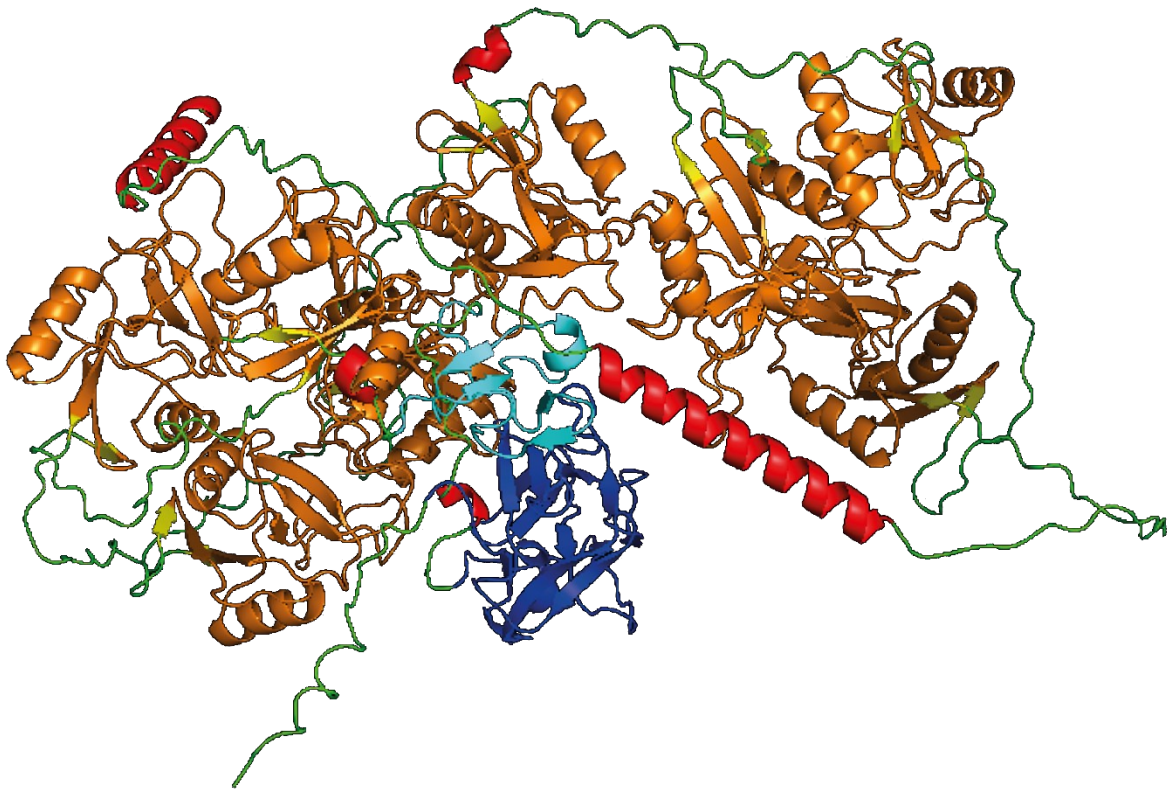


# Untersuchungen zur Rolle des Mannose Rezeptor C-Typ I nach experimentellem Schädel-Hirn-Trauma in der Maus



Jenny Strehle

# **Untersuchungen zur Rolle des Mannose Rezeptor C-Typ I nach experimentellem Schädel-Hirn-Trauma in der Maus**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Grades eines  
**Dr. med. vet.**  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Jenny Strehle

Aus der Klinik für Kleintiere – Neurochirurgie, Neuroradiologie und  
Klinische Neurologie der Justus-Liebig-Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Martin Schmidt

**und**

aus der Klinik für Anästhesiologie der Universitätsmedizin der  
Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Betreuer: Prof. Dr. Michael Schäfer

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

**Jenny Strehle**

Tierärztin aus Worms

Gießen 2024

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

**Dekan:**

Prof. Dr. Dr. Stephan Arnhold

**Gutachter:**

Prof. Dr. Martin Schmidt

Prof. Dr. Michael Schäfer

Prof. Dr. Christoph Daniel Rummel

**Tag der Disputation:**

10.07.2024

*Für den kleinen und den großen Prinzen in meinem Leben*

### **Eidesstattliche Erklärung**

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

***Jenny Strehle***

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>7</b>
<b>1. Literaturübersicht und Forschungsziel</b>	<b>14</b>
1.1 Das Schädel-Hirn-Trauma (SHT)	14
1.1.1 Pathophysiologie des SHTs	14
1.1.2 SHT beim Menschen	18
1.1.3 SHT beim Tier	19
1.1.3.1 In der Tiermedizin	19
1.1.3.2 Bei Labornagern in Forschungsprojekten	21
1.1.4 SHT Modelle	22
1.1.4.1 “Controlled Cortical Impact” (CCI) Modell	22
1.1.4.1.1 Beeinträchtigte Areale des Gehirns bei der Nutzung des „Controlled Cortical Impact Modells“ in unserem Labor	23
1.1.4.1.1.1 Der <i>Cortex cerebri</i>	23
1.1.4.1.1.2 Der <i>Hippocampus</i>	24
1.1.4.1.1.3 Der <i>Thalamus</i>	24
1.1.4.2 “Fluid percussion injury” (FPI) Modell	24
1.1.4.3 Weitere gängige SHT Modelle beim Kleintier	25
1.1.4.4 Spezielle SHT Modelle am Großtier	26
1.1.5 Geschlechtsspezifische Unterschiede des SHTs bei Menschen und Versuchstieren	27
1.2 Vermutliche Schlüssel-moleküle bei der pro- und antiinflammatorischen Antwort im Gehirn	28
1.2.1 Mannose Rezeptor C-Typ I (MRC1)	29
1.2.1.1 Allgemeines	29
1.2.1.2 Funktionen des MRC1 im Detail	29
1.2.1.3 MRC1 im postnatalen Gehirn	30
1.2.1.4 MRC1 im adulten Gehirn	31
1.2.1.5 MRC1 in Zusammenhang mit SHT	32
1.3 Ziel des vorliegenden Forschungsprojekts	33
<b>2 Material</b>	<b>34</b>
2.1 Geräte	34
2.2 Verbrauchsmaterialien	35
2.3 Lösungen	37

2.4	Medikamente	37
2.5	Kits	38
2.6	PCR „Primer“	38
2.7	Antikörper	39
2.8	Software	40
<b>3</b>	<b>Methoden</b>	<b>41</b>
3.1	Studiendesign & Mäuse	41
3.1.1	Genehmigung der Tierversuche	41
3.1.2	Studiendesign	41
3.1.3	MRC1 Knock-out Mäuse (Internationale Nomenklatur: B6.129P2-Mrc1 <sup>tm1Mnz/J</sup> )	43
3.1.3.1	Genotypisierung	44
3.1.3.2	Sicherstellung des richtigen Genotyps	45
3.1.4	Maushaltung	45
3.1.4.1	Käfige	45
3.1.4.2	Versorgung mit Futter und Wasser	45
3.1.4.3	Haltungsform	46
3.1.5	Abbruchkriterien	47
3.2	Chirurgische Eingriffe	50
3.2.1	Anästhesie & Analgesie	50
3.2.2	Durchführung des Controlled Cortical Impact (CCI)	50
3.2.3	Durchführung der Scheinoperation („Sham“)	52
3.2.4	<i>Intraoperatives Monitoring</i>	52
3.3	Verhaltenstests	53
3.3.1	“Modified Neurological Severity Score” (mNSS)	54
3.3.2	Rotarod (RR) Test	57
3.3.3	„Open Field Test“ (OFT)	58
3.3.4	“Elevated Plus Maze” (EPM) Test	59
3.4	Euthanasie der Versuchstiere und Gehirnentnahme	60
3.5	Histologische Untersuchung der Gehirne	60
3.5.1	Anfertigung von Kryoschnitten	60
3.5.2	Kresylviolett-Färbung nach Nissl	62
3.5.3	Hematoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)	62
3.5.4	Immunhistochemie	63
3.5.5	Histopathologische Analysen	63

3.5.5.1	Bestimmung des Läsionsvolumens (Kohorte 1: 5d Überleben) bzw. verbliebenen gesunden Hirngewebes (Kohorte 2: 30d Überleben)	64
3.5.5.2	Quantifizierung der Körnerzellschicht-Dicke des Gyrus dentatus	66
3.5.6	Bestimmung der Hämatomgröße	67
3.5.7	Auswertung immunhistochemischer Aufnahmen	67
3.5.7.1	<i>Periläsionaler lateraler und medialer Cortex cerebri, Hippocampus und Thalamus</i>	67
3.5.7.2	MRC1 <sup>+</sup> Zellen entlang der Mittellinie	68
3.6	Molekularbiologische Methoden	69
3.6.1	RNA-Extraktion aus Hirngewebe	69
3.6.2	Konzentrationsmessung der RNA	70
3.6.3	cDNA-Synthese	70
3.6.4	Quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR)	70
3.6.5	RNA-Sequenzierung und Auswertung	72
3.7	Statistische Auswertung	73
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>75</b>
4.1	Ein SHT führt in der frühen Phase zu einer gesteigerten MRC1 Expression	75
4.2	MRC1-Defizienz hat keine Auswirkungen auf die Körpergewichtsentwicklung der Mäuse nach SHT	76
4.3	MRC1-Knock-out führt zu einer Verschlechterung der neurologischen Fähigkeiten sowie einem reduzierten angstähnlichen Verhalten der Mäuse in der frühen und späten Phase des SHTs	78
4.4	MRC1-Defizienz verschlimmert strukturelle Hirnschäden in der Frühphase und tendenziell in der Spätphase nach SHT	82
4.5	MRC1-Defizienz führt in der frühen Phase des SHTs zu größeren Hämatomen in männlichen Mäusen	85
4.6	MRC1-Defizienz resultiert in einer verminderten Anzahl und CD68-Expression periläsionaler Makrophagen/ Mikroglia unabhängig von der Hämatomgröße in weiblichen Mäusen	86
4.7	Nach einer traumatischen Hirnverletzung findet in der Frühphase keine Beeinflussung von Astrozyten oder Neuronen durch den MRC1-Knock-out statt	89
4.8	Die Abwesenheit des MRC1 hat Auswirkungen auf die Expression zahlreicher Gene 5 Tage nach SHT	91
4.9	Korrelationsanalysen weisen auf einen Zusammenhang zwischen Verhaltensleistung und der Hirnschädigung der Mäuse in der frühen, als auch späten Phase der Pathogenese eines SHTs	94

4.10	Der MRC1 beeinflusst die Pathogenese im frühen Verlauf eines SHTs auf subtile Weise	97
4.11	Der MRC1 ist wichtig für die Immunhomöostase im Gehirn	111
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>118</b>
5.1	Defizienz des MRC1 resultiert vor allem in der frühen Phase nach SHT in einer ausgeprägten Schädigung des Gehirns	118
5.2	MRC1-Defizienz aggraviert neurologische und verhaltensbiologische Defizite in der frühen und späten Phase des SHTs	122
5.3	MRC1-Defizienz führt zu geschlechtsspezifischen Unterschieden in der inflammatorischen Reaktion auf ein SHT	124
5.4	MRC1 spielt eine bedeutende Rolle bei der Aufrechterhaltung der Immunhomöostase des Gehirns sowohl in gesunden als auch in krankhaften Zuständen.	128
5.5	Limitationen dieses Forschungsprojekts	133
5.6	Fazit und Ausblick	133
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>136</b>
<b>7</b>	<b>Abstract</b>	<b>138</b>
<b>8</b>	<b>Anhang</b>	<b>140</b>
8.1	Tabellenverzeichnis	140
8.2	Abbildungsverzeichnis	141
<b>9</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>143</b>
<b>10</b>	<b>Publikationen</b>	<b>159</b>
<b>11</b>	<b>Danksagung</b>	<b>160</b>

## Abkürzungsverzeichnis

% ipsi .....	<i>relativ zur gesamten ipsiläsionalen Hemisphäre</i>
Aif1 .....	<i>ionized calcium-binding adapter molecule 1</i>
AMPA .....	<i>α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor</i>
APC .....	<i>Antigenpräsentierende Zellen</i>
Arg1 .....	<i>Arginase1</i>
ATP .....	<i>Adenosintriphosphat</i>
BAMs .....	<i>border-associated-macrophages</i>
BBB .....	<i>blood-brain barrier</i>
bp .....	<i>Basenpaare</i>
C1qtnf3 .....	<i>C1q And TNF Related 3</i>
C57BL/6 .....	<i>Inzuchtmausstamm</i>
CAMs .....	<i>CNS-associated macrophages</i>
CCI .....	<i>Controlled Cortical Impact</i>
CCL .....	<i>CC-Chemokin-Ligand</i>
CD .....	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA .....	<i>complementary DNA</i>
CrI:CD1(ICR) .....	<i>Inzuchtstamm</i>
CT .....	<i>Computertomografie</i>
CTE .....	<i>Chronische traumatische Enzephalopathie</i>
CTLDs .....	<i>C-Typ Lektin Domänen</i>
Cxcl1 .....	<i>C-X-C Motif Chemokine Ligand 1</i>
Cxcl3 .....	<i>C-X-C Motif Chemokine Ligand 3</i>
d .....	<i>day</i>
DAI .....	<i>Diffuse axonal injury</i>
DAMPs .....	<i>damage associated molecular patterns</i>
DEGs .....	<i>differenziell exprimierten Gene</i>
DNA .....	<i>Desoxyribonukleinsäure</i>
dpi .....	<i>days post injury</i>
DTA .....	<i>Diphtheria Toxin</i>
EGFP .....	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
EPM .....	<i>Elevated Plus Maze</i>
EU RL .....	<i>Richtlinien der europäischen Union</i>
Fcgr1 .....	<i>Fcγ-Rezeptor</i>
FDR .....	<i>False Discovery Rate</i>
FELASA .....	<i>Federation of European Laboratory Animal Science Associations</i>
FPI .....	<i>Fluid Percussion Injury</i>

GCL.....	<i>granule cell layer</i>
GCS .....	<i>Glasgow Coma Scale</i>
gDNA .....	<i>genomische DNA</i>
GFAP .....	<i>glial fibrillary acidic protein</i>
GSEA .....	<i>Gene Set Enrichment Analysis</i>
GV-Solas.....	<i>Gesellschaft für Versuchstierkunde</i>
H&E Färbung .....	<i>Hämatoxylin-Eosin-Färbung</i>
HE .....	<i>Heterozygot</i>
HMGB1 .....	<i>high mobility group box 1</i>
Hz .....	<i>Hertz</i>
ICP .....	<i>intracranial pressure</i>
Ifi47 .....	<i>interferon gamma inducible protein 47</i>
IFN .....	<i>Interferon</i>
IHC.....	<i>Immunhistochemie</i>
IL .....	<i>Interleukin</i>
iNOS .....	<i>induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase</i>
kDA .....	<i>Kilodalton</i>
Klri1.....	<i>Killer cell lectin-like receptor subfamily G member 1</i>
KO.....	<i>Knock-out</i>
Lidocain-HCl 2 %.....	<i>Lidocain-Hydrochlorid 2 %</i>
LPS .....	<i>Lipopolysaccharid</i>
Lyz2 .....	<i>Lysozyme 2</i>
MGCS .....	<i>Modified Glasgow Coma Scale</i>
MHCII.....	<i>Major Histocompatibility Complex II</i>
MMP.....	<i>Matrix Metalloproteinase</i>
mNSS.....	<i>Modified Neurological Severity Score</i>
MRC1.....	<i>Mannose Rezeptor C-Typ I</i>
mRNA .....	<i>messenger RNA</i>
MRT .....	<i>Magnetresonanztomografie</i>
Neo .....	<i>Neomycin-Resistenzselektionsmarker</i>
NeuN.....	<i>Neuronal nuclei</i>
NMDA .....	<i>N-Methyl-D-Aspartat</i>
Nos2.....	<i>Nitric Oxide Synthase 2</i>
OFT.....	<i>Open Field Test</i>
Op .....	<i>Operation</i>
P. carinii .....	<i>Pneumocystis carinii</i>
PAMPS .....	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>

PBS.....	<i>Phosphat buffered saline</i>
PFA.....	<i>Paraformaldehyd</i>
Ppia.....	<i>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A</i>
prä-OP .....	<i>präoperativ</i>
PRR .....	<i>pattern recognition receptor</i>
PTE .....	<i>posttraumatische Epilepsie</i>
Ptgir.....	<i>Prostaglandin I2 Receptor</i>
qPCR .....	<i>quantitative Polymerasekettenreaktion</i>
RIN.....	<i>RNA Integrity Number</i>
RNA .....	<i>Ribonukleinsäure</i>
RNA-Seq.....	<i>RNA-Sequenzierung</i>
RNS .....	<i>reaktive Nitrogenspezies</i>
ROS .....	<i>reaktive Sauerstoffspezies</i>
rpm.....	<i>revolutions per minute</i>
RR.....	<i>Rotarod</i>
scRNA-seq.....	<i>Single-Cell RNA Sequencing</i>
SEM .....	<i>Standard error of the mean</i>
SHT.....	<i>Schädel-Hirn-Trauma</i>
SPF .....	<i>Spezifiziert pathogenfrei</i>
Spp1.....	<i>Osteopontin</i>
ssp.....	<i>Subspezies</i>
TARC .....	<i>Translational Animal Research Center</i>
TGF- $\beta$ .....	<i>transforming growth factor <math>\beta</math></i>
TNF- $\alpha$ .....	<i>Tumor-Nekrose-Faktor <math>\alpha</math></i>
Tnk1 .....	<i>Tyrosine Kinase Non Receptor 1</i>
Trim43a.....	<i>Tripartite Motif Containing 43</i>
TSPO .....	<i>Translokator Protein</i>
WT .....	<i>Wildtyp</i>
Ym1.....	<i>chitinase-like protein 3</i>
Zswim2.....	<i>Zinc Finger SWIM-Type Containing 2</i>

# 1. Literaturübersicht und Forschungsziel

## 1.1 Das Schädel-Hirn-Trauma (SHT)

### 1.1.1 Pathophysiologie des SHTs

Die Pathophysiologie des Schädel-Hirn-Traumas (SHT) lässt sich in den primären und den sekundären Schaden unterteilen. Diese beiden Phasen verlaufen zwar getrennt voneinander, bedingen sich aber trotzdem gegenseitig [1, 2]. Der primäre Schaden entsteht i.d.R. durch eine äußere Krafteinwirkung in Form eines Autounfalls, Sturz, Quetschungen oder ähnliches, die zu einer Verletzung des Hirngewebes führt [3]. Dabei werden Neuronen, Axone, Gliazellen und Blutgefäße gedehnt, geschert oder reißen. Dies führt zu einem neuronalen Zellverlust und nekrotischen Zelltod [4]. Die das Axon betreffende Schädigung durch Dehnung oder Riss wird als „Diffuse axonal injury“ (DAI) bezeichnet und kann in drei Grade klassifiziert werden, welche mit unterschiedlichem Ausgang des SHT assoziiert sind [5]. Durch Ruptur der Blutgefäße kann es zu Blutungen und Ergüsse kommen [6], die sich als subdurale, epidurale oder subarachnoidalen Hämatoome manifestieren können [7, 8]. Akute subdurale Hämatoome können im besonderen Maße gefährlich sein, weil sie in der Regel mit einer größeren Schädigung des Gehirns einhergehen [9]. Wird das Gehirn durch ein Hämatom akut und stark komprimiert ist eine Kraniotomie mit Ausräumung des Hämatoms von Nöten, um den Schaden einzudämmen [10]. Der primäre Schaden ist weder in der Human- noch in der Veterinärmedizin therapeutisch beeinflussbar [1, 3] und kann nur durch Präventionsmaßnahmen wie das Tragen eines Fahrradhelms oder Anlegen des Sicherheitsgurts im Straßenverkehr verhindert bzw. beeinflusst werden [11]. Therapeutische Interventionen fokussieren sich deshalb auf die Eindämmung des sekundären Schadens. Dieser bildet sich innerhalb von Sekunden bis Minuten nach dem eigentlichen Trauma aus und bringt eine Kaskade von Mechanismen in Gang, die sich bis zu Wochen, Monaten bzw. einem Jahr hinziehen [12]. Die damit einhergehenden Veränderungen auf biochemischer, metabolischer und physiologischer Ebene zeigt sich klinisch aber erst verspätet [1, 4]. Der Zusammenbruch der „blood-brain barrier“ (BBB) führt zu einer massiven Freisetzung von Neurotransmittern z.B. Glutamat. Ebenso versagen Glutamat Transporter, die unter physiologischen Bedingungen Glutamat aufnehmen. Glutamat wird deshalb unkontrolliert in den synaptischen Spalt freigesetzt und sorgt für Exzitotoxizität. NMDA und AMPA, welche Glutamat Rezeptoren sind, werden konstant aktiviert, was einen gesteigerten Influx von Calcium und Natrium zur Folge hat. Erhöhte Calcium-Spiegel in der Zelle sorgen für Aktivierung pro-apoptotischer Proteine, die letztlich den programmierten Zelltod auslösen [13]. Oxidativer Stress durch erhöhte Level von reaktiven Sauerstoff Spezies (ROS) sowie reaktiven Nitrogen Spezies (RNS) spielt ebenfalls zu Beginn des SHT eine Rolle. Normalerweise wird die Produktion dieser durch Antioxidantien strikt reguliert [14, 15]. Funktioniert diese

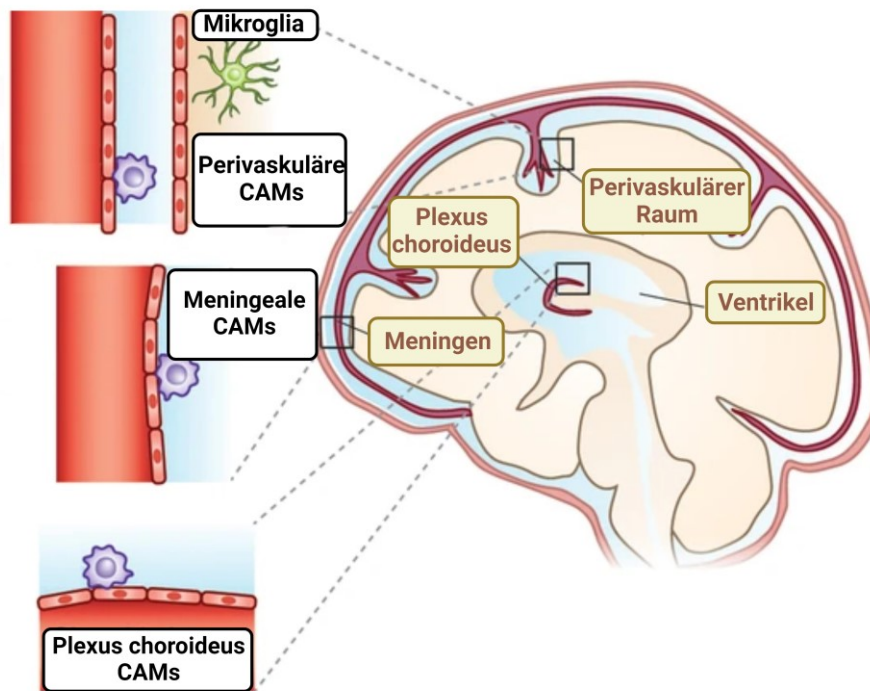
Regulation nicht mehr, werden sämtliche Strukturen wie z.B. Proteine und DNA, aber auch die Zellmembran von Mitochondrien angegriffen. Letzteres führt zum Zusammenbrechen der Adenosintriphosphat-Synthese (ATP). Pro-apoptotische Faktoren werden in Folge dessen freigesetzt und lösen den Zelltod aus [13]. Kontinuierliche Aktivierung von Membran-Pumpen zur Wiederherstellung der Ionen Homöostase resultiert in einem erhöhten Glukose Verbrauch, Erschöpfung der Energiespeicher, Einstrom von Calcium in die Zellen, veränderte oxidative Metabolisierung, Laktatproduktion und letztlich Azidose und Ödeme [16, 17]. Ödeme sorgen – zumindest bei einem geschlossenen SHT - durch ihre Tendenz zur Ausdehnung in der fest begrenzten Schädelhöhle für Druckerhöhung auf das verletzte, aber auch gesunde Hirngewebe. Es kommt zu Minderperfusion und Kolliquationsnekrosen [18].

Neuroinflammation tritt auch im Zuge des Sekundärschadens auf. Ein gewisses Maß an Inflammation ist nützlich und notwendig, um z.B. Zellfragmente zu phagozytieren, aber eine überschießende inflammatorische Antwort über längeren Zeitraum ist schädlich [19, 20]. Dies betrifft periphere Immunzellen, genauso wie die ortsansässigen Mikroglia. Sowohl durch den primären Insult als auch im Rahmen des sekundären Schadens werden „damage associated molecular patterns“ (DAMPs) freigesetzt. Hierzu gehören z.B. DNA, RNA, high mobility group box 1 (HMGB1) und andere. Als Reaktion werden Tumor-Nekrose-Faktor  $\alpha$  (TNF-  $\alpha$ ), Interleukin 6 (IL6) und Interleukin 1 $\beta$  (IL1 $\beta$ ) hoch reguliert, was Mikroglia und aus der Peripherie kommende Immunzellen anlockt. Periphere Immunzellen können erst nach Zusammenbruch der BBB das Gehirn migrieren. Dies geschieht durch Freisetzung von Matrix Metalloproteinase 9 (Mmp-9), welche die „tight junctions“ löst und somit die strukturelle Integrität zerstört [21]. Die ersten Zellen, welche als Reaktion auf das Trauma das Gehirn infiltrieren sind Neutrophile Granulozyten nach 24-48 h. Als nächstes werden Monozyten angelockt und verwandeln sich durch den Einfluss von Zytokinen in Gewebemakrophagen. Dendritische Zellen, T-Lymphozyten und natürliche Killerzellen werden ab dem dritten Tag nach dem initialen Trauma rekrutiert, allerdings in geringerer Anzahl als die anderen Zellen. Die Immunzellen im Gehirn sezernieren Prostaglandine, freie Radikale sowie proinflammatorische Zytokine, was wiederum eine erhöhte Produktion von Chemokinen in den ortsansässigen Gliazellen zur Folge hat. Dies befeuert die inflammatorische Antwort zusätzlich [22, 23]. Die Veränderung im Mikromilieu nehmen Mikroglia, die gewebespezifischen Makrophagen des Gehirns, ebenfalls wahr und reagieren in Form von Polarisation darauf. Früher ging die Wissenschaft von einer reinen M1- bzw. M2-Mikroglia-Aktivierung aus. Auch wenn dieses Konzept heute nicht mehr aktuell ist und mittlerweile eher von einem Hybrid- bzw. gemischten Phänotyp ausgegangen wird [20, 24, 25], möchte ich kurz darauf eingehen, da es grundsätzlich für das Verständnis hilfreich ist. M1- oder „klassisch“ aktivierte Mikroglia werden durch DAMPs, freie Radikale oder proinflammatorische Zytokine wie Interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) polarisiert und zeichnen sich durch die Sekretion proinflammatorischer Zytokine (IL-1 $\beta$ , IL-6,

TNF- $\alpha$ ), Chemokine (CCL5, CXCL10, CXCL12), ROS und einer reduzierten Phagozytoseaktivität aus [26, 27].

Auch wenn M1-Mikroglia häufig als schädlich beschrieben werden, können auch sie neuroprotektiv sein. Problematisch wird es erst dann, wenn eine Dysregulation vorliegt und eine überschießende oder verlängerte M1- Antwort vorliegt und einen hyperinflammatorischen Status hervorruft [28]. M2- oder „alternativ“ aktivierte Mikroglia nehmen ihren Phänotyp hingegen durch Interleukin 4 (IL-4), Interleukin 10 (IL-10), Interleukin 13 (IL-13) und transforming growth factor  $\beta$  (TGF-  $\beta$ ) an. Sie selbst können wiederum antiinflammatorische Zytokine (IL-4, IL-10, IL-13), Chemokine (CCL2, CCL17, CCL22) und neurotrophische Faktoren produzieren, die mit Neuroprotektion und Heilung assoziiert werden. M1-Mikroglia sind durch Expression folgender Oberflächenmarker charakterisiert, CD16/32, CD86, TNF- $\alpha$ , iNOS, MHC II, TSPO und IFN- $\gamma$ , während M2 sich durch CD206, Arg1, Ym1, Fizz1 und TGF- $\beta$  auf ihrer Oberfläche auszeichnen [29-32].

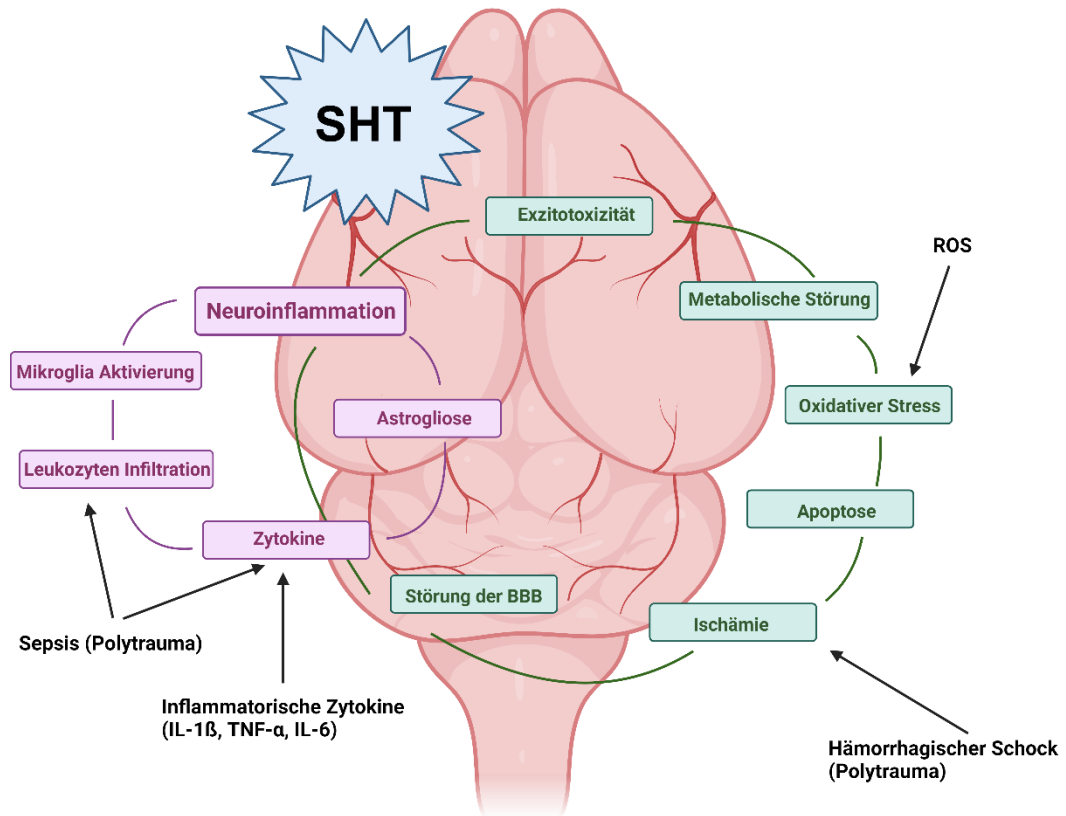
Neben den Mikroglia spielen Astrozyten eine wichtige Rolle im gesunden Gehirn als auch während des Inflammationsprozesses nach einem SHT. Durch Aufnahme neurotrophischer Faktoren können sie positiven Einfluss auf die Axon Regeneration haben und unterstützen das Langzeitüberleben von Neuronen durch Nährstoffzufuhr [33-35]. Weiterhin entfernen sie tote Zellen und formen im späteren Verlauf die Glanarbe um den verletzten Bereich. Während des Inflammationsprozesses vollziehen sie morphologische und funktionelle Adaptationen, die zu einer erhöhten Expression von „glial fibrillary acidic protein“ (GFAP) sowie Freisetzung von Chemo- und Zytokinen führt. Über den Anstieg von GFAP kann auf das Maß der Astrogliose geschlossen werden, welches ein Kennzeichen der SHT Pathologie ist [36]. Auch Astrozyten können ähnlich wie Mikroglia eine Polarisation in einen proinflammatorischen Typ A1 und in einen antiinflammatorischen Typ A2 vollziehen. Wie auch bei den proinflammatorisch aktivierten Mikroglia kann durch A1-Astrozyten eine dysregulierte Entzündungsreaktion auftreten [37]. Besonders in den letzten Jahren ist eine weitere Zellpopulation Stück für Stück mehr in den Fokus geraten. Hierbei handelt es sich um die so genannten „CNS-associated macrophages“ (CAMs) [38] bzw. „border-associated-macrophages“ (BAMs) [39]. Ins Deutsche übersetzt übersetzt wird, von ZNS- bzw. Grenzmembran-assoziierten Makrophagen gesprochen. Diese sind im ZNS in den nicht-parenchymalen Bereichen wie den *Meningen*, perivaskulären Räumen sowie dem *Plexus choroideus* anzutreffen (Abbildung 2).



**Abbildung 2: Lage der CAMs im Gehirn modifiziert nach Greter et al. [40]. CAMS = „CNS-associated macrophages“**

Auf ihrer Oberfläche exprimieren sie CD206 -auch bekannt als Mannose Rezeptor C-Typ 1 (MRC1) - und CD163, welche zur Identifikation dieser Zellen genutzt werden können [41, 42]. CAMs und Mikroglia zeigen zum Teil gleiche Genexpressionsprofile, weisen aber auch unterschiedliche und charakteristische Genexpressionsprofile auf. Die Funktion der CAMs scheint sich grundsätzlich zu unterscheiden – je nachdem in welchem Bereich des ZNS sie sich aufhalten. Zusammenfassend lässt sich aber sagen, dass sie eine Rolle in Bezug auf antivirale Immunabwehr, Trümmerbeseitigung und Reinigung des ZNS, erkennen von Entzündungssignalen sowie Rekrutierung peripherer Immunzellen, Aufrechterhaltung der ZNS Homöostase und der Liquorhomöostase, vor allem im Zusammenhang mit Entzündung spielen [43, 44]. Aufgrund der Ähnlichkeit zu Mikroglia und mit Blick auf die Funktionen ist anzunehmen, dass auch CAMs aktiviert werden können und mit anderen Zellen des ZNS Wechselwirkungen eingehen. Wie genau aber ihre Rolle im ZNS Inflammationsprozess aussieht, ist bislang nur unzureichend geklärt [45].

Abschließend lässt sich sagen, dass die Entzündungsreaktion und damit die SHT Pathologie zu beeinflussen im Zentrum zahlreicher vergangener und aktueller Forschungsvorhaben steht. Doch trotz intensiver Suche konnte bislang keine Monotherapie in klinischen Studien überzeugen, obgleich einige in experimentellen Tiermodellen vielversprechend erschienen [46].



**Abbildung 3: Pathophysiologie des SHTs (BioRender.com).**  
 BBB = „blood-brain-barrier“, IL = Interleukin, ROS = reaktive Sauerstoffspezies, SHT = Schädel-Hirn-Trauma, TNF- $\alpha$  = Tumornekrosefaktor- $\alpha$ .

### 1.1.2 SHT beim Menschen

Als SHT lässt sich eine inhomogene Gruppe von Gehirnverletzungen beschreiben, welche sich in Ursprung, Schweregrad, Pathogenese und klinischen Bild von Patient zu Patient unterscheidet [47].

Eine annäherungsweise Schätzung von Schädel-Hirn-Traumata pro Jahr liegt bei 69 Millionen Fällen weltweit [48]. In Deutschland erlitten z.B. im Jahr 2016 knapp 420.000 Menschen ein SHT [47, 49]. Da diese Schätzung bzw. Zählung aber nur Fälle mit einer Hospitalisierung einschließt, liegt die tatsächliche Zahl der SHTs sicherlich deutlich höher. Männer sind in der Regel häufiger als Frauen betroffen, wobei sich die Inzidenz mit zunehmendem Alter wieder annähert. Kinder und Jugendliche sind in etwa 30 % der Fälle betroffen. Aufgrund der physiologischen Anfälligkeit während des Wachstums besteht bei ihnen - im Gegensatz zu Erwachsenen – ein erhöhtes Risiko ein SHT zu erleiden [50]. Die Mortalität schwankt je nach Studie zwischen 1-5 % und ist regional unterschiedlich [51, 52]. Hauptsächlich sind Stürze, gefolgt von Verkehrsunfällen unterschiedlichster Art. Das SHT alleine oder mit seinen Folgeerkrankungen stellt eine Hauptursache für Tod, aber auch lebenslange Behinderung dar. Deshalb ist es sowohl medizinisch als auch sozioökonomisch ein Krankheitsbild mit hoher

Relevanz [49, 53]. Die Einteilung des SHT erfolgt entsprechend des klinischen Bildes und wird vor allem mit Hilfe des „Glasgow Coma Scale“ (GCS) beurteilt. Es werden verbale Reaktion sowie Reaktion der Augen und Motorik beurteilt, womit der Schweregrad des SHT schnell und einfach evaluiert werden kann. Der Score reicht von 3-15 Punkten, wobei 15 Punkte bei einem uneingeschränkten Bewusstsein erreicht werden. 13-15 entsprechen einem milden, 9-12 einem moderaten und  $\leq 8$  einem schweren SHT [54, 55]. Für Kinder gibt es eine modifizierte Variante des „Glasgow Coma Scale“ [56]. Zusätzlich kann der Schweregrad des SHT durch zahlreiche Bildgebungsverfahren, wie Computertomografie (CT), Magnetresonanztomografie (MRT) oder Doppler Sonografie bestimmt werden [50]. Gängige Symptome direkt nach einem Trauma sind Benommenheit, reduzierte Aufmerksamkeit, Kopfschmerzen, Amnesie, Übelkeit und je nach Schweregrad auch Koma.

Nicht nur das SHT mit den direkt auftretenden transienten Komplikationen ist problematisch, sondern auch die Langzeitfolgen, die damit einhergehen können. Selbst bei einem milden SHT können persistierende kognitive, neuropsychologische und somatische Funktionsstörungen noch mehrere Jahre nach dem Trauma auftreten bzw. persistieren [57, 58]. Chronisch traumatische Enzephalopathie (CTE) sowie chronisches postkonkussives Syndrom und chronische Hypophysitäre Defizienz sind bekannte SHT Folgeerkrankungen [59]. Gleichzeitig erhöht ein SHT das Risiko für eine Vielzahl neurologischer Erkrankungen wie Epilepsie, Schlaganfall und neurodegenerative Erkrankungen wie Alzheimer und Demenz [60].

### **1.1.3 SHT beim Tier**

#### **1.1.3.1 In der Tiermedizin**

Auch in der Tiermedizin ist das SHT ein häufig vorkommendes Krankheitsbild. Genaue Inzidenzzahlen, wie wir sie aus der Humanmedizin kennen, wären wünschenswert, sind aber leider kaum vorhanden. Wenige groß angelegte Studien bieten die Möglichkeit sich einen Überblick über die Häufigkeit von SHTs bei Tieren zu verschaffen. Etwa 35 % vorgestellter Hunde und Katzen in einer Tierklinik sind von einem SHT betroffen [61]. In einer anderen retrospektiv angelegten Studie mit Daten aus den Jahren 1997 – 2003 wurden 235 Hunde mit dem Vorstellungsgrund stumpfes Trauma näher untersucht. Hierbei zeigte sich, dass 25 % dieser Hunde Verletzungen des Kopfes aufwiesen. Eine weitere Tierklinik vermeldet im Rahmen einer dort angelegten Studie in den Jahren 1997 - 1999 290 Hunden und Katzen mit traumatischen Hirnverletzungen [62]. Zahlen für Großtiere, wie Pferde, sind noch rarer. 22 % der mit Funktionsstörung des ZNS eingelieferten Pferde in einer Klinik waren SHT bedingt. 75% dieser Pferde zeigten neurologische Defizite [63].

Die gängigsten Ursachen für ein SHT beim Kleintier sind Verkehrsunfälle, Stürze aus großer Höhe, physische (un-)gewollte Angriffe durch Menschen, andere Tiere bzw. Artgenossen,

Quetschungen, Schussverletzungen sowie Bissverletzungen [64, 65]. Bei Pferden und Wiederkäuern entstehen Schädelverletzungen dagegen eher durch Stürze im Zusammenhang mit Aufregung, Aufrichtversuchen und Tritten an den Kopf [66]. Was die Mortalitäts- bzw. Komplikationsrate angeht, ist die Datenlage ähnlich dünn wie bei den Inzidenzen. Die Angaben schwanken beim Kleintier von 9 % bis 30 % wobei euthanasierte Fälle eingerechnet sind [61, 67].

Auch in der Tiermedizin findet der „Glasgow Coma Scale“ als modifizierte Variante zur Evaluation von SHT Patienten Anwendung. Der so genannte „Modified Glasgow Coma Scale“ (MGCS) beinhaltet die Kategorien Motor Aktivität, Hirnstammreflexe und Bewusstseinslevel. Jede Kategorie beinhaltet sechs Abstufungen, die in einer Punkteanzahl von 1-6 ausgedrückt werden. Der Gesamtscore beläuft sich dementsprechend auf 3-18 Punkte. Auf Basis der Gesamtpunkte lässt sich das SHT in drei Kategorien mit entsprechend guter bzw. schlechter Prognose einteilen. 3-8 Punkte entspricht Score Kategorie I und ist i.d.R. mit einer infausten Prognose verbunden. 9-14 Punkte entsprechen der Score Kategorie II und einer vorsichtigen Prognose. 15-18 Punkte hingegen lassen sich der Score Kategorie III und einer guten Prognose zuordnen [68]. Die Überlebenswahrscheinlichkeit kann bei Hunden mit dem MGCS in den ersten 48 h nach dem Kopf-Trauma nahezu linear prognostiziert werden. So liegt die Überlebenswahrscheinlichkeit bei einem Score von 8 bei 50 % [69]. Gleichzeitig kann der MGCS nicht nur als prognostischer Marker genutzt werden, sondern auch zur objektiven Beurteilung des neurologischen Verlaufs von Hunden und Katzen mit SHT [3].

Als Langzeitfolgen bzw. Komplikationen sind in der Tiermedizin vor allem die posttraumatische Epilepsie (PTE) zu nennen. Die Prävalenz nach einem SHT ein PTE zu entwickeln, liegt bei 6,6 %. Sie steigt mit dem Schweregrad des SHTs, so dass Hunde, die ein SHT mit einer Schädelfraktur erlitten, in 14,3 % der Fälle eine PTE ausbildeten [70]. Andere Autoren geben das Risiko Krampfanfälle nach einem SHT zu entwickeln von 3,5 – 6,8 % bei Hunden bzw. 0 bis 5,6 % bei Katzen an. Wobei bei den Katzen keine Korrelation zwischen dem Schweregrad des Traumas und der Entwicklung einer Epilepsie festgestellt werden konnte [71, 72].

Zu den wichtigsten therapeutischen Maßnahmen von SHT Patienten gehört die Volumen- und Sauerstoffsubstitution. Denn sowohl eine Hypovolämie als auch die Hypoxie begünstigt den Anstieg des intrakraniellen Drucks (ICP), was unbedingt vermieden werden soll [73]. Die Sauerstoffsättigung sollte bei SHT Patienten >94 % betragen und der PaO<sub>2</sub> (arterielle Sauerstoffpartialdruck) > 80 mmHg, um eine ausreichende Perfusion des Gehirns zu erreichen [74]. Reichen Flüssigkeitssubstitution und Sauerstoffzufuhr nicht aus, um den Zustand entscheidend zu verbessern, kann durch Gabe von hyperosmolaren Flüssigkeiten wie 10 % Mannitol der intrakranielle Druck gesenkt werden [75] oder Omeprazol intravenös verabreicht werden, um die Liquorproduktion zu senken [74]. Gleichzeitig kann bei SHT Patienten eine Hyperglykämie auftreten, die zumindest bei Hunden, aber nicht bei Katzen, prognostische

Bedeutung hat. So sind erhöhte Glukosespiegel im Blut mit einer schlechteren Prognose assoziiert [76]. Krampfanfälle können nicht nur als Langzeitfolge eines SHT auftreten, sondern auch kurzzeitig nach dem Trauma. Diese sollten mit antikonklusiven Medikamenten, wie Phenobarbital und Diazepam therapiert werden [77]. Auch von erfolgreichen Therapieversuchen mit Hypothermie wird berichtet [78]. Unabhängig von bereits oben genannten Maßnahmen sollten betroffene Patienten zusätzlich eine ausbalancierte Analgesie z.B. in Form eines Fentanyl-Lidocain-Ketamin-Tropf, antiinflammatorische Medikamente, gastrointestinale Prophylaxe und angepasste Ernährung erhalten. Ebenfalls sind supportive Maßnahmen wie Kopfhochlagerung um 15-30 °, um eine Kompression der *Venae jugulares* zu verhindern, Blasenkontrolle, regelmäßiges Wenden und passive Bewegung der Extremitäten [74, 79] wichtig.

### **1.1.3.2 Bei Labornagern in Forschungsprojekten**

Um die Vorgänge nach einem SHT im Menschen zu replizieren, wurden im Laufe der Jahre eine Vielzahl von Tier-SHT-Modellen, vornehmlich an Ratten und Mäusen, entwickelt [80]. Unabhängig von der SHT Forschung spricht einiges für den Einsatz von Mäusen bzw. Ratten als Versuchstiere. So entspricht das Genom der Maus dem des Menschen zu 98%. Insbesondere gibt es große Ähnlichkeiten in Bezug auf das Nervensystem, was diese Tierart auf diesem Forschungsgebiet besonders geeignet macht [81]. Auch wenn wirtschaftliche Gründe – zumindest, bei zu Rate ziehen entsprechender deutscher Gesetze und die zu Grunde liegenden Richtlinien der europäischen Union (EU RL) - nicht zählen bzw. nicht zählen dürfen, so ist an dieser Stelle trotzdem zu erwähnen, dass der Haltungsaufwand und dementsprechend auch die Kosten für den Einsatz dieser Tierarten verhältnismäßig gering sind und so ihr Einsatz in den meisten Laboren dieser Welt möglich ist. Gleichzeitig zeichnen sich sowohl Ratte als auch Maus durch eine hohe Reproduktionsrate und somit schnelle Verfügbarkeit von Nachkommen aus. Des Weiteren gibt es durch genetische Manipulation die Möglichkeit Mäuse oder auch Ratten zu erwerben, welche ein bestimmtes Protein nicht exprimieren (Knock-out), überexprimieren oder sogar humane Proteine exprimieren (transgen), was sie für die Forschung zusätzlich interessant macht. Tiere kommen entweder klassisch als Versuchstiere in *in-vivo* Experimenten direkt zum Einsatz. Sie können aber auch die Quelle von tierischen Zellen sein, welche in *in-vitro* Experimenten verwendet werden. Letztere dienen z.B. der Untersuchung grundlegender Mechanismen oder Wirkung von Medikamenten. *In-vivo* Modelle bieten den großen Vorteil der Standardisier- und Reproduzierbarkeit sowie dem Einsatz von Kontrollgruppen gegenüber einer rein klinischen Studie. Bei allen bis jetzt genannten Vorteilen, muss aber auch festgestellt werden, dass die Übertragbarkeit von Erkenntnisgewinnen aus SHT-Tiermodell-Studien auf den Menschen

schwankt und teilweise völlig ungenügend ist [82]. Dies liegt unter anderem an unterschiedlichen anatomischen Begebenheiten sowie Unterschieden hinsichtlich der Neurogenese in Nagern und Menschen im adulten Gehirn, aber auch aufgrund der Tatsache, dass Menschen i.d.R. eine Kombination von fokaler und diffuser Verletzung erleiden und Tiermodelle entweder das Eine oder das Andere nachahmen [83, 84]. Dies bedingt, dass die aus Tiermodellstudien gewonnenen Erkenntnisse z.B. mit *In-vitro*-Modellen ergänzt sowie kritisch hinterfragt werden sollten [83], aber auch dass weiterhin nach neuen Tiermodellen gesucht wird, welche die heterogene Natur des SHTs beim Menschen besser nachahmen [85].

#### **1.1.4 SHT Modelle**

Im folgenden Abschnitt möchte ich näher auf die gängigen SHT-Modelle – vor allem in Maus und Ratte, aber auch im Großtier eingehen. Es wird zwischen fokalen, diffusen und gemischten bzw. Modellen ohne Aufprall unterschieden. Wie so oft hat jedes Modell Vor- und Nachteile und es gibt kein Modell, was alle pathophysiologischen Prozesse im menschlichen Gehirn nach einem Trauma zu 100 % abbilden kann [50]. Deshalb sollte stets zielgerichtet für den eigenen Forschungszweck das passende Modell genutzt werden. Wird im Zusammenhang mit SHT-Tiermodellen von „Sham“-Tieren gesprochen, so sind dies die scheinoperierten Kontrolltiere für die SHT-Gruppen. Sie werden in der Regel mit der gleichen Analgesie und den gleichen Anästhetika behandelt, erhalten aber Teile der Operation, die zur Induktion eines SHT notwendig sind, nicht. Rein optisch sollen sie nicht von den SHT-Tieren zu unterscheiden sein, damit ein verblindeter Vergleich mit den Tieren mit SHT möglich ist (näheres siehe 3.2.3).

##### **1.1.4.1 “Controlled Cortical Impact” (CCI) Modell**

Das CCI-Modell gehört zu den am häufigsten genutzten SHT Modellen. Auch in dem vorliegenden Forschungsvorhaben wurde es zur SHT Induktion angewendet. An dieser Stelle möchte ich kurz auf die grundsätzliche Methode und die Vor- bzw. Nachteile eingehen sowie zusätzlich auf die betroffenen Areale des Gehirns. Eine genaue Beschreibung der Methode selbst, wie sie in diesem Forschungsvorhaben durchgeführt wurde, folgt im Teil Material und Methoden. Das CCI-Modell führt zu einer fokalen Hirnschädigung sowie zu einem diffusen axonalen Schaden. Entwickelt wurde das Modell bereits vor über 30 Jahren [86]. Der Ablauf besteht grundsätzlich aus einer Anästhesie der Versuchstiere, gefolgt von einer *Kraniotomie* und dann dem Einschlag auf die *Kortikalis*, welcher mittels eines gesteuerten Impaktors an zuvor festgelegten Parametern durchgeführt wird [87]. Der Schweregrad des induzierten SHTs ist abhängig von der Geschwindigkeit des Aufpralls, der Eindringtiefe und Verweildauer sowie der Größe des Impaktors [88]. Angetrieben wird der Impaktor entweder pneumatisch oder

elektromagnetisch [89]. Besonders vorteilhaft ist dieses Modell dahingehend, dass für alle Tiere einer Kohorte die gleichen Parameter (Geschwindigkeit, Eindringtiefe, Verweildauer und Impaktorgröße) und der gleiche Aufprallort fest eingestellt werden können [90]. Weiterhin lässt es sich im Gegensatz zu allen anderen SHT Modellen über ein großes Spektrum von Tierarten anwenden. Hierzu gehören Ratten [91, 92] und Mäuse [93, 94], aber auch Schweine [95, 96], Frettchen [97] und Affen [98]. Als letzter und wohl wichtigster Punkt können mit Hilfe dieses Modells eine Vielzahl der Pathomechanismen nach einem SHT im Menschen abgebildet und dementsprechend auch untersucht werden [94, 99-102]. Problematisch dagegen ist, dass Hirnstammdeformationen nicht mit diesem Modell untersucht werden können. Zudem ist kein neurologisches Scoring direkt nach der Operation möglich [103], weil die Mäuse einige Zeit benötigen, um die Narkose vollständig auszuschlafen und wieder vollständig wach und orientiert zu sein.

#### **1.1.4.1.1 Beeinträchtigte Areale des Gehirns bei der Nutzung des „Controlled Cortical Impact Modells“ in unserem Labor**

##### 1.1.4.1.1.1 Der *Cortex cerebri*

Die Großhirnrinde ist die Neuronen-reiche äußere Schicht des *Telencephalons*. Die Neuronen der Großhirnrinde sind vor allem multipolar (ein Soma mit mehreren Dendriten). Histologisch lassen sich sechs Schichten von außen nach innen unterscheiden: Molekularschicht – Äußere Granularschicht – äußere Pyramidenschicht – Innere Körnerschicht – innere Pyramidenschicht – multifforme Schicht. Es bestehen sowohl charakteristische regionale Unterschiede, als auch tierartige, was diesen Aufbau anbelangt [104]. Makroskopisch besticht der *Cortex* bei unseren Haussäugetieren durch seine mit Windungen (*Gyri cerebri*) und Furchen (*Sulci cerebri*) versehene Oberfläche. Entwicklungsbiologisch lässt sich der *Cortex* in drei Abschnitte gliedern. Das *Paleo-*, *Archi-* und *Neopallium*. Das *Neopallium*, welches der entwicklungsgeschichtlich neueste Bereich ist, lässt sich weiter in Lappen (*Lobi cerebri*) gliedern, die hauptsächlich zur Orientierung dienen und je nach Autor nichts [104] oder etwas über deren funktionelle Bedeutung aussagt. Abhängig vom Autor unterscheidet sich ebenfalls die Anzahl. Im Stirnlappen (*Lobus frontalis*) sind im Wesentlichen motorische Areale lokalisiert, während im Scheitellappen (*Lobus parietalis*) somatosensorische Areale dominieren. Der Hinterhauptlappen (*Lobus occipitalis*) enthält die Sehrinde und der Schläfenlappen (*Lobus temporalis*) die Hörrinde [105].

Erkrankungen der Großhirnrinde können sich bei unseren Haussäugetieren z.B. in Form zentraler Blindheit, mangelnder Kontaktaufnahme mit der Umwelt und ziellosem Handeln äußern [106].

#### 1.1.4.1.1.2 Der *Hippocampus*

Der *Hippocampus* gehört rein anatomisch gesehen auch noch zur Großhirnrinde. Genauer gesagt, wird er dem *Archicortex* zugeordnet und liegt an der medialen Wand der Großhirnhemisphären [106, 107]. Er besteht aus drei Abschnitten: dem Ammonshorn (*Cornu ammonis*), dem *Gyrus dentatus* sowie dem *Subiculum*. Das Ammonshorn selbst lässt sich weiter in vier Bereiche: CA1-4 untergliedern [108].

Vom Menschen ist bekannt, dass der *Hippocampus* entscheidend an Lern- und Gedächtnisfunktionen beteiligt ist. Auch für die Haussäugetiere gilt, dass er Teil des limbischen Systems ist, welches eine Rolle bei emotionaler, viszeraler und endokriner Verarbeitung spielt [105].

Eine Sonderstellung nimmt der *Hippocampus* dahingehend ein, dass im Gegensatz zu anderen Bereichen des Gehirns lebenslang Neurogenese stattfindet [108]. Beeinträchtigungen der adulten Neurogenese z.B. im Alterungsprozess, aber auch im Rahmen von neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer stehen deshalb im Zentrum vieler aktueller Forschungsvorhaben [109].

#### 1.1.4.1.1.3 Der *Thalamus*

Der *Thalamus* ist dem *Hypothalamus* dorsal aufgelagert und gehört topographisch zum *Diencephalon*. Er bildet die Lateralwände des *Plexus choroideus ventriculi III*. Sowohl zur *Hypophyse* als auch zum limbischen System bestehen Verbindungen.

Der *Thalamus* ist eines der wichtigsten Bindeglieder zwischen der Peripherie und dem Großhirn. Außer für olfaktorische Erregungen stellt er die zentrale Umschaltstation dar. Weil alle Erregungen, die das Bewusstsein erreichen sollen, den *Thalamus* passieren müssen, wird er auch „Tor zum Bewusstsein genannt“. Zudem spielt er eine Rolle, wenn es um die Empfindungen von Schmerz, Unlust oder Wohlbefinden geht. Erkrankungen des *Thalamus* treten bei unseren Haussäugetieren selten auf und sind schwer zu lokalisieren [107]. Bei der Parkinson Erkrankung des Menschen hingegen ist eine der auffälligsten Veränderung in der Aktivität der thalamischen Neuronen in motorischen Schaltkreisen festzustellen [110].

#### 1.1.4.2 “Fluid percussion injury” (FPI) Modell

Das FPI-Modell ist ebenfalls ein häufig genutztes Modell, um die SHT Pathologie am Menschen zu erforschen [111]. Entwickelt wurde es in den 1980er Jahren und erst später auf Ratte und Maus übertragen [112]. Mit diesem Modell kann sowohl eine diffuse als auch gemischte Hirnverletzung hervorgerufen werden– je nachdem ob die Operation bzw. *Kraniotomie* an der Mittellinie (mFPI) oder 3,5 mm lateral von der Mittellinie (lFPI) durchgeführt wird. Zu den Stärken gehören die gute Justierbarkeit des Schweregrads des induzierten SHTs,

sowie die hohe Reproduzierbarkeit über die Grenzen des eigenen Labors hinaus. Als Schwächen sind vor allem die *Kraniotomie* sowie die fehlende Möglichkeit eines direkten post-op neurologischen Scorings zu erwähnen. Hinzu kommt die hohe Mortalität die durch Apnoe hervorgerufen werden kann [103].

Der Schaden wird durch einen etwa 20 Millisekunden andauernden Flüssigkeitsdruckimpuls hervorgerufen, der nach erfolgter *Kraniotomie* direkt auf die intakte *Dura mater* abgegeben wird [113]. Die Flüssigkeit (isotonische Kochsalzlösung) aus dem Flüssigkeitsreservoir wird in diesem Zuge ebenfalls in die Schädelhöhle injiziert, sodass es zu einem erhöhten intrakraniellen Druck kommt, aber auch zur kurzzeitiger Verschiebung und Verformung von Nervengewebe, subduralen Hämatom und kortikalen Kontusion im *frontoparietalen Cortex* [114]. Zur Induktion von SHTs unterschiedlichen Schweregrads kann der Pendelwinkel angehoben oder abgesenkt werden [115].

#### **1.1.4.3 Weitere gängige SHT Modelle beim Kleintier**

Auch das „Weight-drop acceleration injury“ Modell wird in Ratte und Maus bereits viele Jahrzehnte genutzt, um die Pathologie des SHT besser zu verstehen [116]. Hierbei tritt ein Gewicht, welches in einem Apparat kontrolliert fällt und durch die Schwerkraft beschleunigt wird, entweder auf die intakte *Dura* nach *Kraniotomie* oder auf den geschlossenen Schädel auf. Dieses Modell bzw. dessen Varianten können eingesetzt werden, um sowohl eine fokale als auch diffuse Gehirnverletzung hervorzurufen. Vorteilhaft ist die günstige sowie vor allem bei der geschlossenen Schädelkalotte, schnelle und einfache Durchführung und die Möglichkeit den Schweregrad anzupassen. Problematisch ist allerdings die hohe Todesrate durch Apnoe und/oder Schädelfrakturen und mangelnde Reproduzierbarkeit und damit schlechte Vergleichbarkeit [80, 103].

Das „Blast injury“ Modell ruft ein diffuses Trauma hervor und stellt am besten die Verletzungsmechanismen eines SHTs durch eine Explosion, wie sie oft Soldaten im Krieg erleben, dar. Als Tierarten kommen nicht nur Nager, sondern auch Schweine und Primaten zum Einsatz [117-119]. Unter Laborbedingungen wird der Schaden entweder durch Sprengstoffdetonation oder mit Hilfe von Druckluft induziert. Letzteres wird als so genanntes Stoßrohrmodell bezeichnet und wird häufiger angewendet. Hierbei sind die anästhesierten Versuchstiere fixiert und werden unter kontrollierten Bedingungen Druckluft aus einer Kompressorkammer entlang eines geschlossenen zylindrischen Metallrohrs ausgesetzt [80]. Eine spezielle Weste schützt *Thorax* und Teile des *Abdomens*. Die Verletzungen, die hierbei hervorgerufen werden, entstehen vor allem durch die Bewegung des Gehirns in der Schädelkalotte, ausgelöst durch die schnelle Rotation des Kopfes [120].

#### 1.1.4.4 Spezielle SHT Modelle am Großtier

Bis in die 1980er Jahre waren Nager nicht die favorisierten Versuchstiere, wenn es um SHT Forschung ging. Allen voran waren es ethische Gründe, die eine Abkehr von den Großtieren hin zu den Nagern brachten. Großtiere bieten zahlreiche Vorteile, die vermutlich eine größere Übertragbarkeit von Ergebnissen aus Tierstudien auf den Menschen mit sich bringen [121]. Hierzu gehört zum Beispiel, dass im Gegensatz zu Nagetieren die meisten größeren Tiere ebenfalls *gyrencephale* Gehirne besitzen. Die *Gyri* des Gehirns spielen eine Rolle bei der Bewegung des Gehirns in der Schädelhöhle im Zuge eines Traumas und sorgen für mehr Deformation als bei Gehirnen ohne *Gyri*. Auch die Größe des Hirns spielt eine entscheidende Rolle. Nagetiere können aufgrund ihres kleineren, *lissencephalen* Gehirns größere Winkelbeschleunigungskräfte tolerieren als größere Tiere mit einem *gyrencephalen* Gehirn. Dies liegt daran, dass Scherkräfte und Trägheitsbelastung mit der Gehirnmasse direkt zusammenhängen [122]. Zahlreiche weitere Gründe sprechen also auch für den künftigen Einsatz von größeren Tieren bei SHT Studien. Ein genauerer Blick zeigt, dass vor allem Schweine, wie auch bereits oben bei den entsprechenden Modellen erwähnt, häufiger eingesetzt werden. Insbesondere für pädiatrische SHT Versuche eignen sich Ferkel besonders gut. Sie weisen nicht nur eine vergleichbare Größe und ein vergleichbares Gewicht des Gehirns auf, sondern zeigen auch einen ähnlichen Grad an *Myelinisierung* und ähnlichen Liquorgehalt wie das menschliche, juvenile Gehirn [123, 124]. Gängige Modelle, die beim Großtier Anwendung finden, sind das CCI- und das FPI-Modell.

Ein besonderes SHT Forschungsgebiet bei dem Großtiere – hauptsächlich Wiederkäuer [125-127] - eingesetzt werden, ist zudem die Betäubung vor Schlachtung. Hier geht es aber nicht um Erforschung der Pathophysiologie des Traumas selbst, sondern viel mehr um tierwohl- und tierschutzgerechte Betäubung vor Tötung durch Blutentzug [128]. Hierbei werden zwei Varianten von Bolzenschussgeräten eingesetzt. Unterschieden wird zwischen einer penetrierenden und einer nicht-penetrierenden Variante. Bei der penetrierenden Variante handelt es sich um einen Bolzen, der das Gehirn schwer und irreversibel schädigt, indem er auf das Schädeldach aufschlägt und dieses durchdringt. Im Gegensatz hierzu wird bei der Tötung durch einen nicht penetrierenden Bolzenschuss das Schädeldach nicht durchdrungen. Bei Verwendung dieser Methode ist insbesondere darauf zu achten, dass Stirnbeinfrakturen vermieden werden. Weiterhin gibt es Restriktionen bei dieser Methode was das Lebendgewicht von z.B. Wiederkäuern angeht [129].

### **1.1.5 Geschlechtsspezifische Unterschiede des SHTs bei Menschen und Versuchstieren**

Bei Betrachtung von Metaanalysen der letzten Jahrzehnte, so fällt auf, dass Männer gegenüber Frauen 3-bis 4-mal häufiger von einem SHT betroffen sind [130, 131]. Dies liegt vermutlich an der Tatsache, dass Männer zum einen in gefährlicheren Jobs arbeiten, aber zum anderen auch risikobereiter sind als Frauen [132]. In jüngeren Jahren liegt die Inzidenz bei Männern ein SHT zu erleiden höher als bei Frauen [130]. Dieser Unterschied verliert sich ab einem Alter von 65 Jahren [133]. Ergänzend wird von einer 3-mal höheren Todesrate bei Männern nach einem SHT gegenüber Frauen berichtet [134].

Geschlechtsspezifische Unterschiede rücken deshalb zunehmend in den Fokus der SHT Forschung [135, 136]. Trotz alledem werden vermehrt in der präklinischen Forschung, aber auch in klinischen Studien weiterhin nicht immer beide Geschlechter zu gleichen Anteilen verwendet oder zum Teil auch gar keine Information zum verwendeten Geschlecht der Versuchstiere angegeben [132, 137]. Die Literatur hinsichtlich geschlechtsspezifischer Unterschiede im Rahmen des SHT beim Menschen ist kontrovers. Zum einen wird berichtet, dass Frauen signifikant weniger Komplikationen nach moderaten bis schweren SHTs haben [132, 138] und in der Regel eine bessere Prognose, was die Heilung angeht [139, 140]. Auf der anderen Seite gibt es zahlreiche Studien die vom Gegenteil berichten. Einige Studien zeigen, dass Frauen bei einem milden bis moderaten, aber auch moderaten bis schweren SHT [132, 141] einen generell schlechteren Heilungsverlauf haben [142] und initial nach dem Trauma mit stärkeren und länger anhaltenden Symptomen zu kämpfen haben [143, 144]. Wiederum andere Autoren berichten von keinen markanten Unterschieden hinsichtlich des Verlaufs und der Heilung, aber von kleineren Unterschieden, die zum Beispiel die Symptome direkt nach dem Trauma betreffen [145].

