

Aus der Klinik für Neurologie

(Prof. Dr. med. M. Bähr)

der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Studie zur Untersuchung des Antibiotika-Einflusses auf Mikrobiom-
assoziierte Schlaganfallfolgen im Mausmodell**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät der

Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Katrin Schröder

aus

Bremen

Göttingen 2020

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

Referent/in: Prof. Dr. med. G. Trendelenburg

Ko-Referent/in: PD Dr. rer. nat. F. Lühder

Drittreferent/in: Prof. Dr. hum. biol. M. Schön

Datum der mündlichen Prüfung: 04.08.2021

Hiermit erkläre ich, Katrin Schröder, die Dissertation mit dem Titel „Studie zur Untersuchung des Antibiotika-Einflusses auf Mikrobiom-assoziierte Schlaganfallfolgen im Mausmodell“ eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, 29.09.2020

.....

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	IV
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis.....	VI
1	Einleitung..... 1
1.1	Der Schlaganfall. Definition, Epidemiologie und Ätiologie 1
1.1.1	Klinisches Bild des Schlaganfalls im Bereich der Arteria cerebri media..... 2
1.1.2	Therapie des Schlaganfalls 3
1.2	Pathophysiologie des ischämischen Schlaganfalls 4
1.2.1	Exzitotoxizität..... 6
1.2.2	Peri-Infarkt-Depolarisation..... 7
1.2.3	Apoptose 8
1.2.4	Inflammation..... 9
1.3	Immunsystem..... 11
1.3.1	Pattern-Recognition-Rezeptoren (PRRs)..... 12
1.3.2	Toll-like Rezeptoren (TLRs) 13
1.3.3	NOD-like Rezeptoren (NLRs)..... 13
1.3.4	NALP3 14
1.4	Mikrobiom 15
1.4.1	Mikrobiom und Antibiose..... 16
1.4.2	Mikrobiom und Cohousing..... 17
1.5	Tiermodell..... 17
1.5.1	Modell fokaler zerebraler Ischämie 18
1.6	Fragestellung und Zielsetzung..... 19
2	Material und Methoden..... 21
2.1	Geräte und Material 21

2.2	Versuchstiere	30
2.2.1	Herkunft und Haltung	30
2.2.2	Genotypisierung	31
2.2.3	Kriterien zur Gruppeneinteilung	33
2.2.4	Cohousing	33
2.3	Antibiose	33
2.4	Versuchsaufbau	34
2.4.1	Versuche der Arbeitsgruppe	34
2.4.2	Eigene Versuchsreihe	34
2.5	In-vivo-Methoden	36
2.5.1	Technik der Middle cerebral artery occlusion (MCAO)	36
2.5.2	Ausschlusskriterien	39
2.5.3	Randomisierung und Verblindung	39
2.5.4	Neurologische Testung	39
2.5.5	Gewebeaufbereitung, Färbung und Einbettung	41
2.5.6	Infarktvolumetrie	42
2.5.7	Immunhistochemie	43
2.5.8	Beurteilung des ischämischen Schadens auf histologischer Ebene	44
2.5.9	Statistische Methoden	45
3	Ergebnisse	46
3.1	Versuchsergebnisse	46
3.1.1	NALP3 ^{-/-} Darmmikrobiom und Ausprägung der neurologischen Störung	46
3.1.2	Infarktvolumen und Gehirnschwellung	48
3.1.3	Entzündungsreaktion	53
3.1.4	Neurone in der ischämischen Hemisphäre	58
3.2	Zusammenfassung der Ergebnisse	61
4	Diskussion	62

4.1	Versuche der Arbeitsgruppe	63
4.2	Interpretation der Ergebnisse	65
4.2.1	Auswirkungen auf die Infarkt volumina	65
4.2.2	Auswirkungen auf die Mikrogliazellen	68
4.2.3	Auswirkungen auf die neuronalen Zellen	71
4.2.4	Auswirkungen auf das neurologische Outcome	73
4.3	Methodendiskussion	74
4.3.1	Versuchstierzahl.....	74
4.3.2	Darmmikrobiom.....	75
5	Zusammenfassung	76
6	Literaturverzeichnis	78

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Pathophysiologische Faktoren in der Penumbra im zeitlichen Verlauf	5
Abbildung 2: Core Region und Penumbra im Stromgebiet der Arteria cerebri media.....	6
Abbildung 3: Inflammatorische Zellen in ischämischer Hemisphäre im zeitlichen Verlauf.....	11
Abbildung 4: Mechanismus der NALP3-Komplexbildung von Inflammasomen	14
Abbildung 5: Circulus arteriosus cerebri des Menschen	18
Abbildung 6: Versuchsaufbau	35
Abbildung 7: Technik der MCAO.	38
Abbildung 8: TTC-Färbung.....	42
Abbildung 9: Zellquantifizierung im Hirnschnitt in definierten Auswertungszonen.....	45
Abbildung 10: Direkte Infarkt volumina bei WT(NALP3 ^{-/-}) und WT(NALP3 ^{-/-}) _(Abx)	49
Abbildung 11: Direkte Infarkt volumina bei NALP3 ^{-/-} und NALP3 ^{-/-} _(Abx)	50
Abbildung 12: Indirekte Infarkt volumina bei WT(NALP3 ^{-/-}) und WT(NALP3 ^{-/-}) _(Abx)	51
Abbildung 13: Gehirnschwellung bei WT(NALP3 ^{-/-}) und WT(NALP3 ^{-/-}) _(Abx)	52
Abbildung 14: Indirekte Infarkt volumina bei NALP3 ^{-/-} und NALP3 ^{-/-} _(Abx)	53
Abbildung 15: Anzahl aktivierter Mikroglia in ischämischer Hemisphäre bei WT(NALP3 ^{-/-}) und WT(NALP3 ^{-/-}) _(Abx)	54
Abbildung 16: Anzahl aktivierter Mikroglia in ischämischer Hemisphäre bei NALP3 ^{-/-} und NALP3 ^{-/-} _(Abx)	55
Abbildung 17: Anzahl aktivierter Mikroglia in nicht-ischämischer Hemisphäre bei WT(NALP3 ^{-/-}) und WT(NALP3 ^{-/-}) _(Abx)	56
Abbildung 18: Anzahl aktivierter Mikroglia in nicht-ischämischer Hemisphäre bei NALP3 ^{-/-} und NALP3 ^{-/-} _(Abx)	57
Abbildung 19: Neurone in ischämischer Hemisphäre bei WT(NALP3 ^{-/-}) und WT(NALP3 ^{-/-}) _(Abx)	59
Abbildung 20: Neurone in ischämischer Hemisphäre bei NALP3 ^{-/-} und NALP3 ^{-/-} _(Abx)	60

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte.....	21
Tabelle 2: Chirurgisches Material.....	22
Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien.....	24
Tabelle 4: Chemikalien und Bioreagenzien.....	25
Tabelle 5: Puffer	29
Tabelle 6: Antikörper.....	29
Tabelle 7: Computersoftware und Programme.....	30
Tabelle 8: Mastermix	31
Tabelle 9: Programmierung des Thermocyclers.....	32
Tabelle 10: modified Neurological Score Scale: Motorische Testung.....	40
Tabelle 11: modified Neurological Score Scale: Sensorische Testung.....	41
Tabelle 12: mNSS. Vergleich der WT-Mäuse nach 10-wöchigem Cohousing mit NALP3 ^{-/-} -Mäusen mit und ohne Antibiotikagabe.....	47
Tabelle 13: mNSS. Vergleich der NALP3 ^{-/-} -Mäuse mit und ohne Antibiotikagabe.....	48
Tabelle 14: Reaktion und Verhältnis der aktivierten Mikroglia nach Ischämie.....	58
Tabelle 15: Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse Teil 1.....	61
Tabelle 16: Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse Teil 2.....	61

Abkürzungsverzeichnis

A.c.c.	<i>Arteria cerebri communis</i>
A.c.e.	<i>Arteria cerebri externa</i>
A.c.i.	<i>Arteria cerebri interna</i>
A.c.m.	<i>Arteria cerebri media</i>
Abx	mit Antibiotika behandelt
ATP	Adenosintriphosphat
CBF	zerebraler Blutfluss
DAMP	<i>Damage-associated molecular pattern</i>
DGN	Deutsche Gesellschaft für Neurologie
DSS	Dextran-Natriumsulfat
ENI	Europäisches Neurowissenschaftliches Institut Göttingen
Iba	<i>Ionized calcium-binding adapter molecule</i>
MCAO	<i>Middle cerebral artery occlusion</i>
mNSS	<i>modified Neurological Score Scale</i>
NeuN	<i>Neuron-specific nuclear antigen</i>
NeuN ⁺	Antikörper-positive NeuN-Zellen
NALP3 ^{-/-}	NALP3-Knockout
NLR	NOD-like Rezeptor
NLRP	NOD-like Rezeptor Pyrin bindend
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
PFA	Paraformaldehyd
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PRR	<i>Pattern recognition receptor</i>

rtPA	<i>Recombinant tissue plasminogen activator</i>
TAE	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TTC	2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid
WT	Wildtyp

1 Einleitung

1.1 Der Schlaganfall. Definition, Epidemiologie und Ätiologie

Der Schlaganfall ist die Folge einer Durchblutungsstörung des Gehirns, durch die es zu Lähmungen, sowie Störungen der Sinne, der Sprache und des Bewusstseins kommen kann und dessen Symptome andauern oder zum Tode führen können (DGN 2012).

Im Jahre 2008 erlitten in Deutschland 262.000 Menschen einen Schlaganfall, 66.000 davon erlitten ein Rezidiv (Heuschmann et al. 2010). Der Schlaganfall ist die dritthäufigste Todesursache in Deutschland und die häufigste Ursache für erworbene Behinderungen (Heuschmann et al. 2010). Etwa 10 bis 15% der Patienten sterben innerhalb der ersten vier Wochen nach einem Schlaganfall, nur ein Drittel der Überlebenden erholt sich vollständig. Das zweite Drittel der Betroffenen kann einfache tägliche Dinge verrichten, ist aber durch Lähmungen oder andere Symptome behindert und auch nicht mehr berufsfähig. Das letzte Drittel ist dauerhaft pflegebedürftig. Dadurch wird der Schlaganfall volkswirtschaftlich zu einer der teuersten Krankheiten (Hacke 2016).

Die Durchblutungsstörung des Gehirns kann hämorrhagisch bedingt sein (Donnan et al. 2008). Wesentlich häufiger mit über 80% der Fälle ist aber die Mangel durchblutung durch ein verschlossenes Blutgefäß, meistens durch ein lokal entstandenes oder ein eingeschwemmtes Blutgerinnsel (Grau et al. 2001). Durch die Minderversorgung mit Sauerstoff und Glucose kommt es zum Untergang von Hirngewebe (Feigin et al. 2009) und in der Folge zu neurologischen Schäden. Art und Ausmaß der Schäden sind abhängig von der Lage und der Größe des betroffenen Gehirnareals sowie der Dauer der Durchblutungsstörung (Mattle und Mumenthaler 2013).

Begünstigt werden sowohl hämorrhagische als auch ischämische Schlaganfälle durch arteriosklerotische Gefäßveränderungen, verursacht hauptsächlich durch arterielle Hypertonie, Rauchen, Übergewicht, Bewegungsmangel, Diabetes mellitus und als einen der wichtigsten Risikofaktoren das Alter. Die jährliche Inzidenz der Schlaganfälle verdoppelt sich annähernd mit jedem Lebensjahrzehnt (Baltan et al. 2008; O'Donnell et al. 2010).

Nur wenige Prozent der Schlaganfälle beruhen auf einer nicht arteriosklerotischen Gefäßkrankheit, wie zum Beispiel einer Dissektion, Angiitis, Kollagenose, Gerinnungsstörung oder anderen seltenen Erkrankungen (Grau et al. 2001).

In meiner Doktorarbeit beschäftige ich mich mit der häufigsten Art des Schlaganfalls verursacht durch einen Gefäßverschluss im Versorgungsgebiet der *Arteria cerebri media* (Hacke 2016).

1.1.1 Klinisches Bild des Schlaganfalls im Bereich der *Arteria cerebri media*

Die Symptome eines Hirninfarktes im Stromgebiet der *Arteria cerebri media* hängen vom Ort und vom Ausmaß der Läsion ab (Dirnagl et al. 1999).

Üblicherweise treten sensible, motorische oder sensomotorische kontralaterale Halbseitensymptome auf (Hacke 2016). Bei Läsionen auf der sprachdominanten Seite kommen Aphasien und Apraxien vor. Es können Lese- und Rechenstörungen eintreten. Rechtshemisphärische Läsionen können zu einer Störung der Raumverarbeitung führen, auch als Neglect bezeichnet (Bonato 2012).

Neben den direkten neurologischen Auswirkungen des Hirninfarktes können durch spezielle pathophysiologische Abläufe Folgeschäden entstehen. Dazu zählen neben anderen auch eine vermehrte Anfälligkeit für Infektionen (Langhorne et al. 2000).

Nach einer Verletzung des Gehirns tritt das Zentralnervensystem in engen Kontakt mit dem Immunsystem, was zu einer Abnahme der Immunzellen und ihrer Funktionstüchtigkeit führt. Dies wird als Schlaganfall-induzierte Immundepression bezeichnet (Dirnagl et al. 2007). Die Immundepression führt zu einer erhöhten Rate für Infektionen wie Pneumonien und Harnwegsinfekte, die zu einem schlechteren Endergebnis (Outcome) und einer niedrigeren Überlebensrate beitragen (Meisel et al. 2005; Dirnagl et al. 2007).

Die Prognose nach einem Hirninfarkt hängt in erster Linie von der Schwere des Infarktes ab, unter anderem aber auch von den Begleiterkrankungen und dem Alter der Betroffenen (Hacke 2016). Lakunäre Infarkte, entstanden durch verschlossene Arteriolen, haben eine geringe Mortalität, Territorialinfarkte eine höhere (Arboix et al. 2011). Über fünf Jahre nach dem Geschehen sind ca. 70% der Patienten behindert oder verstorben (Luengo-Fernandez et al. 2013).

1.1.2 Therapie des Schlaganfalls

Der Schlaganfall ist wie der Herzinfarkt oder die Lungenembolie ein medizinischer Notfall. Der betroffene Patient sollte so schnell wie möglich in ein qualifiziertes Zentrum (Stroke Unit) eingeliefert werden. Auch in der Klinik sollten Zeitvorgaben eingehalten werden, gemäß dem Konzept *Time is Brain* (DGN 2012).

Nach der Leitlinie zur Akuttherapie des ischämischen Schlaganfalls (2012) sind die Vitalfunktionen zu stabilisieren, dann sollte umgehend eine zerebrale Bildgebung erfolgen (natives Computertomogramm oder Magnetresonanztomographie), um die Diagnose zu sichern.

Richtungsweisende Studien zur interventionellen Rekanalisationstherapie bei Patienten bewegten die DGN 2015 ihre Leitlinie zu ergänzen.

Die Thrombolyse mit intravenöser Gabe von *Recombinant tissue plasminogen activator* (rtPA) wird nun empfohlen bis 4,5 Stunden (bei selektierten Patienten auch 6 Stunden) nach dem Ereignis ohne obere Altersbegrenzung (Toni et al. 2008; Mishra et al. 2010; DGN 2015). Erwogen werden kann diese Therapie nun auch bei milden oder bereits rückläufigen Symptomen (Smith et al. 2005; Nedeltchev et al. 2007; Emberson et al. 2014).

Patienten mit einem großen arteriellen Gefäßverschluss im vorderen Kreislauf (paarige *Arteria carotis interna* mit ihren Verzweigungen) und klinisch relevantem neurologischen Defizit wird eine mechanische Thrombektomie empfohlen innerhalb der ersten 6 Stunden nach dem Ereignis wegen eines besseren Outcomes und einer geringeren Mortalität gegenüber einer alleinigen intravenösen Gabe von rtPA (Berkhemer et al. 2015; Campbell et al. 2015).

Aktuelle Studien zeigen einen Vorteil einer Thrombektomie in einem noch größeren Zeitfenster bis zu 24 Stunden nach Symptombeginn (Albers et al. 2018; Nogueira et al. 2018).

Wichtig bei der weiteren Akutbehandlung eines ischämischen Infarktes ist die Blutdruckeinstellung mit Tolerierung hypertensiver Blutdruckwerte, jedoch nicht über 185/110 mmHg während der Lysetherapie, weiter eine Elektrolyt- und Blutzuckereinstellung sowie eine antipyretische Behandlung bei einer Körpertemperatur über 37,5°C. Eine adäquate Oxygenierung des arteriellen Blutes ist für den Metabolismus im Schadensgebiet relevant.

Bereits früh wird mit einer Sekundärprophylaxe mit Acetylsalicylsäure (ASS) 100 mg täglich begonnen (DGN 2015).

Nach der Akuttherapie in der Stroke Unit empfiehlt sich eine Rehabilitation in einer Fachklinik. Das Programm hier sollte individuell erstellt werden unter Berücksichtigung des Defizits und Physiotherapie, Ergotherapie und Logopädie umfassen. Je nach Stadium der Immobilität gilt es Folgeschäden, wie eine Pneumonie, Thrombosen und Dekubiti zu vermeiden. Ist der Patient berufstätig, ist eine Wiedereingliederung anzustreben (Coole et al. 2013).

Der Patient und auch seine Familie sollten psychologisch unterstützt werden (Creasy et al. 2015).

1.2 Pathophysiologie des ischämischen Schlaganfalls

Das Gehirn eines Menschen macht ca. 2% seiner Körpermasse aus, der zerebrale Blutfluss beträgt jedoch 15% des Herzzeitvolumens und der Verbrauch etwa 20% des gesamten O₂-Bedarfs des Körpers in Ruhe (Hacke 2016). Der Hirnstoffwechsel wird fast ausschließlich durch Glucose aufrechterhalten, täglich ca. 115 g (Mergenthaler et al. 2013).

Der zerebrale Blutfluss (CBF) wird als Flussvolumen pro 100 g Gehirnmasse in der Minute mit der Einheit ml/100 g/min angegeben. Der normale CBF beträgt ca. 50 ml/100 g/min. Sinkt der Blutfluss auf weniger als 22 ml/100 g Hirngewebe/min kommt es zu klinischen Symptomen (Hossmann 1994). Sinkt die Durchblutungsrate weiter auf unter 10 ml/100 g Hirngewebe/min kommt es innerhalb von einigen Minuten zum Absterben von Nervenzellen (Symon et al. 1979; Iadecola und Anrather 2011).

Die plötzliche zerebrale Mangeldurchblutung setzt ein pathophysiologisches Geschehen in Gang, das zu einem Untergang von Nervenzellen führt. Dirnagl et al. (1999) beschreiben den zeitlichen Ablauf: Nach der Exzitotoxizität folgt die Peri-Infarkt-Depolarisation, dann die Inflammation und Apoptose (s. Abbildung 1).

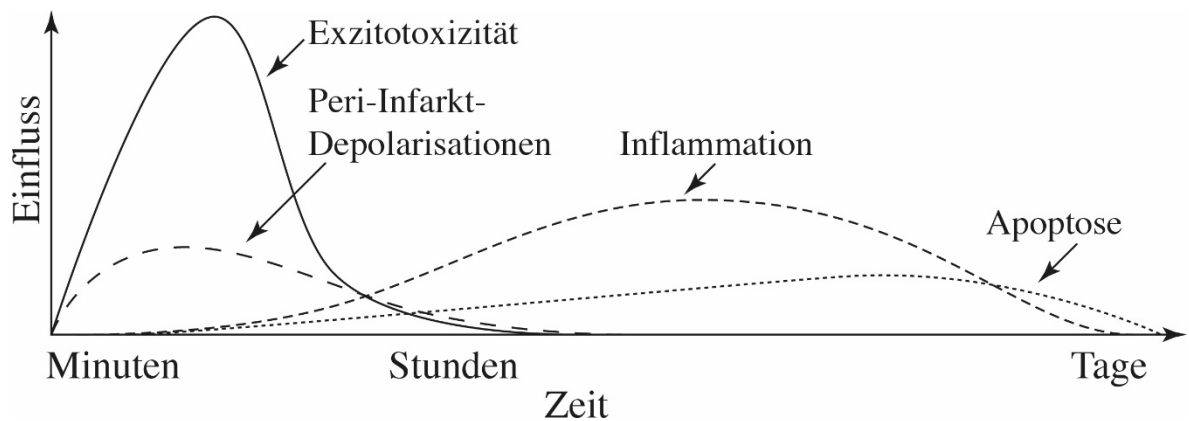


Abbildung 1: Pathophysiologische Faktoren in der *Penumbra* im zeitlichen Verlauf

Diese Abbildung entspricht einer ins Deutschen übersetzten Abbildung von Dirnagl et al. (1999). Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung des Elsevier Verlags.

Der direkte Grund des Untergangs der Hirnzellen ist in erster Linie ein Mangel von Adenosintriphosphat (ATP), das den Energiebedarf der Zelle aus oxidativer Phosphorylierung deckt (Dirnagl et al. 1999). Die Glykogenspeicherkapazität des Gehirns ist sehr begrenzt und deshalb eine kontinuierliche Glucosezufuhr aus dem Blut essentiell. Fehlt diese und Sauerstoff, kann die ATP-abhängige Ionenpumpe die Membranpotentiale der Zelle nicht gewährleisten. Es folgen anoxische Depolarisationen, dann ein nicht kompensierbarer Natrium- und Calciumeinstrom in die Zelle (Silver und Erecińska 1990). Es kommt zu osmotisch bedingtem Wassereinstrom, Schwellung und Degeneration von Zellbestandteilen; die Zellmembranen werden durchlässig und die Zellen in der Folge nekrotisch (Lipton 1999).

Im durchblutungsgestörten Areal unterscheidet man die primär irreversibel geschädigte zentrale Nekrosezone, die *Core Region* (s. Abbildung 2), von der diesen Bereich umschließenden Zone, die noch überlebensfähige Zellen enthält, der *Penumbra* (lat. Halbschatten).

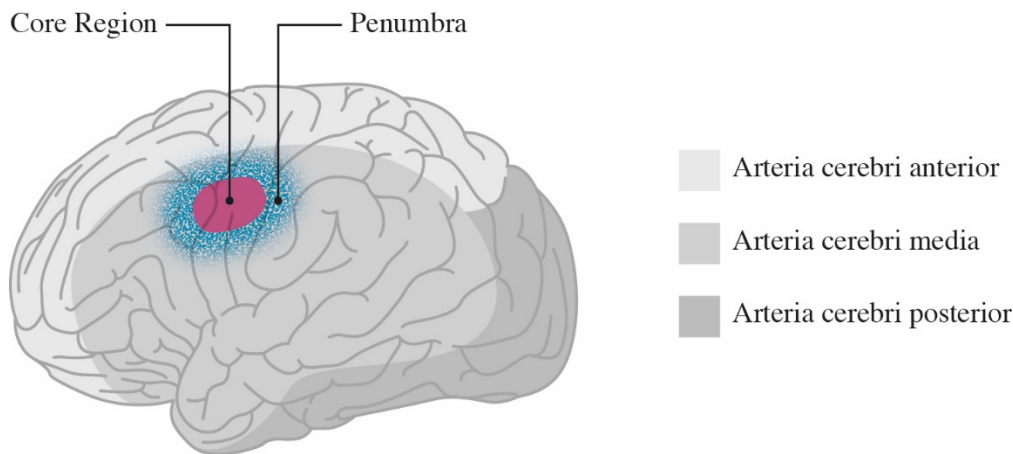


Abbildung 2: *Core Region* und *Penumbra* im Stromgebiet der *Arteria cerebri media*. Quelle: Eigene Darstellung.

In der *Penumbra* wird der Blutfluss durch kollaterale Blutgefäße noch grenzwertig aufrecht erhalten (Astrup et al. 1981) und die ATP-Konzentration ist annähernd normal, es häufen sich jedoch Metabolite an, die die Energiegewinnung stören (Lowry et al. 1964; Astrup et al. 1981).

Irreversibel werden die Schäden in der *Penumbra* jedoch erst durch einen Entzündungsprozess, der durch komplexe Abläufe gestartet und gesteuert wird. Zur Verminderung des neurologischen Schadens ist die Rettung der Nervenzellen im Bereich der *Penumbra* therapeutisches Anliegen (Garcia et al. 1995; Donnan et al. 2008). Ein Behandlungsansatz zur Neuroprotektion ist es, die post-ischämische Inflammation als Schadensmechanismus im Verlauf der zerebralen Ischämie positiv zu beeinflussen (Dirnagl et al. 1999).

1.2.1 Exzitotoxizität

Exzitotoxizität (lat. *excitare* = antreiben und griech. *toxikon* = Gift) beschreibt eine Schädigung von Nervenzellen und deren Untergang. Dieser pathologische Vorgang spielt sich sowohl in der *Core Region* wie auch in der *Penumbra* ab (Dirnagl et al. 1999). Die Exzitotoxizität ist jedoch nicht spezifisch für einen Schlaganfall, sondern kommt bei einer ganzen Reihe von neurologischen Erkrankungen vor, z. B. bei neurodegenerativen Erkrankungen wie Multipler Sklerose, Amyotropher Lateralsklerose oder Morbus Parkinson und auch nach einem Schädel-Hirn-Trauma (Prentice et al. 2015).

Durch den ischämiebedingten Mangel an $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ und $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$ kann der Ionentransport nicht aufrecht gehalten werden und es kommt zu einer Depolarisation der neuronalen Plasmamembran; Kalium strömt in den Extrazellularraum, Natrium und Calcium in die Zellen (Dirnagl et al. 1999).

Der ungebremsste Einstrom von Calcium in das Zellinnere wirkt toxisch durch die Aktivierung proteolytisch wirkender Enzyme, die das Zytoskelett und die extrazelluläre Matrix angreifen (Neely und Gesemann 1994).

Eine weitere Folge der Elektrolytverschiebung ist ein osmotisch bedingter Wassereinstrom intrazellulär aber auch extrazellulär. Es kommt zu einer Ödembildung und dadurch zu einer intrakraniellen Druckerhöhung (Katayama et al. 1992), die bei entsprechender Ausprägung zu einer Gefäßkompression und sogar Gehirneinklemmung führen kann (Dirnagl et al. 1999).

Zusätzlich werden Neurotransmitter, in erster Linie Glutamat freigesetzt (Simon et al. 1984). Die erhöhte Glutamatkonzentration im synaptischen Spalt wirkt toxisch, da sie zu einer Überaktivierung der Rezeptoren führt durch Bindung an *N-Methyl-D-Aspartat*-Kanäle (NMDA-Kanäle), an *α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic-acid*-Rezeptoren (AMPA-Rezeptoren) und metabotrope Glutamat-Rezeptoren (mGlu-Rezeptoren) (Simon et al. 1984). Es kommt zu wiederholten Membrandepolarisationen und Natrium- und Chloridioneneinstrom in die Zelle (Liu et al. 2006).

Durch Aktivierung der Phospholipase A_2 und der Cyclooxygenase kommt es zur Bildung freier Sauerstoffradikale, die die Zellstrukturen zusätzlich weiter schwächen (Orrenius et al. 1992; Iadecola und Anrather 2011).

Durch die oben geschilderten Abläufe werden die Nervenzellen schwer geschädigt und sterben schließlich ab; dieser biologische Prozess kann in zwei Formen münden, der Apoptose oder der Nekrose (Leist und Nicotera 1998).

1.2.2 Peri-Infarkt-Depolarisation

Eine spezielle Form der Gehirnzellschädigung nach Ischämie findet überwiegend in der *Penumbra* statt, da die Voraussetzung für diese Schädigung eine wenn auch minimale Energieversorgung ist, die in der *Core Region* nicht gegeben ist (Astrup et al. 1981).

Der Blutfluss in der *Penumbra* ist zwar vermindert, dennoch ist regional eine nahezu normale ATP-Konzentration in der Gehirnzelle vorhanden. Durch die Mangelversorgung häufen sich jedoch Metabolite an: Phosphokreatin, Laktat, Adenosindiphosphat und Adenosinmonophosphat. Es kommt zu einem metabolischen Ungleichgewicht das die Energiegewinnung stört (Salford et al. 1973a; Salford et al. 1973b; Astrup et al. 1977).

Die Zelle ist zwar in der Lage zu repolarisieren, durch die Vorschädigung befinden sich jedoch Kalium und Glutamat im Extrazellularraum, die eine erneute Depolarisation auslösen (Lowry et al. 1964; Astrup et al. 1981).

Es kommt zu repetitiven Depolarisationen, die die Zelle erschöpft zu Grunde gehen lassen, sodass dieser Ablauf den neuronalen Schaden vergrößert (Mies et al. 1993).

Aufgrund der Lage in der *Penumbra*, die ringförmig die zentrale Infarktregion umschließt, werden diese Depolarisationen Peri-Infarkt-Depolarisationen genannt (Hossmann 1996).

1.2.3 Apoptose

Gehirnzellen können durch eine Apoptose oder eine Nekrose zugrunde gehen. Welche Form des Zelltodes eintritt, ist vom Ausmaß des ischämischen Zellschadens und vom Zelltyp abhängig (Leist und Nicotera 1998).

In der *Core Region* kommt es vornehmlich zur Nekrose, hervorgerufen durch einen kompletten Sauerstoffmangel mit entsprechenden Folgen (Linnik et al. 1995).

In der *Penumbra* dagegen kommt es vorwiegend zur Apoptose. Die Apoptose wird von der betroffenen Zelle selbst aktiv durchgeführt und entspricht damit einem programmierten Zelltod, ohne Schädigung des Nachbargewebes durch eine Entzündungsreaktion, wie es üblicherweise bei der Nekrose vorkommt (Leist und Nicotera 1998). Eine Voraussetzung für die Apoptose ist ein verbliebener Rest an Energie in der Zelle, wie es in der *Penumbra* der Fall sein kann, nicht aber in der von der Blutzufuhr komplett abgeschnittenen *Core Region* (Linnik et al. 1995).

Die Apoptose kann über einen intrinsischen und einen extrinsischen Weg eingeleitet werden (Fujimura et al. 1998).

