

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

**Untersuchungen zur Rolle des Silent information regulator 2  
(Sirt2) im experimentellen Schlaganfall in Mäusen**

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von  
**Lea Farina Magdalena Krey**

aus  
Dieburg

Hannover 2018

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer  
Referent/in: Prof. Dr. G. Trendelenburg  
Koreferent/in: Prof. Dr. Wolfgang Brück  
Drittreferent/in: Prof. Dr. Margarete Schön

Datum der mündlichen Prüfung: 07.08.2019

Hiermit erkläre ich, Lea Farina Magdalena Krey, die Dissertation mit dem Titel „Untersuchungen zur Rolle des Silent information regulator 2 (Sirt2) im experimentellen Schlaganfall in Mäusen“ eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Hannover, den 18.04.18

## **Erklärung über den Eigenanteil an der publikationsbasierten Dissertation:**

Ich habe unter Anleitung von Prof. Dr. George Trendelenburg das Konzept der hier vorgestellten Arbeit entwickelt, die Versuche geplant und nach vorheriger Anleitung durch die Betreuerinnen Birte Könnecke und Dr. Bozena Czech-Zechmeister selbstständig durchgeführt.

Ich habe alle Tiere für sämtliche Versuchsreihen operiert, die Gewebe präpariert, eingebettet, immunhistochemisch gefärbt, ggf. vermessen/ ausgezählt sowie alle statistischen Auswertungen vorgenommen. Alle in dieser Dissertation aufgeführten Abbildungen sind Ergebnisse meiner Arbeit.

Die im beigefügten Paper veröffentlichten Western Blots und Sirt2-Kolokalisationsfärbungen mit CNP, CD68, GFAP, Iba-1 und NeuN (Figure 1 D-J in der Publikation) wurden in einer Kooperation mit dem Max-Planck-Institut für Experimentelle Medizin von Kathrin Kusch durchgeführt und ausgewertet. Die Tiere für diese Experimente wurden ebenfalls von mir operiert. Die Gewebe für die FACS-Analyse wurden von mir präpariert, die FACS-Messungen wurden in Kooperation mit PD Dr. Fred Lühder durchgeführt. Die von mir angefertigten ASC-gefärbten Hirnschnitt-Präparate wurden von Dr. Zara D'Hedouville mit dem konfokalen Mikroskop beurteilt und aufgenommen. Das Manuskript für das beigefügte Paper wurde von Prof. Dr. George Trendelenburg und mir geschrieben.

Hannover, den 18.04.18

# Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis .....	III
Tabellenverzeichnis.....	III
Abkürzungsverzeichnis .....	IV
1 Einleitung .....	1
1.1 Schlaganfallepidemiologie, Pathophysiologie, Diagnostik und Therapie .....	1
1.2 Konzept des Projektes.....	5
1.3 <i>Middle cerebral artery occlusion</i> (MCAO) als Modell der zerebralen Ischämie ...	5
1.4 <i>Silent information regulator 2</i> .....	6
1.4.1 Sirtuine .....	6
1.4.2 Expression von Sirt2 im Gehirn .....	7
1.4.3 Übersicht über bekannte Funktionen von Sirt2 .....	7
1.5 Sirt2 im Zusammenhang mit schlaganfallrelevanten Prozessen .....	8
1.5.1 Neurodegenerative Erkrankungen .....	8
1.5.2 Verlängerung der Lebensspanne.....	8
1.5.3 Inflammation .....	9
1.5.4 Nekroptose.....	10
1.5.5 Inflammasom.....	11
1.5.6 Rolle von Sirt1 in Bezug auf ischämische Gewebeschäden.....	12
1.6 Ziel und Aufbau des Projektes .....	13
2 Material und Methoden.....	15
2.1 Tierhaltung und Ausschlusskriterien .....	15
2.2 <i>Middle cerebral artery occlusion</i> (MCAO) und Laser-Doppler.....	15
2.3 Perfusion und Gewebeverarbeitung.....	16

2.4	2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid-Färbung und Infarktvolumentrie.....	17
2.5	Neuro-Score .....	18
2.6	Immunhistochemie .....	19
2.7	Manuelle Neuronen-/ ASC- <i>speck</i> -Quantifizierung .....	20
2.8	FACS-Analyse (Durchflusszytometrie).....	21
2.9	Verblindung und Statistik .....	22
3	Ergebnisse .....	23
3.1	Physiologische Parameter .....	23
3.2	Sirt2-Expression im Schlaganfall .....	23
3.3	Neuro-Score .....	24
3.4	Infarktvolumentrie und Neuronenquantifizierung.....	25
3.5	Zelluläre Veränderungen.....	25
3.5.1	Astrozytenverteilung .....	25
3.5.2	Einwanderung von Entzündungszellen .....	25
3.6	Inflammasomaktivierung .....	26
3.7	Mortalität.....	27
4	Diskussion .....	28
5	Anhang .....	31
5.1	Tabellen.....	31
6	Literaturverzeichnis .....	32
7	Publikation .....	39

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Darstellung der Mechanismen des neuronalen Zelltodes im Schlaganfall	3
Abbildung 2: Darstellung der MCAO-Methode	6
Abbildung 3: Zusammenfassende schematische Darstellung der Einleitungsinhalte	13
Abbildung 4: Untersuchte Fragestellungen in der Übersicht	13
Abbildung 5: Operationszubehör	16
Abbildung 6: TTC-gefärbte Hirnschnitte eines Mausgehirnes	18
Abbildung 7: NeuN-GFAP-ASC-Färbung	20
Abbildung 8: Sirt2-Färbung	20
Abbildung 9: ASC- <i>speck</i>	21
Abbildung 10: Gewichts- und Temperaturverlaufskurven	23
Abbildung 11: Neuro-Score Infarktmodell 1	24
Abbildung 12: Neuro-Score Infarktmodell 2	24
Abbildung 13: Einwanderung von Entzündungszellen	26
Abbildung 14: Mortalitätskurve	27

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Bederson-Neuro-Score	18
Tabelle 2: Modified Neurological Severity-Score	19
Tabelle 3: Primär- und Sekundärantikörper der immunhistochemischen Färbungen (Anhang)	31
Tabelle 4: Antikörper für die FACS-Analyse (Anhang)	31

## Abkürzungsverzeichnis

<b>A.</b>	Arteria
<b>aPKC</b>	Atypische Proteinkinase C
<b>ASC</b>	<i>apoptosis-associated speck protein</i>
<b>ATP</b>	Adenosintriphosphat
<b>Caspase</b>	<i>cysteiny-l-aspartate specific protease</i>
<b>CDP-Choline</b>	Cytidin-5'-diphosphocholin
<b>CNP</b>	Cyklische Nukleotidphosphodiesterase
<b>CT</b>	Computertomographie
<b>ERC</b>	<i>extrachromosomal ribosomal DNA circles</i>
<b>FACS</b>	<i>flourescence-activated cell sorting</i>
<b>FOXO3</b>	<i>forkhead-box protein O3</i>
<b>HDAC</b>	Histondeacetylase
<b>IL-1</b>	Interleukin 1
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Interleukin 1 $\beta$
<b>IL-18</b>	Interleukin 18
<b>iNOS</b>	<i>inducible nitric oxide synthase</i>
<b>KO</b>	<i>knockout</i>
<b>LaVeS</b>	Niedersächsisches Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit
<b>MCAO</b>	<i>middle cerebral artery occlusion</i>
<b>MLKL</b>	<i>mixed lineage kinase domain-like protein</i>
<b>MNA</b>	1-Methylnicotinamid
<b>mRNA</b>	<i>messenger ribonucleic acid</i>
<b>MRT</b>	Magnetresonanztomographie
<b>NAD<sup>+</sup></b>	Nicotinamidadenindinukleotid
<b>NALP3</b>	<i>NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3</i>
<b>NAM</b>	Nicotinamid
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	<i>nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
<b>NLR</b>	<i>nod-like receptor</i>
<b>NLRP3</b>	<i>nod-like receptor family, pyrin domain containing 3</i>
<b>NO</b>	Stickstoffmonoxid
<b>NOS</b>	<i>nitric oxide synthase</i>
<b>Par-3</b>	<i>polarity protein par-3</i>
<b>PBS</b>	Phosphatgepufferte Salzlösung
<b>PLP</b>	Proteolipid-Protein
<b>PNS</b>	Peripheres Nervensystem
<b>RIPK1/3</b>	<i>receptor-interacting serine/threonine protein kinase 1/3</i>
<b>ROS</b>	<i>reactive oxygen species</i>
<b>rpm</b>	<i>rounds per minute</i>

<b>rtPA</b>	<i>recombinant tissue plasminogen activator</i>
<b>SIRS</b>	<i>systemic inflammatory response syndrome</i>
<b>Sirt2</b>	Sirtuin 2/ <i>silent information regulator two protein</i> (Protein in Säugetieren)
<b>Sir2</b>	<i>silent information regulator 2</i> (Gen in Hefen)
<b>SREBP2</b>	<i>sterol response element binding protein 2</i>
<b>TBS</b>	Tris-gepufferte Salzlösung
<b>TLR</b>	<i>toll-like receptor</i>
<b>TTC</b>	2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid
<b>ZNS</b>	Zentrales Nervensystem
<b>z-VAD-fmk</b>	<i>carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl-[O-methyl]-fluoromethylketone</i>

# 1 Einleitung

## 1.1 Schlaganfallepidemiologie, Pathophysiologie, Diagnostik und Therapie

Zerebrale Durchblutungsstörungen gelten heutzutage als die dritthäufigste Todesursache nach kardiovaskulären Ereignissen und neoplastischen Erkrankungen in den westlichen Ländern (Mukherjee und Patil 2011). 9,7 % aller Tode weltweit werden durch einen Schlaganfall verursacht (Mukherjee und Patil 2011). Die Oxford Vascular-Studie (OXVASC) hat gezeigt, dass fünf Jahre nach einem Schlaganfall 47 % der Patienten verstorben sind und mehr als ein Drittel der Überlebenden eine Behinderung davontrug (Luengo-Fernandez et al. 2013). Der Schlaganfall ist aufgrund seiner Auswirkung sowohl auf kognitive als auch auf motorische Fähigkeiten einer der häufigsten Gründe für eine längerfristige Versorgung von Patienten in Rehabilitationseinrichtungen und Pflegeheimen (Luengo-Fernandez et al. 2013). Zu den Risikofaktoren für das Auftreten eines Schlaganfalls gehören in erster Linie die arterielle Hypertonie, hohes Alter, genetische Prädispositionen für kardiovaskuläre Erkrankungen, ein vorangegangener Schlaganfall oder eine transiente ischämische Attacke, Diabetes mellitus, Adipositas, Vorhofflimmern, ein persistierendes Foramen ovale sowie Hypercholesterinämie, Alkoholabusus, Rauchen und die Einnahme von hormonellen Kontrazeptiva (Grau et al. 2001). Der Schlaganfall ist also weltweit eine der relevantesten Erkrankungen im Hinblick auf Häufigkeit, Folgen und Folgekosten.

Pathophysiologisch unterscheidet man beim Schlaganfall die vaskulären Ischämien (80-85 %) von den zerebralen Blutungen (10-11 %) (Wolf et al. 1992), wobei sich das folgende Projekt mit den ischämischen Insulten beschäftigt. Die Ätiologie der zerebralen Ischämien lässt sich anhand der TOAST-Klassifikation in fünf Kategorien einteilen (Adams et al. 1993; Adams und Biller 2015). Als makroangiopathisch verursachte Schlaganfälle versteht man dabei durch Arteriosklerose in größeren intra- oder extrakraniellen Gefäßen entstandene Infarkte (Adams und Biller 2015). Davon betroffen sind je nach Versorgungsgebiet des stenosierten Gefäßes ganze Kortextareale, eventuell mit zusätzlicher Beteiligung tiefer liegender Bereiche, aber auch der Hirnstamm oder das Kleinhirn (Adams und Biller 2015). Des Weiteren kann es zur Entstehung sogenannter mikroangiopathischer Infarkte kommen. Diese finden sich vor allem bei Patienten mit arterieller Hypertonie und/ oder Diabetes mellitus (Adams und Biller 2015). Mikroangiopathisch verursachte Schlaganfälle betreffen in der Regel kleinere „lakunäre“ Hirnareale, typischerweise in Bereichen wie den Basalganglien, der Capsula interna, dem Thalamus oder dem Hirnstamm (Adams und Biller 2015). Ein dritter ätiologischer Mechanismus des Schlaganfalls ist die kardial verursachte Embolie (Adams und Biller 2015). Diagnostisch wichtig zur Abgrenzung gegenüber anderen Schlaganfallätiologien ist hierbei das Vorliegen einer Herzerkrankung, typischerweise in Form von Vorhofflimmern (Adams und Biller 2015). Die vierte Kategorie umfasst Schlaganfälle mit einer anderen gesicherten Ursache. Hierzu gehören nicht-arteriosklerotische Vasculopathien wie zum Beispiel Vaskulitiden, aber auch hämatologische Erkrankungen oder Thrombophilien (Adams et al. 1993; Adams und Biller 2015). Die fünfte Kategorie bilden Infarkte unbekannter Ursache, die keiner der anderen vier Kategorien eindeutig zuzuordnen sind (Adams und Biller 2015).

Die Minderperfusion während des Schlaganfalls führt im entsprechenden Hirnareal zu einer unzureichenden Versorgung der Zellen mit Sauerstoff und wichtigen Energiemetaboliten wie Glukose (Dirnagl et al. 1999). Dadurch werden Depolarisationen von Neuronen und Gliazellen ausgelöst (Dirnagl et al. 1999). Ein Calciumeinstrom in die Zellen zieht anschließend die Ausschüttung exzitatorischer Neurotransmitter wie Glutamat nach sich (Dirnagl et al. 1999). Dieser Mechanismus, der zum Zelluntergang führen kann, nennt sich Exzitotoxizität (Leist und Nicotera 1998; Dirnagl et al. 1999). Zudem beginnt im geschädigten Gewebe die Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies, die sowohl direkten Schaden in Form von Nekrosen anrichten als auch im Verlauf zur Aktivierung von Inflammationskaskaden und dem programmierten Zelltod (Apoptose) führen (Leist et al. 1999; Iadecola und Anrather 2011). Intrazellulär werden Mitochondrienmembranen durchlässig und Cytochrom C als Apoptoseinduktor freigesetzt (Dirnagl et al. 1999). Hirnareale, die mit weniger als 10 ml/100 g/min perfundiert werden, bezeichnet man als ischämischen Kern (Fisher und Garcia 1996). Hier werden die Zellen so schnell irreversibel geschädigt, dass man sie durch Interventionen nach dem Infarktereignis nicht retten kann (Fisher und Garcia 1996). Hier entstehen vornehmlich Nekrosen, wobei in den Randarealen, in denen eine herabgesetzte Perfusion (zwischen 15 und 40 ml/100 g/min) aufrechterhalten werden kann, zunächst reversible Schäden entstehen (Fisher und Garcia 1996). Diese minderperfundierten Areale, die initial noch keine strukturellen Schädigungen, jedoch bereits funktionelle Einbußen aufweisen, werden als Penumbra bezeichnet (Fisher und Garcia 1996). Die Penumbra ist nach heutigem Kenntnisstand das Hirngewebe, welches man am ehesten durch rechtzeitige effektive Therapie vor dem irreversiblen Untergang schützen kann (Fisher und Garcia 1996).

Im geschädigten Hirngewebe finden unterschiedliche Arten von Zelltod statt. Je nachdem, wie stark Signale einer Zellschädigung wie z. B. Calciumeinstrom, Mitochondrien- oder DNA-Schaden ausgeprägt sind, kann der Zelltod durch Nekrose, Apoptose oder Nekroptose erfolgen (Degterev et al. 2005; Preyat et al. 2015). Ein starker Schaden, bspw. durch Exzitotoxizität, triggert hierbei typischerweise den nekrotischen Zelluntergang (Dirnagl et al. 1999). Geringere Zellschädigung führt eher zur Apoptose durch die Cysteinyl-Aspartat-spezifischen Proteasen Caspase 1 und 3 (Dirnagl et al. 1999; Nicotera et al. 1999). Die Nekroptose ist eine wie die Apoptose durch Liganden-Rezeptor-Interaktion hervorgerufene Nekrose, die in Autophagie resultiert und im Verlauf des Schlaganfalls verzögert aktiviert wird (Degterev et al. 2005; Nikolettou et al. 2013). Wichtig für ihre Aktivierung ist die Bildung eines Multiproteinkomplexes mit den Kinasen RIPK1 und RIPK3 (Nikolettou et al. 2013; Preyat et al. 2015). Auch diese Form des Zelltodes trägt zum Untergang von Hirngewebe und damit zur Schlaganfallgröße bei (Degterev et al. 2005).

Neben diesen pathophysiologischen Mechanismen, die zum Untergang von Neuronen und damit zum Hirninfarkt führen, hat der Schlaganfall noch eine weitere Folge, die ebenfalls das Outcome des Patienten beeinflusst. Durch verschiedene Veränderungen, wie z. B. eine (entzündungsbedingt) erhöhte Durchlässigkeit von Membranen, aber auch perfusionsbedingte Druckveränderungen, entwickelt sich beim akuten Schlaganfall in den ersten Tagen eine Schwellung des betroffenen Gehirngewebes - ein

Hirnödem (O'Brien 1979). Dieses kann im Einzelfall bis zur Hirnstammeinklemmung und damit zum Tod führen (O'Brien 1979).

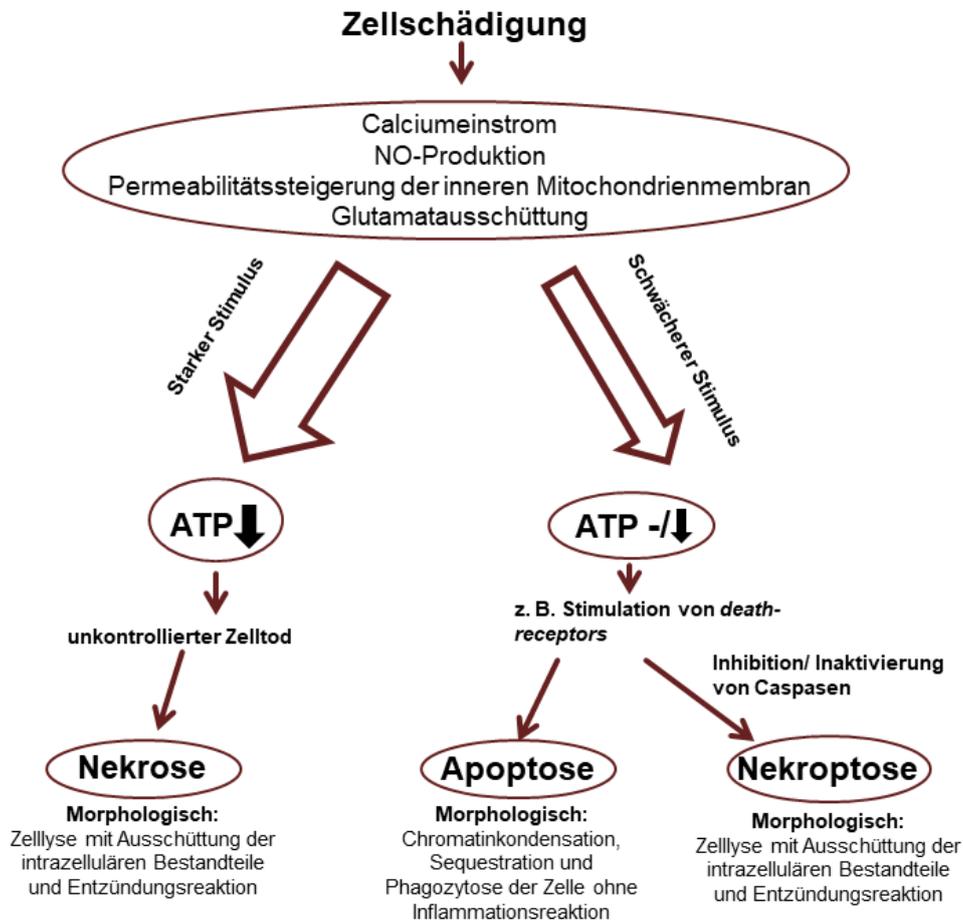


Abbildung 1: **Darstellung der Mechanismen des neuronalen Zelltodes im Schlaganfall**, ohne Anspruch auf Vollständigkeit, nach Leist et al. 1997; Leist und Nicotera 1998; Nicotera et al. 1999; Nicotera et al. 2000; Degterev et al. 2005.

Ein Schlaganfall muss folglich als dynamisches Ereignis verstanden werden, wobei bekannt ist, dass die Entwicklung der Penumbra - sowohl positiv als auch negativ - durch verschiedene Faktoren beeinflussbar ist. Dieses Verständnis der Pathophysiologie des Schlaganfalls zeigt, warum ein schnelles therapeutisches Eingreifen essentiell ist - *time is brain*.

Diagnostisch sind im klinischen Alltag Schlaganfallsymptome wie eine Hemiparese, Hemidysästhesien, Dysarthrie, Aphasie, Gesichtsfelddefekte (z. B. Hemianopsie), ein Neglect, Bewusstseinsstörungen bis zu Somnolenz und Koma, pathologische Reflexe und Hirnnervenausfälle typisch (Masuhr et al. 2013). Diese treten plötzlich und abhängig von dem betroffenen Gefäßterritorium auf (Masuhr et al. 2013). Initial ist eine zerebrale Bildgebung (cCT oder cMRT) zum Ausschluss einer intrakraniellen Blutung wichtig (DGN-Leitlinie Diagnostik und Therapie in der Neurologie 2012). Die Computertomographie macht in einigen Fällen ab 2 h nach dem Eintreten der Ischämie Infarktfrühzeichen, wie z. B. das „hyperdense Mediazzeichen“, sichtbar. Außerdem ist es möglich, Penumbra-äquivalente Gebiete mittels MRT oder CT-basierten Verfahren darzustellen (DGN-Leitlinie Diagnostik und Therapie in der Neurologie 2012). In der diffusionsgewichteten MRT-Sequenz bildet sich der ischämische Kern

als Areal gestörter Diffusion bereits ab 30 min nach dem Infarkt ereignis ab. Die perfusionsgewichtete Sequenz stellt die minderperfundierten Areale dar. Durch das Berechnen des sogenannten *mismatches* lässt sich die Penumbra, also das Risikogewebe graphisch abbilden (DGN-Leitlinie Diagnostik und Therapie in der Neurologie 2012). Dabei entspricht der Infarktkern diffusions- und perfusionseingeschränkten Gebieten, während die Penumbra als das Gewebe gilt, in dem die Perfusion eingeschränkt, die Diffusion jedoch weitgehend erhalten ist (Fisher und Garcia 1996). Zu den weiteren diagnostischen Methoden gehören die CT- oder MR-Angiographie. In der Angiographie kann man ggf. mittels Kontrastmittel das verschlossene Gefäß sichtbar machen und somit Patienten identifizieren, die von einer lokalen Intervention, bpsw. durch Thrombektomie (s. u.), profitieren können (DGN-Leitlinie Akuttherapie des ischämischen Schlaganfalls - Ergänzung 2015).

Therapeutisch wendet man als kausalen Therapieansatz die systemische Thrombolyse mit intravenös verabreichtem rtPA (0,9 mg/kg Körpergewicht) in einem Zeitfenster von 4,5 h nach Symptombeginn an (Hacke et al. 2008; Bluhmki et al. 2009). Es konnte gezeigt werden, dass eine sehr frühe Gabe der systemischen Thrombolyse (< 70 min nach Symptombeginn) das Outcome der Patienten verbessert (Strbian et al. 2010). Diese Ergebnisse unterstreichen das *time-is-brain*-Konzept in der Therapie des Schlaganfalls. Auch eine zusätzliche lokale intraarterielle Thrombolyse mit rtPA ist möglich (Asadi et al. 2015). Die wichtigste und gefährlichste Komplikation der rtPA-Gabe ist die symptomatische intrazerebrale Blutung, die lebensbedrohlich sein kann (Bluhmki et al. 2009).

Eine weitere therapeutische Methode besteht in der kathetergestützten, mechanischen Rekanalisation (Thrombektomie). Studien konnten zeigen, dass diese Technik in Kombination mit der systemischen Thrombolyse der alleinigen Thrombolyse in Bezug auf das Outcome bestimmter Patientengruppen überlegen ist (Asadi et al. 2015; DGN-Leitlinie Akuttherapie des ischämischen Schlaganfalls - Ergänzung 2015; Rodrigues et al. 2016). Ziel all dieser Therapieformen ist eine rasche Rekanalisation des Gefäßes, welche sich, wenn sie gelingt, als effektive Therapie des Schlaganfalls bezüglich des neurologischen Outcomes und der Mortalität erwiesen hat (Mortimer et al. 2013).

