

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

**Biologische Eigenschaften von
circRNA_015350/006696 in Neuronen und
Astrozyten unter hypoxischen Bedingungen**

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von

Ahmed Mohsen [geb. Abdelrahman]

aus

Kairo

Göttingen 2023

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

Betreuungsausschuss

Betreuer*in: Prof. Dr. med. T. R. Döppner, M. Sc.

Ko-Betreuer*in: Prof. Dr. rer. nat. A. Fischer

Prüfungskommission

Referent*in: Prof. Dr. med. T. R. Döppner, M. Sc.

Ko-Referent*in: Prof. Dr. rer. nat. A. Fischer

Drittreferent*in: Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Philipp Kauffmann

Datum der mündlichen Prüfung: 06.12.2024

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel „Biologische Eigenschaften von circRNA_015350/006696 in Neuronen und Astrozyten unter hypoxischen Bedingungen“ eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den
.....
(Unterschrift)

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis.....	V
1 Einleitung	1
1.1 Schlaganfall.....	1
1.1.1 Ätiologie und Epidemiologie.....	1
1.1.2 Definition.....	1
1.1.3 Pathophysiologie des Schlaganfalls.....	2
1.2 Nicht-kodierende Ribonukleinsäuren (ncRNAs).....	4
1.3 Zielsetzung	6
2 Material und Methoden	8
2.1 Material.....	8
2.2 Methoden.....	14
2.2.1 Zellkultur	14
2.2.2 Sauerstoff- und Glukoseentzug (OGD)	15
2.2.3 RNA-Isolierung	15
2.2.4 Isolierung von primären Astrozyten für RNA-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung und Überexpression von circ_006696	16
2.2.5 Ausplattieren von primären Astrozyten für Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung.....	16
2.2.6 RNA-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung	17
2.2.7 Überexpression von circ_006696	18
2.2.8 Knockdown von circ_015350 mit siRNA in SH-SY5Y Zellen unter Verwendung von Lipofectamin	20
2.2.9 Quantitative Echtzeit-PCR	21
2.3 Statistik.....	22
3 Ergebnisse.....	23
3.1 Neuronen und Astrozyten zeigten unterschiedliche Expressionsniveaus ausgewählter nicht-kodierender RNAs unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen	23
3.2 circ_015350 konnte im Zytoplasma nachgewiesen werden und war mit miR-27a-3p kolokalisiert.....	25
3.3 Fluoreszenz in situ Hybridisierung von circ_015350 und miR-27a-3p in primären Astrozyten nach 8 Stunden OGD	27
3.4 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung von circ_006696 und miR-145-5p unter normoxischen Bedingungen bei primären Astrozyten.....	29
3.5 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung von circ_006696 und miR-145-5p in primären Astrozyten nach 8 Stunden OGD	31
3.6 Überexpression von circ_006696 in primären Astrozyten	33
3.7 Knockdown von circ_015350 in SH-SY5Y Zellen.....	35
4 Diskussion.....	39
4.1 PPIA als Referenzgene	39
4.2 OGD beeinflusst die circRNA-Expressionsniveaus in allen Zelltypen.....	39

4.3	Die miR-27 wurde als ein potenzielles Ziel von circ_015350 identifiziert.....	40
4.4	Die miR-145 wurde als ein potenzielles Ziel von circ_006696 identifiziert	41
5	Zusammenfassung.....	43
6	Literaturverzeichnis	44

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Expressionsniveau von miR-27a-3p, miR-27b-3p und circ_015350 unter hypoxischen Bedingungen in Astrozyten (C8D1A).	23
Abbildung 2: Expressionsniveau von miR-27a-3p, miR-27b-3p und circ_015350 unter hypoxischen Bedingungen in (SH-SY5Y)	24
Abbildung 3: Kolokalisation von circ_015350 mit miR-27a-3p unter normoxischen Bedingungen in primären Astrozyten	25
Abbildung 4: Vergrößerungsaufnahme aus der Abbildung 3.....	26
Abbildung 5: Kolokalisation von circ_015350 mit miR-27a-3p unter hypoxischen Bedingungen in primären Astrozyten.	27
Abbildung 6: Vergrößerungsaufnahme aus Abbildung 5.....	28
Abbildung 7: Kolokalisation von circ_006696 mit miR-145-5p unter normoxischen Bedingungen in primären Astrozyten	29
Abbildung 8: Vergrößerungsaufnahme aus Abbildung 7.....	30
Abbildung 9: Kolokalisation von circ_006696 mit miR-145-5p unter hypoxischen Bedingungen in primären Astrozyten	31
Abbildung 10: Vergrößerungsaufnahme aus Abbildung 9.....	32
Abbildung 11: Überexpression von circ_006696 gegenüber der Scramble-Kontrolle.....	33
Abbildung 12: Überexpression von circ_006696 gegenüber der Scramble-Kontrolle unter hypoxischen Bedingungen nach 4 Stunden OGD.....	34
Abbildung 13: Knockdown von circ_015350 gegenüber der Kontrolle unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen nach 4 und 8 Stunden OGD	35
Abbildung 14: Expressionsniveau von miR-27a-3p mit und ohne Knockdown von circ_015350 gegenüber der Kontrolle unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen nach 4 und 8 Stunden OGD.....	37

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Geräte.....	8
Tabelle 2: Software.....	9
Tabelle 3: Chemikalien.....	9
Tabelle 4: Verbrauchsmaterial.....	10
Tabelle 5: Medien und Reagenzien.....	11
Tabelle 6: Lösungen.....	13
Tabelle 7: Kits.....	13
Tabelle 8: Zelllinien.....	14
Tabelle 9: Sequenzen der Oligonukleotid-Sonden, die für die Fluoreszenz-in-situ- Hybridisierungsexperimente verwendet wurden.....	18
Tabelle 10: Expressionvektor-Übersicht.....	19
Tabelle 11: Kontrollvektor-Übersicht.....	19
Tabelle 12: NCoA-2 Silencer® Select Pre-Designed siRNA.....	20
Tabelle 13: Zyklusbedingungen für die quantitative Echtzeit-PCR.....	21
Tabelle 14: Primer-Sequenzen für die quantitative Echtzeit-PCR.....	22

Abkürzungsverzeichnis

ATP	Adenosintriphosphat
BSS	Äquimolare Salzlösung
circRNA	Zirkuläre RNA
CMV	Zytomegalievirus
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dH₂O	Destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modifizierung von Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	Verbessertes grünes fluoreszierendes Protein
FBS	Fötales Rinderserum
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
GFAP	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
IL	Interleukin
MCAO	Mittelhirn-Arterien-Okklusion
miRNA	Mikro-RNA
mRNA	Boten-RNA
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid
OGD	Sauerstoff- und Glukoseentzug
ORF	Offener Leserahmen
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PFA	Paraformaldehyd
PLO	Poly-L-Ornithin
PPIA	Peptidylprolyl-Isomerase A
pre-miRNA	Vorläufer-miRNA
qRT-PCR	Quantitative Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
RISC	RNA-induzierter Silencing-Komplex
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	Ribosomale RNA
SSC	Kochsalz-Natriumcitrat-Puffer
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Schlaganfall

1.1.1 Ätiologie und Epidemiologie

Der Schlaganfall ist in Deutschland und weltweit eine der häufigsten Todesursachen (Busch und Kuhnert 2017). Darüber hinaus zählt der Schlaganfall weltweit zu den führenden Ursachen für langfristige Behinderungen (Busch und Kuhnert 2017; Virani et al. 2020). Jedes Jahr treten in Deutschland ca. 200.000 neue Fälle und 70.000 wiederholte Schlaganfälle auf (Heuschmann et al. 2010). Aufgrund des drastischen Anstiegs der Neuerkrankungen mit zunehmendem Lebensalter ist zu erwarten, dass die Prävalenz und Inzidenz von Schlaganfällen bei beiden Geschlechtern bis zum Jahr 2050 aufgrund der derzeitigen Abnahme der Sterblichkeitsrate und der Veränderung der demografischen Altersstruktur zunehmen wird (Foerch et al. 2008). 25 bis 33 Prozent der Patienten, die einen Schlaganfall erlitten haben, sterben innerhalb des ersten Jahres aufgrund der Folgen des Schlaganfalls. Unter den Überlebenden haben bis zu 40 Prozent erhebliche funktionelle Einschränkungen (Hankey 2017). Von daher hat der Schlaganfall nicht nur für den betroffenen Einzelnen weitreichende Auswirkungen, sondern ist auch von großer sozioökonomischer Bedeutung.

1.1.2 Definition

Die Weltgesundheitsorganisation definiert einen Schlaganfall als das schnelle Auftreten von klinischen Symptomen, die auf eine zerebrale Funktionsstörung mit vaskulären Ursachen zurückzuführen sind und länger als 24 Stunden anhalten oder tödlich sein können (Warlow 1998). Schlaganfälle können in ischämische und hämorrhagische Schlaganfälle unterteilt werden. Ein hämorrhagischer Schlaganfall entsteht durch das Platzen eines Blutgefäßes und kann je nach Ort der Blutung in eine intrazerebrale Blutung und eine subarachnoidale Blutung unterteilt werden (Grysiewicz et al., 2008). Etwa 87 Prozent aller Schlaganfälle werden durch einen ischämischen Schlaganfall verursacht. Ein ischämischer Schlaganfall wird definiert als eine Episode von neurologischen Funktionsstörungen, die aufgrund des Verschlusses eines Blutgefäßes durch einen fokalen Infarkt im Gehirn, der Wirbelsäule oder der Netzhaut entsteht (Sacco et al., 2013; Grysiewicz et al., 2008). Diese Blockaden können durch Blutgerinnsel, Arteriosklerose oder Embolien ausgelöst werden. Die betroffenen Hirnregionen erhalten dadurch nicht ausreichend Sauerstoff und Nährstoffe, was zu fokalneurologischen Defiziten führt (Grysiewicz et al. 2008; Sacco et al. 2013).

1.1.3 Pathophysiologie des Schlaganfalls

Das betroffene Gewebe des Schlaganfalls lässt sich in unterschiedliche metabolische Zonen einteilen, darunter der Infarktkern, der bereits unwiederbringlich zerstört ist, sowie die Penumbra, die ein potenziell reversibel geschädigtes Areal darstellt (Hossmann 1994). Wenn der Blutfluss eingeschränkt wird, der normalerweise Sauerstoff und Glukose zu den Zellen transportiert, kann dies dazu führen, dass die ATP-abhängige Na^+/K^+ -Pumpe, welche für die Aufrechterhaltung des Zell-Membranpotenzials verantwortlich ist, im Bereich des Infarktkerns ausfällt (Katsura et al. 1994; Khoshnam et al. 2017).

Dadurch werden Kalziumkanäle aktiviert, was dazu führt, dass mehr exzitatorische Neurotransmitter, insbesondere Glutamat, in den extrazellulären Raum freigesetzt werden. Wenn sich eine große Menge von Glutamat außerhalb der Zellen ansammelt, kann dies zu einer Exzitotoxizität führen, indem es die Aktivierung von N-Methyl-D-Aspartat (NMDA) und α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure (AMPA) Rezeptoren auslöst. Dies bewirkt, dass Kalziumionen (Ca^{2+}) in die betroffenen Zellen strömen, was weitere schädliche Auswirkungen hat. Dazu gehören die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies, die Entzündungen und Apoptose verursachen können, sowie die Aktivierung von proteolytischen Enzymen, welche die Proteine im Zytoskelett und der extrazellulären Matrix abbauen können (Dirnagl et al. 1999).

Die Peri-Infarkt-Depolarisationen (PID) treten in der Penumbra auf (Hossmann 1996). Als anoxische Depolarisationen, auch als Streudepolarisierung bekannt (Xing et al. 2012), beginnen diese am Infarktkern und wandern in die Penumbra (Rakers et al. 2017). Die PID verringern den Blutfluss im Gehirn und führen zu einer sehr energieintensiven Repolarisation, die den Stoffwechselbedarf erhöht (von Bornstädt et al. 2015). Infolgedessen verringert sich das Regenerationspotenzial der Penumbra und führt zu einer Verschlechterung der Prognose (Mies et al. 1993). Die inflammatorische Immunantwort auf zerebrale Ischämie wird intravasal durch Aktivierung des Komplementsystems, der Thrombozyten und des Endothels ausgelöst, nachdem ein Energiemangel aufgetreten ist (Chamorro et al. 2012).

Die so genannten „damage associated molecular pattern (DAMPS)“, die von Mikrogliazellen über Pathogenerkennungszeporen wie dem Toll-like-Rezeptor (TLR) erkannt werden, aktivieren die residenten Mikrogliazellen (Shim und Wong 2016). Aktivierte Mikrogliazellen verändern sich morphologisch und wandern in den Infarktkern und die Penumbra ein (Ransohoff und Perry 2009). Es besteht die Möglichkeit, die Mikroglia „klassisch“ oder „alternativ“ zu aktivieren (Michelucci et al. 2009). Klassisch aktivierte Mikroglia, auch M1 genannt, sezernieren pro-inflammatorische Zytokine und freie Radikale wie Stickstoffmonoxid (NO). M2-aktivierte Mikroglia erhöhen nicht nur die Produktion von

NO, sondern verstärken auch anti-inflammatorische Zytokine (Xing et al. 2012; Kawabori und Yenari 2015).

Außerdem führen Hypoxie und eine hohe intrazelluläre Konzentration von Ca^{2+} und ROS zu einer erhöhten Expression von Transkriptionsfaktoren wie dem Nuclear Factor-kappa B (NF- κ B), dem Hypoxie-induzierbaren Faktor 1 (HIF-1) und dem interferonregulatorischen Faktor 1, die zur Expression von pro-inflammatorischen Effektorproteinen führen (Dirnagl et al. 1999).

Da die Zellen im ischämischen Kern am stärksten von den ischämischen Bedingungen betroffen sind, findet ein Zelltod, die sogenannte Nekrose, statt. Es handelt sich hierbei um eine nicht-apoptotische Form des Zelltods. Zu den Anzeichen einer Nekrose, die durch die Freisetzung zytoplasmatischer oder entzündungsfördernder Moleküle verursacht wird, gehören Zellschwellung, Vakuolisierung, Membranbruch und Entzündung um die tote Zelle (Saleem 2021).

In der Penumbra, in der die Neuronen beeinträchtigt sind, die Sauerstoff- und Glukosespiegel aber normalerweise noch für das Überleben der Zellen ausreichend sind und eine neuronale Erholung stattfinden kann (Hossmann 1994), ist die Apoptose am weitesten verbreitet (Sekerdag et al. 2018). Die Apoptose ist im Gegensatz zur Nekrose stark reguliert und wird daher auch als programmierter Zelltod bezeichnet. Da es ein energieaufwändiger Prozess ist, findet die Apoptose hauptsächlich in der Penumbra statt.

Apoptose ist gekennzeichnet durch Zellschrumpfung, Aufblähen der Zellmembran, Chromatinkondensation und DNA-Fragmentierung sowie Bildung apoptotischer Körper (Abou-Ghali und Stiban 2015). Im Gegensatz zur Nekrose bleibt die Zellmembran bei der Apoptose bis zum vollständigen Zelltod bestehen (Sekerdag et al. 2018).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die komplexe Pathophysiologie eines ischämischen Schlaganfalls unterschiedliche Angriffspunkte für therapeutische Interventionen bietet, die darauf abzielen, bestimmte biologische Prozesse zu regulieren oder zu beeinflussen.

Im nachfolgenden Abschnitt wird die Rolle der circRNAs und miRNAs im Rahmen des ischämischen Schlaganfalls im Detail dargestellt.

1.2 Nicht-kodierende Ribonukleinsäuren (ncRNAs)

Nicht-kodierende RNA-Moleküle (ncRNAs) sind solche, die nicht für Proteine kodieren, sondern eine Vielzahl biologischer Funktionen erfüllen, wie die Regulierung von mRNAs oder miRNAs, sowie die Hemmung oder Aktivierung der Transkription (Hombach und Kretz 2016; Ning und Li 2018). Mikro-RNAs (miRNAs), kleine RNA-Moleküle, die die Translation und die mRNA-Stabilität kontrollieren können, sind eine wichtige Untergruppe der nichtcodierenden RNAs.

Zirkuläre RNAs oder circRNAs sind eine neue Art von nicht-kodierenden RNAs, die erst kürzlich identifiziert wurden (Memczak et al. 2013). Es handelt sich um stabil exprimierte RNA-Moleküle, die eine kovalent verknüpfte zirkuläre Struktur bilden. Auch circRNAs übernehmen wichtige biologische Aufgaben.

1.2.1 Mikro-RNAs

Mikro-RNAs (miRNAs) sind kleine einzelsträngige RNA-Moleküle mit einer Länge von 21-23 Nukleotiden (Bartel 2004). Sie wirken sich auf viele physiologische Prozesse wie Stoffwechsel, Zelldifferenzierung und Apoptose aus und spielen eine bedeutende Rolle bei der posttranskriptionellen Genregulierung (Zhang X et al. 2019).

Die meisten miRNAs werden von der RNA-Polymerase II aus Introns oder intergenen Regionen transkribiert. Das primäre Transkript wird dann durch einen Mikroprozessorkomplex zu einer pre-miRNA von etwa 70 Nukleotiden geschnitten und in das Zytoplasma exportiert (Bushati und Cohen 2007). Dort wird die pre-miRNA durch das Enzym Dicer in einen etwa 22 Nukleotide langen miRNA: miRNA*-Duplex gespalten, der das Argonaut-Protein Ago2 anzieht und zur Bildung des RISC-Komplexes führt.

Durch die Bindung von RISC an eine mRNA wird dann deren Translation unterdrückt. Einige miRNAs können dabei mehrere mRNAs ansprechen und eine miRNA kann somit mehrere mRNAs regulieren (Gebert und MacRae 2019).

