

Aus dem Centrum für Schlaganfallforschung Berlin,
Abteilung für experimentelle Neurologie
der Medizinischen Fakultät Charité- Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Expression und Regulation von Zinkfingerprotein 580 als Mediator
endogener Neuroprotektion**

Zum Erlangen des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité- Universitätsmedizin Berlin

von

Stephanie Cornelia Marie Lorenz

aus Birmingham/AL, USA

Datum der Promotion: 13.12.2019

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis.....	VIII
Abkürzungsverzeichnis	IX
1 Abstract.....	1
1.1 Abstract Englisch.....	1
1.2 Abstract Deutsch	2
2 Einleitung	4
2.1 Der Schlaganfall	4
2.1.1 Klinik und sozioökonomische Herausforderung.....	4
2.1.2 Therapie	5
2.1.3 Die Pathophysiologie des Schlaganfalls	5
2.1.4 Endogene Neuroprotektion	7
2.2 Zinkfingerproteine	7
2.2.1 Zfp580	9
2.3 Experimentelle Schlaganfallmodelle in der Maus.....	10
2.3.1 Verschluss der mittleren Zerebralarterie (MCAo).....	10
2.3.2 Sauerstoff- und Glukoseentzug (OGD).....	11
2.4 Modelle der exogenen Genreduktion	11
2.4.1 Micro RNA eingebettete spezifische <i>small hairpin</i> RNA (miR-shRNA)	11
2.4.2 tm1a knockout (KO)	12
3 Hypothesen	13
4 Methoden und Material.....	13
4.1 Zellkultur	13
4.1.1 Präparation der Primärkulturen.....	13
4.1.2 Kulturbedingungen.....	14
4.1.3 Mikroskopie	15
4.2 Molekulare Analysen.....	15
4.2.1 Quantitative Polymerase Kettenreaktion (PCR)	15
4.2.1.1 Isolation der RNA	15
4.2.1.2 Reverse Transkriptase PCR (rtPCR).....	16
4.2.1.3 Quantitative real-time PCR (rt-qPCR).....	17
4.2.1.3.1 Durchführung der rt-qPCR	18
4.2.1.3.2 $\Delta\Delta$ Ct-Methode	19
4.2.2 Western Blot Analyse	20
4.2.2.1 Zellextrakte für die Proteinanalyse mit immunoblots.....	20

4.2.2.2	Western Blot	20
4.2.2.3	Bildbearbeitung	21
4.2.3	Immunzytochemie (ICC)	21
4.2.3.1	Fixierung und Färbung	21
4.2.3.2	Fluoreszenzmikroskopie	22
4.2.3.3	Konfokale Mikroskopie	22
4.2.3.4	Bildbearbeitung	22
4.3	Neuroprotektionsanalyse	23
4.3.1	Klonierung der lentiviralen Transfervektoren	23
4.3.1.1	Konstruktion der miR-shRNA-Vektoren	23
4.3.1.2	Produktion der Transfervektoren	27
4.3.1.3	Transformation	27
4.3.2	Produktion und Titration lentiviraler Vektoren	27
4.3.2.1	Transduktion viraler Partikel	28
4.3.3	OGD	28
4.3.3.1	Versuchsablauf des <i>in vitro</i> Hypoxiemodells	28
4.3.3.2	Reoxygenierung	29
4.3.4	Messung der Laktatdehydrogenase-(LDH)-Aktivität	29
4.3.5	Zellzahl	30
4.4	<i>In vivo</i> Experimente	31
4.4.1	Tierhaltung	31
4.4.2	Tm1a knockout	32
4.4.2.1	Das Mausmodell	32
4.4.2.2	Genotypisierung	33
4.4.3	MCAo	36
4.4.3.1	Operation zur Auslösung eines ischämischen Schadens in der Maus	36
4.4.3.2	Scheinoperation (<i>sham</i>)	37
4.4.4	Immunhistochemische Färbungen (IHC)	37
4.4.4.1	Präparation der Hirnschnitte	37
4.4.4.2	Immunhistochemische Färbung	37
4.4.4.3	Konfokale Mikroskopie	38
4.4.5	<i>In vivo</i> Verhaltensstudie	39
4.4.5.1	Versuchsablauf und Basiswerte	39
4.4.5.2	Ödemkorrigierte Läsionsvolumina und Ko- registrierung der Infarktlokalisierung	40
4.4.5.3	Neuroscore	41
4.4.5.4	Rotarod	41
4.4.5.5	Klebestreifentest	42
4.4.5.6	Eckenrotationstest	43
4.5	Statistische Analyse	44
5	Ergebnisse	46

5.1	Expression von Zfp580 in Neuronen.....	46
5.1.1	Zfp580 wird in Neuronen exprimiert.....	46
5.1.2	Zfp580 ist in Neuronen im Nukleus lokalisiert.....	47
5.1.3	Im Western Blot weist Zfp580 ein Molekulargewicht von 19 kDa auf.....	49
5.2	Zfp580 wird in Neuronen durch Schlaganfallmodelle <i>in vitro</i> und <i>ex vivo</i> reguliert.....	49
5.2.1	<i>in vitro</i> wird Zfp580 nach OGD reduziert.....	49
5.2.1.1	Western Blot.....	49
5.2.1.2	Immunzytochemie.....	50
5.2.1.3	rt-qPCR.....	52
5.2.1.4	Immunhistochemie.....	53
5.2.2	<i>Ex vivo</i> steigen mRNA Mengen von Zfp580 in Gesamthirnllysaten nach MCAo an.....	55
5.3	RNA Interferenz und Proteinmengenabnahme von Zfp580 <i>in vitro</i> ist neuroprotektiv nach OGD.....	57
5.3.1	Neuronenspezifische RNA Interferenz von Zfp580.....	57
5.3.2	Nachweis der Reduktion von Zfp580 auf mRNA- und Proteinebene.....	58
5.3.3	RNAi von Zfp580 macht Neuronenkulturen in Basisuntersuchungen nicht vulnerabler als Kontrollkulturen.....	59
5.3.4	RNA Interferenz mit Zfp580 führt zu geringerer Freisetzung der Laktatdehydrogenase nach 2,5 h OGD.....	59
5.3.5	RNA Interferenz von Zfp580 führt zu mehr überlebenden EGFP+ Zellen nach OGD.....	62
5.4	Ein Fehlen von Zfp580 <i>in vivo</i> führte zu keiner verbesserten funktionellen Erholung nach MCAo.....	64
5.4.1	Genotypisierung.....	64
5.4.2	Basisuntersuchungen.....	65
5.4.3	Vergleichbare Läsionsgrößen bei KO von Zfp580.....	66
5.4.4	Neuroscore.....	68
5.4.5	Rotarod.....	69
5.4.6	Klebestreifentest.....	71
5.4.6.1	Kontaktzeit.....	71
5.4.6.2	Entfernungszeit.....	72
5.4.7	Eckenrotationstest.....	74
6	Diskussion.....	76
6.1	Expression in Neuronen <i>in vitro</i>	76
6.2	Expression <i>in vivo</i>	76
6.3	Regulation von Zfp580 durch hypoxischen Stress.....	77
6.4	Resilienzsteigerung durch Zfp580-Reduktion.....	81
6.5	Einfluss von genomischer Ablation von Zfp580 auf Infarkt volumen und Analyse der funktionellen Defizite.....	83

7	Fazit	86
8	Ausblick.....	86
9	Literaturverzeichnis	88
10	Eidesstattliche Versicherung	98
11	Curriculum vitae.....	99
12	Danksagung	102

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: schematische Darstellung des Temperaturverlaufs der rtPCR.....	16
Abbildung 2: Schematische Darstellung des Ablaufs der rt-qPCR.....	18
Abbildung 3: Schrittweise Berechnung des $\Delta\Delta C_t$ -Wertes.	19
Abbildung 4: Vereinfachte Darstellung der mR-shiRNA(Zfp580) Konstrukte.	26
Abbildung 5: Zeitlicher Ablauf der Neuroprotektionsstudie.....	31
Abbildung 6: Schematische Darstellung der inserierten Deletionskassette durch den Vektor L1L2_Bact_P.	33
Abbildung 7: Schematische Darstellung der Genotypisierung.....	35
Abbildung 8: schematische Darstellung des Gefäßsystems der Maus.	37
Abbildung 9: Versuchsablauf der Verhaltensstudie	39
Abbildung 10: Beispielhafte Darstellung der Rotarod-Apparatur.....	42
Abbildung 11: Videoansicht des Klebestreifentests.....	43
Abbildung 12: Aufbau und Auswertung des Eckenrotationstests.	44
Abbildung 13: Zfp580 wird im Gehirn der Maus exprimiert.....	47
Abbildung 14: Zfp580 Protein ist im Nukleus lokalisiert	48
Abbildung 15: Darstellung der Zfp580 Bande bei 19 kDa im Western Blot.	49
Abbildung 16: Zfp580 liegt nach OGD im Western Blot vermindert vor.....	50
Abbildung 17: Zfp580 Protein wird nach OGD fluoreszenzmikroskopisch sichtbar und statistisch signifikant reduziert.	51
Abbildung 18: OGD führt zu Reduktion von Zfp580-mRNA.	53
Abbildung 19: Die Expression von Zfp580 ist nach MCAo in Gehirnschnitten vermindert.	54
Abbildung 20: Expressionssteigerung von Zfp580 mRNA in Gesamthirnlysaten nach MCAo.	56
Abbildung 21: Virusproduktion in HEK Zellen und Neuronenkulturen.....	57
Abbildung 22: Lentiviral transduzierte mi-shRNA gegen Zfp580 ist effektiv.	58
Abbildung 23: RNAi von Zfp580 führt zu ähnlichen LDH Konzentrationen in den Basisuntersuchungen und zu stark verminderten Konzentrationen nach OGD.....	61
Abbildung 24: RNAi von Zfp580 führt zu geringerer Abnahme EGFP-exprimierender Neurone nach OGD.....	63
Abbildung 25: Die Genotypisierung der Geschwistertiere klärte über den Genotyp auf.....	65
Abbildung 26: Im Gewichtsverlauf und den Überlebensraten konnte kein Unterschied zwischen den Genotypen festgestellt werden.	66

Abbildung 27: Im MRT zeigte sich kein Unterschied zwischen den Genotypen in der Läsionsgröße der Infarkte.	67
Abbildung 28: Kein unterschiedliches Abscheiden der Versuchsgruppen im Neuroscore.....	69
Abbildung 29: Kein Unterschied zwischen den Genotypen im Rotarodversuch..	71
Abbildung 30: Kein Unterschied zwischen den Genotypen in der Wahrnehmung des Klebestreifens.	72
Abbildung 31: Kein Unterschied zwischen den genotypen bei der Entfernung des klebestreifens..	73
Abbildung 32: Die Lateralisierung nach MCAo ist für beiden Genotypen vergleichbar	74

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zellkultur	12
-----------------------------	----

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
A.	Arterie <i>Arteria</i> (lat. <i>Arteria</i>)
Aa.	Arterien (lat. <i>Arteriae</i>)
Abb.	Abbildung
ANOVA	Varianzanalyse (engl. <i>analysis of variance</i>)
APO	Apochromat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BNID	<i>BioNumbers</i> ID
Bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin (engl. <i>bovine serum albumine</i>)
BSS	balancierte Salzlösung (engl. <i>balanced salt solution</i>)
C	Cystein (AS)
Ca ²⁺	Calcium
CaCl ₂	Calciumchlorid
CCA	A. carotis communis
cDNA	komplementäre DNA (engl. <i>complementary DNA</i>)
Cl ⁻	Chlorid
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DAPI	6-Diamidin-2-Phenylindol
dd	doppelt-destilliert
dfn	Freiheitsgrad (engl. <i>degree of freedom</i>)
dfd	Nenner des Freiheitsgrades (engl. <i>denominator of freedom</i>)
DIV	Tag in Kultur <i>day in vitro</i> (engl. <i>day in vitro</i>)

DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>desoxyribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphat
DOI	digitaler Objektbezeichner (engl. <i>digital object identifier</i>)
DPBS	Dulbeccos phosphatgepufferte Salzlösung (engl. <i>Dulbecco's phosphate buffered saline</i>)
E	Embryonaltag
E. coli	Escherichia coli
EA.hy	humane endotheliale Hybridoma Zellen
EDTA	Ethylendiaminetetraacetat
EGFP	verstärktes grün fluoreszierendes Protein (engl. <i>enhanced green fluorescent protein</i>)
EGFP+	EGFP-positiv
EMCCD	<i>electron multiplying charge-coupled device</i>
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
ERK 1/2	<i>Extracellular signal-transducing kinase 1/2</i>
EUCOMM	<i>European Conditional Mouse Mutagenesis Program</i>
F	F-Wert (Statistik)
FCS	fetales Kälberserum (engl. <i>fetal calf serum</i>)
FEM	Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin
G	G-Kraft
GC	Guanin-Cytosin (DNA-Basen)
Gli1	<i>Glioma associated oncogen 1</i>
h	Stunde
H	Histidin (AS)
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid

HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazin-Ethansulfonsäure
Hif1 α	Hypoxia-induced-Factor 1 α
HRP	Meerrettichperoxidase (engl. <i>horseradish peroxydase</i>)
HUVEC	Endothelzellen der Umbilikalvene (engl. <i>Human Umbilical vein endothelial cells</i>)
ICC	Immunzytochemie (engl. <i>immunocytochemistry</i>)
IE	internationale Einheit
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie
IL-1	Interleukin-1
IL-6	Interleukin-6
IMSR	<i>International Mouse Strain Resource</i>
K ⁺	Kalium
K ₂ HPO ₄	Dikaliumhydrogenphosphat
KCl	Kaliumchlorid
KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
KI	Konfidenzintervall
KO	<i>knockout</i>
KOMP	<i>Knockout Mouse Project</i>
LaGeSO	Landesamtes für Gesundheit und
LCCA	linke A. carotis communis
LDH	Laktatdehydrogenase
LDL	<i>low density lipoprotein</i> (engl. <i>low density</i> - geringe Dichte)
LECA	linke A. carotis externa
LI	Lateralisierungsindex
LICA	linke A. carotis interna

LPS	Lipopolysaccharid
max.	maximal
MCA	A. cerebri media
MCAo	Verschluss der mittleren Zerebralarterie (engl. <i>middle cerebral artery occlusion</i>)
MDG	<i>Mouse Genome Database</i>
MEM	modifiziertes Eagle Medium
MGC	<i>Multinucleated Giant Cells</i>
MGI	<i>Mouse Genome Informatics</i>
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min	Minute
miRNA	micro RNA
miR-shRNA	micro RNA eingebettete <i>small hairpin</i> RNA
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	<i>messenger</i> RNA (engl. <i>messenger</i> – Bote)
MRT	Magnetresonanztomographie
MW	Mittelwert
mW	Milliwatt
N ₂	Stickstoff
N ₂ O	Lachgas
Na ⁺	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NAD ⁺	oxidiertes Nicotinamidadenindinukleotid
NADH	reduziertes Nicotinamidadenindinukleotid
NaH ₂ PO ₄	Natriumhydrogencarbonat

NBM	Neurobasalmedium
NDS	normales Eselserum (engl. <i>normal donkey serum</i>)
NF-κB	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</i>
NGS	normales Ziegen Serum (engl. <i>normal goat serum</i>)
nm	Nanometer
NP-40	Nonident-P40
O ₂	Sauerstoff
OGD	kombinierter Sauerstoff- und Glukoseentzug (engl. <i>oxygen-glucose-deprivation</i>)
oxLDL	oxygeniertes LDL
p	p-Wert
P/S	Penicillin/Streptomycin
PCR	Polymerase Kettenreaktion (engl. <i>polymerase chain reaction</i>)
PDSM	Phosphorylierungsabhängiges Sumoylierungsmotif (engl. <i>phosphorylation-dependent sumoylation motif</i>)
PEG	Polyethylenglykol
PFA	Paraformaldehyd
PLL	Poly-L-Lysin
pri-miRNA	primäre miRNA
PTM	posttranslationale Modifikation
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RISC	<i>RNA-induced-silencing-complex</i>
RNAi	RNA Interferenz
ROI	<i>region of interest</i>
ROS	reaktive Sauerstoffspezies (engl. <i>reactive oxygen species</i>)
rpm	Umdrehung pro Minute (engl. <i>revolution per minute</i>)

rt-qPCR	quantitative real-time PCR
rtPCR	Reverse Transkriptase PCR
SA	Spliceakzeptor
SDS	Natriumlaurylsulfat (= engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
Sek.	Sekunde
shRNA	<i>small hairpin</i> RNA (engl. <i>small hairpin</i> - kleine Haarnadel)
SUMO	<i>Small ubiquitin-like modifier protein</i>
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor β</i>
TU	Transduktionseinheit (engl. <i>transducing unit</i>)
UTR	nicht-translatierte Region (engl. <i>untranslated region</i>)
V	Volt
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
WPRE	<i>Woodchuck Hepatitis Virus Posttranscriptional Regulatory Element</i>
wt	wildtyp
WTSI	<i>Wellcome Trust Sanger Institute</i>
Zfp	Zinkfingerprotein
Zfp580	Zinkfingerprotein 580
α	α -Fehler

1 Abstract

1.1 Abstract Englisch

Stroke as a sudden neurological deficit caused by an intracerebral reduction of blood flow and oxygen supply or hemorrhage is still one of the major causes of death and acquired disability in the western world. Despite its impact as a socioeconomic burden, therapeutic strategies to improve long-term outcome or minimize lesion sizes are missing. Therefore, research has put great effort into the examination of the pathophysiological and molecular processes in stroke in order to find potential candidates that can improve stroke outcome or foster endogenous resilience strategies against ischemic-like stress. One of these strategies is to foster evolutionary conserved self-healing capacities of the brain, so-called endogenous neuroprotection. Zinc finger protein 580 (Zfp580) serves as potential candidate to achieve these goals. Being part of the broad C₂H₂-family of zinc finger proteins, the transcription factor of 172 amino acids contains a C-terminal DNA-binding motif and a proline-rich N-terminus for protein-protein interaction. It has been well examined in endothelial cells where it displays pro-angiogenic, anti-inflammatory and anti-apoptotic characteristics. However, its beneficial role in hypoxic tolerance in myocardial cells which makes it promising to be examined in mouse models of cerebral ischemia. To our knowledge, this project is the first to elucidate the expression and regulation of Zfp580 in neurons in the context of middle cerebral artery occlusion (MCAo) and combined oxygen and glucose deprivation (OGD). We showed that Zfp580 is expressed in neurons throughout the brain and Zfp580 expression levels were quickly decreased after induction of hypoxia on protein, however not on mRNA level. In a model of lentivirus-mediated miR-shRNA transduction in order to efficiently silence Zfp580 in a neuron-specific manner, we provided evidence that the reduction of Zfp580 is neuroprotective after OGD. Despite these findings, a constitutive and cell type unspecific knockout of Zfp580 could not provide beneficial effects on the tolerance against ischemic-like stress in short-term outcome after MCAo. These findings suggest that Zfp580 is subject to a fast and effective endogenous mechanism in the stress response of neurons against ischemic-like stress. Despite this, its role in the complexity of orchestrating signals in and in between brain cells undergoing hypoxia is not conclusively understood. However, since Zfp580 is a protein that seems to play a role in endogenous neuroprotection, it might serve as a druggable candidate in the treatment of acute ischemic stroke.

1.2 Abstract Deutsch

Der Schlaganfall ist definiert als ein akut auftretendes neurologisches Defizit und wird durch Verminderung des intrazerebralen Blutflusses und der Sauerstoffversorgung oder durch Hämorrhagie verursacht. In der westlichen Welt gilt er nach wie vor als eine der führenden Todesursachen und Gründe für erworbene Behinderung. Neben der großen sozioökonomischen Belastung, die der Schlaganfall darstellt, mangelt es noch immer an suffizienten Behandlungsstrategien, um die Langzeitfolgen zu verbessern oder endogene Resilienzstrategien des Gehirns zu unterstützen. Aus diesem Grund wurde viel Forschung betrieben, um die Pathophysiologie und die molekularen Mechanismen des Schlaganfalls besser zu verstehen, und um potentielle Kandidaten zu identifizieren, die positiven Einfluss auf die Stresstoleranz von Gehirnzellen und speziell von Neuronen nehmen. Eine Strategie verfolgt das Ziel, evolutionär konservierte Selbstschutz- und -heilungskapazitäten des Gehirns zu identifizieren. Das Zinkfingerprotein 580 (Zfp580) ist ein Transkriptionsfaktor, der vielversprechende Charakteristika aufweist, um im Zusammenhang mit dieser sog. endogenen Neuroprotektion (Resilienzsteigerung) diskutiert zu werden. Als Teil der C₂H₂-Familie von Zinkfingerproteinen (Zfp) enthält das 172 Aminosäuren (AS) lange Protein eine C-terminale DNA-Bindungsstelle und einen prolinreichen N-Terminus, der Protein-Protein-Interaktion ermöglicht. In Endothelzellen ist das Protein bereits gut untersucht. Dort werden ihm angiogenesefördernde, antiinflammatorische und anti-apoptotische Eigenschaften zugeschrieben. Vor allem aber ist es seine zuträgliche Rolle in der Hypoxietoleranz von Myokardzellen, die es zu einem vielversprechenden Kandidaten für die Schlaganfallforschung im Mausmodell macht. Dieses Projekt ist das erste uns bekannte, das sich zum Ziel gesetzt hat, die Expression und Regulation von Zfp580 in den Modellen der MCAo und OGD in Neuronen der Maus zu untersuchen. Wir konnten zeigen, dass das Protein in Neuronen des gesamten murinen Gehirns exprimiert wird, und dass Hypoxie zu einer raschen Herunterregulation des Proteins auf Protein- nicht aber auf mRNA-ebene führte. Wir konnten zudem zeigen, dass sich eine neuronspezifische Reduktion der mRNA von Zfp580 durch lentivirale Transduktion von kleinen Zfp580-spezifischen Haarnadel-RNAs (shRNA) auf das Zellüberleben nach hypoxischem Stress auswirkte, also neuroprotektiv wirkt. Trotz dieser Ergebnisse erbrachte ein konstitutiver und zelltypübergreifender Knockout von Zfp580 keine Überlebensvorteile im kurzen Erholungsintervall nach MCAo bzw. OGD. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die schnelle und effektive Reduktion des Transkriptionsfaktors Teil einer endogenen Antwort der Neuronen auf ischämie-ähnlichen Stress ist. Ebenfalls wird deutlich, dass die Rolle von Zfp580 im Zusammenspiel intra- und interzellulärer Signalwege bei Hypoxie noch nicht endgültig verstan-

den ist. Trotz dessen ist Zfp580 ein Kandidat, der für eine medikamentöse Akutintervention im Falle des Schlaganfalls zu diskutieren bleibt.