Der intrinsische Signalweg wird beschritten bei eingetretenen DNA-Schäden, einem mitochondrialen Membranschaden oder osmotischem Stress (Fujimura et al. 1998). Diese Schäden bewirken nach weiteren Zwischenschritten einen Austritt von Cytochrom c aus den

Mitochondrien (del Zoppo et al. 2000; Broughton et al. 2009). Zeitgleich löst sich der Apoptose-auslösende-Faktor-1 (Apop1) von den Zellmembranen der Mitochondrien und bildet zusammen mit der Caspase 9 und Cytochrom c das sogenannte Apoptosom. Apoptosomen aktivieren die Caspase 3.

Der extrinsische Signalweg wird über T-Zellen vermittelt, die sogenannte Todesrezeptoren aktivieren, den Fas-Rezeptor (FasR) (He et al. 2009) oder den Tumornekrosefaktor-Rezeptor (TNFR) (Iadecola und Anrather 2011). Oxidativer Stress mit Ansammlung reaktiver Sauerstoffspezies führt zur Freisetzung der passenden Liganden. Die Caspase 8 (Initiator-Caspase) wird aktiviert, darüber in Folge die Caspase 3, wie auch beim intrinsischen Signalweg. Die Caspase 3 ist eine Effektor-Caspase und spaltet essentielle Proteine, wodurch ein kontrollierter Zelltod eintritt: die Apoptose (Namura et al. 1998).

1.2.4 Inflammation

Die postischämische Inflammation spielt eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung späterer funktioneller Ausfälle des Gehirns, da sie den lokalen Gewebeschaden vergrößert (Garcia 1984; Feuerstein et al. 1998; Dirnagl et al. 1999).

Die in der *Penumbra* ablaufende Inflammation ist ein Zusammenspiel von molekularbiologischen Mediatoren und zunächst lokalen, später auch systemischen Entzündungszellen, gesteuert durch das Immunsystem (Akira et al. 2006; Welsch 2010).

Induziert wird die Inflammation durch reaktive Sauerstoffspezies und Zellbestandteile nekrotischer Zellen (Iadecola und Anrather 2011). Es kommt zur Aktivierung von Sensormolekülen, zu denen auch das NALP3-Molekül gehört (Martinon et al. 2006; Dostert et al. 2008; Hornung et al. 2008). Darüber werden ortsständige Immunzellen, die Mikrogliazellen aktiviert. Die Mikroglia setzen neurotoxische Substanzen frei, u. a. Stickstoffmonoxyd (NO), Sauerstoffradikale (*reactive oxygen species*, ROS) und toxische Prostaglandine, die die Entzündungsreaktion unterhalten (Wang et al. 2007; Shichita et al. 2012). In dieser frühen Phase der postischämischen Entzündung sind zunächst nur residente Immunzellen an dem Prozess beteiligt (Gelderblom et al. 2009).

Bei ungestörten normalen physiologischen Verhältnissen sorgt die Blut-Hirn-Schranke für eine Trennung von Immunzellen und Blut vom Zentralnervensystem. Durch freigesetzte Entzündungsmediatoren wird die Schranke durchlässig und auch Zellen des peripheren

Immunsystems werden nun an der Entzündungsreaktion beteiligt (Wang et al. 1994; Shichita et al. 2012).

Über eine Bindung an stimulierte Adhäsionsmoleküle gelangen Immunzellen durch die defekte Blut-Hirn-Schranke, zunächst neutrophile Zellen, dann Makrophagen und Monozyten, später T-Zellen als Vertreter der erworbenen Immunabwehr (Gelderblom et al. 2009).

Bei diesen eingewanderten Zellen gibt es Unterschiede hinsichtlich ihrer zeitlichen Aktivität (s. Abbildung 3; Stevens et al. 2002; Jin et al. 2010). Makrophagen und Monozyten wandern drei bis sieben Tage nach aufgetretener Ischämie ins Gehirn ein (Jin et al. 2010). Dabei sind Mikroglia und Makrophagen in der Morphologie und Funktion nur schwer zu trennen (Schilling et al. 2003; Schilling et al. 2005). In den ersten 72 Stunden nach einem Schlaganfall, also in der Akutphase der Entzündung, wird über die Produktion weiterer Sauerstoffradikale, Zytokine und Matrix-Metalloproteinase-9 die Immunreaktion gesteigert. Mikroglia und die eingewanderten Makrophagen eliminieren durch ihre phagozytische Aktivität eingewanderte Neutrophile und besitzen daher auch eine neuroprotektive Funktion (Denes et al. 2007). Ebenso werden durch sie neurotrophische Wachstumsfaktoren wie der *Insulin-like-growth-factor* 1 (IGF-1), *Transforming-growth-factor* β 1 (TGF- β 1) oder *Brain-derived-neurotrophic-factor* (BDNF) produziert (Nakajima et al. 2001; Morgan et al. 2004; Choi et al. 2008).

Der inflammatorische Prozess trägt nicht nur zum neurologischen Schaden bei, sondern ist auch essentiell für die Regeneration des Gehirngewebes nach einem ischämischen Schlaganfall (Dirnagl et al. 1999). Eine Entwicklung antiinflammatorischer Therapien zur Erhaltung der Zellen innerhalb der *Penumbra* muss beide Faktoren berücksichtigen.

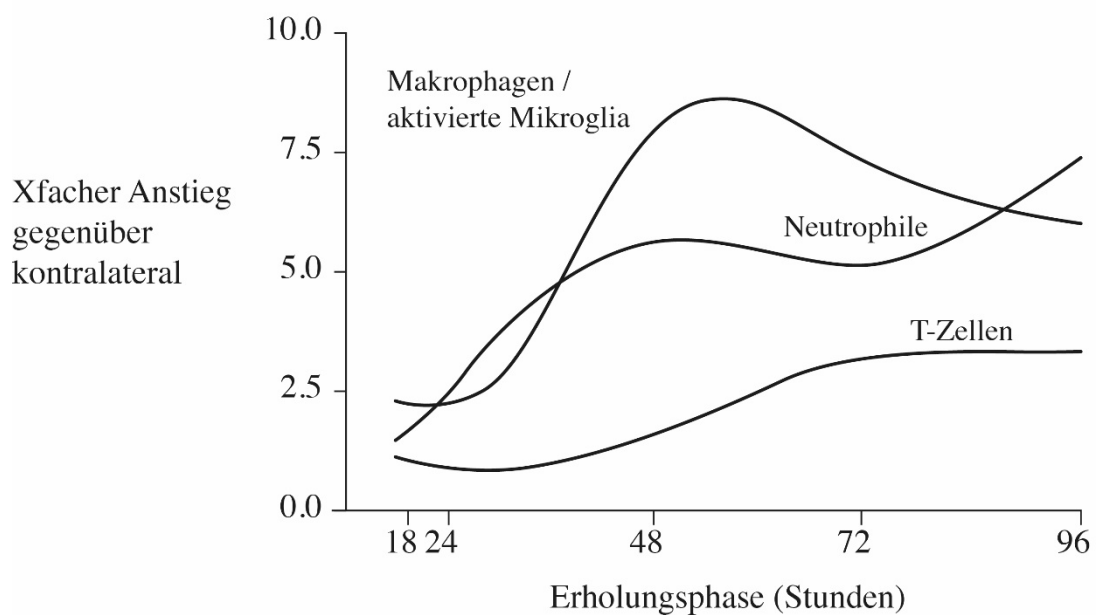


Abbildung 3: Inflammatorische Zellen in ischämischer Hemisphäre im zeitlichen Verlauf

Die Okklusion der *Arteria cerebri media* erfolgte über 60 Minuten.

Diese Abbildung entspricht einer ins Deutschen übersetzten Abbildung von Stevens et al. (2002). Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung des Cell Press Verlags.

1.3 Immunsystem

Wie im vorherigen Kapitel beschrieben, steuert das Immunsystem die Abläufe und die Intensität der Inflammation.

Das Immunsystem der Säugetiere gliedert sich in die angeborene, unspezifische Abwehr und in die erworbene, spezifische Immunabwehr, die eng miteinander verknüpft sind (Akira et al. 2006).

Das erworbene Immunsystem reagiert erst nach einigen Tagen. Es passt sich im Laufe des ganzen Lebens an spezifische Antigene an, die die Immunantwort auslösen (Simon et al. 2015). Das erworbene Immunsystem besteht aus einem humoralen Anteil mit B-Lymphozyten bzw. Plasmazellen, die Antikörper freisetzen, und einem zellvermittelten Anteil mit T-Lymphozyten, die über verschiedene Signale agieren oder direkt zytotoxisch wirken (Weng 2006).

Charakteristisch für das erworbene Immunsystem ist ein immunologisches Gedächtnis, gespeichert in B- und T-Gedächtniszellen, um bei einem erneuten Antigenkontakt schneller reagieren zu können (Andersen und Smedegaard 2000; Welsch 2010).

Das angeborene Immunsystem ist bereits vorgeburtlich aktiv und kann sofort aber nur unspezifisch reagieren und eine Entzündungsreaktion bewirken (Barton 2008). Zu den verschiedenen agierenden Abwehrzellen zählen Makrophagen, neutrophile Granulozyten, dendritische Zellen sowie natürliche Killerzellen. Diese Zellen verfügen über Rezeptormoleküle, über die sie pathogene molekulare Muster von Mikroorganismen, sog. *Pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs), erkennen (Medzhitov 2001; Welsch 2010).

Diese PAMPs werden von Rezeptormolekülen erkannt, sog. *Pattern recognition receptors* (PRRs) (Welsch 2010; Iwasaki und Medzhitov 2015).

1.3.1 Pattern-Recognition-Rezeptoren (PRRs)

Die Pattern-Recognition-Rezeptoren gehören zum System des angeborenen Immunsystems (Aderem und Ulevitch 2000). PRRs erkennen neben PAMPs auch Schaden-assoziierte molekulare Muster, sog. *damage-associated molecular patterns* (DAMPs). Diese eigentlich intrazellulär vorkommenden körpereigenen Moleküle werden beim Untergang von Zellen in den Extrazellularraum freigesetzt (Li et al. 2000). DAMPs sind z. B. das *high mobility group protein B1* (HMGB1), Harnsäure, Hitzeschockproteine (HSP) oder ATP. Sind sie freigesetzt, aktivieren die DAMPs das angeborene und erworbene Immunsystem und lösen eine Entzündungsantwort aus (Rubartelli und Lotze 2007).

Nach der Detektion von PAMPs bzw. DAMPs triggern einige der PRRs einen Signalweg, der zur Produktion proinflammatorischer Zytokine und Chemokine führt und Pathogene zerstört (Akira et al. 2006).

Die PRRs können nach ihrer Lokalisation in membrangebundene und zytosolische PRRs unterschieden werden (Tschopp und Schroder 2010).

Zu den membrangebundenen Rezeptoren zählen Toll-like-Rezeptoren (TLRs) und C-Typ Lektin-Rezeptoren (CTLs).

Zu den zytosolischen PRRs zählen NOD-like Rezeptoren (NLRs), RIG-I-ähnliche Proteine (RLRs), die Ribonukleinsäure (RNA) erkennen, sowie Sensoren, die Desoxyribonukleinsäure (DNA) identifizieren (Kawai und Akira 2009; Tschopp und Schroder 2010).

1.3.2 Toll-like Rezeptoren (TLRs)

Die zehn bisher bekannten humoralen Toll-ähnlichen Rezeptoren sind membrangebunden und haben eine bedeutende Rolle beim Entzündungsablauf der angeborenen Immunantwort (Rock et al. 1998; Aderem und Ulevitch 2000).

Die TLRs werden aktiviert durch Bestandteile körperfremder Mikroorganismen (PAMPs, s. o.) und starten die Immunantwort (Medzhitov et al. 1997). Diese Bestandteile können Lipopolysaccharide von gramnegativen Bakterien sein oder auch Zellbestandteile, die bei endogenen zellzerstörenden Prozessen wie einem Schlaganfall freigesetzt werden (O'Neill et al. 2013).

Die TLRs befinden sich u. a. in der Plasmamembran von Monozyten, Makrophagen, dendritischen Zellen, $\gamma\delta$ -T-Zellen, Th₁- und Th₂- $\alpha\beta$ -Zellen sowie in einigen Epithel- und B-Zellen (Medzhitov et al. 1997). TLR 3, -7, -8 und -9 befinden sich intrazellulär in den Membranen von Endosomen (Vollmer et al. 2005).

1.3.3 NOD-like Rezeptoren (NLRs)

Die Nucleotid-bindenden Oligomerisierungs-Domänen-ähnlichen Rezeptoren sind zytosolisch; von ihnen sind bisher 22 humorale Varianten bekannt (Tschopp und Schroder 2010). Ihre Expression findet vornehmlich in immunkompetenten Zellen statt. Hierzu zählen Lymphozyten, Epithelzellen und Antigen-präsentierende Zellen (APCs), zum Beispiel Makrophagen und dendritische Zellen (Chen et al. 2009).

Die NLRs bestehen aus drei Komponenten: Am C-terminalen Ende befindet sich die Domäne mit Leucin-reichen Sequenzen (*Leucine-rich repeats*, LRRs), um PAMPs und DAMPs zu erkennen und zu binden, mittig die namensgebende Nucleotid-bindende Oligomerisations-Domäne (NOD) und am variablen N-terminalen Ende befindet sich eine Pyrin-bindende (PYD) oder Caspase-bindende Domäne (*caspase recruitment and activation domain*, CARD). Demzufolge werden diese Komponenten NLRP (Pyrin-bindend) oder NLRC (Caspase-bindend) genannt. Diese Domäne legt fest, welche nachgeschalteten Signalwege bei Aktivierung der Rezeptoren in Gang gesetzt werden (Tschopp und Schroder 2010).

Nach Ligandenbindung wird mittels des Adapterproteins *Apoptosis-associated speck-like protein containing CARD* (ASC), welches eine PYD- und CARD-Domäne enthält, das Effektormolekül Procaspase 1 über dessen CARD-Domäne gebunden. Der aus Sensor

(NLRP), Adapter (ASC) und Effektormolekül (Procaspase 1) entstehende Proteinkomplex wird als Inflammasom bezeichnet. Das Inflammasom sorgt über die Aktivierung von Caspase 1 für die Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine Interleukin-1 β und Interleukin-18 (Latz et al. 2013).

1.3.4 NALP3

Eines der am meisten untersuchten NLRPs ist das NLRP3, auch NALP3 genannt, ein Protein bestehend aus NACHT-, LRR- und PYD-Domäne (Manji et al. 2002).

Die NACHT-Domäne besteht aus dem neuronalen Apoptose-hemmendem Protein (*neuronal apoptosis inhibitor protein*, NAIP), dem MHC Klasse II-Transaktivator CIITA, der HET-E-Heterokaryon-Inkompatibilität sowie dem Telomerase-bindenden Protein 1 (TP1) (Guarda und So 2010).

Bei entsprechenden Noxen entsteht durch NALP3 induziert ein Inflammasom, das eine entzündliche Reaktion startet (s. Abbildung 4).

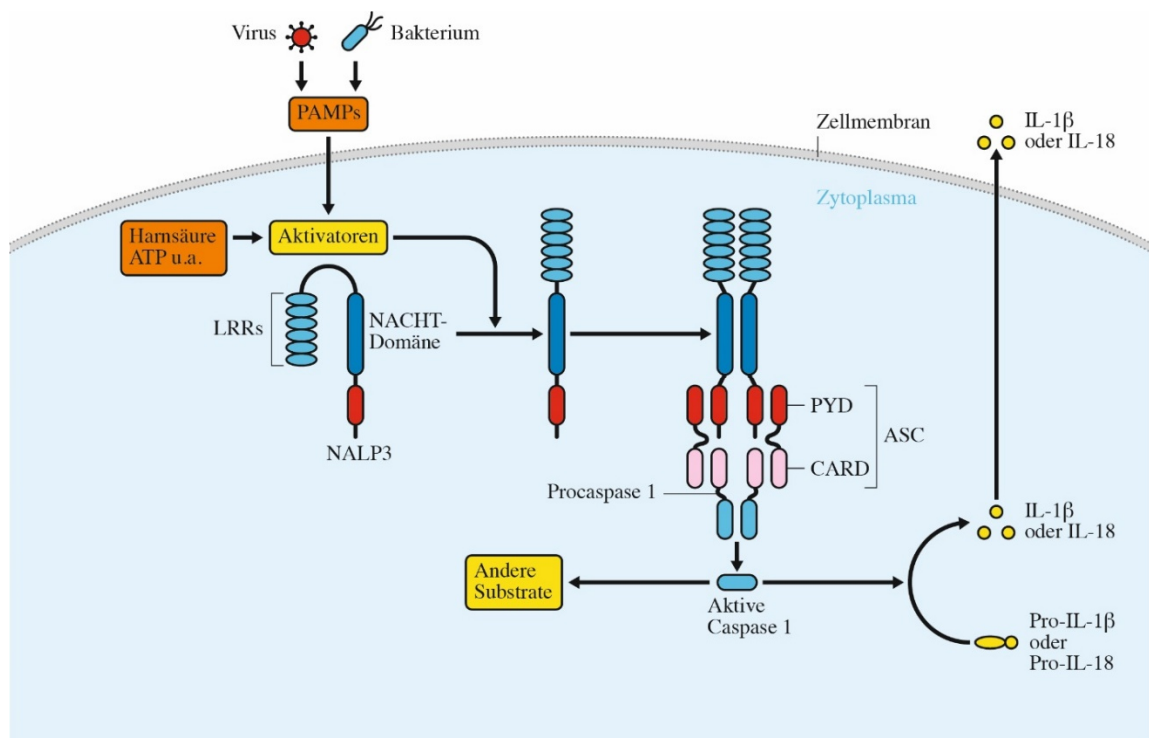


Abbildung 4: Mechanismus der NALP3-Komplexbildung von Inflammasomen

Nach Tschopp und Schroder (2010). Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung der Springer Nature AG & Co. KGaA Verlagsgruppe.

Das NALP3 reagiert als Sensormolekül auf unterschiedliche Arten von Noxen, z. B. auf kristalline Strukturen, u. a. auf Harnsäure (Martinon et al. 2006; Dostert et al. 2008; Hornung et al. 2008) und spielt damit eine Rolle bei der Auslösung einer entzündlichen Reaktion eines Gichtanfalls.

Sensitiv ist das NALP3 ebenfalls bei einem Kaliumverlust der Zelle (Pétrilli et al. 2007). Zu einem bedeutenden Kaliumverlust der Zelle und damit zu einer Aktivierung des NALP3 kommt es in der Phase der Exzitotoxizität nach einem ischämischen Schlaganfall (s. Kapitel 1.2.1).

In der Phase der Exzitotoxizität nach einem ischämischen Geschehen entstehen Sauerstoffradikale, auf die NALP3 ebenfalls reagiert (Orrenius et al. 1992; Iadecola und Anrather 2011; Heid et al. 2013).

Die Reaktion des Sensormoleküls NALP3 auf anfallende Produkte oder Effekte nach einer zerebralen Minderdurchblutung startet nach Verbindung mit der LRR-Domäne und ASC zum Inflammasom die entzündliche Reaktion, die dann zu einer weiteren Destruktion von Hirnzellen führt. Damit nimmt NALP3 eine Schlüsselstellung im Ablauf nach einem Schlaganfall ein (Tschopp und Schroder 2010).

Nachgewiesen ist, dass das Vorhandensein von NALP3 verbunden ist mit einer spezifischen Komposition des Darmmikrobioms (Elinav et al. 2011; Hirota et al. 2011).

1.4 Mikrobiom

Das Immunsystem reagiert auf pathogene Bakterien, toleriert aber kommensale Bakterien (Kosiewicz et al. 2011). Diese Bakterien sind u. a. auf der Haut, in Mund, Nase und dem oberen Respirationstrakt beheimatet, der größte Teil befindet sich jedoch im Verdauungstrakt, nämlich 10^{14} Bakterien (Luckey 1972; Savage 1977). Die meisten von ihnen gehören zu den Stämmen *Firmicutes* und *Bacteroidetes* (Qin et al. 2010).

Als Mikrobiota bezeichnet man die Gesamtheit aller den Menschen besiedelnden Mikroorganismen, als Mikrobiom die Gesamtheit der Gene dieser Mikroorganismen (Lederberg und McCray 2001; Bäckhed et al. 2005). Das Darmmikrobiom spielt, wie wir heute wissen, neben der Verwertung der Nahrung eine wichtige Rolle bei der Steuerung der Immunantwort bei entzündlichen Geschehen (Round und Mazmanian 2009).

Die gesteuerten Entzündungsreaktionen können sich direkt im Darm abspielen, wie zum Beispiel bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (Frank et al. 2007). Aber auch darmferne entzündliche Erkrankungen wie Diabetes mellitus Typ I (Hansen et al. 2006) und Multiple Sklerose (Wang und Kasper 2014) oder neurologische Entwicklungsstörungen (Hsiao et al. 2013) sollen durch das Darmmikrobiom in ihrem Verlauf beeinflusst werden (Round und Mazmanian 2009).

Jüngere Forschungen ergaben, dass das Darmmikrobiom an der Homöostase des Zentralnervensystems beteiligt ist. In einem keimfreien Mausmodell, sog. *germ-free mice* (GF), zeigte sich im Vergleich zu Mäusen mit einer normalen Darmflora eine durchlässigere Blut-Hirn-Schranke (Braniste et al. 2014).

Wie zuvor berichtet, läuft nach einem ischämischen Schlaganfall im Schadensbereich eine programmierte Kaskade ab. Ein entscheidendes Element dieser Kaskade ist die postischämische Inflammation, deren Intensität durch das Immunsystem gesteuert wird (s. Kapitel 1.2.4). Wie oben aufgeführt, spielt das Darmmikrobiom eine Rolle bei der Steuerung einer Immunantwort. Es liegt nun die Vermutung nahe, dass auch eine postischämische Inflammation beeinflusst werden kann, wenn das Darmmikrobiom verändert wird.

Zum Zeitpunkt des Beginns dieser Arbeit lagen zu dieser Hypothese noch keinerlei Forschungsergebnisse vor.

Die bakterielle Zusammensetzung des Darmmikrobioms bei Mäusen mit Genknockout von NALP3 untersuchten Hirota et al. (2011). Bei diesen NALP3^{-/-}-Mäusen wurden neben Mitgliedern der Familie *Enterobacteriaceae*, nämlich die Gattungen *Citrobacter*, *Proteus* und *Shigella*, auch die Gattungen *Mycobacterium*, *Collinsella*, *Subdoligranulum*, *Clostridium* und *Ralstonia* gefunden.

Verändert werden kann das Darmmikrobiom zum Beispiel durch eine antibiotische Behandlung, wodurch auf das jeweilige Antibiotikum empfindliche Bakterienstämme eliminiert werden (Elinav et al. 2011).

1.4.1 Mikrobiom und Antibiose

Der Großteil der in Kapitel 1.4 aufgeführten Bakterienpopulation reagiert empfindlich auf die Kombination der Antibiotika Ciprofloxacin und Metronidazol, sodass mit diesen Medikamenten eine weitgehende Eradikation erreicht werden kann (Elinav et al. 2011) und

ich mich deshalb für diese Antibiotikakombination bei meiner Versuchsreihe entschlossen habe.

1.4.2 Mikrobiom und Cohousing

Darmmikrobiome sind im Versuch mit Mäusen von Tier zu Tier übertragbar durch gemeinsame Haltung, sogenanntes Cohousing (Elinav et al. 2011; Henao-Mejia et al. 2012). Die Übertragung findet durch das Fressen von Kot der zusammen gehaltenen Mäuse statt, ein Verhalten, das bei dieser Gattung normal ist und Koprophagie genannt wird (Takahashi et al. 1985; Ebino et al. 1986; Ebino et al. 1987; Rijnberk und de Vries 2004).

In den Versuchen von Elinav et al. (2011) wurden Knockout-Mäuse ($^{-/-}$) mit ASC $^{-/-}$, einem Adapterprotein, sowie NALP6 $^{-/-}$ und NALP3 $^{-/-}$ jeweils gemeinsam im Käfig gehalten mit Wildtyp (WT)-Mäusen. Hierbei kam es zu einer Übertragung der NLRP6 $^{-/-}$ -Darmmikrobiota auf die WT-Tiere, bewiesen durch Sequenzierung der bakteriellen 16S-ribosomalen RNA-Gene (rRNA) in Kotproben.

Elinav et al. (2011) stellten ebenfalls fest, dass NALP3 $^{-/-}$ -Mäuse nach vierwöchigem Cohousing mit WT-Mäusen eine geringer ausgeprägte Kolitis nach Gabe von Dextran-Natriumsulfat (DSS) über das Trinkwasser zeigten als die WT-Mäuse der Vergleichsgruppe. Die Zeit des Cohousings betrug bei diesen Versuchen vier Wochen.

1.5 Tiermodell

Neuroprotektive Behandlungen für die postprimäre Phase nach einem Schlaganfall sind bisher nur begrenzt möglich aber dringend gewünscht und daher Ziel der Forschung von Neurowissenschaftlern.

Die zerebrale Blutversorgung von Mäusen ist der des Menschen sehr ähnlich (s. Abbildung 5), daher wird die experimentelle Schlaganfallforschung vorzugsweise an dieser Spezies durchgeführt (Rami et al. 2008). Behandlungskonzepte aus der experimentellen Forschung können nur auf den Menschen übertragen werden, wenn die Tiermodellversuche der Ätiologie, der Pathogenese und vor allem der Physiologie des Menschen möglichst ähneln (Perel et al. 2007).

Im Laufe der Zeit wurden verschiedene Tiermodelle für die Schlaganfallforschung entwickelt. Dabei wird hauptsächlich unterschieden in der Art, wie die zerebrale Blutzufuhr unterbrochen wird: global oder fokal, transient oder permanent.

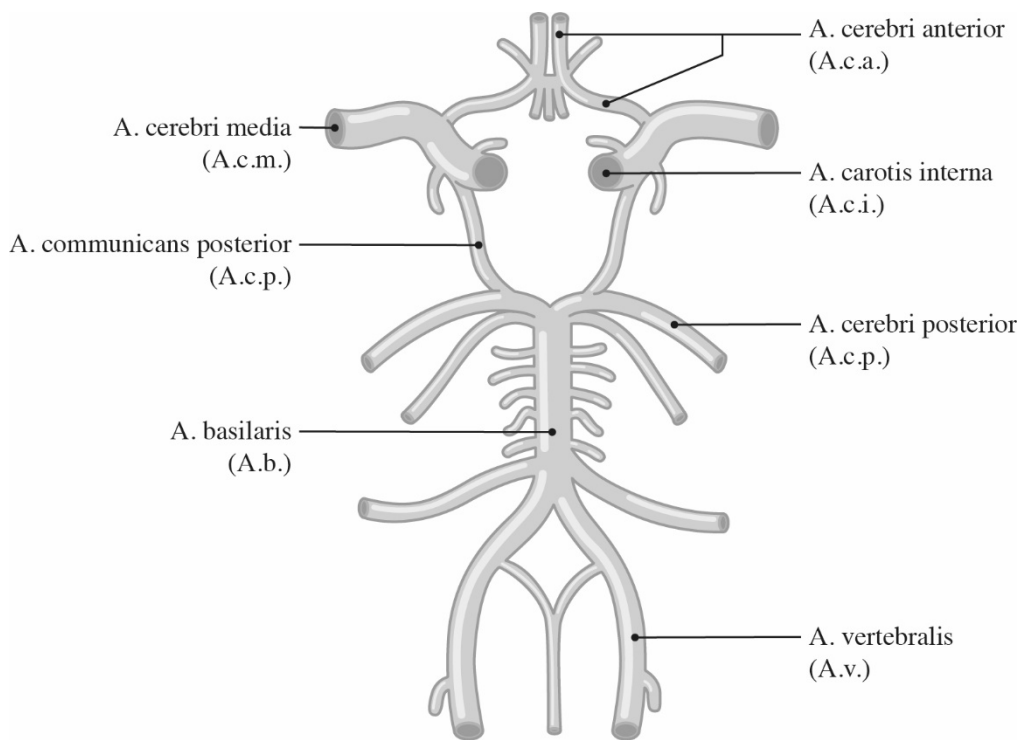


Abbildung 5: *Circulus arteriosus cerebri* des Menschen. Quelle: Eigene Darstellung.

1.5.1 Modell fokaler zerebraler Ischämie

Der ischämische Schlaganfall beim Menschen beruht meistens auf einer Minderperfusion im Stromgebiet der *Arteria cerebri media* (Mattle und Mumenthaler 2013). Für realitätsnahe Experimente am Tier empfehlen sich daher Modelle, die ebenfalls einen Verschluss dieser hauptsächlich betroffenen Arterie hervorrufen (Engel et al. 2011).

Die Auswirkung des Gefäßverschlusses auf die Lage und die Größe des betroffenen Hirnareals erklärt sich durch die anatomischen Gegebenheiten. Wird transtemporal (über eine Ligatur, Kauterisierung oder Clip) die *Arteria cerebri media* (A.c.m.) distal verschlossen, ist nahezu ausschließlich neocorticales Gewebe betroffen (Tamura et al. 1981). Bei einem proximalen Verschluss der Arterie ist das gesamte Mediastromgebiet betroffen, einschließlich der Basalganglien (Baron et al. 2013).

Für die Forschung über die Mechanismen der postischämischen Inflammation ist der Verschluss der *Arteria cerebri media*, die sog. *Middle cerebral artery occlusion* (MCAO) ein übliches Modell (Engel et al. 2011), das auch in dieser Arbeit angewendet wird.

Über die *Arteria carotis communis* (A.c.c.) wird ein Silikon-beschichtetes Filament bis in die Basis der A.c.m. vorgeschoben. Über diese Lumenblockade sistiert der Blutfluss (s. Abbildung 7).

Über die Zeit des Gefäßverschlusses kann ebenfalls die Größe des Gewebeschadens beeinflusst werden (Engel et al. 2011).

1.6 Fragestellung und Zielsetzung

Dirnagl et al. diskutierten 1999, dass der inflammatorische Prozess nach einem ischämischen Schlaganfall, gesteuert über das Immunsystem, den neurologischen Schaden anfangs verschlimmert, aber auch essentiell für die spätere Regeneration ist. Borovikova et al. (2000), bestätigt von Collins und Bercik (2009), beschrieben eine gegenseitige Einflussnahme von intestinalen Mikroorganismen und dem Immunsystem durch eine veränderte Aktivierung des Immunsystems über intestinal bakteriell vermittelte Endotoxin- und Zytokinausschüttung. Elinav et al. (2011) und Hirota et al. (2011) belegten den Einfluss des Mikrobioms auf Inflammationsprozesse am Darm.

