

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

**Analyse neuroprotektiver und neuroregenerativer  
Mechanismen nach Applikation ektopter miRNA-124 am  
Schlaganfallmodell der Maus**

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

vorgelegt von

**Ruth Maria Doehring**

aus Halle (Saale)

Göttingen 2017

Dekan:	Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer
Referent:	Prof. Dr. Mathias Bähr
Ko-Referent:	Prof. Dr. Andre Fischer
Drittreferent:	Prof. Dr. Rainer Mausberg

Datum der mündlichen Prüfung: 15.01.2018

Ergebnisse und Methoden der hier vorliegende Dissertation wurden in folgenden internationalen Zeitschriften mit Peer-Review-System veröffentlicht:

Doepfner TR, Doehring M, Bretschneider E, Zechariah A, Kaltwasser B, Müller B, Koch JC, Bähr M, Hermann DM, Michel U (2013): MicroRNA-124 protects against focal cerebral ischemia via mechanisms involving Usp14-dependent REST degradation.

*Acta Neuropathologica* 126, 251–265.

Doepfner TR, Bretschneider E, Doehring M, Segura I, Sentürk A, Acker-Palmer A, Hasan MR, ElAli A, Hermann DM, Bähr M (2011): Enhancement of endogenous neurogenesis in ephrin-B3 deficient mice after transient focal cerebral ischemia.

*Acta Neuropathologica* 122, 429–442.

## Inhaltsverzeichnis

1. Abkürzungsverzeichnis.....	1
2. Einleitung.....	3
2.1 Definition und Epidemiologie des Schlaganfalls.....	3
2.2 Therapiemöglichkeiten des akuten Schlaganfalls.....	5
2.3 Pathophysiologie der zerebralen Ischämie.....	6
2.3.1 Exzitotoxizität.....	6
2.3.2 Periinfarkt-Depolarisation.....	7
2.3.3 Oxidativer Stress.....	8
2.3.4 Entzündungsreaktion.....	8
2.3.5 Programmierter Zelltod.....	9
2.4 Neuroprotektion.....	10
2.5 Endogene Neurogenese im adulten Gehirn.....	10
2.6 Endogene Neurogenese nach zerebraler Ischämie.....	12
2.7 Der Transkriptionsfaktor REST.....	12
2.7.1 Expressionsmuster von REST nach zerebraler Ischämie.....	14
2.8 Expression, biologische Eigenschaften und Funktion von microRNAs.....	15
2.9 Die miR-124 und ihre biologischen Funktionen.....	17
2.10 MiRNA-Expression nach Ischämie .....	19
3. Zielsetzung.....	21
4. Material und Methoden.....	22
4.1 Materialien.....	22
4.1.1 Chemikalien.....	22
4.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	24
4.1.3 Antikörper für immunhistochemische Färbungen.....	25
4.2 Methoden.....	26
4.2.1 Versuchstiere und Haltung.....	26
4.2.2 Generierung der microRNA-Vektoren.....	27
4.2.3 Experimentelle In-vivo-Gruppen .....	27
4.2.4 Hypoxisch-Hypoglykämische Zellschädigung kortikaler Neurone.....	28
4.2.5 Western Blot mit Nachweis von REST.....	29
4.2.6 Stereotaktische intrastriatale Injektion.....	30

4.2.7 Induktion der zerebralen Ischämie (Fadenokklusionsmodell).....	31
4.2.8 Analyse der post-ischämischen Gewebeschädigung.....	31
4.2.9 Immunhistochemische Analysen.....	33
4.2.10 Analyse post-ischämischer Funktionsdefizite.....	35
4.2.11 Statistik.....	39
5. Ergebnisse.....	40
5.1 Neuroprotektion durch miR-124 in vitro .....	40
5.2 MiR-124-induzierte Neuroprotektion in vivo.....	41
5.2.1 Transfektion in vivo.....	41
5.2.2 Screening unterschiedlicher Viruskonstrukte.....	42
5.2.3 Nachweis der Neuroprotektion anhand der Ödembildung .....	44
5.2.4 Mikrogliale Aktivierung.....	45
5.2.5 Langzeiteffekt der Neuroprotektion.....	46
5.3 Analyse post-ischämischer Motoroordination und kognitiver Defizite.....	46
5.3.1 Rota Rod- und Tight Rope-Test.....	46
5.3.2 Water Maze-Test.....	48
5.4 Analyse der REST-Expression in vivo und in vitro.....	49
5.5 Induktion post-ischämischer Neurogenese durch miR-124.....	54
6. Diskussion.....	59
7. Zusammenfassung.....	66
8. Literaturverzeichnis.....	68

## 1. Abkürzungsverzeichnis

3'UTR	3' untranslatierter Bereich ( <i>3' untranslated regulatory region</i> )
AMPA	Aminomethylphosphonsäure
BrdU	5-Bromo-2-deoxyuridin
CBF	zerebrale Durchblutung ( <i>cerebral blood flow</i> )
CNPase	2'-3'-zyklische Nukleotid-Phosphodiesterase ( <i>2'-3'-cyclic nucleotide phosphodiesterase</i> )
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
Dcx	Doublecortin
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
Dks	Eselserum ( <i>Donkey serum</i> )
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
EtOH	Ethanol
GFAP	saures Gliafaserprotein ( <i>glial fibrillary acidic protein</i> )
HCl	Salzsäure
HDAC	Histondeacetylasen
IB <sub>4</sub>	Isolectin B <sub>4</sub>
ICD-10	Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme, 10. Revision; ( <i>10th revision of the International Statistical Classification of Diseases and Related Health</i> )
IgG	Immunglobulin G
i.p.	intraperitoneal
KCl	Kaliumchlorid
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
MCAO	Verschluss der Arteria cerebri media ( <i>middle cerebral artery occlusion</i> )
miRNA	microRNA
Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> -ATPase	Natrium-Kalium-Pumpe

---

N <sub>2</sub> O	Distickstoffmonoxid
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
ncRNA	nicht-kodierende RNA ( <i>non-coding RNA</i> )
NeuN	<i>neuronal nuclei</i>
NGS	Ziegenserum ( <i>normal goat serum</i> )
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
nNOS	Stickstoffmonoxid-Synthetase ( <i>neuronal nitric oxide synthase</i> )
NO	Stickstoffmonoxid ( <i>nitric oxide</i> )
NPC	neurale Vorläuferzelle ( <i>neural progenitor cell</i> )
OGD	<i>oxygen-glucose-deprivation</i> , Hypoxie-Hypoglykämie-Test
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PFA	Paraformaldehyd
pre-miRNA	<i>precursor</i> miRNA
pri-miRNA	<i>primary</i> miRNA
REST	<i>Repressor element-1 silencing transcription factor</i>
RMS	rostraler Migrationsstrom ( <i>rostral migratory stream</i> )
ROS	reaktive Sauerstoffspezies ( <i>reactive oxygen species</i> )
rtPA	Gewebeplasminogenaktivator ( <i>recombinant tissue plasminogen activator</i> )
s.c.	subcutan
STAIR	<i>Stroke Therapy Academic Industry Roundtable</i>
SVZ	subventrikuläre Zone
TTC	2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid
VEGF	Endothel-Wachstumsfaktoren ( <i>vascular endothelial growth factor</i> )
ZNS	zentrales Nervensystem

## 2. Einleitung

### 2.1 Definition und Epidemiologie des Schlaganfalls

Die Inzidenz des ischämischen Schlaganfalls beträgt in Deutschland zwischen 160-240 pro 100.000 Einwohner. Die Hälfte der Betroffenen ist älter als 70 Jahre (Heuschmann et al. 2010, Amiri et al. 2011). Aufgrund sinkender Mortalität steigt die Prävalenz des Schlaganfalls an, während die Inzidenz noch stabil scheint (Amiri et al. 2011). Dennoch ist im Rahmen der zunehmenden Alterung der Bevölkerung in Zukunft mit einem weiteren Anstieg der absoluten Zahl der Schlaganfallpatienten zu rechnen (Heuschmann et al. 2010).

Insgesamt finden sich zerebrovaskuläre Erkrankungen in der Bevölkerung westlicher Länder etwa ebenso häufig wie kardiovaskuläre Erkrankungen (Rothwell et al. 2005). Auf der Liste der zehn häufigsten Todesursachen in Deutschland nach ICD-10 (Internationale statistische Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme) findet sich der Schlaganfall gemeinsam mit kardiovaskulären und tumorösen Erkrankungen (Statistisches Bundesamt 2014), die Einjahresmortalität nach Schlaganfall liegt bei 25% (Amiri et al. 2011). Er gilt als häufigste Ursache für erworbene Behinderung im Erwachsenenalter und zweithäufigste Ursache für Demenz (Heuschmann et al. 2010). Die intensive Akutbehandlung, hohe Hospitalisierungsraten, lange Rehabilitation, Produktivitätsausfall sowie meist lebenslange Pflegebedürftigkeit machen den Schlaganfall zu einer der teuersten Erkrankungen der Industrieländer (Amiri et al. 2011).

Der Schlaganfall bezeichnet im Allgemeinen ein akut auftretendes, fokalneurologisches Defizit vaskulärer Genese. Es lässt sich vereinfacht ein hämorrhagischer von einem ischämischen Schlaganfall, der mit 85% der häufigste und Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist, unterscheiden (Amiri et al. 2011). Eine genauere Einteilung des ischämischen Schlaganfalls nach der Ätiologie erfolgt anhand der TOAST-Klassifikation (siehe Tabelle 1).

**Tab. 1:** TOAST- (Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment) Klassifikation (Adams et al. 1993)

Ursachen des ischämischen Schlaganfalls
Makroangiopathie
Kardial embolisch
Mikroangiopathie
Andere Ätiologie (z. B. Vaskulitis, Dissektion, Gerinnungsstörung)
Unklare Ätiologie (keine Ursache oder mehrere gefunden)

Ursächlich für das neurologische Defizit ist eine Reduktion bzw. komplette Unterbrechung der Blutversorgung mit nachfolgend verminderter Sauerstoffversorgung des Hirngewebes, welches folglich einen temporären oder auch dauerhaften Funktionsverlust erfährt (Amiri et al. 2011). Die Kernzone umschreibt das Infarktgebiet, in welchem der absolute Energiemangel zum definitiven Untergang des Gewebes führt. Das die Kernzone umgebende Gewebe, mit noch suffizienter Durchblutung für die Aufrechterhaltung der Zellfunktion, wird als Penumbra bezeichnet (Heiss 2000). PET (Positronen-Emissions-Tomographie)- gestützte Untersuchungen definierten die Penumbra als Bereich mit einer zerebralen Durchblutung (*cerebral blood flow* = CBF) zwischen 10 und 22 ml/100 g Gewebe/min, ausgehend von einem normalen CBF von etwa 50 bis 60 ml/100 g Gewebe/min (Baron 1999).

## 2.2 Therapiemöglichkeiten des akuten Schlaganfalls

Noch vor der Therapie einer Erkrankung besteht eine große Herausforderung des ärztlichen Handelns in der Prävention dieser Erkrankung. Einige der wichtigsten beeinflussbaren Risikofaktoren des Schlaganfalls sind dabei sowohl die arterielle Hypertonie, Nikotinabusus, Übergewicht und Hyperlipidämie sowie auch Herzrhythmusstörungen mit Thrombembolierisiko (Meschia et al. 2014).

Die einzige kausale Therapiemöglichkeit des akuten ischämischen Schlaganfalls ist nach wie vor die Thrombolyse mit Gewebeplasminogenaktivator (rtPA = *recombinant tissue plasminogen activator*), welcher systemisch gegeben in den USA und Europa innerhalb eines Zeitfensters von 4,5 Stunden nach Beginn der Symptomatik zugelassen ist (Nolte und Endres 2012). Ein früher Therapiebeginn ist jedoch mit einer besseren Prognose für den Patienten verbunden (Nolte und Endres 2012, Amiri et al. 2011). Mit fortschreitender Zeit sinkt der therapeutische Nutzen für den Patienten, während gleichzeitig die Risiken für Komplikationen wie Hämorrhagien steigen.

Aktuelle Studien zeigen darüber hinaus den therapeutischen Nutzen durch endovaskuläre Verfahren im Sinne einer lokalen Thrombolyse bzw. mechanischen Rekanalisation auf (Goyal et al. 2015, Campbell et al. 2015). In Abhängigkeit vom Infarktterritorium und bei weiterhin engem Zeitfenster konnte in diesen Studien durch endovaskuläre Rekanalisation eine hohe Reperfusionrate und bessere funktionelle Erholung erzielt werden, bei gleichbleibendem Risiko für Komplikationen wie u. a. hämorrhagische Infarzierung.

Vor dem Hintergrund des engen therapeutischen Zeitfensters und definierter Ausschlusskriterien (De Keyser et al. 2007) sowie der für endovaskuläre Verfahren notwendigen Infrastruktur erhält bisher nur eine Minorität der Patienten eine solche Therapiemodalität. Die Anwendung beschränkte sich bis 2010 weiterhin auf unter 10% der Patienten mit einem ischämischen Hirninfarkt (Nimptsch und Mansky 2012). Folgerichtig sind weitere Therapieverfahren mit geringerem Nebenwirkungsprofil und größerem Zeitfenster vonnöten, welche adjuvant zu den obigen Verfahren zum klinischen Einsatz kommen können.

## 2.3 Pathophysiologie der zerebralen Ischämie

Das Gehirn hat einen hohen Energiebedarf, welcher hauptsächlich durch oxidative Verstoffwechslung von Glukose gedeckt wird. Im Rahmen einer zerebralen Ischämie kommt es durch die Hypoperfusion zu einer Unterversorgung des Gewebes und über ein komplexes System von Mechanismen, welche sich gegenseitig aktivieren und verstärken, zu einer zunehmenden Schädigung bis hin zum irreversiblen Zelluntergang durch Nekrose oder Apoptose in der Kernzone des Infarktes und mit zunehmender Ischämiezeit auch in der Penumbra. Zu diesen Mechanismen gehören die durch die Hypoperfusion ausgelöste Exzitotoxizität, welche sich in Perinfarkt-Depolarisationen fortsetzt, sowie die im Verlauf auftretende Inflammation und (apoptotischer) Zelluntergang, unter anderem verstärkt durch oxidativen Stress im Rahmen der Freisetzung großer Mengen Radikale (Dirnagl et al. 1999).

### 2.3.1 Exzitotoxizität

Das Membranpotential der Neuronen und Gliazellen kann bei Energiemangel unter anderem durch die dann beeinträchtigte Funktion der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase (Natrium-Kalium-Pumpe) nicht weiter aufrechterhalten werden. Mit Zusammenbruch des Membranpotentials kommt es zur Depolarisation der Zellen (Dirnagl et al. 1999). Spannungsabhängige Natrium- und Calcium-Kanäle werden aktiviert und ermöglichen einen Einstrom von Ionen mit nachfolgender Transmitterausschüttung (v. a. Glutamat) in den synaptischen Spalt (Budd 1998).

Die Wiederaufnahme der Transmitter ins Zellinnere ist infolge des Energiemangels ebenfalls eingeschränkt. Durch Glutamat aktivierte NMDA (N-Methyl-D-Aspartat)- und AMPA (Aminomethylphosphonsäure)-Rezeptoren öffnen sich und begünstigen eine weitere Zunahme des Calcium-Einstroms, aber auch des Einstroms anderer Ionen wie Natrium und Chlorid, sowie einen Kalium-Auswärtsstrom. Entlang des osmotischen Drucks strömt Wasser nach intrazellulär, infolgedessen bildet sich ein zytotoxisches Ödem. Der Druck auf

das umliegende Gewebe steigt und verschlechtert die Perfusion dort zusätzlich bis hin zur Steigerung des gesamten intrazerebralen Drucks.

Darüber hinaus kommt es durch den Anstieg der Calcium-Konzentration zur Aktivierung proteolytischer Enzyme, Lipasen und Endonucleasen, welche unter anderem Bestandteile des Zytoskeletts abbauen und Schäden an Membranen, Mitochondrien und auch der DNA verursachen. Mitverantwortlich für die Zellschäden ist auch oxidativer Stress durch freie Radikale (s. u.). Zugrunde gehende Mitochondrien verstärken den Energiemangel zusätzlich und setzen neben weiteren Radikalen auch Cytochrom c frei, welches den Signalweg zur Apoptose einleitet.

Exzitotoxizität führt somit sowohl zu akutem Zelltod wie auch zum verzögerten, programmierten Zelltod, der Apoptose. Zusätzlich werden intrazelluläre Signalwege mit der Vermittlung von Entzündungsreaktionen angeregt. Unter anhaltender Exzitotoxizität kommt es zu einer Ausbreitung des Infarktkerns auf Kosten der Penumbra, wo ebenfalls zunehmend irreversibler Zelluntergang eintritt (Dirnagl et al. 1999, Mehta et al. 2007).

### **2.3.2 Periinfarkt-Depolarisation**

Sowohl in der Kernzone wie auch in der Penumbra des Infarkts depolarisieren die Zellen infolge des Anstiegs der extrazellulären Kaliumkonzentration sowie der Transmitterausschüttung. Aufgrund des Mangels an energiereichen Phosphaten sind die Zellen jedoch nur eingeschränkt zu einer Repolarisation in der Lage. In der Penumbra folgen wiederholte Depolarisationen aufeinander, welche in einem höheren Energiebedarf der Zellen resultieren. Die eingeschränkte Perfusion kann den gesteigerten Energiebedarf nicht ausgleichen. Im Verlauf entwickelt sich somit auch in der Penumbra eine zunehmende Hypoxie mit terminaler Depolarisation (Hossmann 1996). Messungen in Tiermodellen zeigen, dass mit der Anzahl der Depolarisationen auch die Größe des Infarktes zunimmt (Mies et al. 1993).

### 2.3.3 Oxidativer Stress

Das Gehirn als lipidreiches Gewebe ist besonders empfindlich für oxidativen Stress durch freie Radikale. Radikale entstehen jederzeit physiologischerweise in den Mitochondrien, können aber in der Regel durch das antioxidative System abgefangen werden. Infolge des Einstroms von Calcium in durch Hypoxie geschädigte Zellen wird jedoch die neuronale Stickstoffmonoxid-Synthetase (nNOS) aktiviert, welche zusätzlich zur Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) beiträgt. Vermehrte NO-Freisetzung führt dann zur Bildung weiterer Radikale der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS). Zu den ROS gehören unter anderem das Superoxid-Anion ( $O_2^-$ ), Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) und das Hydroxyl-Radikal ( $OH^\cdot$ ). Die entstandenen Radikale schädigen neben Lipiden in Membranen auch Proteine und DNA der Zellen und führen so zur Entstehung toxischer Abbauprodukte und Bildung weiterer Radikale. Die Kapazität der zelleigenen antioxidativen Mechanismen ist dann nicht mehr ausreichend. Zunehmende Schäden führen letztendlich zum Zelluntergang durch Nekrose (Mehta et al. 2007).

Neben direkt toxischen Wirkungen können ROS auch proinflammatorische Gene aktivieren und damit zum Beispiel die Expression von Adhäsionsmolekülen triggern, welche die Adhäsion von Leukozyten und damit deren Einwanderung in die Infarktzone ermöglichen (Lakhan et al. 2009).

### 2.3.4 Entzündungsreaktion

Infolge der erhöhten Calciumkonzentration werden über *second-messenger*-Systeme Transkriptionsfaktoren synthetisiert, welche die Expression pro-inflammatorischer Gene induzieren und somit die Bildung von Entzündungsmediatoren wie Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) und Plättchenaktivierender Faktor (PAF) fördern. Diese bewirken an Endothelzellen die Produktion von Adhäsionsmolekülen, welche die Extravasation der Leukozyten (neutrophile Granulozyten gefolgt von Monozyten und Makrophagen) ins Gewebe ermöglichen. Im Gewebe werden die Leukozyten durch Chemotaxis weiter ans Ziel geführt (Dirnagl et al. 1999).

Zusätzlich werden vor Ort mikrogliale Zellen und auch Astrozyten aktiviert, welche dann, neben neutrophilen Molekülen und Wachstumsfaktoren, ihrerseits proinflammatorische Zytokine wie TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , Interleukin-6 (IL-6) und auch zytotoxische Moleküle wie Stickstoffmonoxid, reaktive Sauerstoffspezies und Prostaglandine ausschütten (Lucas et al. 2006). Erhöhte IL-1 $\beta$ -Spiegel korrelieren mit größerem Infarktvolume und stärkerer Ödembildung (Yamasaki et al. 1995).

### 2.3.5 Programmierter Zelltod

Der akute Energiemangel in der Kernzone des Infarkts führt, wie oben bereits aufgeführt, zum Verlust der (osmotischen) Homöostase mit nachfolgender Zellschwellung bis hin zur Lyse der Zelle und damit auch Ausschüttung toxischer Abbauprodukte in den Extrazellularraum. Im Gegensatz dazu verläuft die Apoptose als verzögerter, programmierter und organisierter Zelltod ohne begleitende Entzündungsreaktion. Die Apoptose ist jedoch energieabhängig und damit deutlich häufiger in der Penumbra als in der Kernzone anzutreffen (Charriaut-Marlangue et al. 1996). Apoptose wird über verschiedene Signale in einer Zelle induziert, dazu gehören unter anderem die Bildung großer Mengen freier Radikale, TNF- $\alpha$  und Freisetzung von Cytochrom c aus (durch freie Radikale) geschädigten Mitochondrien. Vor allem durch Cytochrom c erfolgt die Aktivierung von Caspasen, proteolytischen Enzymen welche den organisierten Abbau der Zellstrukturen in Gang setzen (Kowaltowski et al. 2001, Mehta et al. 2007). Es scheint jedoch auch Caspase-unabhängige Wege in die Apoptose zu geben, wobei ein als Apoptose-induzierender Faktor (AIF = *apoptosis-inducing factor*) bezeichnetes Protein, ebenfalls aus Mitochondrien stammend, federführend ist und zur DNA-Fragmentation führt (Hong et al. 2004).

## 2.4 Neuroprotektion

Anhand des Verständnisses der pathophysiologischen Mechanismen des ischämischen Zelluntergangs gab es bereits zahlreiche Versuche, mittels Neuroprotektion therapeutische Ansätze zu entwickeln. In Tiermodellen überzeugende neuroprotektive Substanzen scheiterten jedoch wiederholt an der Umsetzung in klinische Modelle (O'Collins et al. 2006, Mehta et al. 2007, Macleod et al. 2009). Die Ursache dieser insuffizienten Translation vom Tierversuch hin zur Klinik ist multifaktoriell, schuldet aber u. a. auch inadäquater Versuchsdesigns. Auch die Einführung von Qualitätsstandards auf dem Gebiet der experimentellen Schlaganfallforschung (STAIR, *Stroke Therapy Academic Industry Roundtable*, 1999) hat die Situation im Anschluss nicht grundlegend geändert (Macleod et al. 2009). So erwies sich zum Beispiel NXY-059, ein Fänger freier Radikale, zunächst als neuroprotektive Substanz erfolgreich, blieb dennoch in der Phase-III-Studie (SAINT II, *Stroke-Acute Ischemic NXY Treatment II*) wirkungslos (Shuaib et al. 2007). Nach mehr als 1000 experimentell und davon über 100 klinisch getesteten Substanzen bleibt weiterhin einzig die Thrombolyse als erfolgreiches therapeutisches Mittel der Wahl (O'Collins et al. 2006, Ginsberg 2008). Neuere Forschungskonzepte wenden sich daher zunehmend von Neuroprotektion ab und widmen sich vermehrt dem Studium post-ischämischer, neuroregenerativer Ansätze.