Es wurde auf diese Weise festgestellt, dass eine Vielzahl von miRNAs Signalwege regulieren, die verschiedene Mechanismen der postischämischen Pathophysiologie beeinflussen (Mirzaei et al. 2018).

Die Nachweisbarkeit von deregulierten miRNA-Spiegeln im Blut macht sie zu vielversprechenden Kandidaten für die Entwicklung von diagnostischen und therapeutischen Biomarkern im Zusammenhang mit Schlaganfällen (Mirzaei et al. 2018). Durch ihre einfache Gewinnung aus dem Blut können sie dazu beitragen, verschiedene Stadien des Schlaganfalls zu verfolgen und den Verlauf vorherzusagen. Dies bietet zahlreiche Vorteile, wie beispielsweise die Möglichkeit, sie als Zielmoleküle für neue therapeutische Ansätze zu nutzen. Allerdings müssen noch weitere Untersuchungen durchgeführt werden,

um geeignete miRNA-Kandidaten zu identifizieren und die Analysemethoden für den klinischen Gebrauch zu implementieren.

1.2.2 Zirkuläre RNAs

CircRNAs entstehen durch Backsplicing-Ereignisse, bei denen das 3'-Ende des Transkripts mit dem 5'-Ende verbunden wird. Dies schützt sie vor dem Abbau durch Exoribonukleasen und führt zu einer hohen strukturellen Stabilität (Salzman et al., 2012; Jeck und Sharpless, 2014). Die meisten circRNAs wurden jedoch von Exons transkribiert und in Sense- oder, in geringerem Maße, Antisense-Richtung an bekannte Transkripte gebunden (Memczak et al., 2013).

CircRNAs können eine Vielzahl von biologischen Aufgaben erfüllen (Chen, 2016). Sie haben die Fähigkeit, mit einer Vielzahl von RNA-bindenden Proteinen zu interagieren und deren Eigenschaften zu beeinflussen. Sie fungieren als „Proteinschwämme“, indem sie Proteine binden und ihre Funktion regulieren. Außerdem können Sie auch die Expression ihrer „elterlichen“ Gene sowie anderer Gene beeinflussen. Darüber hinaus können die circRNAs als Regulatoren der Transkription wirken und die Aktivität von Transkriptionsfaktoren modulieren (Hsiao et al., 2017; Kristensen et al., 2019).

Die Fähigkeit von circRNAs, an miRNAs zu binden, ist jedoch die wichtigste bisher identifizierte Wirkungsweise. Dadurch haben sie die Fähigkeit, selbst als miRNA-inaktivierende Schwämme zu dienen und den Abbau einer gewünschten mRNA durch miRNA zu stoppen, was zu einer erhöhten Konzentration der entsprechenden mRNA führt (Panda 2018; Kristensen et al. 2019).

Auch die Verbindung zwischen circRNA-Expressionsprofilen und Schlaganfall wurde untersucht. Sechs der circRNAs, die laut Microarray-Analyse nach einem Schlaganfall verändert wurden, wurden von Mehta et al. (2017) mit einer quantitativen Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion untersucht. Drei von ihnen wurden als hochreguliert identifiziert (circ_008018, circ_015350 und circ_016128), während drei von ihnen als herunterreguliert identifiziert wurden (circ_011137, circ_001729 und circ_006696). Außerdem wiesen fünf dieser sechs circRNAs über 60 miRNA-Bindungsstellen auf, was die Möglichkeit eröffnet, dass diese circRNAs als miRNA-Schwämme fungieren könnten.

1.3 Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit war es, zwei der sechs circRNAs, die in der Studie von Mehta et al. (2017) als verändert nach Schlaganfall identifiziert wurden, genauer zu untersuchen, insbesondere ihre Expression in verschiedenen Zelltypen und ihre mögliche Funktion als miRNA-Schwamm. Die circRNAs circ_006696 und circ_015350 wurden ausgewählt, weil sie auf Hypoxie reagieren und eine große Anzahl von miRNA-Bindungsstellen aufweisen.

Um die Analysebedingungen möglichst genau definieren zu können, wurde mit Zellkulturmodellen gearbeitet. Primäre Astrozyten, primäre Neurone sowie eine Astrozyten-Zelllinie (C8-D1A) und eine Neuroblastom-Zelllinie (SH-SY5Y) kamen dabei zur Anwendung. Die genannten Zellen wurden einem Sauerstoff- und Glukoseentzug (OGD) ausgesetzt. Danach wurden in jeder Zellkultur die Veränderungen in den Expressionsniveaus der zwei circRNA-Kandidaten und ihrer möglichen miRNA-Kandidaten bewertet. Bislang gibt es keine Informationen über die möglichen Funktionen der circRNAs, die in dieser Studie untersucht wurden oder ihre Bedeutung für den ischämischen Schlaganfall beim Menschen.

Es wird angenommen, dass circRNAs als miRNA-Schwämme dienen können. Daher wurden circ_006696 und circ_015350 untersucht, ob sie möglicherweise mit einer oder mehreren miRNAs interagieren können. Die Datenbanken miRDB (<https://mirdb.org>), TargetScanMouse (<https://www.targetscan.org>) und RNAhybrid (<https://bibiserv.cebitec.uni-bielefeld.de/rnahybrid/>) wurden verwendet, um mögliche Interaktionspartner von circ_006696 und circ_015350 zu finden.

Aus diesen potenziellen Zielmolekülen wurden miRNAs ausgewählt, von denen berichtet wurde, dass sie nach einem ischämischen Schlaganfall in Tiermodellen hochreguliert bzw. herunterreguliert wurden (Jeyaseelan et al. 2008; Dharap et al. 2009; Wang et al. 2019).

Die Studien von Dharap und seinen Kollegen haben gezeigt, dass die Hochregulierung von mir-145 nach einer transienten MCAO die Expression des antioxidativen Proteins SOD-2 verhindert. Die Behandlung von erwachsenen männlichen spontan hypertensiven Ratten (280-300 g; Charles River) mit antagomir-145 wirkte diesem Effekt entgegen und führte zu einer Neuroprotektion (Dharap et al. 2009).

Ähnlich war es bei einer Studie von Jeyaseelan 2008, die gezeigt hat, dass miR-145 als eine spezifische miRNA identifiziert wurde und auch eine deutliche Hochregulierung für miR-145 nach einem transienten MCAO bei männlichen Sprague-Dawley-Ratten (200-300 g) erkannt worden ist (Jeyaseelan et al. 2008).

Wang und seine Kollegen haben berichtet, dass die Hemmung von miR-27b die Neurogenese im Gyrus dentatus (DG) des Hippocampus und in der subventrikulären Zone (SVZ) der Seitenventrikel über die Aktivierung von AMPK verbessert, außerdem verbesserte sich die Erholung nach dem Schlaganfall in einem MCAO-Modell mit männlichen

C57BL/6J-Mäusen, was eine potenzielle therapeutische Option für den ischämischen Schlaganfall darstellen könnte (Wang et al. 2019).

Infolgedessen wurden miR-145-5p als potenzieller Kandidat für eine Interaktion mit circ_006696 ausgewählt und miR-27a-3p und miR-27b-3p als potenzielle Kandidaten für circ_015350 ausgewählt. Ihre Expressionswerte wurden in Neuronen und Astrozyten mittels qRT-PCR bestimmt.

Schließlich wurden potenzielle circRNA- und miRNA-Kandidaten mit Hilfe von RNA-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) analysiert, um zu untersuchen, ob die circRNA und die miRNAs miteinander interagieren sein können. Am Ende wurde die circRNAs-miRNAs-Interaktion durch Überexpression und Knockdown der circRNAs untersucht und mittels qRT-PCR analysiert.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Tabelle 1: Geräte

Gerät, Typ	Hersteller, Stadt, Land
Feinwaage, BL210S	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Gefrierschrank -20 °C	Liebherr, Bulle, Schweiz
Gefrierschrank -80 °C	Heraeus, Hanau, Deutschland
Hypoxie-Kammer, IBT-HGB16	Toepffer Lab Systems, Göppingen, Deutschland
Inkubationsschrank, Heracell 150	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Deutschland
Kammer zur Zellzählung (Neubauer-Kammer)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
LightCycler® 480 II	Roche, Basel, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop AxioPlan 2	Zeiss, Jena, Deutschland
NanoDrop ND-1000-Spektralphotometer	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Deutschland
Orbitaler Schüttler	IKA, Staufen im Breisgau, Deutschland
Optima XPN-80 Ultrazentrifuge	Beckman Coulter, Brea, USA
Lichtmikroskop, AxioStar Plus	Zeiss, Jena, Deutschland
Mikroskopkamera, AxioCamMRc	Zeiss, Jena, Deutschland
Photometer, Sunrise	Tecan, Männedorf, Schweiz
Reinstwasseranlage, Arium pro	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Thermocycler, Cyclone 25	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Trockenschrank, UT 20	Heraeus, Hanau, Deutschland
Mikrozentrifuge, 5415 R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Kühlzentrifuge, 5810R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Tabelle 2: Software

Software	Hersteller, Stadt, Land
AxioVision Software	Zeiss, Jena, Deutschland
GraphPad Prism 8 Software	GraphPad Software, San Diego, USA
ImageJ Software	National Institutes of Health, Bethesda, USA
ZEN Mikroskopiesoftware	Zeiss, Jena, Deutschland

Tabelle 3: Chemikalien

Chemikalie	Hersteller, Stadt, Land
50x Denhardt's Lösung	Invitrogen, Waltham, USA
Chloroform	Merck Millipore, Deutschland
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dikaliumhydrogenorthosphat (K_2HPO_4)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Diamidinphenylindol (DAPI)	AppliChem GmbH, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
DNase	Roche, Basel, Schweiz
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Formamid	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Isopropanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Thiazolylblau-Tetrazoliumbromid (MTT)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Paraformaldehyd (PFA)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Polyethylenglykol (PEG) 6000	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Poly-L-ornithinhydrobromid (PLO)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA

Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Th. Geyer, Deutschland
RNase-freies Wasser	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Deutschland
Lachssperma-DNA, abgeschert	Invitrogen, Waltham, USA
Natriumchlorid (NaCl)	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Natriumcitrat	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Salzsäure (HCL)	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
TRIzol	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin-EDTA	Gibco®, Life Technologies™, Paisley, Großbritannien
Trypanblau	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Triton X-100	Sigma Aldrich, St. Louis, USA

Tabelle 4: Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Hersteller, Stadt, Land
15 und 50 ml Falcon-Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
6-Well-Platten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
24-Well-Platten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
96-Well-Platten	StarLab, Hamburg, Deutschland
T75- und T175-Zellkulturflaschen	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Chamberslides	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Filtropur V50, 500 ml, 0,2 µm	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Immu-Mount-Einbettmedium	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Deutschland
Parafilm M	Bemis, Neenah, USA
PCR-Gefäße	StarLab, Hamburg, Deutschland

Petrischale	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
5 ml, 10 ml, 25 ml und 50 ml Pipetten	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitze	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Spritze	BD Plastipak, Franklin Lakes, USA
Röhrchen (verschiedener Größen)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zellschaber	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

Tabelle 5: Medien und Reagenzien

Medium/Reagenz	Zusammensetzung	Hersteller, Stadt, Land
Astrozyten-Medium	DMEM ohne Na-Pyruvat, mit stabilem Glutamin, mit 3,7 g/L NaHCO ₃ , mit 4,5 g/L D-Glucose	PAN-Bio-tech, Aidenbach, Deutschland
	1% Penicillin-Streptomycin (10.000 U/ml)	Gibco®, Paisley, UK
	10% fötales Rinderserum (FBS)	Biochrom, Berlin, Deutschland
10 x BSS ₀ gepufferte Salzlösung	800 ml dH ₂ O	
	68 g Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
	4 g Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
	2 g Magnesiumsulfat-Heptahydrat (MgSO ₄ * 7 H ₂ O)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA

	1,4 g Natriumphosphatmonobasisch Monohydrat (NaH ₂ PO ₄ * H ₂ O)	Merck, Darmstadt, Deutschland
BSS ₀ -Lösung	43 ml dH ₂ O	
	5 ml 10 x BSS	
	1,31 ml 1 M Natriumhydrogencarbonat NaHCO ₃	Merck, Darmstadt, Deutschland
	0,5 ml 1 M HEPES	Sigma Al- drich, St. Louis, USA
	90 µl Kalziumchlorid CaCl ₂	Merck, Deutschland
Fötales Rinderse- rum		Gibco®, Paisley, UK
Lipofectamin		Invitrogen, Waltham, USA
Opti-MEM Serum- reduziertes Me- dium für die Trans- fektion kationi- scher Lipide		Gibco®, Paisley, UK
Neuronen-Medium (SH-SY5Y Zelli- nie)	DMEM/F12 ohne Na-Pyruvat, mit stabilem Glu- tamin, mit 3,7 g/L NaHCO ₃ , mit 4,5 g/L D-Glu- cose	Gibco®, Paisley, UK
	1% Penicillin-Streptomycin (10.000 U/ml)	Gibco®, Paisley, UK
	10% fötales Rinderserum (FBS)	Gibco®, Paisley, UK
	0.25% GlutaMAX™-I (100X)	Gibco®, Paisley, UK

Tabelle 6: Lösungen

Lösung	Zusammensetzung
1x phosphatgepufferte Salzlösung (PBS, pH 7,4)	8 g NaCl 0,2 g KCl 2,16 g Na ₂ HPO ₄ 0,2 g KH ₂ PO ₄ 800 ml dH ₂ O
4 % PFA Fixierlösung	40 g Paraformaldehyd 1 L PBS

Tabelle 7: Kits

Kits	Hersteller, Stadt, Land
DNase I	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Deutschland
KAPA SYBR® FAST qRT-PCR Master Mix (2X) Kit	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Lipofectamine RNAiMAX	Invitrogen, Waltham, USA
NCoA-2 Silencer® Select Pre-Designed siRNA	Ambion, Carlsbad, USA
QIAGEN Plasmid Kit	QIAGEN, Hilden, Deutschland
RevertAid H Minus -cDNA-Synthese-Kit	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Deutschland
TurboFect™ Transfection Reagent	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Deutschland

2.2 Methoden

Die Experimente für diese Arbeit wurden in der Arbeitsgruppe für Translationale Schlaganfallforschung der Universitätsmedizin Göttingen in der Klinik für Neurologie unter der Leitung von Prof. Dr. med. Thorsten R. Döppner durchgeführt. Die Generierung von Primärzellkulturen wurde freundlicherweise durch die Mitarbeiter der AG durchgeführt. Die Materialien für die im Folgenden beschriebenen Methoden sind in den entsprechenden Abschnitten von Kapitel 2 aufgeführt (siehe Tabellen 1 bis 7).

2.2.1 Zellkultur

Die verwendeten Zellen wurden in T75 Zellkulturflaschen kultiviert, bis eine Konfluenz von 90% erreicht war. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen wurden einmal mit 10 ml PBS gewaschen. Das PBS wurde entfernt und die Zellen wurden mit 3 ml 1x Trypsin für 3-4 min inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 6-8 ml Medium gestoppt. Anschließend wurde die Zellsuspension in ein 15-ml-Reaktionsgefäß überführt und 4 Minuten lang bei 800 U/min zentrifugiert. Nach dem Absaugen des Überstands wurde 1 ml neues Medium zugegeben und die Zellen mit einer Neubauer-Kammer in einer 1:10-Verdünnung mit Trypanblau gezählt. Zur Vorbereitung der OGD-Experimente wurden 6-Well-Platten verwendet. $4,45 \cdot 10^5$ für primären Astrozyten, $5 \cdot 10^5$ für SH-SY5Y-Zellen und $6 \cdot 10^5$ für C8-D1A Zellen wurden in jede Vertiefung einer 6-Well-Platte in 2 ml Medium gegeben.

Tabelle 8: Zelllinien für Zellkultur

Zelllinie	Beschreibung	Hersteller, Stadt, Land
C8-D1A CRL-2541™	Die C8-D1A-Zelllinie leitet sich von Astrozyten ab, die aus dem Kleinhirn von Mäusen isoliert wurden. Organismus: <i>Mus musculus</i> , Maus.	ATCC, Manassas, USA
SH-SY5Y CRL-2266™	Die SH-SY5Y-Zelllinie ist eine dreifach geklonte Unterlinie der Neuroblastom-Zelllinie SK-N-SH (ATCC HTB-11), die 1970 aus einem metastatischen Knochentumor eines 4 Jahre alten Krebspatienten entwickelt wurde. Organismus: <i>Homo sapiens</i> , Menschen	ATCC, Manassas, USA

2.2.2 Sauerstoff- und Glukoseentzug (OGD)

Hier wurden die Zellen in einer Hypoxiekammer mit glukosefreiem Medium kultiviert, um in diesem Zellkulturmodell Ischämiebedingungen wie während eines Schlaganfalls zu simulieren (Goldberg und Choi 1993). Nach 4 und 8 Stunden wurde das Medium wieder gegen normales Medium ausgetauscht, um die Zellen in einer normoxischen Umgebung wieder mit Sauerstoff und Glukose zu versorgen.

Der Überstand der Neuronen und Astrozyten wurde abgesaugt und die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen. Dann wurden sie mit 2 ml 1x ausgeglichene Salzlösung (BSS₀) bedeckt und in eine Hypoxiekammer (Toepffer Lab Systems, Göppingen, Deutschland) mit einer Mischung aus 95% N₂ /5% CO₂ bei 37 °C überführt. Die Zellen wurden unter diesen Bedingungen des Sauerstoff- und Glukose-Entzugs vier und acht Stunden lang inkubiert. Danach wurden die Zellen aus der Kammer entnommen, das BSS₀ wurde entfernt und frisches Astrozyten- oder Neuronenmedium zugegeben. Die Zellen wurden anschließend 18 Stunden lang reoxygeniert. In jedem Experiment wurden die OGD-exponierten Zellen mit normoxischen Kontrollen verglichen, die in glukosehaltigem Medium inkubiert und unter Standard-Inkubationsbedingungen gehalten wurden.