Ein kontroverses Bild zeigt sich auch, wenn Studien bezüglich geschlechtsspezifischer Unterschiede an Versuchstieren verglichen werden. Dies liegt zum einen daran, dass je nach untersuchten Parametern (z.B. Verhalten, Inflammation, Neurodegeneration) bzw. Subparametern (z.B. Zelltod, Ödem, nekrotische Neuronen) auch innerhalb einer Studie unterschiedliche Ergebnisse erzielt wurden und zum anderen auch daran, dass das angewandte SHT Modell die Untersuchungszeitpunkte sowie die Überlebensdauer der Versuchstiere, die Stämme bzw. teilweise auch die Art der Versuchstiere sich unterscheiden und somit einen Vergleich erschwert.

Während einige Autoren ein geringeres Maß an Neurodegeneration bei weiblichen Mäusen oder Ratten nach SHT feststellten [146-148], gibt es gleichzeitig eine Studie, die von positiven Effekten bei männlichen Mäusen berichtet [149] und wiederum zahlreiche Studien, die keinerlei Unterschiede zwischen den Geschlechtern feststellen konnten [150-152]. Dennoch

scheinen die Beweise zugunsten einer schützenden Rolle von Östrogen zu tendieren [132, 137].

Bis jetzt sind die zugrundeliegenden Mechanismen der geschlechtsspezifischen Unterschiede nur teilweise aufgeklärt. Dies liegt vermutlich an den zahlreichen Einflussfaktoren wie Sexualhormonen, Geschlechtschromosomen und Interaktion der Immunzellen mit den Sexualhormonen [153, 154]. Makrophagen und auch Mikroglia wurden als geschlechtsspezifische Immunzellen im Gehirn beschrieben [155]. Auch ohne SHT Pathologie weisen Mikroglia bereits eine große Anzahl geschlechtsspezifischer Unterschiede hinsichtlich ihrer Morphologie, ihres Transkriptoms und ihrer Proteomik auf. Diese Eigenschaften könnten z.B. dazu beitragen, dass weibliche Mikroglia einen Vorteil haben Umweltveränderungen wie sie durch das SHT ausgelöst werden, wahrzunehmen und so schneller einzugreifen, um die Homöostase des Gehirns auch unter pathologischen Begebenheiten wiederherzustellen bzw. aufrecht zu erhalten [156-158].

Basierend auf den bereits vorliegenden Erkenntnissen und dem Bedarf an weiteren geschlechtsvergleichenden SHT Studien wurden die Ergebnisse dieses Forschungsvorhabens größtenteils getrenntgeschlechtlich ausgewertet.

## **1.2 Vermutliche Schlüsselmoleküle bei der pro- und antiinflammatorischen Antwort im Gehirn**

Wie bereits unter 1.1.1 beschrieben, handelt es sich bei der Pathophysiologie des SHTs um ein komplexes Zusammenspiel, an dem zahlreiche Zelltypen beteiligt sind. Die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen sind bislang nur unzureichend aufgeklärt. Bereits bekannt ist aber, dass die Inflammationsantwort einen hohen Stellenwert einnimmt bzw. zentrale Bedeutung hat. Besonders Makrophagen und Mikroglia spielen als Zelltypen in der akuten Inflammationsantwort des Körpers eine Rolle. Zu ihren Aufgaben gehören neben der Antigenpräsentation auch die Phagozytose [159-161]. Beide Prozesse sind wichtig für die Wundheilung und Wiederherstellung der Homöostase im Gehirn nach Trauma [162]. Um diese durchführen zu können, sind insbesondere Liganden-Rezeptor-Interaktionen von Bedeutung. Es gibt eine Vielzahl solcher Rezeptoren, die auch als Schlüsselmoleküle bezeichnet werden können. Zum Teil können diese bereits funktionell assoziiert werden. Dies gilt vor allem für die proinflammatorischen Rezeptoren, wie Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor, Toll-like-Rezeptor 4 und Interleukin-1-Rezeptor Typ 1 [163-166]. Bei Betrachtung der antiinflammatorischen Rezeptoren ist hingegen bislang keine funktionelle Assoziation möglich. Von den antiinflammatorischen Rezeptoren hat vor allem der Mannose Rezeptor C-Typ I als Marker für antiinflammatorisch polarisierte Makrophagen und Mikroglia [29, 167, 168] in den letzten Jahren Bedeutung erlangt. Es schien aufgrund der aktuellen Literatur vielversprechend, die

funktionelle Bedeutung dieses Rezeptors im Zusammenhang mit einem SHT näher zu untersuchen. In den nachfolgenden Abschnitten ist zunächst allerdings bereits Bekanntes über den Mannose Rezeptor C-Typ I beschrieben.

## **1.2.1 Mannose Rezeptor C-Typ I (MRC1)**

### **1.2.1.1 Allgemeines**

MRC1, auch als CD206 bezeichnet, gehört zur Familie der Mannose Rezeptoren, was wiederum eine Untergruppe der C-Typ-Lectin Superfamilie ist. MRC1 wurde in den späten 1970er Jahren als erstes auf *alveolaren* Makrophagen von Kaninchen entdeckt und ist ein Typ I gebundenes Membranprotein mit einem molekularen Gewicht von 175 kDA. Zusammengesetzt ist das komplexe Molekül aus mehreren extrazellulären Domänen, einem transmembranen Segment, sowie einer kurzen zytosolischen Region. Die extrazelluläre Domäne besteht wiederum aus einer N-terminalen Cystin-reichen Domäne, einer Fibronectin Typ II (FNII) Domäne sowie acht C-Typ Lektin Domänen (CTLDs) [169-171]. MRC1 kann Antigene aufnehmen und für die Präsentation an seiner Oberfläche prozessieren. Als „pattern recognition receptor“ (PRR) fungiert er sowohl für „Pathogen-associated molecular patterns“ (PAMPS) als auch „damage-associated molecular patterns“ (DAMPs) [171]. Zu den Pathogenen, die der Rezeptor mittels der auf den Mikroorganismen exprimierten Mannose bindet, gehören unter anderem *Candida albicans*, *Leishmania ssp.*, *Mycobacterium tuberculosis* und *Dengue Virus* [172-175].

Der Rezeptor wird im ZNS vor allem auf Makrophagen – genauer gesagt CAMs - und dendritischen Zellen exprimiert, befindet sich aber auf einer Vielzahl von Endothelzellen [176, 177]. Der Rezeptor kann nicht nur membrangebunden, sondern auch als lösliches Protein vorliegen. Durch Beteiligung von Matrix-Metalloprotease wird die lösliche Form des MRC1 aus der Membran freigesetzt. Diese Form kann sulfurierte und mannosylierte Kohlenhydrate erkennen [174].

### **1.2.1.2 Funktionen des MRC1 im Detail**

MRC1 ist ein sehr effizienter endozytotischer Rezeptor, der stetig zwischen der Plasmamembran und dem frühen endosomalen Kompartiment recycelt [171]. Dies geschieht auch in Abwesenheit eines Liganden [169].

Bindet ein Ligand an MRC1 erfolgt die Clathrin-abhängige Internalisierung, die durch das FENTLY-Motiv im zytoplasmatischen Rest des Rezeptors vermittelt wird. Anschließend findet der Transport in das frühe Endosom statt. Vermutlich wird dort durch eine Erniedrigung des

pH-Werts die Ligandenfreisetzung induziert und der leere Rezeptor wieder an die Zelloberfläche zurückgeführt [171].

Die intrazelluläre Route, der die internalisierten Antigene nun zugeführt werden, hat entscheidenden Einfluss auf die anschließende Antigenpräsentation [169]. Material, welches durch eine Antigen-präsentierende Zellen (APC) endozytiert wurde, wird dem endozytotischen Prozess zugeführt. Dieser besteht aus dem frühen und späten Endosom sowie dem Lysosom. Das internalisierte Material wird letztlich durch das saure Milieu in kleine Oligopeptide zersetzt, die geeignet sind, um durch MHC-II-Moleküle präsentiert zu werden. Endogene Proteine werden hingegen über den zytosolischen Weg verarbeitet. Die daraus resultierenden Peptide werden zum endoplasmatischen Retikulum transportiert und sind mit MHC-I-Molekülen assoziiert [178]. Auch ist eine Antigen-Kreuzpräsentation, die wohl am bedeutsamsten bei Makrophagen und dendritischen Zellen ist, mit anschließender Stimulation von CD8<sup>+</sup> T-Zellen möglich. Hierbei entgehen spezielle extrazelluläre Antigene der lysosomalen Zersetzung und werden anschließend über MHCI-Moleküle präsentiert [179]. Dies ist vor allem bei der Abwehr von Tumoren und Viren wichtig [178]. Neben seiner endozytotischen Funktion fungiert der MRC1, wie unter 1.2.1.1 erwähnt, auch als Phagozytose Rezeptor für bestimmte Pathogene, z.B. Mykobakterien [180].

Außerdem scheint der Rezeptor eine Rolle bei der gezielten Makrophagen Infiltration zu spielen [171], denn seine Abwesenheit führt zu einer nicht zielgerichteten Infiltration von myeloiden Zellen in der mit *Pneumocystis carinii* (*P. carinii*) infizierten Lunge von MRC1-Knock-out Tieren [181]. Unabhängig davon kann der MRC1 die Genexpression, welche z.B. in einer Zytokinsekretion resultiert, modulieren. Dies ist allerdings nur in Zusammenarbeit mit anderen Rezeptoren (z.B. Toll-like Rezeptor) möglich, welche die Signalkaskade aktivieren. So sorgt die Koexpression von Toll-like Rezeptor 2 und MRC1 für eine IL-8 Produktion als Reaktion auf eine *P. carinii* Infektion der Lunge [182].

### 1.2.1.3 MRC1 im postnatalen Gehirn

Der MRC1 findet sich bereits im frühen postnatalen Stadium (P0) in seiner membrangebundenen, aber auch löslichen Form im murinen Gehirn. Zu diesem Zeitpunkt ist der Rezeptor in den meisten Gehirnregionen vorhanden. Allen voran exprimieren die *Meningen*, die Großhirnrinde, der Hirnstamm, der *Hippocampus*, aber auch das *Cerebellum* den MRC1. Im Laufe der postnatalen Entwicklung nimmt die Expression ab. Die größte Abnahme erfolgt 1-2 Wochen nach der Geburt. Im späteren postnatalen Gehirn (P14) ist der Rezeptor regionsabhängig unterschiedlich hoch exprimiert und ähnelt sehr stark dem Zustand von adulten Tieren. Die größte Expression ist in diesem Entwicklungsstadium im Hirnstamm, in oberen Schichten der Großhirnrinde und Kernen des Hypothalamus und dem *Pedunculus*

*olfactorius* feststellbar. Zu den Zellen, die den MRC1 im postnatalen Gehirn exprimieren, gehören Astrozyten, vor allem im Parenchym, aber auch in perivaskulären Bereich sowie *meningeale* und *perivaskuläre* Makrophagen und Mikroglia, als auch *Purkinje*-Zellen, die zu den Neuronen gehören [183]. Während der Entwicklung des Gehirns ist der MRC1 in Synaptogenese, Kollateralgefäßbildung [184] und Auswuchs von *cerebellären* Neuronen [185] involviert.

#### **1.2.1.4 MRC1 im adulten Gehirn**

Der MRC1 wird im adulten Gehirn auf *perivaskulären* Mikroglia und wie bereits oben erwähnt auf CAMs exprimiert [177, 186]. Überraschender Weise exprimieren auch Astrozyten trotz ihres *neuroektodermalen* Ursprungs den MRC1 im frühen postnatalen, aber auch adulten Gehirn [183]. Gegenüber dem postnatalen Stadium liegt die Expression im gesunden, adulten Gehirn nur noch bei 20 % [183]. Auf den Hirnhäuten, der Großhirnrinde und dem Hirnstamm befindet sich der Rezeptor am zahlreichsten. Reguliert werden die Expression und die Aktivität des Rezeptors zelltypunabhängig durch pro- und antiinflammatorische Chemo- und Zytokine. Zu seinen Funktionen gehört im Gehirn einerseits die Pinozytose und andererseits die Phagozytose. Besonders Makrophagen nehmen über den Rezeptor, wie bereits unter Punkt 1.2.1.1 näher erläutert, eine Vielzahl von Pathogenen auf. Neben Makrophagen sind auch Mikroglia entscheidend am Phagozytoseprozess über den MRC1 beteiligt [168].

Genauere Signalwege, die zur Mannose-Rezeptor medierten Endozytose führen, sind bislang unklar. Bekannt ist aber, dass Zellen durch den Endozytoseprozess aktiviert werden können und dies in einer Freisetzung von Zytokinen resultieren kann [187]. Makrophagen setzen ebenso wie Mikroglia reaktive Sauerstoffspezies, reaktive Stickoxide und verschiedene Zytokine frei [187-189].

All diese Prozesse gemeinsam deuten gemeinsam darauf hin, dass dem Rezeptor eine wichtige Rolle in der Immunabwehr des Gehirns zukommt [190].

Zudem gibt es Hinweise, dass MRC1 eine Rolle bei der Anti-Tumor-Antwort im Gehirn spielt. So exprimieren Gliomzellen auf ihrer Oberfläche mannosylierte Proteine [191], die als tumorspezifische Antikörper dienen können, weil gesunde eukaryotischen Zellen solche Proteine nicht exprimieren. Mikroglia können diese Liganden über den Mannoserezeptor erkennen und Zytokine wie IL-12, TNF- $\alpha$  und ROS freisetzen, welche dem Tumorwachstum entgegenwirken [192]. Des Weiteren setzen Gliome, wie auch andere Tumore, Proteasen wie Cathepsin D [193] und t-PA [194] frei, um Wirtsgewebe leichter zu infiltrieren [195]. Beides sind Liganden für den Mannose-Rezeptor [196]. Astrozyten und Mikroglia können diese Proteasen über den Mannoserezeptor binden und so die Tumordinvasion – zumindest teilweise – hemmen [190]. In einer anderen Studie zeigte sich, dass eine höhere Anzahl an CD68-, CD163- und

CD206-positiven Zellen im Tumorgewebe mit einer erhöhten Überlebensrate der Patienten verbunden war [197]. Unterstrichen wird die Rolle in der Anti-Tumor Antwort im Gehirn durch die aktive Freisetzung von immunsuppressiven Substanzen aus Gliomzellen, um zellvermittelte Immunität, bei der auch der Mannoserezeptor eine Rolle spielt, negativ beeinträchtigen [198].

#### **1.2.1.5 MRC1 in Zusammenhang mit SHT**

Bislang wurde die funktionelle Relevanz des MRC1 auf die Pathophysiologie des SHTs nicht untersucht, wohl aber die (regionale) Expressionsregulation nach SHT im Gehirn. Im gesunden Gehirn des Menschen wird MRC1 – unabhängig von der Gehirnregion – auf niedrigen Level exprimiert. Im Verlaufe eines SHTs beim Menschen verändert sich die Anzahl CD206<sup>+</sup> Zellen mit zunehmender Überlebenszeit. In der akuten Phase erfolgt zwar ein initialer Anstieg von Zellen, die CD206 exprimieren, wobei dieser weder im *Cortex*, *Pons*, *Cerebellum* noch *Substantia alba* signifikant ist. In der subakuten Phase verbleibt die Expression auf diesem Niveau. Erst drei Tage nach dem Trauma erfolgt ein signifikanter Anstieg in allen vier o.g. Hirnregionen [199]. Bisher unveröffentlichte Daten aus unserem Labor zeigen ebenfalls einen initialen, zunächst nicht signifikanten Anstieg von CD206<sup>+</sup> Zellen im murinen Gehirn am ersten Tag nach dem SHT. Dieser geht in einen prominenten und ab diesem Zeitpunkt auch signifikanten Anstieg ab Tag 3 nach SHT über. Bis 7 Tage nach dem Trauma verbleibt die Expression dann etwa auf gleich hohem Niveau. Ansari et al. untersuchte zwar lediglich die CD206 Expression in den ersten 24 h nach einem SHT im ipsilateralen *Hippocampus* von Ratten, doch auch seine Ergebnisse unterstreichen, dass der relevante Anstieg erst im späteren Verlauf erfolgt, wenn der M1-Phänotyp bereits wieder abnimmt [200]. Ergänzend lässt sich sagen, dass die CD206 Expression im *Striatum* im Verlauf des Traumas bis zu Tag 14 weiter abnimmt und sich dem prä-Trauma Niveau wieder annähert.

Wenig Daten liegen zur genauen Gehirnlokalisation dieser Zellen vor. Zhang et al. berichtet von einer Akkumulation CD206- sowie CD163-positiver Zellen im Bereich der Läsion selbst [201]. Andere Autoren konnten ebenfalls mittels immunhistochemischer Untersuchungen zeigen, dass 3 Tage nach einem SHT ein signifikanter Anstieg CD206-positiver Zellen im *ipsilateralen Cortex* und *Striatum* stattfindet, der an Tag 5 seinen Höhepunkt erreicht. Weitere 9 Tage vergehen bis das Ausgangsniveau wieder erreicht wird. Im *ipsilateralen Corpus callosum* wird der Höhepunkt der Expression bereits an Tag 3 erreicht. Interessanterweise reagiert auch das *kontralaterale Corpus callosum* mit einem signifikanten, wenn auch nur geringfügigen Anstieg von CD206-positiven Zellen auf das Trauma [202].

Zusammenfassend deutet dies daraufhin, dass die MRC1 Expression auf Makrophagen und Mikroglia potenziell relevant für die Immunabwehr durch Antigen-Präsentation, Phagozytose

und Immunhomöostase ist. Tatsächlich wurden aber zur Funktion des Rezeptors während der pathophysiologischen Vorgänge im Gehirn nach SHT noch keine Daten veröffentlicht.

### **1.3 Ziel des vorliegenden Forschungsprojekts**

Trotz zahlreichen Forschungsvorhaben, die sich mit der Pathophysiologie des SHTs, hauptsächlich aber therapeutischen Interventionen beschäftigt haben, gibt es nach wie vor keine adäquate Therapie, die zum gewünschten Heilungserfolg führt [203, 204]. Der MRC1 wird von zahlreichen Autoren immer wieder als antiinflammatorischer Marker beschrieben [197, 205]. Andere Autoren berichten sogar, dass MRC1<sup>+</sup>-Zellen die Neuroinflammation aktiv verhindern [167]. Im Zusammenhang mit einem SHT wurde der Rezeptor selbst bislang wenig bis gar nicht erforscht. Ziel dieser Arbeit war es deshalb, mehr über die Rolle des MRC1 im Zusammenhang mit der Pathophysiologie eines SHTs herauszufinden. Die dieser Arbeit zugrundeliegende Hypothese war, dass MRC1 antiinflammatorische Funktionen nach SHT ausübt. Um diese Hypothese zu testen, wurden MRC1-defiziente Mäuse und Wild-Typ Wurfgeschwister einem experimentellem SHT mittels „Controlled Cortical Impact“ unterzogen, verhaltensbiologisch als auch histopathologisch und molekularpathologisch zu einem frühen oder späten Zeitpunkt nach SHT (5 d oder 30 d post Trauma) untersucht.

Dementsprechend erhielten insgesamt 88 MRC1-Wildtyp- und -Knock-out-Mäuse ein Controlled Cortical Impact bzw. eine entsprechende Scheinoperation („Sham“-Operation).

## 2 Material

### 2.1 Geräte

**Tabelle 1: Zusammenfassung verwendeter Geräte inklusive Hersteller.**

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent; Waldbronn, DE
Axiocam 105 color	Carl Zeiss Microscopy GmbH; Oberkochen, DE
BioPhotometer Nanovue	Eppendorf AG; Hamburg, DE
BZ-X-800 Fluoreszenzmikroskop	Keyence, Ōsaka, JP
CCI-Impactor Model #39463923	Leica; Richmond, USA
Cryostar™ NX70 Kryostat	Thermo Fisher Scientific, Walldorf, DE
Uni-Drive N Mikrobohrer	Paggen, Starnberg, DE
„Elevated Plus Maze“	Eigenbau
Heizblock ThermoMixer TM Comfort	Eppendorf AG; Hamburg, DE
Homeothermic Monitoring System Thermostar 69027	RWD, TX, USA
Inkubator Babytherm IC8000	Dräger, Lübeck, DE
Kamera für Ethovision System 106588-10	Basler AG, Ahrensburg, DE
LightCycler® 480	Roche Diagnostics; Mannheim, DE
Magnetrührer IKAMAG® RET	Fischer Scientific GmbH, Schwerte, DE
Mastercycler Gradient	Eppendorf AG; Hamburg, DE
Mastermill MM300	Microtrac Retsch GmbH, Haan, DE
Megafuge 1.0 Zentrifuge	Heraeus Holding GmbH; Hanau, DE
MicroStar 17R Zentrifuge	VWR International GmbH; Darmstadt, DE
MikroCuvette G1.0	Eppendorf AG; Hamburg, DE
Mikrozentrifuge Mini Star Silverline	VWR International GmbH; Darmstadt, DE
Nanovue Spectrophotometer	GE Healthcare, Illinois, USA
Ohrlochzange	Zoonlab; Castrop-Rauxel, DE
„Open Field Arena“ 40x40	Noldus; Wageningen, NL
„Open Field“ Boden, schwarz, 40x40	Noldus; Wageningen, NL
Operations-Mikroskop Technoskop OPMI 1-FC 459909	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Oberkochen, DE
Photometer Glomax	Promega GmbH; Mannheim, DE
Pipetten (verschiedene Größen)	Eppendorf AG; Hamburg, DE

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
Plattformschüttler Unimax 2010	Heidolph Instruments GmbH & Co KG, Schwabach, DE
P-touch D600 Beschriftungsgerät	Brother International GmbH, Bad Vilbel, DE
Qubit 2.0 Fluorometer	Thermo Fisher Scientific; Walldorf, DE
Rota-Rod LE8200	Panlab Harvard Apparatus; Cornella, ES
Stemi 305 Stereomikroskop	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Oberkochen, DE
Stereotaktischer Rahmen	Kopf Instruments; Tujunga, CA, USA
Temperatursonde Physitemp BAT-12	Physitemp; New Jersey, USA
Tierhaltungsschrank, UniProtect THF 3378-V02	Bioscape, Castrop-Rauxel, DE
Tischwaage DIPSE TP-2000	SSR Produkt GmbH & Co KG; Oldenburg, DE
Ultraschall Luftbefeuchter BH-860E	Honeywell, Offenbach am Main, DE
Vapor 19.3 Isofluran	Drägerwerk AG; Lübeck, DE
Vortex Reax control	Heidolph Instruments GmbH & Co KG, Schwabach, DE
Wasserbad 1086	LAUDA-GFL GmbH; Lauda-Königshofen, DE
Zentrifuge 5804R	Eppendorf AG; Hamburg, DE

## 2.2 Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 2: Zusammenfassung verwendeter Verbrauchsmaterialien inklusive Hersteller.**

<b>Verbrauchsmaterial</b>	<b>Hersteller</b>
Aqua sterile Ampuwa®	Fresenius Kabi AG, Bad Homburg, DE
BD Microfine 0,5 ml	Becton Dickinson and Company, NJ, USA
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich; St. Louis, USA
Chloroform	Sigma-Aldrich; St. Louis, USA
Collection tubes (2 ml)	Qiagen GmbH; Hilden, DE
Dako-Pen	Dako North America, Inc.; Carpinteria, CA, USA
Deckgläser	Diagonal GmbH & Co KG, Münster, DE
Einstreu Lignocel® FS14	J.Rettenmaier & Söhne GmbH & Co KG; Rosenberg, DE
Entellan Eindeckmedium	Merck KGaA; Darmstadt, DE

<b>Verbrauchsmaterial</b>	<b>Hersteller</b>
Epredia™ Richard-Allan Scientific™ Neg-50™ Gefrierschnittmedium	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Ethanol 100 %	Honeywell International Inc.; Muskegon, MI, USA
Ethanol 70 %	Honeywell International Inc.; Muskegon, MI, USA
Ethanol 80 %	Honeywell International Inc.; Muskegon, MI, USA
Ethanol 96 %	Honeywell International Inc.; Muskegon, MI, USA
„Falcon®“ (25 ml + 50 ml)	Greier Bio-One GmbH, Kremsmünster, OE
Flüssiger Stickstoff	Air Liquide S.A.; Düsseldorf, DE
Holzwattestäbchen 15 cm	WIROS Wilfried Rosbach GmbH, Willich, DE
Immu-Mount®	Thermo Scientific, Thermo Fisher; Waltham, MA, USA
Inject® Spritzen 1,0 ml	B. Braun, Melsungen, DE
Kresylviolett	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Kryoröhrchen	Thermo Fisher Scientific; Walldorf, DE
Leukosilk-S	BNS medical GmbH, Hamburg, DE
Mikroskop Objektträger Superfrost® Plus	Thermo Scientific; Braunschweig, DE
Microtom Klingen - C35	Feather; Köln, DE
MoliCare® Premium	Paul Hartmann AG, Heidenheim, DE
NaCl 0,9 %	B. Braun, Melsungen, DE
Nitril Handschuhe	VWR International, LLC, Leuven, B
Pasteur Pipetten Volac	Poulten & Graf GmbH, Wertheim, DE
PBS Dulbecco's	Bio&SELL GmbH; Nürnberg, DE
PCR Klebefolie	Eppendorf AG; Hamburg, DE
Pipettenspitzen (verschiedene Größen)	STARLAB GmbH; Hamburg, DE
Prolene 6-0	Ethicon, San Lorenzo, USA
Qiazol Lyse-Reagens	Qiagen GmbH; Hilden, DE
Ratte/Maus Haltung – Alleinfuttermittel	Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, DE
RNase freies Wasser	Fermentas; St. Leon Rot, DE
RNaseZap™	Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Vilnius, LTU

<b>Verbrauchsmaterial</b>	<b>Hersteller</b>
Roti <sup>®</sup> Histokitt	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Roti <sup>®</sup> Histol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, DE
Safe-lock Tubes (1,5 + 2,0 ml)	Eppendorf AG; Hamburg, DE
Saugtupfer Sugi <sup>®</sup>	Questalpha, Eschenburg, DE
Stericam <sup>®</sup> 26 G x 1/2“ Kanülen	B. Braun, Melsungen, DE
Trennsäule	Qiagen GmbH; Hilden, DE
Triton X-100	Sigma-Aldrich GmbH; Steinheim, DE
Trockeneis	Johannes-Gutenberg-Unimedizin Mainz, Mainz, DE
Xylol	PanReac/AppliChem GmbH; Darmstadt, DE

## 2.3 Lösungen

**Tabelle 3: Zusammenfassung angewendeter Lösungen inklusive Herstellung.**

<b>Lösung</b>	<b>Herstellung</b>
Kresylviolett	5 mg Kresylviolett in 100 ml Ethanol (100%), bei 50 °C für 30 min rühren, auf 500 ml mit Aqua dest. auffüllen, anschließend filtrieren
„IHC blocking solution“	5 % NGS + 0,5 % FBS + 0,1 % Triton X-100 in PBS (PBST)
„Phosphat buffered Saline“ + TX100 (PBST)	PBS + 0,1 % Triton X-100
„Phosphat buffered saline“ (PBS)	9,55 g D-PBS in 1 l Aqua dest.
Paraformaldehyd 4%	70 °C 235 ml Aqua dest. + 18.8 g PFA + 0.47 ml 10 M NaOH, Lösung filtern + 235 ml 0.2 M Phosphatpuffer

## 2.4 Medikamente

**Tabelle 4: Zusammenfassung angewandter Medikamente inklusive Hersteller.**

<b>Medikament</b>	<b>Hersteller</b>
Bepanthen <sup>®</sup> Augen- und Nasensalbe	Bayer Vital, Leverkusen, DE
Isofluran-Piramal, Wirkstoff: Isofluran	Piramal Critical Care B.V., TR Voorschoten, NL
Histoacryl <sup>®</sup> Gewebekleber	B. Braun, Melsungen, DE

Medikament	Hersteller
Lidocain (Lidocain-HCl 2 % Injektionslösung)	B. Braun; Melsungen, DE
Rimadyl® 50 mg/ml, Wirkstoff: Carprofen	Zoetis Deutschland GmbH; Berlin, DE

## 2.5 Kits

Tabelle 5: Zusammenfassung verwendeter Kits inklusive Hersteller.

Kit	Hersteller
Absolute Blue qPCR Sybgreen Mix	Thermo Scientific; Braunschweig, DE
MyTaq™ Extract-PCR Kit	Meridian Bioscience®; Cincinnati, OH, USA
PrimaQuant qPCR-CYBR-Green-MasterMix Blue	Steinbrenner Laborsysteme GmbH; Wiesenbach, DE
RNA 6000 Nano Kit	Agilent Technologies; Waldbronn, DE
RNeasy® Micro Kit	Qiagen GmbH; Hilden, DE
QuantiTect® Reverse Transcription Kit	Qiagen GmbH; Hilden, DE
Färbekit: Hämatoxylin & Eosin (H&E)	Morphisto GmbH, Offenbach am Main, DE

## 2.6 PCR „Primer“

Tabelle 6: Zusammenfassung der verwendeten PCR „Primer“.

„Target“	Amplikon Länge (bp)	Oligonukleotidsequenz 5'-3'		Genbank Nummer
		forward	reverse	
<b>Arg1</b>	185	CTCCAAGCCAAAGTCCTTAGAG	AGGAGCTGTCATTAGGGACATC	NM_007482
<b>Cd68</b>	113	CCCACCTGTCTCTCTCATTTTC	CACATTGTATTCCACCGCC	NM_001291058.1
<b>Fcgr1</b>	211	CCACAATGATTGGCTGCTACT	CGTGCCTGAGCAGTGGTA	NM_010186.5
<b>Gfap</b>	120	CGGAGACGCATCACCTCTG	TGGAGGAGTCATTGAGACAA	NM_001131020
<b>Aif1</b>	144	ATCAACAAGCAATTCCTCGATGA	CAGCATTGCTTCAAGGACATA	NM_019467
<b>Lyz2</b>	237	ACTCCTCCTGCTTTCTGTC	TTGCCATCATTACACCAGTATC	NM_017372.3
<b>Mmp9</b>	106	AAGTCTCAGAAGGTGGAT	AATAGGCTTTGTCTTGGTA	NM_013599

„Target“	Amplikon Länge (bp)	Oligonukleotidsequenz 5'-3'		Genbank Nummer
		forward	reverse	
<b>Mrc1</b>	184	GGCTGATTACGAGCAGTGG A	ATGCCAGGGTCACCTTTCA G	NM_008625.2
<b>Nos2</b>	312	TGTGTCAGCCCTCAG AGTAC	CACTGACACTYCGCA CAA	NM_010927
<b>Ppia</b>	146	CATACAGGTCCTGGCATCT TGTC	AGACCACATGCTTGCCATC CAG	NM_008907
<b>Spp1</b>	151	ATGTCATCCCTGTTG CCCAG	GACTGATCGGCACTC TCCTG	NM_001204201.1

## 2.7 Antikörper

Tabelle 7: Zusammenfassung der verwendeten primären Antikörper.

Antikörper	Spezies	IHC Verdünnung	Hersteller	Hersteller-Nr.	Weitere Informationen
<b>anti-CD68</b> (monoklonal)	Ratte	1:300	BD	566389	Direkte Fluorochrome Kopplung mit BV421 an den Primärantikörper
<b>anti-GFAP</b> (polyklonal)	Kaninchen	1:1000	DAKO	Z03340 1-2	
<b>anti-MRC1</b> (monoklonal)	Ratte	1:300	BioLegend	COC68 C2	Direkte Fluorochrome Kopplung mit FITC an den Primärantikörper
<b>anti-NeuN</b> (polyklonal)	Meerschweinchen	1:2000	Synaptic systems	266014	

**Tabelle 8: Zusammenfassung der verwendeten sekundären Antikörper.**

<b>Sekundärer Antikörper</b>	<b>Spezies</b>	<b>Reaktivität</b>	<b>IHC Verdünnung</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Hersteller -Nr.</b>
<b>Alexa Fluor 633 “highly cross-absorbed”</b>	Ziege	Meerschweinchen	1:500	Invitrogen/ Life Science	A-21105
<b>Alexa Fluor 568 „cross-absorbed“</b>	Ziege	Kaninchen	1:500	Invitrogen/ Life Science	A-11011

## 2.8 Software

**Tabelle 9: Zusammenfassung der verwendeten Software.**

<b>Software</b>	<b>Hersteller</b>
Adobe Illustrator 2020	Adobe Inc.; San José, CA, USA
Adobe Photoshop 2020	Adobe Inc.; San José, CA, USA
BioRender	BiorRender, Ontario, Kanada
Calculate and draw custom Venn diagrams	VIB/ UGent, Bioinformatics & Evolutionary Genomics, Gent, B
EndNote 20	Clarivate™, Philadelphia, USA
EthoVision XT15	NOLDUS Information Technology; Wageningen, NL
GraphPad Prism 9	GraphPad Software, Inc.; La Jolla, CA, USA
GSEA 4.1.0.	Broad Institute, Inc.; Massachusetts, CA, USA
ImageJ Version 1,53a	National Institutes of Health; Bethesda, MD, USA
LightCycler® 480, Version 4.5	F. Hoffmann-La Roche AG; Basel, CH
Microsoft Office 2016	Microsoft, Redmond, USA
PyMOL, Version 2.5.5.	Schrödinger Inc., NY, USA
Zen 3.5 blue edition	Carl Zeiss Microscopy GmbH; Oberkochen, DE

## 3 Methoden

### 3.1 Studiendesign & Mäuse

#### 3.1.1 Genehmigung der Tierversuche

Alle Tierversuche, die im Rahmen dieser Dissertation durchgeführt worden sind, wurden gemäß den institutionellen Richtlinien der Johannes Gutenberg-Universität Mainz, Deutschland durchgeführt. Genehmigt wurden die Tierversuche von der Tierschutz- und Ethikkommission des Landesuntersuchungsamts Rheinland-Pfalz (Aktenzeichen 23 177-07/G 19-1-027).

#### 3.1.2 Studiendesign

In diesem Forschungsvorhaben wurden insgesamt 88 männliche und weibliche MRC1-Wildtyp bzw. -Knock-out Mäuse (näheres unter 3.1.3) im Alter von 8-12 Wochen in zwei unabhängigen Kohorten, mit jeweils fünf bzw. 30 Tagen Überlebenszeit, untersucht. In beiden Kohorten wurden die Mäuse nach dem Zufallsprinzip in vier experimentelle Gruppen mit jeweils gleichen Geschlechterverhältnis eingeteilt. Gruppe A: CCI+MRC1-WT, Gruppe B: CCI+MRC1-KO, Gruppe C: MRC1-WT+Sham, Gruppe D: MRC1-KO+Sham.

Kohorte 1 wurde mit 48 Tieren durchgeführt. Kohorte 2 wurde ursprünglich mit 40 Tieren geplant und durchgeführt. Re-Genotypisierung und erneute Verifizierung der Genotypen durch qPCR zeigte, dass bei einigen Mäusen ein anderer Genotyp vorlag als zuvor bestimmt wurde. Dies hatte zu Folge, dass zum einen die Gruppenzugehörigkeit der betroffenen Tiere im Nachhinein geändert werden musste, aber auch Tiere aufgrund eines nun heterozygoten Genotyps exkludiert werden mussten. Dies änderte nicht nur die Gesamtanzahl verwendeter Tiere und die Gruppengröße, sondern sorgte auch für eine ungleiche Geschlechterverteilung in den vier experimentellen Gruppen.

Die genaue Gruppenverteilung von Kohorte 1 und 2 sind nachfolgenden Tabellen zu entnehmen.

**Tabelle 10: Studiendesign Kurzzeitüberleben.**

#### **Kohorte 1: 5d Überleben**

	<b>„Controlled Impact“ (CCI)</b>	<b>Cortical</b>	<b>„Sham“</b>
<b>MRC1-Wildtyp</b>	<b>A (n=8♂/8♀)</b>		<b>C (n=4♂/4♀)</b>
<b>MRC1-Knock-out</b>	<b>B (n=8♂/8♀)</b>		<b>D (n=4♂/4♀)</b>

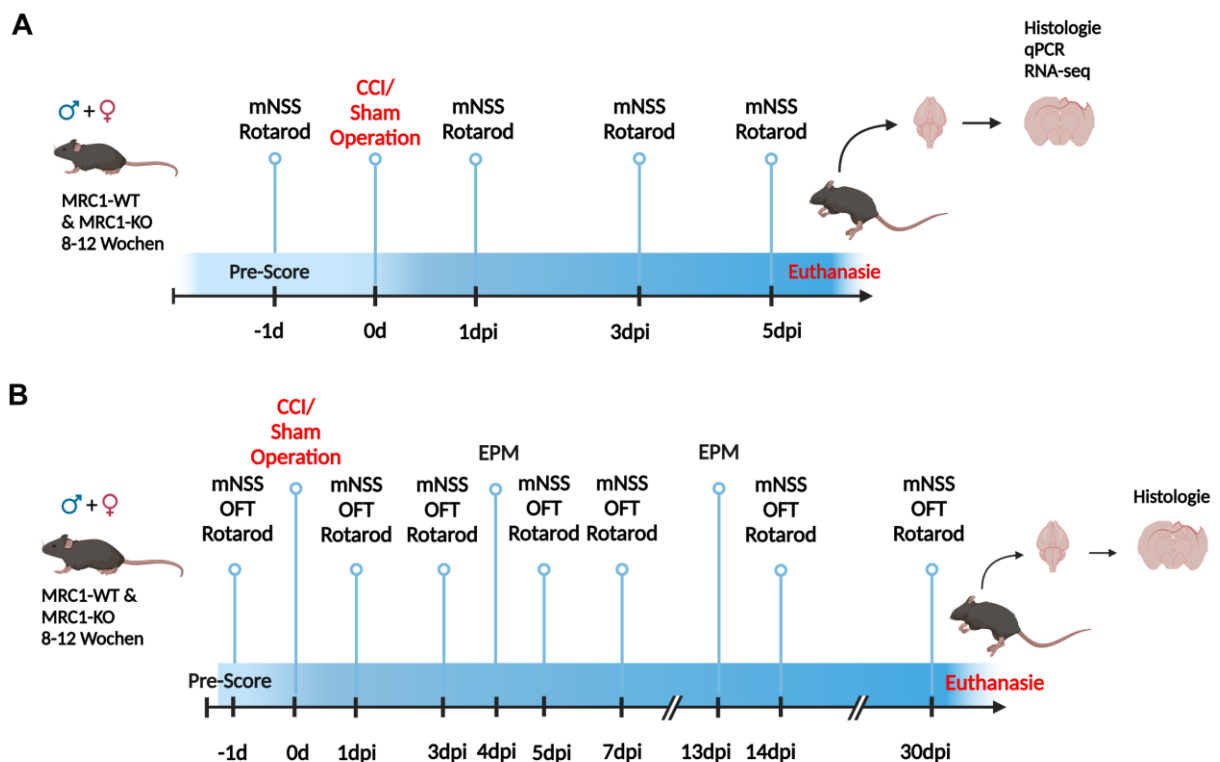
Tabelle 11: Studiendesign Langzeitüberleben.

Kohorte 2: 30d Überleben

	„Controlled Impact“ (CCI)	Cortical	„Sham“
MRC1-Wiltyp	A (n=4♂/6♀)		C (n=4♂/4♀)
MRC1-Knock-out	B (n=5♂/5♀)		D (n=2♂/4♀)

Um genügend Zeit für alle Experimente pro Tag zu haben, wurden in beiden Kohorten Tiere aus Gruppe A-D ebenfalls nach dem Zufallsprinzip in wiederum zwei Gruppen a' 24 (Kohorte 1) bzw. 20 (Kohorte 2) Tiere aufgeteilt. Die Operationen sowie nachfolgend alle Verhaltensexperimente und schließlich die Euthanasie wurde an zwei aufeinanderfolgenden Tagen mit jeweils 24 bzw. 20 Tieren durchgeführt.

Der genaue zeitliche Ablauf lässt sich anhand **Abbildung 4: Studiendesign**.Abbildung 4 nachvollziehen.



Created with [BioRender.com](https://www.biorender.com)

Abbildung 4: Studiendesign.

(A) Studiendesign der Kurzzeit-Überlebensgruppe (Kohorte 1, 5d Überleben, gleiches Geschlechterverhältnis). „Modified Neurological Severity Score“ (mNSS) und Rotarod (RR) wurden 1 Tag vor Operation, sowie 1, 3 und 5 dpi durchgeführt. Die Euthanasie erfolgte an Tag 5. Die Gehirne wurden anschließend für Histologie, qPCR und RNA-Sequenzierung (RNA-Seq) prozessiert. (B) Studiendesign der Langzeit-Überlebensgruppe (Kohorte 2, 30d Überleben, ungleiches Gruppen- und Geschlechterverhältnis). mNSS, RR und „Open Field Test“ (OFT) wurden einen Tag vor Operation sowie 1, 3, 5, 7, 14 und 30dpi durchgeführt. Ergänzend kommt

das „Elevated Plus Maze“ (EPM) 4 und 13dpi hinzu. Nach einer Überlebenszeit von 30 Tagen wurden die Tiere euthanasiert und die Gehirne für histologische Untersuchungen prozessiert. CCI = „Controlled Cortical Impact“, dpi = „days post injury“, EPM = „Elevated Plus Maze“, mNSS = „Modified Neurological Severity Score“, OFT = Open Field Test.

In Kohorte 1 überlebten alle Tiere bis zum Studienende. In Kohorte 2 verstarb ein männliches Tier aus der Gruppe B kurze Zeit nach der CCI-Operation.

Die Experimentatorin war während der gesamten Versuche für den Genotyp, die Operationsart, die Datensammlung und anschließende Analyse verblindet. Die Randomisierung wurde von einer Person durchgeführt, die nicht in die Experimente involviert war.

### **3.1.3 MRC1 Knock-out Mäuse (Internationale Nomenklatur: B6.129P2-Mrc1tm1Mnz/J)**

Michael Nussenzweig generierte den MRC1-Knock-out Mausstamm ursprünglich an der Rockefeller Universität in New-York [206]. Hierfür wurde eine genome Veränderung des Mannose-Rezeptor Locus und des Zielvektors mit EGFP, Neo und DTA (EGFP: „enhanced green fluorescent protein“; Neo; DTA: Diphtheria Toxin) vorgenommen. Das EGFP Reporter Gen wurde am Startcodon, Exon 1, inseriert und beinhaltet ein Stopcodon, welches die Expression des Mannose-Rezeptors aufhebt. Nachdem der Neomycin-Resistenzselektionsmarker entfernt wurde, verbleibt eine loxP-Flankierung an der abgewandten Seite des EGFP. Western-Blot Analysen von Lymphknotenlysaten zeigten die Abwesenheit des normalen Proteins in homozygoten Mäusen.

Zunächst wurde dieser Mausstamm auf einem 129SvJxC57BL/6 Hintergrund generiert. Anschließend wurde der Stamm über sieben Generationen auf den C57BL/6 Hintergrund zurück gekreuzt. Der Stamm zeichnet sich unter anderem durch eine mangelhafte Ausscheidung von Proteinen aus, die zugängliche Mannose- und N-Acetylglucosamin-Reste tragen. Daher weisen sie erhöhte Konzentrationen von acht verschiedenen lysosomalen Hydrolasen auf.

Die Ausscheidung einer Untergruppe von mannosehaltigen Serumglykoproteinen, die im Entzündungsprozess normalerweise erhöht sind, ist ebenfalls beeinträchtigt. Dieser Stamm kann deshalb bei Untersuchungen der Serumglykoprotein-Homöostase nützlich sein, aber auch bei Untersuchungen zu Altern sowie Forschungsfragen, die das Immunsystem betreffen [207], weshalb er für dieses Forschungsvorhaben genutzt wurde.

Unser Labor erhielt im Oktober 2018 kryokonservierte, homozygote Embryonen vom Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg. Diese wurden durch die BioGen – Genetic Engineering and Biotechnology Facility des „Translational Animal Research Center“ (TARC) der Universitätsmedizin Mainz revitalisiert. Es kamen zwei Ammen des Stammes

CrI:CD1(ICR) zum Einsatz, die drei männliche und fünf weibliche homozygote Nachkommen zur Welt brachten. Im Februar 2019 konnten die ersten Verpaarungen mit unseren eigenen C57BL/6J Mäusen erfolgen, um heterozygote Nachkommen für unsere Zucht zu generieren. Alle im Versuchsvorhaben verwendeten Mäuse sind selbstgezogene Nachzuchten. Weder während der Zucht, noch während der Experimente in unserem Labor konnten Auffälligkeiten hinsichtlich Anatomie, Physiologie oder Verhalten der Mäuse – unabhängig welcher Genotyp – festgestellt werden, weshalb dieser Mausstamm als unbelastet eingestuft wurde.

### 3.1.3.1 Genotypisierung

Zur Feststellung des Genotyps im Rahmen der Genotypisierung, werden Ohrstanzen verwendet, welche im Rahmen des Kennzeichnungsprozesses beim Absetzen der Jungtiere ( $\pm$  drei Wochen) mittels einer Ohrlochzange gewonnen werden. Die genomische DNA (gDNA) wird mit dem MyTaq™ Extract-PCR Kit nach Herstellerangaben isoliert, dann mit dem Master-Mix sowie den passenden „Primern“ (siehe unten) gemischt und schließlich dem Mastercycler® zugeführt. Die in diesem Prozess entstandenen Produkte werden im Gel Analysator untersucht. Je nachdem welche Produkte und Banden durch Bindung der entsprechenden Primer entstehen, können folgende Genotypen unterschieden werden:

**Tabelle 12: Genotypinformationen.**

<b>Genotyp</b>	<b>Bindende „Primer“</b>	<b>Amplikon (bp)</b>	<b>Offizielle Bezeichnung</b>
<b>MRC1-KO</b>	Gemeinsam: CCT TTT CAG TCA GGC AGC TC Mutant: GTA GGT CAG GGT GGT CAC GA	330	MRC1 <sup>-/-</sup>
<b>MRC1-HE</b>	Gemeinsam: CCT TTT CAG TCA GGC AGC TC Mutant: GTA GGT CAG GGT GGT CAC GA Wildtyp: CCC CCA CCT CAA AAC AGA C	206 + 330	MRC1 <sup>+/-</sup>
<b>MRC1-WT</b>	Gemeinsam: CCT TTT CAG TCA GGC AGC TC Wildtyp: CCC CCA CCT CAA AAC AGA C	206	MRC1 <sup>+/+</sup>

Um die Lesbarkeit dieser Dissertation zu erleichtern, wird nachfolgend nicht die offizielle Nomenklatur der Genotypen, sondern lediglich MRC1-KO und MRC1-WT als Bezeichnung verwendet. Die HE-Tiere sind nicht im Versuch zum Einsatz gekommen, sondern dienen der Produktion von Versuchstieren und dem Erhalt des Stammes.

### **3.1.3.2 Sicherstellung des richtigen Genotyps**

Zur Sicherstellung, dass die Versuchstiere wirklich den ursprünglich bestimmten Genotyp haben und auch keine Verwechslung im Versuch stattgefunden hat, wurden *post mortem* Schwanzspitzenproben genommen und erneut dem Genotypisierungsprozess zugeführt (Re-Genotypisierung). Hierbei ergaben sich bei einigen Tieren Unstimmigkeiten. Dies betraf insbesondere Versuchstiere der 30 Tage Überleben Kohorte. Um die Tiere final ihren Versuchsgruppen zuzuordnen, wurde deshalb ergänzend Hirngewebe jedes Versuchstieres mittels quantitativer real-time PCR (qPCR) untersucht. Die Ergebnisse sind im Abschnitt 4.1. dargestellt.

### **3.1.4 Maushaltung**

#### **3.1.4.1 Käfige**

Die Haltung der Mäuse erfolgt in Filtertop Typ-II Käfigen. Diese haben eine Grundfläche von 371 cm<sup>2</sup>. Grundsätzlich können in diesem Käfigtyp fünf gleichgeschlechtliche Mäuse oder ein Zuchtpaar (ein Männchen und maximal zwei Weibchen) inklusive Nachzucht gehalten werden. Gruppenhaltung ist bei Mäusen aufgrund ihrer sozialen Lebensweise obligatorisch und gesetzlich in der Richtlinie 2010/63/EU gefordert. Eine Einzelhaltung darf nur unter besonderen Umständen (z.B. Aggression oder besondere Forschungsfragen, die nur durch Einzelhaltung zu beantworten sind) mit Sicht-, Hör- und Riechkontakt erfolgen. Die Käfige funktionieren durch den Filter als eine Art Mikroisolator, der eine Kontamination der Tiere mit Keimen vermeidet.

Die Käfige sind mit Nestbaumaterial und „enrichment“ in Form von Röhren oder roten bzw. Papp-Häuschen ausgestattet. Rote Häuschen bieten den Vorteil, dass Mäuse langwelliges Licht (>580 nm) nicht wahrnehmen können und sich die Tiere in den Häuschen deshalb vollkommen geschützt fühlen, obwohl die Experimentatoren sie beobachten können [208]. Pro Woche werden die Käfige mindestens einmal gewechselt. In diesem Zuge erfolgt auch ein Wechsel der Wasserflaschen.

#### **3.1.4.2 Versorgung mit Futter und Wasser**

Neugeborene Mäuse ernähren sich zunächst nur von Muttermilch. Ab Tag 14 beginnen sie auch festes Futter aufzunehmen. Bis zum Absetzen im Alter von 21 Tagen hat sich ihr Verdauungstrakt vollständig auf feste Nahrung umgestellt. Der Futterbedarf adulter Mäuse in reiner Bestandshaltung wird klassisch über ein pelletiertes Alleinfuttermittel abgedeckt. Tiere in reiner Bestandshaltung erhalten Haltungsfutter. Zuchttiere erhalten dagegen spezielles

Zuchtfutter, welches einen erhöhten Protein- und Energiebedarf während der Trächtigkeit und der Laktation abdeckt [209-211]. Sind die Jungtiere beim Absetzen verhältnismäßig klein, werden zusätzlich zum Haltungsfutter Haferflocken angeboten. Das Futter wird ad-libitum in Käfigraufen dargereicht, um eine Kontamination mit Urin, Kot, aber auch Wasser aus den Trinkflaschen zu vermeiden. Eine Nachfüllung des Futters erfolgt bedarfsgerecht.

Problematisch ist das pelletierte Alleinfuttermittel aufgrund seiner mangelnden Struktur. Dies kann bei Mäusen aufgrund ihrer ständig wachsenden Zähne zu mangelnder Zahnabnutzung und Gebissfehlstellungen führen [211]. Gleichzeitig ist der Energiegehalt bezogen auf die tägliche Leistung der Tiere häufig zu hoch, so dass insbesondere ältere Tiere in reiner Bestandshaltung bei einer ad-libitum Fütterung verfetten [212].

Autoklaviertes Wasser, bzw. Leitungswasser steht den Tieren ebenfalls ad-libitum in Trinkflaschen zur Verfügung. Pro Tag nehmen adulte Mäuse ca. 4-7 ml auf [211].

### 3.1.4.3 **Haltungsform**

Grundsätzlich werden für die Haltung von Versuchsmäusen von der Gesellschaft für Versuchstierkunde (GV-Solas) bestimmte Haltungsparameter empfohlen. Diese werden täglich kontrolliert und dokumentiert. Entsprechende Parameter sind in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt.

**Tabelle 13: Haltungsparameter für Haltung von Labormäusen entsprechend den Empfehlungen der GV-Solas.**

<b>Parameter</b>	<b>Empfohlener Wert</b>
Hell-Dunkel-Rhythmus	10-14 h Licht
Lichtintensität	< 200 Lux
Temperatur	20-24 °C
Relative Luftfeuchtigkeit	45-65 %
Luftwechselrate	15-20/ h

### **Während der Zucht bzw. vor dem Versuchsbeginn (zentrale Tierhaltung):**

Die Haltung erfolgt in Filtertop Typ-II Käfigen in speziellen Regalsystemen mit einem 12 h :12 h Tag/Nacht-Rhythmus. Zugang erfolgt über eine Barriere, um Keimeinträge möglichst gänzlich zu verhindern. Zugang haben nur eingewiesene, autorisierte Personen in entsprechender Schutzkleidung (Tierstallkleidung, Mundschutz, Op-Haube, Handschuhe).

Das Hygienemonitoring in der Haltung der TARC erfolgt nach den Empfehlungen der FELASA zweimal jährlich. Es erfolgt hierbei eine kleine und eine große Testung. Der Hygienestatus der Tiere wird als 'spezifiziert pathogenfrei' bezeichnet, d.h. die Tiere sind frei von bestimmten, einzeln zu benennenden Bakterien, Viren, Parasiten und/oder Pilzen. Je nach Hygieneniveau werden jedoch unterschiedliche Pathogene toleriert. Wenn Tiere von kommerziellen Züchtern direkt in diese Haltung eingebracht werden, müssen sie mindestens SPF-Status haben. Ansonsten erfolgt eine 8-wöchige Quarantänisierung.

### **Während der Experimente:**

Die Tiere werden bereits in den entsprechend für den Versuch vorgesehenen Kleingruppen von zwei Mäusen 3 bis 5 Tage vor Versuchsbeginn von der TARC-Haltung ins Labor geliefert. Dort verbringen sie zunächst Zeit zur Habituation an die neue Umgebung, die ungewohnten Geräusche und auch die Personen, welche den Tierversuch durchführen. Dies soll den Stress der Tiere auf ein kleinstmögliches Maß verringern.

Die Haltung vor Ort erfolgt in einem Tierschrank mit 12 h:12 h Tag/Nacht-Rhythmus. Während der Dunkelphase ist der Tierschrank rot beleuchtet, was die circadiane Rhythmik der Tiere aufgrund mangelnder Wahrnehmung nicht stört, aber trotzdem eine Evaluation der Tiere ermöglicht.

Der Tierschrank befindet sich im Forschungslabor der Klinik für Anästhesiologie der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz und ist nach §11 (1) Nr. 1 des Tierschutzgesetz seit 11.12.2012 als Tierhaltung genehmigt.

Auch in unserem Tierschrank sitzen die Tiere in Filtertop Typ-II Käfigen. Im Gegensatz zur zentralen Tierhaltung gibt es keine speziellen Zugangsbeschränkungen. Die Tiere werden jedoch ausschließlich mit Handschuhen gehandelt. Um weiterhin sicherzustellen, dass unsere Forschungsergebnisse nicht durch Kontamination mit Mikroorganismen beeinflusst werden und die Gesundheit der Tiere beeinträchtigt wird, führen wir zwei Mal jährlich ein inoffizielles Hygienemonitoring nach Vorgaben der FELASA durch.

### **3.1.5 Abbruchkriterien**

Werden Tierversuche durchgeführt, so besagt § 31 Abs. 1 Satz 2 Nr. 1d Tierschutz-Versuchstierverordnung, dass vorher konkrete Abbruchkriterien festgelegt werden müssen

[213]. Das soll verhindern, dass die Versuchstiere Schmerzen, Leiden oder Schäden, die über das zu erwartende Maß hinausgehen, ertragen müssen. Diese Abbruchkriterien gelten über die Dauer des gesamten Tierversuchsvorhabens und schließen so auch präoperative Zeiträume der Gewöhnung im Labor ein. Die Abbruchkriterien werden in Form eines Evaluationsbogens mit anschließender Handlungsanweisung gemeinsam mit dem Tierversuch von der zuständigen Behörde genehmigt (Abbildung 5). So wird jedes Tier im Rahmen des Tierversuchsvorhabens täglich in Augenschein genommen und auf Abnormitäten untersucht. Hierzu zählen Auffälligkeiten hinsichtlich Körpergewichtsschwankungen, Körperpflege, physiologische Bewegung und im Besonderen versuchsspezifische Kriterien. Bei Auffälligkeiten werden Punkte vergeben, die anschließend addiert werden. Bei einer Gesamtpunktzahl von 0–5 ist keine Intervention notwendig. 6–10 Punkte bedeuten, dass das Tier am gleichen Tag erneut beurteilt werden muss. Ab 11 Punkten ist zusätzlich zur zweimal täglichen Untersuchung auch noch der zuständige Tierarzt zu informieren und die Gabe des Analgetikums Rimadyl® in einer Dosierung von 4 mg/kg erforderlich. Hat ein Tier  $\geq 20$  Punkte, so wird es sofort mittels *cervikaler Dislokation* in tiefer Narkose euthanasiert. Kein Tier musste im Verlauf beider Kohorten euthanasiert werden.

## CCI+MRC1WT vs. KO

### Score Sheet mit Abbruchkriterien

Ergänzung zum jeweiligen Operationsprotokoll (CCI)

<b>1. Körpergewicht, bezogen auf das Gewicht der unbehandelten Kontrollgruppe</b>	<b>Score Punkte</b>
- Unbeeinflusst	0
- Reduktion $\leq$ 10%	5
- Reduktion < 20%	10
- Reduktion > 20%	20
 <b>2. Allgemeinzustand</b>	
- Fell glatt, glänzend und anliegend, Augen glänzend, Körperöffnungen sauber	0
- Fell matt, Augen trüb	5
- Fell stumpf, Augen eingesunken trüb, verklebte oder feuchte Körperöffnungen	10
- Fell gestäubt, Tier fühlt sich kalt an, Augen geschlossen, Krämpfe, Lähmungen, Atemgeräusche	20
 <b>3. Spontanverhalten</b>	
- aufmerksam, neugierig, Aufrichten, flinke Bewegungen	0
- ungewöhnliches Verhalten, eingeschränkte oder reduzierte Bewegung oder Überaktivität, reduziertes Explorationsverhalten	5
- Isolation, Apathie, Koordinationsstörungen, ausgeprägte Stereotypien oder Hyperkinetik	10
- Automutilation, Nekrose, Rektumvorfall	20
 <b>4. Versuchsspezifische Kriterien</b>	
- entzündete Wundnaht/offene Wundnaht/Abszess	20
- Tonisch-klonische Krämpfe („Epilepsie“)	20
<hr/>	
<b>Einteilung der Score Punkte und Maßnahmen</b>	<b>Score Punkte</b>
<b>Keine Belastung</b>	<b>0-5</b>
<b>Geringgradig</b> - 2x tägliche Inaugenscheinnahme	<b>6-10</b>
<b>Mittelgradig</b> - 2x tägliche Inaugenscheinnahme, zuständigen Tierarzt informieren und zusätzliche Gabe des Analgetikums Rimadyl (4mg/kg)	<b>11-19</b>
<b>Hochgradig</b> – siehe Abbruchkriterien	<b><math>\geq</math>20</b>

#### Abbruchkriterien:

Gesamtscore  $\geq$ 20 Punkten oder Einzelscore von 20 Punkten: sofortige Tötung des betroffenen Einzeltieres

2 Punkte beim 3cm ‚Beam-walk‘ oder Gesamtscore  $\geq$  8 im Neuroscore

Tötungsmethode: cervikale Dislokation

Abbildung 5: Score-Sheet mit Abbruchkriterien gemäß TierSchVersV bzw. G19-1-027.

## 3.2 Chirurgische Eingriffe

### 3.2.1 Anästhesie & Analgesie

Unabhängig von der Gruppenzugehörigkeit wird allen Tieren mindestens 30 Minuten vor der Narkoseinduktion das Analgetikum Rimadyl® (Wirkstoff: Carprofen) in einer Dosierung von 4 mg/kg Körpergewicht mittels *subkutaner* Injektion verabreicht. Das verwendete Anästhetikum ist nur schwach analgetisch [214], weshalb eine zusätzliche analgetische Abdeckung der Tiere notwendig und auch in der Tierschutzversuchstier-Verordnung gefordert ist.

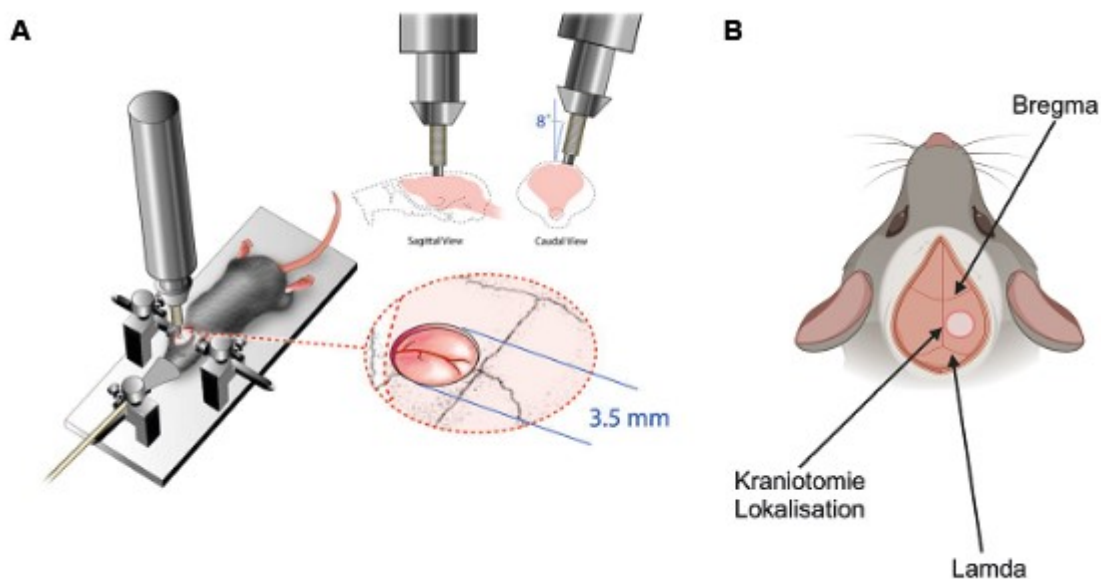
Zur Induktion als auch zur Aufrechterhaltung der Narkose kommt das Narkosegas Isofluran zum Einsatz. Es handelt sich um ein volatiles Anästhetikum, was durch einen Verdampfer gasförmig wird und anschließend zur Inhalation genutzt werden kann. Isofluran bzw. Gasnarkosen im Allgemeinen zeichnen sich durch schnelles An- und Abfluten aufgrund ihrer hohen Lipidlöslichkeit aus, was eine gute Steuerbarkeit ermöglicht [214]. Zur stressfreien Induktion der Narkose werden die Tiere bei 4 Vol.-% Isofluran für ca. 90 Sekunden in eine Vorfluterkammer gesetzt. Ist eine ausreichende Narkosetiefe erreicht, werden die Tiere entweder mit ihren *Incisivi* im stereotaktischen Rahmen fixiert oder auf den „Sham“-Operationsbereich gelegt. Anschließend wird die Narkose durch Verabreichung von Isofluran in einer Konzentration von 1,8–2,3 Vol.-% aufrechterhalten. Die Narkosetiefe wird während der gesamten Operation regelmäßig überwacht. Dies erfolgt visuell durch Kontrolle der Atmung, Messung der rektalen Temperatur mit einer Temperatursonde und Überprüfung der Reflexe. Das Toleranzstadium (Stadium in dem die Operation durchgeführt werden kann) zeichnet sich hierbei durch einen Ausfall des Zwischenzehenreflexes an der Hintergliedmaße aus.

Zusätzlich zur *Prämedikation* mit Rimadyl erhalten die CCI-Tiere *intraoperativ* eine Lokalanästhesie mit Lidocain-HCl 2 %. Dies wird, nachdem die Haut über der Schädelkalotte eröffnet wurde, *subkutan* im Bereich der Schläfen injiziert.

### 3.2.2 Durchführung des Controlled Cortical Impact (CCI)

Der von uns verwendete stereotaktische Rahmen fixiert die Maus zum einen über ihre *Incisivi*, zum anderen über so genannte „shore-bars“. Diese werden im Bereich der Schläfen angebracht und stellen sicher, dass der Kopf während des Impakts nicht zu den Seiten ausbrechen kann. „Shore-bars“ bieten gegenüber anderen Fixationsmöglichkeiten (z.B. „ear-bars“) den Vorteil, dass keine Frakturen der Ohrknöchelchen durch den Impakt entstehen. Auf dem stereotaktischen Rahmen befindet sich eine rückgekoppelte Wärmematte, auf der die Tiere während der gesamten Operationsdauer liegen. Diese hält die Körpertemperatur auf  $37 \pm 1$  °C konstant.

Wie bereits unter 3.2.1 beschrieben werden die Tiere bei Erreichen einer ausreichenden Narkosetiefe in Bauchlage auf den stereotaktischen Rahmen gelegt und zunächst nur mit ihren Schneidezähnen fixiert (Abbildung 6 A). Bepanthen® Nasen- und Augensalbe wird auf beide Augen aufgetragen, um ein Austrocknen während der Operation zu verhindern. Der *Anus* wird ebenfalls mit Salbe benetzt, um das Einführen der Temperatursonde zu erleichtern und keine Verletzungen hervorzurufen. Das Fell im Bereich der Mittellinie wird gescheitelt und die Haut mit der Schere *sagittal* ca. 1,5 cm lang eröffnet. Das *Periost*, welches sich durch ein glänzendes Aussehen auszeichnet, wird mit einem Wattetupfer vorsichtig abgekratzt. Als nächstes werden die „shore-bars“ angelegt und der Kopf vollständig fixiert. Lateral der Mittellinie wird mit einem Mikrobohrer über der rechten Hemisphäre ein ca. 3,5 mm<sup>2</sup> großes, quadratisches Knochenfenster gebohrt (Abbildung 6 B). Die Seite des Knochenfensters, die der Sagittalnaht anliegt, verbleibt ohne Bohrung, so dass das Knochenfenster anschließend mit einer Pinzette zur Mittellinie hin aufgeklappt werden kann. Wichtig ist während des Bohr- und Klappprozess darauf zu achten, dass weder die *Dura mater* noch die *sagittalen* Blutgefäße verletzt werden.