2 Einleitung

2.1 Der Schlaganfall

2.1.1 Klinik und sozioökonomische Herausforderung

Der Schlaganfall ist definiert als ein akutes Auftreten neurologischer Ausfälle, die für mehr als 24 h anhalten auf Grundlage einer Minderversorgung des Gehirngewebes an Sauerstoff und Nährstoffen (Warlow et al., 2003). Den TOAST (*Trial of Org 10172 in Acute Stroke*) Kriterien (Adams et al., 1993) entsprechend sind die häufigsten Ursachen des Schlaganfalls arterio- arterielle Thrombembolien als Folge rupturierter und thrombogener arteriosklerotischer Plaques, gefolgt von kardiogenen Thrombembolien, die meist im Zusammenhang mit Vorhofflimmern auftreten. Als wichtigster Risikofaktor gilt die arterielle Hypertonie. Insgesamt sind thrombembolische Ereignisse für etwa 85 % der Schlagafälle verantwortlich, die restlichen 15 % sind hämorrhagischer Natur (Kunz et al., 2010; Sacco et al., 2013). Laut Weltgesundheitsorganisation (WHO) erleiden 15 Millionen Menschen pro Jahr einen Schlaganfall (Mackay et al., 2004). Damit gilt das Krankheitsbild nicht nur als eine der häufigsten Todesursachen weltweit, sondern auch als die häufigste Ursache für erworbene Behinderung im Erwachsenenalter (Fluri et al., 2015).

Laut einer Studie der *Global Burden of disease 2015 Neurological Disorders Collaborator Group* (GBD, 2017) ist das Risiko für das Erleiden eines Schlaganfalls inzwischen auch vom soziodemographischen Index (SDI) des Landes abhängig. So ging die Schlaganfallinzidenz in den letzten Jahren in Ländern mit hohem SDI zurück und liegt inzwischen unter der Rate in Ländern mit geringem SDI. Am größten ist die Inzidenz in Ländern mit mittlerem SDI. Diese Entwicklung wird von der WHO mit der verbesserten und früheren Therapie der arteriellen Hypertonie und einem leichten Rückgang der zigarettenrauchenden Bevölkerung begründet. Trotz dieser Entwicklung steigen die absoluten Zahlen des Schlaganfalls weiter an. Der Grund hierfür ist die alternde Gesellschaft. Da der Schlaganfall eine Erkrankung des höheren Alters ist, nimmt die Population mit dem höchsten Schlaganfallrisiko stetig zu (Mackay et al., 2004). Bei einer Prävalenz von geschätzt 33 Mio. Schlaganfallüberlebenden weltweit wird sogar von einer „Schlaganfallepidemie“ gesprochen (Hankey, 2017). Hierbei greift noch immer die klinische Faustregel, dass etwa 1/3 der Schlaganfallpatienten stirbt, ein Drittel ohne Behinderung überlebt und ein weiteres Drittel mit einem bleibenden Defizit zu rechnen hat. In Zahlen wird Letzteres in *Disability- adjusted life years* (DALY) ausgedrückt, die sich aus den verlorenen Lebensjahren durch verminderte Lebenserwartung und den verlorenen Lebensjahren durch Behinderung (gemessen an der Prävalenz und Krankheitsschwere) errechnen.

nen lassen (WHO metrics, 2018). Der Schlaganfall wird mit 102 Mio. DALYs als dritthäufigster Grund für erworbene Behinderung weltweit gehandelt (Hankey, 2017). Die „Epidemie“ bezieht sich also nicht nur auf die steigende Zahl an Akutpatienten, sondern auch auf die diejenigen, die das Akutereignis mit zum Teil schwerer Behinderung überleben. Der Schlaganfall stellt somit auch sozioökonomisch eine wachsende Belastung für die Gesundheitssysteme dar.

2.1.2 Therapie

Die Therapie des Schlaganfalls beschränkt sich auf Akutinterventionen, die nur innerhalb fest definierter Zeiträume stattfinden können. Noch immer fehlen Medikamente, die die Folgen eines ischämischen Insultes durch neuroprotektive Wirkung positiv beeinflussen. Noch immer ist die Wissenschaft mit großen Schwierigkeiten konfrontiert, die experimentellen Erkenntnisse in der Klinik umzusetzen (Hankey, 2017). Positiv ist zu berichten, dass sich in den letzten Jahren die Infrastruktur für die Prävention und Versorgung von Schlaganfallpatienten gebessert hat (Mackay et al., 2004), was jedoch die Zahl der Patienten mit Langzeitfolgen nach Schlaganfall nicht reduzieren konnte. Diese Entwicklung verdeutlicht einmal mehr die Notwendigkeit, potentiell beeinflussbare Moleküle zu identifizieren, deren Modifikation das funktionelle Ergebnis nachhaltig verbessern können. Um diese zu identifizieren bedarf es zunächst des Verständnisses der Pathophysiologie des Schlaganfalls.

2.1.3 Die Pathophysiologie des Schlaganfalls

Kein Organ des menschlichen Körpers ist einer akuten Hypoxie gegenüber so vulnerabel wie das Gehirn. Nicht nur verbraucht es in Ruhe gut 20 % der körpereigenen Energie (BNID 110878; Milo et al., 2010), es ist in der Energiebereitstellung auch fast vollständig auf die aerobe Glykolyse angewiesen (Ringleb et al., 2016). Des Weiteren sind Neuronen ausdifferenzierte Zellen, die sich im Falle eines Schadens oder einer Unterversorgung in nur geringem und funktionell unzureichendem Maße regenerieren, teilen oder erneuern können. Dementsprechend groß ist die Notwendigkeit, ein gutes Verständnis für die molekularen Mechanismen und intra- bzw. interzellulären Signalwege der betreffenden Zellen unter hypoxischem Stress zu erlangen. Ein gängiges Modell zur Beschreibung der Pathomechanismen ist die „neurovaskuläre Einheit“ (Dirnagl et al., 1999), zu der u. a. Neuronen, Astrozyten, glatte Muskelzellen der Gefäßwand, Endothelzellen, Perizyten, Basalmembranen und extrazelluläre Matrix gehören und die im Falle der akuten Hypoxie über komplexe Mechanismen miteinan-

der interagiert. Kommt es also zur Verminderung des Blutflusses mit einhergehendem Mangel an Nähr- und Sauerstoff, so kann die Energiebereitstellung nicht mehr ausreichend gewährleistet werden. Das hat zur Folge, dass die Natrium (Na^+)-Kalium (K^+)-ATPase nicht mehr adäquat funktioniert und das Membranpotenzial nicht mehr weiter aufrechterhalten werden kann. Dieser Mechanismus wird Exzitotoxizität genannt, betrifft Neuronen und Microglia und setzt Signalkaskaden in Gang, die zur Zellnekrose führen (Dirnagl et al., 1999; Azad et al., 2016). Im Infarktkern, wo der Blutfluss auf rund 20 % des normalen Blutflusses gesunken ist (Dätwyler, 2012), ist die Exzitotoxizität am stärksten. Die Zellen verlieren ihr Membranpotenzial und entladen Neurotransmitter wie Glutamat in den synaptischen Spalt, was präsynaptisch über die Öffnung von Calcium (Ca^{2+})-Kanälen zum Na^+ und Chlorid (Cl^-) Influx zum ödematösen Anschwellen der Zellen führt und postsynaptisch exzitatorische Glutamatrezeptoren aktiviert, sodass die Zellen depolarisieren. Auf molekularer Ebene setzt dies Mechanismen in Gange, die zur Nekrose der Zelle führen. Im Infarktkern werden proteolytische Enzyme aktiv, die das Zytoskelett irreversibel degradieren (Dirnagl et al., 1999). In den Infarkttrandbereichen werden Enzyme aktiviert, die zur Fettoxygenierung beitragen, sodass reaktive Sauerstoffspezies (ROS) entstehen, die die Integrität von Membranen, DNA und Organellen entscheidend stören. Ob die Zelle überlebt, hängt vom Ausmaß der Schädigung ab. Ist es zu hoch, werden Apoptosekaskaden über Cytochrom C und Caspasen in Gang gesetzt (Dirnagl, 2012). Eine besondere Rolle spielen dabei die Mitochondrien, die nicht nur für den Energiehaushalt der Zelle entscheidend sind, sondern auch Speicherort vieler proapoptotischer Enzyme sind. Der massive Zellzerfall führt zu hohem oxidativem und nitrosativem Stress. Die Unterbrechung des neuronalen Netzwerks bringt zudem eine Übererregbarkeit mit sich, die das ganze Gehirn betrifft und auch über Tage noch messbar ist (Azad et al., 2016). Dies hat u. a. eine Aktivierung von Mikrogliazellen und die Einwanderung von Leukozyten zur Folge, die pro-inflammatorische Signalwege in Gang setzen. Dabei wurde festgestellt, dass die Inflammation auch in Gebieten eine Rolle spielt, die weit entfernt vom eigentlichen Kern und Randgebiet liegen. Der initiale Schritt ist die Ausschüttung von Chemoattraktoren, i. e. Molekülen, die in Leukozyten die Adhäsion am Endothel und Chemotaxis auslösen. So konnte eine panenzephal Hochregulation des Hypoxie-Induzierten-Faktors α ($\text{Hif1}\alpha$), Interleukin-1 (IL-1) und IL-6 nachgewiesen werden (Gertz et al., 2012). Dies bewirkt eine starke Zunahme der Leukozytenzahlen im Gehirn, die ihr Maximum etwa eine Woche nach Schlaganfall erreicht (Dirnagl et al., 1999). Die Ausschüttung dieser Mediatoren wiederum bewirkt eine Veränderung im Transkriptom der Zellen über Signalwege wie der Stat3 Phosphorylierung, was die Förderung von Angiogenese und Migration von En-

dothelzellen sowie die Aktivierung von Mikrogliazellen zur Folge hat (Gertz et al., 2012). Dabei wird die Rolle der Inflammation nach Schlaganfall kontrovers diskutiert. Während in manchen Arbeiten argumentiert wird, dass die Einwanderung von Leukozyten und die Ausschüttung pro-inflammatorischer Mediatoren schädlich auf das bereits lädierte Gehirngewebe wirkt (Dirnagl et al., 1999), so schreiben andere Studien der Inflammation ein effizientes „Aufräumen“ und im Tierversuch das Erhalten von Gehirngewebe mit kleineren Läsionsgrößen und besserem funktionellen Ergebnis im Langzeitverlauf zu (Gertz et al., 2012), sodass sogar von einem „Janus- Gesicht“ der Inflammation im Schlaganfall gesprochen wird. Das Verständnis dieser Mechanismen hat die Grundlagen geschaffen, um potentiell neuroprotektive Strategien und Zielproteine zu identifizieren.

2.1.4 Endogene Neuroprotektion

Die sog. endogene Neuroprotektion beinhaltet evolutionär konservierte körpereigene Mechanismen, die dazu beitragen Hypoxie besser, länger oder weniger folgenreich auszuhalten. Genau genommen bedeutet der in der Literatur feststehende Begriff tatsächlich viel mehr eine zell- und systemeigene Resilienzsteigerung als den wortwörtlichen Schutz (Datwyler et al., 2011; Harms, 2003; Dirnagl, 2012). Sie ist Gegenstand der aktuellen Forschung und umfasst verschiedenste Ansätze wie hypoxische Präkonditionierung (Dirnagl et al., 2009), antiinflammatorische Mediatoren, Statine (Endres 2005) oder die Eindämmung der Exzitotoxizität durch Magnesium (Neuhaus et al., 2017; Yoshimura et al., 2017). Ein prominentes Beispiel der endogenen Resilienzsteigerung kommt aus dem Tierreich: Ziesel (Erdhörnchen) reduzieren während des Winterschlafs den zerebralen Blutfluss dramatisch auf ein Niveau, das dem eines akuten ischämischen Insultes ähnlich ist. Trotzdem überleben die Tiere schadensfrei (Lee et al., 2009). Es konnte herausgefunden werden, dass kleine ubiquitin-ähnliche Proteine (engl. *Small Ubiquitin-like Modifier Proteins*; SUMO) durch Konjugation an ihre Zielproteine den Zellstoffwechsel effektiv und schnell reduzieren und die Zelle so hypoxieresistenter machen können. Eine SUMOylierung findet auch in neuronalen Zellen von Mäusen statt und wirkt auch hier neuroprotektiv (Datwyler et al., 2011). Trotz aller Bemühungen ist es bislang nicht gelungen, diese Erkenntnisse in die Klinik umzusetzen.

2.2 Zinkfingerproteine

Proteine, die sog. Zinkfingerdomänen enthalten, werden in der Nomenklatur mit Zfp (für Zinkfingerprotein) und einer Kennzahl kodiert. Diese „Finger“ bestehen aus Aminosäuren

und deren Disulfidbrücken, die ein Zinkion in ihrer Mitte binden (Krishna et al., 2003). Dass dieses Charakteristikum auf sehr viele Protein zutrifft, macht die Gruppe der Zfp so groß wie heterogen. Tatsächlich bilden sie den größten Anteil der Transkriptionsfaktoren im humanen Genom (Meng et al., 2014). Es ist bekannt, dass Zinkfingerproteine in nahezu allen intrazellulären Prozessen eine Rolle spielen, sei es in der Reparatur, Transkription und Translation von DNA, im Metabolismus, der Zellproliferation oder Apoptose (Krishna et al., 2003). Aufgrund der großen Varianz wurden Bemühungen angestrebt, die Proteine nach Strukturmerkmalen zu ordnen. Maßgeblich dafür sind die Hauptkettenformation, die Sekundärstruktur und die Art der Zinkbindungsstelle. Es entstanden acht Untergruppen. Die größte Gruppe, die „klassischen“ Zfp, sind die C₂H₂-Zfp (Brayer et al., 2008). Deren gemeinsames Merkmal ist die Bindung des Zinkions durch zwei Cysteine (C) und zwei Histidine (H). Auch Zfp580 ist ein C₂H₂-Protein, sodass im Folgenden nur auf diese Subgruppe näher eingegangen werden soll. C₂H₂-Zfp sind meistens Transkriptionsfaktoren. Erstmals im *Xenopus laevis* Transkriptionsfaktor IIIA gefunden, ist inzwischen bekannt, dass die Sequenz zu einer der typischsten Proteindomänen im eukaryotischen Proteom zählt und ca. 3 % der menschlichen Gene für C₂H₂-Zfp kodieren. Die Sequenz ist hochkonserviert und beinhaltet die wiederholte 28 – 30 AS lange Konsensussequenz (Phenylalanin/Tyrosin)-X-Cystein-X₂₋₅-Cystein-X₃-(Phenylalanin/Tyrosin)-X₅-W-X₂-Histidin-X₃₋₄-Histidin (W= AS mit hydrophobem Rest, X= beliebige AS) (Brayer et al., 2008). In der Sekundärstruktur beinhalten die Proteine eine β -Faltblattstruktur, an deren Ende zwei Liganden für das Zinkion lokalisiert sind. Die anderen beiden Bindungspartner für das Zinkion liegen am C-terminalen Ende einer α - Helix (Krishna et al., 2003). Als DNA- Bindungsstelle wurde die große Kerbe der α - Helix identifiziert. Die Spezifität der DNA Bindung wird durch die Interaktion der Basenabfolge und der Seitenketten des jeweiligen Zinkfingerproteins vermittelt. Andere sehr bekannte und gut untersuchte Kandidaten sind Zic1 und Gli1, die eine wichtige Rolle in der Entwicklung des Nervensystems spielen, im Nukleus lokalisiert sind und die Aktivität von Krebszellkulturen modifizieren können (Kobayashi et al., 2012). Zfp580 ist ein weitestgehend unbekannter Kandidat der Familie und ist in seiner Struktur dem weitaus bekannteren Sp1 ähnlich (Meng et al., 2014). Von diesem ist bekannt, dass es neben spezifischer DNA Bindung auch Bindung zu anderen Proteinen eingeht, was es zu einem wichtigen Signaltransduktor macht.

2.2.1 Zfp580

Zfp580 ist ein hochkonserviertes Protein aus der Familie der Zfp (Meng et al., 2014). Es ist auf Chromosom 19q13.42 lokalisiert (Sun et al., 2010). Die Proteinstruktur des murinen Proteins (Zfp580) stimmt mit der des menschlichen Proteins (Znf580) zu 97 % überein (Wei et al., 2015). Das 171 AS lange Protein besitzt drei Zinkfinger motive am C-Terminus (Meng et al., 2014), was eine gute Bindung der DNA ermöglicht. Da sehr viele Gene Bindungsstellen für C₂H₂-Zinkfinger besitzen, ist es in Studien zu Zfp580 zum jetzigen Zeitpunkt Konsens, dass es sich bei Zfp580 um einen Transkriptionsfaktor handelt (Hoffmann et al., 2011; Meng et al., 2014; Luo et al., 2014). Der prolinreiche N-Terminus gilt als geeignet für Protein-Protein Interaktionen (Hoffmann et al., 2011). Fusionsproteine aus EGFP und Zfp580 lassen sich im Zellkern von humanen Nierenzellen (HEK293TN) lokalisieren (Mao et al., 2017). Die bisherige Forschung an Zfp580 wurde vor allem in Endothelzellen (z. B. Wei et al., 2015; Hoffmann et al., 2011; Luo et al., 2014) und in Kardiomyozyten (Meng et al., 2014; Mao et al., 2017) durchgeführt. Bislang ist über den Transkriptionsfaktor bekannt, dass er sensitiv auf Veränderungen in der direkten Umgebung der Zelle reagiert: Durch Metaboliten des Fettstoffwechsels, der Inflammation oder der Hypoxie wird Zfp580 reguliert und nimmt seinerseits Einfluss auf darauffolgende Signalkaskaden. Zfp580 liegt bei hohen Raten von oxLDL/LDL vermehrt in Endothelzellen vor und beeinflusst dadurch die IL-8 Synthese (Hoffmann et al., 2011). Dementsprechend gilt Zfp580 als vasoprotektiv und überdies als wichtiger Signaltransduktor in der Artherosklerose. Inzwischen konnte auch der Einfluss von Zfp580 auf den smad2- Signalweg über TGF-β1 mit der Induktion von eNOS und der damit einhergehenden Vasodilatation und Endothelzellproliferation und -migration (Luo et al., 2014) und seine Rolle in Prozessen der Angiogenese (Sun et al., 2010) gezeigt werden. Eine große Relevanz für diese Arbeit hat die Rolle von Zfp580 im Kontext der akuten Hypoxie. Bislang konnte gezeigt werden, dass Zfp580 sowohl in der akuten kardialen Hypoxie reguliert wird und im Rahmen einer ischämischen Präkonditionierung vermehrt exprimiert wird. Eine exogene Überexpression des Transkriptionsfaktors konnte den Schaden einer akuten Hypoxie reduzieren (Meng et al., 2014). Ebenfalls charakterisiert wurde der anti-apoptische Charakter von Zfp580. Es wurde gezeigt, dass Zfp580 Teil des *extracellular signal-regulated Kinase 1 und 2* (ERK)- Signalweges ist. Der Signalweg ist mit der Stressantwort von Zellen auf hypoxieinduzierte Reperfusionsschäden mittels Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren assoziiert. Außerdem wird das Protein durch Wasserstoffperoxid-(H₂O₂)-Stimulation reguliert, was wiederum den NF-κB Signalweg induziert (DangLi et al.,

2012). Zusammenfassend ist Zfp580 also ein Mediator, der wichtige Signalkaskaden als Reaktion auf Hypoxie, Reperfusionsschäden, oxidativen Stress und Inflammation in Gang setzt und auf diesem Wege im Gefäßsystem anti-apoptotisch, anti-inflammatorisch und angiogenesefördernd wirkt. Da all diese Mechanismen von größter Bedeutung in der Pathophysiologie der akuten zerebralen Ischämie sind, erscheint es sinnvoll, Zfp580 in Neuronen und im Schlaganfallkontext zu untersuchen.

2.3 Experimentelle Schlaganfallmodelle in der Maus

Zahlreiche Methoden haben sich etabliert, um den Schlaganfall *in vivo* und *in vivo* modellhaft darzustellen. Dabei unterscheidet man zwischen globalen und fokalen sowie permanenten und transienten Modellen. Im Folgenden soll nur auf die beiden für diese Arbeit verwendeten Modelle eingegangen werden.

2.3.1 Verschluss der mittleren Zerebralarterie (MCAo)

Die meisten Schlaganfälle ereignen sich durch einen akuten thrombotischen oder thromboembolischen Verschluss (engl. *occlusion*) der A. cerebri media (MCA) (Dätwyler, 2012). Da die MCAo diesen Pathomechanismus am besten imitiert, ist die Methode das am häufigsten angewandte Schlaganfallmodell und gilt als Goldstandard zur Untersuchung neuroprotektiver Mechanismen *in vivo* (Holloway & Gavins, 2016). Die Durchführung der MCAo erfolgte nach einem von der Arbeitsgruppe publizierten Protokoll (Engel et al., 2011). Durch Freilegung und Inzision der A. carotis communis (CCA) vor der Bifurkation in die Aa. Carotis interna und externa kann ein nylonbeschichtetes Filament bis in die MCA vorgeschoben und für einen definierten Zeitraum dort belassen werden. Die Vorteile des Modells bestehen darin, dass die Methode reversibel ist und das Zurückziehen des Fadens einem erneuten Einsetzen des Blutflusses sehr ähnlich ist. Im Vergleich zu den anderen gängigen Methoden ist die MCAo recht wenig invasiv, da Gehirnstrukturen kaum verletzt werden. Ein weiterer Vorteil ist, dass die MCAo sehr gut reproduzierbare kortikale und striatale Infarkte setzt, deren Größen recht gut steuerbar sind. So weiß man, dass eine MCAo unter 10 min keine ischämischen Läsionen verursacht, eine 15-minütige MCAo ein durchschnittliches Infarktvolumen von ca. 10 mm³ und eine 30-minütige Operation ein Volumen von ca. 18-20 mm³ produziert (Hoffmann et al., 2015). Nachteil dieses Modells ist die starke Abhängigkeit vom Operateur, die sowohl durch eine flache Lernkurve als auch durch starke interindividuelle Schwankungen gekennzeichnet ist. Auch das Risiko der Gefäßperforation mit der Folge der Hämorrhagie bleibt trotz Verwendung nylonbeschichteter Fäden bestehen. Auch der operative Eingriff am

Hals des Tieres inklusive Vollnarkose stellt einen Kritikpunkt der Methode dar. Diesen Nachteilen wurde in den hier durchgeführten Experimenten entgegengewirkt, indem die Operationen durch eine erfahrene Operateurin durchgeführt wurde und die Kontrolltiere einer *sham*-Operation (engl. *sham* - Schein) unterzogen wurden.

