

Aus der Klinik für Neurologie  
(Prof. Dr. med. M. Bähr)  
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

# **Der Einfluss von Lithium auf die Bluthirnschrankenintegrität nach zerebraler Ischämie der Maus**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizinischen Fakultät der  
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

**Matteo Haupt**

aus

Bremen

Göttingen 2021

Dekan: Prof. Dr. W. Brück

### **Betreuungsausschuss**

Betreuer:

Ko-Betreuer: PD Dr. B. Kis

### **Prüfungskommission**

Referent: Prof. Dr. T. R. Döppner, M.Sc.

Ko-Referent/in: Prof. Dr. A. Flügel

Drittreferent/in: Prof. Dr. M. Schön

Datum der mündlichen Prüfung: 12.01.2022

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel „Der Einfluss von Lithium auf die Bluthirnschrankenintegrität nach zerebraler Ischämie der Maus“ eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den 21.01.2021

.....

(Unterschrift)

Die Methoden und Ergebnisse, auf denen die vorliegende Arbeit basiert, wurden teilweise publiziert:

**Haupt, M.**, Zechmeister, B., Bosche, B., Lieschke, S., Zheng, X., Zhang, L., Venkataramani, V., Jin, F., Hein, K., Weber, M.S., Hermann, D.M., Bähr, M., Doeppner, T.R., 2020. Lithium enhances post-stroke blood-brain barrier integrity, activates the MAPK/ERK1/2 pathway and alters immune cell migration in mice. *Neuropharmacology* 181, 108357.

**Haupt, M.\***, Zheng, X.\*, Kuang, Y., Lieschke, S., Janssen, L., Bosche, B., Jin, F., Hein, K., Kilic, E., Venkataramani, V., Hermann, D.M., Bähr, M., Doeppner, T.R., 2020. Lithium modulates miR-1906 levels of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles contributing to poststroke neuroprotection by toll-like receptor 4 regulation. *Stem Cells Transl. Med.* sctm.20-0086 (Online ahead of print).

\*Die Autoren haben gleichermaßen zu dieser Arbeit beigetragen.

# Inhaltsverzeichnis

|   |            |
|---|------------|
| <b>Abbildungsverzeichnis .....</b>  | <b>III</b> |
| <b>Tabellenverzeichnis.....</b>   | <b>IV</b>  |
| <b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>  | <b>V</b>   |
| <b>1 Einleitung .....</b>   | <b>1</b>   |
| 1.1 Definition, Epidemiologie, Ätiologie und Therapie des ischämischen Schlaganfalls .....  | 1          |
| 1.2 Pathophysiologie des akuten ischämischen Schlaganfalls.....   | 2          |
| 1.3 Aufbau und Funktion der Bluthirnschranke bei ischämischem Schlaganfall.....   | 4          |
| 1.4 Klinische Anwendungen von Lithium .....   | 6          |
| 1.5 Präklinische neuroprotektive Effekte von Lithium.....   | 8          |
| 1.6 Lithium bei ischämischem Schlaganfall.....  | 10         |
| 1.7 Zielsetzung und Hypothesenbildung.....  | 12         |
| <b>2 Material und Methoden.....</b>   | <b>13</b>  |
| 2.1 Material.....   | 13         |
| 2.2 Methoden.....   | 22         |
| 2.2.1 Kultivierung, Behandlung und Probenaufbereitung in der Zellkultur .....   | 22         |
| 2.2.2 Bestimmung der metabolischen Aktivität von Zellen.....  | 22         |
| 2.2.3 Versuchstierhaltung.....  | 23         |
| 2.2.4 Tierexperimentelle Gruppen und deren Behandlungsregime.....   | 23         |
| 2.2.5 Okklusion der <i>Arteria cerebri media</i> (MCAO) mithilfe des Fadenokklusionsmodells.....                                      | 24         |
| 2.2.6 Evans-Blue-Extravasation .....  | 25         |
| 2.2.7 Western-Blot-Analyse .....  | 25         |
| 2.2.8 Immunfluoreszenzfärbung.....  | 26         |
| 2.2.9 Zymographie.....  | 27         |
| 2.2.10 Durchflusszytometrie.....  | 28         |
| 2.2.11 Statistische Auswertung .....  | 29         |
| <b>3 Ergebnisse .....</b>   | <b>30</b>  |
| 3.1 Lithium erhöht die Überlebensfähigkeit der Zellen und steigert die P-gp- und TJ-Protein-Expression nach OGD <i>in vitro</i> ..... | 30         |
| 3.2 Lithium reduziert die postischämische Durchlässigkeit der Bluthirnschranke .....  | 32         |
| 3.3 Der postischämische Verlust der TJ-Proteine ZO1, Occludin und Claudin-1 wird durch Lithium reduziert.....                         | 33         |
| 3.4 Lithium reduziert Caveolin-1-unabhängig die postischämische Aktivität der MMP-9.....  | 36         |
| 3.5 Lithium aktiviert den MAPK-/ERK1/2-Signalweg durch gesteigerte Phosphorylierung....   | 39         |
| 3.6 Die Inhibition der Aktivierung des MAPK-/ERK1/2-Signalwegs hebt die lithiuminduzierten Effekte auf die Bluthirnschranke auf ..... | 42         |
| 3.7 Die postischämische Aktivierung der Mikroglia wird durch Lithium reduziert .....  | 44         |
| 3.8 Lithium moduliert die postischämische Expression der endothelialen Oberflächenproteine ICAM-1 und P-gp.....                       | 45         |

---

|     |   |           |
|-----|---|-----------|
| 3.9 | Lithium moduliert die frühe Immunzellmigration in das Infarktgewebe ..... | 46        |
| 4   | <b>Diskussion</b> .....   | <b>49</b> |
| 5   | <b>Zusammenfassung</b> .....  | <b>57</b> |
| 6   | <b>Literaturverzeichnis</b> .....   | <b>59</b> |

## Abbildungsverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| Abbildung 1: Gatingstrategie mit den ausgewählten Antikörpern als Immunzellmarker für die Durchflusszytometrie. ....   | 28 |
| Abbildung 2: Die Lithiumbehandlung von Endothelzellen <i>in vitro</i> reduziert den Zelltod und führt zu einer erhöhten Expression des P-Glykoproteins (P-gp) nach Sauerstoff-Glukose-Entzug (OGD). ....   | 30 |
| Abbildung 3: Die Lithiumbehandlung von Endothelzellen <i>in vitro</i> reduziert den Zelltod und führt zu einer erhöhten Expression der <i>Tight-Junction</i> (TJ)-Proteine <i>Zonula occludens-1</i> (ZO1) und Occludin nach Sauerstoff-Glukose-Entzug (OGD). .... | 31 |
| Abbildung 4: Lithium reduziert die Durchlässigkeit der Bluthirnschranke nach zerebraler Ischämie der Maus. ....  | 32 |
| Abbildung 5: Lithium führt zu einer erhöhten Expression des <i>Tight-Junction</i> (TJ)-Proteins Claudin-1 nach zerebraler Ischämie der Maus. ....  | 33 |
| Abbildung 6: Repräsentative Immunfluoreszenz-Ko-Färbungen von Claudin-1 mit <i>Cluster of differentiation</i> (CD) 31, <i>Glial fibrillary acidic protein</i> (GFAP) oder NeuN. ....   | 34 |
| Abbildung 7: Lithium erhöht die Expression der <i>Tight-Junction</i> (TJ)-Proteine <i>Zonula occludens-1</i> (ZO1) und Occludin nach zerebraler Ischämie der Maus. ....  | 35 |
| Abbildung 8: Lithium reduziert die Aktivität der Matrix-Metalloprotease 9 (MMP-9) unabhängig von Caveolin-1 nach zerebraler Ischämie der Maus. ....  | 37 |
| Abbildung 9: Repräsentative Immunfluoreszenz-Ko-Färbungen von Caveolin-1 mit <i>Cluster of differentiation</i> (CD) 31, <i>Glial fibrillary acidic protein</i> (GFAP) oder NeuN. ....  | 39 |
| Abbildung 10: Lithium moduliert die <i>Rapidly-accelerated-fibrosarcoma</i> (c-Raf)-Phosphorylierung nach zerebraler Ischämie der Maus. ....   | 40 |
| Abbildung 11: Lithium moduliert die <i>Extracellular-signal-regulated-kinases</i> (ERK1/2)-Phosphorylierung und die Expression von B-Zell-Lymphom 2 (Bcl-2) nach zerebraler Ischämie der Maus. ....  | 41 |
| Abbildung 12: Der MEK1/2-Inhibitor U0126 hebt die Effekte von Lithium auf die Bluthirnschrankenintegrität nach zerebraler Ischämie der Maus auf. ....  | 43 |
| Abbildung 13: Lithium reduziert die postischämische Aktivierung der Mikroglia. ....  | 44 |
| Abbildung 14: Lithium reduziert die postischämische Expression der Oberflächenproteine <i>Protein intercellular adhesion molecule 1</i> (ICAM-1) und des P-Glykoproteins (P-gp). ....  | 45 |
| Abbildung 15: Repräsentative Rohdaten der Durchflusszytometrie. ....   | 47 |
| Abbildung 16: Lithium moduliert die postischämische Infiltration von Immunzellen aus dem Blut in das Hirnparenchym. ....   | 48 |

## Tabellenverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| Tabelle 1: Chemikalien .....                                   | 13 |
| Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien .....                         | 15 |
| Tabelle 3: Geräte .....  | 15 |
| Tabelle 4: Software.....                                       | 16 |
| Tabelle 5: Antikörper für Western-Blot-Analysen.....           | 17 |
| Tabelle 6: Antikörper für Immunfluoreszenzfärbungen .....      | 17 |
| Tabelle 7: Antikörper für die Durchflusszytometrie .....       | 18 |
| Tabelle 8: Lösungen.....                                       | 18 |
| Tabelle 9: Medien und Reagenzien für die Zellkultur .....      | 21 |
| Tabelle 10: Behandlungsregime der experimentellen Gruppen..... | 24 |



## Abkürzungsverzeichnis

|              |  |
|--------------|--|
| AD           | Alzheimer-Demenz   |
| AMPA         | Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure                 |
| ATP          | Adenosintriphosphat  |
| Bcl-2        | B-Zell-Lymphom 2   |
| BDNF         | <i>Brain-derived neurotrophic factor</i>                         |
| Caspase      | <i>CysteinyI-aspartate specific protease</i>                     |
| CD           | <i>Cluster of differentiation</i>                                |
| c-Raf        | <i>Rapidly accelerated fibrosarcoma</i>                          |
| DGN          | Deutsche Gesellschaft für Neurologie                             |
| DMSO         | Dimethylsulfoxid   |
| ER           | Endoplasmatisches Retikulum                                      |
| ERK1/2       | <i>Extracellular-signal regulated kinases</i>                    |
| FACS         | <i>Fluorescence-activated cell sorting</i>                       |
| FMA          | Fugl-Meyer-Bewertungsskala                                       |
| GABA         | $\gamma$ -Aminobuttersäure                                       |
| GFAP         | <i>Glial fibrillary acidic protein</i>                           |
| GSK3 $\beta$ | Glykogensynthasekinase 3 beta                                    |
| i.p.         | Intraperitoneal  |
| i.v.         | Intravenös   |
| IBA-1        | <i>Calcium-binding adapter molecule 1</i>                        |
| ICA          | <i>Arteria carotis interna</i>                                   |
| ICAM-1       | <i>Intercellular adhesion molecule 1</i>                         |
| IL           | Interleukin  |
| Ly6G         | <i>Lymphocyte antigen 6 complex locus G6D</i>                    |
| MCAO         | Okklusion der <i>Arteria cerebri media</i>                       |
| MCA          | <i>Arteria cerebri media</i>                                     |
| MMP          | Matrix-Metalloproteasen  |
| mNIHSS       | <i>Modified National Institutes of Health Stroke Scale/Score</i> |
| MP           | Morbus Parkinson   |

---

|          |  |
|----------|--|
| MTT      | <i>Thiazolyl blue tetrazolium bromide</i>              |
| NMDA     | N-Methyl-d-Aspartat                                    |
| NVU      | <i>Neurovascular unit</i>                              |
| OGD      | Sauerstoff-Glukose-Entzug                              |
| PBS      | Phosphatgepufferte Salzlösung                          |
| p-ERK1/2 | <i>Phosphor-extracellular-signal regulated kinases</i> |
| P-gp     | P-Glykoprotein   |
| p-c-Raf  | <i>Phosphor-rapidly accelerated fibrosarcoma</i>       |
| PVDF     | Polyvinylidenfluorid                                   |
| ROI      | <i>Region of Interest</i>                              |
| ROS      | Reaktive Sauerstoffspezies                             |
| SHT      | Schädel-Hirn-Trauma                                    |
| TIA      | Transitorische ischämische Attacke                     |
| TJ       | <i>Tight Junction</i>                                  |
| TNF      | Tumornekrosefaktor                                     |
| ZO1      | <i>Zonula occludens-1</i>                              |

# 1 Einleitung

## 1.1 Definition, Epidemiologie, Ätiologie und Therapie des ischämischen Schlaganfalls

Der Schlaganfall ist durch die World Health Organization definiert als sich rasch entwickelnde klinische Zeichen fokaler oder globaler Störungen der zerebralen Funktion, die mehr als 24 Stunden anhalten oder zum Tode führen, ohne andere erkennbare Ursache außer einer vaskulären (Warlow 1998).

Schlaganfälle werden in hämorrhagische Schlaganfälle, die durch die Ruptur geirnversorgender Gefäße gekennzeichnet sind, und in ischämische Schlaganfälle, bei denen es zum Verschluss geirnversorgender Gefäße kommt, unterteilt (Grysiewicz et al. 2008). Die in beiden Fällen resultierende Minderversorgung durch die beeinträchtigte Perfusion der betroffenen Hirnareale kann das Auftreten von fokal-neurologischen Defiziten zur Folge haben. Vom Schlaganfall abzugrenzen ist die transitorische ischämische Attacke (TIA), bei der sich die klinischen Ausfallerscheinungen innerhalb von 24 Stunden vollständig zurückbilden (Easton et al. 2009). Allerdings erleiden 8 – 10 % der Patienten mit aufgetretener TIA innerhalb der ersten 90 Folgetage einen Schlaganfall (Johnston et al. 2000). Der ischämische Schlaganfall, der etwa 85 % aller Schlaganfälle ausmacht (Benjamin et al. 2019), kann nach der TOAST-Klassifikation ätiologisch differenziert werden (Adams et al. 1993). Hierbei wird zwischen kardialer Embolie, Verschluss kleiner Arterien, Arteriosklerose großer Arterien, anderer Ursache und unbestimmter Ursache unterschieden (Adams et al. 1993). Die vorliegende Arbeit hat im Folgenden ausschließlich den ischämischen Schlaganfall zum Thema.

Epidemiologisch betrachtet zählt der Schlaganfall zu den fünf häufigsten Todesursachen in den USA (Krishnamurthi et al. 2015) und ist die häufigste Ursache für Behinderungen weltweit (Benjamin et al. 2019). In Deutschland beträgt die altersstandardisierte Inzidenz des ischämischen Schlaganfalls 182 Erkrankungsfälle pro 100.000 Einwohner pro Jahr (Kolominsky-Rabas und Heuschmann 2002). Dabei lag in Niedersachsen in den Jahren 2010 bis 2011 die 1-Jahres-Mortalität nach Auftreten eines Schlaganfalls bei 18,5 % und die 5-Jahres-Mortalität bei 46 % (Stahmeyer et al. 2019).

Zu den vorrangigen Risikofaktoren des ischämischen Schlaganfalls zählen insbesondere die nicht-beeinflussbaren Faktoren Alter, Geschlecht, Herkunft und genetische Prädispositionen sowie die beeinflussbaren Faktoren Bluthochdruck, Diabetes, Nikotinabusus und Vorhofflimmern (Grysiewicz et al. 2008).

Die häufigsten klinischen Zeichen eines Schlaganfalls umfassen die sensomotorische Hemiparese, Dysarthrie, Aphasie, Vigilanzstörung und den Gesichtsfelddefekt. Die spezifischen Symptomatiken sind dabei durch die Stromgebiete der betroffenen Gefäße determiniert.

Therapeutisch nehmen, neben den vitalparameterstabilisierenden Basismaßnahmen, die systemische Thrombolyse und die mechanische Thrombektomie eine zentrale Rolle bei der Akutbehandlung des ischämischen Schlaganfalls ein (DGN 2012). Prognostisch entscheidend ist das Zeitfenster zwischen dem Auftreten der Symptomatik und dem Einsatz therapeutischer Interventionen (DGN 2012). Die Indikationsstellung beider Therapieformen, welche oftmals auch kombiniert Anwendung finden, ist dabei durch zahlreiche Kontraindikationen und enge Zeitfenster stark limitiert. Problematisch hierbei ist zudem, dass bis zum Einsatz der kausalen Therapien im Regelfall parallel zu den akuten Gewebeschäden destruirende Signalkaskaden ausgelöst werden, die einen verzögerten Gewebeschaden nach sich ziehen und durch die genannten Therapieformen nicht beeinflusst werden können. Eine verlaufsmulierende adjuvante Therapieform könnte daher einen Paradigmenwechsel in der Behandlung des ischämischen Schlaganfalls bedeuten. Trotz intensiver Forschung in den vergangenen Jahren existiert allerdings bis heute keine Therapiemöglichkeit dieser Art.

## 1.2 Pathophysiologie des akuten ischämischen Schlaganfalls

Für die Entwicklung adjuvanter Therapien ist ein Verständnis der Pathophysiologie des ischämischen Schlaganfalls essenziell. Sie umfasst eine komplexe Abfolge pathophysiologischer Ereignisse, die sowohl zeitlich als auch räumlich zu differenzieren sind. Zu dieser durch Ischämie ausgelösten Kaskade, auf welche im Folgenden eingegangen wird, zählen insbesondere die Exzitotoxizität, Streudepolarisierung, Inflammation und Apoptose (Dirnagl et al. 1999; Xing et al. 2012).

Die ausbleibende Perfusion in dem vom Schlaganfall betroffenen Gewebe führt im Infarktkern unmittelbar zu einem Mangel an Sauerstoff und Glukose. Die primäre Folge ist eine Störung der neuronalen und glialen Homöostase durch eine insuffiziente anaerobe Adenosintriphosphat(ATP)-Produktion und eine damit einhergehende Laktatazidose (Candelario-Jalil 2009). Der durch den ATP-Mangel entstandene Energieverlust führt sekundär zu einem Verlust des Ionengradienten, wodurch das zelluläre Membranpotential nicht aufrechterhalten werden kann (Candelario-Jalil 2009). Die resultierende Depolarisierung der betroffenen Zellen führt zu einer Öffnung spannungsabhängiger Calcium( $\text{Ca}^{2+}$ )-, Natrium( $\text{Na}^+$ )- und Kalium( $\text{K}^+$ )-Kanäle (Dirnagl et al. 1999). Daraufhin kommt es zu einem Nettoeinstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Na}^+$  und zu einem massiven Ausstrom von  $\text{K}^+$  und Glutamat (Dirnagl et al. 1999). Die stark erhöhte extrazelluläre Glutamat-Konzentration verursacht eine Exzitotoxizität durch Aktivierung von N-Methyl-d-Aspartat(NMDA)- und  $\alpha$ -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure(AMPA)-Rezeptoren, was den weiteren Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  in die betroffenen Zellen zur Folge hat (Dirnagl et al. 1999). Der inadäquate intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg bedingt eine überschießende Aktivierung von Proteasen und Phospholipasen, die zur Degradierung von wichtigen Proteinen und Membranbestandteilen führen (Lipton 1999). Des Weiteren führt der  $\text{Ca}^{2+}$ -

Anstieg zur vermehrten Produktion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS), die Schädigungen von zellulären Lipiden und Nukleinsäuren verursachen (Lo et al. 2003). Zusätzlich kommt es durch Aktivierung der NMDA- und AMPA-Rezeptoren zu einem starken Wasser- und  $\text{Na}^+$ -Einstrom, was zur Schwellung der Zellen führt (Lipton 1999). Dieses intrazelluläre Ödem wird auch als zytotoxisches Ödem bezeichnet (Stokum et al. 2016).

Parallel führen die hohen extrazellulären Glutamat- und  $\text{K}^+$ -Konzentrationen (siehe oben) auch in dem den Infarktkern umgebenden Areal, der Penumbra, zur Depolarisation der Zellen (Dohmen et al. 2008; Xing et al. 2012). Diese Depolarisation breitet sich wellenförmig aus und wird als Streudepolarisierung bezeichnet (Xing et al. 2012). Es konnte gezeigt werden, dass diese Streudepolarisierung im direkten Zusammenhang zur Größenzunahme des Infarktkerns steht (Strong et al. 2007; Dreier 2011). Da die Penumbra lediglich einer temporären Ischämie unterliegt und teils über Kollateralen perfundiert wird, findet hier jedoch nur eine partielle Depolarisation statt (Hossmann 1996). Kommt es deshalb frühzeitig zu einer ausreichenden Reperfusion, kann ein Erhalt des Gewebes erzielt werden (Hossmann 1996).

Die durch die Ischämie, aber auch durch die anschließende Reperfusion ausgelöste Inflammation spielt eine Schlüsselrolle in der Pathophysiologie des ischämischen Schlaganfalls. Innerhalb weniger Minuten kommt es unter anderem durch *Damage associated molecular patterns*, die von zugrunde gehenden Neuronen freigesetzt werden, zur Aktivierung ansässiger Mikroglia (Banati et al. 1993). Es konnte dabei in Mausexperimenten gezeigt werden, dass diese Aktivierung bei 48 bis 77 Stunden ihren Höhepunkt erreicht und bis zu mehrere Wochen postischämisch anhalten kann (Banati et al. 1993; Dirnagl et al. 1999; Denes et al. 2007; Lalancette-Hébert et al. 2007). Aktivierte Mikrogliazellen wandern in den Infarktkern und die Penumbra ein und verändern sich dabei morphologisch (Ransohoff und Perry 2009). Die Aktivierung der Mikroglia kann dabei „klassisch“ oder „alternativ“ erfolgen (Michelucci et al. 2009). Klassisch aktivierte Mikroglia, auch als M1 bezeichnet, sezernieren pro-inflammatorische Zytokine und freie Radikale wie Stickstoffmonoxid (NO) (Xing et al. 2012). Alternativ aktivierte Mikroglia, auch M2 genannt, produzieren weniger NO, sondern verstärkt auch anti-inflammatorische Zytokine (Xing et al. 2012). Zu erwähnen gilt, dass aktuelle Forschungsergebnisse diese dichotome Einteilung der mikroglialen Aktivierung jedoch als zu simplifiziert infrage stellen. Neben einer Aktivierung der Mikroglia kommt es im restlichen Nervengewebe durch Hypoxie und die hohe intrazelluläre Konzentration von  $\text{Ca}^{2+}$  und ROS zur vermehrten Expression von Transkriptionsfaktoren wie dem *Nuclear factor kappa B*, dem hypoxieinduzierten Faktor 1 und dem interferonregulatorischen Faktor 1, die die Expression pro-inflammatorischer Effektorproteine bewirken (Dirnagl et al. 1999). Die postischämische Synthese und Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine wie Tumornekrosefaktor(TNF)- $\alpha$ , Interleukin(IL)- $1\beta$  und IL-6 führt zu einer weiteren Verstärkung der Neuroinflammation (Khoshnam et al. 2017). Dabei werden die Zytokine von aktivierten Mikroglia (siehe oben), Astrozyten, Endothelzellen und Neuronen sezerniert (Ferrarese et al. 1999). Interleukine wie IL-1 führen unter anderem zu einer erhöhten

Expression der Adhäsionsmoleküle E-Selektin, *Intercellular adhesion molecule 1* (ICAM-1) und *Vascular cell adhesion molecule 1*, welche als Liganden für die Adhäsion von einwandernden Leukozyten an den Endothelzellen dienen (Bernardes-Silva et al. 2001; Koonsman et al. 2004). Dabei wird insbesondere die Expression von ICAM-1 durch die Inflammation stimuliert (Bö et al. 1996). Neben der Expression von Adhäsionsmolekülen ist auch die Öffnung der Bluthirnschranke, unter anderem durch die Aktivierung von Matrix-Metalloproteasen (MMP), entscheidend (siehe auch Abschnitt 1.3). Zu den einwandernden Leukozyten zählen innerhalb der ersten Minuten bis Stunden insbesondere Neutrophile und Monozyten bzw. Makrophagen (Vaas et al. 2017). Die eingewanderten Neutrophilen verstärken die Entzündungsreaktion durch die Produktion von ROS und NO und durch die Sekretion proinflammatorischer Zytokine und aktivierter MMP-9 (Herz et al. 2015; Strecker et al. 2017). Innerhalb von 24 Stunden nach zerebraler Ischämie konnte ebenfalls eine erhöhte Anzahl von T-Lymphozyten im Hirnparenchym von Mäusen beobachtet werden (Brait et al. 2010). Die genaue Bedeutung von T-Lymphozyten und insbesondere die Rolle der Subtypen ist derzeit noch unklar und bedarf weiterer Forschung (Cramer et al. 2019).

Die Endstrecke der durch Hypoxie ausgelösten Kaskade ist der Zelltod durch Nekrose oder Apoptose im Hirnparenchym (Dirnagl et al. 1999). Aktuelle Forschungen zeigen zudem auch Zwischen- bzw. Mischformen dieser beiden Mechanismen des Zelltodes (Galluzzi et al. 2017). Der Zellstress, dem die Neuronen durch die Exzitotoxizität, Streudepolarisierung und Inflammation ausgesetzt sind, führt im Infarktkern zur Nekrose und in der Penumbra zur Aktivierung pro-apoptotischer Signalwege (Jun-Long et al. 2018). Die Nekrose ist gekennzeichnet durch Zellschwellung und anschließenden Zerfall der Zellmembran (Sekerdag et al. 2018). Unter anderem über das endoplasmatische Retikulum (ER) kommt es dabei zur Aktivierung der *CysteinyI-aspartate specific proteases* (Caspasen), wodurch der Zelltod eingeleitet wird (Sekerdag et al. 2018). Die Apoptose hingegen ist maßgeblich durch das Gleichgewicht der pro- und anti-apoptotischen Proteine der B-Zell-Lymphom-2(Bcl-2)-Familie reguliert (Youle und Strasser 2008). Kommt es zu einem Übergewicht der pro-apoptotischen Proteine, wird der programmierte Zelltod auch hier durch die Aktivierung von Caspasen eingeleitet (Sekerdag et al. 2018). Die Zellmembran bleibt bei der Apoptose hingegen bis zum abgeschlossenen Zelltod vorhanden (Sekerdag et al. 2018).

Zusammenfassend bietet die komplexe Pathophysiologie des ischämischen Schlaganfalls distinkte Angriffspunkte für therapeutische Modulatoren. Im nachfolgenden Abschnitt wird die Rolle der Bluthirnschranke im Rahmen des ischämischen Schlaganfalls im Detail dargestellt.

### **1.3 Aufbau und Funktion der Bluthirnschranke bei ischämischem Schlaganfall**

Die Bluthirnschranke ist die zelluläre Grenze, die das zentrale Nervensystem und das zirkulierende Blut voneinander trennt. Sie verhindert den para- und intrazellulären Transport

von potenziell schädlichen Substanzen und kontrolliert die Nährstoffzufuhr. Im Rahmen einer zerebralen Ischämie kann es zu einer partiellen Öffnung und einem damit einhergehenden Funktionsverlust der Bluthirnschranke kommen. Im Folgenden werden der Mikraufbau und die Funktion der Bluthirnschranke bei ischämischem Schlaganfall im Detail besprochen.

Die Bluthirnschranke wird vorrangig durch Endothelzellen gebildet, die die hirnversorgenden Blutgefäße luminal auskleiden und abluminal in enger Interaktion mit Astrozyten, Perizyten, Myozyten, Neuronen und der extrazellulären Matrix stehen (Theodorakis et al. 2017). Die Zusammenschau aus Endothelzellen, Astrozyten, Perizyten, Myozyten, Neuronen und der extrazellulären Matrix wird als *Neurovascular unit* (NVU) bezeichnet (Muio et al. 2014). Die Endothelzellen der NVU bilden ein kontinuierliches Epithel, welches basal auf einer extrazellulären Basalmembran angeordnet und lateral über Zell-Zell-Kontakte verbunden ist. Zu den transmembranen Zell-Zell-Kontakten gehören sogenannte *Tight-Junction*(TJ)-Proteine wie Occludin, *Zonula occludens-1* (ZO1), Claudin-1 und *Junctional adhesion molecules* (Sifat et al. 2017). Diese TJ-Proteine bilden die physikalische Barriere der Bluthirnschranke und verhindern den parazellulären Transport. Der transzelluläre Influx erfolgt durch passive Diffusion und aktiven Transport. Ob ein Molekül passiv diffundieren kann, hängt dabei von der Größe, Ladung und Lipophilität des Moleküls ab. Der aktive Transport erfolgt sowohl über luminal und basal lokalisierte Transporter unter ATP-Verbrauch als auch über verschiedene Mechanismen der Transzytose. Der Efflux aus dem Zytosol nach luminal erfolgt maßgeblich über den P-Glykoprotein(P-gp)-Transporter (Schinkel 1999). Dieser ist apikal auf dem Endothel exprimiert und verhindert die Passage von potenziellen Toxinen aus dem Blut in das Hirnparenchym (Miller 2014).

Die Öffnung der Bluthirnschranke im Rahmen eines Schlaganfalls wird maßgeblich durch den Verlust der parazellulären TJ-Proteine bedingt. Dabei konnten verschiedene experimentelle Studien zeigen, dass dieser Prozess biphasisch verläuft (Merali et al. 2017). Die erste Phase ist potenziell reversibel, beginnt innerhalb der ersten Stunden nach Schlaganfall und hat bei etwa zwölf Stunden postischämisch ihren Höhepunkt (Merali et al. 2017). Die zweite Phase ist irreversibel, beginnt etwa ab dem Höhepunkt der ersten Phase und kann Tage bis Wochen anhalten (Merali et al. 2017). Dabei korreliert das Ausmaß des Schadens an der Bluthirnschranke mit der Schwere des Schlaganfalls (Brouns und De Deyn 2009). Pathophysiologisch nehmen in beiden Phasen insbesondere die MMP-2 und MMP-9 eine prominente Rolle ein (Lakhan et al. 2013). MMPs gehören zu der Gruppe der zinkabhängigen Proteasen und katalysieren die Spaltung von Peptidbindungen in Proteinen (Rempe et al. 2016). Sie werden durch posttranskriptionale Spaltung von der Proform in die aktivierte Form überführt (Rempe et al. 2016). Die erhöhte Expression von MMP-2 und MMP-9 innerhalb der ersten Stunden nach Schlaganfall führt deshalb zu einer Proteolyse der TJ-Proteine von Endothelzellen (Yang et al. 2007). Als Auslöser für das vermehrte Vorkommen aktivierter MMPs werden sowohl ein durch die Ischämie erhöhter Zinkgehalt in den Blutgefäßen als auch die direkte Sezernierung von aktivierter MMP-9 durch

eingewanderte Neutrophile im Rahmen der Inflammation nach Schlaganfall diskutiert (Rosell et al. 2008; Qi et al. 2016). Neben der Proteolyse durch MMPs werden auch die Endozytose von TJ-Proteinen durch Endothelzellen und die posttranslationale Modifikation von TJ-Proteinen aufgrund des hypoxischen Stimulus als weitere Ursachen für den postischämischen Integrationsverlust untersucht (Jiang et al. 2018).

