

Aus der Klinik für Neurologie
der Medizinischen Fakultät Charité –
Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Neuroprotektion nach Schlaganfall:
Die Rolle intravenöser Statine, PACAP und CD39**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Vincent Matthias Prinz
aus Herdecke

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. M. Endres
 2. Prof. Dr. med. R. Haberl
 3. Prof. Dr. med. J. B. Schulz

Datum der Promotion: 19.03.2010

Abstrakt

In unseren Studien charakterisierten wir neuroprotektive Mechanismen anhand von *in vivo* und *in vitro* Modellen für neuronalen Zelltod. Dabei arbeiteten wir mit einem Mausmodell der fokalen zerebralen Ischämie sowie *in vitro* mit primären neuronalen Kulturen der Maus und der Ratte.

Im Mittelpunkt der Arbeit stand die Applikation eines HMG-CoA-Reduktase Inhibitors als Akuttherapie der fokalen zerebralen Ischämie im Mausmodell. HMG-CoA-Reduktase Inhibitoren, sogenannte Statine, vermitteln direkte vasoprotektive Effekte, die unabhängig von einer signifikanten Senkung des Cholesterinspiegels auftreten. In unseren Studien untersuchten wir zunächst den Einfluss einer intravenösen Akuttherapie mit Rosuvastatin auf das Schlaganfalloutcome. Darüber hinaus bestimmten wir das therapeutische Zeitfenster, die Dosis-Wirkungs-Beziehung sowie den Effekt auf die Expression von eNOS und Akt im peripheren und zerebralen Gefäßbett. Im Weiteren charakterisierten wir endogene Signalkaskaden der mikroglialen Inflammation. Als wesentliches mikrogliales Ektoenzym spaltet die Ektonukleotidase CD39 Adenosintriphosphat (ATP) zu Adenosindiphosphat (ADP). Die Aktivierung mikroglialer Zellen durch ATP wurde bereits *in vitro* gezeigt. Die Auswirkungen einer fehlenden Expression von CD39 auf die mikrogliale Aktivierung waren bis dato nicht untersucht. Zuletzt sollten neuroprotektive Mechanismen des hypophysären Adenylatzyklase aktivierenden Polypeptids (PACAP) unter hypoxisch/ischämischen Bedingungen *in vivo* und *in vitro* untersucht werden.

Die intravenöse Applikation von Rosuvastatin in einer klinisch relevanten Dosierung war mit einem signifikant reduzierten Läsionsvolumen sowie einem verbesserten funktionellen Outcome assoziiert. Dabei konnte der neuroprotektive Effekt von Rosuvastatin in einem Zeitfenster von bis zu 4h nach Induktion der Ischämie nachgewiesen werden. Neuroprotektion war assoziiert mit erhöhten Expressionsleveln von Akt Kinase und eNOS.

In unseren Untersuchungen anhand einer *cd39* Knockout Maus (*cd39^{-/-}*) führte die fehlende Expression von CD39 *in vitro* zu einer Hemmung der mikroglialen Aktivierung. Die Aktivierung konnte durch Kostimulation mit ADP als auch durch die Zugabe einer löslichen Ektonukleotidase wiederhergestellt werden. In verschiedenen Modellen für neuronalen Zellschaden zeigten *cd39^{-/-}* Mäuse eine verringerte Akkumulation mikroglialer Zellen. Hierbei zeigten *cd39^{-/-}* Mäuse eine geringere Läsionsgröße im experimentellen Schlaganfallmodell.

Nach fokaler zerebraler Ischämie zeigte sich eine massive Hochregulation von PACAP in kortikalen Projektionsneuronen. *In vitro* führte PACAP zu einer dosisabhängigen Aktivierung von Erk1/2 und MAP Kinase. Neuroprotektion vermittelte PACAP im Modell der milden Sauerstoff-Glukose-Deprivation.

Aus klinischer Sicht ist die Entwicklung einer intravenösen Statinmedikation zur Akuttherapie des ischämischen Schlaganfalls ein viel versprechender therapeutischer Ansatz. Unsere Ergebnisse zur Bedeutung von CD39 zeigen, dass das Gleichgewicht von ATP und ADP Voraussetzung für die mikrogliale Aktivierung ist und CD39, als wesentliche mikrogliale Ectonukleotidase, hier eine wichtige Rolle spielt. Weiterhin konnten wir nachweisen, dass PACAP nach fokaler zerebraler Ischämie in kortikalen Projektionsneuronen hoch reguliert wird und via des Erk1/2 Signalweges *in vitro* Neuroprotektion vermittelt. Die Charakterisierung von Signalkaskaden und Expressionsmustern von PACAP wie auch das Verständnis der Funktion von Mikroglia unter physiologischen sowie pathologischen Bedingungen sind von Bedeutung für die Entwicklung neuer therapeutischer Strategien.

Abstract

In our studies we characterized neuroprotective mechanisms, using *in vivo* and *in vitro* models of neuronal cell death.

HMG-CoA reductase inhibitors, so called statins, exert rapid cholesterol-independent effects. In our studies we tested whether postevent treatment with intravenously (i.v.) administered rosuvastatin improves stroke outcome in mice. In addition we characterized the therapeutic time window, dose-response as well as the impact on levels of phosphorylated endothelial nitric oxide (eNOS) and Akt kinase.

Furthermore we investigated signaling cascades of microglial inflammation. As a dominant cellular ectonucleotidase, CD39 degrades ATP to ADP. *In vitro* studies have shown, that microglia is activated by ATP. Here we tested the impact of CD39 for microglial activation, using *cd39* knockout mice (*cd39*^{-/-}).

In the third part of our studies, we investigated neuroprotective effects of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP). PACAP confers protection in models of cerebral ischemia. However the mechanisms are poorly understood.

In our studies rosuvastatin, administered i.v., significantly reduced lesion size and improved functional outcome, when given up to 4 hours after induction of focal cerebral ischemia. Neuroprotection was associated with increased levels of phosphorylated eNOS and Akt kinase.

Regarding CD39, ATP failed to stimulate purinergic receptor 2 mediated migration in *cd39*^{-/-} microglia. However, the effects of ATP on migration in *cd39*^{-/-} microglia was restored by addition of a soluble ectonucleotidase or co-stimulation with ADP. In different *in vivo* models of neuronal cell death, *cd39*^{-/-} mice showed reduced accumulation of microglia at the pathological sites. Following focal cerebral ischemia the infarct size was increased in *cd39*^{-/-} mice.

PACAP expression was up regulated in cortical pyramidal cells, following focal cerebral ischemia. PACAP conferred protection to ischemic neurons via maintaining Erk1/2 signaling.

Schlagwörter

Schlaganfall, HMG-CoA-Reduktase Inhibitoren, CD39, Mikroglia, PACAP

Keywords

stroke, HMG-CoA-reductase inhibitors, CD39, microglia, PACAP

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BAD	proapoptotisches Protein (BCL 2 assoziiert)
CBF	zerebraler Blutfluss
CD39	Ekto-Nukleosid-Triphosphat Diphosphohydrolase1, auch ENTPDase1
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase
Erk 1/2	extracellular-signal regulated Kinase 1/2
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A
HMG-CoA-Reduktase	3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase
Iba1	ionisiertes Calcium-bindendes Protein1
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
MAP-Kinase	Mitogen aktivierte Kinase
MCAO	Okklusion der Arteria cerebri Media
mRNA	„messenger“ Ribonukleinsäure
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NO	Stickstoffmonoxid
PACAP	hypophysäres Adenylatzyklase aktivierendes Polypeptid
PAC1	PACAP selektiver Rezeptor 1
PAI-1	Plasminogen Aktivator Inhibitor 1
tPA	Gewebsplasminogenaktivator
U0126	selektiver Inhibitor des MEK/Erk1/2 Signaltransduktionsweges
VIP	vasoaktives intestinales Peptid
ZNS	Zentralnervensystem

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
2	ZIELSTELLUNG	4
3	METHODIK	5
4	ERGEBNISSE	8
5	DISKUSSION	12
6	LITERATURVERZEICHNIS	17
7	VERWENDETE PUBLIKATIONEN	23

ANHANG

- **ANTEILSERKLÄRUNG**
- **EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG**
- **LEBENS LAUF**
- **PUBLIKATIONS LISTE**
- **DANKSAGUNG**

1 Einleitung

Der ischämische Schlaganfall stellt weltweit nach kardiovaskulären Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache (1) dar und ist Hauptursache für lebenslange Behinderung und Pflegebedürftigkeit im Erwachsenenalter (2). In den USA werden die durch Schlaganfall verursachten direkten und indirekten Kosten auf 67 Milliarden US Dollar pro Jahr geschätzt (2), was die hohe sozioökonomische Bedeutung des Krankheitsbildes hervorhebt und die Notwendigkeit intensiver Forschung in diesem Bereich unterstreicht (3, 4).

Pathophysiologisch führt der thrombotische oder thromboembolische Verschluss eines zerebralen Gefäßes zu einer kritischen Reduktion des zerebralen Blutflusses (CBF) im abhängigen Stromgebiet. Die akute Beeinträchtigung des Energiestoffwechsels führt über komplexe Schadenskaskaden zum Gewebsuntergang (5). Pathogenetisch stellen Glutamat vermittelte Exitotoxizität, Perinfarkt Depolarisation, Inflammation und programmierter Zelltod (Apoptose) die Hauptschadensmechanismen dar (5).