2.3.2 Sauerstoff- und Glukoseentzug (OGD)

Beim kombinierten Sauerstoff- und Glukoseentzug (engl. *oxygen glucose deprivation*; OGD) werden Zellkulturen in einer Hypoxiekammer mit 0,3 % Sauerstoff (O₂) und 5 % Kohlenstoffdioxid (CO₂) in einer nährstoffarmen Stickstoff-(N₂)/CO₂-equilibrierten und gepufferten Salzlösung inkubiert. Die Methode gilt als die Gängigste in der Nachahmung des Schlaganfalls *in vitro*, da die OGD die pathophysiologischen Prozesse des Gehirns, vom Anschwellen der Zellen zur Apoptose und Exzitotoxizität gut reproduziert (Holloway & Gavins, 2016). Limitierend ist zu erwähnen, dass das Modell trotz aller Bemühungen weit von den realen Verhältnissen entfernt ist. So repräsentieren die Kulturen kaum das komplexe Zusammenspiel der Zelltypen und die O₂-Schwankungen fallen extremer aus. (von 21 % Raumluft zu 0,3 % OGD Kammer). Auch die Glucosekonzentration des Nährmediums übersteigt die physiologischen Verhältnisse. Des Weiteren ist der extrazelluläre Raum in Form des Mediumüberstandes ein Vielfaches größer als im Gehirn, was die Konzentration von Botenstoffen oder anderen Molekülen um ein Vielfaches verdünnt. Trotzdem ist dieses Modell eine etablierte Methode, um einen Schlaganfall *in vitro* zu modellieren.

2.4 Modelle der exogenen Genreduktion

2.4.1 Micro RNA eingebettete spezifische *small hairpin* RNA (miR-shRNA)

MiRNA sind natürlich vorkommende Einzelstrang-RNA, die durch komplementäre Bindung an mRNA Genexpression vermindern (Davis et al., 2012). Zum ersten Mal wurden sie 1993 in *Caenorhabditis elegans* entdeckt (Lee et al., 1993). Seither wurden immer mehr endogene Sequenzen gefunden, die eine essentielle Rolle in der posttranslationalen Modifikation von Proteinen spielen. Heruntergebrochen besteht die Aufgabe einer miRNA darin, die spezifische mRNA in den zytoplasmatischen *RISC* (*RNA-induced-silencing-complex*) Proteinkomplex einzuführen. Genaue Untersuchungen des Mechanismus zeigen, dass endogene miRNA zunächst endonukleär aus einer viel längeren Sequenz, der primären miRNA (pri-miRNA) durch das Enzym DROSHA in Vorläufer-miRNA (pre-miRNA) umgewandelt werden, welche dann aus dem Zellkern in das Zytoplasma ausgeschleust werden. Diese wird auch als

small hairpin RNA (engl. *small hairpin* - kleine Haarnadel; shRNA) bezeichnet, weil ihr charakteristischer Aufbau aus zwei komplementären Sequenzen mit einer nicht bindenden Schlaufe in der Mitte besteht. Im Zytoplasma schneidet das Enzym DICER das ca. 22 Nukleotid lange Endprodukt, die miR-shRNA, aus, welche dann Teil des RISC Komplexes wird und ihre Funktion ausführen kann. Neben der Tatsache, dass immer mehr Krankheitsbilder und endogene Mechanismen identifiziert werden, in denen miRNA oder deren Dysregulation eine Rolle spielen (Davis et al., 2012; Bartel et al., 2004; Caggiu et al., 2018) konnte der Mechanismus auch weiterentwickelt werden, sodass es möglich ist exogene miR-shRNA herzustellen, die Geneexpression von Zielgenen spezifisch herunterregulieren. Die Methode wurde im Labor von David Turner entwickelt und patentiert (U.S. patent Publication Nummer 2004/0053876) (Thermo Fisher Scientific; 2010) Grundlage der Methode ist die endogen vorkommende miRNA-155, deren Kernsequenz entfernt und durch Sequenzen der Ziel-mRNA ersetzt wurde, die dann gebunden und dadurch entweder degradiert oder deren Translation blockiert werden können. Dieser Prozess wird RNA Interferenz (RNAi) genannt. Durch RNAi können heutzutage in virtuell jedem Gen einzigartig Zielsequenzen identifiziert und für die Konstruktion spezifischer miR-shRNA Vektoren genutzt werden (BLOCK-iT™ RNAi Designer, 2009).

2.4.2 tm1a knockout (KO)

Zur Erforschung von Krankheitsmodellen und molekularen Mechanismen *in vivo* hat sich in den letzten Dekaden die Herstellung genetisch veränderter Versuchstiere etabliert. Diese bildet die Grundlage für die Zuordnung von Genen zu Phänotypen. Das europäische Programm für konditionelle Mutagenese in der Maus (*European Conditional Mouse Mutagenesis Program*, EUCOMM) und sein US-amerikanisches Pendant, KOMP (engl. *Knockout Mouse Project*) stellt dabei den Großteil der genetisch veränderten Stammzellen bereit (Ayadi et al., 2012) und ist inzwischen Teil eines internationalen Konsortiums, welches sich zum Ziel gesetzt hat KO-Stammzellen aller Allele des Genoms der C57BL/6N Mauslinie zu generieren. Das Wissen und die Ressourcen der Stammzellen und Tiere wurden in öffentlich zugänglichen Datenbanken wie dem WTSI Mausportal gespeichert. Basis der Modifikation bildet das tm1a-KO-first Modell von EUCOMM, in welchem die Gensynthese konstitutiv und Zelltypenspezifisch inhibiert ist. Hierbei inserieren Vektoren, in die eine Insertionskassette eingesetzt wurde, mittels spezifischer homologer DNA-sequenzen vor oder zwischen den kodierenden Exons eines Gens. Die Insertionskassette enthält dabei einen Spliceakzeptor, ein Re-

portergen (LacZ) und am Ende eine Poly-Adenylierungssequenz, die zur Termination des Transkripts führt, so dass das Gen, welches ablatiert werden soll, nicht abgelesen wird. Die Methode bietet also die Möglichkeit, die Expression eines Gens komplett stillzulegen, obwohl das Gen noch in der DNA der Tiere vorhanden ist (Skarnes et al., 2011). Diese Methode erwies sich in den letzten Jahren als ein erfolgreiches und effizientes Werkzeug, bei dem in rund 80 % der Tiere ein Phänotyp sichtbar wird (Ayadi et al., 2012).

3 Hypothesen

In dieser Arbeit sollen folgende Hypothesen untersucht werden:

1. Zfp580 wird in Neuronen der Maus exprimiert
2. In Modellen des Schlaganfalls der Maus *in vivo* und *in vitro* wird Zfp580 reguliert.
3. Beeinflussung der Gendosis von Zfp580 verändert die Ischämietoleranz neuronaler Kulturen *in vitro* und das funktionelle Ergebnis von KO-Mäusen *in vivo*.

4 Methoden und Material

4.1 Zellkultur

4.1.1 Präparation der Primärkulturen

Alle Experimente wurden unter der Tötungsanzeigenummer T0046/07 angezeigt. Die primären kortikalen Neurone wurden aus Mausembryonen der Linie C57BL/6N (Taconic, Rensselaer/NY, USA) am Embryonaltag 15 (E15) entnommen. Die trächtigen Muttertiere wurden von der Forschungseinrichtung für experimentelle Medizin Berlin (FEM) bereitgestellt. Nach Einleitung einer tiefen Inhalationsnarkose mit Isofluran (Abbott, Wiesbaden, Deutschland) erfolgte die Tötung der Mäuse per Genickbruch und die Entnahme der Embryonen. Unter sterilen Bedingungen wurden die embryonalen Gehirne in Dulbeccos phosphatgepufferter Salzlösung (DPBS, Thermo Fisher Scientific, Waltham/MA, USA) ohne Zusatz von Calcium und Magnesium entnommen. Die Präparation der Hemisphären mit Entfernung der Meningen und Bulbi sowie Großteile des Mittel- und Zwischenhirns erfolgte in Neurobasalmedium (NBM) ohne L-Glutamin (Thermo Fisher Scientific, Waltham/MA, USA), das mit Penicillin/Streptomycin (P/S) (Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland) auf eine Endkonzentration von 1000 U/ml angereichert worden war. Um die Zellen aus dem Verband zu lösen erfolgte eine 15-minütige Inkubation bei 37 °C mit Trypsin und Ethylendiaminotetraacetat (EDTA) (Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland). Nach Waschschritten mit DPBS wurden die Gehirne in Neuronen-Medium, bestehend aus Modifiziertem Eagle Medium (MEM) ohne L-

Glutamin (Thermo Fisher Scientific, Waltham/MA, USA) angereichert mit 10 % fetalem Kälberserum (engl. *fetal calf serum*; FCS; Thermo Fisher Scientific, Waltham/MA, USA), 100 U/ml P/S, 20 µM L-Glutamin (Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland), 100 IE Insulin (Sanofi, Frankfurt, Deutschland), 10 mM N-2-hydroxyethylpiperazin-N2-Ethansulfonsäure (HEPES, Thermo Fisher Scientific, Waltham/MA, USA) und 44 mM D-Glucose (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) unter vorsichtigem Auf- und Abpipettieren vollständig resuspendiert. Nach milder Zentrifugation bei 220 G mit einer Rotixa 50 RS Zentrifuge (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland) über 2 min bei Raumtemperatur konnte das Zellpellet in Starter-Medium aus NBM mit beigesezten 100 U/ml B27-Vitaminzusatz (Thermo Fisher Scientific, Waltham/MA, USA), 100 U/ml P/S, 25 µM Glutamat (Sigma-Aldrich, St.Louis/MO, USA) und 4 µM L-Alanyl-L-Glutamin (GlutaMAX; Thermo Fisher Scientific, Waltham/MA, USA) resuspendiert werden. Durch Anfärben der Zellen mit 0,02 % Trypitanblau (life technologies, Eugene/OR, USA) konnte die Zellzahl/ml und der Anteil der toten Zellen in einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer ausgezählt werden. Hierfür wurde der Mittelwert (MW) der aus mindestens acht Großquadraten ermittelten Zellzahlen in die Formel ($MW * 4 * 16 * 10^{3,2}$) eingesetzt, um die Zellzahl/µl zu errechnen. Daraufhin wurde die Zellsuspension mit Startermedium auf eine Endkonzentration von 3,25 Mio. Zellen/ml eingestellt. Noch am gleichen Tag wurden die Zellen auf entsprechend vorbereiteten Gefäßen ausgesät.

4.1.2 Kulturbedingungen

Für die Zellkultur wurden unbeschichtete Zellkulturplatten mit 6 oder 24 Vertiefungen oder µ-Slide-8-well Platten verwendet (Tab. 1). Um ein gleichmäßiges Anhaften der Zellen zu gewährleisten wurden diese am Tag vor der Neuronenpräparation mit 5 % Poly-L-Lysin (PLL; Thermo Fisher Scientific, Waltham/MA, USA) in DPBS beschichtet. Die Zellen wurden in Inkubatoren bei 37 °C, 5 % CO₂ unter sterilen Bedingungen gelagert. Am dritten Tag in Kultur (DIV3) wurde das ursprüngliche Startermedium durch ein Nährmedium aus NBM mit 1000 U/ml P/S, 0,02 % B27 und 0,0025 % GlutaMAX in den in Tab. 1 angegebenen Mengen ergänzt.

Kulturplatte	Hersteller	Menge Zellen	Nährmedium
µ-Slide-8-well Platte	Ibidi, Martinsried, Deutschland	227500	400 µl
24-well Platte	Corning Life Sci., Amsterdam,	325000	650 µl

	Niederlande		
6-well Platte	Corning Life Sci., Amsterdam,	1,325 Mio.	2,6 ml
	Niederlande		

Table 1: Zellkultur. Übersicht über die Menge an ausgesäten Zellen und verwendetem Medium für die jeweiligen Kulturplatten.

4.1.3 Mikroskopie

Regelmäßige Kontrollen der Zellkultur unter dem Lichtmikroskop gewährleisteten eine adäquate Qualität der Neuronen. Hierbei wurde auf die Regelmäßigkeit des Zellrasens, die Anzahl der toten Zellen, die Ausbildung eines dendritisch-axonalen Netzwerkes und die Abwesenheit möglicher Kontaminationen geachtet.

4.2 Molekulare Analysen

4.2.1 Quantitative Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Um zu evaluieren, inwiefern zellulärer Stress in Form von Hypoxie eine schnelle Veränderung der Genexpression bewirkte, wurden mRNA Mengen von Zfp580 quantitativ analysiert.

4.2.1.1 Isolation der RNA

Primäre kortikale Neuronen wurden an DIV0 in Kultur genommen. An DIV9 wurden, nach vollständiger Entfernung des Kulturmediums und Spülung der Zellen mit DPBS, die Zellen mit 500 µl TRIzol Reagenz (Thermo Fisher Scientific, Waltham/MA, USA) pro Kondition lysiert. Die Ausfällung erfolgte mit 100 µl Chloroform (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) und Zentrifugation bei 14000 rpm für 15 min. Die Ausfällung der RNA erfolgte durch Isopropanol (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland), die Aufreinigung mit Ethanol (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland). Nach Verdunstung des Ethanols wurde die RNA zuletzt in RNase freiem Wasser resuspendiert, die RNA Konzentrationen wurden mittels Spektralphotometer (NanoDrop; Thermo Fisher Scientific, Waltham/MA, USA) bei einer Wellenlänge von 260nm bestimmt und die RNA Proben bei -80 °C gelagert. Für die *ex vivo* Experimente wurden die RNA aus Hirnscheiben von 30 µg aus Mausgehirnen, die einer MCAo unterzogen worden waren, nach dem gleichen Protokoll isoliert.

4.2.1.2 Reverse Transkriptase PCR (rtPCR)

Die rtPCR wandelt durch das Enzym Reverse Transkriptase RNA in cDNA um. Die Durchführung erfolgte gemäß der in der Arbeitsgruppe gängigen standardisierten Arbeitsanweisung (SOP). Zur Initiation des Umwandlungsprozesses wurden zu je 1 µg isolierter RNA 1,5 µl von 100nM-konzentriertem random Primer (Roche, Mannheim, Deutschland) und 1 µl aus 100 µM-konzentriertem oligo-dT Primer mit der Sequenz 5'-TTT TTT TTT TTT TTT TTT-3' (Eurofins Genomics, Ebersberg, Deutschland) hinzugefügt. Das Gemisch wurde in RNA-se-freiem Wasser (Thermo Fisher Scientific, Waltham/MA, USA) verdünnt und zunächst im *Mastercycler gradient* (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland) 5 min auf 65 °C erhitzt, um die Sekundärstrukturen der RNA aufzubrechen. Danach wurden die Proben sofort auf Eis gelagert, um eine Rückfaltung zu verhindern. Danach wurden jeder Probe 2,75 µl RNase freies Wasser, 5 µl RT-Puffer (Promega, Madison/WI, USA), 1 µl M-MLV (*Moloney Murine Leukemia Virus*) Reverse Transkriptase (Promega, Madison/WI, USA) und 1,25 µl 10 mM Desoxyribonucleosidtriphosphat- Mischung (dNTP, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) zugeführt. Für die Primerbindung wurde 10 min. auf 25 °C erhitzt. Danach erfolgte eine 60-minütige Erhitzung auf 37 °C, was die maximale Aktivität der RT begünstigt und das Ablesen der mRNA und Elongation der cDNA gewährleistet. Als Letztes wurden die Proben auf 70 °C erhitzt, was zur Inaktivierung der RT führte. Eine schematische Darstellung des Temperaturablaufs des rtPCR ist in Abb. zu sehen. Die cDNA Proben wurden bei -20 °C gelagert.

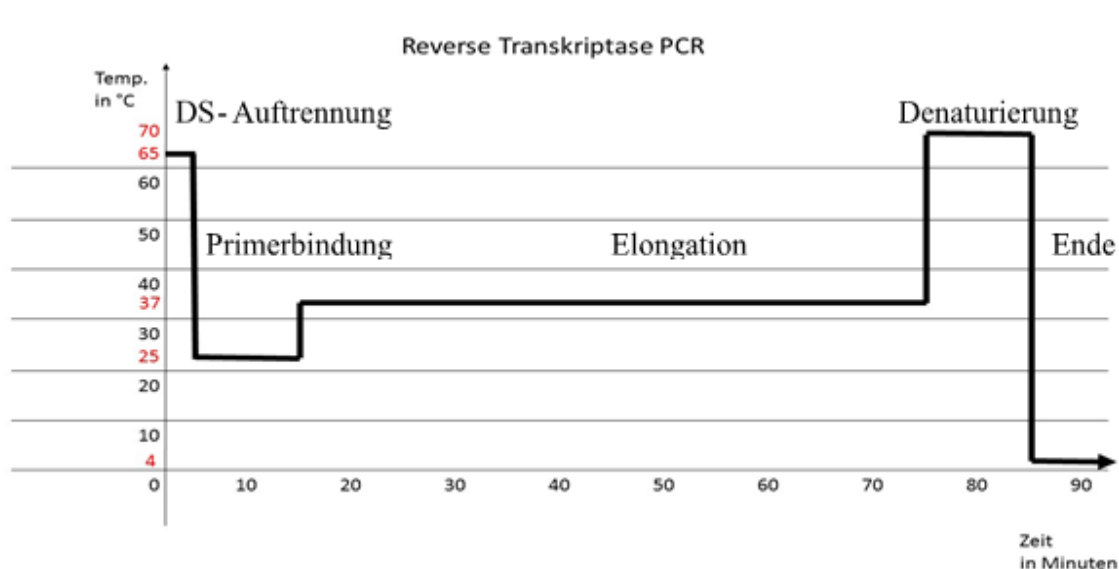


Abbildung 1: schematische Darstellung des Temperaturverlaufs der rtPCR.

Auftrennung der Doppelstränge bei 65 °C, Ansetzen der Primer bei 25 °C. Die M-MLV-RT hat ihr Aktivitätsmaximum bei 37 °C und sorgt für die Elongation der cDNA. Denaturie-

runge bei 70 °C. Ende des Durchlaufs bei 4 °C. DS= Doppelstrang.

4.2.1.3 Quantitative real-time PCR (rt-qPCR)

Die Regulation von Zfp580 wurde mittels rt-qPCR quantifiziert. Dabei wurde eine relative Quantifizierungsstrategie anhand nicht-regulierter, konstitutiv exprimierter Normierungsgene (engl. *housekeeping gene*) verfolgt. Diese dienen als interne Referenz, anhand derer die Mengenveränderung des Ziel-mRNA normiert wird. Die Normalisierung der Expressionsergebnisse gilt als reliable Methode, um mRNA zu quantifizieren (Pfaffl, 2004; Wiedemann et al., 2004). Folgende Normierungsgene kamen zum Einsatz:

Succinat-Dehydrogenasekomplex A (Sdha) (Ncbi gene¹, 2019): Das in der Maus auf Chromosom 13 lokalisierte Gen ist Teil der Succinat- Ubiquinon- Oxidoreduktase, ein Proteinkomplex, der als Teil der Atmungskette im Mitochondrium lokalisiert ist, ubiquitär exprimiert wird und eine wichtige Rolle im Energiehaushalt der Zelle spielt. In der Literatur gilt Sdha als verlässliches und standardmäßig angewandtes Normierungsgen (Kang et al., 2018).

Tyrosin-3-Monooxygenase/Tryptophan-5-Monooxygenase aktivierendes Protein (Ywhaz) (Ncbi gene², 2019): Hierbei handelt es sich um ein ubiquitär vorkommendes und hochkonserviertes Protein, dass Teil des mitochondrialen Importstimulationsfaktors ist und im ATP-abhängigen Transport von Proteinen in das Mitochondrium eine Rolle spielt. Studien konnten zeigen, dass die Expression vor allem in neuronalem Gewebe unter verschiedenen Bedingungen sehr konstant ist und es sich daher um ein geeignetes Normierungsgen handelt (Shaydurov, 2018).

Die Primer mit den folgenden Sequenzen wurden eingesetzt (alle Primer von Eurofins Genomics, Ebersberg, Deutschland):

mZfp580	vorwärts	5'- CCC CGG ACC CGA GAG GCT G -3'
	rückwärts	5'- GAG ACG AGG ACC GAG GGT GGG -3'
mSdha	vorwärts	5'- TTG CTA CTG GGG GCT ACG GGC -3'
	rückwärts	5'- TGA CCA TGG CTG TGC CGT CC -3'
mYwhaz	vorwärts	5'- CCT CGC GCT TTT CCC AGC CTT -3'
	rückwärts	5'- GCA CGA TGA CGT CAA ACG CTT CT -3'

4.2.1.3.1 Durchführung der rt-qPCR

Es wurde nach einem in der Arbeitsgruppe etablierten Protokoll unter Verwendung einer *hot-start* Polymerase gearbeitet. Diese liegt bei Raumtemperatur antikörpergebunden vor, was zusammen mit einem Stabilisator eine Aktivität bei niedrigeren Temperaturen verhindert. Durch initiales zweiminütiges Erhitzen der Proben auf 95 °C am Anfang des PCR- Durchlaufes denaturiert der Komplex und die hitzestabile Polymerase bleibt aktiviert zurück. Dieser Mechanismus verhindert eine vorzeitige Polymeraseaktivität in den Proben und führt zu einer höheren Spezifität der Messergebnisse. Die Versuche wurden in einem RealPlex² Mastercycler (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland) durchgeführt. Zu 2 µl cDNA wurde 10 µl QuantiTect SYBR Green Master Mix (Quiagen, Hilden, Deutschland), 0,06 µl Vorwärts- und Rückwärtsprimer im Verhältnis eins zu eins und 5 µl RNase- freies Wasser hinzugefügt. Als Negativkontrolle wurden jeweils 2 µl H₂O pro Primergemisch anstelle der cDNA verwendet. Es erfolgte eine *2-step* PCR (engl. *two step* – zwei Schritte). Nach initialer zweiminütiger Erhitzung der Proben auf 95 °C wechselten sich 15-sekündige Erhitzungsphasen zum Aufbrechen der Doppelstränge mit einminütigen Anlagerungs- und Elongationsphasen bei 60 °C 45-mal ab. Nach einem finalen Zyklus mit 15 Sek. bei 95 °C und 15 Sek. bei 60 °C wurde eine Schmelzkurvenanalyse zur Qualitätskontrolle durchgeführt (Abb. 2). Hierbei bewirkte der sukzessive Temperaturanstieg von 60 °C auf 95 °C ein Aufschmelzen der doppelsträngigen DNA abhängig von der Größe der Fragmente, was mit einem Verlust des Fluoreszenzsignals einherging. Der einzeitig starke Abfall des Fluoreszenzsignals diente als Qualitätskontrolle.