Die Folgen des Verlusts der TJ-Proteine ist ein erhöhter parazellulärer Transport über die Bluthirnschranke von Zellen und Molekülen aus dem Blut in das Hirnparenchym., was unter anderem eine Störung der Homöostase zur Folge hat (Rosenberg 1999). Dadurch entsteht neben einem intrazellulären zytotoxischen Ödem (siehe Abschnitt 1.2) durch den zusätzlichen Flüssigkeitseinstrom aus den Blutgefäßen in das Interstitium auch ein vasogenes Ödem (Dharmasaroja 2016). Eine weitere Folge des Integritätsverlustes ist die postischämische Leukozyteninfiltration, welche eine Verstärkung der lokalen Inflammation bedingt (siehe Abschnitt 1.2).

Abschließend sei erwähnt, dass in präklinischen Studien gezeigt werden konnte, dass eine Inhibition der Bluthirnschrankenöffnung zu einer Reduzierung des Schlaganfallvolumens führt (Chaturvedi und Kaczmarek 2014). Dies verdeutlicht die zentrale Rolle der Bluthirnschranke in der Pathophysiologie des ischämischen Schlaganfalls, die sie zu einem möglichen Angriffspunkt für zukünftige adjuvante Therapien macht.

## 1.4 Klinische Anwendungen von Lithium

Da Lithium in den vergangenen Jahren neuroprotektive Effekte im Rahmen einer zerebralen Ischämie zeigen konnte (siehe Abschnitt 1.6), ist es in den Fokus als mögliche zukünftige adjuvante Therapie bei ischämischem Schlaganfall gerückt. Im Folgenden wird zunächst ein Überblick über die derzeitige klinische Anwendung von Lithium gegeben.

Lithium ist ein elementares Leichtmetall, das aufgrund seiner hohen Reaktivität in der Medizin ausschließlich als Lithiumsalz verwendet wird. Bereits seit dem 19. Jahrhundert gab es das Bestreben, Lithiumsalze therapeutisch zu nutzen (Schou und Albrecht 1997). Allerdings wurde erst Mitte des 20. Jahrhunderts durch den Psychiater John F. Cade eine randomisierte Doppelblindstudie an manisch-depressiven Patienten durchgeführt, die die Wirkung von Lithium als Phasenprophylaktikum belegte (Schou und Albrecht 1997). Seither sind Lithiumsalze ein fester Bestandteil der medizinischen Therapie und heutzutage als Arzneistoff zur Prophylaxe bei bipolaren Affektstörungen und zur Behandlung bei akuten Depressionen, manischen Episoden und akuten oder chronischen Cluster-Kopfschmerzen zugelassen (Benkert und Hippus 2000). Dabei kommen verschiedene Salze wie Lithiumcarbonat, Lithiumsulfat, Lithiumacetat und Lithiumcitrat zum Einsatz.

In den folgenden Absätzen werden die bisher bekannten Wirkmechanismen, die Pharmakokinetik und Bioverfügbarkeit sowie mögliche Nebenwirkungen thematisiert.



Die genauen Wirkmechanismen von Lithium bei Affektstörungen sind aufgrund der pleiotropen Effekte bis heute nicht vollständig verstanden. Nach derzeitigem Stand wird davon ausgegangen, dass Lithium auf verschiedenste zelluläre Regulatorproteine wirkt, dabei neuroprotektive Effekte vermittelt (Malhi et al. 2013) und außerdem eine Modulation von neurotransmittervermittelten Signalwegen bedingt (Jope 1999). Eines der zentralen Regulatorproteine ist dabei die Glykogensynthasekinase 3 beta (GSK3 $\beta$ ). Die GSK3 $\beta$  aktiviert unter anderem Signalwege der Apoptose und inhibiert Signalwege, die die neuronale Plastizität unterstützen (Carter 2007). Es konnte gezeigt werden, dass Lithium zum einen zu einer verringerten Expression von GSK3 $\beta$  führt und zum anderen über die Phosphorylierung von GSK3 $\beta$  eine Inhibierung derselbigen bewirkt (Valvassori et al. 2017). Die Relevanz dieses Signalwegs wird dadurch verdeutlicht, dass durch eine selektive Inhibierung der GSK3 $\beta$  sowohl eine antidepressive als auch eine antimanische Wirkung beobachtet werden konnte (Martinowich et al. 2009). Zudem gibt es Hinweise, dass die Menge an phosphorylierter GSK3 $\beta$  direkt mit einer Verbesserung der Symptome während depressiver Episoden bei bipolaren Affektstörungen korreliert (de Sousa et al. 2015). Ein weiteres zentrales Zielprotein von Lithium ist der *Brain-derived neurotrophic factor* (BDNF). Der BDNF wird vorrangig im zerebralen Kortex sowie im Hippocampus exprimiert und beeinflusst die neuronale Entwicklung und Differenzierung, die neuronale Plastizität und die Gedächtniskonsolidierung (Dwivedi 2009). Hier konnte gezeigt werden, dass das Expressionslevel des BDNF mit der Schwere von Symptomen bei Depressionen und bipolaren Affektstörungen korreliert (Cunha et al. 2006; Machado-Vieira et al. 2007; Fernandes et al. 2015). In Bezug auf Lithium zeigten Experimente, dass die Langzeitgabe zu einer erhöhten BDNF-Konzentration führen kann (Emamghoreishi et al. 2015; Abdanipour et al. 2019). Zahlreiche Studien konnten des Weiteren zeigen, dass Veränderungen bestimmter Neurotransmitter bei Affektstörungen pathophysiologisch relevant sind. So wurden beispielsweise in Bezug auf das glutamaterge System bei Patienten mit bipolaren Affektstörungen ein vermehrtes Vorkommen von glutamatabhängigen Metaboliten im präfrontal-limbischen Bereich (Yksel und Öngür 2010) sowie eine verminderte Expression von NMDA-Rezeptoren im Hippocampus beobachtet (McCullumsmith et al. 2007). Ebenfalls wurden Beeinträchtigungen bei der Signaltransmission als auch bei der Wiederaufnahme von  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA) beobachtet (Daniele et al. 2012; Gos et al. 2012). Im dopaminergen System zeigt sich bei bipolaren Affektstörungen eine Überaktivität in manischen Episoden, auf die eine Abnahme der Dopaminrezeptoren folgt und die möglicherweise den Übergang in die depressive Phase bedingt (Berk et al. 2007). Bei Lithiumgabe konnte hierbei ein Einfluss sowohl auf das glutamaterge und GABAerge als auch auf das dopaminerge System beobachtet werden (Malhi und Outhred 2016). In Bezug auf das glutamaterge System wurden unter anderem eine präsynaptische Inhibierung von vornehmlich exzitatorischen Signalen (Wakita et al. 2015) sowie ein Einfluss auf die Expression relevanter Enhancer und Promoter durch Lithium beobachtet (Higgins et al. 2015). Lithium zeigte ebenfalls einen Einfluss auf die synaptische Signalübertragung im

GABAergen System, allerdings in abgeschwächter Form im Vergleich zum glutamatergen System (Wakita et al. 2015). Im dopaminergen System konnte ein regulatorischer Effekt durch Inhibierung der übermäßigen Dopaminfreisetzung durch Lithium beobachtet werden (Ago et al. 2012).

Die Pharmakokinetik und Bioverfügbarkeit der verschiedenen Lithiumsalze unterscheiden sich in ihrer jeweiligen Dissoziationsfähigkeit nach oraler Aufnahme. Nach Dissoziation der Lithium-Ionen werden diese entlang des gesamten Gastrointestinaltraktes absorbiert, woraufhin die Serumkonzentration linear ansteigt (Amdisen 1977). Die Bioverfügbarkeit liegt dabei bei 85 – 90 % (Amdisen 1977). Nach Resorption verteilt sich Lithium dosisabhängig innerhalb von sechs bis neun Stunden in 50 – 90 % des Gesamtkörpervolumens (Lehmann und Merten 1974). Dabei ist Lithium nicht an Plasmaproteine gebunden und kann die Bluthirnschranke überwinden (Amdisen 1977). Die Konzentration in der weißen Substanz des Gehirns, in den Knochen und in der Schilddrüse entspricht etwa dem Doppelten der Serumkonzentration (Amdisen et al. 1974). Die Halbwertszeit von Lithium beträgt im Hirnparenchym etwa 28 Stunden und im Blutplasma etwa 16 Stunden (Plenge et al. 1994). Die Elimination erfolgt im Wesentlichen über die Nieren, weshalb vor Beginn einer Therapie die Überprüfung der Nierenfunktion essenziell ist (Netter 2013).

Zu den möglichen Nebenwirkungen einer Lithiumtherapie zählen unter anderem das Auftreten von feinschlägigem Tremor, Hyperreflexie, erhöhtem epileptogenen Potential, Gewichtszunahme, Übelkeit mit Erbrechen, Hypothyreose, kardialen Veränderungen wie Bradykardien, Arrhythmien und Lithium-Nephropathie bis hin zu chronischer Niereninsuffizienz (Lüllmann et al. 2010). Da Lithium eine sehr geringe therapeutische Breite besitzt, besteht die erhöhte Gefahr einer Lithiumintoxikation. Der Lithiumspiegel im Blut muss deshalb engmaschig kontrolliert werden und sollte je nach Zieldosis im Bereich zwischen 0,5 und 1,5 mmol/l gehalten werden (Lüllmann et al. 2010). Oberhalb von 2 mmol/l ist von einer Lithiumintoxikation auszugehen (Lüllmann et al. 2010). Diese kann im Verlauf zu neurologischen Symptomen wie Rigor und generalisierten Krampfanfällen sowie zu Herzrhythmusstörungen und Oligurie mit Niereninsuffizienz führen (Lüllmann et al. 2010).

## 1.5 Präklinische neuroprotektive Effekte von Lithium

In den vergangenen Jahren konnten in präklinischen Studien auch abseits von affektiven Störungen bei verschiedenen neurologischen Krankheitsbildern Wirkungspotenziale von Lithium beobachtet werden. Dazu zählen unter anderem die Alzheimer-Demenz (AD) (Forlenza et al. 2014), der Morbus Parkinson (MP) (Lazzara und Kim 2015) und das Schädel-Hirn-Trauma (SHT) (Yu et al. 2011), auf die im Folgenden einzeln eingegangen wird. Die Wirkung von Lithium bei ischämischem Schlaganfall wird separat in Abschnitt 1.6 beschrieben.

Die AD ist neben der zunehmenden Verschlechterung der kognitiven Leistungsfähigkeit durch das Vorkommen extrazellulärer Beta-Amyloid-Plaques sowie intraneuronaler Neurofibrillen (auch „Alzheimer-Fibrillen“) im Nervengewebe charakterisiert (Weller und Budson 2018). Die Neurofibrillen bestehen aus hyperphosphorylierten Tau-Filamenten und sind pathognomonisch für die AD (Weller und Budson 2018). Die genaue Pathophysiologie ist allerdings bis heute nicht bekannt. Jedoch gibt es deutliche Hinweise, dass sowohl die Beta-Amyloid-Plaques als auch die Neurofibrillen zu einem beeinträchtigten axonalen Transport und damit zur Neurodegeneration führen (Vicario-Orrì et al. 2014). In verschiedenen präklinischen Studien konnte gezeigt werden, dass Lithium die Hyperphosphorylierung von Tau-Proteinen inhibieren kann (Nakashima et al. 2005; Engel et al. 2006a; Sudduth et al. 2012). Dabei nimmt insbesondere die Inhibierung des GSK3 $\beta$ -Signalwegs durch Lithium eine zentrale Rolle ein (siehe auch Abschnitt 1.4). Denn unter anderem über den GSK3 $\beta$ -Signalweg wird die Hyperphosphorylierung von Tau-Proteinen vermittelt (Ryder et al. 2003). So konnte in Mäusen mit überexprimierter GSK3 $\beta$  eine Inhibierung derselben die Tau-Hyperphosphorylierung und die Entstehung eines kognitiven Defizits verhindern (Engel et al. 2006b). Neben den präklinischen Studien wurde in einer Meta-Analyse von randomisierten placebokontrollierten Studien an Patienten mit AD oder leichter kognitiver Störung der Effekt einer Lithiumbehandlung auf die kognitive Leistungsfähigkeit untersucht (Matsunaga et al. 2015). Dabei wurde eine signifikante Reduktion der kognitiven Leistungsabnahme unter Lithiumtherapie im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet (Matsunaga et al. 2015). Da die Meta-Analyse allerdings nur 232 Patienten einschloss, ist dies lediglich als ein erster Hinweis auf eine mögliche protektive Wirkung von Lithium aufzufassen.

Der MP ist durch die Degeneration von dopaminergen Neuronen in der *Pars compacta* der *Substantia nigra* sowie durch das Vorkommen intrazytoplasmatischer Lewy-Körperchen charakterisiert (Lazzara und Kim 2015). Die Lewy-Körperchen bestehen zu einem großen Anteil aus aggregierten Proteinen, zu denen vorrangig  $\alpha$ -Synuklein zählt (Diener und Steinmetz 2019). Die genaue Pathophysiologie des MP ist bis heute nicht verstanden. In Bezug auf Lithium konnten Zhao und Kollegen (2019) im MP-Mausmodell eine verbesserte Performance in verschiedenen Verhaltenstests und eine reduzierte Aggregation von  $\alpha$ -Synuklein sowie einen verminderten Verlust der Neuronen in der *Pars compacta* durch Lithiumgabe beobachten. Als möglicher Mechanismus dieser Neuroprotektion wurden veränderte miRNA-Expressionsmuster und damit eine Modulation des miRNA-Regulationsmechanismus identifiziert (Zhao et al. 2019). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Lithium die Proliferation und dopaminerge Ausdifferenzierung neuraler Stammzellen *in vitro* bewirkt (Qi et al. 2017). Nach Implantation dieser lithiumbehandelten Stammzellen in Ratten eines MP-Modells konnte eine Verbesserung der motorischen Funktion und der Merkfähigkeit festgestellt werden (Qi et al. 2017). Diese neuroprotektiven Effekte waren mit einer Modulation des Wnt-Signalwegs assoziiert (Qi et al. 2017).

Die Pathophysiologie des SHTs lässt sich in zwei Phasen unterteilen. Die erste Phase ist durch die akute Verletzung und den damit einhergehenden primären irreversiblen Schaden gekennzeichnet (Carlson et al. 2017). Die zweite Phase umfasst die durch den primären Schaden ausgelöste sekundäre Verletzungskaskade, die zu zellulären Dysfunktionen und Verlusten sowie einer gestörten Neurotransmission bis hin zu Einschränkungen der motorischen Funktionen und der Merkfähigkeit führen kann (Carlson et al. 2017). In einer tierexperimentellen Studie konnten im Anschluss an eine intraperitoneale (i.p.) Lithiumbehandlung über 14 Tage, gefolgt von der kontrollierten Induktion eines SHTs, Verringerungen des Nervengewebsverlusts, des Hirnödems und der Expression proinflammatorischer Zytokine beobachtet werden (Zhu et al. 2010). Ebenso waren das räumliche Lernvermögen sowie die Merkfähigkeit bei lithiumbehandelten Mäusen nach Induktion des SHTs im Vergleich zu unbehandelten Mäusen verbessert (Zhu et al. 2010). In einer nachfolgenden tierexperimentellen Studie, durchgeführt von Yu und Kollegen (2011), konnte ebenfalls eine Reduzierung der Neurodegeneration und Neuroinflammation sowie eine verbesserte Leistung in Verhaltenstests durch die Lithiumbehandlung gezeigt werden. Hierbei wurde Lithium 15 Minuten nach der Induktion des SHTs und anschließend täglich über einen Zeitraum von bis zu 14 Tagen i.p. verabreicht (Yu et al. 2011). Mechanistisch konnte abermals der GSK3 $\beta$ -Signalweg, auf den Lithium inhibierend wirkt (siehe Abschnitt 1.4), als möglicher Kandidat für die Vermittlung dieser Neuroprotektion identifiziert werden (Shim und Stutzmann 2016). So zeigten selektive Inhibierungen dieses Signalwegs in tierexperimentellen Studien unter anderem eine Reduzierung des Gewebeschadens und des neuronalen Zellverlustes sowie eine damit assoziierte Verbesserung der kognitiven Leistungsfähigkeit (Shim und Stutzmann 2016).

Zusammenfassend zeigen die Forschungsergebnisse, dass Lithium eine Vielzahl von Signalwegen beeinflusst und möglicherweise perspektivisch neue Krankheitsbilder für die Anwendung von Lithium erschlossen werden können.

## 1.6 Lithium bei ischämischem Schlaganfall

Neben den in Abschnitt 1.5 erwähnten neurologischen Krankheitsbildern konnten auch in Bezug auf den ischämischen Schlaganfall in verschiedenen präklinischen als auch in zwei klinischen Studien Effekte von Lithium beobachtet werden.

Im Rahmen einer tierexperimentellen Studie konnte erstmals gezeigt werden, dass eine Lithiumgabe im Vorfeld einer zerebralen Ischämie zu einer Reduzierung des Infarktolumens führt und die Ausprägung der neurologischen Defizite reduziert (Xu et al. 2003). Jahre später konnte in weiteren tierexperimentellen Studien beobachtet werden, dass eine bis zu sechs Stunden nach Induktion einer zerebralen Ischämie und anschließend einmal täglich erfolgte Lithiumgabe ebenfalls zu akuten und langfristigen neuroprotektiven Effekten in der Maus führt (Doepfner et al. 2017). Zu den akuten Effekten zählten innerhalb der ersten vier Tage eine Reduktion des Infarktolumens und der neuronalen Apoptose sowie

eine verringerte zerebrale Ödembildung (Doepfner et al. 2017). Bis zu 56 Tage nach Induktion der zerebralen Ischämie konnte eine verbesserte Leistung in verschiedenen Verhaltenstests und eine höhere neuronale Dichte in der ischämischen Hemisphäre durch die Lithiumgabe beobachtet werden (Doepfner et al. 2017). Hierbei wurden GSK3 $\beta$ -unabhängige Signalwege wie die Modulation der miR-124-Expression und des *RE1-Silencing transcription factor* sowie eine verringerte Ubiquitination von Proteinen beobachtet, die einen Teil der Neuroprotektion bewirken könnten (Doepfner et al. 2017). Eine andere Studie zeigt allerdings, dass ebenfalls der Einfluss von Lithium auf GSK3 $\beta$  für die Neuroprotektion nach zerebraler Ischämie relevant ist (Chuang et al. 2011). In Tierexperimenten mit neonatalen Ratten konnte ebenfalls ein neuroprotektiver Effekt durch die Lithiumgabe über fünf Tage nach Induktion der zerebralen Ischämie beobachtet werden (Xie et al. 2014). Dabei wurde eine Reduktion des Infarktolumens, eine Wiederherstellung der motorischen Fähigkeiten und eine Normalisierung der Level der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6 beobachtet (Xie et al. 2014). Die genauen Mechanismen, die zu den beschriebenen lithiumvermittelten Neuroprotektionen führen, sind bisher jedoch noch unbekannt.

Zusätzlich zu den oben genannten Effekten konnte ein Einfluss von Lithium auf Endothelzellen beobachtet werden. Im Rahmen einer zerebralen Ischämie bedingt die hypoxische Umgebung in Endothelzellen einen massiven Anstieg von Ca<sup>2+</sup> (siehe Abschnitt 1.2), der unter anderem zu einer Deregulation der Bluthirnschrankenfunktion führt (Noll et al. 1995). *In-vitro*-Experimente konnten zeigen, dass Lithium zu einer Reduktion dieses Ca<sup>2+</sup>-Anstiegs durch die Inhibition der inositoltrisphosphatvermittelten Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung aus dem ER führen kann (Bosche et al. 2013). Des Weiteren zeigt die Lithiumgabe in einem nicht-ischämischen *In-vitro*-Modell an Aorten tierischen Ursprungs eine Stabilisierung des Endothels durch eine verringerte Phosphorylierung der leichten Myosin-Ketten (Bosche et al. 2016). Diese beiden Untersuchungen weisen auf einen möglichen Effekt von Lithium auf Endothelzellen der Bluthirnschranke hin. Es bedarf jedoch weiterer *In-vivo*-Studien unter ischämischen Bedingungen, um diese Hinweise zu bestätigen.

Neben den oben genannten präklinischen Studien wurde auch in klinischen Studien der Einfluss einer Lithiumtherapie zum einen auf das Schlaganfallrisiko (Lan et al. 2015) und zum anderen auf den Verlauf nach stattgehabtem ischämischem Schlaganfall (Abdollahi et al. 2014) untersucht. In Bezug auf das Schlaganfallrisiko zeigte die retrospektive Studie von Lan und Kollegen (2105), durchgeführt an 1800 Patienten mit bipolarer affektiver Störung, unter Lithiumtherapie eine signifikante Reduktion des Schlaganfallrisikos. Die prospektive randomisierte placebokontrollierte Studie von Abdollahi und Kollegen (2014) untersuchte den Einfluss der Lithiumgabe bei Patienten mit erstmaligem ischämischem Schlaganfall. Hierbei konnte kein signifikanter Effekt von Lithium in Bezug auf den Punktwert im *Modified National Institutes of Health Stroke Scale/Score* (mNIHSS) und auf der Fugl-Meyer-Bewertungsskala (FMA) in der Grundgesamtheit beobachtet werden. In der Subgruppe der Patienten mit kortikalem Schlaganfall allerdings konnte ein signifikant erhöhter Punktwert im mNIHSS und auf der FMA beobachtet werden, was für eine bessere Prognose und eine

Erholung unter anderem der motorischen Fähigkeiten durch Lithiumgabe spricht. Da diese Studie lediglich 68 Patienten umfasste, ist die Aussagekraft jedoch stark eingeschränkt. Hier bedarf es dringend weiterer klinischer Studien, für die jedoch ein besseres Verständnis der Wirkmechanismen von Lithium bei ischämischem Schlaganfall erforderlich ist.

## 1.7 Zielsetzung und Hypothesenbildung

In zahlreichen präklinischen Studien wurden neuroprotektive Effekte durch Lithium bei zerebraler Ischämie beobachtet. Dabei konnten Einflüsse insbesondere auf das Infarktvolumen, die Inflammation und die neurologische Erholung gezeigt werden. Die genauen Mechanismen blieben dabei jedoch unklar. Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es daher, zugrundeliegende Mechanismen dieser lithiumvermittelten Neuroprotektion zu identifizieren.

Der postschämische Integritätsverlust der Bluthirnschranke hat die Auslösung destruktiver inflammatorischer Kaskaden zur Folge und ist damit ein Schlüsselmechanismus in der Pathophysiologie des ischämischen Schlaganfalls. Umgekehrt zeigte eine Inhibition dieses Integritätsverlustes in verschiedenen präklinischen Studien eine neuroprotektive Wirkung. In vorausgegangenen Studien konnte bei Lithiumgabe unter nicht-ischämischen *In-vitro*-Bedingungen ein Einfluss auf Endothelzellen nachgewiesen werden. Auf Grundlage dieser Beobachtungen dient als initiale Arbeitshypothese, dass Lithium unter ischämischen Bedingungen einen protektiven Einfluss auf Endothelzellen *in vitro* ausübt. Bei Bestätigung dieser Annahme umfasst die Arbeitshypothese weiter, dass Lithium *in vivo* über eine Protektion der Endothelzellen die Integrität der Bluthirnschranke nach zerebraler Ischämie erhöht und darüber einen Teil seiner neuroprotektiven Wirkung entfaltet. Dabei sind die Signalwege, über welche Lithium einen etwaigen Einfluss auf die Bluthirnschranke vermittelt, von zentralem Interesse.

Zur Untersuchung der Arbeitshypothesen werden in der vorliegenden Arbeit die Effekte von Lithium anhand von *In-vitro*-Versuchen an kultivierten Endothelzellen nach Sauerstoff-Glukose-Entzug und *In-vivo*-Versuchen an Mäusen nach experimentellem Schlaganfall analysiert.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

Tabelle 1: Chemikalien

| Chemikalie  | Hersteller, Land               |
|---|--------------------------------|
| 10 x Elektrophorese-Puffer                                    | Bio-Rad Laboratories, USA      |
| 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES) | Sigma-Aldrich, USA             |
| 4 x Laemmli-Puffer nicht-reduzierend                          | Carl Roth, Deutschland         |
| 4 x Laemmli-Puffer reduzierend                                | Carl Roth, Deutschland         |
| 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)                            | AppliChem, Deutschland         |
| Ammoniumpersulfat (APS)                                       | Sigma-Aldrich, USA             |
| Bepanthen   | Bayer, Deutschland             |
| Bovines Serumalbumin (BSA)                                    | Sigma-Aldrich, USA             |
| Buprenorphin (Buprenovet)                                     | Bayer, Deutschland             |
| Carprofen (Rimadyl)   | Zoetis, USA                    |
| Coomassie-Brillantblau  | Sigma-Aldrich, USA             |
| Dimethylsulfoxid (DMSO)                                       | Sigma-Aldrich, USA             |
| DNAse   | Hoffmann-La Roche, Schweiz     |
| ECL (SignalFire ECL Reagent)                                  | Cell Signaling Technology, USA |
| Erythrozyten / FACS Lyse                                      | Becton Dickinson, USA          |
| Eselserum   | Merck Millipore, USA           |
| Essigsäure  | Merck Millipore, USA           |
| Ethylendiamintetraacetat (EDTA)                               | Promega, USA                   |
| Evans Blue  | Sigma-Aldrich, USA             |
| Fötale Kälberserum (FCS) Superior                             | Merck Millipore, USA           |
| Gelatine (vom Schwein)  | Sigma-Aldrich, USA             |
| Glukose   | Merck Millipore, USA           |
| Glycin  | Merck Millipore, USA           |
| Isofluran   | AbbVie, USA                    |
| Kaliumchlorid (KCl)   | Merck Millipore, USA           |
| Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )   | Sigma-Aldrich, USA             |

| <b>Chemikalie</b>   | <b>Hersteller, Land</b>        |
|---|--------------------------------|
| Lithiumchlorid  | Sigma-Aldrich, USA             |
| Methanol  | Merck Millipore, USA           |
| Milchpulver   | Sigma-Aldrich, USA             |
| N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)                      | Sigma-Aldrich, USA             |
| Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )                               | Merck Millipore, USA           |
| Natriumchlorid (NaCl)   | Merck Millipore, USA           |
| Natriumdihydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) | Merck Millipore, USA           |
| Novex Entwicklungspuffer (Zymographie)                        | ThermoScientific, USA          |
| Paraffin (Paraplast PLUS)                                     | Carl Roth, Deutschland         |
| Paraformaldehyd   | Carl Roth, Deutschland         |
| Percoll   | GE Healthcare, Schweden        |
| Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)                            | Cell Signaling Technology, USA |
| Phosphatase-Inhibitor-Cocktail (PhopshoSTOP)                  | Hoffmann-La Roche, Schweiz     |
| Pierce BCA Protein Assay Kit                                  | ThermoScientific, USA          |
| Polyacrylamid   | Carl Roth, Deutschland         |
| Polyalkylenglycoether   | SantaCruz Biotechnology, USA   |
| Polysorbat 20 (Tween 20)                                      | Merck Millipore, USA           |
| Precision Plus Protein Kaleidoscop (Marker)                   | Bio-Rad Laboratories, USA      |
| Protease-Inhibitor-Cocktail (cOmplete)                        | Hoffmann-La Roche, Schweiz     |
| Radioimmunopräzipitations(Ripa)-Arbeitslösung                 | Cell Signaling Technology, USA |
| Sepharose 4B  | Merck Millipore, USA           |
| Sodiumdodecylsulfat (SDS)                                     | Merck Millipore, USA           |
| <i>Thiazoyl blue tetrazolium bromide</i> (MTT)                | Sigma-Aldrich, USA             |
| Trichloressigsäure  | Merck Millipore, USA           |
| Tris-Aminomethan (Tris Base)                                  | Merck Millipore, USA           |
| Triton X-100  | Sigma-Aldrich, USA             |
| U0126   | Cell Signaling Technology, USA |
| Xylol   | Carl Roth, Deutschland         |
| Zitronensäure-Monohydrat                                      | Merck Millipore, USA           |



**Tabelle 2: Verbrauchsmaterialien**

| <b>Verbrauchsmaterial</b>             | <b>Hersteller, Land</b>               |
|---------------------------------------|---------------------------------------|
| 15/50 ml Falcon-Röhrchen              | Sarstedt, Deutschland                 |
| 24-Well-Platten (Zellkultur)          | Sarstedt, Deutschland                 |
| 6-Well-Platten (Zellkultur)           | Sarstedt, Deutschland                 |
| 96-Well-Platten                       | Sarstedt, Deutschland                 |
| Cryomatrix                            | Thermo Fisher Scientific, Deutschland |
| Eppendorf Tubes                       | Eppendorf, Deutschland                |
| Faden 3-0                             | Ethicon, USA                          |
| Fettstift Dako-Pen                    | Dako Agilent, Amerika                 |
| Immu-Mount Eindeckmedium              | Thermo Fisher Scientific, Deutschland |
| Nadeln                                | Braun, Deutschland                    |
| Objektträger                          | Menzel-Gläser, Deutschland            |
| Objektträger-Deckglas                 | Menzel-Gläser, Deutschland            |
| Pipetten                              | Eppendorf, Deutschland                |
| Pipettenspitze                        | Sarstedt, Deutschland                 |
| Polyvinylidenfluorid(PVDF)-Membran    | Merck Millipore, USA                  |
| Seidenfaden 5-0                       | Vömel, Deutschland                    |
| Silikonbeschichtetes Monofilament 6-0 | Doccol Corporation, USA               |
| Spritzen                              | BD Plastipak, Deutschland             |
| Whatman-Papier                        | Bio-Rad Laboratories, USA             |
| Zellschaber                           | Sarstedt, Deutschland                 |