## 2.5 Endogene Neurogenese im adulten Gehirn

Entgegen der viele Jahrzehnte vorherrschenden These Ramon y Cajals, untergegangenes Gewebe des zentralen Nervensystems (ZNS) sei unwiederbringlich verloren, lässt sich auch im adulten ZNS Neurogenese beobachten. Das Phänomen adulter Neurogenese wurde zunächst 1965 von Altman und Das beschrieben (Altman und Das 1965). Nachdem diese zuvor in Nagetieren und Affen gezeigt worden war, gelang Eriksson und Mitarbeitern

1998 der Nachweis der Neurogenese auch im menschlichen Gehirn (Eriksson et al. 1998).

Bis heute konnte die endogene Neurogenese vor allem in zwei umschriebenen Regionen des adulten Gehirns gezeigt werden, der Subgranulärzone des Gyrus dentatus in der Hippokampusformation und der subventrikulären Zone (SVZ) der Seitenventrikel.

Im Hippokampus teilen sich neurale Vorläuferzellen, welche am Rande der Körnerschicht im Bereich des Hilus liegen. Anschließend wandern diese neu entstandenen Zellen in die Körnerschicht ein und beginnen dort sich zu differenzieren (Cameron et al. 1993, Gage et al. 1995, Kuhn et al. 1996).

Bei der SVZ handelt es sich um eine Stammzellnische, die nicht nur Astrozyten (Typ-B-Zellen) und Oligodendrozyten sondern auch Neuroblasten (Typ-A-Zellen) beherbergt, welche über den rostralen Migrationsstrom (RMS) in den Bulbus olfactorius einwandern und sich dort zu Interneuronen differenzieren (Gage et al. 1995, García-Verdugo et al. 1998).

Die Anwesenheit der Typ-B-Zellen, welche sich wie ein Gerüst um die migrierenden Typ-A-Zellen legen, scheint dabei für Proliferation und Migration der Typ-A-Zellen notwendig. Zusätzlich findet sich noch ein weiterer Zelltyp, welcher die stärkste Proliferationsrate aufweist, die sogenannten Typ-C-Zellen. Es wird vermutet, dass es sich um Vorläufer der Typ-A-Zellen handelt (García-Verdugo et al. 1998, Lim und Alvarez-Buylla 1999).

Insgesamt ist bisher nur relativ wenig zu den Regelmechanismen und beeinflussenden Faktoren der Neurogenese bekannt. Zu den endogenen physiologischen Faktoren, welche die Neurogenese fördern, gehören unter anderem der direkte Zellkontakt zwischen Typ-A- und Typ-B-Zellen (s. o.), von Astrozyten produzierte Zytokine (Barkho et al. 2006) und Wachstumsfaktoren, wie beispielsweise Endothelwachstumsfaktoren (VEGF) (Gage et al. 1995). Letztere werden im Rahmen einer Hypoxie/Ischämie induziert und stimulieren die Neurogenese (Schanzer et al. 2004). Interessanterweise, und für die vorliegende Arbeit von unmittelbarer Bedeutung, gibt es Hinweise, dass auch miRNAs an der Regulation der Neurogenese beteiligt sind (Cheng et al. 2009). Auch äußere Einflüsse wie Lernen und Gedächtnis, Stress und das Altern scheinen Auswirkungen auf die Neurogenese zu haben (Gould et al. 1999).

## 2.6 Endogene Neurogenese nach zerebraler Ischämie

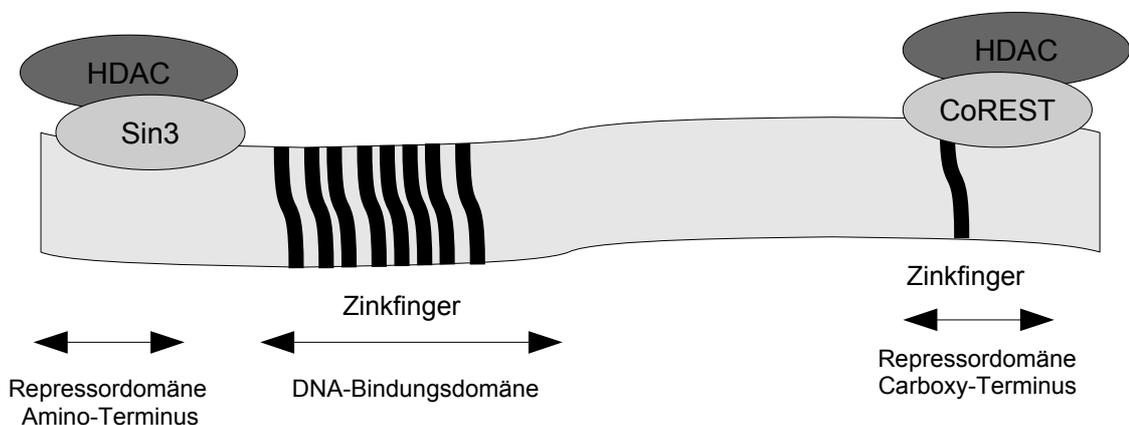
Nach Induktion einer zerebralen Ischämie kommt es ebenfalls zur Induktion der endogenen Neurogenese. Nach transientem Verschluss der Arteria cerebri media (MCAO) in der Ratte mit nachfolgend ischämischer Läsion des Striatums und Teilen des Cortex konnte gezeigt werden, dass endogene neurale Progenitorzellen (NPCs) in der SVZ proliferieren und in das striatale Infarktareal migrieren. Dort prägen sie den Phänotyp der untergegangenen Neurone aus (Arvidsson et al. 2002). Die Quantität der proliferierenden Zellen scheint mit dem Ausmaß der ischämischen Läsion zu korrelieren. Ein größerer Gewebsschaden führt zu einer größeren Anzahl von proliferierenden Zellen (Thored et al. 2006).

Unterschiedliche Studien belegen, dass ein großer Teil der neu entstandenen Neurone schon in den ersten Wochen nach Ischämie wieder zu Grunde geht. Eine vermehrte Proliferation von NPCs aus der SVZ ist jedoch auch 4 Monate nach Ischämie noch nachweisbar (Arvidsson et al. 2002, Thored et al. 2006). Offen bleibt jedoch das Ausmaß der Integration dieser Zellen am Ort der ischämischen Läsion und ihre funktionelle Relevanz.

## 2.7 Der Transkriptionsfaktor REST

Die Differenzierung zu einem neuronalen Phänotyp wird entscheidend durch die Aktivität von Transkriptionsfaktoren beeinflusst. Eine besondere Stellung nimmt dabei der Transkriptionsfaktor REST (*repressor element-1 silencing transcription factor*) ein. REST induziert durch epigenetische Modifikation eine Inhibition der Transkription von Genen. Das REST-Protein besteht aus einer DNA-Bindungsdomäne, welche acht Zinkfinger motive enthält, sowie zwei Repressordomänen, jeweils am Amino- sowie Carboxyterminus des Proteins (siehe Abbildung 1) (Thiel et al. 1998). Die Bindung erfolgt an ein *Silencer-Element*, RE1 bzw. NRSE (*repressor element 1/neuron restrictive silencer*

*element*), innerhalb der DNA (Chong et al. 1995). An die Repressordomänen des REST-Proteins können weitere Korepressoren binden (SinA3 und CoREST), welche wiederum die Bindung von Histondeacetylasen (HDAC) ermöglichen (Ballas et al. 2001, Huang et al. 1999). Im Allgemeinen führt die durch HDACs vermittelte Deacetylierung von Histonen zu einer kompakteren Nucleosomenstruktur, wodurch wiederum die Anlagerung von Aktivatoren der Transkription erschwert wird (Mai et al. 2005). Letztendlich vermittelt REST die Inhibition von Genen, indem es Histondeacetylasen in die entsprechenden DNA-Abschnitte einschleust.



**Abb. 1: Strukturmodell von REST.** Über die DNA-Bindungsdomäne mit acht Zinkfinger-motiven bindet REST an die DNA. Ein weiteres Zinkfingermotiv befindet sich in der Repressordomäne am C-Terminus. Die Korepressoren binden an die Repressordomänen am N- und C-Terminus (nach Thiel et al. 1998, Ballas et al. 2001).

Darüber hinaus fördert CoREST die Bindung von MeCP2 (Methyl-CpG-Bindeprotein) an methylierte DNA, wo es ebenfalls eine repressive Funktion ausübt (Lunyak et al. 2002, Hwang et al. 2012).

Als Zielgene mit REST-Bindungsstellen (RE1/NRSE) zeigen sich vor allem Gene, deren Expression zur Ausprägung des neuronalen Phänotyps notwendig ist (Schoenherr et al. 1996). Diese Gene kodieren unter anderem Proteine für synaptische Vesikel, Ionenkanäle und Rezeptoren für Neurotransmitter (Lunyak et al. 2002, Hwang et al. 2012). Dazu gehört zum Beispiel auch eine Untereinheit des AMPA-Rezeptors, GluR2 (Myers et al. 1998), welche eine

mögliche Calciumpermeabilität des AMPA-Rezeptors verhindert (Kwak und Weiss 2006).

REST inhibiert somit vor allem die Transkription neuronaler Proteine. Analog dazu konnte eine Expression von REST hauptsächlich sowohl in nicht-neuronalen Zellen wie auch in unreifen neuronalen Vorläuferzellen nachgewiesen werden (Chong et al. 1995). Eine Überexpression von REST wiederum verhindert die terminale Differenzierung von Neuronen (Ballas et al. 2001). Die Regulation und zeitgerechte Reduktion der REST-Konzentration während der neuronalen Differenzierung ist somit von entscheidender Bedeutung.

Eine Reduktion der REST-Konzentration erfolgt während der Neurogenese und in maturen Neuronen durch proteasomalen Abbau nach Ubiquitynylierung von REST (Ballas et al. 2005, Westbrook et al. 2008, Kaneko et al. 2014) sowie zusätzlich in maturen Neuronen durch direkte Inhibition des REST-Genes, um den neuronalen Phänotyp aufrechtzuerhalten (Ballas et al. 2001). Darüber hinaus ist auch eine Inhibition durch miRNAs denkbar (Wu und Xie 2006, s.u.). In ausdifferenzierten Neuronen ist REST nur in sehr geringen Mengen vorhanden (Chong et al. 1995) und RE1 bleibt unbesetzt, die Inhibition der Transkription neuronaler Proteine ist also aufgehoben. Es erfolgt jedoch nach wie vor eine Feinregulierung der Expression neuronaler Gene durch CoREST und MeCP2 (Ballas et al. 2005).

### **2.7.1 Expressionsmuster von REST nach zerebraler Ischämie**

Die Exposition von Rattenhirnen gegenüber einer transienten zerebralen Ischämie ist mit einer erhöhten Expression von REST im ischämischen Hippokampus, insbesondere in den vulnerablen Pyramidalneuronen der CA1-Region, vergesellschaftet (Calderone et al. 2003, Formisano et al. 2007). Diese Neurone weisen post-ischämisch eine um zwei bis drei Tage verzögert einsetzende hohe Mortalität auf (Hwang et al. 2012). Gleichzeitig mit dem REST-Anstieg kommt es zu einer verminderten Expression von GluR2 und einer Zunahme Calcium-permeabler AMPA-Kanäle (Calderone et al. 2003, Kwak und Weiss 2006). Die damit einhergehende Verstärkung des

Calciumeinstroms über AMPA-Kanäle schädigt zusätzlich die Zellen (Kwak und Weiss 2006). Durch Ausschalten des REST-Genes konnte in einem Ischämie-Modell *in vitro* eine unverminderte GluR2-Expression und zugleich ein besseres Überleben ebendieser CA1-Neurone erreicht werden (Calderone et al. 2003). Auch *in vivo* konnte bereits in der Ratte post-ischämisch eine Protektion hippokampaler CA1-Neurone erreicht werden, indem über Aktivierung der Casein-Kinase 1 (CK1) eine vermehrte Phosphorylierung von REST unterstützt wird, wodurch dieses der Ubiquitylierung und dem proteasomalen Abbau zugeführt wird und somit eine Reduktion des REST-Levels resultiert (Kaneko et al. 2014).

## **2.8 Expression, biologische Eigenschaften und Funktion von microRNAs**

Durch die Transkription der DNA im Zellkern entstehen zum größten Anteil (etwa 98%) nicht-kodierende RNAs (ncRNA = *non-coding RNA*). MicroRNAs (miRNA) sind die am besten erforschten RNAs unter diesen ncRNAs. Sie sind mit einer Länge zwischen 18 und 24 Nukleotiden kleine, zwischen unterschiedlichen Spezies hochkonservierte Einzelstrang-RNAs (Vemuganti 2010). Auffällig ist für viele miRNAs eine gewebsspezifische Expression. So findet sich u. a. in Mausorganen die miR-1 hauptsächlich im Herzen, miR-122 in der Leber, miR-143 in der Milz, sowie miR-124 im ZNS. Die meisten dieser miRNAs finden sich auch im menschlichen Genom (Lagos-Quintana 2002).

Nach Transkription eines miRNA-Genes entsteht zunächst eine pri-miRNA (*primary miRNA*), welche noch im Zellkern durch einen Mikroprozessorkomplex zu einer pre-miRNA (*precursor miRNA*) gespalten wird. Diese gelangt ins Zytoplasma, wo sie erneut durch eine RNase (Dicer) prozessiert wird (Wu et al. 2012).

Die Funktion der miRNAs liegt in der Feinregulation der Proteinbiosynthese. So führt die Anlagerung einer miRNA, umgeben von einem Multiproteinkomplex miRISC (*miRNA-induced silencing complex*), an den 3' untranslatierten Bereich

(3'UTR = *untranslated regulatory region*) einer Messenger-RNA (mRNA) bei partieller Komplementarität der beiden RNA-Stränge zur Hemmung der Translation. Nahezu vollständige Komplementarität der miRNA und mRNA führt zum Abbau der letzteren (Wienholds und Plasterk 2005, Christensen und Schratt 2009, Wu et al. 2012). Die Blockade der Translation ist reversibel, die Regulation durch miRNAs somit flexibel und dynamisch (Christensen und Schratt 2009). Durch die nur partiell notwendige Komplementarität zu der 3'UTR einer mRNA kann davon ausgegangen werden, dass eine einzige miRNA als Regulator zahlreicher mRNAs fungiert.

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass miRNAs auch in der Lage sind, eine Aktivierung der Translation zu erreichen. Dabei scheint die miRNA-vermittelte Aktivierung der Translation eher in Ruhephasen des Zellzyklus stattzufinden, die Inhibition der Translation dagegen vor allem in proliferierenden Zellen (Vasudevan et al. 2007).

Überdies ist eine direkte Induktion oder Repression der Transkription durch miRNAs möglich, wenn eine Komplementarität zwischen einer miRNA und der Promotorregion eines Gens vorliegt (Place et al. 2008, Hwang et al. 2012). Computergestützte Analysen ermittelten mehr als ein Drittel der menschlichen Gene als potentielle Ziele von miRNAs, die einer entsprechenden Regulation unterliegen könnten (Lewis et al. 2005).

Zu miRNA-regulierten Genen gehören unter anderem auch solche Gene, welche sowohl an den pathologischen Prozessen der Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen wie auch von Tumorerkrankungen beteiligt sind. Dies zeigt sich zum Beispiel am Alzheimer-Precursor-Protein (APP), dessen Gen durch miRNAs reguliert wird und welches im Rahmen der Alzheimer-Erkrankung aber auch bei Hirntumoren überexprimiert wird (Du und Pertsemliadis 2011).

In den Neuronen des zentralen Nervensystems (ZNS) findet sich eine reichhaltige Expression von miRNAs während aller Entwicklungsstadien. Zwei während der Neurogenese zunehmend exprimierte miRNAs sind miR-9 und miR-124 (Christensen und Schratt 2009). MiRNAs tragen zur Differenzierung neuronaler Zelltypen bei, spielen aber auch in reifen Neuronen eine wichtige Rolle, zum Beispiel bei der Beeinflussung synaptischer Form und Plastizität

(Bicker und Schratt 2008, Fiore et al. 2008, Schratt 2009a). Die Möglichkeit der unterschiedlichen räumlichen Verteilung der miRNAs innerhalb einer Zelle gestattet eine lokal spezialisierte Translation und auch Reaktion auf extrazelluläre Reize, zum Beispiel an Dendriten und Synapsen (Schratt 2009b). So wurde unter anderem gezeigt, dass die dendritisch vorkommende miR-134 in Neuronen der Hippokampusformation die Translation der Proteinkinase Limk1 hemmt, welche an der Entwicklung dendritischer Ausläufer beteiligt ist (Schratt et al. 2006).

Synaptische Form und Funktion ist ein grundlegender Bestandteil kognitiver Fähigkeiten wie Lernen und Gedächtnis. Synaptische Fehlfunktion ebenso wie ein verändertes miRNA-Profil findet sich häufig im Rahmen neurodegenerativer Erkrankungen (Christensen und Schratt 2009, Schratt 2009b).

Angesichts des ubiquitären Vorkommens und der vielfachen regulatorischen Funktionen der miRNAs erscheint ein besseres Verständnis ihrer Regulationskreisläufe als eine große Chance, pathologische Prozesse unterschiedlichster Erkrankungen nachvollziehen und therapeutische Strategien entwickeln zu können.

## **2.9 Die miR-124 und ihre biologischen Funktionen**

Die miR-124 ist eine fast ausschließlich im ZNS vorkommende miRNA (Weng et al. 2011). Im Vergleich zu anderen Organen der Maus ist die Konzentration der miR-124 im ZNS hundertfach größer (Mishima et al. 2007). Das Ausmaß der Expression der miR-124 ist altersunabhängig (Selvamani et al. 2012). Dabei ist das Vorkommen von miR-124 nicht in allen Zellen gleichmäßig verteilt. Mit Hilfe von In-situ-Hybridisierung zeigten Cheng et al. eine geringfügige Expression der miR-124 in der subventrikulären Zone (SVZ) und dem rostralen Migrationsstrom (RMS), jedoch ein deutlich stärkeres Expressionsmuster in murenen Neuronen des Bulbus olfactorius. In Oligodendrozyten und Astrozyten konnte hingegen keine Expression der miR-124 nachgewiesen werden (Cheng et al. 2009).

Während miR-124 in neuronalen Vorläuferzellen noch kaum nachweisbar ist, nimmt die Expression im Verlauf der Neurogenese deutlich zu. In-vitro-Studien an embryonalen Stammzellen der Maus zeigten die gleichzeitig auftretende vermehrte Expression der miR-124 und miR-9 bzw. miR-9\* während der Phase der Differenzierung. Eine Blockade der Expression bzw. Überexpression dieser miRNAs führte zu einer Veränderung des Verhältnisses zwischen glialen und neuronalen Zellen, weist also auf die entscheidende Rolle dieser miRNAs während der Differenzierung des Phänotyps hin (Krichevsky et al. 2006).

Diese Bedeutung bestätigte sich auch während der adulten Neurogenese in der SVZ von Mäusen. Unter dem Einfluss der miR-124 wird die neuronale Differenzierung proliferierender Vorläuferzellen (Typ-C-Zellen) hin zu Neuroblasten und der Austritt aus dem Zellzyklus vorangetrieben. Dies wird unter anderem durch Repression von Sox9 durch die miR-124 vermittelt, gleichzeitig erfolgt eine Inhibition von Genen, welche die gliale Differenzierung und die Stammzellerneuerung unterstützen (Cheng et al. 2009).

Weitere nicht-neuronale Faktoren, die durch die miR-124 repressiv reguliert werden, sind unter anderem SCP1 (*small C-terminal domain phosphatase 1*), ein Bestandteil des REST-Repressorkomplexes, dessen Repression die Neurogenese induziert (Visvanathan et al. 2007), und auch PTBP1, ein Repressor neuro-spezifischen Splicings (Makeyev et al. 2007).

Durch die anhaltende Repression nicht-neuronaler Gene dient die miR-124 auch nach Abschluss der Neurogenese dem Erhalt des neuronalen Phänotyps (Christensen und Schratt 2009). Sie ist in ihrer Wirkung gerade gegensätzlich zu der des Transkriptionsfaktors REST, welcher in nicht-neuronalen Zellen die Expression neuronaler Gene verhindert. Die Frage, inwieweit miR-124 und REST sich gegenseitig beeinflussen, liegt also nahe.

Eine Bindungsstelle (RE1) für REST findet sich direkt neben miRNA-Genen, aus denen sowohl miR-124 wie auch miR-9 und miR-9\* hervorgehen. Conaco und Kollegen konnten bereits zeigen, dass durch REST eine Repression dieser drei miRNAs stattfindet (Conaco et al. 2006). Somit ist für die Ausprägung des neuronalen Phänotyps die Abnahme der REST-Konzentration, bzw. -aktivität notwendig, um eine Zunahme der miR-124 zu ermöglichen.

In computergestützten Analysen erwiesen sich Bestandteile des REST-

Repressorkomplexes wie CoREST und MeCP2 als mögliche Ziele der miR-124, miR-9 und miR-9\* (Wu und Xie 2006). Weitergehende Untersuchungen durch Packer et al. (2008) zeigten tatsächlich eine funktionelle Repression von REST durch miR-9, sowie CoREST durch miR-9\*. Neben der indirekten Auswirkung auf REST über Inhibition des REST-Repressorkomplexes (s. o.) ist eine direkte Inhibition von REST durch die miR-124 bisher jedoch nicht nachgewiesen (Stappert et al. 2015).

## 2.10 MiRNA-Expression nach Ischämie

Als Folge einer zerebralen Ischämie zeigt sich eine deutliche Veränderung des Expressionsprofils von miRNAs. Hingegen bleibt die Expression der zur miRNA-Synthese notwendigen RNasen (Ribonukleasen) und Transporterproteine unverändert (Dharap et al. 2009, Hwang et al. 2012).

Einige miRNAs werden verstärkt, beispielsweise die miR-124 in der Penumbra, andere vermindert exprimiert, wodurch nachfolgend ebenso sowohl neuroprotektive als auch pathologische Mechanismen verstärkt werden können (Wu et al. 2012, Sun et al. 2013). MessengerRNAs, welche als Ziele der verändert exprimierten microRNAs in Frage kommen, stehen unter anderem in Zusammenhang mit Entzündungsfaktoren, Transkriptionsfaktoren, Ionenkanälen und auch Rezeptoren für Transmitter (Dharap et al. 2009). So wird zum Beispiel die miR-497 nach zerebraler Ischämie im Gehirn der Maus induziert. MiR-497 scheint die Translation von Bcl-2, einem antiapoptotischen Protein, zu hemmen. Unter Gabe von miR-497-Antagomir zeigten sich niedrigere miR-497-Level und gleichzeitig höhere Bcl-2-Konzentrationen mit korrespondierend niedrigerer Infarktgröße (Yin et al. 2010). Ein ebenfalls erhöhtes Proteinlevel konnte für die miR-21 nach zerebraler Ischämie in der Ratte nachgewiesen werden. In In-vitro-Versuchen erwies sich die miR-21 als neuroprotektiv über einen antiapoptotischen Signalweg (Buller et al. 2010).

