *Stroke* 1994;25(7):1469-75.
 19. Pelus LM, Bian H, King AG, Fukuda S. Neutrophil-derived MMP-9 mediates synergistic mobilization of hematopoietic stem and progenitor cells by the combination of G-CSF and the chemokines GRObeta/CXCL2 and GRObetaT/CXCL2delta4. *Blood* 2004;103(1):110-9.
 20. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 2004;303(5663):1532-5.
 21. Ruhnau J, Schulze K, Gaida B, Langner S, Kessler C, Bröker B, Dressel A, Vogelgesang A. Stroke Alters Respiratory Burst in Neutrophils and Monocytes. *Stroke* 2014;45(3):794-800.
 22. Ruhnau J, Schulze J, Dressel A, Vogelgesang A. Thrombosis, Neuroinflammation, and Poststroke Infection: The Multifaceted Role of Neutrophils in Stroke. *J Immunol Res* 2017;2017:5140679.

23. Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, Weinrauch Y, Brinkmann V, Zychlinsky A. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol* 2007;176(2):231-41.
24. Strecker JK, Schmidt A, Schabitz WR, Minnerup J. Neutrophil granulocytes in cerebral ischemia - Evolution from killers to key players. *Neurochem Int* 2017;107:117-126.
25. Wang Y, Li M, Stadler S, Correll S, Li P, Wang D, Hayama R, Leonelli L, Han H, Grigoryev SA and others. Histone hypercitullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. *Journal of Cell Biology* 2009;184(2):205-213.
26. Huang J, Upadhyay UM, Tamargo RJ. Inflammation in stroke and focal cerebral ischemia. *Surg Neurol* 2006;66(3):232-45.
27. Meisel C, Schwab JM, Prass K, Meisel A, Dirnagl U. Central nervous system injury-induced immune deficiency syndrome. *Nature Reviews Neuroscience* 2005;6(10):775-786.
28. Weitz TM, Town T. Microglia in Alzheimer's Disease: It's All About Context. *Int J Alzheimers Dis* 2012;2012:314185.
29. Aktas O, Ullrich O, Infante-Duarte C, Nitsch R, Zipp F. Neuronal damage in brain inflammation. *Arch Neurol* 2007;64(2):185-9.
30. Neumann J, Sauerzweig S, Ronicke R, Gunzer F, Dinkel K, Ullrich O, Gunzer M, Reymann KG. Microglia cells protect neurons by direct engulfment of invading neutrophil granulocytes: a new mechanism of CNS immune privilege. *J Neurosci* 2008;28(23):5965-75.
31. Neumann J, Henneberg S, von Kenne S, Nolte N, Muller AJ, Schraven B, Gortler MW, Reymann KG, Gunzer M, Riek-Burchardt M. Beware the intruder: Real time observation of infiltrated neutrophils and neutrophil-Microglia interaction during stroke in vivo. *PLoS One* 2018;13(3):e0193970.
32. Shigemoto-Mogami Y, Hoshikawa K, Goldman JE, Sekino Y, Sato K. Microglia Enhance Neurogenesis and Oligodendrogenesis in the Early Postnatal Subventricular Zone. *The Journal of Neuroscience* 2014;34(6):2231-2243.
33. Kettenmann H, Hanisch UK, Noda M, Verkhratsky A. Physiology of microglia. *Physiol Rev* 2011;91(2):461-553.