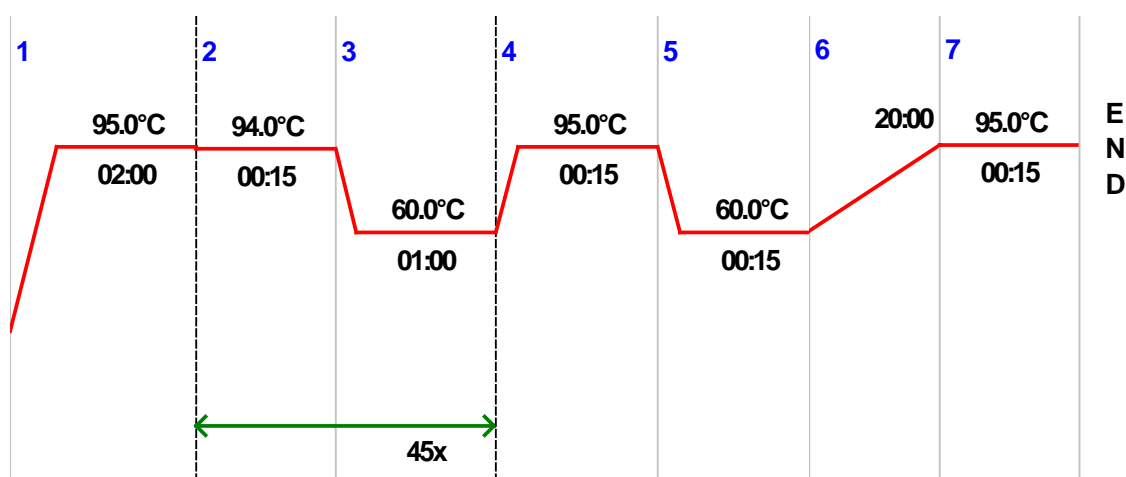


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Ablaufs der rt-qPCR.

Nach anfänglichem hot start (wörtl. heißer Start) mit Aktivierung der DNA-Polymerase folgen 45 Zyklen, in denen die Doppelstränge bei 94 °C aufgebrochen werden, die Primer bei

60 °C anlagern und die DNA Polymerase die entsprechenden Sequenzen amplifiziert. Am Ende jedes Zyklus wird das Fluoreszenzsignal gemessen. Nach Abschluss der Zyklen erfolgte eine Schmelzkurvenanalyse mit erneuter Fluoreszenzmessung. Rote Linie: Temperaturverlauf. Grüner Pfeil: Die Teilschritte 2 und 3 werden 45-mal wiederholt. Gelbe Blitze: Messung des Fluoreszenzsignals zur Detektion der Ct Werte. δ : Schmelzkurvenanalyse. Zur Darstellung kam die vom Hersteller des RealPlex² Mastercyclers (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland) angezeigte Graphik der durchgeführten rt-qPCRs.

4.2.1.3.2 $\Delta\Delta$ Ct-Methode

Die Maßeinheit einer rt-qPCR ist der Ct- Wert. Er ist definiert als die Anzahl von Zyklen, die durchlaufen werden müssen bis ein konstant definiertes Schwellen- Fluoreszenzniveau erreicht ist. Aus den Ct-Werten der housekeeping Gene wurde für die jeweilige Kondition der Mittelwert berechnet. Die Berechnung der auf die Referenzgene bezogene Expression wurde durch die $\Delta\Delta$ Ct-Methode ermittelt. Diese Methode gilt als Standard für die relative Quantifizierung von mRNA bei Verwendung von housekeeping Genen (Pfaffl, 2004). Im ersten Schritt werden hierbei die Ct Werte der Normierungsgene von denen des Zielgens abgezogen (Δ Ct) (Abb. 3A). Als nächstes wird der Unterschied dieser Werte zwischen der behandelten Gruppe und der Kontrollgruppe als Differenz berechnet (Abb. 3B). Den relativen Expressionsunterschied zwischen Behandlung und Kontrolle, bezogen auf die Normierungsgenen wird durch die arithmetische Formel $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ermittelt (Abb. 3C).

$$A \quad \Delta Ct = Ct(mZfp580) - Ct\left(\frac{mYwhaz+Sdha}{2}\right)$$

$$B \quad \Delta\Delta Ct = \Delta Ct(OGD) - \Delta Ct(Kontrolle)$$

$$C \quad \text{relativer Expressionsunterschied} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Abbildung 3: Schrittweise Berechnung des $\Delta\Delta$ Ct-Wertes.

Schrittweise Berechnung der Expressionsänderungen des Zielgens (mZfp580) im Verhältnis zu den nichtregulierten Normierungsgenen mYwhaz und mSdha durch die $\Delta\Delta$ Ct-Methode.

4.2.2 Western Blot Analyse

4.2.2.1 Zellextrakte für die Proteinanalyse mit immunoblots

DIV9 Neuronen wurden mit PBST und 1 % Nonidet-P40 (NP40) (Roche, Mannheim, Deutschland) zuzüglich einer Mischung aus Protease- und Phosphataseinhibitoren (Halt™ Protease/Phosphatase Inhibitor Cocktail 100x, Thermo Fisher Scientific, Waltham/MA, USA) geerntet. Die Zelllysate wurden durch Ultraschall aufgelöst und der Zelldebris durch Zentrifugation entfernt. Eine einheitliche Menge von je 30 µg Protein wurde spektralphotometrisch durch Anfärbung mit Protein Pierce Reagenz (Thermo Scientific, Waltham/MA, USA) ermittelt, die Aliquots in Laemmli-Puffer aus 25mM TRIS (Sigma-Aldrich, St. Louis/MO, USA), 192mM Glycin (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) und 0,1 % Natriumlaurylsulfat (SDS; Sigma-Aldrich, St.Louis/MO, USA) 5 min bei 95 °C erhitzt und bei -80 °C gelagert.

4.2.2.2 Western Blot

Das denaturierte Proteingemisch wurde mittels 10 %-SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese in dreifach gepufferter Kochsalzlösung (TBS) der Größe nach aufgetrennt und auf eine Polyvinylidenfluorid-(PVDF)-membran (Porengröße 0,45 µm, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) in TBS, 0,1 % SDS und 10 % Methanol (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) übertragen. Unspezifische Antikörperbindungsstellen wurden durch Inkubation der Membranen für mindestens 2 h mit 5 % Kuhmilch (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) in TBS-T (TBS versetzt mit dem Detergens Polyoxyethylen-20-Sorbitanmonolaurat (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)) bei Raumtemperatur geblockt und die Membranen schließlich mit dem Primärantikörper gegen die mittlere Region von Zfp580 aus dem Kaninchen (AVIVA Systems Biology, San Diego/CA, USA) in 5 % Milch in TBS-T im Verhältnis 1 : 250 über Nacht bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Membranen dreimal mit TBS-T gewaschen und die Membran mit dem Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten (engl. *horseradish peroxidase*; HRP) Sekundärantikörper gegen Kaninchen-Immunglobulin G (IgG) (Thermo Fisher Scientific, Waltham/MA, USA) im Verhältnis 1 : 1000 für weitere zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten erneute Waschschrte mit TBS-T, bevor die Membran mit Chemilumineszenz HRP Substrat (Thermo Fisher Scientific, Waltham/ MA, USA) eine Minute inkubiert wurde und die Banden anhand einer Chemilumineszenzkamera (Vilber Lourmat, Eberhardzell, Deutschland) detektiert wurden. Die Belichtungszeit für Zfp580 betrug 3 min. Der Marker wurde zur Kennzeichnung der Bandengrößen aufgenommen. Zur Detektion weiterer

Banden auf den Membranen wurde durch 15-minütige Inkubation in 30-prozentigem H₂O₂ (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) die Chemilumineszenzreaktion aufgehoben und die Membran erneut wie o.g. in 5 % Kuhmilch in TBS-T geblockt. Dem gleichen Protokoll folgend wurden folgende weitere Primärantikörper verwendet: Antikörper gegen GFP aus der Maus (1 : 500, Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland) zur Kontrolle einer gleichmäßigen Virusstranduktion, Antikörper gegen GAPDH aus der Maus (1 : 1000, Merck, Darmstadt, Deutschland) und Antikörper gegen β -Aktin aus der Ziege (1 : 1000, Santa Cruz, Heidelberg, Deutschland) als Ladekontrollen. Als Sekundärantikörper wurden jeweils HRP gekoppelte Antikörper im Verhältnis 1 : 1000 verwendet: HRP Antikörper gegen Maus-IgG aus der Ziege (Abcam, Berlin, Deutschland) und HRP Antikörper gegen Ziegen-IgG aus dem Esel (Abcam, Berlin, Deutschland).

4.2.2.3 Bildbearbeitung

Mittels Adobe Photoshop CS3 Extended Software (Knoll et al., 2007) wurden die Aufnahme des Markers und die Chemilumineszenzaufnahme der Banden in zwei Ebenen übereinandergelegt. Es erfolgte eine semiquantitative Beurteilung im Vergleich zum Referenzprotein zur Kontrolle gleicher Proteinmengen in der Ladung des Gels und eine qualitative Beurteilung des Laufverhaltens von Zfp580.

4.2.3 Immunzytochemie (ICC)

4.2.3.1 Fixierung und Färbung

DIV9 Neuronen wurden mit 30 % Paraformaldehyd (PFA, Sigma Life Science, Taufkirchen, Deutschland) fixiert. Durch Waschen mit DPBS wurden die fixierten Zellen von Medium und PFA befreit und mit 0,2 % NP40 permeabilisiert. Unspezifische Antikörperbindungen wurden mit einer Mischung aus 0,1 % NP40 und 5-prozentigem normalem Eselserum (engl. *normal donkey serum*; NDS; Sigma-Aldrich, St.Louis/MO, USA) blockiert. Nach der Blockierung wurden die Proben einem Primärantikörper gegen Zfp580 aus dem Kaninchen (AVIVA Systems Biology, San Diego/CA, USA) im Verhältnis 1 : 250 in PBS mit 0,1 % NP40 und 0,2 % NDS über Nacht bei 4 °C inkubiert. Nach weiteren Waschschritten wurden die Proben mit dem sekundären fluoreszenzmarkierten Antikörper AlexaFluor488 gegen Kaninchenimmunglobuline (IgG) (Thermo Fisher Scientific, Waltham/MA, USA) im Verhältnis 1 : 500 verwendet. Nach zweistündiger Inkubation und erneutem Waschen erfolgte eine dreiminütige Inkubation mit dem DNA-interkalierenden Farbstoff 4',6-Diamidin-2-

Phenylindol (DAPI) (1 : 10000, Honeywell Research Chemicals, Morris Plains/NJ, USA) Die Proben wurden nach weiteren Waschschritten in PBS bei 4 °C gelagert und mit dem Fluoreszenzmikroskop analysiert.

4.2.3.2 Fluoreszenzmikroskopie

Die Färbungen wurden mit einem invertierenden IX81 Mikroskop (Olympus, Hamburg, Deutschland) mit MT10 Belichtungssystem und CCD Kamera (Hamamatsu Photonics, Herrsching am Ammersee, Deutschland) untersucht. Es wurden sowohl Transmissions- als auch Fluoreszenzbilder mit einem 20x LCACHN NA 0.4 Objektiv (Olympus) und Xcellence Software (Olympus, 2012) aufgenommen. Fluoreszenzaufnahmen wurden mit den gefilterten Anregungswellenlängen mit einem Exzitationsmaximum bei 358nm und einem Emissionsmaximum bei 463nm zur Darstellung von DAPI, einem Exzitationsmaximum von 488nm und einem Emissionsmaximum von 517nm zur Darstellung von Zfp580 und EGFP akquiriert. Die Aufnahmen wurden mittels Fiji Software ohne Veränderung der Bildgebungsparameter (Schindelin et al., 2012) beurteilt.

4.2.3.3 Konfokale Mikroskopie

Die Aufnahmen der Zellen wurden in der zentralen Einrichtung für Bildgebende Mikroskopie mit freundlicher Unterstützung von Fr. Dr. Gisela Lättig-Tünnemann mit einem Leica TSP-SPE konfokalen Mikroskop (Leica, Wetzlar, Deutschland) bei 100-facher Vergrößerung mit dem Objektiv HC PL FLUOTAR (Leica, Wetzlar, Deutschland) 10x-0.30 und Beleuchtung durch die Quecksilberkurzbogenlampe EL6000 (Leica, Wetzlar, Deutschland) unter Verwendung der Filterkuben für DAPI, FITC für Zinkfinger 580 und "Far Red" für NeuN aufgenommen.

4.2.3.4 Bildbearbeitung

Für die Bildbearbeitungen wurde die Fiji Software (Schindelin et al., 2012) verwendet, in der die Bilder fusioniert wurden. Aus konfokalen Schnitten wurden Maximum-Intensitäts-Projektionen berechnet. Weiterhin wurden die Bilder vergleichbar kontrastadjustiert. Bildverändernde Transformationen wurden nicht durchgeführt. Für die Analyse der mittleren Intensität des Fluoreszenzsignals von Zfp580 wurden Grauwertmessungen in der Fiji software durchgeführt. Hierfür wurden die in DAPI dargestellten Zellkerne per Hand umrandet und dadurch *regions of interest* (ROI) definiert, deren mittlere Grauwerte im Zfp580 Kanal ge-

messen werden konnten. Die Messungen wurden für 6 ROIs durchgeführt und die Werte mittels ungepaarter zweifaktorieller Varianzanalyse (engl. *analysis of variance*; ANOVA) statistisch überprüft.

4.3 Neuroprotektionsanalyse

4.3.1 Klonierung der lentiviralen Transfervektoren

Die Arbeiten mit genetisch veränderten Organismen wurden in der S2- Anlage mit der Nummer 441/06 durchgeführt und aufgezeichnet (Projektleiter: Prof. Christoph Harms). Die Konstrukte zur gezielten RNA Interferenz (RNAi) wurden in das Plasmid pFSy(1.1)GW (Addgene, Watertown/MA, USA) dank freundlicher Überlassung von Pavel Osten (Dittgen et al., 2004) unter Verwendung unidirektionaler Enzymschnittstellen ligiert und klonal im K12 E.coli Derivat StabI3 expandiert. Das Transferplasmid exprimierte exogene DNA Sequenzen unter Kontrolle des neuronenspezifischen Synapsinpromotors. Eine Expressionskontrolle wurde durch bizistronische Expression des verstärkten grün fluoreszierenden Proteins (engl. *enhanced green fluorescent protein*, EGFP) gewährleistet, welches in den Plasmidkonstrukten C-terminal des Zielgens lokalisiert war. Die Resistenz gegen Ampicillin durch die Vektoren wurde als Selektionsvorteil der Bakterienkulturen auf carbenicillinhaltigem Agar genutzt. Zur Verstärkung der Expression war die Sequenz eines posttranskriptionalen regulatorischen Elementes (WPRE) aus dem Hepatitis Virus Teil aller Plasmide.

4.3.1.1 Konstruktion der miR-shRNA-Vektoren

Die Reduktion der Zfp580 mRNA wurde mittels *BLOCK-iT Polymerase II* micro RNA RNA Interferenz Technologie (Thermo Fisher Scientific, 2010) erzielt. Diese beinhaltet ähnlich eines Baukastensystems das Design zielgerichteter shRNA die, eingebettet in flankierende Regionen der miRNA, die Degradierung virtuell jedes Zielgens ermöglicht. Grundlage bildeten die flankierenden Regionen der endogen vorkommenden miRNA-155 aus der Maus, in die die shRNA per Oligonukleotidanlagerung und Ligation hineinkloniert wurde und über lentiviralen Gentransferin die entsprechende Zielzelle eingeführt werden konnte. Eine detaillierte Beschreibung der Bestandteile der miR-shRNA sind den Abb. 4A und B zu entnehmen. Als Expressionsvektor diente das werkseitig bereitgestellte pcDNATM6.2-GW+EGFP Konstrukt, in welches die spezifischen Oligonukleotidsequenzen C-terminal des EGFP ligiert wurde. Dies erfolgte über 5'-Überhänge, welche im Vektor durch eine invertierte BbsI Schnittstelle und werkseitigem Restriktionsverdau erzielt wurden (Abb. 4B). Die passenden shRNA Se-

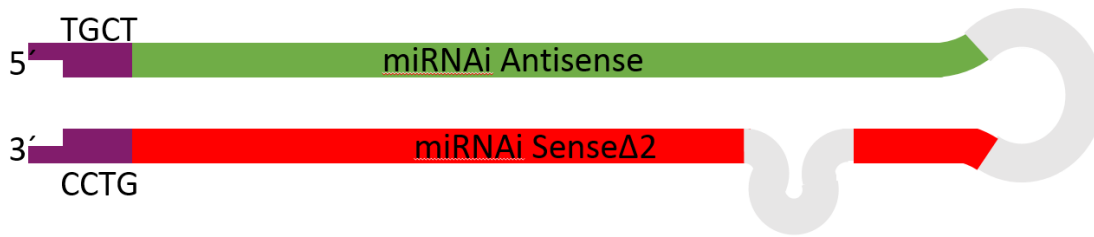
quenzen wurden online erstellt (BLOCK-iT™ RNAi Designer, 2009) (Abb. 4C). Hierfür wurde die mRNA Sequenz von Zfp580 online unter dem Suchbegriff „Zfp580 Mus Musculus“ mit der NM-Nummer 026900 ermittelt (Ncbi gene³, Stand 2019). 10 passende RNAi Zielsequenzen wurden gefunden. Davon wurden zwei Sequenzen an den Startpositionen 772 und 930 mit gleichwertiger RNAi Wahrscheinlichkeit und gleichem GC-Gehalt von 47,62 % ausgewählt, die beide in der 3'-untranslatierten Region (3'UTR) des Zfp580 Transkripts lokalisiert waren. Zur Verhinderung von anderweitigen Bindungsstellen erfolgte eine Homologiesuche im Transkriptom der Maus (*Mus musculus*), die in beiden Fällen eine Nebenwirkung im Sinner der unerwünschten Regulation anderer Gene (sog. *off-target* Effekt) unwahrscheinlich machte. Die ermittelten Sequenzen lauteten 5'-TGCTGTAAGGCAGTAACCTCAGGAGAGTTTTGGCCACTGACTGACTCTCCTGATTACTGCCTTA- 3' und 5'-TGCTGTGCAAAGGCTTACACAGCACAGTTTTGGCCACTGACTGACTGTGCTGTAAGCCTTTGCA- 3'.

Die Kontroll-shRNA mit der Sequenz 5'-TGCTGAAATCGCTGATTTGTGTAGTCGTTTTGGCCACTGACTGACGACTACACATCAGCGATTT-3' und 5'-CCTGAAATCGCTGATGTGTAGTCGTCAGTCA-GTGGCCAAAACGACTACACAAATCAGCGATTTTC-3'

gegen LacZ wurde werkseitig bereitgestellt.

Zur neuronenspezifischen Expression wurden die erworbenen Sequenzen in den Vektor pFSy(1.1)GW umklontiert. Eine schematische Darstellung der Vektoren ist Abb. 4D zu entnehmen.