Als besondere Eigenschaft der miR-124 wurde bereits eine signifikant erhöhte Konzentration im Blutplasma sechs Stunden nach Ischämie beschrieben.

Aufgrund der Gewebsspezifität und auch Stabilität im Plasma über mehrere Stunden wurde miR-124 bereits als Plasma-Biomarker für zerebrale Schädigungen vorgeschlagen (Weng et al. 2011).

Weitere Arbeiten zeigten zudem veränderte Expressionsprofile von miR-124 nach spinalen Traumen, welche möglicherweise mit dem Ausmaß der Verletzung korrelieren (Zhao et al. 2015). Zum gegenwärtigen Zeitpunkt ist die Rolle von miR-124 in Zusammenhang mit pathologischen Prozessen, insbesondere ischämischen, noch nicht abschließend geklärt.

### 3. Zielsetzung

Sowohl der Transkriptionsfaktor REST wie auch die miR-124 spielen in der neuronalen Differenzierung eine entscheidende und reziproke Rolle. Während die Expressionslevel von REST mit fortschreitender Neurogenese abnehmen, nimmt die Expression von miR-124 zu. Gleichzeitig geht die Induktion einer zerebralen Ischämie mit einer verstärkten Expression von REST in ischämisch geschädigten Neuronen einher.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Frage nachgegangen, ob eine ektopische Applikation von miR-124 Einfluss auf das Ausmaß der post-ischämischen Zellschädigung hat. Dazu wurden zum einen kultivierte Neurone einer Hypoxie *in vitro* ausgesetzt bzw. in männlichen C57BL6-Mäusen eine transiente zerebrale Ischämie induziert. Nachfolgend wurde das Ausmaß des post-hypoxischen bzw. post-ischämischen Zellschadens und die funktionelle Erholung der Versuchstiere in einem Zeitraum von bis zu acht Wochen nach Ischämie analysiert. Des Weiteren wurde der Frage nachgegangen, inwiefern diese ektopische Applikation von miR-124 mit einer Stimulation der post-ischämischen Angiogenese assoziiert ist. Abschließende Untersuchungen beschäftigen sich mit der Frage, welche zugrundeliegenden Mechanismen die oben skizzierten Parameter beeinflussen, wobei ein besonderer Schwerpunkt der Interaktion von miR-124 und dem Transkriptionsfaktor REST gewidmet ist.

## 4. Material und Methoden

### 4.1 Materialien

#### 4.1.1 Chemikalien

2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
5-Bromo-2-deoxyuridin (BrdU)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Amersham ECL Reagenz	GE Healthcare, Amersham Place, Buckinghamshire, England
Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare, Amersham Place, Buckinghamshire, England
Ammoniumpersulfat (APS)	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
B-27 Supplement	Gibco/Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Bromphenolblau	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Chloralhydrat	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Citronensäure-Monohydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol)	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	Merck, Darmstadt, Deutschland
Distickstoffmonoxid ( $\text{N}_2\text{O}$ )	Air Liquide, Düsseldorf, Deutschland
EDTA-Lösung	Biochrom KG, Berlin, Deutschland
Eindeckmittel Immu-Mount ( <i>antifading medium</i> )	Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Eselserum ( <i>Donkey serum</i> - Dks)	Chemicon, Temecula, CA, USA
Essigsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol (EtOH, reinst)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Glucose (40%)	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Glycerin	Roth, Karlsruhe, Deutschland

---

Immersionsöl Immersol TM 518F	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Isofluran (Forene®)	Abbott, Ludwigshafen, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ketamin	Inresa, Freiburg, Deutschland
Kresylechtviolett	Merck, Darmstadt, Deutschland
Laminin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
L-Glutamin	Biochrom AG seromed, Berlin, Deutschland
LIVE/DEAD <i>Viability/Cytotoxicity Kit</i> <i>Component B</i> – Ethidium Homodimer-1	Cambrex Bio Science, Wakersville, MD, USA
Magermilchpulver	Saliter, Obergünzburg, Deutschland
Mannitol	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Natriumacetat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid 0,9%, flüssig	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Neurobasal	Gibco/Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Polyacrylamidgel (Acrylamid, Methylenbisacrylamid)	National Diagnostics, Hessele Hull, England
Poly-L-Ornithin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Protease Inhibitor-Mix	Roche, Mannheim, Deutschland
PSN (Penicillin-Streptomycin-Neomycin)	Gibco/Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
PVDF-Membran	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
SDS	Serva, Heidelberg, Deutschland
Sterofundin®	B. Braun, Melsungen, Deutschland
TEMED	Serva, Heidelberg, Deutschland

Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Transferrin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Tris	USB, Cleveland, OH, USA
Tween 20	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Whatman Filterpapier 3MM	Whatman, Maidstone, Großbritannien
Xylazin, 2%	Riemser, Greifswald, Deutschland
Xylol, 98% vergällt	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ziegenserum (Normal goat serum - NGS)	PAA, Etobicoke, Ontario, Kanada
Zweikomponentenkleber Cyanolit	Panacol-Elosol, Steinbach bei Frankfurt, Deutschland

#### 4.1.2 Verbrauchsmaterialien

12-Well Platten	NUNC, Wiesbaden, Deutschland
Chirurgisches Nahtmaterial Ethilon 60 Polypropylen 4.0	Johnson&Johnson, New Brunswick, NJ, USA
Deckgläser	Menzel-Glas, Braunschweig, Deutschland
Glaspasteurpipetten	WU, Mainz, Deutschland
Kanülen: Sterican	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Objektträger	Menzel-Glas, Braunschweig, Deutschland
Petrischalen, 35 x 10 mm	BD Falcon, Heidelberg, Deutschland
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Reagenzgefäße (0,5 ml, 1,5 ml und 2 ml)	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Spritzen (1 ml)	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Reagenzröhrchen (15 und 50 ml)	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland

### 4.1.3 Antikörper für immunhistochemische Färbungen

Antikörper	Spezies	Hersteller
<i>Monoklonale Primärantikörper</i>		
Anti-BrdU	Maus	Roche, Mannheim, Deutschland
Anti-CNPase	Maus	Millipore, Temecula, CA, USA
Anti-NeuN	Maus	Millipore, Temecula, CA, USA
Anti-GFAP	Kaninchen	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
Anti-BrdU	Ratte	Abcam, Cambridge, Großbritannien
Anti-CD31	Ratte	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
<i>Polyklonale Primärantikörper</i>		
Anti-Dcx	Ziege	Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA
Anti-REST	Kaninchen	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
<i>Lectin</i>		
Isolectin B <sub>4</sub> (IB <sub>4</sub> )		Biozol Diagnostica, Eching, Deutschland
<i>Sekundärantikörper</i>		
Anti-Ratte IgG, Cy5-konjugiert	Ziege	Dianova, Hamburg, Deutschland

---

Anti-Maus IgG, Cy3-konjugiert	Ziege	Dianova, Hamburg, Deutschland
Anti-Kaninchen IgG, Cy3-konjugiert	Ziege	Dianova, Hamburg, Deutschland
Anti-Ziege IgG, Alexa 488-Konjugat	Esel	Invitrogen/Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Streptavidin, Cy3-konjugiert	(Streptomyces avidinii)	Invitrogen/Life Technologies, Carlsbad, CA, USA

## 4.2 Methoden

### 4.2.1 Versuchstiere und Haltung

Für die Experimente wurden 11 bis 13 Wochen alte männliche C57BL6/N-Mäuse der Firma Charles River (Sulzfeld, Deutschland) verwendet. Alle Versuche wurden entsprechend den Vorgaben der örtlichen Behörden (Niedersächsisches Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (LAVES), Versuchsnummer G105/08) und den Richtlinien der Tierexperimentellen Einrichtung der Universitätsmedizin Göttingen durchgeführt. Die Haltung der Tiere erfolgte unter Einhaltung einer zirkadianen Rhythmik bei einer Raumtemperatur von 17 bis 21°C mit Zugang zu Wasser und Futter *ad libitum*.

Postoperativ befanden sich die Käfige für 24 Stunden auf Heizplatten mit einer konstanten Temperatur von 37°C. Zusätzlich erhielten die Tiere täglich 4 ml Sterofundin mit 0,1% Glucose subcutan (s.c.).

### 4.2.2 Generierung der microRNA-Vektoren

Bestandteil der durchgeführten In-vitro- und In-vivo-Experimente ist eine Anhebung des intrazellulären Vorkommens von miR-124. Dies wurde unter Anwendung eines ektopen viralen Konstruktes erreicht, basierend auf dem Adeno-assoziierten Virus-Serotyp 2 (AAV-2), einem nicht-pathogenen Virus, welches bevorzugt Neurone infiziert. Das Virusgenom von AAV liegt als Einzelstrang-DNA vor und ist in der Lage, sich in das Genom der Wirtszelle zu integrieren (Büning et al. 2008). In der vorliegenden Arbeit handelt es sich um AAV-miR-124-exprimierende Vektoren, welche zusätzlich EGFP (*enhanced green fluorescent protein*) exprimieren. Als Kontrolle wurden ausschließlich EGFP-exprimierende Viruskonstrukte verwendet. Sämtliche für diese Arbeit genutzten viralen miRNA-Vektoren wurden durch Prof. Uwe Michel (ebenfalls Neurologie, Göttingen) generiert und großzügig zur Verfügung gestellt (Michel et al. 2005).

### 4.2.3 Experimentelle In-vivo-Gruppen

Erstes Ziel der vorliegenden Arbeit war ein definiertes Screening von drei miRNA-Varianten (miR-124, -132 und -134), welche nach vorausgegangenem Literatur- und Datenbankstudium mutmaßliche Kandidaten für einen neuroprotektiven Effekt nach zerebraler Ischämie der Maus waren. C57BL6-Mäusen wurde 21 Tage vor Induktion des Schlaganfalls das entsprechende Viruskonstrukt in die linke (später ischämische) Hemisphäre injiziert (s. u.). Kontrolltiere erhielten das virale „Leerkonstrukt“, welches nur EGFP exprimierte. Die Induktion der transienten, fokalen zerebralen Ischämie erfolgte, wie unten aufgeführt, an Tag Null. Die Auswertung erfolgte an Tag vier nach zerebraler Ischämie mittels Infarktmetrie. Dabei zeigte sich lediglich nach Applikation von miR-124 eine signifikant reduzierte Infarktgröße im Vergleich zur Kontrolle (siehe auch Kapitel 5.2.2). Folglich wurden alle weiteren Arbeiten der hier vorliegenden Dissertation mit miR-124 durchgeführt.

Die nachfolgenden Experimente (siehe Tabelle 5) beziehen sich auf drei Überlebenszeitpunkte. Es sind dies 4, 28 und 56 Tage nach Induktion der

zerebralen Ischämie. In Gruppe I, mit einem Überleben von vier Tagen, kamen sowohl oben geschildertes Leerkonstrukt wie auch PBS (*phosphate buffered saline*) als Kontrollen zum Einsatz. Da jedoch zwischen den mit PBS und den mit Leerkonstrukt behandelten Tieren keine signifikanten Unterschiede festzustellen waren, wurde für die Langzeitüberleber auf die Generierung von PBS-Gruppen verzichtet und nurmehr das EGFP-exprimierende Virus als Kontrolle eingesetzt (Gruppe II und III). Zur Analyse der post-ischämischen Zellproliferation wurde BrdU einmal täglich als intraperitoneale Injektion von 50 mg pro kg Körpergewicht verabreicht.

**Tab. 5:** Einteilung der Versuchsgruppen nach Überlebenszeit (in Tagen) mit der Anzahl der jeweils operierten Tiere.

	<b>Überleben (in Tagen)</b>	<b>BrdU-Gabe (Tag)</b>	<b>Injektionssubstrat</b>	<b>Anzahl Tiere</b>
Gruppe I	4	1 bis 3	PBS	8
			Viruskonstrukt miR-124	8
			Kontrollvirus	8
Gruppe II	28	8 bis 18	Viruskonstrukt miR-124	12
			Kontrollvirus	12
Gruppe III	56	8 bis 56	Viruskonstrukt miR-124	14
			Kontrollvirus	14

#### 4.2.4 Hypoxisch-Hypoglykämische Zellschädigung kortikaler Neurone

Der Hypoxie-Hypoglykämie-Test (*oxygen-glucose deprivation* = OGD) ermöglicht es, eine zerebrale Ischämie unter In-vitro-Bedingungen zu simulieren. Grundlage für die Zellkultur bildeten kortikale Neurone, die dankenswerterweise von Ulrike Schöll (Neurologie, Göttingen) präpariert und bereitgestellt wurden.

Diese Zellen wurden aus dem Kortex von 18 Tage alten Embryonen trächtiger

Wistar-Ratten gewonnen und mit einer Dichte von 100.000/cm<sup>2</sup> auf mit Poly-L-Ornithin- und Laminin-beschichteten Deckgläschen ausgesät. Auf 12-Well-Platten wurden die Zellen pro Well mit 750 µl Cortex-Medium (100 ml Neurobasal mit 0,5 ml Transferrin 0,1%, 1 ml PSN, 0,25 ml L-Glutamin 0,5 mM und 2 ml B-27 Supplement) bedeckt.

Die Inkubationszeit mit den Viruskonstrukten (welche EGFP und miR-124 exprimieren) betrug fünf Tage vor Induktion des OGD. Dabei wurden pro Well 10<sup>8</sup> Viruskonstrukte in 20 µl PBS ausgesät.

Der OGD wurde unter Hinzunahme eines Mediums, bestehend aus 1 mM Mannitol in Sterofundin (OGD-Medium), mit einer Inkubationsdauer von 120 min in einem Inkubator bei 37°C und einem hypoxischen Luftgemisch (1% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 94% N<sub>2</sub>O) durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen für 24 Stunden in gebräuchlichem Cortex Medium unter Standardzellkulturbedingungen rekultiviert, bevor eine Färbung und Fixierung mit Hilfe des LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity Kit und DAPI erfolgte. Um Überlagerungen der grünen Fluoreszenz aus dem Viruskonstrukt (EGFP) und dem ebenfalls grün fluoreszierenden Farbstoff des LIVE/DEAD Kits zu vermeiden, wurde nur der rot fluoreszierende Farbstoff (*Component B*) des Kits verwendet, welcher nicht vitale Zellen anfärbt. Mit Hilfe der DAPI-Kernfärbung konnte zusätzlich die Gesamtzahl der Zellen ermittelt und somit der Anteil der vitalen Zellen berechnet werden.

#### **4.2.5 Western Blot mit Nachweis von REST**

Zur Quantifizierung der REST-Expression sowohl *in vivo* wie auch *in vitro* wurde ein Western Blot durchgeführt. Die Gehirne von Versuchstieren vier Tage nach Ischämie wurden entnommen und schockgefroren. Die ischämischen linksseitigen Hemisphären (von +1,4 mm bis -1,2 mm ab Bregma) wurden in Lysepuffer (50 mmol/l Tris, pH 8,0, 150 mmol/l NaCl, 1% Triton X-100 und Proteaseinhibitoren) homogenisiert und anschließend zentrifugiert. Ähnlich wurden kortikale Neurone aus der Zellkultur 24 Stunden nach OGD mehrfach mit 10000 g über 5 min zentrifugiert, gewaschen und in Lysepuffer gegeben. Beide Lysate wurden zentrifugiert. Die Überstände wurden mittels SDS-PAGE

aufgetrennt (Laemmli 1970), indem jeweils 40 µg des Proteins mit Probenpuffer zusammengegeben, bei 95°C denaturiert und auf ein Polyacrylamidgel (12%) aufgetragen wurden. Nach Übertragen der Proteine auf eine Membran aus Polyvinylidenfluorid (PVDF) in einer Semidry-Blotkammer mit Hilfe eines transversal zur Geloberfläche angelegten elektrischen Feldes, wurde diese für eine Stunde bei Raumtemperatur (RT) in Milchpulverlösung (5% Milchpulver in TBS-T (0,1% Tween 20 + TBS)) zur Blockade unspezifischer Bindungsstellen gegeben. Anschließend erfolgte zunächst die Inkubation mit einem polyklonalen Kaninchen-Antikörper gegen Aminosäuren (1-290) des REST-Moleküls (1:500, Santa Cruz Biotechnology, Deutschland). Nachfolgend wurde ein mit Peroxidase gekoppelter, sekundärer Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper (1:2000, Santa Cruz Biotechnology) aufgetragen und nach mehreren Waschschritten in ECL (*enhanced chemiluminescence*)- Lösung getaucht. Die durch die Peroxidase entstandene Chemilumineszenz wurde mit einem Autoradiographiefilm (Amersham-ECL-Hyperfilm) detektiert.

#### **4.2.6 Stereotaktische intrastriatale Injektion**

21 Tage vor Induktion der zerebralen Ischämie wurden die Viruskonstrukte oder PBS durch stereotaktische Injektion in das Striatum der linken Hemisphäre der Tiere verabreicht. Nach vorangegangener Narkose der Tiere auf Basis von Ketamin (5%) und Xylazin (5%) (i.p.) wurde die Injektion 0,4 mm rostral und 1,8 mm lateral von Bregma in einer Tiefe (d. h. ventral von Bregma) von 3,7 mm durchgeführt. Zum Aufsuchen der Injektionsstelle wurde ein Injektionsrahmen von KOPF Instruments (USA) genutzt. Nach Freilegen von Bregma durch Hautinzision erfolgte die Trepanation der Schädelkalotte und Applikation von 10<sup>9</sup> Viruskonstrukten in 5 µl PBS (Injektionsrate von 0,75 µl/min) mit Hilfe einer Hamilton Spritze (10 µl, Hamilton, Schweiz). Die Spritze wurde nach Abschluss der Injektion zunächst 5 min unverändert *in situ* belassen und danach langsam entfernt. Die Hautinzision wurde regelrecht durch Naht verschlossen.

#### **4.2.7 Induktion der zerebralen Ischämie (Fadenokklusionsmodell)**

Die Tiere wurden mit einem Gasgemisch aus Distickstoffmonoxid mit 30% Sauerstoff und 0,8 bis 1,5% Isofluran anästhesiert. Eine Heizmatte als Unterlage diente dem Erhalt einer konstanten Körpertemperatur. Eine fiberoptische Messsonde (Perimed, Schweden) ermöglichte die Laser-Dopplermessung des zerebralen Blutflusses im Versorgungsgebiet der linken Arteria cerebri media (ACM). Anhand eines ventralen, links paramedian verlaufenden Hautschnitts am Hals und stumpfer Präparation wurde die linke Arteria carotis communis (ACC) bis zur Carotisgabel freigelegt. Die ACC wurde zunächst proximal ligiert. Dies gilt auch für die Arteria carotis externa (ACE) direkt oberhalb der Carotisgabel. Nach transientem Verschluss der Arteria carotis interna (ACI) durch Aufsetzen eines neurochirurgischen Clips (Aesculap, Deutschland) direkt distal der Carotisbifurkation, wurde die ACC im nun blutleeren Raum durch einen kleinen Schnitt eröffnet. Daraufhin wurde ein mit Silikon beschichteter Nylonfaden (Docol, USA, 180-200 µm Durchmesser an der Fadenspitze) eingeführt, der Clip entfernt und der Faden über die ACI bis in den proximalen Abgang der linken ACM vorgeschoben und somit der Blutfluss vorübergehend unterbunden. Mit Hilfe der Messsonde wurde kontrolliert, ob eine Reduktion des Blutflusses unter 30% des Ausgangswertes erreicht wurde. Nach einer Ischämiezeit von 45 min wurde der Nylonfaden wieder entfernt. Als Einschlusskriterium galt eine Mindestreperfusion von 80% des präoperativen Ausgangswertes. Schließlich wurde die Messsonde entfernt und die Wunden an Hals und Kopf durch Hautnähte verschlossen.

#### **4.2.8 Analyse der post-ischämischen Gewebeschädigung**

Die Analyse der post-ischämischen Schädigung erfolgte an Tag vier nach Induktion der Ischämie. Zur Bestimmung des Infarktolumens und der Größe des Hirnödems wurden die Tiere nach Einleitung einer tiefen Anästhesie mit Isofluran getötet und dekapitiert. Die Hirne wurden entnommen, in 2 mm dicke koronare Schnitte zerteilt und mittels TTC (2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid, 2%) angefärbt.

Die Wirkungsweise der TTC-Färbung basiert auf einer Redox-Reaktion in

vitalen Zellen, wodurch TTC zu einem roten Farbstoff reduziert wird. In nicht vitalem Gewebe findet diese Reaktion nicht statt und das Gewebe bleibt blass/weiß.

Nach Anfärbung der Schnitte und 24-stündiger Nachfixierung in PFA (4%), konnten die Infarkt volumina an digitalisierten Abbildern mit Hilfe des Programms ImageJ ausgemessen werden. Dabei wurde jeweils die Größe des ungeschädigten Hirnareales der ischämischen Hemisphäre von der Größe der gesamten kontralateralen Hemisphäre subtrahiert. Die Ausprägung des Gehirnödems ließ sich durch einen Vergleich der Gesamtgröße der geschädigten, ipsilateralen Hemisphäre und der kontralateralen Hemisphäre messen.

Neben der Analyse des Infarktvolumens an nativem Gewebe mit Hilfe der oben skizzierten TTC-Färbung erfolgte die erweiterte Analyse der Gewebeschädigung im Hinblick auf post-ischämische mikrogliale Aktivierung und neuronale Dichte an Paraffinschnitten. Den Tieren wurde zu Versuchsende eine Überdosis von 30%igem Chloralhydrat (420 mg pro kg Körpergewicht) intraperitoneal verabreicht. Nach Eröffnung von Thorax und Abdomen, erfolgte eine transkardiale Perfusion mit 50 ml PBS und 50 ml PFA (4%). Die Hirne wurden entnommen, 24 Stunden in PFA (4%) nachfixiert und anschließend in 2 mm dicke koronare Schnitte geteilt, entwässert und zuletzt mit flüssigem Paraffin imprägniert. Nach dem Anfertigen von Paraffinblöcken an einer Ausgießstation (Thermo Scientific, USA), wurden diese am Mikrotom 2 µm dünn aufgeschnitten. Die gewonnenen Schnitte wurden zunächst in ein Wasserbecken (RT) gegeben, in 50°C warmem Wasser geglättet und anschließend auf beschichtete Objektträger aufgezogen. Das Paraffin wurde durch zweistündiges Trocknen der Schnitte im Inkubator bei 60°C reduziert.

Zur Darstellung der Mikroglia wurden die Schnitte entparaffiniert und eine Färbung mit einem biotinylierten IB<sub>4</sub>-Antikörper (1:25) und einem Cy3-konjugierten Streptavidin-Reagenz (1:50) in einem 2-Tages-Protokoll (siehe auch Kapitel 4.2.9) durchgeführt. Die Analyse der post-ischämischen neuronalen Dichte erfolgte zu chronischen Zeitpunkten der Erkrankung anhand einer Kresylviolett färbung. Hierzu wurden die entparaffinierten Schnitte für 15 min in Färbelösung (5 g Kresylviolett gelöst in 100 ml Ethanol (100%) und 500

ml dH<sub>2</sub>O) angefärbt. Anschließend, nach Durchlaufen der aufsteigenden Alkoholreihe, wurden die Schnitte mit einem wasserfreien Eindeckmedium eingedeckt.