In unserer Arbeitsgruppe hatte bereits Czech-Zechmeister (persönliche Mitteilung, 2013) gezeigt, dass eine Veränderung des Darmmikrobioms bei Mäusen durch Cohousing die Schadensgröße nach einer MCAO beeinflusst (s. Kapitel 2.4.1). Bis zum Beginn dieser Arbeit nicht untersucht wurde der Einfluss eines durch eine Antibiose veränderten Darmmikrobioms auf einen Hirninfarktschaden.

Ziel dieser Arbeit ist es, diesen Einfluss zu untersuchen auf die Größe eines Hirninfarktes und den neurologischen Schaden, hervorgerufen nach einer MCAO bei Mäusen. NALP3 ist ein bisher gut untersuchtes Sensormolekül, das als Teil des Inflammasoms die Immunreaktion u. a. auch nach einem ischämischen Schlaganfall startet (Orrenius et al. 1992; Iadecola und Anrather 2011; Heid et al. 2013). Bekannt ist, dass die Präsenz von NALP3 gekoppelt ist mit einer speziellen Komposition des Darmmikrobioms (Hirota et al. 2011).

Für die Versuche dieser Arbeit wurden nur Tiere mit einem NALP3^{-/-}-Darmmikrobiom eingesetzt. In der ersten Hauptgruppe dieser Arbeit wurde das NALP3^{-/-}-Darmmikrobiom durch Cohousing und Koprophagie auf WT-Mäuse übertragen und die Darmmikrobiome der Versuchstiere dadurch angeglichen (s. Abbildung 6). Diese WT(NALP3^{-/-})-Tiergruppe wurde aufgeteilt in zwei Untergruppen, von denen eine Untergruppe eine Antibiose (Abx) vor der MCAO erhielt. Bei dieser Untergruppe, WT(NALP3^{-/-})_(Abx), wurde das Darmmikrobiom zweimal verändert (Cohousing und Antibiose), bei der anderen Untergruppe, WT(NALP3^{-/-}), nur einmalig durch das Cohousing.

Die zweite Hauptgruppe bestand aus Tieren mit stammtypischem NALP3^{-/-}-Darmmikrobiom. Auch hier wurden nach Cohousing zwei Untergruppen gebildet, von denen eine vor der MCAO antibiotisch behandelt wurde, im Folgenden als NALP3^{-/-}_(Abx) benannt. Damit wurde bei der einen Untergruppe das Darmmikrobiom vor der MCAO nicht verändert (NALP3^{-/-}), bei der anderen einmalig durch die antibiotische Behandlung (s. Abbildung 6).

Kann die Hypothese bestätigt werden, dass über ein durch Antibiotikagabe verändertes Darmmikrobiom Einfluss genommen werden kann auf den Schaden eines akuten Hirninfarktes, könnte sich ein Ansatz ergeben für eine Therapie zur Neuroprotektion nach einem Schlaganfall.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte und Material

Tabelle 1: Geräte

Produkt	Hersteller
Anästhesiesystem für Isofluran	Drägerwerk AG & Co. KGaA, Lübeck
AxioCam MRm (Kamera Mikroskop)	Carl Zeiss Microimaging GmbH, Jena
Axio Examiner. Z1 (Mikroskop)	Carl Zeiss Microimaging GmbH, Jena
dH ₂ O Sartorius arium® 611 VF	Sartorius AG, Göttingen
Eismaschine AF103	Scotsman, Großbritannien
Elektrophorese-Netzgerät EV231	Consort BVBA, Belgien
Feinwaage BL 210 S	Sartorius AG, Göttingen
Floureszenzlampe HXP 120C	Carl Zeiss Microimaging GmbH, Jena
Gelschlitten mit 2 Kämmen	Simplebiotech GmbH, Leipzig
Homeothermic Blanket Control Unit	Harvard Apparatus, USA
Infrarot-Thermometer Scantemp 385	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Kaltlichtquelle KL 1500 LCD	Schott AG, Jena
Kühlzentrifuge 5415R	Eppendorf AG, Hamburg
Magnetrührer IKAMAG® Reo SFB 330	IKA, Staufen
Mikrowelle R-208+	Sharp K.K., Japan
Mikroskop Axiostar plus	Carl Zeiss AG, Jena
Operationsmikroskop Stemi 2000	Carl Zeiss AG, Jena
Paraffin-Einbettssystem Medite® TES Valida	Medite GmbH, Burgdorf
Perfusionspumpe Reglo Digital MS-2/12, ISM 596D	Ismatec SA, Schweiz
pH-Meter Basic pH Meter PB-20	Sartorius AG, Göttingen
Scanner hp scanjet 7400c	Hewlett Packard, USA
SM 2000R (Schlittenmikrotom) HI 1220 (Wärmeplatte)	Leica Mikrosysteme GmbH, Wetzlar

Produkt	Hersteller
TUC2 Flat Cooler (Kühlplatte)	Pathisto®; Wendt Maschinenbau GmbH & Co KG, Georgsmarienhütte
Schüttler WT17	Biometra GmbH, Göttingen
SMC 2009 (Tischsteuerung Mikroskop)	Carl Zeiss Microimaging GmbH, Jena
Stoppuhr Model SKT 338N	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Thermocycler Cyclone 25	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Thermomixer comfort 5355	Eppendorf AG, Hamburg
tiermedizinische Erholungskammer	Peco Services Ltd, USA
Tischzentrifuge Sprout	Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Steinfurt
Trockenschrank Heraeus Function line UT 20	Kendro Laboratory Products, Hanau
UV-Lampe TFX-35 LC	Schütt Labortechnik GmbH, Göttingen
Vortex-Gerät VF2	IKA, Staufen
Waage BL 3100	Sartorius AG, Göttingen

Tabelle 2: Chirurgisches Material

Produkt	Hersteller
chirurgische Schere (surgical scissors)	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg (14084-09)
feine Schere (Extra Fine Bonn Scissors)	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg (14084-08)
gebogene Dumont Pinzetten #7 (Dumontforceps)	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg (11271-30)
gefederte Schere (Spring Scissors)	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg (15000-00)
Gehirnschneider	ASI-Instruments, USA (RMB-2000C)
große Schere (surgical scissors – sharp/blunt)	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg (14001-01)

Produkt	Hersteller
kleiner Nadelhalter (Olsen-Hegar Needle Holder)	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg (12002-12)
Mikrovaskularklemme (microvascular clamp)	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg (18055-04)
mittelgroße Schere (Standard Pattern Scissors)	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg (14101-14)
Nadelhalter (needle holder)	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg (12002-14)
Pinzette (applying forceps for micro clamp)	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg (18057-14)
Pinzette (Cover Glass Forceps)	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg (11073-10)
Pinzette (Student Adson Forceps)	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg (91106-12)
Rasierklingen Isana Men	Dirk Rossmann GmbH, Burgwedel
Spatel	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg
spitze Dumont Pinzette #5CO (medical forceps – Dumostar Biologie Tip)	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg (11295-20)
3-0 Faden (3.0 string) Seide, FS-1, Rundnadel 24 mm B/8c 45 cm	Ethicon (Johnson-Johnson Intl.), USA
5-0 Faden (5.0 string) Polyester, 6 x 45cm	Ethicon (Johnson-Johnson Intl.), USA
6-0 fine MCAO Suture L910 Re PK5 (silikonbeschichtetes Filament)	Doccol Corporation, USA (6021910PK5Re)

Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
0,5 ml Reagenzgefäße (Eppendorfcup)	Eppendorf AG, Hamburg
1,5 ml Reagenzgefäße (Eppendorfcup)	Eppendorf AG, Hamburg
50 ml Reagenzröhrchen, Falcon	Becton Dickinson GmbH (BD Biosciences), USA
BD Plastikpak™ 1ml-Spritze	Becton Dickinson GmbH (BD Biosciences), USA
Deckgläser, 24 x 46 mm	Menzel-Gläser, Braunschweig
Duran™ Weithals-Erlenmeyerkolben, Borosilikatglas (500 ml)	DWK Life Sciences, Wertheim
Fettstift Dako Pen	Agilent Technologies Inc., Dänemark Art.-Nr. S200230
Gewebekulturschalen, 10 ml	Sarstedt AG und Co. KG, Nümbrecht
Handschuhe Sterling™ Nitrile KC 300	Kimberly-Clark, USA REF 13941
Indikatorstäbchen pH-Fix 0-14	Carl Roth GmbH, Karlsruhe Art.-Nr. 0549
Laborglasflaschen Schott Duran® (500 ml, 1000 ml) mit Schraubkappenverschluss	DWK Life Sciences, Wertheim
Objektträger Superfrost® Plus	Menzel-Gläser, Braunschweig LOT: 102512-19
Objektträgerkasten	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf Art.-Nr. 733019
Pasteurpipetten Glas Pasteur Capillary Pipettes, Short (Größe: 150 mm)	Wilhelm Ulbrich GdbR, Mainz
PCR-Gefäße (0,2 ml; 8er-Streifen)	Starlab GmbH; Ahrensburg
Pipettenspitzen TipOne® (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Starlab GmbH, Hamburg
Reagenzgefäße (0,5 ml; 1,5 ml; 2,0 ml)	Eppendorf AG, Hamburg

Produkt	Hersteller
Röhren mit Schraubverschluss, 15 ml	Becton Dickinson GmbH (BD Biosciences), USA
Rotilabo®-Einbettkassetten, für Biopsien	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe Art. E479.1
Tissue Tek Filterblock für Einbettkassetten	Vogel GmbH & Co. KG, Gießen Best.-Nr. SA-4699
Transferpipetten (10 ml, 25 ml)	Sarstedt AG und Co. KG, Nümbrecht
Tuberkulinspritzen (25 G), Omnifix®-F, 1ml	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Unterlagen MoliNea® plus L (40 x 60 cm)	Paul Hartmann AG, Heidenheim
Vernichtungsbeutel	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht REF 86.1197
Wattestäbchen, kleiner Kopf	Karl Beese (GmbH & Co.) Medical, Barsbüttel REF 1260
3M™ Durapore™ Medical tapes	3M Company, USA
18 G – Kanülen BD Microlance™ 3	Becton Dickinson GmbH (BD Biosciences), USA REF: 304 622
30 G – Kanülen Sterican®	B. Braun Melsungen AG, Melsungen

Tabelle 4: Chemikalien und Bioreagenzien

Produkt	Hersteller	
Ciprofloxacin, Laborqualität	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen	Bestell.-Nr. 17850
DirectPCR® Lysis Reagent Tail	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen	Bestell.-Nr. 31-101-T
Eindeckmittel Shandon Immu-Mount™ (20 ml)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA	REF 9990402

Produkt	Hersteller	
Essigsäure Emsure® 100%	Merck KGaA, Darmstadt	Bestell-Nr. 1.00063.1000
Ethanol absolute Emplura®	Merck KgaA, Darmstadt	Bestell-Nr. 8.18760.2500
Ethanol 99%	CVH Chemie-Vertrieb GmbH & Co. Hannover KG, Hannover	
Ethidiumbromid $\geq 98\%$ zur DNA-Färbung. Homidiumbromid, 3,8-Diamino-5-ethyl-6-phenylphenanthridiniumbromid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	Bestell-Nr. 7870.1
Ethylendiamin-tetraessigsäure Dinatriumsalz-Dihydrat (EDTA) $\geq 99\%$, p. a., ACS	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	Art.-Nr. 8043.3
Flüssigstickstoff	Linde AG, Pullach	
Glucose (5%ig)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen	
Isofluran (Forene®)	Abbott AG, Schweiz	
Kaliumchlorid (KCl)	Merck KGaA , Darmstadt	Bestell-Nr. 1.04936.1000
Kaliumpermanganat	Fluka Chemie AG, Schweiz	
Kaliumphosphat (KH ₂ PO ₄) monobasisch, ACS reagent, 99,0%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen	
Kapa 2G Fast PCR Kit mit Fast DNA-Polymerase [5 u/μl], dNTP-Mix [40 mM], Magnesiumchlorid [25 mM], Reaktionspuffer A [5x] (Ladepuffer).	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen	

Produkt	Hersteller	
Metronidazol, Laborqualität	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen	Bestell-Nr. M3761
MgCl ₂ Solution, 25 mM	Promega Corporation, USA	
Natriumchlorid (NaCl), 50 ml in Glasflasche	Fresenius Kabi Deutschland, Homburg	
Natriumhydroxid (NaOH)-Plättchen > 98,0% (T)	Fluka Chemie AG, Schweiz	Art.-Nr. 71690
Normal Donkey Serum (NDS)	Merck Millipore, USA	Katalog-Nr. S30-100 ml
Oligonukleotid Synthese Sequenz (5' → 3') fwNALP3 GCTAGGACATACGT-CTGGA (20) revNALP3wt TGAGGTCCACAT-CTTCAAGG (20) revNALP3ko TTGTAGTTGCCG-TCGTCCTT (20)	Eurofins Genomics, Ebersberg	
peqGOLD PCR Mastermix Y lot: 082211 mit 2x konzentrierter Mastermix mit GoTaq® DNA Polymerase, dNTPs und Magnesiumchlorid	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen	Bestell-Nr. 01-1310
peqGOLD 100 bp DNA-Leiter	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen	
PFA pH7 Roti®-Histofix 4%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	
Proteinase K	AppliChem GmbH, Darmstadt	Bestell-Nr. A3830.01000

Produkt	Hersteller	
ROTI®Garose für die DNA/RNA-Elektrophorese (Agarosepulver)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	Bestell.-Nr. 3810.1
Roti®-Histokitt II	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	
Salzsäure (HCl) c(HCl)=1 mol/l (1N)	Merck KGaA, Darmstadt	Bestell.-Nr. 109057 1000
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Merck KGaA, Darmstadt	Bestell.-Nr. 1.08382.1000
Triton-X-100 Alkylphenylpolyethylenglykol reinst M 624 g/mol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen	
Xylol (Isomere) Xylol > 98% rein	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	Art.-Nr. 9713.3
Zitronensäure	Merck KGaA, Darmstadt	Bestell.-Nr. 1.00244.05000
2,3,5 – Triphenyltetrazolium- chlorid (TTC) ≥ 98,5%, p. a.	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	Art.-Nr. KK13.2
2,3,5 – Triphenyltetrazolium- chlorid (TTC)	Merck KGaA, Darmstadt	
5% Dexpanthenol (Bepanthen® Augensalbe)	Bayer AG, Leverkusen	
5X Green GoTaq® Flexi Buffer	Promega Corporation, USA	

Tabelle 5: Puffer

Name	Inhalt	pH
Citratpuffer	6 g Zitronensäure 3000 ml dH ₂ O	6,0
PBS	800 ml dH ₂ O 8 g NaCl 0,2 g KCl 2,16 g Na ₂ HPO ₄ 0,2 g K ₂ HPO ₄	7,4
TAE (10fach)	48,46 g Tris 11,42 µl Essigsäure 20 ml 0,5 M EDTA pH 8,0	8,5
TBS	800 ml dH ₂ O 8,8 g NaCl 2,4 g Tris-Base	7,6

Tabelle 6: Antikörper

Produkt (Konzentration)	Herkunft	Hersteller	Bestellnummer
Polyklonale Primärantikörper			
Anti-GFAP (1:1000)	Huhn	Merck Millipore, USA	Bestell-Nr. AB5541
Anti-Iba-1 (1:1000)	Hase	Wako Chemicals, USA	Bestell-Nr. 019-19741
Monoklonale Primärantikörper			
Anti-NeuN (1:500)	Maus	Merck Millipore, USA	Bestell-Nr. MAB377

Produkt (Konzentration)	Herkunft	Hersteller	Bestellnummer
Polyklonale Sekundärantikörper			
Cy3 konjugiert Anti-Rabbit (1:250)	Affe	Jackson Immuno, UK	Bestell-Nr. 711-165-152
Cy5 konjugiert Anti-Mouse (1:250)	Affe	Jackson Immuno, UK	Bestell-Nr. 715-175-150
FITC konjugiert Anti-Chicken (1:250)	Affe	Jackson Immuno, UK	Bestell-Nr. 703-095-155

Tabelle 7: Computersoftware und Programme

Adobe Photoshop CS4 (64 Bit)	Adobe Systems, USA
ImageJ (64 bit) Version: 1.46r	National Institutes of Health, USA
Microsoft Office Excel 2007	Microsoft Corporation, USA
Microsoft Office Word 2007	Microsoft Corporation, USA
Satistica 13.0	StatSoft Inc., USA

2.2 Versuchstiere

2.2.1 Herkunft und Haltung

Die Genehmigung der Experimente wurde von der Tierschutzkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen und dem Niedersächsischen Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (LAVES) erteilt. Die Experimente wurden unter der Tierversuchsantragsnummer G 267.11 durchgeführt.

Die NALP3^{-/-}-Mäuse zur Zucht wurden zur Verfügung gestellt von der Abteilung Biochemie der Universität Lausanne.

Die Zucht erfolgte im Europäischen Neurowissenschaftlichen Institut Göttingen (ENI).

Die Tiere wurden im ENI aus heterozygoten NALP3-Tieren gezüchtet. Für die Versuche wurden männliche homozygote NALP3^{-/-}-Mäuse sowie homozygote WT-Mäuse mit einem C57Black/6N-Hintergrund verwendet.

Untergebracht und versorgt wurden die Mäuse in der Zentralen Tierexperimentellen Einheit der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen.

Die Haltung erfolgte standardisiert in einem 12 Stunden Hell-Dunkel-Rhythmus. Die Käfige waren normierte Standardkäfige mit Futterpellets und Wasser ad libitum sowie Spänen als Einstreu und einem roten Kunststoffhaus.

Die Mäuse wurden täglich gewogen, um sie an das Handling zu gewöhnen.

Das Alter der Tiere zum Zeitpunkt der MCAO lag zwischen 10 und 22 Wochen.

2.2.2 Genotypisierung

Zur Genotypisierung der Mäuse waren die DNA-Extraktion aus der Schwanzspitze, die Vermehrung der Genabschnitte mittels einer PCR und die Gelelektrophorese zur Auftrennung der unterschiedlich langen Genfragmente notwendig.

2.2.2.1 DNA-Extraktion

Zur DNA-Extraktion wurden zu dem im 1,5 ml Eppendorfcup liegenden 0,2-0,3 mm langen Schwanzstück 200 µl DirectPCR® Lysis Reagent Tail sowie 0,3 mg/ml Proteinase K gegeben. Die Proben wurden bei 55°C über Nacht auf einer Schüttelplatte bis zur kompletten Lyse des Gewebes inkubiert. Die Eppendorfcups wurden mit dem Vortexmischer durchmischt.

Der Reaktionsansatz wurde bei 85°C für 60 min inkubiert, um eine vollständige Inaktivierung der Proteinase K zu erzielen. Die Proben wurden bei -20°C gelagert.

2.2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion

Für die Polymerase-Kettenreaktion erfolgte zunächst auf Eis die Zusammenstellung eines Mastermix:

Tabelle 8: Mastermix

Menge	Produkt
10,3 µl	dH ₂ O
4 µl	5X Green GoTaq® Flexi Buffer
2 µl	dNTPs Mix

Menge	Produkt
0,2 µl	Primer NALP3 fw 5' GCTAGGACATACGTCTGGA 3'
0,1 µl	Primer NALPr rwKO 5' TTGTAGTTGCCGTCGTCCTT 3'
0,1 µl	Primer NALP3 rwWT 5' TGAGGTCCACATCTTCAAGG 3'
1,2 µl	MgCl ₂ Solution, 25 mM
0,1 µl	GoTaq® DNA Polymerase (5u/µl)

Je 18 µl des Mastermix wurden auf 500 µl Eppendorfcups aufgeteilt. Für die Negativkontrolle wurden 2 µl dH₂O, für die Positivkontrolle die DNA eines transgenen Tieres verwendet. Dann wurden dem Mastermix je 2 µl der zuvor 5 min bei 10.000 rpm zentrifugierten DNA-Lösung hinzugegeben.

DNA und Mastermix wurden vermischt und in den Thermocycler gestellt. Dieser wurde wie folgt programmiert:

Tabelle 9: Programmierung des Thermocyclers

Schritt	Temperatur in °C	Zeit in sec	Anzahl der Zyklen
initiale Denaturierung	95	120	1
Denaturierung	95	30	35
Primerhybridisierung	56	30	
DNA-Synthese	72	60	
abschließende DNA-Synthese	72	300	1
Kühlung zur Lagerung	4	12 Stunden	

Für die anschließende Gelelektrophorese wurde das 2%ige Agarosegel vorbereitet. Hierzu wurden 3,6 g Agarosepulver abgewogen und mit 180 ml TAE-Puffer (TRIS-Acetat-EDTA-Puffer) in einem Erlenmeyerkolben mittels Rührfisch vermischt. Das Ganze wurde in der Mikrowelle erhitzt, bis sich das Pulver vollständig gelöst hatte. Im Anschluss wurde

gewartet, bis sich die Lösung bis auf Handwärme abgekühlt hatte. Nun wurden 3,6 µl Ethidiumbromid (EtBr) hinzugefügt. Die Lösung wurde in einen Gelschlitten mit zwei Kämmen gegossen. Nach Festwerden des Gels wurden die Kämmen entfernt. Nach Beendigung der PCR wurden jedem Eppendorfcup mit DNA-Lösung 4 µl Ladepuffer hinzugefügt. Diese Lösung wurde in die Geltaschen an der Kathode aufgetragen. Zur Bestimmung der Länge wurde in je eine Geltasche der Marker für Wildtyp, 327 Basenpaare (bp), sowie der Marker für NALP3^{-/-}, 589 bp, aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde mit 90 V für 35 min durchgeführt. Das Gel wurde auf eine UV-Lampe gelegt und beurteilt.

2.2.3 Kriterien zur Gruppeneinteilung

Es wurden nur männliche Tiere bei den Versuchen eingesetzt, um eventuelle geschlechtsspezifische Eigenschaften, die die Ergebnisse beeinflussen könnten, auszuschließen.

Die Mäuse waren 10 bis 22 Wochen alt und hatten ein Ausgangsgewicht zwischen 20,2 g bis 31,5 g.

2.2.4 Cohousing

Die WT- und NALP3^{-/-}-Tiere wurden von Geburt an über einen Zeitraum von mindestens zehn Wochen bis zur Durchführung der MCAO gemeinsam in Käfigen gehalten, um eine Übertragung und Angleichung des Darmmikrobioms durch Koprophagie zu ermöglichen.

2.3 Antibiose

Als Antibiotika wurden Ciprofloxacin in einer Konzentration von 0,2 mg/ml und Metronidazol in einer Konzentration von 1 mg/ml verwendet. Für 500 ml Trinkwasser wurden 0,1 g Ciprofloxacin abgewogen und mit 400 ml Leitungswasser 30-45 Minuten mit einem Magnetrührer verrührt. Während des Rührens wurden 43 Tropfen HCl [1 mol/l] hinzugegeben, bis sich das Ciprofloxacin vollständig gelöst hatte. Im Anschluss wurden 100 ml Glucose (5%ig) und 0,5 g Metronidazol hinzugefügt. Jeweils 100 ml der Lösung wurden in eine Trinkflasche abgefüllt.

Die Tiere ohne Antibiotikabehandlung erhielten 100 ml einer Lösung aus 400 ml Leitungswasser, versetzt mit 100 ml Glucose (5%ig).

Die Trinkflaschen wurden täglich gewogen. Alle zwei Tage wurde eine neue Lösung angesetzt und die Flaschen nach gründlichem Ausspülen mit Leitungswasser neu gefüllt und gewogen.

Die antibiotische Behandlung wurde präoperativ über 14 Tage durchgeführt.

2.4 Versuchsaufbau

2.4.1 Versuche der Arbeitsgruppe

In unserer Arbeitsgruppe wurden durch Frau Dr. Bozena Czech-Zechmeister (persönliche Mitteilung, 2013) zwei Versuchsreihen durchgeführt, auf denen der Aufbau der Hauptversuche meiner Arbeit basiert.

In der ersten Versuchsreihe wurde bei WT-Mäusen und NALP3^{-/-}-Mäusen ein Schlaganfall induziert durch die MCAO-Technik mit 60-minütiger Okklusionszeit. Nach 48-stündiger Reperfusion wurde das direkte Infarktvolume ermittelt. In dieser Versuchsreihe konnte kein Unterschied der Infarktvolumina der beiden Tiergruppen festgestellt werden.

In der zweiten Versuchsreihe unserer Arbeitsgruppe wurden WT-Mäuse verglichen mit WT-Mäusen, die mit NALP3^{-/-}-Tieren für vier Wochen im Cohousing gehalten wurden und dadurch eine Veränderung des Darmmikrobioms erfuhren. Die MCAO-Technik, die Okklusions- und Reperfusionszeit waren identisch zur ersten Versuchsreihe. Hier zeigte sich bei den Mäusen nach Cohousing ein signifikant größeres direktes Infarktvolume.

2.4.2 Eigene Versuchsreihe

Untersucht wurde eine Hauptgruppe, bestehend aus WT-Tieren nach Cohousing mit NALP3^{-/-}-Mäusen über zehn Wochen, die in zwei Untergruppen aufgeteilt wurde. Eine dieser Untergruppen erhielt vor der MCAO für zwei Wochen eine Antibiotikakombination über das Trinkwasser.

Parallel wurde ein zweiter Versuch durchgeführt mit NALP3^{-/-}-Mäusen ebenfalls mit einer Dauer des Cohousings von zehn Wochen. Auch diese zweite Hauptgruppe wurde in zwei Untergruppen aufgeteilt, von denen einer für zwei Wochen vor der MCAO eine antibiotische Behandlung über das Trinkwasser zugeführt wurde (s. Abbildung 6).

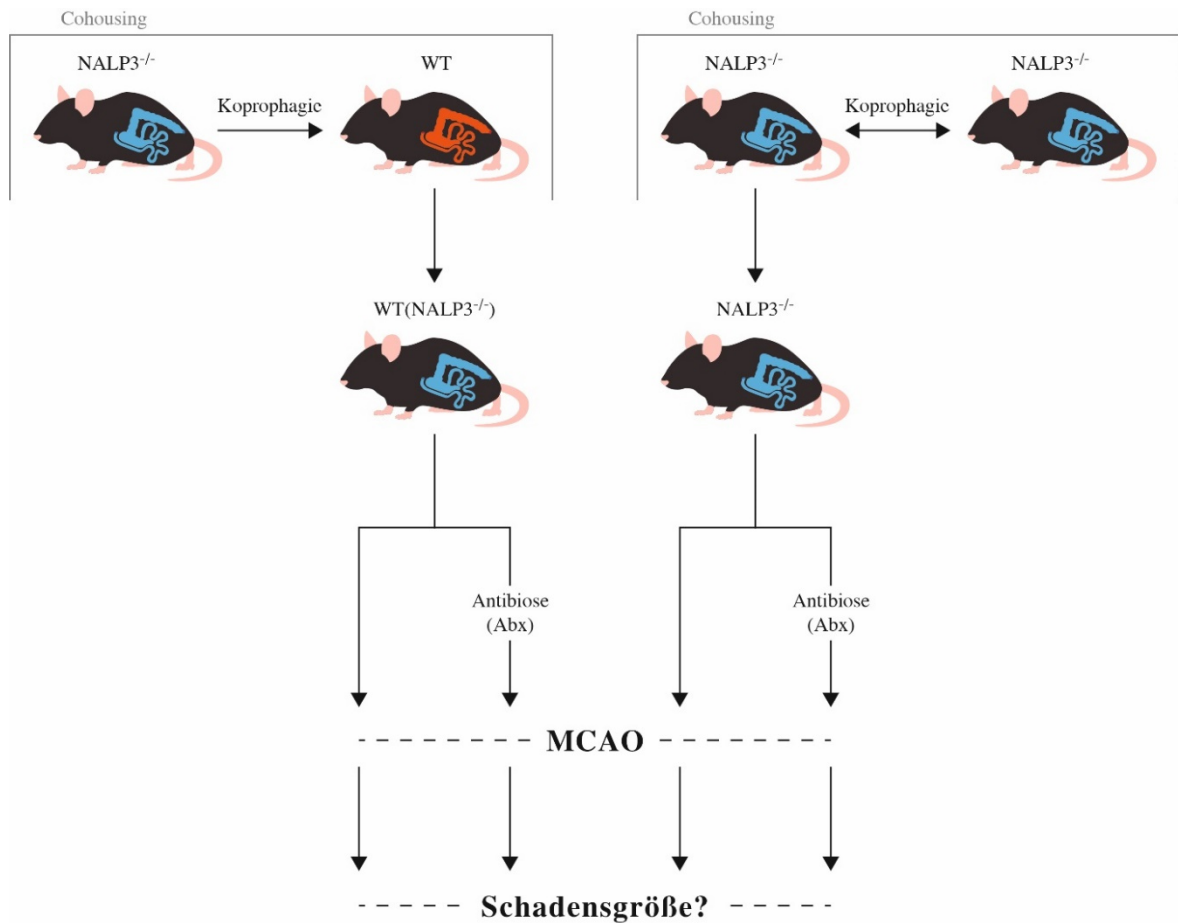


Abbildung 6: Versuchsaufbau

Durch Cohousing mit NALP3^{-/-}-Mäusen wurde das Darmmikrobiom bei WT-Mäusen (rot) verändert zu einem NALP3^{-/-}-Darmmikrobiom (blau). Die Hälfte dieser Hauptgruppe mit dem veränderten Darmmikrobiom, WT(NALP3^{-/-}), erhielt vor der MCAO eine Antibiose (Abx). Die Untergruppen wurden in Bezug auf die Schadensgröße miteinander verglichen.

Von der rechts abgebildeten Hauptgruppe mit ihrem stammtypischen NALP3^{-/-}-Darmmikrobiom erhielt ein Teil eine Antibiose vor der MCAO. Die beiden Untergruppen wurden miteinander verglichen bezüglich der Größe des ischämischen Schadens.