A



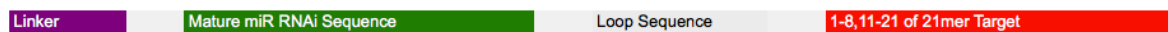
B



C

Designing miR RNAi

miR RNAi Features:



2 selected oligos

Select	No.	Start	Oligo Type	Oligo Sequence
<input checked="" type="checkbox"/>	1	772	Top Strand	5'- TGCTGTAAGGCAGTAACCTCAGGAGAGTTTGGCCACTGACTGACTCTCTCTGATTACTGCCTTA -3'
			Bottom Strand	5'- CCTGTAAGGCAGTAATCAGGAGACTCAGTCAGTGGCCAAAACCTCTCTGAGTTACTGCCTTAC -3'
			ds Oligo	5'- TGCTGTAAGGCAGTAACCTCAGGAGAGTTTGGCCACTGACTGACTCTCTCTGATTACTGCCTTA -3'
				3'- CATTCCGTTCATTGGAGTCCCTCTCAAAAACCGGTGACTGACTGAGAGGACTAATGACGGAATGTCC -5'
<input checked="" type="checkbox"/>	2	930	Top Strand	5'- TGCTGTGCAAAGGCTTACACAGCACAGTTTGGCCACTGACTGACTGTGCTGTAAGCCTTTGCA -3'
			Bottom Strand	5'- CCTGTGCAAAGGCTTACAGCACAGTCAGTCAGTGGCCAAAACCTGTGCTGTAAGCCTTTGCA -3'
			ds Oligo	5'- TGCTGTGCAAAGGCTTACACAGCACAGTTTGGCCACTGACTGACTGTGCTGTAAGCCTTTGCA -3'
				3'- CACGTTTCGAAATGTGTGTCGTCAAAACCGGTGACTGACTGACACGACATTTCGGAAACGTGTCC -5'

D

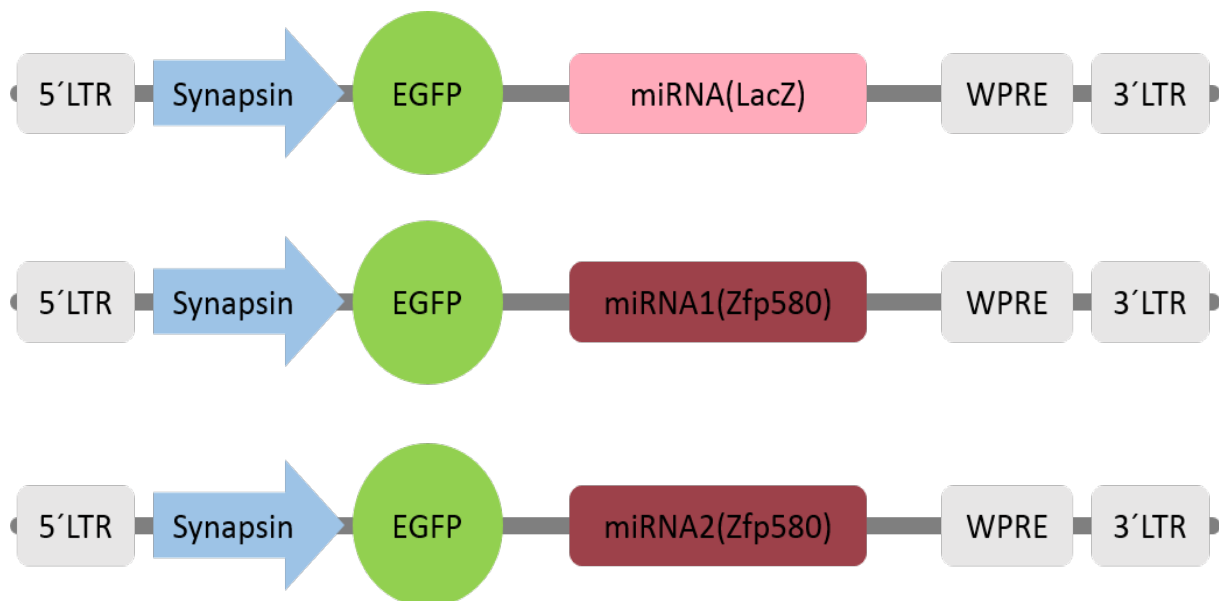


Abbildung 4: Vereinfachte Darstellung der miR-shRNA(Zfp580) Konstrukte.

A. Aufbau der miR-shRNA: vier Nukleotide (TGCT) bilden einen überhängenden Einzelstrang am 5' Ende, der komplementär zu einem werksseitig schon hergestellten Überhang (ACGA) im Expressionsvektor war und ein Anlagern der Sequenzen erleichterte. Dem folgend das Nukleotid G und eine 21 Nukleotid- lange Ziel- shRNA Sequenz, also die Sequenz, die im Verlauf an die mRNA bindet und die Erkennungssequenz für die Degradierung darstellt. Danach 19 Nukleotide ohne komplementäre Partner, sog. Platzhalter, um die terminale Schleife der Haarnadelstruktur zu bilden. Danach eine 21 Nukleotid lange Sequenz mit 2 deletierten Nukleotiden (Position 9 und 10), die wiederum das Gegenstück zu den ersten 21 Nukleotiden bilden. Die zwei deletierten Nukleotide führen zur Ausbildung einer inneren Schleife. Als letztes ein CAGG Überhang am 3' Ende, um wiederum komplementär zum Gegenstrang einen Überhang zu bilden und so die Insertion in den Expressionsvektor zu erleichtern. Violett: Einstrang- Überhänge zur Anlagerung in den pcDNATM6.2-GW+EGFP-Vektor. Grün: die codierende Sequenz für die Zfp580- spezifische miR-shRNA als Antisense-Strang. Grau: Sequenzen ohne komplementären Bindungspartner: Diese bilden in der Struktur die charakteristischen Schleifen. Rot: Zfp580-spezifische miR-shRNA im Sense Strang. 2 Basen an Position 9 und 10 wurden deletiert, sodass es zu einer internen Schleife kommt. **B. Aufbau der in das pcDNATM6.2-GW+EGFP- Plasmid eingebetteten Konstruktes.** Blau: Die aus der miRNA-155 entnommenen Sequenzen am 5'- und 3'- Ende erleichtern die Integration in den Plasmidvektor. EGFP: die bizistronische Expression der miR-shRNA und des fluoreszierenden Proteins ermöglicht die leichte Erfolgskontrolle der erfolgreichen Integration des Plasmids in die Zelle. **C. Darstellung der online ermittelten miR-shRNA (Zfp580) Oligonukleotidsequenzen der Positionen 772 und 930.** Die Farben entsprechen der o.g. Beschreibung. **D. Schematische Darstellung der miR-shRNA-Vektoren.** Grundlage bildete der Transfervektors pFSy(1.1)GW zur neuronenspezifischen Expression der miRNA eingebetteten shRNA. Als Kontrolle diente die gegen LacZ gerichtete miR-shRNA. Grau: long terminal repeat (LTR) als flankierende Regionen. WPRE Sequenz zur verbesserten Expression der Genkassette. Hellblau: Der Synapsin- Promotor machte die Expression der Vektoren neuronenspezifisch. Rot/rosa: die gegen Zfp580 respektive LacZ gerichtete shRNA entsprachen dem dem in A-C dargestellten Aufbau.

4.3.1.2 Produktion der Transfervektoren

Für die neuronenspezifische Expression der miR-shRNA1 und 2 gegen Zfp580 wurden sowohl die Expressionsvektoren pcDNATM6.2-GW+EGFP(Zfp5801/2), pcDNATM6.2-GW+EGFP(LacZ) sowie das pFSy(1.1)GW Plasmid durch die Restriktionsenzyme BpII und XhoI unter komplementär geschnitten. Die geschnittenen DNA Fragmente wurden mit *OrangeG* DNA-Färbemittel (Invitrogen, Carlsbad/CA, USA) auf ein einprozentiges Agarosegel (UltraPure Agarose, Thermo Fisher Scientific, Waltham/MA, USA) aufgetragen und die verschiedenen großen DNA-Fragmente bei 70 V für 45 min separiert. Die gewünschten Banden wurden aus dem Gel ausgeschnitten, mittels *NucleoSpin PCR-cleanup* (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) aufgereinigt und in 20 µl ddH₂O resuspendiert. Die Konzentration der DNA-Fragmente wurde spectrophotometrisch bestimmt und die Proben bei -20 °C gelagert. Für die Ligation der Fragmente wurde ein nach Basenlänge modifiziertes Plasmid-zu-Insert Verhältnis von 1 : 3 bei einer standardisierten Plasmidmenge von 100 ng gewählt und mit der folgenden Formel berechnet:

$$\text{Menge insert} = (\text{Basenpaare Insert/Basenpaare Plasmid}) * 3 * 100$$

Die Ligation erfolgte mittels *T4 Ligase* (Eurofins Genomics, Ebersberg, Deutschland) in je 2,5 µl *T4* Puffer (Eurofins Genomics, Ebersberg, Deutschland) bei 4 °C über Nacht.

4.3.1.3 Transformation

Die Produktion und Vermehrung der neuen Plasmide erfolgte in *E. coli*-Stämmen auf Carbenicillin-beimpften Agarplatten. Die Kulturen wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert und mehrere Kolonien am nächsten Tag geerntet, in einem hefehaltigen Nährmedium über Nacht vermehrt und die DNA mittels *NucleoBond Maxi Kit* (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) extrahiert und gereinigt. Die DNA wurde in 20 µl ddH₂O resuspendiert, die Konzentration spektralphotometrisch bei einer Wellenlänge von 260nm ermittelt und bei -20 °C gelagert. Alle Konstrukte wurden mittels PCR mit dem Primer 5'-CGAGAAGCGCGATCACATGG-3' (Eurofins Genomics, Ebersberg, Deutschland) sequenzverifiziert.

4.3.2 Produktion und Titration lentiviraler Vektoren

Zur Produktion lentiviraler Partikel der 3. Generation wurden alle sequenzverifizierten Plasmide zusammen mit den für die viralen Gene kodierenden Plasmiden pMD2.G und psPAX2

für Verpackung und Hülle der Viren (Addgene, Watertown/MA, USA), zusätzlich zur *XtremeGene HP DNA* Transduktionsreagenz (Roche, Mannheim, Deutschland) und OptiMEM Medium (Gibco, Paisley, UK) zur Ko-transduktion auf Kulturen von HEK293TN (BioCat, Heidelberg, Deutschland) gegeben. Zur Gewinnung des virushaltigen Überstandes wurde das Medium nach 48 und 72 h gesammelt, für 10 min bei 4 °C und 4000 rpm zentrifugiert und durch Filter der Porengröße 0,45 µm (Millipore, Darmstadt, Deutschland) gefiltert. Die Viruspartikel wurden bei 4 °C mit Polyethylenglykol 2000(PEG) (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) präzipitiert, durch 30-minütige Zentrifugation bei 4000rpm und 4 °C konzentriert, in DPBS resuspendiert und bei - 80 °C gelagert.

Die Titration der Transduktionseffizienz erfolgte durch Quantifikation der grün fluoreszierenden Zellen. Hierfür wurden neuronale Primärkulturen an DIV2 mit 2 µl, 0,2 µl, 0,002 µl respektive 0,0002 µl transduziert. An DIV7 wurden je 3 Transmissions- und Fluoreszenzbilder jeder Kulturvertiefung aufgenommen am Fluoreszenzmikroskop mit dem Filter *small Green* aufgenommen. In der Fiji Software wurde unter Zuhilfenahme des *Cell Counter* Plugins (Rueden et al., 2017) die Gesamtzellzahl und die Zahl der EGFP-positiven (EGFP+) Zellen ermittelt und ein Mittelwert aus den drei Werten pro Vertiefung errechnet. Die Virustiter in *Transducing Units* (TU/ml) wurden anhand der folgenden Formel berechnet, wobei TU=6 als adäquate Transduktion angestrebt wurde.

Titer

$$(TU/ml) = \frac{\left(MW \frac{(EGFP+Zellen)}{Gesamtzellzahl \text{ im Bild}} \times Gesamtzellzahl \text{ der Kulturvertiefung} \right)}{Volumen \text{ des Inokulums (ml)}} \times \text{Dilutionsfaktor}$$

Es wurde eine TU von 6TU/Zelle angestrebt.

4.3.2.1 Transduktion viraler Partikel

Alle Kulturen wurden mit den berechneten Mengen Virus an DIV0 durch transduziert. Hierfür wurde die Virussuspension tropfenweise in die Kulturmedien geträufelt.

4.3.3 OGD

4.3.3.1 Versuchsablauf des *in vitro* Hypoxiemodells

Es wurde nach einem in der Arbeitsgruppe etablierten und veröffentlichten Protokoll gearbeitet (Datwyler et al., 2011). Als Medium dienten balancierte Salzlösungen (BSS) aus 116 mM Natriumchlorid (NaCl, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland), 5,4 mM Kaliumchlorid (KCl, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland), 0,8 mM Magnesiumsulfat (MgSO₄, Merck,

Darmstadt, Deutschland) und 1 mM Natriumhydrogenphosphat (NaH_2PO_4 , Merck, Darmstadt, Deutschland), 0,02 M Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3 , Merck, Darmstadt, Deutschland), 0,01 M 4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazin-Ethansulfonsäure-(HEPES-)Puffer (Thermo Fisher Scientific, Waltham/MA, USA), 0,01 mM Glycin (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) und 0,2 mM Calciumchlorid (CaCl_2 , Merck, Darmstadt, Deutschland). Dem Kontrollmedium BSS_{5,5} wurden 5,5 mM D-Glucose (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) beigemischt. BSS₀ wurde über Nacht in der Hypoxiekammer *IN VIVO*₂ 300 (Ruskin, Pencoed, UK) equilibriert. Am Tag der OGD wurden die Zellen zweimal mit BSS₀ gewaschen. Danach wurden die OGD Platten in die Hypoxiekammer transferiert, ein weiteres Mal mit sauerstofffreiem BSS₀ gespült und danach einer 2,5-stündigen Hypoxie bei 0,03 % pO₂, 5 % pCO₂, 95 % N₂, Luftfeuchtigkeit > 90 %, Temperatur 37 °C unterzogen. Der pO₂ wurde mit einer kalibrierten polarographischen Elektrode gemessen. Die Kontrollkulturen wurden mit BSS_{5,5} gewaschen und für den gleichen Zeitraum bei 37 °C unter Normalbedingungen inkubiert.

4.3.3.2 Reoxygenierung

Nach der Hypoxie wurde den Kulturen das ursprüngliche Medium wieder zurückgegeben und die Zellen bei 37 °C über definierte Zeiträume inkubiert. Zur Testung des Zellüberlebens betrug dieser Zeitraum 24 Stunden. Für die Zeitserien wurden Reoxygenierungszeiten von 0h, 3h, 6h und 24h gewählt.

4.3.4 Messung der Laktatdehydrogenase-(LDH)-Aktivität

Die Messung der LDH Aktivität als Zelltodmarker erfolgte gemäß des von der Arbeitsgruppe veröffentlichten Protokolls (Freyer & Harms, 2017) Die LDH Aktivität wird hierbei indirekt spektralphotometrisch bestimmt. Sie beruht auf der reversiblen biochemischen Umwandlung von Pyruvat und dem Coenzym reduzierten Nicotinamidadeninucleotid (NADH) in Lactat und dessen oxidierte Form NAD⁺ durch das Enzym LDH. Da NADH Licht der Wellenlänge 340 nm absorbiert, wird die LDH-Aktivität anhand der Abnahme der optischen Dichte bei 340 nm durch die Abnahme von NADH bestimmt. Hierfür wurden Triplikate zu je 50 µl Zellüberstand pro Kondition vor dem Experiment und zum entsprechenden Zeitpunkt danach auf eine 96-well-Mikrotiterplatte übertragen (Abb. 5). Außerdem wurde durch eine Inkubation mit dem Detergens Triton-X100 Lösung (Merck, Darmstadt, Deutschland) bei einer Endkonzentration von 0,5 % über mindestens 20 min die maximale Disintegration der Zellmemb-

ranen herbeigeführt (engl. *full kill*). Aus diesem Zellüberstand wurden dreimal 25 µl auf die Mikrotiterplatte überführt. Als Standard wurden in je zwei Vertiefungen pro Platte 25 µl der Enzym-Standardlösung *TruCal U* (DiaDys Diagnostic Systems, Holzheim, Deutschland) mit einer bekannten LDH Aktivität von 500 U/ml gegeben. Zur Herstellung der NADH-Lösung wurden je 3 mg NADH in reduzierter Form (Merck, Darmstadt, Deutschland) in 20 ml LDH-Puffer (211,4 µM) aus 4,53 g Kaliumhydrogenphosphat (KH₂PO₄, Merck, Darmstadt, Deutschland) und 11,61 g Dikaliumhydrogenphosphat (K₂HPO₄, Merck, Darmstadt, Deutschland) pro Liter Wasser bei einem pH von 7,4 gelöst. Je 200 µl der NADH-Lösung wurden in die Vertiefungen gegeben. Um die Reaktion zu starten wurde den Vertiefungen 25 µl 22,7 mM Na-Pyruvat-Lösung aus LDH-Puffer und Na-Pyruvat (0,25 g/100 ml, Merck, Darmstadt, Deutschland) beigefügt und die Messung der Extinktion durch das Spektrophotometer *MRX Microplate Reader* (Dynex Technologies, Chantilly/VA, USA) gestartet. Die Wellenlänge betrug 340 nm, es wurden 10 Messungen alle 30 Sek. bei 37 °C durchgeführt, vor und zwischen den Messungen wurden die Platten für 5 Sek. geschüttelt. Zur Berechnung der LDH-Menge wurde aus den Einzelwerten je Kondition Mittelwerte erhoben und die Menge an LDH in U/ml durch Division durch die ermittelten Standardwerte und Multiplikation mit 500 errechnet. Diese Werte wurden im Verhältnis zum *full kill* der jeweiligen Kulturplatte angegeben. Das Zellüberleben wurde anhand der Differenz zwischen „nachher“ und „vorher“ Werten dargestellt. Die daraus berechnete Zunahme der LDH-Mengen in den verschiedenen Konditionen wurde statistisch mittels zweifaktorieller Varianzanalyse ausgewertet.

4.3.5 Zellzahl

Bei der Bestimmung der Zellzahl handelt es sich um ein in der Arbeitsgruppe etablierte und publizierte Analyse des Zellüberlebens nach OGD durch Zählung EGFP+ Zellen vor und nach Intervention (Datwyler et al., 2011). Hierfür wurden an DIV8 Fluoreszenzaufnahmen in 20-facher Vergrößerung (Olympus Mikroskop, Hamburg, Deutschland) durchgeführt und die Lokalisationen mittels Xcellence software (Olympus, Hamburg, Deutschland) gespeichert. Es wurden 3 Aufnahmen pro Kulturvertiefung mit dem Filter *small Green* in einem automatisierten Aufnahmemodus gemacht. 24h nach Intervention (DIV10) wurden die Aufnahmen an den gleichen Positionen wiederholt (Abb. 5).

DIV8 Aufnahmen wurden in der Fiji Software (Schindelin et al., 2012) in Grün, DIV10 Aufnahmen in Rot dargestellt und die EGFP+ Zellen mittels *CellCounter* Plugin gezählt, das

Verhältnis der Werte DIV8/DIV10 berechnet, die Mittelwerte aus den Triplikaten pro Vertiefung gebildet und diese Werte statistisch mittels *two-way* ANOVA ausgewertet.

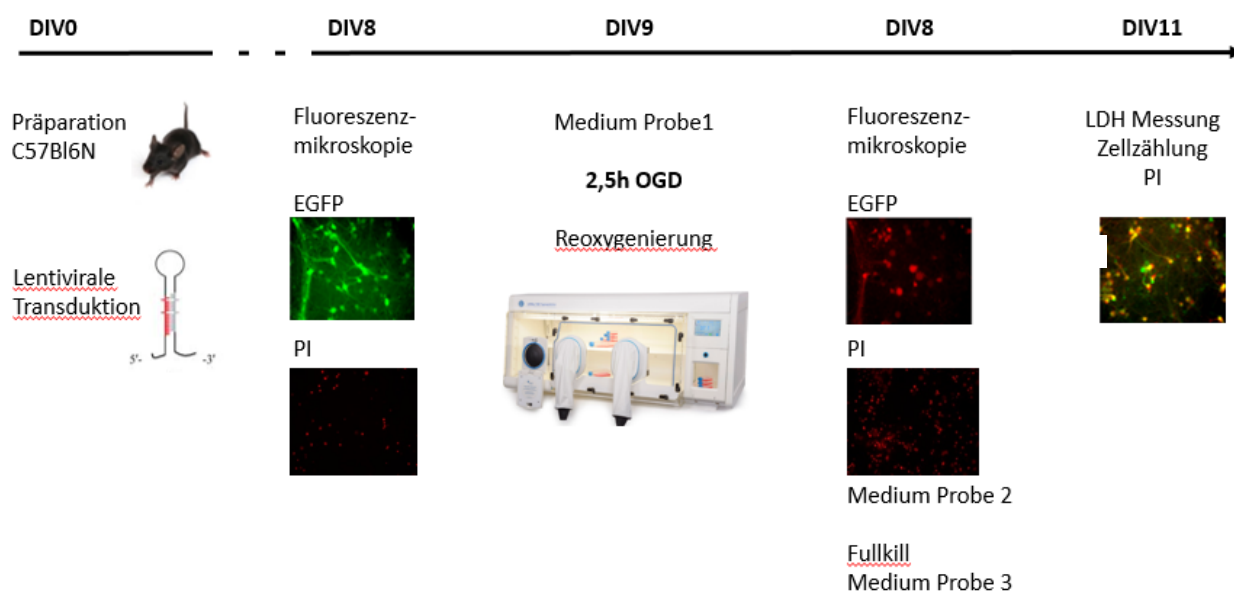


Abbildung 5: Zeitlicher Ablauf der Neuroprotektionsstudie.

Präparation und Transduktion von Viren mit zwei verschiedenen *miR-shRNA* Konstrukten gegen *Zfp580* (*miR-shRNA1/2* (*Zfp580*)) oder gegen *LacZ* (*miR-shRNA* (*LacZ*)) als Kontrollkultur an DIV0. Aufnahme der Fluoreszenzbilder bestimmter Positionen im an DIV8, $n=3$ pro Well. Mediumproben wurden in Triplikaten für die Bestimmung des LDHs an DIV9 abgenommen. Es folgte eine 2,5-stündige OGD, die Kontrollplatten wurden in gleicher Weise gewaschen und während der Zeit unter Normalbedingungen inkubiert. Nach 24-stündiger Reoxygenierung erfolgte eine erneute Abnahme der Mediumproben an DIV10 in Triplikaten, Aufnahmen der Fluoreszenzbilder an den festgesetzten Stellen in den Kulturvertiefungen und full kill der Zellkulturen mit 0,5 % TritonX-100. Erneute Abnahme von Mediumproben. An DIV11 erfolgte die Erhebung der LDH Werte durch eine Enzymaktivitätsanalyse sowie die Auszählung der EGFP+ Zellen vor und nach Behandlung.

4.4 In vivo Experimente

4.4.1 Tierhaltung

Die C57/BL6N Mäuse wurden unter der Tierschutzrichtlinie des Landesamtes für Gesundheit und Soziales (LaGeSo) gehalten. Die Tierversuche und Tiertötungen für Neuronenkulturen wurden vom LaGeSo genehmigt (Tierversuchsantrag G0188/11 und G254/16 sowie

T0046/07). Die Umgebungstemperatur der Ställe betrug 22 ± 2 °C, die Luftfeuchtigkeit von 55 ± 10 % wurde eingehalten. Temperatur und Gewicht wurde regelmäßig kontrolliert und dokumentiert. Zugang zu Futter und Wasser wurde *ad libitum* gewährt. Ein Zyklus von Licht und Dunkelheit zu je 12 h simulierte einen physiologischen Tag-Nacht-Rhythmus.