**Tabelle 3: Geräte**

| <b>Gerät, Typ</b>                           | <b>Hersteller, Land</b>   |
|---|---------------------------|
| Autoklave, VX-65                            | Systec, Deutschland       |
| Blotkammer, Mini Trans-Blot Cell            | Bio-Rad Laboratories, USA |
| ChemiDoc, XRS+                              | Bio-Rad Laboratories, USA |
| Durchflusszytometer, LSRFortessa            | Becton Dickinson, USA     |
| Epifluoreszenzmikroskop, Axioplan 2 imaging | Zeiss, Deutschland        |

| <b>Gerät, Typ</b>                                | <b>Hersteller, Land</b>            |
|--|------------------------------------|
| Feinwaage, BL210S                                | Sartorius, Deutschland             |
| Gelelektrophoresekammer, Mini-Protean Tetra Cell | Bio-Rad Laboratories, USA          |
| Heizplatte, Homeothermic Control Unit            | Harvard Apparatus, USA             |
| Homogenisator, Tissue Lyser LT                   | Qiagen, Deutschland                |
| Hypoxiekammer, IBT-HGB16                         | Toepffer Lab Systems, Deutschland  |
| Inkubationsschrank, Heracell 150                 | Thermo Fisher Scientific, USA      |
| Laser-Doppler, PeriFlux System 5000              | Perimed, Schweden                  |
| Lichtmikroskop, AxioStar Plus                    | Carl Zeiss, Deutschland            |
| Mikroskopkamera, AxioCam MRc                     | Carl Zeiss, Deutschland            |
| Mikrowelle, R-208                                | Sharp, Japan                       |
| pH-Meter, P20                                    | Sartorius, Deutschland             |
| Photometer, Sunrise                              | Tecan, Schweiz                     |
| Reinstwassersystem, Arium pro                    | Sartorius, Deutschland             |
| Rota Rod, Acceler Rota-Rod for mice 7650         | TSE Systems, Deutschland           |
| Schlittenmikrotom, SM2000R                       | Leica, Deutschland                 |
| Thermozykler, Cyclone 25                         | Peqlab Biotechnologie, Deutschland |
| Trockenschrank, UT 20                            | Heraeus, Deutschland               |
| Ultrazentrifuge, 5415R                           | Eppendorf, Deutschland             |
| Zentrifuge, 5810R                                | Eppendorf, Deutschland             |

Tabelle 4: Software

| <b>Computersoftware</b>  | <b>Internetadresse</b>  |
|--------------------------|---|
| AxioVision Software      | <a href="https://www.micro-shop.zeiss.com/de/">https://www.micro-shop.zeiss.com/de/</a> |
| EvolutionCapt Software   | <a href="http://www.vilber.de/">http://www.vilber.de/</a>                               |
| FlowJo Software          | <a href="https://www.flowjo.com/">https://www.flowjo.com/</a>                           |
| GraphPad Prim 7 Software | <a href="https://www.graphpad.com/">https://www.graphpad.com/</a>                       |
| ImageJ Software          | <a href="https://imagej.nih.gov/ij/">https://imagej.nih.gov/ij/</a>                     |
| ImageLab Software        | <a href="https://www.bio-rad.com/">https://www.bio-rad.com/</a>                         |

**Tabelle 5: Antikörper für Western-Blot-Analysen**

| <b>Primäre Antikörper</b>   | <b>Quelle</b> | <b>Verdünnung</b> | <b>Hersteller, Land</b>        |
|-----------------------------|---------------|-------------------|--------------------------------|
| Polyklonal anti-Occludin    | Hase          | 1:1000            | Abcam, England                 |
| Polyklonal anti-ZO1         | Hase          | 1:500             | Abcam, England                 |
| Polyklonal anti-c-Raf       | Hase          | 1:1000            | Cell Signaling Technology, USA |
| Polyklonal anti-p-c-Raf     | Hase          | 1:1000            | Cell Signaling Technology, USA |
| Polyklonal anti-MEK1/2      | Hase          | 1:1000            | Cell Signaling Technology, USA |
| Polyklonal anti-p-MEK1/2    | Hase          | 1:1000            | Cell Signaling Technology, USA |
| Polyklonal anti-ERK1/2      | Hase          | 1:1000            | SantaCruz Biotechnology, USA   |
| Polyklonal anti-ICAM-1      | Maus          | 1:500             | Abcam, England                 |
| Polyklonal anti-P-gp        | Maus          | 1:1000            | Abcam, England                 |
| <b>Sekundäre Antikörper</b> | <b>Quelle</b> | <b>Verdünnung</b> | <b>Hersteller, Land</b>        |
| Polyklonal anti-Maus        | Maus          | 1:10000           | Abcam, England                 |
| Polyklonal anti-Hase        | Maus          | 1:10000           | Abcam, England                 |

**Tabelle 6: Antikörper für Immunfluoreszenzfärbungen**

| <b>Primäre Antikörper</b>  | <b>Quelle</b> | <b>Verdünnung</b> | <b>Hersteller, Land</b> |
|----------------------------|---------------|-------------------|-------------------------|
| Polyklonal anti-NeuN       | Hase          | 1:1000            | Abcam, England          |
| Polyklonal anti-IBA-1      | Hase          | 1:500             | WAKO, Deutschland       |
| Polyklonal anti-GFAP       | Huhn          | 1:1000            | Merck Millipore, USA    |
| Polyklonal anti-Caveolin-1 | Maus          | 1:250             | Abcam, England          |

| <b>Sekundäre Antikörper</b> | <b>Quelle</b> | <b>Verdünnung</b> | <b>Hersteller, Land</b>        |
|-----------------------------|---------------|-------------------|--------------------------------|
| Cy3 anti-Hase               | Affe          | 1:250             | JacksonImmunoResearch, England |
| Cy3 anti-Maus               | Affe          | 1:250             | JacksonImmunoResearch, England |
| Cy3 anti-Ratte              | Affe          | 1:250             | JacksonImmunoResearch, England |
| AlexaFlour488 anti-Huhn     | Ziege         | 1:250             | JacksonImmunoResearch, England |
| AlexaFlour488 anti-Ratte    | Affe          | 1:250             | JacksonImmunoResearch, England |

Tabelle 7: Antikörper für die Durchflusszytometrie

| <b>Antikörper</b>                            | <b>Verdünnung</b> | <b>Hersteller, Land</b> |
|--|-------------------|-------------------------|
| CD16/32 FcX Ratte anti-Maus IgG              | 1:50              | BioLegend, USA          |
| CD3 Ratte anti-Maus IgG-PE                   | 1:50              | Becton Dickinson, USA   |
| CD11b Ratte anti-Maus IgG-PE-Cy7             | 1:50              | eBioscience, USA        |
| CD19 Ratte anti-Maus IgG-APC                 | 1:50              | Becton Dickinson, USA   |
| CD45 Ratte anti-Maus IgG-Brillant Violet 510 | 1:100             | Becton Dickinson, USA   |
| Ly6G Ratte anti-Maus IgG-FTTC                | 1:50              | Becton Dickinson, USA   |
| Ly6C Ratte anti-Maus IgG-V450                | 1:50              | Becton Dickinson, USA   |

Tabelle 8: Lösungen

| <b>Lösung</b>               | <b>Zusammensetzung</b>  |
|-----------------------------|---|
| 1,5 x Tris-HCL/SDS (pH 8,8) | 91 g 0,8 M Tris Base<br>2 g 7 mM SDS<br>500 ml dH <sub>2</sub> O  |
| 10 x Elektrophorese-Puffer  | 15,12 g 250 mM Tris Base<br>71,25 g 1,9 M Glycin<br>5 g 1%ige SDS |

| <b>Lösung</b>                  | <b>Zusammensetzung</b>   |
|--------------------------------|--|
| 10 x TBS-T                     | 500 ml dH <sub>2</sub> O<br>24,2 g 0,2 M Tris Base<br>80 g 1,5 M NaCl<br>10 ml 1%ige Tween-20-Lösung<br>900 ml dH <sub>2</sub> O                                 |
| 10 x Transferpuffer            | 30,25 g 25 mM Tris Base<br>144 g 192 mM Glycin<br>900 ml dH <sub>2</sub> O   |
| 1 x Elektrophorese-Puffer      | 100 ml Stocklösung<br>900 ml dH <sub>2</sub> O   |
| 1 x PBS (pH 7,4)               | 8 g 137 mM NaCl<br>0,2 g 2,7 mM KCl<br>2,16 g 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub><br>0,2 g 1,8 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub><br>800 ml dH <sub>2</sub> O |
| 1 x TBS (pH 7,4)               | 8,8 g 150 mM NaCl<br>2,4 g 20 mM Tris Base<br>800 ml dH <sub>2</sub> O   |
| 1 x TBS-T                      | 100 ml 10 x Stocklösung<br>900 ml dH <sub>2</sub> O  |
| 1 x Transferpuffer             | 100 ml 10 x Stocklösung<br>200 ml Methanol (100%ig)<br>700 ml dH <sub>2</sub> O  |
| 1 x Tris-HCL/SDS (pH 6,8)      | 12,1 g 0,1 M Tris Base<br>0,4 g 1,4 mM SDS<br>100 ml dH <sub>2</sub> O   |
| 5%ige Milchlösung              | Milchpulver  |
| Blockpuffer (Immunhistochemie) | TBS-T<br>TBS<br>2%iges BSA (in TBS)<br>10%iges Eselserum<br>0,25%iges Triton X-100   |

| <b>Lösung</b>                      | <b>Zusammensetzung</b>   |
|------------------------------------|--|
| Citratpuffer (pH 6,0)              | 6 g 0,2%iges Zitronensäure-Monohydrat<br>3 l dH <sub>2</sub> O   |
| Coomassie-Färbelösung              | 1 g Coomassie Blue<br>42 ml dH <sub>2</sub> O<br>50 ml Methanol<br>7 ml Essigsäure   |
| ECL                                | 25 ml Reagenz A<br>25 ml Reagenz B   |
| Entfärbelösung (Zymographie)       | 73 ml dH <sub>2</sub> O<br>20 ml Methanol<br>7 ml Essigsäure   |
| Erythrozyten-Lysepuffer            | 1 ml Erylyse-Lösung<br>10 ml dH <sub>2</sub> O   |
| FACS-Puffer                        | 3 ml FCS<br>97 ml PBS  |
| Lysepuffer (Western Blot)          | 819 µl dH <sub>2</sub> O<br>91 µl RIPA<br>60 µl Phosphatase-Inhibitor Cocktail<br>40 µl Protease-Inhibitor-Cocktail                                    |
| Lysepuffer (Zymographie)           | 100 ml dH <sub>2</sub> O<br>0,607 g Tris Base<br>0,877 g NaCl<br>73,5 mg CaCl <sub>2</sub><br>100 µl NaN <sub>3</sub><br>500 µl Polyalkylenglycolether |
| Percoll-Verdünnungspuffer (pH 7,0) | 300 ml dH <sub>2</sub> O<br>100 ml 10 x PBS  |
| Percoll-Gradient                   | 20 ml Resuspensionspuffer<br>2 ml 70%ige Percoll-Lösung<br>4 ml 45%ige Percoll-Lösung<br>5 ml 30%ige Percoll-Lösung<br>100 ml FACS-Puffer              |

| <b>Lösung</b>              | <b>Zusammensetzung</b>  |
|----------------------------|---|
| Trenn- und Sammelgel       | 30%iges Polyacrylamid<br>1 M Tris + SDS (pH 6,8)<br>1,5 M Tris + SDS (pH 8,8)<br>10%iges Ammoniumpersulfat (in dH <sub>2</sub> O)<br>TEMED<br>dH <sub>2</sub> O |
| Verdauungspuffer/RM-Puffer | 5 ml 10%iges BSA (in PBS)<br>5 g Glukose<br>5 ml DNase (10 mg/ml dH <sub>2</sub> O)<br>500 ml PBS   |

Tabelle 9: Medien und Reagenzien für die Zellkultur

| <b>Medium/Reagenz</b>                                     | <b>Zusammensetzung / Hersteller, Land</b>   |
|---|---|
| 10 x BSS  | 800 ml dH <sub>2</sub> O<br>68 g NaCl<br>4 g KCl<br>2 g MgSO <sub>4</sub><br>1,4 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O        |
| BSS <sub>0</sub> -Lösung                                  | 43 ml dH <sub>2</sub> O<br>5 ml 10 x BSS<br>1,31 ml 1 M NaHCO <sub>3</sub><br>0,5 ml 1 M HEPES<br>16,6 µl Glycin<br>90 µl CaCl <sub>2</sub> |
| Dulbecco's Modified Eagle<br>Medium/Nutrient Mixture F-12 | Merck Millipore, USA  |
| <i>Fetal Bovine Serum</i>                                 | Sigma-Aldrich, USA  |
| Trypsin   | Merck Millipore, USA  |

## 2.2 Methoden

Die verwendeten Materialien zu den im Folgenden beschriebenen Methoden finden sich in den jeweiligen Abschnitten in Kapitel 2 (siehe Tabellen 1 bis 9).

### 2.2.1 Kultivierung, Behandlung und Probenaufbereitung in der Zellkultur

Für die *In-vitro*-Experimente wurden Endothelzellen aus der Maus-Hirnzelllinie bEnd.3 (American Type Culture Collectio, USA) kultiviert und anschließend gemäß dem im Folgenden erläuterten Versuchsaufbau behandelt. Die Endothelzellen wurden auf konfluierenden 6- oder 24-Well-Zellkulturplatten mit einer Dichte von  $6 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> ausgesät und entweder in serumhaltigem Medium (Kontrollgruppe) oder in serumhaltigem Medium, das zusätzlich 2,5 mM Lithiumchlorid (im Nachfolgenden nur noch als „Lithium“ bezeichnet) enthielt (Lithiumgruppe), im Inkubator bei 37 °C kultiviert. Zur Nachahmung der Bedingungen während eines ischämischen Schlaganfalls wurden die Endothelzellen 24 Stunden nach der Aussaat einem 14-stündigen Sauerstoff-Glukose-Entzug (OGD) unterzogen. Dafür wurde das Medium entfernt und durch BSS<sub>0</sub>-Lösung (Kontrollgruppe) oder durch BSS<sub>0</sub>-Lösung, die zusätzlich 2,5 mM Lithium enthielt (Lithiumgruppe), ersetzt und für 14 Stunden in einer Hypoxie-Kammer bei 0,2 % O<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub> und 65 % Luftfeuchtigkeit platziert. Im Anschluss wurde die BSS<sub>0</sub>-Lösung wieder durch serumhaltiges Medium (Kontrollgruppe) oder serumhaltiges Medium, das zusätzlich 2,5 mM Lithium enthielt (Lithiumgruppe), ersetzt. Nach weiteren 24 Stunden im Inkubator wurde die *Thiazoyl-blue-tetrazolium-bromide*(MTT)-Analyse (siehe hierfür Abschnitt 2.8.2) oder die Proteinextraktion für eine anschließende Western-Blot-Analyse durchgeführt. Für die Proteinextraktion wurden die Zellen nach Entfernung der Medien für fünf Minuten auf Eis in Zellysepuffer platziert und anschließend mithilfe eines Zellschabers von den Zellkulturplatten geschabt. Der nun zellhaltige Zellysepuffer wurde gesammelt, bei -80 °C für 20 Minuten gelagert und anschließend bei 12.000 Rotationen/Minute und 4 °C für zehn Minuten zentrifugiert. Der proteinhaltige Überstand wurde gesammelt und die Proteinkonzentration photometrisch mithilfe eines kommerziellen BCA-Kits bestimmt und anschließend bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

### 2.2.2 Bestimmung der metabolischen Aktivität von Zellen

Mithilfe des MTT-Tests kann die metabolische Aktivität von Zellen untersucht werden. Diese kann als indirekter Marker für die Lebensfähigkeit der Zellen dienen.

Der MTT-Test an Endothelzellen wurde 24 Stunden nach OGD durchgeführt. Dafür wurde den Zellen MTT hinzugefügt und die Zellkulturplatten für drei Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das Medium entfernt, durch Dimethylsulfoxid (DMSO) ersetzt und unter konstantem Rütteln für fünf Minuten inkubiert. Danach wurde das nun MTT-haltige DMSO auf 96-Well-Platten pipettiert und die Absorption der Lösung photometrisch bei



einer Wellenlänge von 595 nm bestimmt. Dabei gilt: Je höher die metabolische Aktivität der Zellen, desto stärker die Absorption.

### 2.2.3 Versuchstierhaltung

Für die vorliegende Studie wurden männliche C57BL6/J-Mäuse mit einem Alter von sieben Wochen und einem Gewicht von 22 – 25 g verwendet. Die Mäuse wurden bei zirkadianer Tagesrhythmik mit freiem Zugang zu Wasser und Futter *ad libitum* gemäß den ARRIVE-Richtlinien und den Verordnungen der örtlichen Behörden in der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung des Universitätsklinikums Göttingen gehalten. Die Versuchstiere wurden randomisiert den Experimental- und Kontrollgruppen zugeteilt.

### 2.2.4 Tierexperimentelle Gruppen und deren Behandlungsregime

Im Rahmen des experimentellen Versuchsaufbaus wurden die Mäuse in sieben verschiedene Gruppen unterteilt, für die ein Überlebens- und damit Reperfusionzeitraum nach Okklusion der *Arteria cerebri media* (MCAO) von 24 Stunden oder 72 Stunden gewählt wurde. Je nach Reperfusionzeitraum erhielten die Tiere ein Behandlungsregime mit Injektionen zu definierten Zeitpunkten (siehe Tabelle 10). Das Lithium und U0126 wurden für die Injektionen in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gelöst. Alle Tiere erhielten direkt nach MCAO eine i.p. Injektion mit PBS (Kontrollgruppe und U0126-Gruppe) bzw. 1 mmol/kg Lithium (Lithiumgruppe und U0126+Lithium-Gruppe). Ebenfalls erhielten alle Gruppen sechs Stunden nach MCAO eine i.p. Injektion mit PBS (Kontrollgruppe und U0126-Gruppe) bzw. 2 mmol/kg Lithium (Lithiumgruppe und U0126+Lithium-Gruppe). Die Tiere mit einem Überlebenszeitraum von 72 Stunden erhielten zwei weitere i.p. Injektionen mit PBS (Kontrollgruppe) bzw. 2 mmol/kg Lithium (Lithiumgruppe) jeweils 24 Stunden und 48 Stunden nach MCAO. Versuchstiere der U0126- und U0126+Lithium-Gruppe erhielten zusätzlich zu den zuvor genannten Behandlungen direkt nach MCAO eine einmalige intravenöse Gabe von 0,5 mg/kg U0126. Das Injektionsvolumen bei allen Injektionen betrug 100 µl. Nach 24 bzw. 72 Stunden wurden die Mäuse mittels zervikaler Dislokation unter tiefer Narkose getötet.

**Tabelle 10: Behandlungsregime der experimentellen Gruppen**

| Gruppen                      | 45-min. MCAO | 1. Injektion(en) direkt nach MCAO | 2. Injektion 6 Stunden nach MCAO | Tötung 24 Stunden nach MCAO | 3. Injektion 24 Stunden nach MCAO | 4. Injektion 48 Stunden nach MCAO | Tötung 72 Stunden nach MCAO |
|------------------------------|--------------|-----------------------------------|----------------------------------|-----------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------|
| Schein                       | –            | PBS                               | PBS                              | +                           | –                                 | –                                 | –                           |
| Kontrolle                    | +            | PBS                               | PBS                              | –/+                         | PBS                               | PBS                               | +                           |
| Lithium                      | +            | 1 mmol/kg Li                      | 2 mmol/kg Li                     | –/+                         | 2 mmol/kg Li                      | 2 mmol/kg Li                      | +                           |
| Kontrolle für U0126-Versuche | +            | PBS und DMSO                      | PBS                              | +                           | –                                 | –                                 | –                           |
| Lithium+U0126                | +            | 1 mmol/kg Li und 0,5 mg/kg U0126  | 2 mmol/kg Li                     | +                           | –                                 | –                                 | –                           |
| U0126                        | +            | 0,5 mg/kg U0126 und PBS           | PBS                              | +                           | –                                 | –                                 | –                           |

### 2.2.5 Okklusion der *Arteria cerebri media* (MCAO) mithilfe des Fadenokklusionsmodells

Die Induktion der zerebralen Ischämie in der Maus wurde über das operative Fadenokklusionsmodell erzielt. Dabei wurde den Versuchstieren im Rahmen der Operation ein Infarkt im Stromgebiet der rechten *Arteria cerebri media* (MCA) induziert. Hierfür wurde den Mäusen unter Anästhesie mit 0,8 l pro Minute O<sub>2</sub> und 2 % Isofluran die rechte *Arteria carotis interna* (ICA) im lateralen Halsdreieck freipräpariert und unter mikroskopischer Sicht ein Schnitt in die ICA gesetzt. Durch diesen Schnitt wurde dann ein 6-0-Nylon-Monofilament eingeführt. Anschließend wurde das Nylon-Monofilament bis in die rechte MCA vorgeschoben und verweilte dort für 45 Minuten. Nach anschließender Entfernung des Filaments wurde die Wunde mit einem 3-0-Faden genäht. Mit Entfernung des Nylon-Monofilaments beginnt die Reperfusionzeit. Neben dem im Abschnitt 2.2.4 beschriebenen Behandlungsregime wurde den Mäusen postoperativ 1 ml NaCl-Lösung subkutan verabreicht. Ein adäquates postoperatives Schmerzmanagement mit 4 mg/kg Carprofen und 0,1 mg/kg Buprenorphin folgte. Zusätzlich wurden im postoperativen Verlauf der Allgemeinzustand, das Körpergewicht, die Wundheilung und die Motorik/Koordination der Versuchstiere überprüft. Dabei erforderte das Auftreten eines der im Folgenden genannten Abbruchkriterien das sofortige schmerzlose Töten des Tieres. Zu den Abbruchkriterien zählen zerebrale Anfälle, die mehr als zehn Minuten oder wiederholt innerhalb von 24 Stunden auftreten, ein Gewichtsverlust von mehr als 20 % des ursprünglichen Körpergewichtes und fehlendes Vermögen des Tieres, nach der Operation aufzustehen. Die

Operationen der Tiere wurden freundlicherweise von Frau Dr. phil. nat. Bozena Zechmeister durchgeführt.

### 2.2.6 Evans-Blue-Extravasation

Die Evans-Blue-Extravasation ist ein *In-vivo*-Verfahren, mit dem indirekt die Durchlässigkeit der Bluthirnschranke gemessen werden kann. Der Farbstoff Evans Blue bindet dabei nach intravasaler Applikation an das im Blut befindliche Albumin. Albumin mit einem Molekulargewicht von 66,5 kDa kann physiologischerweise die Bluthirnschranke nicht überwinden. Kommt es allerdings zur Störung der Bluthirnschrankenintegrität im Rahmen einer zerebralen Ischämie, kann die Menge des in das Gehirnparenchym übergetretenen Albumins als Marker für das Ausmaß der Durchlässigkeit dienen. Die Menge an Albumin wird im Rahmen des Testes indirekt über den gebundenen Evans-Blue-Farbstoff photometrisch quantifiziert.

Die Evans-Blue-Extravasation wurde nach bestehendem Protokoll durchgeführt (Doepfner et al. 2011). Dabei wurde den Versuchstieren zwei Stunden vor der Tötung 100 µl einer 4%igen Evans-Blue-Lösung retrobulbär in den Venenplexus verabreicht. Nach der Tötung wurden die Versuchstiere mit PBS kardial perfundiert. Nach anschließender Entnahme des Gehirns wurde dieses in die beiden Hemisphären entlang der *Fissura longitudinalis* zertrennt und das Gewicht der einzelnen Hemisphären ermittelt. Im Folgenden wurden die Hemisphären in 50%ige Trichloressigsäurelösung lysiert. Nach der Zentrifugation bei 12.000 Rotationen/Minute wurde die Absorption des Überstandes bei 620 nm photometrisch gemessen. Die absolute Evans-Blue-Konzentration wurde anschließend anhand einer Standardkurve bestimmt und über das Gewicht der Hemisphäre normalisiert.

### 2.2.7 Western-Blot-Analyse

Im Rahmen der Western-Blot-Analyse wurden die Proteine über eine Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Die aufgetrennten Proteine wurden anschließend mit Antikörpern gegen ausgewählte Epitope sichtbar gemacht und mithilfe einer densitometrischen Messung quantitativ ausgewertet.

Initial erfolgte die Proteinaufbereitung aus den *In-vivo*-Versuchen (siehe hierfür Abschnitt 2.2.1) und den *In-vivo*-Versuchen. Für die Probengewinnung aus den *In-vivo*-Versuchen wurden nach Entnahme des Gehirns die Hemisphären mit einem Mediansagittalschnitt durch die *Fissura longitudinalis* zertrennt, in Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C bis zur

Durchführung der Folgeschritte gelagert. Zur Lysierung des Gewebes wurde jede Hemisphäre in Western-Blot-Lysepuffer bei 50 Oszillationen pro Minute für zehn Minuten im Homogenisator homogenisiert. Im Anschluss wurde das Homogenat für 20 Minuten bei 4 °C und 16.000 Rotationen/Minute zentrifugiert, der Überstand entnommen und bei -80 °C eingelagert. Dabei wurde die Proteinkonzentration photometrisch mit einem kommerziellen BCA-Kit bestimmt. Die zu untersuchenden Proben wurden vor der Elektrophorese mit einem SDS-Laufpuffer (Laemmli) vermischt und fünf Minuten im Thermozykler bei 95 °C hitzedenaturiert. Im Anschluss wurden neben einem Molekulargewichtsstandard äquivalente Mengen an Proteinen in die Taschen eines Polyacrylamidgels gegeben. Dieses setzt sich aus dem Sammelgel mit einem Polyacrylamid-Anteil von 5 % und dem Trenngel mit einem Polyacrylamid-Anteil von 12 % oder 8 % je nach Molekulargewicht des Proteins von Interesse zusammen. Anschließend wurde für die Proteinwanderung (Elektrophorese) ein Spannungsfeld angelegt. Nach abgeschlossener Elektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine in einer Blotkammer bei einer Spannung von 100 V über eine Dauer von ein bis zwei Stunden auf eine Polyvinylidenfluorid(PVDF)-Membran transferiert. Die PVDF-Membranen wurden im Anschluss mit einer 5%igen Milchlösung für eine Stunde inkubiert. Die Inkubation der in 5%iger Milchlösung gelösten primären Antikörper (siehe Tabelle 5) erfolgte über Nacht bei 4 °C. Die ebenfalls in 5%iger Milchlösung gelösten sekundären Antikörper (siehe Tabelle 5) wurden für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die anschließende Darstellung der Banden durch Chemilumineszenz erfolgte mithilfe einer ECL-Lösung in dem Abbildungssystem ChemiDoc. Die densitometrische Auswertung erfolgte mit der Software ImageLab. Für die normalisierte quantitative Auswertung wurden die densitometrischen Werte des Zielproteins und die des definierten *Housekeeping*-Proteins in ein relatives Verhältnis gesetzt. Dabei werden als *Housekeeping*-Proteine Proteine bezeichnet, deren Expression sich durch die Behandlung nicht verändert und die gleichmäßig in den zu untersuchenden Zellen vorzufinden sind.

### 2.2.8 Immunfluoreszenzfärbung

Die Immunfluoreszenzfärbung ermöglicht es, Proteine mithilfe von fluorochromgekoppelten Antikörpern unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar zu machen. Für die quantitative Analyse können einzelne fluoreszenzmarkierte Zellen gezählt oder die mittlere Fluoreszenzintensität gemessen werden.

Zur Herstellung der Hirnschnitte wurden die entnommenen Gehirne im Anschluss für 24 Stunden in Paraformaldehyd gelagert. Danach wurden die Gehirne in vier jeweils 2 mm dicke Schnitte geteilt und im Paraffinblock fixiert. Die mit Paraffin fixierten Hirnschnitte

wurden im Anschluss mithilfe eines Schlittenmikrotoms in 4 µm dicke Schnitte zerteilt und bei 60 °C für zwei Stunden im Trockenschrank auf den Objektträgern fixiert. Weiter wurden die Hirnschnitte nach ihrer Entparaffinierung in Xylol und Ethanol mit Citratpuffer in der Mikrowelle bei 500 W erhitzt und in PBS gewaschen. Im Anschluss wurden die Hirnschnitte mit Blockpuffer für eine Stunde benetzt. Darauf folgte eine Inkubation der Hirnschnitte mit den in Blockpuffer gelösten primären Antikörpern (siehe Tabelle 6) über Nacht. Anschließend wurde, nach Waschen der Hirnschnitte in TBS, der sekundäre Antikörper (siehe Tabelle 6) für eine Stunde bei Dunkelheit inkubiert. Dann wurden die Hirnschnitte mit dem Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) für zehn Minuten bei Dunkelheit inkubiert. Für die Analyse wurden jeweils fünf Bilder in der *Region of Interest* (ROI) mit dem Epifluoreszenzmikroskop und der Software AxioVision angefertigt. Als ROI wurden die Subventrikularzonen und die Stammganglien definiert. Die Subventrikularzonen wurden mit den Koordinaten 0,14 mm anterior, 1,25 mm lateral und 2 mm ventral des Bregmas definiert. Die Region der Stammganglien wurde mit den Koordinaten 0,14 mm anterior, 2 mm lateral und 3 mm ventral des Bregmas definiert. Die Analyse erfolgte mithilfe der Software ImageJ.

### 2.2.9 Zymographie

Die Gelatine-Zymographie ermöglicht es, die enzymatische Aktivität der MMP-9 zu visualisieren und anschließend densitometrisch zu quantifizieren. Hierfür werden Proteine mithilfe der SDS-PAGE in einem gelatinehaltigen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Allerdings werden im Gegensatz zur Western-Blot-Analyse die Proteine nicht hitzedenaturiert und in einem nicht-reduzierenden Probenpuffer gelöst. Die enzymatische Aktivität der MMP-9 führt nach Auftrennung zur Verdauung der gelatinehaltigen Bestandteile im Polyacrylamidgel, was über eine Färbung mit Coomassie-Brillantblau sichtbar gemacht werden kann.