#### **4.2.9 Immunhistochemische Analysen**

Die umfangreichen immunhistochemischen Färbungen zielten nicht nur auf die Analyse des post-ischämischen Gewebeschadens ab (s. o.), sondern beinhalteten zudem sowohl die Analyse der endogenen Angiogenese wie auch die Expression von REST. Es wurden Doppelfärbungen gegen BrdU und verschiedene neurale bzw. endotheliale Differenzierungsmarker durchgeführt. Eingesetzt wurden dabei Färbungen mit NeuN zur Darstellung von muren Neuronen, CNPase für Oligodendrozyten, GFAP für Astrozyten, Dcx als Marker für immature Neurone und CD31 zur Darstellung von Endothelzellen. Ergänzend wurde jeweils eine DAPI-Färbung durchgeführt.

Gefärbt wurden Paraffinschnitte (siehe Kapitel 4.2.8). Diese wurden zuerst in Xylol entparaffiniert (2x10 min) und anschließend über die absteigende Alkoholreihe wieder hydriert. Kochen für 15 min in Citratpuffer (0,2%) diente der Antigendemaskierung. Danach wurde der Serumblock (PBS mit 0,3% Triton X-100 und 10% NGS bzw. Dks) für eine Stunde bei RT aufgetragen. Die Inkubation mit den Primärantikörpern wurde darauffolgend über 18 Stunden bei 4°C durchgeführt. Nach Waschen in PBS (3x5 min) wurde mit dem Sekundärantikörper inkubiert (eine Stunde bei Raumtemperatur), anschließend wurde wieder mit PBS gewaschen (3x5 min). Zuletzt erfolgte eine Färbung über 5 min in einer DAPI-Lösung (2 µg/ml) und wiederholtes Waschen in PBS (4x5 min). Die Schnitte wurden mit Immu-Mount (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland) eingedeckt und bei 4°C lichtgeschützt aufbewahrt.

Die Inkubation der Schnitte mit den entsprechenden Primärantikörpern (siehe Tabelle 6) erfolgte jeweils über Nacht (4°C), gefolgt von wiederholten Waschvorgängen. Die Sekundärantikörper wurden für eine Stunde bei RT appliziert. Die zu färbenden Schnitte befanden sich stets in einer feuchten Kammer. Die Verdünnungen der einzelnen Antikörper sind in Tabelle 6 nochmals ausführlich dargestellt.

**Tab: 6:** Antikörper und Verdünnungen

	<b>Primärantikörper</b>	<b>Sekundärantikörper</b>
Dcx+BrdU	Maus-anti-BrdU, 1:400 Ziege-anti-Dcx, 1:50	Esel-anti-Maus Cy3, 1:200 Esel-anti-Ziege Alexa 488, 1:50
<b>Verdünnung in:</b>	PBS mit 2% Dks und 0,3% Triton X-100	PBS mit 10% Dks
CNPase+BrdU	Ratte-anti-BrdU, 1:50 Maus-anti-CNPase, 1:400	Ziege-anti-Ratte Cy5, 1:100 Ziege-anti-Maus Cy3, 1:200
GFAP+BrdU	Ratte-anti-BrdU, 1:50 Kaninchen-anti-GFAP, 1:1000	Ziege-anti-Ratte Cy5, 1:100 Ziege-anti-Kaninchen Cy3, 1:400
IB <sub>4</sub>	Ratte-anti-BrdU, 1:50 IB <sub>4</sub> biotinyliert, 1:25	Ziege-anti-Ratte Cy5, 1:100 Streptavidin Cy3, 1:50
NeuN+BrdU	Tag 1: Maus-anti-NeuN, 1:200 Tag 2: Ratte-anti-BrdU, 1:50	Tag 2: Ziege-anti-Maus Cy3, 1:200 Tag 3: Ziege-anti-Ratte Cy5, 1:100
REST	Kaninchen-anti-REST, 1:75	Ziege-anti-Kaninchen Cy3, 1:400
CD31	Ratte-anti-CD31, 1:200	Ziege-anti-Ratte Cy5, 1:100
<b>Verdünnung in:</b>	PBS mit 2% NGS und 0,3% Triton X-100	PBS mit 10% NGS

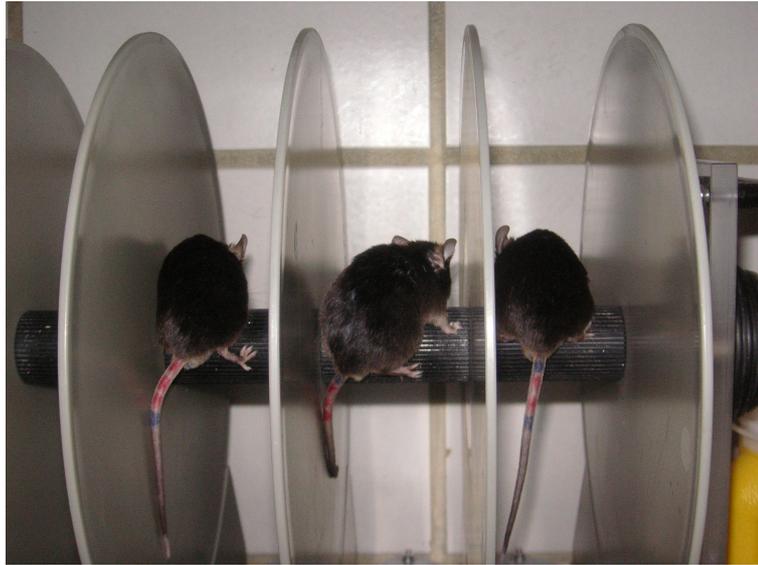
#### **4.2.10 Analyse post-ischämischer Funktionsdefizite**

Post-ischämische neurologische Defizite im Hinblick auf Motorkoordination und kognitive Störungen wurden anhand einer Serie von etablierten Verhaltenstests dezidiert untersucht (Doepfner et al. 2014).

Diese Tests implizierten den Rota Rod-Test, den Tight Rope-Test sowie einen modifizierten Water Maze-Test. Die Tests wurden ausschließlich an Tieren der Gruppe III (Überleben 56 Tage) durchgeführt. Für die Durchführung des Rota Rod-Tests und auch des Tight Rope-Tests wurden die Tiere zunächst vor Induktion der zerebralen Ischämie trainiert. An den Tagen 4, 7, 14, 28 und 56 nach Ischämie fanden die eigentlichen Messungen jeweils doppelt statt. Der Water Maze-Test wurde an den Tagen 26 bis 28 und 54 bis 56 nach zerebraler Ischämie durchgeführt.

##### *Rota Rod-Test*

Im Rota Rod-Test werden die Tiere auf einen rotierenden Zylinder (TSE Systems, Deutschland) mit 3 cm Durchmesser gesetzt (siehe Abbildung 2). Dieser beschleunigt von 4 auf 40 Umdrehungen pro Minute über einen Zeitraum von 260 s. Die maximale Testzeit beträgt 300 s, und es wird die Zeit bis zum Herunterfallen des Tieres gemessen (als Mittelwert von zwei Durchgängen pro Zeitpunkt).



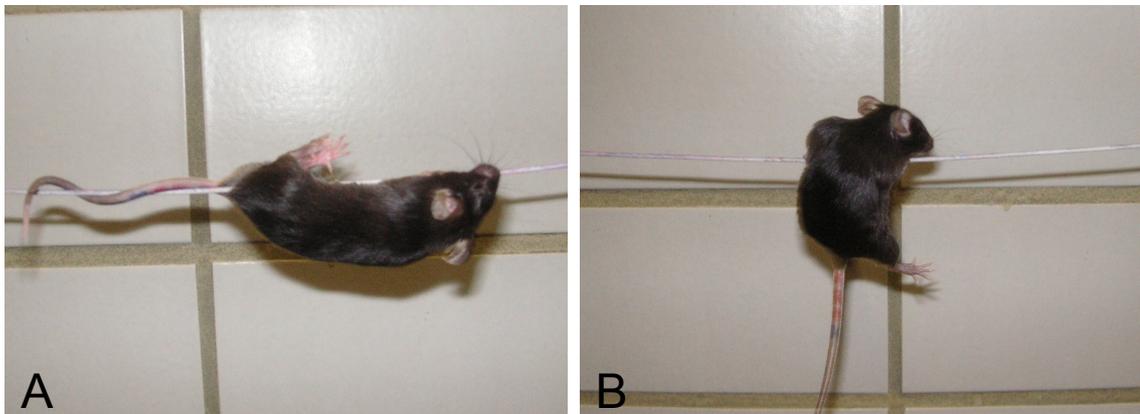
**Abb. 2: Versuchstiere auf dem Rota Rod.** Mit Hilfe eines Schalters wird die Zeitmessung bei Herabfallen einer Maus sofort gestoppt.

### *Tight Rope-Test*

Der Aufbau für den Tight Rope-Test besteht aus einem 60 cm langen, straff horizontal gespannten Seil, an dessen Enden sich zwei Plattformen befinden. Die Höhe des Seils ist so gewählt, dass die Tiere es vermeiden herabzufallen. Kommt es dennoch zum Herabstürzen, schützt ein weicher Untergrund vor Verletzungen. Zu Beginn des Tests werden die Tiere mit den Vorderpfoten auf die Mitte des Seils gesetzt. Zunächst müssen die Tiere die herabhängenden Hinterpfoten aus eigener Kraft ans Seil bringen. Gesunde Mäuse schaffen es bei unbeeinträchtigter Koordination unter Einsatz aller vier Pfoten und des Schwanzes, zügig ans Ende des Seils zu klettern, um die Plattform zu erreichen. Nach zerebraler Ischämie ist dies den Tieren meist nur eingeschränkt möglich (siehe Abbildung 3). Gemessen wird die Zeit bis zum Erreichen der Plattform, bei Nichterreichen wird der Versuch nach 60 s gestoppt. Die Bewertung erfolgt anhand eines Punktwertes, wobei die Zeit auf dem Seil und das Erreichen, bzw. Nichterreichen der Plattform berücksichtigt wird. Dabei gibt es für Erreichen der Plattform je nach benötigter Zeit zwischen 11 und 20 Punkten, bei Nichterreichen ohne Herabzufallen 10 Punkte, und bei Herunterfallen je nach Verweildauer auf dem Seil 0 bis 9 Punkte (siehe Tabelle 7).

**Tab. 7:** Auswertung des Tight Rope-Tests

Zeit auf dem Seil (s)	Punkte, Ziel erreicht	Punkte, Ziel nicht erreicht
1 – 6	20	1
7 – 12	19	2
13 – 18	18	3
19 – 24	17	4
25 – 30	16	5
31 – 36	15	6
37 – 42	14	7
43 – 48	13	8
49 – 54	12	9
55 – 60	11	10

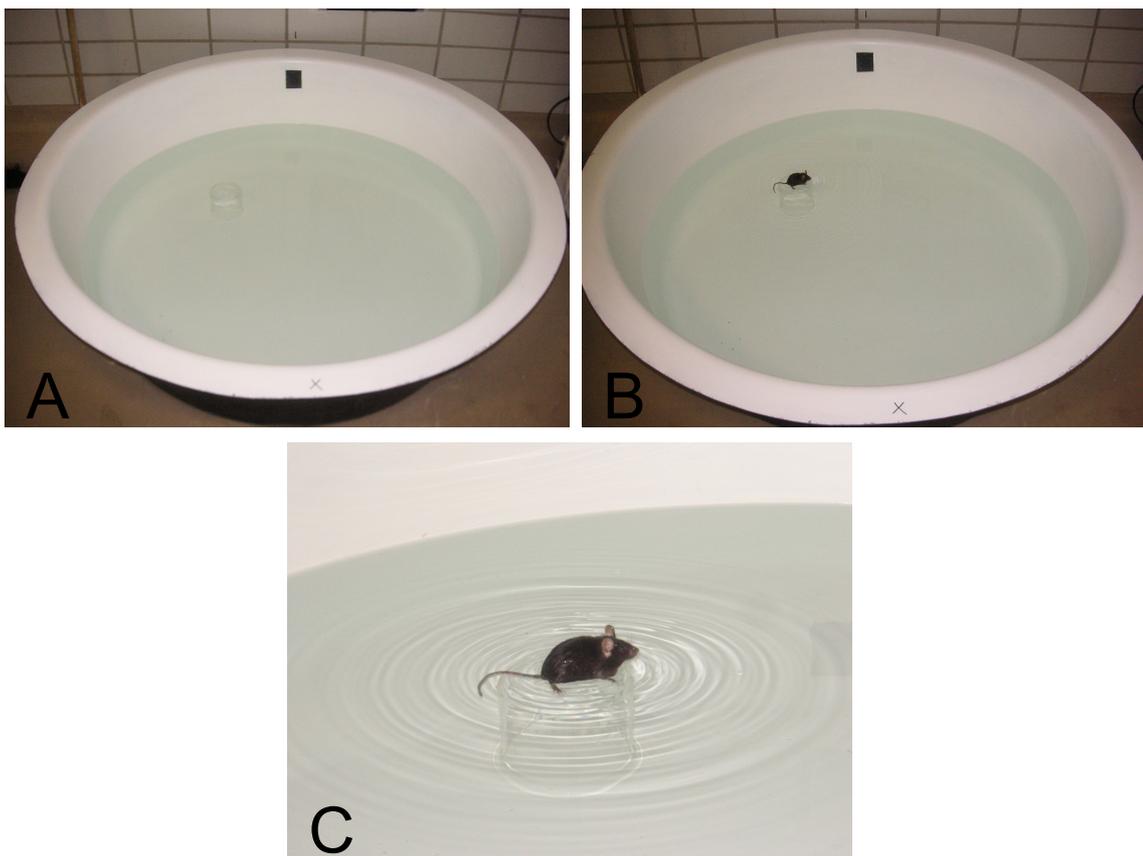


**Abb. 3: Die Maus im Tight Rope-Test.** Unter Einsatz aller vier Pfoten und des Schwanzes gelingt eine zügige Fortbewegung am Seil zur Plattform (A), Tieren nach zerebraler Ischämie fehlt es oft an Kraft und Koordination (B).

#### *Water Maze-Test nach Morris*

Der modifizierte Water Maze-Test nach Morris (1984) wurde an den Tagen 26 bis 28 und 54 bis 56 nach Ischämie durchgeführt. In einem mit Wasser gefüllten runden Becken mit einem Durchmesser von 1 m und 30 cm Wassertiefe befindet sich einen Zentimeter unterhalb der Wasseroberfläche eine für die

Tiere nicht sichtbare Plattform. Die Tiere werden an immer derselben Stelle ins Wasser gesetzt. Wird die Plattform innerhalb der maximalen Testzeit pro Durchlauf (90 s) nicht aufgefunden, werden die Tiere dahin geleitet und 30 s dort belassen (siehe Abbildung 4). Der Test wird an jedem Versuchstag achtmal durchgeführt, wobei zwischen den ersten vier Durchgängen und den letzten vier eine Pause von mindestens vier Stunden eingehalten wird. An Tag 28 und 56 wird durch Umsetzen der Plattform während der ersten vier Durchgänge die Aufgabe erschwert (so genannter *task switch*). Für die nachfolgenden Durchgänge wird die Plattform an die ursprüngliche Position zurückversetzt. Grundsätzlich wird die Dauer bis zum Erreichen der Plattform gemessen. Tiere, die die Plattform nicht erreicht haben, werden mit „90 s“ bewertet.



**Abb. 4: Versuchsanordnung des Water Maze-Tests.** X-Markierung am Rand des Wasserbeckens an der Stelle, wo die Mäuse ins Wasser gesetzt werden und eine einzelne schwarze, für die Tiere sichtbare Markierung zur Orientierung (A). Nach Erreichen der Plattform wird die Maus für 30 s dort sitzen gelassen (B, C).

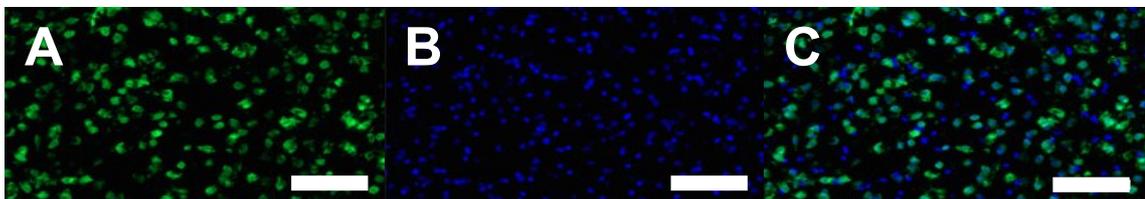
#### **4.2.11 Statistik**

Alle aufgeführten Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben. Der Student t-Test wurde zum Vergleich zweier Gruppen eingesetzt, mehrere Gruppen wurden durch die Durchführung der ANOVA-Varianzanalyse und dem Tukey's-Test verglichen. Als statistisch signifikant wurden p-Werte  $<0,05$  gewertet.

## 5. Ergebnisse

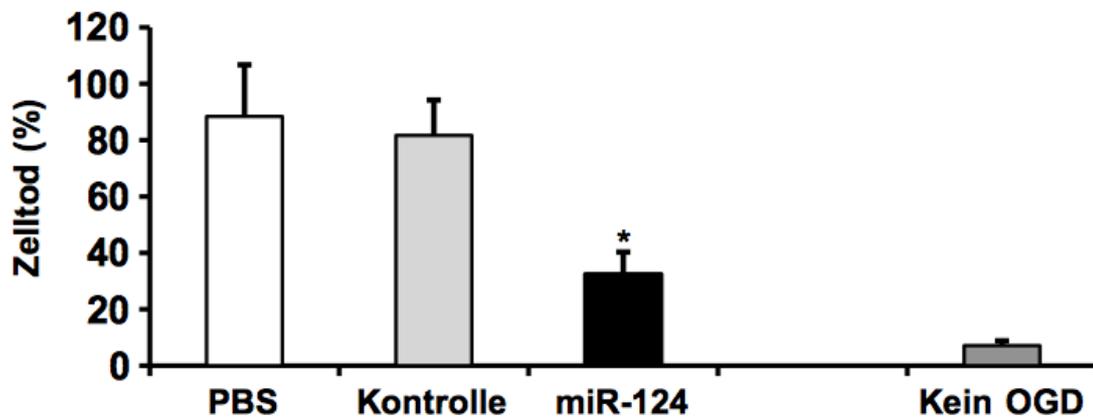
### 5.1 Neuroprotektion durch miR-124 *in vitro*

Zunächst erfolgte eine Inkubation kortikaler Neurone in Zellkultur mit dem oben dargestellten Viruskonstrukt. Anhand der EGFP-Expression ließ sich überprüfen, ob eine erfolgreiche Transfektion durch das Viruskonstrukt stattgefunden hatte. Dabei zeigte sich bereits nach einer fünftägigen Inkubation mit miR-124 ebenso wie mit dem Kontrollvirus (nur EGFP-Expression) eine submaximale Transfektionsrate unter Standardzellkulturbedingungen (siehe Abbildung 5). Die nachfolgenden Versuche wurden deshalb immer fünf Tage nach Aussaat des Viruskonstruktes durchgeführt.



**Abb. 5: Transfektion in kortikalen Zellen in der Zellkultur.** In der Darstellung abgebildet ist die viruseigene EGFP-Expression in kortikalen Neuronen nach fünftägiger Inkubation mit dem Viruskonstrukt (108 pfu), EGFP (A), DAPI (B), EGFP und DAPI (C), Maßstab 50  $\mu$ m.

Als In-vitro-Äquivalenz zur zerebralen Ischämie erfolgte die Durchführung eines 45-minütigen Hypoxie-Hypoglykämie-Tests (OGD) mit anschließender Reaktivierung der Zellen über 24 Stunden unter Standardzellkulturbedingungen und Analyse der Zelltodraten. Der neuroprotektive Effekt von miR-124 zeigte sich anhand einer signifikant reduzierten Zelltodrate nach OGD gegenüber Behandlung mit PBS und dem EGFP-exprimierenden Kontrollvirus (siehe Abbildung 6).

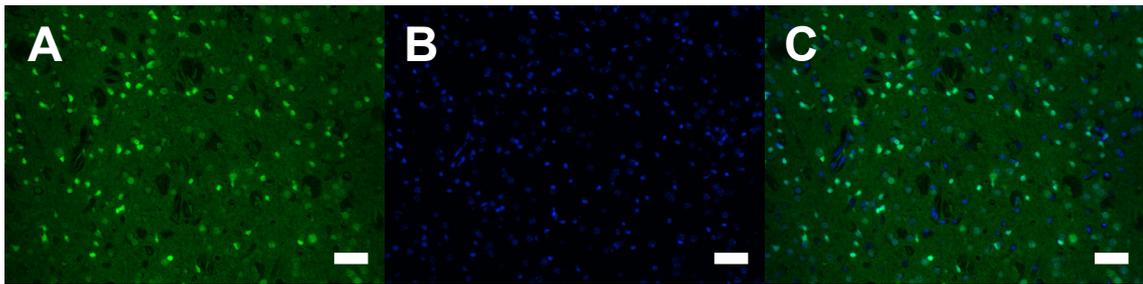


**Abb. 6: Neuroprotektion kultivierter Neurone durch miR-124 gegenüber einer Hypoxie-Hypoglykämie-Testung (OGD).** Fünf Tage nach Transfektion kortikaler Neurone in Zellkultur mit dem Viruskonstrukt wurde nach Durchführung des OGD und 24-stündiger Reinkultivierung in Standardmedium der Versuch beendet und die Zellen gefärbt. Dargestellt sind Zelltodraten bei mit miR-124 behandelten Zellen sowie Kontrollen (PBS und Kontrollvirus) und die Zelltodrate ohne OGD. \*Signifikant unterschiedlich zu Kontrollen,  $p < 0,05$ .

## 5.2 MiR-124-induzierte Neuroprotektion *in vivo*

### 5.2.1 Transfektion *in vivo*

Auf dem Boden der erzielten In-vitro-Daten wurde zunächst die Transfektionsrate des viralen Vektors *in vivo* untersucht. Dazu wurde den Versuchstieren das Viruskonstrukt bzw. das Kontrollvirus oder PBS durch stereotaktische Injektion verabreicht. 21 Tage nach Injektion angefertigte Paraffinschnitte zeigten anhand der grünen Fluoreszenz im Striatum der linken Hemisphäre die erfolgreiche Transfektion an (siehe Abbildung 7).