In meiner Doktorarbeit habe ich mich mit verschiedenen neuroprotektiven Mechanismen in der experimentellen Schlaganfallforschung auseinandergesetzt. Den Schwerpunkt bildete dabei die Untersuchung der intravenösen Applikation eines HMG-CoA-Reduktase Inhibitors als Akuttherapie der fokalen zerebralen Ischämie im Mausmodell (1). Des Weiteren haben wir uns mit dem Einfluss der Ektonukleotidase CD39 auf die mikrogliale Migration befasst (2) und untersuchten darüber hinaus neuroprotektive Mechanismen des hypophysären Adenylatzyklase aktivierenden Polypeptids (PACAP) in verschiedenen *in vivo* und *in vitro* Modellen für neuronalen Zellschaden (3).

Ad 1) Der Einsatz von HMG-CoA-Reduktase Inhibitoren, sogenannten Statinen, zur Therapie der Hypercholesterinämie sowie zur primären und sekundären Prävention von kardio- und zerebrovaskulären Ereignissen bei Patienten mit erhöhtem vaskulären Risiko ist inzwischen weit verbreitet und gilt als sicher (6-10). Neben dem positiven Einfluss auf das Lipidprofil vermitteln Statine eine Vielzahl von direkten vasoprotektiven Effekten, die unabhängig und vor einer signifikanten Senkung des Cholesterinspiegels auftreten (11, 12). Diese pleiotropen Effekte der Statine werden durch die kompetitive Hemmung der HMG-CoA-Reduktase in extrahepatischem Gewebe sowie in Endothel- und Blutzellen hervorgerufen.

Vor allem die sukzessive Steigerung der NO-Bioverfügbarkeit durch eine erhöhte Aktivität der endothelialen NO-Synthase (eNOS) spielt hier eine wichtige Rolle (13, 14), es gibt aber auch Hinweise auf eNOS unabhängige Effekte (s. Abbildung 1) (11).

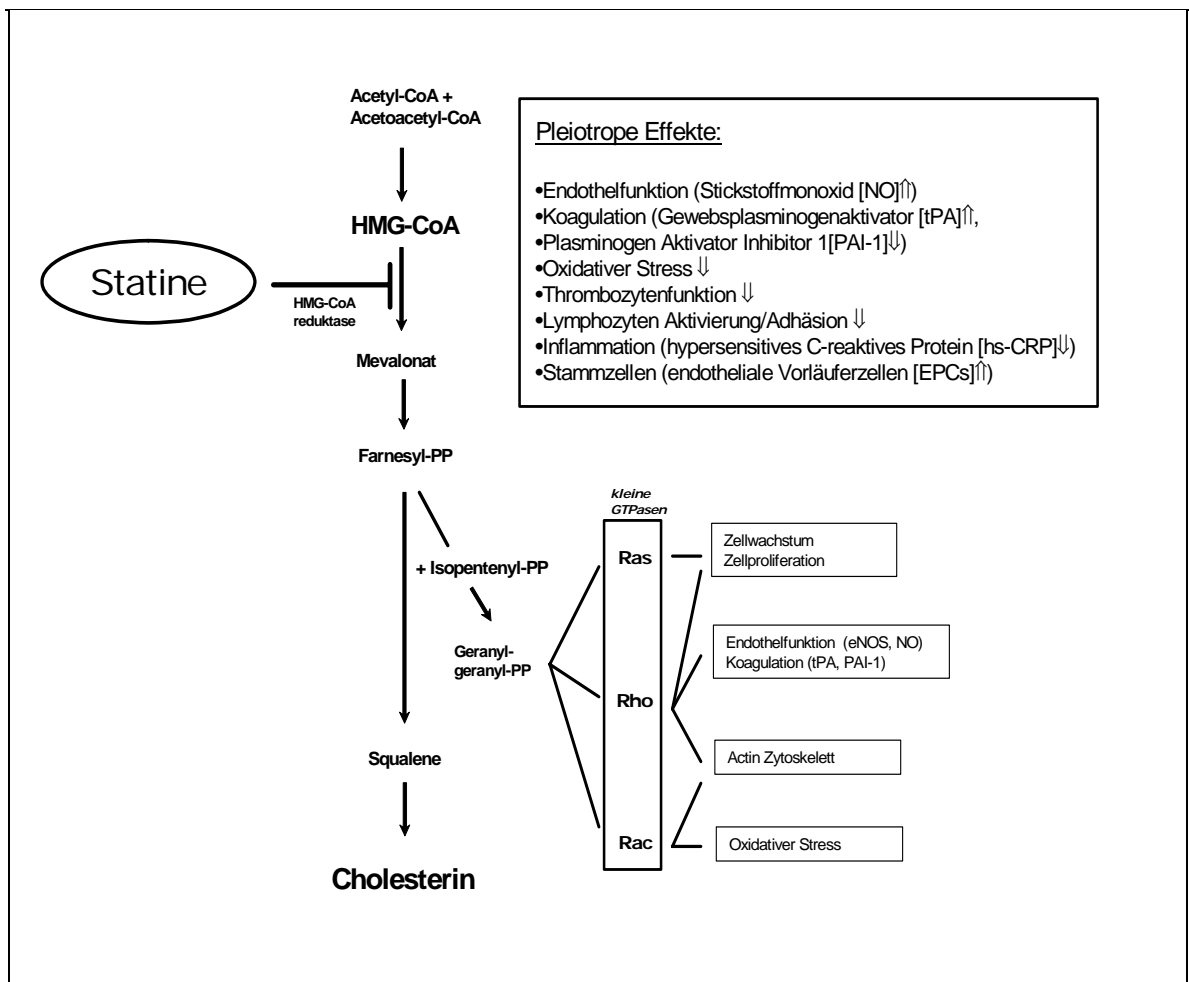


Abbildung 1: Cholesterinsyntheseweg, pleiotrope Effekte von Statinen

Statine inhibieren die Konversion von HMG-CoA zu Mevalonat durch kompetitive Hemmung der HMG-CoA-Reduktase. Neben der Cholesterinbiosynthese wird auch die Synthese isoprenoider Zwischenprodukte inhibiert, wodurch die posttranslationale Modifikation verschiedener Proteine beeinflusst wird. Daraus resultierende pleiotrope Effekte der Statine sind in dem Kasten aufgeführt (11).

In tierexperimentellen Schlaganfallmodellen konnte der protektive Effekt einer chronischen Statinbehandlung auf das zerebrale Läsionsvolumen sowie das funktionelle Outcome bereits eindeutig gezeigt werden (12, 15, 16). Sogar eine subkutane (s.c.) oder intraperitoneale (i.p.) Akuttherapie führte zu einem

reduzierten Gewebsschaden und einem verbesserten funktionellen Outcome, bisher jedoch nur in Kombination mit dem Gewebsplasminogenaktivator (tPA) (17) bzw. in einer sehr hohen Dosierung (18, 19). Inwiefern die akute intravenöse Gabe von Statinen einen neuroprotektiven Effekt bei zerebraler Ischämie vermittelt, wurde bislang nicht untersucht.

Ad 2) Als residente Immunzellen des ZNS werden Mikrogliazellen durch pathologische Veränderungen des Hirnparenchyms aktiviert (20, 21). Extrazelluläre Nukleotide (wie Adenosintriphosphat [ATP]) aktivieren und interagieren mit mikroglialen purinergen Rezeptoren (P2R) (22). Die Freisetzung von ATP aus apoptotischen und gestressten Zellen in den extrazellulären Raum führt *in vitro* zu Aktivierung und Chemotaxis mikroglialer Zellen (21). Die Ektonukleotidase CD39 ist ein wesentliches mikrogliales Ektoenzym (23), das ATP zu Adenosindiphosphat (ADP) spaltet. Auswirkungen einer fehlenden Expression von CD39 im Ischämiemodell hinsichtlich inflammatorischer Prozesse wurden bisher noch nicht untersucht.

Ad 3) Das hypophysäre Adenylatzyklase aktivierende Polypeptid (PACAP) gehört zur Familie der Sekretin/Glucagon/vasoaktiven intestinalen Peptide (VIP) und vermittelt durch Interaktion mit spezifischen Rezeptoren, PAC1 (PACAP - selective receptor 1) und VPAC1/2 (VIP/PACAP receptors 1/2) (24), wichtige neuromodulatorische Effekte (25, 26). Neuroprotektive Eigenschaften konnten bereits in verschiedenen *in vitro* und *in vivo* Modellen demonstriert werden (26). Erst kürzlich wurde gezeigt, dass sowohl exogenes als auch endogenes PACAP neuroprotektive Eigenschaften im experimentellen Schlaganfallmodell aufweisen (27, 28). Die zugrunde liegenden Mechanismen der Neuroprotektion sind bisher jedoch nur unzureichend geklärt.