Zudem hat sich gezeigt, dass Schlaganfallpatienten von einer Aufnahme auf eine spezialisierte *stroke unit* profitieren (Indredavik et al. 1991). Hier kann eine optimale Behandlung garantiert werden, welche das neurologische Outcome der Patienten verbessert und die Mortalitätsrate senkt (Indredavik et al. 1991; Stroke Unit Trialists' Collaboration 2013). Zur optimalen Behandlung gehören das engmaschige Überwachen der Vitalparameter, die Blutdruckkontrolle sowie die frühe Sekundärprophylaxe des Schlaganfalls, z. B. mit 100 mg Acetylsalicylsäure (DGN-Leitlinie Akuttherapie des ischämischen Schlaganfalls - Ergänzung 2015). Die Elektrolyte, der Blutzucker und die Blutgerinnung sollten überwacht und ggf. angepasst werden. Aufgrund eines erhöhten Pneumonierisikos nach einem Schlaganfall sollten die Patienten im Hinblick auf Entzündungszeichen und Temperaturanstiege überwacht werden. Dies ermöglicht eine frühzeitige Therapie der Komplikationen (DGN-Leitlinie Diagnostik und Therapie in der Neurologie 2012). Nach dem *time-is-brain*-Konzept sollte die sogenannte *door-to-*

*needle-time*, also die Zeit vom Eintreffen des Patienten im Krankenhaus bis zur Verabreichung der systemischen Thrombolyse, möglichst nicht mehr als 20 min betragen (Meretoja et al. 2012). Dieses kann durch eine gute Organisation schon vor dem Eintreffen des Patienten in der Notaufnahme erreicht werden. Dazu gehört z. B. die rechtzeitige Absprache mit dem Rettungsdienst sowie nach Ausschluss von Kontraindikationen, die unverzögerte Verabreichung von rtPA (Meretoja et al. 2012; Meretoja et al. 2013).

## 1.2 Konzept des Projektes

Während die akuten Rekanalisations-Möglichkeiten (systemische Thrombolyse, mechanische Rekanalisation s. o.) mittlerweile schon sehr ausgereift sind, ist es trotz enormen wissenschaftlichen Anstrengungen bisher nicht gelungen, die endogenen Schutzmechanismen des Körpers therapeutisch nutzbar zu machen, um den ischämischen Hirnschaden möglichst gering zu halten (Dirnagl et al. 1999; O'Collins et al. 2006). Gemeint ist damit die therapeutische Modulation körpereigener Faktoren (wie z. B. gewisser Proteine), deren Beeinflussung *nach* dem Ereignis des Schlaganfalls zu einem verbesserten neurologischen Outcome des Patienten führt. Viele in Tiermodellen als erfolgsversprechend getestete, „neuroprotektive“ Substanzen ließen sich nicht in eine beim menschlichen Patienten wirksame Therapiestrategie übersetzen (O'Collins et al. 2006). Ein Grund dafür kann sein, dass die für klinische Studien ausgewählten Substanzen oft nicht die Stoffe waren, die in Tiermodellen besonders große Erfolge erzielt hatten (O'Collins et al. 2006). Außerdem wurden die zu Grunde liegenden Tiermodelle nicht ausreichend berücksichtigt. Applikationswege und Dosierungen wurden so stark verändert, dass die Ergebnisse der klinischen Studien nicht mehr mit dem ursprünglichen Tiermodell vergleichbar waren (O'Collins et al. 2006).

Das Konzept dieser Arbeit ist es ebenfalls, eine sogenannte Neuroprotektion beim Schlaganfall zu erreichen und dadurch Nervenzellen vor dem (ischämischen) Untergang zu bewahren. Eine im Vorfeld des Projektes durchgeführte Screeninguntersuchung konnte Proteine identifizieren, die durch einen Schlaganfall in ihrer Expression hochreguliert werden. Von diesen Proteinen kann daher angenommen werden, dass sie eine Rolle in der Reaktion des Körpers auf einen Schlaganfall spielen. Eines dieser postischämisch induzierten Proteine nennt sich Sirtuin 2 (Sirt2). Da Sirt2 Thema von Publikationen war, die es in Zusammenhang mit schlaganfallähnlichen Pathologien brachten, entschieden wir uns, den Einfluss von Sirt2 auf einen Schlaganfall in Mäusen zu untersuchen. Im Folgenden werden die Grundlagen dieser Idee, die Hintergründe zu Sirt2 sowie das Ziel dieser Arbeit erläutert.

## 1.3 *Middle cerebral artery occlusion* (MCAO) als Modell der zerebralen Ischämie

Um den Einfluss von Sirt2 auf den ischämischen Schlaganfall zu untersuchen und daraus eventuell therapeutische Optionen ableiten zu können, war es essentiell, ein Versuchsmodell zu verwenden, welches die Pathophysiologie des ischämischen Schlaganfalls des Menschen bestmöglich widerspiegeln kann. Wir haben uns für einen transienten Verschluss der Arteria cerebri media in Mäusen ent-

schieden (Engel et al. 2011). Der Verschluss wurde mithilfe eines Silikon-beschichteten Filaments, das in das Gefäßlumen inseriert wird, erzeugt. Diese Methode basiert auf einer an Ratten entwickelten Operation (Bederson et al. 1986), die für Mäuse adaptiert wurde (Belayev et al. 1999; Engel et al. 2011). Sie ruft einen vorübergehenden Verschluss des Gefäßes mit einer anschließenden Reperfusionphase hervor und imitiert somit die „physiologischen“ Bedingungen eines Schlaganfalls. Bei Anwendung dieses Verfahrens entstehen ein Infarktkern und eine Penumbrazone, die je nach Dauer des Verschlusses in ihrer Größe variieren (Ansari et al. 2011). Diese Art von künstlich erzeugtem Schlaganfall zeigt eine ähnliche zelluläre Dynamik wie Schlaganfälle im Medialstromgebiet des Menschen und eignet sich daher als Modell zur Untersuchung des Einflusses von Sirt2 auf die Entwicklung eines Schlaganfalls (Hossmann 2008).

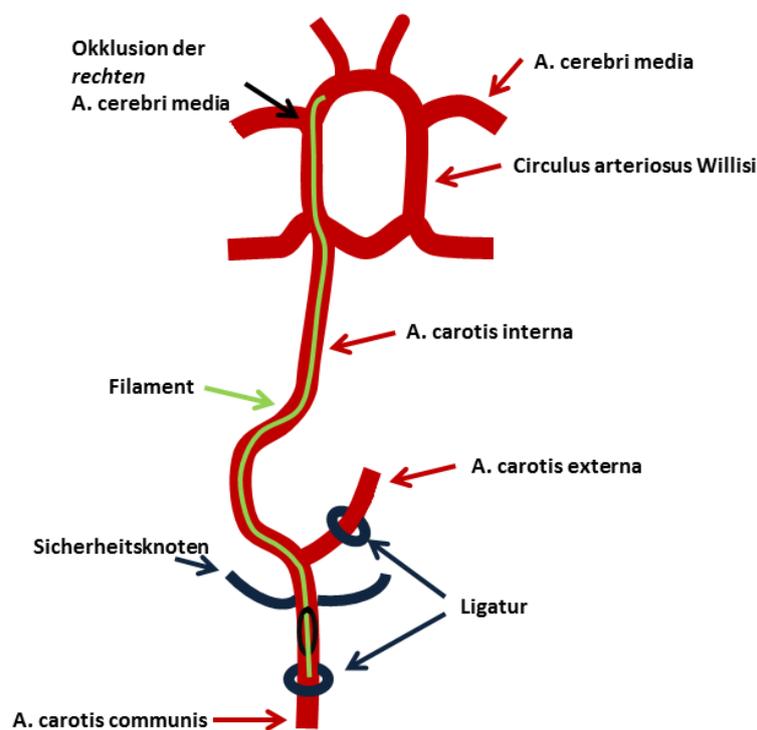


Abbildung 2: **Darstellung der MCAO-Methode** mit einem silikonbeschichteten Filament in Mäusen.

## 1.4 *Silent information regulator 2*

### 1.4.1 Sirtuine

Es gibt sieben Sirtuine, die das Analogon zum *silent information regulator 2* (Sir 2) der Hefe in Säugtieren darstellen (North et al. 2003). Sie gehören zur Klasse III der Histondeacetylasen (HDAC) und benötigen als Substrat NAD<sup>+</sup> (North et al. 2003). Die Abspaltung eines Acetylrests von Proteinen gehört zu den posttranslationalen Proteinmodifikationen, die die Proteinaktivität grundsätzlich sowohl positiv als auch negativ beeinflussen können (North et al. 2003). Die verschiedenen Sirtuine befinden sich in unterschiedlichen Zellen und Zellkompartimenten und haben Einfluss auf eine Vielzahl von zellulären Prozessen, wobei ihre Funktionen bis heute noch zu großen Teilen unbekannt sind.

Eine besondere Aufmerksamkeit erlangten die Sirtuine durch die Beobachtung, dass ihre Überexpression in transgenen Organismen wie Hefen, Würmern und Fliegen zu einer Verlängerung der Lebensspanne führte (Agarwal und Baur 2011).

#### 1.4.2 Expression von Sirt2 im Gehirn

Sirt2 wird im Gehirn exprimiert. Die Verteilung von Sirt2 in den Zellen des Gehirns wurde kontrovers beschrieben. Sirt2 wurde zum einen als neuronales Protein identifiziert, welches sich in Zellkörpern von Kortexneuronen und Purkinjezellen anfärben lässt (Maxwell et al. 2011; Xie et al. 2016). Es ist ein vorrangig zytoplasmatisches Protein, das auch nukleär vorkommen kann (North et al. 2003; Xie et al. 2016). Außerdem ließ sich Sirt2 in CNP-gefärbten Faserbahnen nachweisen (Maxwell et al. 2011). Southwood et al. fanden Sirt2 als von Oligodendrozyten und im PNS von Schwann-Zellen exprimiert (Southwood et al. 2007). Es wurde hier generell als Myelin-assoziiertes Protein vorgefunden. Werner et al. zeigten, dass Sirt2 in der gesamten Reihe der Oligodendrozytenvorläufer vorkommt (Werner et al. 2007). In anderen Experimenten konnte Sirt2 weder in Mikrogliazellen, noch in Neuronen nachgewiesen werden (Li et al. 2007). Pais et al. fanden das Protein in einem Entzündungsmodell des Gehirns jedoch in Mikrogliazellen vor (Pais et al. 2013).

Es existieren 2 alternative Splicevarianten von Sirt2 (Voelter-Mahlknecht et al. 2005), wobei nur die zweite Variante ( $v2$ -Isoform) im Myelin angereichert vorgefunden wurde (Werner et al. 2007).

#### 1.4.3 Übersicht über bekannte Funktionen von Sirt2

Um die Funktionen von Sirt2 zu analysieren, wurden bereits einige seiner Zielproteine *in vitro* und *in vivo* identifiziert. North et al. fanden eine Kolo-kalisation von Sirt2 mit  $\alpha$ -Tubulin (North et al. 2003). Mithilfe von Zellkulturen konnte gezeigt werden, dass Sirt2  $\alpha$ -Tubulin NAD<sup>+</sup>-abhängig deacetyliert (North et al. 2003; Li et al. 2007). Diese Aktivität konnte durch Nicotinamid, einen HDAC Klasse-III-Inhibitor, unterbunden werden (North et al. 2003). Allerdings zeigte sich *in vivo* mit Sirt2<sup>-/-</sup>-Tieren kein Unterschied im Acetylierungsgrad von  $\alpha$ -Tubulin (Bobrowska et al. 2012). Dies legt nahe, dass nicht Sirt2, sondern HDAC6 die vorrangige Tubulindeacetylase *in vivo* darstellt (Bobrowska et al. 2012).

Sirt2, acetyliertes  $\alpha$ -Tubulin und CNP scheinen im Zusammenspiel wichtig für die Reifung von Oligodendrozyten zu sein (Li et al. 2007).

Sirt2 verhinderte *in vitro*, dass zuviel acetyliertes  $\alpha$ -Tubulin vorlag (Li et al. 2007). Hierdurch wurde eine vorzeitige, überschießende Reifung der Oligodendrozyten gebremst (Li et al. 2007). Wird Sirt2 in den Oligodendrozytenvorläufern depletiert, reifen und altern diese Zellen vorzeitig im Vergleich zu Zellen mit „normalem“ Sirt2-Anteil (Li et al. 2007).

Sirt2 wurde außerdem als Einflussfaktor auf die Myelinisierung im peripheren Nervensystem identifiziert. Es deacetyliert hier das *polarity protein par-3* und beeinflusste dadurch im Zusammenspiel mit weiteren Proteinen den Ablauf der Myelinisierung durch Schwann-Zellen (Beirowski et al. 2011).

## 1.5 Sirt2 im Zusammenhang mit Schlaganfallrelevanten Prozessen

In den folgenden Experimenten wurde der Einfluss einer Sirt2-Depletion auf die Pathologie und Folgen des Schlaganfalls untersucht. Dieser Abschnitt soll erläutern, warum Sirt2 in diesem Zusammenhang interessant erschien und einen Überblick darüber geben, in welchen pathophysiologisch ähnlichen Vorgängen Sirt2 bereits untersucht wurde.

### 1.5.1 Neurodegenerative Erkrankungen

Ein Schlaganfall hat pathophysiologische Gemeinsamkeiten mit neurodegenerativen Erkrankungen: So ist z. B. bekannt, dass eine erhöhte Ausschüttung des proinflammatorischen Zytokins IL-1 sowohl beim Schlaganfall als auch bei chronisch neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Parkinson oder Morbus Alzheimer stattfindet (Rothwell et al. 1997). Amyloid-beta, welches zur Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen beiträgt, fällt nach zerebraler Ischämie vermehrt an (Wakita et al. 1992; Floyd 1999). Zudem zeigte sich, dass neuroinflammatorische Prozesse (s. u.) und oxidativer Stress ebenfalls in der Entwicklung beider Erkrankungen wichtig sind (Floyd 1999; Floyd und Hensley 2002).

In einem Versuchsmodell der neurodegenerativen Erkrankung Morbus Parkinson schützte eine Sirt2-Inhibition die dopaminergen Neurone des Striatums (Wang et al. 2015). Die Experimente zeigten, dass Rotenon, welches in Tiermodellen Parkinson auslöst, bei gealterten Ratten zu einer Sirt2-Induktion führt (Wang et al. 2015). Mit dem Sirt2-Inhibitor AK-7 wurde nachgewiesen, dass eine Sirt2-Inhibition zu weniger striatalem Dopaminverlust und zu weniger neurologischen Auffälligkeiten unter Rotenoneinfluss führte (Wang et al. 2015).

Die Sirt2-Inhibition wirkte ebenfalls protektiv in zwei verschiedenen Mausmodellen zur Untersuchung der neurodegenerativen Erkrankung Chorea Huntington (Chopra et al. 2012). Mit dem Inhibitor AK-7 behandelte Tiere zeigten eine bessere motorische Performance als Placebo-behandelte Mäuse (Chopra et al. 2012). Eine geringe AK-7-Dosis führte zu längerem Überleben der behandelten Tiere. Die AK-7-Behandlung führte außerdem zu einem höheren neuronalen Volumen im Striatum und einem geringeren Volumen der Polyglutamin-Aggregate (Chopra et al. 2012). Auch in einem Modell der frontotemporalen Demenz erwies sich die Sirt2-Inhibition als neuroprotektiv (Spires-Jones et al. 2012).

### 1.5.2 Verlängerung der Lebensspanne

In Bezug auf physiologische Alterungsprozesse, welche einen Risikofaktor für das Entstehen eines Schlaganfalles darstellen, wurden die Sirtuine bereits in unterschiedlichen experimentellen Ansätzen untersucht, die sich mit der Länge der Lebensspanne beschäftigen. Besonders Sirt1 wurde in diesem Zusammenhang erforscht. Dabei zeigte sich, dass seine Hochregulierung, z. B. durch Kalorienrestriktion, die Lebensspanne von verschiedenen Organismen verlängern kann (Morris et al. 2011). Sirtuine verwandeln NAD<sup>+</sup> in Nicotinamid (NAM). NAM kann durch Methylierung zu 1-Methylnicotinamid

(MNA) werden, welches bei Nematoden, genauso wie NAM selber, zu einer Verlängerung der Lebensspanne geführt hat (Schmeisser et al. 2013). Diese Effekte zeigten sich nur unter Vorhandensein von *Sir-2.1*, dem Nematodenanalogon von Sirt1 (Schmeisser et al. 2013).

In *Saccharomyces cerevisiae* konnte gezeigt werden, dass eine zusätzliche Kopie des *Sir2*-Gens zu einer Verlängerung der Lebensspanne um 30 % führte, wohingegen ein defektes *Sir2*-Gen die Lebensspanne um 50 % verkürzte (Kaeberlein et al. 1999). Ähnliche Ergebnisse wurden auch in Experimenten mit *Drosophila* gewonnen, wobei eine signifikante Vermehrung des *Sir2*-Gens zu einer Verlängerung der Lebensspanne um bis zu 57 % führte (Rogina und Helfand 2004).

Des Weiteren wurde eine Verknüpfung von einer *Sir2*-Überexpression mit der bekannten Lebensverlängerung durch Kalorienrestriktion gefunden. Fliegen mit einem defekten *Sir2*-Gen, die niedrigkalorisch ernährt wurden, lebten nicht länger als Wildtyp-Fliegen (Rogina und Helfand 2004). Bei Wildtypfliegen, die durch niedrigkalorische Ernährung eine Verlängerung der Lebensspanne erfuhren, konnte eine gesteigerte Expression des *Sir2*-Gens gefunden werden (Rogina und Helfand 2004).

### 1.5.3 Inflammation

Der Schlaganfall als akutes Ereignis führt zur Induktion von lokalen und systemischen Entzündungskaskaden, deren Ausmaß maßgeblich zum neurologischen Outcome beiträgt (Iadecola und Anrather 2011). Der Umfang der Entzündung korreliert dabei wahrscheinlich auch proportional mit dem Ausmaß des neuronalen Schadens (Dirnagl et al. 1999). Trotzdem scheint die Rekrutierung von Entzündungszellen für eine „Heilung“ und einen Wiederaufbau nach entstandenem Schaden wichtig zu sein (Dirnagl et al. 1999). Folglich sind Proteine, die in diese Entzündungskaskaden eingreifen, von besonderem therapeutischem Interesse. Ihre Beeinflussung kann potentiell eine Schadensbegrenzung herbeiführen, wenn der Schlaganfall nicht verhindert werden kann. Gleichzeitig bedeutet dies ein Eingreifen in das fragile Gleichgewicht des Immunsystems. Besonders schwere Schlaganfälle haben eine immunsupprimierende Wirkung, die dann wiederum in einer erhöhten Zahl an systemischen Infektionen und dadurch einer erhöhten Mortalität resultiert (Prass et al. 2003; Meisel et al. 2005). 22 % aller Schlaganfallpatienten leiden im Verlauf der Erkrankung an einer Lungenentzündung, welche die Mortalität um das 2,5-fache steigert und die häufigste Todesursache der Patienten in der postakuten Phase darstellt (Meisel et al. 2005).

Inflammation wird beim Schlaganfall von den durch Calciumeinstrom ausgelösten Signalkaskaden, von freien Radikalen und durch den Mangel an Sauerstoff getriggert (Dirnagl et al. 1999). Es folgt die Aktivierung proinflammatorischer Transkriptionsfaktoren wie NF- $\kappa$ B und anderer, welche zur Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie z. B. TNF- $\alpha$  und Il-1 $\beta$  führen (Dirnagl et al. 1999). Außerdem wird die Einwanderung von Entzündungszellen wie neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und T-Zellen sowie die Aktivierung von Mikrogliazellen und Astrozyten begünstigt (Dirnagl et al. 1999).

NF- $\kappa$ B reguliert als Transkriptionsfaktor die Expression einer Vielzahl von Proteinen, die in Entzündungsprozesse und die Immunantwort des Körpers auf Pathogene involviert sind. Rothgiesser et al. erkannten, dass Sirt2 *in vitro* die p65-Untereinheit von NF- $\kappa$ B deacetyliert und damit die Expression einiger NF- $\kappa$ B-abhängiger Gene hemmt (Rothgiesser et al. 2010). In Sirt2<sup>-/-</sup>-Zellen, in denen diese Hemmung von NF- $\kappa$ B ausbleibt, fand sich demnach eine erhöhte Expression einiger NF- $\kappa$ B-abhängiger Proteine (Rothgiesser et al. 2010). Diese Proteininduktion schützte *in vitro* vor TNF- $\alpha$ -induzierter Apoptose (Rothgiesser et al. 2010).

Um Inflammation im Gehirn im Zusammenhang mit Sirt2 zu untersuchen, wurde ein Tiermodell der bakteriellen Meningitis, ausgelöst durch eine Stimulation mit Lipopolysacchariden (LPS), gewählt (Pais et al. 2013). Die LPS-Stimulation hatte eine Reduktion der Sirt2-Levels im Kortex zur Folge (Pais et al. 2013). In Sirt2<sup>-/-</sup>-Mäusen wurde beobachtet, dass es durch die LPS-Stimulation zu einer erhöhten Aktivität von Mikrogliazellen kommt (Pais et al. 2013). Daraus resultierte ein Anstieg der von ihnen ausgeschütteten, proinflammatorischen Zytokine (Pais et al. 2013). Zudem wurde ein erhöhtes Vorkommen freier Radikale festgestellt. Die Neuronenzahlen in Gehirnen von Sirt2<sup>-/-</sup>-Tieren sanken dadurch (Pais et al. 2013). In diesem Modell einer akuten Entzündung der Hirnhäute erwies sich das Vorhandensein von Sirt2 als neuroprotektiv, während im oben erläuterten TNF- $\alpha$ -Modell eine Sirt2-Inhibition als protektiv identifiziert wurde.

#### 1.5.4 Nekroptose

Inspirierend für unser Projekt waren außerdem Arbeiten, die sich mit dem Thema der Nekroptose in Bezug auf ischämische Gewebeschäden beschäftigen (s. Kapitel 1.1). Dazu gab es kontroverse Ergebnisse in der aktuellen Literatur. Narayan et al. und Preyat et al. publizierten, dass Sirt2 für die Initiation der Nekroptose wichtig sei und dass eine Sirt2-Inhibition Zellen *in vitro* vor Nekroptose schützen könne (Narayan et al. 2012; Preyat et al. 2015). Es wurde vermutet, dass die Abwesenheit von Sirt2 und niedrige NAD-Levels die Formation des RIPK1/3-Komplexes und damit die Initiation der Nekroptose stören würden (Narayan et al. 2012; Preyat et al. 2015). Bezüglich ischämischer Schäden war die Inhibition von Sirt2 in einem Modell der kardialen und renalen Ischämie als protektiv angesehen worden (Narayan et al. 2012; Preyat et al. 2015). Demgegenüber konnte ein entscheidender Einfluss von Sirt2 auf die Nekroptose *in vitro* durch Newton et al. nicht reproduziert werden (Newton et al. 2014). Sie verwendeten ein Nekroptose-Modell, das auf einer Nekroptose-Induktion mit TNF basierte (Newton et al. 2014). TNF kann sowohl Apoptose als auch Nekroptose auslösen. Dabei sind die Faktoren, die entscheiden, welche Art des Zelltodes erfolgt, noch nicht gänzlich geklärt (Preyat et al. 2015). Eine Inhibition von Caspasen (insbesondere Caspase 8), z. B. durch z-VAD-fmk führt dazu, dass der nekroptotische Zelluntergang unter TNF-Stimulation favorisiert wird (Nikoletopoulou et al. 2013; Preyat et al. 2015). Das Modell von Newton et al. zeigte eine erhöhte Sterblichkeit von Sirt2<sup>-/-</sup>-gegenüber Wildtyptieren durch eine TNF-Stimulation (Newton et al. 2014). Die Sirt2<sup>-/-</sup>-Mäuse litten schneller an einem SIRS (*Systemic Inflammatory Response Syndrome*) und verstarben daran häufiger

(Newton et al. 2014). Dagegen zeigten Mäuse, denen die Kinase RIPK3 fehlte, einen Schutz gegen die TNF-Stimulation und eine geringere Mortalität als die Wildtypiere (Newton et al. 2014). Diese kontroversen Ergebnisse, die Sirt2 in Zusammenhang mit Nekroptose bringen, waren ein weiteres Argument für die Untersuchung von Sirt2 im Schlaganfallmodell.