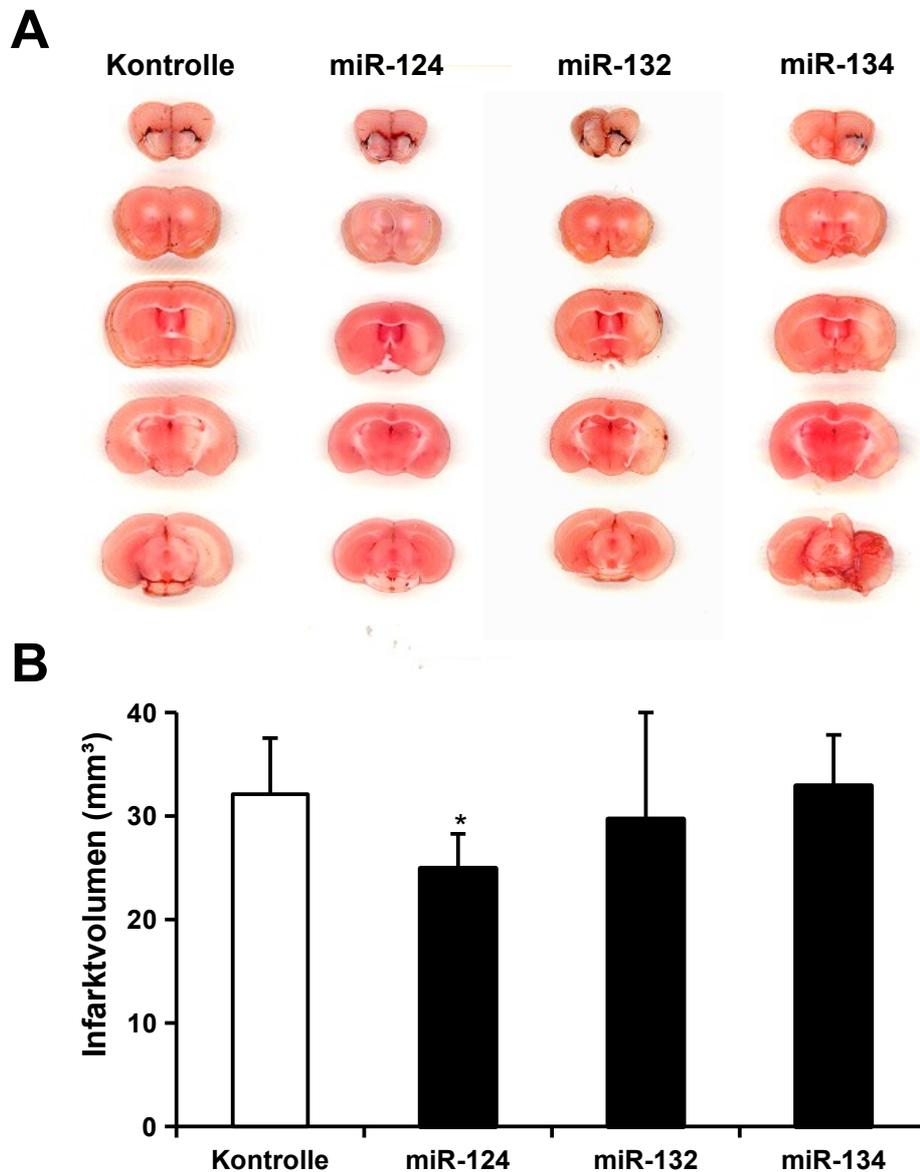


**Abb. 7: Transfektionsrate im Striatum.** Die Tiere wurden 21 Tage nach intrastriataler Injektion des Viruskonstruktes ( $10^9$  pfu/Tier) getötet, Paraffinschnitte angefertigt und mit DAPI gefärbt. Anhand der viruseigenen EGFP-Expression konnte die umfassende Transfektion der striatalen Zellen nachgewiesen werden (EGFP (A), DAPI (B), EGFP und DAPI (C)), Maßstab 50  $\mu\text{m}$ .

### 5.2.2 Screening unterschiedlicher Viruskonstrukte

Vor dem Hintergrund der erzielten signifikanten Neuroprotektion durch miR-124 *in vitro* wurden zudem *in vivo* weitere mutmaßlich neuroprotektive miRNAs auf ihren Einfluss im Schlaganfallmodell der Maus untersucht. Wie im Abschnitt „Material und Methoden“ bereits dargelegt wurden die zu untersuchenden viralen miRNA-Konstrukte (miR-124, miR-132 und miR-134 und Leervektor als Kontrolle) 21 Tage vor Induktion der zerebralen Ischämie in das zukünftige ischämische, linke Striatum injiziert. Als Messparameter diente die Bestimmung der Infarktgröße am Tag vier nach dem Schlaganfall.

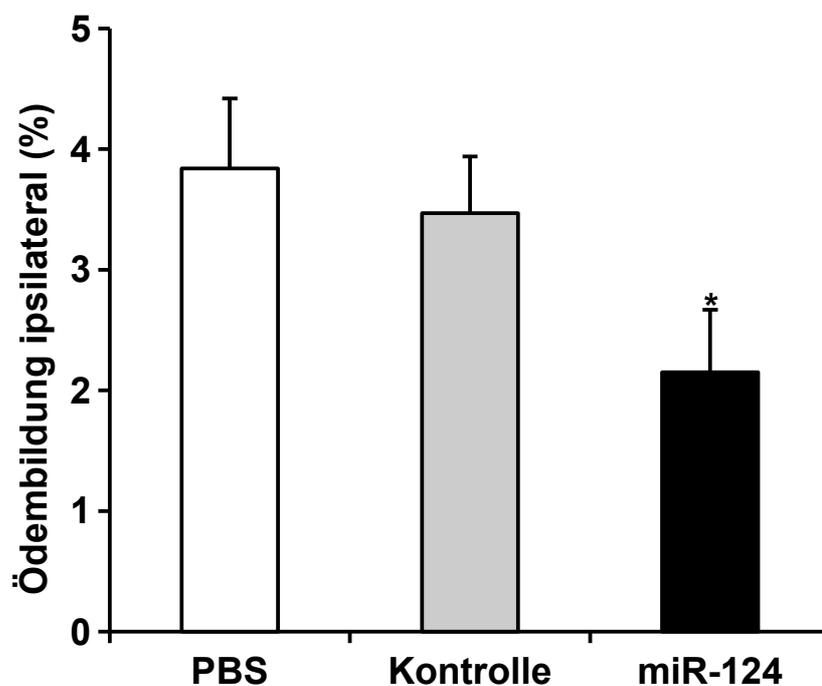
In der Auswertung zeigte sich eine signifikant geringere Infarktgröße bei den mit miR-124 behandelten Tieren (siehe Abbildung 8). Die anderen miRNA-Konstrukte konnten keinen signifikanten neuroprotektiven Effekt erzielen. Diesen Ergebnissen entsprechend wurde nachfolgend ausschließlich miR-124 eingesetzt.



**Abb. 8: MiRNA-Screening nach zerebraler Ischämie.** **A** TTC-gefärbte Hirnschnitte vier Tage nach Ischämie. Dargestellt sind beispielhaft einzelne Tiere der jeweiligen Versuchsgruppe. Die nicht angefärbten Areale entsprechen dem Infarktareal in der linken Hemisphäre. **B** Die Auswertung der Infarktgröße erfolgte mit Hilfe des Programms Image J an den gefärbten Hirnschnitten. Dargestellt sind die Infarktvolumina der jeweiligen Versuchsgruppe und Kontrollgruppe. \*Signifikant unterschiedlich zu Kontrollen,  $p < 0,05$ .

### 5.2.3 Nachweis der Neuroprotektion anhand der Ödembildung

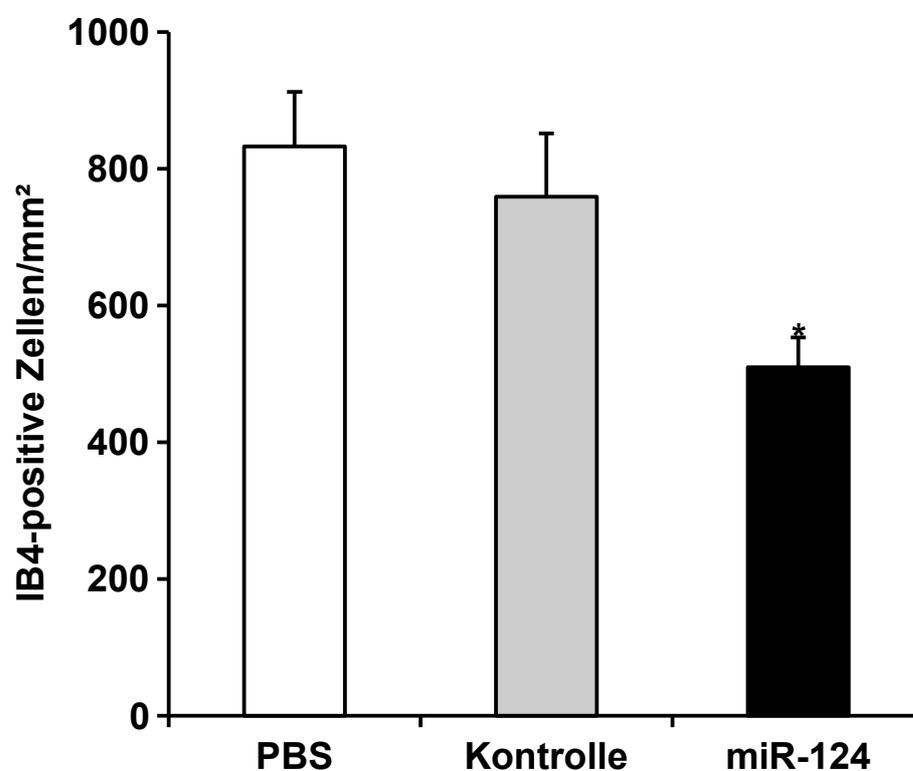
Um die im Screening allein an der Infarktgröße gemessene Neuroprotektion noch anhand weiterer Parameter bezüglich der Gewebsschädigung zu verifizieren, erfolgte ergänzend eine Analyse der Ödembildung in Versuchstieren vier Tage nach Induktion der Ischämie. Die zugrundeliegenden Daten wurden ebenfalls an TTC-gefärbten Hirnschnitten mit Hilfe von Image J ermittelt. Dabei ließ sich auch hier die Neuroprotektion im Sinne einer signifikant reduzierten Ödembildung (siehe Abbildung 9) durch die vorangegangene Behandlung mit miR-124 gegenüber PBS nachweisen.



**Abb. 9: Geringere Ödemausbildung in Tieren nach Behandlung mit miR-124.** Dargestellt ist die Ödembildung der betroffenen Hemisphäre, ermittelt durch Größenvergleich der ipsilateralen und kontralateralen Hemisphäre an TTC-gefärbten Hirnschnitten 4 Tage nach Ischämie. \*Signifikant unterschiedlich zu Kontrollen,  $p < 0,05$ .

### 5.2.4 Mikrogliale Aktivierung

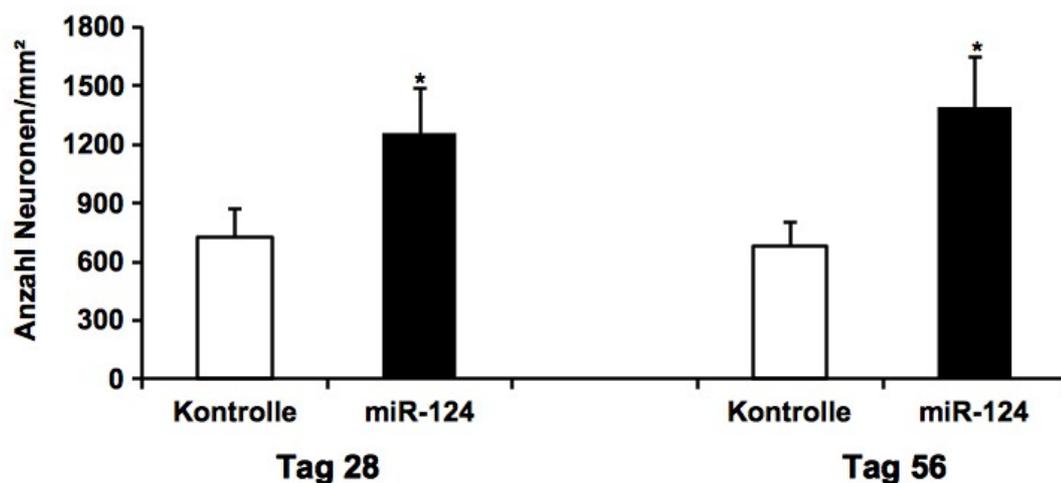
Die mikrogliale Aktivierung als Korrelat für das Ausmaß der Entzündungsreaktion konnte durch immunhistochemische Färbung an Tag vier anhand der Verwendung eines IB4-Antikörper analysiert werden. Dabei zeigte sich die Anzahl der mikroglialen Zellen in den mit miR-124 behandelten Tieren deutlich verringert (siehe Abbildung 10).



**Abb. 10: Reduktion der mikroglialen Aktivierung in Tieren nach Behandlung mit miR-124.** Die immunhistochemische Anfärbung mit IB4-Antikörper in Paraffinschnitten von Tieren vier Tage nach Ischämie zeigt die unterschiedliche Ausprägung der mikroglialen Aktivierung in Tieren nach Behandlung mit miR-124 und mit Kontrollen. \*Signifikant unterschiedlich zu Kontrollen,  $p < 0,05$ .

### 5.2.5 Langzeiteffekt der Neuroprotektion

Die oben dargestellte akute Neuroprotektion durch miR-124 ließ sich auch im Langzeitverlauf fortgesetzt nachweisen. So zeigte die immunhistochemische quantitative Analyse an den Tagen 28 und 56 eine signifikant erhöhte neuronale Dichte in der miR-124-Gruppe im Vergleich zu Kontrolltieren (siehe Abbildung 11).



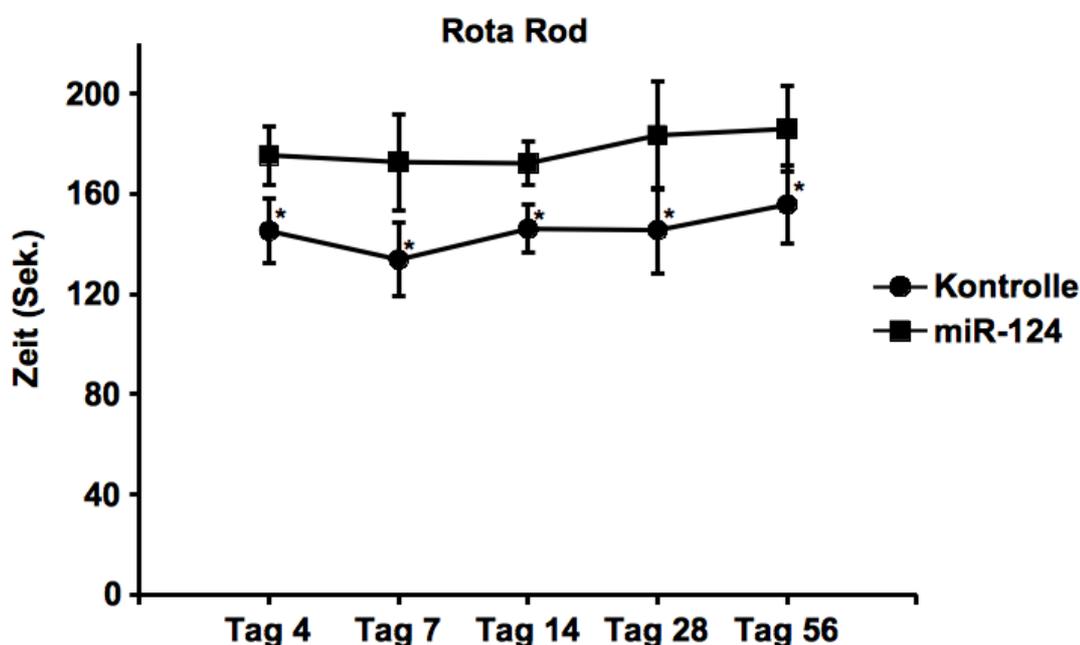
**Abb. 11: Langzeitprotektion nach zerebraler Ischämie durch miR-124.** 28 bzw. 56 Tage nach transienter Ischämie erfolgte die Messung der Neuronendichte nach Färbung mit Kresylviolett. Dargestellt ist die Neuronendichte in Zellen pro mm<sup>2</sup>. \*Signifikant unterschiedlich zu Kontrollen,  $p < 0,05$ .

## 5.3 Analyse post-ischämischer Motorkoordination und kognitiver Defizite

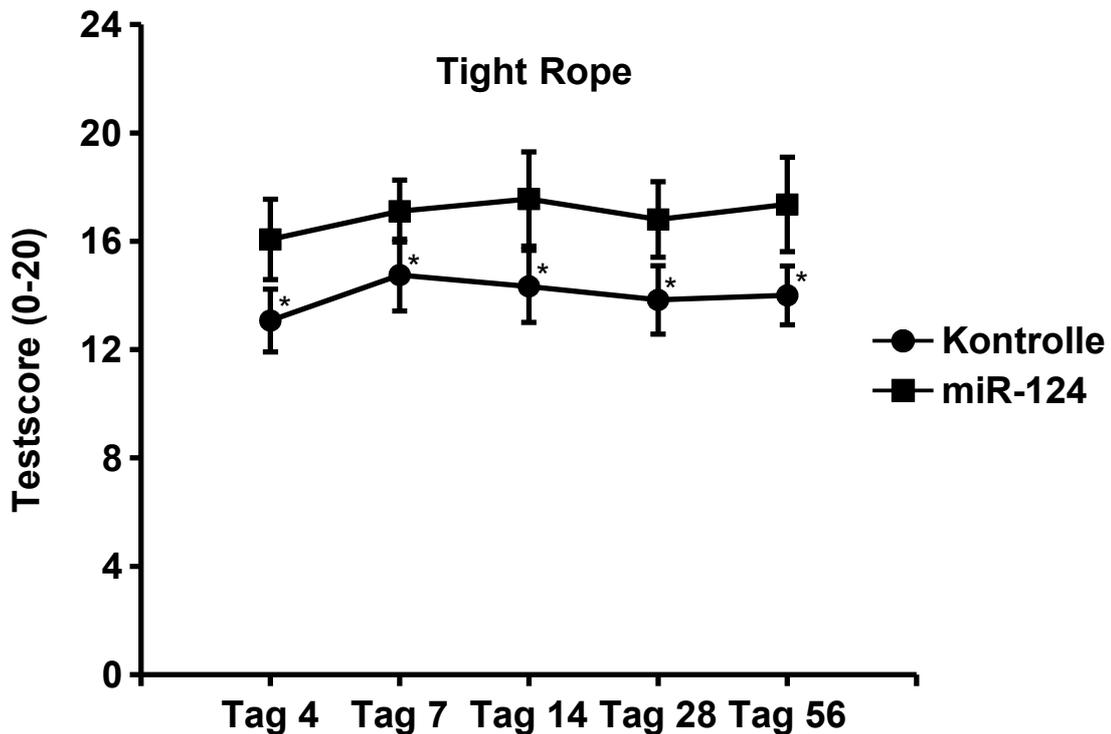
### 5.3.1 Rota Rod- und Tight Rope-Test

Die bereits nachgewiesene histochemische Neuroprotektion ist nicht grundsätzlich mit einer nachfolgenden funktionellen Erholung der Versuchstiere gleichzusetzen, wobei letztere im Hinblick auf zukünftige, translationale Ansätze

von entscheidender Bedeutung ist. Die quantitative Analyse der post-ischämischen Motorkoordination wurde anhand des Rota Rod- und Tight Rope-Tests vorgenommen. Der bereits morphologisch nachgewiesene neuroprotektive Effekt der miR-124 zeigte hier analog eine entsprechende Auswirkung auf funktioneller Ebene. Mit miR-124 behandelte Tiere wiesen zu allen Zeitpunkten ein signifikant reduziertes Defizit im Vergleich zur Kontrollgruppe auf (siehe Abbildungen 12 und 13).



**Abb. 12: Zeit auf dem Rota Rod.** Zur Beurteilung der post-ischämischen Motorkoordination erfolgte der Rota Rod-Test. An oben aufgeführten Zeitpunkten nach Ischämie wurden die Mäuse auf den rotierenden Rota Rod gesetzt und die Zeit bis zum Herunterfallen gemessen. 21 Tage vor Induktion der Ischämie erhielten die Tiere mittels intrastriatler Injektion entweder das miR-124-Viruskonstrukt oder das Leervirus mit alleiniger EGFP-Expression als Kontrolle. \*Signifikant unterschiedlich zu Kontrollen,  $p < 0,05$ .

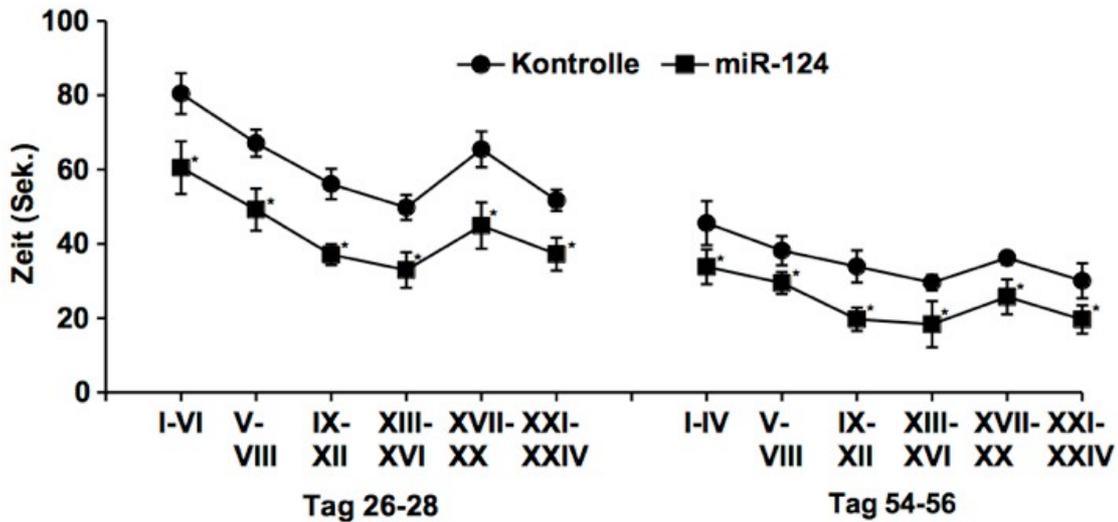


**Abb. 13: Auswertung des Tight Rope-Tests.** Wie bereits im oben genannten Rota Rod-Test zeigte sich auch im Tight Rope-Test an den oben aufgeführten Zeitpunkten nach Ischämie eine bessere motorische Fähigkeit der mit miR-124 behandelten Tiere, welche an allen Zeitpunkten einen höheren Testscore erreichen konnten als die Kontrollgruppe. \*Signifikant unterschiedlich zu Kontrollen,  $p < 0,05$ .

### 5.3.2 Water Maze-Test

Neben der reduzierten Beeinträchtigung der post-ischämischen Motor-koordination durch miR-124 wurde anhand des modifizierten Water Maze-Tests das Ausmaß der post-ischämischen kognitiven Dysfunktion beurteilt.

In den insgesamt 48 Testdurchläufen konnte zwar bei allen Tieren ein erhaltenes Lernvermögen beobachtet werden, jedoch ging die Behandlung mit miR-124 auch hier stets mit einem besserem funktionellen Ergebnis der Tiere einher. Dies galt nicht nur für das Erinnern der Plattformposition, sondern auch für das Wiederfinden der Plattform beim *task switch* in den Testdurchläufen XVII bis XX an Tag 28 und 56 (siehe Abbildung 14).



**Abb. 14: Lernen und Gedächtnis im Water Maze-Test.** An Tag 28 und 56 nach Ischämie wurden die Tiere dem Water Maze-Test unterzogen und anhand der Geschwindigkeit bis zum Erreichen der nicht sichtbaren Plattform im Wasserbecken bewertet. In den Versuchsrounden XVII-XX am jeweils 3. Versuchstag erfolgte der *task switch* durch Versetzen der Plattform. In den Runden XXI bis XXIV wurden die ursprünglichen Bedingungen wiederhergestellt. \*Signifikant unterschiedlich zu Kontrollen,  $p < 0,05$ .