4.4.2 Tm1a knockout

4.4.2.1 Das Mausmodell

Um die Rolle des Zfp580 in Neuronen zu untersuchen wurde mit genetisch modifizierten KO-Mäusen nach dem EUCOMM Verfahren gearbeitet: Informationen über bereits vorhandene mutierte Stammzelllinien wurden über die *Mouse Genome Database (MGD)* (Smith et al., 2018) unter dem Suchbegriff Zfp580 (MGI-Nummer: 1916242) recherchiert. Es wurden 5 verschiedene genetisch modifizierte Linien gefunden. Über die internationale Mauslinien Datenbank IMSR (The Jackson Laboratory, 2011) konnte die Arten der Mutation ermittelt werden. Unter den Mutationen wurde Zfp580^{tm1a(EUCOMM)Wtsi} des Wellcome Trust Sanger Institutes ausgewählt, eine gezielte Mutation der Position 5052374 auf Chromosom 7 mit der MGI-Nummer 4433663. Die Insertion einer LacZ- Genkassette durch den Vektor L1L2_Bact_P erfolgte unmittelbar vor dem kodierenden Exon von Zfp580. Ein *En2* Spliceakzeptor in der inserierten Sequenz und einer SV40 Polyadenylierungssequenz führte zum alternativen Splicing und dem Ablesen eines Nullallels (Testa et al., 2004). Die neu entstandene Gensequenz ermöglichte nicht nur die leicht durchführbare Erfolgskontrolle durch LacZ, sondern auch die Modifizierung des Modells durch Kreuzung mit anderen genetisch modifizierten Mausstämmen. LacZ kodiert für die bakterielle β -Galaktosidase und kommt in eukaryotischen Zellen endogen nicht vor. Die in dem Modell für den konstitutiven KO des Proteins verwendete Nomenklatur „tm1a“ wird im Folgenden als Bezeichnung der genmodifizierten Tiere (tm1aZfp580) gelten. Die Bestandteile der inserierten Sequenz sind in Abb. 6. vereinfacht dargestellt und erklärt.



Abbildung 6: Schematische Darstellung der inserierten Deletionskassette durch den Vektor L1L2_Bact_P.

Die Genkassette inseriert in 5' Richtung zwischen dem endogenen Promotor (blauer Pfeil) und dem kodierenden Exon (blauer Kasten) von Zfp580. Teil der Kassette ist u.a. ein Spliceakzeptor (in hellgrün, SA), an dem Polymerasen ansetzen und die Kassette in 5'-3'-Richtung ablesen. Hierdurch wird das Reprotergen LacZ (dunkelgrün) abgelesen. Durch die Polyadenylierungssequenz (grau) kommt es zum Ablesestop, sodass die Sequenz von Zfp580 nicht abgelesen wird. Das LacZ Gen (in grün), kodierend für die bakterielle β -Galaktosidase, ermöglicht eine Detektion der erfolgreich genmodifizierten Zellen. So kommt es in diesem Modell zum konstitutiven KO in jeder Zelle der genmodifizierten Maus. Überdies wird das Exon von Zfp580 von loxP Bindungsstellen (rot) flankiert. Die Bindungsstellen der Cre-Rekombinase ermöglicht die Modifikation des Tiermodells durch Kreuzung hin zu konditionellen KO-Tieren. Die Graphik ist angelehnt an die schematische Darstellung der Phänotypen von EUCOMM (the EUCOMM program, 2019).

4.4.2.2 Genotypisierung

Zur Feststellung des Genotyps erfolgte eine Genotypisierung der Mäuse. Als Probematerial dienten Stanzen aus den Ohrmuscheln der Mäuse. Von diesem Material wurde die DNA mittels *Invisorb Spin Tissue Mini Kit* (Stratec molecular, Berlin, Deutschland) nach Protokoll des Herstellers aufgereinigt und die Konzentrationen spektralphotometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen (NanoDrop, Thermo Fisher Scientific, Waltham/MA, USA) gemessen. Je 20ng der extrahierten DNA mit je 1 μ g der Primer, 5 μ l doppelt-destilliertem (dd) Wasser (H₂O) und 10 μ l Mango MixTM (Bioline, Luckenwalde, Germany) bildeten die Versuchsansätze für eine Polymerase Kettenreaktion (engl. *Polymerase chain reaction*; PCR). Der Vorwärtsprimer Zfp580 5' mit der Sequenz GTATCTAGGGAGGAACTTGAGGC mit Bindungsstelle vor dem kodierenden Exon von Zfp580, der Rückwärtsprimer Zfp580 3' mit der Sequenz CCCTGCCAGACTGTGCTACTGACC, der komplementär zu einer Sequenz hinter dem Zfp580 kodierenden Exon war (Abb. 7A), und ein Primer (Lar3) mit der Sequenz

CAACGGGTTCTTCTGTTAGTCC (Abb. 7B), der eine Bindungsstelle im Splice-Akzeptor der inserierten LacZ-Kassette in 3' Richtung hatte, (alle Primer von Eurofins genomics, Ebersberg, Deutschland) fanden Verwendung. Die PCR wurde mit 3 min bei 95 °C gestartet, gefolgt von 35 Zyklen der Temperaturabfolge 95 °C - 62 °C - 72 °C zu je 30 Sek. und mit 3 min bei 72 °C und Abkühlung auf 4 °C beendet. Die PCR Produkte wurden mit OrangeG DNA Färbemittel (invitrogen, Carlsbad/CA, USA) auf ein 1,5-prozentiges Agarosegel (Ultra-Pure Agarose, Thermo Fisher Scientific, Waltham/MA, USA,) aufgetragen und die verschiedenen großen DNA-Fragmente bei 70 V für 45 min separiert. Die mit UV-Licht detektierten Banden waren 386 Basenpaare (bp) und 247 bp lang, wobei das größere Fragment die wt-Bande charakterisierte und das kürzere Fragment im Genom der tm1aZfp580 Tiere detektiert werden konnte. Heterozygote Geschwistertiere wurden durch eine Doppelbande identifiziert. Eine schematische Darstellung der Generationenabfolge ist in Abb. 7C gegeben.

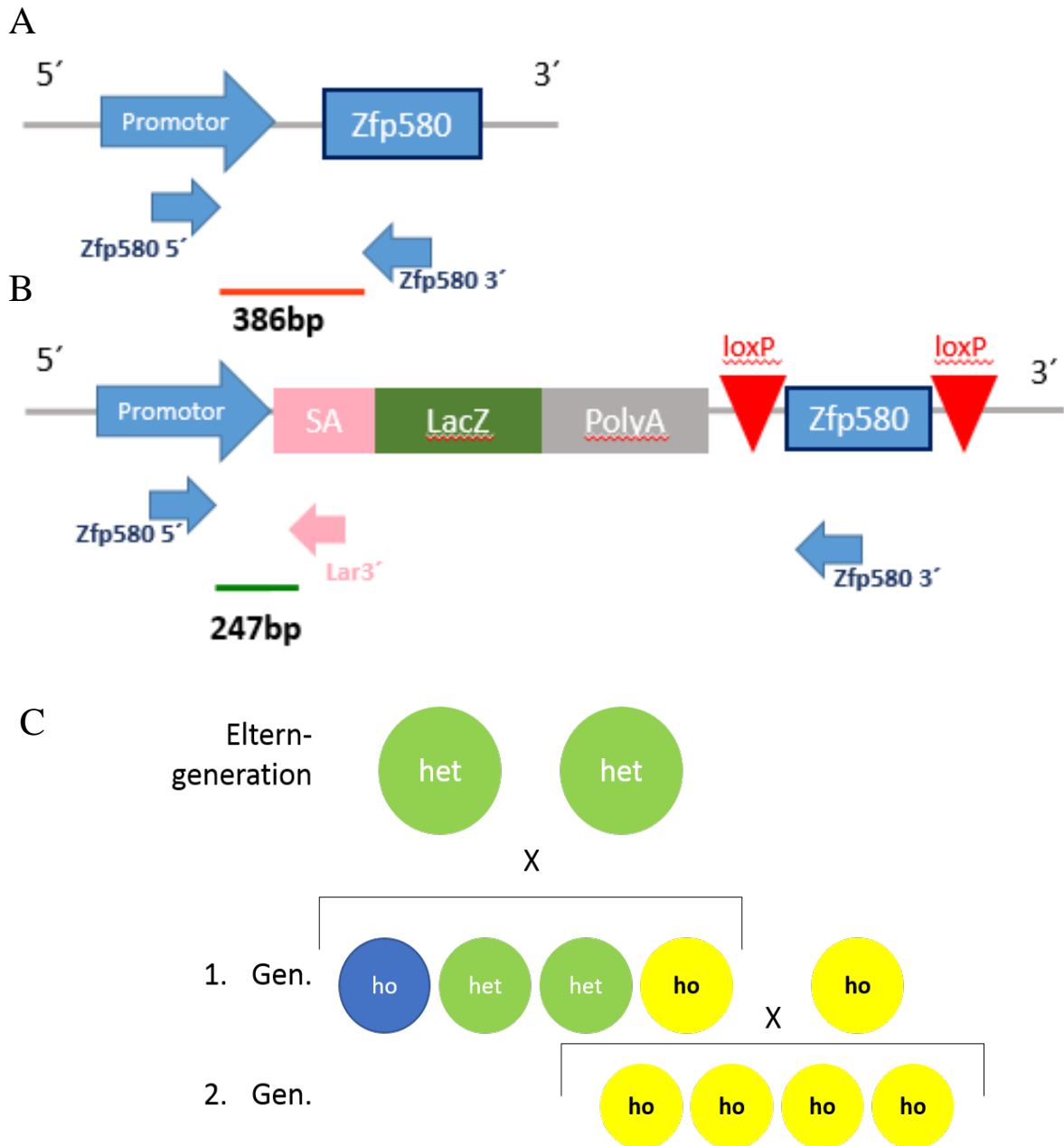


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Genotypisierung.

A. Schematische Darstellung der Gensequenz von wt Zfp580 inkl. Primerbindung. Die Primer Zfp580 5' und Zfp580 3' binden im endogenen Promotor von Zfp580, was zu einem PCR Produkt von 386 bp Länge führt (in orange). **B.** Gensequenz von tm1aZfp580. Durch Insertion der Deletionskassette wird unter anderem ein Spliceakzeptor (SA) inseriert, der die spezifische Bindungsstelle für den Primer Lar3' darstellt. Als PCR Produkt entsteht ein 247 bp langes Produkt (in grün). Die Banden sind charakteristisch für den jeweiligen Genotyp. Heterozygote Geschwister eines Wurfs konnten durch eine Doppelbande identifiziert

werden. *C. Heterozygote Elterntiere wurden verpaart und die homozygoten Tiere nach Genotypisierung als Versuchstiere verwendet. ho= homozygot, het= heterozygot, blau= wt, gelb= tm1aZfp580, grün= heterozygote Tiere.*

4.4.3 MCAo

4.4.3.1 Operation zur Auslösung eines ischämischen Schadens in der Maus

Die Durchführung der MCAo erfolgte nach einem von der Arbeitsgruppe etablierten und publizierten Protokoll (Engel et al., 2011). Alle Mäuse wurden im Alter von 10-12 Wochen mit 1,5 % Isofluran in einem Gasmisch von Lachgas (N₂O) und O₂ im Verhältnis 70:30 inhalativ tief narkotisiert, fixiert und in Rückenlage auf einer Heizplatte operiert, um eine Körpertemperatur bei 36,5 +/- 0,5 °C zu gewährleisten. Ein Zugang wurde sich über einen medialen Halsschnitt verschafft, wo nach Freipräparation der Gefäß- und Nervenverläufe die linke A. carotis communis (LCCA) (Abb. 8) aufgesucht und deren Aufzweigung in die Aa. carotis externa (LECA) und interna (LICA) identifiziert wurden. Der Blutfluss wurde während der Operationszeit durch Ligatur der LCCA proximal und der LECA distal der Bifurkation mit einem 6.0 Nylonfaden (Doccol, Sharon/MA, USA) unterbunden. Eine weitere Ligatur wurde um die LICA vorbereitet. Weiter distal wurde die LICA und die davon abzweigende linke A. pterygopalatinae mit mikrovaskulären Klammern verschlossen. Der Zugang zum Gefäßsystem erfolgte über eine Inzision in die LCCA kurz vor der Bifurkation, durch welche ein 8.0 nylonbeschichteter Bindfaden (Doccol, Sharon/MA, USA) in die LICA eingeführt wurde, der mit vorbereiteten Ligatur fixiert wurde. Nach Entfernung der Klammern und provisorischen Verschluss des Situs wurden die Mäuse in eine Wärmekammer transferiert, wo sie 30 min belassen wurden. Für Lokalanästhesie mit Lidocain und Flüssigkeitssubstitution mit physiologischer Kochsalzlösung wurde gesorgt. Zum Entfernen des Fadens wurden die Mäuse erneut anästhesiert und der Faden aus der Arterie entfernt. Die Operationen wurden von einer erfahrenen Operateurin durchgeführt.

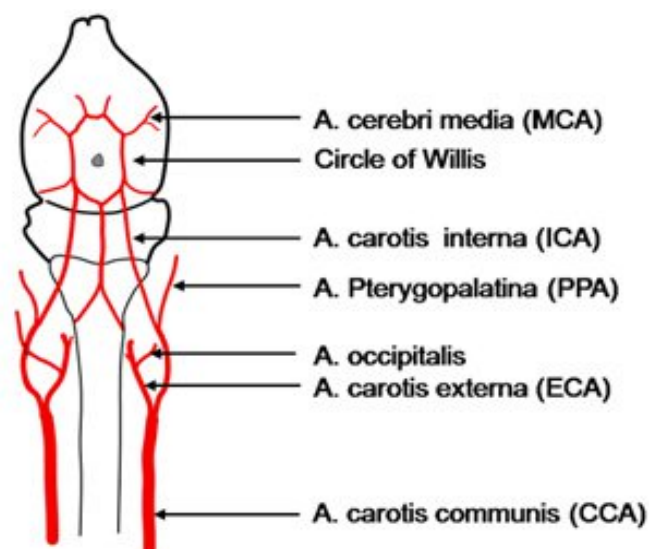


Abbildung 8: schematische Darstellung des Gefäßsystems der Maus.

Der Bindfaden wurde in die linke CCA eingeführt. Verwendung der Graphik mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. Ulrich Dirnagl (Engel et al., 2011).

4.4.3.2 Scheinoperation (*sham*)

Kontrolltiere wurden *sham*-Operation unterzogen. Diese unterscheidet sich im Ablauf lediglich darin, dass der nylonbeschichtete Bindfaden direkt nach Einführung in die LICA wieder herausgezogen wird und es somit nicht zur Behinderung des Blutflusses kommt.

4.4.4 Immunhistochemische Färbungen (IHC)

4.4.4.1 Präparation der Hirnschnitte

MCAo- und *sham*-operierte Tiere wurden tief narkotisiert, durch NaCl-Perfusion blutleer gemacht, per Genickbruch getötet, die Gehirne entnommen, bei $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$ in Methylbutan auf Trockeneis schnell eingefroren und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Von den gefrorenen Gehirnen wurden mit dem Kryostaten Leica CM1950 (Leica Biosystems, Wetzlar, Deutschland) $20\text{ }\mu\text{m}$ dicke Schnittpräparate angelegt, von denen je eines pro repräsentativer Gehirnebene auf einem gläsernen Objektträger (Thermo Fisher Scientific, Waltham/MA, USA) transferiert wurden. Die Objektträger wurden bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis zur Einfärbung gelagert.

4.4.4.2 Immunhistochemische Färbung

Die Objektträger wurden zunächst bei Raumtemperatur 30 min luftgetrocknet. Danach wurden die Schnitte in einem gekühlten Gemisch von Aceton und Methanol zu gleichen Teilen

bei -20°C inkubiert und danach dreimal 10 min mit PBS gewaschen. Danach wurden die Epitope in den Schnitten in 1 M Zitronensäuremonophosphat mit pH= 6 für 30 min bei 100 °C in einem Dampfgarer (Braun, Kronberg, Deutschland) demaskiert. Dieser Vorgang trägt dazu bei, die Immunreaktivität der Schnitte zu verbessern. Nach Abkühlen wurden die Schnitte erneut gewaschen und dann die Schnitte in einem Blockierungsmedium aus PBS mit 0,1 % TritonX-100, 1,5-prozentigem normalem Ziegen Serum (engl. *normal goat serum*; NGS; Gene- Tex, Irvine/Ca, USA) und 2 % BSA (Serva, Heidelberg, Deutschland) zwei Stunden geblockt. Danach wurden die Schnitte mit Primärantikörpern gegen Zfp580 aus dem Kaninchen (AVIVA Systems Biology, San Diego/CA, USA) und gegen NeuN (biotinyliert, Millipore, Burlington/MA, USA) im Verhältnis 1 : 100 im benetzt und über Nacht inkubiert. Zur Kontrolle der spezifischen Bindung des Sekundärantikörpers wurde ein Objektträger ohne Primärantikörper in Blockmedium inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Schnitte nach dreimaligem Waschen in PBS mit den fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern Alexa Fluor 488 aus der Ziege gegen Kaninchen-IgG (Invitrogen, Carlsbad/CA, USA) und Alexa Fluor 633 konjugiertes Streptavidin gegen Biotin (Invitrogen, Carlsbad/CA, USA) im Verhältnis 1 : 400 für zwei Stunden inkubiert. Nach dem Waschen wurden die Zellkerne mit DAPI im Verhältnis 1 : 10000 3 min angefärbt. Nach weiterem Waschen wurden die Schnitte mit Deckgläsern und dem Fixiermittel *ImmuMount* (Thermo Fisher Scientific, Waltham/MA, USA) bedeckt.

4.4.4.3 Konfokale Mikroskopie

Die Aufnahmen der Gehirnschnitte wurden in der zentralen Einrichtung für bildgebende Mikroskopie mit freundlicher Unterstützung von Fr. Dr. Gisela Lättig an einem konfokalen Mikroskop (Leica, Wetzlar, Deutschland) mit einem 10X APO Objektiv durchgeführt. Die Fluoreszenzaufnahmen erfolgten mit den Lasern mit einer Exzitation von 405 nm (> 15 mW) um DAPI zu detektieren, bei 488nm (>8mW) um Zfp580 zu detektieren und 647nm (>15mW) um NeuN aufzunehmen. Dabei wurden pro Gehirn Aufnahmen mit 10 % Überlappung in Rasterform aufgenommen und mittels Leica LASX software zu Übersichtsaufnahmen des gesamten Gehirnschnittes zusammengesetzt.

4.4.5 *In vivo* Verhaltensstudie

4.4.5.1 Versuchsablauf und Basiswerte

Zur Identifizierung, ob sich der konstitutive KO von Zfp580 in der Maus im Kontext der MCAo neuroprotektiv auf das funktionelle Erholen der Tiere auswirkt, wurde eine insgesamt 12-tägige Verhaltensstudie durchgeführt. Mit freundlicher Unterstützung von Fr. Janet Lips wurden wt- und tm1aZfp580-Mäuse in drei Gruppen als Geschwistertiere eines Wurfes unter Normalbedingungen und für Untersucher verblindet und randomisiert gehalten. Insgesamt 34 Tiere wurden untersucht. Zur Gewährleistung des Wohlbefindens wurden die Gewichtsverläufe über diesen Zeitraum täglich dokumentiert und als Mittelwerte mit 95 % KI graphisch dargestellt. Ein Ausschluss von Tieren erfolgte gemäß der vorher festgelegten Abbruchkriterien des bewilligten Tierversuchsantrags (u. a. > 20 % Gewichtsverlust und humane Endpunkte). Die Testungen für die Basiswerte erfolgte fünf Tage vor MCAo und beinhalteten die Erhebung des Neuroscores, Rotarods, Klebestreifen- und Eckenrotationstests. Am Versuchstag Null wurde eine 30-minütige MCAo verblindet und randomisiert gemäß dem veröffentlichten Protokoll durchgeführt. 24 h (Versuchstag 1) nach MCAo wurden MRTs zur Messung der ödemkorrigierten Läsionsgrößen durchgeführt. An den Versuchstagen zwei und fünf wurden erneute Werte für den Neuroscore und Rotarod-Test erhoben. Die letzten Testungen erfolgten am Versuchstag sieben, an dem Werte für den Neuroscore, Rotarod-, Klebestreifen- und Eckenrotationstest durchgeführt wurden (Abb. 9).

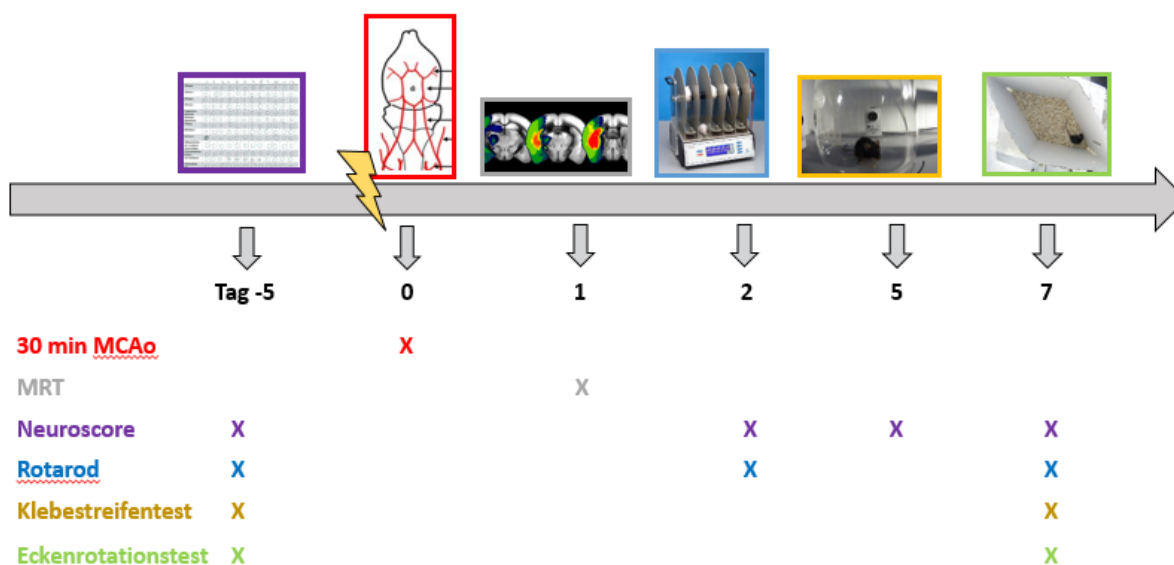


Abbildung 9: Versuchsablauf der Verhaltensstudie.