Im Vorlauf zu den eigentlichen Versuchen wurde die operative Technik der MCAO gelernt. Bei diesen Lernoperationen unter Anleitung von Frau Dr. Bozena Czech-Zechmeister, die zu dieser Zeit bereits eine mehr als siebenjährige Erfahrung mit der MCAO-Technik besaß, wurde eine Okklusionszeit von 60 Minuten angewandt. Bei den für diese Lernoperationen eingesetzten Versuchstieren, die sich genetisch und auch in Alter und Geschlecht unterschieden, ließen sich Infarktareale bei der histologischen Aufarbeitung nach zwölf Stunden Reperfusionzeit im Versorgungsgebiet der *Arteria cerebri media* eindeutig nachweisen. Im Rahmen einer Besprechung innerhalb unserer Arbeitsgruppe wurde über die

Okklusionszeit und Reperfusionzeit diskutiert für die geplante Versuchsreihe meiner Arbeit. Insbesondere wurde gesprochen über das Risiko, bei einer längeren Reperfusionzeit als 24 Stunden einen höheren Tierverlust in Kauf nehmen zu müssen, wie er von Versuchen anderer Autoren bekannt ist (Fisher et al. 2009; Baron et al. 2013; Andresen 2015). Entschieden wurde dann, die Okklusionszeit auf 30 Minuten zu reduzieren, wie auch Katchanov et al. (2003) es empfehlen.

2.5 In-vivo-Methoden

2.5.1 Technik der Middle cerebral artery occlusion (MCAO)

Der Verschluss der mittleren Zerebralarterie (MCAO-Modell) ist eine in-vivo-Methode des experimentellen Schlaganfalls und wurde nach dem Protokoll von Engel et al. (2011) durchgeführt.

In der vorliegenden Arbeit wurde der transiente Verschluss der Hirnarterie gewählt. Nach einer definierten Zeit von 30 Minuten wurde das die *Arteria cerebri media* verschließende Filament wieder entfernt und es kam zur Reperfusion des nachgeschalteten Gewebes.

Die Narkose der Mäuse wurde mit 1,5% Isofluran in 100% O₂ mit einem Fluss von 1,5-2 l/min in einer Kammer eingeleitet und mit 1,0% Isofluran mit einem Fluss von 0,8 l/min über eine Gesichtsmaske aufrechterhalten. Zur Analgesie wurde Buprenorphin 0,1 mg/kg Körpergewicht subkutan injiziert.

Die Augen wurden mit Bepanthen® Augensalbe vor dem Austrocknen geschützt.

Die Lagerung erfolgte auf dem Rücken unter einem Operationsmikroskop Stemi 2000, Carl Zeiss AG, Jena.

Der Verschluss der *Arteria cerebri media* wurde durch eine Lumenverlegung mit einem Filament bewirkt.

Das Filament der Firma Docol hat eine Länge von 20 mm, eine Fadenstärke von 0,21 mm ($\pm 0,002$ mm) und ist an der Spitze über eine Länge von 9-10 mm silikonbeschichtet.

Der Inzisionsbereich wurde mit Ethanol desinfiziert.

Durch eine rechtsseitige zervikale Inzision und mittels stumpfer Präparation wurde die Luftröhre als Leitstruktur dargestellt, dann die rechte *Arteria carotis communis* (A.c.c)

freigelegt und ligiert. Die abgehende *Arteria carotis externa* (A.c.e.) wurde ebenfalls ligiert und die *Arteria carotis interna* (A.c.i.) temporär mit einer Mikrovaskularklemme verschlossen. Eine Ligatur wurde vorgelegt distal der ersten Ligatur an der A.c.c., aber nicht geknotet. Zwischen diesen Ligaturen wurde mit einer gefederten Schere kurzstreckig die A.c.c. längs eröffnet und über dieses Fenster das Filament in das Gefäß eingeführt. Die Mikrovaskularklemme wurde entfernt und das Filament über die A.c.i. zur proximalen *Arteria cerebri media* (A.c.m.) vorgeschoben um sie zu verschließen. Gesichert wurde die Position des Filaments durch Anziehen der vorgelegten Ligatur.

Die Wunde wurde mit Einzelknopfnähten mit einem 3-0 Faden verschlossen.

Die Okklusion wurde für 30 Minuten aufrechterhalten. Die Reperfusion erfolgte durch Entfernen des Filaments in einer zweiten kurzen Narkose. Dabei wurde die A.c.c. durch Knoten des vorgelegten Fadens verschlossen. Es erfolgte danach erneut eine Hautnaht mit Einzelknopfnähten (s. Abbildung 7).

Während beider Eingriffe wurde die Körpertemperatur der Mäuse mittels einer Wärmeplatte konstant auf 37°C gehalten. Vor dem Erwachen aus der Narkose erhielten die Mäuse einmalig 1 ml NaCl subkutan injiziert, um eine Exsikkose zu vermeiden (Garcia et al. 1995; Li et al. 2000; Weiss et al. 2003; Hug et al. 2009)

Postoperativ wurden die Mäuse in Käfige mit frischem Einstreu gesetzt, die zu einem Drittel mit einer MoliNea-Krankenunterlage ausgelegt wurde. Darauf wurde eine Petrischale mit Breifutter gestellt. Es wurden Pellets sowie feine Haferflocken verteilt. Die Käfige wurden mit je einer frischen Trinkflasche mit Leitungswasser und einem roten Kunststoffhaus ausgestattet. Die Mäuse wurden 24 Stunden und 48 Stunden nach der Operation erneut gewogen und neurologisch getestet. Die Körpertemperatur wurde gemessen.

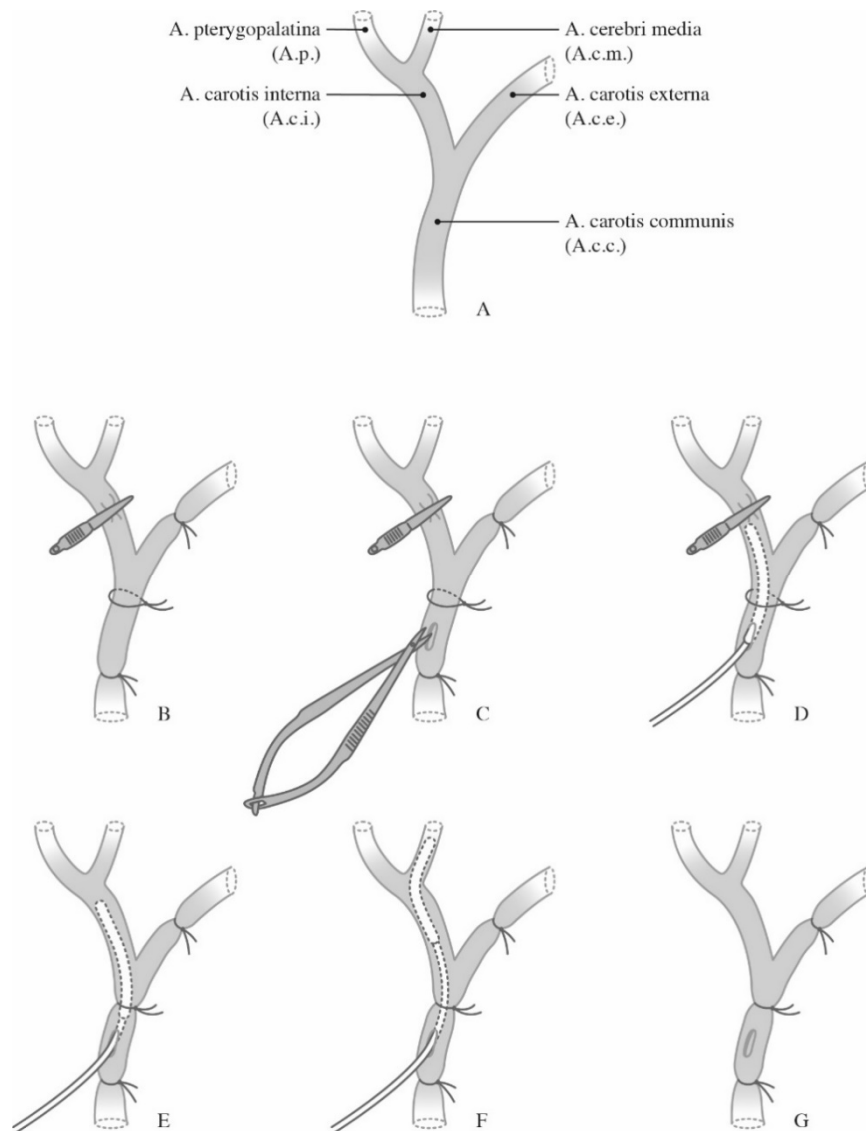


Abbildung 7: Technik der MCAO. Quelle: Eigene Darstellung.

- A:** Verzweigungen der rechten A.c.c., schematisch
- B:** Abbinden der rechten A.c.c. und A.c.e., temporäres Abklemmen der A.c.i.
- C:** Eröffnen der A.c.c. zwischen proximaler Ligatur und distal vorgelegtem Faden
- D:** Einbringen des Filaments in die A.c.i.
- E:** Entfernen der Klemme
- F:** Vorschieben des Filaments in die A.c.m. und Fixation mit vorgelegtem Faden
- G:** Ligatur der A.c.c. nach Entfernen des Filaments

2.5.2 Ausschlusskriterien

Die Tiere, die innerhalb der 48 Stunden 20% oder mehr ihres ursprünglichen Körpergewichts verloren, wurden aus dem Experiment genommen. Ein drastischer Abfall der Oberflächentemperatur auf weniger als 24°C führte ebenfalls zum vorzeitigen Ausscheiden aus dem Experiment.

2.5.3 Randomisierung und Verblindung

Die Behandlung und Auswertung der Tiere wurde konsequent verblindet und randomisiert durchgeführt. Die Entblindung erfolgte erst nach Abschluss aller Experimente und Auswertungen.

2.5.4 Neurologische Testung

Alle Tiere wurden vor dem Eingriff sowie 24 und 48 Stunden nach der Reperfusion getestet. Die Testungen wurden nach einer modifizierten Variante der *modified Neurological Score Scale* durchgeführt (Garcia et al. 1995; Li et al. 2000).

Hierbei wurden die Spontanaktivität, das Klettern am Käfiggitter, die Balance und Koordination, die Körper-Propriozeption und der Pinna-Reflex geprüft. In jedem der fünf Einzeltests wurden maximal drei Punkte vergeben, sodass insgesamt 15 Punkte erreicht werden konnten. Der 15-Punkte-Score wurde unterteilt in eine Gruppe mit leichtem Defizit (11-15 Punkte) und eine Gruppe mit schwerem Defizit (5-10 Punkte) mit schwerer bis schwerster motorischer und neuropsychologischer Störung.

Tabelle 10: *modified Neurological Score Scale*: Motorische Testung

Spontanaktivität			
Die Maus wird in einen Käfig gesetzt und für 5 min beobachtet.			
Score 0	Score 1	Score 2	Score 3
Tod	kaum Bewegung	bewegt sich, aber erkundet weniger als 3 Seiten des Käfigs	bewegt sich und erkundet mindestens 3 Seiten des Käfigs
Klettern am Käfiggitter			
Die Maus wird in einen Käfig mit einem senkrecht stehenden Metallgitter gesetzt und 3 min beobachtet.			
Score 0	Score 1	Score 2	Score 3
Tod	fällt beim Klettern, dreht sich anstatt zu klettern	Schwäche beim Klettern	normales Klettern
Balance und Koordination			
Die Maus wird auf eine mit Leukoplast umwickelte Stange von 1,5 cm Durchmesser und 50 cm Länge sowie Plattformen an beiden Enden in 45 cm Höhe auf eine der Plattformen gesetzt und laufen gelassen. 3 Versuche für jeweils 30 sec.			
Score 0	Score 1	Score 2	Score 3
Tod	Maus kann sich auf der Stange halten, fällt plötzlich	Maus kann sich auf der Stange halten, läuft nicht hinüber	Maus läuft über die Stange zur anderen Seite

Tabelle 11: *modified Neurological Score Scale*: Sensorische Testung

Pinna-Reflex			
Berühren des äußeren Gehörgangs, 3 Versuche; Beobachten der Kopfbewegung, Kopfschütteln			
Score 0	Score 1	Score 2	Score 3
Tod	keine Reaktion	schwache, verlangsamte Reaktion	normale, symmetrische Reaktion
Körper-Propriozeption			
Reaktion beim einseitigen Berühren des Körperstamms mit einem Wattestäbchen, 3 Versuche; Registrierung der Kopfbewegung und des Muskeltonus			
Score 0	Score 1	Score 2	Score 3
Tod	keine Reaktion	schwache, verlangsamte Reaktion	normale, symmetrische Reaktion

2.5.5 Gewebeaufbereitung, Färbung und Einbettung

Die Mäuse wurden 48 Stunden nach der MCAO und der zweiten neurologischen Untersuchung tief narkotisiert mit 5% Isofluran in 100% O₂ mit einem Fluss von 1,5-2 l/min und mittels kardialer Perfusion von 50 ml *Phospate-buffered saline* (PBS) getötet. Hierzu wurden sie auf dem Rücken fixiert, das Sternum gespalten und der linke Ventrikel durch einen kurzen Scherenschnitt eröffnet. Danach wurden 50 ml PBS über eine bis zum Ausgang des linken Atriums vorgeschobene Kanüle mittels einer Perfusionspumpe kontinuierlich injiziert. Die Mäuse wurden danach dekapitiert, anschließend der Schädel mit einer Schere eröffnet. Das entnommene Gehirn wurde mittels Rasierklingen in einem Gehirnschneider in 5 x 2 mm dicke Scheiben in frontaler Ebene geschnitten.

Nun wurden die Präparate mittels 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) gefärbt, um zwischen vitalen Mitochondrien mit rötlich gefärbten Zellen und weiß erscheinenden Zellen mit inaktiven Mitochondrien unterscheiden zu können. Hierzu wurde 1 g TTC in 50 ml PBS (2%ig) gelöst.

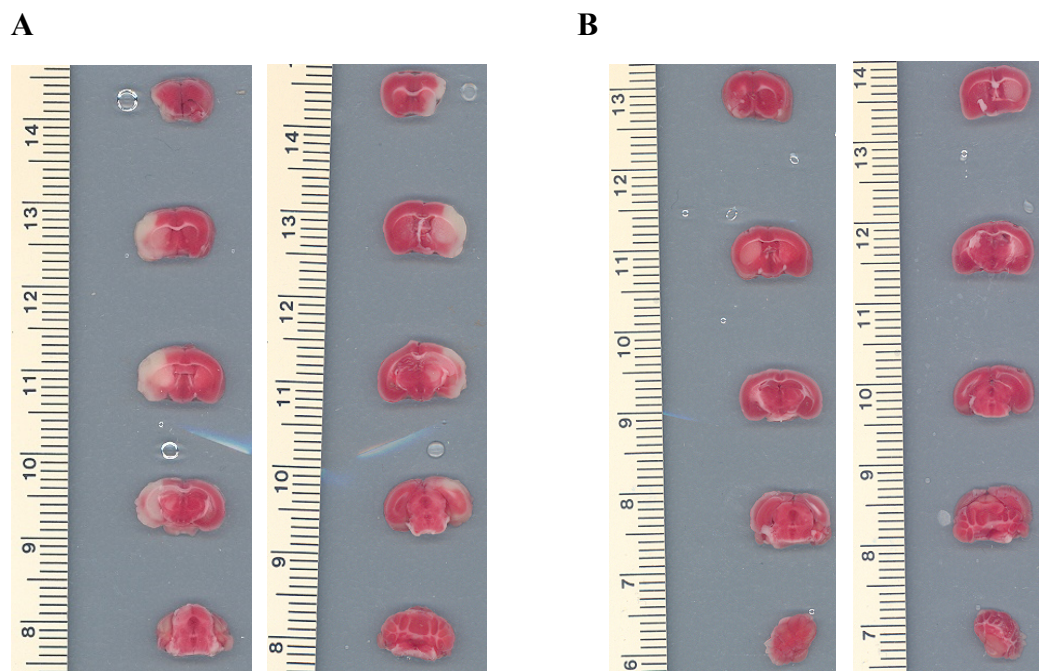


Abbildung 8: TTC-Färbung

Die TTC-Färbung der Gehirnscheiben erfolgte nach 30-minütiger MCAO und 48-stündiger Reperfusionzeit. Die ischämisch geschädigten Areale erscheinen makroskopisch heller.

- A:** WT(NALP3^{-/-}); links: Ansicht von rostral, rechts: Ansicht von okzipital
B: WT(NALP3^{-/-}) mit antibiotisch verändertem Darmmikrobiom; links: Ansicht von rostral, rechts: Ansicht von okzipital

Nach 10 min lichtgeschützter Inkubation in TTC-Lösung waren die Schnitte gefärbt und wurden in 4%igem Paraformaldehyd (PFA) überführt, um die Färbereaktion zu stoppen. Zur weiteren Auswertung wurden die Schnitte von beiden Seiten eingescannt (HP ScanJet 7400C) und als tif-Datei gespeichert (s. Abbildung 8). Die Schnitte wurden in ein 50 ml Falcon mit PFA überführt und über Nacht bei 4°C gelagert. Es erfolgte die Überführung in 50 ml PBS für eine weitere Nacht bei 4°C.

Anschließend erfolgte die Einbettung in Paraffin nach neuropathologischer Standardmethode (Paraffin-Einbettssystem Medite® TES Valida).

2.5.6 Infarktvolumetrie

Von den eingescannten Schnitten wurden die Infarktflächen vermessen mit der ImageJ 1.46r-Software (*National Institutes of Health*, USA).

Berechnet wurden das direkte Infarktvolumen, das indirekte Infarktvolumen sowie die Gehirnschwellung.

Das direkte Infarktvolume berechnet sich aus den addierten Flächen des ischämischen Gewebes multipliziert mit der Dicke der Hirnschnittpräparate. Das indirekte Infarktvolume berechnet sich aus den Flächen der nicht-ischämischen Hemisphäre minus der Flächen des nicht geschädigten Gewebes der ischämischen Hemisphäre, multipliziert mit der Dicke der Schnitte. Die Größe des Gehirnödems ergibt sich aus der Subtraktion des indirekten von dem direkten Infarktvolume (Swanson et al. 1990).

2.5.7 Immunhistochemie

Von den gekühlten Paraffinblöcken wurden mit einem Schlittenmikrotom in horizontaler Richtung Gewebeschnitte von 1,5 µm Dicke angefertigt und in einem 59°C warmen Warmwasserbad mit destilliertem Wasser gestreckt. Anschließend wurden die Schnitte auf Objektträger aufgezogen. Die entstandenen Präparate wurden über Nacht luftgetrocknet und bei Raumtemperatur gelagert.

Die Objektträger wurden zum Schmelzen des Paraffins zwei Stunden bei 60°C in den Trockenschrank gestellt. Vor der Färbung wurde das Paraffin mittels zweimaliger Inkubierung in Xylol für jeweils 10 min entfernt. Das Xylol wurde in dreiminütigen Schritten in einer absteigenden Alkoholreihe (Alkohol 100%, 96%, 90%, 70% und 50%) entfernt.

Im Anschluss wurden die Schnitte 3 min in dH₂O auf einem Schüttler gewaschen. Die Schnitte wurden einmal 3 min bei 800 W sowie achtmal 3 min bei 560 W in 10 mM Citratpuffer pH 6,0 in einer Kunststoffküvette mit Deckel in einer Mikrowelle aufgeköcht. Der verdunstete Citratpuffer wurde ergänzt. Die Schnitte wurden 60 min bei Raumtemperatur zur Abkühlung ohne Deckel stehen gelassen.

Im Anschluss wurden die Schnitte dreimal für 5 min in *Tris-buffered saline* (TBS) auf einem Schüttler gewaschen. Überschüssiges TBS wurde abgetupft und das Gewebe mit einem Fettstift umrandet. 250 µl Blockpuffer wurden aufgetragen und die Schnitte über Nacht bei 4°C in einer Färbekassette inkubiert. Danach begann die Färbung mit den primären Antikörpern *Neuron-specific nuclear antigen* (NeuN), *Ionized calcium-binding adapter molecule* (Iba1) sowie *Glial fibrillary acidic protein* (GFAP), die über zwei Nächte bei 4°C inkubierten. Anschließend wurden die Schnitte viermal für 5 min in TBS auf einem Schüttler gewaschen. Die sekundären Antikörper Indodicarbocyanin (Cy5), Indocarbocyanin (Cy3)

sowie *Fluoresceinisothiocyanat* (FITC) wurden aufgetragen, die eine Stunde bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubierten. Die Schnitte wurden viermal 5 min in TBS auf einem Schüttler gewaschen, für 10 min in 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) inkubiert, 5 min in TBS gewaschen und mittels zwei Tropfen Immu-Mount unter einem 24 x 46 mm Deckgläschen eingedeckelt. Die Lagerung der gefärbten Schnitte erfolgte über Nacht bei 4°C.

2.5.8 Beurteilung des ischämischen Schadens auf histologischer Ebene

Zur Quantifizierung der Zellen des Gewebes Schadens wurden die Schnitte nach der Färbung zeitnah unter einem Auflicht-Fluoreszenzmikroskop (Axio Examiner.Z1, Zeiss) beurteilt. Mit Hilfe der Software (Zen Vision 1.0.0.0) und Kamera (Axio Cam MRm, Zeiss) wurden die Schnitte bei 40facher Vergrößerung eingescannt. Die höheren Wellenlängen wurden zuerst eingescannt, um ein Bleaching, d.h. die Abnahme des Fluoreszenzsignals zu vermindern. Das Intervall beim Scannen betrug $\pm 2 \mu\text{m}$.

In den eingescannten Schnitten stellten sich die Neurone blau und die Iba1⁺-Zellen (Mikroglia) rot dar. Die Schnitte wurden mit einem Maßstab von 500 μm versehen und als tif-Datei gespeichert. Die Dateien wurden mit dem Programm Adobe Photoshop CS4 (64 Bit) ausgewertet. Hierzu wurde eine mediane Hilfslinie gezogen. Bei 100facher Vergrößerung wurden die in der gesamten ischämischen und nicht-ischämischen Hemisphäre gelegenen Iba1⁺-Zellen per Hand gezählt. Hierbei wurde zwischen aktivierten und ruhenden Iba1⁺-Zellen unterschieden. Mithilfe des zuvor eingefügten Maßstabs wurde eine benutzerdefinierte Messskala festgelegt. Es wurden drei horizontale Kästen mit einer Höhe von jeweils 200 μm über die Breite des gesamten Schnittes eingefügt. Die Kästen wurden ausgerichtet am Dach des Anschnitts des IV. Ventrikels, im Bereich des Corpus callosum, am Boden des Anschnitts des III. Ventrikels, im Bereich des vorderen Anteils des paraventriculären thalamischen Nucleus und am Dach des III. Ventrikels, im Bereich des Nucleus der Stria terminalis (s. Abbildung 9). Im Anschluss wurden alle Neurone gezählt, die sich komplett in den Kästen befanden.

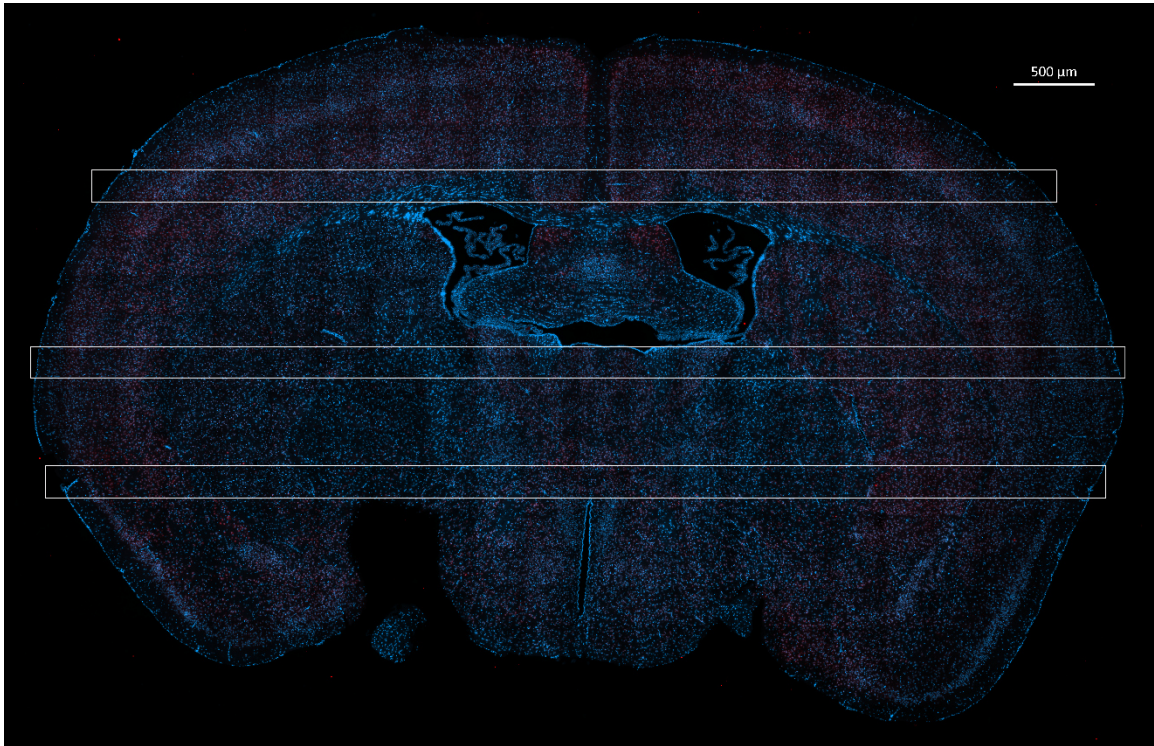


Abbildung 9: Zellquantifizierung im Hirnschnitt in definierten Auswertungszonen

Darstellung der drei ausgewählten Kästen in NeuN-gefärbtem Schnitt auf der Höhe von 3,34 mm interaural.

2.5.9 Statistische Methoden

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm Statistica 13.0.

Aufgrund der relativ kleinen Anzahl von Tieren pro Gruppe erfolgte ein Test auf Normalverteilung mittels Quantil-Quantil-Plot. Es zeigte sich keine Normalverteilung der Ergebnisse. Beide Hauptgruppen wurden außerdem als unabhängig voneinander betrachtet. Für die statistische Auswertung wurde daher der Mann-Whitney-U-Test verwendet.

3 Ergebnisse

Den Versuchen meiner Arbeit vorgeschaltet waren zwei Versuche durch Frau Dr. Bozena Czech-Zechmeister (persönliche Mitteilung, 2013), die Hinweise ergeben sollten, ob ein NALP3^{+/+}-Darmmikrobiom und ein NALP3^{-/-}-Darmmikrobiom bei Mäusen einen unterschiedlichen Einfluss haben auf die entstehende Infarktgröße nach einer MCAO (s. Kapitel 2.4.1).

3.1 Versuchsergebnisse

Die Versuche meiner Arbeit wurden mit männlichen Tieren in zwei Hauptgruppen durchgeführt, die jeweils in zwei Untergruppen aufgeteilt wurden (s. Abbildung 6).

Eine Hauptgruppe bestand aus homozygoten Wildtyp- (WT-) Tieren nach Cohousing mit NALP3^{-/-}-Tieren. Von den zwei Untergruppen dieser Hauptgruppe erhielt die eine Untergruppe eine antibiotische Behandlung über das Trinkwasser (s. Kapitel 2.3), die zweite wurde nicht antibiotisch behandelt vor der MCAO.

Die zweite Hauptgruppe bestand aus homozygoten NALP3-Knockout- (NALP3^{-/-}) Tieren. Von den zwei Untergruppen dieser Hauptgruppe erhielt die eine Untergruppe eine antibiotische Behandlung über das Trinkwasser, die zweite wurde nicht antibiotisch behandelt.

Die Untergruppe der antibiotisch behandelten WT-Tiere nach Cohousing bestand aus acht Tieren, die Untergruppe der antibiotisch unbehandelten WT-Tiere nach Cohousing ebenfalls aus acht Tieren. In der Untergruppe der behandelten NALP3^{-/-}-Tiere waren fünf Tiere und in der Untergruppe der unbehandelten NALP3^{-/-}-Tiere waren sieben Tiere eingeschlossen (s. Tabelle 15 und Tabelle 16).

3.1.1 NALP3^{-/-} Darmmikrobiom und Ausprägung der neurologischen Störung

Der Grad der neurologischen Störung wurde nach der *modified Neurological Score Scale* (mNSS) (Garcia et al. 1995; Li et al. 2000; Hug et al. 2009; Andresen 2015) 48 Stunden nach der MCAO bemessen.

3.1.1.1 Neurologische Testung der WT-Mäuse nach Cohousing und antibiotisch

behandelten WT-Mäuse nach Cohousing

Die Ergebnisse zeigt in Tabelle 12 veranschaulichen, dass in der Gruppe der WT-Tiere nach Cohousing und Antibiose gegenüber der Gruppe der WT-Mäuse nach Cohousing ohne Antibiose ein tendenziell besseres Outcome bestand. Die Gruppe der unbehandelten WT-Tiere zeigte überwiegend schwere motorische und neuropsychologische Defizite. Über 60% der unbehandelten WT-Mäuse, von denen fünf Tiere nur einen Score von fünf Punkten erreichten, wiesen eine stark ausgeprägte Störung auf.

Der mediane Score lag in der antibiotisch behandelten Gruppe bei 9,5, gegenüber einem Wert von 5 in der Gruppe der unbehandelten WT-Mäuse. Dieser Unterschied erreichte jedoch keine statistische Signifikanz ($p = 0,32$).

Tabelle 12: mNSS. Vergleich der WT-Mäuse nach 10-wöchigem Cohousing mit NALP3^{-/-}-Mäusen mit und ohne Antibiotikagabe

WT nach Cohousing mit NALP3^{-/-} als WT(NALP3^{-/-}) bezeichnet. In der zweiten Zeile zusätzlich mit Antibiose (Abx). Der neurologische Score wurde erhoben 48 Stunden nach 30-minütiger Okklusion der *Arteria cerebri media*.