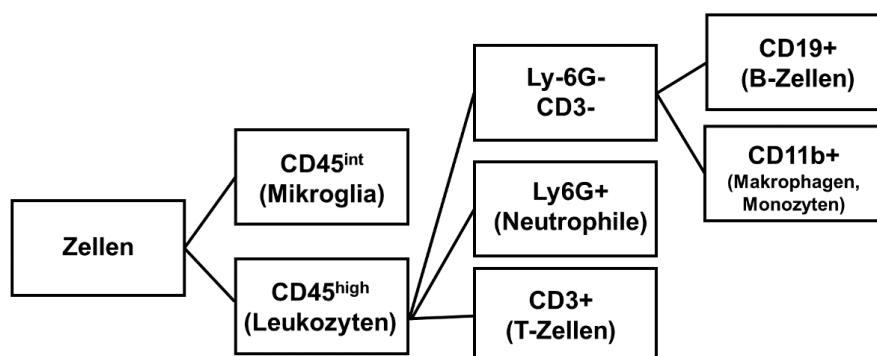
Zur Probenvorbereitung wurden die zu untersuchenden Hemisphären in Lysepuffer homogenisiert und anschließend bei 12.000 Rotationen/Minute zentrifugiert. Der Überstand wurde gesammelt und in einem Verhältnis von 10:1 mit Sepharose 4B für 60 Minuten inkubiert. Die MMP-9 bindet hierbei an die Sepharose 4B. Nach der Inkubation wurde die gewaschene Sepharose 4B in Lysepuffer, der zusätzlich 10 % DMSO enthielt, gelöst. Daraufhin wurde die Proteinkonzentration mit einem kommerziellen BCA-Kit gemessen. Im Anschluss wurden gleiche Mengen Proteine in ein 8%iges Polyacrylamidgel, welches zusätzlich 0,1 % Gelatine enthielt, pipettiert. Im Anschluss an die Gelelektrophorese wurde das Polyacrylamidgel zweimalig in 2,5%igem Triton gewaschen und für 48 Stunden bei 37 °C

in Entwicklungspuffer inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Polyacrylamidgel in 0,1%iger Coomassie-Färbelösung für 30 Minuten gefärbt und im Anschluss in Entfärbelösung gewaschen. Nach der Entfärbung blieben weiße Banden auf blauem Hintergrund zurück. Diese Banden wurden dann mit der Software ImageJ densitometrisch analysiert.

### 2.2.10 Durchflusszytometrie

Mit dem Messverfahren der Durchflusszytometrie (engl. *Fluorescence-activated cell sorting* (FACS)) lassen sich Zellen anhand ihrer Größe und Granularität sortieren. Des Weiteren können ausgewählte zelluläre Oberflächenantigene mithilfe von farbstoffgekoppelten Antikörpern markiert werden, was eine Detektion und anschließende Quantifikation dieser Zellen ermöglicht.

Zur Analyse der in das Hirnparenchym infiltrierten Immunzellen wurden Leukozyten, T-Zellen, B-Zellen, Neutrophile, Makrophagen und Monozyten quantifiziert. Dafür wurden die ischämischen Hemisphären mechanisch in FACS-Lysepuffer homogenisiert und bei 1.600 Rotationen/Minute für zehn Minuten zentrifugiert. Danach wurde das Pellet in 30%igem Percoll gelöst und auf einen Percoll-Gradienten mit 45%igen und 70%igen Percoll-Phasen pipettiert. Nach Zentrifugation bei 1.300 Rotationen/Minute für 20 Minuten ohne Abbremsen wurden die Zellsuspensionen zwischen den Phasen abgesaugt und gesammelt. Nach viermaligem Waschen und anschließendem Zentrifugieren bei 12.000 Rotationen/Minute wurden die Zellsuspensionen für zehn Minuten im FC-Block inkubiert. Im Anschluss wurde die Zellsuspension mit den Fluoreszenz-Antikörpern (Tabelle 7) über Nacht inkubiert. Abschließend erfolgte die Messung am FACS-Gerät. Das Gating-Schema (Abbildung 1) wurde nach Pösel und Kollegen (2016) gewählt. Die Auswertung der Rohdaten erfolgte mit der Software FlowJo.



**Abbildung 1: Gatingstrategie mit den ausgewählten Antikörpern als Immunzellmarker für die Durchflusszytometrie.** Als Immunzellmarker wurden die Antikörper *Cluster of differentiation* (CD)45, *Lymphocyte antigen 6 complex locus G6D* (Ly6G), CD3, CD19 und CD11b verwendet. Leukozyten waren als CD45<sup>high</sup>-positive

Zellen definiert und wurden weiter aufgeteilt in Ly6G-positive Neutrophile und CD3-positive T-Zellen. CD45<sup>high</sup>-positive, CD3- und Ly6G-negative Zellen wurden weiter aufgeteilt in CD19-positive B-Zellen und CD11b-positive Makrophagen und Monozyten.

### **2.2.11 Statistische Auswertung**

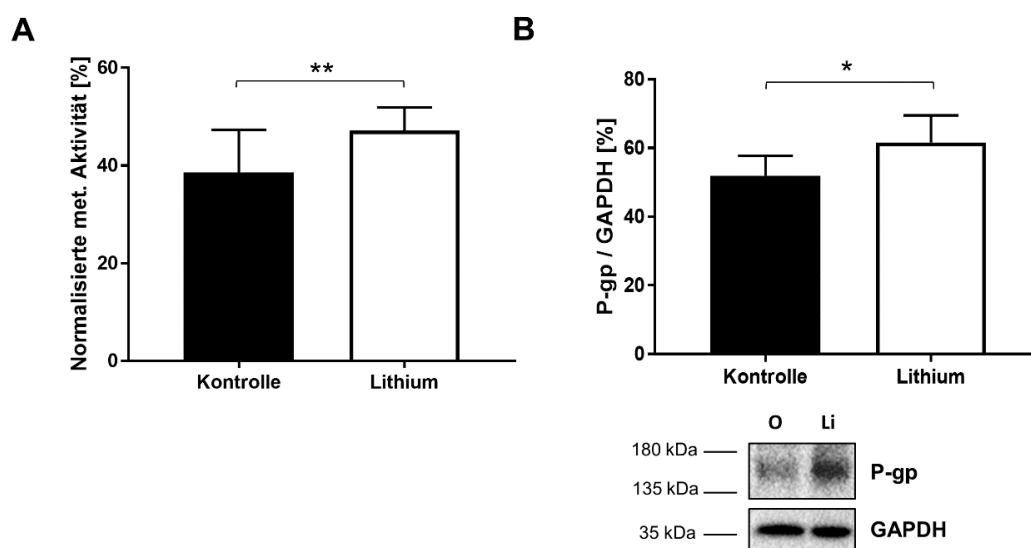
Für alle experimentellen Analysen wurde der Experimentator gegenüber den Behandlungsgruppen verblindet. Die statistische Auswertung erfolgte mit der Software Prism. Eine Normalverteilung der Daten wurde mithilfe des Kolmogorov-Smirnov-Tests ermittelt. Für die statistische Analyse wurde der ungepaarte t-Test (Vergleich zwischen zwei Gruppen) oder die zweiseitige Varianzanalyse (ANOVA) mit anschließendem Post-hoc-Test nach Šidák (Vergleich zwischen mehr als zwei Gruppen) gewählt. Die Daten werden mit Mittelwert und Standardabweichung präsentiert.  $p$ -Werte  $< 0,05$  werden als statistisch signifikant angesehen.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Lithium erhöht die Überlebensfähigkeit der Zellen und steigert die P-gp- und TJ-Protein-Expression nach OGD *in vitro*

Um einen möglichen Einfluss von Lithium auf die Endothelzellen zu untersuchen, wurden die Endothelzellen mit oder ohne Lithiumbehandlung einem OGD unterzogen und anschließend unter Standardbedingungen rekultiviert (Siehe Abschnitt 2.2.1). Daraufhin wurde 24 Stunden nach OGD die metabolische Zellaktivität mittels MTT-Test (siehe Abschnitt 2.2.2) und die Expression der TJ-Proteine ZO1 und Occludin mithilfe der Western-Blot-Analyse (siehe Abschnitt 2.2.7) untersucht. Die metabolische Zellaktivität dient dabei als Marker für die Lebensfähigkeit der Zelle. Die TJ-Proteine ZO1 und Occludin sind maßgebliche Bestandteile der Bluthirnschranke (siehe Abschnitt 1.3).

Die Messung mittels MTT-Tests zeigte eine signifikante Erhöhung der metabolischen Zellaktivität in den lithiumbehandelten Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abbildung 2 A), was auf einen geringeren Zelltod hinweist. Die quantitative Western-Blot-Analyse zeigte des Weiteren eine signifikant erhöhte Expression der TJ-Proteine ZO1 und Occludin in lithiumbehandelten Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abbildung 3 B-C). Auch eine nicht-quantitative Immunfluoreszenzfärbung für ZO1 deutete auf eine höhere Dichte in der Lithiumgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe hin (Abbildung 3 A).



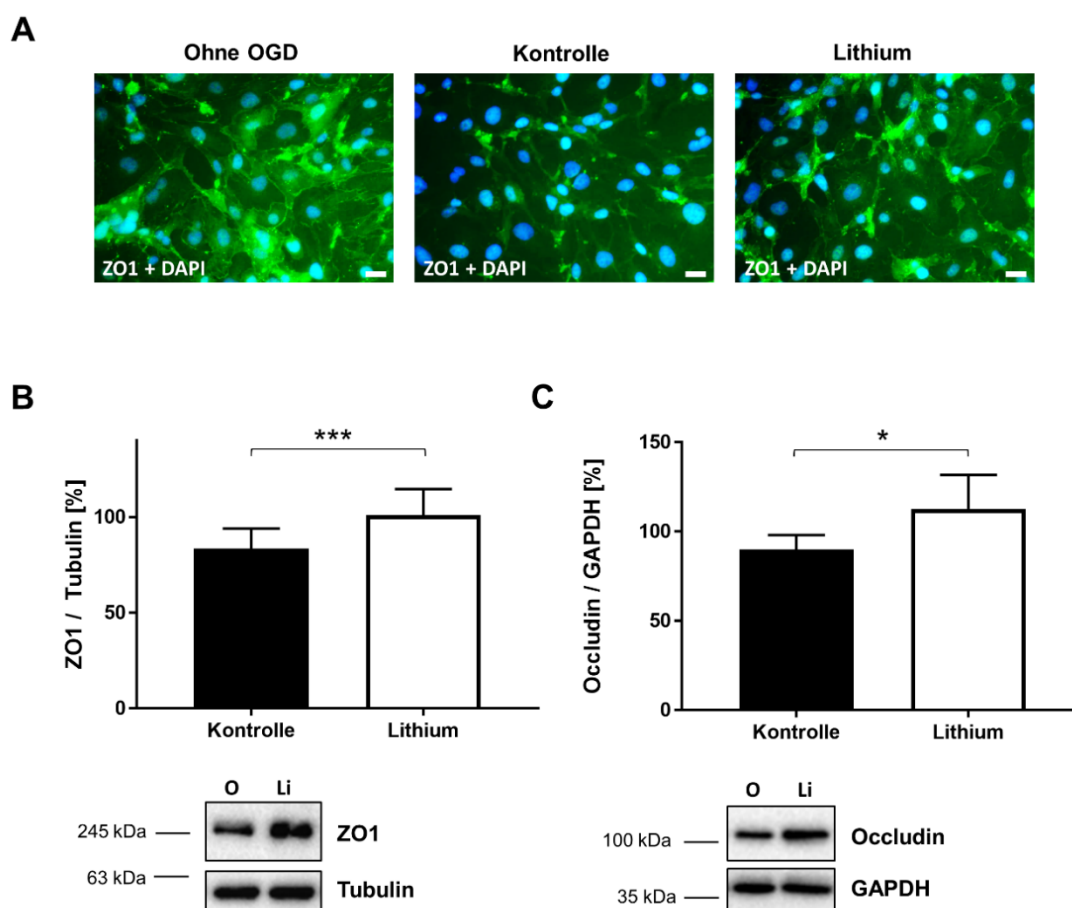
**Abbildung 2:** Die Lithiumbehandlung von Endothelzellen *in vitro* reduziert den Zelltod und führt zu einer erhöhten Expression des P-Glykoproteins (P-gp) nach Sauerstoff-Glukose-Entzug (OGD). Die Endothelzellen wurden einem 14-stündigen OGD unterzogen. Anschließend wurden die Zellen entweder in Medium (Kontrolle) oder in Medium mit 1,25 mM Lithiumchlorid (Lithium) für 24 Stunden unter



Standardbedingungen inkubiert. **(A)** Analyse der metabolischen Zellaktivität mithilfe des *Thiazolyl-blue-tetrazolium-bromide*(MTT)-Tests. **(B)** Quantitative Messung der P-gp-Proteinexpression durch Western-Blot-Analyse. Normalisiert mithilfe des *Housekeeping*-Proteins Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH).  $n = 6 - 16$  pro Gruppe. Die Daten werden als Mittelwert mit Standardabweichung präsentiert.  $*p < 0,05$ ,  $**p < 0,01$ .

Ebenfalls wurde 24 Stunden nach OGD die Expression des P-gp gemessen. Hier zeigte die quantitative Western-Blot-Analyse eine signifikant erhöhte Expression von P-gp-lithiumbehandelten Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abbildung 2 B).

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse der *In-vivo*-Versuche, dass Lithium die Überlebensfähigkeit der Endothelzellen unter OGD erhöht und dabei die Integrität des Zellverbandes über eine erhöhte TJ-Protein-Expression verstärkt.

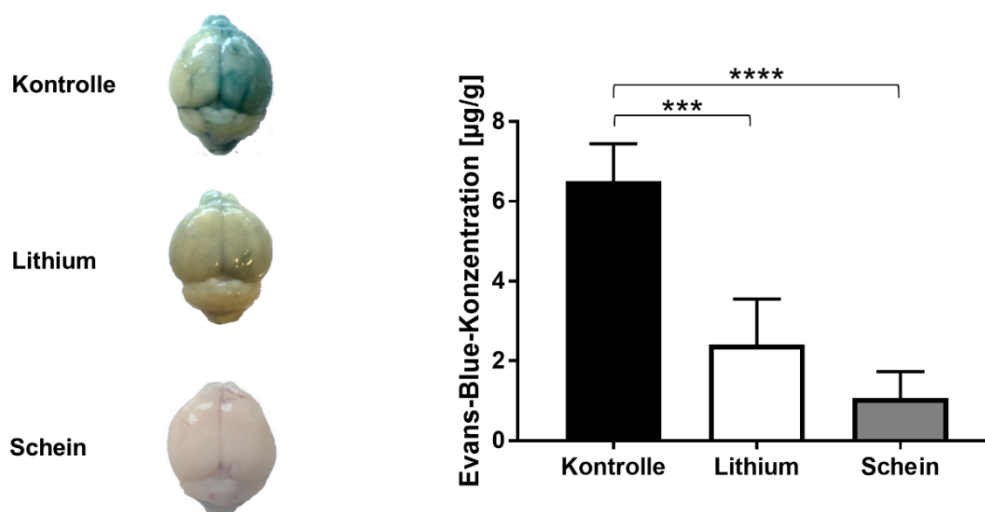


**Abbildung 3:** Die Lithiumbehandlung von Endothelzellen *in vitro* reduziert den Zelltod und führt zu einer erhöhten Expression der *Tight-Junction*(TJ)-Proteine *Zonula occludens-1* (ZO1) und Occludin nach Sauerstoff-Glukose-Entzug (OGD). Die Endothelzellen wurden einem 14-stündigen OGD unterzogen. Anschließend wurden die Zellen entweder in Medium (Kontrolle) oder in Medium mit 1,25 mM Lithiumchlorid (Lithium) für 24 Stunden unter Standardbedingungen inkubiert. **(A)** Nicht-quantitative Darstellung der Immunfluoreszenzfärbung des TJ-Proteins ZO1. Maßstabbalken: 20  $\mu\text{m}$ . **(B-C)** Quantitative Messung der ZO1- und Occludin-Proteinexpression durch Western-Blot-Analyse. Normalisiert mithilfe des *Housekeeping*-Proteins Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH).  $n = 6 - 16$  pro Gruppe. Die Daten werden als Mittelwert mit Standardabweichung präsentiert.  $*p < 0,05$ ,  $**p < 0,01$ .

### 3.2 Lithium reduziert die postischämische Durchlässigkeit der Bluthirnschranke

Angesichts der vielversprechenden *In-vitro*-Ergebnisse an Endothelzellen wurde in einem nächsten Schritt die Durchlässigkeit der Bluthirnschranke nach Lithiumgabe mithilfe der Evans-Blue-Extravasation (siehe Abschnitt 2.2.6) *in vivo* nach zerebraler Ischämie der Maus untersucht. Dafür wurde die Konzentration des Evans-Blue-Farbstoffes sowohl in der rechten Hemisphäre von Versuchstieren der Kontrollgruppe und Lithiumgruppe als auch in der rechten Hemisphäre von Versuchstieren der Scheingruppe gemessen. Die spektrometrische Messung wurde 24 Stunden nach MCAO bzw. OP-Simulation (Scheingruppe) durchgeführt.

Die Messung zeigte eine signifikant erhöhte Evans-Blue-Konzentration im Hirngewebe sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der lithiumbehandelten Gruppe im Vergleich zur Scheingruppe (Abbildung 4). Die Konzentration des Evans-Blue-Farbstoffes in der lithiumbehandelten Gruppe war zudem im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant vermindert (Abbildung 4).

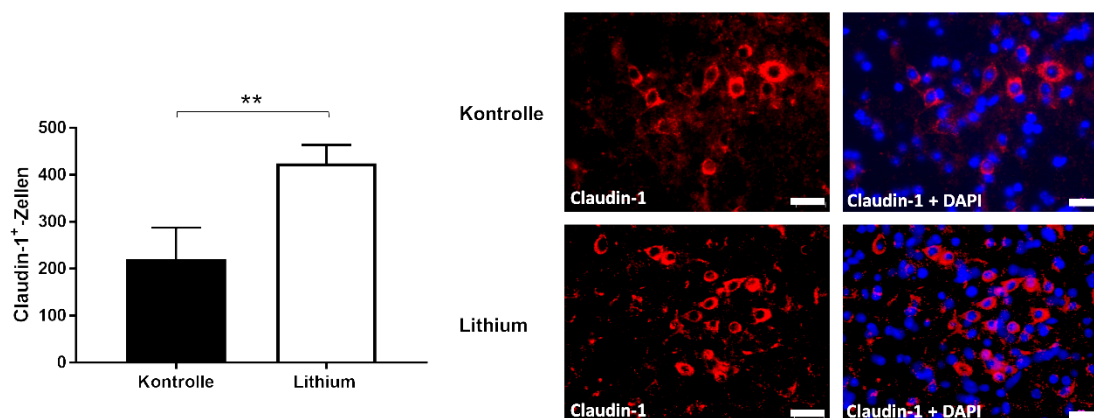


**Abbildung 4: Lithium reduziert die Durchlässigkeit der Bluthirnschranke nach zerebraler Ischämie der Maus.** Die Mäuse der Kontroll- und Lithiumgruppe wurden einer 45-minütigen Okklusion der *Arteria cerebri media* (MCAO) unterzogen, gefolgt von einer Überlebens- bzw. Reperfusionzeit von 24 Stunden. Die Mäuse der Scheingruppe unterliefen das identische Operationsprozedere, allerdings ohne tatsächliche MCAO. Die Mäuse der Kontrollgruppe und Scheingruppe wurden mit Beginn der Reperfusion mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) und nach sechs Stunden mit einer weiteren Dosis PBS intraperitoneal (i.p.) behandelt. Den Mäusen der Lithiumgruppe wurde direkt mit Beginn der Reperfusion 1 mmol/kg Lithiumchlorid in PBS gelöst und sechs Stunden später 2 mmol/kg Lithiumchlorid in PBS gelöst i.p. injiziert. Untersuchung der Bluthirnschrankenintegrität der ischämischen Hemisphäre mithilfe der Evans-Blue-Extravasation.  $n = 4$  pro Gruppe. Die Daten werden als Mittelwert mit Standardabweichung präsentiert. \* $p < 0,05$ .

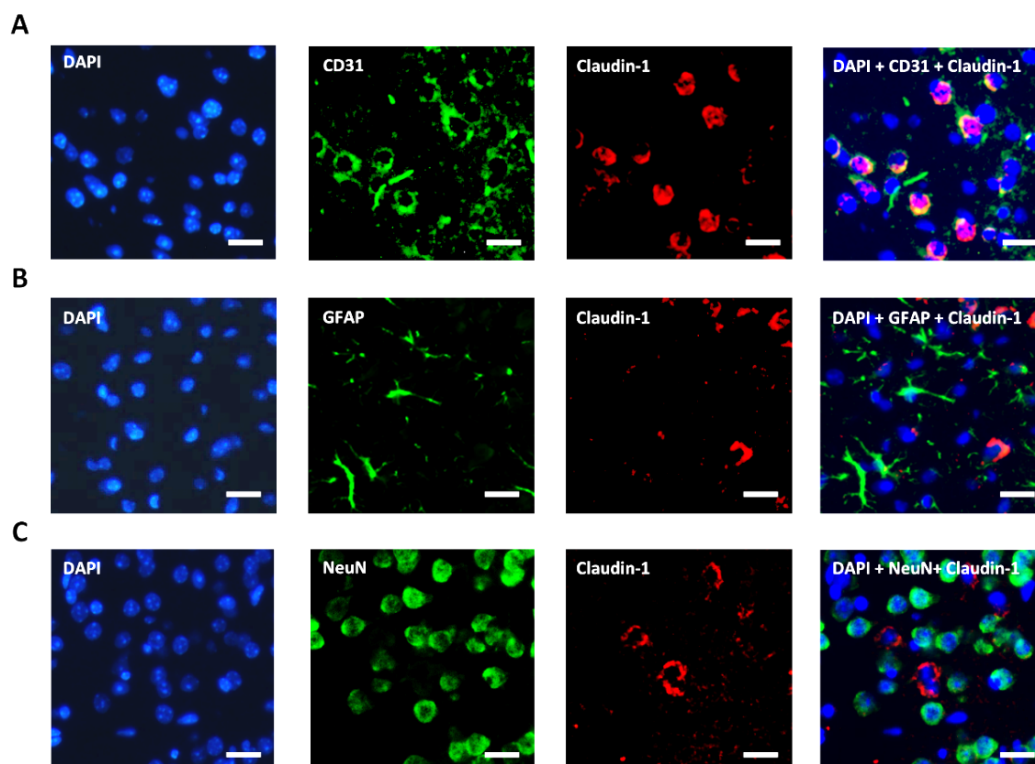
Dies zeigt, dass die Lithiumbehandlung eine verringerte Durchlässigkeit der Bluthirnschranke im Vergleich zur Kontrollgruppe bewirkt, jedoch im Unterschied zur Scheingruppe keinen vollständigen Funktionserhalt bedingt.

### 3.3 Der postischämische Verlust der TJ-Proteine ZO1, Occludin und Claudin-1 wird durch Lithium reduziert

Nachdem Lithium eine erhöhte Expression von TJ-Proteinen *in vitro* und eine geringere Durchlässigkeit der Bluthirnschranke *in vivo* durch die Lithiumbehandlung gezeigt hatte, wurde die Expression der TJ-Proteine ebenfalls *in vivo* untersucht. Dafür wurde die Expression der TJ-Proteine ZO1, Occludin und Claudin-1 in den ischämischen Hemisphären der lithiumbehandelten Mäuse und unbehandelten Kontrolltiere untersucht. Die Expression von ZO1 und Occludin wurde dabei 24 Stunden und 72 Stunden nach MCAO mittels Western-Blot-Analyse (siehe Abschnitt 2.2.7) quantifiziert. Die Expression von Claudin-1 wurde 24 Stunden nach MCAO mittels Immunfluoreszenzfärbung (siehe Abschnitt 2.2.8) analysiert.



**Abbildung 5: Lithium führt zu einer erhöhten Expression des *Tight-Junction*(TJ)-Proteins Claudin-1 nach zerebraler Ischämie der Maus.** Die Mäuse der Kontroll- und Lithiumgruppe wurden einer 45-minütigen Okklusion der *Arteria cerebri media* (MCAO) unterzogen, gefolgt von einer Überlebens- bzw. Reperfusionzeit von 24 Stunden. Die Mäuse der Kontrollgruppe wurden mit Beginn der Reperfusion mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) und nach sechs Stunden mit einer weiteren Dosis PBS intraperitoneal (i.p.) behandelt. Den Mäusen der Lithiumgruppe wurde direkt mit Beginn der Reperfusion 1 mmol/kg Lithiumchlorid in PBS gelöst und sechs Stunden später 2 mmol/kg Lithiumchlorid in PBS gelöst i.p. injiziert. Quantitative immunohistochemische Analyse der Claudin-1-Expression der ischämischen Hemisphäre. Maßstabbalken: 20  $\mu\text{m}$ .  $n = 4 - 10$  pro Gruppe. Die Daten werden als Mittelwert mit Standardabweichung präsentiert. \* $p < 0,05$ .

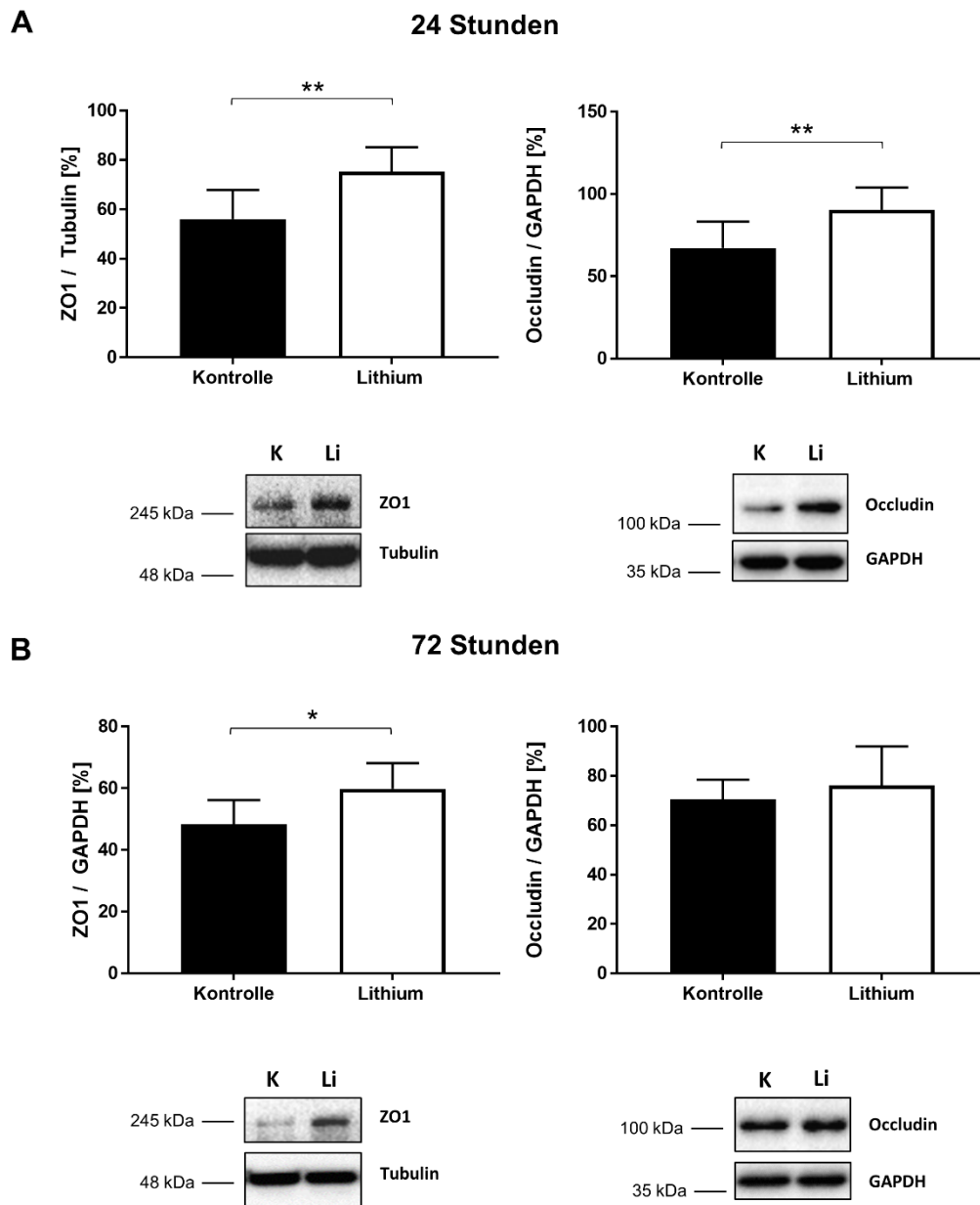


**Abbildung 6:** Repräsentative Immunfluoreszenz-Ko-Färbungen von Claudin-1 mit *Cluster of differentiation* (CD) 31, *Glial fibrillary acidic protein* (GFAP) oder NeuN. Die Mäuse der Lithiumgruppe wurden einer 45-minütigen Okklusion der *Arteria cerebri media* (MCAO) unterzogen, gefolgt von einer Überlebens- bzw. Reperfusionzeit von 24 Stunden. Den Mäusen wurde direkt mit Beginn der Reperfusion 1 mmol/kg Lithiumchlorid in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gelöst und sechs Stunden später 2 mmol/kg Lithiumchlorid in PBS gelöst i.p. injiziert. **(A)** Immunfluoreszenz-Ko-Färbungen von Claudin-1 und CD31. **(B)** Immunfluoreszenz-Ko-Färbungen von Claudin-1 und GFAP. **(C)** Immunfluoreszenz-Ko-Färbungen von Claudin-1 und NeuN. Maßstabbalken: 20  $\mu$ m.

Die Western-Blot-Analyse zeigte eine signifikant erhöhte Expression von ZO1 und Occludin in der lithiumbehandelten Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe 24 Stunden nach MCAO (Abbildung 7 A). 72 Stunden nach MCAO zeigte der Western Blot eine signifikant erhöhte Expression von ZO1 in der lithiumbehandelten Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe und keinen Unterschied in Bezug auf das Expressionsniveau von Occludin (Abbildung 7 B). Die Immunfluoreszenzfärbung für Claudin-1 ergab eine signifikant erhöhte Anzahl an Claudin-1-positiven Zellen in der lithiumbehandelten Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe 24 Stunden nach MCAO (Abbildung 5).

Eine Ko-Färbung mit Claudin-1 und Markern für Endothelzellen (Marker: *Cluster of differentiation* (CD) 31), Astrozyten (Marker: *Glial fibrillary acidic protein* (GFAP)) und Neuronen (Marker: NeuN) zeigte eine Ko-Lokalisation von Claudin-1 zu den Endothelzellen (Abbildung 6 A). Zu Astrozyten und Neuronen wurde keine Ko-Lokalisation von Claudin-1 beobachtet (Abbildung 6 B-C). Dies zeigt, dass es sich bei den gemessenen Proteinen tatsächlich um der Bluthirnschranke zugehörige TJ-Proteine handelt.