### 1.5.5 Inflammasom

Ein Forschungsfeld, welches außerdem interessant erschien, ist die Rolle des „Inflammasoms“ beim Schlaganfall und die Frage, ob Sirt2 damit in einem Wirkzusammenhang steht. Als Inflammasom bezeichnet man einen Multiproteinkomplex, dessen Bildung zur enzymatischen Aktivierung von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1 und IL-18 durch die Caspase 1 führt (Elliott und Sutterwala 2015). NALP3 als wichtiger Initiator des NLRP3-Inflammasoms findet sich in der Zelle assoziiert mit dem endoplasmatischen Retikulum vor (Misawa et al. 2013). Ein weiterer wichtiger Bestandteil des Inflammasoms, das ASC-Protein, findet sich an den Mitochondrien, im Zytosol und im Nucleus (Misawa et al. 2013). Die Stimulation von *toll-like* oder *nod-like* Rezeptoren und des Komplementsystems ist in der Lage die Inflammasomaktivierung zu starten (Trendelenburg 2014). Es existieren dabei sowohl endo- als auch exogene Gefahrenstimuli. Die Liganden-Rezeptor-Interaktion von TLRs oder NLRs zieht einen Kationeneinstrom, ROS-Produktion und mitochondrialen Schaden nach sich (Elliott und Sutterwala 2015). Dadurch wird die Komplexbildung von NALP3, ASC und Procaspace-1 initiiert, welche in der Aktivierung von Caspase 1 resultiert (Elliott und Sutterwala 2015). Die Inflammasomaktivierung hat außerdem die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und Monozyten zur Folge (Franklin et al. 2014). Diese dienen als Barrieren zur Entzündungsbegrenzung und zum Wiederaufbau nach dem entzündlichen Untergang des Gewebes (Franklin et al. 2014). ASC polymerisiert im Rahmen des Inflammasoms, aber eventuell auch unabhängig davon, zu sogenannten *specks*, welche große Ähnlichkeiten zu Prionen aufweisen (Franklin et al. 2014).

Beim Schlaganfall führen Stimuli wie der Verlust von Energiemetaboliten, Calciumeinstrom und ROS-Produktion ebenfalls dazu, dass das NLRP3-Inflammasom aktiviert und eine inflammatorische Kaskade ausgelöst wird (Trendelenburg 2008; Trendelenburg 2014).

Die Inflammasomaktivierung hat sich in Bezug auf verschiedene neurodegenerative Erkrankungen wie Multiple Sklerose und Morbus Alzheimer (Freeman und Ting 2015), aber auch auf akute neurologische Ereignisse wie eine Meningitis oder einen Schlaganfall als wichtiger pathophysiologischer Mechanismus entpuppt (Trendelenburg 2014).

Es wurde beobachtet, dass die Inflammasomaktivierung mit dem Acetylierungsgrad des  $\alpha$ -Tubulins und dadurch auch mit der Aktivität von Sirt2 in Zusammenhang steht (Misawa et al. 2013). Ein Gefahrensignal führt, ebenso wie bekannte Inflammasominduktoren (z. B. Nigericin), zur NAD<sup>+</sup>-Depletion und dadurch zu einer Hemmung von Sirt2 (Misawa et al. 2013). Sirt2 deacetyliert daraufhin das  $\alpha$ -Tubulin in geringerem Maße, was wiederum den Dynein-getriggerten Transport der Mitochondrien

fördert und dadurch NALP3 und ASC in räumliche Nähe bringt. Dieser Mechanismus der Sirt2-Inhibition wird als wichtig für die Inflammasomaktivierung angesehen (Misawa et al. 2013).

### 1.5.6 Rolle von Sirt1 in Bezug auf ischämische Gewebeschäden

Sirt1, das bisher am besten untersuchte Sirtuin, wurde bereits im Zusammenhang mit ischämischen Gewebeschäden untersucht.

In einem Modell der kardialen Ischämie in Mäusen wurde gezeigt, dass die Sirt1-Expression während eines Herzinfarktes herunterreguliert wird (Hsu et al. 2010). In Sirt1<sup>-/-</sup>-Tieren wurde beobachtet, dass das kardiale Infarktvolumentum signifikant größer war als das von Wildtyp-Tieren (Hsu et al. 2010). Mäuse, die Sirt1 überexprimierten, erlitten analog dazu kleinere Infarkte (Hsu et al. 2010). Diese Ergebnisse sprechen für eine protektive Rolle von Sirt1 in Bezug auf ischämische Gewebeschäden.

In einem Modell der permanenten fokalen zerebralen Ischämie konnte gezeigt werden, dass ein Sirt1-Aktivator zu kleineren und ein Sirt1-Inhibitor zu signifikant größeren Schlaganfällen führte (Hernández-Jiménez et al. 2013). In diesen Versuchen erwies sich also das Vorhandensein von Sirt1 als neuroprotektiv (Hernández-Jiménez et al. 2013).

Im Gegensatz zu den Untersuchungen der kardialen Ischämie von Hsu et al., fanden Hurtado et al. *erhöhte* Sirt1-Proteinmengen nach der permanenten zerebralen Ischämie durch MCAO vor (Hurtado et al. 2013). Sie zeigten außerdem, dass eine Erhöhung von Sirt1 durch Aktivatoren wie Resveratrol und CDP-Choline zu signifikant kleineren Infarktvolumentum nach permanenter Ischämie führte (Hurtado et al. 2013). Ein Modell der transienten Ischämie durch MCAO mit Mäusen in denen Sirt1 überexprimiert wurde, zeigte andere Ergebnisse (Kakefuda et al. 2009). Diese Tiere hatten nach der MCAO gleich große Infarktvolumentum und neurologische Defizite wie Wildtyp-Tiere (Kakefuda et al. 2009). Die Ergebnisse zu Sirt1 legen nahe, dass auch andere Sirtuine in Kaskaden eingreifen könnten, die für das Outcome nach ischämischen Gewebeschäden relevant sind.

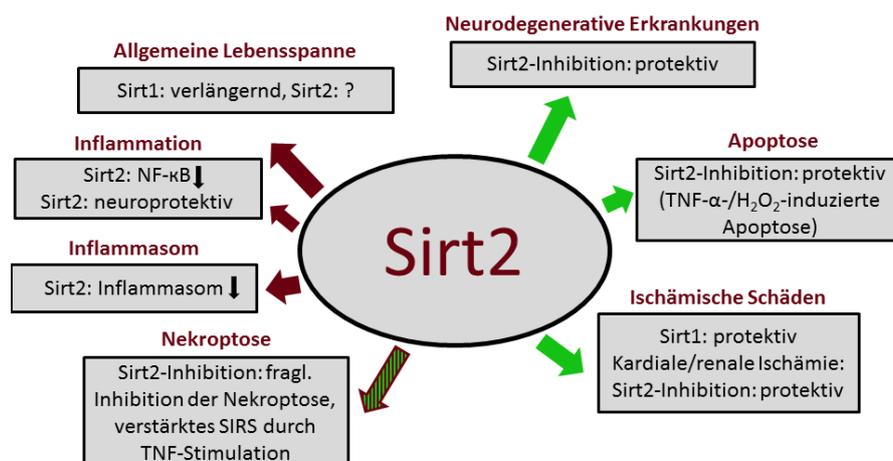


Abbildung 3: **Zusammenfassende schematische Darstellung der Einleitungsinhalte:** Die grünen Pfeile bedeuten, dass diese Ergebnisse dafür sprachen, dass die Sirt2-Depletion in unseren Versuchen einen protektiven Effekt im Schlaganfall haben könnte. Die roten Pfeile zeigen das Gegenteil an, diese Daten machten wahrscheinlich, dass sich die Sirt2-Depletion negativ auf das Schlaganfalloutcome auswirken würde.

All diese Ergebnisse machten die Untersuchung von Sirt2 im Schlaganfallmodell für uns interessant. Zu Beginn der Versuche gab es sowohl Hinweise, die dafür sprachen, dass eine Sirt2-Depletion protektiv wirken könnte als auch Experimente, die das Gegenteil wahrscheinlich machten (s. Abb. 3).

### 1.6 Ziel und Aufbau des Projektes

Ziel des hier beschriebenen Projektes war es herauszufinden, ob ein ischämischer Schlaganfall zu einer Induktion von Sirt2 in Wildtyptieren führt, in welchen Zellen Sirt2 exprimiert wird und welchen Einfluss eine Sirt2-Depletion auf das Schlaganfalloutcome hat.

Dazu wurden Wildtyptiere mit Sirt2<sup>-/-</sup>-Tieren (nach experimentellem Schlaganfall) in Bezug auf Infarktgröße, neurologische Defizite, Zellzahlen und -einwanderung im Gehirn und Inflammasomaktivierung verglichen (s. Abb. 4).

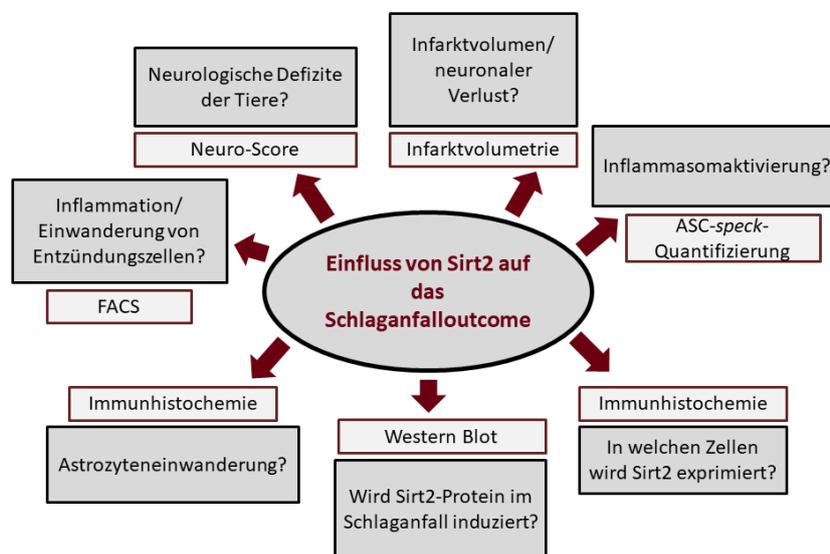


Abbildung 4: **Untersuchte Fragestellungen in der Übersicht**

Basis für die Experimente war eine Affimetrix-Chip-Geninduktions-Analyse, die eine signifikante Induktion von Sirt2-mRNA 24 h nach zerebraler Ischämie nachweisen konnte.

Um die Rolle von Sirt2 im Schlaganfall erstmals zu beleuchten, wurden Sirt2<sup>-/-</sup>-Mäuse mit Wildtyptieren in zwei unterschiedlichen Schlaganfallmodellen verglichen. Zum einen wurde ein Modell mit einer Okklusionszeit der A. cerebri media von 45 min gewählt. Anschließend wurden die neurologischen Funktionen der Tiere für 48 h beobachtet, bevor das Gehirn zur Bestimmung der Infarktvolumina entnommen wurde. Anschließend wurde das Gewebe entweder eingebettet, um immunhistochemische Färbungen durchzuführen, oder für eine FACS-Analyse präpariert, um Veränderungen der Anzahl verschiedener Entzündungszellen bestimmen zu können. Außerdem wurden die Gehirne von Wildtyptieren für einen Western Blot verwendet, um eine mögliche Regulation der Expression der Sirt2-Isoformen im Schlaganfall zu untersuchen.

Im zweiten Ansatz wählten wir eine mildere Ischämie mit einer Okklusionszeit von 15 min und einem Beobachtungszeitraum von sieben Tagen in denen die Tiere neurologisch getestet wurden. Dieses Modell sollte helfen die Frage zu klären, ob die Sirt2-Depletion auch Einfluss auf einen vergleichsweise kleinen Schlaganfall nimmt, der wenig direkten neuronalen Schaden anrichtet und eine längere Beobachtungszeit ermöglicht (Garcia et al. 1994).

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Tierhaltung und Ausschlusskriterien

Alle Tiere wurden in der Tierhaltung der Universität Göttingen unter tageslichtähnlichen Bedingungen in Käfigen mit maximal fünf Tieren gehalten. Alle in die Untersuchungen einbezogenen Versuchstiere waren für mindestens 14 Tage unter diesen Bedingungen eingewöhnt worden. Diese Maßnahme sollte helfen, zusätzlichen Stress durch die neue Umgebung zu vermeiden. Während der Versuche wurden das Gewicht und die Oberflächentemperatur der Tiere kontrolliert. Dies geschah jeweils vor Beginn der Experimente und vor der Neuro-Score-Erhebung. Nach der MCAO-Operation bekamen die Tiere eine Moll-Tex-Matte und Holzwole zusätzlich in den Käfig gelegt. Sie erhielten Breifutter und Pellets, sowie Wasser ad libitum.

Alle Experimente entsprachen den institutionellen und nationalen Richtlinien. Das Projekt und seine Versuche wurden vom LaVeS genehmigt (No.33.12-42502-04-12/849).

Aus den Experimenten ausgeschlossen wurden Tiere, die während oder innerhalb von 6 h nach der MCAO-Operation an dabei aufgetretenen Komplikationen verstorben sind. Auch Tiere, die eine starke arterielle Nachblutung erlitten, wurden ausgeschlossen. Dies sollte Verfälschungen des Neuro-Scores durch den starken Flüssigkeitsverlust vermeiden. Zudem wurden nur Tiere in die Auswertung eingeschlossen, die in der TTC-Färbung einen makroskopisch sichtbaren Infarkt aufwiesen.

### 2.2 Middle cerebral artery occlusion (MCAO) und Laser-Doppler

Die Tiere wurden für die Operation mit Isofluran narkotisiert (4 % Isofluran bei 0,8 l/min O<sub>2</sub> zur Einleitung, 1,5-2 % Isofluran zur Aufrechterhaltung) und auf einer auf 37,6 °C temperierten Wärmeplatte gelagert. Als Analgesie erhielten sie 0,1 mg/kg Buprenorphin (Temgesic, Essex Chemie AG, Schweiz) subkutan vor Beginn der Operation. Die Mäuse wurden auf den Rücken gelagert und ihre Augen wurden durch die Applikation von Bepanthen Augen- und Nasensalbe geschützt.

Anschließend wurde der Zwischenzehenreflex getestet und nur wenn dieser negativ war, wurde mit der Operation begonnen. Nach Desinfektion der Haut wurde sie rechts oberhalb des Sternums eröffnet und nach stumpfem Auseinanderdrängen der beiden Schilddrüsenlappen wurde die A. carotis communis freipräpariert. Diese wurde anschließend mit einem 5,0-Faden ligiert. Als Nächstes wurde die Bifurkation der A. carotis communis aufgesucht und die A. carotis externa ebenso präpariert und ligiert. Nun wurde ein „Sicherheitsknoten“ um die A. carotis communis gelegt, der zwischen dem ersten Knoten und der Bifurkation liegen und vorerst offen bleiben sollte. Daraufhin wurde die A. carotis interna temporär mit einem Gefäßclip verschlossen. Die A. carotis communis wurde mit einer gefederten Gefäßschere proximal von der Ligatur inzidiert. Ein Faden mit Silikonbeschichtung (Doccol Corporation, USA) wurde in das Loch eingeführt. Der Gefäßclip auf der A. carotis interna wurde gelöst und das Silikonfilament weiter in das Gefäß vorgeschoben, bis es sich vor dem Abgang der A. cerebri media

befand und diese somit verschloss (s. Abb. 2). Die Wunde wurde gereinigt und die Haut mit einem 3,0-Faden verschlossen. Die Tiere wurden zum Aufwachen in einen vorgewärmten Käfig gesetzt. Nach Ablauf der Okklusionszeit (45 min/15 min) wurden die Tiere erneut narkotisiert (s. o.), die Wunde abermals geöffnet und das Silikonfilament aus dem Gefäß entfernt. Durch Zuziehen des Sicherheitsknotens wurde eine Blutung verhindert und nach Kontrolle der Ligaturen die Wunde erneut vernäht. Die Naht wurde mit Xylocaingel versorgt und die Mäuse erhielten 1 ml NaCl subkutan.

Der Laser-Doppler eignet sich insbesondere beim Erlernen der MCAO-Operation zur Kontrolle, ob der Verschluss der A. cerebri media tatsächlich suffizient ist. Er ermöglicht die Beobachtung des prozentualen Abfalls des Blutflusses im Gefäß als Indikator für eine erfolgreiche Prozedur.

Nachdem die Tiere, wie oben beschrieben, narkotisiert und analgetisch versorgt worden waren, wurde die Haut am Kopf desinfiziert und medial über dem Schädel eröffnet. Die Dopplersonde wurde auf der durch die Schädeldecke sichtbaren A. cerebri media fixiert. Das Dopplergerät (Perimed, Schweden) konnte so den Blutfluss im Gefäß anzeigen. Die oben beschriebene MCAO-Operation wurde nach Befestigung der Dopplersonde durchgeführt. Der prozentuale Abfall des Blutflusses nach Verschieben des Filaments an die Abgangsstelle der A. cerebri media sollte zwischen 70 und 100 % liegen, um einen ausreichenden und vergleichbaren Gefäßverschluss zu erzeugen.

Diese Methode wurde beim Erlernen der Operationstechnik angewendet, um den Erfolg der Operation zu kontrollieren. Bei den Experimenten wurde darauf verzichtet, um eine längere Narkosedauer und eine möglicherweise erhöhte Komplikationsrate durch die Schädelverletzung zu vermeiden.



Abbildung 5: **Operationszubehör**, **A1**: 1,5-ml Eppendorf-Cup, **A2**: 6,0 *fine MCAO suture*, **A3**: Dumont Pinzette, **B1**: Mikroskop S21 OPMI (Carl Zeiss), **B2**: Kühle Lichtquelle, **B3**: OP-Platz mit Wärmeplatte, **C1**: 5,0-Faden **C2**: 3,0-Faden, **C3**: Xylocaingel 2 %, **C4**: Buprenorphin, **C5**: gefederte Schere, **C6**: Mikrovaskularklemme, **C7**: Bepanthen Augensalbe, **C8**: 3M *Medical tape*, **C9**: Chirurgische Schere, **C10**: Dumont Pinzette, **C11**: Pinzette für Mikroclip, **C12**: spitze Pinzette, **C13**: Dumont Pinzette, **C14**: 6,0 *fine MCAO suture*, **C15**: Nadelhalter, **C16**: Wattestäbchen

### 2.3 Perfusion und Gewebeerarbeitung

Die Perfusion mit phosphatpufferter Salzlösung (PBS) diente dazu, das Gewebe von Blutzellen, insbesondere von Erythrozyten, zu befreien, um die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen zu erleichtern.

Die Perfusion wurde direkt vor der Gewebeentnahme (48 h/ sieben Tage nach der Reperfusion) vorgenommen. Dazu wurde die Perfusionspumpe (Ismatec SA, Schweiz) auf 10 ml/min kalibriert. Dann wurden die Tiere in eine tiefe Narkose gelegt (5 % Isofluran bei 0,8-1 l/min O<sub>2</sub>). Nach Ausbleiben des Zwischenzehenreflexes wurde die Maus fixiert, der Thorax durch seitliche Durchtrennung der Rippen und Lösung des Diaphragmas eröffnet und das anschließend angehobene Sternum fixiert. Das Herz wurde freipräpariert und eine stumpfe Knopfkanüle, die mit der Perfusionspumpe verbunden war, in den linken Ventrikel eingeführt und fixiert, bevor die Perfusion mit insgesamt 50 ml PBS bei 10 ml/min gestartet wurde. Die Hirnpräparation wurde nach der Perfusion und Dekapitation der Mäuse durchgeführt. Dazu wurde die Schädeldecke mit einer Pinzette entfernt. Mit einem stumpfen Spatel wurde das Gehirn aus dem Kopf gelöst und auf dem Gehirnschneider in 2 mm koronale Scheiben geschnitten, um daraus das Infarktvolumen bestimmen zu können.

Zur Fixierung für die immunhistochemischen Färbungen wurden die Hirnschnitte für 24 h in 4 % Paraformaldehyd gelagert. Anschließend wurden sie in PBS überführt und nochmal für 24 h im Kühlschrank (4 °C) gelagert. In Kooperation mit der Neuropathologie der Universitätsmedizin Göttingen wurden sie daraufhin in Paraffin eingebettet. Dazu wurden die Schnitte durch eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert und das Wasser durch Paraffin ersetzt. So wurden jeweils alle koronalen Schnitte, die zu einem Hirn gehörten, in einem Paraffinblock fixiert. Zum Schneiden wurden die Blöcke auf einem Mikrotom eingespannt und in 1,5 µm dicke Scheiben geschnitten, die auf Objektträgern fixiert und getrocknet wurden.

#### 2.4 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid-Färbung und Infarktvolumetrie

Die 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid-Färbung (TTC-Färbung) ist eine schnelle Methode, um im frischen Hirnschnitt gesundes Gewebe von nekrotischem (z. B. durch den Infarkt) zu unterscheiden. Sie basiert auf einem Farbumschlag, den TTC durch eine Reduktion erfährt. Im oxidierten Zustand ist die Substanz farblos, reduziert wird sie rot. Diese Reduktion findet bei Interaktion mit den Dehydrogenasen der Atmungskette statt. Möglich ist dieser Prozess der Reduktion deshalb nur in Gewebe mit intakten Mitochondrien. In Infarktarealen findet sich dementsprechend keine typische Rotfärbung. Anhand dieser Färbung lässt sich mithilfe von graphischer Software das Infarktvolumen des gesamten Gehirnes berechnen.

Nach dem Schneiden des Gehirns in 2 mm dicke koronale Scheiben wurden diese für 5 min von jeder Seite in 2 % TTC-Lösung (1 g TTC (Merck, Darmstadt) + 50 ml PBS), die vor Licht geschützt wurde, gefärbt. Im Anschluss an die Färbung wurden die Schnitte für 10 min in 4 % Paraformaldehyd fixiert. Die gefärbten Schnitte wurden mit einer Zentimeter-Skala versehen und von beiden Seiten mit einem Scanner digitalisiert. Die eingescannten Bilder wurden in Image J 1.47V (National Institutes of Health, USA) vermessen und aus den bestimmten Flächen das Infarktvolumen berechnet. Für das direkte Infarktvolumen wurden dazu die Flächen des Infarktes in den verschiedenen Schnitten addiert und mit

der Dicke der Hirnscheiben (2 mm) multipliziert. Das indirekte Infarktvolumen wurde bestimmt, indem für jede Hirnscheibe von der Fläche der kontralateralen Hemisphäre die Fläche der Ipsilateralen ohne den Infarkt subtrahiert wurde. Diese Werte wurden dann ebenfalls addiert und mit zwei multipliziert. Das Volumen des Gehirnodems wurde als Differenz von direktem und indirektem Infarktvolumen berechnet.



Abbildung 6: **TTC-gefärbte Hirnschnitte eines Mausehirnes** nach 45 min MCAO und 48 h Reperfusion, eingescannt zum digitalen Ausmessen der Infarktflächen mit Image J und anschließender Berechnung des Infarktvolumens.

## 2.5 Neuro-Score

Die verschiedenen Neuro-Scores sind Testverfahren, welche die neurologische Beeinträchtigung der Tiere nach der Induktion der zerebralen Ischämie beurteilbar machen sollen. Alle Tiere wurden im gesunden Zustand und anschließend 24 h und 48 h (bzw. zusätzlich 72 h, fünf Tage und sieben Tage) postoperativ beurteilt.

Neuro-Score nach Bederson/Harhausen: Der Score beruht auf einer Skala von 0-4, wobei die Motorik und der Allgemeinzustand der Tiere grob beurteilt werden (Bederson et al. 1986; Hara et al. 1995; Harhausen et al. 2010).

Tabelle 1: **Bederson-Neuro-Score**

0	Normales Verhalten
1	Vordere Extremität flektiert
2	Maus dreht sich im Kreis
3	Keine Reaktion auf seitliches Anstupsen
4	Tod

Modified Neurological Severity-Score (mNSS): Der Modified Neurological Severity-Score überprüft in verschiedenen Tests sowohl die motorischen- als auch die sensorischen Fähigkeiten einer Maus. Er besteht aus drei Tests in denen die spontane Aktivität in einer neuen Umgebung, das Klettern auf einem Gitter, und das Balancieren auf einer Stange Aufschluss über die motorischen Fähigkeiten der Maus geben sollen. Der Pinna-Reflex am Ohr und das Verhalten der Tiere beim Berühren der Flanke im Seitenvergleich, dienen der Beurteilung des sensorischen Empfindens. Die Reaktion der Maus

auf jeden der Tests wird auf einer Skala von 1-3 eingeordnet, wobei 3 kein Defizit und 1 eine schwere Beeinträchtigung bedeutet. Das Ergebnis liegt also zwischen 15 (Maus ohne sichtbare Einschränkung) und 5 Punkten (Maus mit sehr schweren Defiziten) (Garcia et al. 1994; Li et al. 2000; Hua et al. 2009).