2 Zielstellung

Beim ischämischen Schlaganfall führt die kritische Reduktion des CBF über komplexe Schadenskaskaden zum Gewebsuntergang. Neben der Untersuchung der intravenösen Applikation eines Statins als Akuttherapie der fokalen zerebralen Ischämie im Mausmodell (1) sollten endogene Signalkaskaden der mikroglialen Inflammation (2) sowie Mechanismen der Neuroprotektion durch PACAP *in vitro* und *in vivo* charakterisiert werden (3), um hieraus mögliche therapeutische Konsequenzen abzuleiten.

1. a) Zunächst sollte der Effekt der intravenösen Applikation einer klinisch relevanten Dosierung von Rosuvastatin als Akuttherapie der fokalen zerebralen Ischämie im Tiermodell untersucht werden.
b) In weiteren Versuchen wollten wir das therapeutische Zeitfenster und die Dosierung näher charakterisieren, sowie den Effekt auf die Expression von eNOS und phospho Akt im peripheren und zerebralen Gefäßbett untersuchen.
2. Der Einfluss der Ektonukleotidase CD39 auf die mikrogliale Migration sollte im Kontext einer *cd39* knockout Maus (*cd39*^{-/-}) untersucht werden.
3. Veränderungen der Expressionsmuster von PACAP, VIP und des PACAP selektiven Rezeptors 1 bei zerebraler Ischämie sollten *in vivo* bestimmt werden. Darüber hinaus galt es, *in vitro* Signalkaskaden und Neuroprotektion durch PACAP unter hypoxisch/ischämischen Bedingungen zu charakterisieren.

3 Methodik

Tiere und Behandlung

Alle Tierexperimente wurden unter Einhaltung der gesetzlichen Tierschutzrichtlinien durchgeführt und sind im Tierversuchsvorhaben G0206/06 und G0301/04 (Endres) vom Berliner Landesamt für Gesundheit und Soziales (LAGeSo) genehmigt worden.

Für die Versuche wurden SVJ129 Wildtypmäuse des Bundesinstituts für Risikobewertung (BfR) Berlin und C57Bl6 Mäuse von Charles River verwendet. CD39 defiziente (*cd39^{-/-}*) Mäuse und die zugehörigen Wildtypen (C57BL6xSVJ129) stammten aus einer Zucht am Max-Delbrück-Centrum (MDC) Berlin. Die Tiere wurden ursprünglich von der Arbeitsgruppe Professor Robson, Boston, generiert und zeigen einen primär unauffälligen Phänotyp (29). Wasser und Futter war allen Tieren ad libitum zugänglich. Im Tierstall herrschte ein normaler Tag-/Nachtrhythmus.

Die Experimente zur Statintherapie wurden mit Rosuvastatin (in Reinform von der Firma AstraZeneca zur Verfügung gestellt) durchgeführt. Aufgrund der hydrophilen Eigenschaften ist Rosuvastatin gut zur Herstellung einer intravenösen Applikationsform geeignet. Die Tiere erhielten Rosuvastatin i.v. und i.p. in unterschiedlichen Dosierungen (0,02-20mg/kg Körpergewicht [KG]) und zu unterschiedlichen Zeitpunkten (1h, 3h, 4h, 6h) nach Ischämieinduktion. Der Kontrollgruppe wurde die Trägersubstanz appliziert. *Cd39^{-/-}* Mäuse sowie die Kontrollen erhielten intraperitoneal Bromdesoxyuridin (BrdU).

Ischämiemodell

Der operative Eingriff zur Ischämieinduktion wurde in Isofluran-Narkose und bei konstanter Körpertemperatur durchgeführt. Mittels eines silikonbeschichteten Monofilaments, über die linke A. carotis communis eingebracht und intraluminal über die A. carotis interna vorgeschoben, wird der Abgang der A. cerebri media verlegt, was eine Ischämie im Versorgungsgebiet der linken A. cerebri media auslöst. Das jeweilige Filament wurde nach unterschiedlichen Ischämiezeiten (30, 60 oder 90 Minuten) wieder entfernt, um die Reperfusion zu ermöglichen. In einigen Tieren der jeweiligen Gruppe wurden während des Eingriffs physiologische Parameter wie Blutgase und mittlerer arterieller Blutdruck bestimmt, sowie der

regionale zerebrale Blutfluss über dem Mediastromgebiet mittels Laser-Doppler gemessen (15).

Neurologisches Defizit und funktionelles Outcome

Das neurologische Defizit wurde von einem unabhängigen Untersucher anhand der Bederson-Kriterien (30) zu den Zeitpunkten 30 Minuten und 24h nach Einsetzen der Ischämie bestimmt (0=kein Defizit, 1=leichtes Defizit, 2=mäßiges Defizit, 3=schweres Defizit). Außerdem testeten wir in einer weiteren Gruppe das funktionelle Outcome zum Zeitpunkt 5 Tage nach zerebraler Ischämie, mittels „pole test“ und „wire hanging“, wie beschrieben (31, 32). Hierfür wurden die Tiere zuvor an das Prozedere habituiert.

Gewebsentnahme und Infarktauswertung

Nach Dekapitation der Tiere in tiefer Narkose wurden die Hirne entnommen und bei -40°C cryofixiert. Pro Hirn wurden aus 5 equidistanten Koronarebenen rostrokaudal $20\mu\text{m}$ dicke Schnitte am Cryomicrotom angefertigt. Nach histologischer Standardfärbung mit Hämatoxylin-Eosin (HE) erfolgte die computergestützte Infarktauswertung. Dabei ergibt sich das direkte Infarktvolumen durch Summierung der Infarktareale bzw. das indirekte Infarktvolumen aus der Differenz von kontralateraler und nicht-infarzierter ipsilateraler Hemisphäre (15).

Rosuvastatin-Plasmaspiegel

Via Schwanzveneninjektion wurde die entsprechende Dosis Rosuvastatin appliziert. Zu den Zeitpunkten 1h, 3h und 5h nach Injektion wurden die Tiere in tiefer Narkose dekapitiert und dabei $600\mu\text{l}$ Blut gewonnen. Nach Aufbereitung der Blutproben wurden in Kooperation mit Frau Dr. Connie Azuyama (AstraZeneca Laboratory, Delaware) die Rosuvastatin-Plasmaspiegel bestimmt (33).

Bestimmung von eNOS, phospho eNOS und phospo Akt

In tiefer Narkose wurde das vordere und mittlere Mediastinum von ventral eröffnet, die Aorta descendens freipräpariert und eine etwa 1cm lange Probe entnommen, die cryofixiert wurde. Auch die Hirne wurden entnommen und cryofixiert (s.o.). Die „Western Blot“ Untersuchungen zur Proteinbestimmung von eNOS und Akt-Kinase in Aorta und Hirn erfolgten wie beschrieben (13) in

Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Laufs (Klinik für Innere Medizin, Universitätsklinikum, Homburg/Saar).

Gewebeaufbereitung und Immunhistochemie

In tiefer Narkose wurde die in-situ Fixation via transkardialer-Perfusion mit 4% Paraformaldehydlösung durchgeführt. Anschließend wurden die Hirne für 48 Stunden in 4% Paraformaldehydlösung postfixiert. Iba1 (ionisiertes Calcium-bindendes Protein1) gilt als etablierter Marker für mikrogliale Zellen (34). Die immunhistologischen Untersuchungen wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Kettenmann (Max-Delbrück-Centrum, Berlin) sowie Herrn Dr. Stumm (Otto-von Guericke Universität, Magdeburg) durchgeführt.

Neuronale, astrozytäre und mikrogliale Zellkultur

Für die *in vitro* Untersuchungen zum Einfluss der Ektonukleotidase CD39 auf die mikrogliale Migration und Aktivierung wurden mikrogliale Zellen aus zerebralen Kortices von *cd39*^{-/-}, C57BL6xSVJ129 Wildtypmäusen sowie Adenosinrezeptor 1 defizienten Mäusen (A1^{-/-}) wie beschrieben präpariert und aufbereitet (35). Die Untersuchungen erfolgten in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Kettenmann.

Die im Kontext der Untersuchung neuroprotektiver Mechanismen von PACAP durchgeführten *in vitro* Versuche erfolgten anhand von primären neuronalen und astrozytären Kulturen, die aus Sprague-Dawley Ratten-Embryonen gewonnen wurden. Das Ischämiemodell, basierend auf Sauerstoff-Glukose-Entzug (OGD), wie auch weitere *in vitro* Analysen erfolgten in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Stumm.

Statistik

Die statistische Auswertung der Daten wurde mittels Student's t-test (zum Vergleich zweier normalverteilter Stichproben) oder ANOVA gefolgt vom Tukey post hoc test durchgeführt. Der Mann-Whitney-Test wurde zum Vergleich nicht parametrischer Daten angewendet. Als statistisch signifikant wurde $P < 0,05$ angenommen.