2.2.3 RNA-Isolierung

Zur Extraktion der RNA wurde die TRIzol-Methode verwendet. Der Überstand der Zellen, die vier und acht Stunden lang einem Sauerstoff- und Glukoseentzug ausgesetzt waren oder als Kontrolle unter normalen Bedingungen gehalten wurden, wurde abgesaugt und 500 µl TRIzol (Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Deutschland) wurden in jede Vertiefung einer 6-Well-Platte gegeben, um die Zellen zu lysieren. Nach einer 5-minütigen Inkubation wurden das Zelllysat aus zwei Vertiefungen jeweils in ein 2-ml-Reaktionsgefäß überführt. In jedes Reaktionsgefäß wurden 200 µl Chloroform gegeben und geschüttelt, bis die Reagenzien gemischt waren. Dann wurden die Proben bei 12000 U/min für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert und der klare Überstand in neue Reaktionsgefäße überführt. Jeder Probe wurden 500 µl Isopropanol zugesetzt, erneut gemixt und wie oben beschrieben zentrifugiert. Danach wurde der Überstand verworfen und 1 ml 75%iges Ethanol zu jedem RNA-Pellet gegeben. Nach einer 5-minütigen Zentrifugation bei 7500 U/min wurde der Überstand erneut verworfen und die Reaktionsgefäße wurden offengelassen, damit das Pellet trocknen konnte. Schließlich wurden 25 µl RNase-freies Wasser hinzugefügt und die RNA-Konzentration mit einem NanoDrop™ 2000 Spektralphotometer (Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Deutschland) bestimmt.

2.2.4 Isolierung von primären Astrozyten für RNA-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung und Überexpression von circ_006696

Für die Isolierung von primären Astrozyten wurden T75-Zellkulturflaschen mit PLO beschichtet, wie oben beschrieben. Astrozyten und Mikroglia wurden aus den Kortizes von neugeborenen Mäusen am ersten postnatalen Tag isoliert. Dazu wurden die Mäuse schmerzfrei getötet und die Gehirne entnommen. Nach der Entfernung der Hirnhaut, des Kleinhirns und der weißen Substanz wurde das Kortexgewebe 15 Minuten lang bei 37 °C mit 1 ml 0,05% Trypsin und 50 µl DNase I behandelt. Anschließend wurde die Probe 5 Minuten lang bei 300 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und die Zellen wurden in 10 ml DMEM mit 10% FBS und 1% Pen/Strep (Astrozytenmedium) resuspendiert, bevor sie in einer beschichteten T75-Flasche mit 10 ml Astrozytenmedium überführt wurden. Drei Tage nach der Isolierung wurde das Medium gegen frisches Astrozytenmedium ausgetauscht.

Zehn Tage nach der Präparation wurden Mikroglia und Astrozyten getrennt. 6-Well-Platten wurden dafür bei 37 °C für 1 Stunde mit 1 ml 1x PLO beschichtet und wie oben beschrieben zweimal mit PBS gewaschen. Da Mikroglia weniger adhären sind als Astrozyten, wurde die Zellkulturflasche bei 340 U/min auf einem Orbitalschüttler geschüttelt. Alle fünf Minuten wurde die Ablösung der Mikroglia unter dem Mikroskop überprüft, bis sich alle Mikroglia abgelöst hatten. Dann wurde das Medium, das die Mikroglia enthielt, entfernt und neues Medium zu den verbleibenden adhären Astrozyten hinzugefügt.

2.2.5 Ausplattieren von primären Astrozyten für Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

Für die Vorbereitung der FISH-Experimente wurden 4-Well Zellkulturkammern (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland), auf Polycycloalkan (PCA)-Objektträger mit ablösbarem Rahmen verwendet. Sie wurden 1 Stunde lang bei 37 °C mit PLO beschichtet. Das Astrozytenmedium wurde von T75-Zellkulturflaschen entfernt und die primären Astrozyten wurden einmal mit 10 ml PBS gewaschen. Das PBS wurde abgesaugt und die Zellen wurden mit 2 ml 1x Trypsin für 3 Minuten inkubiert. Die Reaktion wurde gestoppt, indem 6 ml Medium in die T75-Zellkulturflaschen gegeben wurden. Die Zellsuspension wurde dann in ein 50-ml-Reaktionsgefäß überführt und 8 Minuten lang bei 800 U/min zentrifugiert. Nach dem Absaugen des Überstands wurde 1 ml neues Medium zugegeben und die Zellen mit einer Neubauer-Kammer in einer 1:10-Verdünnung mit Trypanblau gezählt. $0,88 \cdot 10^5$ Zellen wurden in jede Kammer einer 4-Well-Platte ausgesät und mit 1 ml Medium gegeben.

2.2.6 RNA-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung

Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) wurde verwendet, um die Lokalisierung und potenzielle Ko-Lokalisierung ausgewählter circRNAs und miRNAs nachzuweisen (Zirkel und Papantonis, 2018). Es wurden Sonden verwendet, die die „Kopf-Schwanz“-Verbindungen von circ 006696 und circ 015350 überspannen, miR-145-5p und miR-27a-3p nachweisen sowie mit ATTO550 oder Alexa Fluor 488 fluoreszierend markiert waren (Tabelle 9). Primäre Astrozyten wurden wie erwähnt in 4-Well Zellkulturkammern ausgesät und vier Tage später für 15 Minuten mit 4% Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Anschließend wurden die Zellen 5 Minuten lang mit PBS gewaschen, bevor sie mit eiskaltem 70%igem Ethanol fixiert wurden.

Nach Waschen in PBS für 5 Minuten erfolgte eine 10-minütige Permeabilisierung mit 0,5% Triton-X, anschließend wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen und mit 3,7 % PFA für 5 Minuten nachfixiert, gefolgt von einmaligem Waschen mit PBS für 10 Minuten. Die Hybridisierungsmischung wurde stets frisch hergestellt. Die Probe enthielt 25% Formamid, 2x SSC, 200 ng/L gescherte Lachssperma-DNA, 5x Denhardts Lösung, 50 mM Phosphatpuffer (20 mM KH_2PO_4 , 30 mM K_2HPO_4 , pH 7,0) und 1 mM EDTA. Die Endkonzentration für jede Sonde betrug 2,5 ng/L. Die Sonden wurden dabei entweder einzeln oder als Kombination aus zwei Sonden aufgetragen. Hybridisierungsmischung wurde 10 Minuten lang bei 90 °C denaturiert und anschließend sofort auf Eis gelegt. 150 µl dieser Mischung wurden über Nacht in jeder Kammer bei 37 °C in einer lichtgeschützten Umgebung inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Hybridisierungsmischung entfernt und die Zellen wurden dreimal mit 2x SSC bei 37°C für 10 Minuten gewaschen. Danach wurde ein Waschschriff mit DEPC H_2O durchgeführt und die Zellkerne wurden mit 4',6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI) (1: 10000 in PBS) für 5 min bei RT gegengefärbt. Anschließend wurden die Zellen 5 Minuten lang mit PBS gewaschen und die Objektträger mit ImmoMount (Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Deutschland) eingedeckelt. Die Zellen wurden anschließend an einem konfokalen Mikroskop analysiert. Die Experimente wurden an zwei verschiedenen Gruppen durchgeführt: die erste Gruppe unter normoxischen Bedingungen und die zweite nach 8 Stunden OGD.

Tabelle 9: Sequenzen der Oligonukleotid-Sonden, die für die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungsexperimente verwendet wurden.

Name	Sequenz
circ_015350	ATT0550-5'-CAGTGAAGCCAGATGCGAGGAAAATCTT-GCTCTTTGATCTGGCGGATCTGC -3'
circ_006696	ATT0550-5'-CTCCTTGTA AAAAATGCAATCCGTGCCGT-TTTATTGTCAAAAAACTTGATGTGTCTC-3'
miR-27a-3P	Alexa Fluor488 5'-GCGGAACTTAGCCACTGTGAA-3'
miR-145-5p	Alexa Fluor488-5'-CAGGTCAAAAGGGTCCTTAGGGA-3'

2.2.7 Überexpression von circ_006696

Zur Überexpression der circ_006696 wurde ein Expressionsvektor konfiguriert und von Vectorbuilder (Neu-Isenburg, Deutschland) bezogen. Die Spezifikationen des Expressionsvektors sind in Tabelle 10 dargestellt. Ein entsprechender Kontrollvektor wurde ebenfalls konfiguriert, dessen Spezifikationen sind in Tabelle 11 dargestellt.

Die Transfektion erfolgte mittels Turbofect Reagenz (Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Deutschland). Die Zellen wurden vor der Transfektion für 18-24 Stunden in 6-Well-Platten ausgesät. Für die Kultivierung der Zellen wurde Astrozytenmedium verwendet. Primäre Astrozyten hatten zum Zeitpunkt der Transfektion eine Dichte von 70-90%. Die Zellen wurden auf die Transfektion vorbereitet, indem das Medium in jeder Kavität durch serumfreies DMEM ersetzt wurde. Die folgenden Volumina galten für die Transfektion einer einzelnen Kavität in einer 6-Well-Platte: 1 µg Plasmid-RNA wurde mit 50 µl DMEM in einem Reaktionsgefäß vorsichtig gemischt. In einem zweiten Reaktionsgefäß wurden 3 µl Turbofect Reagenz und 50 µl DMEM vorsichtig vermischt. Anschließend wurden die Inhalte beider Reaktionsgefäße miteinander vermischt, um den Transfektionskomplex zu bilden. Dazu wurde die Mischung 15-20 Minuten lang ungestört bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 100 µl der Komplexlösung je Kavität hinzugefügt und die Platte vorsichtig geschwenkt, um die Komplexe gleichmäßig zu verteilen. Danach wurden die transfizierten Zellen in einem CO₂-Inkubator bei 37°C für 24 Std. inkubiert. Danach wurden die transfizierten Zellen für 4 Stunden unter OGD-Bedingungen inkubiert. Die relative Expressionswerte der Circ_006696 wurden nach 24 Stunden mittels Q-RT-PCR analysiert und mit einer normoxischen Kontrollgruppe verglichen.

Tabelle 10: Expressionvektor-Übersicht

Vektorname	pRP[Exp]-EGFP-CMV>5':{mmu_circRNA_006696}:3'
Vektorgröße	7637 bp
Vektor Art	Genexpressionsvektor
Eingefügter Promoter	CMV
Eingefügter ORF	5', {mmu_circRNA_006696}, 3'
Eingefügter Marker	EGFP
Antibiotikaresistenz	Ampicillin
Klon-Host	VB UltraStable

Tabelle 11: Kontrollvektor-Übersicht

Vektorname	pRP[Exp]-CMV>EGFP
Vektorgröße	3657 bp
Vektor Art	Genexpressionsvektor
Eingefügter Promoter	CMV
Eingefügter ORF	EGFP
Antibiotikaresistenz	Ampicillin
Klon-Host	VB UltraStable

2.2.8 Knockdown von circ_015350 mit siRNA in SH-SY5Y Zellen unter Verwendung von Lipofectamin

Für die Kultivierung der neuronalen Zelllinie SH-SY5Y wurde DMEM/F12 mit FBS verwendet. Für die Transfektion wurden die Zellen für 18-24 Stunden in 6-Well-Platten kultiviert. Die Transfektion wurde durchgeführt, sobald die SH-SY5Y Zellen eine Konfluenz von 60-80% erreicht hatten. Für die Herstellung des Transfektionskomplexes wurde das serumfreie Medium Opti-MEM® verwendet.

Je Kavität für 6-Well-Platten wurden 9 µl Lipofectamine® RNAiMAX-Reagenz mit 150 µl Opti-MEM® Medium vermischt. In einem zweiten Reaktionsgefäß wurden je Kavität 3 µl siRNA (10 µM) mit 150 µl Opti-MEM® Medium vermischt. Anschließend wurden beide Mischungen im Verhältnis 1:1 vermischt und 5 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. Jeweils 250 µl siRNA-Lipid-Komplex wurde in anschließend auf die Zellen gegeben. Die finale Konzentration an siRNA pro Kavität betrug 25 pmol. Die Zellen wurden ein Tag lang bei 37°C inkubiert. Bei den transfizierten Zellen wurde eine OGD für 4 und 8 Stunden durchgeführt. Für die Kontrollgruppe wurden die Zellen entsprechend unter normoxischen Bedingungen kultiviert. Anschließend wurden die Zellen lysiert, die RNA isoliert und die Behandlungsgruppen mittels qRT-PCR analysiert.

Tabelle 12: Ncoa2 Silencer® Select Pre-Designed siRNA

Produktlinie	Silencer® Select	
siRNA Typ	Pre-Designed	
siRNA ID	s70426	
Genname	Kernrezeptor-Coaktivator 2	
Spezies	Mus musculus	
Zielgen-Symbol	Ncoa2	
	Sense	Antisense
Sequenz (5'-3')	GAUAAUUGGUUUACCG-GAAAtt	UUUCCGGUAAACCAAUAUCtt
Länge	21	21
Prozent G/C	33%	33%
Molekular-gewicht	6800	6600
Molarextinktionskoeffizient	216900	206400
Getempertes Molekulargewicht	13300 (40 µ/OD wurde zur Berechnung der Konzentration verwendet)	

2.2.9 Quantitative Echtzeit-PCR

Für die quantitative Echtzeit-PCR wurden der KAPA SYBR® FAST qPCR Master Mix (2x) Kit (Merck) und die entsprechenden Primer (Tabelle 14) verwendet. 7,2 bzw. 8,2 µl nukleasefreies H₂O, der spezifische Vorwärts- und Rückwärtsprimer (je 0,4 µl) und 1 bzw. 2 µl der komplementären DNA wurden zu 10 µl des Mastermixes hinzugefügt. Die PCR-Reaktion wurde im LightCycler® 480 Instrument II (Roche, Basel, Deutschland) durchgeführt, die Cycling-Bedingungen sind in Tabelle 13 dargestellt. PPIA wurde als interne Referenz verwendet und die relative Expression der analysierten RNAs wurde mit der Methode $2^{-\Delta\Delta C_t}$ quantifiziert.

Tabelle 13: Zyklusbedingungen für die quantitative Echtzeit-PCR.

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
erste Denaturierung	95°C	3 min	
zweite Denaturierung	94°C	30 s	45
Primerhybridisierung	58°C	30 s	
Elongation	72°C	1 s	

Tabelle 14 Primer-Sequenzen für die quantitative Echtzeit-PCR.

Name	Richtung	Sequenz
circ_015350	Vorwärtsprimer	5'- CAGATCCGCCAGATCAAAGA-3'
	Rückwärtsprimer	5'- TCTCCCATCCCCTCATCTT -3'
circ_006696	Vorwärtsprimer	5'-GTAAGTCACCCTACACTTCCTG-3'
	Rückwärtsprimer	5'-TTCTCTTGACCTTTCCTTCTCC-3'
miR-27a-3p	Vorwärtsprimer	5'-GTATACTTCACAGTGGCTAAG-3'
	Rückwärtsprimer	5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3'
miR-27b-3p	Vorwärtsprimer	5'-GTATACTTCACAGTGGCTAAG-3'
	Rückwärtsprimer	5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3'
miR-145-5p	Vorwärtsprimer	5'- GCGTCCAGTTTCCCAGGA-3'
	Rückwärtsprimer	5'- GCAGGGTCCGAGGTATTC-3'
Peptidylprolyl- Isomerase A (PPIA)	Vorwärtsprimer	5'-ACCGTGTTCTTCGACATTGC-3'
	Rückwärtsprimer	5'-GGCATGAATATTGTGGAGGC-3'

2.3 Statistik

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden mittels GraphPad Prism 7 Software analysiert. Die angegebenen Werte zeigen den Mittelwert \pm SEM (Standardfehler des Mittelwerts). Zur Bestimmung der statistischen Signifikanz wurden der Student's t-Test oder eine one-way ANOVA verwendet, wobei p-Werte $< 0,05$ als signifikant angesehen wurden ($p < 0,05 = *$; $p < 0,01 = **$; $p < 0,001 = ***$; $p < 0,0001 = ****$).

3 Ergebnisse

3.1 Neuronen und Astrozyten zeigten unterschiedliche Expressionsniveaus ausgewählter nicht-kodierender RNAs unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen

Die Zellen wurden vier und acht Stunden lang unter Sauerstoff- und Glukoseentzug (OGD) sowie unter normoxischen Bedingungen als Kontrolle gehalten. Anschließend wurde das Expressionsniveau der circRNA- und miRNA-Kandidaten bestimmt.

Sowohl 4 als auch 8 Std. OGD hatten einen signifikanten Einfluss auf die Expressionswerte von miR-27a-3p und miR-27b-3p in Astrozyten (C8-D1A) und neuronalen Zellen (SH-SY5Y) (Abb.1 und 2). Das Expressionsniveau der miRNAs war signifikant herunterreguliert. Das Expressionsniveau von miR-27a-3p war nach 4 Std. OGD um 80% reduziert und nach 8 Std. OGD sogar um 90%. (Abb. 1A). Ähnlich war das Expressionsniveau von miR-27b-3p (Abb. 1B). Nach 4 Std. OGD stieg das Expressionsniveau der circ_015350 signifikant um ca. 40% (Abb. 1C).