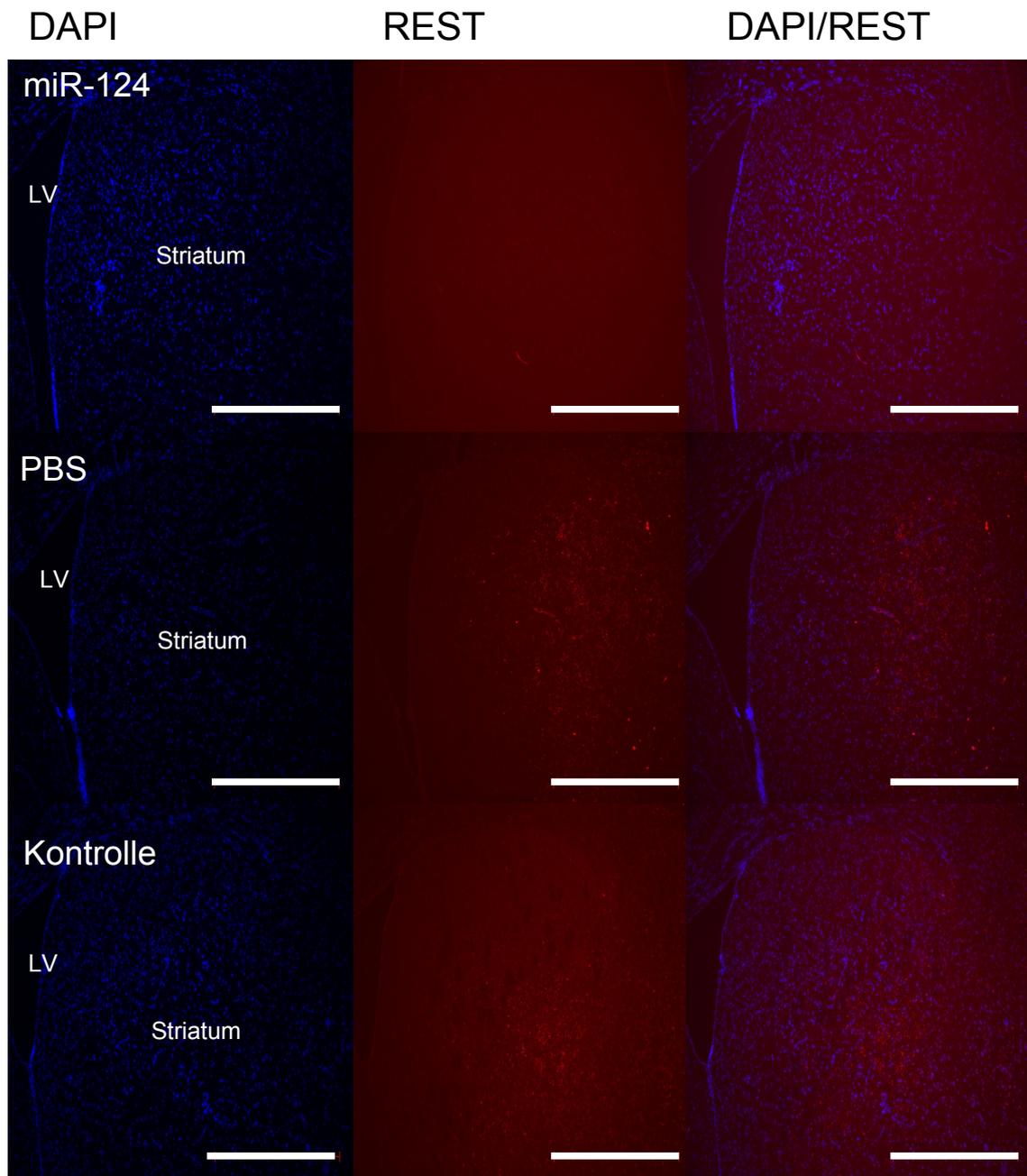
#### 5.4 Analyse der REST-Expression *in vivo* und *in vitro*

Eine Inhibition der Transkription von miR-124 durch REST ist bereits bekannt (Conaco et al. 2006). Darüber hinaus gibt es Daten bezüglich einer Inhibition des SCP1, einem Bestandteil des REST-Repressorkomplexes, durch miR-124 und somit eines negativen Einflusses von miR-124 auf die Aktivität von REST (Visvanathan et al. 2007). Im Gegensatz dazu ist eine direkte Regulierung der REST-Expression durch miR-124 bisher nicht beschrieben worden.

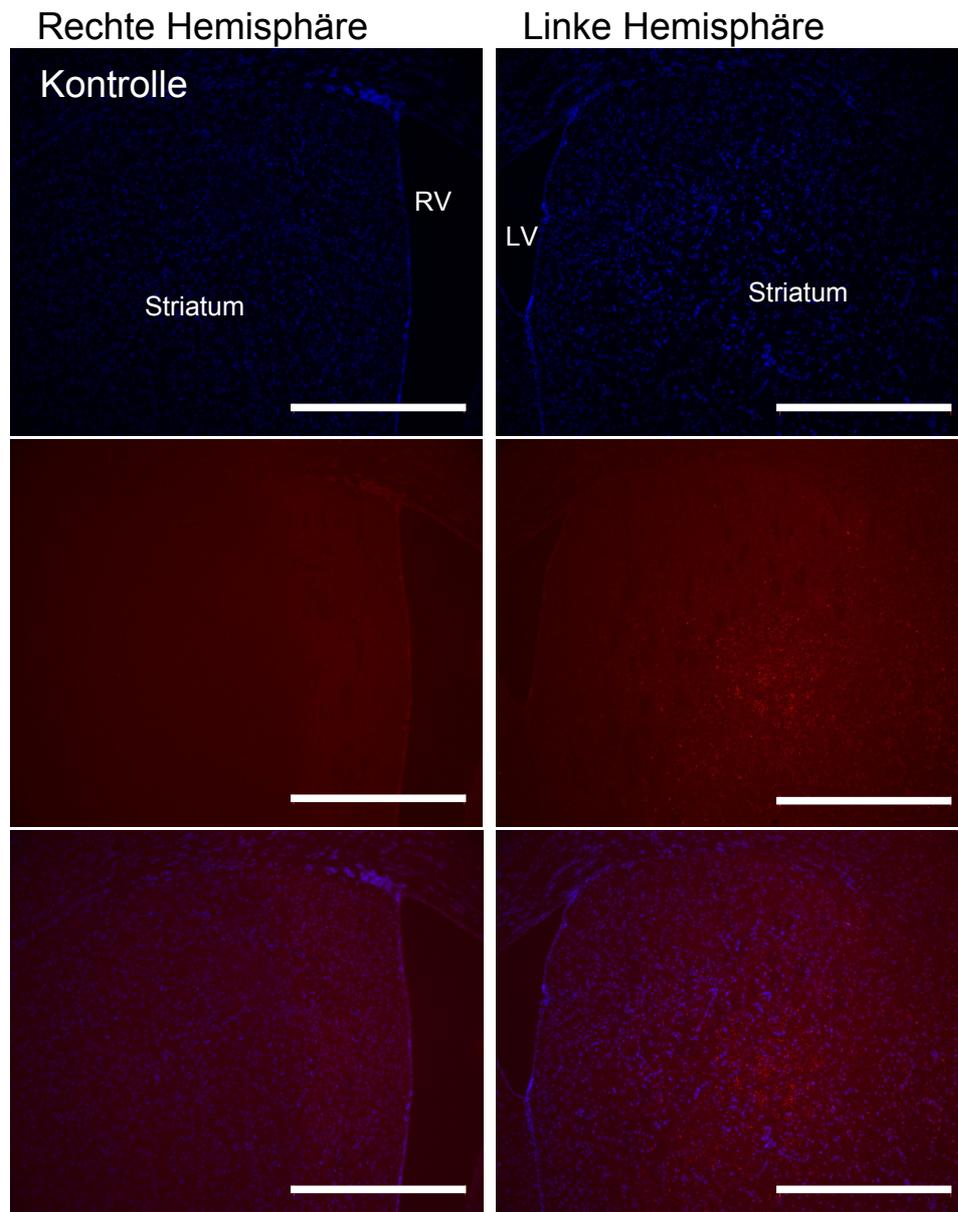
In der hier vorliegenden Arbeit wurde die REST-Expression vier Tage nach zerebraler Ischämie sowohl immunhistochemisch wie auch mittels Western-Blot-Verfahren bestimmt. Nach Behandlung mit PBS und Kontrollvirus zeigte sich in Übereinstimmung mit vorangegangenen Untersuchungen eine deutliche Verstärkung der REST-Expression im ischämisch geschädigten Striatum im

Gegensatz zur kontralateralen, nicht betroffenen Hemisphäre, wo REST kaum nachweisbar blieb (Calderone et al. 2003, Formisano et al. 2007).

Bei mit miR-124 behandelten Tieren war sowohl im geschädigten wie auch im kontralateralen, gesunden Striatum ein Nachweis von REST durch Immunhistochemie kaum möglich, entsprechend auch den Ergebnissen in nicht-ischämischen Hemisphären von mit PBS behandelten Mäusen (siehe Abbildungen 15 und 16).

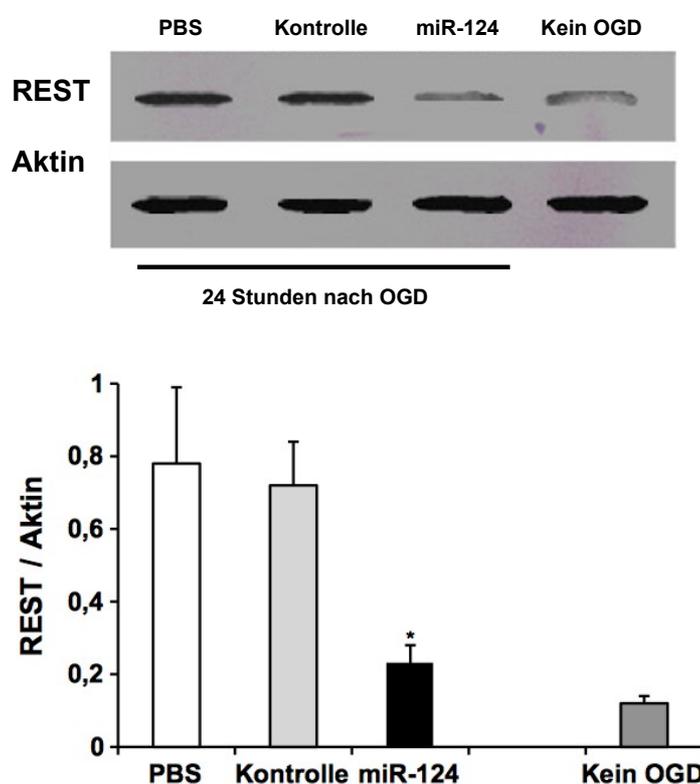


**Abb. 15: Reduktion der REST-Expression durch miR-124 im ischämischen Kortex.** Immunhistochemische Färbung an Paraffinschnitten von Tieren mit viertägigem Überleben nach Ischämie. Nach Behandlung mit PBS und Kontrollvirus ist im Gegensatz zu der Behandlung mit miR-124 durch immunhistochemische Färbung ein Nachweis von REST kaum möglich. LV – Linker Ventrikel, Maßstab 500  $\mu\text{m}$ .

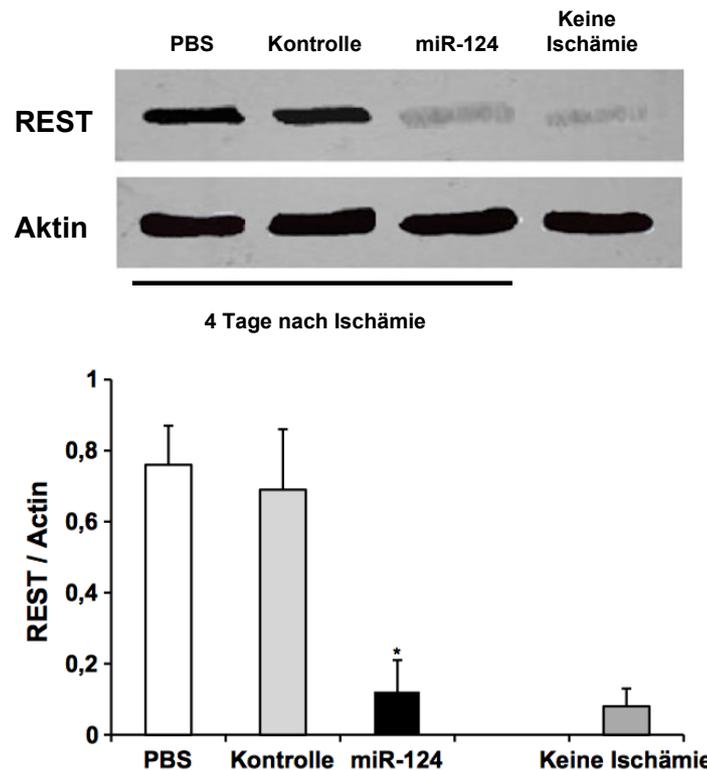


**Abb. 16: REST-Expression in der ischämischen linken und nicht ischämischen rechten Hemisphäre.** In den hier gezeigten Hemisphären des selben Tieres der Kontrollgruppe (intrastriatale Injektion von PBS) wird die Zunahme der REST-Expression in der ischämischen Hemisphäre im Gegensatz zur nicht betroffenen Seite sichtbar. RV – rechter Ventrikel, LV – linker Ventrikel, Maßstab 500  $\mu$ m.

Analog dazu ergab eine quantitative Analyse der REST-Expression durch Western Blot ebenfalls ein deutlich geringeres Vorkommen von REST in den miR-124 Versuchsgruppen sowohl *in vitro* wie auch *in vivo* (siehe Abbildungen 17 und 18). Der Western Blot wurde mit kortikalen Neuronen aus der Zellkultur 24 Stunden nach OGD sowie mit Gewebe des betroffenen Striatums in Mäusen vier Tage nach transientscher Ischämie durchgeführt.



**Abb. 17: Reduktion der post-ischämischen REST-Expression durch miR-124 *in vitro*.** Quantifizierung der REST-Expression mittels Western Blot in kortikalen Zellen nach Inkubation mit dem Viruskonstrukt bzw. einer Kontrolle über fünf Tage und anschließend 45-minütigem OGD mit Reinkultivierung für 24 Stunden unter Standardzellkulturbedingungen. \*Signifikant unterschiedlich zu Kontrollen,  $p < 0,05$ .



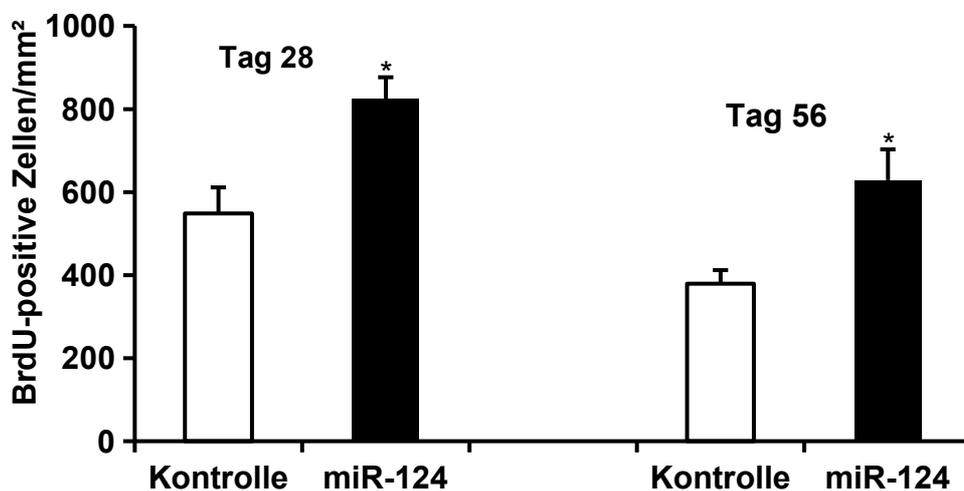
**Abb. 18: Reduktion der post-ischämischen REST-Expression durch miR-124 *in vivo*.** Darstellung der REST-Expression im ischämischen Kortex von mit miR-124 oder Kontrollen vorbehandelten Mäusen vier Tage nach Ischämie mittels Western Blot. \*Signifikant unterschiedlich zu Kontrollen,  $p < 0,05$ .

## 5.5 Induktion post-ischämischer Neurogenese durch miR-124

Die Förderung der neuronalen Differenzierung durch miR-124 im Rahmen der physiologischen Neurogenese in der SVZ wurde bereits gezeigt (Cheng et al. 2009). Mit Hilfe von miR-124 und zweier Transkriptionsfaktoren (MYT1L und BRN2) ist es darüber hinaus in der Zellkultur gelungen, eine Umdifferenzierung dermalen Fibroblasten in Neurone zu erreichen (Ambasudhan et al. 2011). Weiterhin konnte, ebenfalls in der Zellkultur, gezeigt werden, dass eine Blockade von miR-124 einen glialen Phänotyp der Zellen induziert und umgekehrt (Krichevsky et al. 2006). *In vitro* fördert miR-124 post-ischämisch die

neuronalen Differenzierung neuronaler Vorläuferzellen über Repression von Jagged-1 (JAG1), eines Notch-Liganden (Liu et al. 2011).

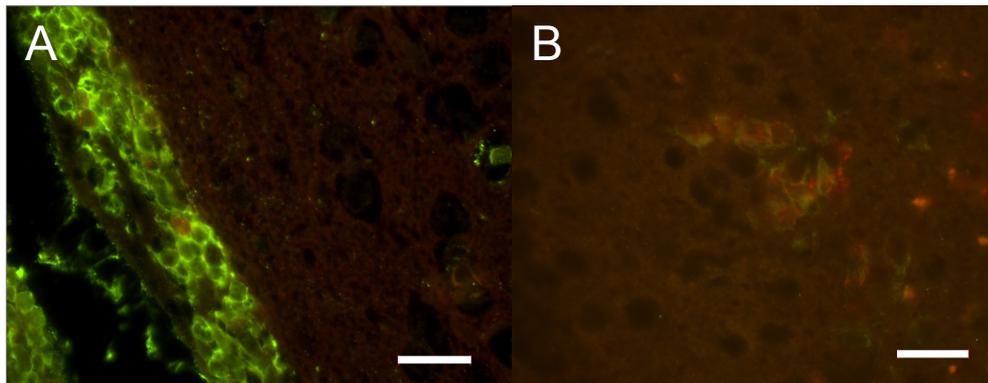
In der hier vorliegenden Arbeit ging es folgerichtig darum zu analysieren, ob und in welchem Ausmaß miR-124 einen Effekt auf die post-ischämische Neurogenese hat. Die immunhistochemische Analyse BrdU-positiver Zellen als Ausdruck der proliferativen Aktivität an den Tagen 28 und 56 zeigte eine signifikant erhöhte Anzahl von BrdU-positiven innerhalb des ischämischen Striatum in den mit miR-124 behandelten Tieren (siehe Abbildung 19).



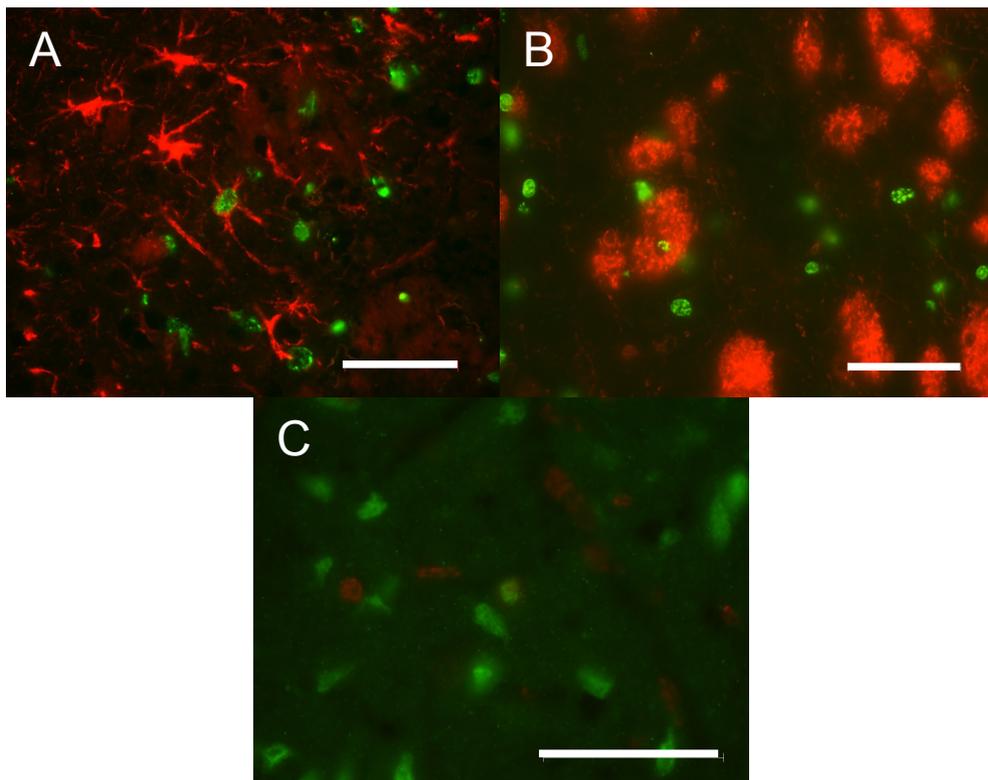
**Abb. 19: Post-ischämisch vermehrt proliferierende Zellen nach Behandlung mit miR-124 *in vivo*.** Zur Markierung proliferierender Zellen erfolgte die intraperitoneale Injektion von BrdU an Tag 8 bis 18 bzw. 8 bis 56 nach Ischämie und nachfolgend immunhistochemische Anfärbung. Gezeigt ist die Anzahl der BrdU-positiven Zellen an Tag 28 und 56 nach Ischämie im ischämischen Kortex von Mäusen nach Behandlung mit miR-124 oder Kontrollvirus. \*Signifikant unterschiedlich zu Kontrollen,  $p < 0,05$ .

Weitere Analysen zielten darauf ab, den Phänotyp dieser (neu entstandenen) BrdU-positiven Zellen im Hinblick auf neuronale oder gliale Differenzierung weiter zu determinieren.

Dabei wurden Färbungen mit NeuN zur Darstellung von murenen Neuronen, CNPase für Oligodendrozyten, GFAP für Astrozyten, CD31 zur Darstellung von Endothelzellen und Dcx als Marker für immature Neurone eingesetzt (siehe Kapitel 4.2.9, Abbildungen 20 und 21).