4 Ergebnisse

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind in den unter 7. der Dissertationsschrift genannten Publikationen enthalten und werden wie folgt zitiert:

Referenz #1: Prinz V, Laufs U, Gertz K, Kronenberg G, Balkaya M, Leithner C, Lindauer U, Endres M (2008) Intravenous rosuvastatin for acute stroke treatment: An animal study, *Stroke* 39, 433-438

Referenz #2: Farber K, Markworth S, Pannasch U, Nolte C, Prinz V, Kronenberg G, Gertz K, Endres M, Bechmann I, Enyoji K, Robson SC, Kettenmann H (2008) The ectonucleotidase *cd39/entpdase1* modulates purinergic-mediated microglial migration, *Glia* 56, 331-341

Referenz #3: Stumm R, Kolodziej A, Prinz V, Endres M, Wu DF, Holt V (2007) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is up-regulated in cortical pyramidal cells after focal ischemia and protects neurons from mild hypoxic/ischemic damage, *J Neurochem* 103,1666-1681

Effekte von intravenösem vs. intraperitonealem Rosuvastatin auf das zerebrale Läsionsvolumen

Nach 60 Minuten Ischämie erhielten die Tiere einmalig Rosuvastatin bzw. die Trägersubstanz i.v. oder i.p.. Ein Zeitfenster von bis zu 6h nach Ischämieinduktion wurde untersucht. Die Tiere wurden 24h nach Ischämieinduktion getötet, das Gewebe aufbereitet und die Infarktvolumina bestimmt.

Die i.v. Applikation von 0,2 und 2mg/kg/KG Rosuvastatin 1h nach Ischämieinduktion zeigte einen protektiven Effekt, was sich in einem reduzierten direkten als auch indirekten Infarktvolumen zeigte. Die Konzentration von 0,02mg/kg/KG war nicht wirksam. Die i.p. Applikation führte lediglich in der Dosierung von 20mg/kg/KG zu einem reduzierten Infarktvolumen (Referenz #1).

In den Versuchen zur Charakterisierung des Zeitfensters erhielten die Tiere zu unterschiedlichen Zeitpunkten (1h, 3h, 4h und 6h) nach Induktion der Ischämie 0,2 und 2mg/kg/KG Rosuvastatin i.v.. Beide Dosierungen zeigten reduzierte direkte und indirekte Infarktvolumina in einem Zeitfenster von bis zu 4h. Bei i.v. Injektion von 0,2mg/kg/KG, 6h nach Ischämieinduktion, zeigte sich keine signifikante Reduktion des Infarktvolumens, wohingegen die Dosierung von 2mg/kg/KG hinsichtlich des indirekten Läsionsvolumen signifikant wirksam, beim direkten

Infarktvolume aber nur ein Trend zu erkennen war. Die i.p. Gabe von 2 und 20mg/kg/KG Rosuvastatin zum Zeitpunkt 3h nach Ischämieinduktion hatte keinen Effekt auf das zerebrale Läsionsvolumen (Referenz #1).

Effekte von Rosuvastatin auf das funktionelle Outcome und Läsionsvolumen zum Zeitpunkt 5 Tage nach zerebraler Ischämie

5 Tage nach 60 Minuten zerebraler Ischämie war bei den Tieren, die mit 2mg/kg/KG Rosuvastatin i.v. behandelt worden waren, ein signifikant besseres funktionelles Outcome zu beobachten. Des Weiteren bestätigte sich hier erneut der protektive Effekt im Sinne einer ausgeprägten Reduktion des Infarktvolume (s. Abbildung 2, Referenz #1).

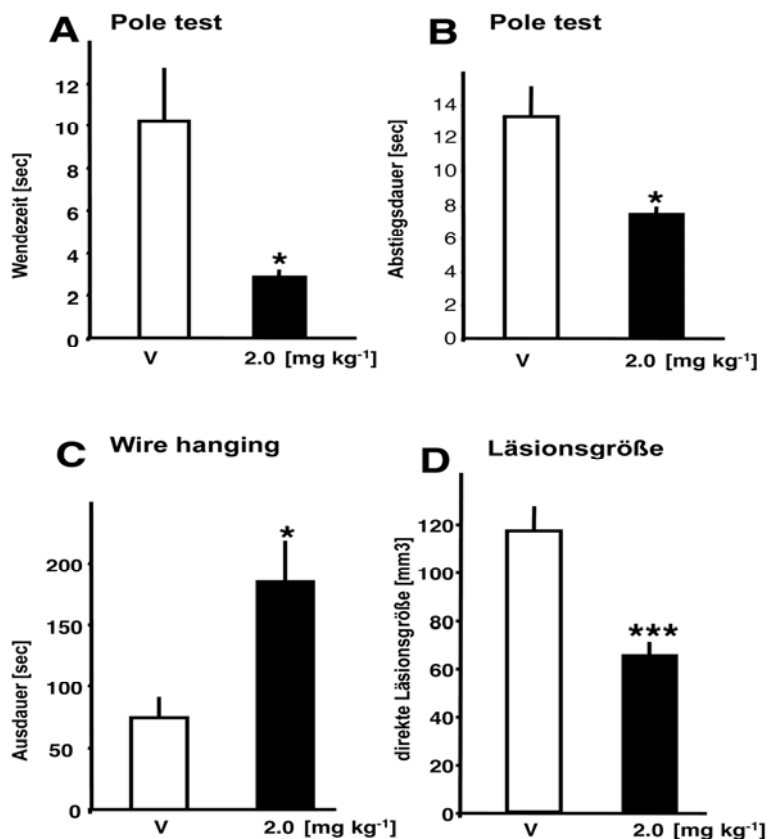


Abbildung 2: Funktionelle Defizite und Läsionsgröße zum Zeitpunkt 5 Tage nach zerebraler Ischämie.

129SV Mäuse wurden 60 Minuten der fokalen zerebralen Ischämie ausgesetzt und erhielten 3h nach Ischämieinduktion Rosuvastatin (2.0mg Kg⁻¹) oder als Kontrolle die Trägersubstanz (V) intravenös. An Tag 5 wurden die Tiere auf das funktionelle Outcome im Pole test (A, B) und Wire hanging (C) untersucht. Anschließend wurden die Tiere getötet und die direkte Läsionsgröße bestimmt (D). n=10 Tiere pro Gruppe, Mittelwert ± SEM; *P<0.05 vs. Kontrolle.

Physiologische Parameter

Mit Rosuvastatin behandelte Tiere zeigten keine Auffälligkeiten physiologischer Parameter im Vergleich zur Kontrollgruppe (Referenz #1).

Rosuvastatin Plasmaspiegel

Neuroprotektion wurde mit einer Peak-Plasma Konzentration kleiner 0,5ng/ml erzielt. Die Rosuvastatin Plasmaspiegel zu verschiedenen Zeitpunkten nach i.v. Injektion sind tabellarisch in Referenz#1 dargestellt.

Effekte von Rosuvastatin auf die Expression von eNOS, phospho-eNOS und Phospho-Akt-Kinase

Im Vergleich zur Kontrollgruppe war die Expression von eNOS, phosphorylierter eNOS und -Akt-Kinase in den Aorten behandelter Tiere bereits 1h nach Injektion einer Konzentration von 0,2 und 2mg/kg/KG Rosuvastatin erhöht. Weiterhin zeigte die „Western Blot“ Analyse von lysiertem Hirngewebe eine Erhöhung von eNOS, phosphorylierter eNOS und -Akt-Kinase 3h sowie 5h nach Injektion von 2mg/kg/KG Rosuvastatin (Referenz #1).

Einfluss der Ectonucleotidase CD39 auf die mikrogliale Migration und Aktivierung *in vitro* und *in vivo*

In vitro führte die Stimulation mit ATP, ADP oder AMP zur Migration mikroglialer Wildtypzellen. Weitere Untersuchungen mit Zellen Adenosin-Rezeptor-defizienter Mäuse (A1^{-/-}) sowie dem Adenosin-Rezeptor-Antagonisten CGS15493 zeigten eine reduzierte Aktivierung mikroglialer Zellen unter Stimulation mit ATP bzw. Kostimulation mit ATP und CGS15493.

In *cd39*^{-/-} Zellen war die Aktivierung durch ATP, ADP, AMP und Adenosin stark herabgesetzt. Durch Koinkubation von ATP oder ADP mit einer löslichen NTPDase konnten *cd39*^{-/-} Zellen aktiviert werden, wohingegen Wildtypzellen inhibiert wurden. Auch die Kostimulation mit ATP und Adenosin führte zu einer Aktivierung der *cd39*^{-/-} Zellen. Die Ergebnisse der elektrophysiologischen Untersuchungen zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen *cd39*^{-/-} und Wildtypzellen hinsichtlich der Expression purinergere Rezeptoren (Referenz #2).

Zur Untersuchung der Rolle von CD39 bei zerebraler Ischämie wurde in *cd39*^{-/-} Mäusen und den dazugehörigen Kontrollen eine fokale zerebrale Ischämie

induziert und das Gewebe zu den Zeitpunkten 24, 48 und 96 h nach Ischämie ausgewertet.

Cd39^{-/-} Mäuse wiesen zu allen Zeitpunkten größere Infarktvolumina auf. Weiterhin zeigten *cd39*^{-/-} Tiere eine reduzierte mikrogliale Invasion in das peri-ischämische Gewebe. Die mikrogliale Proliferation zeigte sich unverändert in *cd39*^{-/-} Tieren (Referenz #2).