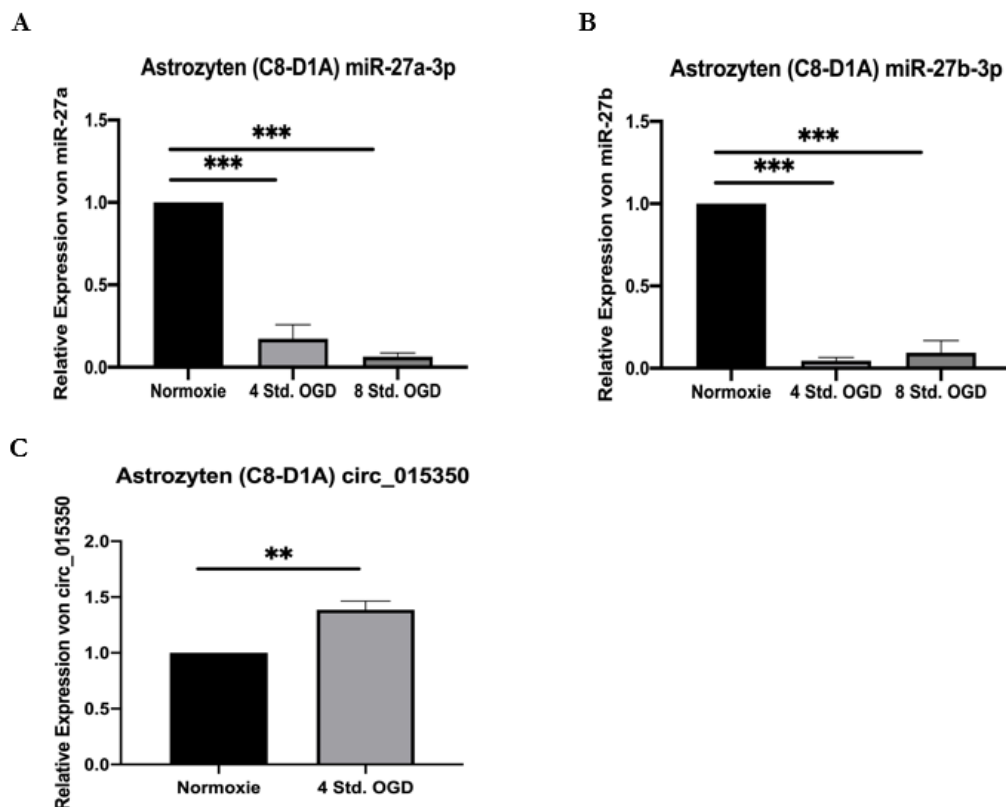


Abbildung 1: Expressionsniveau von miR-27a-3p, miR-27b-3p und circ_015350 unter hypoxischen Bedingungen in Astrozyten (C8D1A). Astrozyten (C8D1A) wurden vier und acht Stunden lang unter Sauerstoff- und Glukoseentzug (OGD) sowie unter normoxischen Bedingungen als Kontrolle gehalten. Nach 18 Stunden Reoxygenierung wurde die RNA isoliert und eine qRT-PCR durchgeführt. Dargestellt sind die Veränderungen des Expressionsniveaus von miR-27a-3p (A), miR-27b-3p (B) und circ_015350 (C) unter

OGD-Bedingungen. Das Experiment wurde mindestens dreimal mit $n=3$ Proben pro Bedingung durchgeführt. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM, berechnet mit der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Methode und PPIA als Referenzgen. $p<0,05=*$; $p<0,01=**$; $p<0,001=***$; $p<0,0001=****$, ANOVA.

In SH-SY5Y-Zellen war das Expressionsniveau von miR-27a-3p nach 4 und 8 Std. OGD um 65% reduziert (Abb. 2A). Ähnlich war die Herunterregulierung des Expressionsniveaus von miR-27b-3p (Abb. 2B). Nach 8 Std. OGD stieg das Expressionsniveau der circ_015350 signifikant um ca. 40% (Abb. 2C). Im Gegensatz dazu zeigte circ_015350 nach acht Stunden OGD eine signifikante Hochregulierung in SH-SY5Y-Zellen, jedoch bereits nach vier Stunden bei C8D1A-Zellen (Abb. 1C und 2C).

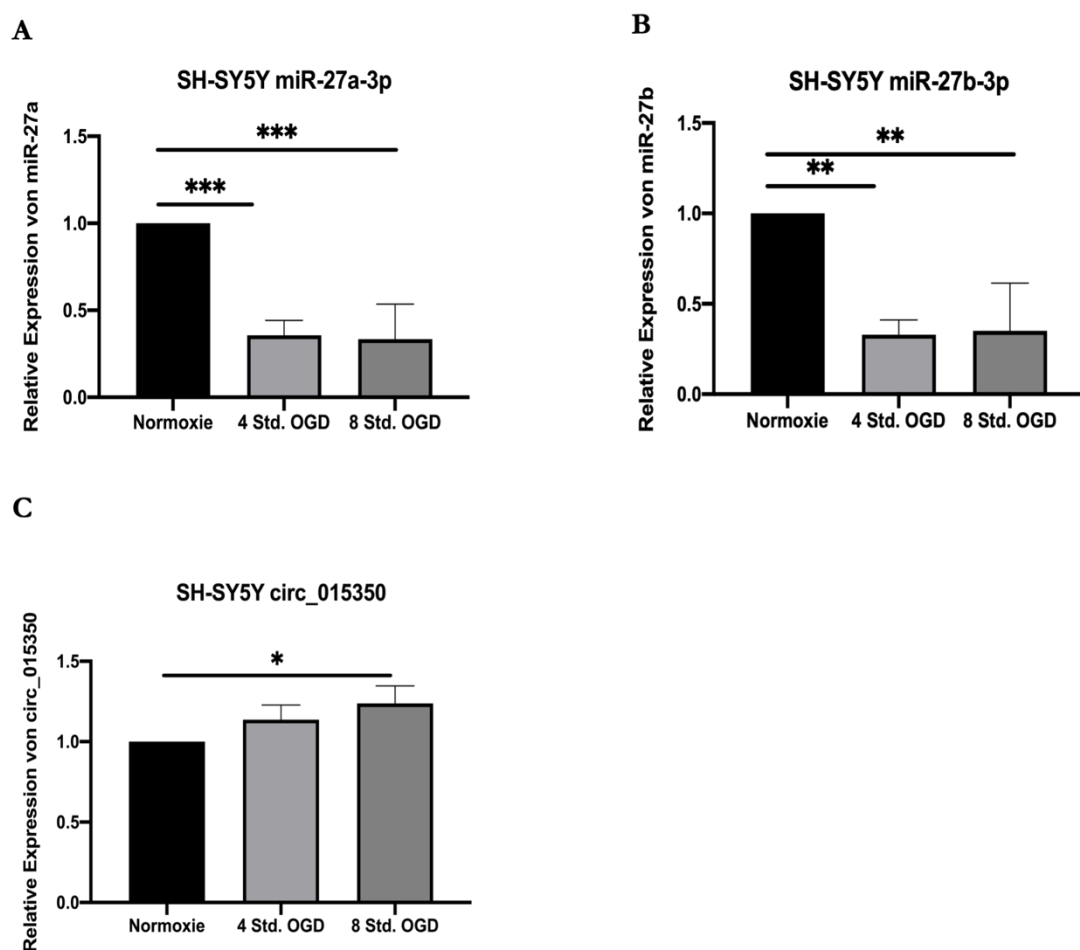


Abbildung 2: Expressionsniveau von miR-27a-3p, miR-27b-3p und circ_015350 unter hypoxischen Bedingungen in Neuronen (SH-SY5Y). Neuronen (SH-SY5Y) wurden vier und acht Stunden lang unter Sauerstoff- und Glukoseentzug (OGD) oder unter normoxischen Bedingungen als Kontrolle gehalten. Nach 18 Stunden Reoxygenierung wurde die RNA isoliert und eine qRT-PCR durchgeführt. Dargestellt sind die Veränderungen des Expressionsniveaus von miR-27a-3p (A), miR-27b-3p (B) und circ_015350 (C) unter OGD-Bedingungen. Das Experiment wurde mindestens dreimal mit $n=3$ Proben pro Bedingung durchgeführt. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM, berechnet mit der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Methode und PPIA als Referenzgen. $p<0,05=*$; $p<0,01=**$; $p<0,001=***$; $p<0,0001=****$, ANOVA.

3.2 circ_015350 konnte im Zytoplasma nachgewiesen werden und war mit miR-27a-3p kolokalisiert

Zirkuläre RNAs, insbesondere wenn sie als miRNA-Schwämme fungieren, befinden sich hauptsächlich im Zytoplasma (Memczak et al., 2013; Li et al., 2018). Es konnte gezeigt werden, dass sich die circ_015350 tatsächlich im Zytoplasma primärer Astrozyten nachweisen lässt (Abb. 3).

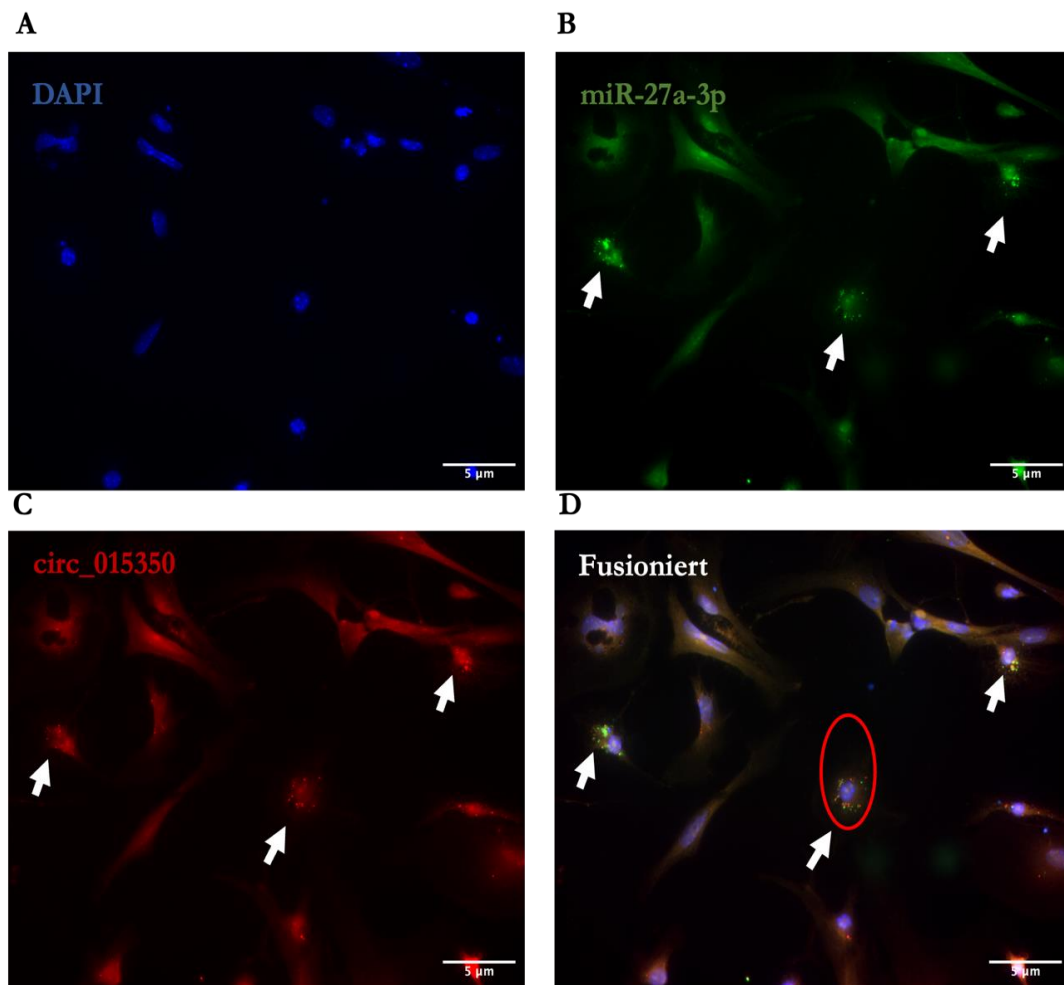


Abbildung 3: Kolokalisation von circ_015350 mit miR-27a-3p unter normoxischen Bedingungen in primären Astrozyten. Die Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt (A). Die miR-27a-3p-Sonden wurden mit Alexa Fluor 488 markiert und zeigen die Lokalisation von miR-27a-3p im Zytoplasma (B). ATTO550 wurde zur Markierung der circ_015350-Sonde verwendet, um die Lokalisation von circ_015350 im Zytoplasma darzustellen (C). Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung zeigte, dass circ_015350 mit miR-27a-3p kolokalisiert war (D). Die Bilder wurden mit einer 63-fachen Vergrößerung aufgenommen, weiße Pfeile zeigen kolokalisierte RNA-Spezies an. Scale bar: 5 µm.

Zur besseren Darstellung der Kolo­kalisierung wurde die mit rotem Kreis markierte Zelle in Abb. 3 vergrößert und als separate Abbildung 4 dargestellt.

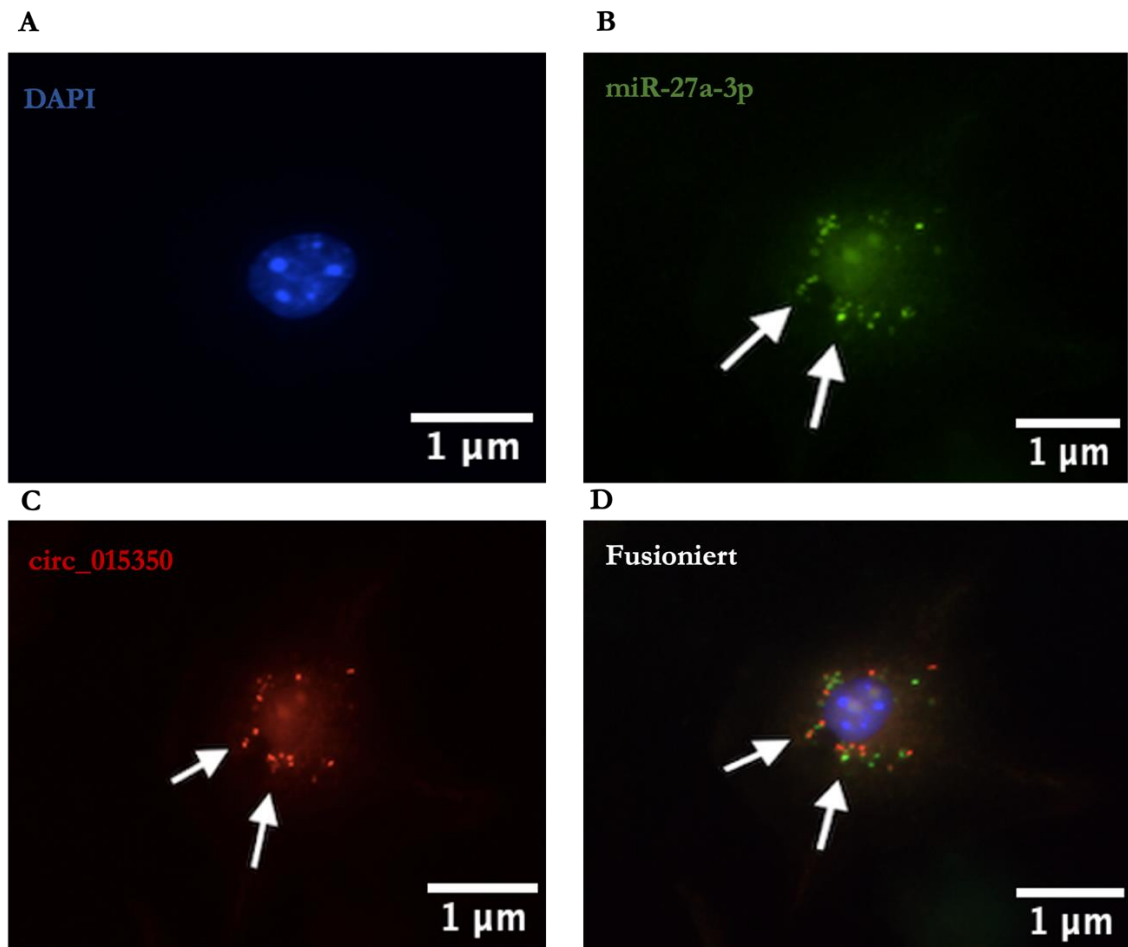


Abbildung 4: Vergrößerungsaufnahme aus Abbildung 3. Die Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt (A). Lokalisierung von miR-27a-3p im Zytoplasma (B). Lokalisierung von circ_015350 im Zytoplasma (C). Die weißen Pfeile zeigen, dass circ_015350 mit miR-27a-3p kolo­kalisiert war (D). Scale bar: 1 µm.

3.3 Fluoreszenz in situ Hybridisierung von circ_015350 und miR-27a-3p in primären Astrozyten nach 8 Stunden OGD

Da die circ_015350 als Reaktion auf den Sauerstoff- und Glukoseentzug hochreguliert wurde (Abb. 1 und 2), wurde sie ebenfalls mit Fluoreszenzsonden markiert und gleichzeitig mit miR-27a-3p analysiert. Auch unter OGD-Bedingungen konnte eine Kolokalisation von circ_015350 mit miR-27a-3p nachgewiesen werden (Abb. 5 A-D).