34. Chamorro A, Dirnagl U, Urra X, Planas AM. Neuroprotection in acute stroke: targeting excitotoxicity, oxidative and nitrosative stress, and inflammation. *Lancet Neurol* 2016;15(8):869-881.
35. Mitrasinovic OM, Grattan A, Robinson CC, Lapustea NB, Poon C, Ryan H, Phong C, Murphy GM, Jr. Microglia overexpressing the macrophage colony-stimulating factor receptor are neuroprotective in a microglial-hippocampal organotypic coculture system. *J Neurosci* 2005;25(17):4442-51.
36. Szalay G, Martinecz B, Lenart N, Kornyei Z, Orsolits B, Judak L, Csaszar E, Fekete R, West BL, Katona G and others. Microglia protect against brain injury and their selective elimination dysregulates neuronal network activity after stroke. *Nat Commun* 2016;7:11499.
37. Nguyen HX, O'Barr TJ, Anderson AJ. Polymorphonuclear leukocytes promote neurotoxicity through release of matrix metalloproteinases, reactive oxygen species, and TNF- α . *Journal of Neurochemistry* 2007;102(3):900-912.
38. Ullrich N, Strecker J-K, Minnerup J, Schilling M. The temporo-spatial localization of polymorphonuclear cells related to the neurovascular unit after transient focal cerebral ischemia. *Brain Research* 2014;1586:184-192.
39. Enzmann G, Mysiorek C, Gorina R, Cheng YJ, Ghavampour S, Hannocks MJ, Prinz V, Dirnagl U, Endres M, Prinz M and others. The neurovascular unit as a selective barrier to polymorphonuclear granulocyte (PMN) infiltration into the brain after ischemic injury. *Acta Neuropathol* 2013;125(3):395-412.
40. Jung S, Aliberti J, Graemmel P, Sunshine MJ, Kreutzberg GW, Sher A, Littman DR. Analysis of fractalkine receptor CX(3)CR1 function by targeted deletion and green fluorescent protein reporter gene insertion. *Mol Cell Biol* 2000;20(11):4106-14.
41. Hasenberg A, Hasenberg M, Mann L, Neumann F, Borkenstein L, Stecher M, Kraus A, Engel DR, Klingberg A, Seddigh P and others. Catchup: a mouse model for imaging-based tracking and modulation of neutrophil granulocytes. *Nat Methods* 2015;12(5):445-52.
42. Bucher K, Schmitt F, Autenrieth SE, Dillmann I, Nurnberg B, Schenke-Layland K, Beer-Hammer S. Fluorescent Ly6G antibodies determine macrophage phagocytosis of neutrophils and alter the retrieval of neutrophils in mice. *J Leukoc Biol* 2015;98(3):365-72.
43. Hickey MJ. Has Ly6G finally found a job? *Blood* 2012;120(7):1352-3.

44. Lee PY, Wang JX, Parisini E, Dascher CC, Nigrovic PA. Ly6 family proteins in neutrophil biology. *J Leukoc Biol* 2013;94(4):585-94.
45. Fleming TJ, Fleming ML, Malek TR. Selective expression of Ly-6G on myeloid lineage cells in mouse bone marrow. RB6-8C5 mAb to granulocyte-differentiation antigen (Gr-1) detects members of the Ly-6 family. *J Immunol* 1993;151(5):2399-408.
46. Loughner CL, Bruford EA, McAndrews MS, Delp EE, Swamynathan S, Swamynathan SK. Organization, evolution and functions of the human and mouse Ly6/uPAR family genes. *Hum Genomics* 2016;10:10.
47. Wang JX, Bair AM, King SL, Shnyder R, Huang YF, Shieh CC, Soberman RJ, Fuhlbrigge RC, Nigrovic PA. Ly6G ligation blocks recruitment of neutrophils via a beta2-integrin-dependent mechanism. *Blood* 2012;120(7):1489-98.
48. Abbitt KB, Cotter MJ, Ridger VC, Crossman DC, Hellewell PG, Norman KE. Antibody ligation of murine Ly-6G induces neutropenia, blood flow cessation, and death via complement-dependent and independent mechanisms. *J Leukoc Biol* 2009;85(1):55-63.
49. Schittenhelm L, Hilkens CM, Morrison VL. beta2 Integrins As Regulators of Dendritic Cell, Monocyte, and Macrophage Function. *Front Immunol* 2017;8:1866.
50. Yipp BG, Kubes P. Antibodies against neutrophil LY6G do not inhibit leukocyte recruitment in mice in vivo. *Blood* 2013;121(1):241-2.
51. Faust N, Varas F, Kelly LM, Heck S, Graf T. Insertion of enhanced green fluorescent protein into the lysozyme gene creates mice with green fluorescent granulocytes and macrophages. *Blood* 2000;96(2):719-26.
52. Nigrovic PA. Ly6G: a work in progress--author's reply to Yipp. *Blood* 2013;121(1):242-3.
53. Bai M, Grieshaber Bouyer R, Wang J, Schmider A, Wilson Z, Zeng L, Halyabar O, Godin M, Nguyen H, Levescot A and others. CD177 modulates human neutrophil migration through activation-mediated integrin and chemoreceptor regulation. *Blood* 2017;130(19):2092-2100.
54. Bayat B, Werth S, Sachs UJ, Newman DK, Newman PJ, Santoso S. Neutrophil transmigration mediated by the neutrophil-specific antigen CD177 is influenced by the endothelial S536N dimorphism of platelet endothelial cell adhesion molecule-1. *J Immunol* 2010;184(7):3889-96.