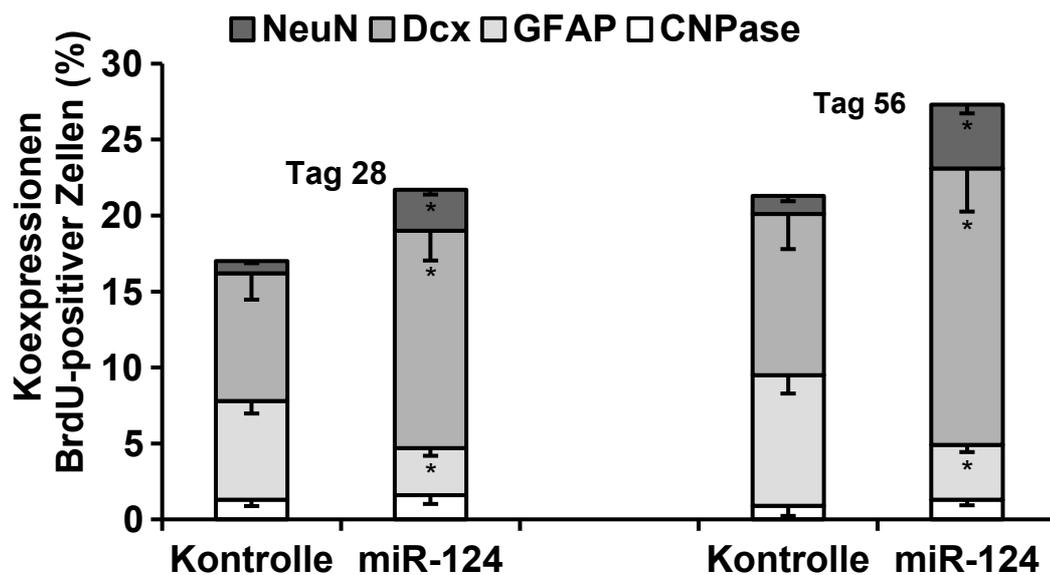


**Abb. 20: Immunhistochemische Färbung mit Dcx (grün).** Darstellung neuronaler Vorläuferzellen mit aktiven Zellteilungsprozessen in der subventrikulären Zone (A). Typische Anordnung Dcx-positiver Zellen in der ischämischen Zone (B). Rot gefärbt sind BrdU-positive Zellen. Maßstab: 20  $\mu$ m.

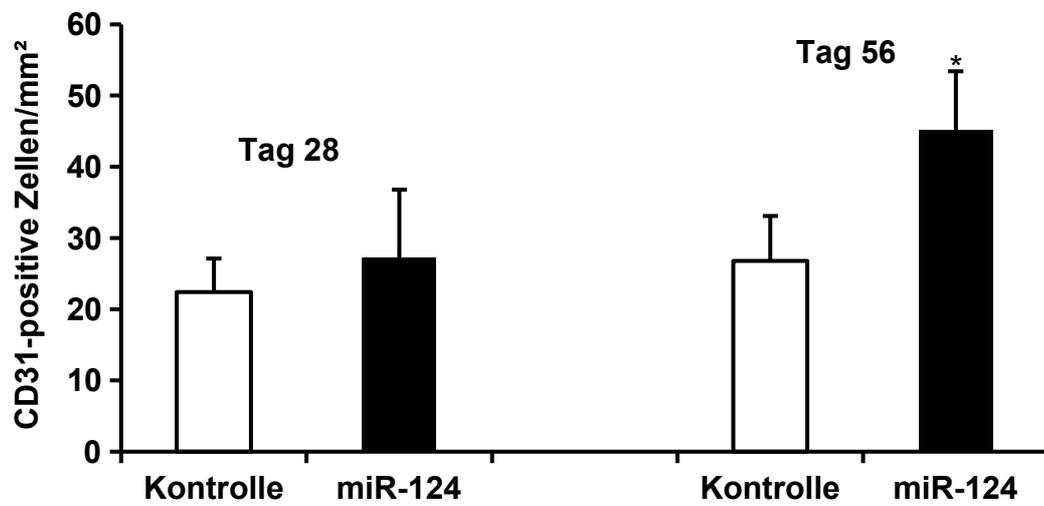


**Abb. 21: Kokalisationen BrdU-positiver Zellen (grün).** Färbung mit GFAP-Antikörper (A), CNPase-Antikörper (B), NeuN-Antikörper (C), Maßstab: 50  $\mu$ m.

Zu den oben genannten Zeitpunkten ließ sich eine vermehrte Co-Expression von Dcx bzw. NeuN mit BrdU in der miR-124-Gruppe darstellen. Dies weist auf eine erhöhte post-ischämische Neurogenese durch die Applikation von miR-124 hin (siehe Abbildung 22). In diesem Zusammenhang zeigte die gleichzeitige Analyse der Expression von BrdU und des endothelialen Markers CD31 eine signifikant erhöhte Co-Expression dieser in den durch miR-124 behandelten Tieren (siehe Abbildung 23). Die Applikation von miR-124 geht also mit einer erhöhten post-ischämischen Neurogenese und Angiogenese im Tiermodell einher.



**Abb. 22: Differenzierungsanalyse der proliferierenden Zellen.** In Kombination mit BrdU erfolgte die Färbung mit NeuN zur Darstellung von murenen Neuronen, mit Dcx als Marker immaturer Neurone, mit GFAP als Marker für Astrozyten und mit CNPase für die Darstellung von Oligodendrozyten an Tag 28 und 56 nach zerebraler Ischämie. Dargestellt ist der jeweilige Anteil der Kolokalisationen an der Gesamtzahl der BrdU-positiven Zellen. \*Signifikant unterschiedlich zu Kontrollen,  $p < 0,05$ .



**Abb. 23: Anzahl CD31-positiver Zellen an Tag 28 und 56.** Anzahl der proliferierenden, BrdU-positiven Zellen, die eine Co-Expression mit dem endothelialen Marker CD31 als Hinweis auf eine Angiogenese an den Tagen 28 und 56 nach zerebraler Ischämie aufweisen. An Tag 56 zeigt sich eine signifikant höhere Co-Expression in Mäusen nach Behandlung mit miR-124. \*Signifikant unterschiedlich zu Kontrollen,  $p < 0,05$ .

## 6. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde der Frage nachgegangen, ob die ektope Applikation eines miR-124-exprimierenden viralen Vektors zu einer Neuroprotektion und -regeneration nach ischämischem Schlaganfall führt und falls ja, welcher Mechanismus mutmaßlich hierfür heranzuziehen ist. Die Untersuchungen fanden in diesem Zusammenhang sowohl *in vitro* anhand eines OGD-Testes wie auch *in vivo* am Schlaganfallmodell der Maus statt. Es zeigte sich, dass die Applikation von miR-124 mit einer stabilen Neuroprotektion mit verbesserter neurologischer Erholung und einer Induktion neuroregenerativer Mechanismen vergesellschaftet ist. Ursächlich hierfür zeigte sich – zumindest teilweise – eine Inhibition des ischämieinduzierten REST-Anstiegs durch miR124.

Ausgangspunkt für die vorliegenden Untersuchungen waren bisherige Erkenntnisse über miRNAs und ihre Fähigkeit, die Proteinbiosynthese zu beeinflussen, sowie die vermutete, maßgebliche Beteiligung der miRNAs an intrazellulären Regulationsmechanismen (Wienholds und Plasterk 2005, Christensen und Schratt 2009, Wu et al. 2012).

Nach zerebraler Ischämie verändert sich das Expressionsprofil der miRNAs neuronaler Zellen, unter anderem auch der miR-124 (Wu et al. 2012, Sun et al. 2013). Der Transkriptionsfaktor REST, dessen Ausprägung im Verlauf der neuronalen Differenzierung nachlässt, wird nach zerebraler Ischämie wieder vermehrt nachweisbar (Calderone et al. 2003, Formisano et al. 2007). Unter anderem durch eine verminderte Expression von GluR2 führt REST zu einer Verstärkung der ischämischen Zellschädigung (Calderone et al. 2003, Kwak und Weiss 2006).

Um allogene DNA (z. B. in Form von Plasmiden) in Zellen einzuschleusen, ist die Elektroporation, welche 1982 zuerst beschrieben wurde, ein bewährtes Verfahren (Neumann et al. 1982). Allerdings ist damit eine Transfektion von Zellen nur *ex vivo* möglich. Ein großer Fortschritt ist die Nutzung von

Viruskonstrukten. In der hier vorliegenden Arbeit waren dies AAV-2-Viruskonstrukte. Eine erfolgreiche Transfektion mit Hilfe dieser Viruskonstrukte konnte bereits *in vitro* an Hippokampusneuronen der Ratte und in neuronalen Ganglienzellen in der Retina der Ratte gezeigt werden (Michel et al. 2005). Anhand der EGFP-Expression konnte hier die erfolgreiche Transfektion auch in kortikalen Neuronen in der Zellkultur sowie *in vivo* nach intrastriataler Injektion nachgewiesen werden.

Die hier gezeigte Neuroprotektion durch ektope Zufuhr von miR-124 äußerte sich *in vitro* in einer größeren Widerstandsfähigkeit kortikaler Neurone gegenüber OGD. Weiterhin zeigte sich *in vivo* in der ischämischen Hemisphäre der mit miR-124 behandelten Mäuse ein deutlich geringfügigerer Gewebeschaden mit kleinerer Infarktzone, geringerer Ödembildung und höherer Neuronendichte im Gegensatz zu der Kontrollgruppe.

Dies steht im Einklang mit einer Studie von Sun et al. (2013), welche ebenfalls durch Überexpression von miR-124 nach transienter Ischämie in Mäusen eine geringere Größe der Infarktzone nachweisen konnten. Auch *in vitro* (OGD) zeigte sich in genannter Studie ein neuroprotektiver Effekt mit reduzierter Apoptose und Zelltod durch Behandlung mit miR-124.

Sun et al. (2013) konnten weiterhin reduzierte Level von Apoptose-Proteinen (u. a. Bcl-2 und Bcl-xL) nach miR-124-Zugabe nachweisen und gehen davon aus, dass miR-124 einen neuroprotektiven Effekt über eine Inhibition der Apoptose erwirkt.

Welcher Mechanismus der Neuroprotektion durch miR-124 zugrunde liegt, ist nicht eindeutig bekannt. Die Multifunktionalität von miRNAs ist bereits belegt (siehe Kapitel 2.8). Somit ist denkbar, dass die miR-124 ebenfalls in der Lage ist, unterschiedliche Signalwege zu beeinflussen, also einerseits an der Reduktion von REST beteiligt ist (s. u.) und gleichzeitig auch Apoptose-Proteine beeinflusst. Es ist aber auch nicht auszuschließen, dass die reduzierten Level von Apoptose-Proteinen in Zusammenhang mit der Reduktion von REST stehen.

Dass die hier gezeigte Neuroprotektion tatsächlich auch funktionelle Relevanz hat, wird durch eine bessere neurologische Erholung der mit miR-124 behandelten Tiere in den Verhaltenstests deutlich.

Der in der vorliegenden Arbeit beobachtete post-ischämische Anstieg der REST-Expression im ischämischen Striatum wurde in ähnlicher Weise bereits in vorangegangenen Studien für Pyramidalneurone im Hippokampus von Rattenhirnen gezeigt (Calderone et al. 2003, Formisano et al. 2007). Nachweisbar war darüber hinaus hier jedoch auch eine deutliche Reduktion des post-ischämischen REST-Anstiegs nach Behandlung mit miR-124 sowohl *in vivo* wie auch *in vitro*.

Über welchen Mechanismus die miR-124 hier Einfluss auf REST ausübt, bleibt im Rahmen dieser Arbeit zunächst ungeklärt. Theoretisch kann eine Reduktion des REST-Levels einerseits durch verminderte Expression oder andererseits vermehrten Abbau desselben erreicht werden.

Während eine repressive Regulation der miR-124 durch REST bereits gezeigt wurde (Conaco et al. 2006), ist eine direkte Regulation des REST-Genes durch die miR-124 jedoch unwahrscheinlich, da keine passende Bindungsstelle für die miR-124 an der 3'UTR der REST-mRNA existiert (Wu und Xie 2006). Bekannt ist lediglich, dass miR-124 eine Repression auf SCP1 ausübt, einen Bestandteil des REST-Repressorkomplexes (Visvanathan et al. 2007). Möglicherweise liegt der Einfluss der miR-124 eher im Rahmen des REST-Abbaus. Dass während der Neurogenese ein Abbau von REST nach Ubiquitinylierung über Proteasomen erfolgt, konnte bereits nachgewiesen werden (Westbrook et al. 2008, Ballas et al. 2005). Eine Regulation des REST-Levels durch miR-124 über die Ubiquitinylierung und Förderung eines verstärkten Abbaus von REST ist folglich denkbar. Weiterführende Untersuchungen, die nicht Bestandteil der vorliegenden Arbeit, aber Teil der projektbezogenen Publikation waren, beschreiben eine verminderte Deubiquitinylierungs-Aktivität nach Behandlung mit ektopter miR-124. Dabei gibt es Hinweise, dass der zugrundeliegende Mechanismus im Zusammenhang mit einer Repression deubiquitinylierender

Enzyme (DUB) durch miR-124 steht. Zwei DUBs, Usp14 und Usp24, welche den proteasomalen Abbau hemmen, weisen Bindungsstellen für die miR-124 auf (Doepfner et al. 2013).

Wie bereits beschrieben, ist das Verhältnis zwischen REST und miR-124 von großer Wichtigkeit während der neuronalen Differenzierung. REST als Repressor neuronaler Gene (Schoenherr et al. 1996, Lunyak et al. 2002, Hwang et al. 2012) muss herunterreguliert werden, während miR-124 als Repressor nicht-neuronaler Gene (Visvanathan et al. 2007, Makeyev et al. 2007) vermehrt exprimiert werden muss. Wie eingangs erwähnt, geht die Induktion einer zerebralen Ischämie mit einer Stimulation der endogenen Neurogenese einher, wobei mature Neurone entstehen. Die biologische Wertigkeit scheint jedoch von untergeordneter Rolle zu sein, da ein Großteil der neu entstandenen Neurone wenige Wochen nach zerebraler Ischämie bereits wieder untergegangen ist (Arvidsson et al. 2002). In diesem Zusammenhang kann sich eine Modulation der post-ischämischen REST-Expression durch die ektope Gabe von miR-124 als vorteilhaft erweisen.

In der vorliegenden Arbeit erfolgte eine Analyse der Zellproliferation und -differenzierung an zwei Zeitpunkten, d. h. 4 Wochen und 8 Wochen nach Induktion der Ischämie. Dabei zeigte sich, dass die Behandlung mit miR-124 zu einer erhöhten post-ischämischen Zellproliferation im Infarktareal führt. Zu beiden Zeitpunkten war die Zahl der BrdU-positiven Zellen gegenüber der Kontrollgruppe erhöht, wenngleich auch die Gesamtzahl der BrdU-positiven Zellen über den Beobachtungszeitraum hinweg abnahm. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen von Arvidsson et al. (2002) und Doepfner et al. (2012).

Mittels Differenzierungsmarkern konnten proliferierende gliale Zellen (Astrozyten und Oligodendrozyten) von neuronalen Zellen unterschieden werden. Es zeigte sich eine erhöhte Co-Expression von proliferierenden BrdU-positiven Zellen mit den neuronalen Markern Dcx und NeuN in den mit miR-124 behandelten Tieren.

Diese Ergebnisse suggerieren eine Stimulation der post-ischämischen Neurogenese durch miR-124. Dies steht in Übereinstimmung mit bisherigen Erkenntnissen von Krichevsky et al. (2006) und Makeyev et al. (2007) aus *In-vitro*-Untersuchungen an P19-Karzinomzellen und embryonalen Stammzellen, das ein höheres Vorkommen von miR-124 während der Differenzierung die Ausprägung des neuronalen Phänotyps fördert. Ebenfalls konform dazu sind Ergebnisse von Cheng et al. (2009), wonach eine Überexpression der miR-124 zu einer Abnahme von Astrozyten und Zunahme postmitotischer Neurone in SVZ-Zellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* führt. Eine Neuroregeneration nach Ischämie wurde jedoch in diesen Studien nicht untersucht.

Cheng et al. sehen die Bedeutung der miR-124 anhand ihrer Ergebnisse jedoch vor allem in der Rolle des zeitlichen Regulators der Neurogenese. Ein Knockdown endogener miR-124 führte nicht zu einer alleinigen Gliogenese, sondern zu verspäteter Neurogenese (Cheng et al. 2009). Es bleibt offen, inwieweit sich intrazelluläre Prozesse während adulter Neurogenese und Neurogenese im Rahmen einer Regeneration nach Ischämie hier unterscheiden. Die extrazelluläre Matrix, intaktes Gewebe versus geschädigtem, kann nicht ohne Einfluss auf die Zelldifferenzierung bleiben. Allein die Migration der reifenden Neurone in das ischämische Areal, Gebiete in denen unter physiologischen Bedingungen keine Neurogenese stattfindet (Arvidsson et al. 2002), zeugt von einer Reaktion auf Signale oder Botenstoffe.

Nach Behandlung mit miR-124 zeigt sich in dieser Arbeit im Vergleich zur Kontrollgruppe eine verstärkte Angiogenese. Angiogenese nach ischämischem Schlaganfall verbessert die Perfusion des ischämischen Areals und damit das Sauerstoff- und Nährstoffangebot, was die dortige Regeneration unterstützt. Eine Beteiligung zahlreicher miRNAs an der Regulierung der Angiogenese ist bekannt (Yin et al. 2015), eine Studie an humanen Gliomzellen beschreibt miR-124 als Inhibitor von Tumorwachstum und tumorassoziierter Angiogenese über Repression von Ras-Onkogenen (Shi et al. 2014). Mögliche Beziehungen zwischen miR-124 und Angiogenese im Rahmen der zerebralen Ischämie sind nicht geklärt. Der in dieser Arbeit zugrundeliegende Mechanismus bleibt offen.

Denkbar ist, dass die Umfeldbedingungen mit geringerer Narbenbildung, geringerer mikroglialer Aktivierung und stärkerer Neurogenese nach Behandlung mit miR-124 über diverse Faktoren oder Signale Einfluss auf die Angiogenese ausüben.

Als Grundlage der In-vivo-Versuche wurde in dieser Arbeit das Fadenokklusionsmodell an der Maus angewandt. Da in Tiermodellen erfolgreiche neuroprotektive Substanzen bereits wiederholt an der klinischen Umsetzung gescheitert sind (O'Collins et al. 2006, Mehta et al. 2007, Macleod et al. 2009), wurde im Rahmen der Fehlersuche unter anderem die Methode der Fadenokklusion bereits mehrfach kritisiert (Hata et al. 2000, Hossmann 2012). Ansatzpunkt der Kritik ist die Erzeugung einer transienten Ischämie, welche sich in ihrer Art vom klinischen Schlaganfall unterscheidet. Während eine permanente Ischämie entsprechend dem klinischen Schlaganfall zur Entstehung der Kernzone führt, welche sich innerhalb von 3 bis 6 Stunden zu ihrer maximalen Größe in die Penumbra ausdehnt, ermöglicht eine transiente Ischämie mit der Reperfusion zunächst eine partielle Erholung des Gewebes auch in der Kernzone, nachfolgend kommt es jedoch zu einer verzögerten sekundären Schädigung mit Ausbreitung der Kernzone noch nach 6 bis 12 Stunden (Hossmann 2012). Somit ist im experimentellen Modell das therapeutische Zeitfenster deutlich länger als in der klinischen Realität und das häufige Scheitern der experimentell zunächst erfolgreichen Strategien nachvollziehbar. Dieses Zeitfenster bezieht sich jedoch vor allem auf therapeutische Ansätze, welche auf einer Abmilderung des ischämischen Gewebeschadens beruhen. Ist das Ziel eine Verbesserung der post-ischämischen Neuroregeneration, ist dieses Zeitfenster von untergeordneter Bedeutung.

In der vorliegenden Arbeit wurde die zu untersuchende Substanz bereits vor Einsetzen der Ischämie verabreicht. Dies widerspricht einem therapeutischen Ansatz, der nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit war. Vielmehr war es das Ziel der Dissertation, mögliche Mechanismen und Effekte einer ektopen Applikation von miR-124 im Schlaganfallmodell der Maus näher zu

untersuchen. Es kann jedoch nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden, dass die pathophysiologischen Mechanismen sich in mehr als dem zeitlichen Ablauf unterscheiden.

Das experimentelle Modell mit jungen, gleichaltrigen, gesunden, ausschließlich männlichen Tieren ist notwendig zur Schaffung standardisierter und reproduzierbarer Versuchsbedingungen. Im Gegensatz dazu besteht die klinische Realität aus multimorbiden Patienten mit zerebralen Infarkten unterschiedlicher Genese und an verschiedensten Lokalisationen. Dennoch ist das Versuchsmodell für die hier verfolgten Ziele, ein umfassenderes Verständnis der pathophysiologischen Mechanismen zu erhalten, geeignet.

Mit dem in dieser Arbeit durchgeführten Versuchsansatz, wurde vor allem ein besseres Verständnis der Funktionen der miR-124 und ihrer Beziehung zu REST angestrebt. Deutlich geworden ist die Neuroprotektion durch miR-124 bei gleichzeitig reduziertem Vorkommen von REST. In weiterführenden Untersuchungen, welche nicht Gegenstand dieser Dissertation waren, zeigten sich deutliche Hinweise, dass ein Einfluss der miR-124 auf REST über die Verstärkung des proteasomalen Abbaus von REST möglich ist (Doepfner et al. 2013).

Für einen therapeutischen Ansatz ist vorliegender Versuchsaufbau nicht nur aufgrund der Applikation des Viruskonstruktes vor der eigentlichen Ischämie ungeeignet. Auch der Applikationsweg mittels intrastriärer Injektion ist realitätsfern. Dennoch besteht die Hoffnung, mit einem umfassenderen Wissen über die Vorgänge in den Zellen der geschädigten Penumbra letztendlich einem therapeutischen Ansatz näher zu kommen, mit welchem Patienten nach einem Schlaganfall geholfen werden kann, vor allem wenn für diese eine Lysetherapie aufgrund der zahlreichen Kontraindikationen nicht in Frage kommt. Der Nachweis veränderter miRNA-Expressionsprofile auch in anderen zerebralen Erkrankungen (Kim et al. 2007, Vemuganti 2010, Zhao et al. 2015) macht deutlich, dass das Verständnis der Funktion der miRNAs und ihr potenzieller therapeutischer Nutzen noch weitaus umfassendere Bedeutung haben könnte.

## 7. Zusammenfassung

Im Rahmen einer zerebralen Ischämie kommt es im geschädigten Gewebe zu einem vermehrten Vorkommen des Transkriptionsfaktors REST, welcher normalerweise in ausdifferenzierten neuronalen Zellen in nur geringfügigem Maße zu finden ist. REST wird mit einer Verstärkung der ischämischen Zellschädigung in Verbindung gebracht.

REST wirkt als Repressor der miR-124, einer in neuronalen Zellen stark verbreiteten miRNA, welche im Rahmen der Neurogenese zunehmend exprimiert wird und Einfluss auf die Entwicklung und auch den Erhalt des neuronalen Phänotyps hat, u. a. durch Repression nicht-neuronaler Gene.

Zentrale Frage dieser Arbeit war, ob ektop mittels Viruskonstrukt applizierte miR-124 einen positiven Einfluss auf Neuroregeneration, Neurogenese und auch funktionelle Erholung nach zerebraler Ischämie hat und wenn ja, welcher Mechanismus möglicherweise ursächlich ist. Zusätzlich wurde auch das Vorkommen von REST beobachtet und die Frage nach einem Zusammenhang zwischen miR-124 und REST gestellt.