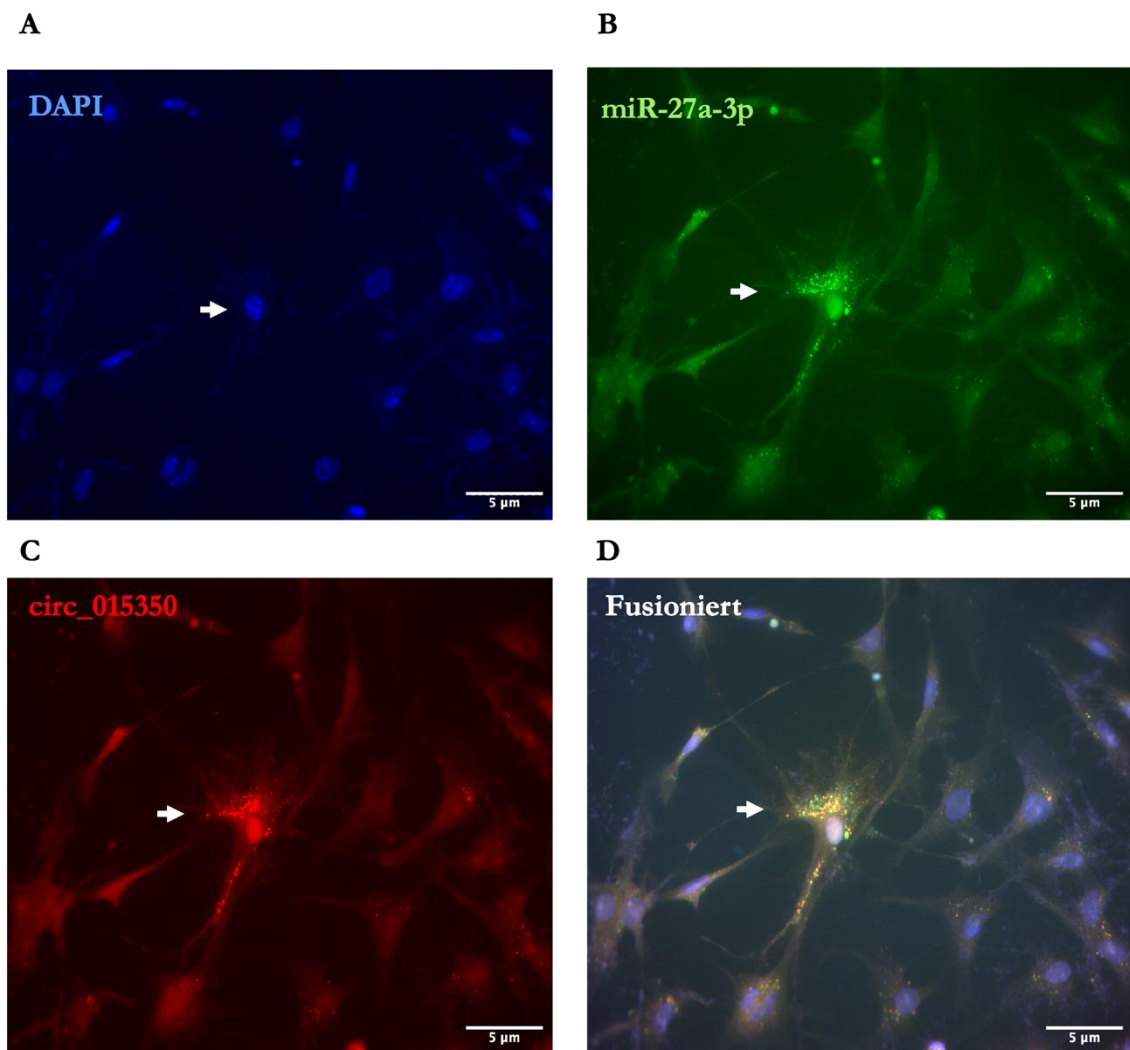


Abbildung 5: Kolokalisation von circ_015350 mit miR-27a-3p unter hypoxischen Bedingungen in primären Astrozyten. Die Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt (A). Die miR-27a-3p-Sonden wurden mit Alexa Fluor 488 markiert. Lokalisierung von miR-27a-3p im Zytoplasma (B). ATTO550 wurde zur Markierung der circ_015350-Sonde verwendet. Lokalisierung von circ_015350 im Zytoplasma (C). Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung zeigte, dass circ_015350 mit miR-27a-3p kolokalisiert war (D). Die Bilder wurden mit einer 63-fachen Vergrößerung aufgenommen. Weiße Pfeile zeigen kolokalisierte RNA-Spezies an. Scale bar 5 µm.

Zur besseren Darstellung der Kolo­kalisierung wurde die mit weißen Pfeilen markierte Zelle in Abb. 5 vergrößert und als separate Abbildung 6 dargestellt.

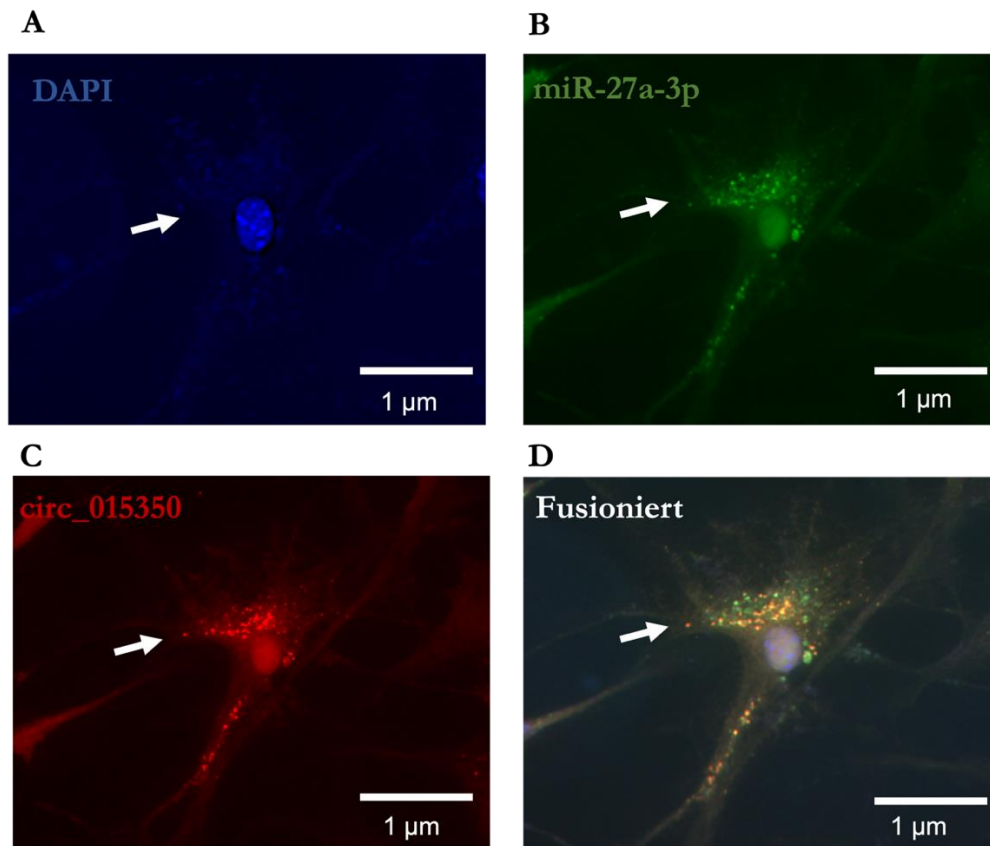


Abbildung 6: Vergrößerungsaufnahme aus Abbildung 5. Die Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt (A). Lokalisierung von miR-27a-3p im Zytoplasma (B). Lokalisierung von circ_015350 im Zytoplasma (C). Die weißen Pfeile zeigen, dass circ_015350 mit miR-27a-3p kolo­kalisiert war (D). Scale bar: 1 µm.

3.4 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung von circ_006696 und miR-145-5p unter normoxischen Bedingungen bei primären Astrozyten

Um zu untersuchen, ob circ_006696 auch mit einer oder mehreren anderen miRNAs interagieren könnte, wurde die Datenbank miRDB verwendet, um mögliche weitere miRNA-Kandidaten zu identifizieren, die mit circ_006696 bzw. interagieren könnten. Aus diesen potenziellen Zielmolekülen wurden miRNAs ausgewählt, von denen berichtet wurde, dass sie nach einem ischämischen Schlaganfall bei männlichen Sprague-Dawley-Ratten hochreguliert sind (Dharap et al., 2009; Jeyaseelan et al., 2008). Infolgedessen wurden miR-145-5p als potenzieller Kandidat für eine Interaktion mit circ_006696 ausgewählt.

Es konnte gezeigt werden, dass circ_006696 und miR-145-5p im Zytoplasma in primären Astrozyten kolokalisiert waren (Abb. 6 A-D). Daher konzentrierten sich die weiteren Untersuchungen auf diese spezielle circRNA.

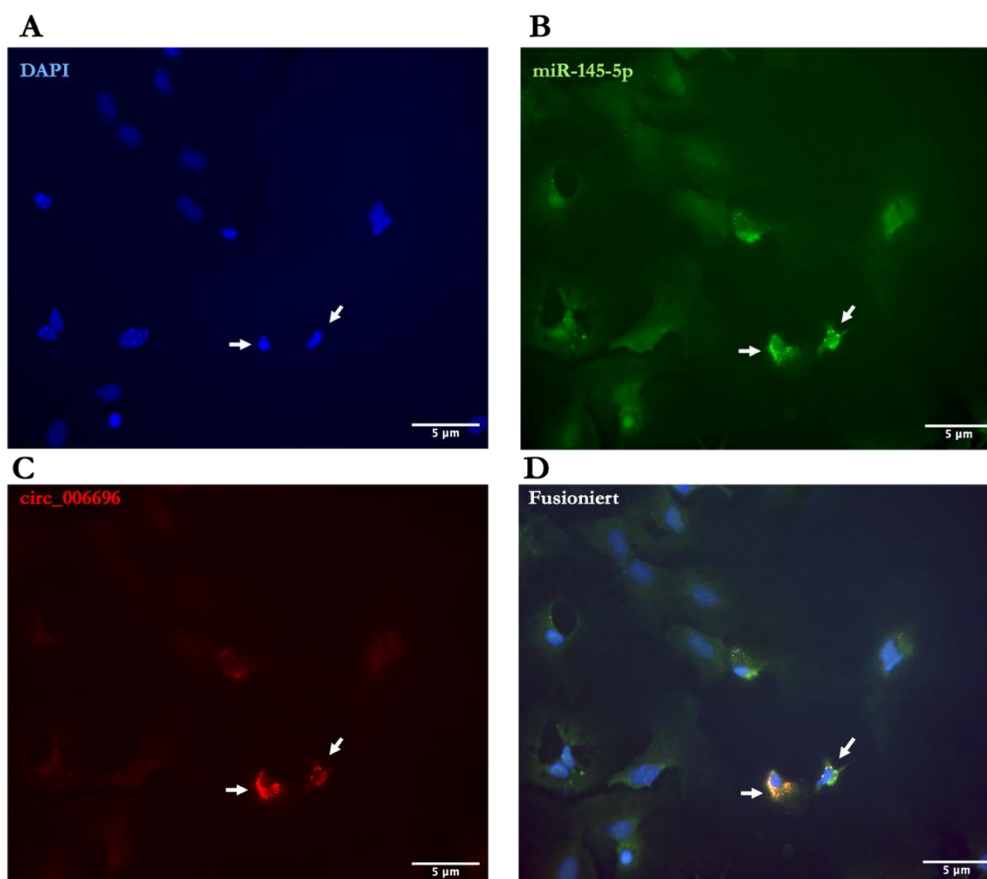


Abbildung 7: Kolokalisierung von circ_006696 mit miR-145-5p unter normoxischen Bedingungen in primären Astrozyten. Die Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt (A). Die miR-145-5p-Sonden wurden mit Alexa Fluor 488 markiert und lokalisierten die miR-145-5p im Zytoplasma (B). ATTO550 wurde zur Markierung der circ_006696-Sonde verwendet. Lokalisierung von circ_006696 im Zytoplasma (C). Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung zeigte, dass circ_006696 mit miR-145-5p kolokalisiert war (D). Die Bilder wurden mit einer 63-fachen Vergrößerung aufgenommen. Weiße Pfeile zeigen kolokalisierte RNA-Spezies an. Scale bar: 5 µm.

In Abbildung 7 wurden die Zellen mit weißen Pfeilen vergrößert und in Abbildung 8 separat dargestellt, um die Kolokalisation besser darzustellen.

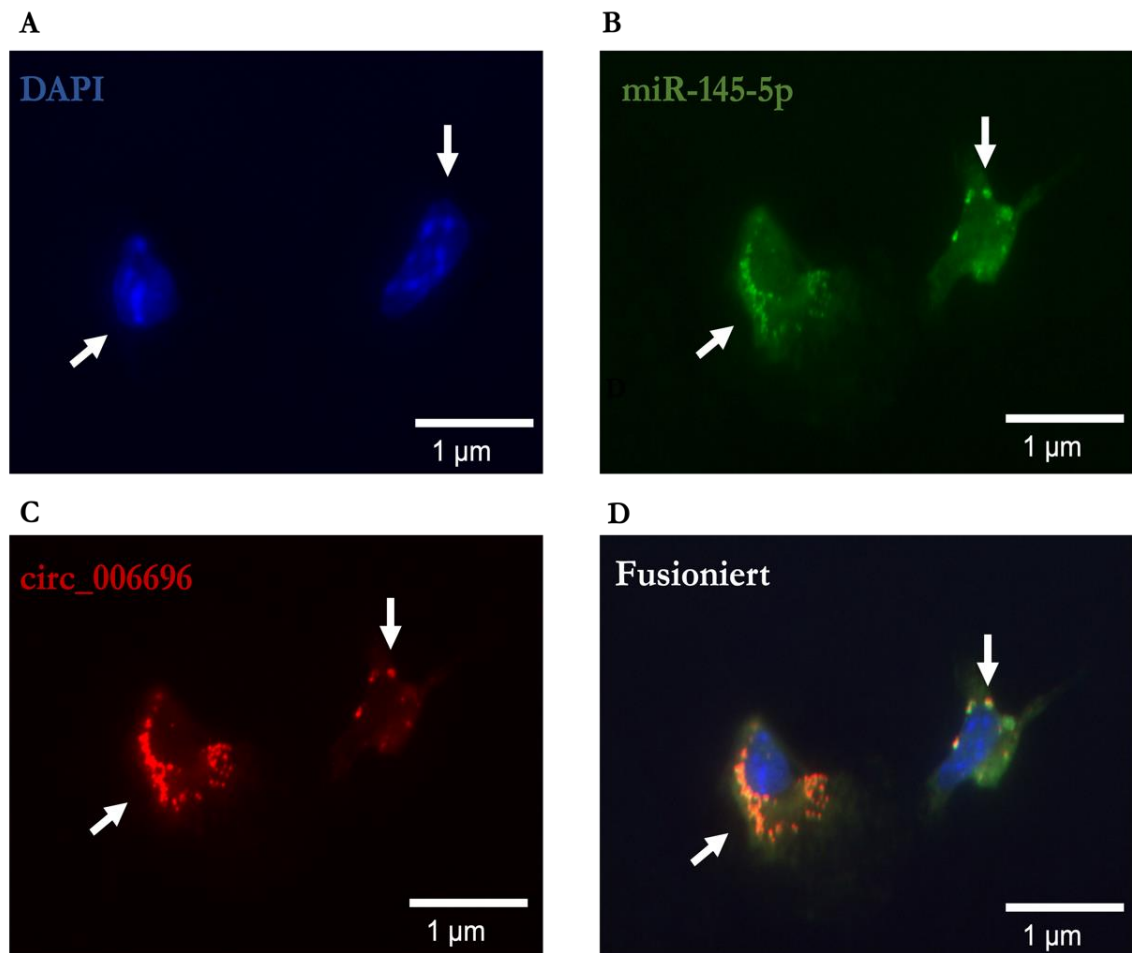


Abbildung 8: Vergrößerungsaufnahme aus Abbildung 7. Die Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt (A). Lokalisierung von miR-145-5p im Zytoplasma (B). Lokalisierung von circ_006696 im Zytoplasma (C). Die weißen Pfeile zeigen, dass circ_006696 mit miR-145-5p kolokalisiert war (D). Scale bar: 1 µm.

3.5 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung von circ_006696 und miR-145-5p in primären Astrozyten nach 8 Stunden OGD

Es konnte weiterhin festgestellt werden, dass circ_006696 und miR-145-5p in primären Astrozyten nach 8 Std. OGD kolokalisiert waren (Abb. 9 A-D).