Zusammengenommen zeigen diese Ergebnisse, dass die Lithiumbehandlung zu einem verstärkten Erhalt der TJ-Proteine und somit zu einem gesteigerten Funktionserhalt der Bluthirnschranke nach MCAO führt.



**Abbildung 7: Lithium erhöht die Expression der *Tight-Junction*(TJ)-Proteine *Zonula occludens-1* (ZO1) und Occludin nach zerebraler Ischämie der Maus.** Die Mäuse der Kontroll- und Lithiumgruppe wurden einer 45-minütigen Okklusion der *Arteria cerebri media* (MCAO) unterzogen, gefolgt von einer Überlebens- bzw. Reperfuionszeit von 24 bzw. 72 Stunden. Die Mäuse der Kontrollgruppe wurden mit Beginn der Reperfusion mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) und nach sechs Stunden mit einer weiteren Dosis PBS intraperitoneal (i.p.) behandelt. Den Mäusen der Lithiumgruppe wurde direkt mit Beginn der Reperfusion 1 mmol/kg Lithiumchlorid in PBS gelöst und sechs Stunden später 2 mmol/kg Lithiumchlorid in PBS gelöst i.p. injiziert. Die Gruppen mit einer Überlebenszeit von 72 Stunden erhielten alle 24 Stunden weitere i.p. Injektionen mit PBS (Kontrollgruppe) bzw. 2 mmol/kg Lithiumchlorid in PBS gelöst (Lithiumgruppe). **(A)** Quantitative Messung der Proteinexpression von ZO1 und Occludin 24 Stunden nach MCAO mithilfe der Western-Blot-Analyse der ischämischen Hemisphäre. Die Daten sind normalisiert mit den *Housekeeping*-Proteinen Tubulin oder Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). **(B)** Quantitative Messung

der Proteinexpression von ZO1 und Occludin 72 Stunden nach MCAO mithilfe der Western-Blot-Analyse der ischämischen Hemisphäre. Die Daten sind normalisiert mit den *Housekeeping*-Proteinen Tubulin oder Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH).  $n = 4 - 10$  pro Gruppe. Die Daten werden als Mittelwert mit Standardabweichung präsentiert.  $*p < 0,05$ ,  $**p < 0,01$ .

### 3.4 Lithium reduziert Caveolin-1-unabhängig die postischämische Aktivität der MMP-9

Da die Behandlung mit Lithium einen Effekt auf die Durchlässigkeit der Bluthirnschranke und die TJ-Protein-Expression zeigte, wurde anschließend die Aktivität und Expression der Proformen und aktivierten Formen von MMP-2 und MMP-9 und die Expression des Regulatorproteins Caveolin-1 untersucht. Die Aktivität der MMPs wurde dabei mittels Zymographie (siehe Abschnitt 2.2.9) aus Gewebeproben der rechten Hemisphäre 24 Stunden nach MCAO bzw. nach OP-Simulation bestimmt. Die Expression von MMP-9 und Caveolin-1 wurde mittels Immunfluoreszenzfärbung (siehe Abschnitt 2.2.8) und Western-Blot-Analyse (siehe Abschnitt 2.2.7) ebenfalls 24 Stunden nach MCAO gemessen. Des Weiteren wurde mittels Immunfluoreszenzfärbungen die Ko-Lokalisation von Caveolin-1 zu Endothelzellen, Astrozyten und Neuronen untersucht.

Die Messung der MMP-2/9-Aktivität mittels Zymographie ergab eine signifikant verminderte Aktivität von pro-MMP-9 und aktivierter MMP-9 in der Lithiumgruppe und Kontrollgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 8 B). Ebenfalls zeigte sich in der Kontroll- und Lithiumgruppe eine signifikant erhöhte pro-MMP-9-Aktivität im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 8 B). Des Weiteren wurde eine erhöhte Aktivität von pro-MMP-9 und pro-MMP-2 in der Kontrollgruppe im Vergleich zur Scheingruppe beobachtet (Abbildung 8 B). Aktivierte MMP-2 wurde in keiner Gruppe detektiert. Die Immunfluoreszenzfärbung für MMP-9 zeigte eine signifikant verminderte Expression von MMP-9 in der lithiumbehandelten Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 8 A). Sowohl die Western-Blot-Analyse als auch die Immunfluoreszenzfärbung für Caveolin-1 zeigten keinen Unterschied zwischen der Lithiumgruppe und der Kontrollgruppe (Abbildung 8 C-D). Die Ko-Färbung mit Caveolin-1 und Markern für Endothelzellen (Marker: CD31), Astrozyten (Marker: GFAP) und Neuronen (Marker: NeuN) zeigte keine Ko-Lokalisation zu einem bestimmten Zelltyp, sondern eine ubiquitinäre Expression (Abbildung 10).

Zusammengefasst lässt sich festhalten, dass die Lithiumbehandlung eine Reduzierung der Aktivität und Expression von MMP-9 im Vergleich zur Kontrollgruppe bewirkt, und das

unabhängig von der Cavolin-1-Expression. Im Vergleich zur Scheingruppe bleibt die Aktivität von MMP-9 in der Lithiumgruppe jedoch weiterhin erhöht.

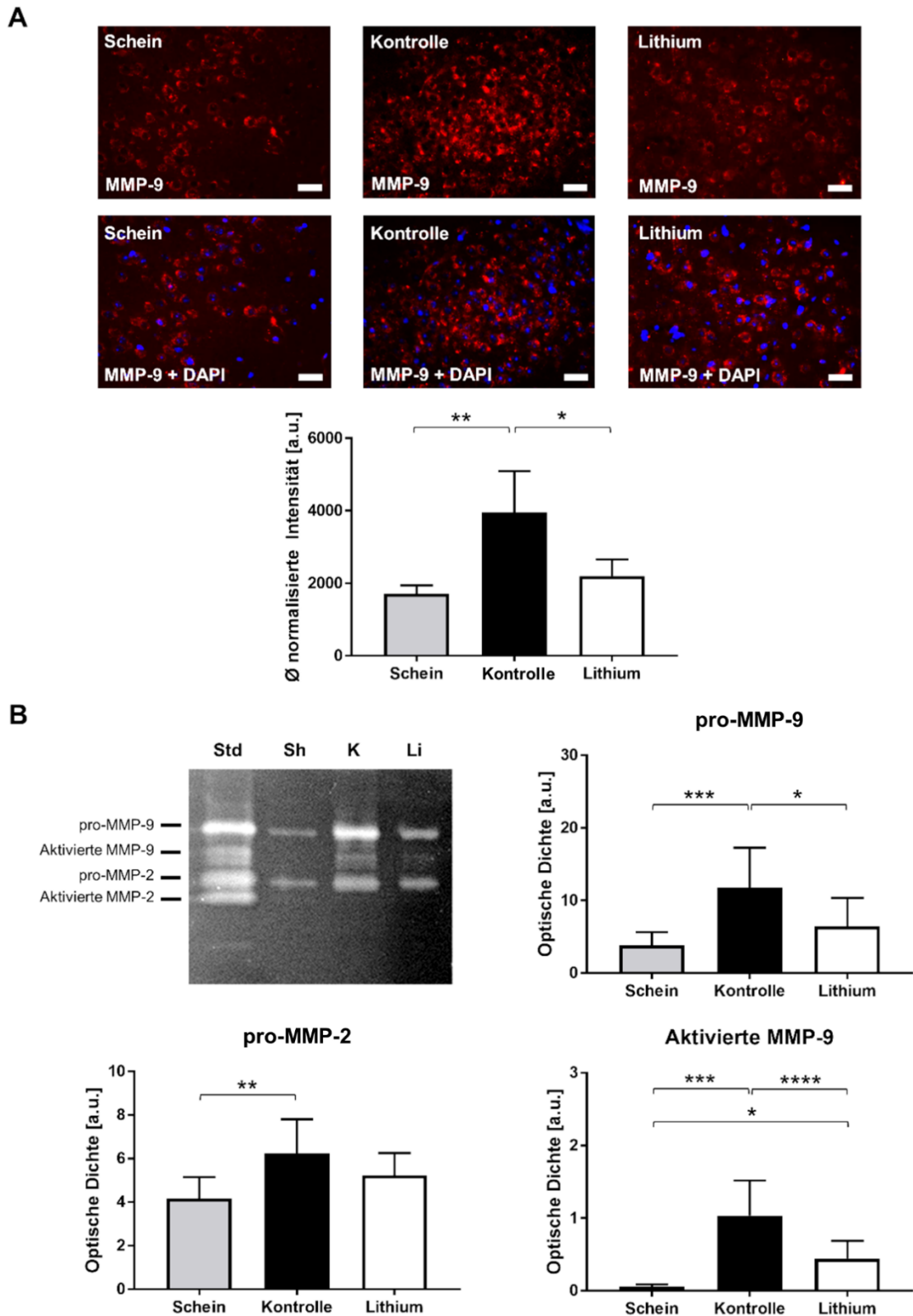
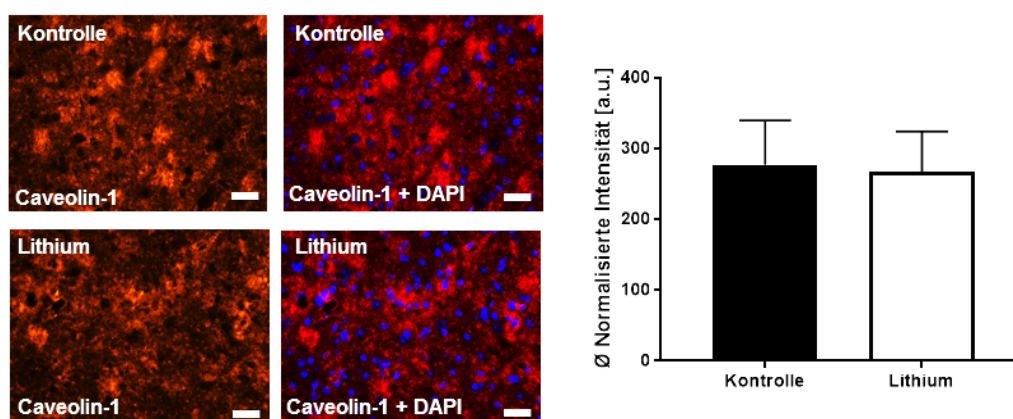


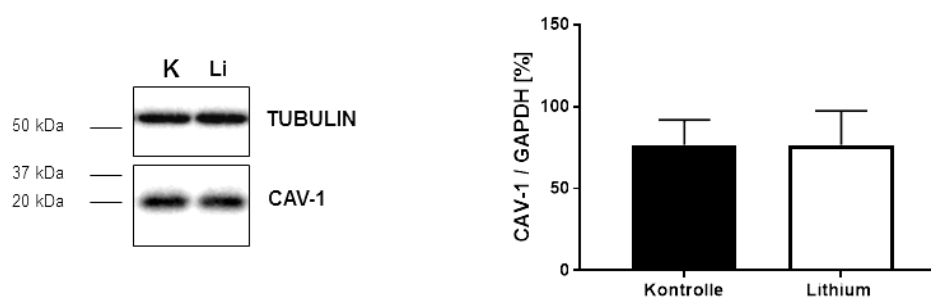
Abbildung 8: Lithium reduziert die Aktivität der Matrix-Metalloprotease 9 (MMP-9) nach zerebraler Ischämie der Maus. Die Mäuse der Kontroll- und Lithiumgruppe wurden einer 45-minütigen Okklusion der

*Arteria cerebri media* (MCAO) unterzogen, gefolgt von einer Überlebens- bzw. Reperfusionzeit von 24 Stunden. Die Mäuse der Scheingruppe unterliefen das identische Operationsprozedere, allerdings ohne tatsächliche MCAO. Die Mäuse der Kontrollgruppe und Scheingruppe wurden mit Beginn der Reperfusion mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) und nach sechs Stunden mit einer weiteren Dosis PBS intraperitoneal (i.p.) behandelt. Den Mäusen der Lithiumgruppe wurde direkt mit Beginn der Reperfusion 1 mmol/kg Lithiumchlorid in PBS gelöst und sechs Stunden später 2 mmol/kg Lithiumchlorid in PBS gelöst i.p. injiziert. **(A)** Quantitative Messung der MMP-9-Expression durch Analyse der Fluoreszenzintensität der ischämischen Hemisphäre. Normalisiert durch die Fluoreszenzintensität der nicht-ischämischen Hemisphäre. Maßstabbalken: 20  $\mu\text{m}$ . **(B)** Messung der Aktivität von pro-MMP-2/MMP-9 und aktivierter MMP-2/MMP-9 mithilfe der Zymographie.  $n = 4 - 10$  pro Gruppe. Die Daten werden als Mittelwert mit Standardabweichung präsentiert. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ .

A

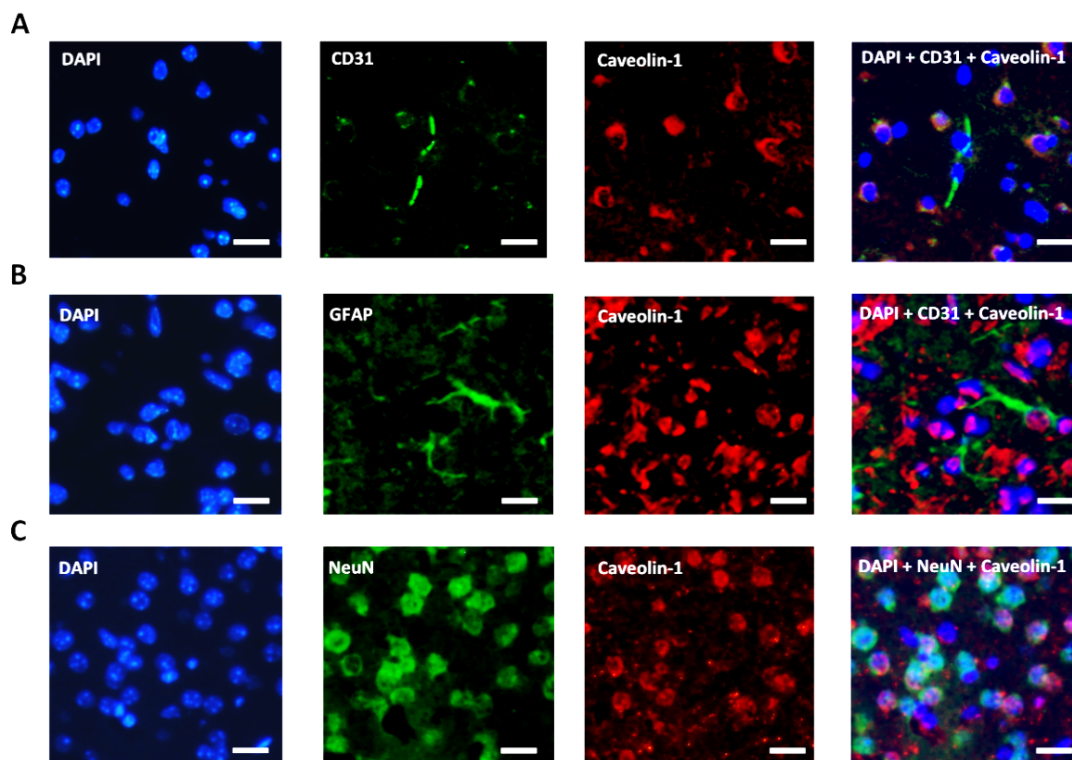


B



**Abbildung 9: Lithium zeigt keinen Einfluss auf die Caveolin-1-Expression.** Die Mäuse der Kontroll- und Lithiumgruppe wurden einer 45-minütigen Okklusion der *Arteria cerebri media* (MCAO) unterzogen, gefolgt von einer Überlebens- bzw. Reperfusionzeit von 24 Stunden. Die Mäuse der Scheingruppe unterliefen das identische Operationsprozedere, allerdings ohne tatsächliche MCAO. Die Mäuse der Kontrollgruppe und Scheingruppe wurden mit Beginn der Reperfusion mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) und nach sechs Stunden mit einer weiteren Dosis PBS intraperitoneal (i.p.) behandelt. Den Mäusen der Lithiumgruppe wurde direkt mit Beginn der Reperfusion 1 mmol/kg Lithiumchlorid in PBS gelöst und sechs Stunden später 2 mmol/kg Lithiumchlorid in PBS gelöst i.p. injiziert. **(A)** Quantitative Messung der Caveolin-1-Expression durch Analyse der Fluoreszenzintensität der ischämischen Hemisphäre. Normalisiert durch die Fluoreszenzintensität der nicht-ischämischen Hemisphäre. Maßstabbalken: 20  $\mu\text{m}$ . **(B)** Quantitative Messung der ZO1- und Occludin-Proteinexpression durch Western-Blot-Analyse. Normalisiert mithilfe des *Housekeeping*-Proteins Tubulin.  $n = 4 - 10$  pro Gruppe. Die Daten werden als Mittelwert mit Standardabweichung präsentiert. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ .



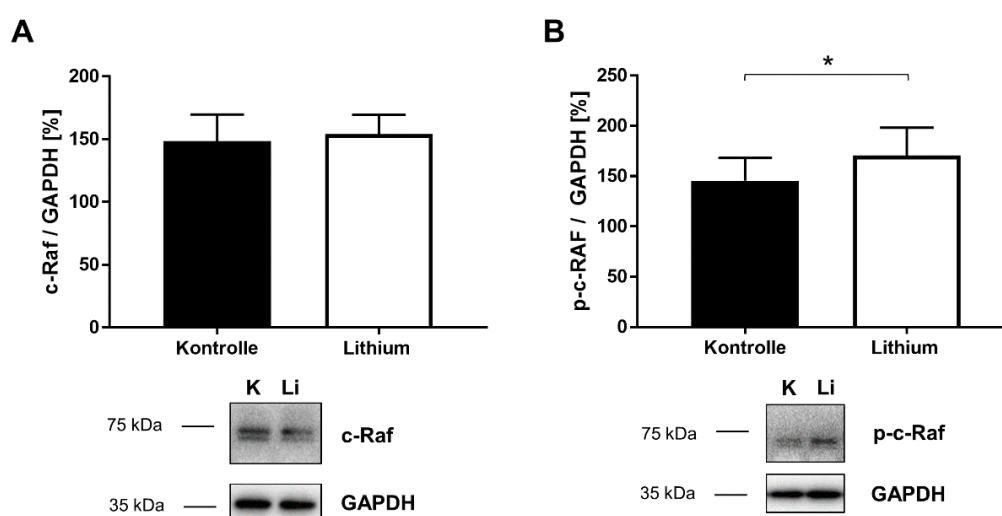


**Abbildung 10:** Repräsentative Immunfluoreszenz-Ko-Färbungen von Caveolin-1 mit *Cluster of differentiation (CD) 31*, *Glial fibrillary acidic protein (GFAP)* oder *NeuN*. Die Mäuse der Lithiumgruppe wurden einer 45-minütigen Okklusion der *Arteria cerebri media (MCAO)* unterzogen, gefolgt von einer Überlebens- bzw. Reperfuionszeit von 24 Stunden. Den Mäusen wurde direkt mit Beginn der Reperfusion 1 mmol/kg Lithiumchlorid in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gelöst und sechs Stunden später 2 mmol/kg Lithiumchlorid in PBS gelöst i.p. injiziert. **(A)** Immunfluoreszenz-Ko-Färbungen von Cavoclin-1 und CD31. **(B)** Immunfluoreszenz-Ko-Färbungen von Caveolin-1 und GFAP. **(C)** Immunfluoreszenz-Ko-Färbungen von Caveolin-1 und NeuN. Maßstabbalken: 20  $\mu\text{m}$ .

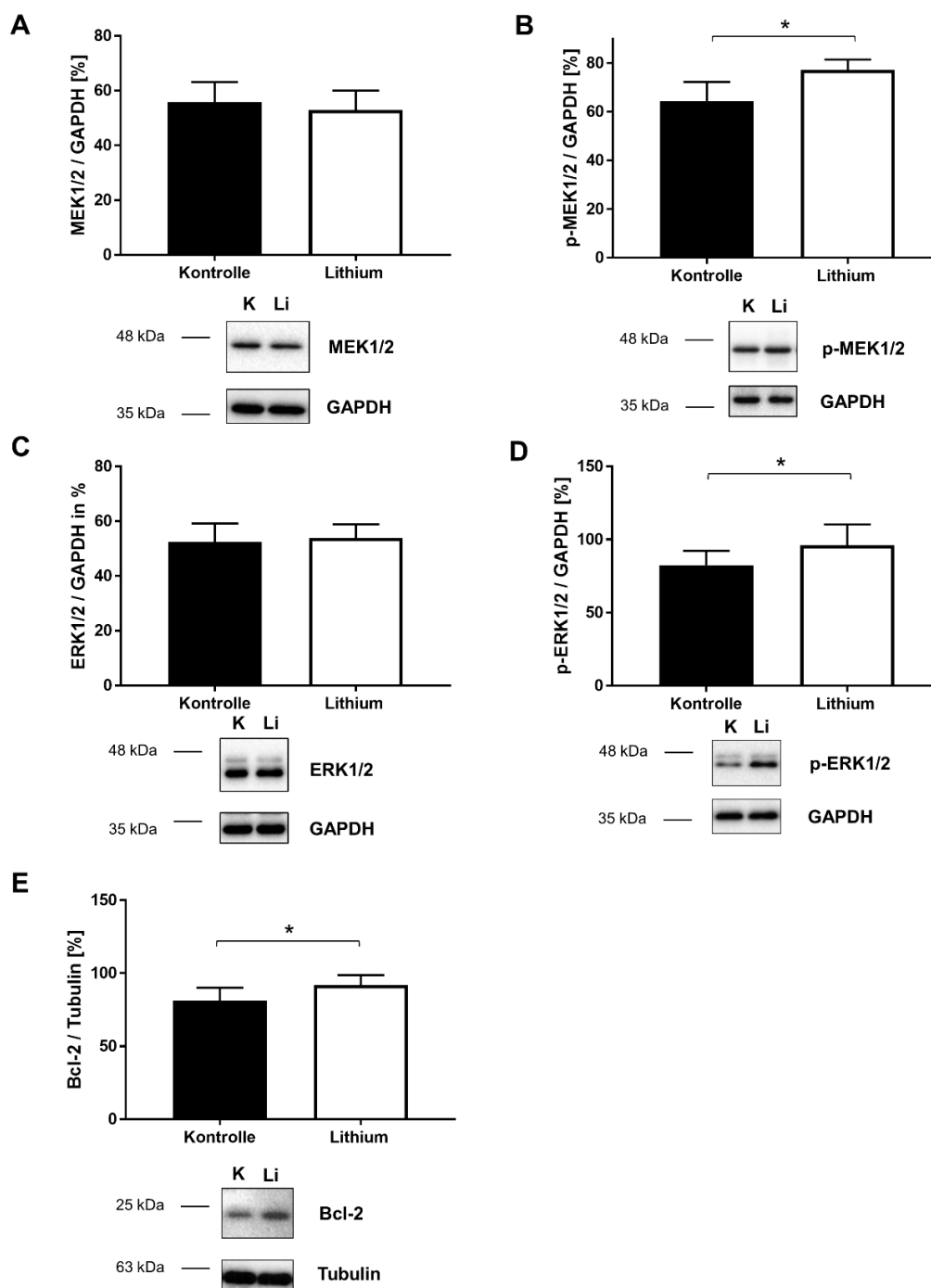
### 3.5 Lithium aktiviert den MAPK-/ERK1/2-Signalweg durch gesteigerte Phosphorylierung

Zur Identifizierung des Signalwegs, über den Lithium seine Effekte auf die Bluthirnschranke vermittelt, wurde der MAPK-/ERK1/2-Signalweg als möglicher Kandidat untersucht. Hierfür wurde die Expression von *Rapidly accelerated fibrosarcoma (c-Raf)*, MEK1/2, *Extracellular-signal regulated kinases (ERK1/2)* und deren aktivierten Formen *Phosphor-rapidly accelerated fibrosarcoma (p-c-Raf)*, p-MEK1/2 und *Phosphor-extracellular-signal regulated kinases (p-ERK1/2)* mithilfe der Western-Blot-Analyse (siehe Abschnitt 2.2.7) gemessen. Dabei wurde das Gewebe der ischämischen Hemisphären der lithiumbehandelten Mäuse und der unbehandelten Kontrolltiere 24 Stunden nach MCAO analysiert.

Wie die Western-Blot-Analyse ergab, zeigte sich bzgl. der Expression von c-Raf, MEK1/2 und ERK1/2 kein Unterschied zwischen den lithiumbehandelten Mäusen und den unbehandelten Kontrolltieren (Abbildung 11 A, Abbildung 12 A und C). Die Expression der phosphorylierten Formen p-c-Raf, p-MEK1/2 und p-ERK1/2 war hingegen in der lithiumbehandelten Gruppe signifikant erhöht im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe (Abbildung 11 B, Abbildung 12 B und D). Des Weiteren zeigte sich die Expression des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 als des nachgeschalteten Effektorproteins des MAPK-/ERK1/2-Signalwegs durch die Lithiumbehandlung signifikant erhöht (Abbildung 12 E).



**Abbildung 11: Lithium moduliert die *Rapidly-accelerated-fibrosarcoma*(c-Raf)-Phosphorylierung nach zerebraler Ischämie der Maus.** Die Mäuse der Kontroll- und Lithiumgruppe wurden einer 45-minütigen Okklusion der *Arteria cerebri media* (MCAO) unterzogen, gefolgt von einer Überlebens- bzw. Reperfuionszeit von 24 Stunden. Die Mäuse der Kontrollgruppe wurden mit Beginn der Reperfusion mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) und nach sechs Stunden mit einer weiteren Dosis PBS intraperitoneal (i.p.) behandelt. Den Mäusen der Lithiumgruppe wurde direkt mit Beginn der Reperfusion 1 mmol/kg Lithiumchlorid in PBS gelöst und sechs Stunden später 2 mmol/kg Lithiumchlorid in PBS gelöst i.p. injiziert. **(A-B)** Quantitative Messung der Expression von c-Raf und *Phosphor-rapidly accelerated fibrosarcoma* (p-c-Raf) mithilfe der Western-Blot-Analyse der ischämischen Hemisphäre. Die Daten sind normalisiert mit dem *Housekeeping*-Protein Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH).  $n = 6$  in der Kontrollgruppe und  $n = 10$  in der Lithiumgruppe. Die Daten werden als Mittelwert mit Standardabweichung präsentiert. \* $p < 0,05$ .



**Abbildung 12:** Lithium moduliert die *Extracellular-signal-regulated-kinases*(ERK1/2)-Phosphorylierung und die Expression von B-Zell-Lymphom 2 (Bcl-2) nach zerebraler Ischämie der Maus. Die Mäuse der Kontroll- und Lithiumgruppe wurden einer 45-minütigen Okklusion der *Arteria cerebri media* (MCAO) unterzogen, gefolgt von einer Überlebens- bzw. Reperusionszeit von 24 Stunden. Die Mäuse der Kontrollgruppe wurden mit Beginn der Reperfusion mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) und nach sechs Stunden mit einer weiteren Dosis PBS intraperitoneal (i.p.) behandelt. Den Mäusen der Lithiumgruppe wurde direkt mit Beginn der Reperfusion 1 mmol/kg Lithiumchlorid in PBS gelöst und sechs Stunden später 2 mmol/kg Lithiumchlorid in PBS gelöst i.p. injiziert. **(A-D)** Quantitative Messung der Expression von MEK1/2, p-MEK1/2, ERK1/2 und *Phosphor-extracellular-signal regulated kinases* (p-ERK1/2) mithilfe der Western-Blot-Analyse der ischämischen Hemisphäre. Die Daten sind normalisiert mit dem *Housekeeping*-Protein Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). **(E)** Quantitative Messung der Bcl-2-Expression mithilfe der Western-Blot-Analyse der ischämischen Hemisphäre. Die Daten sind normalisiert mit den *Housekeeping*-Proteinen Tubulin oder Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH).  $n = 6$  in der

Kontrollgruppe und  $n = 10$  in der Lithiumgruppe. Die Daten werden als Mittelwert mit Standardabweichung präsentiert.  $*p < 0,05$ .

Zusammengenommen zeigen die Ergebnisse eine lithiumvermittelte Aktivierung des MAPK-/ERK1/2-Signalwegs durch verstärkte Phosphorylierung der Effektorproteine des Signalwegs. Die absoluten Expressionslevel der Effektorproteine blieben dabei unverändert.

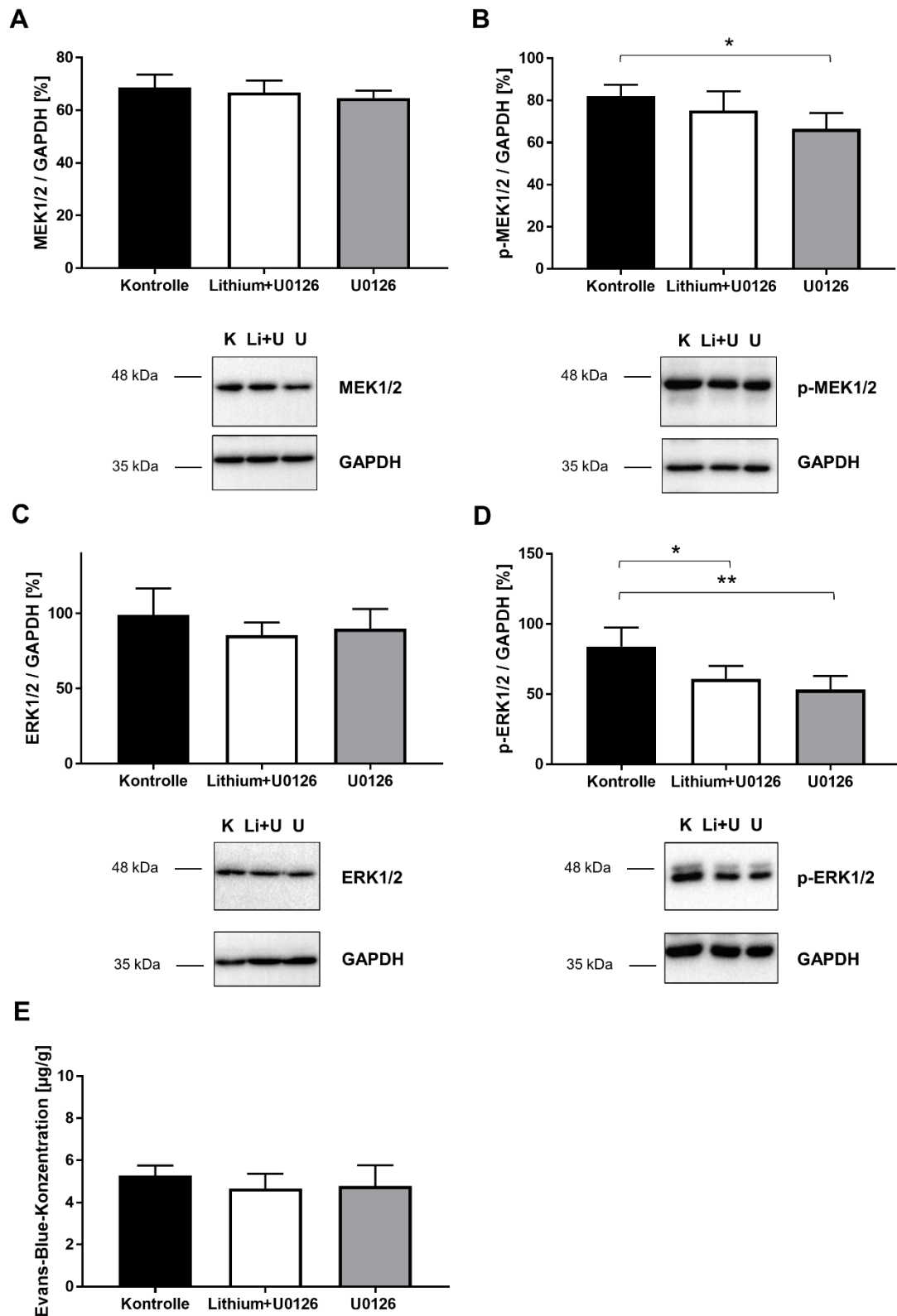
### **3.6 Die Inhibition der Aktivierung des MAPK-/ERK1/2-Signalwegs hebt die lithiuminduzierten Effekte auf die Bluthirnschranke auf**

Um zu untersuchen, ob die Aktivierung des MAPK-/ERK1/2-Signalwegs relevant für die lithiuminduzierten Effekte auf die Bluthirnschranke ist, wurde die Aktivierung mithilfe des MEK-Inhibitors U0126 unterdrückt. Um sicherzustellen, dass die Inhibition der Aktivierung mittels U0126 erfolgreich war, wurden 24 Stunden nach MCAO die Expressionslevel von MEK1/2, p-MEK1/2, ERK1/2 und p-ERK1/2 mithilfe der Western-Blot-Analyse (siehe Abschnitt 2.2.7) untersucht.