**Abbildung 6: Durchführung des „Controlled Cortical Impacts“ (BioRender.com).**

**(A) Schematische Darstellung einer im stereotaktischen Rahmen fixierten Maus mit dem Impaktor über der rechten Hemisphäre platziert. (B) Lokalisation der Kraniotomie von dorsal. Modifiziert nach Cole et al. [215].**

Der Stempel des elektromagnetisch betriebenen Impaktors wird zentral im Knochenfenster platziert und mit leichtem Kontakt auf die Gehirnoberfläche, unter Schonung der *Dura mater*, aufgesetzt. Der Stempelbolzen (Durchmesser: 3,5 mm) sollte sich exakt im rechten Winkel zur

Gehirnoberfläche befinden. Der Impakt wird anschließend mit den folgenden Parametern ausgelöst: Eindringtiefe: 1,5 mm, Aufpralldauer: 200 ms und Aufprallgeschwindigkeit: 6 m/s. Nach erfolgtem Einschlag wird das Knochenfenster wieder in Ausgangsposition geklappt und nach Blutstillung mit Histoacryl-Gewebekleber verschlossen. Abschließend wird die Haut mit drei bis vier Einzelknopfnähten verschlossen.

Die Gesamtdauer der Operation beträgt etwa 20 Minuten. Anschließend werden die Tiere in einen Säuglingsinkubator mit  $37 \pm 1$  °C für mindestens 1,5 h verbracht, um wieder vollständig das Bewusstsein zu erlangen.

### **3.2.3 Durchführung der Scheinoperation („Sham“)**

„Sham“-Tiere werden nach Erreichen einer entsprechenden Narkosetiefe ebenfalls in Bauchlage gelegt, aber nicht weiter fixiert. Auch sie liegen auf einer rückgekoppelten Wärmematte, erhalten Bepanthen® Augen- und Nasensalbe auf Augen sowie *Anus*. Grundsätzlich entspricht die „Sham“-Operation bis auf die Injektion von Lidocain sowie die *Kraniotomie* mit anschließendem Impakt der CCI-Operation.

Auf eine *Kraniotomie* wird im Rahmen unserer „Sham“-Operationen bewusst verzichtet. Magnetresonanztomografie Aufnahmen haben gezeigt, dass auch die *Kraniotomie* allein bereits erhebliche Läsionen verursacht [215, 216]. Da unsere „Sham“-Tiere aber als unverletzte Kontrolltiere dienen sollen, ist eine Läsion des Gehirns auf keinen Fall gewünscht. Die Dauer der „Sham“-Operation entspricht der Dauer der CCI-Operation. Auch die „Sham“-Tiere verbleiben bis zum vollständigen Erwachen für mindestens 1,5 h im Säuglingsinkubator.

### **3.2.4 Intraoperatives Monitoring**

Wie bereits unter 3.2.2 erwähnt, wurde während allen operativen Prozessen ein *intraoperatives* Monitoring durchgeführt. Die Körpertemperatur wurde mittels einer rückgekoppelten Wärmematte auf  $37 \pm 1$  °C konstant gehalten und vor als auch während der Operation mit einer Rektalsonde regelmäßig kontrolliert. Auch die Operationsdauer wurde notiert. In beiden Kohorten konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden.

**Tabelle 14: Intraoperatives Monitoring 5 und 30 d Überleben. Werte sind angegeben als Mittelwert  $\pm$  SEM.**

**Tabelle 14-1: Kohorte 1, 5d Überleben**

	CCI		Sham	
	MRC1-WT	MRC1-KO	MRC1-WT	MRC1-KO
<b>Rektale Temperatur vor Op [°C]</b>	36.19 $\pm$ 0.14	36.30 $\pm$ 0.14	36.44 $\pm$ 0.28	36.38 $\pm$ 0.21
<b>Rektale Temperatur während der Op [°C]</b>	36.48 $\pm$ 0.12	36.51 $\pm$ 0.19	36.24 $\pm$ 0.17	36.33 $\pm$ 0.18
<b>Operationsdauer [min]</b>	17.06 $\pm$ 0.73	17.75 $\pm$ 0.39	15.63 $\pm$ 0.32	17.88 $\pm$ 0.88

**Tabelle 14-2: Kohorte 2, 30d Überleben**

	CCI		Sham	
	MRC1-WT	MRC1-KO	MRC1-WT	MRC1-KO
<b>Rektale Temperatur vor Op [°C]</b>	36.49 $\pm$ 0.17	36.62 $\pm$ 0.21	36.46 $\pm$ 0.17	36.88 $\pm$ 0.12
<b>Rektale Temperatur während der Op [°C]</b>	34.74 $\pm$ 0.19	35.02 $\pm$ 0.15	36.35 $\pm$ 0.13	36.67 $\pm$ 0.13
<b>Operationsdauer [min]</b>	15.10 $\pm$ 0.66	14.25 $\pm$ 0.43	15.00 $\pm$ 0	15.00 $\pm$ 0

### 3.3 Verhaltenstests

Um die neurologischen Defizite, welche sich in Folge des *zerebralen Insults* ergeben, gezielt beurteilen und quantifizieren zu können, sind Verhaltenstests verschiedener Art notwendig. Die Tests dienen aber nicht nur zur Evaluation des Verhaltens über den gesamten Studienverlauf, sondern auch zur Feststellung von (neurologischen) Auffälligkeiten vor dem eigentlichen Versuch. So können Tiere, die bereits Einschränkungen aufweisen, exkludiert werden, ohne den Versuch zu beeinflussen. Gleichzeitig wird der Basiswert durch den *prä-OP* „Score“ bestimmt. Dieser ist ein wichtiger Referenzwert, um die Leistungsfähigkeit des entsprechenden Tieres bzw. der Gruppe vor und nach dem Trauma vergleichen zu können. Bei allen Verhaltensexperimenten ist zu beachten, dass unterschiedliche Mausstämme (Inzucht-, Auszucht- und genmanipulierte Stämme) unterschiedlich leistungsfähig sind bzw. der Stamm Einfluss auf das Verhalten und die Lernkapazität hat [217, 218]. Für alle Verhaltenstest ist es unabdingbar, dass der Raum in dem die Verhaltenstests durchgeführt werden, für diese Zeit ausschließlich für die Evaluation der Tiere genutzt wird und Störfaktoren wie laute Geräusche reduziert oder gänzlich ausgeschlossen werden.

Weiterhin muss der Raum geschlossen sein und keinerlei Fluchtmöglichkeiten für die Tiere nach draußen bieten.

### 3.3.1 “Modified Neurological Severity Score” (mNSS)

Der NSS dient zur Erfassung neurologischer Funktion der Maus in Bereichen wie Koordination, Balance, Motorik, Reflexe und Allgemeinverhalten [219]. Er wurde entsprechend den Bedürfnissen unseres Labors bzw. unseres SHT-Modells angepasst, weshalb es sich um eine modifizierte Variante (mNSS) handelt.

Für jede Aufgabe bzw. jeden Teil des mNSS werden Punkte vergeben. Es können Punktzahlen von 0-15 Punkte vergeben werden. Je höher die Punktzahl, desto größer die Schädigung. In diesem Zuge wird auch das Körpergewicht der Tiere erfasst, da es sich hierbei um einen Parameter handelt, von dem aus auf das Allgemeinbefinden und Wohlergehen geschlossen werden kann. Um Körpergewichtsverluste durch Harn- und Kotabsatz zu vermeiden, erfolgt die Messung des Körpergewichts zuerst. Die Messung erfolgt mit einer handelsüblichen Küchenwaage.

Der mNSS inklusive Messung des Körpergewichts wird einen Tag vor CCI/“Sham“-Operation sowie an den Tagen 1, 3, 5 (Kohorte 1+2), 7, 14, 30 (Kohorte 2) nach Operation durchgeführt (Abbildung 8).

Nachfolgend werden die entsprechenden Tests kurz erklärt.

1. „startle“-Reflex: Für diesen Test ist es wichtig, dass sich das Tier frei bewegen kann. Ohne einen Lufthauch zu erzeugen, wird in die Hände geklatscht und die Schreckreaktion – meist in Form eines kurzen Verharrens - auf das laute Geräusch beobachtet.

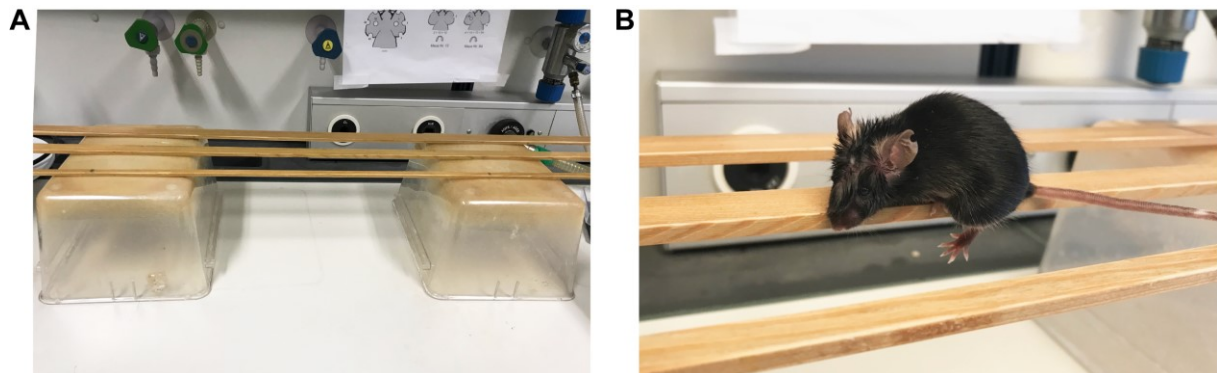
2. Allgemeinverhalten: In diesem Test wird beurteilt, ob das Tier arttypisches Erkundungsverhalten in Form von Schnuppern, Richtungsänderung des Kopfes und Aufrichten, um die Umgebung besser überblicken zu können, zeigt. Weiterhin wird evaluiert, ob ein geradeaus gerichtetes Gehen möglich ist. Hierfür ist es notwendig, dass das Tier sich möglichst stressfrei für einige Zeit selbstbestimmt bewegen kann.

3. Koordination: Dieser Teil des Tests wird auch „Beam-walk“ genannt und besteht aus drei verschiedenen breiten Holzbalken (3, 2 und 1 cm Breite), die das Tier nacheinander überqueren muss (Abb. 7 A). Die Balken befinden sich in einer Höhe von ca. 13,5 cm. Die zu überquerende Strecke beträgt ca. 40 cm. Begonnen wird mit dem breitesten Balken. Danach folgt der mittelbreite und als letztes der schmalste Balken. Die Tiere überqueren von rechts nach links die Balken, um optimalen Blick auf die linke Körperseite zu haben. Da das CCI im Bereich des rechten *parietalen Cortex* induziert wird, sind motorische Defizite auf der *kontralateralen* Seite zu erwarten [104] (Abbildung 7 B). Beurteilt wird, ob das Tier grundsätzlich in der Lage ist

jeden einzelnen Balken zu überqueren aber auch, ob und wie viele Fehlritte es währenddessen macht.

**4. Balance:** Dieser Teil des Tests wird mit einem quadratischen und einem runden Stab durchgeführt. Die Maus wird hierfür auf den Stab gesetzt. Die Aufgabe besteht darin, sich entweder für 10 s aufrecht auf dem Stab zu halten oder aber diesen mit allen vier Pfoten für 10 s fest zu umklammern. Da der quadratische Stab aufgrund seiner Kanten besseren Halt gewährt, wird mit diesem begonnen und sich dann hin zum runden Stab gesteigert. Je nach Zustand des Tieres ist ein Herabfallen möglich. Um zu vermeiden, dass die Tiere unsanft auf der darunterliegenden Oberfläche aufkommen, wird eine Hand ca. 10 cm unterhalb der Maus gehalten, um diese im Zweifel sanft aufzufangen. Die Tiere lernen im Verlauf der Experimente aber teilweise, dass ein Herabfallen auf die Hand kein Problem darstellt und verlieren mitunter Motivation die Aufgabe sauber zu absolvieren. Deshalb muss abgewogen werden in wie weit ein Herabfallen stattfindet, weil das Tier sich nicht festhalten kann oder weil schlichtweg die Motivation fehlt. Im Zweifel sollte der Test also wiederholt werden.

**5. Motordefizite:** Zum Schluss wird das motorische Können beurteilt. Hierfür können Erkenntnisse aus anderen Aufgabenbereichen des mNSS mit einfließen. Geklärt wird, ob ein normales Gangbild oder eine Parese einer Pfote oder eine *Hemiparese* vorliegt. Als *Parese* wird eine unvollständige Lähmung bezeichnet. *Hemiparese* bedeutet, dass beide Gliedmaßen der gleichen Seite betroffen sind (siehe auch Abbildung 7 B).



**Abbildung 7: “Modified Neurological Severity Score” – “Beam-walk”.**

**(A) Aufbau des „Beam-walks“ zur Beurteilung der Koordination (B) Maus mit deutlich sichtbarer Parese der linken Hintergliedmaße auf dem 2 cm breiten Balken.**

## CCI + MRC1-WT vs. KO G19-1-027

Animal-ID:					
OP-Date:					
	Pre-Op	Day 1	Day 3	Day 5	

**1. Reflexes**

startle reflex	Present (0)				
	Absent (1)				
Clap your hands once above the mouse; did it react?					

**2. General behavioral deficit?**

Seeking behavior	Present (0)				
	Absent (1)				
Walk straight	Present (0)				
	Absent (1)				

**3. Coordination**

Beam walking 3 cm	Score (0-2)				
Beam walking 2 cm	Score (0-2)				
Beam walking 1 cm	Score (0-2)				
0 point: normal movement 1 point: feet misplacements / unstable movement 2 points: sits down / stops moving on beam / falls down					

**4. Balance**

Roundstick	Score (0-2)				
Square stick	Score (0-2)				
0 point: Can grip the stick with 4 paws for 10 seconds 1 points: turn the stick: can it do that again, or is a paw (hemiparesis) "hanging out"					

**5. Motor deficit**

Paresis	Absent (0)				
	One foot (1)				
	Hemiparesis (2)				

**6. Body weight (g)**

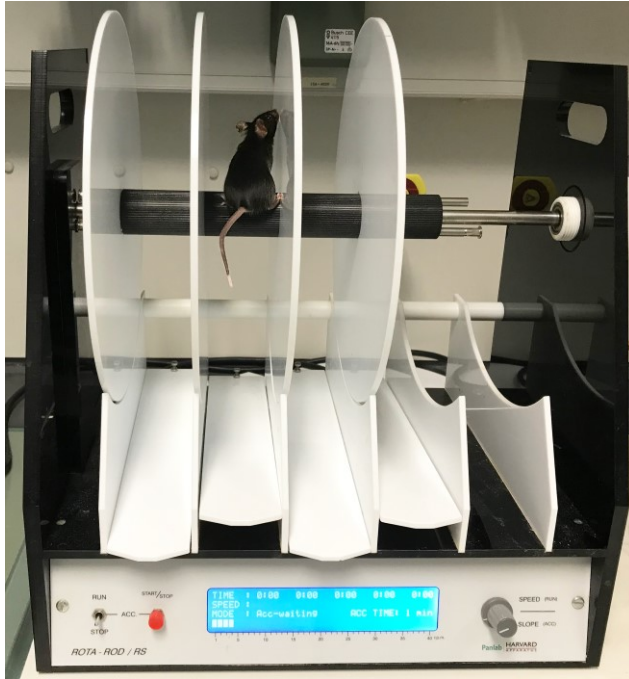
Weight loss over 20% from pre to d1 -> euthanasia					
---	--	--	--	--	--

Abbildung 8: "Modified Neurological Severity Score-Sheet", Beispiel 5 Tage Überleben.

Beurteilung von Reflexen, Allgemeinverhalten [220], Koordination, Balance und Motorik der Versuchstiere.

### 3.3.2 Rotarod (RR) Test

Der Rotarod Test dient der Evaluation von Motorkoordination und Balance [221]. Die Vorteile des Tests gegenüber dem mNSS sind, dass zusätzliche motorische Aspekte beurteilt werden können [222]. Das RR besteht aus einer ca. 15 cm erhöhten, rotierenden Rolle, welche seitlich durch Plastikwände begrenzt ist. Die Rolle ist mit Rillen versehen, um die Griffbarkeit zu erhöhen (**Abbildung 9**). Der RR Test funktioniert folgendermaßen. Zunächst wird die Maus auf die Rolle gesetzt. Die darunterliegende Basisplatte der RR wird angehoben und der Startknopf am Zeitmesser gedrückt. Ab diesem Zeitpunkt wird die Geschwindigkeit, mit der sich die Rolle bewegt, innerhalb von zwei Minuten gleichmäßig von 4 auf 40 Umdrehungen pro Minute erhöht. Ist die Maus nicht mehr in der Lage sich auf der Rolle zu halten, fällt sie herunter, landet auf der Basisplatte und der Zeitmesser stoppt automatisch. Die Laufzeit korreliert hierbei positiv mit der Koordination und Motorfunktion des Tieres. Das verwendete RR in unserem Versuchsvorhaben bietet Platz für 5 Tiere gleichzeitig. Dies ermöglichte uns beide Tiere eines Käfigs gemeinsam laufen zu lassen. Um die Tiere zunächst erst einmal an das RR zu gewöhnen, erfolgen einen Tag vor der Operation vier Trainingsläufe. Hierbei sollen die Tiere z.B. lernen, wie sie sich am besten auf der Rolle halten können und dass das Umdrehen auf der Rolle nicht erwünscht ist. Nach den Trainingsläufen erfolgen zwei Läufe, die als „Baseline“-Werte dienen. An den Tagen 1, 3, 5 (Kohorte 1+2), 7, 14, 21 und 30 (Kohorte 2) nach der Operation werden jeweils zwei weitere Läufe durchgeführt. Für jeden Lauf wird die Zeit sowie die Geschwindigkeit notiert. Der beste Wert pro Tag (längste Laufzeit) wird zu Analyse Zwecken verwendet.



**Abbildung 9: Rotarod.**

**Maus auf dem Rotarod mit hochgeklappter Basisplatte. Rechter Teil des Geräts war zu diesem Zeitpunkt nicht funktional, weshalb keinerlei Trennwände oder Rollen eingebaut sind.**

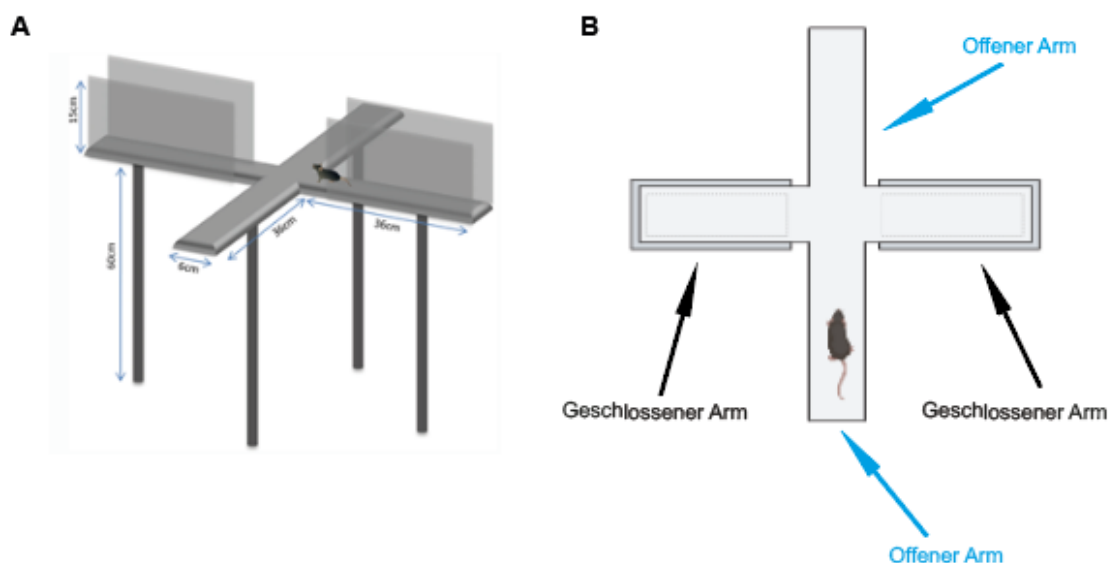
### **3.3.3 „Open Field Test“ (OFT)**

Mit dem OFT kann die generelle Bewegungsaktivität und Angsthähnliches Verhalten von Nagern beurteilt werden [223]. Nager meiden normalerweise offene, hell-beleuchtete Areale und suchen dunkle, geschützte Bereiche auf. Gleichzeitig liegt es in ihrer Natur, ungewohntes zu erkunden. Der Test basiert auf beiden genannten Eigenschaften. Eine 40 x 40 x 40 cm quadratische Box aus grauen Hartplastik dient als „open field arena“. Direkt darüber befindet sich eine Kamera, welche Software gesteuert (EthoVision XT14, Wageningen, NL) die Maus erkennt und ihre exakte Bewegung, während der 3 Minuten Aufenthaltsdauer in der Box, aufzeichnen kann. Eine Lichtquelle, welche auf die Decke des ansonsten dunklen Raumes gerichtet ist, dient als indirekte Beleuchtung für die Arena. Während die Maus die Arena frei erkundet, wird die zurückgelegte Distanz (cm) und die Geschwindigkeit (cm/s) aufgezeichnet. Ergänzend befindet sich ein imaginärer Kreis in der Mitte der Arena (Durchmesser: 23 cm). So kann evaluiert werden, wie viel Zeit die Maus in der Mitte bzw. im restlichen Bereich der Arena verbracht hat und auf den Ängstlichkeitszustand des Tieres geschlossen werden. Zurückgelegte Distanz und Geschwindigkeit dienen hingegen zur Beurteilung der generellen Aktivität. Der OFT kam nur in Kohorte 2 (Langzeitüberleben) zum Einsatz und wurde gemeinsam mit dem mNSS einen Tag *prä-OP* sowie an den Tagen 1, 3, 5, 7, 14, 21 und 30 nach Operation durchgeführt.

### 3.3.4 “Elevated Plus Maze” (EPM) Test

Auch der EPM (Eigenbau) Test kann genutzt werden, um angsthähnliches Verhalten von Nagern zu evaluieren [224]. Eine Beurteilung des Angstverhaltens alleine mit Daten aus dem OFT ist oftmals schwierig und nur wenig aussagekräftig, weshalb zusätzlich noch der EPM Test durchgeführt wird. Auch dieses Modell basiert auf der natürlichen Aversion von Nagern gegenüber offenen Flächen und erhöhten Arealen. Das EPM besteht aus zwei offenen und zwei mit hohen Wänden versehenen, 60 cm hohen Armen, welche über eine gemeinsame zentrale Fläche in Form eines Kreuzes verbunden sind (**Abbildung 10**). Reduziertes Angstverhalten zeigt sich hierbei in Form von längerer Aufenthaltsdauer im Bereich der offenen Arme und häufigeres Betreten der offenen Arme und wird oft im Zusammenhang mit der Verabreichung von *anxiolytischen* Medikamenten beobachtet [225]. Aber auch ein SHT kann das Angstverhalten von Mäusen beeinflussen, weshalb das EPM ein ebenso geeigneter Test hierfür ist [226].

Zur Durchführung des Tests wird die Maus auf die zentrale Fläche mit Blickrichtung eines offenen Arms gesetzt. Anschließend kann das EPM für fünf Minuten frei erkundet werden. Währenddessen zeichnet eine über dem EPM befestigte Kamera, Software (EthoVision XT14, Wageningen, NL) gesteuert, die kumulative Aufenthaltsdauer in den offenen bzw. geschlossenen Armen, die Anzahl des Betretens der offenen bzw. geschlossenen Arme sowie so genannte „head-dips“ auf. Letzteres sind Momente in denen die Maus ihre Nase über den Rand der Plattform hinaus streckt und in die Tiefe schaut. All diese Daten werden anschließend zur Evaluation des Angsthähnlichen Verhaltens herangezogen. Der EPM Test wurde nur in der zweiten Kohorte durchgeführt. Er fand unabhängig von allen anderen Verhaltenstests an Tag 4 und 13 statt.



**Abbildung 10: Schematische Darstellung eines „Elevated Plus Maze“.**

**(A) Ansicht von der Seite modifiziert nach Ari et al. [224] (B) Ansicht von oben (BioRender.com).**

### 3.4 Euthanasie der Versuchstiere und Gehirnentnahme

Nach einer Überlebenszeit von 5 (Kohorte 1) bzw. 30 d (Kohorte 2) werden die Tiere in tiefer Isofluran-Narkose (4 Vol.-% für mind. 90 Sekunden) mittels *Dekapitation* getötet. Das Blut wird in einem 50 ml „Falcon“, welches 80 µl Heparin enthält, aufgefangen und anschließend bei 3800 Umdrehungen/min für 8 Minuten zentrifugiert. Das Plasma wird mit einer Pipette in 1,5 ml Eppendorfgläser transferiert und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Um das Gehirn zu entnehmen, wird zunächst die Kopfhaut *sagittal* mit der Schere von *caudal* nach *rostral* eröffnet. Die Schere wird danach in das *Foramen magnum* eingeführt und die Schädelplatte *dorsal* mit einem Scherenschlag leicht eröffnet. Von diesem Punkt aus wird der Knochen Stück für Stück von *medial* nach *lateral* gebrochen, bis das gesamte Gehirn zur Entnahme frei liegt. Mit einem Spatel wird das Gehirn aus der Schädelhöhle vorsichtig entnommen. In diesem Zug werden auch die Abgänge der Gehirnnerven abgetrennt. Das Gehirn wird in pulverisiertem Trockeneis schockgefroren und in einem Probenbeutel bei -22 °C gelagert. Auch die Schwanzspitze wird entfernt und in ein Kryoröhrchen überführt, um den Genotyp jedes Tieres erneut zu überprüfen.

### 3.5 Histologische Untersuchung der Gehirne

#### 3.5.1 Anfertigung von Kryoschnitten

Zur Anfertigung von Kryoschnitten werden die gefrorenen Mausgehirne zunächst mit Neg-50™ Gefrierschnittmedium (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) im Kryostat (Cryostar™ NX70 Kryostat, Thermo Fisher Scientific, Walldorf, DE) fixiert. Das Gefriermedium sorgt hierbei nicht nur für die Fixation, sondern auch für ein erleichtertes Schneiden im Bereich des Schadens und minimiert Risse in den Schnitten. Zwischen *Bregma*-Level +3,14 mm und -4,36 mm werden in 500 µm Intervallen 12 µm dicke Kryoschnitte über 16 Ebenen angefertigt und auf Objektträger übertragen. Pro Gehirn werden sechs Objektträger mit jeweils 16 Ebenen angefertigt und bei -22 °C gelagert. Zwischen Level 6 und 13 (*Bregma* +0,64 mm und -2,86 mm) (Abbildung 11) werden zusätzlich so genannte Trimschnitte produziert. Dies erfolgt indem pro Level vier 60 µm dicke Schnitte aufeinandergestapelt werden. Anschließend wird das untere Drittel mit einem Skalpell abgetrennt und der Schnitt entlang der Mittellinie in eine *kontra-* und *ipsiläsionale Hemisphäre* geteilt und in Kryoröhrchen (jeweils eins für *ipsi-* und eins für *kontralateral*) überführt und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

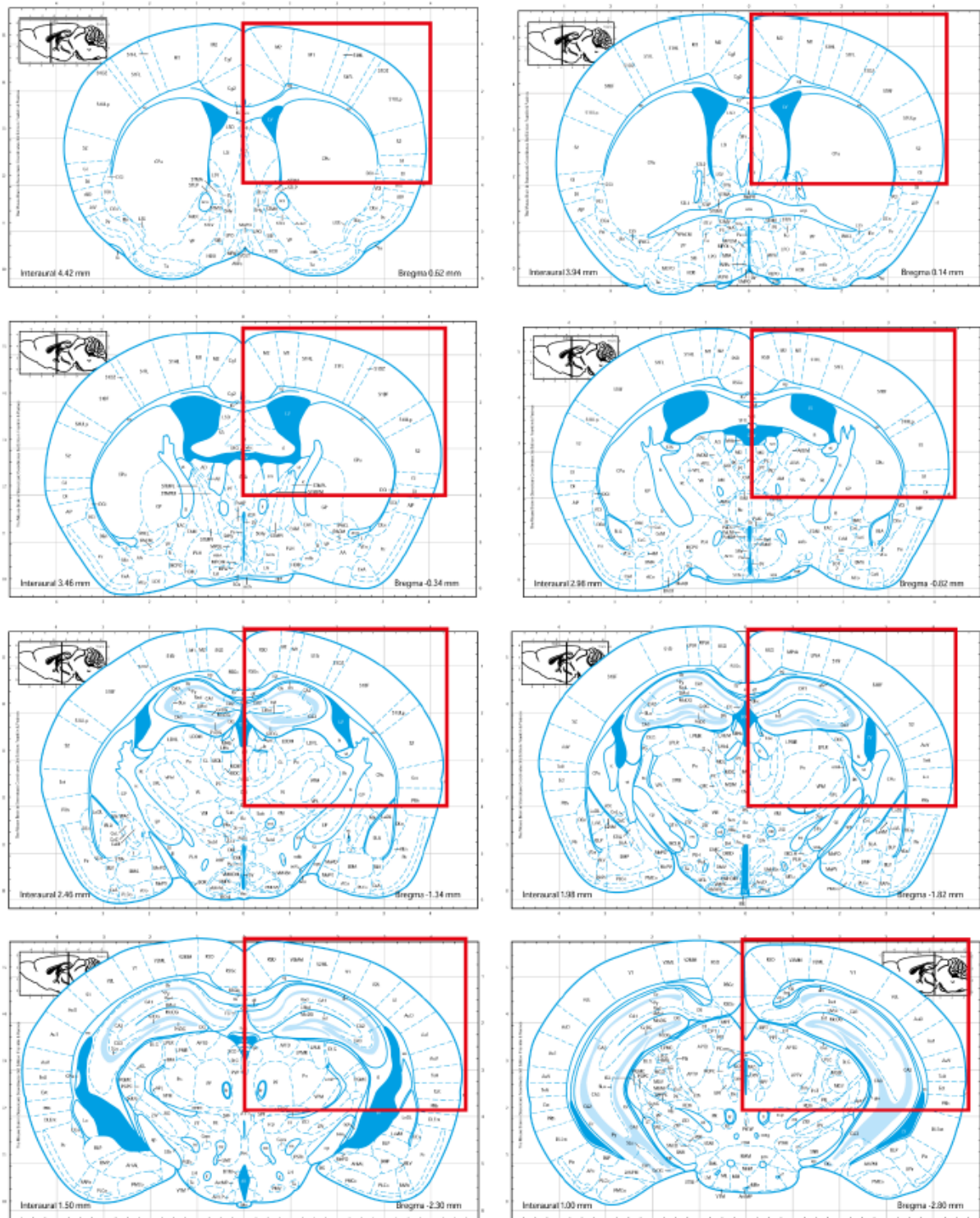


Abbildung 11: Schematische Darstellung von *Bregma*-Leveln.

Diese resultieren aus serieller Anfertigung von Kryoschnitten zwischen +0,62 mm und -2,80 mm. Die roten Kästen zeigen die *ipsilateralen* gesammelten Bereiche von CCI- (Läsion nicht dargestellt) bzw. „Sham“-Mäusen, die für weitere Prozessierung z.B. qPCR verwendet wurden [94].

CCI = „Controlled Cortical Impact“, qPCR = quantitative Polymerasekettenreaktion.

### 3.5.2 Kresylviolett-Färbung nach Nissl

Die Kresylviolett-Färbung ist eine klassische histologische Färbung zur Beurteilung von Neuronen. Kresylviolett bindet hierbei an die *basophilen* Strukturen wie DNA und RNA und sorgt so für eine intensive bläuliche Farbe des Zellkerns. Besonders intensiv färbt sich auch der Bereich des endoplasmatischen Retikulums durch seine Vielzahl von Ribosomen und ribosomaler RNA an. Dieser Bereich des Neurons wird nach dem Münchner Neurologen und Psychiater Franz Nissl auch Nissl-Schollen genannt [227], weshalb die Färbung auch als Nissl-Färbung bekannt ist [228]. Im Gegensatz zu oben genannten Strukturen des Neurons, befinden sich in den Axonen und Dendriten keinerlei Zellorganellen, so dass diese Bereiche ungefärbt bleiben.

Die Herstellung der Kresylviolett-Färbelösung ist Punkt 2.3 zu entnehmen. Die Kryoschnittobjektträger werden zunächst eine Stunde bei Raumtemperatur getrocknet und danach für 2 min in 70 % Ethanol getaucht, um überschüssiges Gefriermedium zu entfernen. Anschließend werden die Objektträger für 10 Minuten in die Kresylviolett Lösung getaucht. Um überschüssige Farbe zu entfernen, werden sie zunächst zwei Mal kurz in Aqua dest. überführt. Zur Dehydrierung werden sie danach jeweils zwei Mal in eine aufsteigende Ethanolreihe (70 %, 96 % und 100 % Ethanol) eingetaucht. Eine Behandlung mit 5 min bzw. 2 min. Roti-Histol® sorgen für die Hyalinisierung. Als letzter Schritt werden die Schnitte mit Roti-Histokitt® eingebettet, so dass ein Ausbleichen verhindert wird und sie bei Raumtemperatur gelagert werden können.

### 3.5.3 Hematoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)

Die HE-Färbung wird durchgeführt, um in Kohorte 1 (Kurzzeitüberleben) das *Hämatom*-Areal zu bestimmen. Die Durchführung erfolgt entsprechend eines Standardprotokolls, was nachfolgend kurz erläutert wird. Zunächst erfolgt eine Trocknung bei Raumtemperatur für 20 min. Der Reihe nach werden die Schnitte in 100 % (10 min), 96 % (1 min) und 70 % Ethanol (1 min) getaucht und rehydriert. Darauf folgt ein zweimaliges, kurzes Waschen in Aqua dest. mit anschließendem Tauchen in Hemalaun für 1 min. Anschließend wird erst für 10 min mit Leitungswasser gewaschen, dann erneut zweimal kurz in Aqua dest. getaucht bevor die Schnitte für 75 s mit Eosin gefärbt werden. Danach folgt das Waschen in Aqua dest. mit anschließender *Dehydrierung* in 70 % (5 min), 80 % (2 min 30 s), 96 % (1 min) und 100 % Ethanol (1 min). Zuletzt wird 2 min bzw. danach 5 min Roti-Histol® appliziert und am Schluss mit Roti-Histokitt® eingebettet. Die Lagerung erfolgt ebenfalls bei Raumtemperatur.

### 3.5.4 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie (IHC) ist eine Technik, um spezifische Antigene in Gewebeproben sichtbar zu machen [229]. Grundsätzlich werden zwei Arten von Färbungen unterschieden.

Die indirekte Färbung erfolgt in einem zweistufigen Prozess. Zunächst bindet der primäre Antikörper an die gewünschte Zielstruktur in der Gewebeprobe. In einem zweiten Schritt bindet ein Fluorophor-gekoppelter sekundärer Antikörper wirtsspezifisch an den primären Antikörper und somit indirekt auch an das Antigen.

Bei der direkten Färbung wird hingegen ein Fluorophor gekoppelter primärer Antikörper, wie z.B. anti-CD68 mit dem Fluorophor BV421 (BD Biosciences, Allschwil, Schweiz), verwendet, so dass kein sekundärer Antikörper benötigt wird.

Eine Verwendung verschiedener, passender Primär- und ggf. Sekundärantikörperpaare ermöglicht mehrere Antigene in einer Gewebeprobe farblich nachzuweisen.

Bei Raumluft werden die Kryoschnitte für 30 min getrocknet. Mit dem Dako pen werden die zu färbenden Ebenen (Level 11-13: *Bregma*  $\approx$  -1,32 mm, -1,82 mm, -2,32 mm) auf dem Objektträger umrandet und die restlichen Ebenen mit einem Ethanol-getränkten Wattetupfer entfernt. Die Objektträger werden in Färbeküvetten überführt und mit 4 % PFA 10 Minuten fixiert. Anschließend wird auf einem Orbitalschüttler mit Dulbecco's PBS für 10 min gewaschen. Die Objektträger werden dann in eine dunkle Feuchtigkeitskammer überführt und mit Blockierlösung (5 % NGS, 0,5 % BSA und 0,1 % Triton-X in PBS) für eine Stunde inkubiert, um unspezifische Antikörperbindung zu verhindern. Die Blockierlösung wird verworfen und die Schnitte werden mit 200  $\mu$ l primärer Antikörperlösung (Blockierlösung plus primäre Antikörper) bedeckt und bei 4 °C über Nacht in der dunklen Feuchtigkeitskammer inkubiert. Am nächsten Tag werden ungebundene primäre Antikörper durch dreimalige Waschung in PBS für 10 min auf einem Orbitalschüttler entfernt und die Schnitte mit 200  $\mu$ l sekundärer Antikörperlösung (Blockierlösung plus sekundäre Antikörper) bedeckt. Die Inkubationszeit in der dunklen Feuchtigkeitskammer beträgt 1 h bei Raumtemperatur. Unter Ausschluss von Licht erfolgt erneutes Waschen in PBS für 3 x 10 min. Danach werden die Schnitte mit Immu-mount und Deckgläsern eingedeckt und am nächsten Tag mit Nagellack seitlich verschlossen, um Eindringen von Luft zu verhindern und die Haltbarkeit zu verlängern. Eine Tabelle mit den verwendeten Antikörpern ist unter Punkt 2.7 zu finden.

### 3.5.5 Histopathologische Analysen

In beiden Kohorten wurden Aufnahmen von Kresylviolett- und in Kohorte 1 zusätzlich von HE-gefärbten Schnitten mit einem Stereomikroskop Stemi 305 (Carl Zeiss Microscopy Deutschland GmbH, Oberkochen, DE) und daran gekoppelter Kamera Axiocam (Carl Zeiss Microscopy Deutschland GmbH, Oberkochen, DE) erstellt. Die Quantifizierung des

Läsionsvolumens bzw. des verbliebenen gesunden Hirngewebes sowie die Messung der Dicke der Körnerzellschicht erfolgte mit der Software Zen 3.5 blue (Carl Zeiss Microscopy Deutschland GmbH, Oberkochen, DE). Die Größe des *Hämatoms* wurde mit ImageJ Version 1,53a (National Institutes of Health; Bethesda, MD, USA) ermittelt. Immunhistochemische Bilder des gesamten Gehirns sowie der Mittellinie wurden an einem Fluoreszenzmikroskop (BZ-X-800 Keyence, Ōsaka, JP) aufgenommen. Die quantitative Auswertung erfolgte mit ImageJ (ImageJ, RRID:SCR\_003070).

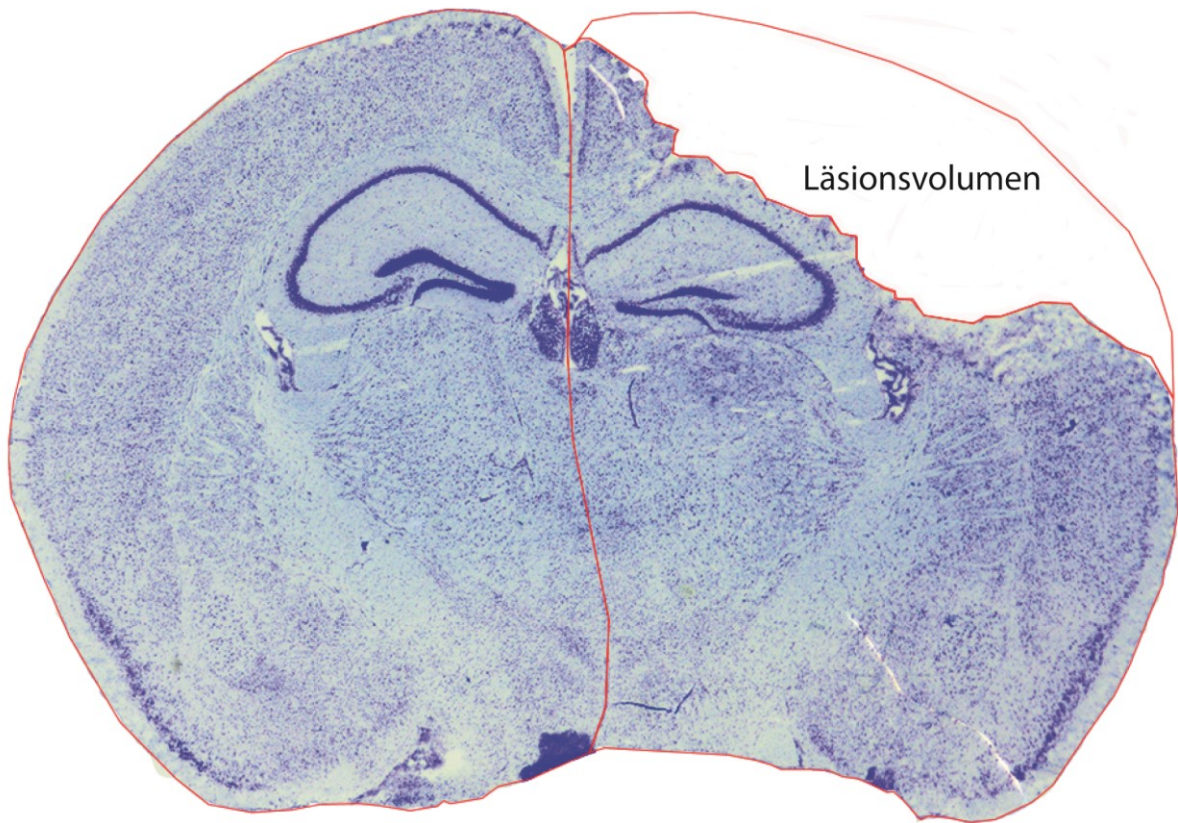
### **3.5.5.1 Bestimmung des Läsionsvolumens (Kohorte 1: 5d Überleben) bzw. verbliebenen gesunden Hirngewebes (Kohorte 2: 30d Überleben)**

Gesundes Hirngewebe stellt sich in der Nissl-Färbung blau-lila dar, während die Läsion nicht angefärbt wird und so eine klare Abgrenzung ermöglicht. Für die Quantifizierung des Läsionsvolumens sind individuelle Aufnahmen von allen 16 Ebenen des Gehirns notwendig. Die Auswertung der Kohorte 1 beinhaltete die Messung der gesamten *kontralateralen Hemisphäre* als Basis für die Größenschätzung der ursprünglichen *ipsilateralen Hemisphäre* vor CCI sowie den gesunden Teil der *ipsilateralen Hemisphäre* (Abbildung 12 A). Die Kalkulation besteht zunächst aus Multiplikation des Flächenmittelwerts aller 16 Ebenen mit 0,5. Danach wird die *ipsilaterale Hemisphäre* ohne Läsion von der gesamten *ipsiläsionalen* Fläche abgezogen (Formel siehe unten). Um das relative Läsionsvolumen zu ermitteln, welches für die Auswertung genutzt wurde, wird das Läsionsvolumen durch das Volumen der *ipsilateralen Hemisphäre* geteilt.

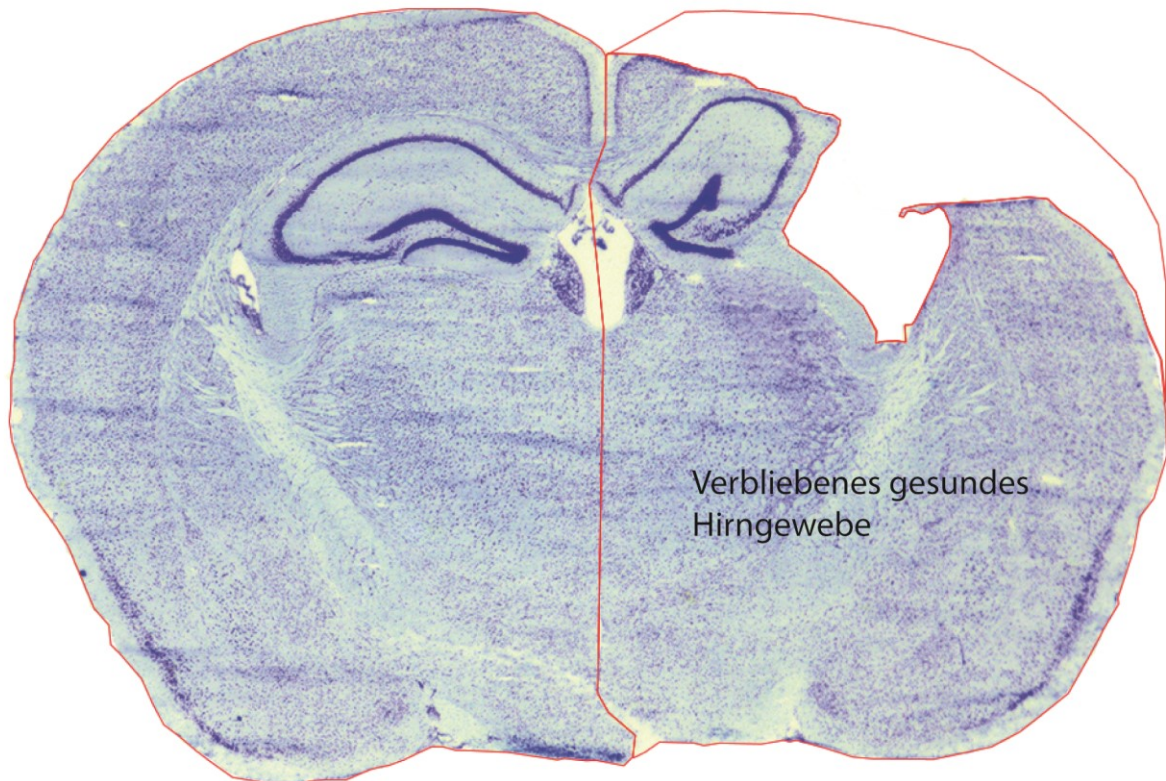
$$V = \sum_{1}^{16} A \times 0.5 \text{ mm}$$

Aufgrund der Problematik, dass 30 d nach der Induktion des CCI oftmals eine Deformation des *Hippocampus* sowie eine Öffnung der Seitenventrikel entsteht, die die Größe des Läsionsvolumens beeinflussen könnte, wird stattdessen das verbliebene gesunde Hirngewebe aller 16 Schnittebenen ermittelt. Hierfür wird zunächst die Gesamtgröße der *kontralateralen Hemisphäre* gemessen und gleich wie in Kohorte 1 auf die ursprüngliche Größe der *ipsiläsionalen Hemisphäre* vor CCI geschätzt. Anschließend wird das verbliebene gesunde Hirngewebe der *ipsiläsionalen Hemisphäre* vermessen (Abbildung 12 B). Das gesunde Hirngewebe der *ipsiläsionalen Hemisphäre* wird nun durch die Gesamtgröße der *ipsiläsionalen Hemisphäre* geteilt, um den prozentualen Anteil zu ermitteln.

**A**



**B**



**Abbildung 12: Schematische Darstellung der Vermessung des Läsionsvolumens bzw. verbliebenen gesunden Hirngewebes.**

(A) Vermessung des Läsionsvolumens 5 Tage nach Trauma bzw. (B) verbliebenen gesunden Hirngewebes 30 Tage nach Trauma mit Zen 3.5 blue edition. Die roten Linien zeigen die gemessenen Bereiche in beiden Kohorten an.

### 3.5.5.2 Quantifizierung der Körnerzellschicht-Dicke des Gyrus dentatus

Eine reduzierte Dicke der Körnerzellschicht des *Gyrus dentatus* gilt als verlässlicher Parameter, um die Hirnschädigung abseits der eigentlichen Läsion in unserem SHT Modell zu beurteilen [100, 230]. Deshalb wird in beiden Kohorten die Körnerzellschicht-Dicke des *Gyrus dentatus* auf der Basis zweier Kryoschnitte zwischen den *Bregma*-Leveln  $\approx -1,82$  mm und  $-2,18$  mm ausgemessen. Pro Tier werden zwei Schnittebenen beurteilt. Die Dicke wird jeweils *ipsi-* und *kontraläsional* an drei verschiedenen Abschnitten (innen, zentral und außen) des Gyrus dentatus gemessen (Abbildung 13). Es ist darauf zu achten, dass die zu messenden Abschnitte beider *Hemisphären* vergleichbar gewählt werden und die Messlinien stets senkrecht zur Struktur gezeichnet werden, um keine falschen Messergebnisse zu generieren. Das Messergebnis wird in  $\mu\text{m}$  mit zwei Nachkommastellen notiert. Pro Tier wird zunächst der Mittelwert aus den gemessenen Werten pro *Hemisphäre* berechnet und danach das Verhältnis von *ipsi-* zur *kontraläsionaler* Dicke gebildet.

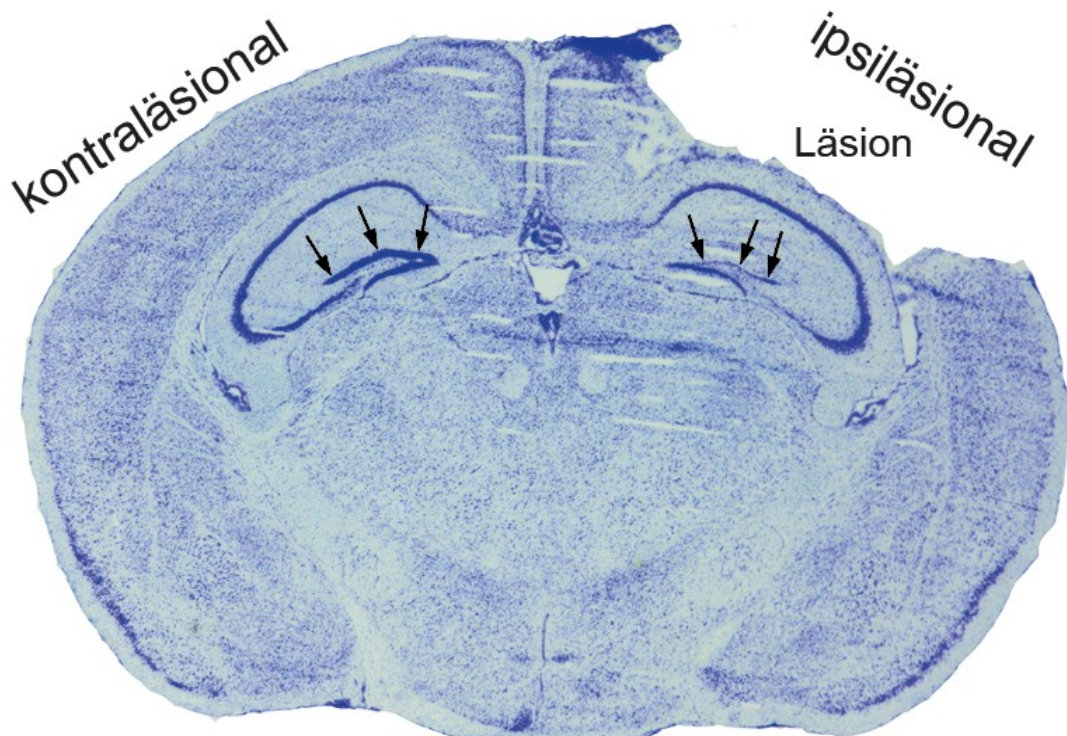


Abbildung 13: Schematische Darstellung der Messpunkte zur Bestimmung der Dicke der Körnerzellschicht des *Gyrus dentatus*.

Bestimmt wird die Dicke im Bereich von drei Punkten – außen, zentral und innen. Die schwarzen Pfeile zeigen die entsprechenden Positionen am Beispiel eines Tieres aus der Kohorte 1.

### 3.5.6 Bestimmung der Hämatomgröße

In Kohorte 1 wird zur Ermittlung der Hämatomgröße die Software ImageJ (ImageJ, RRID:SCR\_003070) verwendet. Das *Hämatom* (Abbildung 14 A) wird mit dem „Zauberstab“-Werkzeug bei optimal eingestellten Schwellenwert (Abbildung 14 B) ausgewählt und anschließend durch das „Vermessung“-Plugin analysiert. Für jedes Tier werden vier aufeinanderfolgende Schnittebenen (*Bregma*-Level +0,14 mm bis -1,38 mm) beurteilt und daraus der Mittelwert errechnet.

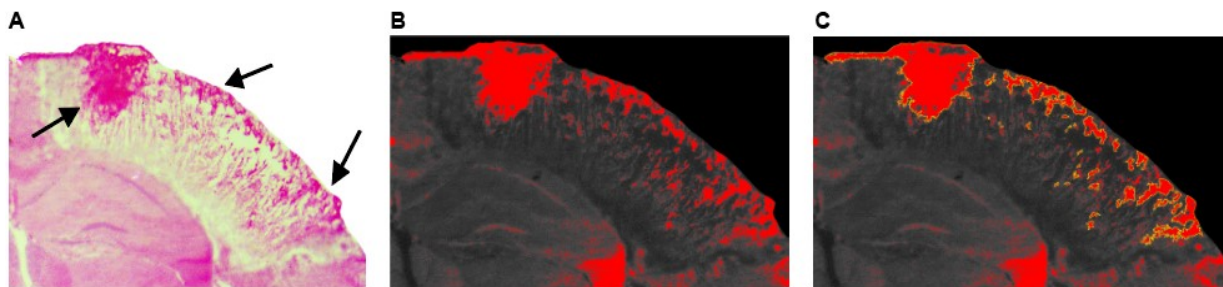


Abbildung 14: Schematische Darstellung der Beurteilung der Hämatomgröße mit ImageJ.

(A) Originalbild mit sichtbaren Hämatombereichen (schwarze Pfeile). (B) Adäquate SchwellenwertEinstellung in ImageJ. (C) Mit Hilfe des Zauberstab-Werkzeugs ausgewählte Hämatombereiche (rote Flächen mit gelber Umrandung) in ImageJ.

### 3.5.7 Auswertung immunhistochemischer Aufnahmen

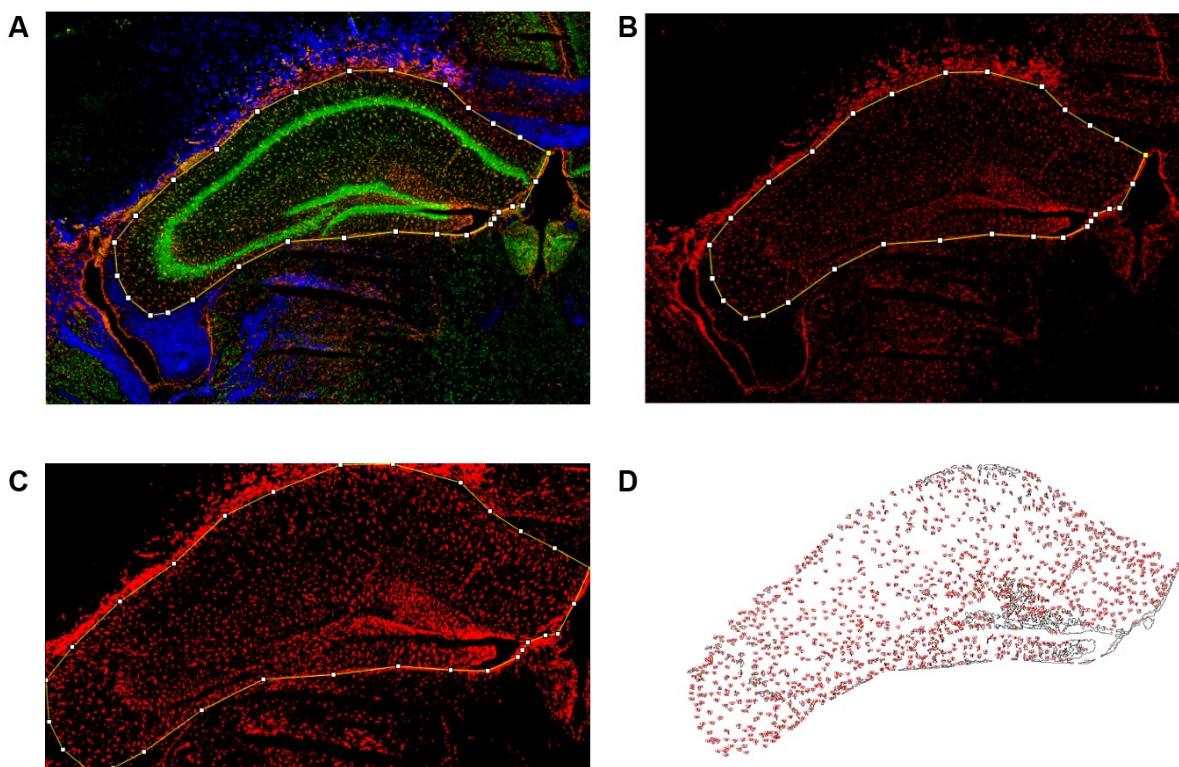
#### 3.5.7.1 *Periläsionaler lateraler und medialer Cortex cerebri, Hippocampus und Thalamus*

Die Auswertung immunhistochemischer Aufnahmen erfolgte durch Markierung der auszuwertenden Region (*medialer* und *lateralen periläsionalen Cortex, Hippocampus* und *Thalamus*) mit dem „Polygon“ Werkzeug (Abbildung 15 A), Auswahl des gewünschten Farbkanals (Abbildung 15 B) und anschließend unter Einstellung adäquater Schwellenwerte (Abbildung 15 C) und dem „Vermessungs“-Plugin. Alle Zellen mit einer Partikelgröße von 20-5000 wurden analysiert (Abbildung 15 D). Pro Tier wurden zwei aufeinanderfolgende Schnittebenen ausgewertet und anschließend der Mittelwert der gezählten Zellen (GFAP und CD68) bzw. der Mittelwert der auszuwertenden Region (NeuN) zur Berechnung herangezogen. Auf dieser Basis wurden die Zellen/mm<sup>2</sup> (GFAP und CD68) mit unten aufgeführter Formel berechnet.

$$\text{Zellen pro mm}^2 = \frac{\text{Mittelwert gezählter Zellen}}{\text{Mittelwert gemessene Fläche}} \times 1000000$$

Für NeuN war eine Auswertung auf Basis Zellen pro mm<sup>2</sup> nicht möglich. Dies liegt daran, dass die NeuN positiven Bereiche so viele Zellen enthalten, dass das Programm ImageJ die einzelnen Zellen nicht mehr ausreichend voneinander abgrenzen konnte. Um eine Verzerrung der Ergebnisse zu verhindern, wurde der gesamte Bereich NeuN positiver Zellen im Vergleich zur Gesamtfläche, die mit dem Polygon-Werkzeug ausgewählt wurde, ins Verhältnis gesetzt. Nachfolgend findet sich ebenfalls die Formel zur Auswertung.

$$\% \text{ Fläche NeuN}^+ \text{ Zellen} = \frac{\text{Mittelwert Fläche NeuN}^+ \text{ Zellen}}{\text{Mittelwert gesamte Fläche}}$$



**Abbildung 15:** Schematische Darstellung der Auswertung von immunhistochemischen Aufnahmen am Beispiel des *Hippocampus*.

(A) Ausgewählter *Hippocampus* Bereich mit Neun<sup>+</sup> (grün), GFAP<sup>+</sup>(rot) und CD68<sup>+</sup> (blauen) Zellen. (B) *Hippocampus* Bereich mit GFAP<sup>+</sup> Zellen. (C) *Hippocampus* Bereich mit optimalen Schwellenwert. Die intensiv rote Farbe markiert die zu zählenden Zellen. (D) Zellumrisse, die für die weitere Analyse mit dem „Vermessungs“-Werkzeug ausgewählt wurden. CD68 = „cluster of differentiation 68“, GFAP = „glial fibrillary acidic protein“.

### 3.5.7.2 MRC1<sup>+</sup> Zellen entlang der Mittellinie

Die Analyse der MRC1<sup>+</sup> Zellen entlang der Mittellinie beinhaltete zunächst die Längenbestimmung der Mittellinie mit dem „Geraden“-Werkzeug. Anschließend wurde der Bereich um die Mittellinie, der die auszuwertenden Zellen enthielt, mit dem „Polygon“-Werkzeug markiert. Der gewünschten Farbkanal (grün) wurde ausgewählt und nachfolgend

unter Einstellung des adäquaten Schwellenwerts und dem „Vermessungs“-Plugin die Zellzahl bestimmt. Alle Zellen mit einer Partikelgröße von 20-5000 wurden analysiert. Die Zellzahl wurde im Anschluss daran durch die Länge der Mittellinie geteilt, sodass sich MRC1<sup>+</sup> Zellen/mm Mittellinie ergab. Pro Tier wurden zwei aufeinanderfolgende Schnittebenen ausgewertet und anschließend der Mittelwert verwendet.

## **3.6 Molekularbiologische Methoden**

### **3.6.1 RNA-Extraktion aus Hirngewebe**

Zur Extraktion der RNA wird das Qiagen Rneasy<sup>®</sup> plus Universal Micro-Kit (Qiagen GmbH; Hilden, DE) verwendet. Die RNA wird aus Trimschnitten, welche bei der Kryoschnittanfertigung gewonnen und in Kryogefäßen bei 80 °C zwischengelagert wurden, extrahiert. Die Trimschnitte werden in 2 ml Eppendorfgefäße gemeinsam mit einer Metallkugel und 450 µl Qiazol-Reagenz überführt. Zur mechanischen Destruktion werden die Eppendorfgefäße zwei Mal für jeweils eine Minute bei einer Frequenz von 20 Hz in einen Gewebehomogenisator (Mastermill MM 300, Retsch Technology GmbH, Haan, DE) gestellt. Zwischen beiden Rüttelvorgängen muss die Platte gewendet werden. Anschließend erfolgt eine Inkubation bei Raumtemperatur für 5 Minuten. 50 µl gDNA Eliminator wird hinzugefügt und 15 Sekunden gevortext. Danach werden 90 µl Chloroform mit anschließend gleichen Vortex-Prozedere hinzugefügt und es folgt eine Inkubation bei Raumtemperatur für 2-3 Minuten. Nun werden die Eppendorfgefäße für 15 Minuten bei 12000 Umdrehungen/min (rpm) bei 4 °C zentrifugiert. Durch die Zentrifugation entstehen drei Phasen: Eine farblose, wässrige Phase, welche die RNA enthält, eine weiße DNA-haltige Zwischenphase und eine rote Phase, die organische Reste enthält. Die wässrige, RNA-haltige Phase wird in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt, die bereits 300 µl 70 % Ethanol enthalten und kurz gemixt. Bis zu 700 µl der Probe werden nun in Rneasy Micro Säulen überführt und bei Raumtemperatur und 10000 rpm für 15 s zentrifugiert. Die Flüssigkeit im Sammelgefäß wird anschließend verworfen. Dies gilt auch für die zwei folgenden Zentrifugationsschritte. Als nächstes werden 700 µl RWT Puffer in die Micro Säule pipettiert und bei ebenfalls 10000 rpm für 15 s zentrifugiert. Gleich verfahren wird nach der Zugabe von 500µl RPE Puffer. Als nächstes werden 500 µl 80 % Ethanol auf die Mikrosäule pipettiert und bei gleicher Einstellung der Zentrifuge für 2 Minuten zentrifugiert. Die Microsäulen werden nun in neue Sammelgefäße überführt und mit offenen Deckeln bei 13000 rpm für 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Um die RNA aus der Microsäule zu lösen, wird im letzten Schritt diese mit 20 µl RNase-freien Wasser aus dem Filter herausgespült. Die Microsäulen werden sicherheitshalber aufgehoben bis die RNA-Konzentrationsmessung erfolgt ist.

### 3.6.2 Konzentrationsmessung der RNA

Mit einem BioPhotometer (Eppendorf AG; Hamburg, DE) wird die Konzentration der extrahierten RNA ermittelt. Hierfür muss das Photometer zunächst mit 2 µl RNase-freien Wasser kalibriert werden. 2 µl der entsprechenden Probe werden anschließend zur Messung verwendet. Sollten Konzentrationen über 1,0 µg/µl gemessen werden, ist eine weitere Verdünnung notwendig. Sind die gemessenen Werte dagegen zu niedrig, wird die Probe ein zweites Mal auf die ursprüngliche Mikrosäule pipettiert und bei Raumtemperatur und 10000 rpm zentrifugiert werden. Die Reinheit der RNA wird mittels eines Quotienten aus zwei Spektren angegeben [A260/A280]. Ersteres steht hierbei für Nukleinsäuren, die Licht einer Wellenlänge von 260 nm und letzteres für Proteine, die im Bereich von 280 nm absorbieren. Ein Verhältnis zwischen 1,8 und 2,1 indiziert eine sehr reine RNA [231]. Als weiteren Wert zur Beurteilung der Reinheit der RNA kann das Verhältnis aus A260 zu A230 herangezogen werden. Das Absorptionsspektrum von 230 nm entspricht dabei anderen Kontaminationen wie Kohlenhydraten oder Phenolresten aus dem Extraktionsprozess. Zu erwartende Werte reiner RNA für [A260/A230] liegen zwischen 2,0 und 2,2 [232].