Expression von PACAP *in vivo*

Innerhalb weniger Stunden führte die fokale zerebrale Ischämie zu einer ausgeprägten NMDA-Rezeptor abhängigen Hochregulation von PACAP-mRNA in kortikalen Pyramidenzellen, jedoch nicht im Striatum. Die Expression von PACAP fiel unter das Kontrollniveau an Tag 2 und normalisierte sich nach 4 Tagen. Die Expression von VIP-mRNA war im Vergleich gegenläufig reguliert, mit einem Abfall in der Akutphase und einem Anstieg nach 2 Tagen. Weiterhin zeigte sich, dass VIP und PACAP exprimierende Neuronenpopulationen sich nur geringfügig überschneiden. PAC1-mRNA zeigte ein ubiquitäres Verteilungsmuster in Neuronen und Astrozyten und war lediglich am 2. Tag nach Ischämieinduktion geringfügig erhöht (Referenz #3).

Neuroprotektion durch PACAP *in vitro*

Die Stimulation kortikaler Neuronen mit PACAP bedingte via PAC1 eine dosisabhängige Aktivierung von Erk 1/2 sowie p38 MAP Kinase. In Astrozyten war dieser Effekt hingegen nur sehr geringfügig ausgeprägt. Unter hypoxisch/ischämischen Bedingungen zeigte sich eine starke Reduktion der Erk1/2 Aktivität, die mit einer verstärkten Dephosphorylierung des proapoptotischen Proteins Bad assoziiert war.

Die Stimulation mit PACAP27, in einer nanomolaren Konzentration, wirkte der Inaktivierung von Erk1/2 unter 60min Sauerstoff-Glukose-Entzug entgegen, was eine verminderte Aktivierung von Bad und einen reduzierten neuronalen Schaden bedingte. Die neuroprotektiven Effekte von PACAP waren jedoch nur unter diesen milden hypoxisch/ischämischen Konditionen zu beobachten und waren weiterhin unter Co-Stimulation mit UO126, einem Inhibitor des MEK/Erk1/2 Signaltransduktionsweges, aufgehoben.

5 Diskussion

In unseren Studien haben wir unterschiedliche Mechanismen der Neuroprotektion nach Schlaganfall charakterisiert.

Statine bedingen eine Vielzahl direkter vasoprotektiver Effekte, die unabhängig und vor einer signifikanten Senkung des Cholesterinspiegels auftreten (11). Experimentelle Studien haben eindeutig gezeigt, dass eine chronische Statintherapie mit einem verbesserten Outcome nach Schlaganfall assoziiert ist (12, 15). Wie bereits in früheren Studien der Arbeitsgruppe Endres gezeigt wurde, werden die neuroprotektiven Effekte einer Statinvorbehandlung zumindest zum Teil durch die verstärkte Expression der endothelialen NO-Synthase (eNOS) in Endothelzellen hervorgerufen (13, 14). Neben einer verzögerten Hochregulation der eNOS Expression durch Stabilisierung der eNOS mRNA bewirken Statine eine direkte Aktivitätssteigerung der eNOS durch Aktivierung der Protein Akt Kinase und der AMP aktivierten Protein Kinase (AMPK) (36). Die sukzessive Steigerung der NO-Bioverfügbarkeit vermittelt eine verbesserte Endothelfunktion, eine Steigerung des zerebralen Blutflusses, hemmt die Thrombozytenaggregation und wirkt darüber hinaus antiinflammatorisch (11, 14, 37). Auch die Akuttherapie mit Statinen weist in tierexperimentellen Schlaganfallmodellen neuroprotektive Eigenschaften auf, bisher allerdings nur mit einer hohen Dosierung (18) oder in Kombination mit Gewebsplasminogenaktivator (17, 19).

Mittels der intravenösen Applikation von Rosuvastatin beobachteten wir einen neuroprotektiven Effekt mit einer Dosisreduktion um zwei Größenordnungen, im Vergleich zur intraperitoneal applizierten Dosis, wie bereits zuvor von Kilic et al. (18) beschrieben worden war. Darüber hinaus konnten wir den neuroprotektiven Effekt in einem Zeitfenster von bis zu 4h nachweisen. Die Protektion zeigte sich sowohl in einem reduzierten Infarkt volumen, als auch in einem deutlich verbesserten funktionellen Outcome zum Zeitpunkt 5 Tage nach Ischämie.

Die Applikation von Rosuvastatin i.v. in einer Dosierung von 0,2mg/kg/KG führte bereits nach 1h zu einer signifikanten Erhöhung von phosphorylierter Akt Kinase und vermittelte in derselben Dosierung Neuroprotektion. Dahingegen waren die Proteinlevel von eNOS und phosphorylierter eNOS erst bei einer Dosierung von 2mg/kg/KG zum Zeitpunkt 3h signifikant erhöht. Zuletzt führte die Injektion von 0,02mg/kg/KG Rosuvastatin weder zu einer Erhöhung von Akt-Kinase, noch zeigte diese Dosierung einen neuroprotektiven Effekt. Diese Korrelation der Level von

phosphorylierter Akt-Kinase und Neuroprotektion deutet darauf hin, dass die Aktivierung von Akt mit akuter Protektion im Schlaganfallmodell verbunden ist. Die Effekte von Rosuvastatin auf die Expression von Akt und eNOS fanden sich sowohl im peripheren als auch zerebrovaskulären Gefäßbett. Der neuroprotektive Effekt einer chronischen Statinbehandlung ist in eNOS defizienten Mäusen aufgehoben (15). In zukünftigen Untersuchungen wäre es interessant, die Applikation von Statinen zur Akuttherapie der zerebralen Ischämie in eNOS-defizienten Tieren zu untersuchen.

In unseren Studien wurde der neuroprotektive Effekt nach i.v. Applikation von Rosuvastatin bereits mit einem Peak Plasma Level $<0,5\text{ng/ml}$ vermittelt. In Untersuchungen von Kilic et al. wurden die Rosuvastatin Plasmalevel nach i.p. Administration von Rosuvastatin bestimmt. Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen zeigten sich hier eine lineare Pharmakokinetik sowie höhere Plasmaspiegel von Rosuvastatin (18). Die pharmakokinetischen Differenzen von i.v. und i.p. Applikation weisen möglicherweise auf eine akzelerierte hepatische Aufnahme nach i.v. Gabe hin.

Ergebnisse aus retrospektiven Studien weisen darauf hin, dass eine chronische Statinbehandlung vor einem ischämischen Schlaganfall mit einem verbesserten Outcome assoziiert ist (38, 39). Eine Analyse der prospektiv erhobenen Daten der Stroke Prevention with Aggressive Reduction in Cholesterol Levels (SPARCL) Studie ergab, dass Patienten unter Therapie mit Atorvastatin weniger schwere Reinfarkte erlitten als Patienten die Plazebo erhielten (40). Weiterhin wies die mit Atorvastatin behandelte Gruppe eine ausgeprägte Reduktion fataler Schlaganfälle auf (7). In einer randomisiert kontrollierten Pilotstudie (41) zeigten Patienten, die innerhalb der ersten 3-12 Stunden nach Schlaganfall Simvastatin erhielten, ein signifikant besseres neurologisches Outcome nach 90 Tagen. Diese Ergebnisse müssen durch größere Studien abgesichert werden.

Zur Akuttherapie des ischämischen Schlaganfalls sind oral verfügbare Statine nicht sinnvoll (42). Auch zur Vermeidung von adversen Effekten bei abruptem Absetzen einer vorbestehenden Statinbehandlung (43) ist eine intravenöse Applikationsform wünschenswert (42). Da Statine neben der Hochregulation der eNOS auch eine verstärkte Expression von tPA sowie eine verminderte Expression von Plasminogen Aktivator Inhibitor 1 (PAI-1) bewirken (44, 45), ist eine Kombinationstherapie mit Gewebsplasminogenaktivator und Statinen zu erwägen. Klinische Beobachtungsstudien weisen auf ein verbessertes Outcome nach

Thrombolyse bei mit Statinen vorbehandelten Patienten hin (38). Neben der Schlaganfalltherapie konnten bereits auch für andere Krankheitsbilder, bei denen die endotheliale Dysfunktion einen massiven Einfluss auf den Krankheitsverlauf nimmt (wie bei Subarachnoidalblutung oder auch Zustand nach kardiovaskulärem Eingriff), günstige Effekte einer Statintherapie beobachtet werden (46-48). Natürlich muss die i.v. Applikation von Statinen zunächst in Phase I Studien untersucht werden. Hydrophile Statine wie Rosuvastatin sind gut geeignet zur Herstellung einer intravenösen Applikationsform. Die intravenöse Injektion von 8 mg Rosuvastatin wurde bereits an gesunden Probanden untersucht und zeigte keine adversen Effekte (49).