Gruppe	n	Score								5-10	11-15
		5	6-10	11	12	13	14	15	Median		
WT (NALP3 ^{-/-})	8	5		2		1			5	62,5%	37,5%
WT (NALP3 ^{-/-}) (Abx)	8	4					3	1	9,5	50%	50%

3.1.1.2 Neurologische Testung der NALP3^{-/-}-Mäuse und antibiotisch behandeltenNALP3^{-/-}-Mäuse

Bei NALP3^{-/-}-Mäusen zeigte eine antibiotische Behandlung eine nicht signifikante nachteilige Tendenz für das motorische und neuropsychologische Testergebnis. 48 Stunden nach der MCAO konnte bei drei Mäusen nur ein Score von fünf Punkten ermittelt werden, somit zeigten 80% der Tiere ein schweres Defizit (s. Tabelle 13). Die unbehandelten Tiere wiesen dagegen einen geringer ausgeprägten Schaden des Gehirns auf, belegt durch ein besseres motorisches und neuropsychologisches Outcome. 70% der Tiere zeigten nur ein leichtes Defizit (s. Tabelle 13). Der Unterschied beider Gruppen war statistisch nicht signifikant ($p = 0,12$).

Tabelle 13: mNSS. Vergleich der NALP3^{-/-}-Mäuse mit und ohne Antibiotikagabe

In der zweiten Zeile zusätzlich mit Antibiose (Abx). Der neurologische Score wurde erhoben 48 Stunden nach 30-minütiger Okklusion der *Arteria cerebri media*.

Gruppe	n	Score											Median	5-10	11-15
		5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15			
NALP3 ^{-/-}	7			1			1	1	1	2	1		12	28,6%	71,4%
NALP3 ^{-/-} (Abx)	5	3				1					1		5	80%	20%

3.1.2 Infarkt volumen und Gehirnschwellung

Im nächsten Schritt nach der neurologischen Untersuchung wurde der Gewebeschaden untersucht. Hierfür wurden die Tiere 48 Stunden nach Herbeiführen der fokalen zerebralen Ischämie tief narkotisiert, getötet und das Gehirn entnommen und in 5 x 2 mm dicke Scheiben in frontaler Ebene geschnitten. Im Anschluss erfolgte eine Färbung mittels 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) und die Gehirnscheiben wurden von beiden Seiten eingescannt. Das Ischämieareal konnte mit dieser Methode makroskopisch erkannt werden und die betroffenen Areale wurden markiert.

Um die Größe zu quantifizieren erfolgte die computergestützte volumetrische Berechnung des direkten und indirekten Schlaganfallvolumens sowie der Gehirnschwellung.

3.1.2.1 Direktes Infarkt volumen bei WT-Mäusen nach Cohousing und WT-Mäusen nach Cohousing und antibiotischer Behandlung

Zur Berechnung des direkten Schlaganfallvolumens wurden die Flächen des ischämischen Gewebes addiert und mit der Dicke der Hirnschnittpräparate multipliziert.

Die Abbildung 10 zeigt die direkten Schlaganfallvolumina der WT-Tiere nach Cohousing mit dem übertragenen NALP3^{-/-}-Darmmikrobiom mit und ohne antibiotische Behandlung. In der behandelten Untergruppe zeigte sich ein geringerer Mittelwert von $26,06 \pm 24,44 \text{ mm}^3$ gegenüber den unbehandelten Tieren mit $56,12 \text{ mm}^3 \pm 27,23 \text{ mm}^3$, jedoch kein statistisch signifikanter Unterschied ($p = 0,10$).

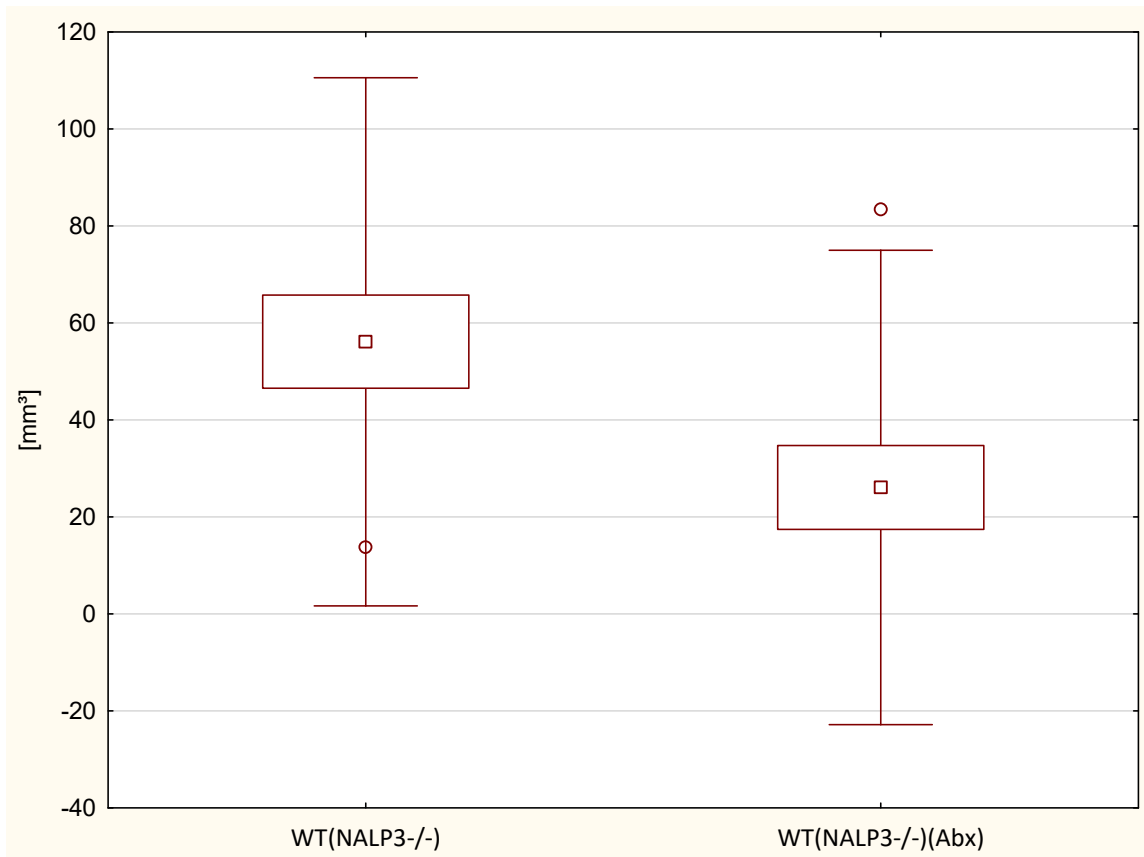


Abbildung 10: Direkte Infarkt volumina bei WT(NALP3^{-/-}) und WT(NALP3^{-/-})(Abx)

48 Stunden nach MCAO mit 30-minütiger Okklusion und anschließender Reperfusion bei WT-Mäusen nach Cohousing (n = 8) und antibiotisch behandelten WT-Mäusen nach Cohousing (n = 8). Dargestellt sind Mittelwert ± Standardabweichung. Die statistische Signifikanz wurde getestet mit dem Mann-Whitney U-Test.

3.1.2.2 Direktes Infarktvolumen bei NALP3^{-/-}-Mäusen und NALP3^{-/-}-Mäusen mit antibiotischer Behandlung

Unbehandelte NALP3^{-/-}-Tiere zeigten bei den direkten Infarktvolumina einen Mittelwert von $31,32 \pm 24,74 \text{ mm}^3$. In der Untergruppe der NALP3^{-/-}-Mäuse mit durch Antibiose verändertem Darmmikrobiom zeigte sich ein höherer Mittelwert bei $44,15 \pm 20,52 \text{ mm}^3$ (s. Abbildung 11), der sich jedoch als nicht statistisch signifikant erwies ($p = 0,42$).

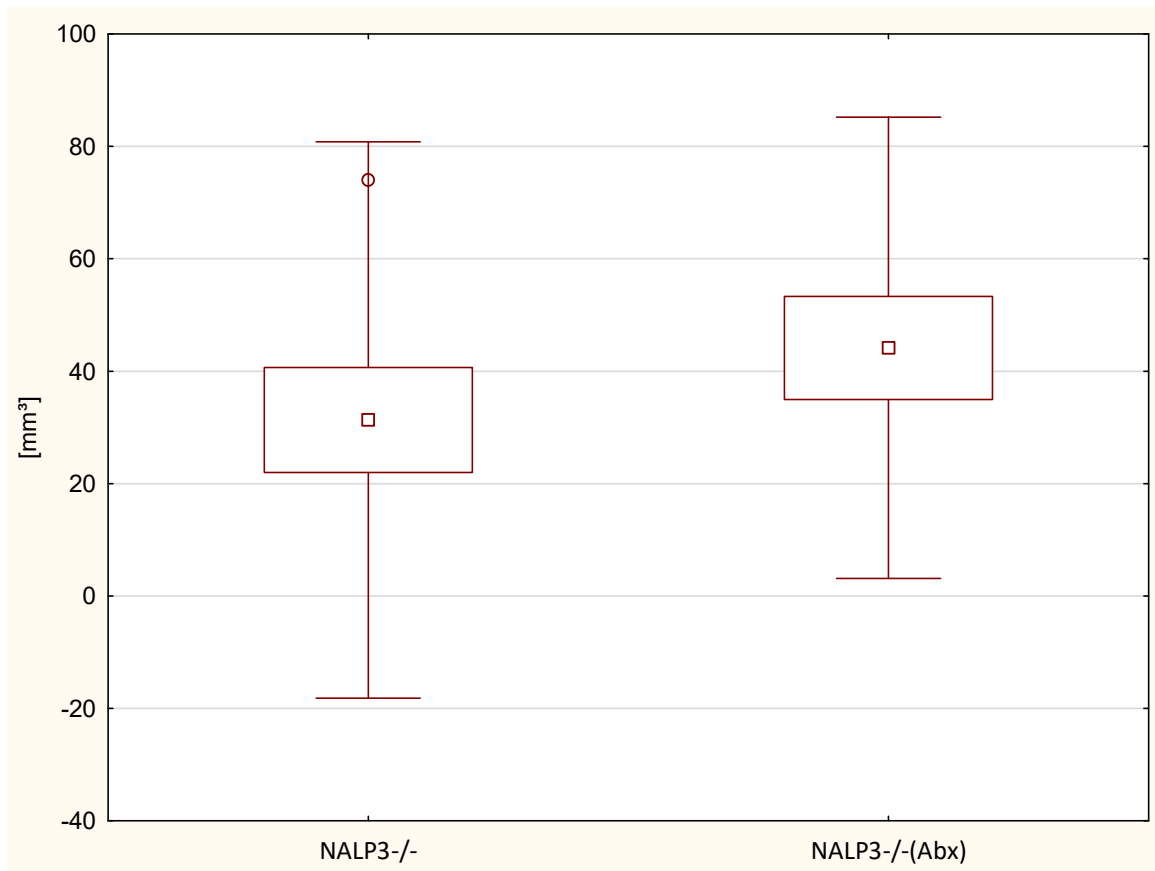


Abbildung 11: Direkte Infarkt volumina bei NALP3^{-/-} und NALP3^{-/-(Abx)}

48 Stunden nach MCAO mit 30-minütiger Okklusion und anschließender Reperfusion bei NALP3^{-/-}-Mäusen (n = 7) und antibiotisch behandelten NALP3^{-/-}-Mäusen (n = 5). Dargestellt sind Mittelwert ± Standardabweichung. Die statistische Signifikanz wurde getestet mit dem Mann-Whitney U-Test.

3.1.2.3 Indirektes Infarktvolumen bei WT-Mäusen nach Cohousing und WT-Mäusen nach Cohousing und antibiotischer Behandlung

Das indirekte Infarktvolumen berechnet sich aus der Fläche der nicht-ischämischen Hemisphäre minus der Flächen des nicht geschädigten Gewebes der ischämischen Hemisphäre, multipliziert mit der Dicke der Schnitte.

Die indirekten Schlaganfallvolumina 48 Stunden nach fokaler zerebraler Ischämie sind in Abbildung 12 dargestellt. Diese zeigten einen signifikanten Unterschied ($p = 0,02$) im Vergleich der Mittelwerte zwischen WT-Tieren nach Cohousing und WT-Mäusen nach Cohousing und Antibiose. Die behandelte Untergruppe zeigte einen kleineren Mittelwert ($25,13 \pm 21,22 \text{ mm}^3$ versus $49,80 \pm 16,54 \text{ mm}^3$).

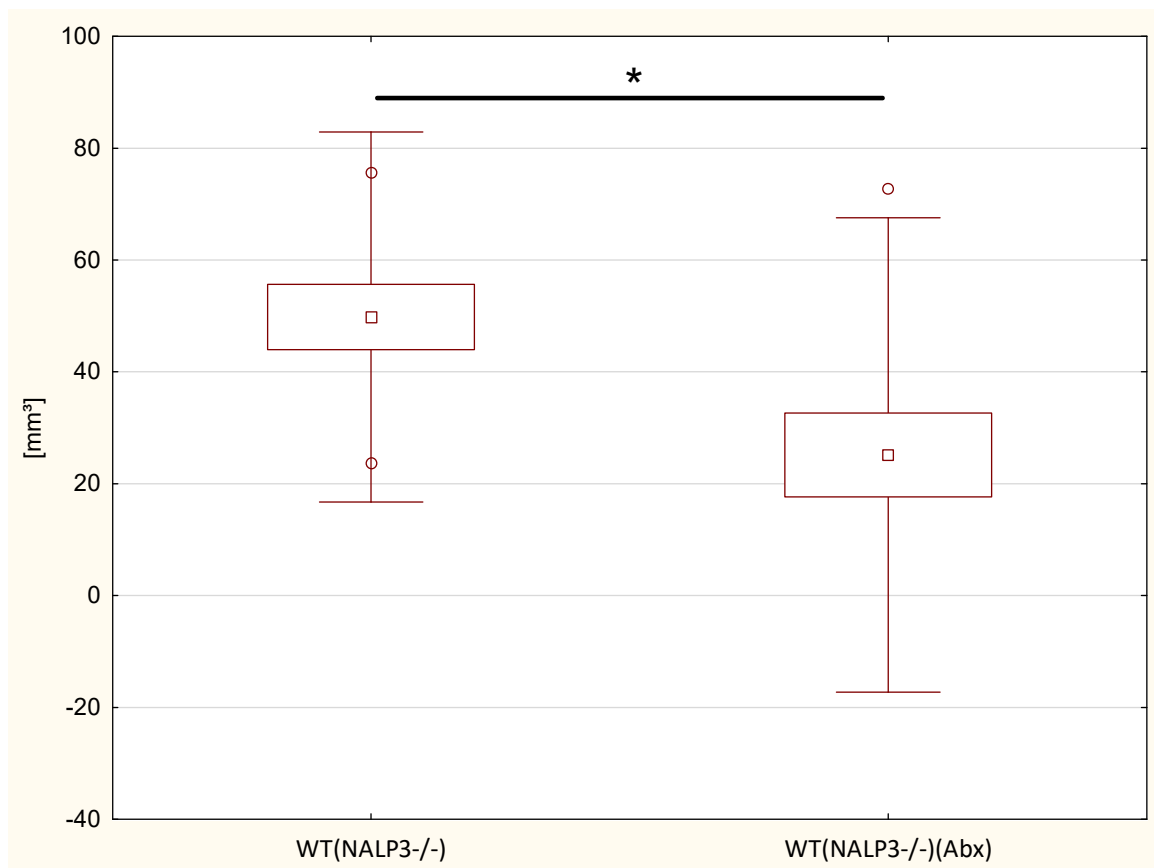


Abbildung 12: Indirekte Infarkt volumina bei WT(NALP3^{-/-}) und WT(NALP3^{-/-})(Abx)

48 Stunden nach MCAO mit 30-minütiger Okklusion und anschließender Reperfusion bei WT-Mäusen nach Cohousing (n = 8) und antibiotisch behandelten WT-Mäuse nach Cohousing. (n = 8). Dargestellt sind Mittelwert ± Standardabweichung. Die statistische Signifikanz wurde getestet mit dem Mann-Whitney U-Test (* p < 0,05).

Daraufhin wurde die Gehirnschwellung bei den WT-Mäusen nach Cohousing und den antibiotisch behandelten WT-Tieren nach Cohousing untersucht (s. Abbildung 13). Die Größe des Hirnödems errechnete sich aus der Subtraktion des indirekten vom direkten Infarkt volumen. Hierbei zeigte sich zwischen den Untergruppen kein signifikanter Unterschied (p = 0,56) bei der volumetrischen Auswertung der Gehirnschwellung.

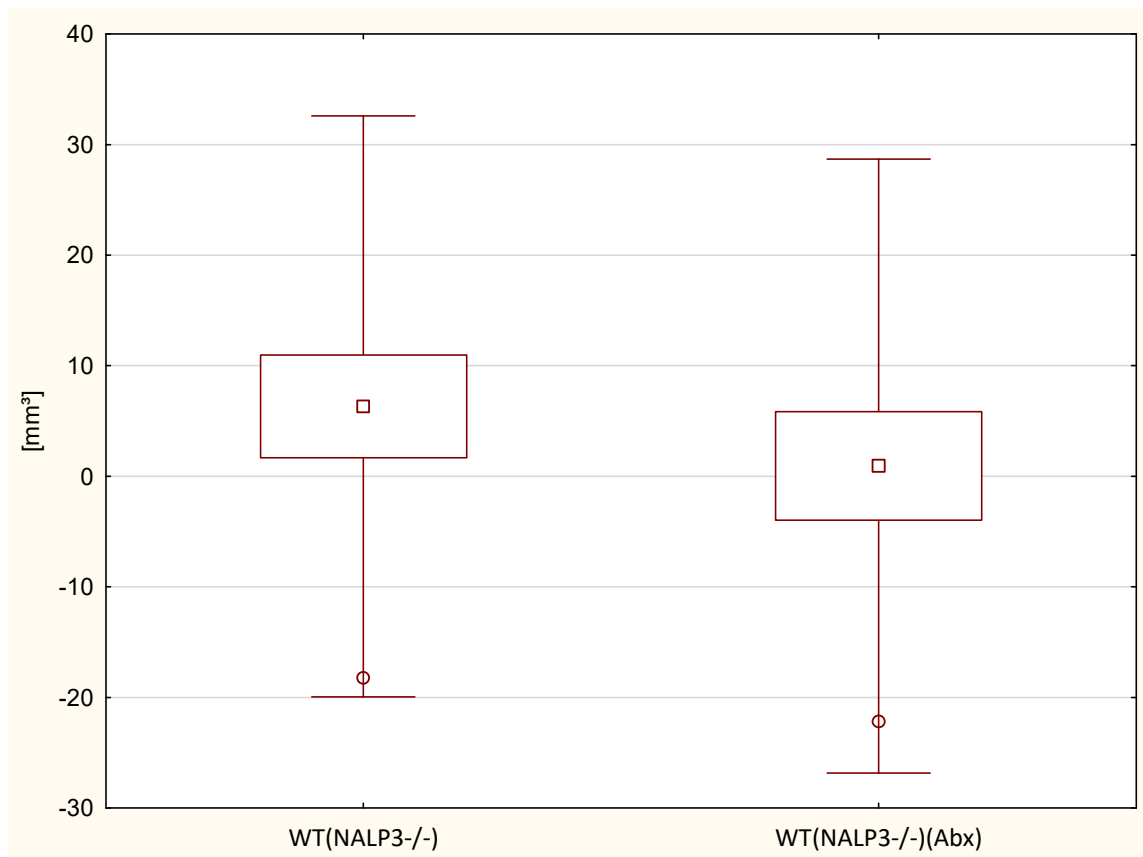


Abbildung 13: Gehirnschwellung bei WT(NALP3^{-/-}) und WT(NALP3^{-/-})(Abx)

48 Stunden nach MCAO mit 30-minütiger Okklusion und anschließender Reperfusion bei WT-Mäusen nach Cohousing (n = 8) und antibiotisch behandelten WT-Mäusen nach Cohousing (n = 8). Dargestellt sind Mittelwert ± Standardabweichung. Die statistische Signifikanz wurde getestet mit dem Mann-Whitney U-Test.

3.1.2.4 Indirektes Infarktvolume der NALP3^{-/-}-Mäuse und NALP3^{-/-}-Mäuse nach antibiotischer Behandlung

In der Untergruppe der unbehandelten NALP3^{-/-}-Tiere betrug der Mittelwert des indirekten Schlaganfallvolumens $33,49 \pm 21,0 \text{ mm}^3$ (s. Abbildung 14). Behandelte NALP3^{-/-}-Tiere wiesen mit einem Mittelwert von $26,30 \pm 21,65 \text{ mm}^3$ keinen großen Unterschied auf und nach statistischer Prüfung ergab sich keine Signifikanz ($p = 0,75$).

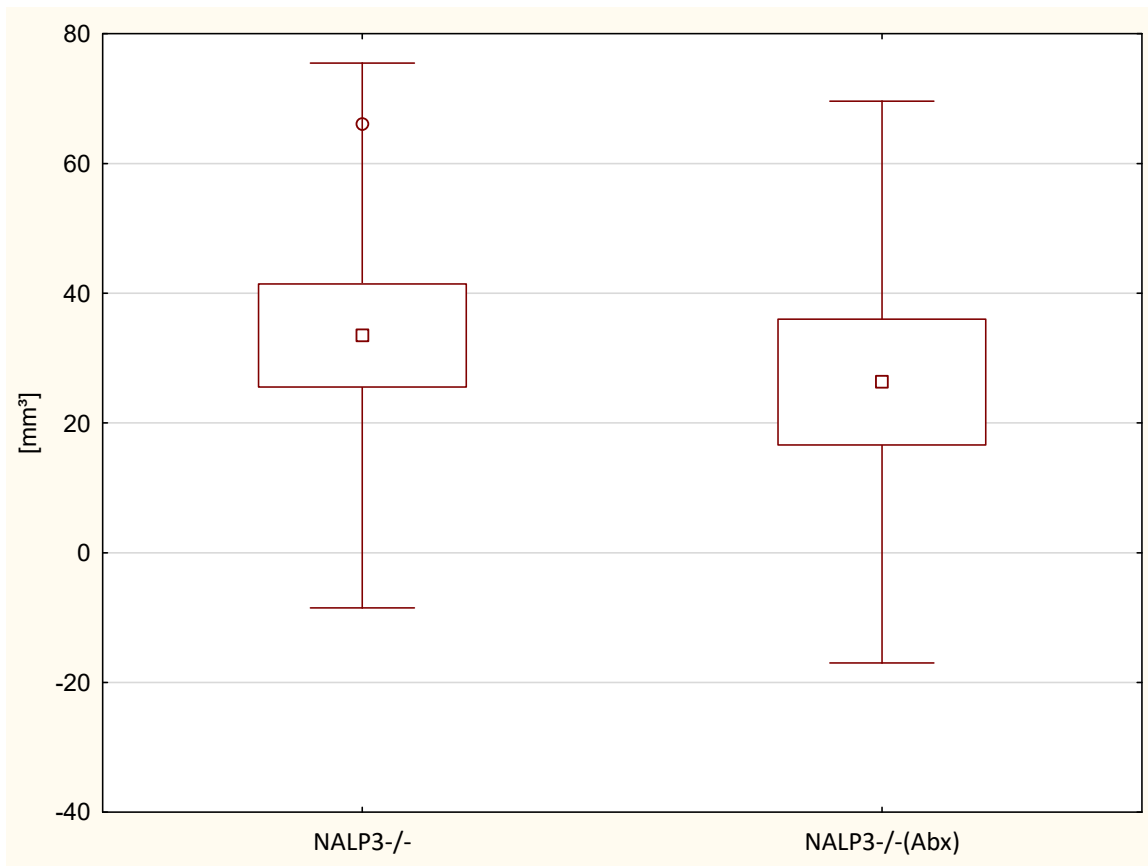


Abbildung 14: Indirekte Infarkt volumina bei NALP3^{-/-} und NALP3^{-/-(Abx)}

48 Stunden nach MCAO mit 30-minütiger Okklusion und anschließender Reperfusion bei NALP3^{-/-}-Mäusen (n = 7) und antibiotisch behandelten NALP3^{-/-}-Mäusen (n = 5). Dargestellt sind Mittelwert ± Standardabweichung. Die statistische Signifikanz wurde getestet mit dem Mann-Whitney U-Test.

3.1.3 Entzündungsreaktion

Es folgte die Quantifizierung des Zellschadens und Analyse der Aktivität von Mikrogliazellen 48 Stunden nach Hervorrufen einer fokalen zerebralen Ischämie. Das Hirngewebe wurde nach neuropathologischer Standardmethode in Paraffin eingebettet und mittels Schlittenmikrotom wurden Schnitte mit einer Stärke von 1,5 µm angefertigt.

Die weitere Auswertung erfolgte nach einer immunhistochemischen Färbung. Hierbei wurden Mikroglia, Neurone sowie Astrozyten angefärbt. Die Schnitte wurden mit einem Auflicht-Fluoreszenzmikroskop bei 40facher Vergrößerung betrachtet und anschließend eingescannt.

3.1.3.1 Aktivierte Mikroglia in der ischämischen Hemisphäre

Zum Nachweis von Immunzellen wurde eine immunhistochemische Färbung mit Iba-1 vorgenommen, das von aktivierten Gliazellen vermehrt exprimiert wird.

Per Hand wurden die in der gesamten Hemisphäre gelegenen aktivierten Iba1⁺-Zellen gezählt. Bei der Betrachtung der Iba1⁺-Zellen in der ischämischen Hemisphäre wurde 48 Stunden nach MCAO in der unbehandelten WT(NALP3^{-/-})-Untergruppe ein Median von 62 Zellen ermittelt. Die Untergruppe der behandelten WT(NALP3^{-/-})-Tiere wies einen größeren Median von 129,5 auf (s. Abbildung 15), der jedoch nach statistischer Analyse nicht signifikant war ($p = 0,79$).

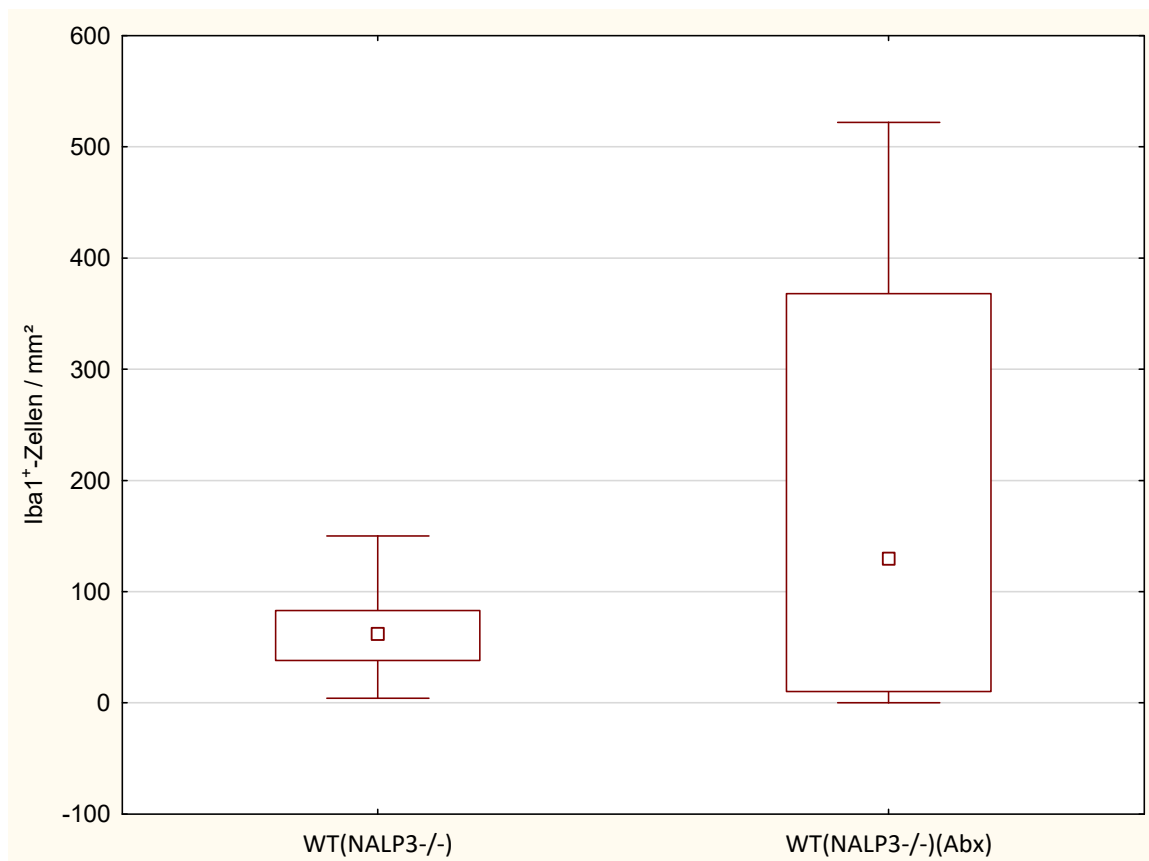


Abbildung 15: Anzahl aktivierter Mikroglia in ischämischer Hemisphäre bei WT(NALP3^{-/-}) und WT(NALP3^{-/-})(Abx)

Anzahl der Iba1⁺-Zellen in der ischämischen Hemisphäre 48 Stunden nach MCAO mit 30-minütiger Okklusion und anschließender Reperfusion bei WT-Mäusen nach Cohousing ($n = 8$) und antibiotisch behandelten WT-Mäusen nach Cohousing ($n = 8$). Die Daten sind dargestellt als Box-and-Whisker-Plot mit dem ersten (25%) und dritten Quartil (75%). Die statistische Signifikanz wurde getestet mit dem Mann-Whitney U-Test.

Im Vergleich mit den unbehandelten NALP3^{-/-}-Mäusen zeigten die Tiere der antibiotisch behandelten NALP3^{-/-}-Untergruppe in der ischämischen Hemisphäre einen größeren Median von Iba1⁺-Zellen (s. Abbildung 16), jedoch ohne eine statistische Signifikanz ($p = 0,87$).