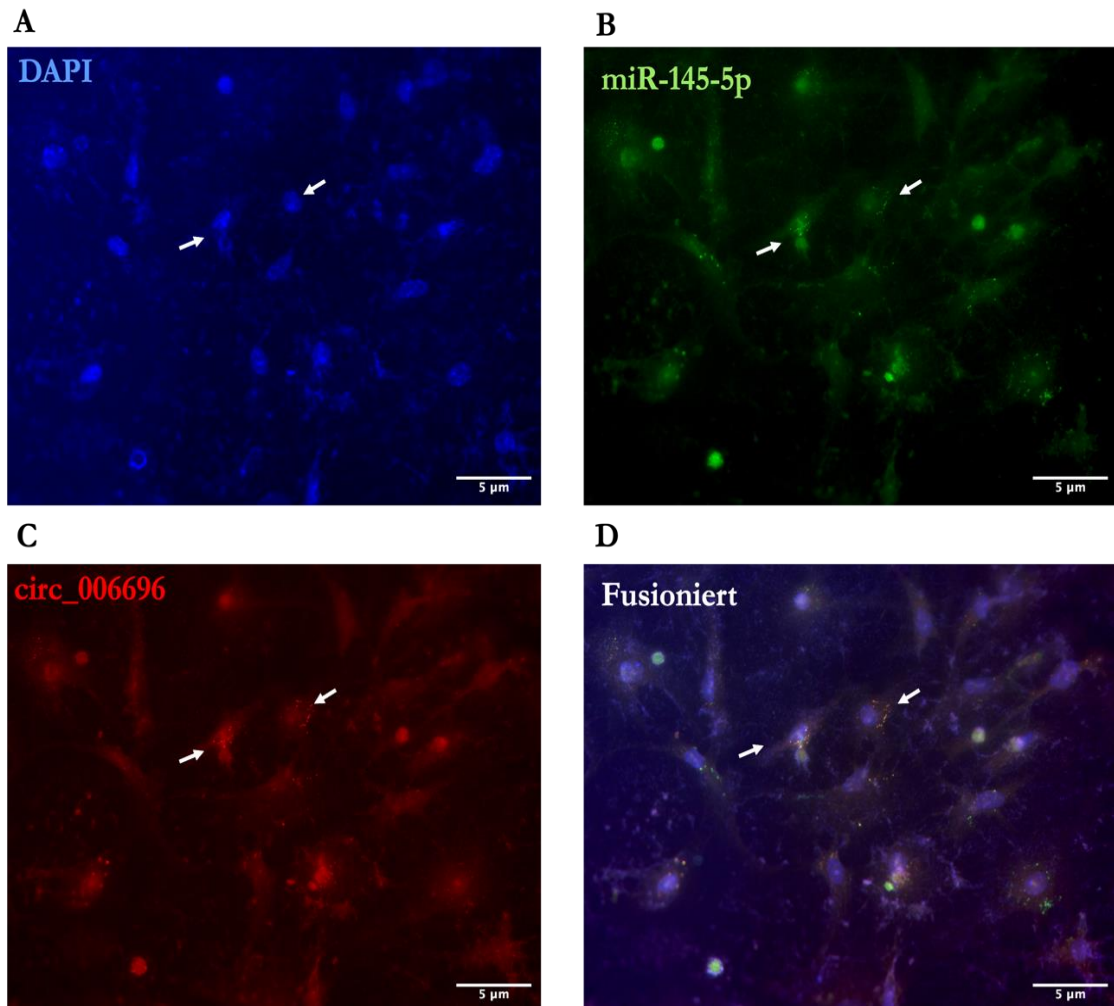


Abbildung 9: Kolokalisation von circ_006696 mit miR-145-5p unter hypoxischen Bedingungen in primären Astrozyten. Die Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt (A). Die miR-145-5p-Sonden wurden mit Alexa Fluor 488 markiert. Lokalisierung von miR-145-5p im Zytoplasma (B). ATTO550 wurde zur Markierung der circ_006696-Sonde verwendet. Lokalisierung von circ_006696 im Zytoplasma (C). Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung zeigte, dass circ_006696 mit miR-145-5p kolokalisiert war (D). Die Bilder wurden mit einer 63-fachen Vergrößerung aufgenommen. Weiße Pfeile zeigen kolokalisierte RNA-Spezies an. Scale bar. 5 µm.

In Abbildung 9 wurden die mit weißen Pfeilen markierten Zellen vergrößert und als separate Abbildung 10 dargestellt, um die Kolokalisation besser darzustellen.

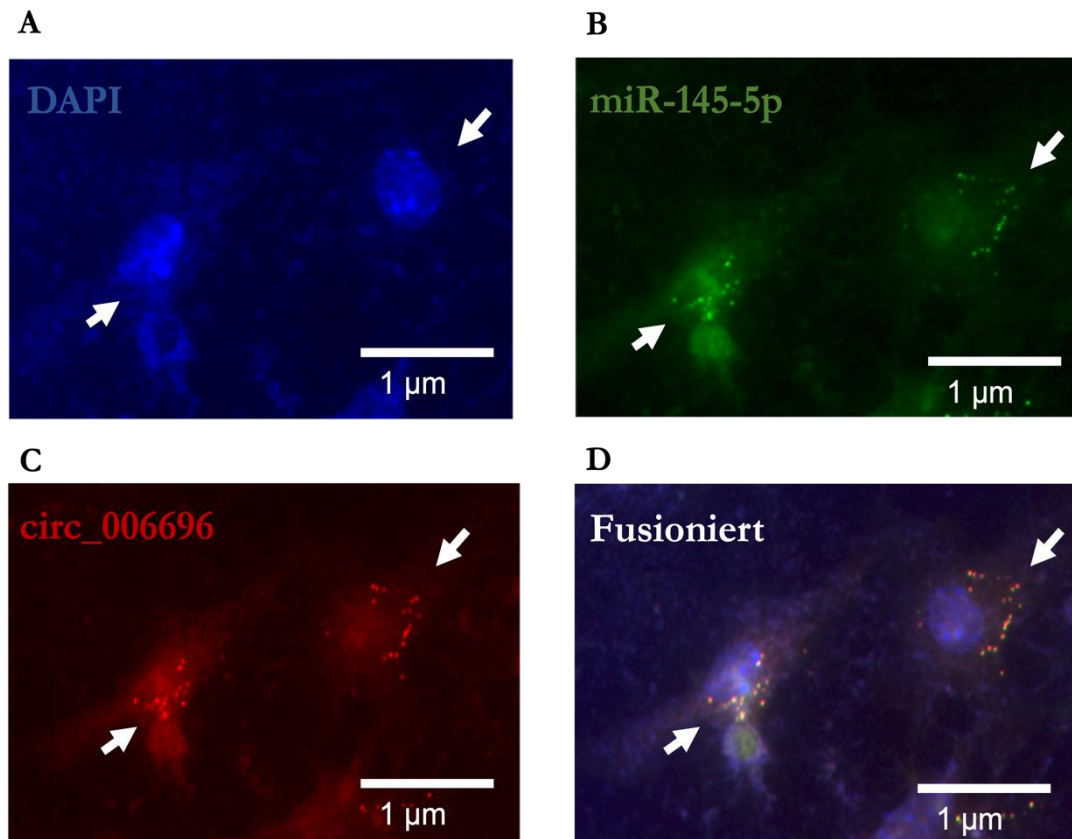


Abbildung 10: Vergrößerungsaufnahme aus Abbildung 9. Die Zellkerne wurden mit DAPI gegengefärbt (A). Lokalisierung von miR-145-5p im Zytoplasma (B). Lokalisierung von circ_006696 im Zytoplasma (C). Die weißen Pfeile zeigen, dass circ_006696 mit miR-145-5p kolokalisiert war (D). Scale bar: 1 µm.

3.6 Überexpression von circ_006696 in primären Astrozyten

Für die Überexpression von circ_006696 wurden primäre Astrozyten mit einem entsprechenden Expressionsplasmid transfiziert. Der Vergleich des Expressionsniveaus zu mit einem Kontrollplasmid (Scramble) transfizierten Astrozyten zeigte eine signifikante Überexpression von circ_006696 um das Zweieinhalbfache (Abb. 11).

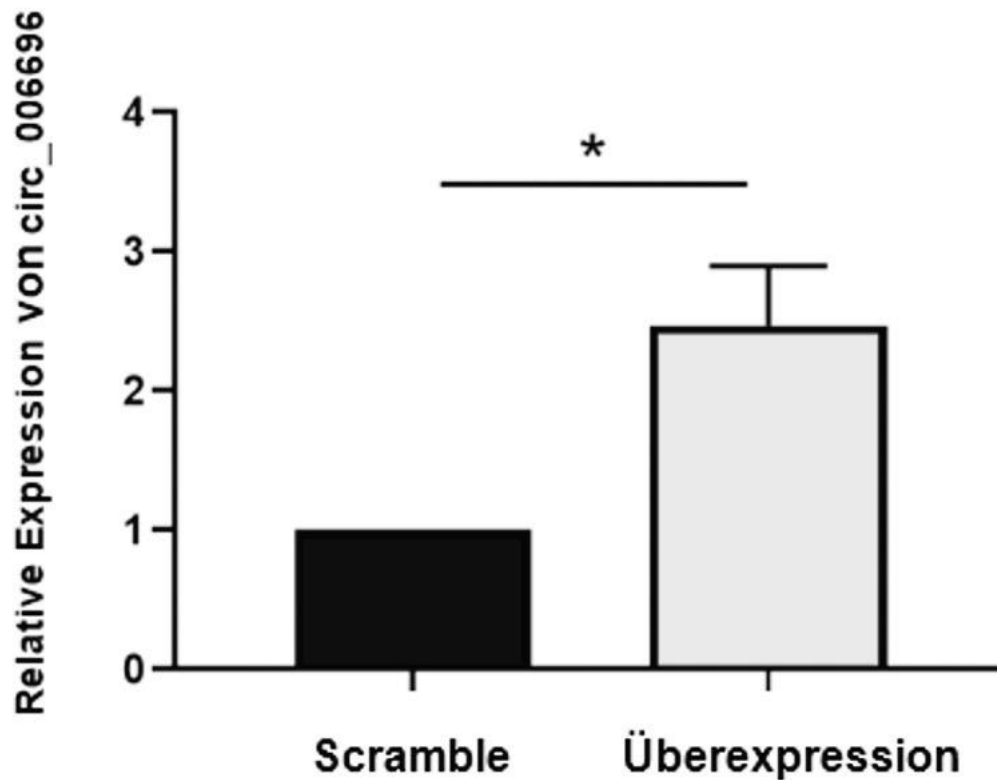


Abbildung 11: Überexpression von circ_006696 gegenüber der Scramble-Kontrolle. Die Überexpression erfolgte nach Transfektion der primären Astrozyten mit einem Expressionsvektor (vgl. Tabelle 12 und 13). Die Hochregulierung von circ_006696 im Vergleich zur Scramble-Kontrolle wurde mittels qRT-PCR analysiert. $p < 0,05 = *$; t-Test.

Um die Auswirkungen der Überexpression von circ_006696 auf die miR-145-5p zu untersuchen, wurden primäre Astrozyten mit dem entsprechenden Expressionsvektor transfiziert und unter OGD-Bedingungen analysiert. Die Überexpression von circ_006696 führte zu einer signifikanten Herunterregulation des Expressionsniveaus von miR-145-5p (Abb. 12 A und B). Dabei zeigte sich, dass die Dauer der OGD-Behandlung einen Einfluss auf die Expressionslevel sowohl von circ_006696 als auch von miR-145-5p hat. Interessanterweise scheinen die Expressionsmuster negativ korreliert zu sein.

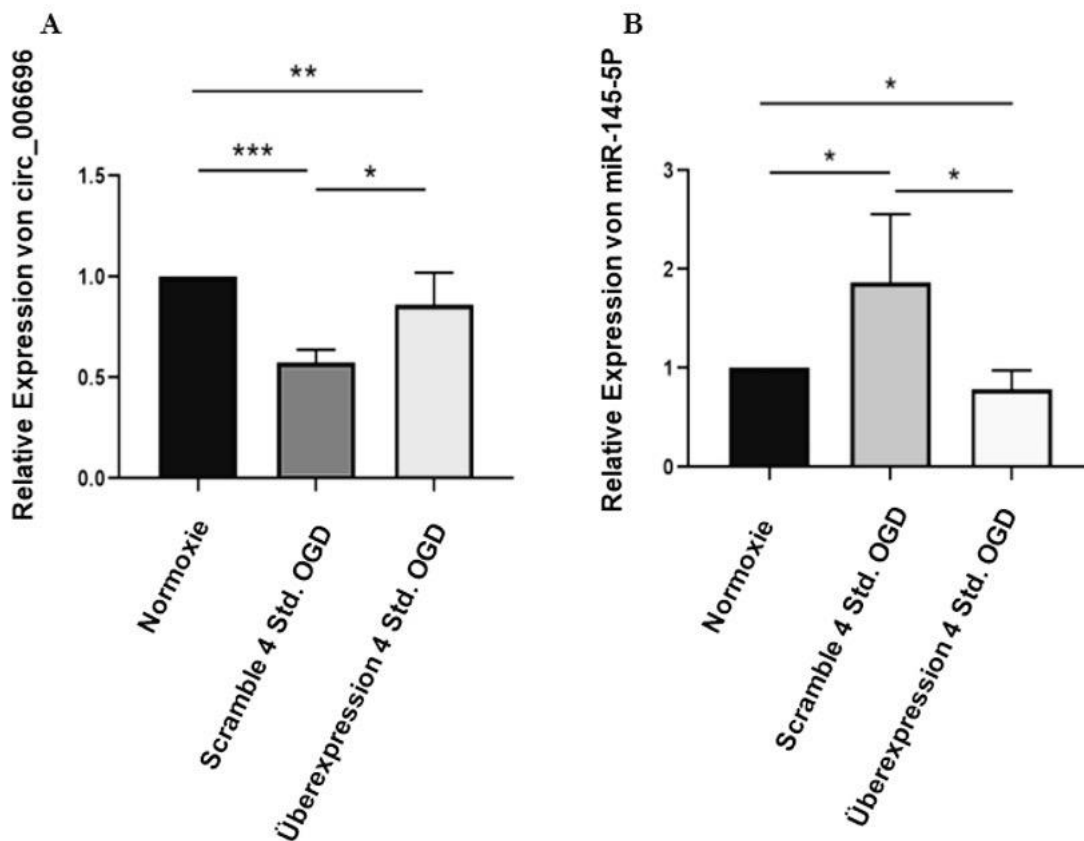


Abbildung 12: Überexpression von circ_006696 gegenüber der Scramble-Kontrolle unter hypoxischen Bedingungen nach 4 Stunden OGD. Die Überexpression erfolgte durch Transfektion mit einem Expressionsvektor für circ_006696 (A) (Tabelle 12 und 13). Das Expressionsniveau von miR-145-5p zeigte eine negative Korrelation zur Expression von circ_006696 (B). Der Nachweis erfolgte mittels qRT-PCR im Vergleich zur Scramble-Kontrolle. $p < 0,05 = *$; $p < 0,01 = **$; $p < 0,001 = ***$; $p < 0,0001 = ****$, ANOVA.

3.7 Knockdown von circ_015350 in SH-SY5Y Zellen

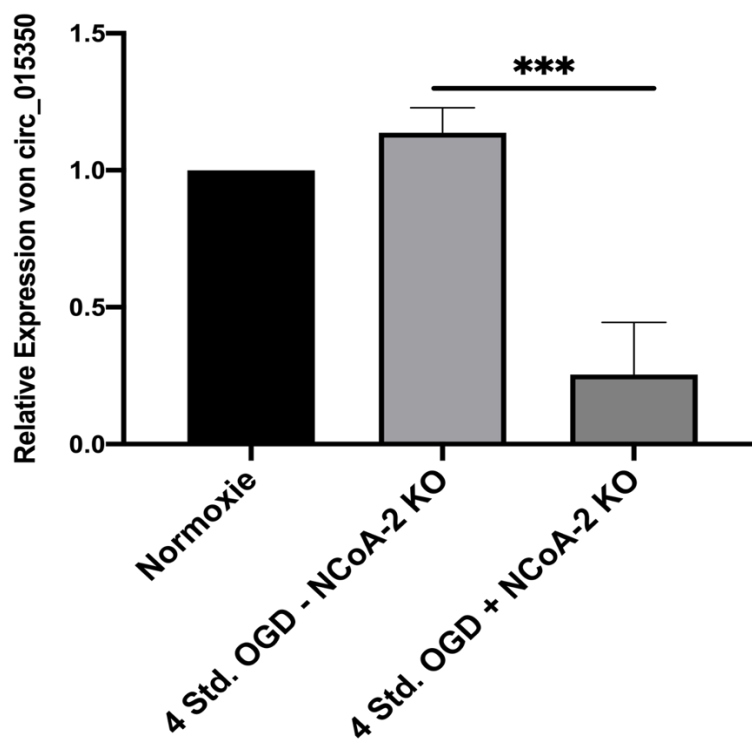
NCoA-2 wurde als das Hosting-Gen für die zirkuläre RNA circ_015350 identifiziert (Mehta et al., 2017). Hier wurde bestätigt, dass der Knockdown von circ_015350 durch die Transfektion mit siRNA bei SH-SY5Y Neuronen erfolgreich war (Abb. 10).

Abbildung 13 A zeigt, dass das Expressionsniveau von circ_015350 nach 4 Std. OGD um ca. 80% im Vergleich zur Expressionsniveau von circ_015350 nach 4 Std. OGD ohne Knockdown von NCoA-2 reduziert war.

Abbildung 13 B zeigt, dass das Expressionsniveau von circ_015350 nach 8 Std. OGD um 70% im Vergleich zur Expressionsniveau von circ_015350 nach 8 Std. OGD ohne Knockdown reduziert war.