### 3.6.3 cDNA-Synthese

Zur Synthese der cDNA wird das QuantiTect® Reverse Transkription Kit (Qiagen GmbH; Hilden, DE) verwendet. Im ersten Schritt werden 1 µg RNA (aus der RNA Extraktion) mit 2 µl gDNA W-Puffer (DNase) gemischt und mit RNase-freien Wasser auf ein Gesamtvolumen von 14 µl aufgefüllt. Anschließend wird bei 42 °C für 8 Minuten die verbliebene genomische DNA verdaut. Um pro Probe ein Gesamtvolumen von 20 µl herzustellen, wird 1 µl Quantiscript RTranskriptase (reverse Transkriptase), 4 µl Quantiscript RT-Puffer, 1 µl RT-Primer Mix sowie die 14 µl RNA gemeinsam in ein 0,5 ml „Tube“ pipettiert. Es folgt eine Inkubation bei 42 °C für 30 Minuten mit anschließendem Transfer der „Tubes“ auf Eis. Zur Inaktivierung der reversen Transkriptase werden die Proben für 3 Minuten auf 95 °C erhitzt. Im letzten Schritt wird jede Probe 1:2 mit H<sub>2</sub>O verdünnt und bei -20 °C gelagert.

### 3.6.4 Quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR)

Quantitative Polymerasekettenreaktion oder auch besser als qPCR bekannt ist eine sensitive und spezifische Technik, um Nukleinsäuren in Form von mRNA nachzuweisen [233]. Für die Durchführung der qPCR bedarf es allerdings cDNA, welche deshalb im Schritt zuvor hergestellt wird. Die einfachste Möglichkeit das PCR Produkt zu quantifizieren, ist die Nutzung von DNA-Farbstoffen. Diese Fluoreszenzfarbstoffe binden an die kleine Furche der doppelsträngigen DNA. Die Menge des emittierten Fluorophors, welche im Laufe der qPCR Zyklen entsteht, ist dabei proportional zur Menge der amplifizierten DNA. Mittels zuvor

etablierter Standardkurven für jedes Target, kann in unserem Labor die Konzentration der DNA und damit indirekt der mRNA bestimmt werden [234]. Mit Hilfe eines Referenzgens wird anschließend eine relative Quantifizierung der gemessenen Werte bei gleichzeitiger Effizienzkorrektur und anschließender Normalisierung durchgeführt. Diese Methode nennt sich E-Methode oder Pfaffl Methode. Durch die Berücksichtigung der Effizienzunterschiede zwischen Target- und Referenzgen eignet sich diese Methode besonders gut zur Analyse geringer Unterschiede in der Genexpression. Weiterhin bietet die Methode den Vorteil, dass Target- und Referenzgen sich nicht auf der gleichen Platte befinden müssen sowie, dass auch nur Teile der Platte s.g. „subsets“ analysiert werden können [235, 236].

Als Referenzgen wird Peptidylprolyl-Isomerase A genutzt. Der Vorteil dieses Gens liegt darin, dass es keiner Regulierung nach CCI unterliegt. Alle qPCR Experimente dieses Forschungsvorhabens werden entweder mit Primaquant (Steinbrenner Laborsysteme GmbH; Wiesenbach, DE) oder Absolute Blue (Thermo Scientific; Braunschweig, DE) SYBR Green Master Mix und dem SYBR Green Programm am LightCycler durchgeführt.

Die Proben werden auf eine 96-Well-Platte pipettiert und pro Tier und Target wird jeweils ein Duplikat erstellt. Aus beiden Werten wird später der Mittelwert gebildet und für die Auswertung verwendet.

Eine Tabelle mit den verwendeten Targets und entsprechenden Primern ist unter Punkt 2.6 zu finden.

**Tabelle 15: Master-Mix für das SYBR Green qPCR Programm.**

<b>Reagenz</b>	<b>Volumen pro Probe [µl]</b>
SYBR Green Master Mix	5
Forward primer	0,25
Reverse primer	0,25
Destilliertes H <sub>2</sub> O	4,5
cDNA	1

**Tabelle 16: SYBR Green qPCR Programmschritte.**

**Das Absolute Blue bzw. Primaquant Kit benötigt unterschiedliche Zeiten je Programmschritt, weshalb die Zeitdarstellung folgendermaßen aussieht: Absolute Blue/Primaquant.**

	qPCR Schritt	Temperatur [°C]	Zeit [s]
	<b>Präinkubation</b>	<b>95</b>	120/900
50 Zyklen	<b>Denaturierung</b>	<b>95</b>	10/8
	<b>Primerhybridisierung</b>	<b>58</b>	10/5
	<b>Elongation</b>	<b>72</b>	15/20
	<b>Schmelzen</b>	<b>95</b>	5
	<b>Startpunkt</b>	<b>55</b>	60
	<b>Schmelzkurve</b>	<b>97</b>	Kontinuierliche Steigerung um 2,2 °C/s.
	<b>Kühlen</b>	<b>40</b>	10

### 3.6.5 RNA-Sequenzierung und Auswertung

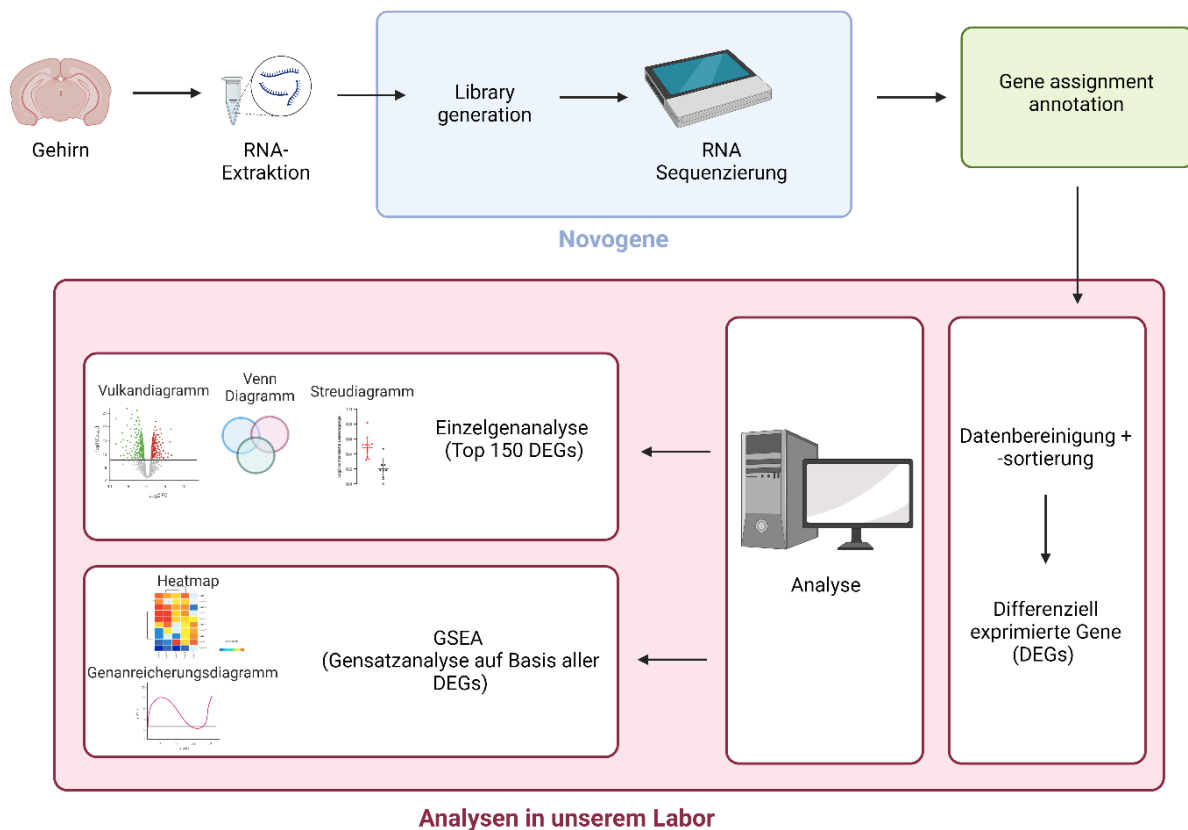
In Kohorte 1 wurde RNA aus Gehirnschnitten, wie in Abschnitt 3.6.1 beschrieben, extrahiert. Zunächst wurde die RNA mit dem RNAeasy Kit (Qiagen GmbH; Hilden, DE) aufgereinigt, die Menge mit Qubit 2.0 (Thermo Fisher Scientific; Walldorf, DE) bestimmt und schließlich die Qualität mit dem Agilent 2100 Bioanalyzer und dem RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies, Waldbronn, DE) geprüft. Proben mit einem RIN-Wert >8, welcher genutzt wird, um die RNA Integrität abschätzen zu können, wurden auf Trockeneis an die Firma Novogene (Novogene; Cambridge, UK) zur Durchführung der RNA-Sequenzierung geschickt. Die RNA-Sequenzierung wird mit einem Illumina NovaSeq 6000-Sequenzierungssystem (Illumina; San Diego, CA, USA) mit einer Sequenzierungstiefe von 30 Mio. „paired end reads“ (150 Zyklen) pro Probe durchgeführt. Die Qualität der Proben wird mit Hilfe von fastq.gz Dateien vor Ort bewertet. Die weitere Verarbeitung der Daten erfolgt mit der Software CLC Genomics Workbench (v21.0.5) von Qiagen mit den Standardeinstellungen für die RNA-Sequenzierungs-Analyse.

Die Ergebnisse aus diesem Analyseschritt beinhalten die Anzahl der kartierten Lesevorgänge, Ziellänge, Quelllänge und -position, Strang, Gene und Gen-IDs und werden mit ArrayStar 17 dargestellt.

Die von Novogene generierten Daten werden in unserem Labor log<sub>2</sub>-transformiert und die Ergebnisse in Form von differenziell exprimierten Genen (DEGs) als Streu- und Vulkandiagramme zum leichteren Verständnis präsentiert.

Venn-Diagramme dienen des Weiteren zur Darstellung von Schnittmengen unterschiedlicher Gruppen.

Alle DEGs werden des Weiteren mit Gene Set Enrichment Analysis (GSEA (<http://www.gsea-msigdb.org>)) untersucht, um funktionelle Auswirkungen hoch- oder herabregulierter Gene zu bewerten und ein Gen-Ranking zu erstellen [237]. Auf Basis dieser Ergebnisse werden „heatmaps“ zur Veranschaulichung von Genexpressionsmustern generiert sowie biologische Prozesse und Zustände in Form von Genanreicherungsdiagrammen dargestellt. Der p-Wert wird hierfür auf 0,05 sowie der q-Wert auf 0,25 festgelegt. Das GSEA Programm gibt dennoch alle signifikant hochregulierten Prozesse für  $p < 0,05$  - unabhängig vom q-Wert an. Eine vereinfachte Darstellung der Abläufe ist Abbildung 16 zu entnehmen.



**Abbildung 16: Vereinfachte Darstellung der Auswertung der RNA-Sequenzierung.**

### 3.7 Statistische Auswertung

In beiden Kohorten wurden die Daten mit der Software GraphPad Prism 9.0 (GraphPad Software, Boston, MA, USA) analysiert und graphisch aufbereitet. Extremwerte wurden mit dem ROUT Test identifiziert und aus weiterführenden Analysen ausgeschlossen. Entsprechende Informationen zum Ausschluss von Extremwerten sind den Legenden zur Abbildung zu entnehmen. Die Datenverteilung wurde mit dem Shapiro Wilk Test untersucht.

In Kohorte 1 wurden überwiegend Mehrgruppen-Vergleiche mit der zweifaktoriellen Varianzanalyse und anschließenden Holm-Šídák's post-hoc Test durchgeführt und männliche und weibliche Mäuse separat analysiert. Teilweise musste aufgrund ungleicher Stichprobengröße zu unterschiedlichen Zeitpunkten auf eine spezielle Version der zweifaktoriellen Varianzanalyse „mixed-effect-analysis“ und anschließenden Holm-Šídák's post-hoc Test zurückgegriffen werden. Für die Auswertung der Immunfluoreszenzaufnahmen wurde auf die einfaktorielle Varianzanalyse zurückgegriffen.

In Kohorte 2 wurden männliche und weibliche Mäuse aufgrund von ungleicher Geschlechts- und Genotypenverteilung nicht geschlechtergetrennt ausgewertet. Die Auswertung erfolgte dennoch grundsätzlich gleich wie in Kohorte 1 in Abhängigkeit von Vorhandensein gleicher bzw. ungleicher Stichprobenanzahlen pro Zeitpunkt.

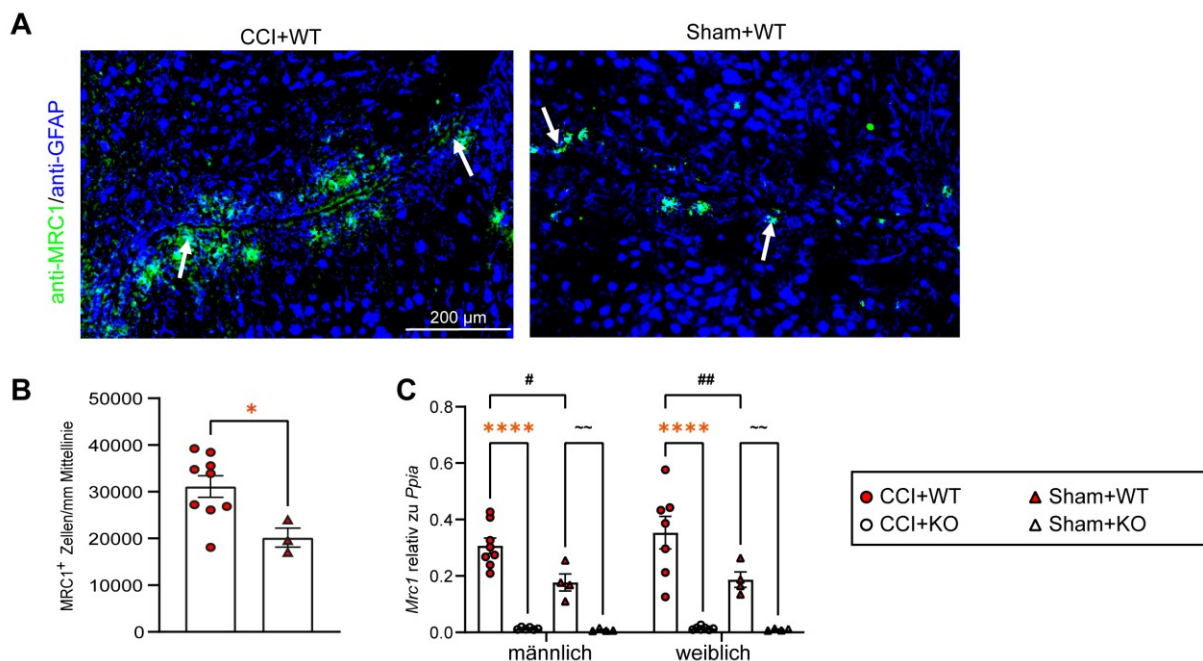
Paarweise Vergleiche parametrisch verteilter Daten aus histopathologischen Analysen, die nur CCI-Tiere inkludierten, wurden in beiden Kohorten mit dem ungepaarten, zweiseitigen „Student's t-test“ bzw. nicht-parametrisch verteilte Daten mit dem „Mann-Whitney-U-Test“ analysiert.

Graphen zeigen stets Punkte für jedes Individualtier plus den Mittelwert  $\pm$  SEM. P-Werte  $<0,05$  wurden als statistisch signifikant angesehen, während bei Werten von  $\leq 0,15$  von einem Trend gesprochen wird. Die entsprechenden Signifikanzniveaus werden in den Abbildungen näher erläutert. Grundsätzlich werden \* für Unterschiede zwischen den CCI-Gruppen verwendet, während # Unterschiede zwischen CCI- und korrespondierender Sham-Gruppe markiert und Unterschiede zwischen den Sham-Gruppen durch ~ verdeutlicht.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Ein SHT führt in der frühen Phase zu einer gesteigerten MRC1 Expression

Fünf Tage nach SHT wurde eine anti-MRC1/anti-GFAP Immunfärbung durchgeführt, um den grundsätzlichen Einfluss eines SHTs auf die MRC1 Expression zu untersuchen. Hierbei sollte nicht nur geklärt werden, ob MRC1 nach einem SHT hochreguliert wird, aber auch ob MRC1 als zuverlässiger Marker für ZNS-assoziierte Makrophagen [177] und Mikroglia [94] genutzt werden kann. GFAP wird primär in Astrozyten exprimiert und gilt als ein verlässlicher Marker für deren Entwicklung und Funktion [238]. Darüber hinaus bilden Astrozyten auch die *Glia limitans*, weshalb sich dieser Marker besonders zur Darstellung dieses Bereichs eignet. Bereits bekannt ist, dass die MRC1<sup>+</sup> CAMs vornehmlich im Bereich der Mittellinie und um die Blutgefäße herum zu finden sind. Um die Frage zu beantworten, ob und wie sich ein SHT auf alle potenziell MRC1<sup>+</sup> Zellen auswirkt, wurden Aufnahmen von der gesamten *ipsilateralen Hemisphäre* sowie der Mittellinie von allen vier Versuchsgruppen angefertigt. In MRC1-defizienten Mäusen wurde keine spezifische Immunfärbung mit anti-MRC1 festgestellt, was die Spezifität des verwendeten Antikörpers bestätigte und zur Validierung der Genotypisierung beitrug. Bei der Betrachtung der angefertigten Bilder von Mäusen aus der Sham+MRC1-WT- sowie CCI+MRC1-WT-Gruppe wurden fast ausschließlich MRC1<sup>+</sup> Zellen entlang der Mittellinie und direkt benachbart gefunden, weshalb nur dieser Bereich für die Analyse verwendet wurde (Abbildung 17 A). Es zeigt sich eine erhöhte Anzahl an MRC1<sup>+</sup> Zellen entlang der Mittellinie in der CCI+MRC1-WT-Gruppe (Abbildung 17 B). Auch in der Sham+MRC1-WT-Gruppe sind MRC1<sup>+</sup> Zellen vorhanden, allerdings in signifikant geringerer Anzahl. Um dieses Ergebnis zu überprüfen, wurde die MRC1-Genexpression mit der qPCR überprüft. Auch hier zeigten sich die gleichen Ergebnisse wie in der immunhistologischen Untersuchung. Nach SHT erfolgt ein signifikanter Anstieg von MRC1 im Vergleich der Sham+MRC1-WT- gegenüber der CCI+MRC1-WT-Gruppe in den männlichen als auch in den weiblichen Mäusen, wobei letzterer noch deutlicher ausgeprägt ist. Weiterhin zeigt sich, dass eine basale Expression von MRC1 in den Sham+MRC1-WT-Tieren vorhanden ist (Abbildung 17 C). Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass 5 Tage nach SHT die Protein- und Genexpression von MRC1 unabhängig vom Geschlecht erhöht war.



**Abbildung 17: Ein SHT führt in der frühen Phase zu einer gesteigerten MRC1 Expression.**

(A, B) Anti-MRC1/Anti-GFAP-Immunfärbung zeigt eine signifikant erhöhte Anzahl von MRC1<sup>+</sup>-Zellen (weiße Pfeile), die entlang der hemisphärischen Mittellinie in der CCI+MRC1-WT-Gruppe im Vergleich zur Sham+MRC1-WT-Gruppe 5 Tage nach Trauma ausgerichtet sind. (C) MRC1 Genexpression relativ zu Ppia; CCI: n = 8-9, Sham: n = 3-6, pro Gruppe. (B) Ungepaarter zweiseitiger Student's t-test. (C) Zweifaktorielle Varianzanalyse mit anschließenden Holm Šidák Multigruppenvergleich („mixed-effect-analysis“). Werte einzelner Tiere und Mittelwert  $\pm$  SEM werden angezeigt. \*zeigt CCI+WT vs. CCI+KO an, \*p < 0,05, \*\*\*\*p < 0,0001. # zeigt CCI- im Vergleich zur entsprechenden Sham-Gruppe an, #p < 0,05, ##p < 0,01. ~ zeigt Sham+WT vs. Sham+KO an, ~p < 0,01.

GFAP = „glial fibrillary acidic protein“, MRC1 = Mannose Rezeptor C-Typ I, Ppia = Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A.

#### 4.2 MRC1-Defizienz hat keine Auswirkungen auf die Körpergewichtsentwicklung der Mäuse nach SHT

Männliche und weibliche Mäuse wurden einer CCI-Operation zur Induktion eines SHTs bzw. einer entsprechenden Scheinoperation unterzogen. Während der gesamten Versuchsdauer hatten sie *ad-libitum* Zugang zu Standard Haltungsfutter. Das Gewicht der Mäuse wurde im Verlauf der gesamten Studien an zuvor festgelegten Tagen ermittelt und aufgezeichnet. Initial zeigen die SHT Tiere, unabhängig vom Genotyp - nach dem Trauma eine nicht signifikante Reduktion ihres Körpergewichts. Dieser Effekt verliert sich im Verlauf der folgenden Tage und ist bereits fünf Tage nach Trauma nicht mehr sichtbar. Im Verlauf beider Kohorten nimmt das Körpergewicht der Tiere aller Gruppen, unabhängig von der OP-Methode sowie dem Genotyp, stetig zu, sodass sie am Ende des Forschungsvorhabens in der Regel ein höheres Körpergewicht als zu Beginn haben (Abbildung 18 B). Lediglich in der 5 Tage Überlebenskohorte können die CCI-Tiere ihr ursprüngliches Gewicht zwar wieder erreichen,

aber von einer Zunahme kann nicht gesprochen werden (Abbildung 18 A). Somit hat die MRC1-Defizienz keine Auswirkungen auf die Gewichtsentwicklung nach SHT.

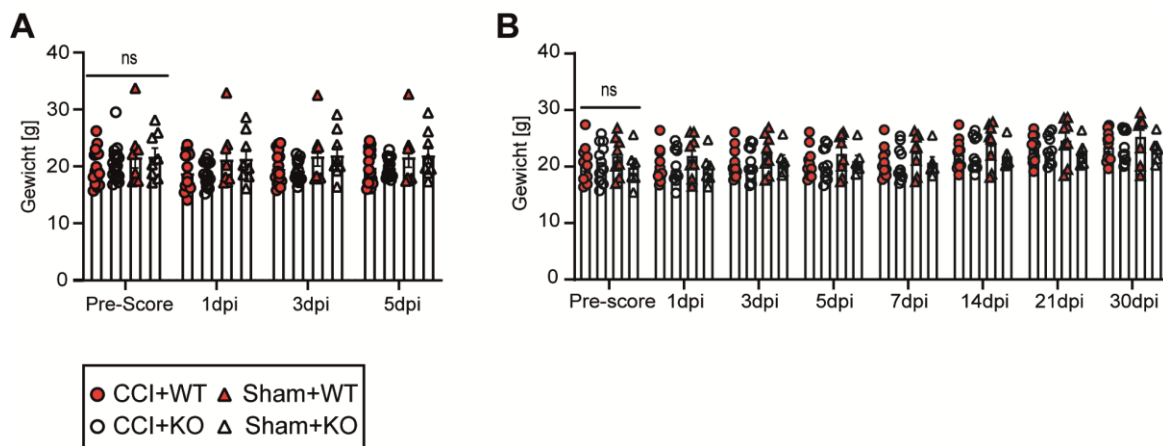
**Tabelle 17: Körpergewicht von MRC1-Wildtyp/Knock-out CCI- und Sham-Mäusen. Werte sind angegeben als Mittelwert  $\pm$  SEM.**

**Tabelle 17-1: Kohorte 1, 5 d Überleben (Körpergewicht in Gramm)**

	CCI		Sham	
	Wildtyp	Knock-out	Wildtyp	Knock-out
<b>Prä-OP</b>	19.86 $\pm$ 0.82	20.60 $\pm$ 0.78	21.68 $\pm$ 1.95	21.78 $\pm$ 1.45
<b>1 dpi</b>	18.88 $\pm$ 0.80	18.75 $\pm$ 0.56	21.28 $\pm$ 1.90	21.43 $\pm$ 1.55
<b>3 dpi</b>	19.68 $\pm$ 0.72	19.27 $\pm$ 0.49	21.85 $\pm$ 1.80	22.01 $\pm$ 1.48
<b>5 dpi</b>	19.85 $\pm$ 0.74	19.79 $\pm$ 0.44	21.68 $\pm$ 1.84	22.01 $\pm$ 1.46

**Tabelle 17-2: Kohorte 2, 30 d Überleben (Körpergewicht in Gramm)**

	CCI		Sham	
	Wildtyp	Knock-out	Wildtyp	Knock-out
<b>Prä-OP</b>	20.41 $\pm$ 1.09	20.58 $\pm$ 0.97	21.83 $\pm$ 1.24	19.82 $\pm$ 1.43
<b>1 dpi</b>	20.25 $\pm$ 0.95	20.03 $\pm$ 0.92	21.89 $\pm$ 1.30	19.70 $\pm$ 1.18
<b>3 dpi</b>	20.67 $\pm$ 0.88	20.50 $\pm$ 0.88	22.31 $\pm$ 1.22	20.98 $\pm$ 1.01
<b>5 dpi</b>	20.82 $\pm$ 0.78	20.42 $\pm$ 0.85	22.24 $\pm$ 1.25	22.98 $\pm$ 1.00
<b>7 dpi</b>	20.90 $\pm$ 0.86	20.39 $\pm$ 0.87	22.55 $\pm$ 1.20	20.86 $\pm$ 1.02
<b>14 dpi</b>	22.35 $\pm$ 0.85	22.05 $\pm$ 0.86	23.90 $\pm$ 1.37	21.78 $\pm$ 0.92
<b>21 dpi</b>	23.28 $\pm$ 0.77	22.89 $\pm$ 0.74	24.63 $\pm$ 1.40	22.42 $\pm$ 0.94
<b>30 dpi</b>	23.68 $\pm$ 0.87	23.37 $\pm$ 0.82	25.25 $\pm$ 1.46	23.08 $\pm$ 0.91



**Abbildung 18: MRC1-Defizienz hat keine Auswirkungen auf die Körpergewichtsentwicklung der Mäuse nach SHT.**

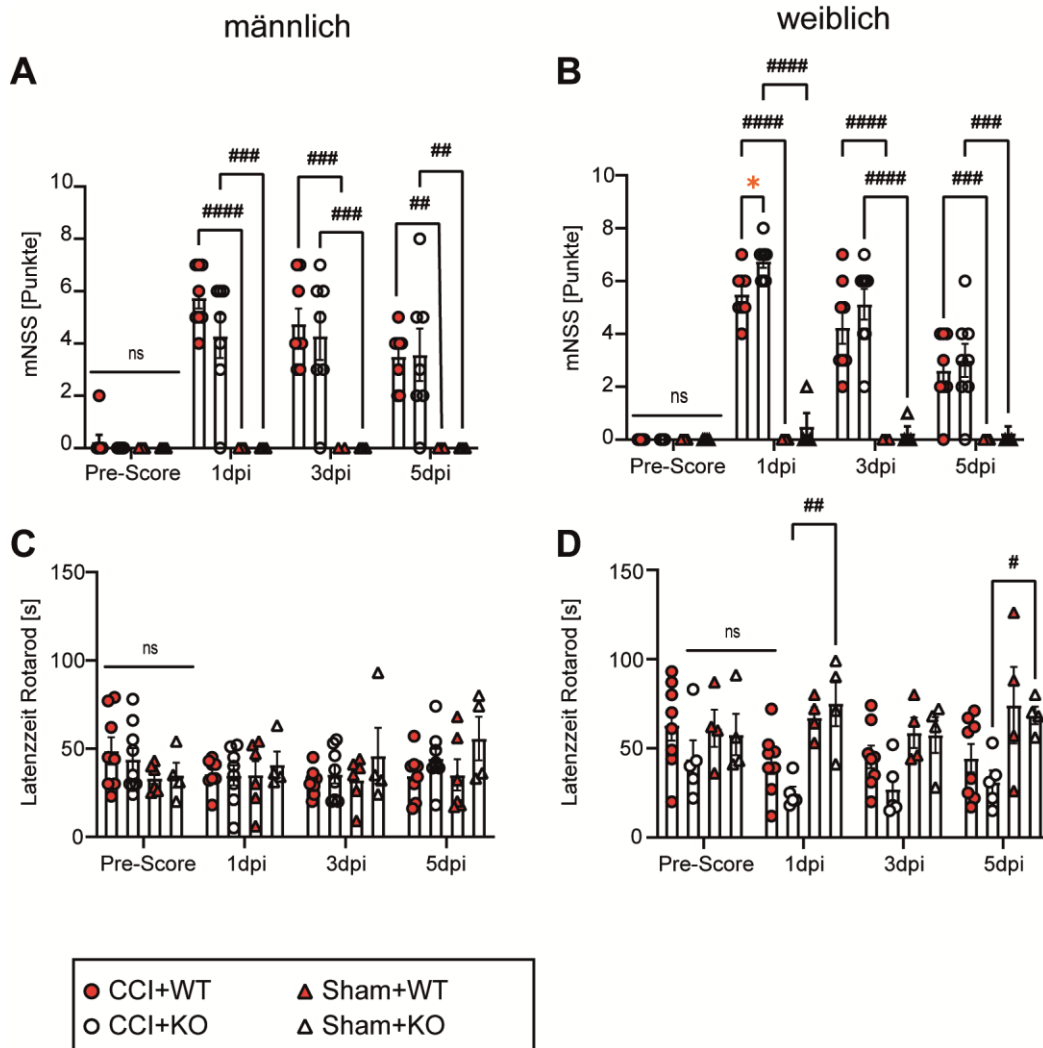
(A, B) Körpergewichtsentwicklung aller Mäuse der Kurz- bzw. Langzeitüberleben-Kohorte. CCI:  $n = 10-16$  pro Gruppe und Kohorte, Sham:  $n = 6-8$  pro Gruppe und Kohorte. (A, B) Zweifaktorielle Varianzanalyse mit anschließenden Holm Šidák Multigruppenvergleich. Werte einzelner Tiere und Mittelwert  $\pm$  SEM werden angezeigt. ns = nicht signifikant.

#### 4.3 MRC1-Knock-out führt zu einer Verschlechterung der neurologischen Fähigkeiten sowie einem reduzierten angstähnlichen Verhalten der Mäuse in der frühen und späten Phase des SHTs

Neurologische Defizite der Mäuse wurden mit Hilfe des mNSS, RR, OFT und EPM ermittelt. Wie auch vorherige Studien in unserem SHT Modell zeigen [100], erreichte der mNSS am ersten Tag nach SHT den Höhepunkt und reduzierte sich kontinuierlich bis 5 d bzw. 30 d nach CCI in beiden Gruppen unabhängig vom Genotyp. In den beiden Sham-Gruppen hielt sich die Gesamtpunktzahl über den Studienverlauf bei beinahe null Punkten. Die Ergebnisse unterschieden sich zwischen den beiden Kohorten, obgleich eine übereinstimmende Tendenz sichtbar ist. Deshalb werden anschließend die Ergebnisse separat aufgeführt.

In Kohorte 1 (5 d Überleben) zeigten weibliche MRC1-KO-Mäuse am ersten Tag nach CCI einen signifikant erhöhten NSS im Vergleich zur MRC1-WT-Gruppe (Abbildung 19 B). Dieser Effekt hielt zu späteren Zeitpunkten nicht mehr an und war auch nicht in männlichen Mäusen zu sehen (Abbildung 19 A).

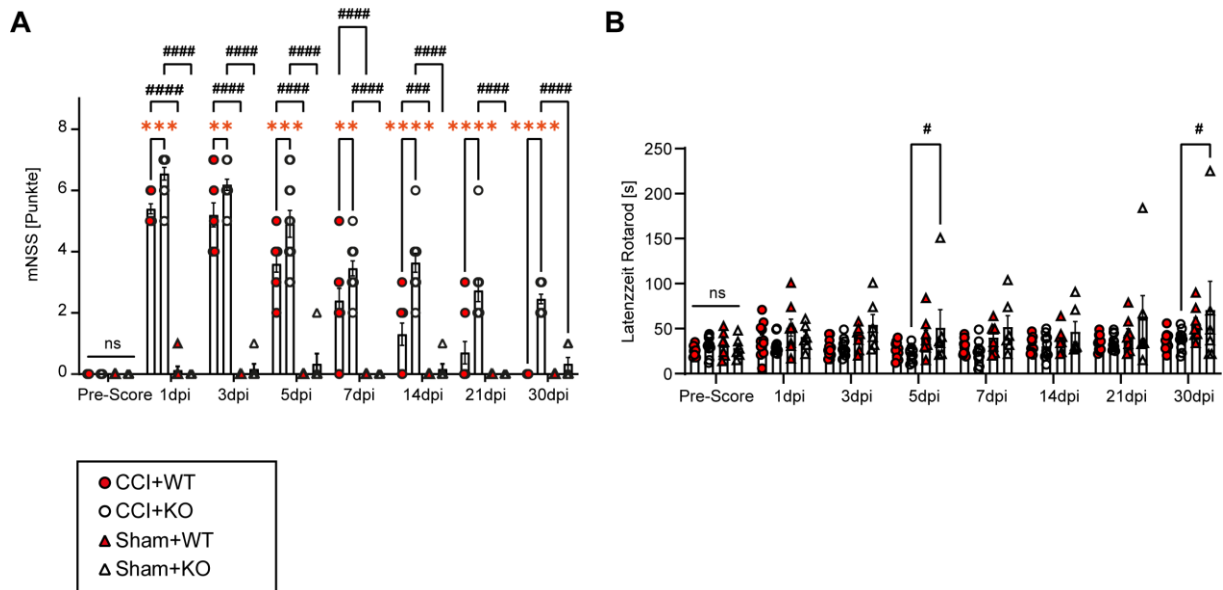
Der Rotarod Test zeigte weder bei männlichen noch weiblichen Mäusen Unterschiede zwischen beiden CCI-Gruppen hinsichtlich der Latenzzeit. Signifikante Unterschiede in der Latenzzeit auf dem Rotarod waren aber an Tag 1 und Tag 5 nach CCI zwischen der CCI+MRC1-KO-Gruppe und der korrespondierenden Sham-Gruppe in weiblichen Mäusen festzustellen (Abbildung 19 D). Die korrespondierende Sham-Gruppe zeichnete sich durch längere Laufzeiten auf dem Rotarod aus. Dies impliziert, dass ein SHT in weiblichen CCI+MRC1-KO-Mäusen zu einer schlechteren Rotarod Leistung führt.



**Abbildung 19: MRC1-KO beeinflusst das frühzeitige neurologische Ergebnis nach experimentellen SHT nur geringfügig bei weiblichen, nicht aber bei männlichen Mäusen.**

(A, B) mNSS bei männlichen und weiblichen Mäusen (höhere Werte weisen auf eine erhöhte Einschränkung der Mäuse hin). (C, D) RR bei männlichen und weiblichen Mäusen (höhere Latenzzeit weist auf eine bessere Leistung hin). CCI: n = 15–16 pro Gruppe, Sham: n = 8 pro Gruppe. (A-D) Zweifaktorielle Varianzanalyse gefolgt von Holm-Sidak's Multigruppenvergleich („mixed-effect-analysis“). Werte einzelner Tiere und Mittelwert  $\pm$  SEM werden angezeigt. \* zeigt CCI+WT vs. CCI+KO an, \* $p < 0,05$ ; # zeigt CCI im Vergleich zur entsprechenden Sham-Gruppe an, # $p < 0,05$ , ## $p < 0,01$ , ### $p < 0,001$ , #### $p < 0,0001$ ; ns = nicht signifikant.

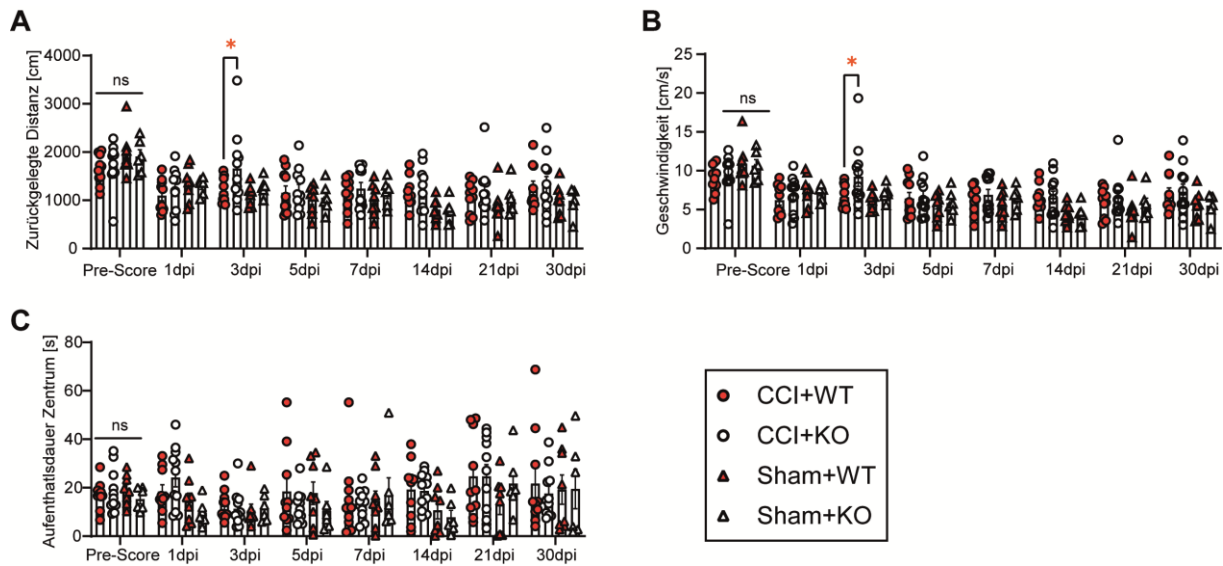
Im Gegensatz dazu zeigte sich in Kohorte 2 (30 d Überleben), unabhängig vom Geschlecht, ein konstant signifikant erhöhter mNSS in den CCI+MRC1-KO Mäusen, der bis zum letzten Tag der Studie anhielt (Abbildung 20 A). Ab Tag 14 nach Trauma-induktion ist dieser Effekt bis Tag 30 besonders stark ausgeprägt. Im Rotarod Test konnte, wie auch schon in der Kohorte 1, kein signifikanter Unterschied zwischen CCI+MRC1-WT und CCI+MRC1-KO festgestellt werden. Sham+MRC1-KO Mäuse liefen hingegen 5 und 30 Tage nach SHT signifikant länger bis zum Herabfallen auf dem Rotarod als die CCI+MRC1-KO-Gruppe (Abbildung 20 B).



**Abbildung 20: MRC1-KO verursacht schlechtere neurologische Ergebnisse in der Spätphase nach Schädel-Hirn-Trauma.**

(A) mNSS aller Mäuse (höhere Punktzahl weist auf einen erhöhten Schweregrad des Traumas hin). (B) RR-Leistung aller Mäuse (höhere Latenz zeigt eine bessere Leistung an). CCI: n = 10–11 pro Gruppe, Sham: n = 6–8 pro Gruppe. (A, B) Zweifaktorielle Varianzanalyse gefolgt von Holm Šidáks Multigruppenvergleich („mixed-effect-analysis“) (A, B) Werte einzelner Tiere und Mittelwert  $\pm$  SEM werden angezeigt. \* gibt CCI+WT vs. CCI+KO an, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001, \*\*\*\*p < 0,0001; # zeigt CCI- im Vergleich zum entsprechenden Sham-Gruppe an, #p < 0,05, ###p < 0,001, ####p < 0,0001; ns = nicht signifikant.

Ergänzend zum Neuroscore und dem Rotarod Test wurde in Kohorte 2 zusätzlich der „Open Field Test“ (OFT) durchgeführt, um zusätzliche Informationen über das Verhalten der Mäuse zu gewinnen. Der OFT zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen CCI+MRC1-WT- und CCI+MRC1-KO-Mäusen 3 Tage nach CCI-Induktion. CCI+MRC1-KO-Mäuse verhielten sich aktiver, was sich in einer höheren Geschwindigkeit sowie größeren zurückgelegten Distanz zeigte (Abbildung 21 A, B). Die Aufenthaltsdauer im Zentrum des „Open Field Tests“ resultierte in keinem signifikanten Ergebnis (Abbildung 21 C). Ebenfalls konnten keine Unterschiede zwischen den CCI-Gruppen und ihren korrespondierenden Sham-Gruppen festgestellt werden.

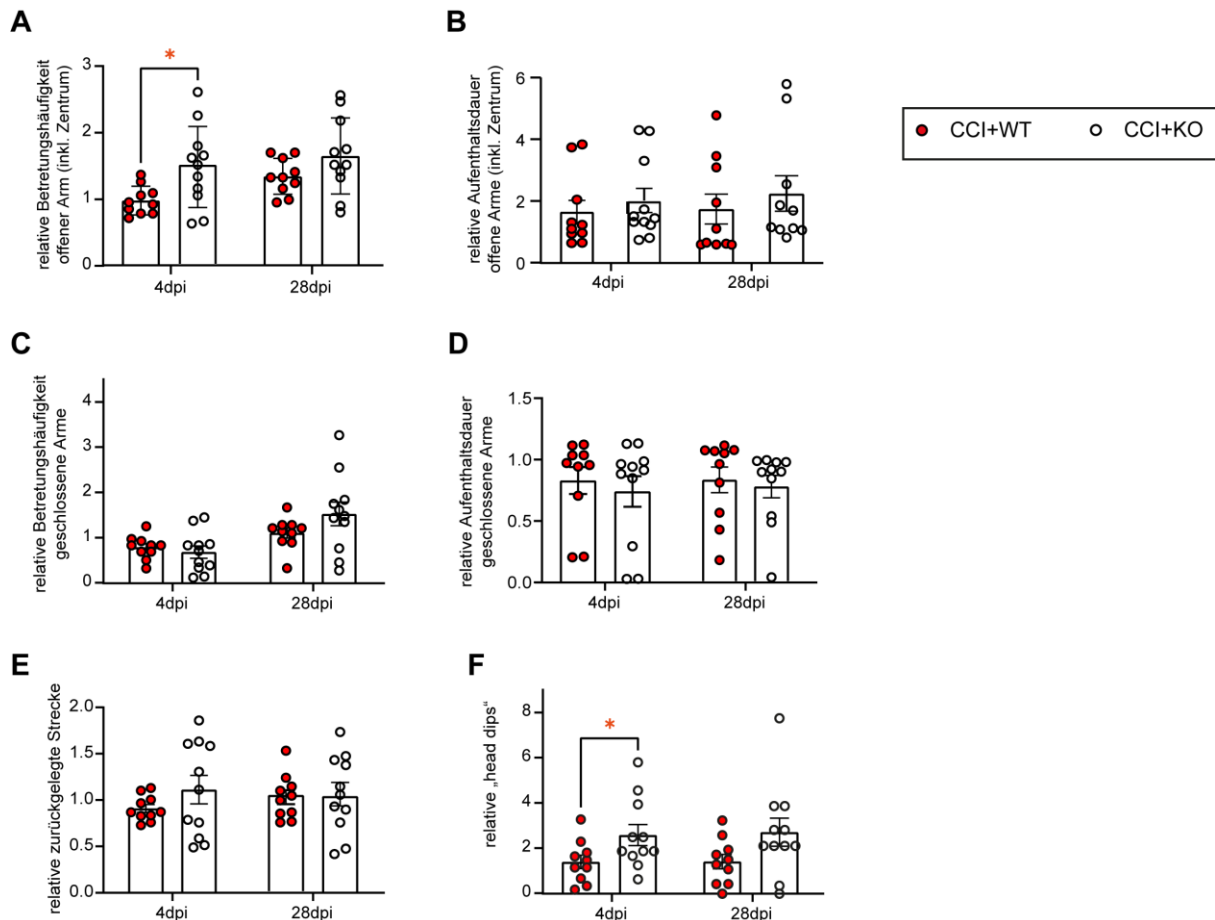


**Abbildung 21: MRC1-KO Mäuse zeigen vermehrten Bewegungsdrang wenige Tage nach SHT.**

(A) Zurückgelegte Strecke im OFT bzw. (B) Geschwindigkeit bzw. (C) Aufenthaltsdauer im Zentrum aller Mäuse. CCI: n = 10–11 pro Gruppe, Sham: n = 6–8 pro Gruppe. (A-C) Zweifaktorielle Varianzanalyse gefolgt von Holm Šidáks Multigruppenvergleich („mixed-effect-analysis“). Werte einzelner Tiere und Mittelwert  $\pm$  SEM werden angezeigt. \*gibt CCI+WT vs. CCI+KO an, \* $p < 0,05$ ; ns = nicht signifikant.

Der „Elevated plus maze“ Test, welcher ebenfalls nur in dieser Kohorte durchgeführt wurde, dient wie der OFT Test zur tiefgreifenden Verhaltensanalyse. Analysiert wurde die zurückgelegte Strecke, Anzahl an „head-dips“ sowie Betretungshäufigkeit und Aufenthaltsdauer offener bzw. geschlossener Arme. Bei „head-dips“ handelt es sich um den Zustand der Maus, bei der sie mindestens die Schnauze über den Rand des offenen Arms des EPM hinausstreckt.

Es konnten keine Unterschiede zwischen den beiden CCI-Gruppen hinsichtlich der zurückgelegten Strecke, Betretungshäufigkeit und Aufenthaltsdauer geschlossener Arme sowie Aufenthaltsdauer offener Arme festgestellt werden (Abbildung 22 B, C, D, E). Signifikante Unterschiede zeigten sich hingegen bei der Analyse der Betretungshäufigkeit offener Arme sowie bei den „head-dips“. CCI+MRC1-KO-Mäuse betraten 4 Tage nach Trauma signifikant häufiger die offenen Arme als die CCI+MRC1-WT-Wurfgeschwister (Abbildung 22 A). Dieser signifikante Effekt hielt nicht bis zum Ende der Studie an, obwohl nach wie vor ein Trend diesbezüglich ersichtlich war ( $p = 0,1385$ ). Darüber hinaus zeigten die CCI+MRC1-KO-Mäuse ein verringertes angstähnliches Verhalten, welches mit Hilfe von „head-dips“ quantifiziert wurde. In der frühen Phase, vier Tage nach Trauma, führten die CCI+MRC1-KO-Mäuse signifikant mehr „head-dips“ durch (Abbildung 21 F). Dieser Effekt hielt auch in der späten Phase, 28 Tage nach dem Trauma, an. Allerdings resultierte die Auswertung nur noch in einem Trend ( $p = 0,0874$ ).



**Abbildung 22: CCI+MRC1-KO-Mäuse zeigen weniger angsthähnliches Verhalten in der frühen und späten Phase des SHTs.**

(A) relative Betretungshäufigkeit offene Arme (B) relative Aufenthaltsdauer offene Arme (C) relative Betretungshäufigkeit geschlossene Arme (D) relative Aufenthaltsdauer geschlossene Arme (E) relative zurückgelegte Strecke (F) Anzahl der „head-dips“. (A-F) Ursprungswerte wurden mit der entsprechenden Sham-Gruppe normalisiert und anschließend mit ungepaartem, zweiseitigen Student's t-test ausgewertet. Werte einzelner Tiere und Mittelwert  $\pm$  SEM werden angezeigt. \*gibt CCI+WT vs. CCI+KO an, \* $p < 0,05$ .

Zusammengefasst führt die MRC1-Defizienz zu einer Verschlechterung der neurologischen Fähigkeiten sowie einem reduzierten angsthähnlichen Verhalten der Mäuse in der frühen und späten Phase des SHTs.

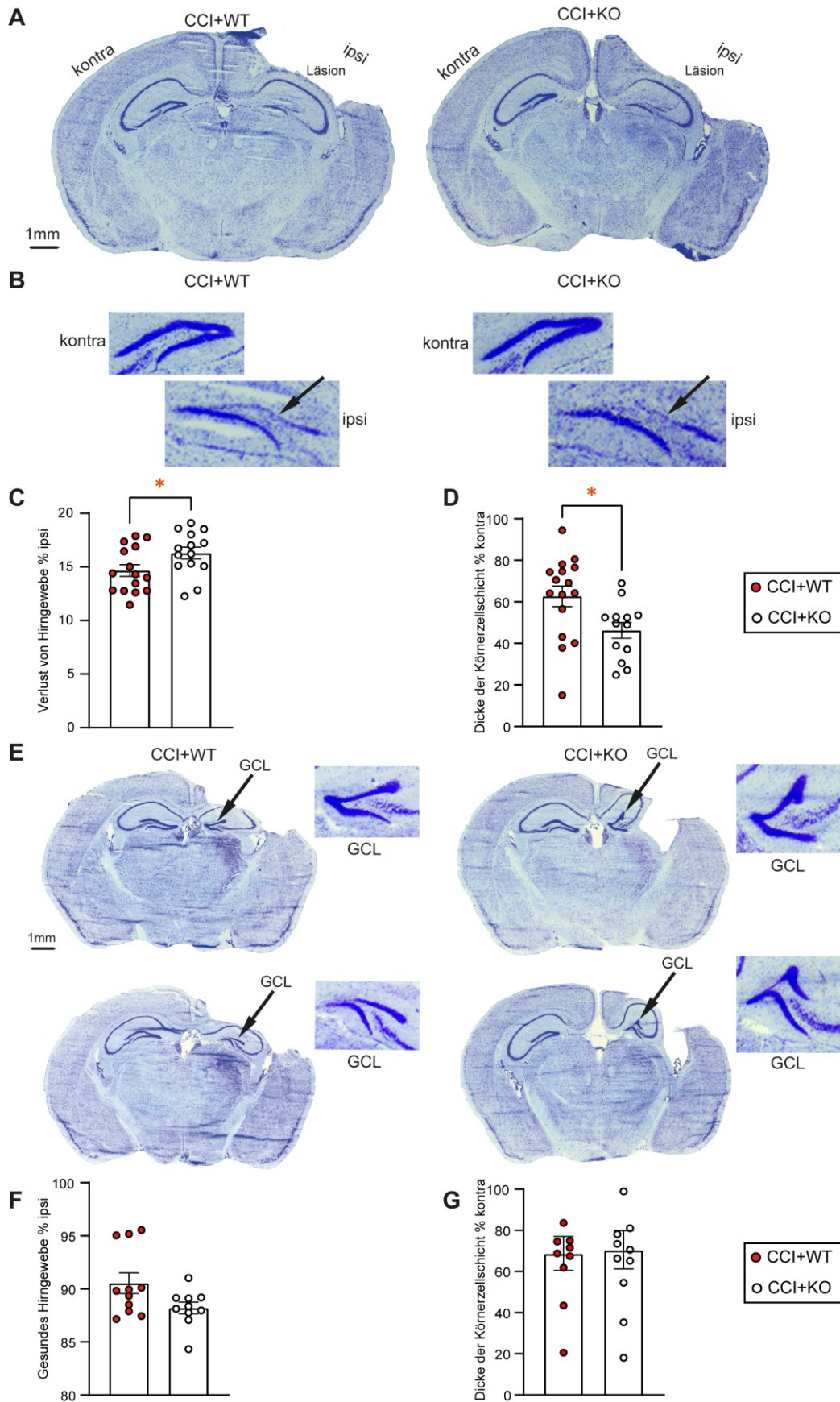
#### 4.4 MRC1-Defizienz verschlimmert strukturelle Hirnschäden in der Frühphase und tendenziell in der Spätphase nach SHT

Als nächsten Schritt wurde das Läsionsvolumen bzw. das verbliebene gesunde Hirngewebe sowie die Dicke der Körnerzellschicht des *Gyrus dentatus* bestimmt. Die zerebrale Schädigung schloss kortikale und subkortikale Regionen wie den *Hippocampus* (beide Kohorten) sowie den *Thalamus* (nur Kohorte 2) ein (Abbildung 23 A, B, E). In der Kurzzeitüberleben-Kohorte waren signifikante Unterschiede in der Größe des Läsionsvolumens feststellbar. CCI+MRC1-KO-Mäuse präsentierten ein größeres, relatives Läsionsvolumen verglichen mit den

CCI+MRC1-WT-Mäusen fünf Tage nach Trauma (Abbildung 23 C). Des Weiteren wies die CCI+MRC1-KO-Gruppe zu diesem Zeitpunkt ebenfalls ein signifikant vermindertes Verhältnis von *ipsi-/kontralateraler* Körnerzellschicht-Dicke des *Gyrus dentatus* [Körnerzellschicht-Dicke % *kontralateral*] auf (Abbildung 23 D). Beides gemeinsam spricht für einen stärkeren Verlust von Hirngewebe in der frühen Phase nach SHT.

In der 30 Tage Überleben-Kohorte konnten keinen signifikanten Unterschiede im Hinblick auf das verbliebene, gesunde Hirngewebe sowie die Körnerzellschicht-Dicke des *Gyrus dentatus* (Abbildung 23 G) zwischen den CCI-Gruppen festgestellt werden. Trotzdem resultierte die Analyse des verbliebenen gesunden Hirngewebes in einem Trend hinsichtlich einer Verminderung des verbliebenen gesunden Hirngewebes in CCI+MRC1-KO-Mäusen ( $p = 0,0924$ ) (Abbildung 23 F).

All diese Ergebnisse zeigen, dass der MRC1-Knock-out besonders in der frühen Phase der Pathologie des SHT in einer Vergrößerung des Läsionsvolumen resultierte. Dieser Effekt war aber in der späteren Phase des SHT nicht mehr deutlich ersichtlich.

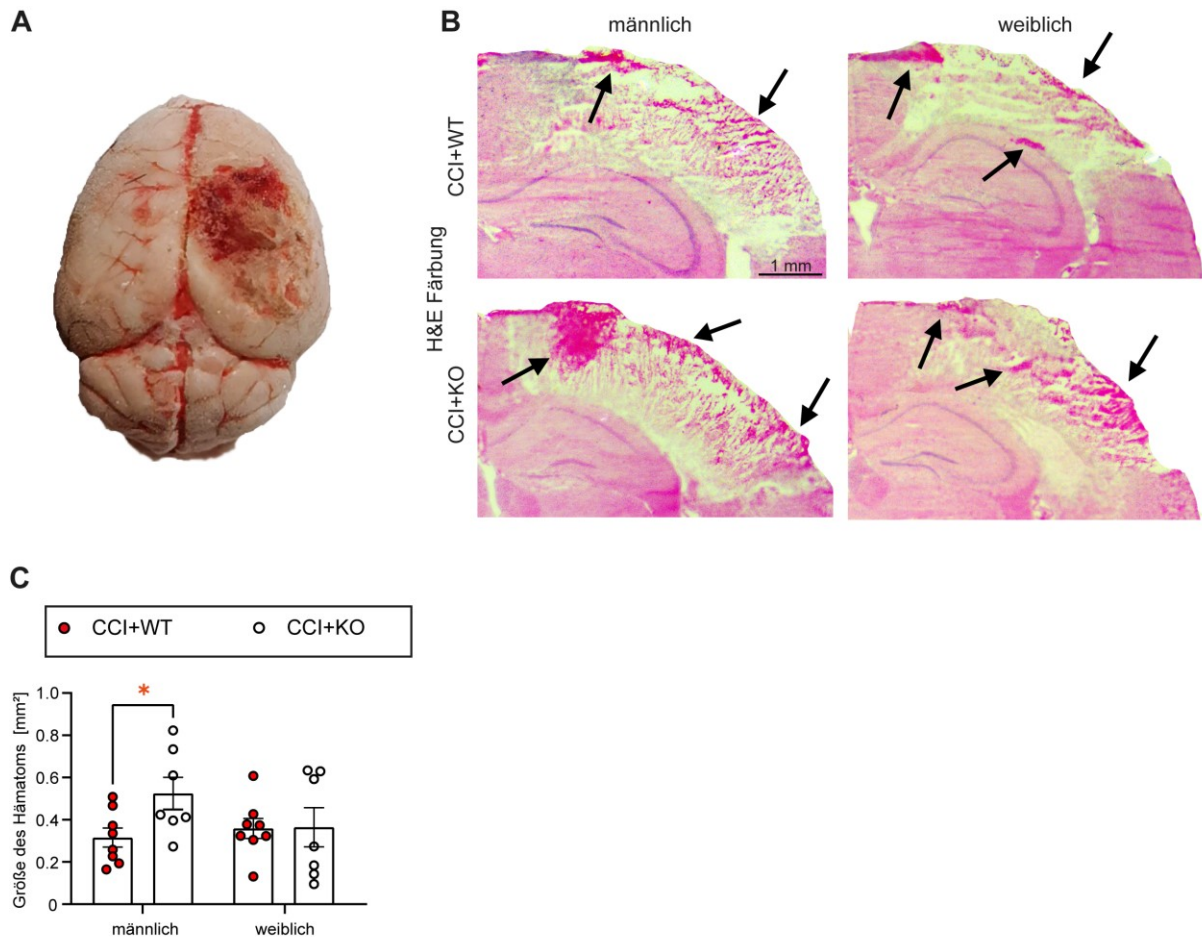


**Abbildung 23: MRC1-Defizienz verschlimmert strukturelle Hirnschäden in der Frühphase und tendenziell in der Spätphase nach SHT.**

(A) Kresylviolett gefärbte Schnitte zeigen strukturelle Hirnschäden bei CCI+MRC1-WT- und CCI+MRC1-KO 5 Tage nach Schadensinduktion. (B) Bildvergrößerungen, die den *ipsiläsionalen (ipsi)* und *kontraläsionalen (kontra)* GCL des *Hippocampus* zeigen. Die Pfeile zeigen auf den Bereich der verringerten Dicke des *ipsiläsionalen* GCL. (C) Hirngewebeverlust 5 Tage nach Trauma. Gemessene Werte (n = 13-16 pro Gruppe) werden in % relativ zum Volumen der *ipsiläsionalen Hemisphäre* ausgedrückt. (D) *Ipsiläsionale* GCL-Dicke in der MRC1-WT- und MRC1-KO-CCI-Gruppe fünf Tage nach CCI-Induktion (n = 14–16 pro Gruppe). Die Messwerte werden in % relativ zur *kontraläsionalen* GCL-Dicke ausgedrückt. (E) Kresylviolette Färbung von Schnitten, die verbleibendes gesundes Gehirngewebe in der Spätphase nach SHT zeigt. Die Pfeile zeigen auf den *ipsiläsionalen* GCL. Bildvergrößerungen zeigen den *ipsiläsionalen* GCL des *Hippocampus* in den CCI-Gruppen MRC1-WT und MRC1-KO. (F) Gesundes Hirngewebe 30 Tage nach Trauma. Werte (n = 10-11 pro Gruppe) werden in % relativ zum gesamten Hirngewebe der *ipsiläsionalen Hemisphäre* ausgedrückt. (G) *Ipsiläsionale* GCL-Dicke in CCI+MRC1-WT und CCI+MRC1-KO 30 Tage nach Trauma (n = 14–16 pro Gruppe). Die Werte werden in % relativ zur *kontraläsionalen* GCL-Dicke ausgedrückt. (C, D, F, G) Ungepaarter Student's t-test oder Mann-Whitney-U-Test. Werte einzelner Tiere und Mittelwert  $\pm$  SEM werden angezeigt. \*zeigt MRC1-WT vs. MRC1-KO an, \*p < 0,05.

#### 4.5 MRC1-Defizienz führt in der frühen Phase des SHTs zu größeren Hämatomen in männlichen Mäusen

Um Herauszufinden, ob die Defizienz des MRC1-Rezeptors sich auch auf den Prozess der Phagozytose auswirkt, wurde die Größe des *intrazerebralen Hämatoms* fünf Tage nach Trauma Induktion vermessen. Die H&E Färbung sorgt dafür, dass sich das *Hämatom* Areal intensiv Magenta färbt (Abbildung 24 B). So konnte zum einen gezeigt werden, dass sich das *Hämatom* ausschließlich auf den *ipsiläsionalen* Hirnbereich beschränkt (Abbildung 24 A) und zum anderen konnte der erste Eindruck entstehen, dass die CCI+MRC1-KO-Gruppe ein vergrößertes *subdurales Hämatom* aufweist. Anschließende Quantifizierung bestätigte, dass die MRC1-Defizienz zu signifikant größeren *Hämatomen* in männlichen, nicht aber in weiblichen Mäusen führte (Abbildung 24 C).



**Abbildung 24:** Der MRC1-KO führt in der frühen Phase des SHTs zu größeren *Hämatomen* in männlichen Mäusen.

(A) Kryokonserviertes Gehirn einer Maus aus der CCI+MRC1-WT-Gruppe mit sichtbarem *Hämatom* im Bereich der *ipsiläsionalen Hemisphäre* (B) H&E-Färbung (Hämatoxylin-Eosin-Färbung) mit *intrazerebralem Hämatom* (Pfeile) im *ipsiläsionalen Hirngewebe* von CCI+MRC1-WT und CCI+MRC1-KO bei männlichen und weiblichen Mäusen. (C) Die *Hämatomfläche* ist bei männlichen CCI+MRC1-KO-Mäusen vergrößert, jedoch nicht bei weiblichen Mäusen im Vergleich zur MRC1-WT-CCI-Gruppe (n = 7-8 pro Gruppe). (C) Ungepaarter Student's t-test. Es werden Werte von einzelnen Tieren und Mittelwerte  $\pm$  SEM angezeigt, \*zeigt MRC1-WT vs. MRC1-KO an, \*p < 0,05.

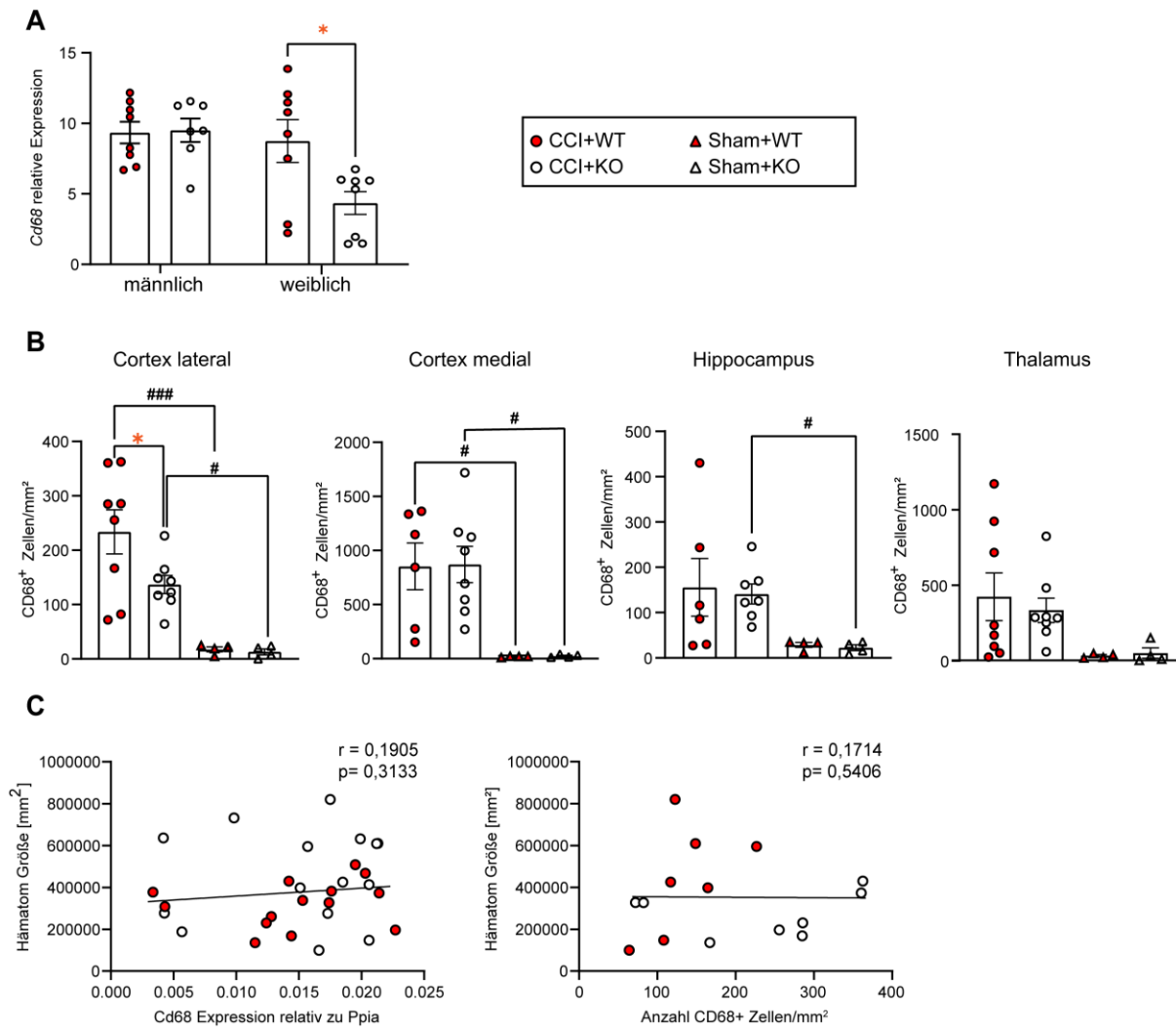
#### 4.6 MRC1-Defizienz resultiert in einer verminderten Anzahl und CD68-Expression periläsionaler Makrophagen/ Mikroglia unabhängig von der *Hämatomgröße* in weiblichen Mäusen

Vorherige Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass bei C57BL6/JRj Mäusen eine negative Korrelation zwischen der Expression von Cd68 bzw. Anzahl periläsionaler CD68-positiver Makrophagen /Mikroglia und der *Hämatom* Größe besteht [94]. Um herauszufinden, ob dieser Zusammenhang auch in der vorliegenden Studie zutrifft, wurden die Cd68 mRNA Expression mittels qPCR sowie die CD68-Proteinexpression mittels Immunfärbung 5 Tage nach SHT untersucht. Die anschließende Analyse der Cd68 mRNA Expression beinhaltete

eine geschlechtergetrennte Normalisierung der Werte der CCI-Gruppen mit den Werten der entsprechenden Sham-Gruppen. Das SHT resultierte in beiden Geschlechtern und Genotypen im Vergleich zur korrespondierenden Sham-Gruppe in einer 5- bis 10-fachen Hochregulation von Cd68.