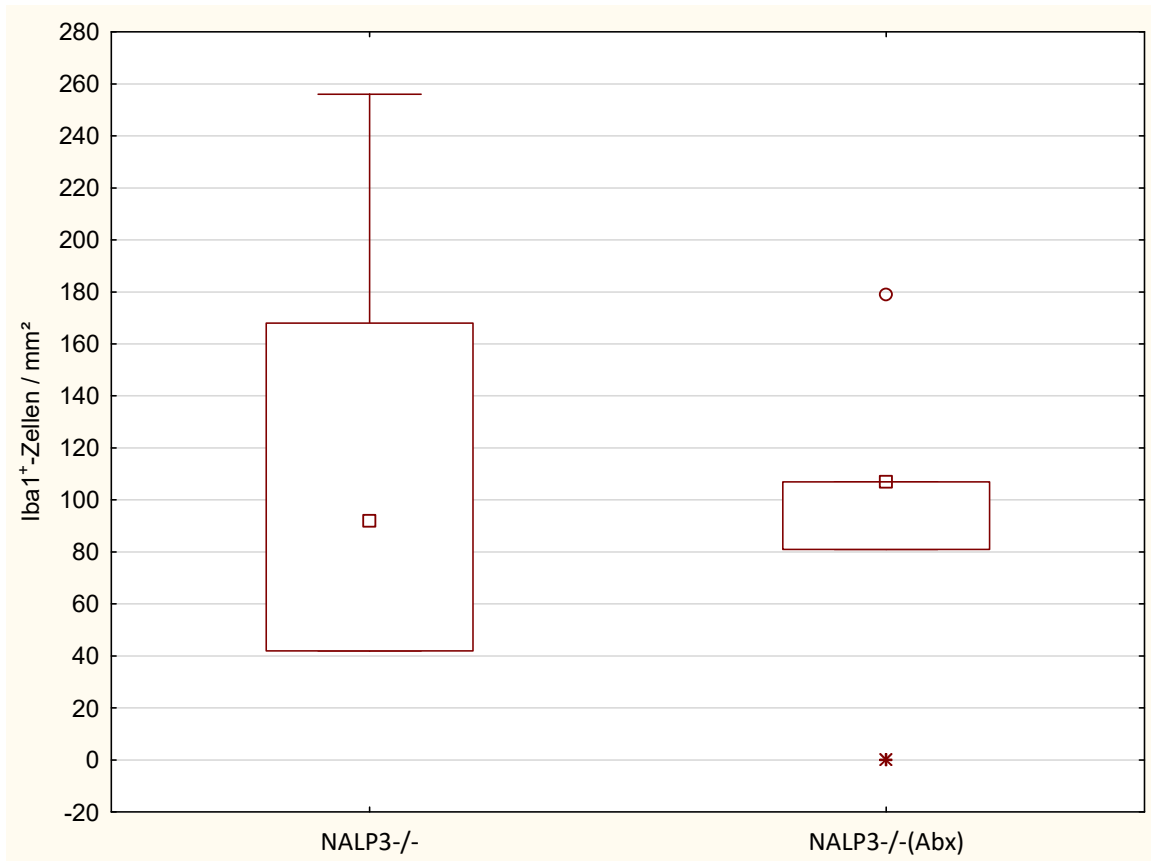


Abbildung 16: Anzahl aktivierter Mikroglia in ischämischer Hemisphäre bei NALP3^{-/-} und NALP3^{-/-(Abx)}

Anzahl der Iba1⁺-Zellen in der ischämischen Hemisphäre 48 Stunden nach MCAO mit 30-minütiger Okklusion und anschließender Reperfusion bei NALP3^{-/-} ($n = 7$) und antibiotisch behandelten NALP3^{-/-}-Mäusen ($n = 5$). Die Daten sind dargestellt als Box-and-Whisker-Plot mit dem ersten (25%) und dritten Quartil (75%). Die statistische Signifikanz wurde getestet mit dem Mann-Whitney U-Test.

3.1.3.2 Aktivierte Mikroglia in der nicht-ischämischen Hemisphäre

Die Iba-1⁺-Zellen fanden sich auch in den nicht-ischämischen Hemisphären.

Die behandelten WT-Tiere nach Cohousing wiesen 48 Stunden nach der Ischämie einen tendenziell kleineren Median ($p = 0,08$) in diesem Bereich auf (s. Abbildung 17).

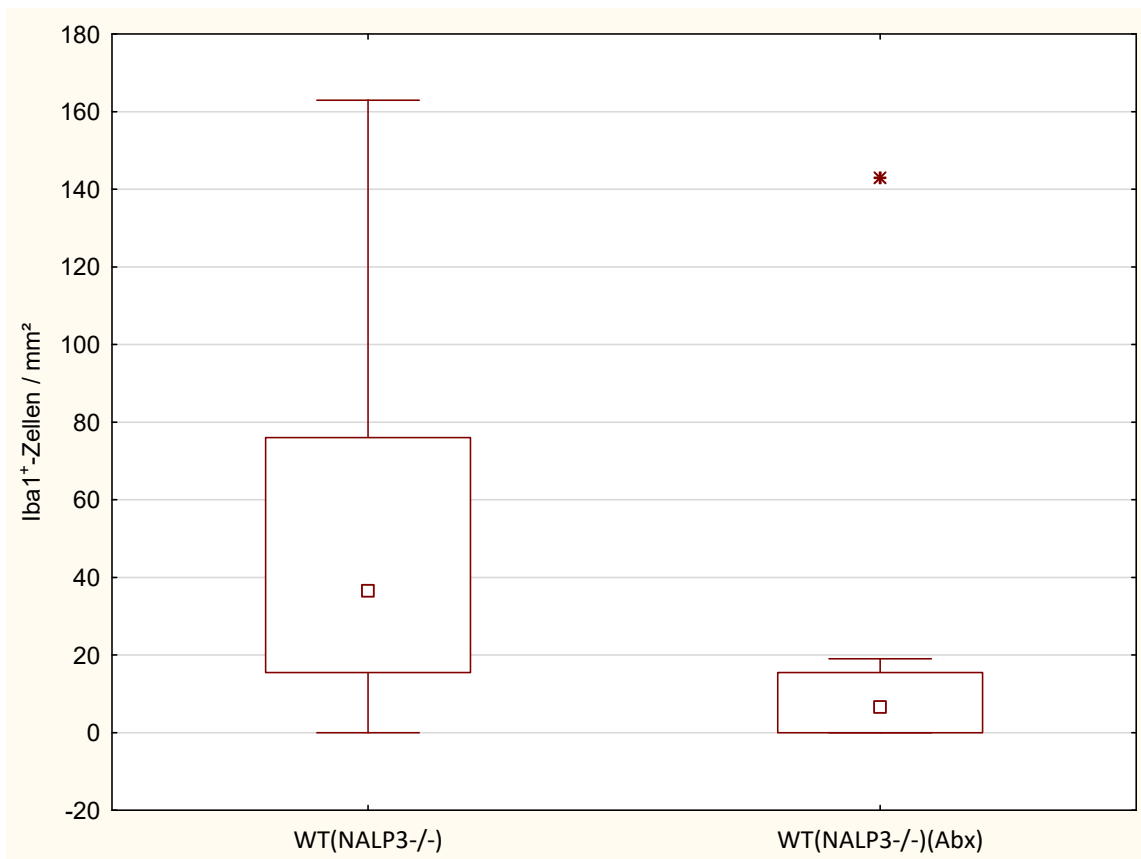


Abbildung 17: Anzahl aktivierter Mikroglia in nicht-ischämischer Hemisphäre bei WT(NALP3^{-/-}) und WT(NALP3^{-/-})(Abx)

Anzahl der Iba1⁺-Zellen in der nicht-ischämischen Hemisphäre 48 Stunden nach MCAO mit 30-minütiger Okklusion und anschließender Reperfusion bei WT-Mäusen nach Cohousing (n = 8) und antibiotisch behandelten WT-Mäusen nach Cohousing (n = 8). Die Daten sind dargestellt als Box-and-Whisker-Plot mit dem ersten (25%) und dritten Quartil (75%). Die statistische Signifikanz wurde getestet mit dem Mann-Whitney U-Test.

Die Anzahl der Iba1⁺-Zellen in den nicht-ischämischen Hemisphären (s. Abbildung 18) zeigte keinen signifikanten Unterschied (p = 0,81) zwischen den Untergruppen der behandelten und unbehandelten NALP3^{-/-}-Mäuse.

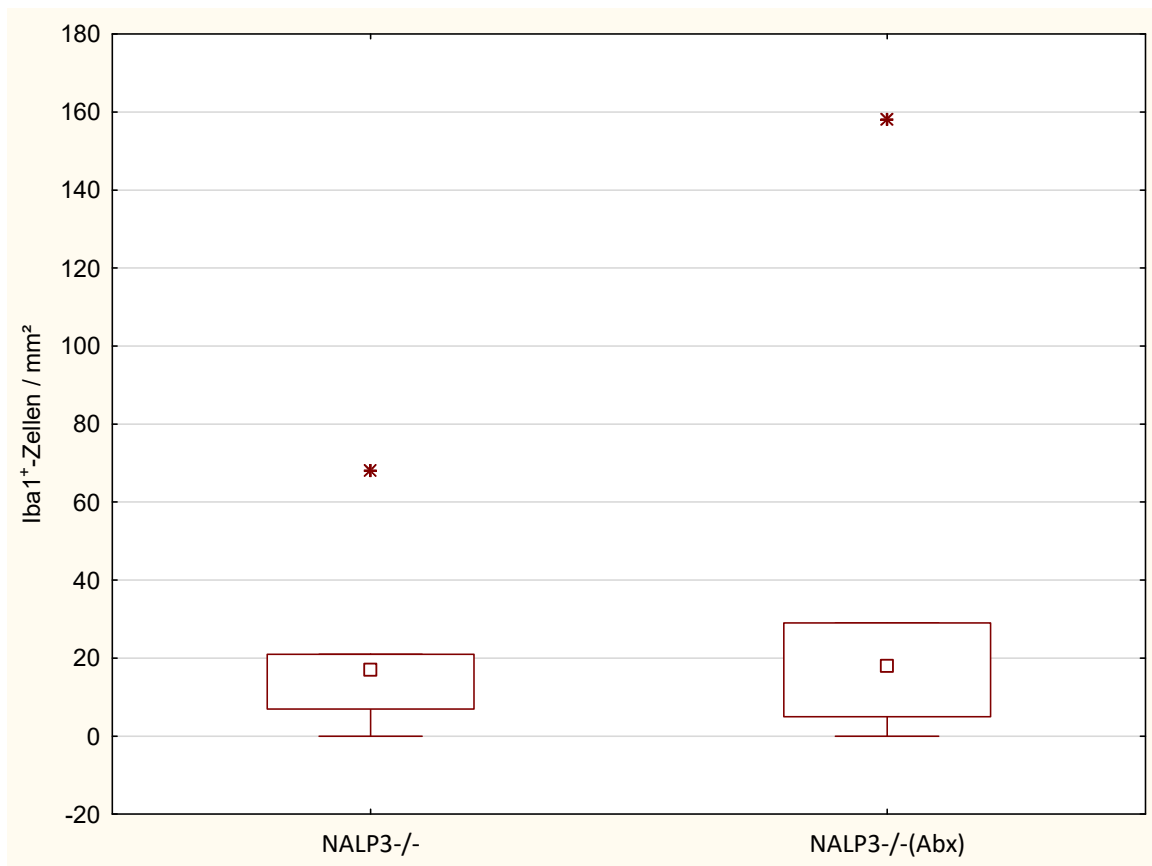


Abbildung 18: Anzahl aktivierter Mikroglia in nicht-ischämischer Hemisphäre bei NALP3^{-/-} und NALP3^{-/(Abx)}

Anzahl der Iba1⁺-Zellen in der nicht-ischämischen Hemisphäre 48 Stunden nach MCAO mit 30-minütiger Okklusion und anschließender Reperfusion bei NALP3^{-/-} (n = 7) und antibiotisch behandelten NALP3^{-/-}-Mäusen (n = 5). Die Daten sind dargestellt als Box-and-Whisker-Plot mit dem ersten (25%) und dritten Quartil (75%). Die statistische Signifikanz wurde getestet mit dem Mann-Whitney U-Test.

3.1.3.2 Verteilung der aktivierten Mikroglia in den Hemisphären

Die Verteilung der aktivierten Mikroglia im Vergleich der ischämischen und der nicht-ischämischen Hemisphären bei den Versuchsgruppen zeigt Tabelle 14.

Tabelle 14: Reaktion und Verhältnis der aktivierten Mikroglia nach Ischämie

Gruppe	aktivierte Mikroglia		Verhältnis ischämische Hemisphäre / nicht- ischäm. Hemisphäre
	ischämische Hemisphäre	nicht-ischämische Hemisphäre	
WT(NALP3 ^{-/-})	62	36,5	1,7 : 1
WT(NALP3 ^{-/-}) _(Abx)	129,5	6,5	20 : 1
NALP3 ^{-/-}	92	17	5,4 : 1
NALP3 ^{-/-} _(Abx)	107	18	6 : 1

3.1.4 Neurone in der ischämischen Hemisphäre

Um das Ausmaß des Zellschadens zu ermitteln, wurden die Neurone mittels des Antikörpers NeuN gefärbt und in der ischämischen Hemisphäre gezählt. Nach Einfügen und Ausrichtung dreier horizontaler Kästen (s. Kapitel 2.5.8 und Abbildung 9) wurden alle NeuN⁺- Zellen gezählt, die sich komplett in den Kästen befanden.

Bei der Betrachtung der medianen Anzahl der NeuN⁺-Zellen in der ischämischen Hemisphäre (s. Abbildung 19) zeigten die WT-Tiere nach Cohousing und antibiotischer Behandlung einen größeren medianen Wert, der sich nach statistischer Untersuchung als nicht signifikant erwies ($p = 0,37$).

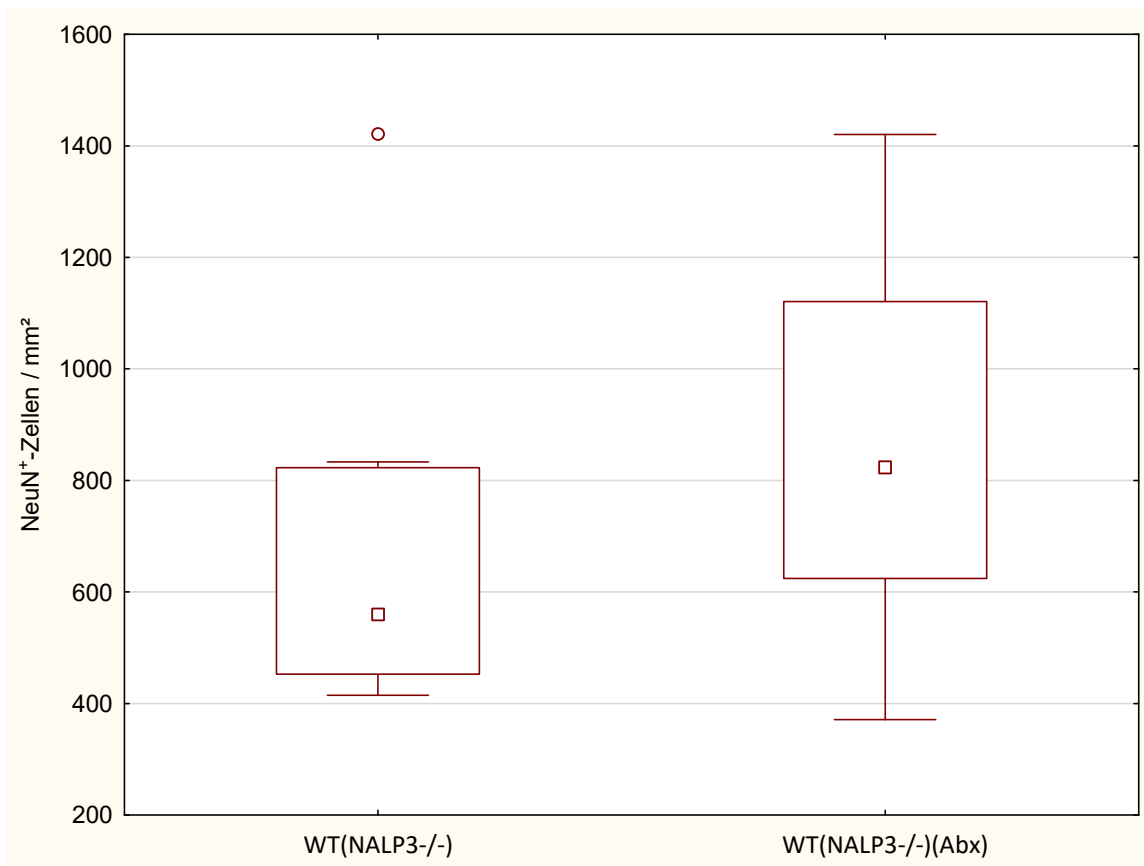


Abbildung 19: Neurone in ischämischer Hemisphäre bei WT(NALP3^{-/-}) und WT(NALP3^{-/-})(Abx)

Anzahl der NeuN⁺-Zellen in der ischämischen Hemisphäre 48 Stunden nach MCAO mit 30-minütiger Okklusion und anschließender Reperfusion bei WT-Mäusen nach Cohousing (n = 8) und antibiotisch behandelten WT-Mäusen nach Cohousing (n = 8). Die Daten sind dargestellt als Box-and-Whisker-Plot mit dem ersten (25%) und dritten Quartil (75%). Die statistische Signifikanz wurde getestet mit dem Mann-Whitney U-Test.

Bei der Erhebung der Anzahl der NeuN⁺-Zellen der NALP3^{-/-}-Hauptgruppe war zu beobachten, dass die antibiotisch behandelten Tiere in der ischämischen Hemisphäre im Median eine statistisch signifikant niedrigere Anzahl von Neuronen aufwiesen (p = 0,04) (s. Abbildung 20).

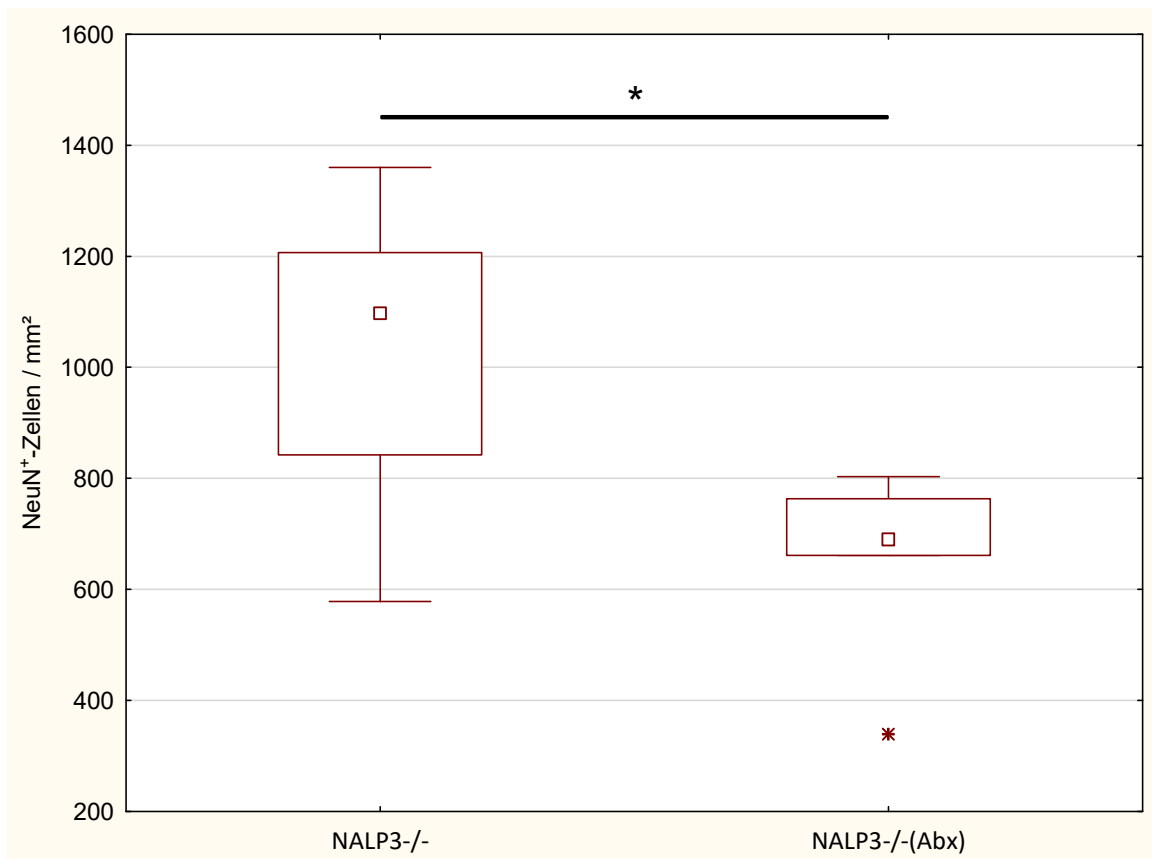


Abbildung 20: Neurone in ischämischer Hemisphäre bei NALP3^{-/-} und NALP3^{-/(Abx)}

Anzahl der NeuN⁺-Zellen in der ischämischen Hemisphäre 48 Stunden nach MCAO mit 30-minütiger Okklusion und anschließender Reperfusion bei NALP3^{-/-} (n = 7) und antibiotisch behandelten NALP3^{-/-}-Mäusen (n = 5). Die Daten sind dargestellt als Box-and-Whisker-Plot mit dem ersten (25%) und dritten Quartil (75%). Die statistische Signifikanz wurde getestet mit dem Mann-Whitney U-Test (* p < 0,05).

3.2 Zusammenfassung der Ergebnisse

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Versuche in tabellarischer Form zusammengefasst (s. Tabelle 15 und Tabelle 16).

Tabelle 15: Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse Teil 1

Gruppe	n	direktes Infarkt- volumen	indirektes Infarkt- volumen	Mikroglia ischämische Hemisphäre	Mikroglia nicht- ischämische Hemisphäre	
		Mittelwert [mm ³]		Median		Verhältnis ischäm. / nicht- ischäm. H.
WT (NALP3 ^{-/-})	8	56,12	49,80	62	36,5	1,7 : 1
WT (NALP3 ^{-/-}) (Abx)	8	26,06	25,13	129,5	6,5	20 : 1
NALP3 ^{-/-}	7	31,32	33,49	92	17	5,4 : 1
NALP3 ^{-/-} (Abx)	5	44,15	26,30	107	18	6 : 1

Tabelle 16: Tabellarische Zusammenfassung der Ergebnisse Teil 2

Gruppe	n	Neurone ischämische Hemisphäre	mNSS Score		
		Median	Median	Score 5-10	Score 11-15
WT (NALP3 ^{-/-})	8	559,6	5	62,5%	37,5%
WT (NALP3 ^{-/-}) (Abx)	8	823	9,5	50%	50%
NALP3 ^{-/-}	7	1097	12	28,6%	71,4%
NALP3 ^{-/-} (Abx)	5	690	5	80%	20%

4 Diskussion

Nach einem ischämischen Schlaganfall waren die bisher möglichen effektiven primären Therapien im Wesentlichen beschränkt auf ein Zeitfenster bis zu sechs Stunden, in dem eine Thrombektomie oder eine systemische Lyse durchgeführt wurde (DGN 2015). Aktuelle Studien weisen darauf hin, dass eine Thrombektomie auch 24 Stunden nach einem Schlaganfall vorteilhaft sein kann (Albers et al. 2018; Nogueira et al. 2018).

Wünschenswert wäre jedoch eine weitergehende gezielte Therapie, bei der die destruierte postischämische Inflammation gemindert und der neurologische Schaden begrenzt wird. Bisher bekannt ist, dass die Intensität einer abakteriell hervorgerufenen Inflammation beeinflusst wird durch das Darmmikrobiom (Round und Mazmanian 2009; Elinav et al. 2011; Wang und Kasper 2014). Es ist daher prüfenswert, ob eine Manipulation des Darmmikrobioms auch Auswirkungen haben kann auf die Inflammation nach einem ischämischen Schlaganfall im Tierversuch.

Gegen Ende der 80er Jahre konnten erstmals die Auswirkungen von Genen *in vivo* untersucht werden. Mittels genetischer Deletion und Ausschaltung von Genen bei Mäusen wurden die Grundlagen der Genforschung von Capecchi, Evans und Smithies entwickelt, die für diese Entdeckung 2007 den Nobelpreis für Medizin erhielten.

Die Knockout-Maus ist mittlerweile zu einem der wichtigsten Modelle in der Forschung geworden, auch weil sie zu 99% mit dem menschlichen Genom identisch ist (O'Brien und Woychik 2003). Außerdem kann eine Auswirkung von äußeren Einflüssen bei genetisch identischen Tieren besser erkannt und interpretiert werden.

In meiner Promotionsarbeit wurde die Auswirkung einer Antibiotikagabe untersucht auf einen Hirninfarktschaden am *in-vivo*-Mausmodell.

Untersucht wurden Mäuse mit einem NALP3^{-/-}-Darmmikrobiom und Wildtyp-Mäuse nach zehn-wöchigem Cohousing mit Mäusen, die ein NALP3^{-/-}-Darmmikrobiom aufwiesen.

Jeweils ein Teil dieser beiden Tiergruppen erhielt vor der Hirnischämie für zwei Wochen eine Antibiotikakombination.

Die Untersuchung erfolgte durch neurologische Tests, Messung der Infarkt volumina und immunhistochemische Untersuchungen am *in-vivo*-Mausmodell nach zerebraler Ischämie mit 30-minütiger Okklusion der *Arteria cerebri media* (MCAO) und anschließender Reperfusion über 48 Stunden.

Der Versuchsaufbau basiert auf der Hypothese, dass nach einer MCAO und damit in einem definierten Infarktgebiet mit festgelegter Okklusions- und Reperusionszeit zunächst annähernd gleich große Infarktareale entstehen. Es wird unterstellt, dass im weiteren Verlauf der Reperfusion dann unterschiedliche Infarktareale und ein differentes Outcome entstehen können durch eine immunologische Reaktion gesteuert von einem modulierten Darmmikrobiom.

Die Immunantwort nach einer Ischämie des Gehirns wird in den ersten Stunden vom ortsständigen, angeborenen Immunsystem gegeben, vertreten durch Mikrogliazellen (Gelderblom et al. 2009; Iadecola und Anrather 2011). Diese Antwort wird beeinflusst durch das Darmmikrobiom mit den daran gekoppelten Sensormolekülen, z. B. NALP3 (Fann et al. 2013; Yang et al. 2014).

4.1 Versuche der Arbeitsgruppe

In unserer Arbeitsgruppe wurden durch Frau Dr. Bozena Czech-Zechmeister 2013 zwei Versuche durchgeführt, auf denen der Versuchsaufbau meiner Arbeit basiert (Versuchsaufbau s. Kapitel 2.4.1), weil sie Hinweise lieferten, dass der Typ des Darmmikrobioms den Schlaganfallschaden beeinflusst.

Zaki et al. (2010) untersuchten den Einfluss von NALP3 bei Mäusen, bei denen eine Kolitis mittels Dextran-Natriumsulfat (DSS) hervorgerufen wurde. Sie verglichen die Entzündungsreaktion zwischen WT-Mäusen und Mäusen mit einem NALP3^{-/-}-Mikrobiom (durch Stammzellübertragung erzeugt). In diesem Versuch zeigte sich eine schwerer ausgeprägte Kolitis bei den NALP3^{-/-}-Tieren.

Elinav et al. (2011) untersuchten den Einfluss von Sensormolekülen, darunter auch NALP3 bei Mäusen, bei denen ebenfalls eine Kolitis mittels DSS hervorgerufen wurde. Sie verglichen die Entzündungsreaktion bei WT-Tieren nach vier Wochen Cohousing mit NALP3^{-/-}-Tieren. Dabei zeigten die NALP3^{-/-}-Tiere eine geringer ausgeprägte Kolitis als die WT-Mäuse nach Cohousing. Die Arbeitsgruppe um Elinav et al. (2011) diskutierte jedoch, dass die Ergebnisse ihrer Arbeit im Widerspruch stehen mit denen anderer vorheriger Arbeiten (Allen et al. 2010; Zaki et al. 2010; Hirota et al. 2011), bei denen festgestellt wurde,

dass bei Vorliegen des NALP3^{-/-}-Darmmikrobioms eine Entzündungsreaktion intensiver ausfällt.

Zeitgleich mit der Versuchsreihe von Czech-Zechmeister wurde eine Arbeit veröffentlicht von Fann et al. (2013). Diese Arbeitsgruppe führte eine MCAO über 60 min durch und untersuchte ihre Versuchstiere nach 24 Stunden Reperfusionzeit. Fann et al. (2013) verglichen WT-Mäuse mit Mäusen, bei denen mittels eines Immunglobulins der Signaltransduktionsweg zur Expression und Aktivierung des Sensormoleküls NALP3 in aufsteigenden Graden mittels höherer Dosierung gedämpft wurde. Bei der Auswertung zeigten sich in der Gruppe mit der abgeschwächten NALP3-Aktivierung signifikant kleinere Infarkt volumina.

Bei der Arbeit von Fann et al. (2013) wurde der Effekt des Sensormoleküls NALP3 direkt gemildert und nicht über das Mikrobiom durch ein Cohousing wie bei Elinav et al. (2011). Auf Grund der Erkenntnisse von Fanns Arbeitsgruppe stellt sich auch die Frage nach einem möglichen direkten proinflammatorischen Effekt von NALP3 im ischämischen Hirngewebe, unabhängig von der Verknüpfung mit dem Darmmikrobiom.

In einem zweiten Versuch unserer Arbeitsgruppe wurden durch Czech-Zechmeister WT-Mäuse verglichen mit WT-Mäusen, die mit NALP3^{-/-}-Tieren für vier Wochen im Cohousing gehalten wurden. Hierbei zeigten die dem Cohousing ausgesetzten WT-Tiere signifikant größere direkte Infarkt volumina. Kurz zusammengefasst zeigte sich bei den Versuchen von Czech-Zechmeister kein Unterschied bei der Infarktgröße nach einer MCAO zwischen WT-Tieren und NALP3^{-/-}-Tieren, jedoch ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen WT-Tieren und WT-Tieren nach Cohousing mit Tieren die ein NALP3^{-/-}-Darmmikrobiom besaßen.