In Bezug auf die Expressionslevel von MEK1/2 und ERK1/2 konnten dabei keine Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden (Abbildung 13 A und C). Bei p-MEK1/2 allerdings war die Expression in der U0126-Gruppe signifikant vermindert im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 13 B und D). Zusätzlich war das Expressionslevel von p-ERK1/2 in der U0126+Lithium-Gruppe und der U0126-Gruppe signifikant vermindert im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 13 E). Dies zeigt, dass die Aktivierung des MAPK-/ERK1/2-Signalwegs effektiv mithilfe des U0126 unterdrückt werden kann.

Im Anschluss wurde die Durchlässigkeit der Bluthirnschranke mithilfe der Evans-Blue-Extravasation (siehe Abschnitt 2.2.6) in allen drei Gruppen untersucht. Hierbei konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen beobachtet werden (Abbildung 13 E).

Zusammengenommen zeigen die Ergebnisse, dass eine Inhibition der Aktivierung des MAPK-/ERK1/2-Signalwegs durch Lithium zur Aufhebung der lithiuminduzierten Effekte auf die Durchlässigkeit der Bluthirnschranke führt. Das wiederum beweist, dass die Aktivierung des MAPK-/ERK1/2-Signalwegs ein zentraler Mechanismus des lithiuminduzierten Effekts auf die Bluthirnschranke ist.



**Abbildung 13: Der MEK1/2-Inhibitor U0126 hebt die Effekte von Lithium auf die Bluthirnschrankenintegrität nach zerebraler Ischämie der Maus auf.** Die Mäuse der Kontroll-, Lithium+U0126- und U0126-Gruppe wurden einer 45-minütigen Okklusion der *Arteria cerebri media* (MCAO) unterzogen, gefolgt von einer Überlebens- bzw. Reperusionszeit von 24 Stunden. Den Mäusen der Kontrollgruppe wurde mit Beginn der Reperfusion phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) intraperitoneal (i.p.) und intravenös (i.v.) injiziert und nach sechs Stunden eine weitere Dosis PBS i.p. injiziert. Mäusen der Lithium+U0126-Gruppe wurde direkt mit Beginn der Reperfusion 1 mmol/kg Lithiumchlorid in PBS gelöst

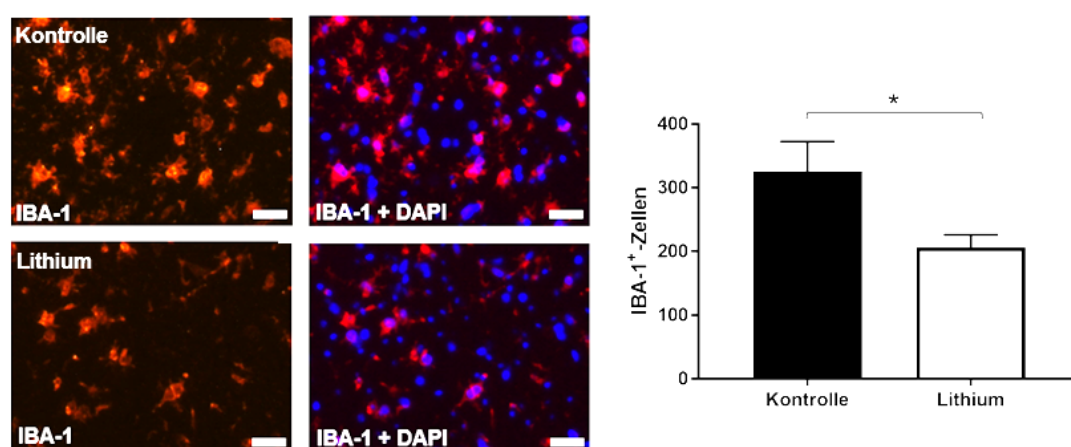
i.p. und 0,5 mg/kg U0126 i.v. sowie sechs Stunden später 2 mmol/kg Lithiumchlorid in PBS gelöst i.p. injiziert. Den Mäusen der U0126-Gruppe wurde mit Beginn der Reperfusion phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) i.p. und 0,5 mg/kg U0126 i.v. injiziert und nach sechs Stunden eine weitere Dosis PBS i.p. injiziert. **(A-D)** Quantitative Messung der Expression von MEK1/2, p-MEK1/2, *Extracellular-signal regulated kinases* (ERK1/2) und *Phosphor-extracellular-signal regulated kinases* (p-ERK1/2) mithilfe der Western-Blot-Analyse der ischämischen Hemisphäre. Die Daten sind normalisiert mit dem *Housekeeping*-Protein Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). **(E)** Untersuchung der Bluthirnschrankenintegrität der ischämischen Hemisphäre mithilfe der Evans-Blue-Extravasation.  $n = 4$  pro Gruppe. Die Daten werden als Mittelwert mit Standardabweichung präsentiert.  $*p < 0,05$ .

### 3.7 Die postischämische Aktivierung der Mikroglia wird durch Lithium reduziert

Um einen möglichen Einfluss auf die Neuroinflammation durch die Lithiumbehandlung zu untersuchen, wurde im Folgenden die Aktivierung der Mikroglia 24 Stunden nach MCAO untersucht. Hierfür wurde eine Immunfluoreszenzfärbung (siehe Abschnitt 2.2.8) mit dem Antikörper *Calcium-binding adapter molecule 1* (IBA-1) durchgeführt. Dabei wurde für die Immunfluoreszenzfärbung Gewebe der ischämischen Hemisphären von Versuchstieren der Lithiumgruppe und der Kontrollgruppe 24 Stunden nach MCAO verwendet. Bei der Auswertung wurden ausschließlich morphologisch aktivierte Mikrogliazellen gezählt.

Die Immunfluoreszenzfärbung zeigte eine signifikante Reduzierung der morphologisch aktivierten Mikrogliazellen in der lithiumbehandelten Gruppe im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe 24 Stunden nach MCAO (Abbildung 14).

Dies deutet auf eine Modulation der Neuroinflammation durch die Lithiumbehandlung nach MCAO hin.



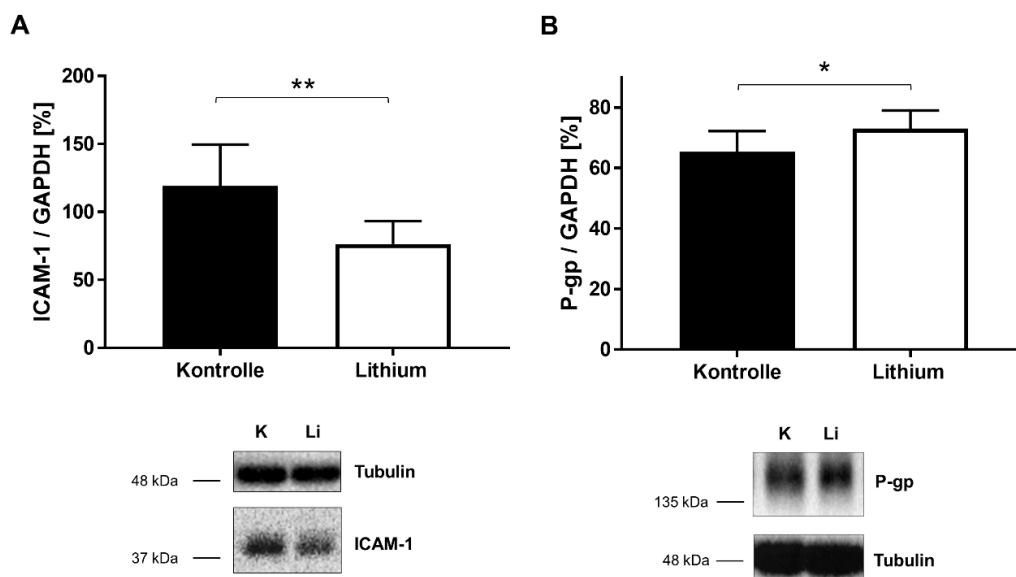
**Abbildung 14: Lithium reduziert die postischämische Aktivierung der Mikroglia.** Die Mäuse der Kontroll- und Lithiumgruppe wurden einer 45-minütigen Okklusion der *Arteria cerebri media* (MCAO) unterzogen, gefolgt von einer Überlebens- bzw. Reperusionszeit von 24 Stunden. Die Mäuse der Kontrollgruppe wurden mit Beginn der Reperfusion mit phosphatgepuffertter Salzlösung (PBS) und nach

sechs Stunden mit einer weiteren Dosis PBS intraperitoneal (i.p.) behandelt. Den Mäusen der Lithiumgruppe wurde direkt mit Beginn der Reperfusion 1 mmol/kg Lithiumchlorid in PBS gelöst und sechs Stunden später 2 mmol/kg Lithiumchlorid in PBS gelöst i.p. injiziert. Quantitative immunohistochemische Analyse der aktivierten *Calcium-binding-adaptor-molecule-1* (IBA-1)-positiven Mikrogliazellen der ischämischen Hemisphäre. Maßstabbalken: 20  $\mu\text{m}$ .  $n = 4$  pro Gruppe. Die Daten werden als Mittelwert mit Standardabweichung präsentiert.  $*p < 0,05$ .

### 3.8 Lithium moduliert die postischämische Expression der endothelialen Oberflächenproteine ICAM-1 und P-gp

Die zelluläre, lokale Immunantwort ist ein weiteres zentrales Element in der Inflammationsreaktion nach ischämischem Schlaganfall. Für die Einwanderung der Leukozyten ist die erhöhte Expression sogenannter Zelladhäsionsmoleküle wie dem *Intercellular adhesion molecule 1* (ICAM-1) von zentraler Bedeutung. Aus diesem Grund wurde im Folgenden mittels Western-Blot-Analyse (siehe Abschnitt 2.2.7) die Expression von ICAM-1 untersucht. Dafür wurde Gewebe der ischämischen Hemisphären der Lithiumgruppe und Kontrollgruppe 24 Stunden nach MCAO untersucht.

Tatsächlich zeigte sich in der Western-Blot-Analyse eine signifikant verminderte ICAM-1-Expression in der lithiumbehandelten Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 15 A).



**Abbildung 15: Lithium reduziert die postischämische Expression der Oberflächenproteine *Protein intercellular adhesion molecule 1* (ICAM-1) und des P-Glykoproteins (P-gp).** Die Mäuse der Kontroll- und Lithiumgruppe wurden einer 45-minütigen Okklusion der *Arteria cerebri media* (MCAO) unterzogen, gefolgt von einer Überlebens- bzw. Reperfusionszeit von 24 Stunden. Die Mäuse der Kontrollgruppe wurden mit Beginn der Reperfusion mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) und nach sechs Stunden mit einer weiteren Dosis PBS intraperitoneal (i.p.) behandelt. Den Mäusen der Lithiumgruppe wurde direkt mit Beginn der Reperfusion 1 mmol/kg Lithiumchlorid in PBS gelöst und sechs Stunden später 2 mmol/kg Lithiumchlorid in PBS gelöst i.p. injiziert. **(A-B)** Quantitative Messung der Expression von ICAM-1 und P-gp mithilfe der Western-Blot-

Analyse der ischämischen Hemisphäre. Die Daten sind normalisiert mit dem *Housekeeping*-Protein Tubulin.  $n = 6$  in der Kontrollgruppe und  $n = 10$  in der Lithiumgruppe. Die Daten werden als Mittelwert mit Standardabweichung präsentiert.  $*p < 0,05$ ,  $**p < 0,01$ .

Nachdem eine Lithiumbehandlung im Zellversuch eine erhöhte P-gp-Expression bewirkte (siehe Abschnitt 3.1), wurde nun ebenfalls *in vivo* die Expression von P-gp mittels Western-Blot-Analyse untersucht. Dafür wurde Gewebe der ischämischen Hemisphären von Versuchstieren der Lithiumgruppe und der Kontrollgruppe 24 Stunden nach MCAO verwendet.

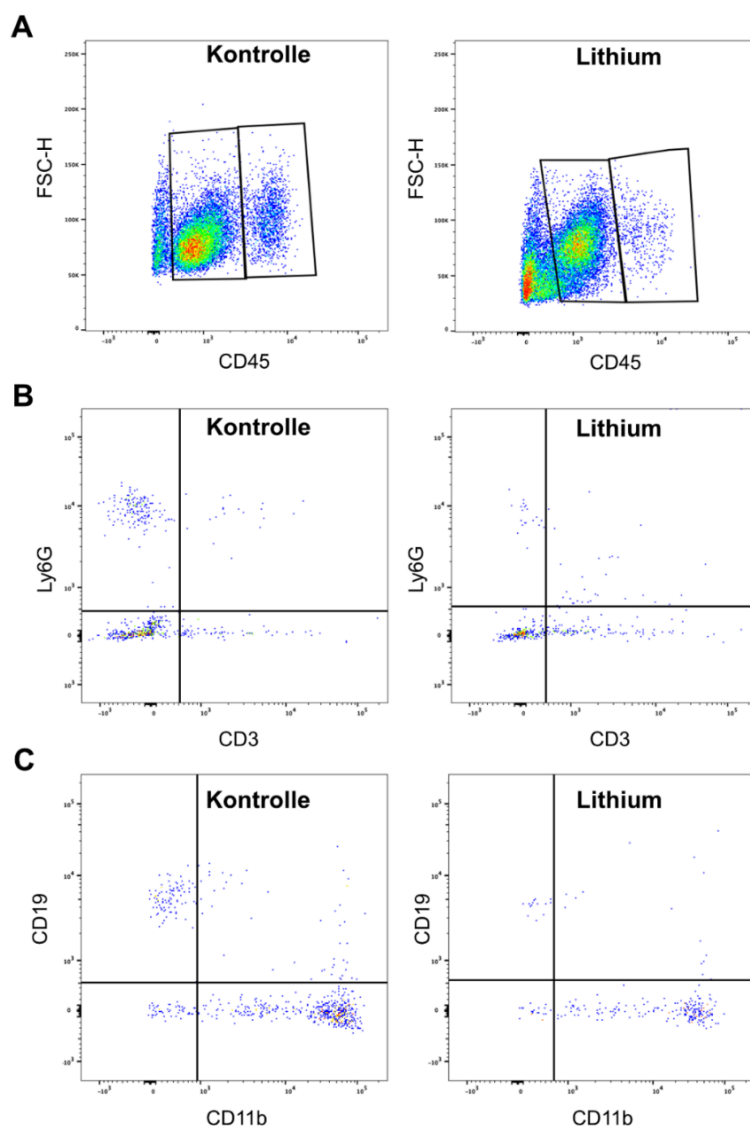
Analog zu den Ergebnissen des Zellversuches (siehe Abschnitt 3.1) zeigte die Analyse des Western Blots eine signifikant erhöhte P-gp-Expression in der lithiumbehandelten Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 15 B).

Zusammengefasst zeigt dies, dass die Lithiumbehandlung zu einer veränderten Expression von Oberflächenproteinen auf Endothelzellen führt.

### **3.9 Lithium moduliert die frühe Immunzellmigration in das Infarktgewebe**

Da Lithium einen Effekt sowohl auf die Bluthirnschrankenintegrität als auch auf die Zelladhäsionsmoleküle ICAM-1 zeigte (siehe Abschnitt 3.2 und Abschnitt 3.8), wurde im nächsten Schritt untersucht, ob Lithium einen Einfluss auf die postischämische Infiltration der Leukozyten hat. Dabei wurden die infiltrierten Leukozyten sowohl quantitativ gemessen als auch die relativen Anteile der Subgruppen ermittelt. Leukozyten, Neutrophile, T-Zellen, B-Zellen, Makrophagen und Monozyten wurden mit ihren zugehörigen Oberflächenmarkern untersucht (Abbildung 1). Die Messung erfolgte mit der Durchflusszytometrie (siehe Abschnitt 2.2.10) mit Gewebe der ischämischen Hemisphären von Versuchstieren der Lithiumgruppe und der Kontrollgruppe 24 Stunden nach MCAO.



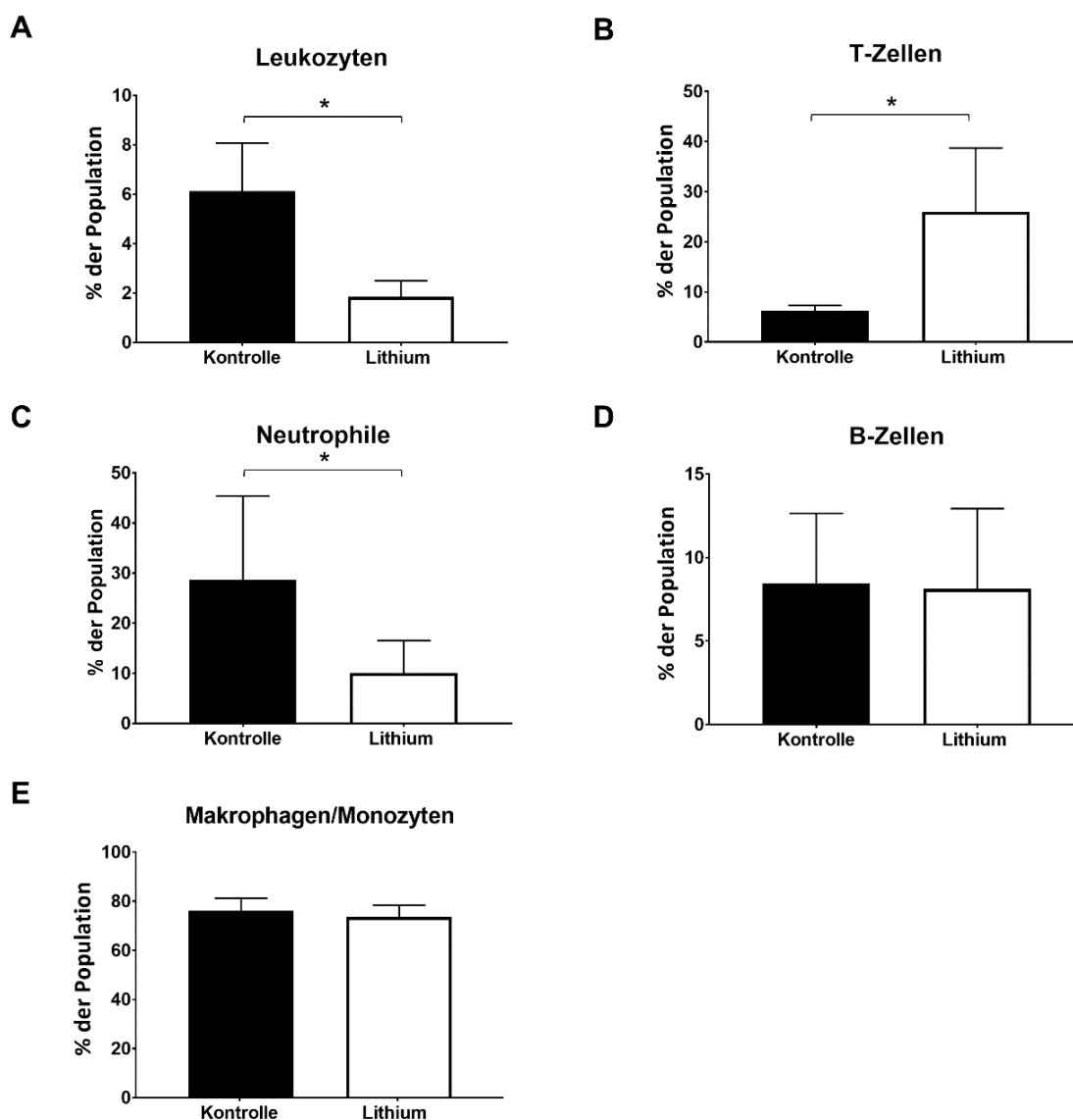


**Abbildung 16: Repräsentative Rohdaten der Durchflusszytometrie.** Die Mäuse der Kontroll- und Lithiumgruppe wurden einer 45-minütigen Okklusion der *Arteria cerebri media* (MCAO) unterzogen, gefolgt von einer Überlebens- bzw. Reperfuionszeit von 24 Stunden. Die Mäuse der Kontrollgruppe wurden mit Beginn der Reperfusion mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) und nach sechs Stunden mit einer weiteren Dosis PBS intraperitoneal (i.p.) behandelt. Den Mäusen der Lithiumgruppe wurde direkt mit Beginn der Reperfusion 1 mmol/kg Lithiumchlorid in PBS gelöst und sechs Stunden später 2 mmol/kg Lithiumchlorid in PBS gelöst i.p. injiziert. **(A)** Repräsentative Durchflusszytometrie-Messung mit Gating für Mikroglia (CD45<sup>int</sup>) und Leukozyten (CD45<sup>high</sup>). **(B)** Repräsentative Durchflusszytometrie-Messung mit Gating für Neutrophile (Ly6G<sup>+</sup>, CD3<sup>-</sup>) und T-Zellen (Ly6G<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>). **(C)** Repräsentative Durchflusszytometrie-Messung mit Gating für B-Zellen (CD19<sup>+</sup>, CD11b<sup>-</sup>) und Makrophagen/Monozyten (CD19<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup>).

Abbildung 16 zeigt beispielhaft Rohdaten einer repräsentativen durchflusszytometrischen Messung. Die anschließende Auswertung der gewonnenen Rohdaten zeigte eine signifikante Verringerung von infiltrierten Leukozyten in der Lithiumgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 17 A). Des Weiteren zeigte sich der relative Anteil an Neutrophilen signifikant vermindert und der relative Anteil an T-Zellen signifikant erhöht in

der Lithiumgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 17 B und C). Auf die relativen Anteile an B-Zellen, Monozyten und Makrophagen (Abbildung 17 D und E) zeigte die Lithiumbehandlung keinen Effekt.

Zusammengenommen zeigen die Ergebnisse der Durchflusszytometrie, dass die Lithiumbehandlung zu einer Modulation der lokalen Immunantwort führt.



**Abbildung 17: Lithium moduliert die postischämische Infiltration von Immunzellen aus dem Blut in das Hirnparenchym.** Die Mäuse der Kontroll- und Lithiumgruppe wurden einer 45-minütigen Okklusion der *Arteria cerebri media* (MCAO) unterzogen, gefolgt von einer Überlebens- bzw. Reperfusionzeit von 24 Stunden. Die Mäuse der Kontrollgruppe wurden mit Beginn der Reperfusion mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) und nach sechs Stunden mit einer weiteren Dosis PBS intraperitoneal (i.p.) behandelt. Den Mäusen der Lithiumgruppe wurde direkt mit Beginn der Reperfusion 1 mmol/kg Lithiumchlorid in PBS und sechs Stunden später 2 mmol/kg Lithiumchlorid in PBS i.p. injiziert. Quantitative Analyse der (A) Leukozyten, (B) T-Zellen, (C) Neutrophilen, (D) B-Zellen und (E) Makrophagen/Monozyten in der ischämischen Hemisphäre mithilfe der Durchflusszytometrie.  $n = 5$  pro Gruppe. Die Daten werden als Mittelwert mit Standardabweichung präsentiert.  $*p < 0,05$ .

## 4 Diskussion

Zur Therapie des ischämischen Schlaganfalls stehen zur Akuttherapie die systemische Thrombolyse und die mechanische Thrombektomie zur Verfügung. Beides sind kausale Verfahren, die die Rekanalisierung des okkludierten Gefäßes zum Ziel haben. Eine weiterführende verlaufsmodifizierende adjuvante medikamentöse Therapie existiert hingegen nicht. Seit Jahrzehnten wird deshalb intensive Forschung betrieben, um eine Substanz zu entdecken, die sicher im Einsatz ist und zugleich einen signifikanten neuroprotektiven Effekt bei Patienten nach ischämischem Schlaganfall hat. Eine Vielzahl von möglichen Substanzen wurde so in den vergangenen Jahren untersucht. Trotz oftmals vielversprechender präklinischer Daten scheiterten bisher alle Substanzen spätestens in der klinischen Phase der Studien (Patel und McMullen 2017). Die Gründe für die gescheiterte Translation sind dabei vielfältig. Zu den wichtigsten zählen starke Nebenwirkungen am Menschen, das Nicht-Berücksichtigen von Komorbiditäten im Tiermodell und schlichtweg fehlende Übertragbarkeit vom Tiermodell auf den Menschen (Dirnagl et al. 1999). Hier bietet Lithium, welches neben seinem Einsatz bei psychiatrischen Erkrankungen auch bei zerebraler Ischämie neuroprotektive Effekte gezeigt hat (siehe Abschnitt 1.6), als potenzielles Medikament einige Vorteile. Da Lithium seit Jahrzehnten erfolgreich klinisch angewandt wird, sind Nebenwirkungen und tolerierbare Plasmaspiegel gut erforscht (siehe Abschnitt 1.4). Neben der Vielzahl präklinischer Studien zeigte auch eine prospektive randomisierte placebokontrollierte Studie Hinweise auf eine mögliche therapeutische Wirkung von Lithium bei Patienten mit erstmaligem Auftreten eines ischämischen Schlaganfalls (siehe Abschnitt 1.6). Hier sind jedoch weitere Studien nötig, um diese ersten Hinweise hinreichend zu validieren. Die Wirkmechanismen von Lithium blieben dabei bisher nicht verstanden. Insbesondere für die Planung weiterer klinischer Studien ist es allerdings hilfreich, die genauen Mechanismen der lithiumvermittelten Neuroprotektion zu verstehen. So könnte ein besseres Verständnis eine präzisere Selektion von Patienten ermöglichen, die von einer Therapie mit Lithium profitieren.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einen Teil der Mechanismen zu identifizieren, über die Lithium seine neuroprotektive Wirkung induziert. Hierfür wurden *In-vitro*-Versuche an Endothelzellen mit OGD als Imitation des Zustandes unter zerebraler Ischämie und *In-vivo*-Versuche an Mäusen mit Induktion eines Schlaganfalls mithilfe der MCAO-Technik durchgeführt. Dabei wurde der Hypothese nachgegangen, dass die Lithiumgabe zu einer postschämischen Protektion der Bluthirnschranke und damit zur Neuroprotektion führt.

Tatsächlich konnte in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal gezeigt werden, dass Lithium *in vitro* an Endothelzellen eine Modulation der Expression von TJ-Proteinen und des P-gp-Rezeptors bewirkt (siehe Abschnitt 3.1). Weiter zeigten die *In-vivo*-Experimente eine durch die Lithiumtherapie reduzierte Durchlässigkeit der Bluthirnschranke 24 Stunden nach MCAO sowie eine Modulation der Expression von TJ-Proteinen 24 und 72 Stunden nach MCAO (siehe Abschnitt 3.2 und Abschnitt 3.3). Hierbei konnte zudem gezeigt werden, dass diese Stabilisierung der Bluthirnschranke mit einer verringerten Aktivierung und Expression von MMP-9 einhergeht (siehe Abschnitt 3.4). Dabei war der Einfluss von Lithium auf die MMP-9 unabhängig von dem regulatorischen Protein Caveolin-1 (siehe Abschnitt 3.4). Die Lithiumgabe war zudem mit einer erhöhten Phosphorylierung der Effektorproteine des MAPK-/ERK1/2-Signalwegs sowie mit einer erhöhten Expression des anti-apoptotischen Proteins Bcl-2 verbunden (siehe Abschnitt 3.5). Eine Antagonisierung dieser lithiumvermittelten Modulation des MAPK-/ERK1/2-Signalwegs durch den MEK1/2-Inhibitor U0126 führte zu einer Aufhebung der Wirkung von Lithium auf die Durchlässigkeit der Bluthirnschranke (siehe Abschnitt 3.6). Die Lithiumgabe führte in Bezug auf die Inflammation zu einer Modulation der mikroglialen Aktivierung sowie zu einer verringerten Expression des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 (siehe Abschnitt 3.7 und Abschnitt 3.8). Zeitgleich konnte eine reduzierte Infiltration von Leukozyten aus dem Blut in das Hirnparenchym beobachtet werden (siehe Abschnitt 3.9). Innerhalb der eingewanderten Leukozyten konnte zudem ein verringerter Anteil an Neutrophilen und ein erhöhter Anteil an T-Zellen beobachtet werden. Im Folgenden werden die gesamten Ergebnisse im Detail diskutiert.