Im Vergleich der CCI-Gruppen zeigte sich weiterhin eine signifikante Reduktion von Cd68 in der CCI+MRC1-KO-Gruppe in weiblichen, überraschenderweise aber nicht in männlichen Mäusen (Abbildung 25 A).

Die Auswertung der Immunfärbung ergab geschlechterübergreifend eine signifikant verminderte Anzahl CD68<sup>+</sup> Zellen im *lateralen, periläsionalen Cortex*, während in anderen Regionen wie dem *medialen, periläsionalen Cortex* und dem *Hippocampus* lediglich Unterschiede zwischen CCI- und der korrespondierenden Sham-Gruppe festgestellt werden konnten (Abbildung 25 B). Im *Thalamus* fand sich hingegen keinerlei signifikanter Unterschied. Die anschließende Korrelationsanalyse der Cd68 Genexpression bzw. CD68<sup>+</sup> Zellen mit der Hämatomgröße resultierte in keinem signifikanten Ergebnis (Abbildung 25 C).



**Abbildung 25: MRC1-Defizienz resultiert in einer verminderten Anzahl und Cd68-Expression periläsionaler Makrophagen/ Mikroglia unabhängig von der Hämatomgröße in weiblichen Mäusen.**

(A) Cd68 Expression in männlichen und weiblichen Mäusen normalisiert mit entsprechender Sham-Gruppe (n = 8 pro CCI-Gruppe) (B) Histogramme, die eine verringerte Anzahl von CD68<sup>+</sup> Makrophagen/Mikroglia in der CCI+MRC1-KO-Gruppe im Vergleich zur CCI+MRC1-WT-Gruppe im *lateralen periläsionalen Cortex* zeigen und erhöhte CD68<sup>+</sup> Makrophagen/Mikroglia-Zahlen in beiden CCI-Gruppen vs. korrespondierende Sham-Gruppe im *lateralen und medialen periläsionalen Kortex* sowie im *Hippocampus* zeigen (geschlechtsunabhängig; n = 8 pro CCI-Gruppe, n = 3–4 Sham-Gruppe). (C) Es besteht keine Korrelation zwischen der Cd68 Expression bzw. Anzahl CD68<sup>+</sup> Zellen/mm<sup>2</sup> und der Hämatomgröße (geschlechtsunabhängig). (A) ungepaarter Student's t-test (B) Zweifaktorielle Varianzanalyse gefolgt von Holm Šidák Multigruppenvergleich. (C) Korrelationsanalyse mittels Spearman Korrelationskoeffizient (n= 6-16 pro CCI-Gruppe). Es werden Werte von einzelnen Tieren und Mittelwerte ± SEM angezeigt. \*zeigt MRC1-WT vs. MRC1-KO an, \*p < 0,05; # zeigt CCI- vs. entsprechende Sham-Gruppe an, #p < 0,05, ###p < 0,001.

Cd/CD68 = „Cluster of differentiation 68“ (Gen bzw. Protein).

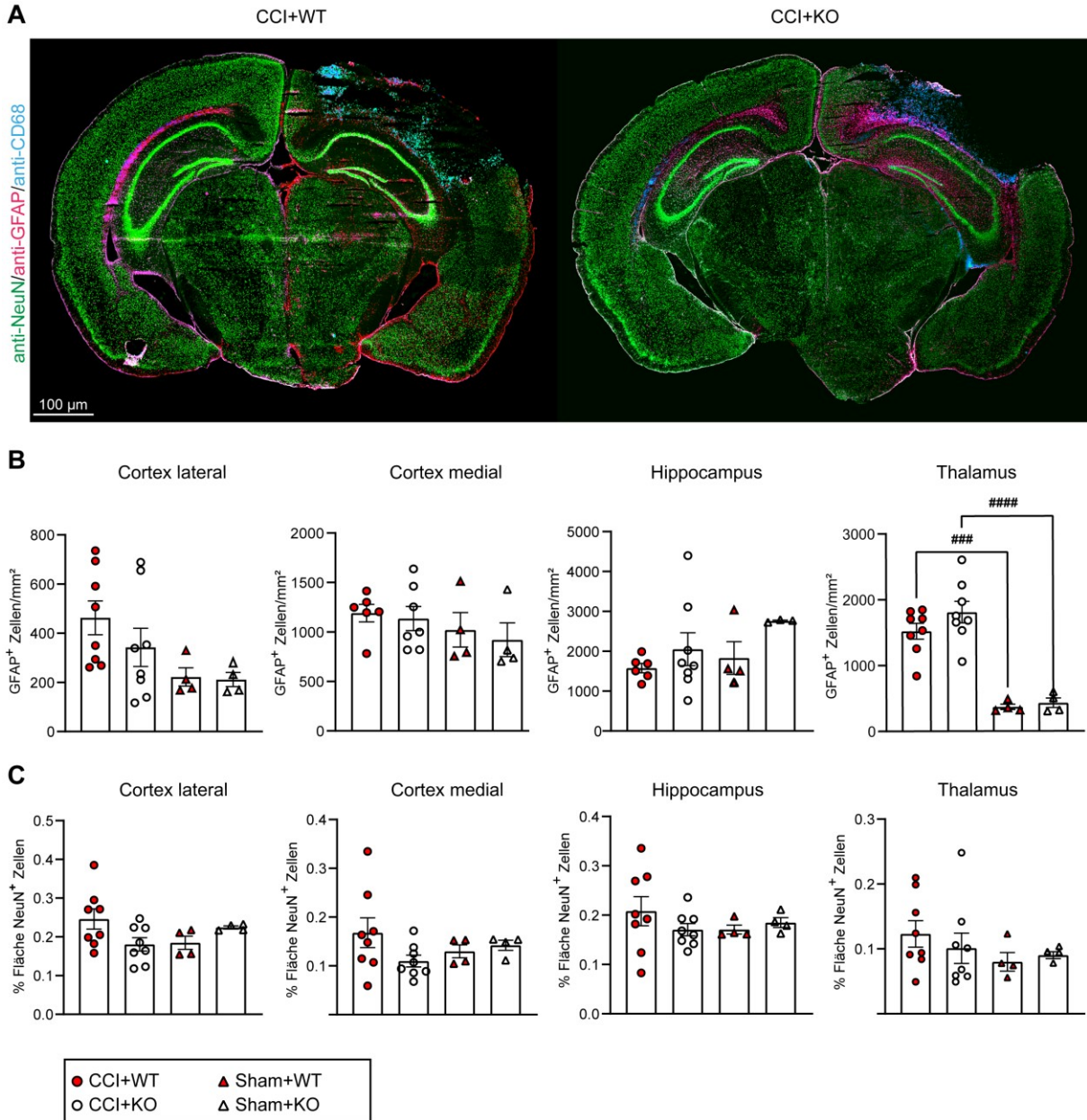
#### **4.7 Nach einer traumatischen Hirnverletzung findet in der Frühphase keine Beeinflussung von Astrozyten oder Neuronen durch den MRC1-Knock-out statt**

Neben Makrophagen und Mikroglia sind insbesondere auch Astrozyten in den Prozess der Neuroinflammation involviert bzw. werden davon beeinflusst. Dies ließ die Frage aufkommen, ob der MRC1-Knock-out sich auch auf andere Zellen des Gehirns auswirkt.

Astrozyten gehören zu den residenten Zellen, welche ebenfalls Inflammation – und das über Monate bis Jahre – vermitteln können [239], während vor allem Neuronen von den Auswirkungen betroffen sind [240]. Im Zuge der bereits oben erwähnten Immunfärbung wurden nicht nur anti-CD68, sondern auch anti-GFAP und anti-NeuN Antikörper verwendet, um diese Fragestellung beantworten zu können (Abbildung 26 A).

Die Quantifizierung von Astrozyten mittels anti-GFAP ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen allen vier Gruppen, wenn die Anzahl GFAP<sup>+</sup> Zellen im *periläsionalen Cortex* (medial und lateral) und im *Hippocampus* verglichen wurde. Einzig im *Thalamus* konnte eine signifikante Hochregulation der GFAP<sup>+</sup> positiven Zellen in beiden CCI-Gruppen gegenüber der korrespondierenden Sham-Gruppe festgestellt werden (Abbildung 26 B). Diese erhöhte Anzahl GFAP<sup>+</sup> Zellen lässt sich allerdings nicht auf den MRC1-Knock-out, sondern viel mehr auf die CCI-Induktion zurückführen. Der Vergleich beider CCI-Gruppen ergab hingegen eine vergleichbare Anzahl GFAP<sup>+</sup> Zellen, sodass sich schlussfolgern lässt, dass die MRC1-Defizienz in der frühen Phase nach dem SHT keinerlei Auswirkungen auf die Aktivierung von Astrozyten hat.

Wie bereits unter Punkt 3.5.7.1 erwähnt, wurde NeuN auf der Basis der NeuN<sup>+</sup> Fläche ausgewertet. In keiner der ausgewerteten Bereiche (*periläsionaler Cortex lateral* und *medial*, *Thalamus* und *Hippocampus*) konnten Unterschiede zwischen dem prozentualen Anteil der NeuN<sup>+</sup> Zellen zwischen den CCI-Gruppen oder zu den jeweiligen Sham-Gruppen festgestellt werden (Abbildung 26 C). Dies deutet darauf hin, dass der SHT-induzierte Zelltod von Neuronen zu diesem Zeitpunkt bereits abgeschlossen ist. Die Defizienz des MRC1 scheint keinerlei Auswirkungen auf den regionalen Erhalt der Neuronen im Gehirn fünf Tage nach einem SHT zu haben.



**Abbildung 26:** Nach einer traumatischen Hirnverletzung findet in der Frühphase keine Beeinflussung von Astrozyten oder Neuronen durch den MRC1-Knock-out statt.

(A) Anti-NeuN/Anti-GFAP/Anti-CD68-Immunfärbung des gesamten Gehirns (B) Histogramme zeigen eine höhere Anzahl GFAP<sup>+</sup>-Zellen in beiden CCI-Gruppen im Vergleich zur korrespondierenden Sham-Gruppe im Thalamus (n = 8 pro CCI-Gruppe, n = 3–4 Sham-Gruppe). (C) Histogramme zeigen keinerlei Unterschiede hinsichtlich der % Fläche NeuN<sup>+</sup> Zellen. (B, C) Zweifaktorielle Varianzanalyse, gefolgt von Holm Šidáks Multigruppenvergleich. Werte einzelner Tiere und Mittelwert ± SEM werden angezeigt. # zeigt CCI- vs. entsprechende Sham-Gruppe an, ###p < 0,001, ####p < 0,0001.

CD68 = „Cluster of differentiation 68“, GFAP = „glial fibrillary acidic protein“, NeuN = „Neuronal nuclei“.

#### 4.8 Die Abwesenheit des MRC1 hat Auswirkungen auf die Expression zahlreicher Gene 5 Tage nach SHT

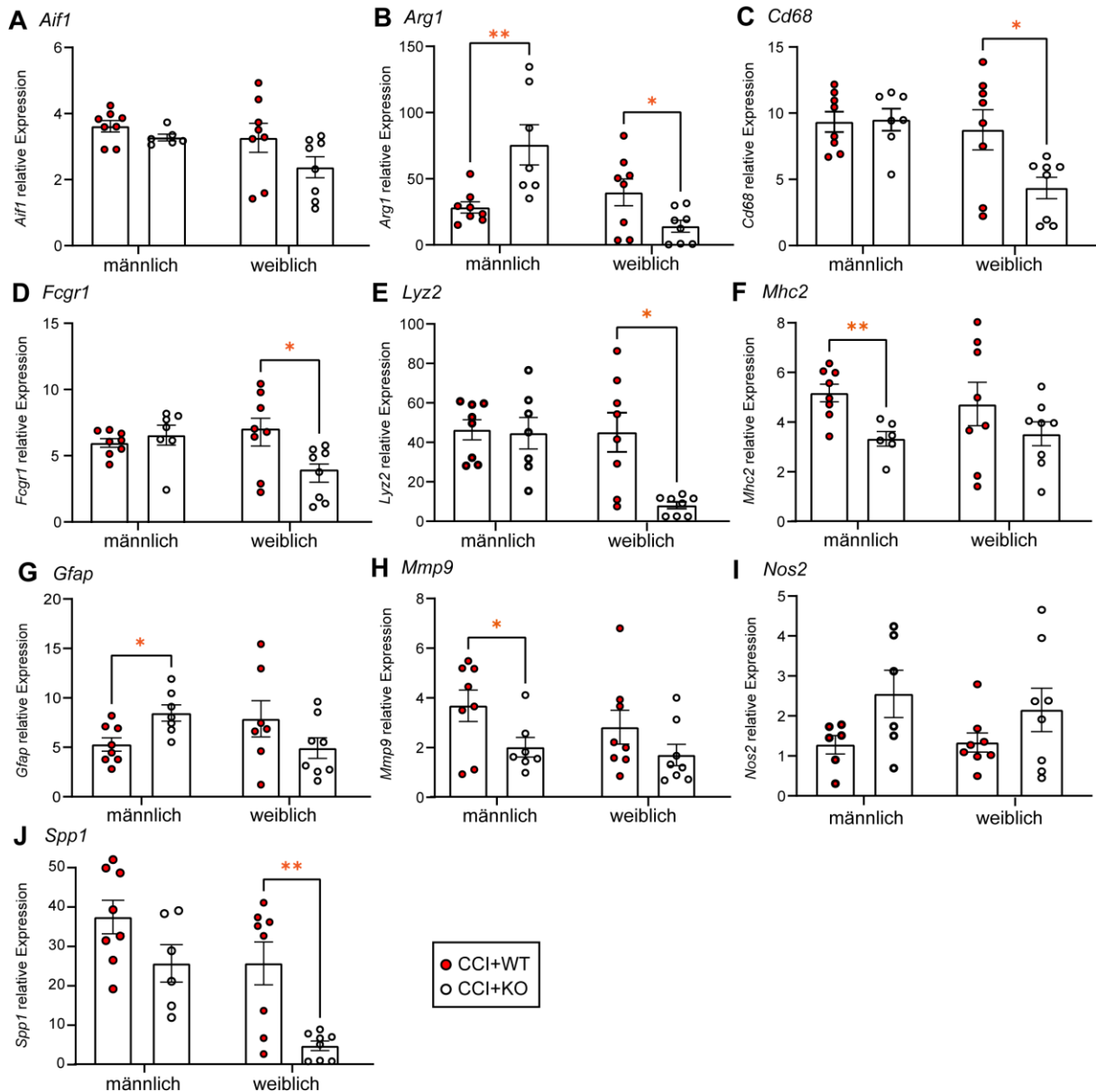
Bereits gezeigt werden konnte, dass der MRC1 die Makrophagen Polarisation moduliert und die Aufnahme von Schadantigenen durch Makrophagen im Rahmen einer allergischen Inflammation in der Lunge vermittelt [241]. Deshalb ist die Vermutung naheliegend, dass gleichartige Mechanismen auch im Zuge der Neuroinflammation im Gehirn stattfinden. Um potenzielle Auswirkungen der MRC1-Defizienz auf molekularbiologischer Ebene der Neuroinflammation zu untersuchen, wurden mRNA Expressionsanalysen für 10 Inflammationsmarker durchgeführt, die teilweise Makrophagen/Mikroglia oder Astrozyten zugeordnet werden können oder als allgemeine Inflammationsmarker angesehen werden, weil sie keinem bestimmten Zelltyp spezifisch zugeordnet werden können.

Die Auswertung der qPCR Ergebnisse erfolgte zunächst geschlechtergetrennt nach einem etablierten Standardprotokoll. Werte werden hierbei relativ zum Referenzgen *Ppia* berechnet. Hierbei waren keinerlei signifikante Unterschiede zwischen CCI+MRC1-WT vs. -KO ersichtlich. Ein signifikanter Effekt durch die CCI-Induktion – nachfolgend als CCI-Effekt bezeichnet – war hingegen in Form eines Anstiegs von allen Inflammationsmarkern außer *Nos2* in beiden Geschlechtern vorhanden. Dies führte zu einer angepassten Auswertung der Daten. Die Werte aus den CCI-Gruppen wurden jeweils mit dem Mittelwert der korrespondierenden Sham-Gruppe normalisiert. Die geschlechtergetrennte Auswertung wurde beibehalten. Die nachfolgende Tabelle gibt einen kurzen Überblick über die verwendeten Gene, die zelluläre Zuteilung sowie den funktionellen Kontext.

**Tabelle 18: Übersicht über die untersuchten Gene und deren Charakterisierung. Informationen zur zellulären Zuteilung im Gehirn stammen aus dem Proteinatlas ([www.proteinatlas.org](http://www.proteinatlas.org)).**

Gen	Zelluläre Zuteilung im Gehirn	Funktioneller Kontext
<b><i>Arg1</i></b>	vor allem Neuronen, auch Makrophagen/Mikroglia	M2-Polarisierung
<b><i>Cd68</i></b>	Makrophagen/Mikroglia	Makrophagen/Mikroglia Aktivierungsmarker
<b><i>Fcgr1</i></b>	Professionell Antigen-präsentierende Zellen wie Makrophagen, Mikroglia	Phagozytosemarker/ M1-Polarisierung
<b><i>Aif1</i></b>	Makrophagen/Mikroglia	Aktivierungs-Marker
<b><i>Lyz2</i></b>	Makrophagen/Mikroglia	Autophagie
<b><i>Mhc2</i></b>	Makrophagen/Mikroglia	Antigen Präsentation
<b><i>Gfap</i></b>	Astrozyten	Aktivierungs-Marker
<b><i>Mmp9</i></b>	Nicht spezifisch, vor allem Gefäß-assoziiert	Blut-Hirn-Schranken Regulator

<b>Gen</b>	<b>Zelluläre Zuteilung im Gehirn</b>	<b>Funktioneller Kontext</b>
<b><i>Nos2</i></b>	Neuronen, insgesamt wenig regionale Spezifität im Gehirn	Beteiligt am Inflammationsprozess, steigert Synthese proinflammatorischer Mediatoren
<b><i>Spp1</i></b>	Professionell Antigen-präsentierende Zellen wie Makrophagen	Zytokin mit neuroprotektiven und regenerativen Effekten



**Abbildung 27: Differenzielle Genexpression.**

(A-F) Makrophagen/Mikroglia-, (G) Astrozyten-, (H-J) allgemeine Inflammations-Marker. Fast alle Gene zeigen signifikante Unterschiede zwischen den beiden CCI-Gruppen, die in der Regel nur ein Geschlecht betreffen. *Nos2* und *Aif1* weisen keinerlei Unterschied zwischen der CCI+MRC1-WT- und -KO Gruppe auf. (n = 7-8 pro CCI-Gruppe). (A-J) Ursprungswerte wurden mit der entsprechenden Sham-Gruppe normalisiert und anschließend mit ungepaartem zweiseitigen Student's t-test ausgewertet. Werte einzelner Tiere und Mittelwert  $\pm$  SEM werden angezeigt. \*p gibt CCI+WT vs. CCI+KO an, \*p < 0,05, \*\*p < 0,01.

*Aif1* = „ionized calcium-binding adapter molecule 1“, *Arg1* = Arginase 1, *Cd68* = „Cluster of differentiation 68“, *Fcgr1* = Fcy-Rezeptor, *GFAP* = „glial fibrillary acidic protein“, *Lyz2* = Lysozyme 2, *Mhc2* = „Major Histocompatibility Complex II“, *Mmp9* = Matrix Metalloproteinase 9, *Nos2* = „Nitric Oxide Synthase 2“, *Spp1* = Osteopontin.

Diese angepasste Auswertung resultierte in folgenden Ergebnissen. Die Makrophagen/Mikroglia-Marker *Arg1*, *Cd68*, *Fcgr1*, *Lyz2* und *Mhc2* wiesen signifikante Unterschiede zwischen den beiden CCI-Gruppen auf. Diese Ergebnisse waren jedoch zwischen beiden Geschlechtern inkonsistent. So resultierte das SHT in einer signifikant

verringerten Expression von *Arg1*, *Cd68*, *Fcgr1* und *Lyz2* in weiblichen MRC1-KO Mäusen (Abbildung 27 B, C, D, E). In männlichen MRC1-KO Mäusen zeigte sich hingegen eine signifikante Hochregulation von *Arg1* (Abb. 27 B) sowie eine signifikant verringerte Expression von *Mhc2* (Abbildung 27 F). *Aif1* war als einziges Gen in beiden Geschlechtern nicht signifikant reguliert (Abbildung 27 A). Die Makrophagen/Mikroglia-Marker lassen daher keine allgemeine, geschlechtsübergreifende Aussage zu.

Die MRC1-Defizienz wirkte sich nur in männlichen Mäusen signifikant auf *Gfap* als einzigen Astrozyten-Marker aus. Im Gegensatz zu den Wildtyp-Geschwistern war die *Gfap* Expression in den Knock-outs signifikant erhöht (Abbildung 27 G).

Die deutlichen Unterschiede hinsichtlich der Genexpression zwischen den beiden Geschlechtern setzten sich auch bei den allgemeinen Inflammationsmarkern fort. Der MRC1-KO resultierte nur in männlichen Mäusen in einer signifikanten Reduktion der *Mmp9* Expression (Abbildung 27 H) sowie einem Trend hinsichtlich einer geringeren Expression von *Spp1* ( $p = 0,0909$ ) (Abbildung 27 J). Gleichzeitig lag ein Trend hinsichtlich einer verstärkten Expression von *Nos2* ( $p = 0,0737$ ) vor (Abbildung 27 I). Weibliche Mäuse mit dem gleichen Genotyp präsentierten stattdessen nur eine signifikant verringerte *Spp1* Expression (Abbildung 27 J).

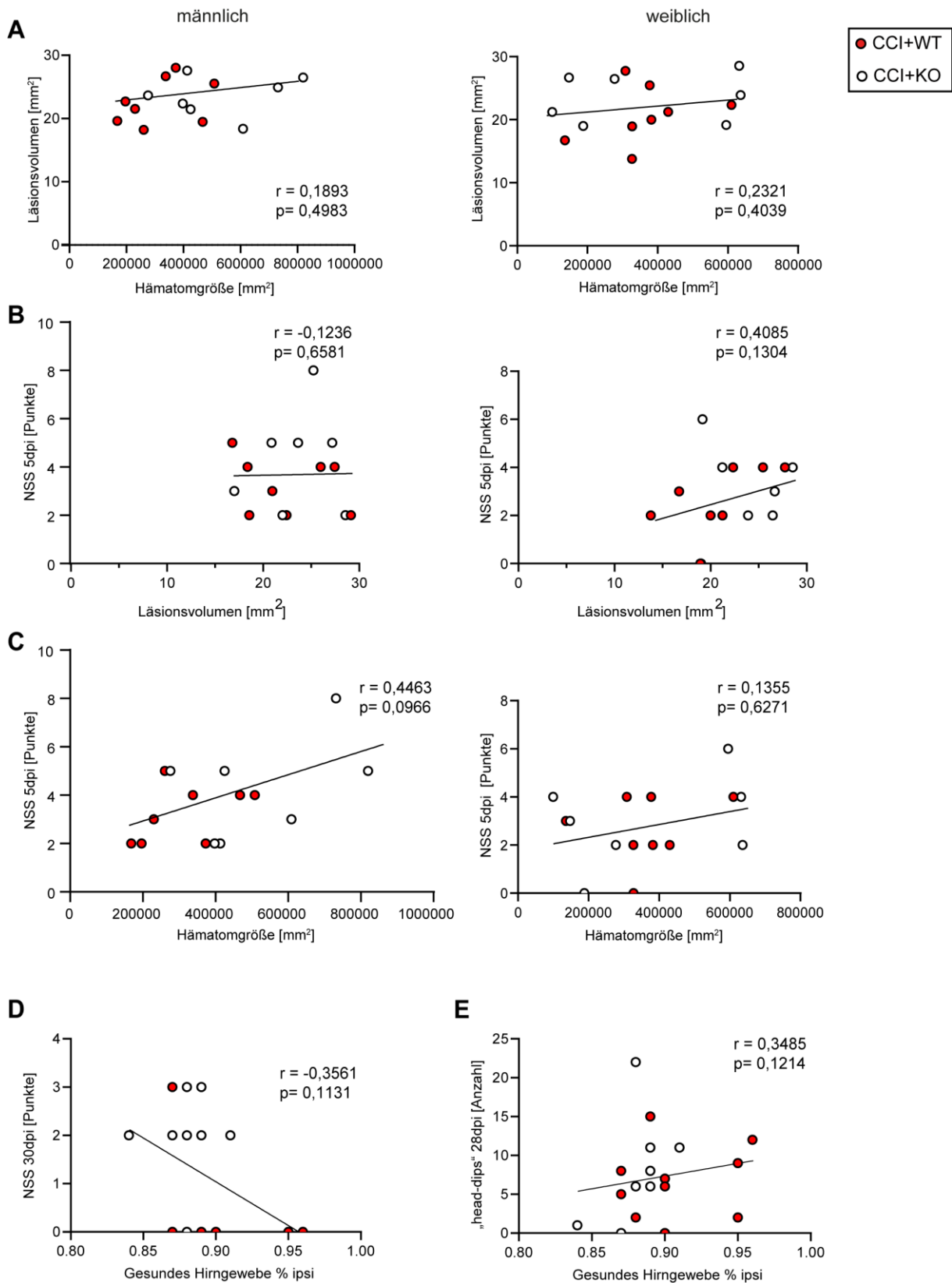
Insgesamt zeigen die Ergebnisse der mRNA Expressionsanalysen mit einem Panel von 10 Inflammations-assoziierten Markern, dass MRC1-Defizienz zu deutlichen geschlechtsspezifischen Veränderungen in der Frühphase nach SHT führt. In weiblichen MRC1-defizienten Mäusen ist die SHT-induzierte Hochregulation in 5 von 10 Markern gegenüber dem Wild-Typ signifikant vermindert. In männlichen MRC1-defizienten Mäusen sind 4 von 10 Markern gegenüber dem Wild-Typ differenziell exprimiert, wobei jeweils 2 Marker eine erhöhte (*Arg1*, *Gfap*) bzw. eine verminderte Expression (*Mhc2*, *Mmp9*) gegenüber WT dem aufweisen.

#### **4.9 Korrelationsanalysen weisen auf einen Zusammenhang zwischen Verhaltensleistung und der Hirnschädigung der Mäuse in der frühen, als auch späten Phase der Pathogenese eines SHTs**

Um herauszufinden, ob Tiere mit einem größeren Hämatom oder einem größeren Läsionsvolumen auch schlechter in den Verhaltensexperimenten abschneiden, wurden lineare Korrelationsanalysen (Spearman Korrelation) durchgeführt. Diese zeigen einen Trend hin zu einer positiven Korrelation ( $r = 0,4085$ ,  $p = 0,1304$ ) zwischen dem Läsionsvolumen und dem mNSS in weiblichen Mäusen 5 Tage nach SHT (Abbildung 28 B). In männlichen Mäusen zeigt sich hingegen ein Trend hin zu einer positiven Korrelation ( $r = 0,4463$ ,  $p = 0,0966$ ) zwischen der Hämatomgröße und dem mNSS 5 Tage nach dem Neurotrauma (Abbildung 28 C). Die

anschließende Korrelationsanalyse von Hämatomgröße und Läsionsvolumen ergab für beide Geschlechter kein signifikantes Ergebnis (Abbildung 28 A).

Ergänzend zu den obigen Korrelationsanalysen der Kurzzeitüberleben-Kohorte wurden auch in der Langzeitüberleben-Kohorte lineare Korrelationsanalysen (Spearman Korrelation) durchgeführt, um festzustellen, ob ebenfalls ein Zusammenhang zwischen der Verhaltensleistung und der Hirnschädigung besteht. 30 Tage nach SHT liegt kein messbares Hämatom mehr vor, so dass nur das verbliebene gesunde Hirngewebe als Parameter für die Hirnschädigung genutzt wurde. Wie auch in der 5 Tage Überleben-Kohorte besteht ein Trend zur Korrelation zwischen dem Verhalten der Mäuse und der Hirnschädigung. So besteht ein negativer Trend ( $p = 0,1131$ ) zwischen den Punkten im mNSS an Tag 30 und dem verbliebenen gesunden Hirngewebe (Abbildung 28 D). Diese Ergebnisse bedeuten, je mehr gesundes Hirngewebe vorhanden ist, desto besser ist die allgemeine Verhaltensleistung der Mäuse bzw. umgekehrt, je größer die Schädigung, desto stärker ist das Verhalten der Mäuse beeinträchtigt. Interessanterweise besteht aber auch ein Trend hin zu einer positiven Korrelation ( $p = 0,1214$ ) zwischen der Anzahl an „head-dips“ 28 Tage nach Trauma und dem verbliebenen gesunden Hirngewebe (Abbildung 28 E). Dies bedeutet, dass Mäuse mit einer geringeren Hirnschädigung häufiger „head-dips“ durchführen, als solche mit einem größeren Hirnschaden.



**Abbildung 28: Korrelationsanalysen weisen auf einen Zusammenhang zwischen Verhaltensleistung und der Hirnschädigung der Mäuse in der frühen, als auch späten Phase der Pathogenese eines SHTs.**

(A-C) Lineare Korrelationsanalyse von männlichen (links) und weiblichen (rechts) Mäusen mittels Spearman-Korrelationskoeffizient zwischen (A) Läsionsvolumen und Hämatomgröße 5

Tage nach SHT (B) Läsionsvolumen und mNSS 5 Tage nach SHT (C) Hämatomgröße und mNSS 5 Tage nach Trauma-induktion. (D, E) Lineare Korrelationsanalyse von Mäusen beider Geschlechter mittels Spearman-Korrelationskoeffizient zwischen (D) gesunden Hirngewebe % ipsi und mNSS 30 Tage nach CCI und (E) Anzahl „head-dips“ 28 Tage nach Trauma und gesunden Hirngewebe % ipsi; n= 6-8 pro Gruppe. Werte einzelner Tiere  $\pm$  SEM sind dargestellt. CCI = „Controlled Cortical Impact“, ipsi = ipsiläsional, mNSS = „Modified Neurological Severity Score“.

#### 4.10 Der MRC1 beeinflusst die Pathogenese im frühen Verlauf eines SHTs auf subtile Weise

Die mRNA Expressionsanalysen mit einem Panel von 10 Inflammations-assoziierten Markern zeigten, dass MRC1-Defizienz zu deutlichen geschlechtsspezifischen Veränderungen in der Frühphase nach SHT führt. Um sich ein detaillierteres Bild darüber zu machen, wie sich der MRC1-Knock-out auf molekularer Ebene auswirkt, wurden globale Transkriptome von 18 CCI-Tieren (10 CCI+MRC1-WT, 8 CCI+MRC1-KO) sowie 11 „Sham“-Tieren (5 Sham+MRC1-WT, 6 Sham+MRC1-KO) mittels RNA-Sequenzierung untersucht. Die ungleiche Anzahl an eingesendeten Proben pro Gruppe ergab sich durch eine qualitative Vorauswahl aufgrund der RNA-Integrität sowie der Exklusion von statistisch signifikanten Ausreißern nach der Analyse der RNA-Sequenzierungsergebnisse. Die Analysen sollten sowohl allgemeine Auswirkungen des Knock-outs auf die Mäuse (siehe 4.11) als auch Auswirkungen durch die CCI-Induktion und geschlechtsspezifische Unterschiede, die in diesem Forschungsprojekt zahlreich aufgetreten sind, aufklären. Auf die Auswirkungen des MRC1-Knock-outs unter physiologischen Bedingungen, möchte ich an späterer Stelle eingehen (siehe 4.11).

Die Ergebnisse sind zunächst tabellarisch dargestellt (Tabelle 19), um einen besseren Überblick zu ermöglichen. Anschließend erfolgt eine detailliertere Betrachtung.

**Tabelle 19: Ergebnisse der RNA-Sequenzierung im Überblick.**

Analysemethode	Gruppenvergleich	Ergebnisse	
		<b>Einzelgenanalyse (Top 150 DEGs)</b>	<b>GSEA (alle DEGs)</b>
<b>Geschlechtsunabhängig</b>	CCI+MRC1-KO vs. - WT	Inflammations- bzw. Nervensystem-assoziierte Gene in CCI+MRC1-KO signifikant reguliert, insgesamt aber niedrige Absolutexpressionswerte	Deutlicher CCI-Effekt in MRC1-WT Mäusen, kein signifikantes Ergebnis für CCI+MRC1-KO
	CCI+MRC1-KO vs. Sham+MRC1-KO	Immunregulation und –modulations-assoziierte	Inflammatorische Immunantwort

Analysemethode	Gruppenvergleich	Ergebnisse	
		Gene in CCI+MRC1-KO signifikant hochreguliert – CCI-Effekt deutlich sichtbar	auf das Trauma in CCI-Tieren
	CCI+MRC1-WT vs. Sham+MRC1-WT	Immunregulation-, Zelldifferenzierung- und Astrozyten-assoziierte Gene in CCI-MRC1-WT signifikant hochreguliert – CCI-Effekt deutlich sichtbar	Inflammatorische Immunantwort auf das Trauma in CCI-Tieren
<b>Geschlechtsabhängig</b>	CCI+MRC1-KO vs. - WT <b>(Männchen)</b>	Immunsystem bzw. Immunantwort sowie Zellzyklus- und Apoptose- assoziierte Gene in CCI+MRC1-KO signifikant hochreguliert, absolute Expressionswerte insgesamt niedrig	Gesteigerte inflammatorische Antwort in CCI+MRC1-KO
	CCI+MRC1-KO vs. - WT <b>(Weibchen)</b>	Kein überzeugender Genotyp-spezifischer Effekt sichtbar	Keine eindeutige Aussage für CCI+MRC1-KO

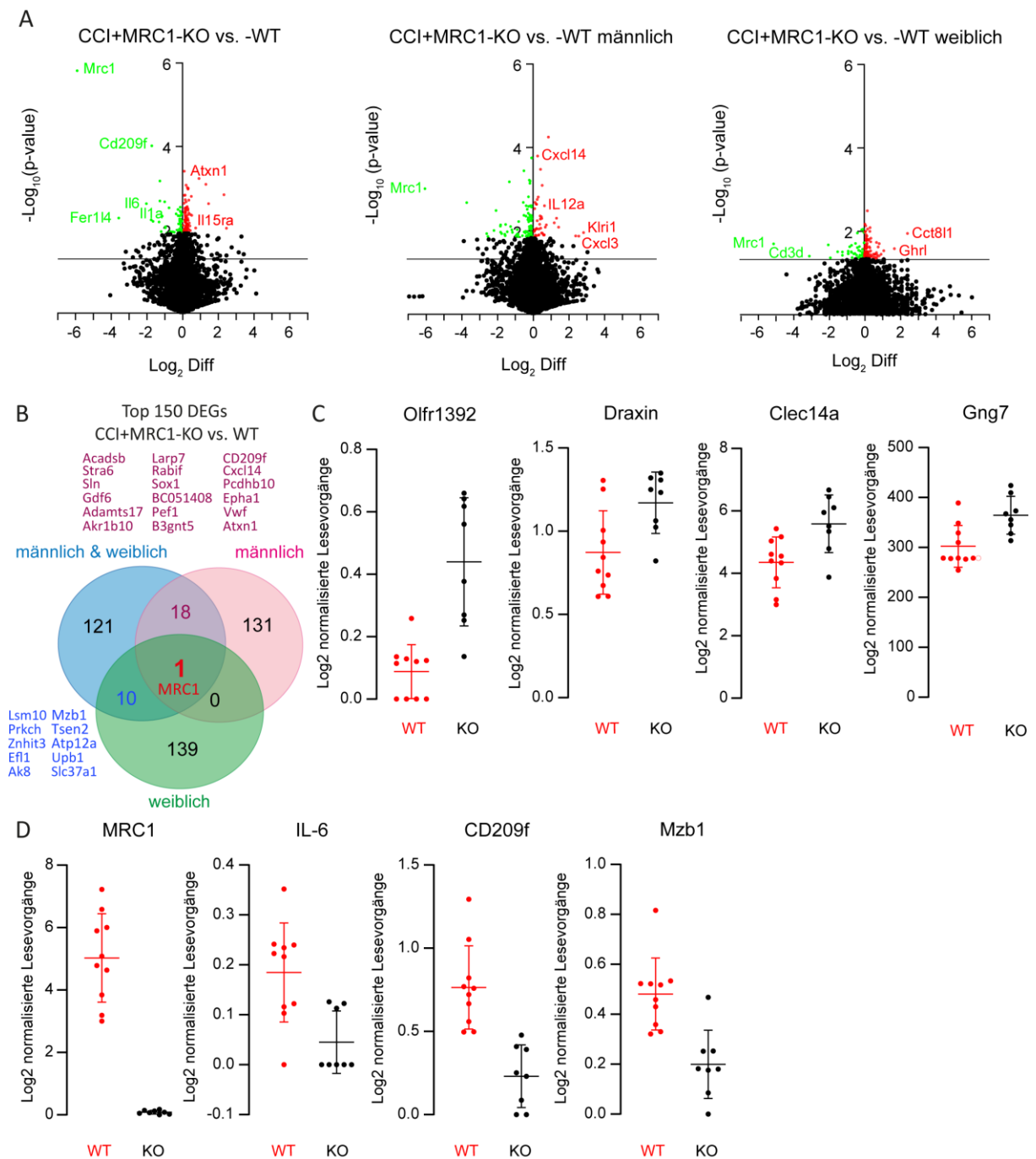
Wie dem Abschnitt 3.6.5 des Methodenteils zu entnehmen ist, wurden zuerst die differenziell exprimierten Gene (DEGs) – insbesondere die Top 150 DEGs analysiert. Im geschlechtsunabhängigen Vergleich der Top 150 DEGs von CCI+MRC1-KO vs. -WT konnte festgestellt werden, dass in den Knock-outs einige Gene, welche Inflammations- bzw. Nervensystem-assoziiert sind (*Mrc1*, *Il-6*, *Mzb1*, *Cd209f*, *Clec14a*, *Draxin* und *Gng7*) reguliert waren.

Die geschlechtsabhängige Auswertung dieser Top 150 DEGs resultierte in männlichen CCI+MRC1-KO-Mäusen in deutlich mehr regulierten Genen (u.a. *Klri1*, *Cxcl3*, *Il12a*, *Cd209f*, *Zswim2*), welche mit dem Immunsystem bzw. einer Immunantwort sowie Zellteilung und Apoptose in Verbindung stehen. Bei weiblichen Mäusen war dies nicht der Fall.

Die Top 150 DEGs von beiden Geschlechtern sowie nur männlichen und nur weiblichen Mäusen wurden zusätzlich in Form eines Venn-Diagramms dargestellt. Hierbei zeigte sich, dass nur *Mrc1* in allen drei Gruppen differenziell exprimiert war.

Zwischen männlichen und weiblichen Mäusen gab es hingegen kein einziges Gen, was in beiden Gruppen reguliert war (Abbildung 29 B). Dies zeigt eindrücklich, dass die Reaktion des Körpers auf ein induziertes SHT in beiden Geschlechtern sehr unterschiedlich ist.

Gleichzeitig wurden Vulkandiagramme für alle DEGs für beide Geschlechter gemeinsam, nur für männliche und nur für weibliche Mäuse erstellt. Hierbei zeigte sich zusätzlich eindrücklich, dass in weiblichen CCI+MRC1-KO-Mäusen insgesamt deutlich weniger Gene signifikant reguliert waren, als in männlichen Mäusen mit dem gleichen Genotyp (Abbildung 29 A).



**Abbildung 29: Der Knock-out des MRC1-Rezeptors führt zu signifikanten geschlechtsspezifischen Unterschieden in Bezug auf die regulierten Gene.**

**(A) Vulkandiagramm der unterschiedlichen Genexpression in CCI+MRC1-KO im Vergleich zu CCI+MRC1-WT in beiden Geschlechtern gemeinsam, nur in männlichen und nur in weiblichen Mäusen. Die X-Achse zeigt die  $\log_2\text{Diff}$ , was bedeutet, dass hochregulierte Gene in der CCI+MRC1-KO-Gruppe positiv (rot), während reduzierte Gene negativ (grün) erscheinen. Die Y-Achse zeigt hingegen den  $-\log_{10}(\text{p-value})$ . Die Top 150 regulierten Gene sind farblich in grün und rot hervorgehoben, während die restlichen Gene schwarz dargestellt sind. Die schwarze Linie teilt die Gene zusätzlich in signifikant (oberhalb der Linie) und nicht signifikant (unterhalb der Linie) reguliert ein. (B) Venn-Diagramm der Top 150 DEGs (C) Exemplarische Streudiagramme ausgewählter hoch- bzw. (D) herunterregulierter Gene in CCI+MRC1-KO-Mäusen. Gene wurden auf der Basis der Top 150 regulierten Gene, entsprechend des p-Werts und unter der Voraussetzung, dass sie bei den hallmarks der GSEA eine Rolle spielen, ausgewählt. (CCI: n = 8-10 pro Gruppe).**

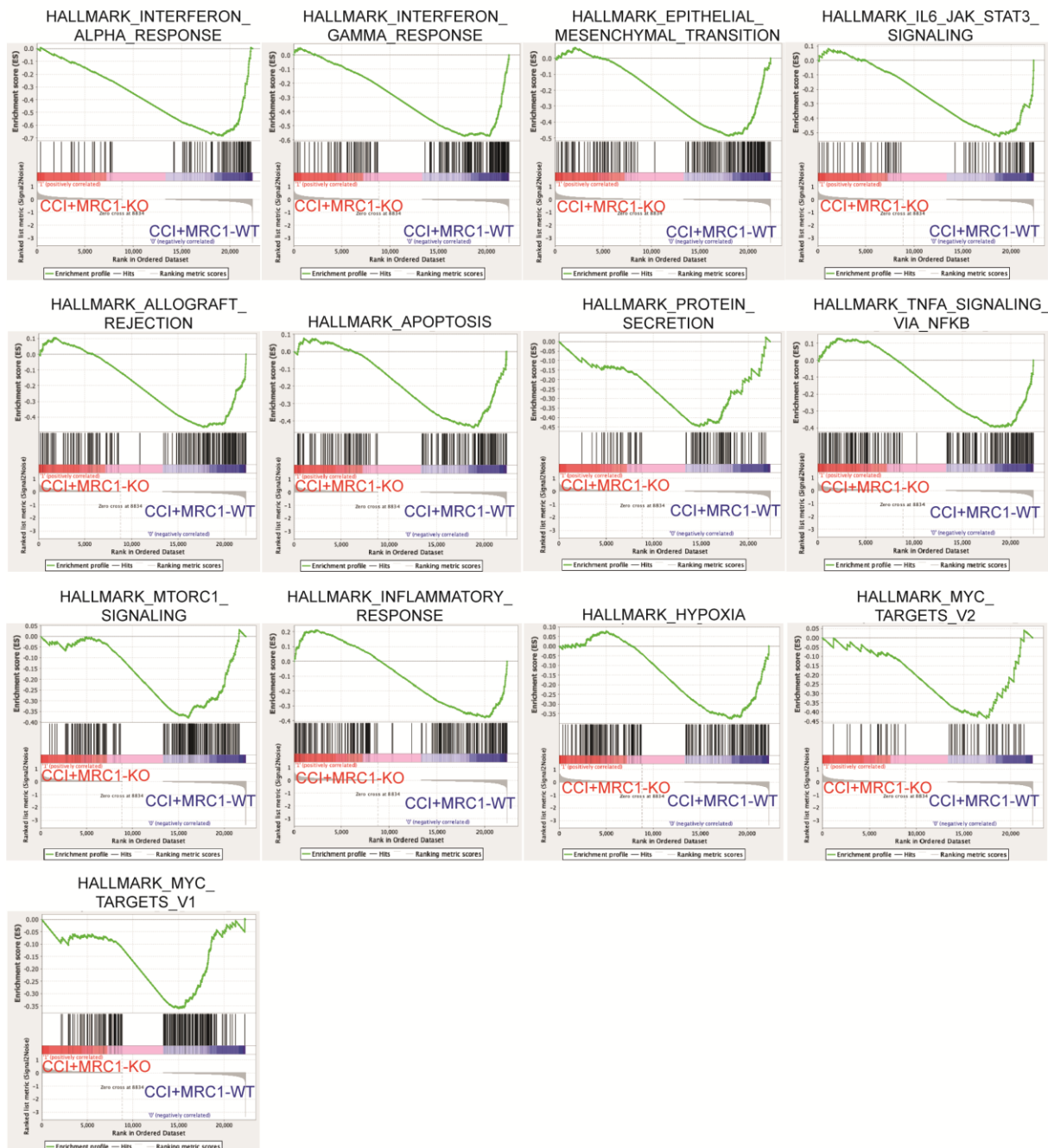
**CD209f = „Cluster of differentiation 209f“, Clec14a = „C-Type Lectin Domain Containing 14A“, DEGs = differenziell exprimierte Gene, Gng7 = „G Protein Subunit Gamma 7“, GSEA = „Gene Set Enrichment Analysis“, IL-6 = Interleukin 6, MRC1 = Mannose Rezeptor C-Typ I, Mzb1 = „Marginal Zone B And B1 Cell Specific Protein“, Olfr1392 = „Olfactory Receptor 1392“.**

Anschließend wurde GSEA geschlechtsunabhängig und –abhängig durchgeführt, um Informationen über hochregulierte biologische Prozesse oder Zustände in Form s.g. „hallmarks“ zu erhalten.

Im geschlechtsunabhängigen Vergleich von MRC1-WT vs. MRC1-KO zum Zeitpunkt 5 Tage nach SHT, wurden 40 hochregulierte Gensätze identifiziert. Davon waren 13 Gensätze signifikant hochreguliert. Alle in der CCI+MRC1-WT-Gruppe signifikant hochregulierten „hallmarks“ stehen im Zusammenhang mit inflammatorischen Prozessen (Interferon alpha Antwort, IL-6/JAK/STAT3-Signalweg, Apoptose, Entzündungsantwort, Hypoxie, usw) (Abbildung 30).

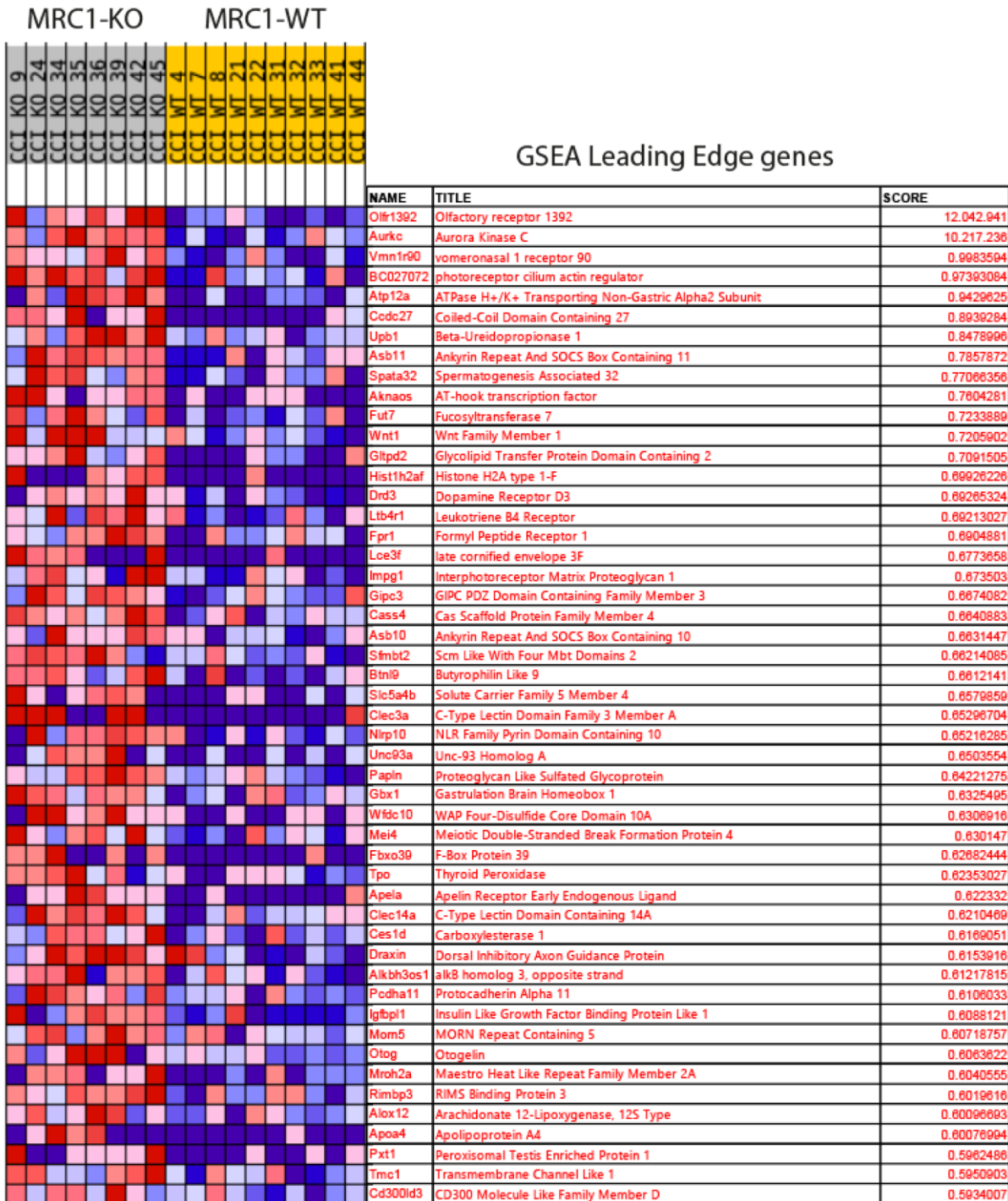
Demgegenüber waren 10 Gensätze in MRC1-KO vs. MRC1-WT hochreguliert. Ein statistisch signifikanter Unterschied wurde jedoch für keinen Gensatz ermittelt. Zusammen betrachtet, weist dieses Ergebnis darauf hin, dass die inflammatorische Reaktion auf ein SHT in Wildtypen deutlich ausgeprägter als in MRC1-defizienten Mäusen ist bzw. dass die Immunantwort auf ein SHT in Knock-outs beeinträchtigt ist.

**A** Genanreicherungsdiagramme von hochregulierten biologischen Prozessen und Zuständen in CCI+MRC1-WT vs. -KO



**Abbildung 30: Genanreicherungsdiagramme von GSEA-Gensätzen in CCI+MRC1-KO- gegenüber CCI+MRC1-WT-Mäusen.**

Genatzanreicherungsanalysen wurden mit GSEA 4.1.0. für biologische Prozesse und Zustände durchgeführt. Anreicherungsdiagramme zeigen den Anreicherungswert eines bestimmten Gens im Genatz. Die grüne Linie stellt den Verlauf des Anreicherungswert dar. Der Spitzenwert steht für den endgültigen Anreicherungswert. In CCI+MRC1-KO-Tieren angereicherte Gene werden als positive Anreicherungswerte (rot) dargestellt. In CCI+MRC1-WT-Mäusen angereicherte Gene werden als negative Anreicherungswerte (blau) dargestellt. Aufgrund der Tatsache, dass kein „hallmark“ in der CCI+MRC1-KO-Gruppe signifikant hochreguliert war, gibt es hierfür keine Genanreicherungsdiagramme. (A) In CCI+MRC1-WT-Mäusen (blau) angereicherte Gene.



**Abbildung 31: Heatmap (Teil 1) der unterschiedlich exprimierten Gene in den CCI-Mäusen, die einen MRC1-KO bzw. -WT Genotyp haben.**

Mäuse wurden fünf Tage nach der CCI-Operation euthanasiert. Gehirngewebe des ipsiläonalen oberen Quadranten wurde entsprechend des Protokolls gesammelt und per RNA-Sequenzierung analysiert. Die GSEA wurde mit einer Eingabe von 22335 gültigen Genen unter Verwendung von GSEA 4.1.0 durchgeführt. Die farbliche Kodierung der Top 50 herunterregulierten Gene reicht von einem hohen Anreicherungs Wert in dunkelrot bis zu einem niedrigen Anreicherungs Wert in dunkelblau.

GSEA = „Gene Set Enrichment Analysis“.

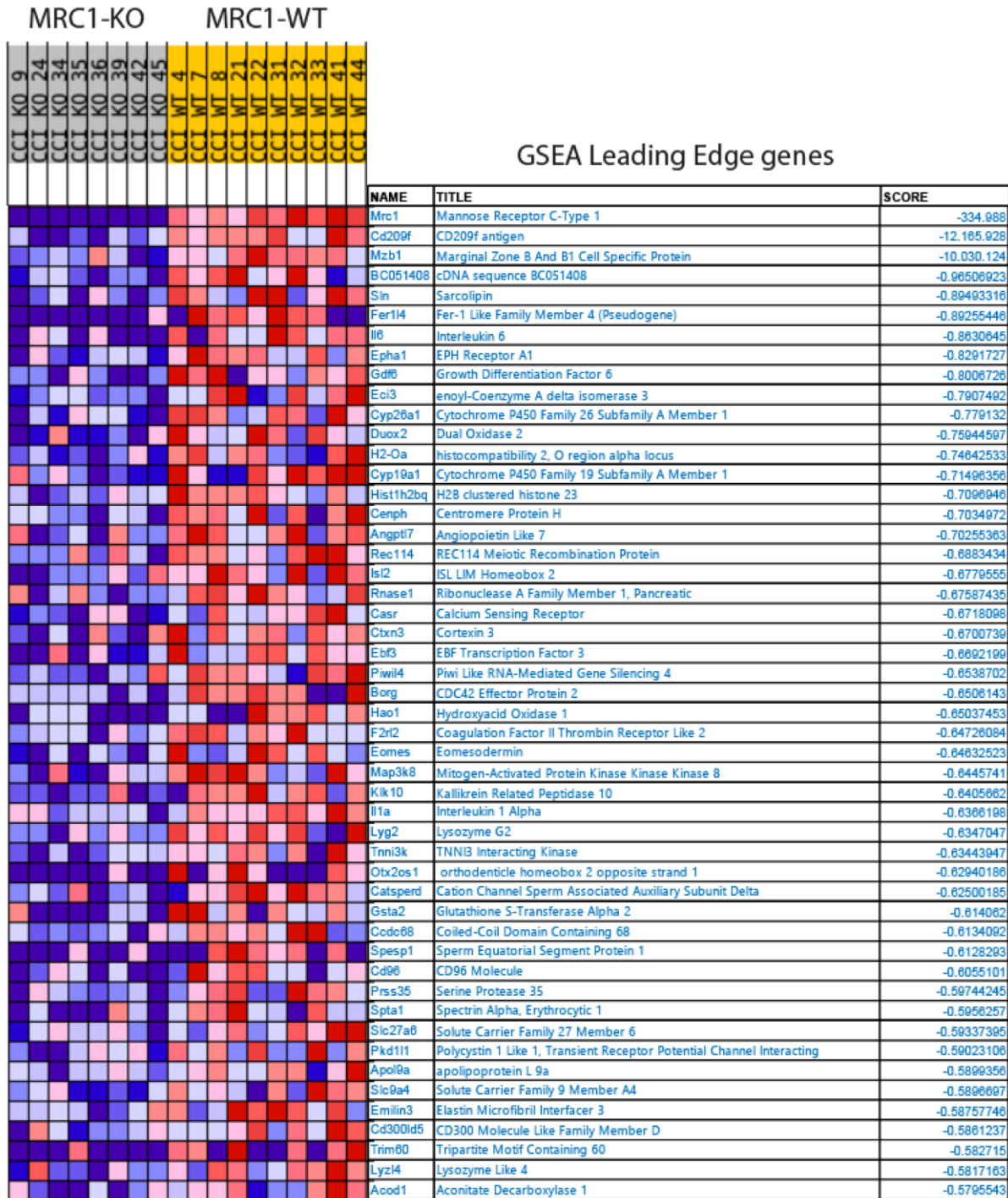


Abbildung 32: Heatmap (Teil 2) der unterschiedlich exprimierten Gene in den CCI-Mäusen, die einen MRC1-KO bzw. -WT Genotyp haben.

Der Ablauf erfolgte wie in Abbildung 31 beschrieben (siehe oben). Die farbliche Kodierung der Top 50 herunterregulierten Gene reicht von einem hohen Anreicherungs Wert in dunkelrot bis zu einem niedrigen Anreicherungs Wert in dunkelblau.  
**GSEA = „Gene Set Enrichment Analysis“.**

Aufgrund der vorherigen Ergebnisse, stellte sich die Frage, ob beide Genotypen grundsätzlich gleich auf ein SHT reagieren. Um dies zu beantworten, wurde die GSEA anschließend mit

beiden CCI-Gruppen im Vergleich zu ihrer jeweiligen korrespondierenden „Sham“-Gruppe durchgeführt. Die Analyse der CCI+MRC1-WT vs. Sham+MRC1-WT resultierte in 49 hochregulierten Gensätzen, von denen 26 signifikant ( $p < 0,05$ ) waren. Auch die CCI+MRC1-KO vs. Sham+MRC1-KO Analyse ergab 49 Gensätze hochreguliert, wovon 26 signifikant ( $p < 0,05$ ) waren. Alle signifikant regulierten „hallmarks“ beider Gruppen sind Abbildung 33 zu entnehmen, während in Abbildung 34 die Genanreicherungsdiagramme zu den ersten acht „hallmarks“ dargestellt sind.

Ein Vergleich der biologischen Prozesse bzw. Zustände zeigte, dass diese zum überwiegenden Teil identisch sind und die inflammatorische Antwort im Gehirn in all ihren Facetten [Inflammation (u.a. Interferon, Komplement, reaktive Sauerstoffspezies, TNF- $\alpha$ , IL-6/JAK/STAT3-Signalweg), Zelldifferenzierung und -proliferation (u.a. epitheliale, mesenchymale Transition, Kras-Signalweg) und Blut-assoziierte Prozesse (u.a. Koagulation, Angiogenese)] widerspiegelt. Zusammengefasst bedeutet dies, dass beide Genotypen auf transkriptioneller Ebene zunächst mit den gleichen Mechanismen auf ein induziertes Neurotrauma reagieren.

**A**

	GS follow link to MSigDB	GS DETAILS	SIZE	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val
1	<a href="#">HALLMARK_INTERFERON_ALPHA_RESPONSE</a>	<a href="#">Details...</a>	90	0.85	1.95	0.000	0.000
2	<a href="#">HALLMARK_INTERFERON_GAMMA_RESPONSE</a>	<a href="#">Details...</a>	183	0.81	1.91	0.000	0.000
3	<a href="#">HALLMARK_IL6_JAK_STAT3_SIGNALING</a>	<a href="#">Details...</a>	83	0.82	1.89	0.000	0.000
4	<a href="#">HALLMARK_ALLOGRAFT_REJECTION</a>	<a href="#">Details...</a>	187	0.76	1.81	0.000	0.000
5	<a href="#">HALLMARK_EPITHELIAL_MESENCHYMAL_TRANSITION</a>	<a href="#">Details...</a>	191	0.76	1.80	0.000	0.000
6	<a href="#">HALLMARK_G2M_CHECKPOINT</a>	<a href="#">Details...</a>	184	0.76	1.79	0.000	0.000
7	<a href="#">HALLMARK_INFLAMMATORY_RESPONSE</a>	<a href="#">Details...</a>	195	0.75	1.78	0.000	0.000
8	<a href="#">HALLMARK_COAGULATION</a>	<a href="#">Details...</a>	133	0.74	1.73	0.000	0.000
9	<a href="#">HALLMARK_IL2_STAT5_SIGNALING</a>	<a href="#">Details...</a>	194	0.72	1.70	0.000	0.000
10	<a href="#">HALLMARK_E2F_TARGETS</a>	<a href="#">Details...</a>	194	0.72	1.70	0.000	0.000
11	<a href="#">HALLMARK_COMPLEMENT</a>	<a href="#">Details...</a>	185	0.71	1.69	0.000	0.000
12	<a href="#">HALLMARK_TNFA_SIGNALING_VIA_NFKB</a>	<a href="#">Details...</a>	193	0.69	1.64	0.000	0.000
13	<a href="#">HALLMARK_KRAS_SIGNALING_UP</a>	<a href="#">Details...</a>	194	0.66	1.58	0.000	0.001
14	<a href="#">HALLMARK_APOPTOSIS</a>	<a href="#">Details...</a>	161	0.67	1.58	0.000	0.001
15	<a href="#">HALLMARK_ANGIOGENESIS</a>	<a href="#">Details...</a>	36	0.73	1.58	0.001	0.000
16	<a href="#">HALLMARK_MITOTIC_SPINDLE</a>	<a href="#">Details...</a>	198	0.64	1.51	0.000	0.002
17	<a href="#">HALLMARK_P53_PATHWAY</a>	<a href="#">Details...</a>	193	0.62	1.46	0.000	0.005
18	<a href="#">HALLMARK_XENOBIOTIC_METABOLISM</a>	<a href="#">Details...</a>	193	0.61	1.43	0.000	0.010
19	<a href="#">HALLMARK_HYPOXIA</a>	<a href="#">Details...</a>	191	0.58	1.37	0.000	0.022
20	<a href="#">HALLMARK_TGF_BETA_SIGNALING</a>	<a href="#">Details...</a>	53	0.60	1.34	0.047	0.035
21	<a href="#">HALLMARK_GLYCOLYSIS</a>		198	0.57	1.34	0.002	0.035
22	<a href="#">HALLMARK_ADIPOGENESIS</a>		194	0.57	1.34	0.001	0.033
23	<a href="#">HALLMARK_ESTROGEN_RESPONSE_LATE</a>		190	0.56	1.33	0.003	0.035
24	<a href="#">HALLMARK_CHOLESTEROL_HOMEOSTASIS</a>		70	0.58	1.33	0.040	0.035
25	<a href="#">HALLMARK_REACTIVE_OXIGEN_SPECIES_PATHWAY</a>		47	0.58	1.30	0.069	0.049
26	<a href="#">HALLMARK_NOTCH_SIGNALING</a>		31	0.61	1.30	0.097	0.048

**B**

	GS follow link to MSigDB	GS DETAILS	SIZE	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val
1	<a href="#">HALLMARK_INTERFERON_ALPHA_RESPONSE</a>	<a href="#">Details...</a>	90	0.86	2.10	0.000	0.000
2	<a href="#">HALLMARK_INTERFERON_GAMMA_RESPONSE</a>	<a href="#">Details...</a>	183	0.82	2.07	0.000	0.000
3	<a href="#">HALLMARK_IL6_JAK_STAT3_SIGNALING</a>	<a href="#">Details...</a>	83	0.83	1.99	0.000	0.000
4	<a href="#">HALLMARK_INFLAMMATORY_RESPONSE</a>	<a href="#">Details...</a>	195	0.74	1.87	0.000	0.000
5	<a href="#">HALLMARK_G2M_CHECKPOINT</a>	<a href="#">Details...</a>	184	0.74	1.86	0.000	0.000
6	<a href="#">HALLMARK_ALLOGRAFT_REJECTION</a>	<a href="#">Details...</a>	187	0.75	1.86	0.000	0.000
7	<a href="#">HALLMARK_EPITHELIAL_MESENCHYMAL_TRANSITION</a>	<a href="#">Details...</a>	191	0.71	1.79	0.000	0.000
8	<a href="#">HALLMARK_E2F_TARGETS</a>	<a href="#">Details...</a>	194	0.71	1.79	0.000	0.000
9	<a href="#">HALLMARK_COAGULATION</a>	<a href="#">Details...</a>	133	0.71	1.76	0.000	0.000
10	<a href="#">HALLMARK_IL2_STAT5_SIGNALING</a>	<a href="#">Details...</a>	194	0.70	1.75	0.000	0.000
11	<a href="#">HALLMARK_COMPLEMENT</a>	<a href="#">Details...</a>	185	0.68	1.69	0.000	0.000
12	<a href="#">HALLMARK_APOPTOSIS</a>	<a href="#">Details...</a>	161	0.66	1.65	0.000	0.000
13	<a href="#">HALLMARK_TNFA_SIGNALING_VIA_NFKB</a>	<a href="#">Details...</a>	193	0.65	1.61	0.000	0.000
14	<a href="#">HALLMARK_KRAS_SIGNALING_UP</a>	<a href="#">Details...</a>	194	0.63	1.57	0.000	0.001
15	<a href="#">HALLMARK_ANGIOGENESIS</a>	<a href="#">Details...</a>	36	0.69	1.55	0.003	0.001
16	<a href="#">HALLMARK_P53_PATHWAY</a>	<a href="#">Details...</a>	193	0.61	1.54	0.000	0.002
17	<a href="#">HALLMARK_MITOTIC_SPINDLE</a>	<a href="#">Details...</a>	198	0.60	1.50	0.000	0.004
18	<a href="#">HALLMARK_XENOBIOTIC_METABOLISM</a>	<a href="#">Details...</a>	193	0.59	1.47	0.000	0.008
19	<a href="#">HALLMARK_REACTIVE_OXIGEN_SPECIES_PATHWAY</a>	<a href="#">Details...</a>	47	0.60	1.39	0.034	0.023
20	<a href="#">HALLMARK_CHOLESTEROL_HOMEOSTASIS</a>	<a href="#">Details...</a>	70	0.56	1.33	0.046	0.054
21	<a href="#">HALLMARK_ADIPOGENESIS</a>		194	0.53	1.32	0.007	0.059
22	<a href="#">HALLMARK_HYPOXIA</a>		191	0.53	1.32	0.010	0.063
23	<a href="#">HALLMARK_GLYCOLYSIS</a>		198	0.51	1.29	0.012	0.081
24	<a href="#">HALLMARK_APICAL_JUNCTION</a>		197	0.51	1.29	0.022	0.080
25	<a href="#">HALLMARK_TGF_BETA_SIGNALING</a>		53	0.54	1.27	0.117	0.094
26	<a href="#">HALLMARK_ESTROGEN_RESPONSE_LATE</a>		190	0.50	1.26	0.024	0.097

**Abbildung 33: Hochregulierte „hallmarks“ CCI- vs. korrespondierende „Sham“-Gruppe.**

**(A) Signifikant hochregulierte „hallmarks“ CCI-MRC1-WT vs. Sham-MRC1-WT auf Basis des p-Werts (<0,05). (B) Signifikant hochregulierte „hallmarks“ CCI-MRC1-KO vs. Sham-MRC1-KO auf Basis des p-Werts (<0,05).**

Die ersten 20 Ergebnisse werden vom GSEA Programm automatisch blau dargestellt. GSEA = „Gene Set Enrichment Analysis“.