Ein wichtiger, bisher in Schlaganfallmodellen nur unzureichend untersuchter Prozess, ist die Freisetzung von ATP durch gestresste sowie apoptotische Zellen und die daraus resultierenden Effekte auf Mikroglia. In unseren *in vitro* Untersuchungen zum Einfluss der Ektonukleotidase CD39 auf die mikrogliale Inflammation konnten wir zunächst bestätigen (21), dass Mikroglia durch ATP und ADP stimuliert und aktiviert wird. Wie wir weiter zeigen konnten, bedarf es dazu der Kostimulation des purinergen Typ 2 Rezeptors, sowie des Typ 1 Adenosin Rezeptors durch ATP und ADP. Die mikrogliale Ektonukleotidase CD39 spielt hier offensichtlich eine Schlüsselrolle, da sie als Ekto-ATPase ATP zu ADP spaltet und somit das Gleichgewicht von ATP und ADP reguliert. In *cd39* defizienten Zellen führte die alleinige Stimulation mit ATP, wie auch die alleinige Stimulation mit ADP, nicht zur Migration. Das Fehlen dieser Ekto ATPase verursacht hier ein gestörtes Gleichgewicht von ATP und ADP. Durch Kostimulation mit einer löslichen Ektonukleotidase wurde die Aktivierung der *cd39*^{-/-} Mikroglia wieder hergestellt, wohingegen Wildtyp Mikroglia hier inhibiert wurde, was wahrscheinlich auf eine beschleunigte Degradierung von ATP zurückzuführen ist.

Den Einfluss von CD39 *in vivo* untersuchten wir anhand zweier Modelle für neuronalen Zellschaden. Mikrogliale Zellen wurden immunhistologisch mit Iba1 detektiert. In beiden Modellen zeigte sich eine signifikant niedrigere Dichte Iba1 positiver Zellen am Ort der Läsion, was die wesentliche Funktion der Ektonukleotidase CD39 für Migration und Aktivierung von Mikroglia unterstützt. Weiterhin wiesen *cd39*^{-/-} Tiere im Ischämiemodell größere Infarkt volumina und eine erhöhte Letalität nach 60min MCAo auf, was bereits beschrieben worden war (50).

Die Rolle von Mikroglia bei Schlaganfall und anderen neurodegenerativen Prozessen wird kontrovers diskutiert (20). Abhängig vom Aktivierungsgrad können Mikrogliazellen einerseits durch Freisetzung zytotoxischer Moleküle neurodegenerative Prozesse antreiben, andererseits aber über Sekretion von Neutrophinen Neuroprotektion und –regeneration fördern (51). Unsere Ergebnisse, die Assoziation von größeren Infarkt volumina mit reduzierter mikroglialer Einwanderung in das periischämische Gewebe in *cd39-/-* Tieren, unterstützen die neuroprotektive Rolle von Mikroglia bei zerebraler Ischämie. Neben CD39 exprimieren Mikrogliazellen eine weitere Ektonukleotidase, die sogenannte Ekto 5 Nukleotidase (CD73) (52). In weiteren Studien planen wir den Einfluss von CD73 auf die mikrogliale Migration zu untersuchen.

Unsere Studien zu PACAP charakterisieren erstmalig die Expressionsmuster von PACAP, VIP und dem PAC1 Rezeptor im Schlaganfallmodell. *In vivo* induzierte die fokale zerebrale Ischämie eine biphasische, NMDA-abhängige Hochregulation von PACAP in kortikalen pyramidalen Neuronen. Obwohl sich nahezu keine PACAP Synthese im Striatum zeigte, ist davon auszugehen, dass subkortikale Regionen über Projektionen kortikaler pyramidaler Zellen (53) erreicht werden. Durch das ubiquitäre Verteilungsmuster des PACAP spezifischen Rezeptors PAC1 können Neuronen und Astrozyten sowohl in kortikalen als auch striatalen Regionen beeinflusst werden und hier neuroprotektive Effekte vermitteln, wie bereits gezeigt wurde (27).

In vitro führte die Stimulation kortikaler Neuronen mit exogenem PACAP zu einer dosisabhängigen Aktivierung von ERK1/2 und p38 MAP Kinase. Unter hypoxisch/ischämischen Bedingungen wirkte die Stimulation mit PACAP der Inaktivierung von Erk1/2 entgegen, was mit einer reduzierten Dephosphorylierung des proapoptotischen Proteins Bad assoziiert ist. Dieser direkte neuroprotektive Effekt ist jedoch nur unter milden hypoxisch/ischämischen Bedingungen zu beobachten. Weiterhin vermittelt PACAP indirekte neuroprotektive Effekte durch PAC1 induzierte Produktion astrozytärer neurotropher Faktoren.

Zusammenfassung:

Der ischämische Schlaganfall führt über komplexe Schadenskaskaden zum Gewebsuntergang. In unseren Studien haben wir unterschiedliche Mechanismen der exogenen sowie endogenen Neuroprotektion untersucht. Unsere Ergebnisse

tragen hoffentlich zu einem besseren Verständnis dieser Mechanismen bei und dienen so der Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze.

Insbesondere unsere Ergebnisse zur intravenösen Applikation von Rosuvastatin als Akuttherapie der zerebralen Ischämie sind von hoher klinischer Relevanz. In Zusammenschau mit den bisherigen experimentellen und klinischen Daten zu Schlaganfall und Statinen ist der Einsatz von Statinen zur Akuttherapie des ischämischen Schlaganfalls viel versprechend. Zum akuten Einsatz von Statinen zur Behandlung kritisch erkrankter Patienten wie auch Patienten mit Schluckstörungen, die im Rahmen eines Schlaganfalls auftreten können, oder auch Patienten, bei denen ein operativer Eingriff erfolgt, ist die Verfügbarkeit einer intravenösen Applikationsform notwendig und wird bereits diskutiert (42).

6 **Literaturverzeichnis**

1. Murray CJ, Lopez AD (1997) Mortality by cause for eight regions of the world: Global Burden of Disease Study, *Lancet* 349, 1269-1276.
2. Rosamond W, Flegal K, Friday G, Furie K, Go A, Greenlund K, Haase N, Ho M, Howard V, Kissela B, Kittner S, Lloyd-Jones D, McDermott M, Meigs J, Moy C, Nichol G, O'Donnell CJ, Roger V, Rumsfeld J, Sorlie P, Steinberger J, Thom T, Wasserthiel-Smoller S, Hong Y (2007) Heart disease and stroke statistics 2007 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee, *Circulation* 115, e69-171.
3. Meairs S, Wahlgren N, Dirnagl U, Lindvall O, Rothwell P, Baron JC, Hossmann K, Engelhardt B, Ferro J, McCulloch J, Kaste M, Endres M, Koistinaho J, Planas A, Vivien D, Dijkhuizen R, Czlonkowska A, Hagen A, Evans A, De Libero G, Nagy Z, Rastenyte D, Reess J, Davalos A, Lenzi GL, Amarenco P, Hennerici M (2006) Stroke research priorities for the next decade - A representative view of the European scientific community, *Cerebrovasc Dis* 22, 75-82.
4. Endres M, Engelhardt B, Koistinaho J, Lindvall O, Meairs S, Mohr JP, Planas A, Rothwell N, Schwaninger M, Schwab ME, Vivien D, Wieloch T, Dirnagl U (2008) Improving outcome after stroke: overcoming the translational roadblock, *Cerebrovasc Dis* 25, 268-278.
5. Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA (1999) Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view, *Trends Neurosci* 22, 391-397.
6. Nassief A, Marsh JD (2008) Statin therapy for stroke prevention, *Stroke* 39, 1042-1048.
7. Amarenco P, Bogousslavsky J, Callahan A 3rd, Goldstein LB, Hennerici M, Rudolph AE, Silleesen H, Simunovic L, Szarek M, Welch KM, Zivin JA (2006) High-dose atorvastatin after stroke or transient ischemic attack, *N Engl J Med* 355, 549-559.
8. Baigent C, Keech A, Kearney PM, Blackwell L, Buck G, Pollicino C, Kirby A, Sourjina T, Peto R, Collins R, Simes R (2005) Efficacy and safety of cholesterol-lowering treatment: prospective meta-analysis of data from 90,056 participants in 14 randomised trials of statins, *Lancet* 366, 1267-1278.

9. Amarenco P, Labreuche J, Lavallee P, Touboul PJ (2004) Statins in stroke prevention and carotid atherosclerosis: systematic review and up-to-date meta-analysis, *Stroke* 35, 2902-2909.
10. Ridker PM, Danielson E, Fonseca FA, Genest J, Gotto AM Jr, Kastelein JJ, Koenig W, Libby P, Lorenzatti AJ, Macfadyen JG, Nordestgaard BG, Shepherd J, Willerson JT, Glynn RJ (2008) Rosuvastatin to Prevent Vascular Events in Men and Women with Elevated C-Reactive Protein, *N Engl J Med* 359, 2195-2207.
11. Liao JK, Laufs U (2005) Pleiotropic effects of statins, *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 45, 89-118.
12. Endres M (2005) Statins and stroke, *J Cereb Blood Flow Metab* 25, 1093-1110.
13. Laufs U, La Fata V, Plutzky J, Liao JK (1998) Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors, *Circulation* 97, 1129-1135.
14. Endres M, Laufs U, Liao JK, Moskowitz MA (2004) Targeting eNOS for stroke protection, *Trends Neurosci* 27, 283-289.
15. Endres M, Laufs U, Huang Z, Nakamura T, Huang P, Moskowitz MA, Liao JK (1998) Stroke protection by 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA reductase inhibitors mediated by endothelial nitric oxide synthase, *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 8880-8885.
16. Laufs U, Gertz K, Dirnagl U, Bohm M, Nickenig G, Endres M (2002) Rosuvastatin, a new HMG-CoA reductase inhibitor, upregulates endothelial nitric oxide synthase and protects from ischemic stroke in mice, *Brain Res* 942, 23-30.
17. Zhang L, Zhang ZG, Ding GL, Jiang Q, Liu X, Meng H, Hozeska A, Zhang C, Li L, Morris D, Zhang RL, Lu M, Chopp M (2005) Multitargeted effects of statin-enhanced thrombolytic therapy for stroke with recombinant human tissue-type plasminogen activator in the rat, *Circulation* 112, 3486-3494.
18. Kilic U, Bassetti CL, Kilic E, Xing H, Wang Z, Hermann DM (2005) Post-ischemic delivery of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor rosuvastatin protects against focal cerebral ischemia in mice via inhibition of extracellular-regulated kinase-1/-2, *Neuroscience* 134, 901-906.