Tabelle 2: **Modified Neurological Severity-Score**

Spontanaktivität	Balancieren	Klettern	Pinna-Reflex	Seitliches Anstupsen
1-3	1-3	1-3	1-3	1-3
= minimal 5 bis maximal 15 Punkte				

## 2.6 Immunhistochemie

Zur Neuronenzählung und zur Darstellung von Astrozyten und Inflammation wurde eine NeuN-GFAP-ASC-Mehrfachfärbung durchgeführt (n = 6 pro Gruppe). Zur Evaluierung des Sirt2-Verteilungsmusters nach dem Schlaganfall wurde eine Sirt2-Färbung etabliert (n = 4 pro Gruppe).

Die immunhistochemischen Färbungen beruhen auf dem Prinzip der spezifischen Antigen-Antikörper-Bindung. Um diese nachweisen zu können, sollten durch einen Blockpuffer zuerst alle unspezifischen Bindungsstellen blockiert werden. Anschließend wurde mit dem spezifischen Primärantikörper das nachzuweisende Protein durch Bindung markiert. Da der Primärantikörper nicht sichtbar ist, wurde anschließend ein passender Sekundärantikörper gewählt, der unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden kann. So wurden die Stellen, an denen der spezifische Antigen-Antikörper-Kontakt durch den Primärantikörper stattgefunden hat, aufgezeigt (Primär- und Sekundärantikörper der verwendeten Färbungen, inklusive Verdünnungen, s. Anhang, Tabelle 3).

Die Blockpufferlösung aus Serum (*normal-donkey-serum*), Triton-X-100 und Tris-gepufferter Salzlösung (TBS) wurde auf Eis angesetzt. Anschließend wurden die Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe deparaffiniert. Es folgte das Aufkochen in Citratpuffer und verschiedene Waschgänge in TBS. Anschließend wurden Blockpuffer, Primär-, Sekundär-Antikörper und DAPI-Lösung (Applchem, Darmstadt) zur Färbung der Zellkerne aufgetragen und die Objektträger zwischendurch in TBS gewaschen. Der Primärantikörper inkubierte dabei für 24 h (Sirt2-Färbung), bzw. 48 h (NeuN-GFAP-ASC-Färbung) bei 4 °C. Der Sekundärantikörper inkubierte für 1 h bei Raumtemperatur unter Lichtschutz und die DAPI-Lösung für weitere 10 min im Dunklen. Schließlich wurden die gefärbten Schnitte mit Deckgläschen versehen und bei 4 °C aufbewahrt.

Die fertigen Präparate wurden mit dem Axio Examiner Z.1 (Carl Zeiss, Jena) mikroskopiert und mit der Axio Cam MRm (Carl Zeiss, Jena) mithilfe der Zen-Software (Zen Version 1.0.0.0, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Jena) digitalisiert.

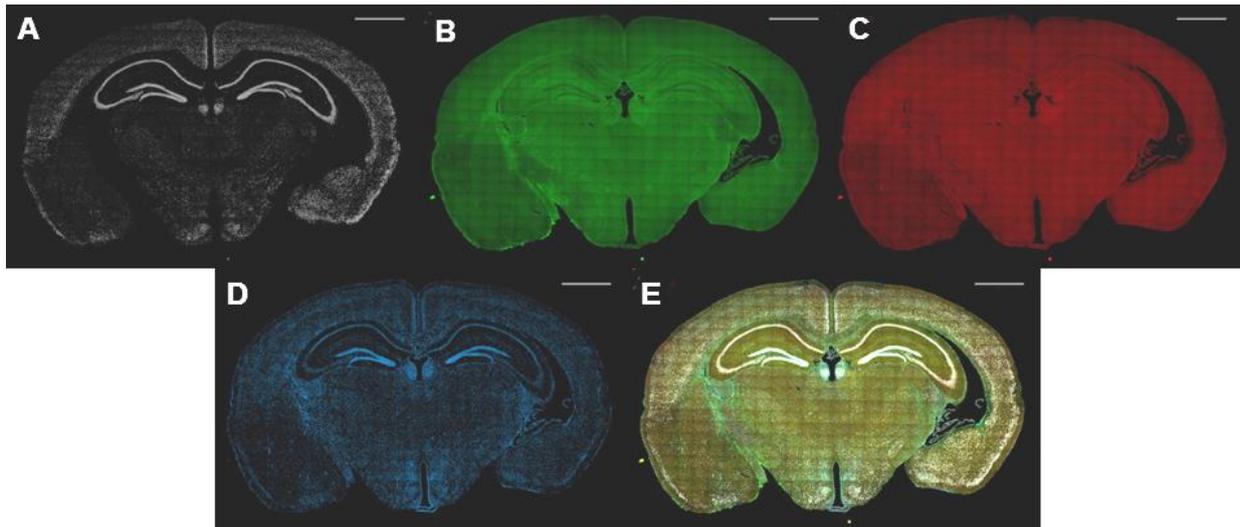


Abbildung 7: **NeuN-GFAP-ASC-Färbung** eines Maushirnes nach 45 min MCAO und 48 h Reperfusion, Maßstab 1000  $\mu\text{m}$   
**A:** NeuN, **B:** GFAP, **C:** ASC, **D:** DAPI (Zellkerne), **E:** NeuN+GFAP+ASC+DAPI.

Da die Sirt2-Färbung im Rahmen dieser Forschungsarbeit neu etabliert wurde, wurde zuerst ein Antikörper (ab115681, Abcam, Cambridge) in verschiedenen Konzentrationen getestet. Dieser wurde jedoch aufgrund von deutlich angefärbten Zellen in den Schnitten der  $\text{Sirt2}^{-/-}$ -Tiere als unzureichend spezifisch erkannt. Mit dem zweiten getesteten Antikörper (ab67299, Abcam, Cambridge) ergab sich ein Bild ohne spezifische Färbung im  $\text{Sirt2}^{-/-}$ -Hirngewebe. Nur die mit diesem Antikörper gefärbten Wildtypschnitte wurden in die Auswertung aufgenommen.

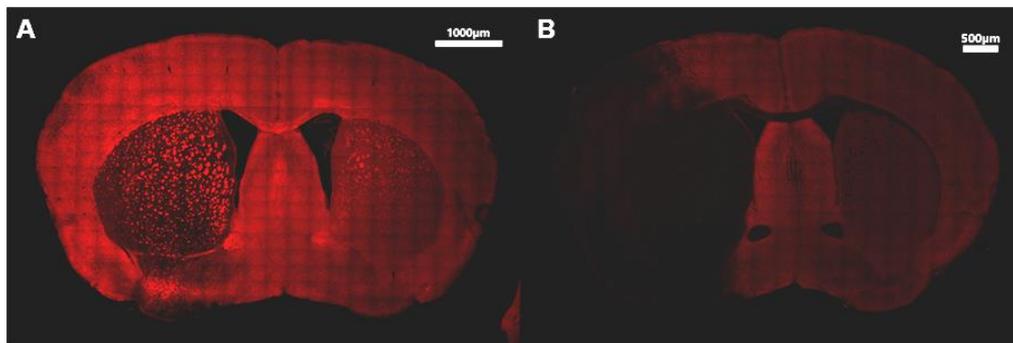


Abbildung 8: **Sirt2-Färbung** mit dem Antikörper ab67299, **A:** Wildtypgehirn nach 45 min MCAO und 48 h Reperfusion, **B:** Gehirnschnitt eines  $\text{Sirt2}^{-/-}$ -Tieres (45 min MCAO, 48 h Reperfusion).

## 2.7 Manuelle Neuronen-/ ASC-speck-Quantifizierung

In den gefärbten und eingescannten Bildern wurden mithilfe von Adobe Photoshop CS4 Extended, Version 11.0 (Adobe Systems, USA) drei Bereiche von jeweils 200  $\mu\text{m}$  Breite an definierten Stellen ausgewertet. Diese maßstabgerechten Bereiche wurden jeweils unter dem Corpus callosum, am unteren Rand der lateralen Ventrikel und am kaudalen Teil des medialen preoptischen Areales markiert. Die Hemisphären wurden zusätzlich optisch getrennt. Anschließend wurden alle vitalen Neurone in den Bereichen gezählt und durch die Bestimmung der ausgezählten Flächen mit AxioVision40

(V 4.8.2.0, Carl Zeiss, Jena) die Neuronenzahl pro Quadratmillimeter berechnet. Aus den Einzelwerten wurde der Mittelwert pro Quadratmillimeter gebildet und anhand dieses Wertes der Neuronenverlust von der ipsilateralen im Vergleich zur kontralateralen Hemisphäre in Prozent berechnet.

Für die Quantifizierung der *ASC-specks* wurden mithilfe von Adobe Photoshop die Hemisphären geteilt und alle *specks* in der ipsilateralen Hemisphäre manuell ausgezählt. Dazu wurde jeweils ein Schnitt von sechs Tieren pro Gruppe verwendet. Um zu überprüfen, ob die in den Schnitten sichtbaren Strukturen tatsächlich *ASC-specks* sein könnten, wurde ein Schnitt zusätzlich mithilfe eines konfokalen Mikroskops beurteilt. Die so entstandenen Bilder konnten die Identifikation von *ASC-specks* zusätzlich erhärten (s. Abb. 9).

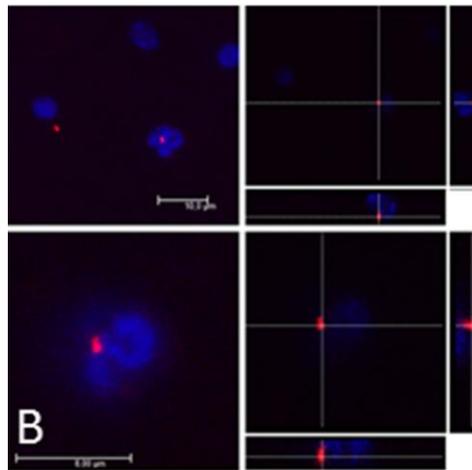


Abbildung 9: *ASC-speck* in einem Wildtypgehirn 48 h nach 45 min MCAO mit einem konfokalen Mikroskop aufgenommen (rot = ASC-Färbung, blau = DAPI).

## 2.8 FACS-Analyse (Durchflusszytometrie)

Für die FACS-Analyse wurden die Tiere nach dem ersten Infarktmodell (45 min Okklusion, 48 h Reperfusion) operiert. Nach 48 h fand eine Perfusion mit 50 ml PBS statt, darauf folgte die Gehirnentnahme. Die Hemisphären wurden geteilt, einzeln in einer Petrischale homogenisiert und in 20 ml Resuspensionspuffer in ein Falcon-Gefäß aufgenommen. Die gleiche Prozedur wurde mit einer Milz durchgeführt, um das FACS-Gerät mit den Milzzellen eichen zu können. Die Suspension wurde bei 1600 rpm für 10 min in einer auf 4 °C temperierten Zentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet am Boden des Falcons wurde in 6 ml 30 % Percoll (GE Healthcare Bio-Sciences, Uppsala) gelöst. In einen weiteren 15-ml-Falcon wurden 4 ml 45 %-Percoll-Lösung pipettiert und mit einer langen Kanüle 2 ml 70 %-Percoll-Lösung daruntergelegt. Auf diesen Gradienten wurde nun vorsichtig die 30 %-Percoll-Lösung mit der Hirnsuspension aufgeladen. Anschließend wurde der Falcon 20 min bei 2300 rpm bei 4 °C zentrifugiert. Das Myelin setzte sich als gut sichtbare Schicht oben auf der Lösung ab und wurde mit einer Pipette abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen, die sich an den beiden Grenzschichten innerhalb des Falcons befanden, mit einer Pipette abgesaugt. Die Zellsuspension wurde in einen 50-ml-Falcon überführt, mit FACS-Puffer aufgefüllt und erneut

10 min bei 1600 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde in 10 ml FACS-Puffer resuspendiert und erneut bei den gleichen Bedingungen 10 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand erneut verworfen und das Pellet in 1 ml FACS-Puffer gelöst.

Die Zelllösung wurde auf 3 ml mit FACS-Puffer in einem FACS-Falcon aufgefüllt und bei 1200 rpm 8 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen und das Pellet wurde mit 100 µl Primärantikörper (Antikörper s. Anhang, Tabelle 4) versehen, vermischt und für 15 min in einen auf 4 °C regulierten Kühlschrank gestellt. Anschließend wurden die FACS-Röhrchen erneut mit 3 ml FACS-Puffer aufgefüllt und zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und es wurden 100 µl von dem Sekundärantikörper auf das Pellet pipettiert und vermischt. Die Röhrchen wurden nun erneut für 15 min im Kühlschrank gelagert. Danach folgte ein letzter Waschgang mit 3 ml FACS-Puffer in der Zentrifuge. Nachdem der Überstand erneut verworfen wurde, erfolgte das Pipettieren der Probe durch einen Papierfilter. Zum Schluss wurden 200 µl FACS-Puffer aufgebracht und diese Lösung, nach einer Eichung durch die mitpräparierten Milzzellen, im FACS-Gerät gemessen.

## 2.9 Verblindung und Statistik

Alle Versuche wurden verblindet durchgeführt und die Verblindung wurde erst nach Abschluss der Experimente zur Auswertung aufgehoben.

Alle Graphen und statistischen Test wurden mit der GraphPad Prism 5 Software (Graph Pad Software, USA) durchgeführt. Die Infarkt volumina, das Gehirnödem und die Neuronenzahlen wurden nach einer Überprüfung der Werte auf Normalverteilung (D'Agostino and Pearson omnibus normality test) mit einem ungepaarten, beidseitigen T-Test mit Welch-Korrektur verglichen. Für den Vergleich der Neuro-Scores, der Zellzahlen aus der FACS-Analyse und der ASC-*specks* wurde ein beidseitiger Mann-Whitney-Test angewendet. Im zweiten Versuchsteil mit 15-minütiger MCAO wurden die Vergleiche der Neuro-Scores mit einem einseitigen Mann-Whitney-Test vorgenommen. Vergleiche mit einem p-Wert unter 0,05 wurden als signifikant angesehen.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Physiologische Parameter

**Gewichts- und Temperaturverlaufskurven von Sirt2<sup>-/-</sup>- und Wildtyptieren unterscheiden sich nicht signifikant.**

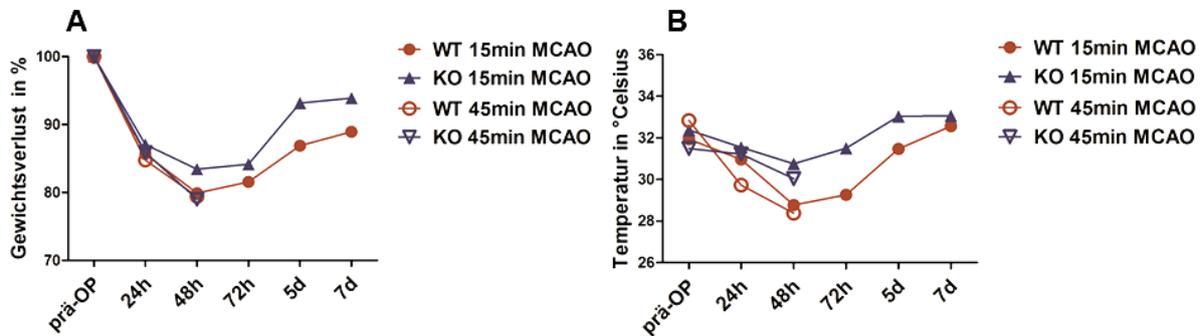


Abbildung 10: **Gewichts- und Temperaturverlaufskurven**, gezeigt werden der aus den Mittelwerten des Gewichts errechnete Gewichtsverlust in Prozent sowie die Mittelwerte der Temperaturen aller Tiere beider Gruppen im zeitlichen Verlauf.

Die Gewichts- und Temperaturmessungen der Tiere ergaben einen ähnlichen Verlauf während des Experimentes ohne signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen (s. Abb. 10 A/B). Es zeigte sich eine Tendenz zu einem stärkeren Temperaturabfall der Wildtyptiere bis 48 h nach Induktion der zerebralen Ischämie (s. Abb. 10 B). Insgesamt erfolgte in beiden Gruppen ein Gewichts- und Temperaturverlust nach der MCAO-Operation, der beginnend ab dem dritten Tag nach der Ischämie langsam wieder ausgeglichen werden konnte.

### 3.2 Sirt2-Expression im Schlaganfall

**Sirt2 wird vorwiegend im Myelin exprimiert und seine Isoformen zeigen nach zerebraler Ischämie eine unterschiedlich regulierte Expression.**

Der Western Blot nach 45 min zerebraler Ischämie zeigte eine differenzierte Regulation der Sirt2-Isoformen. Während die zytoplasmatische Isoform in Wildtyptieren nach dem Schlaganfall vermindert vorlag, wurde die längere v1-Isoform in der ipsi- und kontralateralen Hemisphäre im Vergleich zu unbehandelten Tieren (ohne MCAO) erhöht vorgefunden (ohne Abb.).

Um das Verteilungsmuster von Sirt2 nach zerebraler Ischämie beurteilen zu können, wurde eine Sirt2-Färbung durchgeführt. Im Wildtypier zeigte sich Sirt2 besonders in myelinhaltigen Strukturen verteilt über das gesamte Gehirn (s. Abb. 8). Im Infarktbereich leuchteten diese „Myelininseln“ intensiver als kontralateral. In den verschiedenen Doppelfärbungen zeigten sich eine deutliche Kolokalisation von Sirt2 mit dem Oligodendrozytenmarker CNP und eine schwache, inkonsistente Kolokalisation mit dem Makrophagenoberflächenprotein CD68. Sirt2 fand sich nicht in Zellen die mit GFAP (Astrozyten), Iba-1 (Mikrogliazellen) oder NeuN (Neurone) gefärbt wurden (ohne Abb.).

### 3.3 Neuro-Score

#### Sirt2-Depletion führt zu einem verbesserten neurologischen Outcome nach zerebraler Ischämie.

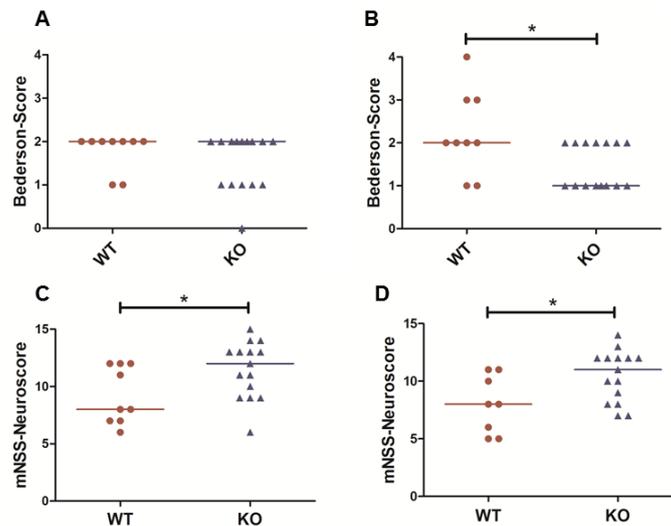


Abbildung 11: **Neuro-Score Infarktmodell 1:** Bederson-Score und Modified Neurological Severity-Score 24 und 48 h nach einer 45-minütigen Okklusion der A. cerebri media. Dargestellt wird der Median, Wildtyp n = 8, Sirt2<sup>-/-</sup> n = 15 (\* = p < 0,05, p (B) = 0,0428, p (C) = 0,0413, p (D) = 0,0341).

Im ersten Modell einer 45-minütigen Ischämie zeigten die Sirt2<sup>-/-</sup>-Tiere gegenüber den Wildtypieren 24 und 48 h nach der Reperfusion des Gefäßes einen signifikant besseren neurologischen Score im mNSS (s. Abb. 11 C/D). Im Bederson-Score, der eine etwas größere Einschätzung vornimmt, fand sich 48 h nach der Reperfusion ein signifikanter Unterschied zugunsten der Sirt2<sup>-/-</sup>-Mäuse (s. Abb. 11 A/B).

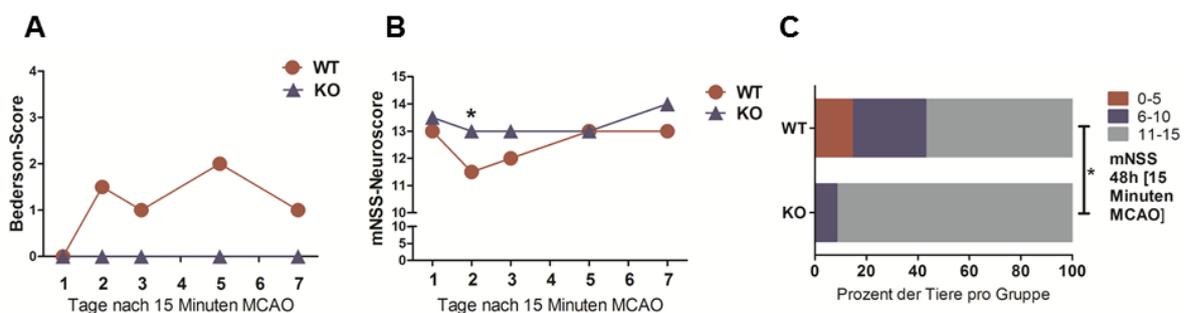


Abbildung 12: **Neuro-Score Infarktmodell 2:** Bederson-Score und mNSS bis zu sieben Tage nach einer subkortikalen zerebralen Ischämie von 15 min. A/B zeigen jeweils den Median. Wildtyp n = 14, Sirt2<sup>-/-</sup> n = 13 (\* = p < 0,05, p (B/C) = 0,0321).

Im milderen Infarktmodell (15 min MCAO) zeigte sich ein ähnliches Bild wie im vorherigen Versuch: Die Sirt2<sup>-/-</sup>-Gruppe befand sich zu jedem Zeitpunkt in der gleichen oder einer besseren neurologischen Verfassung als die Wildtypgruppe (s. Abb. 12 A/B). Dieser Trend blieb auch noch bis zu sieben Tagen nach der Induktion der zerebralen Ischämie erhalten (s. Abb. 12 A/B). 48 h nach der MCAO zeigten die Sirt2<sup>-/-</sup>-Mäuse signifikant weniger neurologische Defizite als die Wildtypiere im mNSS

(s. Abb. 12 B/C). Durch den Tod einiger Tiere im Verlauf des Versuches (5 Wildtyptiere, 3 Sirt2<sup>-/-</sup>-Tiere) ist das Ergebnis des mNSS gegen Ende etwas verzerrt, da tote Tiere in diesem Score, im Gegensatz zum Bederson-Score, nicht auftauchen. Im Bederson-Score ist der Unterschied zwischen den Gruppen im gesamten Verlauf nicht signifikant (48 h p = 0,0665, drei Tage p = 0,0584, fünf und sieben Tage p = 0,0748).

### 3.4 Infarkt volumetrie und Neuronenquantifizierung

#### **Infarktgrößen und Neuronenzahlen unterscheiden sich nicht signifikant zwischen Sirt2<sup>-/-</sup>- und Wildtyptieren nach MCAO.**

Bezüglich der Infarktvolumina fand sich 48 h nach einer 45-minütigen Okklusionszeit kein signifikanter Unterschied zwischen der Wildtyp- und der Sirt2<sup>-/-</sup>-Gruppe. Beim direkten Infarktvolumen bildete sich ein Trend zu größeren Infarkten bei den Wildtyptieren ab (Mittelwert Wildtypgruppe = 85,85 mm<sup>3</sup>, Mittelwert Sirt2<sup>-/-</sup>-Gruppe = 71,80 mm<sup>3</sup>), was sich im indirekten Infarktvolumen jedoch umkehrte. Auch die Größe des Hirnödems war zwischen den Gruppen nicht signifikant verschieden. Es zeigte sich eine Tendenz zu einer stärkeren Schwellung bei den Wildtyptieren (Mittelwert Wildtypgruppe = 31,69 mm<sup>3</sup>, Mittelwert Sirt2<sup>-/-</sup>-Gruppe = 12,87 mm<sup>3</sup>). Bei der Neuronenzählung ergab sich ein ähnliches Ergebnis wie bei der Infarktvolumetrie. Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Anzahl vitaler Neurone oder des prozentualen Neuronenverlustes auf der infarktgeschädigten Seite des Gehirns zwischen den Gruppen.