55. Sachs UJ, Andrei-Selmer CL, Maniar A, Weiss T, Paddock C, Orlova VV, Choi EY, Newman PJ, Preissner KT, Chavakis T and others. The neutrophil-specific antigen CD177 is a counter-receptor for platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31). *J Biol Chem* 2007;282(32):23603-12.
56. Hermann DM, Kleinschnitz C, Gunzer M. Implications of polymorphonuclear neutrophils for ischemic stroke and intracerebral hemorrhage: Predictive value, pathophysiological consequences and utility as therapeutic target. *J Neuroimmunol* 2018;321:138-143.
57. Hermann DM, Kleinschnitz C, Gunzer M. Role of polymorphonuclear neutrophils in the reperfused ischemic brain: insights from cell-type-specific immunodepletion and fluorescence microscopy studies. *Ther Adv Neurol Disord* 2018;11:1756286418798607.
58. Szymczak AL, Workman CJ, Wang Y, Vignali KM, Dilioglou S, Vanin EF, Vignali DA. Correction of multi-gene deficiency in vivo using a single 'self-cleaving' 2A peptide-based retroviral vector. *Nat Biotechnol* 2004;22(5):589-94.
59. Turrin NP, Plante MM, Lessard M, Rivest S. Irradiation does not compromise or exacerbate the innate immune response in the brains of mice that were transplanted with bone marrow stem cells. *Stem Cells* 2007;25(12):3165-72.
60. Kuraoka M, Furuta T, Matsuwaki T, Omatsu T, Ishii Y, Kyuwa S, Yoshikawa Y. Direct experimental occlusion of the distal middle cerebral artery induces high reproducibility of brain ischemia in mice. *Exp Anim* 2009;58(1):19-29.
61. Lee JK, Park MS, Kim YS, Moon KS, Joo SP, Kim TS, Kim JH, Kim SH. Photochemically induced cerebral ischemia in a mouse model. *Surg Neurol* 2007;67(6):620-5; discussion 625.
62. Nolan JP, Condello D. Spectral flow cytometry. *Curr Protoc Cytom* 2013;Chapter 1:Unit1 27.
63. Paddock SW, Eliceiri KW. Laser scanning confocal microscopy: history, applications, and related optical sectioning techniques. *Methods Mol Biol* 2014;1075:9-47.
64. Savill J, Dransfield I, Gregory C, Haslett C. A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. *Nat Rev Immunol* 2002;2(12):965-75.
65. Ravichandran KS. Beginnings of a good apoptotic meal: the find-me and eat-me signaling pathways. *Immunity* 2011;35(4):445-55.

66. Jiang Z, Zhou X, Li R, Michal JJ, Zhang S, Dodson MV, Zhang Z, Harland RM. Whole transcriptome analysis with sequencing: methods, challenges and potential solutions. *Cell Mol Life Sci* 2015;72(18):3425-39.
67. Emerich DF, Dean RL, 3rd, Bartus RT. The role of leukocytes following cerebral ischemia: pathogenic variable or bystander reaction to emerging infarct? *Exp Neurol* 2002;173(1):168-81.
68. Gronberg NV, Johansen FF, Kristiansen U, Hasseldam H. Leukocyte infiltration in experimental stroke. *J Neuroinflammation* 2013;10:115.
69. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* 2007;7(9):678-89.
70. Perez-de-Puig I, Miró-Mur F, Ferrer-Ferrer M, Gelpi E, Pedragosa J, Justicia C, Urra X, Chamorro A, Planas AM. Neutrophil recruitment to the brain in mouse and human ischemic stroke. *Acta Neuropathologica* 2015;129(2):239-257.
71. Cho KS, Lee EJ, Kim JN, Choi JW, Kim HY, Han S-H, Ryu JH, Cheong JH, Shin CY, Kwon KJ. Proteinase 3 Induces Neuronal Cell Death Through Microglial Activation. *Neurochemical Research* 2015;40(11):2242-2251.
72. Strecker JK, Schmidt A, Schäbitz WR, Minnerup J. Neutrophil granulocytes in cerebral ischemia - Evolution from killers to key players. *Neurochem Int* 2017;107:117-126.
73. Narantuya D, Nagai A, Sheikh AM, Masuda J, Kobayashi S, Yamaguchi S, Kim SU. Human Microglia Transplanted in Rat Focal Ischemia Brain Induce Neuroprotection and Behavioral Improvement. *PLOS ONE* 2010;5(7):e11746.
74. Cunin P, Lee PY, Kim E, Schmider AB, Cloutier N, Pare A, Gunzer M, Soberman RJ, Lacroix S, Boilard E and others. Differential attenuation of $\beta 2$ integrin-dependent and -independent neutrophil migration by Ly6G ligation. *Blood Adv* 2019;3(3):256-267.
75. Fan Z, Ley K. Leukocyte arrest: Biomechanics and molecular mechanisms of beta2 integrin activation. *Biorheology* 2015;52(5-6):353-77.
76. Ruoslahti E. Integrins. *J Clin Invest* 1991;87(1):1-5.
77. Wu X, Reddy DS. Integrins as receptor targets for neurological disorders. *Pharmacol Ther* 2012;134(1):68-81.
78. Savill J. Apoptosis in resolution of inflammation. *Journal of Leukocyte Biology* 1997;61(4):375-380.