Die Verhaltensstudie umfasste insgesamt 12 Versuchstage. 34 Tiere wurden verblindet und randomisiert und verblindet in drei Gruppen eingeteilt und untersucht. Zur Gewährleistung des Wohlbefindens wurden die Gewichtsverläufe über diesen Zeitraum täglich doku-

mentiert. Die Testungen für die Basiswerte erfolgte fünf Tage vor MCAo und beinhalteten die Erhebung des Neuroscores, Rotarods, Klebestreifen- und Eckenrotationstests. Am Versuchstag Null wurde eine 30-minütige MCAo verblindet und randomisiert gemäß dem veröffentlichten Protokoll durchgeführt. 24 h (Versuchstag 1) nach MCAo wurden MRTs zur Messung der ödemkorrigierten Läsionsgrößen durchgeführt. An den Versuchstagen zwei und fünf wurden erneute Werte für den Neuroscore und Rotarod-Test erhoben. Die letzten Testungen erfolgten am Versuchstag sieben, an dem Werte für den Neuroscore, Rotarod-, Klebestreifen- und Eckenrotationstest durchgeführt wurden. (Bildquellen: mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. Ulrich Dirnagl (Engel et al., 2011), Beispielbild eines Herstellers aus dem Internet (Linton Instrumentation, 2011), sonstige Bilder aus eigenen Erhebungen.)

4.4.5.2 Ödemkorrigierte Läsionsvolumina und Ko-registrierung der Infarktlokalisation

Die MRT Untersuchung und Auswertung der Daten erfolgte durch die zentrale Einrichtung für MRT Bildgebung des Instituts unter Dr. Stefan Koch und Dr. Philipp Böhm- Sturm mit freundlicher Unterstützung von Fr. Dipl. Ing. Susanne Müller nach einer von der Arbeitsgruppe publizierten Methode (Koch et al., 2017). Um magnetresonanztomographische Aufnahmen zu machen wurden die Tiere 24h nach MCAo mit auf einer beheizten Wärmedecke gelagert, um eine Körpertemperatur von 37 °C zu gewährleisten. Die Tiere tief narkotisiert. Die MRT Aufnahmen wurden in einem 7 Tesla Kleintier Scanner Pharmascan 70/16 (Bruker BioSpin, Ettlingen, Deutschland) mit einem 16 cm Lochmagneten mit einer Resonanzfrequenz von 300 MHz und einer maximalen Gradientenstärke von 300 mT/min durchgeführt. Die Daten wurden mit der Paravision 5.1 software (Bruker, Ettlingen, Deutschland) akquiriert und weiterverarbeitet. Im T2 gewichteten Turbo Spin (T2w) Modus wurden Bilder des Gehirns mit einer Schichtdicke von 0,5 mm und einem Sichtfeld von 2,56 x 2,56 cm gemacht. Die Läsionsvolumina wurden mit der Analyze 10.0 software (AnalyseDirect, Overland Parks/KS, USA) durchgeführt. Dabei wurden die hyperintensiven Areale mit dem ROI-Werkzeug als ischämisch gekennzeichnet. Anhand der Grauwerte konnten die zutreffenden Pixel zusammengeführt und daraus ein 3D Bild der gesamten Infarktregion generiert werden und daraus das Läsionsvolumen errechnet werden. Anhand dieser Methode konnte zudem eine Ödemkorrektur der Läsion stattfinden. Diese berücksichtigt die Tatsache, dass 24-48h nach Schlaganfall durch Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke Flüssigkeit nicht nur in das

infarzierte Gewebe, sondern auch in die umliegenden Bereiche austritt und z. T. große raumfordernde Wirkung hat. Durch die Normierung der Gehirne auf den *Allen Mouse Brain Atlas* (Allen Mouse Brain Atlas, 2017) konnte das Läsionsvolumen also auf das Gewebe bezogen, nicht auf den Raum im Gehirn angegeben werden (Allen Brain Atlas, 2011. Abb. 11). Danach konnten die Gehirnareale, die durch die MCAo betroffen waren im *Allen Brain Atlas* identifiziert werden. Hierbei handelt es sich um eine Datenbank, in die tausende Mausgehirne histologisch aufgearbeitet und eingepflegt wurden, um die Lokalisation der verschiedenen Gehirnareale zu normieren. Der Atlas eignet sich daher als Referenz, um Läsionen in Einzelgehirnen dem anatomischen Gehirnareal zuordnen zu können. Die Zahlenwerte aller Läsionsvolumina pro Kondition wurden als *heat map* dargestellt und statistisch ausgewertet.

4.4.5.3 Neuroscore

Zur Analyse von objektivierbaren generellen sowie fokal neurologischen Defiziten wurde der modifizierte Neuroscore nach de Simoni wie publiziert durchgeführt (Donath et al., 2016). Jedes Tier wurde 5 Tage vor (Tag -5) und zwei bzw. sieben Tage nach MCAo untersucht. Der Test erlaubt, das Wohlbefinden des Tieres über einen Zeitverlauf objektiv als Punktwert auszudrücken. Hierbei wurden generelle Gesundheitsmerkmale wie die Fellstruktur genauso berücksichtigt wie spontan bzw. in Tests provozierte neurologische Defizite (z. B. Lateralisierung zu einer Körperseite). Die insgesamt 12 Testkriterien wurden beurteilt und mit Punkten von Null (kein Defizit) bis zu 4 (schweres Defizit) quantifiziert. Der Summationswert ergab im Minimum Null bis max. 43 Punkte. Je mehr Punkte das Tier zu einem Zeitpunkt erreichte, desto stärker ausgeprägt waren die Defizite. Die Punktwerte wurden als Mittelwerte pro Versuchsgruppe und Zeitpunkt mittels Varianzanalyse ausgewertet.

4.4.5.4 Rotarod

Durch den Rotarod Test werden motorischen Fähigkeiten der Mäuse an den Versuchstagen -5, 2,5 und 7 untersucht. Hierbei werden die Tiere auf eine sich bei einer festgelegten Geschwindigkeit drehende Stange gesetzt und müssen auf dieser schnell genug laufen, um nicht herunterzufallen (Abb. 10). Der Test gilt als robuste Messung neuromuskulärer und koordinativer Fähigkeiten und wurde, wie von der Arbeitsgruppe publiziert, durchgeführt (Donath et al., 2016). Die Maximalzeit wurde auf 5 min festgelegt, wobei die Umdrehungszahl innerhalb dieser Zeit von 4 auf 60rpm gesteigert wurde. Drei Durchgänge pro Versuchstag wurden mit

einem Abstand von 30 min gemessen. Die gemessenen Zeiten beim Herunterfallen der Maus wurden als Mittelwerte pro Zeitpunkt (in Sek.) statistisch mittels ANOVA ausgewertet.



Abbildung 10: Beispielhafte Darstellung der Rotarod-Apparatur.

Die Mäuse mussten sich für max. fünf Minuten auf einer sich drehenden und schneller werdenden Stange halten. Beispielbild eines Herstellers (Linton Instrumentation, 2011).

4.4.5.5 Klebestreifentest

Der Klebestreifentest ist ein gängiges Mittel um sensomotorische Defizite zu untersuchen und wurde an den Tagen -5 und 7 durchgeführt. Pro Tier und Zeitpunkt erfolgten jeweils drei Durchläufe. Hierbei wurden den Mäusen ein gelber Klebestreifen auf den Ballen der rechten Vorderpfote geklebt. Die Mäuse wurden in einen Glasbehälter gesetzt und für max. 120 Sek. aus vier Richtungen gefilmt (Abb. 11). Die Videoanalyse erfolgte verblindet. Hierbei wurde der Zeitpunkt (in Sek.) dokumentiert, an dem das Tier den Klebestreifen das erste Mal wahrnahm (Kontaktzeit) und der Zeitpunkt, an dem es diesen von der Pfote erfolgreich entfernte. Als entfernt wurde gewertet, sobald sich der Klebestreifen nicht mehr am Ballen befand. Schaffte ein Tier es während der 120 Sek. nicht, den Klebestreifen zu entfernen, wurde dieses als 121 Sek. dokumentiert. Die drei Einzelwerte pro Zeitpunkt wurden gemittelt und die Differenz zwischen Entfernungs- und Kontaktzeit errechnet. Die Werte vor bzw. nach MCAo wurden mittels gepaarter zweifaktorieller ANOVA mit wiederholten Messungen und Sidaks post hoc Analyse statistisch analysiert.

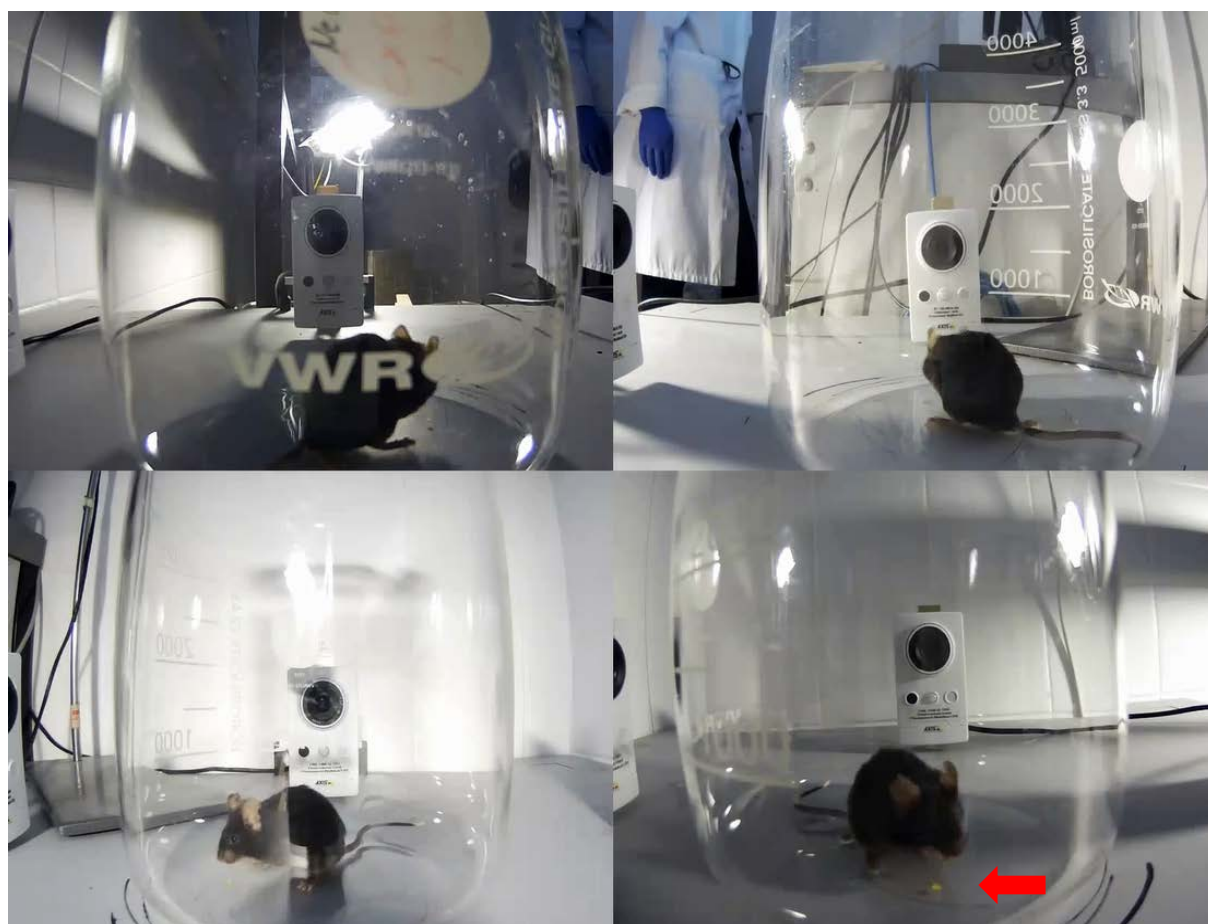


Abbildung 11: Videoansicht des Klebestreifentests.

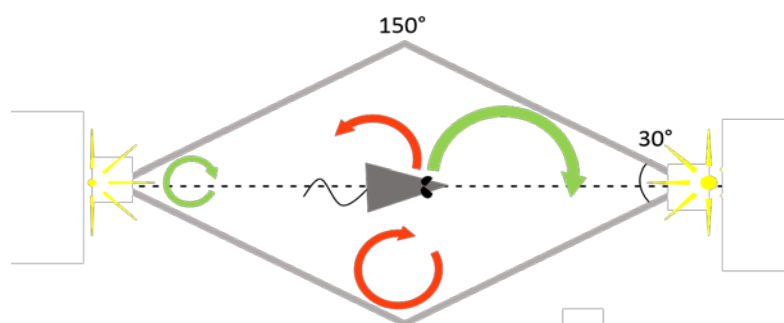
Die Tiere wurden aus vier Perspektiven gefilmt. In der verblindeten Analyse wurde die Kontaktzeit und die Zeit bis zum Entfernen des gelben Klebestreifens (siehe roter Pfeil) in Sek. Gemessen (Bildquelle: eigene Analysen)

4.4.5.6 Eckenrotationstest

Der Eckenrotationstest eignet sich, um ischämieinduzierte Lateralisation und Defizite in der motorischen Exekutivfunktion nach MCAo zu untersuchen. Der Test wurde nach publiziertem Protokoll der Arbeitsgruppe an den Tagen -5 und 7 durchgeführt (Balkaya, 2013). Die Tiere wurden in einer aus zwei Pappwänden zusammengestellten rautenförmigen Box (Abb. 12A und B) mit den Winkeln 30° und 150° untersucht. In den beiden spitzen Winkeln befand sich eine Lücke, durch die Licht in die Box schien. Die Mäuse wurden in die Box gesetzt und fünf Minuten gefilmt. Das natürliche Explorationsverhalten der Tiere führte zum vermehrten Annähern der spitzwinkligen Ecken, aus der sich die Maus nach erfolglosem Versuch, den Spalt zu passieren, in eine oder die andere Richtung drehte. Beim gesunden Tier ist die Richtungswahl annähernd normalverteilt, während ein Tier mit einem fokalen De-

fizit zur kranken Seite hin lateralisiert. Die Anzahl der Drehungen von $\geq 180^\circ$ über eine gedachte Mittellinie (Abb. 12A) zwischen den beiden spitzwinkligen Ecken wurde je Seite gezählt. Inkomplette Rotation oder Rotationen, die die Mittellinie nicht passierten, wurden ignoriert. Der Lateralisationsindex (LI) wurde wie in Abb. 12 C dargestellt berechnet. Die erhobenen Werte pro Versuchsgruppe wurden mittels gepaarter zweifaktoriellen ANOVA auf Varianz zwischen Genotypen und Zeitpunkten geprüft.

A



B



C

$$LI = \frac{[Rotation(links) - Rotation(rechts)]}{[Rotation(links) + Rotation(rechts)]}$$

Abbildung 12: Aufbau und Auswertung des Eckenrotationstests.

A. Als Rotation wurden alle Drehungen gewertet, die $\geq 180^\circ$ betragen und eine gedachte Mittellinie überschritten (grüne Pfeile) Inkomplette Drehungen wurden ignoriert (rote Pfeile). Darstellung angelehnt an Balkaya et al., 2013 **B.** beispielhafter Versuchsaufbau (Bildquelle: eigene Analysen) **C.** Formel zur Berechnung des Lateralisationsindex.

4.5 Statistische Analyse

Die *in vivo* Experimente wurden verblindet und randomisiert ohne Kenntnis der Gruppenzugehörigkeit durchgeführt. Wenn nicht anders angegeben, wurden biologische Replikate mit $n \geq 3$ in der *GraphPad Prism* software Version 6.0 für Windows (La Jolla/CA, USA; www.graphpad.com) mittels zweifaktorieller ANOVA analysiert und als $MW \pm 95\%$ Kon-

fidenzintervall (KI) angegeben. Die Signifikanzgrenze wurde auf $p \leq 0,05$ festgelegt. Wenn nicht anders beschrieben wurden die Angaben als Freiheit(F) (Freiheitsgrad (DFn), Nenner des Freiheitsgrades(DFd)) angegeben.

5 Ergebnisse

5.1 Expression von Zfp580 in Neuronen

5.1.1 Zfp580 wird in Neuronen exprimiert

Die immunhistochemische Analyse von Mikroskopiepräparaten von Mausgehirnen ergab, dass sich Zfp580+ Zellen in allen Schnitten und in allen Gehirnarealen detektieren ließen. In manchen Arealen wurde das Protein in höheren Intensitäten detektiert. Während die Zellen des kortikalen Bandes ein stärkeres Fluoreszenzsignal abgaben als diejenigen der subkortikalen Räume, wurde das stärkste Fluoreszenzsignal in hippocampalen Zellen gefunden (Abb. 13). Bei Untersuchung der intrazellulären Lokalisation von Zfp580 fiel eine Übereinstimmung des Signals mit dem von DAPI und NeuN auf, was darauf schließen ließ, dass Zfp580 im Nukleus vorlag. Dabei wurden Bilder kortikaler (a), subkortikaler (b) sowie hippocampaler (c) Bereiche aufgenommen. Zudem konnte anhand der Ko-färbung mit NeuN festgestellt werden, dass sowohl der überwiegende Teil der Neurone Zfp580+ waren als auch die Zahl der Zfp580+ Zellen gleichzeitig NeuN+ waren. Die Sekundärkontrolle zeigte kein Signal, sodass von einem spezifischen Fluoreszenzsignal ausgegangen werden konnte.

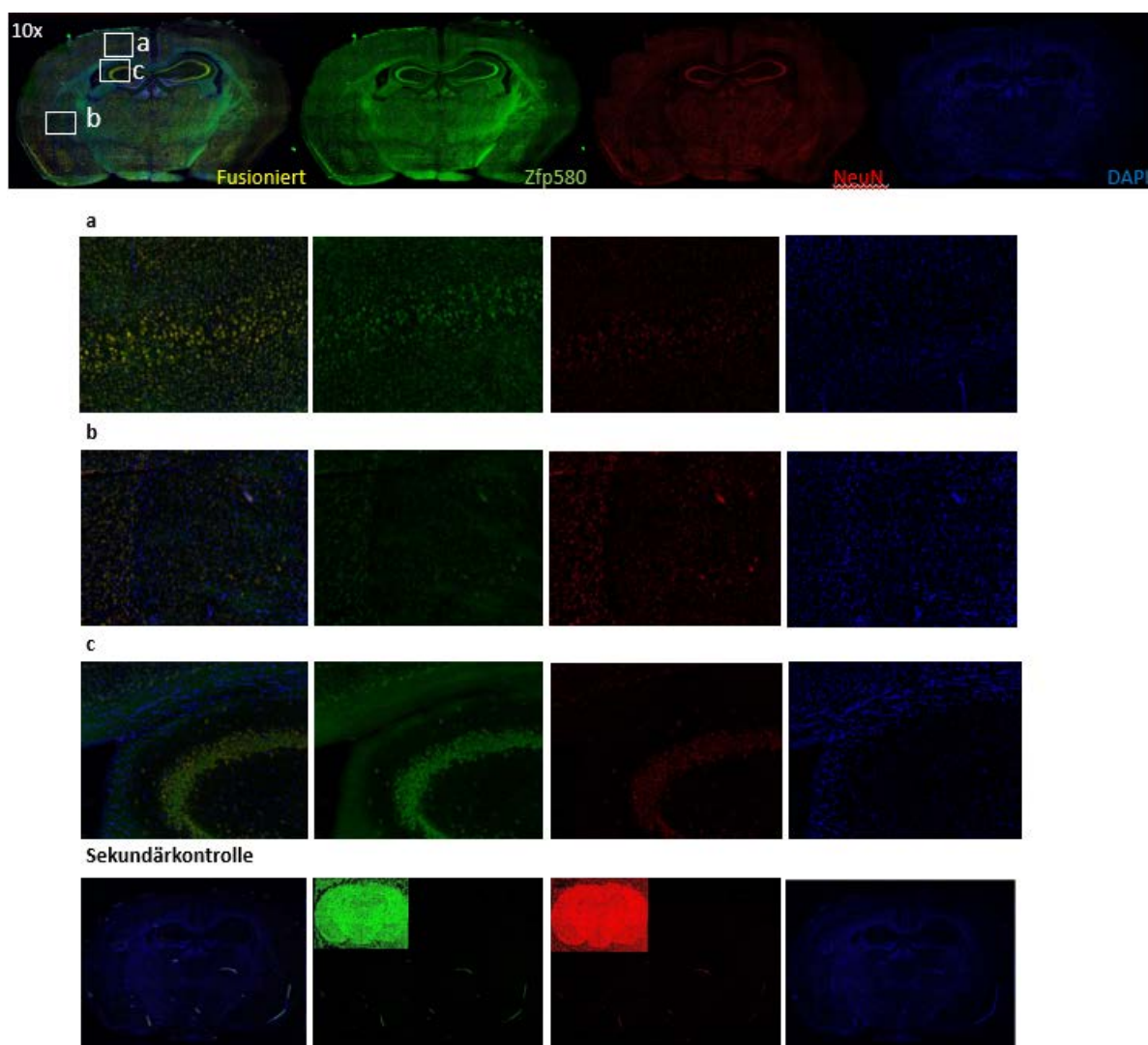


Abbildung 13: Zfp580 wird im Gehirn der Maus exprimiert.

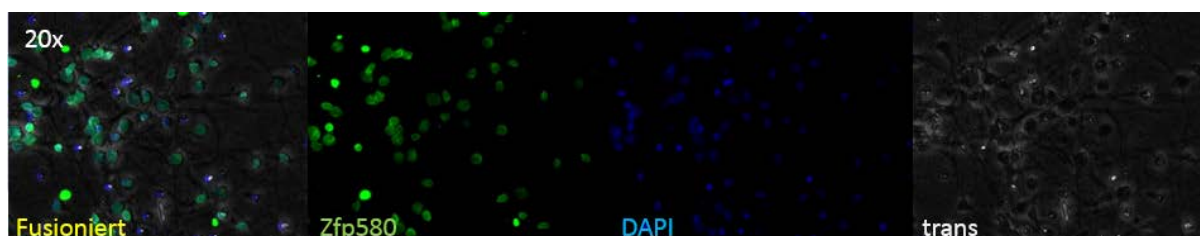
A. Übersichtsaufnahmen. Immunhistochemische Färbung von Gehirnschnitten aus C57Bl6N Mäusen in zehnfacher Vergrößerung. Ein Fluoreszenzsignal für Zfp580 (grün) konnte neben NeuN (rot) für neuronale Nuklei und DAPI (blau) als Marker von DNA in über die gesamten Gehirnschnitte detektiert werden **B.** Vergrößerte Detailaufnahmen. **a.** Zellen in kortikalen Bereichen zeigten ein Signalmuster, dass den Kernfärbungen DAPI und NeuN in der Lokalisation ähnlich war. **b.** Zellen in subkortikalen Arealen zeigten ein weniger starkes Fluoreszenzsignal für Zfp580. **c.** Zellen im Hippocampus zeigten das stärkste Fluoreszenzsignal für Zfp580.