### 3.5 Zelluläre Veränderungen

#### 3.5.1 Astrozytenverteilung

##### **Die Verteilung von GFAP-gefärbten Astrozyten unterscheidet sich nicht zwischen den Gruppen.**

Ein Unterschied zwischen den Gruppen bezüglich des Musters der Astrozyteneinwanderung nach MCAO wurde nicht gefunden. Es lässt sich allerdings feststellen, dass 48 h nach MCAO in beiden Versuchsgruppen deutlich mehr aktive Astrozyten in der ipsilateralen als in der kontralateralen Hemisphäre zu finden sind. Sie sind vorwiegend im Randbereich des Infarktes (Penumbra) lokalisiert.

#### 3.5.2 Einwanderung von Entzündungszellen

**Es zeigen sich keine quantitativen Unterschiede bezüglich der Einwanderung von Mikrogliazellen, Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und T-Zellen zwischen den beiden Gruppen. Eine nicht weiter charakterisierte Population an doppelt-negativen T-Zellen (CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>-</sup>) macht den größten Anteil der einwandernden T-Zellen in beiden Gruppen aus.**

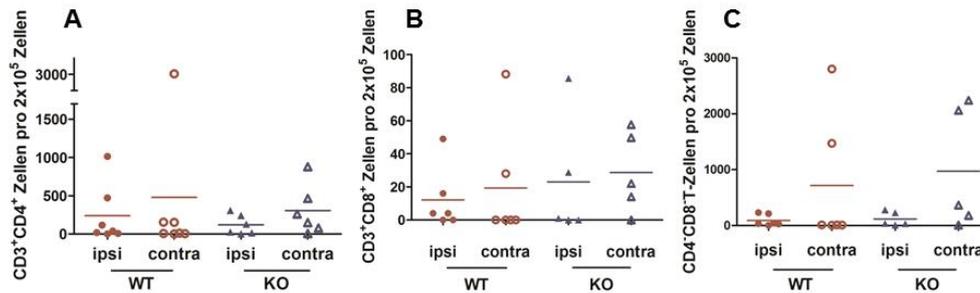


Abbildung 13: **Einwanderung von Entzündungszellen:** Darstellung der Anzahl eingewanderter CD4<sup>+</sup>-T-Zellen (A), CD8<sup>+</sup>-T-Zellen (B) und CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>-</sup>-T-Zellen (C). Wildtyp n = 7 (A), n = 6 (B/C), Sirt2<sup>-/-</sup> n = 6 (A), n = 5 (B/C). Gezeigt wird der Mittelwert.

Mithilfe einer FACS-Analyse wurde die Anzahl an einwandernden Entzündungszellen im Vergleich zwischen ipsi- und kontralateraler Hemisphäre beider Gruppen quantifiziert. Dafür wurde in sieben Wildtyp- und sechs Sirt2<sup>-/-</sup>-Tieren eine Okklusion der A. cerebri media über 45 min ausgelöst und die Gehirne für die Zellzahlbestimmung 48 h nach Reperfusion präpariert.

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen bezüglich der untersuchten Zellen. Die Aktivierung von Mikrogliazellen und die Einwanderung von Makrophagen fanden in beiden Gruppen im gleichen Maße statt. Die Einwanderung von neutrophilen Granulozyten zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen der ipsi- und kontralateralen Hemisphäre beider Gruppen (p = 0,0131). Es fand sich hier jedoch ebenfalls kein Unterschied zwischen den Gruppen.

Auch die Untersuchung der eingewanderten T-Zellen zeigte keinen Unterschied zwischen Wildtyp- und Sirt2<sup>-/-</sup>-Tieren (s. Abb. 13 A-C). Auffällig war aber die große Anzahl an CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>-</sup>-T-Zellen, die nicht weiter klassifiziert werden konnten (s. Abb. 13 C). In sechs Hemisphären von Wildtyp-Tieren wurden deshalb zusätzlich der  $\gamma\delta$ -T-Zellrezeptor sowie die  $\beta$ -Kette des T-Zellrezeptors gefärbt. Dies sollte helfen herauszufinden, zu welcher der beiden T-Zell-Rezeptorgruppen die doppelt negativen Zellen zählten. Es zeigte sich, dass Zellen mit beiden Rezeptortypen vorkamen, wobei der  $\alpha/\beta$ -T-Zellrezeptor etwas häufiger vorlag. Zusammengezählt entsprachen aber alle Zellen, die für den einen oder anderen Rezeptor positiv waren, bei weitem nicht der Anzahl der nachgewiesenen doppelt negativen T-Zellen. Zusätzlich wurde NK1.1 gefärbt um zu überprüfen, ob es sich bei den doppelt negativen T-Zellen um natürliche Killerzellen handeln könnte. Dies war nicht der Fall. Es lagen nur vereinzelt positive Zellen vor.

### 3.6 Inflammasomaktivierung

#### **Es findet sich kein Unterschied in der Anzahl von immunhistochemisch quantifizierten ASC-specks im Vergleich zwischen Sirt2<sup>-/-</sup>- und Wildtyp-Tieren 48 h nach MCAO.**

Die Zählung der ASC-specks zeigte keinen signifikanten Unterschied in der Aktivierung des ASC-Proteins und damit des NLRP3-Inflammasoms. Ein signifikanter Einfluss von Sirt2 auf die Inflammasomaktivierung ist damit im Schlaganfallmodell unwahrscheinlich. Der Verlust von Sirt2 hat hier we-

der zu einer Alteration der Anzahl von einwandernden Entzündungszellen, noch zu einer veränderten Aggregation von ASC-Protein geführt.

### 3.7 Mortalität

**Die Überlebenskurve zeigt einen Trend zu mehr überlebenden Tieren in der Sirt2<sup>-/-</sup>-Gruppe, der Unterschied ist nicht signifikant.**

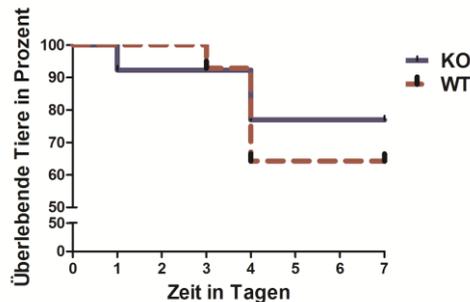


Abbildung 14: **Mortalitätskurve**, Darstellung der überlebenden Tiere in Prozent über die Zeit des Experimentes nach 15-minütiger zerebraler Ischämie und sieben Tage langer Beobachtung. Wildtyp n = 14, Sirt2<sup>-/-</sup> n = 13.

Die Überlebenskurve zeigt, dass in der Sirt2<sup>-/-</sup>-Gruppe nach sieben Tagen noch fast 80 % der Tiere lebten, während in der Wildtypgruppe nur 65 % der Mäuse die sieben Tage überlebt haben (s. Abb. 14). Der kritische Tag, an dem viele Tiere den Folgen der Ischämie erlagen, war der vierte postoperative Tag. Alle Tiere, die diesen Punkt passiert hatten, überlebten im Versuch die vollen sieben Tage.

## 4 Diskussion

Fasst man zusammen, so zeigten die hier vorgestellten Untersuchungen das vorrangig Myelin-assoziierte Verteilungsmuster von Sirt2 nach einem Schlaganfall in Mäusen. Eine Sirt2-Inhibition erwies sich als protektiv im Sinne eines verbesserten neurologischen Outcomes der Sirt2<sup>-/-</sup>-Tiere.

In einem MCAO-Modell mit dem Sirt2-Inhibitor AK-7 wurden keine Unterschiede bezüglich der Infarkt volumina der AK-7-behandelten Mäuse im Vergleich mit unbehandelten Tieren gesehen (Chen et al. 2015). Auch der Bederson-Neuro-Score war 24 h postoperativ nicht signifikant verschieden (Chen et al. 2015). In einem anderen Versuchsmodell der transienten Ischämie bei Mäusen (MCAO) wurde eine Neuroprotektion durch Sirt2-Inhibition im Schlaganfall gefunden (Xie et al. 2016). Hier zeigten die Sirt2<sup>-/-</sup>-Tiere signifikant kleinere Infarkte und einen besseren neurologischen Score nach dem Schlaganfallereignis (Xie et al. 2016). Diese Ergebnisse decken sich mit den hier vorgelegten. Auch in unseren Versuchen zeigten die Sirt2<sup>-/-</sup>-Tiere ein besseres neurologisches Outcome als die Wildtypvergleiche.

Diese Ergebnisse sprechen für einen protektiven Effekt der Sirt2-Inhibition im Schlaganfall. Wir konnten allerdings ebenso wie Chen et al. keine Unterschiede in der Größe der Infarktvolumina, Gehirnodeme oder Neuronenzahlen feststellen. Das bedeutet, dass der bessere Zustand der Sirt2<sup>-/-</sup>-Tiere in diesen Versuchen wahrscheinlich nicht von der Größe des Infarktes oder der Anzahl der erhaltenen Neurone abhängt (Chen et al. 2015).

Trotzdem ist es möglich, dass eine Sirt2-Inhibition auch zu einer Inhibition der Nekroptose im Verlauf des Schlaganfalles geführt hat (Narayan et al. 2012; Preyat et al. 2015). Dagegen sprechen die Daten von Newton et al., die einen solchen Effekt nicht reproduzieren konnten (Newton et al. 2014). Es ist bekannt, dass das Unterbinden von einer Form des Zelltodes den Zelluntergang oft nicht verhindern kann (Nicotera et al. 1999; Nikolettou et al. 2013). Es kommt dabei lediglich zum Untergang der Zelle durch eine andere Form des Zelltodes (Nicotera et al. 1999). Der Vergleich der Infarktvolumina kann keine Aussage darüber machen, durch welche Form des Zelltodes die jeweiligen Zellen untergegangen sind. Es wäre sinnvoll, hier weitere Experimente anzuschließen, die die zurzeit kontroverse Rolle von Sirt2 in Bezug auf unterschiedliche Formen des Zelltodes genauer charakterisieren.

Die Hypothese, dass Sirt2 über NF- $\kappa$ B Einfluss auf die postischämische Inflammationskaskade nehmen könnte, bestätigte sich nicht. Die Anzahl an einwandernden Entzündungszellen war in beiden Gruppen gleich. Auch die Inflammasomaktivierung blieb von der Sirt2-Depletion unbeeinflusst. Es stellt sich also die Frage, welcher Mechanismus für den besseren neurologischen Zustand der Tiere unter Sirt2-Depletion verantwortlich ist.

Während eines Schlaganfalls gehen neben Neuronen auch Oligodendrozyten zugrunde, was eine axonale Dysfunktion nach sich ziehen kann (Saab und Nave 2016). Das Verteilungsmuster, das Sirt2 in dieser Studie nach einem Schlaganfall in Wildtyptieren zeigte, war Myelin-assoziiert. Sirt2 wurde

sowohl im Myelin direkt als auch in den Oligodendrozyten nachgewiesen. Das spricht dafür, dass die Effekte der Sirt2-Inhibition auf einen Einfluss von Sirt2 auf das Myelin und darüber auf die Axone zurückgeführt werden könnte.

Diese Hypothese geht konform mit den Erkenntnissen von Werner et al., Southwood et al. und Beirowski et al., welche Sirt2 als Myelin- und Oligodendrozyten-assoziiert charakterisiert haben (Southwood et al. 2007; Werner et al. 2007; Beirowski et al. 2011). Werner et al. untersuchten im Tiermodell einer spastischen Paraplegie eine Form der axonalen Degeneration durch das Fehlen von Proteolipid-Protein (PLP) (Werner et al. 2007). Dabei verlieren die Axone die Möglichkeit des axonalen Transportes und degenerieren bei intakten Myelinscheiden (Werner et al. 2007). Bei PLP<sup>-/-</sup>-Mäusen fiel auf, dass diesen Tieren Sirt2 im Myelin fehlte, obwohl die gleiche Menge an Sirt2 mRNA wie in Wildtyp-Tieren vorhanden war (Werner et al. 2007). Werner et al. postulierten also den Sirt2-Transport ins Myelin als eine mögliche Funktion von PLP (Werner et al. 2007). Gleichzeitig ist das Fehlen von Sirt2 im Myelin eventuell einer der Gründe für die Degeneration von Axonen unter PLP-Verlust. Es ist möglich, dass Sirt2 im ZNS-Myelin wichtig ist, um die Axon-Instandhaltung durch die Oligodendrozyten zu gewährleisten (Werner et al. 2007; Werner et al. 2013).

Beirowski et al. untersuchten Sirt2 in Bezug auf die Myelinisierung durch Schwann-Zellen im peripheren Nervensystem (PNS) (Beirowski et al. 2011). Sie konnten Sirt2 dort als an der Myelinisierung beteiligtes Protein identifizieren (Beirowski et al. 2011). Es lag gleichzeitig mit für die Myelinisierung notwendigen Proteinen vermehrt vor (Beirowski et al. 2011). Bei Mäusen, in deren Schwann-Zellen Sirt2 depletiert wurde, fand sich eine verlangsamte und gestörte Myelinisierung der peripheren Nerven, die mit fortschreitendem Alter jedoch aufgeholt werden konnte (Beirowski et al. 2011). In diesen Experimenten wurde Par-3 als ein Deacetylierungsziel von Sirt2 entdeckt (Beirowski et al. 2011). Sirt2 nahm im Zusammenspiel mit Par-3 und der Kinase aPKC Einfluss auf den Myelinisierungsprozess der peripheren Nerven (Beirowski et al. 2011).

Die genaue Wirkweise, mit der eine Sirt2-Inhibition das Myelin und die Axone während einer zerebralen Ischämie schützen könnte, bleibt weiterhin unklar. Die Bedeutung der unterschiedlichen Isoformen von Sirt2, im Zusammenhang mit deren unterschiedlicher Regulation während der zerebralen Ischämie, ist ein möglicher Ansatzpunkt. Es wäre außerdem sinnvoll, Experimente mit Myelin-spezifischen Sirt2<sup>-/-</sup>-Tieren durchzuführen. Interessant wäre zu beobachten, ob eine Hemmung von Sirt2 *nur* im Myelin ebenfalls zu Verbesserungen des neurologischen Outcomes führen würde.

Alles in allem sprechen unsere Ergebnisse dafür, dass eine Sirt2-Hemmung bei der zerebralen Ischämie protektiv wirkt. Eine Sirt2-Inhibition sowie eine Sirt1-Induktion zeigten einen günstigen Einfluss auf das neurologische Outcome nach einem Schlaganfall (Hernández-Jiménez et al. 2013; Xie et al. 2016).

Das Übertragen der Ergebnisse aus den Tiermodellen auf den menschlichen Organismus ist jedoch leider nicht ohne weiteres möglich. Das Immunsystem, welches immer wieder als wichtiges Element im Verlauf der zerebralen Ischämie hervorgehoben wird, ist sehr komplex und bei Menschen und Mäusen verschieden (Dirnagl et al. 1999). Folglich können sich Eingriffe, die im Mausmodell neuroprotektive Vorteile bringen, im menschlichen Organismus anders darstellen (Dirnagl et al. 1999). Dies kann ein Grund dafür sein, warum bis heute wenig der experimentell beobachteten Therapieansätze auf den Menschen übertragbar waren (Dirnagl et al. 1999; O'Collins et al. 2006).

Weitere Versuche sind notwendig, um ein umfassenderes Verständnis der Pathophysiologie des Schlaganfalls zu erlangen, damit tierexperimentelle Erfolge in therapeutische Strategien für Menschen übersetzt werden können. Es bedarf folglich weiterer grundlagenwissenschaftlicher Studien, bevor über eine Anwendung von Sirt2-Inhibitoren im klinischen Alltag nachgedacht werden kann.

## 5 Anhang

### 5.1 Tabellen

Tabelle 3: **Primär- und Sekundärantikörper der immunhistochemischen Färbungen**

NeuN	Primär-AK	<i>anti-mouse</i>	1:500	MAB377 Merck Millipore, Darmstadt	Neurone
GFAP	Primär-AK	<i>anti-chicken</i>	1:1000	AB5541, Merck Millipore, Darmstadt	Astrozyten
ASC	Primär-AK	<i>anti-rabbit</i>	1:500	AG-25B-0006, Adipogen, Hamburg	ASC-specks
SIRT2	Primär-AK	<i>anti-rabbit</i>	1:500	ab67299, Abcam, Cambridge	Sirt2
Cy5	Sekundär-AK	<i>anti-mouse</i>	1:250	715-175-150, Jackson-ImmunoResearch, Ely	NeuN
FITC	Sekundär-AK	<i>anti-chicken</i>	1:250	703-095-155, Jackson-ImmunoResearch, Ely	GFAP
Cy3	Sekundär-AK	<i>anti-rabbit</i>	1:250	711-165-152, Jackson-ImmunoResearch, Ely	ASC/Sirt2

Tabelle 4: **Antikörper für die FACS-Analyse**

CD3e	Biotin	<i>anti-mouse</i>	Cat. 553060, BD BioSciences Pharmingen, Heidelberg
Streptavidin	PE/Cy5		Cat. 405205, BioLegend, San Diego
CD45.2	APC	<i>anti-mouse</i>	Cat. 109813, BioLegend, San Diego
CD11b	FITC	<i>anti-mouse/human</i>	Cat. 101205, BioLegend, San Diego
GR-1	PE Ly-6G and Ly-6C	<i>anti-mouse</i>	Cat. 553128, BD BioSciences Pharmingen, Heidelberg
CD4	APC/Cy7	<i>anti-mouse</i>	Cat. 100526, BioLegend, San Diego
CD8a	PE/Cy7	<i>anti-mouse</i>	Cat. 100722, BioLegend, San Diego
CD4	PE-eFlour 610	<i>anti-mouse</i>	61-0042-80, eBioScience, San Diego
TCR $\gamma/\delta$	PerCP/Cy5.5	<i>anti-mouse</i>	Cat. 118117, BioLegend, San Diego
TCR- $\beta$ -chain	Alexa Flour 700	<i>anti-mouse</i>	Cat. 109223, BioLegend, San Diego
NK-1.1	APC/Cy7	<i>anti-mouse</i>	Cat. 108723, BioLegend, San Diego

Tabelle 4: Erläuterung: CD45<sup>+</sup> + CD11b<sup>+</sup> = aktivierte Mikroglia/ Makrophagen, Gr-1<sup>+</sup> + CD11b<sup>+</sup> = neutrophile Granulozyten, CD4<sup>+</sup> + CD3<sup>+</sup> = CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, CD8<sup>+</sup> + CD3<sup>+</sup> = CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>-</sup> = doppelt negative T-Zellen, TCR $\gamma/\delta$ <sup>+</sup> = T-Zellen mit  $\gamma/\delta$ -T-Zell-Rezeptor, TCR- $\beta$ -chain<sup>+</sup> = T-Zellen mit  $\alpha/\beta$ -T-Zell-Rezeptor, NK-1.1<sup>+</sup> = natürliche Killerzellen

## 6 Literaturverzeichnis

- Adams HP, Biller J (2015): Classification of subtypes of ischemic stroke: history of the trial of org 10172 in acute stroke treatment classification. *Stroke* 46, e114–e117
- Adams HP, Bendixen BH, Kappelle LJ, Biller J, Love BB, Gordon DL, Marsh EE 3rd (1993): Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of org 10172 in acute stroke treatment. *Stroke* 24, 35–41
- Agarwal B, Baur JA (2011): Resveratrol and life extension. *Ann N Y Acad Sci* 1215, 138–143
- Ansari S, Azari H, McConnell DJ, Afzal A, Mocco J (2011): Intraluminal middle cerebral artery occlusion (MCAO) model for ischemic stroke with laser doppler flowmetry guidance in mice. *J Vis Exp* 8, 2879
- Asadi H, Dowling R, Yan B, Wong S, Mitchell P (2015): Advances in endovascular treatment of acute ischaemic stroke: Advances in treatment of stroke. *Intern Med J* 45, 798–805
- Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, Nishimura MC, Davis RL, Bartkowski H (1986): Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke* 17, 472–476
- Beirowski B, Gustin J, Armour SM, Yamamoto H, Viader A, North BJ, Michan S, Baloh RH, Golden JP, Schmidt RE, et al. (2011): Sir-two-homolog 2 (Sirt2) modulates peripheral myelination through polarity protein Par-3/atypical protein kinase C (aPKC) signaling. *Proc Natl Acad Sci* 108, e952–e961
- Belayev L, Busto R, Zhao W, Fernandez G, Ginsberg MD (1999): Middle cerebral artery occlusion in the mouse by intraluminal suture coated with poly-L-lysine: neurological and histological validation. *Brain Res* 833, 181–190
- Bluhmki E, Chamorro Á, Dávalos A, Machnig T, Sauce C, Wahlgren N, Wardlaw J, Hacke W (2009): Stroke treatment with alteplase given 3.0 – 4.5 h after onset of acute ischaemic stroke (ECASS III): additional outcomes and subgroup analysis of a randomised controlled trial. *Lancet Neurol* 8, 1095–1102
- Bobrowska A, Donmez G, Weiss A, Guarente L, Bates G (2012): SIRT2 ablation has no effect on tubulin acetylation in brain, cholesterol biosynthesis or the progression of Huntington’s disease phenotypes in vivo. *PLoS One* 7, e34805
- Chen X, Wales P, Quinti L, Zuo F, Moniot S, Herisson F, Rauf NA, Wang H, Silverman RB, Ayata C, et al. (2015): The sirtuin-2 inhibitor AK7 is neuroprotective in models of Parkinson’s disease but not amyotrophic lateral sclerosis and cerebral ischemia. *PLoS One* 10, e0116919
- Chopra V, Quinti L, Kim J, Vollor L, Narayanan KL, Edgerly C, Cipicchio PM, Lauver MA, Choi SH, Silverman RB, et al. (2012): The sirtuin 2 inhibitor AK-7 is neuroprotective in Huntington’s disease mouse models. *Cell Rep* 2, 1492–1497

- Degterev A, Huang Z, Boyce M, Li Y, Jagtap P, Mizushima N, Cuny GD, Mitchison TJ, Moskowitz MA, Yuan J (2005): Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nat Chem Biol* 1, 112–119
- DGN-Leitlinie 2012 für Diagnostik und Therapie in der Neurologie. Diener, o. O. 2012.  
Kurzform: (DGN-Leitlinie Diagnostik und Therapie in der Neurologie 2012)
- DGN- Leitlinie 2015 für Diagnostik und Therapie in der Neurologie: Akuttherapie des ischämischen Schlaganfalls – Ergänzung 2015. Ringleb, o. O. 2015.  
Kurzform: (DGN-Leitlinie Akuttherapie des ischämischen Schlaganfalls - Ergänzung 2015)
- Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA (1999): Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* 22, 391–397
- Elliott EI, Sutterwala FS (2015): Initiation and perpetuation of NLRP3 inflammasome activation and assembly. *Immunol Rev* 265, 35–52
- Engel O, Kolodziej S, Dirnagl U, Prinz V (2011): Modeling stroke in mice - middle cerebral artery occlusion with the filament model. *J Vis Exp* 6, 2423
- Fisher M, Garcia JH (1996): Evolving stroke and the ischemic penumbra. *Neurology* 47, 884–888
- Floyd RA (1999): Neuroinflammatory processes are important in neurodegenerative diseases: an hypothesis to explain the increased formation of reactive oxygen and nitrogen species as major factors involved in neurodegenerative disease development. *Free Radic Biol Med* 26, 1346–1355
- Floyd RA, Hensley K (2002): Oxidative stress in brain aging: implications for therapeutics of neurodegenerative diseases. *Neurobiol Aging* 23, 795–807
- Franklin BS, Bossaller L, De Nardo D, Ratter JM, Stutz A, Engels G, Brenker C, Nordhoff M, Mirandola SR, Al-Amoudi A, et al. (2014): The adaptor ASC has extracellular and „prionoid“ activities that propagate inflammation. *Nat Immunol* 15, 727–737
- Freeman LC, Ting JP (2016): The pathogenic role of the inflammasome in neurodegenerative diseases. *J Neurochem* 136, 29–38
- Garcia JH, Wagner S, Liu KF, Hu XJ (1995): Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke* 26, 627–635
- Grau AJ, Weimar C, Buggle F, Heinrich A, Goertler M, Neumaier S, Glahn J, Brandt T, Hacke W, Diener HC (2001): Risk factors, outcome, and treatment in subtypes of ischemic stroke: the German stroke data bank. *Stroke* 32, 2559–2566
- Hacke W, Kaste M, Bluhmki E, Brozman M, Dávalos A, Guidetti D, Larrue V, Lees KR, Medeghri Z, Machnig T, et al. (2008): Thrombolysis with alteplase 3 to 4.5 hours after acute ischemic stroke. *N Engl J Med* 359, 1317–29