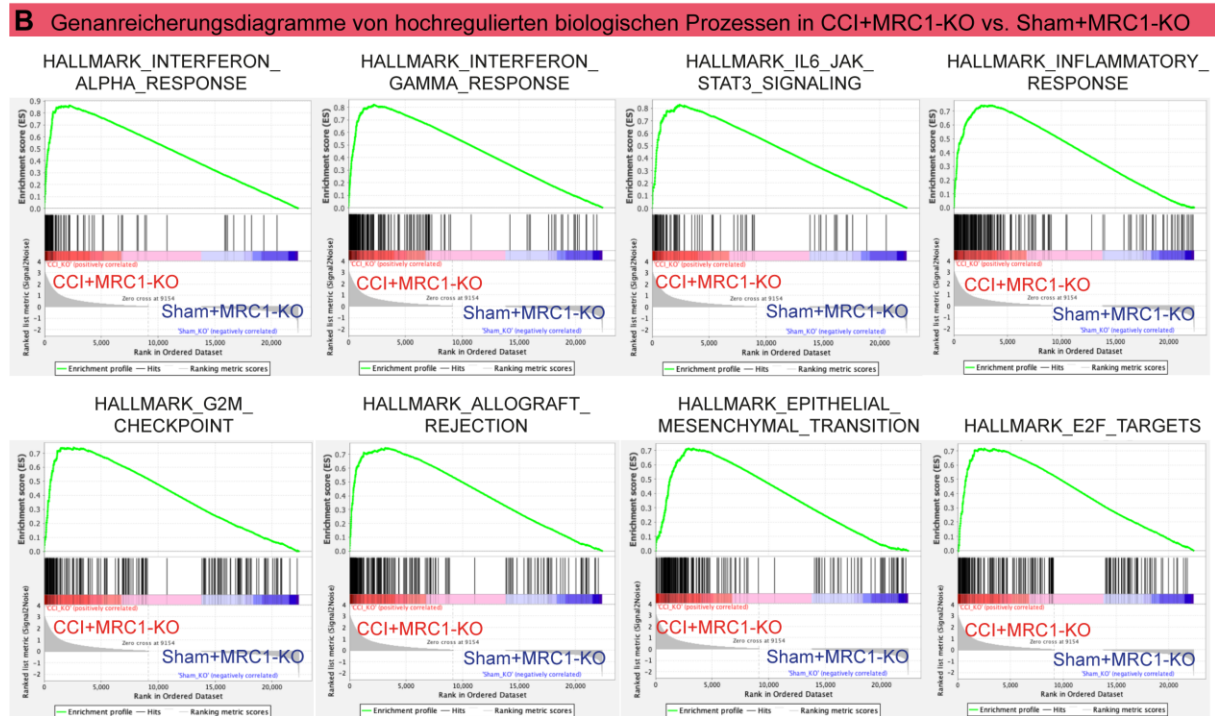
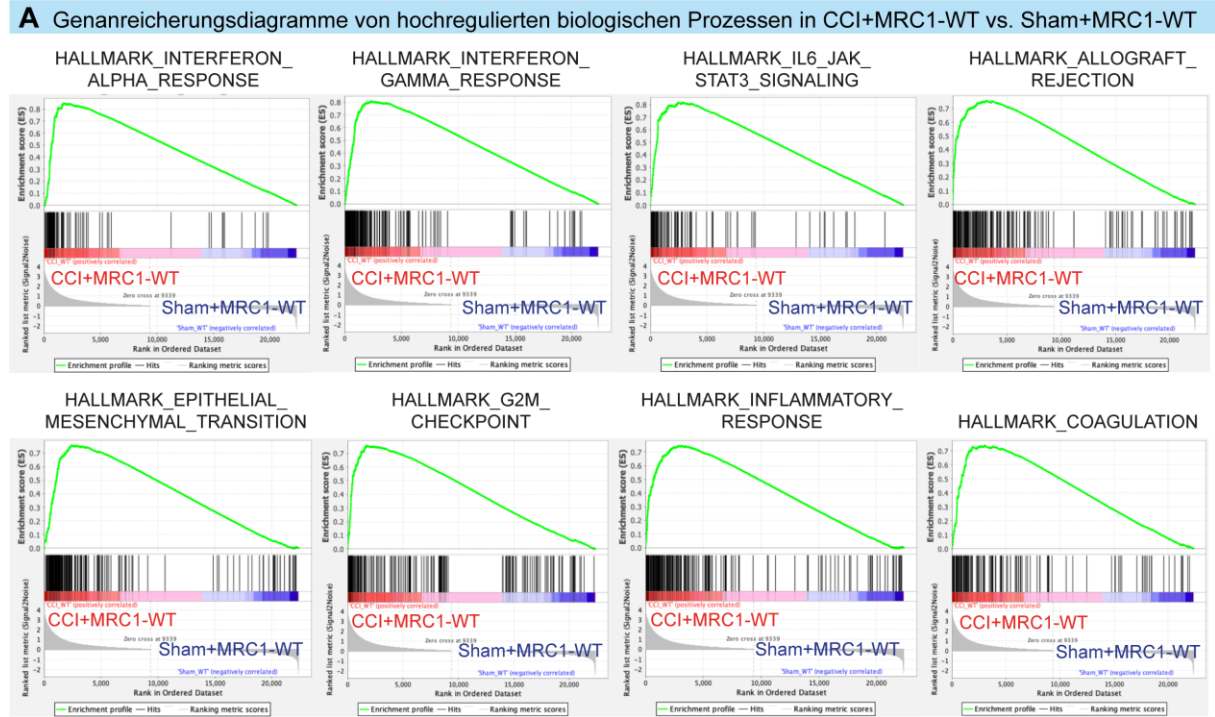


Abbildung 34: Top 8 Genanreicherungsdiagramme für CCI+MRC1-WT- bzw. CCI+MRC1-KO-Mäuse im Vergleich zu ihrer korrespondierenden „Sham“-Gruppe.

Die Durchführung der Gensatzanreicherungsanalysen erfolgte wie in Abbildung 30 (siehe oben) beschrieben. Anreicherungsdiagramme zeigen den Anreicherungswert eines bestimmten Gens im Gensatz. Die grüne Linie stellt den Verlauf des Anreicherungswert dar. Der Spitzenwert steht

**für den endgültigen Anreicherungswert. In CCI+MRC1-WT- bzw. -KO-Tieren angereicherte Gene werden als positive Anreicherungswerte (rot) dargestellt. (A) In CCI+MRC1-WT-Mäusen angereicherte Gene. (B) In CCI+MRC1-KO-Mäusen angereicherte Gene.**

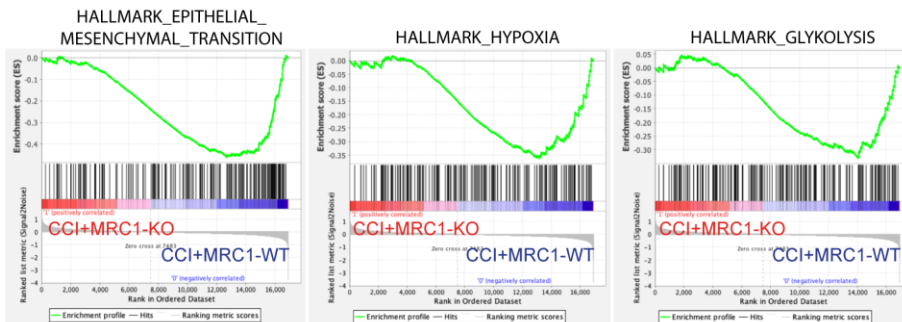
Um den geschlechtsspezifischen Effekten, die in zahlreichen Versuchsabschnitten präsent waren, nun näher auf den Grund zu gehen, wurde die GSEA geschlechtsabhängig für CCI-MRC1-WT vs. -KO durchgeführt. Was bereits in der Analyse der Top 150 DEGs ersichtlich war, bestätigte sich. So lässt sich feststellen, dass die Reaktion des Körpers nach einem CCI geschlechtsspezifisch verläuft und in zahlreichen Geschlechtsunterschieden resultiert.

In männlichen Mäusen der CCI+MRC1-WT ergab die GSEA Analyse 32 hochregulierte Gensätze, von denen 3 auf Basis des p-Werts ( $<0,05$ ) signifikant hochreguliert waren (Abbildung 35 A). Männliche Mäuse dieser Gruppe zeichnen sich durch heilungsfördernde, aber auch destruktive hochregulierte biologische Prozesse und Zustände aus.

In männlichen CCI+MRC1-KO-Mäusen im Vergleich zu -WT waren 18 Gensätze hochreguliert. Unter Berücksichtigung des p-Werts ( $<0,05$ ) verblieb nur ein biologisch aktiver Prozess bzw. Zustand (Abbildung 35 B). Betrachtet man nur den p-Wert, könnte man schlussfolgern, dass in männlichen CCI+MRC1-KO-Mäusen eine deutlich verstärkte Immunantwort stattfindet. Dieses Ergebnis ist allerdings aufgrund des hohen FDR q-Werts (0,996) mit einer gewissen Vorsicht zu betrachten. Der FDR q-Wert gibt an, mit welcher Wahrscheinlichkeit das Ergebnis als richtig betrachtet werden kann. Je höher er ist, desto wahrscheinlicher ist es, dass eine falsche Annahme als vermeintlich richtig angesehen wird. Signifikante „hallmarks“, welche einen niedrigen FDR q-Wert haben, sind grundsätzlich geeigneter, um Hypothesen aufzustellen, als welche die einen hohen FDR q-Wert haben [242]. Es ist allerdings grundsätzlich auch nicht ausgeschlossen, dass die Annahme falsch ist, nur weil ein hoher FDR q-Wert vorliegt. Auch eine geringe Stichprobe kann so z.B. Auswirkungen auf den FDR q-Wert haben [243]. Um dies auszuschließen wurden die 55 Gene, auf dessen Basis die GSEA das „hallmark“ „inflammatory response“ ausgibt, mit den Genen in männlichen CCI+MRC1-KO-Mäusen, welche einen p-Wert von  $\leq 0,1$  haben, verglichen. Nur ein Gen (Cxcl1) von diesen 55 ist signifikant reguliert. Immerhin 3 Gene (Ptgir, Ccl22, Il15ra) zeigen einen Trend. Dies entspricht nur 7,2 % und lässt die verstärkte Immunantwort in männlichen CCI+MRC1-KO-Mäusen anzweifeln. Bei erneuter Betrachtung der Top 150 DEGs, finden sich unter den insgesamt 44 hochregulierten Genen, 11 Gene, welche im Zusammenhang mit einer Immunantwort stehen. Das entspricht 25 %. Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass männliche MRC1-KO-Mäuse tendenziell mit einer verstärkten Immunantwort auf ein induziertes SHT reagieren als ihre Wildtyp-Geschwister. Dies steht im Gegensatz zur geschlechtsunabhängigen Analyse.

## Männchen

### A Genanreicherungsdiagramme von hochregulierten biologischen Prozessen und Zuständen in CCI+MRC1-WT vs. -KO



### B Genanreicherungsdiagramme von hochregulierten biologischen Prozessen und Zuständen in CCI+MRC1-KO vs. -WT

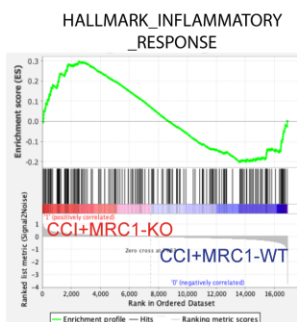


Abbildung 35: Genanreicherungsdiagramme von GSEA-Gensätzen in männlichen CCI+MRC1-WT- gegenüber CCI+MRC1-KO-Mäusen.

Die Durchführung der Gensatzanreicherungsanalysen erfolgte wie in Abbildung 30 (siehe oben) beschrieben. Anreicherungsdiagramme zeigen den Anreicherungswert eines bestimmten Gens im Gensatz. Die grüne Linie stellt den Verlauf des Anreicherungswert dar. Der Spitzenwert steht für den endgültigen Anreicherungswert. Gene, die in männlichen CCI+MRC1-WT-Tieren angereichert waren, werden als negative Anreicherungswerte (blau) dargestellt. Gene, die in männlichen CCI+MRC1-KO-Mäusen angereichert waren, werden als positive Anreicherungswerte (rot) dargestellt. (A) Genanreicherungsdiagramme von hochregulierten „hallmarks“ männlicher CCI+MRC1-WT-Mäuse. (B) Genanreicherungsdiagramme von hochregulierten „hallmarks“ männlicher CCI+MRC1-KO-Mäuse. GSEA = „Gene Set Enrichment Analysis“.

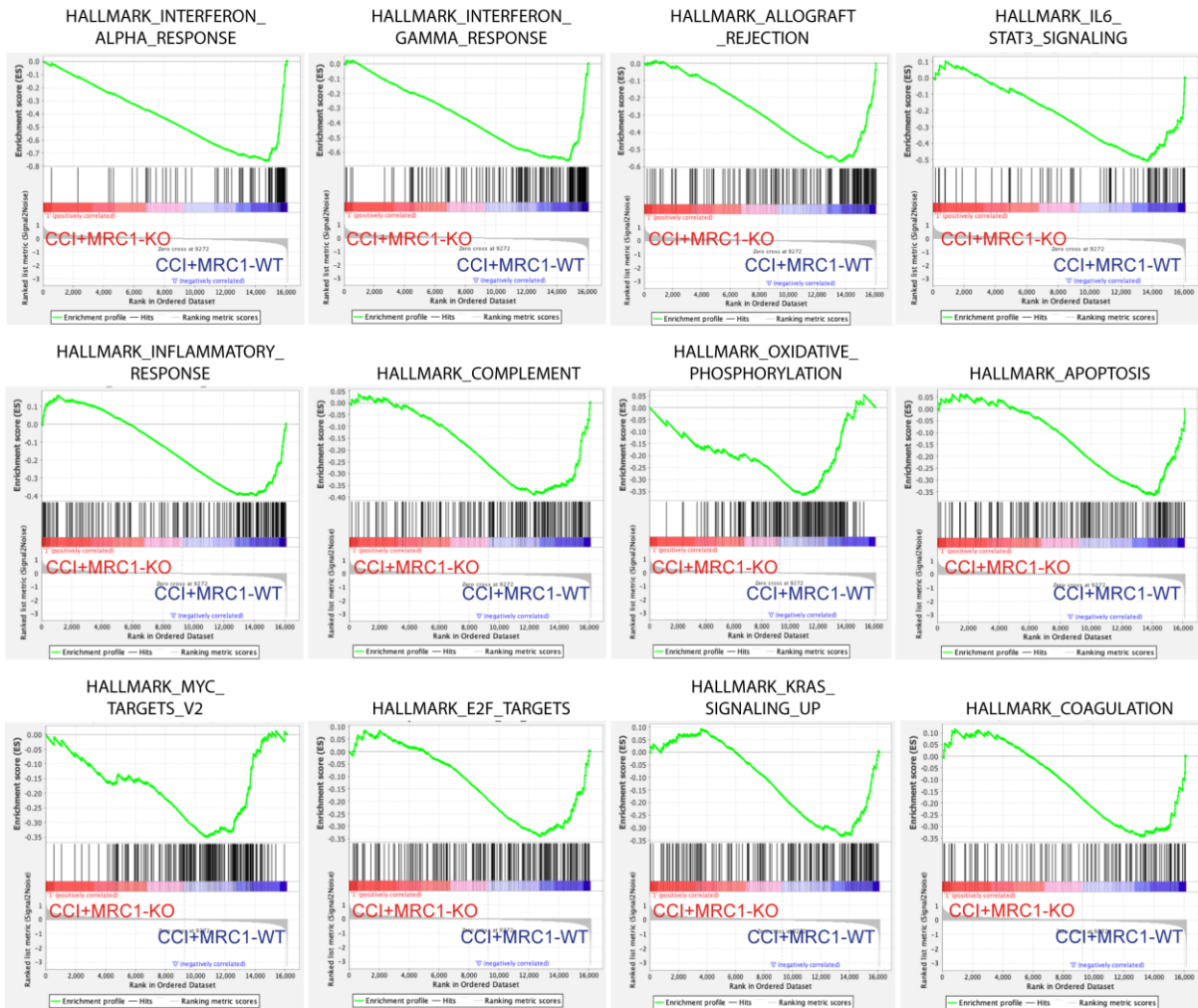
In weiblichen CCI+MRC1-WT-Mäusen ergab die GSEA 32 hochregulierte „hallmarks“. Den p-Wert ( $<0,05$ ) zugrunde legend, verblieben hiervon noch 15 signifikant hochregulierte Gensätze. Das sind drei Mal so viele wie in männlichen Mäusen mit dem gleichen Genotyp. Der überwiegende Anteil dieser „hallmarks“ weist auf eine prominente Entzündungsantwort [Inflammation direkt betreffend (Interferon- $\alpha$  und - $\gamma$  Antwort, IL-6/JAK/STAT3-Signalweg, Inflammationsantwort, Komplement, Apoptose, Myc-Zielwerte V1, TNF- $\alpha$  Signalweg über NF $\kappa$ B), Blut-assoziierte Prozesse (Koagulation)] des Gehirns auf das induzierte Neurotrauma hin. Die verbliebenen „hallmarks“ betreffen die Energiegewinnung (Oxidative Phosphorylierung) sowie den Zellzyklus (Zelldifferenzierung, -proliferation und Zellzykluskontrolle) (Abbildung 36 A).

In weiblichen CCI+MRC1-KO-Mäusen wurden 18 hochregulierte Gensätze gefunden. Unter Berücksichtigung des p-Werts ( $<0,05$ ) verbleiben davon nur zwei signifikant.

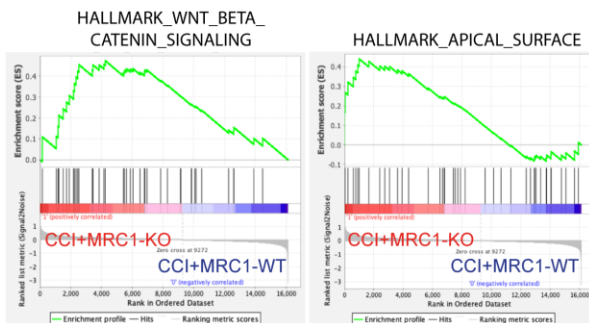
Auch hierbei handelt es sich um Prozesse, welche mit Heilung in Verbindung gebracht werden können (Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweg) [244, 245], aber auch um Prozesse, die auf eine Einschränkung von Funktionen nach dem Trauma hinweisen (apikale Oberfläche von Epithelzellen) [246] (Abbildung 36 B).

## Weibchen

### A Genanreicherungsdiagramme von hochregulierten biologischen Prozessen und Zuständen in CCI+MRC1-WT vs. -KO



### B Genanreicherungsdiagramme von hochregulierten biologischen Prozessen und Zuständen in CCI+MRC1-KO vs. -WT



**Abbildung 36: Genanreicherungsdiagramme von GSEA-Gensätzen in weiblichen CCI+MRC1-WT- gegenüber CCI+MRC1-KO-Mäusen.**

Die Durchführung der Gensatzanreicherungsanalysen erfolgte wie in Abbildung 30 (siehe oben) beschrieben. Anreicherungsdiagramme zeigen den Anreicherungswert eines bestimmten Gens im Gensatz. Die grüne Linie stellt den Verlauf des Anreicherungswert dar. Der Spitzenwert steht für den endgültigen Anreicherungswert. Gene, die in weiblichen CCI+MRC1-WT-Tieren angereichert waren, werden als negative Anreicherungswerte (blau) dargestellt. Gene, die in weiblichen CCI+MRC1-KO-Mäusen angereichert waren, werden als positive Anreicherungswerte (rot) dargestellt. (A) Genanreicherungsdiagramme von hochregulierten „hallmarks“ weiblicher

**CCI+MRC1-WT-Mäuse. (B) Genanreicherungsdiagramme von hochregulierten „hallmarks“ weiblicher CCI+MRC1-KO-Mäuse.  
GSEA = „Gene Set Enrichment Analysis“.**

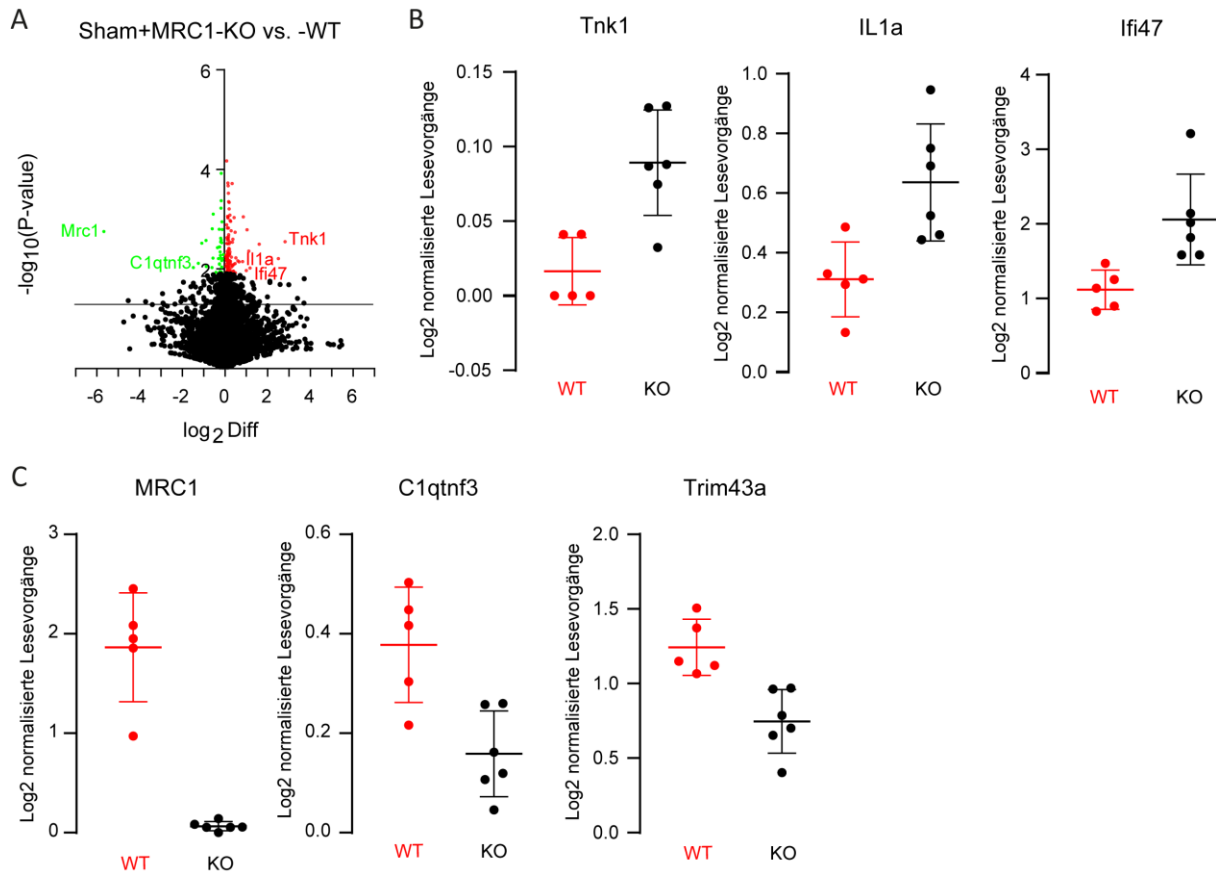
Auch hier zeigt sich, dass die Transkriptomveränderungen infolge von SHT in weiblichen Mäusen unterschiedlich zu männlichen Geschwistertieren des gleichen Genotyps sind. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass beide Genotypen im Vergleich zu ihren entsprechenden Sham-Gruppen auf transkriptioneller Ebene fast identisch auf ein SHT reagieren. Dies deutet darauf hin, dass der MRC1-Rezeptor im Frühstadium nach einem SHT entweder eine untergeordnete Rolle spielt oder die Ausgangssituation der beiden Genotypen für ein SHT so unterschiedlich ist, dass sich nur im direkten Vergleich der beiden CCI-Gruppen miteinander Unterschiede zeigen.

Im geschlechtsunabhängigen direkten Vergleich beider CCI-Gruppen zeigte sich eine deutliche Reaktion auf das SHT nur in den MRC1-WT-Mäusen, während MRC1-KO-Mäuse nicht mal eine zu erwartende pathophysiologische Reaktion aufwiesen. Dies ist verwunderlich, denn ein gewisses Maß an Inflammation ist Bestandteil einer normtypischen SHT-Reaktion. Erst im geschlechtsabhängigen Vergleich zeigte sich eine Tendenz zu einer verstärkten inflammatorischen Antwort in männlichen MRC1-KO Mäusen, während in weiblichen Mäusen keine so eindeutige Antwort ersichtlich war. Diese Ergebnisse legen nahe, dass der MRC1 eine immunregulierende oder -modulierende Funktion im Gehirn nach einem SHT einnimmt. Gleichzeitig ist zu vermuten, dass die Effekte in weiblichen Mäusen dazu beitragen, dass im geschlechtsunabhängigen Vergleich Ergebnisse maskiert werden.

#### **4.11 Der MRC1 ist wichtig für die Immunhomöostase im Gehirn**

Aufgrund der Eigenschaften des MRC1 und seiner vielfach beschriebenen Rolle in der Infektabwehr [247-250], stellte sich die Frage ob auch „Sham“-Tiere einen veränderten inflammatorischen Status – unabhängig von einer Reaktion auf ein SHT – aufweisen. Die bereits vorliegenden Ergebnisse aus dem Vergleich CCI- vs. korrespondierende „Sham“-Gruppe wurden deshalb näher betrachtet und weiter analysiert.

Unter den Top 150 DEGs (Abbildung 37 A) zwischen den beiden „Sham“-Gruppen gehören prominente Gene, welche sowohl mit einer (angeborenen) Immunantwort, Inflammationsprozessen als auch Zellproliferation, -überleben und -entwicklung in Verbindung gebracht werden (unter Anderem *Ifi47*, *IL1a*, *Tnk1*, *C1qtnf3*, *Trim43a*, *Mrc1*) (Abbildung 37 B, C). Die absoluten Expressionswerte bewegen sich insgesamt im niedrigen Bereich, was eher für einen moderaten genotypabhängigen Effekt hinsichtlich des inflammatorischen Status spricht.



**Abbildung 37: Der MRC1 ist wichtig für die Immunhomöostase im Gehirn.**

(A) Vulkandiagramm der unterschiedlichen Genexpression in Sham+MRC1-KO- im Vergleich zu Sham+MRC1-WT-Mäusen. Die X-Achse zeigt die  $\log_2\text{Diff}$ , was bedeutet, dass hochregulierte Gene in der Sham+MRC1-KO-Gruppe positiv (rot), während reduzierte Gene negativ (grün) erscheinen. Die Y-Achse zeigt den  $-\log_{10}(\text{p-value})$ . Die Top 150 regulierten Gene sind farblich in grün und rot hervorgehoben, während die restlichen Gene schwarz dargestellt sind. Die schwarze Linie teilt die Gene zusätzlich in signifikant (oberhalb der Linie) und nicht signifikant (unterhalb der Linie) reguliert ein. (B) Exemplarische Streudiagramme ausgewählter hoch- bzw. (C) herunterregulierter Gene in Sham+MRC1-KO-Mäusen. Gene wurden auf der Basis der Top 150 regulierten Gene entsprechend des p-Werts und unter der zusätzlichen Voraussetzung, dass sie in den signifikanten biologischen Prozessen der GSEA aufgeführt wurden, ausgewählt. C1qtnf3 = „C1q And TNF Related 3“, GSEA = „Gene Set Enrichment Analysis“, Ifi47 = „Interferon gamma inducible protein 47“, IL1a = Interleukin 1a, MRC1 = Mannose Rezeptor C-Typ I, Tnk1 = „Tyrosine Kinase Non Receptor 1“, Trim43a = „Tripartite Motif Containing 43A“.

Die anschließend durchgeführte GSEA offenbarte deutliche Unterschiede zwischen in Sham+MRC1-KO- vs. Sham-MRC1-WT Mäusen exprimierten Spitzengenen bzw. den damit im Zusammenhang stehenden biologischen Prozessen und Zuständen.

In der Sham+MRC1-WT-Gruppe waren vier „hallmarks“ hochreguliert. Auf Basis des nominalen p-Werts ( $<0,05$ ) verblieben zwei signifikant (oxidative Phosphorylierung, Myc Zielwerte) (Abbildung 38 A), welche keine direkte gemeinsame Assoziation zulassen.

Im Gegensatz dazu waren in der Sham+MRC1-KO-Gruppe insgesamt 46 „hallmarks“ hochreguliert. Auf der Basis des nominalen p-Werts ( $<0,05$ ) verblieben davon 20 signifikant

hochreguliert (Abbildung 38 B). Bei näherer Betrachtung dieser 20 „hallmarks“ fiel auf, dass diese zum großen Teil inflammationsassoziiert (z.B. Interferon- $\gamma$ -Antwort, Komplement, TNF- $\alpha$ -Signalübertragung, Hypoxie, Apoptose, Entzündungsreaktion) bzw. immunsuppressiv (TGF- $\beta$ ) waren.

Des Weiteren fiel bei intensiverer Betrachtung der signifikant regulierten „hallmarks“ der Sham+MRC1-KO-Gruppe auf, dass eine sehr große Schnittmenge mit Mäusen aus der CCI+MRC1-WT-Gruppe besteht, wie der Tabelle 20 zu entnehmen ist.

**Tabelle 20: Vergleich der signifikant regulierten „hallmarks“ der CCI+MRC1-WT- und Sham+MRC1-KO-Gruppe.**

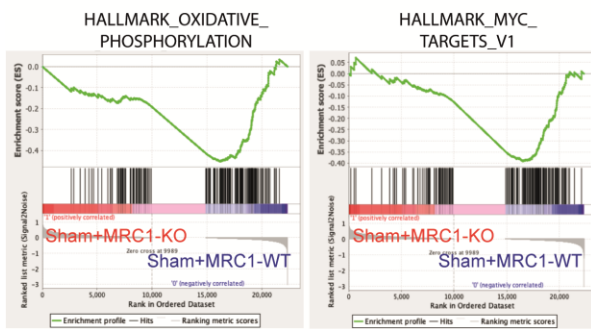
hallmark	CCI+MRC1-WT	Sham+MRC1-KO
INTERFERON_ALPHA_RESPONSE	✓	✓
INTERFERON_GAMMA_RESPONSE	✓	✓
EPITHELIAL_MESENCHYMAL_TRANSITION	✓	✓
IL6_JAK_STAT3_SIGNALING	✓	✓
ALLOGRAFT_REJECTION	✓	✓
APOPTOSIS	✓	✓
PROTEIN_SECRETION	✓	
TNFA_SIGNALING_VIA_NFKB	✓	✓
MTORC1_SIGNALING	✓	
INFLAMMATORY_RESPONSE	✓	✓
HYPOXIA	✓	✓
MYC_TARGETS_V2	✓	
MYC_TARGETS_V1	✓	
KRAS_SIGNALING_UP		✓
ANGIOGENESIS		✓
COMPLEMENT		✓
MITOTIC_SPINDLE		✓
COAGULATION		✓
TGF_BETA_SIGNALING		✓

Diese Ergebnisse bestätigten die Vermutung, dass eine MRC1-Defizienz auch im physiologischen Gehirn nicht ohne Folgen bleibt. Zusammen deuten sie daraufhin, dass durch den MRC1-Knock-out eine Dysbalance der Immunhomöostase im Gehirn in Richtung eines immunreaktiveren oder milden proinflammatorischen Milieus hervorgerufen wird. Dies wird

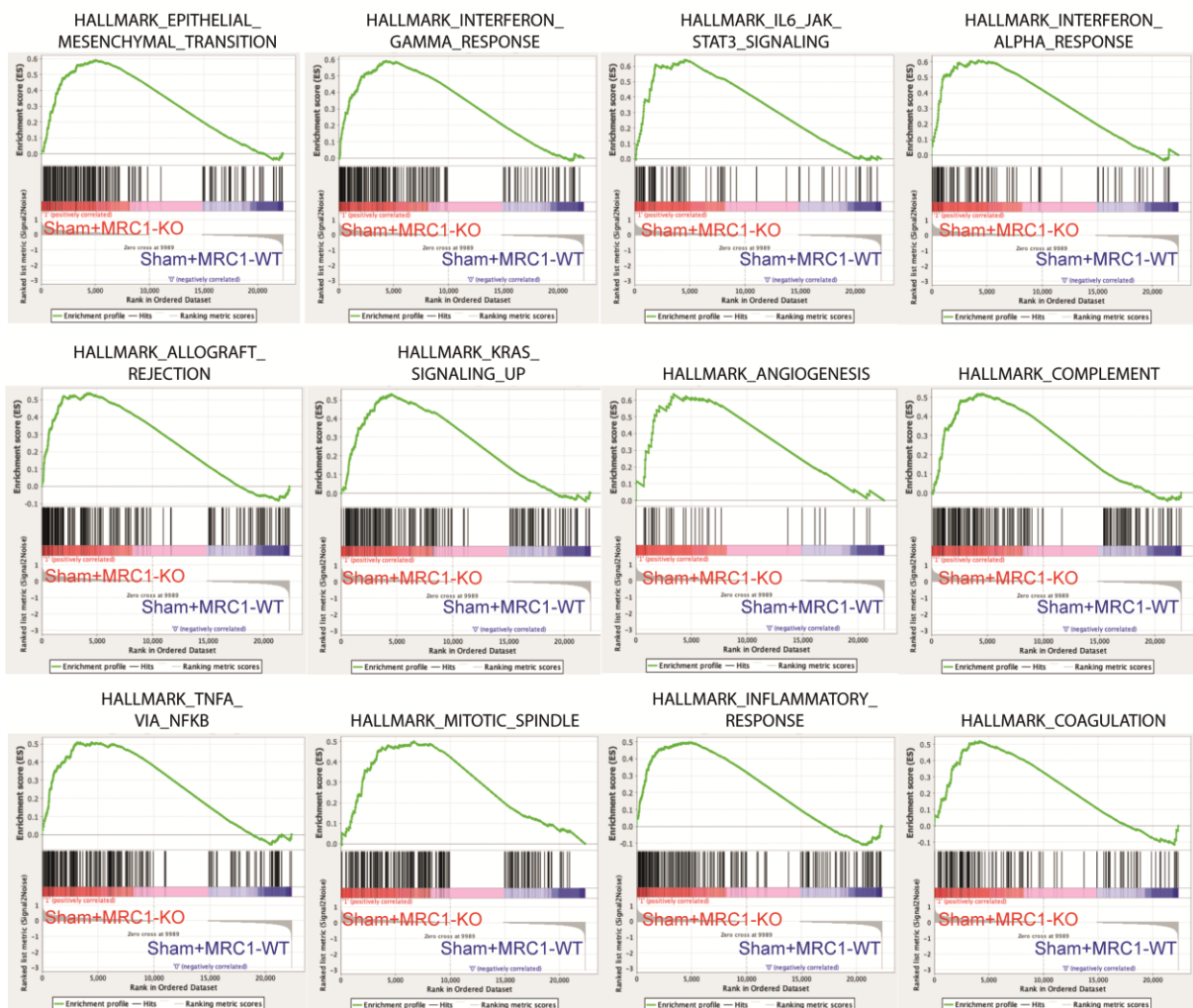
insbesondere durch die große Schnittmenge von Sham+MRC1-KO- und CCI+MRC1-WT-Mäusen deutlich. So werden in Sham+MRC1-KO-Mäusen größtenteils fast identische biologische Prozesse und Zustände wie in CCI+MRC1-WT hochreguliert, obwohl diese keiner CCI-Operation unterzogen wurden.

Weiterhin führt der Verlust des Rezeptors auch zu einer Deregulation von Zellwachstum und –proliferation. Auch wenn es sich hierbei um „Sham“-Tiere handelt, welche nicht automatisch mit Nativ-Tieren gleichzusetzen sind, ist aufgrund der Ergebnisse davon auszugehen, dass beide MRC1-Genotypen eine völlig unterschiedliche Ausgangslage für ein induziertes SHT haben.

**A** Genanreicherungsdiagramme von hochregulierten biologischen Prozessen in Sham+MRC1-WT vs. Sham-MRC1-KO



**B** Genanreicherungsdiagramme von hochregulierten biologischen Prozessen in Sham+MRC1-KO vs. Sham-MRC1-WT



**Abbildung 38: Genanreicherungsdiagramme von GSEA-Gensätzen in Sham+MRC1-KO- gegenüber Sham+MRC1-WT-Mäusen.**

Die Gensatzanreicherungsanalyse erfolgte analog zu der in Abbildung 30 (siehe oben) beschriebenen Methode. Anreicherungsdiagramme zeigen den Anreicherungswert eines bestimmten Gens im Gensatz. Die grüne Linie stellt den Verlauf des Anreicherungswert dar. Der Spitzenwert steht für den endgültigen Anreicherungswert. In Sham+MRC1-WT-Tieren angereicherte Gene werden als negative Anreicherungswerte (blau) dargestellt. In Sham+MRC1-KO-Mäusen angereicherte Gene sind als positive Anreicherungswerte (rot) dargestellt. (A) Genanreicherungsdiagramme von hochregulierten „hallmarks“ in Sham+MRC1- WT-Mäusen. (B) Genanreicherungsdiagramme von hochregulierten „hallmarks“ in Sham+MRC1-KO-Mäusen. Aus Platzgründen wurden nur die Top 12 der hochregulierten „hallmarks“ dargestellt.

MRC1-KO MRC1-WT

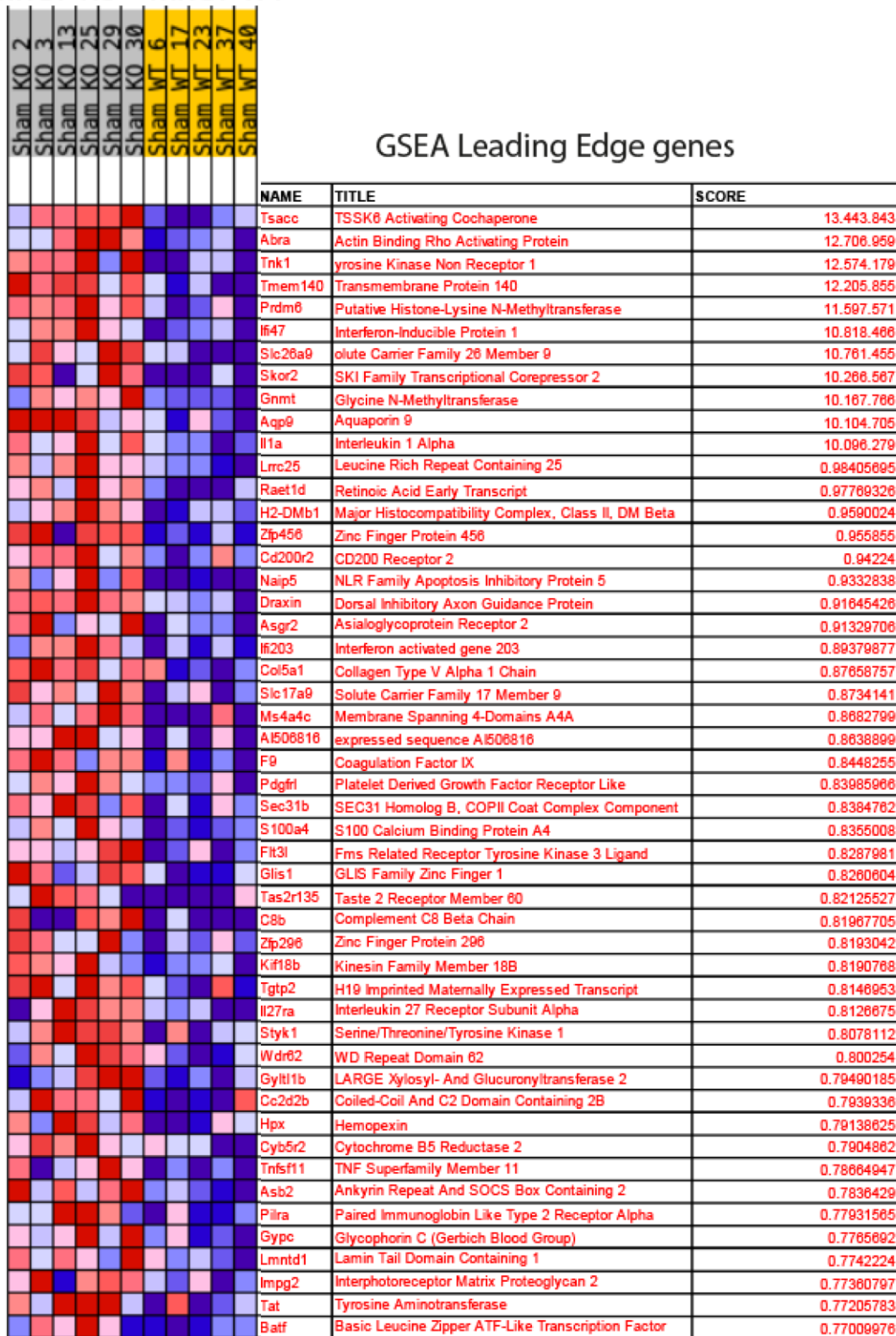


Abbildung 39: Heatmap (Teil 1) der unterschiedlich exprimierten Gene in den „Sham“-Mäusen, die einen MRC1-KO bzw. -WT Genotyp haben.

Euthanasie der „Sham“-Mäuse, Prozessierung des Hirngewebes sowie Durchführung der RNA-Sequenzierung mit anschließender GSEA wurde wie in Abbildung 31 beschrieben (siehe oben) durchgeführt. Die farbliche Kodierung der Top 50 hochregulierten Gene reicht von einem hohen Anreicherungs Wert in dunkelrot bis zu einem niedrigen Anreicherungs Wert in dunkelblau.

MRC1-KO MRC1-WT

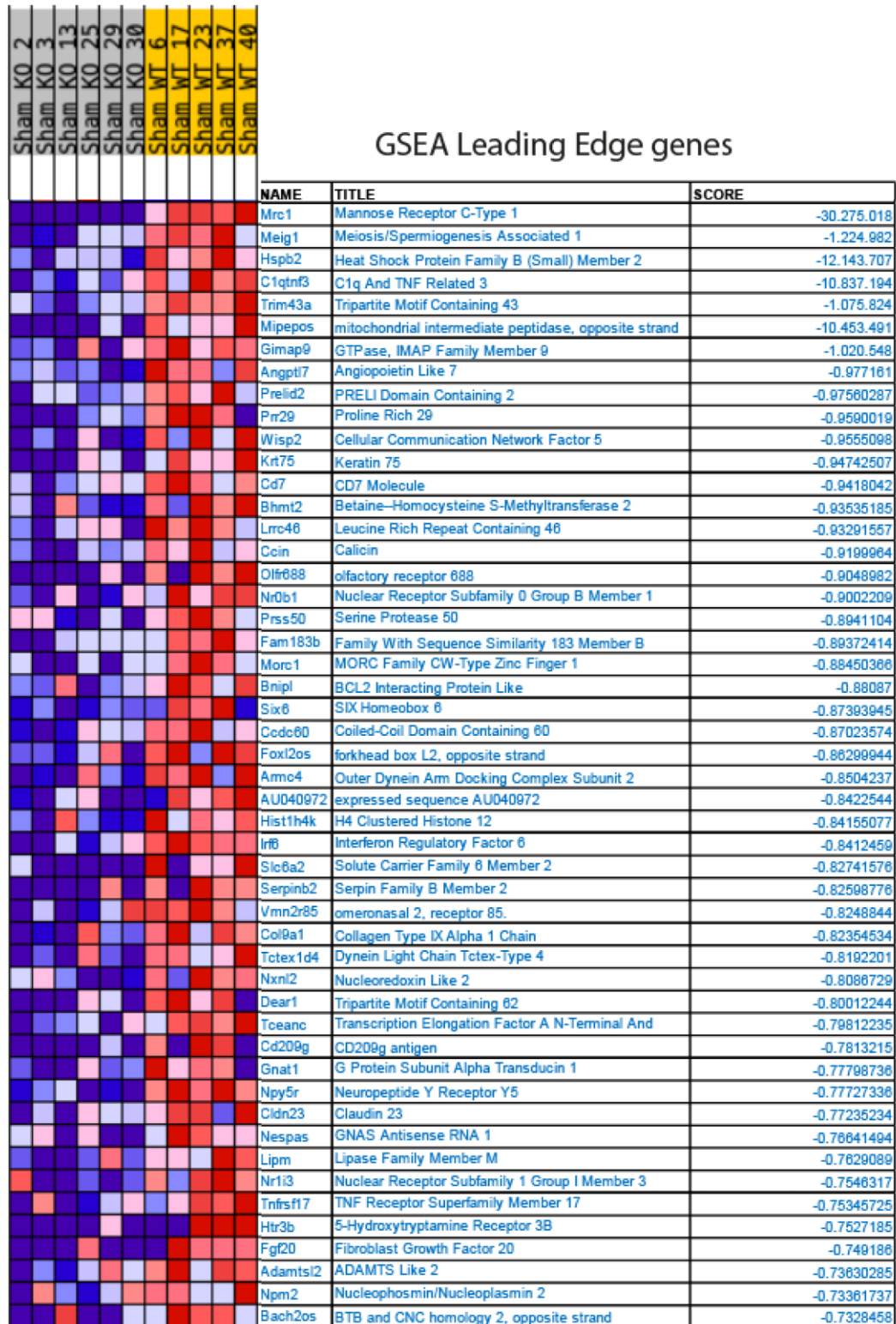


Abbildung 40: Heatmap (Teil 2) der unterschiedlich exprimierten Gene in den „Sham“-Mäusen, die einen MRC1-KO bzw. -WT Genotyp haben.

Euthanasie der „Sham“-Mäuse, Prozessierung des Hirngewebes sowie Durchführung der RNA-Sequenzierung mit anschließender GSEA wurde wie in Abbildung 31 beschrieben (siehe oben) durchgeführt. Die farbliche Kodierung der Top 50 herunterregulierten Gene reicht von einem hohen Anreicherungswert in dunkelrot bis zu einem niedrigen Anreicherungswert in dunkelblau.

## 5 Diskussion

Das SHT stellt eine akute Verletzung des ZNS dar, das bei entsprechendem Schweregrad zu den chronischen, unzureichend behandelbaren Erkrankungen gezählt wird und geht mit einem breiten Spektrum an neurologischen Folgen einher [49, 53]. Die Komplexität und Variabilität dieses Krankheitsbildes erschwert die Entwicklung neuer Therapiemöglichkeiten und stellt die Forschung bis heute vor große Herausforderungen. Allgemein anerkannt ist die Bedeutung der akuten und chronisch auftretenden inflammatorischen Prozesse. Der Zelloberflächenmarker MRC1, auch bekannt als CD206, schien aufgrund seiner antiinflammatorischen Eigenschaften in anderen Krankheitsmodellen [190, 191, 197] ein grundsätzlich vielversprechender Rezeptor zu sein, um die Pathophysiologie, die nach einem SHT abläuft – insbesondere die antiinflammatorischen Effekte – besser zu verstehen und sollte deshalb in diesem Forschungsvorhaben im Zusammenhang mit einem SHT näher untersucht werden. Die pathophysiologische Relevanz von MRC1 im SHT ist bislang unbekannt und bisherige Studien beschränkten sich vor allem auf die Nutzung von MRC1 als Marker für M2-polarisierte Makrophagen/ Mikroglia [29] sowie auf deskriptive Untersuchungen zur räumlich-zeitlichen Regulation von MRC1 [199, 200]. Um die pathophysiologische Relevanz von MRC1 zu untersuchen, wurde ein MRC1-Knock-out Mausmodell verwendet und eine Kurz- und Langzeitstudie mit einer Überlebenszeit von 5 bzw. 30 Tagen nach experimentellem SHT durchgeführt.

Die zentralen Ergebnisse dieser Arbeit sind:

1. MRC1-Defizienz resultiert vor allem in der frühen Phase nach SHT in einer ausgeprägteren Schädigung des Gehirns.
2. MRC1-Defizienz aggraviert neurologische und verhaltensbiologische Defizite in der frühen und späten Phase des SHTs.
3. MRC1-Defizienz führt zu geschlechtsspezifischen Unterschieden in der inflammatorischen Reaktion auf ein SHT.
4. MRC1 spielt eine bedeutende Rolle bei der Aufrechterhaltung der Immunhomöostase des Gehirns sowohl in gesunden als auch in krankhaften Zuständen.

In den folgenden Abschnitten werden diese Ergebnisse diskutiert und zum Schluss Limitationen dieses Forschungsprojekts aufgezeigt sowie ein Ausblick auf die Zukunft gewährt.

### 5.1 Defizienz des MRC1 resultiert vor allem in der frühen Phase nach SHT in einer ausgeprägten Schädigung des Gehirns

Mäuse beider Genotypen wurden einer standardisierten Operation zur Induktion eines SHT unterzogen. Während der Beobachtungsphase von 5 bzw. 30 Tagen wurden Auswirkungen auf das Verhalten untersucht. Anschließend wurden Untersuchungen zu den

molekularbiologischen Auswirkungen durchgeführt. Hierbei zeigte sich, dass die MRC1-KO Mäuse 5 Tage nach einem SHT ein signifikant vergrößertes relatives Läsionsvolumen aufwiesen. Gleichzeitig war die Dicke der Körnerzellschicht des Gyrus dentatus in der gleichen Versuchsgruppe zu diesem Zeitpunkt ebenfalls signifikant reduziert. Ergänzend hierzu wiesen männliche MRC1-KO Mäuse 5 Tage nach Trauma-induktion ein signifikant vergrößertes Hämatom auf. Bei weiblichen Mäusen war hingegen kein Unterschied in der Hämatomgröße feststellbar.

Auch in der chronischen Phase scheint sich der Trend hinsichtlich einer ausgeprägteren Hirnschädigung zu bestätigen. So weisen MRC1-KO Mäuse einen Trend ( $p = 0,0924$ ) zu einem reduzierten Erhalt des gesunden Hirngewebes auf. Die Dicke der Körnerzellschicht des Gyrus dentatus wies hingegen keinen Unterschied auf.

Basierend auf den gewonnenen Erkenntnissen der IHC-Färbung (unter Verwendung von anti-MRC1/anti-GFAP-Antikörpern) liegt nahe, dass es sich bei den entlang der Mittellinie lokalisierten MRC1<sup>+</sup> Zellen, um sogenannte CAMs handelt [251]. Andere Bereiche des Gehirns wie z.B. der periläsionale Bereich wiesen in der Färbung nur äußerst vereinzelt MRC1<sup>+</sup> Zellen auf, weshalb es unwahrscheinlich ist, dass auch andere phagozytierende Zellen wie Mikroglia diesen Rezeptor 5 Tage nach Trauma exprimieren. Andererseits ist es unwahrscheinlich, dass diese vergleichsweise geringe Anzahl von Zellen für den signifikanten Anstieg der *Mrc1*-Expression in der qPCR verantwortlich ist. Folgende Erklärungen kommen in Frage: Zum einen kann der MRC1-Rezeptor nicht nur als zellassoziierte Form, sondern auch als lösliches Protein vorliegen [252]. Nicht jeder Antikörper ist geeignet, auch diese Variante des Rezeptors korrekt zu detektieren. Der verwendete Antikörper (anti-MRC1, COC68C2 von BioLegend, San Diego, CA, USA) eignet sich nicht nur als Antikörper für IHC Färbungen, sondern auch für FACS Analysen. Er ist deshalb gegen extrazelluläre Strukturen des Rezeptors gerichtet. Obwohl dieser Antikörper grundsätzlich in der Lage ist, die lösliche Form von MRC1 zu erkennen, wird diese durch das Vorliegen in der extrazellulären Matrix diluiert, wodurch eine Detektion und Quantifizierung erschwert wird. Dies könnte zu einer Fehlinterpretation hinsichtlich einer vermeintlich kleinen Anzahl an MRC1<sup>+</sup> Strukturen geführt haben. Eine Western-Blot Analyse mit Fraktionen für lösliches Protein und einem geeigneten Western-Blot Antikörper könnte Klarheit in Bezug auf diese Fragestellung schaffen. Ebenso möglich wäre eine MRC1 Expression in anderen Zellen des Gehirns unabhängig von Makrophagen und Mikroglia. Auch Astrozyten können den Rezeptor im adulten Gehirn im physiologischen, aber auch pathologischen Zustand exprimieren. Sie finden sich dort im Besonderen auf Hirnhäuten, der Großhirnrinde und dem Hirnstamm, aber auch in anderen Bereichen [183]. Aufgrund der angefärbten Bereiche in der IHC-Färbung ist zwar nicht davon auszugehen, aber um diese Möglichkeit endgültig auszuschließen, wäre ein transgenes Reportermausmodell mit einem fluoreszenten Reporter wie GFP unter Kontrolle des MRC1-Promoters notwendig. Dies würde

auch ermöglichen MRC1+ Zellen zu detektieren, bei denen der extrazelluläre Teil von MRC1 proteolytisch abgespalten wird.

Weiterhin stellt sich die Frage, warum es durch den Knock-out des MRC1, welcher vermeintlich gering nach SHT exprimiert ist, überhaupt zu so potenten Auswirkungen auf die Läsionsparameter kommen kann.

Eine Möglichkeit wäre, dass durch die schon vorhandene Inflammation im Gehirn der MRC1-KO-Mäuse (siehe 4.11) vor Trauma eine Art Präkonditionierung, die anschließend in einer verstärkten Immunantwort nach Trauma resultiert, stattgefunden hat. In einem *hämorrhagischen* Schockmodell wurde Ratten Lipopolysaccharid (LPS) in niedriger Dosierung 24 h vor Induktion des *hämorrhagischen* Schocks verabreicht. Anschließend konnte festgestellt werden, dass sich diese Tiere – im Gegensatz zur Kontrollgruppe– durch eine verstärkte Nitridoxid- sowie gesteigerte proinflammatorische Zytokin-Produktion auszeichneten und aggravierte Organfunktionsstörungen aufwiesen [253]. Auch andere Autoren konnten feststellen, dass eine bereits vorliegende Inflammation – in den meisten Fällen durch systemische LPS Präkonditionierung induziert – die Immunzellen des Gehirns, insbesondere Mikroglia, in einen aktiven Phänotyp versetzt und in Kombination mit zusätzlichen induzierten Traumata aus der Peripherie oder dem Gehirn selbst in übertriebenen lokalen Entzündungsreaktionen mit schlechteren Ergebnissen resultiert [254, 255]. Es gibt aber auch gegensätzliche Beobachtungen. So konnten einige Autoren einen positiven Effekt der LPS-Präkonditionierung auf Immunzellen beobachten. Diese berichten von neuroprotektiven Effekten – insbesondere in Schlaganfallmodellen [256-258], aber auch in einigen SHT-Modellen [259, 260]. All diesen Modellen ist aber gemein, dass LPS kurz vor Trauma verabreicht wurde, was die Situation in den MRC1-KO Mäusen nur unzureichend widerspiegelt. Aufgrund der kontroversen Literatur hinsichtlich Auswirkungen einer bestehenden Inflammation auf später induzierte Traumata, lässt sich abschließend nicht klären, ob die Inflammation im Gehirn der MRC1-KO Mäuse tatsächlich für die stärkere Hirnschädigung verantwortlich war.

Eine weitere Ursache für die starke Variation der Läsionsparameter zwischen den beiden CCI-Gruppen, wäre eine verstärkte systemische Inflammation, die durch den MRC1-KO induziert wurde. Systemische Inflammation kann in ZNS-Krankheitsmodellen zu einer Verschlimmerung des ursprünglichen Traumas beitragen [261, 262]. Die RNA-Sequenzierungsergebnisse von Sham+MRC1-KO-Mäusen zeigen, dass ein MRC1-KO zu einer Deregulation immunbedingter Prozesse im Gehirn führt. Auch andere Autoren konnten feststellen, dass der MRC1 eine wichtige regulatorische Funktion in verschiedenen Organen und Geweben übernimmt [178, 263-265]. Der Knock-out des MRC1-Rezeptors in dem verwendeten Mausstamm dieses Forschungsprojektes ist nicht lokal auf das Gehirn begrenzt, sondern betrifft den ganzen Körper (siehe 3.1.3). Es ist deshalb naheliegend, dass ein Knock-out auch auf systemischer

Ebene Auswirkungen hat und nicht nur lokal im Gehirn zum Tragen kommt. Im Zuge dieser wissenschaftlichen Untersuchung lag der Schwerpunkt auf dem Gehirn, genauer gesagt auf den Auswirkungen eines MRC1-Knock-outs in Verbindung mit einem SHT. Es liegen deshalb keinerlei Daten zu systemischen Auswirkungen vor. Eine RNA-Sequenzierung von Blutzellen bzw. verschiedenen peripheren Organen könnte weitere Informationen in dieser Hinsicht liefern.

Zu guter Letzt könnte der MRC1-KO zu einer verminderten Phagozytoseaktivität geführt haben, die in gesteigerten Läsionsvolumina resultierte. Einerseits könnte dies allein durch eine geringere Anzahl von CAMs, als auch peripheren Makrophagen im Bereich der Läsion durch weniger zielgerichtete Infiltration ausgelöst werden [181]. Andererseits könnte eine tatsächlich eingeschränkte Phagozytoseleistung auf Ebene einzelner CAMs verantwortlich sein. Diese These wird von Autoren unterstützt, die feststellen konnten, dass eine gesteigerte Phagozytoseaktivität zu einer Verminderung des Läsionsvolumens beitragen kann [266]. Betrachtet man zusätzlich die Funktionen des MRC1 erneut, lässt sich feststellen, dass sowohl die Phago-, als auch Endozytose zu den Aufgaben des MRC1 gehört (siehe 1.2.1.2). Grundsätzlich können Mikroorganismen, apoptotische Zellen und extrazellulärer Trümmer über den MRC1-medierten Phagozytoseprozess direkt beseitigt werden [267]. Über die Endozytose stimuliert der MRC1 hingegen andere Zellen des Immunsystems und treibt den Aufräumprozess so indirekt weiter voran [178]. In den MRC1-KO Mäusen könnten diese Prozesse gestört sein. Ergänzend hierzu konnte in *in-vitro* Experimenten in unserem Labor gezeigt werden, dass der MRC1-KO Einfluss auf die Phagozytosepräferenz und Phagozytoseplastizität hat. So phagozytierten MRC1<sup>-/-</sup> Mikroglia aus primären Gliakulturen nach Stimulation mit MCSF und IL-4 signifikant weniger Myelin, als MRC1<sup>+/+</sup>, die nach dem gleichen Schema stimuliert wurden. Die Translabilität dieser *in-vitro* Ergebnisse auf die *in-vivo* Situation ist nicht immer gegeben [268]. Gleichzeitig gibt es im Immunsystem zahlreiche weitere Rezeptoren, die Phago- und Endozytose vermitteln können [269, 270], weshalb nicht klar ist, ob sich der Knock-out tatsächlich in einer Einschränkung diesbezüglich äußert. Zur Klärung dieser Möglichkeit, wären ebenfalls weitere Untersuchungen – insbesondere zur Phagozytoseleistung von Makrophagen und Mikroglia unter *in-vivo* Bedingungen notwendig. Mit den vorliegenden Daten und der aktuellen Literatur kann also bislang nicht abschließend geklärt werden, ob und wie genau der MRC1-KO tatsächlich in einer stärkeren Schädigung des Gehirns resultiert.

## 5.2 MRC1-Defizienz aggraviert neurologische und verhaltensbiologische Defizite in der frühen und späten Phase des SHTs

Zur Beurteilung des Verhaltens bzw. Einschränkungen neurologischer Fähigkeiten der Mäuse wurde in diesem Forschungsprojekt der mNSS, der Rotarod Test, der OFT Test sowie das EPM genutzt. Der mNSS ist ein geeignetes Werkzeug, um die neurologischen Funktionen, insbesondere Motorik, Balance, Verhalten und Aufmerksamkeit in Mäusen nach einer Hirnverletzung zu beurteilen [271, 272]. Mäuse, die ein SHT erlitten haben, weisen deutlich höhere Punktzahlen im Vergleich zu „Sham“-Mäusen auf, was mit einer stärkeren neurologischen Einschränkung verbunden ist. In SHT Mäusen ist die Punktzahl am ersten Tag nach Trauma am höchsten und verringert sich dann im Verlaufe der Studie kontinuierlich [100, 273]. Dies trifft auch auf das vorliegende Forschungsprojekt zu. Der MRC1-KO führte darüber hinaus zu einer signifikant erhöhten Punktzahl 1 Tag nach Trauma bei weiblichen Mäusen (Kurzzeitüberleben) sowie 1-30 Tage nach Trauma in beiden Geschlechtern. Ab Tag 14 nach Trauma war der Unterschied zwischen beiden CCI-Gruppen besonders ausgeprägt und hielt sich bis Tag 30 auf diesem Niveau (Langzeitüberleben).

Ergänzend zum mNSS wurde der Rotarod Test zur Evaluation motorischer Defizite und Ausdauer durchgeführt [222]. Hierbei zeigte sich, dass an d 1 und d 5 (Kohorte 1) sowie d 5 und d 30 (Kohorte 2) die CCI+MRC1-KO-Gruppe signifikant kürzere Latenzzeiten präsentierte als ihre korrespondierende „Sham“-Gruppe (SHT-Effekt). Im Wildtyp gab es keinerlei Unterschiede. Im Gegensatz zu anderen Autoren [274, 275] konnte in zuvor durchgeführten Studien unseres Labors bereits festgestellt werden, dass der Rotarod Test häufig nicht sensitiv genug ist, um Effekte zwischen den Versuchsgruppen bzw. überhaupt einen SHT Effekt nachzuweisen, obwohl die Versuchsgruppen Unterschiede im mNSS und anderen Verhaltenstests aufwiesen [94, 100]. Ebenfalls für eine mangelnde Sensitivität dieses Tests spricht, dass über den gesamten Studienverlauf in beiden Kohorten keinerlei signifikante Verbesserung in Form einer längeren Latenz festgestellt wurde.