19. Sironi L, Cimino M, Guerrini U, Calvio AM, Lodetti B, Asdente M, Balduini W, Paoletti R, Tremoli E (2003) Treatment with statins after induction of focal ischemia in rats reduces the extent of brain damage, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23, 322-327.
20. Hanisch UK, Kettenmann H (2007) Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain, *Nat Neurosci* 10, 1387-1394.
21. Honda S, Sasaki Y, Ohsawa K, Imai Y, Nakamura Y, Inoue K, Kohsaka S (2001) Extracellular ATP or ADP induce chemotaxis of cultured microglia through Gi/o-coupled P2Y receptors, *J Neurosci* 21, 1975-1982.
22. Farber K, Kettenmann H (2006) Purinergic signaling and microglia, *Pflugers Arch* 452, 615-621.
23. Braun N, Sevigny J, Robson SC, Enjyoji K, Guckelberger O, Hammer K, Di Virgilio F, Zimmermann, H (2000) Assignment of ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase-1/cd39 expression to microglia and vasculature of the brain, *Eur J Neurosci* 12, 4357-4366.
24. Joo KM, Chung YH, Kim MK, Nam RH, Lee BL, Lee KH, Cha CI (2004) Distribution of vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide receptors (VPAC1, VPAC2 and PAC1 receptor) in the rat brain, *J Comp Neurol* 476, 388-413.
25. Arimura A (1992) Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP): discovery and current status of research, *Regul Pept* 37, 287-303.
26. Dejda A, Sokolowska P, Nowak JZ (2005) Neuroprotective potential of three neuropeptides PACAP, VIP and PHI, *Pharmacol Rep* 57, 307-320.
27. Ohtaki H, Nakamachi T, Dohi K, Aizawa Y, Takaki A, Hodoyama K, Yofu S, Hashimoto H, Shintani N, Baba A, Kopf M, Iwakura Y, Matsuda K, Arimura A, Shioda S (2006) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) decreases ischemic neuronal cell death in association with IL-6, *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 7488-7493.
28. Reglodi D, Somogyvari-Vigh A, Vigh S, Kozicz T, Arimura A (2000) Delayed systemic administration of PACAP38 is neuroprotective in transient middle cerebral artery occlusion in the rat, *Stroke* 31, 1411-1417.

29. Enjyoji K, Sevigny J, Lin Y, Frenette PS, Christie PD, Esch JS 2nd, Imai M, Edelberg JM, Rayburn H, Lech M, Beeler DL, Csizmadia E, Wagner D D, Robson SC, Rosenberg RD (1999) Targeted disruption of cd39/ATP diphosphohydrolase results in disordered hemostasis and thromboregulation, *Nat Med* 5, 1010-1017.
30. Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, Nishimura MC, Davis RL, Bartkowski H (1986) Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination, *Stroke* 17, 472-476.
31. Matsuura K, Kabuto H, Makino H, Ogawa N (1997) Pole test is a useful method for evaluating the mouse movement disorder caused by striatal dopamine depletion, *J Neurosci Methods* 73, 45-48.
32. Gertz K, Priller J, Kronenberg G, Fink KB, Winter B, Schrock H, Ji S, Milosevic M, Harms C, Bohm M, Dirnagl U, Laufs U, Endres M (2006) Physical activity improves long-term stroke outcome via endothelial nitric oxide synthase-dependent augmentation of neovascularization and cerebral blood flow, *Circ Res* 99, 1132-1140.
33. Hull CK, Penman AD, Smith CK, Martin PD (2002) Quantification of rosuvastatin in human plasma by automated solid-phase extraction using tandem mass spectrometric detection, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 772, 219-228.
34. Ito D, Imai Y, Ohsawa K, Nakajima K, Fukuuchi Y, Kohsaka S (1998) Microglia-specific localisation of a novel calcium binding protein, Iba1, *Brain Res Mol Brain Res* 57, 1-9.
35. Prinz M, Kann O, Draheim HJ, Schumann RR, Kettenmann H, Weber J R, Hanisch UK (1999) Microglial activation by components of grampositive and -negative bacteria: distinct and common routes to the induction of ion channels and cytokines, *J Neuropathol Exp Neurol* 58, 1078-1089.
36. Sun W, Lee TS, Zhu M, Gu C, Wang Y, Zhu Y, Shyy JY (2006) Statins activate AMP-activated protein kinase in vitro and in vivo, *Circulation* 114, 2655-2662.

37. Endres M (2006) Statins: potential new indications in inflammatory conditions, *Atheroscler Suppl* 7, 31-35.
38. Alvarez-Sabin J, Huertas R, Quintana M, Rubiera M, Delgado P, Ribo M, Molina CA, Montaner J (2007) Prior statin use may be associated with improved stroke outcome after tissue plasminogen activator, *Stroke* 38, 1076-1078.
39. Marti-Fabregas J, Gomis M, Arboix A, Aleu A, Pagonabarraga J, Belvis R, Cocho D, Roquer J, Rodriguez A, Garcia MD, Molina-Porcel L, Diaz-Manera J, Marti-Vilalta JL (2004) Favorable outcome of ischemic stroke in patients pretreated with statins, *Stroke* 35, 1117-1121.
40. Goldstein LB, Amarenco P, Callahan M, Hennerici M, Silleesen H, Szarek M, Zivin J, Welch KMA, on behalf of the SPARCL investigators. (2006) Effect of statins on stroke severity, In *American Neurological Association 131st Annual Meeting; October 8-11, Chicago, IL*. pp Abstract T-60
41. Montaner J, Chacon P, Krupinski J, Rubio F, Millan M, Molina CA, Hereu P, Quintana M, Alvarez-Sabin J (2008) Simvastatin in the acute phase of ischemic stroke: a safety and efficacy pilot trial, *Eur J Neurol* 15, 82-90.
42. Endres M, Laufs U (2008) The Medical Case for the Development of an Intravenous Statin Formulation - Beyond Ischemic Stroke, *Cerebrovasc Dis* 25, 593-594.
43. Endres M, Laufs U (2006) Discontinuation of statin treatment in stroke patients, *Stroke* 37, 2640-2643.
44. Wiesbauer F, Kaun C, Zorn G, Maurer G, Huber K, Wojta J (2002) HMG-CoA reductase inhibitors affect the fibrinolytic system of human vascular cells in vitro: a comparative study using different statins, *Br J Pharmacol* 135, 284-292.
45. Asahi M, Huang Z, Thomas S, Yoshimura S, Sumii T, Mori T, Qiu J, Amin-Hanjani S, Huang PL, Liao JK, Lo EH, Moskowitz MA (2005) Protective effects of statins involving both eNOS and tPA in focal cerebral ischemia, *J Cereb Blood Flow Metab* 25, 722-729.
46. Tseng MY, Czosnyka M, Richards H, Pickard JD, Kirkpatrick PJ (2005) Effects of acute treatment with pravastatin on cerebral vasospasm, autoregulation, and delayed ischemic deficits after aneurysmal

subarachnoid hemorrhage: a phase II randomized placebo-controlled trial, *Stroke* 36, 1627-1632.

47. Tseng MY, Hutchinson PJ, Czosnyka M, Richards H, Pickard JD, Kirkpatrick PJ (2007) Effects of acute pravastatin treatment on intensity of rescue therapy, length of inpatient stay, and 6-month outcome in patients after aneurysmal subarachnoid hemorrhage, *Stroke* 38, 1545-1550.
48. Patti G, Chello M, Candura D, Pasceri V, D'Ambrosio A, Covino E, Di Sciascio G (2006) Randomized trial of atorvastatin for reduction of postoperative atrial fibrillation in patients undergoing cardiac surgery: results of the ARMYDA-3 (Atorvastatin for Reduction of MYocardial Dysrhythmia After cardiac surgery) study, *Circulation* 114, 1455-1461.
49. Martin PD, Warwick MJ, Dane AL, Brindley C, Short T (2003) Absolute oral bioavailability of rosuvastatin in healthy white adult male volunteers, *Clin Ther* 25, 2553-2563.
50. Pinsky DJ, Broekman MJ, Peschon JJ, Stocking KL, Fujita T, Ramasamy R, Connolly ES Jr, Huang J, Kiss S, Zhang Y, Choudhri TF, McTaggart R A, Liao H, Drosopoulos JH, Price VL, Marcus AJ, Maliszewski CR (2002) Elucidation of the thromboregulatory role of CD39/ectoapyrase in the ischemic brain, *J Clin Invest* 109, 1031-1040.
51. Hanisch UK (2002) Microglia as a source and target of cytokines, *Glia* 40, 140-155.
52. Braun N, Lenz C, Gillardon F, Zimmermann M, Zimmermann H (1997) Focal cerebral ischemia enhances glial expression of ecto-5'-nucleotidase, *Brain Res* 766, 213-226.
53. Bannister AP (2005) Inter- and intra-laminar connections of pyramidal cells in the neocortex, *Neurosci Res* 53, 95-103.