- Hara H, Huang PL, Panahian N, Fishman MC, Moskowitz MA (1996): Reduced brain edema and infarction volume in mice lacking the neuronal isoform of nitric oxide synthase after transient MCA occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 16, 605–611
- Harhausen D, Khojasteh U, Stahel PF, Morgan BP, Nietfeld W, Dirnagl U, Trendelenburg G (2010): Membrane attack complex inhibitor CD59a protects against focal cerebral ischemia in mice. *J Neuroinflammation* 7, 15
- Hernández-Jiménez M, Hurtado O, Cuartero MI, Ballesteros I, Moraga A, Pradillo JM, McBurney MW, Lizasoain I, Moro MA (2013): Silent information regulator 1 protects the brain against cerebral ischemic damage. *Stroke* 44, 2333–2337
- Hossmann KA (2008): Cerebral ischemia: models, methods and outcomes. *Neuropharmacology* 55, 257–270
- Hsu CP, Zhai P, Yamamoto T, Maejima Y, Matsushima S, Hariharan N, Shao D, Takagi H, Oka S, Sadoshima J (2010): Silent information regulator 1 protects the heart from ischemia/reperfusion. *Circulation* 122, 2170–2182
- Hua F, Ma J, Ha T, Kelley JL, Kao RL, Schweitzer JB, Kalbfleisch JH, Williams DL, Li C (2009): Differential roles of TLR2 and TLR4 in acute focal cerebral ischemia/reperfusion injury in mice. *Brain Res* 1262, 100–108
- Hurtado O, Hernández-Jiménez M, Zarruk JG, Cuartero MI, Ballesteros I, Camarero G, Moraga A, Pradillo JM, Moro MA, Lizasoain I (2013): Citicoline (CDP-choline) increases Sirtuin1 expression concomitant to neuroprotection in experimental stroke. *J Neurochem* 126, 819–826
- Iadecola C, Anrather J (2011): The immunology of stroke: from mechanisms to translation. *Nat Med* 17, 796–808
- Indredavik B, Bakke F, Solberg R, Rokseth R, Haaheim LL, Holme I (1991): Benefit of a stroke unit: a randomized controlled trial. *Stroke* 22, 1026–1031
- Kaeberlein M, McVey M, Guarente L (1999): The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms. *Genes Dev* 13, 2570–2580
- Kakefuda K, Fujita Y, Oyagi A, Hyakkoku K, Kojima T, Umemura K, Tsuruma K, Shimazawa M, Ito M, Nozawa Y, et al. (2009): Sirtuin 1 overexpression mice show a reference memory deficit, but not neuroprotection. *Biochem Biophys Res Commun* 387, 784–788
- Leist M, Nicotera P (1998): Apoptosis, excitotoxicity, and neuropathology. *Exp Cell Res* 239, 183–201
- Leist M, Single B, Castoldi AF, Kühnle S, Nicotera P (1997): Intracellular adenosine triphosphate (ATP) concentration: a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *J Exp Med* 185, 1481–1486

- Leist M, Single B, Naumann H, Fava E, Simon B, Kühnle S, Nicotera P (1999): Inhibition of mitochondrial ATP generation by nitric oxide switches apoptosis to necrosis. *Exp Cell Res* 249, 396–403
- Leitlinie Neurologie s. DGN-Leitlinie 2012
- Leitlinie Neurologie - Ergänzung 2015 s. DGN-Leitlinie 2015
- Li W, Zhang B, Tang J, Cao Q, Wu Y, Wu C, Guo J, Ling EA, Liang F (2007): Sirtuin 2, a mammalian homolog of yeast silent information regulator-2 longevity regulator, is an oligodendroglial protein that decelerates cell differentiation through deacetylating alpha-tubulin. *J Neurosci* 27, 2606–2616
- Li Y, Chopp M, Chen J, Wang L, Gautam SC, Xu YX, Zhang Z (2000): Intrastriatal transplantation of bone marrow nonhematopoietic cells improves functional recovery after stroke in adult mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 20, 1311–1319
- Luengo-Fernandez R, Paul NL, Gray AM, Pendlebury ST, Bull LM, Welch SJ, Cuthbertson FC, Rothwell PM (2013): Population-based study of disability and institutionalization after transient ischemic attack and stroke: 10-year results of the Oxford Vascular Study. *Stroke* 44, 2854–2861
- Masuhr KF, Masuhr F, Neumann M (Hrsg): Durchblutungsstörungen des Gehirns und Rückenmarks. In: *Neurologie (Duale Reihe)*. 7., vollst. überarb. und erw. Auflage; Thieme, Stuttgart 2013, 380-397
- Maxwell MM, Tomkinson EM, Nobles J, Wizeman JW, Amore AM, Quinti L, Chopra V, Hersch SM, Kazantsev AG (2011): The Sirtuin 2 microtubule deacetylase is an abundant neuronal protein that accumulates in the aging CNS. *Hum Mol Genet* 20, 3986–3996
- Meisel C, Schwab JM, Prass K, Meisel A, Dirnagl U (2005): Central nervous system injury-induced immune deficiency syndrome. *Nat Rev Neurosci* 6, 775–786
- Meretoja A, Strbian D, Mustanoja S, Tatlisumak T, Lindberg PJ, Kaste M (2012): Reducing in-hospital delay to 20 minutes in stroke thrombolysis. *Neurology* 79, 306–313
- Meretoja A, Weir L, Ugalde M, Yassi N, Yan B, Hand P, Truesdale M, Davis SM, Campbell BC (2013): Helsinki model cut stroke thrombolysis delays to 25 minutes in Melbourne in only 4 months. *Neurology* 81, 1071–1076
- Misawa T, Takahama M, Kozaki T, Lee H, Zou J, Saitoh T, Akira S (2013): Microtubule-driven spatial arrangement of mitochondria promotes activation of the NLRP3 inflammasome. *Nat Immunol* 14, 454–460
- Morris KC, Lin HW, Thompson JW, Perez-Pinzon MA (2011): Pathways for ischemic cytoprotection: role of sirtuins in caloric restriction, resveratrol, and ischemic preconditioning. *J Cereb Blood Flow Metab* 31, 1003–1019
- Mortimer AM, Bradley MD, Renowden SA (2013): Endovascular therapy in hyperacute ischaemic stroke: history and current status. *Interv Neuroradiol* 19, 506–518

- Mukherjee D, Patil CG (2011): Epidemiology and the global burden of stroke. *World Neurosurg* 76, 85–90
- Narayan N, Lee IH, Borenstein R, Sun J, Wong R, Tong G, Fergusson MM, Liu J, Rovira II, Cheng HL, et al. (2012): The NAD-dependent deacetylase SIRT2 is required for programmed necrosis. *Nature* 492, 199–204
- Newton K, Hildebrand JM, Shen Z, Rodriguez D, Alvarez-Diaz S, Petersen S, Shah S, Dugger DL, Huang C, Auwerx J, et al. (2014): Is SIRT2 required for necroptosis? *Nature* 506, E4–E6
- Nicotera P, Leist M, Ferrando-May E (1999): Apoptosis and necrosis: different execution of the same death. In: Brown GC, Nicholls DG, Cooper CE (Hrsg.): *Mitochondria and Cell Death*. Biochemical Society Symposia, Band 66; Princeton University Press, Princeton 1999, 69–73
- Nicotera P, Leist M, Fava E, Berliocchi L, Volbracht C (2000): Energy requirement for caspase activation and neuronal cell death. *Brain Pathol* 10, 276–282
- Nikoletopoulou V, Markaki M, Palikaras K, Tavernarakis N (2013): Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochim Biophys Acta* 1833, 3448–3459
- North BJ, Marshall BL, Borra MT, Denu JM, Verdin E (2003): The human Sir2 ortholog, SIRT2, is an NAD<sup>+</sup>-dependent tubulin deacetylase. *Mol Cell* 11, 437–444
- O’Brien MD (1979): Ischemic cerebral edema. A review. *Stroke* 10, 623–628
- O’Collins VE, Macleod MR, Donnan GA, Horky LL, van der Worp BH, Howells DW (2006): 1,026 Experimental treatments in acute stroke. *Ann Neurol* 59, 467–477
- Pais TF, Szegő ÉM, Marques O, Miller-Fleming L, Antas P, Guerreiro P, de Oliveira RM, Kasapoglu B, Outeiro TF (2013): The NAD-dependent deacetylase sirtuin 2 is a suppressor of microglial activation and brain inflammation. *EMBO J* 32, 2603–2616
- Prass K, Meisel C, Höflich C, Braun J, Halle E, Wolf T, Ruscher K, Victorov IV, Priller J, Dirnagl U, et al. (2003): Stroke-induced immunodeficiency promotes spontaneous bacterial infections and is mediated by sympathetic activation reversal by poststroke T helper cell type 1–like immunostimulation. *J Exp Med* 198, 725–736
- Preyat N, Rossi M, Kers J, Chen L, Bertin J, Gough PJ, Le Moine A, Rongvaux A, Van Gool F, Leo O (2016): Intracellular nicotinamide adenine dinucleotide promotes TNF-induced necroptosis in a sirtuin-dependent manner. *Cell Death Differ* 23, 29–40
- Rodrigues FB, Neves JB, Caldeira D, Ferro JM, Ferreira JJ, Costa J (2016): Endovascular treatment versus medical care alone for ischaemic stroke: systematic review and meta-analysis. *BMJ* 353, 1754
- Rogina B, Helfand SL (2004): Sir2 mediates longevity in the fly through a pathway related to calorie restriction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 15998–16003

- Rothgiesser KM, Erener S, Waibel S, Lüscher B, Hottiger MO (2010): SIRT2 regulates NF- $\kappa$ B-dependent gene expression through deacetylation of p65 Lys310. *J Cell Sci* 123, 4251–4258
- Rothwell N, Allan S, Toulmond S (1997): The role of interleukin 1 in acute neurodegeneration and stroke: pathophysiological and therapeutic implications. *J Clin Invest* 100, 2648–2652
- Saab AS, Nave KA (2016): Neuroscience: A mechanism for myelin injury. *Nature* 529, 474–475
- Schmeisser K, Mansfeld J, Kuhl D, Weimer S, Priebe S, Heiland I, Birringer M, Groth M, Segref A, Kanfi Y, et al. (2013): Role of sirtuins in lifespan regulation is linked to methylation of nicotinamide. *Nat Chem Biol* 9, 693–700
- Southwood CM, Peppi M, Dryden S, Tainsky MA, Gow A (2007): Microtubule deacetylases, Sirt2 and HDAC6, in the nervous system. *Neurochem Res* 32, 187–195
- Spires-Jones TL, Fox LM, Rozkalne A, Pitstick R, Carlson GA, Kazantsev AG (2012): Inhibition of Sirtuin 2 with sulfobenzoic acid derivative AK1 is non-toxic and potentially neuroprotective in a mouse model of frontotemporal dementia. *Front Pharmacol* 3, 42
- Strbian D, Soenne L, Sairanen T, Happola O, Lindsberg PJ, Tatlisumak T, Kaste M (2010): Ultraearly thrombolysis in acute ischemic stroke is associated with better outcome and lower mortality. *Stroke* 41, 712–716
- Stroke Unit Trialists' Collaboration (2013): Organised inpatient (stroke unit) care for stroke. *Cochrane Database of Syst Rev* 9, CD000197
- Trendelenburg G (2008): Acute neurodegeneration and the inflammasome: central processor for danger signals and the inflammatory response? *J Cereb Blood Flow Metab* 28, 867–881
- Trendelenburg G (2014): Molecular regulation of cell fate in cerebral ischemia: role of the inflammasome and connected pathways. *J Cereb Blood Flow Metab* 34, 1857–1867
- Voelter-Mahlknecht S, Ho A, Mahlknecht, U (2005): FISH-mapping and genomic organization of the NAD-dependent histone deacetylase gene, Sirtuin 2 (Sirt2). *Int J Oncol* 5, 1187–1196
- Wakita H, Tomimoto H, Akiguchi I, Ohnishi K, Nakamura S, Kimura J (1992): Regional accumulation of amyloid beta/A4 protein precursor in the gerbil brain following transient cerebral ischemia. *Neurosci Lett* 146, 135–138
- Wang X, Guan Q, Wang M, Yang L, Bai J, Yan Z, Zhang Y, Liu Z (2015): Aging-related rotenone-induced neurochemical and behavioral deficits: role of SIRT2 and redox imbalance, and neuroprotection by AK-7. *Drug Des Devel Ther* 9, 2553–2563
- Werner HB, Kuhlmann K, Shen S, Uecker M, Schardt A, Dimova K, Orfaniotou F, Dhaunchak A, Brinkmann BG, Möbius W, et al. (2007): Proteolipid protein is required for transport of sirtuin 2 into CNS myelin. *J Neurosci* 27, 7717–7730

- Werner HB, Krämer-Albers EM, Strenzke N, Saher G, Tenzer S, Ohno-Iwashita Y, De Monasterio-Schrader P, Möbius W, Moser T, Griffiths IR, et al. (2013): A critical role for the cholesterol-associated proteolipids PLP and M6B in myelination of the central nervous system. *Glia* 61, 567–586
- Wolf PA, D’Agostino RB, O’Neal MA, Sytkowski P, Kase CS, Belanger AJ, Kannel WB (1992): Secular trends in stroke incidence and mortality. The Framingham Study. *Stroke* 23, 1551–1555
- Xie XQ, Zhang P, Tian B, Chen XQ (2017): Downregulation of NAD-Dependent deacetylase SIRT2 protects mouse brain against ischemic stroke. *Mol Neurobiol* 54, 7251-7261

Journal of Cerebral Bloodflow and Metabolism, Dezember 2015 Band 35(12), Seite 2080-2088. doi: 10.1038/jcbfm.2015.178.

## Knockout of silent information regulator 2 (SIRT2) preserves neurological function after experimental stroke in mice.

Krey L, Lühder F, Kusch K, Czech-Zechmeister B, Könnecke B, Fleming Outeiro T, Trendelenburg G

## ORIGINAL ARTICLE

## Knockout of silent information regulator 2 (SIRT2) preserves neurological function after experimental stroke in mice

Lea Krey<sup>1</sup>, Fred Lühder<sup>2</sup>, Kathrin Kusch<sup>3</sup>, Bozena Czech-Zechmeister<sup>1</sup>, Birte Könnecke<sup>1</sup>, Tiago Fleming Outeiro<sup>4</sup> and George Trendelenburg<sup>1</sup>

Sirtuin-2 (Sirt2) is a member of the NAD<sup>+</sup>-dependent protein deacetylase family. Various members of the sirtuin class have been found to be involved in processes related to longevity, regulation of inflammation, and neuroprotection. Induction of Sirt2 mRNA was found in the whole hemisphere after experimental stroke in a recent screening approach. Moreover, Sirt2 protein is highly expressed in myelin-rich brain regions after stroke. To examine the effects of Sirt2 on ischemic stroke, we induced transient focal cerebral ischemia in adult male Sirt2-knockout and wild-type mice. Two stroke models with different occlusion times were applied: a severe ischemia (45 minutes of middle cerebral artery occlusion (MCAO)) and a mild one (15 minutes of MCAO), which was used to focus on subcortical infarcts. Neurological deficit was determined at 48 hours after 45 minutes of MCAO, and up to 7 days after induction of 15 minutes of cerebral ischemia. In contrast to recent data on Sirt1, Sirt2<sup>-/-</sup> mice showed less neurological deficits in both models of experimental stroke, with the strongest manifestation after 48 hours of reperfusion. However, we did not observe a significant difference of stroke volumes or inflammatory cell count between Sirt2-deficient and wild-type mice. Thus we postulate that Sirt2 mediates myelin-dependent neuronal dysfunction during the early phase after ischemic stroke.

*Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* (2015) **35**, 2080–2088; doi:10.1038/jcbfm.2015.178; published online 29 July 2015

**Keywords:** cerebral ischemia; inflammasome; inflammation; sirtuin; stroke

## INTRODUCTION

Acetylation is an important posttranslational modification of cells to respond to different environmental challenges: acetylation of tubulin has been found to increase the pro-inflammatory activity in response to metabolic stress<sup>1</sup> and the degree of histone acetylation determines the neuronal resistance against ischemic injury.<sup>2</sup> Both sirtuin-2 (Sirt2) and sirtuin-1 (Sirt1) belong to the class III histone deacetylase family. These deacetylases require NAD<sup>+</sup> as a co-substrate, in contrast to class I and II histone deacetylases.<sup>3</sup> The sirtuins have been found to have an important role in cell death, aging, and inflammation.<sup>4–6</sup> Thus they are key factors in the pathology of multiple major age-dependent neurological diseases.<sup>7</sup>

There are few data available on sirtuin signaling in ischemic injury.<sup>3</sup> The sirtuin member Sirt1 has recently been shown to protect against ischemic damage: Sirt1<sup>-/-</sup> mice displayed larger stroke volumes in a murine model of permanent stroke<sup>5</sup> and had increased damage in a model of myocardial ischemia.<sup>8</sup> However, transgenic mice that overexpress Sirt1 in neurons were not protected 1 day after induction of transient cerebral ischemia.<sup>9</sup>

In contrast to Sirt1, there is a recent debate on whether Sirt2 mediates ischemic injury,<sup>10</sup> and there is no information available about the role of Sirt2 in ischemic stroke *in vivo*. According to the existing data on sirtuins, a protective effect of Sirt2 in stroke could be postulated as well as the opposite effect.

Sirt2 directly impacts inflammation by deacetylating and thus inactivating the p65 subunit of nuclear factor- $\kappa$ B, limiting the expression of proinflammatory genes.<sup>6,11</sup> It was also postulated that Sirt2 mediates the protective innate immune response caused by caloric restriction or metabolic stress,<sup>4,11</sup> and Sirt2 has been shown to inhibit inflammasome-mediated inflammation in response to reactive oxygen species (ROS).<sup>1,12</sup> However, it was demonstrated that Sirt2 increases ROS levels<sup>13</sup> and mediates oxidative stress-induced apoptosis of PC12 cells *in vitro*.<sup>14</sup> Moreover, there is a current discussion on whether Sirt2 mediates necroptotic cell death in ischemic myocardial injury.<sup>10</sup>

As we observed a significant mRNA induction of several sirtuin family members during cerebral ischemia in a recent screening approach, we wanted to define the functional role of Sirt2 in stroke. Thus two different standard stroke models were applied in Sirt2<sup>-/-</sup> and wild-type mice. Our experiments revealed that Sirt2 protein is mainly expressed in the myelin-rich regions of the ischemic hemisphere in oligodendrocytes, that different Sirt2 protein isoforms are differentially regulated after ischemia, and that Sirt2<sup>-/-</sup> mice have significantly less neurological impairments after stroke when compared with wild-type animals. As we did not observe a significant alteration of the stroke volumes or number of inflammatory cells in either strain, we postulate a mainly myelin-dependent effect of Sirt2 inhibition.

<sup>1</sup>Department of Neurology, University Medical Center Göttingen, Göttingen, Germany; <sup>2</sup>Department of Neuroimmunology, Institute for Multiple Sclerosis Research, University Medical Center Göttingen, Göttingen, Germany; <sup>3</sup>Department of Neurogenetics, Max Planck Institute of Experimental Medicine, Göttingen, Germany and <sup>4</sup>Center for Nanoscale Microscopy and Molecular Physiology of the Brain, Department of Neurodegeneration and Restorative Research, University Medical Center Göttingen, Göttingen, Germany. Correspondence: Dr G Trendelenburg, Department of Neurology, University Medical Center Göttingen, Robert-Koch Street 40, Göttingen 37075, Germany. E-mail: george.trendelenburg@med.uni-goettingen.de

This work was supported by Niedersachsen-Research Network on Neuroinfectiology (N-RENNT) of the Ministry of Science and Culture of Lower Saxony and Deutsche Forschungsgemeinschaft SFB-TRR43 TP B11 to FL, Georg-August-University Göttingen Foundation to GT, and ERC grant 'AxoGlia' to KK.

Received 23 February 2015; revised 24 June 2015; accepted 25 June 2015; published online 29 July 2015

## MATERIALS AND METHODS

### Ethics Statement

All animal handling and surgery were performed in accordance with the Guidelines for the Use of Animals in Neuroscience Research (Society for Neuroscience) and according to institutional and national guidelines. Experiments were written in accordance with the ARRIVE guidelines. All experiments were approved by the local institutional Animal Care Committee, LaVeS (No.33.12-42502-04-12/849).

### Animals

Adult 8-to-11-week-old male *Sirt2*<sup>-/-</sup> mice (NKI, Amsterdam, The Netherlands)<sup>6</sup> had been backcrossed to the original C57Bl/6N background for >10 generations. Age-matched male 8-to-11-week-old wild-type animals from the same background strain (C57Bl/6N) were bred under the same conditions in the same facility and were used as controls in all experiments. The initial body weight of the control mice was 24.3 ± 4.0 compared with 26.8 ± 7.8 g in *Sirt2*<sup>-/-</sup> mice. Mice were housed under diurnal lighting conditions and allowed access to food and water *ad libitum*. Mice that died within 6 hours after the middle cerebral artery occlusion (MCAO) procedure or lost >20% of their body weight within 48 hours were excluded from the experiments. All experiments were performed in a randomized manner, and surgery, stroke volume determination, cell counting, and fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis were all performed by investigators masked to the genotypes.

### Induction of Focal Cerebral Ischemia

MCAO was induced by inserting a silicone-coated filament (6-0 MCAO suture, Doccol Corporation, Sharon, MA, USA) into the internal carotid artery as described previously.<sup>15,16</sup> The mice received 0.1 mg/kg body weight buprenorphine as analgesia and were anesthetized with 4% isoflurane for induction and maintained with 2% isoflurane at an oxygen flow of 0.8 L/min via a face mask. After occlusion times of 60 minutes (for gene expression analysis), 45 minutes (for evaluation of neurological deficit and stroke volume), and 15 minutes (mild infarct model), the animals were re-anesthetized and the filament was removed to permit reperfusion. Efficiency of occlusion and reperfusion of the middle cerebral artery was monitored by Laser Doppler flowmetry (Perimed, Stockholm, Sweden) in a selected group of animals (*n* = 12) before starting with the main project. Body temperature was maintained between 37.0°C and 37.5°C with a heating pad during surgery. All mice received 1 ml of NaCl subcutaneously after the procedure and were allowed to awake in an animal recovery chamber (32°C) for 30 minutes. There was no significant difference in the mean body weight or temperature between the different groups.

### Analysis of Gene Expression

Mice were deeply anesthetized and decapitated at specified time points of reperfusion. The brains were removed rapidly from the skull. RNA derived from the separated hemispheres, pooled from six wild-type C57Bl/6 mice (after MCAO or sham treatment) at each time point, were used for gene expression analysis using Affymetrix GeneChip Mouse Expression Set 430 (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) as described previously.<sup>15,16</sup> To determine the induction of specific mRNAs in the ischemic hemispheres of MCAO-treated animals, expression values were compared with those derived from sham-operated animals. Commercially available Affymetrix software was applied for data analysis of the Affymetrix GeneChips. Fold change (FC) was calculated using the following formula:  $FC = 2^m$ , for  $m \geq 0$ , and  $FC = (-1) \times 2^{-m}$  for  $m < 0$ , with  $m = \log_2(\text{ratio})$ .

### Neuroscore

Two different scores were used to assess the neurological deficit of the mice after the induction of stroke. The neurological dysfunction was determined using a neurological score described by Bederson *et al*<sup>17</sup> and modified by Hara *et al*<sup>18</sup>; this score rates the mouse from 0 (no deficit), via 1 (failure to extend forepaw), 2 (circling to contralateral side), 3 (loss of postural reflex) to 4 (death). Additionally, a modified Neurological Severity Score (mNSS) was applied.<sup>19,20</sup> It contains three motor tests (exploration of a new cage, climbing, and balance) and two sensory tests (body proprioception and pinna reflex), which are each evaluated by a score between 3 and 1, where 3 equals no deficit and 1 severe deficit. The scores

are added up to a score between 5 (severe impairment) and 15 (no neurological impairment).