In den *In-vitro*-Versuchen konnte gezeigt werden, dass lithiumhaltiges Medium zu einer besseren Überlebensfähigkeit der Endothelzellen führt. Dieser Effekt wurde bereits in anderen Studien beobachtet (Cimarosti et al. 2001; Silachev et al. 2016). Ein Erklärungsansatz für diesen Effekt bietet der Einfluss von Lithium auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase. Hier verhindert Lithium den massiven intrazellulären Anstieg von  $\text{Ca}^{2+}$  unter zerebraler Ischämie (siehe Abschnitt 1.6). Interessanterweise konnte des Weiteren in der vorliegenden Arbeit erstmals auch ein Einfluss auf die Expression von TJ-Proteinen bei Endothelzellen nach OGD beobachtet werden. Denn hier verhinderte Lithium den Verlust von TJ-Proteinen nach OGD. Da die absolute Expression mit dem *Housekeeping*-Protein Tubulin bzw. Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) normalisiert wurde, lässt sich die höhere Expression nicht durch das erhöhte Zellüberleben erklären. Da der Verlust von TJ-Proteinen der Hauptfaktor für die Öffnung der Bluthirnschranke ist, bestätigt diese Beobachtung in einem ersten Schritt die Hypothese dieser Arbeit. Die *In-vitro*-Versuche sind

allerdings mit deutlichen Einschränkungen in Bezug auf die Übertragbarkeit auf die *In-vivo*-Situation zu werten. Zum einen zeigte sich die verwendete Endothelzelllinie gegenüber dem OGD sehr widerstandsfähig, weshalb die Zeit des Entzugs mit 14 Stunden deutlich länger als bei der MCAO-Technik bzw. bei Patienten mit einem ischämischen Schlaganfall ist, und zum anderen sind die Zellen gänzlich isoliert von den komplexen lokalen und systemischen Abläufen, die die Ischämie *in vivo* auslöst. Eine weitere erwähnenswerte Einschränkung ist, dass die Zellen vor, während und nach OGD mit Lithium inkubiert waren. Diese Behandlungsstrategie ist perspektivisch nicht auf den klinischen Alltag übertragbar. Zur Bestätigung dieser ersten Hinweise auf einen Einfluss von Lithium auf Endothelzellen wurden die Versuche *in vivo* in Mäusen fortgesetzt.

Die *In-vivo*-Versuche zeigten in Bezug auf die Bluthirnschranke eine verringerte Durchlässigkeit 24 Stunden nach zerebraler Ischämie. Die Durchlässigkeit wurde anhand des im Hirnparenchym angereicherten Evans-Blue-Farbstoffes quantifiziert und über das Gesamtgewicht der Hemisphäre normalisiert. Da der Evans-Blue-Farbstoff eine hohe Toxizität aufweist, wurde in diesen Versuchen zusätzlich eine Scheingruppe eingesetzt. Damit wurde ausgeschlossen, dass der beobachtete Effekt aufgrund des Farbstoffes selbst auftritt. Die Durchlässigkeit der Bluthirnschranke wird maßgeblich über die TJ-Proteine Claudin-1, ZO1 und Occludin reguliert (Jiao et al. 2011; Yadav und Shin 2015; Jiang et al. 2018). In der vorliegenden Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass die Expression von Claudin-1, ZO1 und Occludin 24 Stunden nach MCAO durch die Lithiumgabe im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe erhöht ist. Die immunhistochemische Ko-Färbung von Claudin-1 zeigte zudem die Assoziation von Claudin-1 zu Endothelzellen. Dies macht deutlich, dass tatsächlich TJ-Proteine der Bluthirnschranke betroffen sind. Interessanterweise konnte ebenfalls gezeigt werden, dass sich die Expressionslevel von Occludin 72 Stunden nach MCAO in der Kontrollgruppe und Lithiumgruppe angeglichen hatten. Dies könnte auf einen einsetzenden endogenen Reparaturmechanismus der Bluthirnschranke in der Kontrollgruppe hinweisen, denn bekannt ist, dass die Öffnung lediglich temporär ist und es im Verlauf zu einer postischämischen Wiederherstellung der Bluthirnschrankenintegrität kommt. Hierzu haben Jiao und Kollegen (2011) in einem Tierexperiment die Dynamik der TJ-Protein-Expression in Abhängigkeit von der Zeit nach ischämischem Schlaganfall untersucht. Übereinstimmend mit den vorliegenden Ergebnissen zeigte auch diese Studie eine signifikante Abnahme der TJ-Proteine innerhalb von 24 Stunden nach zerebraler Ischämie (Jiao et al. 2011). Allerdings konnten die Forscher erst nach 120 Stunden einen beginnenden Wiederanstieg der TJ-Protein-Expression beobachten. Einen Erklärungsansatz für den früheren Zeitpunkt des Anstiegs der Occludin-Expression

in der vorliegenden Arbeit bietet die kürzere Ischämiezeit im Vergleich zu den Versuchen von Jiao und Kollegen (2011). Der dadurch verringerte Schaden am Endothel könnte eine schnellere endogene Wiederherstellung der Bluthirnschranke ermöglichen. Zusammenfassend sind diese Ergebnisse im Einklang mit den vorherigen *In-vivo*-Daten und bestätigen die eingangs aufgestellte Hypothese. Im Folgenden wurde nach Mechanismen für die gezeigte Protektion der Bluthirnschranke gesucht.

Die Degradierung der TJ-Proteine nach zerebraler Ischämie wird maßgeblich über eine massive Aktivierung der MMP-9 vermittelt (siehe Abschnitt 1.3). So konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass eine Inhibierung dieser postschämischen MMP-9-Aktivierung zu einer Stabilisierung der Bluthirnschranke führt und damit eine Neuroprotektion bewirkt (Medsker et al. 2016). Aus diesem Grund wird die Rolle von selektiven MMP-9-Inhibitoren als therapeutische Option bei ischämischem Schlaganfall diskutiert (Chaturvedi und Kaczmarek 2014). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Lithium zu einer Inhibition sowohl der Aktivität als auch der Expression von MMP-9 24 Stunden nach Induktion der zerebralen Ischämie führt. Im Anschluss an diese Beobachtung wurde untersucht, über welchen Signalweg Lithium diese Modulation der MMP-9-Aktivität und -Expression bewirkt. Ein wichtiger Regulator der MMP-9-Aktivität ist Caveolin-1. Bei Caveolin-1 handelt es sich um integrale Membranproteine, welche im Bereich der kleinen Ausbuchtungen der Plasmamembran, der *Caveolae*, exprimiert werden (Gu et al. 2011). In Tierexperimenten konnte gezeigt werden, dass es zu einer Verringerung der Caveolin-1-Expression durch vermehrtes Vorkommen von Sauerstoffradikalen nach ischämischem Schlaganfall kommt (Gu et al. 2012). Diese Verringerung führt zu einer gesteigerten Aktivität der MMP-9 und damit zu einer erhöhten Durchlässigkeit der Bluthirnschranke (Gu et al. 2012). In der vorliegenden Arbeit konnte allerdings kein Effekt von Lithium auf die Caveolin-1-Expression beobachtet werden. Dies spricht für einen Caveolin-1-unabhängigen Effekt auf die MMP-9. Ein weiterer Signalweg der MMP-9-Regulation ist der MAPK-/ERK1/2-Signalweg. Zu diesem Signalweg gehören die Effektorproteine c-Raf, MEK1/2 und ERK1/2, die über Phosphorylierung aktiviert werden. Der MAPK-/ERK1/2-Signalweg ist neben der Regulation der MMP-9-Aktivität in eine Vielzahl von überlebenswichtigen Wegen der Signaltransduktion involviert (Sun et al. 2015). Die Rolle des Signalwegs bei ischämischem Schlaganfall ist derzeit nicht abschließend geklärt. Es konnten sowohl protektive als auch schädigende Effekte nach zerebraler Ischämie durch Aktivierung des MAPK-/ERK1/2-Signalwegs beobachtet werden (Sawe et al. 2008). In Bezug auf die MMP-9-Aktivität konnte eine Reduzierung durch Aktivierung des Signalwegs gezeigt werden (Curry et al. 2010). Übereinstimmend zu dieser Beobachtung wurde in der vorliegenden

Studie ein erhöhtes Vorkommen von phosphoryliertem c-Raf, MEK1/2 und ERK1/2 bei gleichzeitig inhibierter MMP-9-Aktivität nach Lithiumgabe gemessen. Demnach stellt die Aktivierung des MAPK-/ERK1/2-Signalwegs und die resultierende Inhibierung der MMP-9-Aktivität einen möglichen Mechanismus des lithiuminduzierten Effekts auf die Bluthirnschranke dar. Um dies zu überprüfen, wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit weitere Experimente mit dem MEK1/2-Inhibitor U0126 durchgeführt. Initial wurde über quantitative Western-Blot-Analysen sichergestellt, dass U0126 die Aktivierung des MAPK-/ERK1/2-Signalwegs von Lithium aufhebt. Anschließend konnte gezeigt werden, dass die Inhibierung der Aktivierung des MAPK-/ERK1/2-Signalwegs durch U0126 den Effekt von Lithium auf die Bluthirnschranke aufhebt. Diese Ergebnisse legen eine zentrale Bedeutung des MAPK-/ERK1/2-Signalwegs für die Wirkung von Lithium auf die Bluthirnschranke nahe.

Parallel zu dem direkten Effekt auf die Bluthirnschranke konnte gezeigt werden, dass die Expression von Bcl-2, einem anti-apoptotischen Protein, nach Lithiumbehandlung erhöht war. Bcl-2 ist ein nachgeschaltetes Effektorprotein des MAPK-/ERK1/2-Signalwegs, und die Expression wird durch die Aktivierung des Signalwegs verstärkt. In Tierexperimenten konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Expression von Bcl-2 nach zerebraler Hypoxie in Ratten zu einer Neuroprotektion führt (Zhang et al. 2015). Interessant wäre hier die weiterführende Untersuchung, ob eine Inhibierung der Apoptose durch erhöhte Bcl-2-Expression gehäuft in bestimmten Zelltypen wie Endothelzellen oder Neuronen zu beobachten ist.

Neben den oben genannten Effekten von Lithium auf die TJ-Proteine der Bluthirnschranke konnte ebenfalls eine verringerte Expression von P-gp 24 Stunden nach OGD bzw. MCAO sowohl *in vitro* als auch *in vivo* durch Lithiumgabe beobachtet werden. Ein Effekt von Lithium auf P-gp wurde bisher nicht erforscht. Allerdings ist die Rolle von P-gp bei ischämischen Schlaganfall weitestgehend unverstanden. Bekannt ist, dass P-gp ein primär aktiver Effluxtransporter ist, der luminal auf Endothelzellen der Bluthirnschranke exprimiert wird und seine Substrate aus den Endothelzellen in das Blut bewegt (siehe Abschnitt 1.3). Spudich und Kollegen (2016) konnten des Weiteren zeigen, dass das P-gp 24 Stunden nach zerebraler Ischämie der Ratte im Endothel vermehrt exprimiert ist. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass durch Ischämie ausgelöster Zellstress eine Expression von P-gp auf Astrozyten und Neuronen bewirkt (Ramos et al. 2004). Bei beiden Zelltypen wird P-gp physiologischerweise nicht exprimiert. Im Rahmen einer Studie in P-gp-*Knockout*-Mäusen konnte eine Reduktion des Schlaganfallvolumens durch die reduzierte P-gp-Expression beobachtet werden (Murozono et al. 2009). Dem gegenüber steht die Beobachtung, dass P-gp hypoxische Zellen

vor einer intrazellulären Akkumulation von toxischen Komponenten durch den Efflux derselbigen schützt (Lazarowski et al. 2007). Dafür spricht, dass eine erhöhte P-gp-Expression mit einer verringerten Anfälligkeit von Zellen für den Übergang in eine Apoptose assoziiert ist (Robinson et al. 1997; Johnstone et al. 1999). In Bezug auf die Bluthirnschranke konnten Kraya und Kollegen (2016) eine Assoziation zwischen der P-gp-Aktivität und der TJ-Protein-Expression feststellen. Zusammenfassend ist deshalb nach derzeitigem Forschungsstand nicht geklärt, ob das P-gp eine protektive Rolle nach zerebraler Ischämie einnimmt und damit relevanter Aspekt der lithiuminduzierten Neuroprotektion ist.

Ein weiteres Oberflächenprotein, bei dem im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine signifikant verringerte Expression 24 Stunden nach MCAO beobachtet werden konnte, ist ICAM-1. Dies ist ein Oberflächenprotein, welches auf Endothelzellen der Bluthirnschranke verstärkt unter zerebraler Ischämie exprimiert wird und ein Ligand für die Anhaftung von Leukozyten ans Endothel ist (Supanc et al. 2011). Die vermehrte Expression von ICAM-1 wird ausgelöst durch Ausschüttung von Chemokinen wie TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1b und eine anschließende Aktivierung des Endothels im Rahmen der lokalen Entzündung (siehe Abschnitt 1.2). Durch die Anhaftung der Leukozyten am Endothel wird bei geöffneter Bluthirnschranke eine parazelluläre Migration der Leukozyten aus dem Blut ins Hirnparenchym ermöglicht und die lokale Inflammation weiter verstärkt (siehe Abschnitt 1.2). Interessant ist hierbei, dass durch pharmakologische Antagonisierung des ICAM-1 eine Reduzierung des Infarkt volumens und eine verringerte Ausprägung der neurologischen Defizite nach Induktion einer zerebraler Ischämie im Tiermodell beobachtet werden konnten (Demirseren et al. 2007; Cao et al. 2009). Eine Inhibierung der vermehrten Expression von ICAM-1 nach zerebraler Ischämie zeigte analoge Effekte (Connolly et al. 1996; Vemuganti et al. 2004). Des Weiteren konnten zwei der zuletzt genannten Studien zeigen, dass die Inhibierung von ICAM-1 mit einer verringerten postischämischen Infiltration von Neutrophilen assoziiert ist (Connolly et al. 1996; Cao et al. 2009). Übereinstimmend mit diesen Beobachtungen konnte auch in der vorliegenden Arbeit eine Reduzierung der eingewanderten Leukozyten insgesamt und der Neutrophilen im Speziellen beobachtet werden. Die Neutrophilen gehören zu den ersten hämatogenen Immunzellen, die nach zerebraler Ischämie das Hirnparenchym erreichen (Anrather und Iadecola 2016). Verschiedene präklinische Studien konnten eine direkte Verbindung zwischen der Einwanderung von Neutrophilen und dem Ausmaß des Gewebeschadens nach zerebraler Ischämie feststellen (Strecker et al. 2017). So führt eine Blockade der Infiltration von Neutrophilen unter anderem zu einer massiven Reduzierung des Infarkt volumens und einer deutlichen Verbesserung der neurologischen Erholung (Herz et al. 2015; Neumann et al.



2015). Dies deutet auf die zentrale Bedeutung der Neutrophilen bei der lithiuminduzierten Neuroprotektion hin. Allerdings scheiterten die bisherigen Versuche, in klinischen Studien einen protektiven Effekt durch selektive Inhibierung der Neutrophile zu erzielen (Becker 2002; Krams et al. 2003). Interessanterweise konnte des Weiteren in präklinischen Studien gezeigt werden, dass Neutrophile an der Öffnung der Bluthirnschranke beteiligt sind. Dies geschieht über die Sezernierung von aktivierten MMP-9 (Rosell et al. 2008), was zur weiteren Destabilisierung der Bluthirnschranke durch Degradierung der TJ-Proteine führt (siehe oben). So konnte bei Inhibierung der Einwanderung von Neutrophilen über die Blockade von ICAM-1 eine verringerte MMP-9-Aktivität und eine Stabilisierung der Bluthirnschranke beobachtet werden (Ludewig et al. 2013). In der Zusammenschau legen diese Erkenntnisse nahe, dass die Inhibierung der ICAM-1-Expression und die daraus resultierende modulierte Leukozyteninfiltration ein zentraler Mechanismus der lithiuminduzierten Neuroprotektion sind.

Neben der verringerten Anzahl an Neutrophilen zeigte die durchflusszytometrische Messung eine erhöhte Konzentration von T-Zellen in der ischämischen Hemisphäre. T-Zellen infiltrieren zeitlich nach den Neutrophilen aus dem Blut das Hirnparenchym. Nach derzeitigem Verständnis nehmen die verschiedenen Untergruppen der T-Zellen gegensätzliche Rollen ein. So konnte gezeigt werden, dass T-Effektorzellen zu einer Verstärkung des Gewebeschadens führen (Hurn et al. 2007). Bei Einwanderung regulatorischer T-Zellen hingegen konnte ein neuroprotektiver Effekt beobachtet werden (Planas und Chamorro 2009; Liesz et al. 2013). Dabei konnten Liesz und Kollegen (2013) zeigen, dass regulatorische T-Zellen über eine Erhöhung von Interleukin-10 zu einer Inhibition der Neuroinflammation führen können. Diese Modulation der Neuroinflammation hatte ein reduziertes Schlaganfallvolumen zur Folge (Liesz et al. 2013). In einer weiteren Studie konnte durch die exogene Gabe regulatorischer T-Zellen eine Stabilisierung der Bluthirnschranke durch Inhibierung der MMP-9-Aktivität beobachtet werden (Li et al. 2013). Diese Beobachtungen deuten auf die Wichtigkeit der T-Zellen in Bezug auf die Bluthirnschranke hin. In der vorliegenden Arbeit wurde als Oberflächenmarker für die Messung der T-Zellen CD4 verwendet. Da CD4 auf allen T-Zellen exprimiert wird, lassen sich keine Rückschlüsse auf die einzelnen Untergruppen treffen. Für weiterführende Untersuchungen wäre deshalb die Analyse der einzelnen Subgruppen von Interesse. Bei den Anteilen von B-Zellen und Makrophagen in der ischämischen Hemisphäre konnte in der vorliegenden Arbeit keine Veränderung durch Lithiumgabe festgestellt werden.

Weiterhin konnte in der vorliegenden Arbeit eine reduzierte Aktivierung der Mikroglia 24 Stunden nach MCAO beobachtet werden. Im Hirnparenchym ansässige Mikrogliazellen nehmen bei der Vermittlung der neuroinflammatorischen Reaktion nach zerebraler Ischämie eine zentrale Rolle ein (siehe Abschnitt 1.2). Die Mikroglia werden innerhalb weniger Minuten nach zerebraler Ischämie aktiviert und zählen noch vor der Leukozyteninfiltration zu den Initiatoren der Neuroinflammation (Nakajima und Kohsaka 2004). Aktivierte Mikroglia modulieren die Neuroinflammation unter anderem durch Ausschüttung reaktiver Sauerstoffspezies, pro- und anti-inflammatorischer Zytokine und Wachstumsfaktoren. Da reaktive Sauerstoffspezies zu einem direkten Schaden der Bluthirnschranke führen, ist die Aktivierung der Mikroglia und das Öffnen der Bluthirnschranke eng miteinander verknüpft (Abdullahi et al. 2018). So konnte in tierexperimentellen Studien durch Inhibierung der Aktivierung der Mikroglia eine Reduzierung des Infarktolumens und eine verringerte Durchlässigkeit der Bluthirnschranke beobachtet werden (Yenari et al. 2006). Als weiteren Mechanismus konnten Jolivel und Kollegen (2015) außerdem zeigen, dass 24 Stunden nach ischämischem Schlaganfall perivaskulär lokalisierte Mikroglia Endothelzellen der Bluthirnschranke über Endozytose abbauen. Diese Beobachtungen zeigen die prominente Rolle der aktivierten Mikroglia in Bezug auf die Öffnung der Bluthirnschranke.

Zusammenfassend gewährt die vorliegende Arbeit detaillierte Einblicke in bisher unbekannte Mechanismen, die zur Neuroprotektion durch Lithium nach zerebraler Ischämie führen. Erstmals konnte dabei eine lithiuminduzierte Stabilisierung der Bluthirnschranke nach ischämischem Schlaganfall im Tiermodell nachgewiesen werden. Gleichzeitig wurde ein detailliertes Verständnis von distinkten zu dieser Stabilisierung beitragenden Signalwegen erlangt. Dadurch wird neben dem besseren Verständnis des Wirkungsmechanismus von Lithium im Speziellen auch ein detaillierter Einblick in neuroprotektive Mechanismen im Allgemeinen ermöglicht. Die vorliegenden Ergebnisse bieten damit ein hohes translationales Potential und können zur Planung zukünftiger klinischer Studien zur weiteren Untersuchung der Lithiumbehandlung an Schlaganfallpatienten beitragen, denn vor dem Hintergrund der dringend benötigten adjuvanten Therapiemöglichkeiten präsentiert sich die Lithiumbehandlung als aussichtsreiche Perspektive.

## 5 Zusammenfassung

Lithium wird seit Jahrzehnten bei der Behandlung von bipolaren Affektstörungen, Manie, Depression und Cluster-Kopfschmerz verwendet. Zusätzlich zeigte die Gabe von Lithium auch in einer Vielzahl präklinischer Tierexperimente und in einer klinischen Studie neuroprotektive Effekte bei ischämischem Schlaganfall. Dies ist von herausragendem Interesse, da in der Behandlung des ischämischen Schlaganfalls bisher keine adjuvante verlaufsmulierende pharmakologische Therapie existiert. Die derzeit angewandten Therapieformen haben ausschließlich die kausale Rekanalisierung der verschlossenen Gefäße im akuten Stadium des Schlaganfalls zum Ziel, von denen aufgrund von engen Zeitfenstern und Kontraindikationen nur eine Minorität der Patienten profitiert. In vorangegangenen Tierexperimenten äußerte sich die lithiuminduzierte Neuroprotektion akut durch eine Reduktion des Schlaganfallvolumens sowie eine verringerte neuronale Apoptose und langfristig durch eine verbesserte neurologische Erholung. Die genauen Wirkmechanismen sind allerdings bisher unbekannt. Die bisher einzige randomisierte Doppelblindstudie gab ebenfalls erste Hinweise auf einen gesteigerten Erhalt der motorischen Funktionen durch Lithiumbehandlung bei Patienten mit erstmaligem kortikalem ischämischem Schlaganfall. Weitere klinische Studien sind zwingend notwendig. Hierfür ist ein besseres Verständnis der Mechanismen der lithiuminduzierten Neuroprotektion sowohl zur Identifizierung von neuroprotektiven Mechanismen im Allgemeinen als auch für eine bessere Patientenselektion für zukünftige klinische Studien im Speziellen notwendig.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, zugrundeliegende Mechanismen der lithiuminduzierten Neuroprotektion zu identifizieren. Die hierbei aufgestellte Hypothese war, dass Lithium eine protektive Wirkung auf die Bluthirnschranke hat, welche in der Pathophysiologie des ischämischen Schlaganfalls eine herausragende Rolle einnimmt.

Hierfür wurden in einem ersten Schritt *In-vitro*-Experimente an Endothelzellen, die ein zentraler Bestandteil der Bluthirnschranke sind, durchgeführt. Dabei wurden die Zellen einem Sauerstoff-Glukose-Entzug ausgesetzt und anschließend im Standardmedium oder im Standardmedium, welches zusätzlich Lithium enthielt, inkubiert. Im Anschluss wurden die Unterschiede zwischen den Gruppen in Bezug auf das Zellüberleben und das Expressionslevel von Zell-Zell-Kontakten, sogenannten *Tight-Junction*-Proteinen, analysiert. In einem zweiten Schritt wurden *In-vivo*-Experimente an Mäusen, denen ein Schlaganfall durch operative Okklusion der *Arteria cerebri media* induziert wurde, durchgeführt. Als Kontrolle wurden zudem in ausgewählten Experimenten Scheingruppen eingesetzt, die das gesamte Prozedere der Operation durchliefen, ohne eine tatsächliche Okklusion des

Gefäßes. Im Anschluss erhielten die Mäuse je nach Gruppenzugehörigkeit eine Behandlung mit Placebo (phosphatgepufferte Salzlösung), Lithium und/oder MEK-Inhibitor U0126. Als Überlebenszeit (und damit zerebrale Reperfusionzeit) der Mäuse wurden 24 Stunden und 72 Stunden gewählt. Nach Ablauf dieser Zeiträume wurden die Durchlässigkeit der Bluthirnschranke, die Expressionslevel der *Tight-Junction*-Proteine, die Leukozyteninfiltration und die Mechanismen, die einen Einfluss auf die Stabilität der Bluthirnschranke haben, untersucht.

Die *In-vitro*-Analysen zeigten ein erhöhtes Zellüberleben und eine verstärkte Expression der *Tight-Junction*-Proteine *Zonula occludens-1* und Occludin. Dies spricht für einen protektiven Effekt von Lithium auf die Endothelzellen gegenüber dem Sauerstoff-Glukose-Entzug, welcher ebenfalls mit einer erhöhten Integrität des Zellverbandes assoziiert ist. Analog dazu zeigten auch die *In-vivo*-Analysen deutliche Effekte auf die Endothelzellen der Bluthirnschranke durch Lithium. Hier führte die Lithiumgabe nach zerebraler Ischämie zu einer reduzierten Durchlässigkeit der Bluthirnschranke, welche ebenfalls mit einer erhöhten Expression der *Tight-Junction*-Proteine Claudin-1, *Zonula occludens-1* und Occludin assoziiert war. Zugleich führte die Lithiumbehandlung zu einer Reduktion der Expression und Aktivität der Matrix-Metalloprotease 9, die eine Schlüsselrolle bei der postischämischen Degradierung der *Tight-Junction*-Proteine hat. Des Weiteren führte Lithium zu einer Modulation der Leukozyteninfiltration aus dem Blut in das Hirnparenchym durch eine verringerte Expression des *Intercellular adhesion molecule-1*. Mechanistisch konnte die zentrale Rolle der Aktivierung des MAPK-/MEK1/2-/ERK1/2-Signalwegs durch Lithium identifiziert werden, da die Inhibierung dieser Aktivierung durch den MEK-Inhibitor U0126 zu einer Aufhebung des lithiumvermittelten Effekts auf die Durchlässigkeit der Bluthirnschranke führte.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit ein umfassendes Verständnis von bisher unbekanntem protektiven Wirkmechanismen von Lithium auf die Bluthirnschranke nach zerebraler Ischämie erlangt werden. Insbesondere vor dem Hintergrund des Mangels an adjuvanten Therapiemöglichkeiten bietet Lithium als bereits bei verschiedenen Krankheitsbildern etabliertes Medikament eine herausragende Perspektive in der Behandlung von Patienten mit ischämischen Schlaganfall. Für die Planung und Durchführung weiterer dringend notwendiger klinischer Studien an ebendiesen Patienten können die vorliegenden Einblicke in die Wirkmechanismen von Lithium einen bedeutenden Beitrag leisten.