Der OFT resultierte in signifikanten Unterschieden zwischen den beiden CCI-Gruppen an Tag 1 und 3 hinsichtlich ihrer Aktivität. CCI+MRC1-KO-Mäuse legten eine größere Strecke zurück und bewegten sich mit einer höheren Geschwindigkeit. Unterschiede zwischen „Sham“- und CCI-Tieren konnten keine festgestellt werden. Sowohl das Rotarod als auch der OFT scheinen aufgrund der Ergebnisse nur teilweise geeignet, um den s.g. SHT-Effekt bzw. Effekt zwischen den beiden CCI-Versuchsgruppen nachzuweisen. Zu einem ähnlichen Schluss kommen auch Autoren einer *Hypoxie-Ischämie* induzierten Schlaganfall Studie in Mäusen [276]. Verschiedene Gründe kommen in Frage, warum der OFT nicht zwischen „Sham“- und CCI-Gruppen unterscheiden konnte. Zum einen könnte es an einer mangelhaften Ausführung des Tests liegen, zum anderen am Schweregrad der Hirnverletzung in verschiedenen Tiermodellen [277] oder an mangelhafter Sensitivität des Tests für die Fragestellung an sich.

Ersteres und letzteres kann weitestgehend ausgeschlossen werden, weil der Test nach einem etablierten Standardprotokoll in unserem Labor schon vielfach zu signifikanten Ergebnissen geführt hat. Mangelhafte Sensitivität des Tests für die Unterscheidung zwischen „Sham“- und CCI-Tieren ist hingegen eine durchaus plausible Erklärung, denn auch andere Autoren fanden bei Nutzung des CCI-Modells keine signifikanten Unterschiede in ihren Forschungsprojekten [230, 278, 279]. Gegen diese These spricht, dass Unterschiede zwischen den beiden CCI-Gruppen an Tag 1 und 3 sichtbar waren.

Angstähnliches Verhalten ist eine häufige Konsequenz nach einem SHT [226]. Um dieses Verhalten in unserem Forschungsprojekt zu untersuchen, wurde der EPM Test an d4 und d28 in Kohorte 2 durchgeführt. Generell gelten kürzere Aufenthaltsdauer sowie weniger häufiges Betreten der offenen Arme relativ zu scheinoperierten Tieren als gesteigertes angstähnliches Verhalten [280], während gesteigerte Betretungsfrequenz bzw. längere Verweildauer auf den offenen Armen als reduziertes angstähnliches Verhalten bzw. erhöhte Impulsivität und Risikobereitschaft aufgefasst werden kann [217, 281, 282]. Konsistent mit anderen Studien, die ebenfalls das CCI-Modell verwendet haben, konnte kein SHT-Effekt in diesem Forschungsvorhaben festgestellt werden (Daten nicht dargestellt) [283, 284]. Nach Normalisierung der CCI-Gruppen gegenüber der korrespondierenden „Sham“-Gruppe betrat die CCI+MRC1-KO-Gruppe 4 Tage nach Trauma signifikant häufiger die offenen Arme und hatte ebenfalls eine erhöhte „head-dip“ Anzahl. Hieraus lässt sich schließen, dass diese Mäuse weniger angstähnliches Verhalten zeigen bzw. risikobereiter sind.

Eine mögliche Erklärung für die größere Risikobereitschaft der MRC1-KO Mäuse ist der größere strukturelle Hirnschaden, welcher auch der Grund für die schlechtere mNSS Performance sowie die Unterschiede im OFT sein könnten. Anatomisch gesehen, spielt der präfrontale Kortex eine Rolle bei der physiologischen Regulation impulsiven Verhaltens [285]. Auch unter pathologischen Verhältnissen wie Zwangsspektrumerkrankungen ist der frontale Kortex von zentraler Bedeutung [286], was sich auch in einem frontalen CCI-Rattenmodell in Entscheidungsbeeinflussung äußert [287]. Unterstützt wird dies durch den Fakt, dass der mNSS und die Größe des Läsionsvolumens in weiblichen Mäusen sowie der mNSS und die Hämatomgröße in männlichen Mäusen 5 Tage nach Trauma einen Trend zu einer positiven Korrelation zeigen (Kurzzeitüberleben) (siehe 4.9). Auch in der Langzeitüberleben-Kohorte lässt sich dieser Trend ablesen. Aufgrund der Tatsache, dass hier nicht das Läsionsvolumen, sondern das gesunde, verbliebene Hirngewebe für die Korrelationsanalyse verwendet wurde, ergibt sich ein Trend hinsichtlich einer negativen Korrelation zwischen den Punkten im mNSS an Tag 30 sowie dem verbliebenen, gesunden Hirngewebe. Nicht in dieses Bild passt hingegen das Ergebnis der Korrelationsanalyse von der Anzahl an „head-dips“ 28 Tage nach Trauma und dem verbliebenen, gesunden Hirngewebe 30 Tage nach Trauma Induktion. Denn dieses Ergebnis würde nach der oben gängigen EPM Interpretation bedeuten, dass Tiere mit

mehr gesundem Hirngewebe risikobereiter sind und kein gesundes angsthähnliches Verhalten aufweisen. Es gibt aber auch andere Interpretationsweisen für die Anzahl an „head-dips“. Mehr „head-dips“ weisen auf ein vermindertes angsthähnliches Verhalten und mehr exploratives Verhalten hin [288]. Da auch vermehrtes angsthähnliches bzw. depressives Verhalten nach einem SHT als Komplikation auftreten kann [289], ist ein vermehrtes exploratives Verhalten in diesem Zusammenhang als positiv zu werten. So könnten die „head-dips“ 28 Tage nach Trauma also nicht nur als weiterhin verstärkte Risikobereitschaft gewertet werden, sondern als vermindertes depressives Verhalten. Um dies herauszufinden, wäre ein weiterer EPM Test zwischen Tag 4 und Tag 28 wünschenswert sowie andere Verhaltenstests wie der „forced swim test“ [290]. Nur so könnte geklärt werden, ob die CCI-Tiere im Verlauf der Studie überhaupt depressionsähnliches Verhalten nach dem SHT entwickeln, was sich im Verlauf der Heilungsphase vermindert und in einer vermehrten Anzahl an „head-dips“ äußert.

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass die Trends ( $p \leq 0,15$ ) selbstverständlich nicht so stark zu gewichten sind, wie signifikante Ergebnisse ( $p < 0,05$ ). Aufgrund der Tatsache, dass aber in mehreren unabhängig voneinander durchgeführten Korrelationsanalysen immer wieder ein Trend diesbezüglich sichtbar ist, sollten diese Ergebnisse nicht außer Acht gelassen werden. Auch wenn das Ergebnis der Korrelationsanalyse zwischen den „head-dips“ 28 Tage nach Trauma und dem verbliebenen, gesunden Hirngewebe nicht vollständig ins Bild passt, legen die restlichen Ergebnisse nahe, dass die schlechtere Leistung in den Verhaltenstests der MRC1-KO Mäuse auf die stärkere Hirnschädigung zurückzuführen ist. Die Literatur diesbezüglich ist eher kontrovers. So berichten einige Autoren von einer positiven Korrelation zwischen dem Läsionsvolumen und der Verhaltensperformance [291, 292], während andere keinerlei Korrelation feststellen konnten [293]. Abschließend lässt sich also sagen, dass nicht endgültig geklärt werden kann, woher die Verhaltensbeeinträchtigungen kommen. Gleichzeitig ist all dies ein deutlicher Erkenntnisgewinn in einem Forschungsfeld, was sich bislang nur mit Eigenschaften und nicht mit Auswirkungen des MRC1 im Zusammenhang mit einem induzierten SHT beschäftigt hat.

### **5.3 MRC1-Defizienz führt zu geschlechtsspezifischen Unterschieden in der inflammatorischen Reaktion auf ein SHT**

Es ist mittlerweile allgemein bekannt, dass geschlechtsspezifische Unterschiede während eines SHTs und auch anderen Erkrankungen auftreten können [132, 294]. Die Forschung hat deshalb in den letzten Jahren einen Paradigmenwechsel vollzogen und fordert nun beide Geschlechter in Forschungsprojekten zu berücksichtigen [295, 296]. Dadurch werden kontinuierlich neue Erkenntnisse zu diesem Thema gewonnen. Jedoch ist immer noch nicht vollständig geklärt, was genau diese Geschlechtsunterschiede verursacht und aufrechterhält.

Um geschlechtsspezifische Unterschiede in diesem Forschungsprojekt zu untersuchen, wurden beide Geschlechter verwendet. Eine Vielzahl an Analysen (Verhalten, Läsionsparameter, Genexpression und RNA-Sequenzierung) resultierte in Unterschieden zwischen männlichen und weiblichen Mäusen. Nachfolgend möchte ich insbesondere die Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen MRC1-KO Mäusen näher betrachten, die Schwerpunkt dieses Forschungsprojekts sind. Was das Verhalten betrifft, so zeigten sich Unterschiede zwischen den beiden CCI-Gruppen lediglich in weiblichen Mäusen an Tag 1 und nicht in männlichen Mäusen. Über geschlechtsspezifische Unterschiede in der chronischen Phase kann aufgrund der gemeinsamen Auswertung von männlichen und weiblichen Mäusen keine Aussage gemacht werden.

Bei Betrachtung der Mittelwerte der mNSS Punkte am ersten Tag nach SHT von beiden Geschlechtern der CCI+MRC1-KO-Gruppe lässt sich feststellen, dass Weibchen deutlich höhere Punktzahlen (Mittelwert: 6,75) aufweisen als Männchen (Mittelwert: 4,28). In den CCI+MRC1-WT-Mäusen sind die Punktzahlen in männlichen und weiblichen Mäusen dagegen vergleichbar. Die Literatur ist kontrovers, wenn es um die Fragestellung geht, welches Geschlecht geringere Verhaltenseinschränkungen nach einem SHT hat. So gibt es Autoren, die berichten, dass angstähnliches Verhalten und schlechtere Verhaltensleistungen häufiger in weiblichen als in männlichen Nagern beobachtet werden [297, 298]. Demgegenüber stehen zahlreiche Autoren, die das Gegenteil beobachtet haben [149, 299]. Vereinzelt wird auch publiziert, dass die Leistung männlicher und weiblicher Mäuse in Verhaltenstests nicht per se geschlechtsabhängig ist [300]. Schlussendlich gibt es wiederum Autoren die berichten, dass geschlechtsspezifische Unterschiede in der Leistung bei Verhaltenstests unbedeutend sind [301]. Interessanterweise gibt es auch Forschungsprojekte, die die Leistung von weiblichen Ratten nach einem SHT in Abhängigkeit ihres Zyklusstandes untersucht haben und herausfanden, dass der Östrus wohl Einfluss auf depressionsähnliches Verhalten, aber nicht auf motorische Fähigkeiten hat [302]. Es bedarf also weiterer Forschung, um herauszufinden, welche Effekte genau zu den schlechteren Verhaltensergebnissen in weiblichen Mäusen an Tag 1 nach SHT geführt haben.

Neben den geschlechtsspezifischen Unterschieden im Verhalten nach SHT, waren auch Effekte hinsichtlich der Pathophysiologie sichtbar. Männliche CCI+MRC1-KO-Mäuse präsentierten ein signifikant vergrößertes Hämatom und wiesen eine verstärkte inflammatorische Antwort auf den induzierten Schaden auf. Bei den Weibchen war kein Unterschied in der Hämatomgröße feststellbar. Ebenso konnte keine verstärkte Inflammation in den MRC1-KO-Weibchen diagnostiziert werden. Das vergrößerte Hämatom der männlichen MRC1-KO Mäuse könnte aus einer erhöhten Permeabilität der BBB resultieren [303]. Dieses Phänomen wurde bislang allerdings in weiblichen und nicht in männlichen Mäusen beobachtet [304]. Die stärkere Inflamationsantwort im Zuge des Sekundärschadens in männlichen

MRC1-KO-Mäusen nach einem SHT könnte erklären, warum in diesem Forschungsprojekt hingegen männliche Mäuse ein größeres Hämatom aufweisen. Inflammation sowie auch andere Faktoren treiben den Zusammenbruch der ohnehin schon durch den Primärschaden vorgeschädigten BBB weiter voran [303] und ebnen den Weg für einen vermehrten Blutaustritt aus den Gefäßen. Die erniedrigte Mmp9 Genexpression in den männlichen MRC1-KO-Mäusen (siehe 4.8) sollte allerdings eine positive Wirkung auf die Integrität der BBB haben und diese weniger durchlässig machen, was die Hypothese nicht unterstützt. Gleichzeitig gibt es mehr Matrix Metalloproteasen, die die Integrität der BBB herabsetzen können [305, 306]. Insofern ist fraglich, ob alleine die verminderte Mmp9 Expression sich positiv auswirken kann bzw. den negativen Auswirkungen der vermehrten Inflammation entgegenwirken kann. Geschlechtsspezifische Unterschiede, welche die Pathophysiologie betreffen, werden in Tiermodellen insgesamt häufiger berichtet als Verhaltenseffekte. Selten aber wird auch die geschlechtsspezifische neuroinflammatorische Antwort untersucht [307], obwohl diese essenziell für den Verlauf der Erkrankung ist. Erschwerend kommt hinzu, dass die Neuroinflammation zwar ein konsistentes Merkmal von einem SHT ist [308], aber auch abhängig vom verwendeten SHT Tiermodell ist [309]. In der aktuellen wissenschaftlichen Literatur wird eine Uneinigkeit deutlich, wobei vermehrt von ungünstigeren Ergebnissen bei männlichen Tieren berichtet wird [132, 310-312], was auch in diesem Forschungsprojekt festzustellen war.

Aufgrund der gesamten Ergebnisse dieses Forschungsprojektes und der aktuellen Literatur lässt sich vermuten, dass nicht der Knock-out des MRC1 für die Verhaltensänderung und die veränderte Pathophysiologie verantwortlich ist, da sonst beide Geschlechter bei allen Analysen gleichermaßen betroffen sein müssten. Stattdessen scheint der Knock-out die ohnehin schon geschlechtsspezifischen Unterschiede nach einem SHT zu verstärken bzw. weiter zu modulieren. Das Geschlecht ist also vielmehr ein verstärkender Faktor. Eine mögliche Erklärung für den schlechteren pathophysiologischen Ausgang in männlichen MRC1-KO-Mäusen ist die Mikroglia Heterogenität beider Geschlechter - auch schon unter physiologischen Bedingungen. Weibliche Mikroglia weisen längere, dickere und verzweigtere Fortsätze auf [158]. Dieser Phänotyp wird auch als „Überwacher“ bezeichnet [313]. Des Weiteren sind vermehrt Gene hochreguliert, die einen Schwerpunkt auf intrazelluläre Signalübertragung und dynamische Koordination legen [19]. All dies könnte den Weibchen einen entscheidenden Vorteil im Hinblick auf Wahrnehmung von Veränderungen in ihrer Umwelt sowie aktives Aufrechterhalten der Homöostase durch physiologische Interventionen, verschaffen [156]. Männliche Mikroglia haben kürzere Fortsätze sowie einen vergrößerten Zellkörper [158] und exprimieren verstärkt Gene, die unter den Überbegriffen inflammatorische Antwort, Chemotaxis- und Zytokin-Regulation zusammengefasst werden können [156, 314]. Unter pathologischen Bedingungen wie einem SHT verstärkt sich dieser morphologische

Unterschied. Während der „Überwacher“-Typ im weiblichen Gehirn zunimmt, steigt der Anteil Iba1<sup>+</sup> Mikroglia im männlichen Nagerhirn. Gleichzeitig präsentieren diese Mikroglia ein verstärkt inflammatorisches Profil im Kortex, Thalamus und Gyrus dentatus in der akuten und subakuten Phase nach Trauma [310]. Auch wird von einer stärkeren Aktivierung von Mikroglia bzw. höheren Anzahl dieser Zellen im männlichen im Vergleich zum weiblichen Gehirn nach einem CCI berichtet [315]. Über geschlechtsspezifische morphologische Unterschiede von Makrophagen lässt sich in der aktuellen Literatur nichts finden. Bekannt ist hingegen, dass Unterschiede in der Polarisierung von Makrophagen und der Art, wie diese sich anschließend im Verlauf einer Erkrankung verhalten, durch den Einfluss von Sexualhormonen vermittelt werden [316, 317].

Ergänzend zeigen sich geschlechtsspezifische Unterschiede auch in der Einwanderung peripherer myeloider Zellen. Männliche Mäuse nach CCI zeigen im Vergleich zu weiblichen einen vermehrten Zustrom peripherer myeloider Zellen im Gehirn, auf die eine Proliferation von Mikroglia folgt [315]. Auch wenn längst nicht alle offenen Fragen auf diesem Forschungsgebiet geklärt sind, so lassen sich zumindest Unterschiede in der Mikroglia Morphologie sowie Reaktion von Makrophagen durch den Einfluss von Sexualhormonen erklären [318]. Das weibliche Sexualhormon Östrogen ist wichtig für die geschlechtsspezifische Gehirnfunktion im Erwachsenenalter und nimmt auch Einfluss auf Mikroglia sowie deren Morphologie [319]. In mehreren SHT Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass Östrogen neuroprotektive Effekte sowohl in weiblichen als auch in männlichen Nagern entfaltet [320-322]. Andere Autoren konnten zwar eine Modulation der inflammatorischen Antwort durch Östrogen bestätigen, nicht aber einen verminderten Hirnschaden oder eine geringere Inflammation nach Trauma [323]. Auch die Gabe von Testosteron wirkt sich positiv auf den Heilungsverlauf nach einem SHT aus. Allerdings werden die positiven Effekte auf Astrozyten und Mikroglia wohl zumindest teilweise durch seine Metaboliten Östrogen und Dihydrotestosteron vermittelt [324]. Neben Östrogen wird auch Progesteron eine protektive Rolle durch eine Verringerung der Inflammation zugeschrieben [137, 325]. Niedrigere Östrogen- und Progesteronspiegel in männlichen Mäusen sowie die daraus resultierenden Unterschiede in der Mikroglia Morphologie, die Art wie diese Zellen auf ein verändertes Milieu im Gehirn reagieren und Unterschiede in der Makrophagen Reaktivität und dem Einstrom peripherer myeloider Zellen sind ein Erklärungsansatz für schlechtere Ergebnisse nach einem induzierten SHT. Vermutlich ist dies in den männlichen MRC1-KO Mäusen verstärkt ausgeprägt, weil diese zusätzlich durch das Fehlen des Rezeptors eine Immunderegulation im Gehirn erfahren. Ergebnisse aus der qPCR unterstützen die These reaktiverer Immunzellen in männlichen MRC1-KO-Mäusen nur bedingt. Arg1 gilt als Marker für M2-polarisierte Makrophagen und Mikroglia in ZNS-Krankheitsmodellen [326]. Die erhöhte Expression in männlichen MRC1-KO Mäusen würde dementsprechend für eine verstärkte M2-

Polarisierung sprechen. MHC II wird sowohl an der Oberfläche von M1 als auch M2 polarisierten Makrophagen und Mikroglia exprimiert, wobei M1 im Gegensatz zu M2 hohe Mengen an MHC II exprimieren [327]. MHC II ist in männlichen MRC1-KO Mäusen erniedrigt. Diese qPCR Ergebnisse vermitteln den Eindruck von vermehrt protektiven und vermindert schädlichen Makrophagen und Mikroglia in männlichen MRC1-KO Mäusen. Interessanterweise kann ein SHT auch einen besonderen Makrophagen Phänotyp induzieren, welcher sowohl Arg1<sup>+</sup> als auch MHC II<sup>+</sup> ist. Die Autoren, die dies herausfanden, postulieren, dass Arg1 aufgrund der gewonnenen Erkenntnisse kein geeigneter Marker für konventionelle M2 Makrophagen in einem SHT Modell ist [328], was die obige Argumentation von vermehrt protektiven Makrophagen im Gehirn in Frage stellt. In diesem Zusammenhang gilt es ebenfalls zu erwähnen, dass die Rolle bzw. der kausale Zusammenhang von Arg1 im Zusammenhang mit der M2 Polarisation insgesamt nicht klar ist [329]. So wurde zunächst vermutet, dass Arg1 in Makrophagen zur Auflösung der Entzündung und zur Gewebereparatur beiträgt, indem es die Zytokin-Produktion von Th-2 Phänotyp T-Zellen fördert [330]. Eine Studie an Arg1-Defizienz Mäusen resultierte allerdings in einer verstärkten Th2-Reaktion, was auf Arg1 als Suppressor einer Th2-abhängigen Antwort hinweist und die Ursprungsthese nicht unterstützt [331]. Auch wenn diese Ergebnisse aus anderen Krankheitsmodellen stammen, sollten sie bei der Interpretation der Daten nicht gänzlich außer Acht gelassen werden. Deshalb sollten die Ergebnisse aus der qPCR eher den Ergebnissen aus der RNA-Sequenzierung, die besser geeignet ist, um sich einen Gesamtüberblick über die Vorgänge im Gehirn nach einem SHT zu verschaffen, untergeordnet werden. Abschließend lässt sich sagen, dass eine stärkere Inflammationsantwort in männlichen MRC1-KO-Mäusen, in Kombination mit den ohnehin vorliegenden geschlechtsspezifischen Effekten, eine insgesamt stärkere Schädigung des Gehirns im Gegensatz zu weiblichen Mäusen erklären würde. Gleichzeitig sind weitere Untersuchungen notwendig, um die noch unbekanntes geschlechtsspezifischen Mechanismen, die im Verlauf eines SHTs auftreten, aufzuklären.

#### **5.4 MRC1 spielt eine bedeutende Rolle bei der Aufrechterhaltung der Immunhomöostase des Gehirns sowohl in gesunden als auch in krankhaften Zuständen.**

Die RNA-Sequenzierungsergebnisse der Kohorte 1 (Kurzzeitüberleben, 5 d) zeugen deutlich von einem vermehrt inflammatorischen Milieu im Gehirn von Sham+MRC1-KO-Mäusen im Gegensatz zu ihren Wildtyp-Geschwistern. In CCI+MRC1-KO-Mäusen vs. ihren Wildtyp-Geschwistern ist feststellbar, dass das Fehlen des Rezeptors in einer äußerlich nicht vorhandenen Immunreaktion in der GSEA in der geschlechtsunabhängigen Auswertung sowie in einem Trend hinsichtlich einer verstärkten Entzündungsreaktion in männlichen Mäusen resultiert. In weiblichen Mäusen mit dem gleichen Genotyp ist dies nicht der Fall.

Betrachtet man ergänzend zu den GSEA Ergebnissen die DEGs dieser Gruppen, so lässt sich feststellen, dass sich in Sham+MRC1-KO vs. -WT unter den Top 15 DEGs zahlreiche Gene finden, welche mit einer inflammatorischen Antwort oder Zellproliferation in Verbindung stehen (Ifi47, Tnk1 und Il1a signifikant erhöht; C1qtnf3, und Trim43a signifikant erniedrigt). Auch in der geschlechtsunabhängigen Auswertung von CCI+MRC1-KO vs. -WT finden sich Inflammations- bzw. Nervensystem-assoziierte Gene sowie Gene, welche mit Zelldifferenzierung assoziiert werden können (Aurkc, Clec14a, Draxin und Gng7 signifikant erhöht; Il-6, Cd209f, Mzb1 signifikant erniedrigt,) unter den ersten hoch- bzw. herunterregulierten DEGs. Zuletzt wird dieses Bild durch die DEGs der männlichen CCI+MRC1-KO vs. -WT komplettiert. Gene, die mit Immunsystem bzw. Immunantwort sowie Zellzyklus- und Apoptose (Klri1, Cxcl3, Zswim2, Il12a signifikant hochreguliert; Cd209f signifikant erniedrigt) assoziiert werden können, waren signifikant erhöht. Die entsprechenden Gruppen (Sham+MRC1-KO, CCI+MRC1-KO, männliche CCI+MRC1-KO) weisen allerdings insgesamt niedrige absoluten Expressionswerte auf.

Die verstärkte Expression von Genen sowie von Prozessen, welche unter den Überbegriffen Zellzyklus und -differenzierung zusammengefasst werden können, ist in Anbetracht der bekannten SHT-induzierten Proliferation von Mikroglia, CAMs und Astrozyten in den CCI-Mäusen plausibel [201, 332, 333]. Ebenso spricht hierfür, dass auch CCI+MRC1-WT-Mäuse ähnliche Prozesse hochregulieren. Es ist also davon auszugehen, dass nicht die MRC1-Defizienz, sondern das induzierte SHT für diese Effekte sorgt. Dies erklärt allerdings nicht, warum diese Effekte auch in Sham-Mäusen sichtbar sind. Zu vermuten ist, dass die basale Inflammation – bzw. vielmehr die dadurch erhöhten Level von IL-6 bzw. dem IL6/JAK/STAT3-Signalweg, sowie TNF- $\alpha$  via NF- $\kappa$ B - im Gehirn dieser Tiere bereits ausreicht, um lokale Immunzellen sowie Astrozyten zu aktivieren und zur Proliferation anzuregen [334-338].

Wie lässt sich aber die gesteigerte Inflammation bzw. das verstärkt inflammatorische Milieu in den MRC1-KO Mäusen unter physiologischen, aber auch pathophysiologischen Bedingungen erklären? Bereits in anderen Studien konnte unabhängig von unserem Knock-out Mausmodell gezeigt werden, dass der MRC1 eine Art Brückenfunktion zwischen Homöostase und Immunität einnimmt [178]. Auch die Lage der CAMs im Plexus choroideus, meningealen und perivaskulären Bereichen unterstreicht die besondere Rolle in der immunologischen Überwachung und Aufrechterhaltung der Homöostase [263]. Diese These wird auch von anderen Autoren befürwortet, die feststellen konnten, dass MRC1<sup>+</sup> Makrophagen die Gewebekomöostase unterstützen [339]. So sind CD206<sup>+</sup> Makrophagen im Fettgewebe entscheidend an der Regulation der Glukose-Homöostase beteiligt [340]. Eine Cd206-Überexpression findet sich dagegen z.B. in Leberkrebszellen und ist mit einer schlechten Prognose für die Patienten assoziiert [264]. In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass CD206<sup>+</sup> Makrophagen für ein besonderes Mikromilieu verantwortlich sind, welches das

myogene Potenzial reguliert bzw. kontrolliert [265]. Auch wenn diese Studien völlig andere Gewebe untersucht haben, so haben sie alle gemeinsam, dass dem MRC1 auf Makrophagen scheinbar eine regulatorische Aufgabe zukommt.

Aber was genau ist eigentlich Homöostase? Als Homöostase wird der Zustand der aktiven Aufrechterhaltung bestimmter quantitativer Eigenschaften eines Systems, sogenannter regulierter Variablen, innerhalb eines gewünschten Bereichs, beschrieben. Regulierte Variablen in diesem speziellen Fall wären die Genexpressionslevel von inflammationsassoziierten Genen im Gehirn. Um dies umzusetzen, benötigt das System spezielle Sensoren, die unerwünschte Veränderung wahrnehmen und Effektoren, die die entsprechende Korrektur übernehmen. Dies bezeichnet man als homöostatischer Kreislauf, welcher auch auf Zellebene grundsätzlich so vorhanden ist [341]. Im Gegensatz dazu steht der Begriff Inflammation, bei dem man sicherlich im ersten Moment an die Reaktion auf eine Infektion oder auf einen Gewebeschaden, wie das SHT, denkt. Dennoch gibt es auch zahlreiche Beispiele bei denen Inflammation auf der Störung von Zell- und Gewebhomöostase basiert [341, 342]. Gewebespezifische Makrophagen gehören gemeinsam mit anderen Zellen zu den Sensoren, welche Veränderungen der lokalen Sauerstoff- und Nährstoffkonzentrationen, aber auch pH- und Osmolaritätsänderungen auf zellulärer Ebene wahrnehmen [341]. Es liegt die Vermutung nahe, dass durch den Knock-out des MRC1, welcher sich auch auf CAMs befindet, ggf. deren sensorische Funktion gestört ist oder die anschließende Kommunikation mit den Effektoren zur Korrektur einer wahrgenommenen Entgleisung der Homöostase nicht mehr fehlerfrei funktioniert. Dies würde erklären, warum in den CCI-Tieren, aber auch in Sham-Tieren, welche keinerlei Gewebeschaden in Form eines SHTs erhalten haben, eine vermehrte Inflammation vorliegt. Ebenso ist aufgrund der gut bekannten Rolle des MRC1 in der Pathogenabwehr zu vermuten, dass Tiere mit einer MRC1-Defizienz mit einer gesteigerten Reaktion auf pathogene Umweltreize reagieren. In einem Allergenmodell konnte so festgestellt werden, dass MRC1-KO Mäuse mit einer erhöhten Überempfindlichkeit und verstärkten Entzündungen der Atemwege auf eine Allergiebehandlung reagierten [241]. Es liegt nahe, dass diese Vorgänge nicht nur in der Lunge, sondern im ganzen Körper der Mäuse dieses Forschungsvorhabens so stattfinden würde. Möglich wäre also, dass eine Infektion zu einer systemischen Entzündungsreaktion mit anschließenden Auswirkungen auch auf das Gehirn geführt hat. Die Tatsache, dass unser Tierschrank bzw. die dort gehaltenen Mäuse regelmäßig auf vorliegende, gängige Pathogene getestet werden und bislang kein Vorliegen festgestellt werden konnte, lässt diese Hypothese allerdings unglaublich erscheinen.

Darüber hinaus spielt der MRC1 auch eine Rolle bei der Clearance einer Untergruppe von Mannose-tragenden Serumglykoproteinen, welche normalerweise während der Entzündung erhöht sind [343]. So lässt sich vermuten, dass die erhöhten Level von Serumglykoproteinen

durch die geschädigte BBB ins Gehirn gelangen und dort nicht durch MRC1 gebunden werden, sondern stattdessen im Parenchym verbleiben und dort Mikroglia zusätzlich zu der vorliegenden Inflammation durch das SHT selbst, proinflammatorisch stimulieren.

Abgesehen davon könnte das vermehrt inflammatorische Milieu in Sham+MRC1-KO-Mäusen des Weiteren auch durch die Anästhesie ausgelöst worden sein. Anästhesie allein sowie in Kombination mit einem operativen Eingriff kann bereits zu einer Aktivierung des Immunsystems mit ggf. nachfolgender überschießender Immunantwort führen [344]. Isofluran, welches auch in diesem Forschungsvorhaben für die Anästhesie verwendet wurde, führt so z.B. in älteren Mäusen (14 Monaten) zu einer Inflammation im Hippocampus sowie kognitiven Einschränkungen [345]. Aufgrund der Tatsache, dass die in diesem Forschungsprojekt verwendeten Mäuse allerdings deutlich jünger waren (8-12 Wochen) und auch Sham+MRC1-WT-Mäuse für die gleiche Zeitdauer mit Isofluran anästhesiert wurden und keinerlei vergleichbare Reaktionen aufwiesen, ist dies eher unwahrscheinlich. Grundsätzlich wäre es auch möglich, dass allein der operative Eingriff zu einer Aktivierung des Immunsystems geführt hat [346]. Dieser müsste dann aber ebenfalls in beiden Versuchsgruppen sichtbar sein, was in diesem Forschungsprojekt nicht festgestellt werden konnte. Möglich wäre dennoch, dass die Auswirkungen der Anästhesie bzw. des operativen Eingriffs in den MRC1-KO aufgrund der Einschränkungen in der Immunabwehr deutlicher ausfallen und deshalb in den -WT-Mäusen keine vergleichbare Reaktion erkennbar ist. Diese Hypothese kann nur endgültig durch RNAseq von Nativtieren, welche keinerlei Analgetika und Anästhetika verabreicht bekommen haben, ausgeschlossen werden.

All diese Hypothesen erklären dennoch nicht, warum in der GSEA keinerlei inflammatorische Reaktion in den CCI+MRC1-KO vs. -WT ersichtlich war. Ein möglicher Erklärungsansatz für die Diskrepanz ist, dass eine bereits vorhandene basale Inflammation im Gehirn auch in einer verminderten inflammatorischen Reaktion des Körpers auf ein neuronales Trauma resultieren kann (siehe auch 5.2). Einige Autoren konnten neuroprotektive Effekte in Form von einer Verminderung neuronaler Apoptose im Hippocampus [260] sowie signifikant reduzierte Astroglieose in der Nähe des Corpus callosum [347], als auch positive Auswirkungen auf die Verhaltensleistungen und den histologischen Hirnschaden feststellen [259]. Diese wurden insbesondere durch die prä-operative LPS-induzierte Proliferation und Aktivierung von Mikroglia vermittelt [348]. Die LPS Gabe kurze Zeit vor Traumainduktion versetzt den Körper bereits in eine positive Alarmbereitschaft und bereitet auf die zukünftige Verletzung vor („pre-conditioning“). Dies geschieht sowohl peripher, als auch im Gehirn; denn LPS kann direkt und indirekt die BBB schädigen und dort eine Neuroinflammation auslösen [349]. Diese Erkenntnisse würden zwar erklären, warum keine inflammatorische Reaktion bzw. gar keine Reaktion in der RNA-Sequenzierung der CCI+MRC1-KO-Gruppe sichtbar ist, lassen sich aber mit anderen Ergebnissen, wie der größeren Hirnschädigung und den

Verhaltenseinschränkungen nicht in Einklang bringen. Gleichzeitig würde man tendenziell hochregulierte heilungsfördernde „hallmark“s erwarten. Des Weiteren ist aufgrund des Alters der Mäuse und den Ergebnissen der RNA-Sequenzierung der Sham+MRC1-KO Mäuse davon auszugehen, dass der MRC1-KO bereits zu einer chronischen Neuroinflammation auf niedrigem Level vor SHT geführt hat. Ob eine chronische Neuroinflammation vor SHT im Gegensatz zu einer kurzfristig ausgelösten Entzündungsreaktion auch zu einer geringeren Inflamationsantwort nach SHT führt, ist deshalb fraglich. Der Umstand, dass allein eine chronische Neuroinflammation schon zu einer Mikroglia Aktivierung im Gehirn und schlechteren räumlichen Gedächtnisleistungen führt [350], spricht jedenfalls nicht dafür. Weitere Forschung auf diesem Gebiet ist allerdings notwendig, um dies abschließend klären zu können.

Naheliegender ist, dass Auswirkungen der MRC1-Defizienz nach einem SHT durch die gemeinsame Auswertung von männlichen und weiblichen Mäusen maskiert werden. Für diese These spricht, dass erst die geschlechtsabhängige GSEA zu signifikant hochregulierten biologischen Prozessen und Zuständen in CCI+MRC1-KO vs. -WT führt, was bei geschlechtsunabhängiger Auswertung nicht der Fall war. In beiden Geschlechtern können diese „hallmarks“ mit der Reaktion auf ein SHT in Verbindung gebracht werden. In männlichen CCI+MRC1-KO-Mäusen resultiert die GSEA in einer Tendenz zu einer verstärkten inflammatorischen Antwort. In weiblichen CCI+MRC1-KO-Mäusen resultiert diese in Prozessen, welche sowohl mit reparativen Maßnahmen als auch der Schädigung selbst assoziiert sind. Ebenfalls für die Maskierung spricht, dass die Top 150 DEGs beider Geschlechter der CCI+MRC1-KO vs. -WT keine Schnittmenge aufweisen. (siehe Abbildung 29 B). Weiterhin spricht für diese These, dass neben den Knock-outs auch die Wildtypen von diesem Phänomen betroffen sind. Eine gemeinsame Auswertung beider Geschlechter resultiert in einer deutlichen inflammatorischen Antwort auf das SHT. Diese ist auch in weiblichen CCI+MRC1-WT-Mäusen deutlich sichtbar. Männliche CCI+MRC1-WT-Mäuse weisen hingegen keinen Prozess auf, der direkt auf eine Inflammation hindeutet; wengleich aufgrund der verstärkten *Hypoxie* auf ein induziertes Trauma geschlossen werden kann. Ergänzend festzustellen ist, dass bereits bekannt ist, dass einzelne Beobachtungen maskiert werden, wenn „gepoolte“ Daten ausgewertet werden [351], weshalb diese Hypothese naheliegend erscheint. Dagegen spricht, dass nur einzelne Beobachtungen in einer gemeinsamen Auswertung maskiert werden, wobei an dieser Stelle fraglich ist, ob die GSEA Ergebnisse als einzelne Beobachtungen innerhalb dieses gesamten Forschungsprojekts gesehen werden können. Gleichwohl ist festzustellen, dass durch die gemeinsame Auswertung Erkenntnisse verloren gehen, weshalb in zukünftigen Untersuchungen – nicht nur in Bezug auf MRC1 – stets eine getrenntgeschlechtliche Auswertung favorisiert werden sollte.

Abschließend lässt sich aufgrund der vermehrten Inflammation in Sham+MRC1-defizienten Mäusen sowie schlechterer neurologischer Fähigkeiten, beeinflusstes angstähnliches Verhalten, stärkere Hirnschädigung, Veränderungen auf zellulärer Ebene sowie weiteren veränderten Parametern in CCI+MRC1-KO-Mäusen feststellen, dass der MRC1 mit Sicherheit eine immunregulatorische bzw. -modulierende Aufgaben im gesunden sowie im erkrankten Gehirn übernimmt. In welchem Ausmaß der MRC1 Einfluss auf die Pathogenese des SHTs nimmt, welche Auswirkungen die MRC1-Defizienz auf den restlichen Körper bzw. auf das Gehirn in älteren Mäusen hat, lässt sich mit den durchgeführten Analysen zu diesem Zeitpunkt noch nicht feststellen und bedarf weiterer Untersuchungen.

## **5.5 Limitationen dieses Forschungsprojekts**

Dieses Forschungsprojekt war mit einigen Einschränkungen verbunden, die berücksichtigt werden sollten.

Erstens wurden nur Gehirne von CCI- bzw. „Sham“-Mäusen beider Genotypen für die RNA-Sequenzierung eingeschickt und analysiert. Gehirne von gänzlich unbehandelten MRC1-WT und -KO Nativmäusen wurden nicht untersucht.

Zweitens wurden keinerlei molekularbiologische Untersuchungen in der Langzeitüberleben-Kohorte durchgeführt. Diese Entscheidung wurde aufgrund fehlender statistisch signifikanter histopathologischer Evidenzen für Genotyp-spezifische Unterschiede getroffen, sollte aber aus wissenschaftlichem Interesse in der Zukunft durchgeführt werden.

Drittens war aufgrund des ungleichen Genotyp- und Geschlechtsverhältnisses nach Re-Genotypisierung keine Aussage über geschlechtsspezifische Effekte in der chronischen Phase nach einem SHT möglich.

Viertens wurden nur Effekte im Gehirn und keine systemischen Effekte des MRC1-KO untersucht.

## **5.6 Fazit und Ausblick**

In diesem Forschungsprojekt wurde die Rolle des MRC1 im Zusammenhang mit einem experimentell induzierten SHT-Mausmodell in einer Kurz- und Langzeitüberleben-Kohorte untersucht. Bisherige Untersuchungen zu MRC1 deuteten auf eine wichtige Rolle in der Immunabwehr des Gehirns hin [173, 178, 190, 267], weshalb der Rezeptor in den Fokus unserer Forschung geraten ist.

Diese Ergebnisse der umfangreichen Untersuchungen führen zu dem Fazit, dass der MRC1 insbesondere in der frühen Phase eines SHTs immunregulatorische und –modulierende Aufgaben im Gehirn übernimmt und wichtig für die Aufrechterhaltung der Immunhomöostase sowohl in gesunden als auch in krankhaften Zuständen ist.

Trotz zahlreicher gewonnener Erkenntnisse auf einem bislang wenig erforschten Gebiet, bleiben offene Fragen, die nur durch zukünftige Forschungsvorhaben beantwortet werden können. Gleichzeitig verdeutlichen die Ergebnisse, dass einige Themen in der Forschung bislang zu wenig Beachtung erfahren haben.

Durch die Ergebnisse dieses Forschungsprojekts wird vor allem ersichtlich, dass geschlechtsspezifische Unterschiede in der Pathophysiologie eines SHTs eine bedeutsame, bislang aber oft unterschätzte Rolle spielen. Dies liegt zum einen daran, dass vermehrt männliche Versuchstiere in Forschungsprojekten verwendet werden [137] bzw. Frauen in klinischen Studien unterrepräsentiert sind [352] oder wie in diesem Forschungsprojekt, Ergebnisse aufgrund unvorhersehbarer Probleme nicht geschlechtsabhängig ausgewertet werden können. Geschlechtsspezifische Unterschiede stellen Forschende bislang und auch zukünftig vor zahlreiche Herausforderungen. Einerseits ist die Interpretation der Ergebnisse ohnehin schon schwierig und komplex, andererseits sind die zugrundeliegenden Mechanismen bislang nicht oder nur unzureichend bekannt [294], was die Interpretation zusätzlich erschwert. Zukünftige Forschungsprojekte sollten also sowohl beide Geschlechter berücksichtigen als auch getrenntgeschlechtlich auswerten, um neue Erkenntnisse zu gewinnen.

Weiterhin ist aufgrund der RNA-Seq Ergebnisse der Sham+MRC1-KO-Mäuse sowie im direkten Vergleich zu Sham+MRC1-WT-Mäusen sehr wahrscheinlich, dass die MRC1-Defizienz im Gehirn zu einem proinflammatorischen Milieu führt. Dennoch sollte zur endgültigen Klärung eine RNA-Seq von Nativtieren durchgeführt werden. Diese könnte bei geeigneter Probenwahl, neben dem Gehirn, ebenfalls Aufschluss über Auswirkungen der MRC1-Defizienz auf den restlichen Körper geben. Daran anschließend ist bislang unklar, wie sich die MRC1-Defizienz langfristig im Gehirn bzw. dem gesamten Körper auswirkt. So wäre es in diesem Zusammenhang sinnvoll ältere, native Mäuse (>52 Wochen) verhaltensbiologisch zu untersuchen und anschließend histopathologische und molekularbiologische Untersuchungen sowie RNA-Seq von Gehirn und anderen Organen durchzuführen.

Eine Fragestellung, die gleichermaßen weiterer Untersuchungen bedarf, ist die genaue Rolle des MRC1 im Zusammenhang mit einem SHT. Neue Möglichkeiten diese Fragestellung zu beantworten, ergeben sich durch stetige Weiterentwicklung technischer Möglichkeiten wie „Single-Cell RNA Sequencing“ (scRNA-seq). Bislang ermöglichten Transkriptomanalysen die Entschlüsselung molekularer Mechanismen z.B. im gesamten Gehirn, welches eine Vielzahl an Zellen enthält und deshalb die Beurteilung einzelner Zellen nicht möglich machte [353]. Mit scRNA-seq ist es nun möglich Aussagen zu einzelnen Zellen in räumlich-zeitlicher Auflösung treffen zu können. So könnte scRNA-seq genutzt werden, um die Rolle von MRC1 auf CAMs detaillierter zu charakterisieren und neue Hypothesen für zukünftige Projekte aufzustellen.

Bislang ist diese Technik allerdings sehr teuer und es wird wohl noch einige Zeit dauern, ehe sie allen Forschenden zugänglich ist.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Ergebnisse dieses Forschungsprojekts ein weiteres Puzzleteil im Verständnis der Pathophysiologie eines SHTs liefern. Zukünftige Forschungsprojekte an MRC1 erscheinen vielversprechend, um weitere offene Fragen beantworten zu können und in ferner Zukunft, aufgrund besseren Verständnisses der Pathophysiologie, SHT Patienten besser behandeln zu können.

## 6 Zusammenfassung

Das Schädel-Hirn-Trauma (SHT) ist ein komplexes Krankheitsbild, welches sich durch eine hohe Mortalität, aber auch eine Vielzahl von Langzeitfolgen auszeichnet. Trotz unzähligen Forschungsprojekten auf diesem Gebiet besteht nach wie vor Unklarheit über die sekundären pathophysiologischen Vorgänge, die im Gehirn nach einem SHT ablaufen, was die Entwicklung universeller Therapiemöglichkeiten schwierig macht und sowohl Human- als auch Veterinärmediziner vor Herausforderungen im Umgang mit den SHT-Patienten stellt. Einigkeit besteht in der Bedeutung inflammatorischer Prozesse in der Pathophysiologie des SHT und viele experimental-therapeutische Interventionen zielen daher auf diese Prozesse ab, um das Ausmaß der Hirnschädigung zu begrenzen. Vor diesem Hintergrund wurde in der vorliegenden Arbeit die pathophysiologische Rolle des Mannose Rezeptor C-Typ I (MRC1) untersucht. MRC1 wird seit vielen Jahren als Marker für antiinflammatorisch polarisierte ZNS-assoziierte Makrophagen und Mikroglia verwendet. Funktionell wird MRC1 als Zelloberflächenrezeptor beschrieben, der in der Erkennung und Internalisierung von Pathogenen und Serumproteinen und ggfs. in der Präsentation von Antigenen eine Rolle spielt, was zur immunologischen Überwachung des Gehirns beiträgt.

Um die Relevanz von MRC1 für die Pathophysiologie des SHTs zu untersuchen, wurden transgene MRC1-defiziente Mäuse und ihre Wildtyp-Geschwister beider Geschlechter einem standardisierten SHT mittels Controlled Cortical Impact (CCI) unterzogen und sowohl Kurz- als auch Langzeiteffekte untersucht. Scheinoperierte Tiere („Sham“) wurden parallel als Kontrollen für das SHT untersucht.

Zu den Untersuchungsmethoden zählten Verhaltenstests, histopathologische und molekularbiologische Analysen sowie RNA-Sequenzierung mit anschließenden Transkriptomanalysen.

MRC1-KO Mäuse zeigten im Gegensatz zu ihren Wildtyp-Geschwistern schlechtere Leistungen in den Verhaltenstests sowie eine Reduktion angstähnlichen Verhaltens in der frühen und späten Phase des SHTs. Auch wiesen MRC1-defiziente Mäuse ausgeprägtere strukturelle Hirnschäden fünf Tage nach Trauma auf. Zudem wiesen männliche MRC1-KO Mäuse zu diesem Zeitpunkt größere intrazerebrale Hämatomate auf. Unabhängig vom Geschlecht war die Anzahl periläsionaler CD68<sup>+</sup>-Makrophagen/-Mikroglia in MRC1-KO Mäusen 5 Tage nach SHT signifikant verringert, was auf eine reduzierte Aktivierung hindeutet. 30 Tage nach SHT waren keine signifikanten Unterschiede in der strukturellen Hirnschädigung zwischen MRC1-defizienten und Wildtypmäusen feststellbar, was auf einen zunächst aggravierten aber schließlich normtypischen Verlauf nach SHT hindeutet.

RNA-Sequenzierung gefolgt von Transkriptomanalysen von verletzten Gehirnen 5 Tage nach SHT zeigten starke geschlechtsspezifische Unterschiede. In der männlichen MRC1-KO

Gruppe waren mehr Gene reguliert, die mit Inflammation assoziiert sind, was auf eine stärkere Entzündungsreaktion auf das Trauma hindeutet. In den männlichen MRC1-WT Mäusen ergab eine Gene Set Enrichment Analysis (GSEA), Assoziationen mit verschiedenen Gensätzen, die auf eine ausgeprägtere Reaktion auf das SHT gegenüber MRC1-KO Mäusen hindeutet. In weiblichen Mäusen konnte kein klarer Genotyp-abhängiger Unterschied nach SHT festgestellt werden.

In Sham+MRC1-KO Mäusen resultierte die GSEA in einem überraschenden Ergebnis. Der MRC1-KO führte zu einem erhöhten inflammatorischen Status im Gehirn dieser Tiere. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass eine MRC1-Defizienz zu einer Dysbalance der Immunhomöostase im gesunden Gehirn führt, dass er aber auch regulatorische Funktionen nach einem induzierten SHT übernimmt und sein Verlust in starken geschlechtsspezifischen Unterschieden resultiert.

## 7 Abstract

Traumatic brain injury (TBI) is a complex condition characterized by high mortality and a multitude of long-term consequences. Despite intensive research, a lack of understanding of the secondary pathophysiological processes following TBI hinders both the development of universal therapies and the treatment by doctors or veterinarians. Inflammatory processes seem to play a central role in the pathophysiology of TBIs and many current experimental-therapeutic interventions aim to address this process in order to limit the extent of brain damage. Consequently, the following project aimed to elucidate the pathophysiological role of the Mannose Receptor C-Type I (MRC1). MRC1 is a marker for anti-inflammatory, polarized macrophages and microglia associated with the central nervous system. As a cell-surface receptor, MRC1 binds and internalizes pathogens and serum proteins. Alongside its proposed involvement in antigen presentation, MRC1 thereby contributes to the immunological surveillance of the brain.

Here, to investigate the relevance of MRC1 in the pathophysiology of TBI, transgene MRC1-deficient mice (MRC1-KO) and their wild-type-siblings (MRC1-WT) of both sexes underwent a standardized form of TBI via controlled cortical impact (CCI), after which short- and long-term effects were assessed. Sham-operated mice (Sham) were used in parallel as controls. The assays used included behavioral tests, histopathological and molecular biological assays, as well as RNA-sequencing followed by transcriptome analysis.

In contrast to their wild-type siblings, MRC1-KO mice exhibited poorer performance in the behavioral tests and a reduction in anxiety-like behavior in the early and late phases after TBI. Additionally, MRC1-KO mice displayed more pronounced structural brain damage five days following trauma. Furthermore, male MRC1-KO mice had larger intracerebral hematomas at this stage. Regardless of sex, a significant decrease in perilesional CD68<sup>+</sup> macrophages/microglia was observed in MRC1-KO mice five days after TBI, indicating a reduced activation. In contrast, no significant differences in structural brain damage was evident after 30 days, suggesting an eventually normal progression of TBI follows this initially aggravated state. RNA-sequencing followed by transcriptome analysis of injured brains five days after TBI revealed strong sex-specific differences. The male MRC1-KO group was enriched for genes associated with inflammation, indicating enhanced inflammation in response to the trauma. Gene set enrichment analysis (GSEA) for the male MRC1-wildtype (MRC1-WT) mice revealed various gene sets, indicating a more pronounced reaction to TBI in comparison to the MRC1-KO mice. In contrast, no clear genotype-dependent differences following TBI were evident for female mice.

GSEA of the Sham-operated MRC1-KO mice surprisingly revealed a heightened inflammatory status in the brains of these animals.

In summary, the deficiency of MRC1 leads to an imbalance in immune homeostasis in the healthy brain and affects the response to TBI in a highly sex-specific manner.

## 8 Anhang

### 8.1 Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1: Zusammenfassung verwendeter Geräte inklusive Hersteller.</b>	<b>34</b>
<b>Tabelle 2: Zusammenfassung verwendeter Verbrauchsmaterialien inklusive Hersteller.</b>	<b>35</b>
<b>Tabelle 3: Zusammenfassung angewandeter Lösungen inklusive Herstellung.</b>	<b>37</b>
<b>Tabelle 4: Zusammenfassung angewandter Medikamente inklusive Hersteller.</b>	<b>37</b>
<b>Tabelle 5: Zusammenfassung verwendeter Kits inklusive Hersteller.</b>	<b>38</b>
<b>Tabelle 6: Zusammenfassung der verwendeten PCR „Primer“.</b>	<b>38</b>
<b>Tabelle 7: Zusammenfassung der verwendeten primären Antikörper.</b>	<b>39</b>
<b>Tabelle 8: Zusammenfassung der verwendeten sekundären Antikörper.</b>	<b>40</b>
<b>Tabelle 9: Zusammenfassung der verwendeten Software.</b>	<b>40</b>
<b>Tabelle 10: Studiendesign Kurzzeitüberleben.</b>	<b>41</b>
<b>Tabelle 11: Studiendesign Langzeitüberleben.</b>	<b>42</b>
<b>Tabelle 12: Genotypinformationen.</b>	<b>44</b>
<b>Tabelle 13: Haltungparameter für Haltung von Labormäusen entsprechend den Empfehlungen der GV-Solas.</b>	<b>46</b>
<b>Tabelle 14: <i>Intraoperatives</i> Monitoring 5 und 30 d Überleben. Werte sind angegeben als Mittelwert <math>\pm</math> SEM.</b>	<b>53</b>
<b>Tabelle 15: Master-Mix für das SYBR Green qPCR Programm.</b>	<b>71</b>
<b>Tabelle 16: SYBR Green qPCR Programmschritte.</b>	<b>72</b>
<b>Tabelle 17: Körpergewicht von MRC1-Wildtyp/Knock-out CCI- und Sham-Mäusen. Werte sind angegeben als Mittelwert <math>\pm</math> SEM.</b>	<b>77</b>
<b>Tabelle 18: Übersicht über die untersuchten Gene und deren Charakterisierung. Informationen zur zellulären Zuteilung im Gehirn stammen aus dem Proteinatlas (<a href="http://www.proteinatlas.org">www.proteinatlas.org</a>).</b>	<b>91</b>
<b>Tabelle 19: Ergebnisse der RNA-Sequenzierung im Überblick.</b>	<b>97</b>
<b>Tabelle 20: Vergleich der signifikant regulierten „hallmarks“ der CCI+MRC1-WT- und Sham+MRC1-KO-Gruppe.</b>	<b>113</b>

## 8.2 Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1: Proteinstruktur des MRC1.</b>	1
<b>Abbildung 2: Lage der CAMs im Gehirn modifiziert nach Greter et al. [38].</b>	17
<b>Abbildung 3: Pathophysiologie des SHTs (BioRender.com).</b>	18
<b>Abbildung 4: Studiendesign.</b>	42
<b>Abbildung 5: Score-Sheet mit Abbruchkriterien gemäß TierSchVersV bzw. G19-1-027.</b>	49
<b>Abbildung 6: Durchführung des Controlled Cortical Impacts (BioRender.com).</b>	51
<b>Abbildung 7: Modified Neurological Severity Score – Beam-walk.</b>	55
<b>Abbildung 8: mNSS Score-Sheet, Beispiel 5 Tage Überleben.</b>	56
<b>Abbildung 9: Rotarod.</b>	58
<b>Abbildung 10: Schematische Darstellung eines EPM.</b>	59
<b>Abbildung 11: Schematische Darstellung von Bregma Leveln.</b>	61
<b>Abbildung 12: Schematische Darstellung der Vermessung des Läsionsvolumens bzw. verbliebenen gesunden Hirngewebes.</b>	65
<b>Abbildung 13: Schematische Darstellung der Messpunkte zur Bestimmung der Dicke der Körnerzellschicht des Gyrus dentatus.</b>	66
<b>Abbildung 14: Schematische Darstellung der Beurteilung der Hämatomgröße mit ImageJ.</b>	67
<b>Abbildung 15: Schematische Darstellung der Auswertung von immunhistochemischen Aufnahmen am Beispiel des Hippocampus.</b>	68
<b>Abbildung 16: Vereinfachte Darstellung der Auswertung der RNASequenzierung.</b>	73
<b>Abbildung 17: Ein SHT führt in der frühen Phase zu einer gesteigerten MRC1 Expression.</b>	76
<b>Abbildung 18: MRC1-Defizienz hat keine Auswirkungen auf die Körpergewichtsentwicklung der Mäuse nach SHT.</b>	78
<b>Abbildung 19: MRC1-KO beeinflusst das frühzeitige neurologische Ergebnis nach experimentellen SHT nur geringfügig bei weiblichen, nicht aber bei männlichen Mäusen.</b>	79
<b>Abbildung 20: MRC1-KO verursacht schlechtere neurologische Ergebnisse in der Spätphase nach Schädel-Hirn-Trauma.</b>	80
<b>Abbildung 21: MRC1-KO Mäuse zeigen vermehrten Bewegungsdrang wenige Tage nach SHT.</b>	81
<b>Abbildung 22: CCI+MRC1-KO-Mäuse zeigen weniger angstähnliches Verhalten in der frühen und späten Phase des SHTs.</b>	82
<b>Abbildung 23: MRC1-Defizienz verschlimmert strukturelle Hirnschäden in der Frühphase und tendenziell in der Spätphase nach SHT.</b>	84
<b>Abbildung 24: Der MRC1-KO führt in männlichen Mäusen in der frühen Phase des SHTs zu größeren Hämatomen.</b>	86

<b>Abbildung 25: MRC1-Defizienz resultiert in einer verminderten Anzahl und CD68-Expression periläsionaler Makrophagen/ Mikroglia unabhängig der Hämatomgröße in weiblichen Mäusen.</b>	88
<b>Abbildung 26: Nach einer traumatischen Hirnverletzung findet in der Frühphase keine Beeinflussung von Astrozyten oder Neuronen durch den MRC1-Knock-out statt.</b>	90
<b>Abbildung 27: Differenzielle Genexpression.</b>	93
<b>Abbildung 28: Korrelationsanalysen weisen auf einen Zusammenhang zwischen Verhaltensleistung und der Hirnschädigung der Mäuse in der frühen, als auch späten Phase der Pathogenese eines SHTs.</b>	96
<b>Abbildung 29: Der Knock-out des MRC1-Rezeptors führt zu signifikanten geschlechtsspezifischen Unterschieden in Bezug auf die regulierten Gene.</b>	99
<b>Abbildung 30: Genanreicherungsdiagramme von GSEA-Gensätzen in CCI+MRC1-KO- gegenüber CCI+MRC1-WT-Mäusen.</b>	101
<b>Abbildung 31: Heatmap der unterschiedlich exprimierten Gene in den CCI-Mäusen, die einen MRC1-KO bzw. -WT Genotyp haben.</b>	Fehler! Textmarke nicht definiert.
<b>Abbildung 32: Hochregulierte hallmarks CCI- vs. korrespondierende Sham-Gruppe.</b>	105
<b>Abbildung 33: Top 8 Genanreicherungsdiagramme für CCI+MRC1- WT bzw. CCI+MRC1-KO-Mäuse im Vergleich mit ihrer korrespondierenden Sham-Gruppe.</b>	106
<b>Abbildung 34: Geschlechtsabhängige Genanreicherungsdiagramme von GSEA-Gensätzen in CCI+MRC1-WT- gegenüber CCI+MRC1-KO-Mäusen.</b>	108
<b>Abbildung 35: Der MRC1 ist wichtig für die Immunhomöostase im Gehirn.</b>	112
<b>Abbildung 36: Genanreicherungsdiagramme von GSEA-Gensätzen in Sham+MRC1-KOI gegenüber Sham+MRC1-WT-Mäusen.</b>	115
<b>Abbildung 37: Heatmap der unterschiedlich exprimierten Gene in den Sham-Mäusen, die einen MRC1-KO bzw. -WT Genotyp haben.</b>	116

## 9 Literaturverzeichnis

1. Werner, C. and K. Engelhard, *Pathophysiology of traumatic brain injury*. Br J Anaesth, 2007. **99**(1): p. 4-9.
2. Jarrahi, A., et al., *Revisiting Traumatic Brain Injury: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Interventions*. Biomedicines, 2020. **8**(10).
3. Sande, A. and C. West, *Traumatic brain injury: a review of pathophysiology and management*. J Vet Emerg Crit Care (San Antonio), 2010. **20**(2): p. 177-90.
4. Kabadi, S.V. and A.I. Faden, *Neuroprotective strategies for traumatic brain injury: improving clinical translation*. Int J Mol Sci, 2014. **15**(1): p. 1216-36.
5. Angelova, P., et al., *Contemporary insight into diffuse axonal injury*. Folia Med (Plovdiv), 2021. **63**(2): p. 163-170.
6. Pellot, J.E. and O. De Jesus, *Cerebral Contusion*, in *StatPearls*. 2023, StatPearls Publishing

Copyright © 2023, StatPearls Publishing LLC.: Treasure Island (FL) ineligible companies. Disclosure: Orlando De Jesus declares no relevant financial relationships with ineligible companies.

7. Aromatario, M., et al., *Traumatic Epidural and Subdural Hematoma: Epidemiology, Outcome, and Dating*. Medicina (Kaunas), 2021. **57**(2).
8. Griswold, D.P., L. Fernandez, and A.M. Rubiano, *Traumatic Subarachnoid Hemorrhage: A Scoping Review*. J Neurotrauma, 2022. **39**(1-2): p. 35-48.
9. Galgano, M., et al., *Traumatic Brain Injury: Current Treatment Strategies and Future Endeavors*. Cell Transplant, 2017. **26**(7): p. 1118-1130.
10. Al-Mufti, F. and S.A. Mayer, *Neurocritical Care of Acute Subdural Hemorrhage*. Neurosurg Clin N Am, 2017. **28**(2): p. 267-278.
11. Lozano, D., et al., *Neuroinflammatory responses to traumatic brain injury: etiology, clinical consequences, and therapeutic opportunities*. Neuropsychiatr Dis Treat, 2015. **11**: p. 97-106.
12. Bramlett, H.M. and W.D. Dietrich, *Progressive damage after brain and spinal cord injury: pathomechanisms and treatment strategies*. Prog Brain Res, 2007. **161**: p. 125-41.
13. Thapa, K., et al., *Traumatic Brain Injury: Mechanistic Insight on Pathophysiology and Potential Therapeutic Targets*. J Mol Neurosci, 2021. **71**(9): p. 1725-1742.
14. Dong, A., et al., *Superoxide dismutase 1 protects retinal cells from oxidative damage*. J Cell Physiol, 2006. **208**(3): p. 516-26.
15. Pisoschi, A.M. and A. Pop, *The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review*. Eur J Med Chem, 2015. **97**: p. 55-74.
16. Giza, C.C. and D.A. Hovda, *The new neurometabolic cascade of concussion*. Neurosurgery, 2014. **75 Suppl 4**(0 4): p. S24-33.
17. Barkhoudarian, G., D.A. Hovda, and C.C. Giza, *The Molecular Pathophysiology of Concussive Brain Injury - an Update*. Phys Med Rehabil Clin N Am, 2016. **27**(2): p. 373-93.
18. Mokri, B., *The Monro-Kellie hypothesis: applications in CSF volume depletion*. Neurology, 2001. **56**(12): p. 1746-8.
19. Correale, J. and A. Villa, *The neuroprotective role of inflammation in nervous system injuries*. J Neurol, 2004. **251**(11): p. 1304-16.
20. Simon, D.W., et al., *The far-reaching scope of neuroinflammation after traumatic brain injury*. Nat Rev Neurol, 2017. **13**(3): p. 171-191.
21. Yu, F., et al., *Posttrauma cotreatment with lithium and valproate: reduction of lesion volume, attenuation of blood-brain barrier disruption, and improvement in motor coordination in mice with traumatic brain injury*. J Neurosurg, 2013. **119**(3): p. 766-73.
22. Ransohoff, R.M., *The chemokine system in neuroinflammation: an update*. J Infect Dis, 2002. **186 Suppl 2**: p. S152-6.
23. Bellander, B.M., et al., *Complement activation in the human brain after traumatic head injury*. J Neurotrauma, 2001. **18**(12): p. 1295-311.

24. Ransohoff, R.M., *A polarizing question: do M1 and M2 microglia exist?* Nat Neurosci, 2016. **19**(8): p. 987-91.
25. Jassam, Y.N., et al., *Neuroimmunology of Traumatic Brain Injury: Time for a Paradigm Shift.* Neuron, 2017. **95**(6): p. 1246-1265.
26. Tang, Y. and W. Le, *Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases.* Mol Neurobiol, 2016. **53**(2): p. 1181-1194.
27. Glass, C.K., et al., *Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration.* Cell, 2010. **140**(6): p. 918-34.
28. Hernandez-Ontiveros, D.G., et al., *Microglia activation as a biomarker for traumatic brain injury.* Front Neurol, 2013. **4**: p. 30.
29. Cherry, J.D., J.A. Olschowka, and M.K. O'Banion, *Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the bad, and the inflamed.* J Neuroinflammation, 2014. **11**: p. 98.
30. He, Y., et al., *IL-4 Switches Microglia/macrophage M1/M2 Polarization and Alleviates Neurological Damage by Modulating the JAK1/STAT6 Pathway Following ICH.* Neuroscience, 2020. **437**: p. 161-171.
31. Loane, D.J. and A. Kumar, *Microglia in the TBI brain: The good, the bad, and the dysregulated.* Exp Neurol, 2016. **275 Pt 3**(0 3): p. 316-327.
32. Jurga, A.M., M. Paleczna, and K.Z. Kuter, *Overview of General and Discriminating Markers of Differential Microglia Phenotypes.* Front Cell Neurosci, 2020. **14**: p. 198.
33. Wu, L.Y., et al., *Scavenger receptor on astrocytes and its relationship with neuroinflammation.* Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao, 2014. **36**(3): p. 330-5.
34. Zhao, Z., et al., *Overexpression of glial cell line-derived neurotrophic factor in the CNS rescues motoneurons from programmed cell death and promotes their long-term survival following axotomy.* Exp Neurol, 2004. **190**(2): p. 356-72.
35. Hennes, M., et al., *Astrocytes shape the plastic response of adult cortical neurons to vision loss.* Glia, 2020. **68**(10): p. 2102-2118.
36. Kwon, H.S. and S.H. Koh, *Neuroinflammation in neurodegenerative disorders: the roles of microglia and astrocytes.* Transl Neurodegener, 2020. **9**(1): p. 42.
37. Fan, Y.Y. and J. Huo, *A1/A2 astrocytes in central nervous system injuries and diseases: Angels or devils?* Neurochem Int, 2021. **148**: p. 105080.
38. Dalmau Gasull, A., et al., *The niche matters: origin, function and fate of CNS-associated macrophages during health and disease.* Acta Neuropathol, 2024. **147**(1): p. 37.
39. Sun, R. and H. Jiang, *Border-associated macrophages in the central nervous system.* J Neuroinflammation, 2024. **21**(1): p. 67.
40. Greter, M., *Family ties among CNS macrophages.* Nat Immunol, 2016. **17**(7): p. 742-3.
41. Swanson, M.E.V., et al., *Quantitative immunohistochemical analysis of myeloid cell marker expression in human cortex captures microglia heterogeneity with anatomical context.* Sci Rep, 2020. **10**(1): p. 11693.
42. Fabriek, B.O., et al., *CD163-positive perivascular macrophages in the human CNS express molecules for antigen recognition and presentation.* Glia, 2005. **51**(4): p. 297-305.
43. Taketomi, T. and F. Tsuruta, *Towards an Understanding of Microglia and Border-Associated Macrophages.* Biology (Basel), 2023. **12**(8).
44. Kierdorf, K., et al., *Macrophages at CNS interfaces: ontogeny and function in health and disease.* Nat Rev Neurosci, 2019. **20**(9): p. 547-562.
45. Amann, L., T. Masuda, and M. Prinz, *Mechanisms of myeloid cell entry to the healthy and diseased central nervous system.* Nat Immunol, 2023. **24**(3): p. 393-407.
46. Lynch, D.G., R.K. Narayan, and C. Li, *Multi-Mechanistic Approaches to the Treatment of Traumatic Brain Injury: A Review.* J Clin Med, 2023. **12**(6).
47. Corps, K.N., T.L. Roth, and D.B. McGavern, *Inflammation and neuroprotection in traumatic brain injury.* JAMA Neurol, 2015. **72**(3): p. 355-62.