Es erfolgten Untersuchungen sowohl *in vivo* an männlichen C57BL6-Mäusen, in welchen eine transiente zerebrale Ischämie induziert wurde, als auch *in vitro*, indem kultivierte Neurone einer transienten Hypoxie und Hypoglykämie (OGD) ausgesetzt wurden. Analysen des nachfolgenden Zellschadens und der funktionellen Erholung der Versuchstiere erfolgten bis zu acht Wochen nach Ischämie.

Es konnte gezeigt werden, dass durch Zugabe von miR-124 eine stabile Neuroprotektion nach zerebraler Ischämie erreicht wird. Dies wird *in vivo* an einer reduzierten Infarktgröße, Ödembildung und erhöhten Neuronendichte und *in vitro* an reduzierten Zelltodraten nach OGD deutlich. In Verhaltenstests zeigte sich darüber hinaus auch eine funktionelle Relevanz dieser Neuroprotektion.

Ein weiterer Effekt von miR-124 *in vivo* ist eine verstärkte Zellproliferation nach Ischämie, verbunden mit einer Zunahme der Neurogenese und Angiogenese. Mittels Western Blot und Immunhistochemie konnte nachgewiesen werden, dass eine Inhibition des ischämieinduzierten REST-Anstiegs durch miR-124 erfolgt. Der Mechanismus blieb im Rahmen dieser Arbeit zunächst unklar, weiterführende projektbezogene Untersuchungen zeigten jedoch Hinweise auf eine Repression deubiquitylierender Enzyme durch miR-124, was einen verstärkten proteasomalen Abbau von REST verursachen könnte.

Der Versuchsaufbau der vorliegenden Arbeit ist nicht dafür gedacht, einen therapeutischen Ansatz zu entwickeln. Jedoch kann das bessere Verständnis der Interaktion zwischen miR-124 und REST möglicherweise in zukünftigen Studien therapeutische Angriffspunkte aufzeigen.

Auch in anderen zerebralen Erkrankungen zeigen sich veränderte miRNA-Expressionsprofile. Dies macht deutlich, dass das Verständnis der Funktion von miRNAs eine potenzielle therapeutische Nutzung mit umfassender Bedeutung ermöglichen könnte.

## 8. Literaturverzeichnis

- Adams HP, Bendixen BH, Kappelle LJ, Biller J, Love BB, Gordon DL, Marsh EE (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
- Altman J, Das GD (1965): Autoradiographic and histological evidence of postnatal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol* 124, 319-335
- Ambasudhan R, Talantova M, Coleman R, Yuan X, Zhu S, Lipton SA, Ding S (2011): Direct reprogramming of adult human fibroblasts to functional neurons under defined conditions. *Cell Stem Cell* 9, 113-118
- Amiri H, Hacke W, Bösel J (2011): Thrombolytische Therapie des akuten Schlaganfalls. *Internist (Berl)* 52, 1310-1316
- Arvidsson A, Collin T, Kirik D, Kokaia Z, Lindvall O (2002): Neuronal replacement from endogenous precursors in the adult brain after stroke. *Nat Med* 8(9), 963-970
- Ballas N, Battaglioli E, Atouf F, Andres ME, Chenoweth J, Anderson ME, Burger C, Moniwa M, Davie JR, Bowers WJ (2001): Regulation of neuronal traits by a novel transcriptional complex. *Neuron* 31, 353-365
- Ballas N, Grunseich C, Lu DD, Speh JC, Mandel G (2005): REST and its corepressors mediate plasticity of neuronal gene chromatin throughout neurogenesis. *Cell* 121, 645-657
- Barkho BZ, Song H, Aimone JB, Smrt RD, Kuwabara T, Nakashima K, Gage FH, Zhao X (2006): Identification of astrocyte-expressed factors that modulate neural stem/progenitor cell differentiation. *Stem Cells Dev* 15, 407-421
- Baron JC (1999): Mapping the ischaemic penumbra with PET: implications for acute stroke treatment. *Cerebrovasc Dis* 9, 193-201

- Bicker S, Schratt G (2008): microRNAs: tiny regulators of synapse function in development and disease. *J Cell Mol Med* 12, 1466-1476
- Budd SL (1998): Mechanisms of neuronal damage in brain hypoxia/ischemia: focus on the role of mitochondrial calcium accumulation. *Pharmacol Ther* 80, 203-229
- Buller B, Liu X, Wang X, Zhang RL, Zhang L, Hozeska-Solgot A, Chopp M, Zhang ZG (2010): MicroRNA-21 protects neurons from ischemic death. *FEBS J* 277, 4299-4307
- Büning H, Perabo L, Coutelle O, Quadt-Humme S, Hallek M (2008): Recent developments in adeno-associated virus vector technology. *J Gene Med* 10, 717-733
- Calderone A, Jover T, Noh KM, Tanaka H, Yokota H, Lin Y, Grooms SY, Regis R, Bennett MV, Zukin RS (2003): Ischemic insults derepress the gene silencer REST in neurons destined to die. *J Neurosci* 23, 2112-2121
- Campbell BC, Mitchell PJ, Kleinig TJ, Dewey HM, Churilov L, Yassi N, Yan B, Dowling RJ, Parsons MW, Oxley TJ (2015): Endovascular Therapy for Ischemic Stroke with Perfusion-Imaging Selection. *N Engl J Med* 372(11), 1009-1018
- Cameron HA, Woolley CS, McEwen BS, Gould E (1993): Differentiation of newly born neurons and glia in the dentate gyrus of the adult rat. *Neuroscience* 56(2), 337-344
- Charriaud-Marlangue C, Margail I, Represa A, Popovici T, Plotkine M, Ben Ari Y (1996): Apoptosis and necrosis after reversible focal ischemia: an in situ DNA fragmentation analysis. *J Cereb Blood Flow Metab* 16, 186-194
- Cheng LC, Pastrana E, Tavazoie M, Doetsch F (2009): miR-124 regulates adult neurogenesis in the subventricular zone stem cell niche. *Nat Neurosci* 12, 399-408
- Chong JA, Tapia-Ramirez J, Kim S, Toledo-Aral JJ, Zheng Y, Boutros MC, Altshuler YM, Frohman MA, Kraner SD, Mandel G (1995) REST: a mammalian silencer protein that restricts sodium channel gene expression to neurons. *Cell* 80, 949-957

- Christensen M, Schratt GM (2009): microRNA involvement in developmental and functional aspects of the nervous system and in neurological diseases. *Neurosci Lett* 466, 55-62
- Conaco C, Otto S, Han JJ, Mandel G (2006): Reciprocal actions of REST and a microRNA promote neuronal identity. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 2422-2427
- De Keyser J, Gdovinová Z, Uyttenboogaart M, Vroomen PC, Luijckx GJ (2007): Intravenous alteplase for stroke: beyond the guidelines and in particular clinical situations. *Stroke* 38(9), 2612-2618
- Dharap A, Bowen K, Place R, Li LC, Vemuganti R (2009): Transient focal ischemia induces extensive temporal changes in rat cerebral MicroRNAome. *J Cereb Blood Flow Metab* 29, 675-687
- Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA (1999): Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. *Trends Neurosci* 22(9), 391-397
- Doepfner TR, Ewert TA, Tonges L, Herz J, Zechariah A, ElAli A, Ludwig AK, Giebel B, Nagel F, Dietz GP (2012): Transduction of neural precursor cells with TAT-heat shock protein 70 chaperone: therapeutic potential against ischemic stroke after intrastriatal and systemic transplantation. *Stem Cells* 30, 1297-1310
- Doepfner TR, Doehring M, Bretschneider E, Zechariah A, Kaltwasser B, Müller B, Koch JC, Bähr M, Hermann DM, Michel U (2013): MicroRNA-124 protects against focal cerebral ischemia via mechanisms involving Usp14-dependent REST degradation. *Acta Neuropathol* 126, 251-265
- Doepfner TR, Kaltwasser B, Bähr M, Hermann DM (2014): Effects of neural progenitor cells on post-stroke neurological impairment - a detailed and comprehensive analysis of behavioral tests. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 8, 338
- Du L, Pertsemlidis A (2011): Cancer and neurodegenerative disorders: pathogenic convergence through microRNA regulation. *J Mol Cell Biol* 3, 176-180
- Eriksson PS, Perfilieva E, Bjork-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Peterson DA, Gage FH (1998): Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 4, 1313-1317

- Fiore R, Siegel G, Schratt G (2008): MicroRNA function in neuronal development, plasticity and disease. *Biochim Biophys Acta* 1779, 471-478
- Formisano L, Noh KM, Miyawaki T, Mashiko T, Bennett MV, Zukin RS (2007): Ischemic insults promote epigenetic reprogramming of  $\mu$  opioid receptor expression in hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 4170-4175
- Gage FH, Ray J, Fisher LJ (1995): Isolation, characterization, and use of stem cells from the CNS. *Annu Rev Neurosci* 18, 159-192
- García-Verdugo JM, Doetsch F, Wichterle H, Lim DA, Alvarez-Buylla A (1998): Architecture and cell types of the adult subventricular zone: in search of the stem cells. *J Neurobiol* 36, 234-248
- Ginsberg MD (2008): Neuroprotection for ischemic stroke: past, present and future. *Neuropharmacology* 55, 363-389
- Gould E, Tanapat P, Hastings NB, Shors TJ (1999): Neurogenesis in adulthood: a possible role in learning. *Trends Cogn Sci* 3, 186-192
- Goyal M, Demchuk AM, Menon BK, Eesa M, Rempel JL, Thornton J, Roy D, Jovin TG, Willinsky RA, Sapkota BL (2015): Randomized Assessment of Rapid Endovascular Treatment of Ischemic Stroke. *N Engl J Med* 372(11), 1019-1030
- Hata R, Maeda K, Hermann D, Mies G, Hossmann KA (2000): Evolution of brain infarction after transient focal cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 20, 937-946
- Heiss WD (2000): Ischemic penumbra: evidence from functional imaging in man. *J Cereb Blood Flow Metab* 20, 1276-1293
- Heuschmann PU, Busse O, Wagner M, Endres M, Villringer A, Röther J, Kolominsky-Rabas PL, Berger K (2010): Schlaganfallhäufigkeit und Versorgung von Schlaganfallpatienten in Deutschland. *Akt Neurol* 37, 333-340
- Hong SJ, Dawson TM, Dawson VL (2004): Nuclear and mitochondrial conversations in cell death: PARP-1 and AIF signaling. *Trends Pharmacol Sci* 25, 259-264

- Hossmann KA (1996): Periinfarct depolarizations. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 8, 195-208
- Hossmann KA (2012): The two pathophysiologies of focal brain ischemia: implications for translational stroke research. *J Cereb Blood Flow Metab* 32(7), 1310-1316
- Huang Y, Myers SJ, Dingledine R (1999): Transcriptional repression by REST: recruitment of Sin3A and histone deacetylase to neuronal genes. *Nat Neurosci* 2, 867-872
- Hwang JY, Aromolaran KA, Zukin RS (2012): Epigenetic mechanisms in stroke and epilepsy. *Neuropsychopharmacology* 38, 167-182
- Kaneko N, Hwang JY, Gertner M, Pontarelli F, Zukin RS (2014): Casein kinase 1 suppresses activation of REST in insulted hippocampal neurons and halts ischemia-induced neuronal death. *J Neurosci* 34(17), 6030-6039
- Kim J, Inoue K, Ishii J, Vanti WB, Voronov SV, Murchison E, Hannon G, Abeliovich A (2007): A microRNA feedback circuit in midbrain dopamine neurons. *Science* 317, 1220-1224
- Kowaltowski AJ, Castilho RF, Vercesi AE (2001): Mitochondrial permeability transition and oxidative stress. *FEBS Lett* 495(1-2), 12-15
- Krichevsky AM, Sonntag K-C, Isacson O, Kosik KS (2006): Specific MicroRNAs modulate embryonic stem cell-derived neurogenesis. *Stem Cells* 24, 857-864
- Kuhn HG, Dickinson-Anson H, Gage FH (1996): Neurogenesis in the dentate gyrus of the adult rat: Age-related decrease of neuronal progenitor proliferation. *J Neurosci* 16, 2027-2033
- Kwak S, Weiss JH (2006): Calcium-permeable AMPA channels in neurodegenerative disease and ischemia. *Curr Opin Neurobiol* 16, 281-287
- Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5295), 680-685
- Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, Lendeckel W, and Tuschl T (2002): Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol* 12, 735-739

- Lakhan SE, Kirchgessner A, Hofer M (2009): Inflammatory mechanisms in ischemic stroke: therapeutic approaches. *J Transl Med* 17(7), 97
- Lewis BP, Burge CB, Bartel DP (2005): Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 120, 15-20
- Lim DA, Alvarez-Buylla A (1999): Interaction between astrocytes and adult subventricular zone precursors stimulates neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 7526-7531
- Liu XS, Chopp M, Zhang RL, Tao T, Wang XL, Kassis H, Hozeska-Solgot A, Zhang L, Chen C, Zhang ZG (2011): MicroRNA Profiling in Subventricular Zone after Stroke: MiR-124a Regulates Proliferation of Neural Progenitor Cells through Notch Signaling Pathway. *PLoS ONE* 6(8), e23461
- Lucas SM, Rothwell NJ, Gibson RM (2006): The role of inflammation in CNS injury and disease. *Br J Pharmacol* 147(Suppl 1), S232-240
- Lunyak VV, Burgess R, Prefontaine GG, Nelson C, Sze SH, Chenoweth J, Schwartz P, Pevzner PA, Glass C, Mandel G (2002): Corepressor-dependent silencing of chromosomal regions encoding neuronal genes. *Science* 298, 1747-1752
- Macleod MR, Fisher M, O'Collins V, Sena ES, Dirnagl U, Bath PM, Buchan A, van der Worp HB, Traystman RJ, Minematsu K (2009): Reprint: Good laboratory practice: preventing introduction of bias at the bench. *Int J Stroke* 4(1), 3-5
- Mai A, Massa S, Rotili D, Cerbara I, Valente S, Pezzi R, Simeoni S, Ragno R (2005): Histone deacetylation in epigenetics: an attractive target for anticancer therapy. *Med Res Rev* 25, 261-309
- Makeyev EV, Zhang J, Carrasco MA, Maniatis T (2007): The MicroRNA miR-124 promotes neuronal differentiation by triggering brain-specific alternative pre-mRNA splicing. *Mol Cell* 27, 435-448
- Mehta SL, Manhas N, Raghubir R (2007): Molecular targets in cerebral ischemia for developing novel therapeutics. *Brain Res Rev* 54(1), 34-66

- Meschia JF, Bushnell C, Boden-Albala B, Braun LT, Bravata DM, Creager MA, Eckel RH, Elkind MSV, Fornage M, Goldstein LB (2014): Guidelines for the primary prevention of stroke: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke* 45(12), 3754-3832
- Michel U, Malik I, Ebert S, Bähr M, Kügler S (2005): Long-term in vivo and in vitro AAV-2- mediated RNA interference in rat retinal ganglion cells and cultured primary neurons. *Biochem Biophys Res Commun* 326, 307-312
- Mies G, Iijima T, Hossmann KA (1993): Correlation between peri-infarct DC shifts and ischaemic neuronal damage in rat. *Neuroreport* 4(6), 709-711
- Mishima T, Mizuguchi Y, Kawahigashi Y, Takizawa T (2007): RT-PCR-based analysis of microRNA (miR-1 and -124) expression in mouse CNS. *Brain Res* 1131, 37-43
- Morris R (1984): Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods* 11(1), 47-60
- Myers SJ, Peters J, Huang Y, Comer MB, Barthel F, Dingledine R (1998): Transcriptional regulation of the GluR2 gene: neural-specific expression, multiple promoters, and regulatory elements. *J Neurosci* 18, 6723-6739
- Neumann E, Schaefer-Ridder M, Wang Y, Hofschneider PH (1982): Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. *EMBO J* 1(7), 841-845
- Nimptsch U, Mansky T (2012): Trends in acute inpatient stroke care in Germany-an observational study using administrative hospital data from 2005-2010. *Dtsch Arztebl Int* 109(51-52), 885-892
- Nolte CH, Endres M (2012): Akutversorgung des ischämischen Schlaganfalls. *Internist (Berl)* 53, 585-594
- O'Collins VE, Macleod MR, Donnan GA, Horky LL, Worp BH van der, Howells DW (2006): 1,026 experimental treatments in acute stroke. *Ann Neurol* 59, 467-477
- Packer AN, Xing Y, Harper SQ, Jones L, Davidson BL (2008): The bifunctional microRNA miR-9/miR-9\* regulates REST and CoREST and is downregulated in Huntington's disease. *J Neurosci* 28, 14341-14346

- Place RF, Li LC, Pookot D, Noonan EJ, Dahiya R (2008): MicroRNA-373 induces expression of genes with complementary promoter sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 105, 1608-1613
- Rothwell PM, Coull AJ, Silver LE, Fairhead JF, Giles MF, Lovelock CE, Redgrave JNE, Bull LM, Welch SJV, Cuthbertson FC (2005): Population-based study of event-rate, incidence, case fatality, and mortality for all acute vascular events in all arterial territories (Oxford Vascular Study). *Lancet* 366, 1773-1783
- Schanzer A, Wachs FP, Wilhelm D, Acker T, Cooper-Kuhn C, Beck H, Winkler J, Aigner L, Plate KH, Kuhn HG (2004): Direct stimulation of adult neural stem cells in vitro and neurogenesis in vivo by vascular endothelial growth factor. *Brain Pathol* 14, 237-248
- Schoenherr CJ, Paquette AJ, Anderson DJ (1996): Identification of potential target genes for the neuron-restrictive silencer factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 9881-9886
- Schratt G (2009a): Fine-tuning neural gene expression with microRNAs. *Curr Opin Neurobiol* 19, 213-219
- Schratt G (2009b): microRNAs at the synapse. *Nat Rev Neurosci* 10:842-849
- Schratt GM, Tuebing F, Nigh EA, Kane CG, Sabatini ME, Kiebler M, Greenberg ME (2006): A brain-specific microRNA regulates dendritic spine development. *Nature* 439, 283-289
- Selvamani A, Sathyan P, Miranda RC, Sohrabji F (2012): An antagomir to microRNA Let7f promotes neuroprotection in an ischemic stroke model. *PLoS ONE* 7(2), e32662
- Shi Z, Chen Q, Li C, Wang L, Qian X, Jiang C, Liu X, Wang X, Li H, Kang C (2014): MiR-124 governs glioma growth and angiogenesis and enhances chemosensitivity by targeting R-Ras and N-Ras. *Neuro-Oncology* 16(10), 1341-1353
- Shuaib A, Lees KR, Lyden P, Grotta J, Davalos A, Davis SM, Diener HC, Ashwood T, Wasiewski WW, Emeribe U (2007): NXY-059 for the treatment of acute ischemic stroke. *N Engl J Med* 357, 562-571

Statistisches Bundesamt 2014

<https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/HaeufigsteTodesursachen.html>,  
Zugriff 10.11.2016

Stappert L, Roesse-Koerner B, Brustle O (2015): The role of microRNAs in human neural stem cells, neuronal differentiation and subtype specification. *Cell Tissue Res* 359, 47-64

Stroke Therapy Academic Industry Roundtable (1999): Recommendations for standards regarding preclinical neuroprotective and restorative drug development. *Stroke* 30, 2752–2758

Sun Y, Gui H, Li Q, Luo ZM, Zheng MJ, Duan JL, Liu X (2013): MicroRNA-124 protects neurons against apoptosis in cerebral ischemic stroke. *CNS Neurosci Ther* 19(10), 813-819

Thiel G, Lietz M, Cramer M (1998): Biological activity and modular structure of RE-1 silencing transcription factor (REST), a repressor of neuronal genes. *J Biol Chem* 273, 26891-26899

Thored P, Arvidsson A, Cacci E, Ahlenius H, Kallur T, Darsalia V, Ekdahl CT, Kokaia Z, Lindvall O (2006): Persistent production of neurons from adult brain stem cells during recovery after stroke. *Stem Cells* 24, 739-747

Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA (2007): Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science* 318, 1931-1934

Vemuganti R (2010): The MicroRNAs and Stroke: No Need to be Coded to be Counted. *Transl Stroke Res* 1, 158-160

Visvanathan J, Lee S, Lee B, Lee JW, Lee SK (2007): The microRNA miR-124 antagonizes the anti-neural REST/SCP1 pathway during embryonic CNS development. *Genes Dev* 21, 744-749

Weng H, Shen C, Hirokawa G, Ji X, Takahashi R, Shimada K, Kishimoto C, Iwai N (2011): Plasma miR-124 as a biomarker for cerebral infarction. *Biomed Res* 32, 135-14

Westbrook TF, Hu G, Ang XL, Mulligan P, Pavlova NN, Liang A, Leng Y, Maehr R, Shi Y, Harper JW (2008): SCFbeta-TRCP controls oncogenic transformation and neural differentiation through REST degradation. *Nature* 452, 370-374

- Wienholds E, Plasterk RH (2005): MicroRNA function in animal development. *FEBS Lett* 579(26), 5911-5922
- Wu J, Xie X (2006): Comparative sequence analysis reveals an intricate network among REST, CREB and miRNA in mediating neuronal gene expression. *Genome Biol* 7, R85
- Wu P, Zuo X, Ji A (2012): Stroke-induced microRNAs: The potential therapeutic role for stroke. *Exp Ther Med* 3, 571-576
- Yamasaki Y, Matsuura N, Shozuhara H, Onodera H, Itoyama Y, Kogure K (1995): Interleukin-1 as a pathogenetic mediator of ischemic brain damage in rats. *Stroke* 26, 676-680
- Yin KJ, Deng Z, Huang H, Hamblin M, Xie C, Zhang J, Chen YE (2010): MiR-497 regulates neuronal death in mouse brain after transient focal cerebral ischemia. *Neurobiol Dis* 38, 17-26
- Yin KJ, Hamblin M, Chen YE (2015): Angiogenesis-regulating microRNAs and ischemic stroke. *Current vascular pharmacology* 13(3), 352-365
- Zhao Y, Zhang H, Zhang D, Yu C, Zhao X, Liu F, Bian G, Ju G, Wang J (2015): Loss of microRNA-124 expression in neurons in the peri-lesion area in mice with spinal cord injury. *Neural Regen Res* 10(7), 1147–1152

## Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. M. Bähr für die Möglichkeit, die Promotion in seiner Abteilung durchführen zu dürfen.

Sehr herzlich bedanken möchte ich mich besonders bei meinem Betreuer, Herrn PD Dr. med. Thorsten R. Döppner, für das Projekt, die Einarbeitung und ausdauernde Unterstützung und Beratung vom Anfang bis zum Ende.

Ein herzliches Dankeschön gilt Herrn Prof. Dr. rer. nat. U. Michel für die Bereitstellung des Viruskonstruktes und seiner Expertise. Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Frau Ulrike Schöll für die Präparation der kortikalen Neurone für die Zellkultur.

Sehr dankbar bin ich auch allen Kollegen und Mit-Promovierenden, die den Laboralltag geteilt und verschönert haben, ganz besonders Britta Kaltwasser und Dr. Eva Picht für alle praktischen Hinweise und immer gute Laune.