## 6 Literaturverzeichnis

- Abdanipour A, Moradi F, Fakheri F, Ghorbanlou M, Nejatbakhsh R (2019): The effect of lithium chloride on BDNF, NT3, and their receptor mRNA levels in the spinal contusion rat models. *Neurol Res* 41, 577–583
- Abdollahi F, Moqaddam MM, Majdinasab N, Sadr F, Sajedi SA, Mohammadianinejad SE (2014): The effect of lithium in post-stroke motor recovery. *Clin Neuropharmacol* 37, 73–78
- Abdullahi W, Tripathi D, Ronaldson PT (2018): Blood-brain barrier dysfunction in ischemic stroke: targeting tight junctions and transporters for vascular protection. *Am J Physiol Physiol* 315, C343–C356
- Adams HP, Love BB, Bendixen BH, Gordon DL (1993): Classification of subtype of acute ischemic stroke definitions for use in a multicenter clinical trial. *Stroke* 24, 35–41
- Ago Y, Tanaka T, Kita Y, Tokumoto H, Takuma K, Matsuda T (2012): Lithium attenuates methamphetamine-induced hyperlocomotion and behavioral sensitization via modulation of prefrontal monoamine release. *Neuropharmacology* 62, 1634–1639
- Amdisen A (1977): Serum level monitoring and clinical pharmacokinetics of lithium. *Clin Pharmacokinet* 2, 73–92
- Amdisen A, Gottfries CG, Jacobsson L, Winblad B (1974): Grave lithium intoxication with fatal outcome. *Acta Psychiatr Scand* 50, 25–33
- Anrather J, Iadecola C (2016): Inflammation and stroke: An overview. *Neurotherapeutics* 13, 661–670
- Banati RB, Gehrman J, Schubert P, Kreutzberg GW (1993): Cytotoxicity of microglia. *Glia* 7, 111–118
- Becker KJ (2002): Anti-leukocyte antibodies: LeukArrest (Hu23F2G) and enlimomab (R6.5) in acute stroke. *Curr Med Res Opin* 18, 18–22
- Benjamin EJ, Muntner P, Alonso A, Bittencourt MS, Callaway CW, Carson AP, Chamberlain AM, Chang AR, Cheng S, Das SR, et al. (2019): Heart disease and stroke statistics-2019 update: A report from the American Heart Association. *Circulation* 139, e56–e66
- Benkert O, Hippus H: *Kompodium der Psychiatrischen Pharmakotherapie*. 11. Auflage; Springer, Leipzig 2000

- Berk M, Dodd S, Kauer-Sant'Anna M, Malhi GS, Bourin M, Kapczinski F, Norman T (2007): Dopamine dysregulation syndrome: Implications for a dopamine hypothesis of bipolar disorder. *Acta Psychiatr Scand* 116, 41–49
- Bernardes-Silva M, Anthony DC, Issekutz AC, Perry VH (2001): Recruitment of neutrophils across the blood-brain barrier: The role of E- and P-selectins. *J Cereb Blood Flow Metab* 21, 1115–1124
- Bö L, Peterson JW, Mørk S, Hoffman PA, Gallatin WM, Ransohoff RM, Trapp BD (1996): Distribution of immunoglobulin superfamily members ICAM-1, -2, -3, and the  $\beta$ 2 integrin LFA-1 in multiple sclerosis lesions. *J Neuropathol Exp Neurol* 55, 1060–1072
- Bosche B, Schäfer M, Graf R, Härtel FV, Schäfer U, Noll T (2013): Lithium prevents early cytosolic calcium increase and secondary injurious calcium overload in glycolytically inhibited endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 434, 268–272
- Bosche B, Molcanyi M, Noll T, Rej S, Zatschler B, Doepfner TR, Hescheler J, Müller DJ, Macdonald RL, Härtel FV (2016): A differential impact of lithium on endothelium-dependent but not on endothelium-independent vessel relaxation. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry* 67, 98–106
- Brait VH, Jackman KA, Walduck AK, Selemidis S, Diep H, Mast AE, Guida E, Broughton BRS, Drummond GR, Sobey CG (2010): Mechanisms contributing to cerebral infarct size after stroke: Gender, reperfusion, T lymphocytes, and Nox2-derived superoxide. *J Cereb Blood Flow Metab* 30, 1306–1317
- Brouns R, De Deyn PP (2009): The complexity of neurobiological processes in acute ischemic stroke. *Clin Neurol Neurosurg* 111, 483–495
- Candelario-Jalil E (2009): Injury and repair mechanisms in ischemic stroke: Considerations for the development of novel neurotherapeutics. *Curr Opin Investig Drugs* 10, 644–654
- Cao J, Shi X, Li W, Liu J, Miao X, Xu J (2009): Protective effect of anti-intercellular adhesion molecule-1 antibody on global cerebral ischemia/reperfusion injury in the rat. *Biosci Trends* 3, 48–52
- Carlson SW, Yan H, Dixon CE (2017): Lithium increases hippocampal SNARE protein abundance after traumatic brain injury. *Exp Neurol* 289, 55–63

- Carter CJ (2007): Multiple genes and factors associated with bipolar disorder converge on growth factor and stress activated kinase pathways controlling translation initiation: Implications for oligodendrocyte viability. *Neurochem Int* 50, 461–490
- Chaturvedi M, Kaczmarek L (2014): MMP-9 inhibition: A therapeutic strategy in ischemic stroke. *Mol Neurobiol* 49, 563–573
- Chuang D-M, Wang Z, Chiu C-T (2011): GSK-3 as a target for lithium-induced neuroprotection against excitotoxicity in neuronal cultures and animal models of ischemic stroke. *Front Mol Neurosci* 4, 15
- Cimarosti H, Rodnight R, Tavares A, Paiva R, Valentim L, Rocha E, Salbego C (2001): An investigation of the neuroprotective effect of lithium in organotypic slice cultures of rat hippocampus exposed to oxygen and glucose deprivation. *Neurosci Lett* 315, 33–36
- Connolly ES, Winfree CJ, Springer TA, Naka Y, Liao H, Yan S Du, Stern DM, Solomon RA, Gutierrez-Ramos JC, Pinsky DJ (1996): Cerebral protection in homozygous null ICAM-1 mice after middle cerebral artery occlusion. Role of neutrophil adhesion in the pathogenesis of stroke. *J Clin Invest* 97, 209–216
- Cramer J V., Benakis C, Liesz A (2019): T cells in the post-ischemic brain: Troopers or paramedics? *J Neuroimmunol* 326, 33–37
- Cunha ABM, Frey BN, Andreazza AC, Goi JD, Rosa AR, Gonçalves CA, Santin A, Kapczinski F (2006): Serum brain-derived neurotrophic factor is decreased in bipolar disorder during depressive and manic episodes. *Neurosci Lett* 398, 215–219
- Curry A, Guo M, Patel R, Liebelt B, Sprague S, Lai Q, Zwagerman N, Cao FX, Jimenez D, Ding Y (2010): Exercise pre-conditioning reduces brain inflammation in stroke via tumor necrosis factor- $\alpha$ , extracellular signal-regulated kinase 1/2 and matrix metalloproteinase-9 activity. *Neurol Res* 32, 756–762
- Daniele S, Da Pozzo E, Abelli M, Panighini A, Pini S, Gesi C, Lari L, Cardini A, Cassano GB, Martini C (2012): Platelet uptake of GABA and glutamate in patients with bipolar disorder. *Bipolar Disord* 14, 301–308
- de Sousa RT, Zanetti M V., Talib LL, Serpa MH, Chaim TM, Carvalho AF, Brunoni AR, Busatto GF, Gattaz WF, Machado-Vieira R (2015): Lithium increases platelet serine-9 phosphorylated GSK-3 $\beta$  levels in drug-free bipolar disorder during depressive episodes. *J Psychiatr Res* 62, 78–83

- Demirseren ME, Sarici M, Gokrem S, Yenidunya S (2007): Protective effects of monoclonal antibody to intercellular adhesion molecule-1 in venous ischemia-reperfusion injury: Experimental study in rats. *J Reconstr Microsurg* 23, 41–44
- Denes A, Vidyasagar R, Feng J, Narvainen J, McColl BW, Kauppinen RA, Allan SM (2007): Proliferating resident microglia after focal cerebral ischaemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 27, 1941–1953
- DGN (2012): Akuttherapie des ischämischen Schlaganfalls (Leitlinie der DGN). *NeuroTransmitter* 23, 1–65
- Dharmasaroja PA (2016): Fluid intake related to brain edema in acute middle cerebral artery infarction. *Transl Stroke Res* 7, 49–53
- Diener H-C, Steinmetz H: Referenz Neurologie. Thieme, Leipzig 2019
- Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz AM (1999): Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* 22, 391–397
- Doepfner TR, Kaltwasser B, Elali A, Zechariah A, Hermann DM, Bähr M (2011): Acute hepatocyte growth factor treatment induces long-term neuroprotection and stroke recovery via mechanisms involving neural precursor cell proliferation and differentiation. *J Cereb Blood Flow Metab* 31, 1251–1262
- Doepfner TR, Kaltwasser B, Sanchez-Mendoza EH, Caglayan AB, Bähr M, Hermann DM (2017): Lithium-induced neuroprotection in stroke involves increased miR-124 expression, reduced RE1-silencing transcription factor abundance and decreased protein deubiquitination by GSK3 $\beta$  inhibition-independent pathways. *J Cereb Blood Flow Metab* 37, 914–926
- Dohmen C, Sakowitz OW, Fabricius M, Bosche B, Reithmeier T, Ernestus RI, Brinker G, Dreier JP, Woitzik J, Strong AJ, Graf R (2008): Spreading depolarizations occur in human ischemic stroke with high incidence. *Ann Neurol* 63, 720–728
- Dreier JP (2011): The role of spreading depression, spreading depolarization and spreading ischemia in neurological disease. *Nat Med* 17, 439–447
- Dwivedi Y (2009): Brain-derived neurotrophic factor: Role in depression and suicide. *Neuropsychiatr Dis Treat* 5, 433–449



- Easton JD, Saver JL, Albers GW, Alberts MJ, Chaturvedi S, Feldmann E, Hatsukami TS, Higashida RT, Johnston SC, Kidwell CS et al. (2009): Definition and evaluation of transient ischemic attack: A scientific statement for healthcare professionals from the American Heart association/American Stroke Association Stroke Council; Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia; Council on Cardiovascular Radiology and Intervention; Council on Cardiovascular Nursing; and the Interdisciplinary Council on Peripheral Vascular Disease. *Stroke* 40, 2276–2293
- Emamghoreishi M, Keshavarz M, Nekooeian AA (2015): Acute and chronic effects of lithium on BDNF and GDNF mRNA and protein levels in rat primary neuronal, astroglial and neuroastroglia cultures. *Iran J Basic Med Sci* 18, 240–246
- Engel T, Goñi-Oliver P, Lucas JJ, Avila J, Hernández F (2006a): Chronic lithium administration to FTDP-17 tau and GSK-3 $\beta$  overexpressing mice prevents tau hyperphosphorylation and neurofibrillary tangle formation, but pre-formed neurofibrillary tangles do not revert. *J Neurochem* 99, 1445–1455
- Engel T, Hernández F, Avila J, Lucas JJ (2006b): Full reversal of Alzheimer's disease-like phenotype in a mouse model with conditional overexpression of glycogen synthase kinase-3. *J Neurosci* 26, 5083–5090
- Fernandes BS, Molendijk ML, Köhler CA, Soares JC, Leite CMGS, Machado-Vieira R, Ribeiro TL, Silva JC, Sales PMG, Quevedo J, et al. (2015): Peripheral brain-derived neurotrophic factor (BDNF) as a biomarker in bipolar disorder: A meta-analysis of 52 studies. *BMC Med* 13, 289
- Ferrarese C, Mascarucci P, Zoia C, Cavarretta R, Frigo M, Begni B, Sarinella F, Frattola L, De Simoni MG (1999): Increased cytokine release from peripheral blood cells after acute stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 19, 1004–1009
- Forlenza O V., De-Paula VJR, Diniz BSO (2014): Neuroprotective effects of lithium: Implications for the treatment of Alzheimer's disease and related neurodegenerative disorders. *ACS Chem Neurosci* 5, 443–450
- Galluzzi L, Kepp O, Chan FK-M, Kroemer G (2017): Necroptosis: Mechanisms and relevance to disease. *Annu Rev Pathol Mech Dis* 12, 103–130
- Gos T, Steiner J, Bielau H, Dobrowolny H, Gunther K, Mawrin C, Krzyzanowski M, Hauser R, Brisch R, Bernstein HG, et al. (2012): Differences between unipolar and bipolar I depression in the quantitative analysis of glutamic acid decarboxylase-immunoreactive neuropil. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 262, 647–655

- Grysiewicz RA, Thomas K, Pandey DK (2008): Epidemiology of ischemic and hemorrhagic stroke: incidence, prevalence, mortality, and risk factors. *Neurol Clin* 26, 871–895
- Gu Y, Dee CM, Shen J (2011): Interaction of free radicals, matrix metalloproteinases and caveolin-1 impacts blood-brain barrier permeability. *Front Biosci (Schol Ed)* 3, 1216–1231
- Gu Y, Zheng G, Xu M, Li Y, Chen X, Zhu W, Tong Y, Chung SK, Liu KJ, Shen J (2012): Caveolin-1 regulates nitric oxide-mediated matrix metalloproteinases activity and blood-brain barrier permeability in focal cerebral ischemia and reperfusion injury. *J Neurochem* 120, 147–156
- Herz J, Sabellek P, Lane TE, Gunzer M, Hermann DM, Doeppner TR (2015): Role of neutrophils in exacerbation of brain injury after focal cerebral ischemia in hyperlipidemic mice. *Stroke* 46, 2916–2925
- Higgins GA, Allyn-Feuer A, Barbour E, Athey BD (2015): A glutamatergic network mediates lithium response in bipolar disorder as defined by epigenome pathway analysis. *Pharmacogenomics* 16, 1547–1563
- Hossmann KA (1996): Periinfarct depolarizations. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 8, 195–208
- Hurn PD, Subramanian S, Parker SM, Afentoulis ME, Kaler LJ, Vandenbark AA, Offner H (2007): T- and B-cell-deficient mice with experimental stroke have reduced lesion size and inflammation. *J Cereb Blood Flow Metab* 27, 1798–805
- Jiang X, Andjelkovic A V, Zhu L, Yang T, Bennett MVL, Chen J, Keep RF, Shi Y (2018): Blood-brain barrier dysfunction and recovery after ischemic stroke. *Prog Neurobiol* 163–164, 144–171
- Jiao H, Wang Z, Liu Y, Wang P, Xue Y (2011): Specific role of tight junction proteins claudin-5, occludin, and ZO-1 of the blood-brain barrier in a focal cerebral ischemic insult. *J Mol Neurosci* 44, 130–139
- Johnston SC, Gress DR, Browner WS, Sidney S (2000): Short-term prognosis after emergency department diagnosis of TIA. *J Am Med Assoc* 284, 2901–2906
- Johnstone RW, Cretney E, Smyth MJ (1999): P-glycoprotein protects leukemia cells against caspase-dependent, but not caspase-independent, cell death. *Blood* 93, 1075–1085
- Jolivel V, Bicker F, Binamé F, Ploen R, Keller S, Gollan R, Jurek B, Birkenstock J, Poisa-Beiro L, Bruttger J, et al. (2015): Perivascular microglia promote blood vessel disintegration in the ischemic penumbra. *Acta Neuropathol* 129, 279–295

- Joje RS (1999): Anti-bipolar therapy: Mechanism of action of lithium. *Mol Psychiatry* 4, 117–128
- Jun-Long H, Yi L, Bao-Lian Z, Jia-Si L, Ning Z, Zhou-Heng Y, Xue-Jun S, Wen-Wu L (2018): Necroptosis signaling pathways in stroke: From mechanisms to therapies. *Curr Neuropharmacol* 16, 1327–1339
- Khoshnam SE, Winlow W, Farzaneh M, Farbood Y, Moghaddam HF (2017): Pathogenic mechanisms following ischemic stroke. *Neurol Sci* 38, 1167–1186
- Kolominsky-Rabas PL, Heuschmann PU (2002): Inzidenz, Ätiologie und Langzeitprognose des Schlaganfalls. *Fortschritte der Neurol Psychiatr* 70, 657–662
- Konsman JP, Vignes S, Mackerlova L, Bristow A, Blomqvist A (2004): Rat brain bascular distribution of interleukin-1 type-1 receptor immunoreactivity: Relationship to patterns of inducible cyclooxygenase expression by peripheral inflammatory stimuli. *J Comp Neurol* 472, 113–129
- Krams M, Lees KR, Hacke W, Grieve AP, Orgogozo JM, Ford GA (2003): Acute stroke therapy by inhibition of neutrophils (ASTIN): An adaptive dose-response study of UK-279,276 in acute ischemic stroke. *Stroke* 34, 2543–2548
- Kraya R, Komin A, Searson P (2016): On chip bioelectric impedance spectroscopy reveals the effect of P-Glycoprotein efflux pumps on the paracellular impedance of tight junctions at the blood–brain barrier. *IEEE Trans Nanobioscience* 15, 697–703
- Krishnamurthi R V., Moran AE, Feigin VL, Barker-Collo S, Norrving B, Mensah GA, Taylor S, Naghavi M, Forouzanfar MH, Nguyen G, et al. (2015): Stroke prevalence, mortality and disability-adjusted life years in adults aged 20–64 years in 1990–2013: Data from the global burden of disease 2013 study. *Neuroepidemiology* 45, 190–202
- Lakhan SE, Kirchgessner A, Tepper D, Leonard A (2013): Matrix metalloproteinases and blood-brain barrier disruption in acute ischemic stroke. *Front Neurol* 4, 32
- Lalancette-Hébert M, Gowing G, Simard A, Yuan CW, Kriz J (2007): Selective ablation of proliferating microglial cells exacerbates ischemic injury in the brain. *J Neurosci* 27, 2596–2605
- Lan CC, Liu CC, Lin CH, Lan TY, McInnis MG, Chan CH, Lan TH (2015): A reduced risk of stroke with lithium exposure in bipolar disorder: A population-based retrospective cohort study. *Bipolar Disord* 17, 705–714

- Lazarowski A, Caltana L, Merelli A, Rubio MD, Ramos AJ, Brusco A (2007): Neuronal mdr-1 gene expression after experimental focal hypoxia: A new obstacle for neuroprotection? *J Neurol Sci* 258, 84–92
- Lazzara CA, Kim YH (2015): Potential application of lithium in Parkinson's and other neurodegenerative diseases. *Front Neurosci* 9, 403
- Lehmann K, Merten K (1974): Elimination of lithium in dependence on age in healthy subjects and patients with renal insufficiency. *Int J Clin Pharmacol* 10, 292–298
- Li P, Gan Y, Sun B-L, Zhang F, Lu B, Gao Y, Liang W, Thomson AW, Chen J, Hu X (2013): Adoptive regulatory T-cell therapy protects against cerebral ischemia. *Ann Neurol* 74, 458–471
- Liesz A, Zhou W, Na SY, Hämmerling GJ, Garbi N, Karcher S, Mracsko E, Backs J, Rivest S, Veltkamp R (2013): Boosting regulatory T cells limits neuroinflammation in permanent cortical stroke. *J Neurosci* 33, 17350–17362
- Lipton P (1999): Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol Rev* 79, 1431–1568
- Lo EH, Dalkara T, Moskowitz MA (2003): Neurological diseases: Mechanisms, challenges and opportunities in stroke. *Nat Rev Neurosci* 4, 399–414
- Ludewig P, Sedlacik J, Gelderblom M, Bernreuther C, Korkusuz Y, Wagener C, Gerloff C, Fiehler J, Magnus T, Horst AK (2013): Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1 inhibits MMP-9-mediated blood-brain-barrier breakdown in a mouse model for ischemic stroke. *Circ Res* 113, 1013–1022
- Lüllmann H, Mohr K, Hein L: *Pharmakologie und Toxikologie: Arzneimittelwirkungen verstehen – Medikamente gezielt einsetzen*. 18. Auflage; Thieme, Leipzig 2010
- Machado-Vieira R, Dietrich MO, Leke R, Cereser VH, Zanatto V, Kapczinski F, Souza DO, Portela L V., Gentil V (2007): Decreased plasma brain derived neurotrophic factor levels in unmedicated bipolar patients during manic episode. *Biol Psychiatry* 61, 142–144
- Malhi GS, Outhred T (2016): Therapeutic mechanisms of lithium in bipolar disorder: Recent advances and current understanding. *CNS Drugs* 30, 931–949
- Malhi GS, Tanious M, Das P, Coulston CM, Berk M (2013): Potential mechanisms of action of lithium in bipolar disorder: Current understanding. *CNS Drugs* 27, 135–153
- Martinowich K, Schloesser RJ, Manji HK (2009): Bipolar disorder: From genes to behavior pathways. *J Clin Invest* 119, 726–736

- Matsunaga S, Kishi T, Annas P, Basun H, Hampel H, Iwata N (2015): Lithium as a treatment for Alzheimer's disease: A systematic review and meta-analysis. *J Alzheimer's Dis* 48, 403–410
- McCullumsmith RE, Kristiansen L V., Beneyto M, Scarr E, Dean B, Meador-Woodruff JH (2007): Decreased NR1, NR2A, and SAP102 transcript expression in the hippocampus in bipolar disorder. *Brain Res* 1127, 108–118
- Medsker B, Forno E, Simhan H, Juan C, Sciences R (2016): Matrix metalloproteinases as therapeutic targets for stroke. *70*, 773–779
- Merali Z, Huang K, Mikulis D, Silver F, Kassner A (2017): Evolution of blood-brain-barrier permeability after acute ischemic stroke. *PLoS One* 12, e0171558
- Michelucci A, Heurtaux T, Grandbarbe L, Morga E, Heuschling P (2009): Characterization of the microglial phenotype under specific pro-inflammatory and anti-inflammatory conditions: Effects of oligomeric and fibrillar amyloid- $\beta$ . *J Neuroimmunol* 210, 3–12
- Miller DS (2014): ABC transporter regulation by signaling at the blood-brain barrier: relevance to pharmacology. *Adv Pharmacol* 71, 1–24
- Muoio V, Persson PB, Sendeski MM (2014): The neurovascular unit - concept review. *Acta Physiol* 210, 790–798
- Murozono M, Matsumoto S, Okada S, Nagaoka D, Isshiki A, Watanabe Y (2009): Reduction of brain infarction induced by a transient brain ischemia in *mdr1a* knockout mice. *Neurochem Res* 34, 1555–1561
- Nakajima K, Kohsaka S (2004): Microglia: Neuroprotective and neurotrophic cells in the central nervous system. *Curr Drug Targets – Cardiovasc Haematol Disord* 4, 65–84
- Nakashima H, Ishihara T, Suguimoto P, Yokota O, Oshima E, Kugo A, Terada S, Hamamura T, Trojanowski JQ, Lee VMY, Kuroda S (2005): Chronic lithium treatment decreases tau lesions by promoting ubiquitination in a mouse model of tauopathies. *Acta Neuropathol* 110, 547–556
- Netter FH: *Netters Innere Medizin*. 2. Auflage; Thieme, Leipzig 2013
- Neumann J, Riek-Burchardt M, Herz J, Doepfner TR, König R, Hütten H, Etemire E, Männ L, Klingberg A, Fischer T, et al. (2015): Very-late-antigen-4 (VLA-4)-mediated brain invasion by neutrophils leads to interactions with microglia, increased ischemic injury and impaired behavior in experimental stroke. *Acta Neuropathol* 129, 259–277

- Noll T, Muhs A, Besselmann M, Watanabe H, Piper HM (1995): Initiation of hyperpermeability in energy-depleted coronary endothelial monolayers. *Am J Physiol Circ Physiol* 268, H1462–H1470
- Patel RAG, McMullen PW (2017): Neuroprotection in the treatment of acute ischemic stroke. *Prog Cardiovasc Dis* 59, 542–548
- Planas AM, Chamorro A (2009): Regulatory T cells protect the brain after stroke. *Nat Med* 15, 138–139
- Plenge P, Stensgaard A, Jensen H V., Thomsen C, Møller ET, Henriksen O (1994): 24-hour lithium concentration in human brain studied by Li-7 magnetic resonance spectroscopy. *Biol Psychiatry* 36, 511–516
- Pösel C, Möller K, Boltze J, Wagner DC, Weise G (2016): Isolation and flow cytometric analysis of immune cells from the ischemic mouse brain. *J Vis Exp* 108, 53658
- Qi L, Tang Y, He W, Pan H, Jiang W, Wang L, Deng W (2017): Lithium chloride promotes neuronal differentiation of rat neural stem cells and enhances neural regeneration in Parkinson's disease model. *Cytotechnology* 69, 277–287
- Qi Z, Liang J, Pan R, Dong W, Shen J, Yang Y, Zhao Y, Shi W, Luo Y, Ji X, Liu KJ (2016): Zinc contributes to acute cerebral ischemia-induced blood–brain barrier disruption. *Neurobiol Dis* 95, 12–21
- Ramos AJ, Lazarowski A, Villar MJ, Brusco A (2004): Transient expression of MDR-1/P-Glycoprotein in a model of partial cortical devascularization. *Cell Mol Neurobiol* 24, 101–107
- Ransohoff RM, Perry VH (2009): Microglial physiology: Unique stimuli, specialized responses. *Annu Rev Immunol* 27, 119–145
- Rempe RG, Hartz AMS, Bauer B (2016): Matrix metalloproteinases in the brain and blood-brain barrier: Versatile breakers and makers. *J Cereb Blood Flow Metab* 36, 1481–1507
- Robinson LJ, Roberts WK, Ling TT, Lamming D, Sternberg SS, Roepe PD (1997): Human MDR 1 protein overexpression delays the apoptotic cascade in Chinese hamster ovary fibroblasts. *Biochemistry* 36, 11169–11178
- Rosell A, Cuadrado E, Ortega-Aznar A, Hernández-Guillamon M, Lo EH, Montaner J (2008): MMP-9-positive neutrophil infiltration is associated to blood-brain barrier breakdown and basal lamina type IV collagen degradation during hemorrhagic transformation after human ischemic stroke. *Stroke* 39, 1121–1126

- Rosenberg GA (1999): Ischemic brain edema. *Prog Cardiovasc Dis* 42, 209–216
- Ryder J, Su Y, Liu F, Li B, Zhou Y, Ni B (2003): Divergent roles of GSK3 and CDK5 in APP processing. *Biochem Biophys Res Commun* 312, 922–929
- Sawe N, Steinberg G, Zhao H (2008): Dual roles of the MAPK/ERK1/2 cell signaling pathway after stroke. *J Neurosci Res* 86, 1659–1669
- Schinkel AH (1999): P-Glycoprotein, a gatekeeper in the blood-brain barrier. *Adv Drug Deliv Rev* 36, 179–194
- Schou M, Albrecht J: Lithiumbehandlung der manisch-depressiven Krankheit: Informationen für Arzt, Patient und Angehörige; 5 Tabellen. Thieme, Leipzig 1997
- Sekerdag E, Solaroglu I, Gursoy-Ozdemir Y (2018): Cell death mechanisms in stroke and novel molecular and cellular treatment options. *Curr Neuropharmacol* 16, 1396–1415
- Shim SS, Stutzmann GE (2016): Inhibition of glycogen synthase kinase-3: An emerging target in the treatment of traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 33, 2065–2076
- Sifat AE, Vaidya B, Abbruscato TJ (2017): Blood-brain barrier protection as a therapeutic strategy for acute ischemic stroke. *AAPS J* 19, 957–972
- Silachev DN, Plotnikov EY, Babenko VA, Savchenko ES, Zorova LD, Pevzner IB, Gulyaev M V., Pirogov YA, Sukhikh GT, Zorov DB (2016): Protection of neurovascular unit cells with lithium chloride and sodium valproate prevents brain damage in neonatal ischemia/hypoxia. *Bull Exp Biol Med* 160, 313–318
- Spudich A, Kilic E, Xing H, Kilic Ü, Rentsch KM, Wunderli-Allenspach H, Bassetti CL, Hermann DM (2006): Inhibition of multidrug resistance transporter-1 facilitates neuroprotective therapies after focal cerebral ischemia. *Nat Neurosci* 9, 487–488
- Stahmeyer JT, Stubenrauch S, Geyer S, Weissenborn K, Eberhard S (2019): Häufigkeit und Zeitpunkt von Rezidiven nach inzidentem Schlaganfall. *Dtsch Arztebl Int* 116, 711–717
- Stokum JA, Gerzanich V, Simard JM (2016): Molecular pathophysiology of cerebral edema. *J Cereb Blood Flow Metab* 36, 513–538
- Strecker JK, Schmidt A, Schäbitz WR, Minnerup J (2017): Neutrophil granulocytes in cerebral ischemia – Evolution from killers to key players. *Neurochem Int* 107, 117–126

- Strong AJ, Anderson PJ, Watts HR, Virley DJ, Lloyd A, Irving EA, Nagafuji T, Ninomiya M, Nakamura H, Dunn AK, Graf R (2007): Peri-infarct depolarizations lead to loss of perfusion in ischaemic gyrencephalic cerebral cortex. *Brain* 130, 995–1008
- Sudduth TL, Wilson JG, Everhart A, Colton CA, Wilcock DM (2012): Lithium treatment of APPSwDI/NOS2<sup>-/-</sup> mice leads to reduced hyperphosphorylated tau, increased amyloid deposition and altered inflammatory phenotype. *PLoS One* 7, e31993
- Sun Y, Liu WZ, Liu T, Feng X, Yang N, Zhou HF (2015): Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis. *J Recept Signal Transduct* 35, 600–604
- Supanc V, Biloglav Z, Kes V, Demarin V (2011): Role of cell adhesion molecules in acute ischemic stroke. *Ann Saudi Med* 31, 365–370
- Theodorakis PE, Müller EA, Craster R V., Matar OK (2017): Physical insights into the blood-brain barrier translocation mechanisms. *Phys Biol* 14, 041001
- Vaas M, Enzmann G, Perinat T, Siler U, Reichenbach J, Licha K, Kipar A, Rudin M, Engelhardt B, Klohs J (2017): Non-invasive near-infrared fluorescence imaging of the neutrophil response in a mouse model of transient cerebral ischaemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 37, 2833–2847
- Valvassori SS, Dal-Pont GC, Resende WR, Jornada LK, Peterle BR, Machado AG, Farias HR, de Souza CT, Carvalho AF, Quevedo J (2017): Lithium and valproate act on the GSK-3 $\beta$  signaling pathway to reverse manic-like behavior in an animal model of mania induced by ouabain. *Neuropharmacology* 117, 447–459
- Vemuganti R, Dempsey RJ, Bowen KK (2004): Inhibition of intercellular adhesion molecule-1 protein expression by antisense oligonucleotides is neuroprotective after transient middle cerebral artery occlusion in rat. *Stroke* 35, 179–184
- Vicario-Orrí E, Opazo CM, Muñoz FJ (2014): The pathophysiology of axonal transport in Alzheimer's disease. *J Alzheimer's Dis* 43, 1097–1113
- Wakita M, Nagami H, Takase Y, Nakanishi R, Kotani N, Akaike N (2015): Modifications of excitatory and inhibitory transmission in rat hippocampal pyramidal neurons by acute lithium treatment. *Brain Res Bull* 117, 39–44
- Warlow CP (1998): Epidemiology of stroke. *Lancet* 352, 1–4
- Weller J, Budson A (2018): Current understanding of Alzheimer's disease diagnosis and treatment. *F1000Research* 7, 1161



- Xie C, Zhou K, Wang X, Blomgren K, Zhu C (2014): Therapeutic benefits of delayed lithium administration in the neonatal rat after cerebral hypoxia-ischemia. *PLoS One* 9, e107192
- Xing C, Arai K, Lo EH, Hommel M (2012): Pathophysiologic cascades in ischemic stroke. *Int J Stroke* 7, 378–385
- Xu J, Culman J, Blume A, Brecht S, Gohlke P (2003): Chronic treatment with a low dose of lithium protects the brain against ischemic injury by reducing apoptotic death. *Stroke* 34, 1287–1292
- Yadav BK, Shin B-S (2015): Single-nucleotide polymorphisms of tight junction component claudin-1 associated with leukoaraiosis. *J Stroke Cerebrovasc Dis* 24, 1662–1670
- Yang Y, Estrada EY, Thompson JF, Liu W, Rosenberg GA (2007): Matrix metalloproteinase-mediated disruption of tight junction proteins in cerebral vessels is reversed by synthetic matrix metalloproteinase inhibitor in focal ischemia in rat. *J Cereb Blood Flow Metab* 27, 697–709
- Yenari MA, Xu L, Xian NT, Qiao Y, Giffard RG (2006): Microglia potentiate damage to blood-brain barrier constituents: Improvement by minocycline in vivo and in vitro. *Stroke* 37, 1087–1093
- Yksel C, Öngür D (2010): Magnetic resonance spectroscopy studies of glutamate-related abnormalities in mood disorders. *Biol Psychiatry* 68, 785–794
- Youle RJ, Strasser A (2008): The BCL-2 protein family: Opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 47–59
- Yu F, Wang Z, Tchantchou F, Chiu C-T, Zhang Y, Chuang D-M (2011): Lithium ameliorates neurodegeneration, suppresses neuroinflammation, and improves behavioral performance in a mouse model of traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 29, 362–374
- Zhang HR, Peng JH, Zhu GY, Xu RX (2015): Neuroprotective effects of Bcl-2 overexpression on nerve cells of rats with acute cerebral infarction. *Genet Mol Res* 14, 7696–7703
- Zhao Q, Liu H, Cheng J, Zhu Y, Xiao Q, Bai Y, Tao J (2019): Neuroprotective effects of lithium on a chronic MPTP mouse model of Parkinson's disease via regulation of  $\alpha$ -synuclein methylation. *Mol Med Rep* 19, 4989–4997
- Zhu Z-F, Wang Q-G, Han B-J, William CP (2010): Neuroprotective effect and cognitive outcome of chronic lithium on traumatic brain injury in mice. *Brain Res Bull* 83, 272–277

## **Danksagung**

Die vorliegende Doktorarbeit ist in der Forschungsgruppe für translationale Schlaganfallforschung in der Abteilung der Neurologie der Universitätsmedizin Göttingen im Zeitraum von 2017 bis 2020 entstanden.

Herrn Prof. Dr. med. Mathias Bähr danke ich für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit in seiner Abteilung anfertigen zu können.

Besonderen Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Thorsten R. Döppner M.Sc. für die Aufnahme in seine Forschungsgruppe, die Vergabe des Dissertationsthemas, die hervorragende Betreuung und die vielen spannenden wissenschaftlichen Diskussionen.

Herrn PD Dr. med. Bernhard Kis danke ich für die Zweitbetreuung meiner Doktorarbeit.

Frau Irina Graf danke ich für die sehr gute Einarbeitung in die Labortätigkeiten und für die zahlreichen technischen Ratschläge bei der Durchführung meiner Experimente.

Abschließend danke ich allen Mitarbeitern der Forschungsgruppe für die vielen anregenden Diskussionen und die hilfreiche Unterstützung im Laboralltag.