### Perfusion and TTC (2,3,5-triphenyl-tetrazolium-chloride) Staining

Forty-eight hours after reperfusion, the animals were deeply anesthetized with 5% of isoflurane at an oxygen flow of 0.8 L/min, and their thorax was opened to expose the heart. A cannula connected to a perfusion pump was introduced into the left ventricle, and the right atrial appendage was opened. Animals were perfused with 50 ml of phosphate-buffered saline (PBS) with a rate of 10 mL/min. Brains were isolated and cut into 2 mm coronal sections. For the stroke volumetry, a TTC staining was performed to stain areas with vital cells. The 2-mm sections were incubated in a 2% TTC solution for 5 minutes from each side. The staining process was stopped by transferring the brain slices into 4% paraformaldehyde in PBS. The stained sections were scanned, and the stroke volume was determined using the Image J software (version 1.48). Three parameters were assessed: the area of the contralateral hemisphere as well as the ipsilateral hemisphere divided into non-infarcted area and infarct area. The direct stroke volume equals the infarct area and the indirect stroke volume was calculated by subtraction of the non-infarcted area (ipsilateral) from the contralateral hemisphere to correct for brain swelling.

### FACS Analysis

Brains of seven wild-type and six *Sirt2*<sup>-/-</sup> animals were removed after perfusion at 48 hours after 45 minutes of MCAO, and then their hemispheres were separated and prepared for FACS analysis individually. Cell suspensions were generated using a percoll gradient and stained for CD3 (Biotin anti-mouse CD3e, BD Biosciences, San Jose, CA, USA); Streptavidin PE/Cy5, BioLegend, San Diego, CA, USA), CD45 (APC anti-mouse CD45.2, BioLegend), CD11b (FITC anti-mouse CD11b, BioLegend), GR-1 (PE anti-mouse LY-6G and Ly6C (GR-1), BD Biosciences), CD4 (APC/Cy7 anti-mouse CD4, BioLegend), and CD8 (PE/Cy7 anti-mouse CD8a, BioLegend) and analyzed by the FACS Diva Version 6.1.3 (BD Biosciences).

### Immunohistochemistry

After 24 hours fixation in 4% paraformaldehyde and subsequent 24 hours incubation in PBS, brain tissues were embedded in paraffin and cut into 1.5- $\mu$ m-thick slices. Slices from six animals per group were stained for NeuN (MAB377, Merck Millipore, Billerica, MA, USA), GFAP (glial fibrillary acidic protein; Ab5541, Merck Millipore), ASC (apoptosis-associated speckle-like protein containing a CARD; AG-25B-0006, Adipogen, San Diego, CA, USA) and counterstained with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole). As secondary antibodies Cy5, FITC, and Cy3 (715-175-150, 703-095-155, and 711-165-152, respectively; Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) were used. For counting of neuronal cell numbers, three boxes of 200  $\mu$ m height and covering the entire brain from left to right (ipsilateral and contralateral hemispheres) were placed in each brain slide at the following predefined positions: one below the oriens layer of the hippocampus, one above the top of the third ventricle, and one in the middle between the other ones. Afterwards, the mean cell number per mm<sup>2</sup> was calculated for each hemisphere (ischemic vs. non-ischemic). The neuronal loss was determined by the ratio, which was calculated by the difference of NeuN-positive cell counts in both (ischemic and non-ischemic) hemispheres divided by the number of NeuN-positive cells in the non-ischemic/contralateral hemisphere. ASC specks were counted in the entire ipsilateral hemisphere. Expression of *Sirt2* protein in wild-type mouse brain was examined using a specific *Sirt2* antibody (ab67299; Abcam, Cambridge, UK). Cell nuclei were counterstained with DAPI. Brain tissue derived from *Sirt2*<sup>-/-</sup> mice was used to control for specificity. The slices were scanned with a  $\times 40$  magnification using Axio Examiner.Z1 microscope (Zeiss, Jena, Germany) with the Zen Software (Zeiss). Cell-type-specific expression of *Sirt2* was evaluated using paraffin sections of 1.5  $\mu$ m thickness, which were deparaffined followed by antigen retrieval as described.<sup>21</sup> After blocking for 20 minutes in 20% (v/v) horse serum and 0.4% (w/v) bovine serum albumin in PBS, primary antibodies were applied at 4°C for two nights in 20% (v/v) horse serum and 0.4% (w/v) bovine serum albumin in PBS. Antibodies were specific for *Sirt2* (Abcam, 1:200), IBA1 (Abcam, 1:1000), NeuN (Millipore, 1:50), and CNP (Sigma, St Louis, MO, USA, 1:200). For immunofluorescence for CD68, paraffin sections were deparaffined as described,<sup>21</sup> followed by antigen retrieval by cooking for 10 minutes in EnVision FLEX Target Retrieval Solution Low pH (Dako, Glostrup, Denmark). After cool down in the solution and blocking for 20 minutes in Protein Block Serum Free (Dako), anti-CD68 (AbD Serotec, Oxford, UK, 1:100) antibody

was applied over night at 4 °C in Antibody Diluent (Dako). Fluorophore-conjugated secondary antibodies were applied for 1 hour at room temperature in 2% (v/v) horse serum and 0.4% (w/v) bovine serum albumin in PBS. Fluorophore-conjugated secondary antibodies were anti-mouseAlexa488 (Dianova, Hamburg, Germany, 1:2000), anti-ratAlexa488 (Dianova, 1:2000), anti-goatAlexa488 (Dianova, 1:2000), and anti-rabbitAlexa555 (Dianova, 1:2000). DAPI was applied for nuclear staining. Slices were mounted in AquaPolymount (Polysciences, Warrington, PA, USA). Images were acquired at  $\times 63$  magnification at an inverted Zeiss Axio Observer. For green fluorescence (Alexa488), a 450 to 490 nm bandpass filter was used for excitation, and emission was recorded with a 500 to 550 nm bandpass filter. For red fluorescence (Alexa555), a 533 to 558 nm bandpass filter was used, and emission was recorded with a 570 to 640 nm bandpass filter. For blue fluorescence (DAPI), a 335 to 383 nm bandpass filter was applied and emission detected using a 420 to 470 nm bandpass filter.

#### Biochemical Analysis

Brains were dissected, separated into hemispheres, and snap frozen on dry ice. Homogenates of one hemisphere were prepared in 5 ml 0.32 mol/L sucrose solution supplemented with protease inhibitor cocktail (Complete, Roche, Basel, Switzerland) using an IKA T10 ULTRA TURRAX (IKA, Staufen, Germany). Protein concentration was determined using the DC protein assay (Bio-Rad, München, Germany). Immunoblots were performed as described.<sup>22</sup> Antibodies used were specific for Sirt2 (1:5000)<sup>23</sup> and  $\alpha$ -tubulin (Sigma, 1:1000). Signals were detected using ECL (Western Lightning Plus ECL, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) and a chemiluminescence scanner (Intas ChemoCam System, Göttingen, Germany). Band intensities were quantified using ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA) 1.48. Sirt2 protein abundances of each isoform are given relative to  $\alpha$ -tubulin abundance and the mean total Sirt2 protein abundance (sum of both isoforms) at control conditions. Images were processed using Adobe Photoshop (San Jose, CA, USA). Statistical analysis using a one-way unpaired analysis of variance was carried out in GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA).

#### Statistics

Power calculation was performed using SISA-Binomial as described before.<sup>24</sup> Based on the known variance of previous experiments, the MCAO experiments were powered ( $\alpha=0.05$ ;  $\beta=0.8$ ) to detect effect sizes  $d$  (Cohen<sup>25</sup>) of at least 1, i.e., of 1 s.d. Figures and statistical analysis were performed using the GraphPad Prism Software (Version 5, La Jolla, CA, USA). Student's *t*-test for independent samples was applied to determine statistical significance between the mean values of two study groups if not stated otherwise. *P* values  $< 0.05$  were considered statistically significant. If groups were not normal distributed, Mann-Whitney *U*-test was used (e.g., neuroscores). Neuroscore graphs show single values and the median. Stroke volumes, neuronal loss, and ASC specks are presented as the mean  $\pm$  s.d. The inflammatory cell counts (FACS analysis) are presented with the mean.

## RESULTS

### mRNAs of Several Sirtuin Family Members are Induced After Cerebral Ischemia

We first performed a screening experiment to identify differentially regulated gene products after experimental stroke. Interestingly, we found that mRNAs of several sirtuin family members

were induced (Table 1). Sirt2 mRNA was found induced 6 hours after MCAO in the ischemic mouse brain and up to 24 hours after induction of cerebral ischemia (Table 1).

### Sirt2 is Mainly Expressed in Myelin-Rich Regions in Non-Ischemic and Ischemic Brain Tissue, is Mainly Expressed in Oligodendrocytes, and the Two Major Sirt2 Protein Isoforms are Differentially Regulated After Ischemia

As shown in Figure 1, a Sirt2-specific antibody was used to evaluate the expression pattern of Sirt2 after stroke. Myelin-rich structures in both hemispheres were immunoreactive for Sirt2, and the staining seemed more intense in the ischemic hemisphere (Figures 1A and 1B). Double-labeling immunofluorescence studies using Sirt2-specific antibody in combination with various cell-type-specific markers revealed a preferential expression of Sirt2 protein in myelin formed by oligodendrocytes (CNP-positive white matter tracts) but no detectable Sirt2-specific signal in astrocytes (GFAP-positive cells), microglia (Iba1-positive cells), or neurons (NeuN-positive cells); whereas only some CD68-positive cells (macrophages) showed also a weak and inconstant Sirt2-positive staining pattern (Figures 1D and 1H).

### Sirt2 Isoforms are Differentially Regulated After Cerebral Ischemia

Western blotting with Sirt2-specific antibody was performed to quantify the Sirt2 protein expression in whole ischemic mouse brain 48 hours after induction of MCAO (Figures 1I and 1J). Interestingly, the two major isoforms<sup>22,23</sup> of Sirt2 protein showed a differential regulation after cerebral ischemia in wild-type mice: whereas the expression of the major cytoplasmic isoform (SIRTv2) was reduced when compared with untreated wild-type control mice, the longer v1-isoform (SIRTv1) was induced in both ischemic/ipsilateral and non-ischemic/contralateral brain hemispheres when compared with untreated wild-type mice (Figures 1I and 1J). Thus, not only Sirt2 mRNA (Table 1) but also Sirt2 protein isoforms are differentially regulated after cerebral ischemia in the ischemic mouse brain (Figure 1).

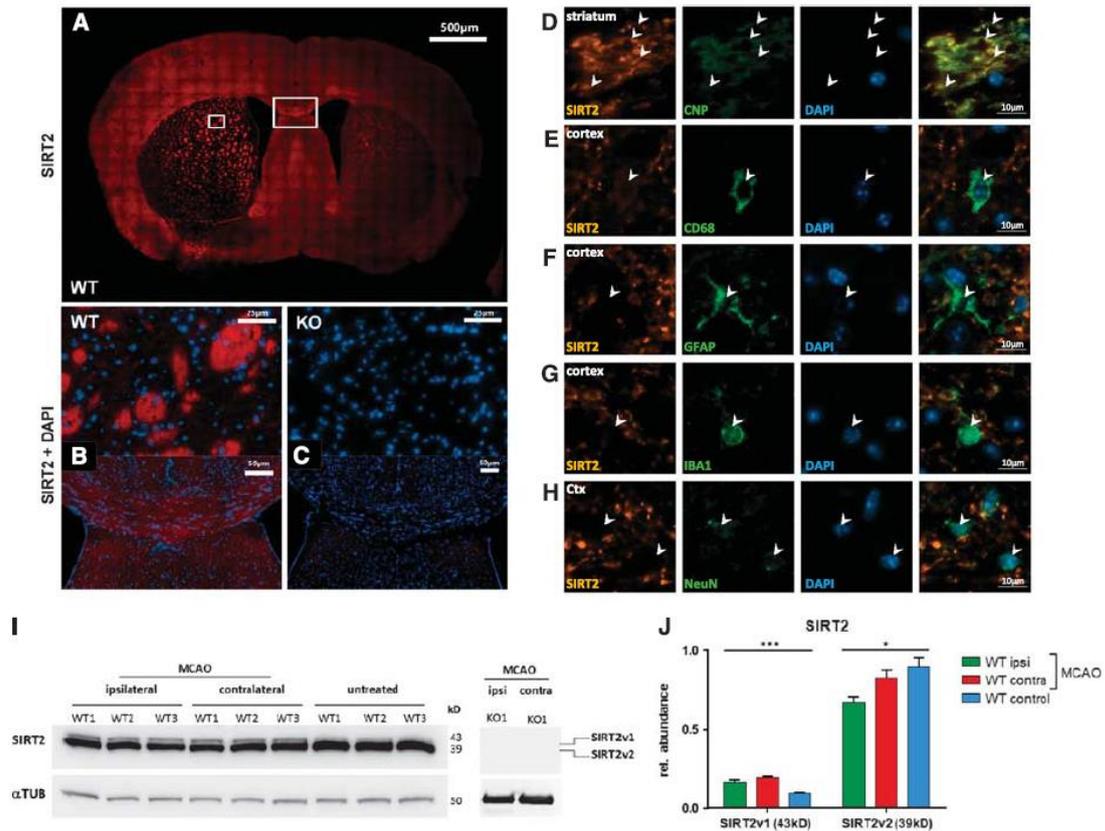
### Sirt2 Deficiency has no Influence on Stroke Volumes or Neuronal Cell Death After Focal Transient Cerebral Ischemia

To evaluate whether Sirt2-deficiency protects against experimental stroke, male adult Sirt2<sup>-/-</sup> mice were compared with wild-type mice after 45 minutes MCAO and 48 hours of reperfusion. Neither indirect nor direct stroke volumes showed a significant difference between Sirt2-deficient and wild-type animals (Figures 2A–2C). Next we examined whether Sirt2 deficiency could protect against ischemic neuronal cell death despite a lack of a significant alteration of stroke volumes. To this end, the 'neuronal loss' was determined by counting neurons both in ischemic and non-ischemic brain hemispheres of Sirt2<sup>-/-</sup> and wild-type mice after 45 minutes MCAO and 2 days of reperfusion. In agreement with the absence of a significant alteration of stroke volumes, Sirt2-

**Table 1.** mRNAs of different sirtuin family members are induced after transient focal cerebral ischemia in the ischemic mouse brain

Gene	Probe number	Signal	P-value	1 hour	3 hours	6 hours	12 hours	24 hours
Sirt1	1418640_at	88	0.011	-1.14	1.20	-1.02	1.43	1.11
Sirt2	1423507_a_at	1274	7E-04	-1.23	1.00	1.20	1.17	1.35
Sirt3	1417892_a_at	726	2E-04	-1.28	1.01	1.19	1.02	1.07
Sirt6	1429631_at	211	0.04	-1.08	-1.02	-1.38	ND	ND

ND, not determined. Relative expression levels of the mRNA of different sirtuin family members in posts ischemic mouse brain tissue after various reperfusion times. Expression levels were determined by the use of Affymetrix GeneChip analysis of total mRNA derived from complete ipsilateral (ischemic) hemispheres of wild-type mice after 1 hour MCAO. For each time point, mRNA was pooled from entire ipsilateral posts ischemic hemispheres of C57BL/6 wild-type mice ( $n=6$  for each time point). Expression levels of ipsilateral hemispheres were compared with the levels of sham-treated control animals. Downregulation is indicated by '-'. Gene-specific probes were used (Affymetrix identifier numbers are shown in the second row).



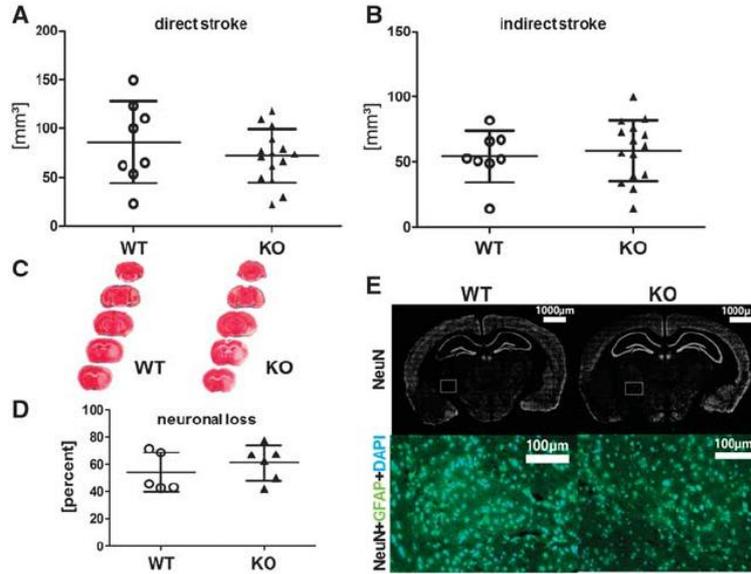
**Figure 1.** Sirtuin-2 (Sirt2) protein is almost exclusively expressed in myelin-rich regions, is expressed mainly in oligodendrocytes, and the different Sirt2 protein isoforms are differentially regulated in the ischemic brain hemisphere. Whole mouse brain tissue at 48 hours of reperfusion after 45 minutes of middle cerebral artery occlusion (MCAO) was immunofluorescence stained with anti-Sirt2 antibody in wild-type (A and B) and Sirt2-deficient mice (C). Sirt2-specific labeling revealed an intense Sirt2-specific labeling of myelin-like structures in the ischemic hemisphere of wild-type mice (A, left hemisphere; B). The specificity of the antibody was confirmed by the lack of specific staining observed in Sirt2-deficient mice (C). Cell nuclei were counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (B and C). Cell-type-specific expression of Sirt2 protein in male wild-type mice was evaluated at 48 hours of reperfusion after 45 minutes MCAO in 1.5- $\mu$ m thick paraffin sections by the use of co-labeling studies with various cell-type-specific antibodies (D: CNP (oligodendrocytes); E: CD68 (macrophages); F: glial fibrillary acidic protein (GFAP; astrocytes); G: Iba1 (macrophages/microglia); H: NeuN (neurons)). Protein quantification by the use of western blotting with Sirt2-specific antibody (I and J) was performed using the whole brain hemispheres of untreated wild-type mice ('WT control'), as well as the ischemic/ipsilateral ('WT ipsi') or non-ischemic/contralateral ('WT contra') hemispheres of male C57Bl6 wild-type mice at 48 hours after 45 minutes MCAO ( $n = 3$  each) ( $\alpha$ TUB:  $\alpha$ -tubulin; SIRT2v1: longer isoform of Sirt2 (ca. 43 kD); SIRT2v2: shorter isoform of Sirt2 (ca 39 kD)) (J: relative protein abundance of SIRT2v1 and SIRT2v2 isoforms normalized to  $\alpha$ -tubulin expression as determined by western blotting (I) are given by mean  $\pm$  s.e.m.; \*\*\* $P = 0.0004$ ; \* $P = 0.0428$ ).

deficient mice had no significant difference in the loss of neurons in their ischemic hemisphere when compared with wild-type mice (Figure 2D). Moreover, immunostaining of astrocytes did not reveal a significant difference in astrocyte distribution in the ischemic brain of Sirt2-deficient and wild-type control mice after MCAO (Figure 2E).

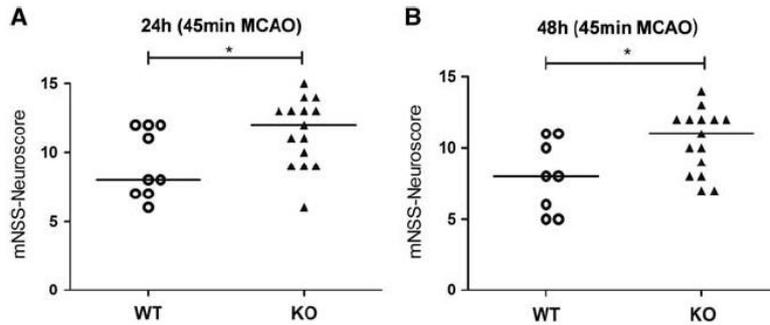
#### Sirt2-Deficiency Preserves Neurological Function After Cerebral Ischemia

To evaluate the level of functional impairment of the mice after experimental stroke, we assessed different neuroscores to determine motoric and sensoric disabilities. Despite the absence of differences in the stroke volume, adult male Sirt2<sup>-/-</sup> mice showed less neurological impairment (measured by the mNSS) 24 and 48 hours after induction of cerebral ischemia for 45 minutes

(Figure 3). We could not detect a significant difference between the two groups 24 hours after MCAO using the Bederson Score ( $P = 0.3661$ , median 2 in both groups). However, 48 hours after the induction of cerebral ischemia, the Sirt2<sup>-/-</sup> mice showed a significantly better neurological performance compared with the wild-type mice in the Bederson Score as well ( $P = 0.0428$ , median<sub>wild-type</sub> = 2, median<sub>Sirt2<sup>-/-</sup></sub> = 1). Because of the mainly myelin-associated and subcortical expression of Sirt2 (Figure 1), we additionally induced cerebral ischemia with shorter occlusion times (15 minutes MCAO) to evaluate the functional effect of Sirt2 deficiency in a subcortical stroke model, which mainly affects subcortical brain regions and white matter. A significant difference of the neuroscores between the genotypes was also observed in the second, mild stroke model at 48 hours after MCAO (Figures 4A and 4C). Although we did not observe a significant difference of the mNSS at later time



**Figure 2.** Sirtuin-2 (Sirt2) deficiency has only a minor effect on stroke volumes, neuronal cell death, and astrocyte distribution after focal cerebral ischemia. Direct (A) and indirect (B) stroke volumes were determined by the use of TTC (2,3,5-triphenyl-tetrazolium-chloride) staining (C) in wild-type (WT) and Sirt2-deficient mice at 48 hours of reperfusion after 45 minutes middle cerebral artery occlusion (MCAO) (WT  $n=8$ , knockout (KO)  $n=15$ ). Stroke volumes displayed no significant difference (A to C). Neuronal loss was calculated by counting neurons in three predefined boxes in both ipsilateral and contralateral hemispheres ( $n=5$  per group). Percentage of neuronal loss in each animal as shown in panel D was determined by the quotient of the difference of both cell counts (in ischemic and non-ischemic hemispheres) and the cell count in the non-ischemic hemisphere (D). A staining of the entire brain slices with anti-GFAP-antibody (astrocytes), anti-NeuN antibody (neurons) and 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; cell nuclei) (E) shows that there is no difference between the distribution patterns of neurons or astrocytes of WTe or Sirt2-deficient mice 48 hours after 45 minutes of MCAO (E). Data are presented with mean  $\pm$  s.d. GFAP, glial fibrillary acidic protein.

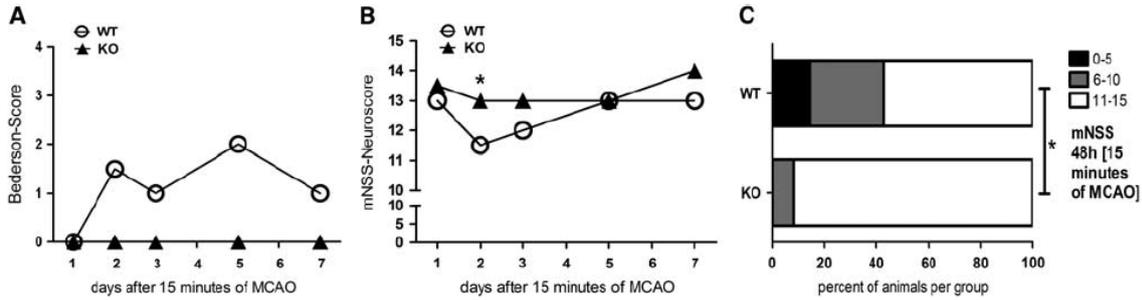


**Figure 3.** Sirtuin-2 (Sirt2)-deficient male mice have an improved neurological performance after experimental stroke. The modified Neurological Severity Score (mNSS) was assessed 24 and 48 hours after 45 minutes of middle cerebral artery occlusion (MCAO) in male adult wild-type (WT) and Sirt2-knockout (KO) mice (WT  $n=8$ , KO  $n=15$ ). The mNSS contains three motor and two sensory tests: 15 points equal no and 5 points a severe neurological deficit (please note that a higher mNSS value represents a better performance in neurological testing, corresponding to a reduced neurological deficit). The Sirt2-KO mice showed a significantly better neurological outcome 24 (A) and 48 hours (B) after MCAO when compared with WT animals. Data are presented with the median.