A

SH-SY5Y circ_015350 4 Std. OGD ohne und mit Knockdown von NCoA-2



B
SH-SY5Y circ_015350 8 Std. OGD ohne und mit Knockdown von NCoA-2

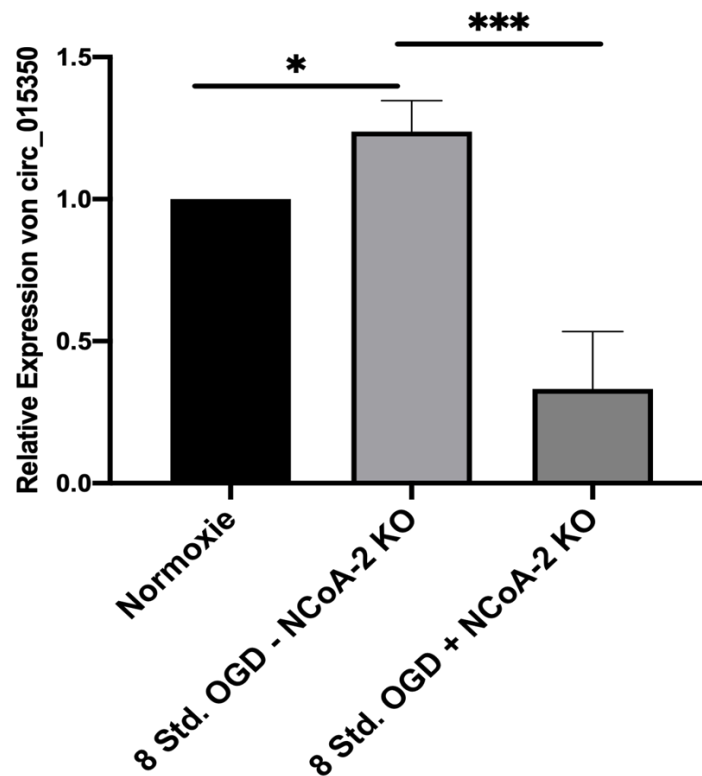


Abbildung 13: Knockdown von circ_015350 gegenüber der Kontrolle unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen nach 4 und 8 Stunden OGD. Der Knockdown (KO) von circ_015350 erfolgte durch siRNA Transfection mit Lipofectamin. Relative Expression von circ_015350 nach 4 Std. OGD mit und ohne Knockdown von NCoA-2 (A). Relative Expression von circ_015350 nach 8 Std. OGD mit und ohne Knockdown von NCoA-2 (B). Der Knockdown von circ_015350 und die Hochregulierung von miR-27a-3P im Vergleich zur Kontrolle wurde mittels qRT-PCR bestätigt. Das Experiment wurde mindestens dreimal mit $n=3$ Proben pro Bedingung durchgeführt. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM, berechnet mit der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Methode und PPIA als Referenzgen. $p<0,05=*$; $p<0,01=**$; $p<0,001=***$; $p<0,0001=****$, ANOVA.

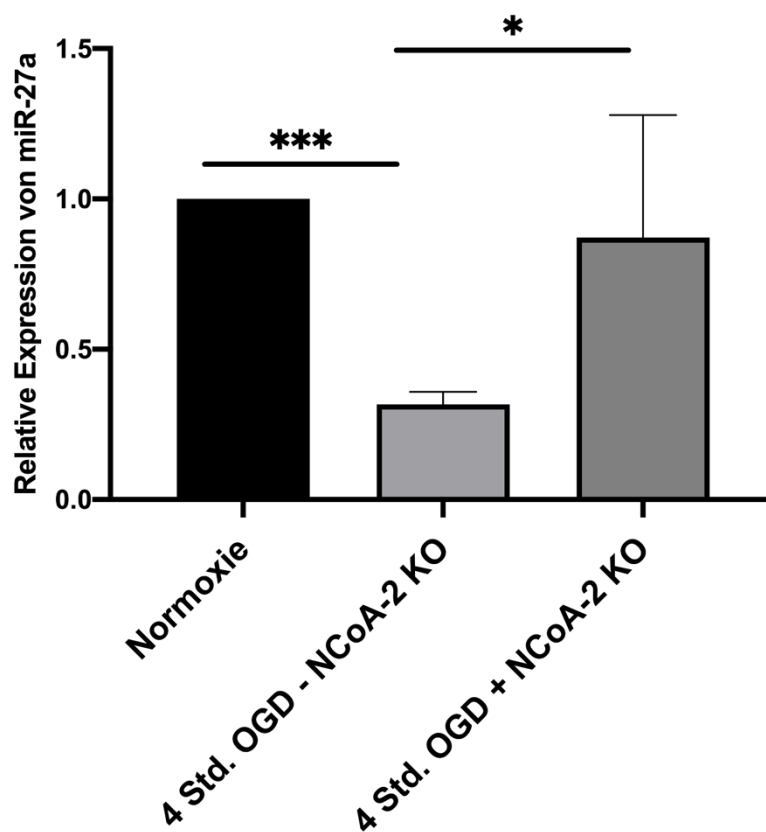
Um die Auswirkungen der Überexpression von circ_015350 auf die miR-27a-3p zu untersuchen, wurden SH-SY5Y-Zellen mit der entsprechenden siRNA transfiziert und unter OGD-Bedingungen analysiert. Der Knockdown von circ_015350 führte zu einer signifikanten Hochregulation des Expressionsniveaus von miR-27a-3p (Abb. 14 A und B). Dabei zeigte sich, dass die Dauer der OGD-Behandlung einen Einfluss auf die Expressionslevel sowohl von circ_015350 als auch von miR-27a-3p hat.

Abbildung 14 A zeigt, dass das Expressionsniveau von miR-27a-3p nach 4 Std. OGD um 60 % im Vergleich zur Expressionsniveau von miR-27a-3p nach 4 Std. OGD ohne Knockdown von NCoA-2 hochreguliert war.

Abbildung 14 B zeigt, dass das Expressionsniveau von miR-27a-3p nach 8 Std. OGD um 70 % im Vergleich zur Expressionsniveau von miR27a-3p nach 8 Std. OGD ohne Knockdown von NCoA-2 hochreguliert war.

A

SH-SY5Y miR-27a 4 Std. OGD ohne und unter Knockdown von NCoA-2



B

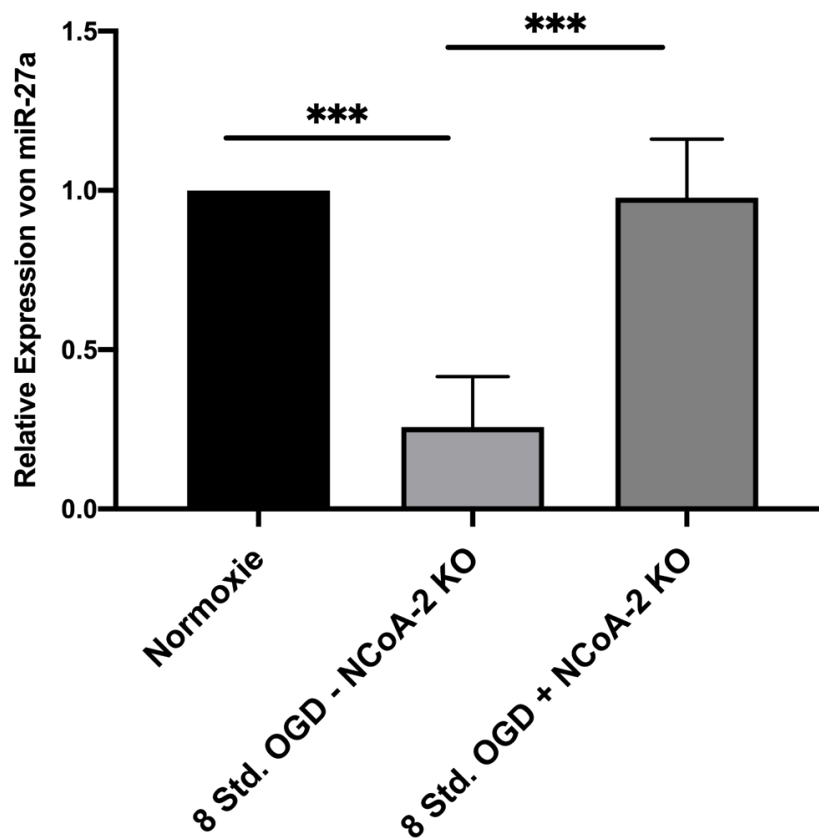
SH-SY5Y miR-27a 8 Std. OGD ohne und mit Knockdown von NCoA-2

Abbildung 14: Expressionsniveau von miR-27a-3p mit und ohne Knockdown von circ_015350 gegenüber der Kontrolle unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen nach 4 und 8 Stunden OGD. Expressionsniveau von miR-27a-3p mit und ohne Knockdown (KO) von circ_015350 nach 4 Std. OGD (A). Expressionsniveau von miR-27a-3p mit und ohne Knockdown von circ_015350 nach 8 Std. OGD (B). Das Expressionsniveau von miR-27a-3P wurde folglich nach 8 Std. hochreguliert. Der Knockdown von circ_015350 und die Hochregulierung von miR-27a-3P im Vergleich zur Kontrolle wurde mittels qRT-PCR bestätigt. Das Experiment wurde mindestens dreimal mit n=3 Proben pro Bedingung durchgeführt. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM, berechnet mit der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Methode und PPIA als Referenzgen. $p < 0,05 = *$; $p < 0,01 = **$; $p < 0,001 = ***$; $p < 0,0001 = ****$, ANOVA.

4 Diskussion

Eine Unterversorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen nach einem Schlaganfall ist charakteristisch für diese Erkrankung und führt zu pathologischen Prozessen im betroffenen Gewebe. Jüngste Studien zeigen, dass nicht-kodierende RNAs dabei eine wichtige Rolle spielen. In dieser Arbeit wurden die Auswirkungen von Sauerstoff- und Glukosemangel auf das Expressionsniveau von circ_015350 und circ_006696 in Neuronen und Astrozyten analysiert. Weiterhin wurde die Lokalisierung der beiden circRNAs untersucht, und es wurden mögliche mirRNA-Ziele dieser circRNAs identifiziert.

4.1 PPIA als Referenzgene

Bei der qRT-PCR wurde Peptidylprolylisomerase A (PPIA) als Referenzgen verwendet. Die Methode basiert dabei auf der Normalisierung der gemessenen Expression des zu untersuchenden Gens auf eine interne Referenz, die auch als Referenzgen bezeichnet wird (Huggett et al. 2005). PPIA wird häufig als Referenzgen für die Normalisierung von qRT-PCR-Daten verwendet (Langnaese et al., 2008; Kirschneck et al., 2017). In Untersuchungen in einem fokalen Ischämie-Modell an männlichen Sprague-Dawley-Ratten erschien PPIA das verlässlichste Referenzgen zu sein (Pomierny et al. 2022). Weiterhin ist PPIA auch im MCAO-Modell des Schlaganfalls an männlichen Sprague-Dawley-Ratten als geeignetes Referenzgen etabliert (Harrison et al. 2000).

Der Grund dafür ist, dass PPIA sowohl unter normoxischen als auch unter hypoxischen Bedingungen sowohl in den Neuronen- als auch in den Astrozyten in stabilen Konzentrationen nachgewiesen werden konnte und somit als Referenzgen geeignet ist.

4.2 OGD beeinflusst die circRNA-Expressionsniveaus in allen Zelltypen

Mehreren Studien haben gezeigt, dass das Expressionsniveau vieler circRNAs nach einem ischämischen Schlaganfall im Mausmodell verändert waren (Liu et al., 2017; Mehta et al., 2017). Mehta und Kollegen konnten durch eine Microarray-Analyse Veränderungen in der Expression von diversen circRNAs nach dem Schlaganfall bei C57BL/6J-Mäuse beobachten und anschließend durch qRT-PCR für drei hochregulierte (circ_008018, circ_015350 und circ_016128) und drei herunterregulierte (circ_011137, circ_001729 und circ_006696) circRNAs validieren (Mehta et al. 2017). Aktuell ist allerdings noch nicht vollständig geklärt, in welchem Ausmaß bestimmte Zelltypen für diese Veränderungen verantwortlich sind, welche Mechanismen zu einem erhöhten oder verringerten Expressionsniveau führen und wie sich die unterschiedlichen Expressionsniveaus der circRNAs auf Apoptose, Zelltod und neuronale Regeneration nach einem Schlaganfall auswirken könnten. Daher wurde in dieser Studie ein in vitro Modell des ischämischen

Schlaganfalls verwendet, um die Expressionsveränderungen von zwei verschiedenen circRNAs unter OGD-Bedingungen in den verschiedenen Zelltypen des Gehirns zu analysieren. Die zirkulären RNAs circ_015350 und circ_006696 konnten zunächst in allen primären Astrozyten, C8-D1A-Zellen und SH-SY5Y-Zellen erfolgreich auf hohem Expressionsniveau nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass es sich bei den untersuchten circ-RNAs nicht bloß um Nebenprodukte der Transkription handelt, sondern dass sie von biologischer Bedeutung sein und beispielsweise regulatorische Funktionen ausüben könnten. Dies sollte in den weiterführenden Analysen näher untersucht werden.

Die qRT-PCR-Analyse zeigte, dass die Expressionswerte von circ_015350 bereits nach 4 Std. OGD bei C8D1A-Zellen und nach 8 Std. OGD in SH-SY5Y-Zellen signifikant hochreguliert sind. Im Gegensatz dazu konnte bei primären Astrozyten nach 4 Std. OGD eine signifikante Herunterregulierung von circ_006696 beobachtet werden, was mit der Beobachtung von Mehta et al. (2017) übereinstimmt. Dabei muss allerdings berücksichtigt werden, dass für die Analyse der circ_015350 Expressionsniveaus in SH-SY5Y und C8-D1A in der Zellkultur Zelllinien anstelle von primären Zellen verwendet wurden. Auch wenn dies ein häufig verwendeter Ansatz ist, auch für OGD-Experimente (Li et al. 2014; Li et al. 2021), ist es nicht auszuschließen, dass primäre Zellen anders reagieren als Zelllinien. Zudem wurden in der Studie von Mehta und Kollegen (2017) ganze Gehirne für die Analysen verwendet, während in dieser Arbeit ausschließlich Zellkulturen verwendet wurden.

4.3 Die miR-27 wurde als ein potenzielles Ziel von circ_015350 identifiziert

Die miR27a-3p und miR27b-3p gehören beide zur miR-27-Familie und haben daher ähnliche Sequenzen. Die miR-27-Familie umfasst mehrere Isoformen, die sich in ihrer Sequenz leicht unterscheiden, aber ähnliche Funktionen haben können. Die miR27a-3p und miR27b-3p können daher ähnliche Zielgene regulieren oder in ähnlichen biologischen Prozessen eine Rolle spielen (Jia et al. 2015).

Die qRT-PCR-Analyse zeigte, dass die Expressionswerte von den beiden miRNA-Kandidaten, miR-27a-3p und miR-27b-3p, unter OGD sowohl in C8-D1A als auch in SH-SY5Y-Zelllinien herunterreguliert waren. Im Gegensatz dazu konnte in den gleichen Ziellinien unter OGD eine Hochregulierung von circ_015350 beobachtet werden.

Nach dem Knockdown von NCoA-2, welches das Gen von circ_015350 darstellt (Mehta et al. 2017), war das Expressionsniveau von miR-27a-3p unter OGD-Bedingungen in SH-SY5Y-Zellen hochreguliert. Dies bekräftigte unsere Hypothese, dass circ_015350 als „miRNA-Schwamm“ für miR27 fungieren könnte. Weiterhin konnte circ_015350 im Zytoplasma bei primären Astrozyten unter normoxischen und unter OGD-Bedingungen nachgewiesen werden.

In weiterführenden immunocytochemischen Analysen konnten wir mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) nachweisen, dass die circ_015350 mit der miR-27a-3p sowohl unter normoxischen Bedingungen als auch unter OGD kolokalisiert war. Dies ist der Nachweis, dass circ_015350 tatsächlich als „Schwamm“ für miR-27a-3p fungieren kann.

In einem MCAO-Modell von männlichen C57BL/6J-Mäusen haben Wang und Kollegen festgestellt, dass eine milde Aktivierung von AMPK durch anti-miR-27b die Neurogenese induziert und die Erholung nach einem Schlaganfall fördert. Dies könnte somit eine potenzielle therapeutische Option für ischämische Schlaganfälle sein (Wang et al., 2019).

4.4 Die miR-145 wurde als ein potenzielles Ziel von circ_006696 identifiziert

Die miR-145 wurde als ein potenzielles Ziel von circ_006696 identifiziert, wie oben beschrieben. Die circ_006696 konnte in primären Astrozyten auf intermediärem Niveau nachgewiesen werden und zeigte eine signifikante Herunterregulierung in primären Astrozyten nach 4 Std. OGD. Es wurde bereits berichtet, dass miR-145 sowohl bei Patienten mit ischämischem Schlaganfall als auch im Schlaganfallmodell der Ratte nach MCAO hochreguliert ist (Jeyaseelan et al. 2008; Dharap et al. 2009; Jia et al. 2015).

Die circ_006696 konnte weiterhin im Zytoplasma von primären Astrozyten nachgewiesen werden. Darüber hinaus zeigte die RNA-Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung, dass die circ_006696 mit miR-145 unter normoxischen und unter OGD-Bedingungen kolokalisiert war. Durch die Überexpression von circ_006696 in primären Astrozyten konnte zudem gezeigt werden, dass das Expressionsniveau von miR-145 herunterreguliert wurde. Dies stimmt ebenfalls mit unserer Hypothese überein, nach der circ_006696 als miRNA-Schwamm fungiert und so die Bindung von miR-145 an seine Zielgene hemmt.

Die Auswirkungen dieser Herunterregulierung können je nach Kontext variieren, aber es wurde berichtet, dass miR-145 eine Rolle bei der Regulation von Krebswachstum spielt und einen vielversprechenden prognostischen Wert für kolorektales Karzinom hat sowie eine niedrige Expression von miR-145 mit einer schlechten Prognose für die Patienten verbunden ist (Michael et al. 2003).

Des Weiteren wurde festgestellt, dass miR-145 die Neuronen vor dem induzierten Zelltod (Apoptose) bei OGD schützt (Cai et al., 2019) und die Lebensfähigkeit von Kardiomyozyten bei Hypoxie erhöht (Sun et al., 2018; Yuan et al., 2017). Die miR-145 könnte daher ein möglicher therapeutischer Angriffspunkt sein, um die Lebensfähigkeit von Neuronen nach einem Schlaganfall zu erhöhen. Dafür bedarf es jedoch weiterer Untersuchungen.

Es gibt immer mehr Hinweise darauf, dass circRNAs bei vielen zellulären Prozessen wichtig sind und dass ihre Dysregulation zur Pathogenese verschiedener Krankheiten beiträgt. CircRNAs sind äußerst stabil und werden normalerweise gemäß dem Zell- oder Gewebetyp

exprimiert. Daher werden sie momentan durch Knockdown oder Überexpression als mögliche Therapieziele untersucht (He et al. 2021).