7 **Verwendete Publikationen und Impactfaktoren**

Impactfaktoren der verwendeten Publikationen
(kumulativer Impactfaktor, Stand 2007: 16.13)

Referenz #1: Prinz V, Laufs U, Gertz K, Kronenberg G, Balkaya M, Leithner C, Lindauer U, Endres M (2008) Intravenous rosuvastatin for acute stroke treatment: An animal study, *Stroke* 39, 433-438

IF: 6.30

Referenz #2: Farber K, Markworth S, Pannasch U, Nolte C, Prinz V, Kronenberg G, Gertz K, Endres M, Bechmann I, Enjyoji K, Robson SC, Kettenmann H (2008) The ectonucleotidase *cd39/entpdase1* modulates purinergic-mediated microglial migration, *Glia* 56, 331-341

IF: 5.38

Referenz #3: Stumm R, Kolodziej A, Prinz V, Endres M, Wu DF, Holtt V (2007) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is up-regulated in cortical pyramidal cells after focal ischemia and protects neurons from mild hypoxic/ischemic damage, *J Neurochem* 103,1666-1681

IF: 4.45

Anhang

Eidesstattliche Erklärung

Ich, Vincent Matthias Prinz, geboren am 7. August 1979 in Herdecke, erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Promotionsschrift selbstständig und ohne die unerlaubte Hilfe Dritter verfasst habe, sowie die verwendete Literatur und Hilfsmittel stets angegeben sind. Die Arbeit ist keine Kopie anderer Arbeiten, auch nicht in Teilen.

Vincent Prinz

Berlin, 19.05.2009

Anteilserklärung

Berlin, 19.05.2009

Der selbstständige Anteil, den ich, Vincent Matthias Prinz, geb. am 07.08.1979, an der Erstellung der im Anhang der Dissertationsschrift aufgeführten Publikationen habe, setzt sich prozentual wie folgt zusammen:

Referenz #1: 60%

Prinz V, Laufs U, Gertz K, Kronenberg G, Balkaya M, Leithner C, Lindauer U, Endres M (2008) Intravenous rosuvastatin for acute stroke treatment: An animal study, *Stroke* 39, 433-438

Beitrag im Einzelnen: Planung und Durchführung aller in vivo Versuche zur Akuttherapie der fokalen zerebralen Ischämie im Mausmodell; i.v. und i.p. Applikation von Rosuvastatin; Gewebsentnahme, HE Standardfärbung und Infarktauswertung; Blutentnahme und Plasmapräparation; Assistenz bei der funktionellen Testung

Referenz #2: 15%

Farber K, Markworth S, Pannasch U, Nolte C, Prinz V, Kronenberg G, Gertz K, Endres M, Bechmann I, Enjyoji K, Robson SC, Kettenmann H (2008) The ectonucleotidase cd39/entpdase1 modulates purinergic-mediated microglial migration, *Glia* 56, 331-341

Beitrag im Einzelnen: Planung und Durchführung der operativen Ischämieinduktion im Mausmodell; Gewebsentnahme, HE Standardfärbung und Infarktauswertung; transkardiale Gewebefixation, i.p. Injektionen mit BrdU

Referenz #3: 20%

Stumm R, Kolodziej A, Prinz V, Endres M, Wu DF, Hollt V (2007) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is up-regulated in cortical pyramidal cells after focal ischemia and protects neurons from mild hypoxic/ischemic damage, *J Neurochem* 103,1666-1681

Beitrag im Einzelnen: Planung und Durchführung der operativen Ischämieinduktion im Mausmodell; transkardiale Gewebefixation; Gewebsentnahme

Vincent Prinz

Prof. Dr. med. Matthias Endres

Lebenslauf

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

Publikationsliste

Originalarbeiten

Prinz V, Laufs U, Gertz K, Kronenberg G, Balkaya M, Leithner C, Lindauer U, Endres M (2008) Intravenous rosuvastatin for acute stroke treatment: An animal study, *Stroke* 39, 433-438

Farber K, Markworth S, Pannsch U, Nolte C, Prinz V, Kronenberg G, Gertz K, Endres M, Bechmann I, Enjoji K, Robson SC, Kettenmann H (2008) The ectonucleotidase *cd39/entpdase 1* modulates purinergic-mediated microglial migration, *Glia* 56, 331-341

Stumm R, Kolodziej A, Prinz V, Endres M, Wu DF, Holtt V (2007) Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is up-regulated in cortical pyramidal cells after focal ischemia and protects neurons from mild hypoxic/ischemic damage, *J Neurochem* 103, 1666-1681

Ziegler G, Harhausen D, Schepers C, Hoffmann O, Röhr C, Prinz V, König J, Lehrach H, Nietfeld W, Trendelenburg G (2007) TLR2 has a detrimental role in mouse transient focal ischemia, *Biochemical and Biophysical Research Communications* 7, 359, 574-579

Harhausen D, Prinz V, Ziegler G, Gertz K, Endres M, Lehrach H, Stahel P, Dirnagl U, Nietfeld W, Trendelenburg G. CD93/AA4.1 – a novel endogenous neuroprotectant in murine focal cerebral ischemia, *in preparation*

Kiessling C, Müller T, Becker-Witt C, Begenau J, Prinz V, Schleiermacher S (2003) A Medical Humanities Special Study Module on Principles of Medical Theory and Practice at the Charité, Humboldt University, Berlin, Germany, *Academic Medicine*, 78, 10, 1031-1035

Review

Prinz V, Endres M (2008) The Acute (cerebro) vascular effects of statins, *Anesthesia and Analgesia*, *in press*

Buchbeiträge

Endres M, Prinz V (2008) Neurologische Intensivmedizin. In: Dietel M, Suttorp N, Zeitz M (Hg), Harrisons Innere Medizin: Deutsche Ausgabe, Bd. II (269), 2118-2129

Endres M, Prinz V (2008) Zerebrovaskuläre Erkrankungen. In: Dietel M, Suttorp N, Zeitz M (Hg), Harrisons Innere Medizin: Deutsche Ausgabe, Bd. II (364), 3105-3134

Prinz V, Endres M Modeling of focal cerebral ischemia in rodents: introduction and overview. In Vorbereitung für: Dirnagl U (Hg), Rodent Models of Stroke

Prinz V, Endres M Filament models. In Vorbereitung für: Dirnagl U (Hg), Rodent Models of Stroke

Poster

Prinz V, Kronenberg G, Müller S, Balkaya M , Gertz K, Leithner C, Hoertnagl H, Endres M: Histological and MRI characteristics of exofocal postischemic neuronal death, following middle cerebral artery occlusion in mice, *Brain Conference, 2009*

Custodis F, Gertz K, Prinz V, Balkaya M, Böhm M, Endres M, Laufs U: Herzfrequenzreduktion reduziert Effekte von chronischem Stress und Herzfrequenz auf das Infarkt volumen ischämischer Schlaganfälle, die Endothelfunktion und vaskulären oxidativen Stress. *Kongress der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie - Herz- und Kreislaufforschung, 2009*

Kronenberg G, Balkaya M, Prinz V, Gertz K, Ji S, Hoertnagl H, Waeber C, Stumm R, Endres M: Citalopram confers neuroprotection in a mouse model of post stroke depression, *Brain Conference, 2009*

Enzmann GU, Prinz V, Endres M, Engelhardt B: Role of cell adhesion molecules in leukocyte recruitment across the blood brain barrier during reperfusion injury, *Neuroscience, 2008 Washington, D.C.*

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Ulrich Dirnagl für die Möglichkeit zur Durchführung meiner Promotionsarbeit im Institut für experimentelle Neurologie.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Matthias Endres für die Überlassung des Promotionsthemas sowie die exzellente Betreuung und stetige Förderung meiner Arbeit.

Herrn Prof. Dr. med. Ulrich Laufs (Klinik für Innere Medizin, Universität des Saarlands) danke ich für die Erhebung der *in vitro* Daten.

Frau Dr. med. Karen Gertz möchte ich für die ausgezeichnete Einführung in die Laborarbeit danken.

Darüber hinaus gilt mein Dank den Arbeitskollegen der AG Endres, Dr. med. Karen Gertz, Prof. Dr. med. Golo Kronenberg und Mustafa Balkaya für die gute Zusammenarbeit.

Nicht zuletzt gilt mein besonderer Dank auch meinen Eltern, die mich unermüdlich mit Rat und Tat unterstützen.