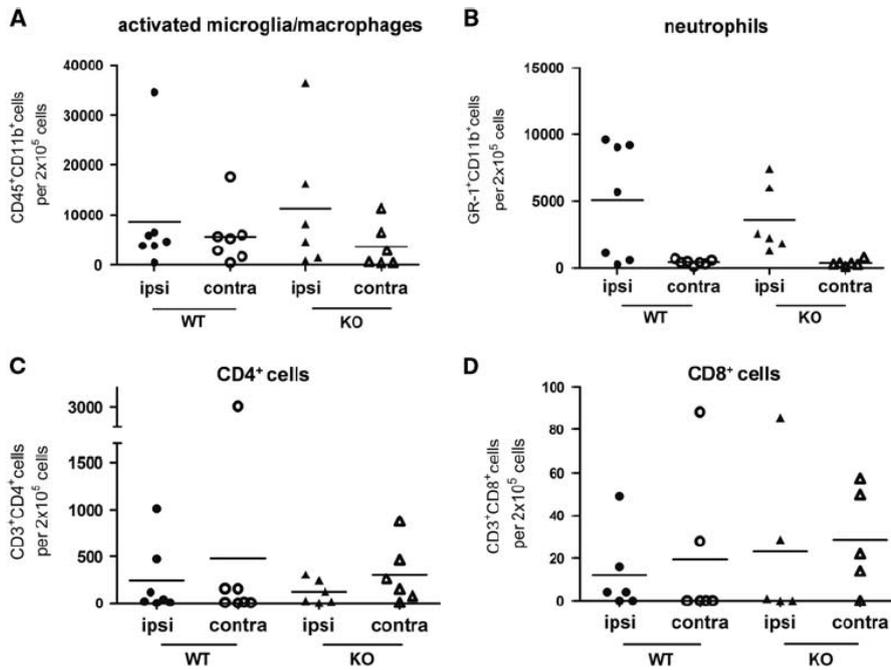
points (days 3 to 7, Figure 4A), the tendency towards a better performance of the Sirt2<sup>-/-</sup> mice—though without statistical significance—remained up to 7 days, as demonstrated by higher values of the median Bederson Score in wild-type mice at every time point after stroke when compared with Sirt2<sup>-/-</sup> mice (Figure 4B).

**Sirt2 Induces Minor Effects on the Inflammatory Cellular Response After Ischemic Brain Injury**

We used FACS analysis to determine absolute cell numbers of neutrophils, activated microglia/macrophages, and CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> T cells 48 hours after induction of focal cerebral ischemia for 45 minutes to evaluate whether Sirt2 deficiency affects postischemic



**Figure 4.** Sirtuin-2 (Sirt2)-deficient mice have a better neurological outcome compared with wild-type (WT) animals in a mild stroke model. The Neuroscores (Bederson Score (A) and modified Neurological Severity Score (mNSS) (B and C)) were assessed 1, 2, 3, 5, and 7 days after induction of focal ischemia for 15 minutes (WT:  $n = 14$ , knockout (KO):  $n = 13$ ). Whereas the mNSS contains motor and sensory tests (15 = no deficit, 5 = severe deficit), the Bederson Score rates neurological outcome from no deficit (0) to death (4). The Sirt2-deficient mice had less neurological impairment at every time point of the Bederson Score (A) and showed a better or the same (5d) neurological performance in the mNSS (B); the difference between the groups was significant at 48 hours after middle cerebral artery occlusion (MCAO) (C). Data are presented with the median.

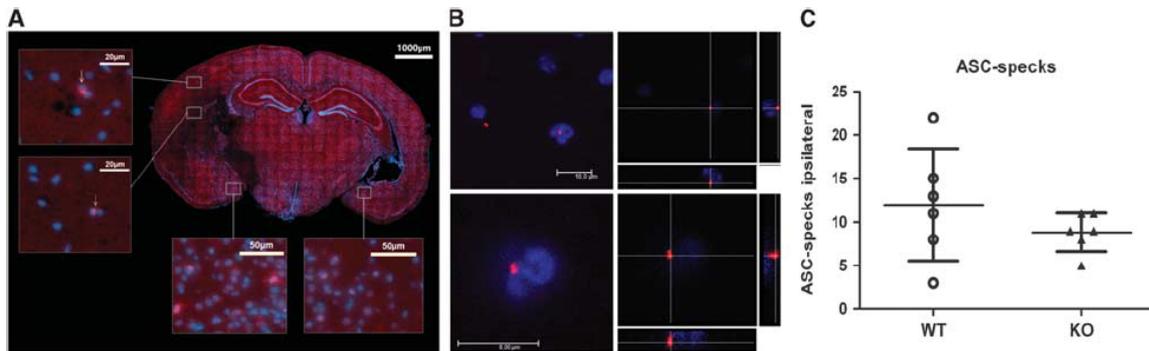


**Figure 5.** Quantification of inflammatory cells in ischemic (ipsi) and non-ischemic (contra) brain hemisphere of sirtuin-2 (Sirt2)-deficient and wild-type (WT) control mice did not reveal a difference between both genotypes. The entire hemispheres of ischemic Sirt2-deficient and KO mice were isolated 48 hours after 45 minutes of middle cerebral artery occlusion (MCAO) (WT:  $n = 7$ ; knockout (KO):  $n = 6$ ). Cells were prepared with a Percoll gradient after homogenization and stained for fluorescence-activated cell sorting analysis. Figures show absolute cell counts of major inflammatory cell types in the ipsilateral and contralateral hemispheres of WT and Sirt2-deficient (KO) male mice. Despite a significant induction of mainly neutrophils in the ipsilateral hemisphere (B), there were overall no significant alterations in the cell numbers of activated microglia/macrophages (A), neutrophils (B), CD4<sup>+</sup> T cells (C), or CD8<sup>+</sup> T cells (D) between mice of the two genotypes. Data are presented with the mean.

influx of immune cells as well as the activation status of resident innate immune cells. There was a similar increase of neutrophils and activated microglia/macrophages in the ischemic brain hemispheres both of wild-type and Sirt2-deficient mice, and overall no significant alteration in the distribution of inflammatory cells in both hemispheres between mice of the two genotypes (Figure 5).

The Amount of ASC-Positive Specks in the Ischemic Hemispheres of Sirt2<sup>-/-</sup> and Wild-Type Mice does not Differ

Based on the recent report of the involvement of Sirt2 in the stress-mediated inflammatory response,<sup>1</sup> we wondered whether the appearance of ASC-positive specks, indicative of activated inflammasomes,<sup>26</sup> is increased in Sirt2-deficient mice after MCAO



**Figure 6.** Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC)-positive specks are detected in the ischemic hemisphere of both, *Sirt2*<sup>-/-</sup> and wild-type (WT) mice, but there was no significant increase of speck count in *Sirt2*<sup>-/-</sup> mice after middle cerebral artery occlusion. Mouse brain after 48 hours of reperfusion and 45 minutes of ischemia stained with anti-ASC-specific antibody and 4',6-diamidino-2-phenylindole to label cell nuclei (**A** and **B**). Arrows indicate ASC-positive specks in the infarcted area (**A**, magnifications on the left side), whereas cells with a microglial morphology in the peri-infarct region (penumbra) display a more diffuse cytoplasmic ASC staining (**A**, magnification in the middle below). ASC specks are localized next to the nucleus (**B**). To evaluate potential differences of the amount of ASC-positive specks in WT and *Sirt2*<sup>-/-</sup> mice, the number of specks was quantified (**C**).

when compared with wild-type controls. As shown in Figure 6A, ASC-specific polyclonal antibody staining revealed intensely stained speck-like structures, which are mainly located at the border of the ischemic core, the so-called penumbra zone, as well as cells with cytoplasmic staining for ASC, which morphologically resemble microglial cells or macrophages (Figure 6B). To exclude that the ASC-specks are staining artifacts similar to antibody aggregates on the surface of the slice, they were examined further by confocal microscopy. The confocal images show that the specks are located next to the nucleus and therefore could be ASC aggregates that appear after activation of the inflammasome.<sup>26,27</sup> In contrast to the postulated increase of inflammasome activation after Sirt2 inhibition,<sup>1</sup> we could not detect a significant increase of ASC-positive specks in postischemic mouse brain tissue of *Sirt2*-deficient mice compared with wild-type mice (Figure 6C). However, this observation fits well with the absence of a substantial effect on the inflammatory cell count in *Sirt2*-deficient mice (Figure 5).

## DISCUSSION

The exact way of Sirt2 action still remains to be fully elucidated, but there are several potential protein functions that may be of significance in ischemic tissue injury. First, an anti-inflammatory role of Sirt2 during metabolic stress involves the NAD<sup>+</sup>-dependent reduction of tubulin acetylation and thereby links metabolism with the activation of the innate immune system.<sup>11,12</sup> Misawa *et al*<sup>1</sup> reported that NAD<sup>+</sup>-dependent inhibition of Sirt2 activity leads to an inflammasome aggregation, which promotes the inflammatory response under conditions of tissue stress. Second, Sirt2 in the central nervous system was shown to be an inhibitor of microglial activation in models of neurodegeneration.<sup>6</sup> As microglial activation and NLRP3 inflammasome activation mediate ischemic brain injury,<sup>27,28</sup> one hypothesis could have been that *Sirt2*-deficient mice would show increased ischemic damage because of increased inflammasome activation and pronounced inflammatory response.

In contrast to that supposed overall protective effects of Sirt2 during ischemia, especially concerning inflammatory processes,<sup>1,6</sup> there is recent debate about a potential direct involvement of Sirt2 in necroptotic signaling, which could be responsible for a protective effect of Sirt2 deficiency in models of ischemic myocardial injury.<sup>10</sup> Furthermore, Spire-Jones *et al*<sup>29</sup> found a

protective role of Sirt2-inhibition in a mouse model of frontotemporal dementia, and the Sirt2 inhibitor AK7 was neuroprotective in an *in vivo* model of Huntington disease.<sup>30</sup> Sirt2 inhibitor AGK2 also decreases cell death in Parkinson's disease models and cardiac infarction.<sup>31</sup> Interestingly, a recent report demonstrates that the conversion of NAD<sup>+</sup> to nicotinamide by sirtuins increases generation of ROS, which leads to the activation of protective pathways. That mechanism is suspected not only to cause the life-extending effects of sirtuins<sup>13</sup> but may also promote the ischemic damage by increasing the amount of ROS production during ischemic injury.

Our investigations show that *Sirt2*-deficient mice were functionally protected against ischemic stroke, and protection with regard to neurological performance surmounts an only minor effect regarding stroke volumes or neuronal cell loss. A very recent study using the Sirt2 inhibitor AK7 did not detect a significant difference of the neurological deficit scores according to Bederson, but a tendency toward a better neurological outcome in the AK7-treated animals when compared with vehicle-treated animals at 24 hours after 1 hour MCAO.<sup>32</sup> These results are consistent with our own findings, as we did not see a significant difference between the groups using the Bederson Score at 24 hours after 45 minutes MCAO. However, after 48 hours both mNSS and Bederson Scores revealed significantly reduced neurological deficits in *Sirt2*<sup>-/-</sup> mice when compared with wild-type mice. Thus the difference of the neurological deficit in both groups is not evident by the use of a rather rough test such as the Bederson Score at 24 hours of reperfusion. Moreover, it is possible that AK7 inhibits Sirt1 to some degree as well,<sup>32</sup> which would cloud the result of the Sirt2 inhibition, as Sirt1 and Sirt2 are currently suspected to have opposite effects on the outcome of cerebral ischemia.<sup>3,5</sup>

The absence of significant changes regarding the immune response in *Sirt2*-deficient mice after stroke, measured by FACS analysis, argues against a prominent role of Sirt2 concerning the initiation of an inflammatory response. Additionally arguing against a major role of Sirt2 in tubulin-acetylation-dependent modulation of inflammation, Sirt2 deletion does not alter tubulin acetylation *in vitro* or *in vivo*.<sup>33,34</sup> Fitting to a minor role of Sirt2 in triggering the early stroke-induced inflammatory response, we found Sirt2 protein mainly expressed in myelin structures and co-localized with oligodendrocyte-specific markers (CNP) and only to a minor degree if at all in inflammatory cells, such as

macrophages (CD68-positive cells). This observation is paralleled with the data of Werner *et al.*<sup>22</sup> and Beirovski *et al.*<sup>35</sup> who have shown that Sirt2 is mainly a myelin-associated protein and regulates myelination. Thus we now hypothesize mainly a myelin-mediated effect of Sirt2 in ischemic brain injury, which rather affects axonal function than pure global stroke volume or postischemic inflammatory processes after cerebral ischemia.

Our findings confirm the current view that inhibition of Sirt2 or activation of Sirt1 seems to be beneficial for the organism against certain age-associated diseases.<sup>36</sup> Sirt1 and Sirt2 seem to differ regarding their effects on ischemic brain injury. In contrast to our results that show a protective effect of Sirt2 deficiency, Sirt1-knockout mice showed increased stroke volumes after cerebral ischemia when compared with wild-type mice, and most studies conclude that Sirt1 is beneficial in stroke.<sup>3,5</sup> This difference could be explained by the different cellular expression pattern of both sirtuin family members: Sirt1 is mainly expressed in neurons,<sup>5,36</sup> whereas Sirt2 is mainly expressed in oligodendroglia.<sup>22</sup>

Differential regulation of Sirt2 mRNA and Sirt2 protein isoforms, which are supposed to result from differential splicing<sup>22</sup> are in congruence with a mainly posttranscriptional regulation of Sirt2 protein expression.<sup>22</sup>

The protective effect of Sirt2 deficiency that we discovered in stroke and the opposite effect observed in Sirt1-deficient mice<sup>5</sup> correlates with similar effects of Sirt1 and Sirt2 in myocardial ischemia: Sirt1 deficiency in the myocardium increases damage after ischemia/reperfusion in the heart,<sup>8</sup> whereas Sirt2-deficiency potentially mediates protection in myocardial ischemia-reperfusion injury.<sup>10</sup>

However, this black and white classification on the net effects of specific sirtuin family members seems to be overly simplistic. The different sirtuins are not only expressed in different cell types, or cellular compartments, but are also known to deacetylate different substrates<sup>35</sup> and that process could also depend on the degree of phosphorylation of these proteins.<sup>6</sup> Thus further experimental *in vivo* and *in vitro* studies (including studies to evaluate the significance of different Sirt2 protein isoforms) are required before clinical stroke studies with Sirt2 inhibitors are initiated.

## CONCLUSION

We herein demonstrate that Sirt2 mRNA and Sirt2 protein are differentially regulated after ischemic brain damage and mainly expressed in oligodendrocytes. Moreover, Sirt2 deficiency improves the neurological outcome after experimental stroke in mice in the early postischemic period. Given the minor changes in the stroke volume, as well as in the neuronal and inflammatory cell count and the myelin-associated expression pattern, we hypothesize that Sirt2 mainly affects neurological deficits by influencing myelin and thus axonal function.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

Lea Krey performed the major part of the experiments (MCAO, immunohistochemistry, etc.) and wrote major parts of the manuscript as well as finally approved the manuscript; Kathrin Kusch performed co-localizing studies and biochemical analysis; Fred Lühder contributed to the concept of the study, performed flow cytometry and data analysis, and finally approved the manuscript; Bozena Czech-Zechmeister helped with the MCAO model, data acquisition, data analysis, as well as final approval of the manuscript; Birte Könnecke helped with the immunohistochemical evaluation, the data acquisition, the data analysis, and critical reading and final approval of the manuscript; Tiago F Outeiro contributed by help with the concept and design of the study, by analyzing the data, and by critically reading and revising the manuscript; George Trendelenburg contributed by help with the design and concept of the study, evaluating the data, and writing and revising the manuscript.

## DISCLOSURE/CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Regine Kruse for excellent technical assistance, Zara Haschemol-Hosseini for help with confocal laser-scanning microscopy, and Cathy Ludwig for language correction.

## REFERENCES

- Misawa T, Takahama M, Kozaki T, Lee H, Zou J, Saitoh T *et al.* Microtubule-driven spatial arrangement of mitochondria promotes activation of the NLRP3 inflammasome. *Nat Immunol* 2013; **14**: 454–460.
- Yildirim F, Ji S, Kronenberg G, Barco A, Olivares R, Benito E *et al.* Histone acetylation and CREB binding protein are required for neuronal resistance against ischemic injury. *PLoS One* 2014; **9**: e95465.
- Petegnief V, Planas AM. SIRT1 regulation modulates stroke outcome. *Transl Stroke Res* 2013; **4**: 663–671.
- Morris KC, Lin HW, Thompson JW, Perez-Pinzon MA. Pathways for ischemic cytoprotection: role of sirtuins in caloric restriction, resveratrol, and ischemic preconditioning. *J Cereb Blood Flow Metab* 2011; **31**: 1003–1019.
- Hernández-Jiménez M, Hurtado O, Cuartero MI, Ballesteros I, Moraga A, Pradillo JM *et al.* Silent information regulator 1 protects the brain against cerebral ischemic damage. *Stroke* 2013; **44**: 2333–2337.
- Pais TF, Szegő EM, Marques O, Miller-Fleming L, Antas P, Guerreiro P *et al.* The NAD-dependent deacetylase sirtuin 2 is a suppressor of microglial activation and brain inflammation. *EMBO J* 2013; **32**: 2603–2616.
- Ma Y, Chen H, He X, Nie H, Hong Y, Sheng C *et al.* NAD+ metabolism and NAD(+) dependent enzymes: promising therapeutic targets for neurological diseases. *Curr Drug Targets* 2012; **13**: 222–229.
- Hsu CP, Zhai P, Yamamoto T, Maejima Y, Matsushima S, Hariharan N *et al.* Silent information regulator 1 protects the heart from ischemia/reperfusion. *Circulation* 2010; **122**: 2170–2182.
- Kakefuda K, Fujita Y, Oyagi A, Hyakkoku K, Kojima T, Umemura K *et al.* Sirtuin 1 overexpression mice show a reference memory deficit, but not neuroprotection. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; **387**: 784–788.
- Newton K, Hildebrand JM, Shen Z, Rodriguez D, Alvarez-Diaz S, Petersen S *et al.* Is SIRT2 required for necroptosis? *Nature* 2014; **506**: E4–E6.
- McGettrick AF, O'Neill LAJ. How metabolism generates signals during innate immunity and inflammation. *J Biol Chem* 2013; **288**: 22893–22898.
- Donath MY. When metabolism meets immunology. *Nat Immunol* 2013; **14**: 421–422.
- Schmeisser K, Mansfeld J, Kuhlmann D, Weimer S, Priebe S, Heiland I *et al.* Role of sirtuins in lifespan regulation is linked to methylation of nicotinamide. *Nat Chem Biol* 2013; **9**: 693–700.
- Nie H, Hong Y, Lu X, Zhang J, Chen H, Li Y *et al.* SIRT2 mediates oxidative stress-induced apoptosis of differentiated PC12 cells. *Neuroreport* 2014; **25**: 838–842.
- Ziegler G, Prinz V, Albrecht MW, Harhausen D, Khojasteh U, Nacken W *et al.* Mrp-8 and -14 mediate CNS injury in focal cerebral ischemia. *Biochim Biophys Acta* 2009; **1792**: 1198–1204.
- Harhausen D, Prinz V, Ziegler G, Gertz K, Endres M, Lehrach H *et al.* CD93/AA4.1: a novel regulator of inflammation in murine focal cerebral ischemia. *J Immunol* 2010; **184**: 6407–6417.
- Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, Nishimura MC, Davis RL, Bartkowski H. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination. *Stroke* 1986; **17**: 472–476.
- Hara H, Huang PL, Panahian N, Fishman MC, Moskowitz MA. Reduced brain edema and infarction volume in mice lacking the neuronal isoform of nitric oxide synthase after transient MCA occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 1996; **16**: 605–611.
- Garcia JH, Wagner S, Liu KF, Hu XJ. Neurological deficit and extent of neuronal necrosis attributable to middle cerebral artery occlusion in rats. Statistical validation. *Stroke* 1995; **26**: 627–634.
- James ML, Sullivan PM, Lascola CD, Vitek MP, Laskowitz DT. Pharmacogenomic effects of apolipoprotein E on intracerebral hemorrhage. *Stroke* 2009; **40**: 632–639.
- Wemer HB, Krämer-Albers EM, Strenzke N, Saher G, Tenzer S, Ohno-Iwashita Y *et al.* A critical role for the cholesterol-associated proteolipids PLP and M6B in myelination of the central nervous system. *Glia* 2013; **61**: 567–586.
- Wemer HB, Kuhlmann K, Shen S, Uecker M, Schardt A, Dimova K *et al.* Proteolipid protein is required for transport of sirtuin 2 into CNS myelin. *J Neurosci* 2007; **27**: 7717–7730.
- Southwood CM, Peppi M, Dryden S, Tainsky MA, Gow A. Microtubule deacetylases, Sirt2 and HDAC6, in the nervous system. *Neurochem Res* 2007; **32**: 187–195.

- 24 Harhausen D, Khojasteh U, Stahel PF, Morgan BP, Nietfeld W, Dirnagl U et al. Membrane attack complex inhibitor CD59a protects against focal cerebral ischemia in mice. *J Neuroinflammation* 2010; **7**: 15.
- 25 Cohen J. *Statistical power analysis for the behavioral sciences*. Lawrence Erlbaum Associates: Mahwah, NJ, USA, 19882.
- 26 Franklin BS, Bossaller L, De Nardo D, Ratter JM, Stutz A, Engels G et al. The adaptor ASC has extracellular and 'prionoid' activities that propagate inflammation. *Nat Immunol* 2014; **15**: 727–737.
- 27 Trendelenburg G. Molecular regulation of cell fate in cerebral ischemia: role of the inflammasome and connected pathways. *J Cereb Blood Flow Metab* 2014; **34**: 1857–1867.
- 28 Yang F, Wang Z, Wei X, Han H, Meng X, Zhang Y et al. NLRP3 deficiency ameliorates neurovascular damage in experimental ischemic stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 2014; **34**: 660–667.
- 29 Spires-Jones TL, Fox LM, Rozkalne A, Pitstick R, Carlson GA, Kazantsev AG. Inhibition of sirtuin 2 with sulfobenzoic acid derivative AK1 is non-toxic and potentially neuroprotective in a mouse model of frontotemporal dementia. *Front Pharmacol* 2012; **3**: 42.
- 30 Chopra V, Quinti L, Kim J, Vollar L, Narayanan KL, Edgerly C et al. The sirtuin 2 inhibitor AK-7 is neuroprotective in Huntington's disease mouse models. *Cell Rep* 2012; **2**: 1492–1497.
- 31 Li Y, Nie H, Wu D, Zhang J, Wei X, Ying W. Poly(ADP-ribose) polymerase mediates both cell death and ATP decreases in SIRT2 inhibitor AGK2-treated microglial BV2 cells. *Neurosci Lett* 2013; **544**: 36–40.
- 32 Chen X, Wales P, Quinti L, Zuo F, Moniot S, Herisson F et al. The sirtuin-2 inhibitor AK7 is neuroprotective in models of Parkinson's disease but not amyotrophic lateral sclerosis and cerebral ischemia. *PLoS One* 2015; **1**: e0116919.
- 33 Taes I, Timmers M, Hersmus N, Bento-Abreu A, Van Den Bosch L, Van Damme P et al. Hdac6 deletion delays disease progression in the SOD1G93A mouse model of ALS. *Hum Mol Genet* 2013; **22**: 1783–1790.
- 34 Bobrowska A, Donmez G, Weiss A, Guarente L, Bates G. SIRT2 ablation has no effect on tubulin acetylation in brain, cholesterol biosynthesis or the progression of Huntington's disease phenotypes in vivo. *PLoS One* 2012; **7**: e34805.
- 35 Beirowski B, Gustin J, Armour SM, Yamamoto H, Viader A, North BJ et al. Sir-two-homolog 2 (Sirt2) modulates peripheral myelination through polarity protein Par-3/atypical protein kinase C (aPKC) signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; **108**: E952–E961.
- 36 Donmez G, Outeiro TF. SIRT1 and SIRT2: emerging targets in neurodegeneration. *EMBO Mol Med* 2013; **5**: 344–352.

## **Danksagung**

Ich danke Herrn Prof. Dr. George Trendelenburg für die Vermittlung und sehr gute Betreuung eines spannenden Forschungsprojektes im Rahmen dieser Dissertation. Es war eine lehrreiche und produktive Zeit, ich bin dankbar für die Unterstützung, die ich stets bekam, wenn ich sie gebraucht habe.

Meinen Betreuerinnen Birte Könnecke und Dr. Bozena Czech-Zechmeister möchte ich ebenfalls für die ständige Unterstützung und Hilfe danken. Ich habe den herzlichen Umgang, persönlichen Austausch und die angenehme Zusammenarbeit sehr geschätzt.

Ich danke Regine Kruse für ihre Hilfsbereitschaft und tatkräftige Unterstützung bei der aufwendigen FACS-Präparation.

Außerdem danke ich Lena Andresen und Manuel Khajehalichalehshtari für ihre Unterstützung im Team, die hilfreichen Gespräche und die sehr nette gemeinsame Zeit im Labor. Meiner Familie danke ich für das Korrekturlesen dieser Arbeit und für die ständige Unterstützung und Beratung, auf die ich mich immer verlassen kann.