Wenn sich bewahrheitet, dass die Hemmung oder Überexpression bestimmter circRNAs dazu beitragen kann, die funktionelle Erholung nach einem Schlaganfall zu verbessern, würde dies möglicherweise die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze ermöglichen.

Beispielsweise war in einem Mausmodell mit transientem Mittelhirnarterienverschluss (tMCAO) und im Plasma von Patienten mit akutem ischämischem Schlaganfall (AIS) das Expressionsniveau von circHECTD1 bei tMCAO-Mäusen sowie bei AIS-Patienten signifikant erhöht. CircHECTD1 hat miR-142 gebunden, sodass die TCDD Inducible Poly (ADP-Ribose) Polymerase (TIPARP) erhöht und die Astrozytenaktivierung durch Autophagie gestoppt wurde. In vivo reduzierte das Zugabe von circHECTD1 siRNA bei C57BL/6J-Mäusen die Astrozytenaktivierung und den Infarkt (Han et al. 2018).

In einer anderen Studie zeigte sich, dass bei Patienten mit AIS sowie im tMCAO-Mausmodell circTLK1 hochreguliert wurde. Die circTLK1 hatte miR-335-3p gebunden, woraufhin TIPARP reguliert wurde (Zhang P et al., 2019). Die Injektion einer small hairpin RNA (shRNA), die auf circTLK1 abzielt, reduzierte anschließend die Infarktgröße sowie neurologische Defizite in vivo (Zhang P et al. 2019).

Die gezielte Beeinflussung von deregulierten RNAs ist mittlerweile ein praktikables und attraktives Instrument in der präklinischen und klinischen Entwicklung geworden (Rupaimoole und Slack 2017), was bedeutet, dass diese Erkenntnisse möglicherweise in Zukunft genutzt werden können, um gezielte Therapien zu entwickeln. Diese könnten darauf abzielen, die circRNA-Expression in betroffenen Bereichen zu regulieren, um die funktionelle Erholung nach einem Schlaganfall zu fördern. Zum heutigen Zeitpunkt gibt es vielversprechende präklinische Nachweise für Hunderte von möglichen neuroprotektiven Medikamenten, doch leider konnte bisher keines davon erfolgreich in den klinischen Alltag integriert werden (Doepfner et al. 2022). Es müssen daher weitere Untersuchungen durchgeführt werden, um die Sicherheit und Wirksamkeit solcher Therapien zu bestimmen.

5 Zusammenfassung

Die circRNAs sind eine Gruppe der nicht-kodierenden RNAs, die erst vor kurzem entdeckt wurde. Viele der biologischen Funktionen von circRNAs sind noch nicht vollständig bekannt. Derzeit wird angenommen, dass circRNAs unter anderem als miRNA-Schwamm, RNA-binding protein (RBP)-Schwamm, Transkriptionsregulatoren oder als Translationsvorlagen fungieren können. Zudem wurden circRNAs in allen Arten von Zellen nachgewiesen und sind an vielen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen beteiligt.

Man kann daher vermuten, dass circRNAs auch am ischämischen Schlaganfall beteiligt sind. Suresh L. Mehta und seine Kollegen entdeckten, dass sich Expressionsmuster von circRNAs im Gehirn von Mäusen nach einer transienten fokalen Ischämie signifikant veränderten und identifizierten sechs vielversprechende circRNA-Kandidaten. Die circRNAs circ_008018, circ_015350 und circ_016128 werden in diesem Kontext hochreguliert, während circ_011137, circ_001729 und circ_006696 herunterreguliert werden. Die Expressionsniveaus dieser circRNAs in bestimmten Zelltypen sind jedoch bislang noch nicht untersucht worden, insbesondere auch nicht die Interaktion zwischen bestimmten Zelltypen in Bezug auf die circRNA-Expression.

In der hier vorliegenden Arbeit wurden die Expressionsniveaus von zweien dieser circRNAs in Neuronen und Astrozyten untersucht, nämlich circ_015350 und circ_006696. Unter hypoxischen Bedingungen veränderten sich die Expressionsniveaus der circRNAs in den verschiedenen Zelltypen unterschiedlich: circ-15350 wurde hochreguliert, wohingegen circ_006696 herunterreguliert wurde. Es ist daher anzunehmen, dass circ_015350 und circ_006696 möglicherweise eine wichtige Rolle im Rahmen der Resistenz gegenüber hypoxischen Noxen für diese Zelltypen sein könnten. Vor dem Hintergrund der „Schwammfunktion“ von solchen circRNAs wurde im weiteren Verlauf dieser Arbeit eine Interaktion mit ausgewählten miRNAs postuliert. Nach Analyse der Datenbank „miRDB“ konnten FISH-Experimente eine Co-Lokalisation von circ_015350 mit miR-27b-3p und miR-27a-3p bzw. von circ_006696 mit miR-145-5P bestätigen. Die hier vorliegenden Ergebnisse unterstützen daher die Hypothese, dass circ_015350 bzw. circ_006696 vielversprechende Kandidaten für zukünftige Therapieansätze beim ischämischen Schlaganfall sein könnten.

6 Literaturverzeichnis

- Abou-Ghali M, Stiban J (2015): Regulation of ceramide channel formation and disassembly: Insights on the initiation of apoptosis. *Saudi J Biol Sci* 22, 760–772
- Bartel DP (2004): MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116, 281–297
- Busch MA, Kuhnert R (2017): 12-Monats-Prävalenz von Schlaganfall oder chronischen Beschwerden infolge eines Schlaganfalls in Deutschland. *GBE JoHM* 2(1), 70–76
- Bushati N, Cohen SM (2007): microRNA functions. *Annu Rev Cell Dev Biol* 23, 175–205
- Chamorro Á, Meisel A, Planas AM, Urra X, van de Beek D, Veltkamp R (2012): The immunology of acute stroke. *Nat Rev Neurol* 8, 401–410
- Dharap A, Bowen K, Place R, Li L-C, 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, 391–397
- Doepfner TR, Haupt M, Gerner ST, Bähr M (2022): Quest for Quality in Translational Stroke Research-A New Dawn for Neuroprotection? *Int J Mol Sci* 23, 5381
- Foerch C, Misselwitz B, Sitzler M, Steinmetz H, Neumann-Haefelin T (2008): MEDIZIN-Originalarbeit-Die Schlaganfallzahlen bis zum Jahr 2050. *Deutsches Arzteblatt-Arztliche Mitteilungen-Ausgabe A* 105, 467
- Gebert LFR, MacRae IJ (2019): Regulation of microRNA function in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 20, 21–37
- Goldberg MP, Choi DW (1993): Combined oxygen and glucose deprivation in cortical cell culture: calcium-dependent and calcium-independent mechanisms of neuronal injury. *J Neurosci* 13, 3510–3524
- Grysiewicz RA, Thomas K, Pandey DK (2008): Epidemiology of ischemic and hemorrhagic stroke: incidence, prevalence, mortality, and risk factors. *Neurol Clin* 26, 871–895, vii
- Han B, Zhang Yuan, Zhang Yanhong, Bai Y, Chen X, Huang R, Wu F, Leng S, Chao J, Zhang JH, et al. (2018): Novel insight into circular RNA HECTD1 in astrocyte activation via autophagy by targeting MIR142-TIPARP: implications for cerebral ischemic stroke. *Autophagy* 14, 1164–1184
- Hankey GJ (2017): Stroke. *Lancet* 389, 641–654
- Harrison DC, Medhurst AD, Bond BC, Campbell CA, Davis RP, Philpott KL (2000): The

- use of quantitative RT-PCR to measure mRNA expression in a rat model of focal ischemia-caspase-3 as a case study. *Brain Res Mol Brain Res* 75, 143–149
- He AT, Liu J, Li F, Yang BB (2021): Targeting circular RNAs as a therapeutic approach: current strategies and challenges. *Signal Transduct Target Ther* 6, 185
- Heuschmann PU, Busse O, Wagner M, Endres M, Villringer A, Röther J, Kolominsky-Rabas PL, Berger K, null für das Kompetenznetz Schlaganfall die DSG sowie die SDS-H (2010): Schlaganfallhäufigkeit und Versorgung von Schlaganfallpatienten in Deutschland. *Aktuelle Neurologie* 37, 333–340
- Hombach S, Kretz M (2016): Non-coding RNAs: Classification, Biology and Functioning. *Adv Exp Med Biol* 937, 3–17
- Hossmann KA (1994): Viability thresholds and the penumbra of focal ischemia. *Ann Neurol* 36, 557–565
- Hossmann KA (1996): Perinfarct depolarizations. *Cerebrovasc Brain Metab Rev* 8, 195–208
- Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A (2005): Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun* 6, 279–284
- Jeyaseelan K, Lim KY, Armugam A (2008): MicroRNA expression in the blood and brain of rats subjected to transient focal ischemia by middle cerebral artery occlusion. *Stroke* 39, 959–966
- Jia L, Hao F, Wang W, Qu Y (2015): Circulating miR-145 is associated with plasma high-sensitivity C-reactive protein in acute ischemic stroke patients. *Cell Biochem Funct* 33, 314–319
- Katsura K, Kristián T, Siesjö BK (1994): Energy metabolism, ion homeostasis, and cell damage in the brain. *Biochem Soc Trans* 22, 991–996
- Kawabori M, Yenari MA (2015): The role of the microglia in acute CNS injury. *Metab Brain Dis* 30, 381–392
- Khoshnam SE, Winlow W, Farzaneh M, Farbood Y, Moghaddam HF (2017): Pathogenic mechanisms following ischemic stroke. *Neurol Sci* 38, 1167–1186
- Kristensen LS, Andersen MS, Stagsted LVW, Ebbesen KK, Hansen TB, Kjems J (2019): The biogenesis, biology and characterization of circular RNAs. *Nat Rev Genet* 20, 675–691
- Li Y-J, Zhan Y, Li C, Sun J, Yang C (2021): CPI-1189 protects neuronal cells from oxygen glucose deprivation/re-oxygenation-induced oxidative injury and cell death. *Aging (Albany NY)* 13, 6712–6723
- Li Y-N, Pan R, Qin X-J, Yang W-L, Qi Z, Liu W, Liu KJ (2014): Ischemic neurons activate astrocytes to disrupt endothelial barrier via increasing VEGF expression. *J Neurochem* 129, 120–129

- Mehta SL, Pandi G, Vemuganti R (2017): Circular RNA expression Profiles Alter Significantly in Mouse Brain after Transient Focal Ischemia. *Stroke* 48, 2541–2548
- Memczak S, Jens M, Elefsinioti A, Torti F, Krueger J, Rybak A, Maier L, Mackowiak SD, Gregersen LH, Munschauer M, et al. (2013): Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency. *Nature* 495, 333–338
- Michael MZ, O' Connor SM, van Holst Pellekaan NG, Young GP, James RJ (2003): Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Mol Cancer Res* 1, 882–891
- Michelucci A, Heurtaux T, Grandbarbe L, Morga E, Heuschling P (2009): Characterization of the microglial phenotype under specific pro-inflammatory and anti-inflammatory conditions: Effects of oligomeric and fibrillar amyloid-beta. *J Neuroimmunol* 210, 3–12
- Mies G, Iijima T, Hossmann KA (1993): Correlation between peri-infarct DC shifts and ischaemic neuronal damage in rat. *Neuroreport* 4, 709–711
- Mirzaei H, Momeni F, Saadatpour L, Sahebkar A, Goodarzi M, Masoudifar A, Kouhpayeh S, Salehi H, Mirzaei HR, Jaafari MR (2018): MicroRNA: Relevance to stroke diagnosis, prognosis, and therapy. *J Cell Physiol* 233, 856–865
- Ning S, Li X (2018): Non-coding RNA Resources. *Adv Exp Med Biol* 1094, 1–7
- Panda AC (2018): Circular RNAs Act as miRNA Sponges. *Adv Exp Med Biol* 1087, 67–79
- Pomierny B, Krzyzanowska W, Jurczyk J, Strach B, Skorkowska A, Leonovich I, Budziszewska B, Pera J (2022): Identification of optimal reference genes for gene expression studies in a focal cerebral ischaemia model—Spatiotemporal effects. *J Cell Mol Med* 26, 3060–3067
- Rakers C, Schmid M, Petzold GC (2017): TRPV4 channels contribute to calcium transients in astrocytes and neurons during peri-infarct depolarizations in a stroke model. *Glia* 65, 1550–1561
- Ransohoff RM, Perry VH (2009): Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. *Annu Rev Immunol* 27, 119–145
- Rupaimoole R, Slack FJ (2017): MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases. *Nat Rev Drug Discov* 16, 203–222
- Sacco RL, Kasner SE, Broderick JP, Caplan LR, Connors JJB, Culebras A, Elkind MSV, George MG, Hamdan AD, Higashida RT, et al. (2013): An updated definition of stroke for the 21st century: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke* 44, 2064–2089
- Saleem S (2021): Apoptosis, Autophagy, Necrosis and Their Multi Galore Crosstalk in Neurodegeneration. *Neuroscience* 469, 162–174
- Sekerdag E, Solaroglu I, GURSOY-OZDEMIR Y (2018): Cell Death Mechanisms in Stroke and

- Novel Molecular and Cellular Treatment Options. *Curr Neuropharmacol* **16**, 1396–1415
- Shim R, Wong CHY (2016): Ischemia, Immunosuppression and Infection--Tackling the Predicaments of Post-Stroke Complications. *Int J Mol Sci* **17**, 64
- Tian YF, Zhang PB, Xiao XL, Zhang JS, Zhao JJ, Kang QY, Chen XL, Qiu F, Liu Y (2007): The quantification of ADAMTS expression in an animal model of cerebral ischemia using real-time PCR. *Acta Anaesthesiol Scand* **51**, 158–164
- Virani SS, Alonso A, Benjamin EJ, Bittencourt MS, Callaway CW, Carson AP, Chamberlain AM, Chang AR, Cheng S, Delling FN, et al. (2020): Heart Disease and Stroke Statistics-2020 Update: A Report From the American Heart Association. *Circulation* **141**, e139–e596
- Von Bornstädt D, Houben T, Seidel JL, Zheng Y, Dilekoz E, Qin T, Sandow N, Kura S, Eikermann-Haerter K, Endres M, et al. (2015): Supply-demand mismatch transients in susceptible peri-infarct hot zones explain the origins of spreading injury depolarizations. *Neuron* **85**, 1117–1131
- Wang F, Zuroske T, Watts JK (2020): RNA therapeutics on the rise. *Nat Rev Drug Discov* **19**, 441–442
- Wang Z, Yuan Y, Zhang Z, Ding K (2019): Inhibition of miRNA-27b enhances neurogenesis via AMPK activation in a mouse ischemic stroke model. *FEBS Open Bio* **2**, 859–869
- Warlow CP (1998): Epidemiology of stroke. *Lancet* **352 Suppl 3**, SIII1-4
- Xing C, Arai K, Lo EH, Hommel M (2012): Pathophysiologic cascades in ischemic stroke. *Int J Stroke* **7**, 378–385
- Zhang P, Chao Z, Zhang R, Ding R, Wang Y, Wu W, Han Q, Li C, Xu H, Wang L, Xu Y (2019): Circular RNA Regulation of Myogenesis. *Cells* **8**, 885
- Zhang X, Hamblin MH, Yin K-J (2019): Noncoding RNAs and Stroke. *Neuroscientist* **25**, 22–26

Danksagung

Diese Doktorarbeit wurde während der Zeit von 2020 bis 2023 in der Forschungsgruppe für translationale Schlaganfallforschung in der Abteilung der Neurologie der Universitätsmedizin Göttingen verfasst. Ich möchte Herrn Prof. Dr. med. Mathias Bähr meinen Dank aussprechen, dass er mir die Gelegenheit gab, meine Doktorarbeit in seiner Abteilung anzufertigen.

Besonderen Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Thorsten R. Döppner für die Aufnahme in seine Forschungsgruppe, die Bereitstellung des Dissertationsthemas und die hervorragende Betreuung. Er hat mir immer bei fachlichen Fragen, inhaltlicher Diskussion sowie bei Problemen sehr geholfen.

Herrn Prof. Dr. André Fischer danke ich für die Zweitbetreuung meiner Doktorarbeit. Ich möchte Herrn Dr. Lars Tatenhorst herzlich für seine hervorragende Betreuung während der Arbeit und seine persönliche Unterstützung danken. Frau Irina Graf danke ich für die Einarbeitung in die Laboraufgaben und für die vielen technischen Ratschläge bei der Durchführung meiner Experimente. Abschließend möchte ich allen Mitarbeitern der Forschungsgruppe meinen Dank für die hilfreiche Unterstützung während der Laborarbeit aussprechen.

Gewidmet ist diese Arbeit meiner Großmutter Kout el Kloub Abu el Magd Eid.

Lebenslauf

Mein Name ist Ahmed Mohsen und ich wurde 1990 in Kairo, Ägypten, geboren. Ich habe mein Studium der Zahnmedizin von 2013 bis 2019 an der Universitätsmedizin Göttingen abgeschlossen und meine Approbation erlangt. Nach meinem Abschluss arbeitete ich als Ausbildungsassistent in verschiedenen Zahnarztpraxen in Osnabrück und Höxter. Seit 2022 bin ich als Zahnarzt in Heilbad Heiligenstadt tätig und kümmere mich um die Zahngesundheit meiner Patienten.

Seit 2020 bin ich als Doktorand in der Forschungsgruppe für translationale Schlaganfallforschung in der Klinik für Neurologie an der Universitätsmedizin Göttingen tätig. Unter der Leitung von Prof. Dr. med. Thorsten R. Döppner ist diese Promotion entstanden.