Wenn, wie in diesen Versuchen gezeigt, ein durch Cohousing verändertes Darmmikrobiom zu einer veränderten Ausprägung eines Schlaganfalls führt, stellt sich die Frage, ob durch eine Veränderung des Darmmikrobioms durch eine Antibiotikagabe ebenfalls eine Beeinflussung der Infarktgröße bei einer MCAO hervorgerufen werden kann und in welcher Form sich der Einfluss auswirkt.

Der Versuchsaufbau zur Beantwortung dieser Frage ist in Abbildung 6 dargestellt.

4.2 Interpretation der Ergebnisse

4.2.1 Auswirkungen auf die Infarktvolumina

Bei der Auswertung der Ergebnisse des direkten Infarktvolumens zeigte sich ein deutlich kleinerer Schaden bei den WT-Mäusen nach Cohousing und Antibiotikagabe im Vergleich mit den WT-Mäusen nach Cohousing ohne Antibiotikagabe (s. Abbildung 10). Im Mittelwert war das direkte Infarktvolumen der antibiotisch behandelten Mäuse im Vergleich mit dem der unbehandelten Tiere um 46% verringert, dieser Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant.

Elinav et al. (2011) berichteten, dass vierwöchiges Cohousing von NALP3^{-/-}-Mäusen mit WT-Mäusen zu einer Veränderung einer Entzündungsreaktion im Darm führte. In den Versuchen meiner Arbeit betrug die Zeit des Cohousings zehn Wochen. Die Gabe von Ciprofloxacin und Metronidazol bei den WT-Mäusen nach Cohousing führte dann dazu, dass die direkten und auch die indirekten Infarktvolumina kleiner wurden, das indirekte Infarktvolumen in statistisch signifikantem Maße (s. Abbildung 12).

Die Differenz der Volumina zwischen direktem und indirektem Infarktvolumen ergibt das Volumen des Hirnödems, eines unspezifischen Begleitsymptoms, stärker ausgeprägt bei größerem Schaden. Das Hirnödem war geringer ausgebildet bei den antibiotisch behandelten Mäusen, ebenfalls ein Indiz dafür, dass ein geringerer Schaden eingetreten ist (s. Abbildung 13).

Yang et al. (2014) untersuchten 55 WT-Mäuse und 29 Mäuse mit NALP3^{-/-}-Darmmikrobiom. Die MCAO wurde bei diesen Versuchen über zwei Stunden aufrechterhalten, die Reperfusionzeit betrug 24 Stunden.

Bei diesen Untersuchungen zeigte sich ein signifikant kleineres direktes Infarktvolumen und auch kleineres Hirnödem in der Knockout-Gruppe. Auch in der neurologischen Untersuchung zeigten sich signifikant weniger Defizite bei den Knockout-Tieren.

Gestützt werden die Ergebnisse Yangs und seiner Arbeitsgruppe (2014) bezüglich der Rolle des NALP3^{-/-} durch die Versuche von Fann et al. (2013). Diese Arbeitsgruppe führte eine MCAO über eine Stunde durch und untersuchte ihre Versuchstiere wie die Arbeitsgruppe von Yang et al. (2014) auch nach 24 Stunden Reperfusionzeit. Fann et al. (2013) verglichen

WT-Mäuse mit Mäusen, bei denen mittels eines Immunglobulins über Vorstufen die Bildung des NALP3-Sensormoleküls eingeschränkt wurde. Bei der Auswertung zeigten sich bei den mit dem Immunglobulin behandelten Tieren signifikant kleinere Infarkt volumina (s. Kapitel 4.1).

Nach standardisierter MCAO bei Mäusen in einer Versuchsgruppe sollten durch die Blockade der *Arteria cerebri media* im Mittel gleich große Infarkt areale entstehen, sodass davon auszugehen ist, dass die differierenden Infarktgrößen der zu vergleichenden Gruppen in den 24 Stunden Reperfusionzeit entstanden. Dirnagl et al. (1999) beschrieben den zeitlichen Ablauf der postischämischen Kaskade (s. Abbildung 1). Nach der Ischämie und den in Minuten später ablaufenden destruierenden Vorkommnissen der Exzitotoxizität und Peri-Infarkt-Depolarisationen setzt die weiter destruierende postischämische Inflammation innerhalb weniger Stunden ein, wodurch der lokale Gewebeschaden vergrößert wird (Garcia 1984; Feuerstein et al. 1998; Dirnagl et al. 1999).

Für die Versuche meiner Arbeit sollten bei beiden WT-Tiergruppen gleichartige Verhältnisse des Darmmikrobioms durch Cohousing über zehn Wochen geschaffen werden. Durch diese Maßnahme sollte das Darmmikrobiom phänotypisch in ein NALP3^{-/-}-Darmmikrobiom überführt werden (Heno-Mejia et al. 2012).

In der Gruppe der WT-Mäuse nach Cohousing kam es nach 14-tägiger antibiotischer Behandlung zu kleineren Infarktgebieten, bzw. vergrößerten sich die Gebiete des ischämischen Schadens in der Zeit der Reperfusion über 48 Stunden geringer als in der zweiten Gruppe ohne Antibiotikabehandlung. Ein direkter protektiver Einfluss der Antibiotika Ciprofloxacin und Metronidazol ist zwar nicht komplett auszuschließen, jedoch nicht wahrscheinlich und in der Literatur bisher nicht beschrieben. Naheliegender sind veränderte Abläufe in der Steuerung der postischämischen Inflammation durch veränderte Eigenschaften des Darmmikrobioms hervorgerufen durch Eradikation von Bakterienstämmen.

Bestätigt wird unsere Beobachtung, dass ein durch Antibiotika verändertes Mikrobiom die Infarkt volumina beeinflussen kann, durch die Arbeit von Benakis et al. (2016).

Die Autoren wiesen deutlich geringere Infarktvolumina und ein besseres neurologisches Outcome bei antibiotisch behandelten Mäusen nach, in einem Versuch mit einer MCAO mit 35 Minuten Verschlusszeit und einer Reperusionszeit von drei Tagen. Das Darmmikrobiom wurde durch die Antibiotika Amoxicillin und auch Vancomycin, die länger als eine Woche verabreicht wurden, verändert. Verbunden war dieser Effekt mit vermehrt auftretenden regulatorischen T-Zellen im Darm und einer nachfolgenden IL-10-vermittelten Suppression von proinflammatorischen IL-17-positiven γ - δ -T-Zellen, die destruktiv wirken sollen (Benakis et al. 2016). Die Autoren betiteln diesen Vorgang als eine Mikrobiota-Darm-Hirn-Achse.

Unterstützt wird die Hypothese einer Mikrobiota-Darm-Hirn-Achse durch Versuche von Singh et al. (2016). Eine dysbiotische Mikrobiota, die von Mäusen stammte, bei denen ein Schlaganfall induziert worden war durch eine MCAO mit einer Okklusionszeit von 60 Minuten, führte nach einer Fäkaltransplantation bei den damit rekolonialisierten Mäusen nach einer MCAO zu größeren Infarktvolumina, schlechterem Outcome und vermehrten proinflammatorischen Zytokinleveln im Gehirn und in Peyer-Plaques.

In meiner zweiten Versuchsreihe verglichen wir nach einer MCAO NALP3^{-/-}-Mäuse. Nach Ausschluss von Tieren gemäß den Kriterien (s. Kapitel 2.5.2) wurden nach der MCAO sieben unbehandelte Mäuse in die Auswertung aufgenommen und fünf, die über 14 Tage über das Trinkwasser Ciprofloxacin und Metronidazol bekommen hatten.

Die Antibiotikagabe erwies sich hier jedoch als nicht vorteilhaft, sondern führte zu einer Vergrößerung der direkten Infarktvolumina. Im Mittel betrug die Infarktgröße der antibiotisch unbehandelten Tiere 31,3 mm³, die der antibiotisch behandelten Tiere 44,2 mm³ (s. Tabelle 15).

Die Behandlung führte ebenfalls zu einer Dezimierung der neuronalen Zellen und dem Ergebnis eines schlechteren neurologischen Outcomes, in nicht signifikantem Maße (s. Tabelle 16). Darüber berichte ich in den Kapiteln 4.2.3 und 4.2.4 im Einzelnen.

4.2.2 Auswirkungen auf die Mikrogliazellen

Mikroglia gehört zu den ortsansässigen Immunzellen im Gehirn, sie wird aktiviert durch Zellbestandteile aus geschädigten Zellen (Wang et al. 2007; Shichita et al. 2012) und soll ein sensibler Indikator für eine Hirnischämie sein (Abrahám und Lázár 2000; Stevens et al. 2002). Ihre Aufgabe besteht unter anderem in der Phagozytose und Zytokinfreisetzung.

In den beiden Untergruppen der WT-Mäuse nach Cohousing fiel bei der Auszählung der aktivierten Mikrogliazellen ein Unterschied in der Anzahl und in der Verteilung auf.

Die Untergruppe der WT-Tiere nach Cohousing und antibiotischer Behandlung zeigte im Mittelwert nur halb so große Infarktvolumina, dabei war das indirekte Infarktvolumen im Mittelwert signifikant kleiner (s. Tabelle 15). In dieser Gruppe zählten wir im Median eine doppelt so hohe Anzahl aktivierter Mikroglia in der ischämischen Hemisphäre und eine niedrigere in der nicht-ischämischen Hemisphäre verglichen mit den nicht antibiotisch behandelten Tieren (s. Tabelle 15).

Stevens et al. (2002) untersuchten den zeitlichen Ablauf der Aktivierung der Mikroglia mit männlichen WT-Mäusen nach 60-minütiger MCAO.

In der Versuchsreihe von Stevens et al. (2002) war 18 Stunden nach einer MCAO die Anzahl aktivierter Mikroglia in der ischämischen Hemisphäre um das Zweieinhalbfache erhöht gegenüber der nicht-ischämischen Hemisphäre. Nach 48 Stunden war dann die Anzahl aktivierter Mikroglia in der ischämischen Hemisphäre um mehr als das Achtfache angestiegen gegenüber der Anzahl der aktivierten Mikroglia in der nicht-ischämischen Hemisphäre (s. Abbildung 3).

In unserer Arbeitsgruppe zeigte sich bei den WT-Mäusen nach Cohousing und Antibiotikagabe nach 48 Stunden Reperfusion die Anzahl aktivierter Mikroglia in der ischämischen Hemisphäre fast um das 20fache erhöht (129,5 Zellen im Median) gegenüber der nicht-ischämischen Hemisphäre (6,5 Zellen im Median, s. Tabelle 15).

Ganz im Gegensatz dazu zählten wir bei den WT-Tieren nach Cohousing aber ohne antibiotische Behandlung nur einen knapp zweifachen Anstieg der aktivierten Mikrogliazellen im Median im Seitenvergleich der Hemisphären (s. Tabelle 15).

Nach Ritzel et al. (2015) sind Mikroglia vorteilhaft für das Outcome nach einer zerebralen Ischämie. Die Aufgabe der Mikroglia ist es, Zelltrümmer zu phagozytieren, T-Zellen

Antigene zu präsentieren und Zytokine sowie Chemokine freizusetzen (Hanisch und Kettenmann 2007; Napoli und Neumann 2009).

Diese von Ritzel et al. (2015) beschriebene positive biologische Aufgabe der Mikroglia wurde in meinen Versuchen bei den nach Cohousing antibiotisch behandelten WT-Mäusen anscheinend erfüllt. Bei diesen Tieren befand sich im Median eine hohe Anzahl der aktivierten Mikroglia in der geschädigten Hemisphäre und wenig Mikroglia in der nicht-ischämischen Hemisphäre (Verhältnis 20:1). Das direkte und auch das indirekte Infarktvolume waren im Mittelwert nur halb so groß wie in der Gruppe ohne antibiotische Behandlung, das indirekte Infarktvolume hier statistisch signifikant.

Auch das neurologische Outcome war bei den Tieren mit antibiotischer Behandlung besser (s. Tabelle 15).

Bei den WT-Tieren nach Cohousing ohne antibiotische Behandlung erschien die Reaktion der Mikroglia dagegen geradezu unkoordiniert. Es fand sich im Median nur die Hälfte der Zahl aktivierter Mikroglia in der ischämischen Hemisphäre im Vergleich zur antibiotisch behandelten Gruppe, dafür mehr als die fünffache Zahl aktivierter Mikroglia in der nicht geschädigten Hemisphäre.

Unterstellt, dass die oben zitierte Feststellung von Wang et al. (2007) und Shichita et al. (2012) zutrifft, dass die Mikroglia aktiviert wird durch Zellbestandteile aus geschädigten Zellen, wäre zu erwarten gewesen, dass nach der gleichartigen MCAO anfangs ein in etwa gleichgroßer ischämischer Schaden in beiden WT(NALP3^{-/-})-Gruppen entstanden war und damit ein vergleichbar großer Reiz auf den Aktivierungsvorgang der Mikroglia ausgeübt wurde. Dennoch beobachteten wir eine geradezu diametrale Reaktion der Verteilung der Mikroglia in diesen beiden Tiergruppen. Diese unterschiedliche Reaktion wurde nach einer Reperusionszeit von 48 Stunden festgestellt. Nach Stevens et al. (2002) wird zu diesem Zeitpunkt ein Höchstwert der Aktivität der Mikroglia erreicht.

Über welche Schritte es zu dieser durch die Antibiotikagabe veränderten Immunantwort durch die aktivierte Mikroglia gekommen ist, ist durch meine Versuchsreihe im Detail nicht weiter zu klären. Nach meiner Beobachtung stellt es sich jedoch so dar, dass die Mikroglia in ihrer Reaktion beeinflusst wurde durch neu aufgetretene Eigenschaften des durch die Antibiose veränderten Darmmikrobioms. Zur Bestätigung oder zum Ausschluss dieser Hypothese bedarf es jedoch weiterer gezielter Versuche.

An dieser Stelle sei angemerkt, dass die Anzahl der zur Auswertung zur Verfügung stehenden WT(NALP3^{-/-})-Mäuse begrenzt war. Es handelte sich um acht Tiere ohne sowie um acht Mäuse mit antibiotischer Behandlung. Eventuelle Messfehler verursacht durch eine unzureichende Anfärbung der Mikroglia oder Zählfehler sind nicht mit Sicherheit auszuschließen und wirken sich bei einer geringen Versuchstierzahl stärker aus als bei größeren Tierzahlen. Auch reichen die Ergebniszahlen nicht für eine statistisch signifikante Aussage in allen untersuchten Disziplinen. Die Untersuchung fand jedoch verblindet statt. Die von der Färbung, Zellzählung und damit verbundener eventueller Ergebnisunschärfe unabhängige neurologische Untersuchung zeigte ein tendenziell, aber nicht signifikant besseres Outcome in der antibiotisch behandelten WT(NALP3^{-/-})-Untergruppe und würde somit zur Hypothese passen, dass eine vermehrte Aktivität der Mikroglia zumindest in dieser Versuchsgruppe protektiv wirkte nach einer Hirnischämie. Auch die Zahl der überlebenden Neurone in der ischämischen Hemisphäre der antibiotisch behandelten WT(NALP3^{-/-})-Mäuse war im Median um ca. 50% größer als in der nicht antibiotisch behandelten Kontrollgruppe und das Infarktvolumen betrug im Mittelwert nur etwa die Hälfte der Größe der Kontrollgruppe. Drei Kriterien zeigten damit übereinstimmend ein tendenziell günstigeres Ergebnis nach einer MCAO in der antibiotisch behandelten WT-Untergruppe nach Cohousing: das Infarktvolumen war geringer, die Neuronenzahl in der ischämischen Hemisphäre war größer und das neurologische Outcome war besser. Dazu passt die vermehrte Aktivität der aktivierten Mikroglia, die nach Hinweisen aus der Literatur protektiv wirkt (Ritzel et al. 2015).

Von der oben beschriebenen Reaktion und Verteilung der Mikrogliazellen unterschied sich die Gruppe der Mäuse mit angeborenem NALP3-Defizit.

Fünf Tiere wurden für zwei Wochen über das Trinkwasser antibiotisch behandelt, sieben Tiere nicht. Dennoch trat kein nennenswerter Unterschied in der Reaktion der Mikrogliazellen auf.

Die aktivierte Mikroglia war in beiden Untergruppen im Median um das Fünffache bis Sechsfache erhöht in den ischämischen Hemisphären gegenüber den nicht-ischämischen Hemisphären (s. Tabelle 15).

Damit entsprach das Verhältnis der aktivierten Mikroglia in der ischämischen Hemisphäre verglichen mit der nicht-ischämischen Hemisphäre in etwa den Angaben der Arbeitsgruppe

von Stevens et al. (2002), die 48 Stunden nach einer MCAO einen achtfachen Anstieg im Verhältnis beobachtete (s. Abbildung 3).

Trotz der nahezu identischen Reaktion der Mikroglia in den beiden NALP3^{-/-}-Untergruppen kam es hier in den drei anderen Kriterien der Bewertung zu Unterschieden: Bei der nicht antibiotisch behandelten Gruppe war das direkte Infarktvolumen im Mittelwert kleiner als in der Vergleichsgruppe, die Anzahl der Neurone in der ischämischen Hemisphäre war im Median um ca. 60% größer und das neurologische Outcome besser.

Diese genannten Ergebnisse scheinen meinen Überlegungen bezüglich der Reaktion und Aufgabe der aktivierten Mikroglia im ersten Versuchsaufbau zu widersprechen.

Bei der Überlegung bezüglich der Wertung der Funktion und der Aufgabe der Mikroglia gilt es jedoch zu berücksichtigen, dass es sich bei den beiden Tiergruppen um Mäuse mit unterschiedlichem Genom handelt, die deshalb nicht direkt in ihrer Reaktion verglichen werden können: Die Knockout-Mäuse sind genotypisch frei von NALP3, die WT-Tiere nach Cohousing mit Knockout-Tieren nur phänotypisch.

4.2.3 Auswirkungen auf die neuronalen Zellen

Zeigt nach einer MCAO das Infarktvolumen den ischämischen Schaden der Gewebestruktur, die aktivierte Mikroglia die biologische Reaktion des angeborenen Immunsystems, so zeigt die Anzahl der überlebenden Neurone den Zellschaden, der mit den funktionellen neurologischen Ausfällen korreliert (s. Tabelle 16).

In meiner Versuchsreihe fanden sich mehr überlebende Neurone in den ischämischen Hemisphären bei den Mäusen mit angeborener NALP3-Defizienz ohne antibiotische Behandlung. Dieses Ergebnis zeigte eine statistische Signifikanz (s. Abbildung 20). Dagegen schnitten die antibiotisch behandelten Mäuse mit NALP3^{-/-}-Darmmikrobiom schlechter ab (s. Tabelle 16).

Bei gleichen Bedingungen der MCAO ist zu unterstellen, dass es primär zu annähernd gleich großen ischämischen Schäden gekommen ist, sodass die differierenden neuronalen Schäden in den 48 Stunden Reperfusionzeit entstanden sind. Der unterschiedliche neuronale Schaden der beiden Untergruppen in dieser Versuchsreihe ist nicht zu erklären mit einer unterschiedlichen Reaktion der aktivierten Mikroglia. Nach 48 Stunden war die Anzahl der Mikroglia in der ischämischen Hemisphäre beider Gruppen nahezu gleich, auch das

Zahlenverhältnis der ischämischen zur nicht ischämischen Hemisphäre in diesen Gruppen war annähernd gleich (s. Tabelle 14).

Die von mir erhobenen Daten lassen keine gezielte Schlussfolgerung auf einen bestimmten destruierenden oder protektiven Vorgang zu, sondern gestatten zunächst nur die rein deskriptive Aussage, dass die antibiotische Behandlung und damit eine Veränderung des Darmmikrobioms bei Mäusen mit angeborenem NALP3-Defizit in signifikantem Maße nachteilig ist für Überleben der neuronalen Zellen nach einer MCAO (s. Abbildung 20).

Die WT-Tiere mit verändertem Darmmikrobiom durch ein Cohousing profitierten tendenziell, jedoch nicht statistisch signifikant nach der antibiotischen Behandlung. Die Anzahl der Neurone in der ischämisch geschädigten Hemisphäre war im Median um ca. 50% höher als bei der Kontrollgruppe (s. Tabelle 16).

Das Gemeinsame der beiden NALP3^{-/-}-Untergruppen war das hereditäre, nicht durch Cohousing übertragene Darmmikrobiom. Hypothetisch möglich wäre eine verknüpfte Koordination der angeborenen Immunreaktion mit dem tierstammspezifischen Darmmikrobiom. Wird dieses verändert, kommt es zu einer veränderten Immunantwort, weil spezielle Eigenschaften des angeborenen Immunsystems nur in vermindertem Maße koordiniert werden können mit dem durch die Antibiose veränderten Darmmikrobiom.

Bei den Versuchsgruppen beobachtete ich nach der Veränderung der Darmmikrobiome durch die Antibiotikagabe von Ciprofloxacin und Metronidazol die folgenden Effekte: WT-Tiere, deren Darmmikrobiom verändert wurde durch ein Cohousing und die ein zweites Mal eine Veränderung des Darmmikrobioms durch o. g. Antibiotikabehandlung erfuhren, profitierten, nach einer MCAO war hier das indirekte Infarktvolumen signifikant kleiner. Die Tiere mit dem stammtypischen NALP3^{-/-}-Darmmikrobiom und Antibiotikabehandlung zeigten tendenziell schlechtere neurologische Ergebnisse. Dabei spielte nach der Auswertung meiner Versuche das ortsständige angeborene Immunsystem eine wichtige Rolle bei den WT-Tieren nach Cohousing: hier kam es zu einer heftigen, anscheinend vorteilhaft gesteuerten Reaktion der Mikroglia (20fache Anzahl in der geschädigten Hemisphäre). Möglicherweise wird eine Inkompatibilität der durch das Cohousing hervorgerufenen Darmmikrobiomveränderung mit der Immunabwehr durch die Antibiotikagabe kompensiert, sodass es im Vergleich zur Kontrollgruppe der Tiere zu einem

besseren Ergebnis kommt bezogen auf das Infarktvolumen und die Zahl der überlebenden Neurone sowie das neurologische Outcome (s. Kapitel 4.2.4).

Die Hypothese, dass ein modifiziertes Darmmikrobiom zu einer veränderten inflammatorischen Reaktion führt, wird durch die Ergebnisse der Versuche unserer Arbeitsgruppe durch Czech-Zechmeister gestützt. WT-Versuchstiere verglichen mit NALP3^{-/-}-Mäusen zeigten nach einer MCAO gleichgroße Infarktvolumina. WT-Tiere nach vierwöchigem Cohousing mit NALP3^{-/-}-Mäusen zeigten nach einer MCAO größere Infarktvolumina als WT-Tiere ohne Cohousing.

4.2.4 Auswirkungen auf das neurologische Outcome

Die Erfassung von Defiziten sensorischer und funktioneller Art bei Mäusen ist problematisch, insbesondere die Skalierung, da weder eine Befragung noch psychische Tests wie beim menschlichen Patienten möglich sind (Baron et al. 2013).

Von der Infarktgröße kann nicht direkt auf die Schwere des neurologischen Ausfalls geschlossen werden, da auch morphologisch unauffälliges Hirngewebe in der Funktion gestört sein kann (Braeuninger und Kleinschnitz 2009). Auch Bouët et al. (2007) stellten fest, dass keine lineare Beziehung besteht zwischen der Infarktgröße und den funktionellen Defiziten.

Nach diesen Aussagen kann bei vergleichbar großen Infarktvolumina nicht auf vergleichbar große neurologische Defizite geschlossen werden. Es bedarf daher funktioneller neurologischer Tests.

Wir verwandten für die Quantifizierung der neurologischen Störung die *modified Neurological Score Scale* (mNSS) die die Spontanaktivität, das Klettern am Käfiggitter, die Balance und Koordination sowie die Körperpropriozeption erfasst und auch den Pinna-Reflex einschließt (Garcia et al. 1995; Li et al. 2000; Hua et al. 2009; Andresen 2015; s. Kapitel 2.5.4).

Der für die neurologische Testung alternativ in Frage kommende *Bederson-Score* ist weniger sensitiv. Dieser Test erfasst neurologische Ausfälle nicht im Detail und dient eher der Feststellung, ob eine Infarzierung eingetreten ist (Bederson et al. 1986).

Die WT-Mäuse nach Cohousing ohne Antibiose, die nach einer MCAO im Mittelwert größere direkte und signifikant größere indirekte Infarktvolumina zeigten, erreichten im Median nur einen neurologischen Score von 5, mit antibiotischer Behandlung einen Score von 9,5 (s. Tabelle 16).

Die Versuchstiere mit dem angeborenen NALP3-Defizit ohne antibiotische Behandlung wiesen im Mittelwert kleinere direkte Infarktvolumina auf und der neurologische Score war im Median tendenziell, jedoch nicht signifikant besser, verglichen mit der NALP3^{-/-}-Versuchstiergruppe mit antibiotischer Behandlung (medianer Score 12 gegenüber 5, s. Tabelle 15 und Tabelle 16).

In Zusammenschau der Ergebnisse zeigte sich in meiner Arbeit bei den WT-Mäusen nach Cohousing ohne Antibiotikatherapie und bei den NALP3^{-/-}-Tieren mit Antibiotikatherapie eine bei drei voneinander unabhängigen Untersuchungskriterien in gleiche Richtung weisende Tendenz: ein im Mittelwert größeres Infarktvolumen war verbunden mit einer im Median reduzierten Anzahl überlebender Neurone in der ischämischen Hemisphäre und führte zu einem im Median niedrigeren Score bei der neurologischen Untersuchung.

4.3 Methodendiskussion

Um die Aussagekraft der in dieser Versuchsreihe erhaltenen Ergebnisse und ihre Relevanz bezüglich der klinischen Wertigkeit zu beurteilen, bedarf es der Diskussion der angewandten Methoden.

4.3.1 Versuchstierzahl

In erster Linie kritisch anzumerken ist die begrenzte Anzahl von Tieren, die zur Untersuchung zur Verfügung standen.

Eingesetzt wurden für diese Versuchsreihe in Göttingen gezüchtete, ausschließlich homozygote männliche Mäuse nach Genotypisierung (s. Kapitel 2.2.1 und 2.2.2). Von diesen wurden während des Versuchs die Tiere ausgeschlossen, die innerhalb der Reperfusionzeit 20% oder mehr ihres ursprünglichen Körpergewichts verloren oder einen Abfall der Oberflächentemperatur auf weniger als 24°C aufwiesen (s. Kapitel 2.5.2). Bewertet wurden daraufhin schließlich 28 Tiere nach der beschriebenen strengen Auswahl.

4.3.2 Darmmikrobiom

Die Versuchstiergruppen unterschieden sich durch das angeborene Darmmikrobiom. Die WT-Mäuse wurden seit der Geburt gemeinsam in Käfigen mit der NALP3^{-/-}-Tiergruppe gehalten.

Elinav et al. (2011) beschrieben nach einem Cohousing von vier Wochen eine Übertragung des NALP6^{-/-}-Darmmikrobioms auf WT-Mäuse und bewiesen die Übertragung durch anschließende Sequenzierung der bakteriellen 16S-ribosomalen RNA-Gene (rRNA) in Kotproben. Henao-Mejia et al. (2012) beschrieben ebenfalls eine Übertragung des Darmmikrobioms durch Cohousing von Knockout- mit WT-Mäusen, auch von NALP3^{-/-} auf WT-Mäuse. Ausnahmen einer Übertragung nach vier Wochen wurden in den Arbeiten nicht beschrieben und sind auch aus der weiteren Literatur nicht bekannt (s. Kapitel 1.4.2).

Die Zeit des Cohousings betrug bei meinen Versuchen mindestens zehn Wochen bei jedem Tier (s. Kapitel 2.2.4).

Eine Stuhluntersuchung der WT-Tiere zum Beweis der Darmmikrobiomübertragung fand nicht statt. Die Darmmikrobiomübertragung kann damit nicht als bewiesen gelten, sondern nur mit o.a. Begründung unterstellt werden.

5 Zusammenfassung

Der Schlaganfall ist die dritthäufigste Todesursache in Deutschland und die häufigste Ursache für erworbene Behinderungen. Die primären Therapiemöglichkeiten sind durch ein Zeitfenster begrenzt und therapeutische Interventionen bei einem ischämischen Schlaganfall limitiert auf eine Lysetherapie und eine interventionelle oder operative Thrombektomie. Wünschenswert ist zusätzlich eine neuroprotektive Therapie, um in der Penumbra eine durch postischämische Prozesse ablaufende weitere Schädigung neuronalen Gewebes zu begrenzen.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss des Darmmikrobioms auf die postischämische inflammatorische Destruktion nach einer *Middle cerebral artery occlusion* (MCAO) bei Mäusen mit 30-minütiger Okklusionszeit und 48-stündiger Reperfusionzeit untersucht.

Es wurden zwei Gruppen von Mäusen mit jeweils einheitlichem Darmmikrobiom untersucht, eine Hauptgruppe von Wildtyp-Tieren (WT) nach zehn Wochen Cohousing mit NALP3-Knockout-Mäusen (NALP3^{-/-}), eine zweite Hauptgruppe Versuchstiere hatte von Geburt an ein NALP3^{-/-}-Mikrobiom. Jeweils eine Untergruppe wurde 14 Tage vor der MCAO über das Trinkwasser antibiotisch mit Ciprofloxacin und Metronidazol behandelt. Durch die antibiotisch verursachte Veränderung des Darmmikrobioms konnten die Ischämieschäden beeinflusst werden.

Bei den WT-Tieren nach Cohousing erschien die antibiotische Behandlung vorteilhaft. Hier waren die direkten Infarkt volumina im Mittelwert kleiner und die indirekten kleiner in statistisch signifikantem Maße; die überlebenden Neurone im Median zahlreicher und das neurologische Outcome im Median besser. Bei den NALP3^{-/-}-Tieren war die antibiotische Therapie tendenziell nachteilig. Die direkten Infarkt volumina waren im Mittelwert größer. Die Neuronenzahl in der ischämischen Hemisphäre geringer in statistisch signifikantem Maße und das neurologische Outcome im Median schlechter.