79. Denes A, Vidyasagar R, Feng J, Narvainen J, McColl BW, Kauppinen RA, Allan SM. Proliferating resident microglia after focal cerebral ischaemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 2007;27(12):1941-53.
80. Weston RM, Jones NM, Jarrott B, Callaway JK. Inflammatory Cell Infiltration after Endothelin-1-Induced Cerebral Ischemia: Histochemical and Myeloperoxidase Correlation with Temporal Changes in Brain Injury. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 2007;27(1):100-114.
81. Bretschneider T, Anderson K, Ecke M, Müller-Taubenberger A, Schroth-Diez B, Ishikawa-Ankerhold HC, Gerisch G. The three-dimensional dynamics of actin waves, a model of cytoskeletal self-organization. *Biophys J* 2009;96(7):2888-900.
82. Conner SD, Schmid SL. Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 2003;422(6927):37-44.
83. Greenberg S, Grinstein S. Phagocytosis and innate immunity. *Curr Opin Immunol* 2002;14(1):136-45.
84. Underhill DM, Ozinsky A. Phagocytosis of Microbes: Complexity in Action. *Annual Review of Immunology* 2002;20(1):825-852.
85. Groves E, Dart AE, Covarelli V, Caron E. Molecular mechanisms of phagocytic uptake in mammalian cells. *Cell Mol Life Sci* 2008;65(13):1957-76.
86. Castellano F, Chavrier P, Caron E. Actin dynamics during phagocytosis. *Semin Immunol* 2001;13(6):347-55.
87. May RC, Machesky LM. Phagocytosis and the actin cytoskeleton. *J Cell Sci* 2001;114(Pt 6):1061-77.
88. Swanson JA. Shaping cups into phagosomes and macropinosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008;9(8):639-49.
89. Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood* 1998;92(9):3007-17.
90. Aderem A, Underhill DM. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol* 1999;17:593-623.
91. Daëron M. Fc RECEPTOR BIOLOGY. *Annual Review of Immunology* 1997;15(1):203-234.
92. Tohyama Y, Yamamura H. Complement-mediated phagocytosis - the role of Syk. *IUBMB Life* 2006;58(5-6):304-308.

93. Bagalkot V, Deiuliis JA, Rajagopalan S, Maiseyeu A. "Eat me" imaging and therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2016;99:2-11.
94. Gardai SJ, Bratton DL, Ogden CA, Henson PM. Recognition ligands on apoptotic cells: a perspective. *J Leukoc Biol* 2006;79(5):896-903.
95. Ravichandran KS. Find-me and eat-me signals in apoptotic cell clearance: progress and conundrums. *The Journal of experimental medicine* 2010;207(9):1807-1817.
96. Segawa K, Nagata S. An Apoptotic 'Eat Me' Signal: Phosphatidylserine Exposure. *Trends Cell Biol* 2015;25(11):639-650.
97. Gierahn TM, Wadsworth MH, 2nd, Hughes TK, Bryson BD, Butler A, Satija R, Fortune S, Love JC, Shalek AK. Seq-Well: portable, low-cost RNA sequencing of single cells at high throughput. *Nat Methods* 2017;14(4):395-398.

Veröffentlichung

Teile dieser Arbeit wurden unter dem Titel

Beware the intruder: Real time observation of infiltrated neutrophils and neutrophil - Microglia interaction during stroke *in vivo*

durch folgende Autoren

Jens Neumann^{1*}, Sophie Henneberg², Susanne von Kenne¹, Niklas Nolte³, Andreas J. Müller^{3,4}, Burkhard Schraven³, Michael W. Götler¹, Klaus G. Reymann⁵, Matthias Gunzer², Monika Riek-Burchardt^{3*}

1 Department of Neurology, Medical Faculty, Otto-von-Guericke University Magdeburg, Germany, 2 Institute for Experimental Immunology and Imaging, Medical Faculty, Essen, University Duisburg-Essen, Germany, 3 Institute for Molecular and Clinical Immunology, Medical Faculty, Otto-von-Guericke University Magdeburg, Germany, 4 Helmholtz Center for Infection Research, Braunschweig, Germany, 5 Project Group Neuropharmacology, Leibniz Institute for Neurobiology, Magdeburg, Germany

in der Zeitschrift

PLoS ONE 13(3): e0193970. March 15, 2018

veröffentlicht.

Danksagung

Die Danksagung ist in dieser Version aus Datenschutzgründen nicht enthalten.

Darstellung des Bildungsweges

Die Darstellung des Bildungsweges ist in dieser Version aus Datenschutzgründen nicht enthalten.