48. Dewan, M.C., et al., *Estimating the global incidence of traumatic brain injury*. J Neurosurg, 2018. **130**(4): p. 1080-1097.
49. Collaborators, G.N., *Global, regional, and national burden of traumatic brain injury and spinal cord injury, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016*. Lancet Neurol, 2019. **18**(1): p. 56-87.
50. Najem, D., et al., *Traumatic brain injury: classification, models, and markers*. Biochem Cell Biol, 2018. **96**(4): p. 391-406.
51. Gao, G., et al., *Clinical characteristics and outcomes in patients with traumatic brain injury in China: a prospective, multicentre, longitudinal, observational study*. Lancet Neurol, 2020. **19**(8): p. 670-677.
52. Rickels, E., K. von Wild, and P. Wenzlaff, *Head injury in Germany: A population-based prospective study on epidemiology, causes, treatment and outcome of all degrees of head-injury severity in two distinct areas*. Brain Inj, 2010. **24**(12): p. 1491-504.
53. Roozenbeek, B., A.I. Maas, and D.K. Menon, *Changing patterns in the epidemiology of traumatic brain injury*. Nat Rev Neurol, 2013. **9**(4): p. 231-6.
54. Bodanapally, U.K., et al., *Imaging of Traumatic Brain Injury*. Radiol Clin North Am, 2015. **53**(4): p. 695-715, viii.
55. Imhoff, S., et al., *Driving assessment and rehabilitation using a driving simulator in individuals with traumatic brain injury: A scoping review*. NeuroRehabilitation, 2016. **39**(2): p. 239-51.
56. Hoffmann, F., et al., *Comparison of the AVPU Scale and the Pediatric GCS in Prehospital Setting*. Prehosp Emerg Care, 2016. **20**(4): p. 493-8.
57. Johansson, B., P. Berglund, and L. Rönnbäck, *Mental fatigue and impaired information processing after mild and moderate traumatic brain injury*. Brain Inj, 2009. **23**(13-14): p. 1027-40.
58. Makley, M.J., et al., *Prevalence of sleep disturbance in closed head injury patients in a rehabilitation unit*. Neurorehabil Neural Repair, 2008. **22**(4): p. 341-7.
59. Ling, H., J. Hardy, and H. Zetterberg, *Neurological consequences of traumatic brain injuries in sports*. Mol Cell Neurosci, 2015. **66**(Pt B): p. 114-22.
60. Wilson, L., et al., *The chronic and evolving neurological consequences of traumatic brain injury*. Lancet Neurol, 2017. **16**(10): p. 813-825.
61. Kolata, R.J., *Trauma in dogs and cats: an overview*. Vet Clin North Am Small Anim Pract, 1980. **10**(3): p. 515-22.
62. Syring, R.S., C.M. Otto, and K.J. Drobatz, *Hyperglycemia in dogs and cats with head trauma: 122 cases (1997-1999)*. J Am Vet Med Assoc, 2001. **218**(7): p. 1124-9.
63. Feige, K., et al., *Traumatic injury to the central nervous system in horses: occurrence, diagnosis and outcome*. Equine Veterinary Education, 2000. **12**(4): p. 220-224.
64. Caine, A., et al., *MRI in 30 cats with traumatic brain injury*. J Feline Med Surg, 2019. **21**(12): p. 1111-1119.
65. Yanai, H., et al., *Results of magnetic resonance imaging performed within 48 hours after head trauma in dogs and association with outcome: 18 cases (2007-2012)*. J Am Vet Med Assoc, 2015. **246**(11): p. 1222-9.
66. Finnie, J.W., *Pathology of traumatic brain injury*. Vet Res Commun, 2014. **38**(4): p. 297-305.
67. Chai, O., et al., *Serum Concentrations of Neuron-Specific Enolase in Dogs Following Traumatic Brain Injury*. J Comp Pathol, 2020. **179**: p. 45-51.
68. Shores, A. and R. Kirk, *Current Veterinary Therapy X*. 1983, WB Saunders.
69. Platt, S.R., S.T. Radaelli, and J.J. McDonnell, *The prognostic value of the modified Glasgow Coma Scale in head trauma in dogs*. J Vet Intern Med, 2001. **15**(6): p. 581-4.
70. Steinmetz, S., A. Tipold, and W. Löscher, *Epilepsy after head injury in dogs: a natural model of posttraumatic epilepsy*. Epilepsia, 2013. **54**(4): p. 580-8.
71. Grohmann, K.S., et al., *Prevalence of seizures in cats after head trauma*. J Am Vet Med Assoc, 2012. **241**(11): p. 1467-70.

72. Friedenber, S.G., et al., *Seizures following head trauma in dogs: 259 cases (1999-2009)*. J Am Vet Med Assoc, 2012. **241**(11): p. 1479-83.
73. Dewey, C.W., *Emergency management of the head trauma patient. Principles and practice*. Vet Clin North Am Small Anim Pract, 2000. **30**(1): p. 207-25, vii-viii.
74. Klinik für Kleintiere, S.t.H.H., *Neurologie (Kleintierklinik)*. 2018.
75. CF:, S., *Notfalltherapie in der Kleintierpraxis*. 2009: Schattenauer.
76. Cameron, S., J.G. Weltman, and D.J. Fletcher, *The prognostic value of admission point-of-care testing and modified Glasgow Coma Scale score in dogs and cats with traumatic brain injuries (2007-2010): 212 cases*. J Vet Emerg Crit Care (San Antonio), 2022. **32**(1): p. 75-82.
77. Charalambous, M., D. Brodbelt, and H.A. Volk, *Treatment in canine epilepsy--a systematic review*. BMC Vet Res, 2014. **10**: p. 257.
78. Hayes, G.M., *Severe seizures associated with traumatic brain injury managed by controlled hypothermia, pharmacologic coma, and mechanical ventilation in a dog*. J Vet Emerg Crit Care (San Antonio), 2009. **19**(6): p. 629-34.
79. DiFazio, J. and D.J. Fletcher, *Updates in the management of the small animal patient with neurologic trauma*. Vet Clin North Am Small Anim Pract, 2013. **43**(4): p. 915-40.
80. Xiong, Y., A. Mahmood, and M. Chopp, *Animal models of traumatic brain injury*. Nat Rev Neurosci, 2013. **14**(2): p. 128-42.
81. *Tierarten und ihr Einsatz in der Forschung*. 2021; Available from: <https://www.tierversuche-verstehen.de/tierarten-und-ihr-einsatz-in-der-forschung/>.
82. Schlüter, K.D., *Tierversuche: Übertragbarkeit auf den Menschen und ihre Durchführbarkeit*. Zeitschrift für Herz-,Thorax- und Gefäßchirurgie, 2018. **33**(1): p. 67-71.
83. Morganti-Kossmann, M.C., E. Yan, and N. Bye, *Animal models of traumatic brain injury: is there an optimal model to reproduce human brain injury in the laboratory?* Injury, 2010. **41 Suppl 1**: p. S10-3.
84. Moreno-Jiménez, E.P., et al., *Evidences for Adult Hippocampal Neurogenesis in Humans*. J Neurosci, 2021. **41**(12): p. 2541-2553.
85. Cernak, I., *Animal models of head trauma*. NeuroRx, 2005. **2**(3): p. 410-22.
86. Anderson, T.E., *A controlled pneumatic technique for experimental spinal cord contusion*. J Neurosci Methods, 1982. **6**(4): p. 327-33.
87. Menzel, L., et al., *Progranulin protects against exaggerated axonal injury and astrogliosis following traumatic brain injury*. Glia, 2017. **65**(2): p. 278-292.
88. Siebold, L., A. Obenaus, and R. Goyal, *Criteria to define mild, moderate, and severe traumatic brain injury in the mouse controlled cortical impact model*. Exp Neurol, 2018. **310**: p. 48-57.
89. Osier, N. and C.E. Dixon, *Mini Review of Controlled Cortical Impact: A Well-Suited Device for Concussion Research*. Brain Sci, 2017. **7**(7).
90. Osier, N.D. and C.E. Dixon, *The Controlled Cortical Impact Model: Applications, Considerations for Researchers, and Future Directions*. Front Neurol, 2016. **7**: p. 134.
91. Dean, D.D., J.A. Frank, and L.C. Turtzo, *Controlled Cortical Impact in the Rat*. Curr Protoc Neurosci, 2017. **81**: p. 9.62.1-9.62.12.
92. Vonder Haar, C., et al., *Successive bilateral frontal controlled cortical impact injuries show behavioral savings*. Behav Brain Res, 2013. **240**: p. 153-9.
93. Xie, B.S., et al., *Inhibition of ferroptosis attenuates tissue damage and improves long-term outcomes after traumatic brain injury in mice*. CNS Neurosci Ther, 2019. **25**(4): p. 465-475.
94. Wang, Y., et al., *Early posttraumatic CSF1R inhibition via PLX3397 leads to time- and sex-dependent effects on inflammation and neuronal maintenance after traumatic brain injury in mice*. Brain Behav Immun, 2022. **106**: p. 49-66.
95. De Kegel, D., et al., *Investigation of tissue level tolerance for cerebral contusion in a controlled cortical impact porcine model*. Traffic Inj Prev, 2021. **22**(8): p. 616-622.

96. Costine, B.A., et al., *Neuron-specific enolase, but not S100B or myelin basic protein, increases in peripheral blood corresponding to lesion volume after cortical impact in piglets.* J Neurotrauma, 2012. **29**(17): p. 2689-95.
97. Lighthall, J.W., *Controlled cortical impact: a new experimental brain injury model.* J Neurotrauma, 1988. **5**(1): p. 1-15.
98. King, C., et al., *Brain temperature profiles during epidural cooling with the ChillerPad in a monkey model of traumatic brain injury.* J Neurotrauma, 2010. **27**(10): p. 1895-903.
99. Pöttker, B., et al., *Traumatic brain injury causes long-term behavioral changes related to region-specific increases of cerebral blood flow.* Brain Struct Funct, 2017. **222**(9): p. 4005-4021.
100. Hummel, R., et al., *Administration of all-trans retinoic acid after experimental traumatic brain injury is brain protective.* Br J Pharmacol, 2020. **177**(22): p. 5208-5223.
101. Ritter, K., et al., *Pre-traumatic antibiotic-induced microbial depletion reduces neuroinflammation in acute murine traumatic brain injury.* Neuropharmacology, 2023. **237**: p. 109648.
102. Appel, D., et al., *Pharmacologic Inhibition of ADAM10 Attenuates Brain Tissue Loss, Axonal Injury and Pro-inflammatory Gene Expression Following Traumatic Brain Injury in Mice.* Front Cell Dev Biol, 2021. **9**: p. 661462.
103. Ma, X., et al., *Animal Models of Traumatic Brain Injury and Assessment of Injury Severity.* Mol Neurobiol, 2019. **56**(8): p. 5332-5345.
104. Nickel, S.S., *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere, Band IV Nervensystem, Sinnesorgane, Endokrine Drüsen.* 4. Auflage. 2003: Parey Verlag, Stuttgart.
105. Liebich, K., *Anatomie der Haussäugetiere.* 3. Auflage. 2005: Schattener GmbH, Stuttgart.
106. Wissdorf, H.G.H.D., *Praxisorientierte Anatomie und Propädeutik des Pferdes.* 3. Auflage. 2010: M. & H. Schaper.
107. Salomon, F.H.G., U., *Anatomie für die Tiermedizin.* 2. Auflage. 2008: Enke Verlag, Stuttgart.
108. Knierim, J.J., *The hippocampus.* Curr Biol, 2015. **25**(23): p. R1116-21.
109. Culig, L., X. Chu, and V.A. Bohr, *Neurogenesis in aging and age-related neurodegenerative diseases.* Ageing Res Rev, 2022. **78**: p. 101636.
110. Halliday, G.M., *Thalamic changes in Parkinson's disease.* Parkinsonism Relat Disord, 2009. **15** **Suppl 3**: p. S152-5.
111. Alder, J., et al., *Lateral fluid percussion: model of traumatic brain injury in mice.* J Vis Exp, 2011(54).
112. Carbonell, W.S., et al., *Adaptation of the fluid percussion injury model to the mouse.* J Neurotrauma, 1998. **15**(3): p. 217-29.
113. Lifshitz, J., et al., *Clinical relevance of midline fluid percussion brain injury: Acute deficits, chronic morbidities and the utility of biomarkers.* Brain Inj, 2016. **30**(11): p. 1293-1301.
114. Lippert-Grüner, M., et al., *Early rehabilitation model shows positive effects on neural degeneration and recovery from neuromotor deficits following traumatic brain injury.* Physiol Res, 2007. **56**(3): p. 359-368.
115. Raton, B., *Brain Neurotrauma Molecular, Neuropsychological, and Rehabilitation Aspects.* 2015: Frontiers in Neuroengineering.
116. O'Connor, W.T., A. Smyth, and M.D. Gilchrist, *Animal models of traumatic brain injury: a critical evaluation.* Pharmacol Ther, 2011. **130**(2): p. 106-13.
117. Kaur, C., et al., *The response of neurons and microglia to blast injury in the rat brain.* Neuropathol Appl Neurobiol, 1995. **21**(5): p. 369-77.
118. de Lanerolle, N.C., et al., *Characteristics of an explosive blast-induced brain injury in an experimental model.* J Neuropathol Exp Neurol, 2011. **70**(11): p. 1046-57.
119. Lu, J., et al., *Effect of blast exposure on the brain structure and cognition in Macaca fascicularis.* J Neurotrauma, 2012. **29**(7): p. 1434-54.
120. Elder, G.A. and A. Cristian, *Blast-related mild traumatic brain injury: mechanisms of injury and impact on clinical care.* Mt Sinai J Med, 2009. **76**(2): p. 111-8.

121. Dai, J.X., et al., *Large animal models of traumatic brain injury*. Int J Neurosci, 2018. **128**(3): p. 243-254.
122. Finnie, J., *Animal models of traumatic brain injury: a review*. Aust Vet J, 2001. **79**(9): p. 628-33.
123. Finnie, J.W., *Comparative approach to understanding traumatic injury in the immature, postnatal brain of domestic animals*. Aust Vet J, 2012. **90**(8): p. 301-7.
124. Donat, C.K., et al., *Early increase of cannabinoid receptor density after experimental traumatic brain injury in the newborn piglet*. Acta Neurobiol Exp (Wars), 2014. **74**(2): p. 197-210.
125. Finnie, J.W., et al., *Evaluation of brain damage resulting from penetrating and non-penetrating captive bolt stunning using lambs*. Aust Vet J, 2000. **78**(11): p. 775-8.
126. Finnie, J.W., et al., *Brain damage in sheep from penetrating captive bolt stunning*. Aust Vet J, 2002. **80**(1-2): p. 67-9.
127. Finnie, I.W., *Traumatic head injury in ruminant livestock*. Aust Vet J, 1997. **75**(3): p. 204-8.
128. Hultgren, J., et al., *Animal Welfare and Food Safety When Slaughtering Cattle Using the Gunshot Method*. Animals (Basel), 2022. **12**(4).
129. UNION, D.R.D.E. VERORDNUNG (EG) Nr. 1099/2009 DES RATES vom 24. September 2009 über den Schutz von Tieren zum Zeitpunkt der Tötung 2009; Available from: <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:303:0001:0030:DE:PDF>.
130. Durkin, M.S., et al., *The epidemiology of urban pediatric neurological trauma: evaluation of, and implications for, injury prevention programs*. Neurosurgery, 1998. **42**(2): p. 300-10.
131. Nell, V. and D.S. Brown, *Epidemiology of traumatic brain injury in Johannesburg--II. Morbidity, mortality and etiology*. Soc Sci Med, 1991. **33**(3): p. 289-96.
132. Gupte, R., et al., *Sex Differences in Traumatic Brain Injury: What We Know and What We Should Know*. J Neurotrauma, 2019. **36**(22): p. 3063-3091.
133. Cuthbert, J.P., et al., *Epidemiology of adults receiving acute inpatient rehabilitation for a primary diagnosis of traumatic brain injury in the United States*. J Head Trauma Rehabil, 2015. **30**(2): p. 122-35.
134. Coronado, V.G., et al., *Surveillance for traumatic brain injury-related deaths--United States, 1997-2007*. MMWR Surveill Summ, 2011. **60**(5): p. 1-32.
135. Eom, K.S., et al., *Gender differences in adult traumatic brain injury according to the Glasgow coma scale: A multicenter descriptive study*. Chin J Traumatol, 2021. **24**(6): p. 333-343.
136. Mollayeva, T., S. Mollayeva, and A. Colantonio, *Traumatic brain injury: sex, gender and intersecting vulnerabilities*. Nat Rev Neurol, 2018. **14**(12): p. 711-722.
137. Späni, C.B., D.J. Braun, and L.J. Van Eldik, *Sex-related responses after traumatic brain injury: Considerations for preclinical modeling*. Front Neuroendocrinol, 2018. **50**: p. 52-66.
138. Berry, C., et al., *The effect of gender on patients with moderate to severe head injuries*. J Trauma, 2009. **67**(5): p. 950-3.
139. Sarkaki, A.R., et al., *Time- and dose-dependent neuroprotective effects of sex steroid hormones on inflammatory cytokines after a traumatic brain injury*. J Neurotrauma, 2013. **30**(1): p. 47-54.
140. Saban, K.L., et al., *Sex differences in perceived life satisfaction and functional status one year after severe traumatic brain injury*. J Womens Health (Larchmt), 2011. **20**(2): p. 179-86.
141. Kraus, J.F., C. Peek-Asa, and D. McArthur, *The independent effect of gender on outcomes following traumatic brain injury: a preliminary investigation*. Neurosurg Focus, 2000. **8**(1): p. e5.
142. Kirkness, C.J., et al., *Is there a sex difference in the course following traumatic brain injury?* Biol Res Nurs, 2004. **5**(4): p. 299-310.
143. Baker, J.G., et al., *Gender Differences in Recovery From Sports-Related Concussion in Adolescents*. Clin Pediatr (Phila), 2016. **55**(8): p. 771-5.
144. Berz, K., et al., *Sex-specific differences in the severity of symptoms and recovery rate following sports-related concussion in young athletes*. Phys Sportsmed, 2013. **41**(2): p. 58-63.

145. Mathias, J.L. and P. Wheaton, *Contribution of brain or biological reserve and cognitive or neural reserve to outcome after TBI: A meta-analysis (prior to 2015)*. *Neurosci Biobehav Rev*, 2015. **55**: p. 573-93.
146. Hehar, H., et al., *Impulsivity and Concussion in Juvenile Rats: Examining Molecular and Structural Aspects of the Frontostriatal Pathway*. *PLoS One*, 2015. **10**(10): p. e0139842.
147. Mychasiuk, R., et al., *Mean girls: sex differences in the effects of mild traumatic brain injury on the social dynamics of juvenile rat play behaviour*. *Behav Brain Res*, 2014. **259**: p. 284-91.
148. Mychasiuk, R., et al., *The direction of the acceleration and rotational forces associated with mild traumatic brain injury in rodents effect behavioural and molecular outcomes*. *J Neurosci Methods*, 2016. **257**: p. 168-78.
149. O'Connor, C.A., I. Cernak, and R. Vink, *Interaction between anesthesia, gender, and functional outcome task following diffuse traumatic brain injury in rats*. *J Neurotrauma*, 2003. **20**(6): p. 533-41.
150. Xiong, Y., et al., *Role of gender in outcome after traumatic brain injury and therapeutic effect of erythropoietin in mice*. *Brain Res*, 2007. **1185**: p. 301-12.
151. Russell, K.L., et al., *Sensorimotor behavioral tests for use in a juvenile rat model of traumatic brain injury: assessment of sex differences*. *J Neurosci Methods*, 2011. **199**(2): p. 214-22.
152. Hanlon, L.A., R. Raghupathi, and J.W. Huh, *Differential effects of minocycline on microglial activation and neurodegeneration following closed head injury in the neonate rat*. *Exp Neurol*, 2017. **290**: p. 1-14.
153. Bobotis, B.C., et al., *Sex differences of microglia in the healthy brain from embryonic development to adulthood and across lifestyle influences*. *Brain Res Bull*, 2023. **202**: p. 110752.
154. Kovats, S., *Estrogen receptors regulate innate immune cells and signaling pathways*. *Cell Immunol*, 2015. **294**(2): p. 63-9.
155. Han, J., et al., *Uncovering sex differences of rodent microglia*. *J Neuroinflammation*, 2021. **18**(1): p. 74.
156. Guneykaya, D., et al., *Transcriptional and Translational Differences of Microglia from Male and Female Brains*. *Cell Rep*, 2018. **24**(10): p. 2773-2783.e6.
157. Sharon, A., H. Erez, and M.E. Spira, *Significant Sex Differences in the Efficacy of the CSF1R Inhibitor-PLX5622 on Rat Brain Microglia Elimination*. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2022. **15**(5).
158. Schwarz, J.M., P.W. Sholar, and S.D. Bilbo, *Sex differences in microglial colonization of the developing rat brain*. *J Neurochem*, 2012. **120**(6): p. 948-63.
159. Mass, E., et al., *Tissue-specific macrophages: how they develop and choreograph tissue biology*. *Nat Rev Immunol*, 2023. **23**(9): p. 563-579.
160. Muntjewerff, E.M., L.D. Meesters, and G. van den Bogaart, *Antigen Cross-Presentation by Macrophages*. *Front Immunol*, 2020. **11**: p. 1276.
161. Fu, R., et al., *Phagocytosis of microglia in the central nervous system diseases*. *Mol Neurobiol*, 2014. **49**(3): p. 1422-34.
162. Kourtzelis, I., G. Hajishengallis, and T. Chavakis, *Phagocytosis of Apoptotic Cells in Resolution of Inflammation*. *Front Immunol*, 2020. **11**: p. 553.
163. Perez-Polo, J.R., et al., *Inflammatory cytokine receptor blockade in a rodent model of mild traumatic brain injury*. *J Neurosci Res*, 2016. **94**(1): p. 27-38.
164. Rowe, R.K., et al., *Novel TNF receptor-1 inhibitors identified as potential therapeutic candidates for traumatic brain injury*. *J Neuroinflammation*, 2018. **15**(1): p. 154.
165. Radpour, M., et al., *Activating toll-like receptor 4 after traumatic brain injury inhibits neuroinflammation and the accelerated development of seizures in rats*. *Exp Neurol*, 2022. **357**: p. 114202.
166. Lindblad, C., E. Rostami, and A. Helmy, *Interleukin-1 Receptor Antagonist as Therapy for Traumatic Brain Injury*. *Neurotherapeutics*, 2023. **20**(6): p. 1508-1528.
167. Niehaus, J.K., et al., *Spinal macrophages resolve nociceptive hypersensitivity after peripheral injury*. *Neuron*, 2021. **109**(8): p. 1274-1282.e6.

168. von Ehr, A., et al., *Inhibition of Microglial TGF $\beta$  Signaling Increases Expression of Mrc1*. Front Cell Neurosci, 2020. **14**: p. 66.
169. van der Zande, H.J.P., et al., *The Mannose Receptor: From Endocytic Receptor and Biomarker to Regulator of (Meta)Inflammation*. Front Immunol, 2021. **12**: p. 765034.
170. Nielsen, M.C., et al., *Macrophage Activation Markers, CD163 and CD206, in Acute-on-Chronic Liver Failure*. Cells, 2020. **9**(5).
171. Martínez-Pomares, L., *The mannose receptor*. J Leukoc Biol, 2012. **92**(6): p. 1177-86.
172. Chakraborty, R., P. Chakraborty, and M.K. Basu, *Macrophage mannosyl fucosyl receptor: its role in invasion of virulent and avirulent L. donovani promastigotes*. Biosci Rep, 1998. **18**(3): p. 129-42.
173. Miller, J.L., et al., *The mannose receptor mediates dengue virus infection of macrophages*. PLoS Pathog, 2008. **4**(2): p. e17.
174. Martínez-Pomares, L., et al., *A functional soluble form of the murine mannose receptor is produced by macrophages in vitro and is present in mouse serum*. J Biol Chem, 1998. **273**(36): p. 23376-80.
175. Tailleux, L., et al., *How is the phagocyte lectin keyboard played? Master class lesson by Mycobacterium tuberculosis*. Trends Microbiol, 2003. **11**(6): p. 259-63.
176. Jordão, M.J.C., et al., *Single-cell profiling identifies myeloid cell subsets with distinct fates during neuroinflammation*. Science, 2019. **363**(6425).
177. Prinz, M., D. Erny, and N. Hagemeyer, *Ontogeny and homeostasis of CNS myeloid cells*. Nat Immunol, 2017. **18**(4): p. 385-392.
178. Gazi, U. and L. Martínez-Pomares, *Influence of the mannose receptor in host immune responses*. Immunobiology, 2009. **214**(7): p. 554-61.
179. Burgdorf, S., et al., *Distinct pathways of antigen uptake and intracellular routing in CD4 and CD8 T cell activation*. Science, 2007. **316**(5824): p. 612-6.
180. Kang, P.B., et al., *The human macrophage mannose receptor directs Mycobacterium tuberculosis lipoarabinomannan-mediated phagosome biogenesis*. J Exp Med, 2005. **202**(7): p. 987-99.
181. Swain, S.D., et al., *Absence of the macrophage mannose receptor in mice does not increase susceptibility to Pneumocystis carinii infection in vivo*. Infect Immun, 2003. **71**(11): p. 6213-21.
182. Tachado, S.D., et al., *Pneumocystis-mediated IL-8 release by macrophages requires coexpression of mannose receptors and TLR2*. J Leukoc Biol, 2007. **81**(1): p. 205-11.
183. Burudi, E.M. and A. Régnier-Vigouroux, *Regional and cellular expression of the mannose receptor in the post-natal developing mouse brain*. Cell Tissue Res, 2001. **303**(3): p. 307-17.
184. Zipser, B. and R.N. Cole, *A mannose-specific recognition mediates the defasciculation of axons in the leech CNS*. J Neurosci, 1991. **11**(11): p. 3471-80.
185. Horstkorte, R., et al., *The fourth immunoglobulin-like domain of NCAM contains a carbohydrate recognition domain for oligomannosidic glycans implicated in association with L1 and neurite outgrowth*. J Cell Biol, 1993. **121**(6): p. 1409-21.
186. Linehan, S.A., et al., *Mannose receptor and its putative ligands in normal murine lymphoid and nonlymphoid organs: In situ expression of mannose receptor by selected macrophages, endothelial cells, perivascular microglia, and mesangial cells, but not dendritic cells*. J Exp Med, 1999. **189**(12): p. 1961-72.
187. Shibata, Y., W.J. Metzger, and Q.N. Myrvik, *Chitin particle-induced cell-mediated immunity is inhibited by soluble mannan: mannose receptor-mediated phagocytosis initiates IL-12 production*. J Immunol, 1997. **159**(5): p. 2462-7.
188. Milone, M.C. and P. Fitzgerald-Bocarsly, *The mannose receptor mediates induction of IFN- $\alpha$  in peripheral blood dendritic cells by enveloped RNA and DNA viruses*. J Immunol, 1998. **161**(5): p. 2391-9.

189. Astarie-Dequeker, C., et al., *The mannose receptor mediates uptake of pathogenic and nonpathogenic mycobacteria and bypasses bactericidal responses in human macrophages*. *Infect Immun*, 1999. **67**(2): p. 469-77.
190. Régnier-Vigouroux, A., *The mannose receptor in the brain*. *Int Rev Cytol*, 2003. **226**: p. 321-42.
191. Koide, N., T. Muramatsu, and A. Kobata, *Studies on mannosyl glycopeptides from normal and transformed cells*. *J Biochem*, 1979. **85**(1): p. 149-55.
192. Apostolopoulos, V., et al., *Ex vivo targeting of the macrophage mannose receptor generates anti-tumor CTL responses*. *Vaccine*, 2000. **18**(27): p. 3174-84.
193. Sivaparvathi, M., et al., *Expression of cathepsin D during the progression of human gliomas*. *Neurosci Lett*, 1996. **208**(3): p. 171-4.
194. Sandström, M., et al., *Expression of the proteolytic factors, tPA and uPA, PAI-1 and VEGF during malignant glioma progression*. *Int J Dev Neurosci*, 1999. **17**(5-6): p. 473-81.
195. Rooprai, H.K. and D. McCormick, *Proteases and their inhibitors in human brain tumours: a review*. *Anticancer Res*, 1997. **17**(6b): p. 4151-62.
196. Young, P.R., C. Karanutilake, and A.P. Zygas, *Binding of cathepsin D to the mannose receptor on rat peritoneal macrophages*. *Biochim Biophys Acta*, 1991. **1095**(1): p. 1-4.
197. Zeiner, P.S., et al., *Distribution and prognostic impact of microglia/macrophage subpopulations in gliomas*. *Brain Pathol*, 2019. **29**(4): p. 513-529.
198. Dix, A.R., et al., *Immune defects observed in patients with primary malignant brain tumors*. *J Neuroimmunol*, 1999. **100**(1-2): p. 216-32.
199. Bohnert, S., et al., *TMEM119 as a specific marker of microglia reaction in traumatic brain injury in postmortem examination*. *Int J Legal Med*, 2020. **134**(6): p. 2167-2176.
200. Ansari, M.A., *Temporal profile of M1 and M2 responses in the hippocampus following early 24h of neurotrauma*. *J Neurol Sci*, 2015. **357**(1-2): p. 41-9.
201. Zhang, Z., et al., *Lesional accumulation of CD163+ macrophages/microglia in rat traumatic brain injury*. *Brain Res*, 2012. **1461**: p. 102-10.
202. Wang, G., et al., *Microglia/macrophage polarization dynamics in white matter after traumatic brain injury*. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2013. **33**(12): p. 1864-74.
203. Hansson, M.J. and E. Elmér, *Cyclosporine as Therapy for Traumatic Brain Injury*. *Neurotherapeutics*, 2023. **20**(6): p. 1482-1495.
204. Laskowitz, D.T. and D.W. Van Wyck, *ApoE Mimetic Peptides as Therapy for Traumatic Brain Injury*. *Neurotherapeutics*, 2023. **20**(6): p. 1496-1507.
205. Wang, S., et al., *Luteolin Alters Macrophage Polarization to Inhibit Inflammation*. *Inflammation*, 2020. **43**(1): p. 95-108.
206. Lee, S.J., et al., *Mannose receptor-mediated regulation of serum glycoprotein homeostasis*. *Science*, 2002. **295**(5561): p. 1898-901.
207. JAX - The Jackson Laboratory, M.S.B.H., ME USA 04609. *B6.129P2-Mrc1tm1Mnz/J*, *RRID:IMSR\_JAX:007620*. Available from: <https://www.jax.org/strain/007620>.
208. GV Solas - M. Busch, S. Chourbaji, P. Dammann, S. Gerold, A. Haemisch, P. Jirkof, P. Oehlert, A. Osterkamp, S. Ott, S. Peters, K. Spekl, P. Tsai, . *Tiergerechte Haltung Maus 2014*; Available from: [https://www.gv-solas.de/wp-content/uploads/2021/08/hal\\_201408Tiergerechte-Haltung-Maus.pdf](https://www.gv-solas.de/wp-content/uploads/2021/08/hal_201408Tiergerechte-Haltung-Maus.pdf).
209. Masuda, A., et al., *Body Protein Reserves Sustain Maternal Performance in Early Lactation but Dietary Protein Is Necessary to Maintain Performance and Immune Responses to *Nippostrongylus brasiliensis* in Lactating Rats*. *J Nutr*, 2018. **148**(10): p. 1638-1646.
210. Naismith, D.J., *The requirement for protein, and the utilization of protein and calcium during pregnancy*. *Metabolism*, 1966. **15**(7): p. 582-95.
211. Meyer, P.D.D.H.c.H., *Supplemente der Tierernährung*. 2014: Josef Kamphues.
212. Mitchell, S.J., et al., *Daily Fasting Improves Health and Survival in Male Mice Independent of Diet Composition and Calories*. *Cell Metab*, 2019. **29**(1): p. 221-228.e3.

213. BMEL. *Verordnung zum Schutz von zu Versuchszwecken oder zu anderen wissenschaftlichen Zwecken verwendeten Tieren (Tierschutz-Versuchstierverordnung - TierSchVersV)*. 2015; Available from: <https://www.gesetze-im-internet.de/tierschversv/BJNR312600013.html>.
214. Wolfgang Löscher, A.R., *Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin*. Vol. 4. vollständig überarbeitete Auflage. 2016.
215. Onyszchuk, G., et al., *A mouse model of sensorimotor controlled cortical impact: characterization using longitudinal magnetic resonance imaging, behavioral assessments and histology*. J Neurosci Methods, 2007. **160**(2): p. 187-96.
216. Cole, J.T., et al., *Craniotomy: true sham for traumatic brain injury, or a sham of a sham?* J Neurotrauma, 2011. **28**(3): p. 359-69.
217. Carola, V., et al., *Evaluation of the elevated plus-maze and open-field tests for the assessment of anxiety-related behaviour in inbred mice*. Behav Brain Res, 2002. **134**(1-2): p. 49-57.
218. Faure, A., et al., *Social behaviors and acoustic vocalizations in different strains of mice*. Behav Brain Res, 2017. **320**: p. 383-390.
219. Ding, W., et al., *Parthenolide ameliorates neurological deficits and neuroinflammation in mice with traumatic brain injury by suppressing STAT3/NF- $\kappa$ B and inflammasome activation*. Int Immunopharmacol, 2022. **108**: p. 108913.
220. Paxinos, K.B.J.F.G., *The Mouse Brain Compact third edition*. 2008.
221. Shi, X., et al., *Behavioral Assessment of Sensory, Motor, Emotion, and Cognition in Rodent Models of Intracerebral Hemorrhage*. Front Neurol, 2021. **12**: p. 667511.
222. Hamm, R.J., et al., *The rotarod test: an evaluation of its effectiveness in assessing motor deficits following traumatic brain injury*. J Neurotrauma, 1994. **11**(2): p. 187-96.
223. Kraeuter, A.K., P.C. Guest, and Z. Sarnyai, *The Open Field Test for Measuring Locomotor Activity and Anxiety-Like Behavior*. Methods Mol Biol, 2019. **1916**: p. 99-103.
224. Kraeuter, A.K., P.C. Guest, and Z. Sarnyai, *The Elevated Plus Maze Test for Measuring Anxiety-Like Behavior in Rodents*. Methods Mol Biol, 2019. **1916**: p. 69-74.
225. Ari, C., et al., *Elevated Plus Maze Test Combined with Video Tracking Software to Investigate the Anxiolytic Effect of Exogenous Ketogenic Supplements*. J Vis Exp, 2019(143).
226. Miao, H.T., et al., *Spautin-1 Protects Against Mild TBI-Induced Anxiety-Like Behavior in Mice via Immunologically Silent Apoptosis*. Neuromolecular Med, 2023. **25**(3): p. 336-349.
227. Gomes, M.D.M., *Franz Nissl (1860-1919), noted neuropsychiatrist and neuropathologist, staining the neuron, but not limiting it*. Dement Neuropsychol, 2019. **13**(3): p. 352-355.
228. Deitch, A.D. and M.J. Moses, *The Nissl substance of living and fixed spinal ganglion cells. II. An ultraviolet absorption study*. J Biophys Biochem Cytol, 1957. **3**(3): p. 449-56.
229. Sukswai, N. and J.D. Houry, *Immunohistochemistry Innovations for Diagnosis and Tissue-Based Biomarker Detection*. Curr Hematol Malig Rep, 2019. **14**(5): p. 368-375.
230. Ritter, K., et al., *Early Reciprocal Effects in a Murine Model of Traumatic Brain Injury and Femoral Fracture*. Mediators Inflamm, 2021. **2021**: p. 8835730.
231. Wilfinger, W.W., K. Mackey, and P. Chomczynski, *Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity*. Biotechniques, 1997. **22**(3): p. 474-6, 478-81.
232. Matlock, B. *Assessment of Nucleic Acid Purity*. 2015; Available from: <https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/CAD/Product-Bulletins/TN52646-E-0215M-NucleicAcid.pdf>.
233. Forootan, A., et al., *Methods to determine limit of detection and limit of quantification in quantitative real-time PCR (qPCR)*. Biomol Detect Quantif, 2017. **12**: p. 1-6.
234. Thal, S.C., et al., *Selection of endogenous control genes for normalization of gene expression analysis after experimental brain trauma in mice*. J Neurotrauma, 2008. **25**(7): p. 785-94.
235. Science, R.A., *Quantifizierungsstrategien mit dem LightCycler 480 PCR-Analysesystem*. 2009.
236. Pfaffl, M.W., *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR*. Nucleic Acids Res, 2001. **29**(9): p. e45.

237. Reimand, J., et al., *Pathway enrichment analysis and visualization of omics data using g:Profiler, GSEA, Cytoscape and EnrichmentMap*. Nat Protoc, 2019. **14**(2): p. 482-517.
238. Brenner, M. and A. Messing, *Regulation of GFAP Expression*. ASN Neuro, 2021. **13**: p. 1759091420981206.
239. Morganti-Kossmann, M.C., et al., *The complexity of neuroinflammation consequent to traumatic brain injury: from research evidence to potential treatments*. Acta Neuropathol, 2019. **137**(5): p. 731-755.
240. Candelario-Jalil, E., R.M. Dijkhuizen, and T. Magnus, *Neuroinflammation, Stroke, Blood-Brain Barrier Dysfunction, and Imaging Modalities*. Stroke, 2022. **53**(5): p. 1473-1486.
241. Zhou, Y., et al., *Mannose receptor modulates macrophage polarization and allergic inflammation through miR-511-3p*. J Allergy Clin Immunol, 2018. **141**(1): p. 350-364.e8.
242. Broad Institute, G.a.M.T. *Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) User Guide*. 2019; Available from: [https://www.gsea-msigdb.org/gsea/doc/GSEAUUserGuideFrame.html?Interpreting\\_GSEA](https://www.gsea-msigdb.org/gsea/doc/GSEAUUserGuideFrame.html?Interpreting_GSEA).
243. Broad Institute, G.a.M.T. *FAQ GSEA*. 2021; Available from: [https://software.broadinstitute.org/cancer/software/gsea/wiki/index.php/FAQ#Where\\_are\\_the\\_GSEA\\_statistics\\_.28ES.2C\\_NES.2C\\_FDR.2C\\_FWER.2C\\_nominal\\_p\\_value.29\\_described.3F](https://software.broadinstitute.org/cancer/software/gsea/wiki/index.php/FAQ#Where_are_the_GSEA_statistics_.28ES.2C_NES.2C_FDR.2C_FWER.2C_nominal_p_value.29_described.3F).
244. Liu, J., et al., *Wnt/ $\beta$ -catenin signalling: function, biological mechanisms, and therapeutic opportunities*. Signal Transduct Target Ther, 2022. **7**(1): p. 3.
245. Menet, R., S. Lecordier, and A. ElAli, *Wnt Pathway: An Emerging Player in Vascular and Traumatic Mediated Brain Injuries*. Front Physiol, 2020. **11**: p. 565667.
246. Özevren, H., E. Deveci, and M.C. Tuncer, *Histopathological changes in the choroid plexus after traumatic brain injury in the rats: a histologic and immunohistochemical study*. Folia Morphol (Warsz), 2018. **77**(4): p. 642-648.
247. Liu, H., et al., *A 14 bp indel polymorphism in the promoter region is associated with different responses to porcine circovirus type 2 infection by regulating MRC1 transcription*. Vet Immunol Immunopathol, 2021. **234**: p. 110202.
248. Upadhyay, A.A., et al., *TREM2(+) and interstitial-like macrophages orchestrate airway inflammation in SARS-CoV-2 infection in rhesus macaques*. Nat Commun, 2023. **14**(1): p. 1914.
249. Zhang, X., et al., *Polymorphic allele of human MRC1 confer protection against tuberculosis in a Chinese population*. Int J Biol Sci, 2012. **8**(3): p. 375-82.
250. Manohar, M., et al., *Novel Circulating and Tissue Monocytes as Well as Macrophages in Pancreatitis and Recovery*. Gastroenterology, 2021. **161**(6): p. 2014-2029.e14.
251. Masuda, T., et al., *Specification of CNS macrophage subsets occurs postnatally in defined niches*. Nature, 2022. **604**(7907): p. 740-748.
252. Rødgaard-Hansen, S., et al., *A soluble form of the macrophage-related mannose receptor (MR/CD206) is present in human serum and elevated in critical illness*. Clin Chem Lab Med, 2014. **52**(3): p. 453-61.
253. Sordi, R., et al., *'Preconditioning' with low dose lipopolysaccharide aggravates the organ injury / dysfunction caused by hemorrhagic shock in rats*. PLoS One, 2015. **10**(4): p. e0122096.
254. Püntener, U., et al., *Long-term impact of systemic bacterial infection on the cerebral vasculature and microglia*. J Neuroinflammation, 2012. **9**: p. 146.
255. Perry, V.H. and C. Holmes, *Microglial priming in neurodegenerative disease*. Nat Rev Neurol, 2014. **10**(4): p. 217-24.
256. Rosenzweig, H.L., et al., *Endotoxin preconditioning prevents cellular inflammatory response during ischemic neuroprotection in mice*. Stroke, 2004. **35**(11): p. 2576-81.
257. Sangaran, P.G., et al., *LPS Preconditioning Attenuates Apoptosis Mechanism by Inhibiting NF- $\kappa$ B and Caspase-3 Activity: TLR4 Pre-activation in the Signaling Pathway of LPS-Induced Neuroprotection*. Mol Neurobiol, 2021. **58**(5): p. 2407-2422.

258. Vartanian, K.B., et al., *LPS preconditioning redirects TLR signaling following stroke: TRIF-IRF3 plays a seminal role in mediating tolerance to ischemic injury*. J Neuroinflammation, 2011. **8**: p. 140.
259. Longhi, L., et al., *Long-lasting protection in brain trauma by endotoxin preconditioning*. J Cereb Blood Flow Metab, 2011. **31**(9): p. 1919-29.
260. Eslami, M., et al., *The effect of Lipopolysaccharide (LPS) pretreatment on hippocampal apoptosis in traumatic rats*. Neurol Res, 2020. **42**(2): p. 91-98.
261. Utagawa, A., et al., *Systemic inflammation exacerbates behavioral and histopathological consequences of isolated traumatic brain injury in rats*. Exp Neurol, 2008. **211**(1): p. 283-91.
262. Badner, A., et al., *Early Intravenous Delivery of Human Brain Stromal Cells Modulates Systemic Inflammation and Leads to Vasoprotection in Traumatic Spinal Cord Injury*. Stem Cells Transl Med, 2016. **5**(8): p. 991-1003.
263. Gerganova, G., A. Riddell, and A.A. Miller, *CNS border-associated macrophages in the homeostatic and ischaemic brain*. Pharmacol Ther, 2022. **240**: p. 108220.
264. Fan, W., et al., *Identification of CD206 as a potential biomarker of cancer stem-like cells and therapeutic agent in liver cancer*. Oncol Lett, 2019. **18**(3): p. 3218-3226.
265. Nawaz, A., et al., *Depletion of CD206(+) M2-like macrophages induces fibro-adipogenic progenitors activation and muscle regeneration*. Nat Commun, 2022. **13**(1): p. 7058.
266. Ren, H., et al., *CD22 blockade modulates microglia activity to suppress neuroinflammation following intracerebral hemorrhage*. Pharmacol Res, 2023. **196**: p. 106912.
267. Fraser, I.P. and R.A.B. Ezekowitz, *Mannose receptor and phagocytosis*, in *Advances in Cellular and Molecular Biology of Membranes and Organelles*, S. Gordon, Editor. 1999, JAI. p. 87-101.
268. Mattes, W.B., *In vitro to in vivo translation*. Current Opinion in Toxicology, 2020. **23-24**: p. 114-118.
269. Uribe-Querol, E. and C. Rosales, *Phagocytosis: Our Current Understanding of a Universal Biological Process*. Front Immunol, 2020. **11**: p. 1066.
270. Mukherjee, S., R.N. Ghosh, and F.R. Maxfield, *Endocytosis*. Physiol Rev, 1997. **77**(3): p. 759-803.
271. Sha, R., et al., *Electroacupuncture Alleviates Ischemic Brain Injury by Inhibiting the miR-223/NLRP3 Pathway*. Med Sci Monit, 2019. **25**: p. 4723-4733.
272. Chen, Y., et al., *An experimental model of closed head injury in mice: pathophysiology, histopathology, and cognitive deficits*. J Neurotrauma, 1996. **13**(10): p. 557-68.
273. Xuan, W., et al., *Low-level laser therapy for traumatic brain injury in mice increases brain derived neurotrophic factor (BDNF) and synaptogenesis*. J Biophotonics, 2015. **8**(6): p. 502-11.
274. Liu, X.L., et al., *Maraviroc promotes recovery from traumatic brain injury in mice by suppression of neuroinflammation and activation of neurotoxic reactive astrocytes*. Neural Regen Res, 2023. **18**(1): p. 141-149.
275. Shultz, S.R., et al., *Clinical Relevance of Behavior Testing in Animal Models of Traumatic Brain Injury*. J Neurotrauma, 2020. **37**(22): p. 2381-2400.
276. Feng, L., et al., *Deficits in motor and cognitive functions in an adult mouse model of hypoxia-ischemia induced stroke*. Sci Rep, 2020. **10**(1): p. 20646.
277. Bona, E., B.B. Johansson, and H. Hagberg, *Sensorimotor function and neuropathology five to six weeks after hypoxia-ischemia in seven-day-old rats*. Pediatr Res, 1997. **42**(5): p. 678-83.
278. de la Tremblaye, P.B., et al., *Chronic unpredictable stress during adolescence protects against adult traumatic brain injury-induced affective and cognitive deficits*. Brain Res, 2021. **1767**: p. 147544.
279. Islam, M., et al., *Differential neuropathology and functional outcome after equivalent traumatic brain injury in aged versus young adult mice*. Exp Neurol, 2021. **341**: p. 113714.
280. Walf, A.A. and C.A. Frye, *The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents*. Nat Protoc, 2007. **2**(2): p. 322-8.

281. Bortolato, M., et al., *Behavioral disinhibition and reduced anxiety-like behaviors in monoamine oxidase B-deficient mice*. *Neuropsychopharmacology*, 2009. **34**(13): p. 2746-57.
282. Grahn, R.E., et al., *Effects of plus-maze experience and chlordiazepoxide on anxiety-like behavior and serotonin neural activity in the dorsal raphe nucleus in rats*. *Behav Pharmacol*, 2019. **30**(2 and 3-Spec Issue): p. 208-219.
283. Sierra-Mercado, D., et al., *Controlled cortical impact before or after fear conditioning does not affect fear extinction in mice*. *Brain Res*, 2015. **1606**: p. 133-41.
284. Watanabe, J., et al., *Administration of TSG-6 improves memory after traumatic brain injury in mice*. *Neurobiol Dis*, 2013. **59**: p. 86-99.
285. Li, B., et al., *Inhibition of impulsive action by projection-defined prefrontal pyramidal neurons*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2020. **117**(29): p. 17278-17287.
286. van den Heuvel, O.A., et al., *Frontal-striatal abnormalities underlying behaviours in the compulsive-impulsive spectrum*. *J Neurol Sci*, 2010. **289**(1-2): p. 55-9.
287. Vonder Haar, C., et al., *Frontal Traumatic Brain Injury Increases Impulsive Decision Making in Rats: A Potential Role for the Inflammatory Cytokine Interleukin-12*. *J Neurotrauma*, 2017. **34**(19): p. 2790-2800.
288. Pote, W., et al., *Effects of a hydroethanolic extract of *Boophone disticha* bulb on anxiety-related behaviour in naive BALB/c mice*. *J Ethnopharmacol*, 2018. **214**: p. 218-224.
289. Chen, Y.T., et al., *Pretreatment with Lovastatin Improves Depression-Like Behavior After Traumatic Brain Injury Through Activation of the AMPK Pathway*. *World Neurosurg*, 2023. **180**: p. e350-e363.
290. Yankelevitch-Yahav, R., et al., *The forced swim test as a model of depressive-like behavior*. *J Vis Exp*, 2015(97).
291. Clark, L., et al., *The contributions of lesion laterality and lesion volume to decision-making impairment following frontal lobe damage*. *Neuropsychologia*, 2003. **41**(11): p. 1474-83.
292. Karlińska, I., et al., *Cognitive impairment in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. The correlation with MRI lesion volume*. *Neurol Neurochir Pol*, 2008. **42**(5): p. 416-23.
293. Walter, J., et al., *Focal lesion size poorly correlates with motor function after experimental traumatic brain injury in mice*. *PLoS One*, 2022. **17**(3): p. e0265448.
294. Haynes, N. and T. Goodwin, *Literature Review of Sex Differences in mTBI*. *Mil Med*, 2023. **188**(5-6): p. e978-e984.
295. Keet, K., J. Roy, and B.M. Henry, *Reporting sex or gender in anatomical research: Which is appropriate?* *Clin Anat*, 2019. **32**(5): p. 697-698.
296. Lee, S.K., *Sex as an important biological variable in biomedical research*. *BMB Rep*, 2018. **51**(4): p. 167-173.
297. Hoffman, A.N., et al., *Sex Differences in Behavioral Sensitivities After Traumatic Brain Injury*. *Front Neurol*, 2020. **11**: p. 553190.
298. Wirth, P., et al., *New method to induce mild traumatic brain injury in rodents produces differential outcomes in female and male Sprague Dawley rats*. *J Neurosci Methods*, 2017. **290**: p. 133-144.
299. Wagner, A.K., et al., *Gender associations with chronic methylphenidate treatment and behavioral performance following experimental traumatic brain injury*. *Behav Brain Res*, 2007. **181**(2): p. 200-9.
300. McCorkle, T.A., Z.L. Romm, and R. Raghupathi, *Repeated Mild TBI in Adolescent Rats Reveals Sex Differences in Acute and Chronic Behavioral Deficits*. *Neuroscience*, 2022. **493**: p. 52-68.
301. Tsushima, W.T., M. Lum, and O. Geling, *Sex differences in the long-term neuropsychological outcome of mild traumatic brain injury*. *Brain Inj*, 2009. **23**(10): p. 809-14.
302. Giacometti, L.L., J.W. Huh, and R. Raghupathi, *Sex and estrous-phase dependent alterations in depression-like behavior following mild traumatic brain injury in adolescent rats*. *J Neurosci Res*, 2022. **100**(2): p. 490-505.

303. Han, L. and C. Jiang, *Evolution of blood-brain barrier in brain diseases and related systemic nanoscale brain-targeting drug delivery strategies*. Acta Pharm Sin B, 2021. **11**(8): p. 2306-2325.
304. Scott, M.C., et al., *Determining Sex-Based Differences in Inflammatory Response in an Experimental Traumatic Brain Injury Model*. Front Immunol, 2022. **13**: p. 753570.
305. Tasaki, A., et al., *Autocrine MMP-2/9 secretion increases the BBB permeability in neuromyelitis optica*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2014. **85**(4): p. 419-30.
306. Louboutin, J.P. and D.S. Strayer, *Blood-brain barrier abnormalities caused by HIV-1 gp120: mechanistic and therapeutic implications*. ScientificWorldJournal, 2012. **2012**: p. 482575.
307. Kumar, A. and D.J. Loane, *Neuroinflammation after traumatic brain injury: opportunities for therapeutic intervention*. Brain Behav Immun, 2012. **26**(8): p. 1191-201.
308. Chiu, C.C., et al., *Neuroinflammation in animal models of traumatic brain injury*. J Neurosci Methods, 2016. **272**: p. 38-49.
309. Grovola, M.R., et al., *Understanding microglial responses in large animal models of traumatic brain injury: an underutilized resource for preclinical and translational research*. J Neuroinflammation, 2023. **20**(1): p. 67.
310. Villapol, S., D.J. Loane, and M.P. Burns, *Sexual dimorphism in the inflammatory response to traumatic brain injury*. Glia, 2017. **65**(9): p. 1423-1438.
311. Jullienne, A., et al., *Male and Female Mice Exhibit Divergent Responses of the Cortical Vasculature to Traumatic Brain Injury*. J Neurotrauma, 2018. **35**(14): p. 1646-1658.
312. Günther, M., et al., *COX-2 regulation and TUNEL-positive cell death differ between genders in the secondary inflammatory response following experimental penetrating focal brain injury in rats*. Acta Neurochir (Wien), 2015. **157**(4): p. 649-59.
313. Jolivel, V., et al., *Microglial Cell Morphology and Phagocytic Activity Are Critically Regulated by the Neurosteroid Allopregnanolone: A Possible Role in Neuroprotection*. Cells, 2021. **10**(3).
314. Villa, A., et al., *Sex-Specific Features of Microglia from Adult Mice*. Cell Reports, 2018. **23**(12): p. 3501-3511.
315. Doran, S.J., et al., *Sex Differences in Acute Neuroinflammation after Experimental Traumatic Brain Injury Are Mediated by Infiltrating Myeloid Cells*. J Neurotrauma, 2019. **36**(7): p. 1040-1053.
316. Campbell, L., et al., *Estrogen receptor-alpha promotes alternative macrophage activation during cutaneous repair*. J Invest Dermatol, 2014. **134**(9): p. 2447-2457.
317. Khan, D. and S. Ansar Ahmed, *The Immune System Is a Natural Target for Estrogen Action: Opposing Effects of Estrogen in Two Prototypical Autoimmune Diseases*. Front Immunol, 2015. **6**: p. 635.
318. Hoffmann, J.P., et al., *Sex hormone signaling and regulation of immune function*. Immunity, 2023. **56**(11): p. 2472-2491.
319. Acosta-Martínez, M., *Shaping Microglial Phenotypes Through Estrogen Receptors: Relevance to Sex-Specific Neuroinflammatory Responses to Brain Injury and Disease*. J Pharmacol Exp Ther, 2020. **375**(1): p. 223-236.
320. Barreto, G.E., M. Santos-Galindo, and L.M. Garcia-Segura, *Selective estrogen receptor modulators regulate reactive microglia after penetrating brain injury*. Front Aging Neurosci, 2014. **6**: p. 132.
321. Brotfain, E., et al., *Neuroprotection by Estrogen and Progesterone in Traumatic Brain Injury and Spinal Cord Injury*. Curr Neuropharmacol, 2016. **14**(6): p. 641-53.
322. Wang, J., et al., *Estrogen Attenuates Traumatic Brain Injury by Inhibiting the Activation of Microglia and Astrocyte-Mediated Neuroinflammatory Responses*. Mol Neurobiol, 2021. **58**(3): p. 1052-1061.
323. Bruce-Keller, A.J., et al., *Gender and estrogen manipulation do not affect traumatic brain injury in mice*. J Neurotrauma, 2007. **24**(1): p. 203-15.

324. Barreto, G., et al., *Testosterone decreases reactive astroglia and reactive microglia after brain injury in male rats: role of its metabolites, oestradiol and dihydrotestosterone*. Eur J Neurosci, 2007. **25**(10): p. 3039-46.
325. Webster, K.M., et al., *Progesterone treatment reduces neuroinflammation, oxidative stress and brain damage and improves long-term outcomes in a rat model of repeated mild traumatic brain injury*. J Neuroinflammation, 2015. **12**: p. 238.
326. Francos-Quijorna, I., et al., *IL-4 drives microglia and macrophages toward a phenotype conducive for tissue repair and functional recovery after spinal cord injury*. Glia, 2016. **64**(12): p. 2079-2092.
327. Laboratories, B.-R. *Mini-review: Macrophage polarisation*. 2016; Available from: <https://www.bio-rad-antibodies.com/macrophage-polarization-minireview.html>.
328. Hsieh, C.L., et al., *Traumatic brain injury induces macrophage subsets in the brain*. Eur J Immunol, 2013. **43**(8): p. 2010-22.
329. Yang, Z. and X.F. Ming, *Functions of arginase isoforms in macrophage inflammatory responses: impact on cardiovascular diseases and metabolic disorders*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 533.
330. Mills, C.D., *M1 and M2 Macrophages: Oracles of Health and Disease*. Crit Rev Immunol, 2012. **32**(6): p. 463-88.
331. Pesce, J.T., et al., *Arginase-1-expressing macrophages suppress Th2 cytokine-driven inflammation and fibrosis*. PLoS Pathog, 2009. **5**(4): p. e1000371.
332. Muñoz-Ballester, C. and S. Robel, *Astrocyte-mediated mechanisms contribute to traumatic brain injury pathology*. WIREs Mech Dis, 2023. **15**(5): p. e1622.
333. Witcher, K.G., et al., *Traumatic Brain Injury Causes Chronic Cortical Inflammation and Neuronal Dysfunction Mediated by Microglia*. J Neurosci, 2021. **41**(7): p. 1597-1616.
334. Sulistio, Y.A., et al., *Interleukin-6-Mediated Induced Pluripotent Stem Cell (iPSC)-Derived Neural Differentiation*. Mol Neurobiol, 2018. **55**(4): p. 3513-3522.
335. Xie, Z., et al., *Interleukin-6/interleukin-6 receptor complex promotes osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells*. Stem Cell Res Ther, 2018. **9**(1): p. 13.
336. Taga, T. and S. Fukuda, *Role of IL-6 in the neural stem cell differentiation*. Clin Rev Allergy Immunol, 2005. **28**(3): p. 249-56.
337. De Simone, V., et al., *Th17-type cytokines, IL-6 and TNF- $\alpha$  synergistically activate STAT3 and NF- $\kappa$ B to promote colorectal cancer cell growth*. Oncogene, 2015. **34**(27): p. 3493-503.
338. Arranz-Valsero, I., et al., *IL-6 as a corneal wound healing mediator in an in vitro scratch assay*. Exp Eye Res, 2014. **125**: p. 183-92.
339. N, A.G., et al., *Phagocytosis imprints heterogeneity in tissue-resident macrophages*. J Exp Med, 2017. **214**(5): p. 1281-1296.
340. Nawaz, A., et al., *CD206(+) M2-like macrophages regulate systemic glucose metabolism by inhibiting proliferation of adipocyte progenitors*. Nat Commun, 2017. **8**(1): p. 286.
341. Meizlish, M.L., et al., *Tissue Homeostasis and Inflammation*. Annu Rev Immunol, 2021. **39**: p. 557-581.
342. Ip, W.K. and R. Medzhitov, *Macrophages monitor tissue osmolarity and induce inflammatory response through NLRP3 and NLRC4 inflammasome activation*. Nat Commun, 2015. **6**: p. 6931.
343. Svecla, M., et al., *Impact of Asialoglycoprotein Receptor and Mannose Receptor Deficiency on Murine Plasma N-glycome Profiles*. Mol Cell Proteomics, 2023. **22**(9): p. 100615.
344. Rossaint, J. and A. Zarbock, *Anesthesia-induced immune modulation*. Curr Opin Anaesthesiol, 2019. **32**(6): p. 799-805.
345. Wang, Z., et al., *Critical role of NLRP3-caspase-1 pathway in age-dependent isoflurane-induced microglial inflammatory response and cognitive impairment*. J Neuroinflammation, 2018. **15**(1): p. 109.
346. Saxena, S. and M. Maze, *Impact on the brain of the inflammatory response to surgery*. Presse Med, 2018. **47**(4 Pt 2): p. e73-e81.

347. Turner, R.C., et al., *Single low-dose lipopolysaccharide preconditioning: neuroprotective against axonal injury and modulates glial cells*. Neuroimmunol Neuroinflamm, 2017. **4**: p. 6-15.
348. Chen, Z., et al., *Lipopolysaccharide-induced microglial activation and neuroprotection against experimental brain injury is independent of hematogenous TLR4*. J Neurosci, 2012. **32**(34): p. 11706-15.
349. Peng, X., et al., *Blood-Brain Barrier Disruption by Lipopolysaccharide and Sepsis-Associated Encephalopathy*. Front Cell Infect Microbiol, 2021. **11**: p. 768108.
350. Ma, J., et al., *Chronic brain inflammation causes a reduction in GluN2A and GluN2B subunits of NMDA receptors and an increase in the phosphorylation of mitogen-activated protein kinases in the hippocampus*. Mol Brain, 2014. **7**: p. 33.
351. Mou, X., *Estimation Problems for pooled Data*, U.o.S. Carolina, Editor. 2019.
352. Uhl, K., A. Parekh, and S. Kweder, *Females in clinical studies: where are we going?* Clin Pharmacol Ther, 2007. **81**(4): p. 600-2.
353. Xing, J., et al., *Single-Cell RNA Sequencing Reveals Cellular and Transcriptional Changes Associated With Traumatic Brain Injury*. Front Genet, 2022. **13**: p. 861428.

## 10 Publikationen

1. Wang, Y., I. Wernersbach, **J. Strehle**, S. Li, D. Appel, M. Klein, K. Ritter, R. Hummel, I. Tegeder, and M.K.E. Schäfer. 2022. Early posttraumatic CSF1R inhibition via PLX3397 leads to time- and sex-dependent effects on inflammation and neuronal maintenance after traumatic brain injury in mice. *Brain Behav Immun.* 106:49-66.
2. Weyer MP, **Strehle J**, Schäfer MKE, Tegeder I. 2024. Repurposing of pexidartinib for microglia depletion and renewal. *Pharmacol Ther.* 253:108565.

## 11 Danksagung

Als erstes möchte ich meinem Betreuer vor Ort in Mainz Herrn Prof. Michael Schäfer für die Möglichkeit danken, dieses Forschungsprojekt durchführen zu dürfen, sowie für die gute Betreuung, den stetigen Austausch und den unermüdlichen Input, der zu diesem Ergebnis geführt hat. Ich werde unsere Gespräche als bereichernden und konstruktiven Austausch in guter Erinnerung behalten.

Weiterhin gilt mein Dank meinem Doktorvater Herrn Prof. Martin Schmidt an der Justus-Liebig-Universität in Gießen, welcher meine Promotion ergänzend betreut hat und mich vor allem stets mit einer freundlichen, ermunternden Art und mit schnellen, hilfreichen Korrekturen auf meinem Weg unterstützt hat.

Ebenfalls möchte ich Herrn Prof. Christian Werner als Chef der Klinik für Anästhesiologie an der Unimedizin in Mainz für sein Vertrauen in mich als Tierärztin und Doktorandin zu Beginn meines Berufsstarts danken.

Meinen Kollegen Tobias Hirnet, Leonie Link, Dana Pieter, Pawit Somnuke, Sudena Wang, Yong Wang und Isa Wernersbach, die mittlerweile viel mehr zu Freunden geworden sind, gilt ein besonderer Dank. Zum einen für den stetigen fachlichen Austausch, das gemeinsame Brainstorming und das Korrekturlesen, zum anderen vor allem aber für die zahlreichen Momente in denen herzlich gelacht, mit Nervennahrung versorgt oder einfach umarmt worden ist, wenn nichts mehr anderes half. Ohne dies wäre der Laboralltag deutlich trister und so manche Durststrecke kaum erträglich gewesen.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Freund Martin Schach für das unglaubliche Verständnis, den unerschütterlichen Glauben an eine erfolgreiche Dissertation, zahlreichen Word- und Excel-Tricks und die stetige mentale Unterstützung.

Dankbar bin ich ebenfalls meinem Sohn Jakob, welcher mich im Verlaufe dieses Projekts immer wieder an das Leben jenseits des Schreibtischs erinnert hat und stets ein Lächeln und eine Umarmung bereit hielt.

Ferner möchte ich meinen Eltern für die kaum in Worte zu fassende Unterstützung in egal welcher Art und Weise der gesamten letzten Jahre danken, ohne die weder das Veterinärmedizinstudium noch diese Promotion möglich gewesen wäre.

Außerdem gilt mein Dank meinen Freunden, welche mich in den Hochs und Tiefs individuell unterstützt und an mich geglaubt haben.

Zuletzt möchte ich dem besten Hund aller Zeiten danken, ohne den ich niemals zu der Tierärztin geworden wäre, die ich heute bin.