Aufgrund der geringen Versuchstierzahlen konnten bei nur zwei Kriterien meiner Versuche signifikante Ergebnisse ermittelt werden.

Der biologische Mechanismus der veränderten inflammatorischen Reaktion nach einer MCAO war durch den Versuchsaufbau dieser Arbeit nicht zu klären. Eine numerisch auffällige Mikrogliareaktion in der WT-Cohousing-Gruppe nach antibiotischer Therapie

verbunden mit einem tendenziell besseren Outcome war in der NALP3^{-/-}-Gruppe nicht analog sichtbar.

Um den Wirkmechanismus einer Darmmikrobiomveränderung auf einen Hirnischämieschaden nach einer MCAO zu untersuchen, empfehlen sich weitere Versuche mit größeren Tierzahlen. Die mikrobielle Komposition der Darmmikrobiome sollte bei diesen Untersuchungen analysiert werden, um die biologischen Zusammenhänge nach der Modifikation des Darmmikrobioms durch Antibiotika zu ergründen als möglichen Ansatz für eine neuroprotektive Therapie nach einem Schlaganfall.

6 Literaturverzeichnis

- Abrahám H, Lázár G (2000): Early microglial reaction following mild forebrain ischemia induced by common carotid artery occlusion in rats. *Brain Res* 862, 63–73
- Aderem A, Ulevitch RJ (2000): Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 406, 782–787
- Akira S, Uematsu S, Takeuchi O (2006): Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124, 783–801
- Albers GW, Marks MP, Kemp S, Christensen S, Tsai JP, Ortega-Gutierrez S, McTaggart RA, Torbey MT, Kim-Tenser M, Leslie-Mazwi T et al. (2018): Thrombectomy for stroke at 6 to 16 hours with selection by perfusion imaging. *New England Journal of Medicine* 378, 708–718
- Allen IC, TeKippe EM, Woodford RMT, Uronis JM, Holl EK, Rogers AB, Herfarth HH, Jobin C, Ting JPY (2010): The NLRP3 inflammasome functions as a negative regulator of tumorigenesis during colitis-associated cancer. *J Exp Med* 207, 1045–1056
- Andersen P, Smedegaard B (2000): CD4+ T-cell subsets that mediate immunological memory to mycobacterium tuberculosis infection in mice. *Infect Immun* 68, 621–629
- Andresen L: Therapeutisches Potenzial und Langzeiteffekt der TLR4-Inhibition bei der fokalen zerebralen Ischämie. *Med. Diss. Göttingen 2015*
- Arboix A, Arbe G, García-Eroles L, Oliveres M, Parra O, Massons J (2011): Infarctions in the vascular territory of the posterior cerebral artery: clinical features in 232 patients. *BMC Res Notes* 4, 329
- Astrup J, Symon L, Branston NM, Lassen NA (1977): Cortical evoked potential and extracellular K⁺ and H⁺ at critical levels of brain ischemia. *Stroke* 8, 51–57
- Astrup J, Siesjö BK, Symon L (1981): Thresholds in cerebral ischemia - the ischemic penumbra. *Stroke* 12, 723–725
- Bäckhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI (2005): Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* 307, 1915–1920
- Baltan S, Besancon EF, Mbow B, Ye Z, Hamner MA, Ransom BR (2008): White matter vulnerability to ischemic injury increases with age because of enhanced excitotoxicity. *J Neurosci* 28, 1479–1489
- Baron JC, Macrae IM, Adams HP, Dirnagl U (2013): ESC-BRAIN: experimental and clinical stroke research--do they connect?. Meeting report of the ESC-BRAIN joint symposium held in London and Shanghai in May 2013. *Cerebrovasc Dis* 36, 306–321

- Barton GM (2008): A calculated response: control of inflammation by the innate immune system. *J Clin Invest* 118, 413–420
- Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, Nishimura MC, Davis RL, Bartkowski H (1986): Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke* 17, 472–476
- Benakis C, Brea D, Caballero S, Faraco G, Moore J, Murphy M, Sita G, Racchumi G, Ling L, Pamer EG et al. (2016): Commensal microbiota affects ischemic stroke outcome by regulating intestinal $\gamma\delta$ T cells. *Nat Med* 22, 516–523
- Berkhemer OA, Fransen PSS, Beumer D, van den Berg LA, Lingsma HF, Yoo AJ, Schonewille WJ, Vos JA, Nederkoorn PJ, Wermer MJH et al. (2015): A randomized trial of intraarterial treatment for acute ischemic stroke. *N Engl J Med* 372, 11–20
- Bonato M (2012): Neglect and extinction depend greatly on task demands: a review. *Front Hum Neurosci* 6, 195
- Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M, Yang H, Botchkina GI, Watkins LR, Wang H, Abumrad N, Eaton JW, Tracey KJ (2000): Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature* 405, 458–462
- Bouët V, Freret T, Toutain J, Divoux D, Boulouard M, Schumann-Bard P (2007): Sensorimotor and cognitive deficits after transient middle cerebral artery occlusion in the mouse. *Exp Neurol* 203, 555–567
- Braeuninger S, Kleinschnitz C (2009): Rodent models of focal cerebral ischemia: procedural pitfalls and translational problems. *Exp Transl Stroke Med* 1, 8
- Braniste V, Al-Asmakh M, Kowal C, Anuar F, Abbaspour A, Tóth M, Korecka A, Bakocevic N, Ng LG, Guan NL et al. (2014): The gut microbiota influences blood-brain barrier permeability in mice. *Sci Transl Med* 6, 263
- Broughton BRS, Reutens DC, Sobey CG (2009): Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia. *Stroke* 40, 331–339
- Campbell BCV, Mitchell PJ, Kleinig TJ, Dewey HM, Churilov L, Yassi N, Yan B, Dowling RJ, Parsons MW, Oxley TJ et al. (2015): Endovascular therapy for ischemic stroke with perfusion-imaging selection. *N Engl J Med* 372, 1009–1018
- Chen G, Shaw MH, Kim YG, Nuñez G (2009): NOD-like receptors: role in innate immunity and inflammatory disease. *Annu Rev Pathol* 4, 365–398
- Choi YS, Cho HY, Hoyt KR, Naegele JR, Obrietan K (2008): IGF-1 receptor-mediated ERK/MAPK signaling couples status epilepticus to progenitor cell proliferation in the subgranular layer of the dentate gyrus. *Glia* 56, 791–800
- Collins SM, Bercik P (2009): The relationship between intestinal microbiota and the central nervous system in normal gastrointestinal function and disease. *Gastroenterology* 136, 2003–2014

- Coole C, Radford K, Grant M, Terry J (2013): Returning to work after stroke: perspectives of employer stakeholders, a qualitative study. *J Occup Rehabil* 23, 406–418
- Creasy KR, Lutz BJ, Young ME, Stacciarini JMR (2015): Clinical implications of family-centered care in stroke rehabilitation. *Rehabil Nurs* 40, 349–359
- del Zoppo G, Ginis I, Hallenbeck JM, Iadecola C, Wang X, Feuerstein GZ (2000): Inflammation and stroke: putative role for cytokines, adhesion molecules and iNOS in brain response to ischemia. *Brain Pathol* 10, 95–112
- Denes A, Vidyasagar R, Feng J, Narvainen J, McColl BW, Kauppinen RA, Allan SM (2007): Proliferating resident microglia after focal cerebral ischaemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 27, 1941–1953
- DGN (2012): Akuttherapie des ischämischen Schlaganfalls (Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie). S1-Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Neurologie. https://dgn.org/leitlinien/23_10-11-22-2012-akuttherapie-des-ischamischen-schlaganfalls; abgerufen am 14.10.2019
- DGN (2015): Akuttherapie des ischämischen Schlaganfalls – rekanalisierende Therapie (Ergänzung 2015) (Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie). S2k-Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Neurologie. <https://dgn.org/leitlinien/3198-030-140-rekanalisierende-therapie-ergaenzung-akuttherapie-schlaganfall>; abgerufen am 14.10.2019
- Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA (1999): Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* 22, 391–397
- Dirnagl U, Klehmet J, Braun JS, Harms H, Meisel C, Ziemssen T, Prass K, Meisel A (2007): Stroke-induced immunodepression: experimental evidence and clinical relevance. *Stroke* 38, 770–773
- Donnan GA, Fisher M, Macleod M, Davis SM (2008): Stroke. *Lancet* 371, 1612–1623
- Dostert C, Pétrilli V, Van Bruggen R, Steele C, Mossman BT, Tschopp J (2008): Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science* 320, 674–677
- Ebino KY, Suwa T, Kuwabara Y, Saito TR, Takahashi KW (1986): [Analyses of constituents of feces and the effect of a vitamin B12 fortified diet on coprophagy in the mouse]. *Jikken Dobutsu* 35, 381–386
- Ebino KY, Amao H, Suwa T, Kuwabara Y, Saito TR, Takahashi KW (1987): [Coprophagy in the germfree mouse]. *Jikken Dobutsu* 36, 33–37
- Elinav E, Strowig T, Kau AL, Henao-Mejia J, Thaiss CA, Booth CJ, Peaper DR, Bertin J, Eisenbarth SC, Gordon JI et al. (2011): NLRP6 inflammasome is a regulator of colonic microbial ecology and risk for colitis. *Cell* 145, 745–757

- Emberson J, Lees KR, Lyden P, Blackwell L, Albers G, Bluhmki E, Brott T, Cohen G, Davis S, Donnan G et al. (2014): Effect of treatment delay, age, and stroke severity on the effects of intravenous thrombolysis with alteplase for acute ischaemic stroke: a meta-analysis of individual patient data from randomised trials. *Lancet* 384, 1929–1935
- Engel O, Kolodziej S, Dirnagl U, Prinz V (2011): Modeling stroke in mice - middle cerebral artery occlusion with the filament model. *J Vis Exp* 47, 2423
- Fann DYW, Lee SY, Manzanero S, Tang SC, Gelderblom M, Chunduri P, Bernreuther C, Glatzel M, Cheng YL, Thundyil J et al. (2013): Intravenous immunoglobulin suppresses NLRP1 and NLRP3 inflammasome-mediated neuronal death in ischemic stroke. *Cell Death Dis* 4, e790
- Feigin VL, Lawes CMM, Bennett DA, Barker-Collo SL, Parag V (2009): Worldwide stroke incidence and early case fatality reported in 56 population-based studies: a systematic review. *Lancet Neurol* 8, 355–369
- Feuerstein GZ, Wang X, Barone FC (1998): The role of cytokines in the neuropathology of stroke and neurotrauma. *Neuroimmunomodulation* 5, 143–159
- Fisher M, Feuerstein G, Howells DW, Hurn PD, Kent TA, Savitz SI, Lo EH, STAIR Group (2009): Update of the stroke therapy academic industry roundtable preclinical recommendations. *Stroke* 40, 2244–2250
- Frank DN, St. Amand AL, Feldman RA, Boedeker EC, Harpaz N, Pace NR (2007): Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 13780–13785
- Fujimura M, Morita-Fujimura Y, Murakami K, Kawase M, Chan PH (1998): Cytosolic redistribution of cytochrome c after transient focal cerebral ischemia in rats. *J Cereb Blood Flow Metab* 18, 1239–1247
- Garcia JH (1984): Experimental ischemic stroke: a review. *Stroke* 15, 5–14
- Garcia JH, Wagner S, Liu KF, Hu X (1995): Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats statistical validation. *Stroke* 26, 627–635
- Gelderblom M, Leypoldt F, Steinbach K, Behrens D, Choe CU, Siler DA, Arumugam TV, Orthey E, Gerloff C, Tolosa E et al. (2009): Temporal and spatial dynamics of cerebral immune cell accumulation in stroke. *Stroke* 40, 1849–1857
- Grau AJ, Weimar C, Buggle F, Heinrich A, Goertler M, Neumaier S, Glahn J, Brandt T, Hacke W, Diener HC (2001): Risk factors, outcome, and treatment in subtypes of ischemic stroke: the German stroke data bank. *Stroke* 32, 2559–2566
- Guarda G, So A (2010): Regulation of inflammasome activity. *Immunology* 130, 329–336
- Hacke W: Zerebrale Durchblutungsstörungen: Ischämische Infarkte. In: Hacke W (Hrsg.): *Neurologie*. 14. Auflage; Springer-Verlag, Berlin 2016, 183-240

- Hanisch UK, Kettenmann H (2007): Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nat Neurosci* 10, 1387–1394
- Hansen AK, Ling F, Kaas A, Funda DP, Farlov H, Buschard K (2006): Diabetes preventive gluten-free diet decreases the number of caecal bacteria in non-obese diabetic mice. *Diabetes Metab Res Rev* 22, 220–225
- He S, Wang L, Miao L, Wang T, Du F, Zhao L, Wang X (2009): Receptor interacting protein kinase-3 determines cellular necrotic response to TNF-alpha. *Cell* 137, 1100–1111
- Heid ME, Keyel PA, Kamga C, Shiva S, Watkins SC, Salter RD (2013): Mitochondrial reactive oxygen species induces NLRP3-dependent lysosomal damage and inflammasome activation. *J Immunol* 191, 5230–5238
- Henao-Mejia J, Elinav E, Jin CC, Hao L, Mehal WZ, Strowig T, Thaïss CA, Kau AL, Eisenbarth SC, Jureczak MJ et al. (2012): Inflammasome-mediated dysbiosis regulates progression of NAFLD and obesity. *Nature* 482, 179–185
- Heuschmann PU, Busse O, Wagner M, Endres M, Villringer A, Röther J, Kolominisky-Rabas PL, Berger K (2010): Schlaganfallhäufigkeit und Versorgung von Schlaganfallpatienten in Deutschland. *Akt Neurol* 37, 333–340
- Hirota SA, Ng J, Lueng A, Khajah M, Parhar K, Li Y, Lam V, Potentier MS, Ng K, Bawa M et al. (2011): The NLRP3 inflammasome plays key role in the regulation of intestinal homeostasis. *Inflamm Bowel Dis* 17, 1359–1372
- Hornung V, Bauernfeind F, Halle A, Samstad EO, Kono H, Rock KL, Fitzgerald KA, Latz E (2008): Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat Immunol* 9, 847–856
- Hossmann KA (1994): Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia. *Ann Neurol* 36, 557–565
- Hossmann KA (1996): Periinfarct depolarizations. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 8, 195–208
- Hsiao EY, McBride SW, Hsien S, Sharon G, Hyde ER, McCue T, Codelli JA, Chow J, Reisman SE, Petrosino JF et al. (2013): Microbiota modulate behavioral and physiological abnormalities associated with neurodevelopmental disorders. *Cell* 155, 1451–1463
- Hua F, Ma J, Ha T, Kelley JL, Kao RL, Schweitzer JB, Kalbfleisch JH, Williams DL, Li C (2009): Differential roles of TLR2 and TLR4 in acute focal cerebral ischemia/reperfusion injury in mice. *Brain Res* 1262, 100–108
- Hug A, Dalpke A, Wiczorek N, Giese T, Lorenz A, Auffarth G, Liesz A, Veltkamp R (2009): Infarct volume is a major determiner of post-stroke immune cell function and susceptibility to infection. *Stroke* 40, 3226–3232

- Iadecola C, Anrather J (2011): The immunology of stroke: from mechanisms to translation. *Nat Med* 17, 796–808
- Iwasaki A, Medzhitov R (2015): Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nat Immunol* 16, 343–353
- Jin R, Yang G, Li G (2010): Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: role of inflammatory cells. *J Leukoc Biol* 87, 779–789
- Katayama Y, Tamura T, Becker DP, Tsubokawa T (1992): Early cellular swelling during cerebral ischemia in vivo is mediated by excitatory amino acids released from nerve terminals. *Brain Res* 577, 121–126
- Katchanov J, Waeber C, Gertz K, Gietz A, Winter B, Brück W, Dirnagl U, Veh RW, Endres M (2003): Selective neuronal vulnerability following mild focal brain ischemia in the mouse. *Brain Pathol* 13, 452–464
- Kawai T, Akira S (2009): The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *Int Immunol* 21, 317–337
- Kosiewicz MM, Zirnheld AL, Alard P (2011): Gut microbiota, immunity, and disease: a complex relationship. *Front Microbiol* 2, 180
- Langhorne P, Stott DJ, Robertson L, MacDonald J, Jones L, McAlpine C, Dick F, Taylor GS, Murray G (2000): Medical complications after stroke: a multicenter study. *Stroke* 31, 1223–1229
- Latz E, Xiao TS, Stutz A (2013): Activation and regulation of the inflammasomes. *Nat Rev Immunol* 13, 397–411
- Lederberg J, McCray A (2001): `Ome sweet `omics - a genealogical treasury of words. *The Scientist* 15, 8
- Leist M, Nicotera P (1998): Apoptosis, excitotoxicity, and neuropathology. *Exp Cell Res* 239, 183–201
- Li Y, Chen J, Chopp M (2000): Coadministration of bone marrow cells and an inhibitor of apoptosis (Z-VAD) promotes bone marrow cell survival and neurological functional recovery after focal cerebral ischemia in adult rat. *Stroke* 32, 379–380
- Linnik MD, Miller JA, Sprinkle-Cavallo J, Mason PJ, Thompson FY, Montgomery LR, Schroeder KK (1995): Apoptotic DNA fragmentation in the rat cerebral cortex induced by permanent middle cerebral artery occlusion. *Brain Res Mol Brain Res* 32, 116–124
- Lipton P (1999): Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev* 79, 1431–1568
- Liu T, Kuljaca S, Tee A, Marshall GM (2006): Histone deacetylase inhibitors: multifunctional anticancer agents. *Cancer Treat Rev* 32, 157–165

- Lowry OH, Passonneau JV, Hasselberger FX, Schulz DW (1964): Effect of ischemia on known substrates and cofactors of the glycolytic pathway in brain. *J Biol Chem* 239, 18–30
- Luckey TD (1972): Introduction to intestinal microecology. *Am J Clin Nutr* 25, 1292–1294
- Luengo-Fernandez R, Paul NLM, Gray AM, Pendlebury ST, Bull LM, Welch SJV, Cuthbertson FC, Rothwell PM (2013): A population-based study of disability and institutionalisation after TIA and stroke: 10-year results of the Oxford Vascular Study. *Stroke* 44, 2854–2861
- Manji GA, Wang L, Geddes BJ, Brown M, Merriam S, Al-Garawi A, Mak S, Lora JM, Briskin M, Jurman M et al. (2002): PYPAF1, a PYRIN-containing Apaf1-like protein that assembles with ASC and regulates activation of NF-kappa B. *J Biol Chem* 277, 11570–11575
- Martinon F, Pétrilli V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J (2006): Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* 440, 237–241
- Mattle H, Mumenthaler M: Ischämische Schlaganfälle. In: Mattle H, Mumenthaler M (Hrsg.): *Neurologie*. 13. Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2012, 116-160
- Medzhitov R (2001): Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 1, 135–145
- Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA (1997): A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 388, 394–397
- Meisel C, Schwab JM, Prass K, Meisel A, Dirnagl U (2005): Central nervous system injury-induced immune deficiency syndrome. *Nat Rev Neurosci* 6, 775–786
- Mergenthaler P, Lindauer U, Dienel GA, Meisel A (2013): Sugar for the brain: the role of glucose in physiological and pathological brain function. *Trends Neurosci* 36, 587–597
- Mies G, Iijima T, Hossmann KA (1993): Correlation between peri-infarct DC shifts and ischaemic neuronal damage in rat. *Neuroreport* 4, 709–711
- Mishra NK, Lyden P, Grotta JC, Lees KR, VISTA Collaborators (2010): Thrombolysis is associated with consistent functional improvement across baseline stroke severity: a comparison of outcomes in patients from the Virtual International Stroke Trials Archive (VISTA). *Stroke* 41, 2612–2617
- Morgan SC, Taylor DL, Pocock JM (2004): Microglia release activators of neuronal proliferation mediated by activation of mitogen-activated protein kinase, phosphatidylinositol-3-kinase/Akt and delta-Notch signalling cascades. *J Neurochem* 90, 89–101
- Nakajima K, Honda S, Tohyama Y, Imai Y, Kohsaka S, Kurihara T (2001): Neurotrophin secretion from cultured microglia. *J Neurosci Res* 65, 322–331

- Namura S, Zhu J, Fink K, Endres M, Srinivasan A, Tomaselli KJ, Yuan J, Moskowitz MA (1998): Activation and cleavage of caspase-3 in apoptosis induced by experimental cerebral ischemia. *J Neurosci* 18, 3659–3668
- Napoli I, Neumann H (2009): Microglial clearance function in health and disease. *Neuroscience* 158, 1030–1038
- Nedeltchev K, Schwegler B, Haefeli T, Brekenfeld C, Gralla J, Fischer U, Arnold M, Remonda L, Schroth G, Mattle HP (2007): Outcome of stroke with mild or rapidly improving symptoms. *Stroke* 38, 2531–2535
- Neely MD, Gesemann M (1994): Disruption of microfilaments in growth cones following depolarization and calcium influx. *J Neurosci* 14, 7511–7520
- Nogueira RG, Jadhav AP, Haussen DC, Bonafe A, Budzik RF, Bhuva P, Yavagal DR, Ribo M, Cognard C, Hanel RA et al. (2018): Thrombectomy 6 to 24 hours after stroke with a mismatch between deficit and infarct. *N Engl J Med* 378, 11–21
- O'Brien T, Woychik R (2003): Our small relative. *Nat Genet* 33, 3–4
- O'Donnell MJ, Xavier D, Liu L, Zhang H, Chin SL, Rao-Melacini P, Rangarajan S, Islam S, Pais P, McQueen MJ et al. (2010): Risk factors for ischaemic and intracerebral haemorrhagic stroke in 22 countries (the INTERSTROKE study): a case-control study. *Lancet* 376, 112–123
- O'Neill LAJ, Golenbock D, Bowie AG (2013): The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity. *Nat Rev Immunol* 13, 453–460
- Orrenius S, Burkitt MJ, Kass GE, Dypbukt JM, Nicotera P (1992): Calcium ions and oxidative cell injury. *Ann Neurol* 32, 33–42
- Perel P, Roberts I, Sena E, Wheble P, Briscoe C, Sandercock P, Macleod M, Mignini LE, Jayaram P, Khan KS (2007): Comparison of treatment effects between animal experiments and clinical trials: systematic review. *BMJ* 334, 197–200
- Pétrilli V, Papin S, Dostert C, Mayor A, Martinon F, Tschopp J (2007): Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. *Cell Death Differ* 14, 1583–1589
- Prentice H, Modi JP, Wu JY (2015): Mechanisms of neuronal protection against excitotoxicity, endoplasmic reticulum stress, and mitochondrial dysfunction in stroke and neurodegenerative diseases. *Oxid Med Cell Longev* 2015; 2015
- Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, Nielsen T, Pons N, Levenez F, Yamada T et al. (2010): A human gut microbial gene catalog established by metagenomic sequencing. *Nature* 464, 59–65
- Rami A, Bechmann I, Stehle JH (2008): Exploiting endogenous anti-apoptotic proteins for novel therapeutic strategies in cerebral ischemia. *Prog Neurobiol* 85, 273–296

- Rijnberk A, de Vries HW: Kleine Heimtiere. In: Rijnberk A, de Vries HW (Hrsg.): Anamnese und körperliche Untersuchung kleiner Haus- und Heimtiere. 2. Auflage; Enke Verlag, Stuttgart, 2004, 361-380
- Ritzel RM, Patel AR, Grenier JM, Crapser J, Verma R, Jellison ER, McCullough LD (2015): Functional differences between microglia and monocytes after ischemic stroke. *J Neuroinflammation* 12, 106
- Rock FL, Hardiman G, Timans JC, Kastelein RA, Bazan JF (1998): A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 588–593
- Round JL, Mazmanian SK (2009): The gut microbiome shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat Rev Immunol* 9, 313–323
- Rubartelli A, Lotze MT (2007): Inside, outside, upside down: damage-associated molecular-pattern molecules (DAMPs) and redox. *Trends Immunol* 28, 429–436
- Salford LG, Plum F, Siesjö BK (1973a): Graded hypoxia-oligemia in rat brain. I. Biochemical alterations and their implications. *Arch Neurol* 29, 227–233
- Salford LG, Plum F, Brierley JB (1973b): Graded hypoxia-oligemia in rat brain. II. Neuropathological alterations and their implications. *Arch Neurol* 29, 234–238
- Savage DC (1977): Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annu Rev Microbiol* 31, 107–133
- Schilling M, Besselmann M, Leonhard C, Mueller M, Ringelstein EB, Kiefer R (2003): Microglial activation precedes and predominates over macrophage infiltration in transient focal cerebral ischemia: a study in green fluorescent protein transgenic bone marrow chimeric mice. *Exp Neurol* 183, 25–33
- Schilling M, Besselmann M, Müller M, Strecker JK, Ringelstein EB, Kiefer R (2005): Predominant phagocytic activity of resident microglia over hematogenous macrophages following transient focal cerebral ischemia: an investigation using green fluorescent protein transgenic bone marrow chimeric mice. *Exp Neurol* 196, 290–297
- Shichita T, Sakaguchi R, Suzuki M, Yoshimura A (2012): Post-ischemic inflammation in the brain. *Front Immunol* 3, 132
- Silver IA, Erecińska M (1990): Intracellular and extracellular changes of [Ca²⁺] in hypoxia and ischemia in rat brain in vivo. *J Gen Physiol* 95, 837–866
- Simon AK, Hollander GA, McMichael A (2015): Evolution of the immune system in humans from infancy to old age. *Proc Biol Sci* 282, 1821
- Simon RP, Swan JH, Griffiths T, Meldrum BS (1984): Blockade of N-methyl-D-aspartate receptors may protect against ischemic damage in the brain. *Science* 226, 850–852

- Singh V, Roth S, Llovera G, Sadler R, Garzetti D, Stecher B, Dichgans M, Liesz A (2016): Microbiota dysbiosis controls the neuroinflammatory response after stroke. *J Neurosci* 36, 7428–7440
- Smith EE, Abdullah AR, Petkovska I, Rosenthal E, Koroshetz WJ, Schwamm LH (2005): Poor outcomes in patients who do not receive intravenous tissue plasminogen activator because of mild or improving ischemic stroke. *Stroke* 36, 2497–2499
- Stevens SL, Bao J, Hollis J, Lessov NS, Clark WM, Stenzel-Poore MP (2002): The use of flow cytometry to evaluate temporal changes in inflammatory cells following focal cerebral ischemia in mice. *Brain Res* 932, 110–119
- Swanson RA, Morton MT, Tsao-Wu G, Savalos RA, Davidson C, Sharp FR (1990): A semiautomated method for measuring brain infarct volume. *J Cereb Blood Flow Metab* 10, 290–293
- Symon L, Branston NM, Chikovani O (1979): Ischemic brain edema following middle cerebral artery occlusion in baboons: relationship between regional cerebral water content and blood flow at 1 to 2 hours. *Stroke* 10, 184–191
- Takahashi KW, Ebino KY, Saito TR, Imamichi T (1985): Strain difference in coprophagous behavior in laboratory mice (*Mus musculus*). *Zoological Science* 2, p249-255
- Tamura A, Graham DI, McCulloch J, Teasdale GM (1981): Focal cerebral ischaemia in the rat: 1. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 1, 53–60
- Toni D, Lorenzano S, Agnelli G, Guidetti D, Orlandi G, Semplicini A, Toso V, Caso V, Malferrari G, Fanucchi S et al. (2008): Intravenous thrombolysis with rt-PA in acute ischemic stroke patients aged older than 80 years in Italy. *Cerebrovasc Dis* 25, 129–135
- Tschopp J, Schroder K (2010): NLRP3 inflammasome activation: the convergence of multiple signalling pathways on ROS production? *Nat Rev Immunol* 10, 210–215
- Vollmer J, Tluk S, Schmitz C, Hamm S, Jurk M, Forsbach A, Akira S, Kelly KM, Reeves WH, Bauer S et al. (2005): Immune stimulation mediated by autoantigen binding sites within small nuclear RNAs involves Toll-like receptors 7 and 8. *J Exp Med* 202, 1575–1585
- Wang Q, Tang XN, Yenari MA (2007): The inflammatory response in stroke. *J Neuroimmunol* 184, 53–68
- Wang X, Yue TL, Barone FC, White RF, Gagnon RC, Feuerstein GZ (1994): Concomitant cortical expression of TNF-alpha and IL-1 beta mRNAs follows early response gene expression in transient focal ischemia. *Mol Chem Neuropathol* 23, 103–114
- Wang Y, Kasper LH (2014): The role of microbiome in central nervous system disorders. *Brain Behav Immun* 38, 1–12

- Weiss J, Maeß J, Nebendahl K: Versuchsplanung und -durchführung. In: Weiss J, Maeß J, Nebendahl K (Hrsg.): Haus- und Versuchstierpflege. 2. Auflage; Enke Verlag, Stuttgart 2003, 351
- Welsch U: Immunsystem. In: Welsch U (Hrsg.): Lehrbuch Histologie. 3. Auflage. Urban und Fischer/Elsevier Verlag, München 2010, 223-252
- Weng N (2006): Aging of the immune system: How much can the adaptive immune system adapt? *Immunity* 24, 495–499
- Yang F, Wang Z, Wei X, Han H, Meng X, Zhang Y, Shi W, Li F, Xin T, Pang Q et al. (2014): NLRP3 deficiency ameliorates neurovascular damage in experimental ischemic stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 34, 660–667
- Zaki MH, Boyd KL, Vogel P, Kastan MB, Lamkanfi M, Kanneganti TD (2010): The NLRP3 inflammasome protects against loss of epithelial integrity and mortality during experimental colitis. *Immunity* 32, 379–391

Danksagung

Ich bedanke mich ganz herzlich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. George Trendelenburg für die Überlassung des Themas dieser Dissertation sowie die gute Betreuung und den gemeinsamen wissenschaftlichen Austausch.

Meinen Betreuerinnen Frau Dr. Bozena Czech-Zechmeister und Frau Birte Könnecke danke ich für die umfangreiche methodische Ausbildung, die wissenschaftliche und persönliche Betreuung.

Ich danke Frau Dr. Lena Andresen für die Unterstützung, den persönlichen Austausch und die kollegiale Zusammenarbeit.