5.1.2 Zfp580 ist in Neuronen im Nukleus lokalisiert

Neuronenkulturen aus C57Bl6/N Mäusen wurden an DIV9 immunhistochemisch gegen Zfp580 und DAPI gefärbt in 20- und 60-facher Vergrößerung analysiert (Abb. 14A und B).

Es fiel auf, dass die meisten DAPI+ Neuronen Zfp580 exprimierten und dass sich das Fluoreszenzsignal auf den Bereich des Zellkerns beschränkte. Daraus wurde geschlossen, dass Zfp580 in Neuronen im Zellkern lokalisiert ist. Diese Befunde stimmten mit den Befunden der gefärbten Hirnpräparate überein. Die Sekundärkontrolle (zweite Reihe) bestätigte die spezifische Bindung des Sekundärantikörpers.

A



B

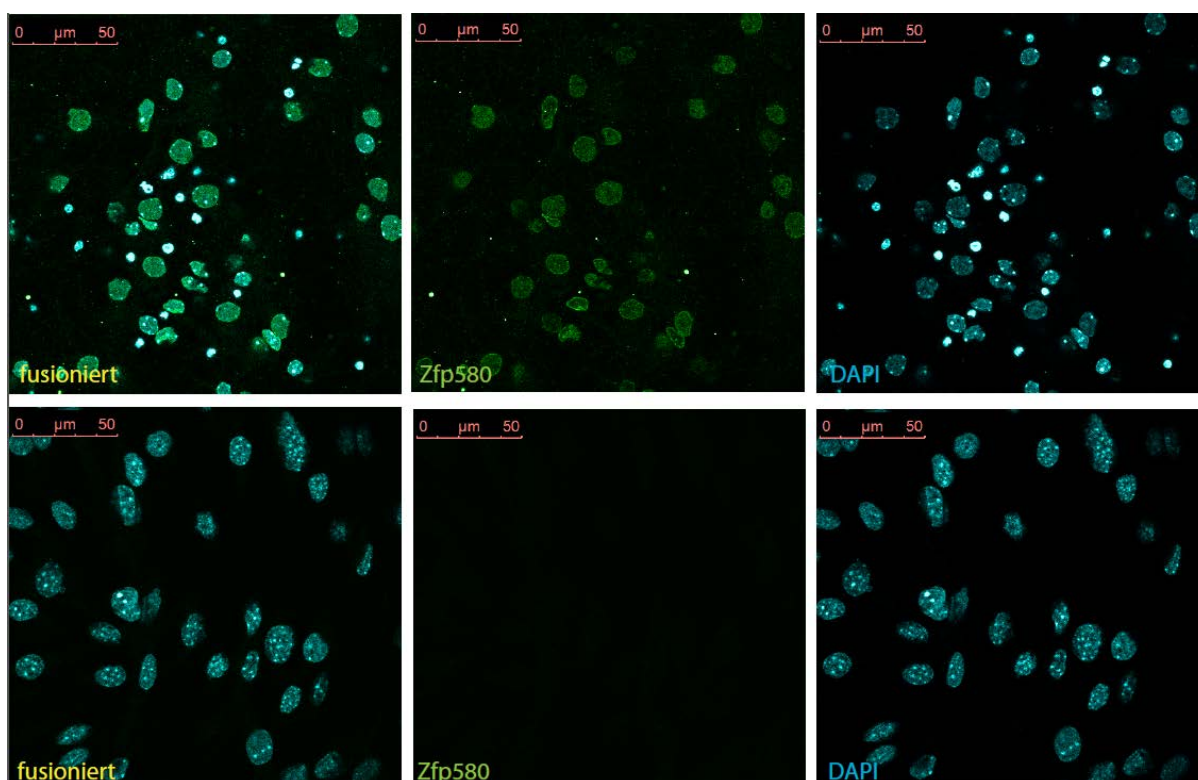


Abbildung 14: Zfp580 Protein ist im Nukleus lokalisiert.

A. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen in 20-facher Vergrößerung. Die Transmissionsaufnahme zeigt einen Bildausschnitt primärer kortikaler Neurone inklusive des Netzwerks. DAPI (blau) identifizierte die DNA der Nuklei. Es war zu beobachten, dass Zfp580 (grün) ein der DAPI-färbung ähnliches Expressionsmuster zeigte, was für eine nukleäre Lokalisation des Proteins sprach. Dies konnte im fusionierten Bild bestätigt werden. **B.** Konfokalmikroskopische Aufnahme von Zfp580 in Neuronen in 60-facher Vergrößerung. Auch hier

konnte die Lokalisation von Zfp580 im Zellkern bestätigt werden. Zweite Reihe: Die Negativkontrolle bestätigte die Spezifität des fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörpers.

5.1.3 Im Western Blot weist Zfp580 ein Molekulargewicht von 19 kDa auf

Das Molekulargewicht von Zfp580 wurde in der online verfügbaren Datenbank *UniProt* (Apweiler et al., 2017) unter dem Suchbegriff „Zfp580“ unter der Eintragsnummer Q9DB38 recherchiert und betrug 19kDa. Dieses Molekulargewicht stimmte mit den Ergebnissen der bislang veröffentlichten Studien überein (z. B. Hoffmann et al., 2011; Meng et al., 2014). In Western Blots aus DIV9 Neuronenkulturen aus drei biologischen Replikaten konnte dies bestätigt werden. Als Ladekontrolle diente β -Aktin (Abb. 15).

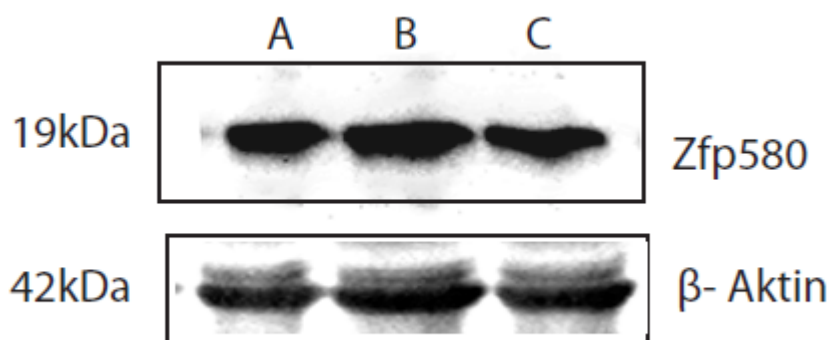


Abbildung 15: Darstellung der Zfp580 Bande bei 19 kDa im Western Blot.

Das Molekulargewicht von 19kDa konnte in Western Blot Analysen aus drei biologischen Replikaten (A, B, C) bestätigt werden. Als Ladekontrolle diente das Protein β -Actin.

5.2 Zfp580 wird in Neuronen durch Schlaganfallmodelle *in vitro* und *ex vivo* reguliert

5.2.1 *in vitro* wird Zfp580 nach OGD reduziert

5.2.1.1 Western Blot

Western Blot Analysen stellten die Proteinmenge von Zfp580 nach OGD zu unterschiedlichen Reoxygenierungszeiten im Vergleich zu Kontrollkulturen dar. Eine leichte Reduktion der 19kDa Bande im Vergleich zur Kontrollgruppe konnte direkt und drei Stunden nach OGD festgestellt werden. Eine deutlich verminderte Proteinbande war nach sechs und nach 24 Stunden Reoxygenierung im Vergleich zu den Kontrollkulturen zu sehen (Abb. 16).

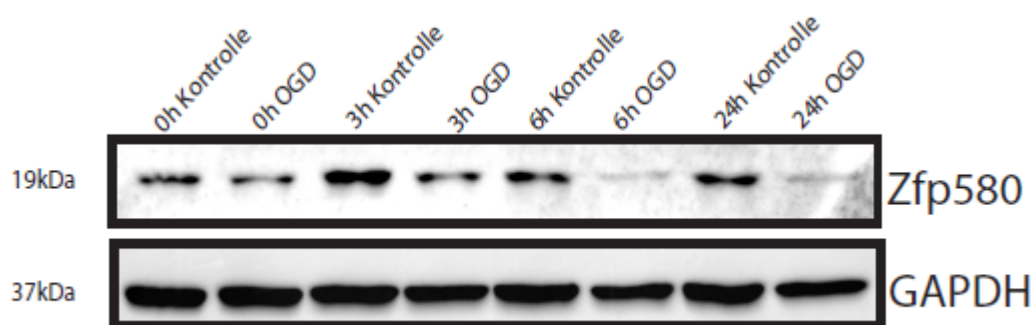


Abbildung 16: Zfp580 Protein liegt nach OGD im Western Blot vermindert vor.

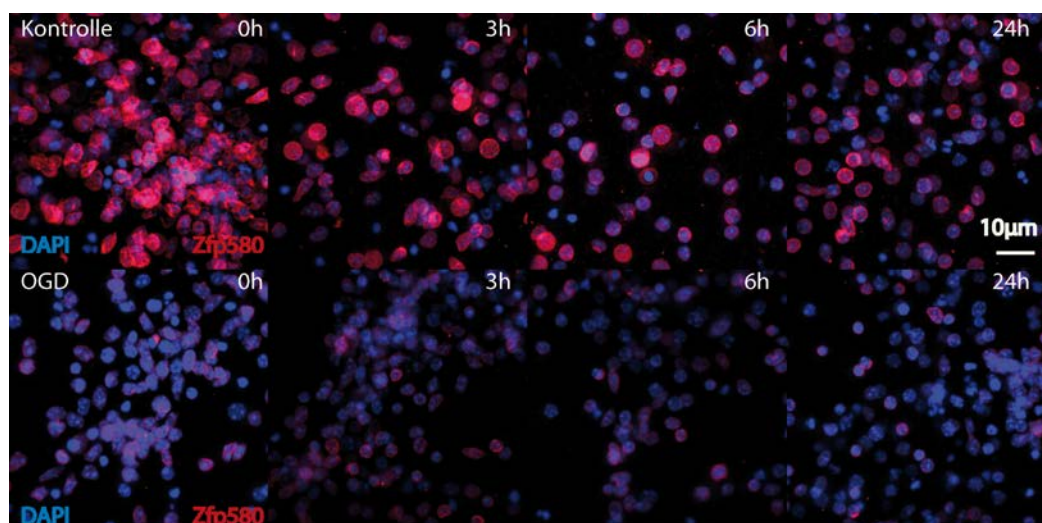
Im Western Blot zeigt sich eine deutliche Verminderung des Proteins nach OGD mit unterschiedlichen Reoxygenierungszeiten im Vergleich zu den waschkontrollierten Kulturplatten. Die Reduktion ist nach 6 und 24h am stärksten. Als Ladekontrolle diente GAPDH. Repräsentativer Western Blot aus > drei unabhängigen Experimenten.

5.2.1.2 Immunzytochemie

Proteinmengen und die Lokalisation von Zfp580 nach OGD wurden immunzytochemisch gegen Zfp580 und DAPI angefärbt und konfokalmikroskopisch in 20-facher Vergrößerung dargestellt. Es konnte beobachtet werden, dass die Intensität der Zfp580 Expression nach OGD im Vergleich zu den waschkontrollierten Schwesterkulturen abnahm (Abb. 17A). Um diese Befunde zu objektivieren wurden Grauwertanalysen von 6 ROIs pro Kondition vorgenommen und die Faktoren OGD und Reoxygenierungszeit mittels ungepaarter zweifaktorieller ANOVA mit wiederholten Messungen gegeneinander verglichen (Abb. 17B). Eine signifikante Abnahme der Grauwerte durch OGD war für alle Zeitpunkte detektierbar. Für 66,8 % der Varianz war der Faktor OGD unabhängig von der Oxygenierungszeit mit $F(1,44) = 135,7$ verantwortlich, was mit einem p -Wert $< 0,0001$ hochsignifikant war. Viel weniger, mit nur 5,594 %, trugen die einzelnen Zeitpunkte mit $F(3,44) = 3,79$ zur Varianz der Ergebnisse bei, konnten aber ebenfalls mit $p = 0,0168$ als signifikant eingestuft werden. Die Interaktion von OGD und Reoxygenierungszeit war mit $F(3,44) = 4,403$ und $p = 0,009$ statistisch signifikant und erklärte 6,499 % der Varianz. Um festzustellen, inwiefern sich die Intensitäten zu den einzelnen Zeitpunkten verhielt, wurde eine post hoc Analyse nach Tukey durchgeführt. Eine Familie mit 28 Vergleichen wurde bei einem α -Fehler (α) von 0,05 getestet. Hier konnte bestätigt werden, dass die Intensitäten jeder Kontrollplatte unabhängig von der Reoxygenierungszeit eine stärkere Intensität als jede OGD- Kultur aufwies. Vergleich man allerdings die Werte der OGD Kulturen mit den unterschiedlichen Reoxygenierungszeiten untereinander, so konnte kein signifikanter Unterschied detektiert werden. Diese Befunde stimmten mit den

Mikroskopieaufnahmen überein und bestätigen, dass Zfp580 schnell und effizient nach OGD herunterreguliert wird.

A



B

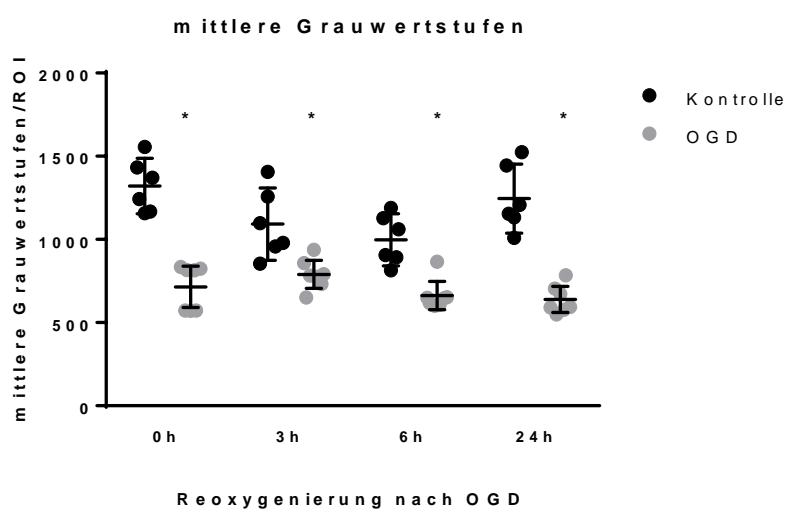


Abbildung 17: Zfp580 Protein wird nach OGD fluoreszenzmikroskopisch sichtbar und statistisch signifikant reduziert.

A. Konfokalmikroskopische Aufnahmen von Neuronenkulturen mit IHC gegen Zfp580 (rot) und DAPI (blau) nach OGD (2.Reihe) oder Waschkontrolle (1.Reihe) zu unterschiedlicher Reoxygenierungszeiten. Es zeigt sich eine deutliche Verminderung des Fluoreszenzsignals zu allen Zeitpunkten. Dies spricht für eine schnelle und effiziente Herunterregulation des Proteins. **B.** Statistische Aufarbeitung der Grauwertstufen mittels zweifaktorieller ANOVA mit wiederholten Messungen und Tukeys post hoc Test mit multiplen Vergleichen. Vergli-

*chen wurden die Faktoren OGD und Reoxygenierungszeit. Eine signifikante Abnahme der mittleren Grauwertstufen war für alle Zeitpunkte detektierbar. 66,8 % der Varianz konnten über den Faktor OGD ($F(1,44) = 135,7$) erklärt werden, was $p < 0,0001$ entsprach. Die Interaktion von OGD und Reoxygenierung mit $F(3,44) = 4,4$ und $p = 0,0086$ konnten 6,5 % der Varianz erklären. Es konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den OGD Kulturen der einzelnen Reoxygenierungszeitpunkte festgestellt werden. $n = 6$ pro Kon-
dition, Zahl der Familien = 1, Zahl der Vergleiche pro Familie = 28, $\alpha = 0,05$.*

5.2.1.3 rt-qPCR

Um die beobachtete Modifikation der Proteinebene auch auf mRNA Ebene zu untersuchen, wurden mRNA Mengen primärer kortikaler Neuronenkulturen nach OGD und durch rtPCR und rt-qPCR im Vergleich zu den nicht regulierten Referenzgenen Sdha und Ywhaz gemessen und mittels ddCt-Methode relativ quantifiziert. Zudem erfolgte eine Darstellung der Ct-Werte im Verhältnis zu den Ct-Werten der Kontrollkulturen (OGD/Kontrolle). Die Varianzanalyse der Faktoren OGD und Reoxygenierungszeit erfolgte durch eine ungepaarte zweifaktorielle ANOVA mit $\alpha = 0,05$. Hierbei konnten 15,29 % der Varianz mit $F(1, 24) = 7,35$ durch den Faktor OGD erklärt werden, was mit $p = 0,012$ als signifikant zu bewerten war (Abb. 18). Die einzelnen Reoxygenierungszeitpunkte konnten mit $F(4, 24) = 1,28$ 10,65 % der Varianz erklären, was einem p-Wert von 0,305 entsprach. Auch die Interaktion von OGD und Reoxygenierungszeit konnte nicht als signifikant bewertet werden ($p = 0,305$) und erklärte ebenfalls 7,894 % der Varianz ($F(4, 24) = 0,789$). In der Bonferronikorrektur schlug sich lediglich die Reduktion Zfp580 mRNA nach 24 h mit einem p-Wert $< 0,01$ als statistisch signifikant nieder. Die Ergebnisse sprachen für eine späte Reduktion der mRNA Mengen von Zfp580 durch OGD, die sich weit weniger ausgeprägt präsentierte als die Regulation auf Proteinebene.

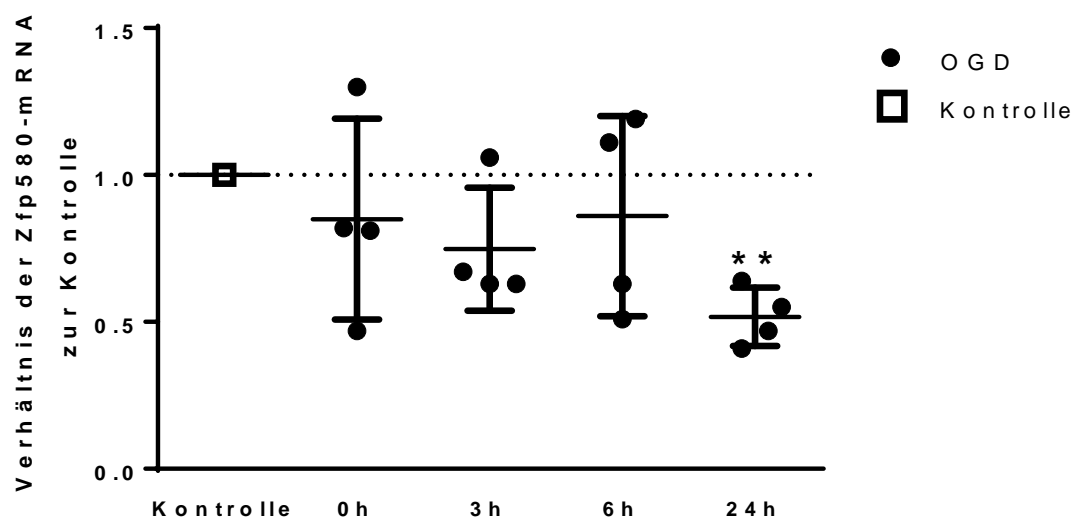


Abbildung 18: OGD führt zu Reduktion von Zfp580-mRNA.

Rt-qPCR zur Untersuchung von mRNA Veränderung von Zfp580 nach OGD anteilig an nicht regulierten Referenzgenen Sdha und Ywhaz im Zeitverlauf über 24h im Verhältnis zu Kontrollkulturen. Varianzanalyse mittels ungepaarter zweifaktorieller ANOVA. Der Faktor OGD konnte 15,29 % der Varianz erklären ($p = 0,0122$), während nur die Regulation der mRNA nach 24 h Reoxygenierungszeit signifikant war ($p < 0,01$, $t = 3,610$). Die Interaktion beider Faktoren war nicht signifikant ($p = 0,3054$). ($n = 4$ pro Kondition, Zahl der Familien = 1, Messungen pro Familie = 5, $\alpha = 0,05$). Das Ergebnis wies darauf hin, dass es durch OGD zu einer Abnahme der mRNA Mengen kommt, die sich erst relativ spät nach Hypoxie relevant niederschlug.

5.2.1.4 Immunhistochemie

Mäuse des C57Bl6N Hintergrundes wurden einer 45-minütigen MCAo unterzogen und die Gehirne nach 48 h entnommen und immunhistochemisch gegen Zfp580, NeuN und DAPI gefärbt. Die Schnitte wurden konfokalmikroskopisch untersucht (Abb. 19). Es wurden Übersichtsaufnahmen der Standardebenen und Detailaufnahmen des Infarktgebietes (a), des Perinfarktgebietes (b) und des Kortex kontralateral (c) aufgenommen. Es wurde beobachtet, dass auch *in vivo* das Zfp580 Fluoreszenzsignal nach MCAo im Gebiet in und um den Infarktkern in geringerem Maße zu detektieren war. Insbesondere im Bereich um den Infarktkern, wo NeuN+ Zellen detektiert werden konnten, zeigte sich die Reduktion deutlich. Auch die kontralaterale Hemisphäre erschien betroffen von der Reduktion. Eine Änderung der Lokalisation

des Proteins konnte aufgrund der geringen Signalstärke nicht hinreichend evaluiert werden. Diese Befunde stimmten mit den *in vitro* Ergebnissen überein.

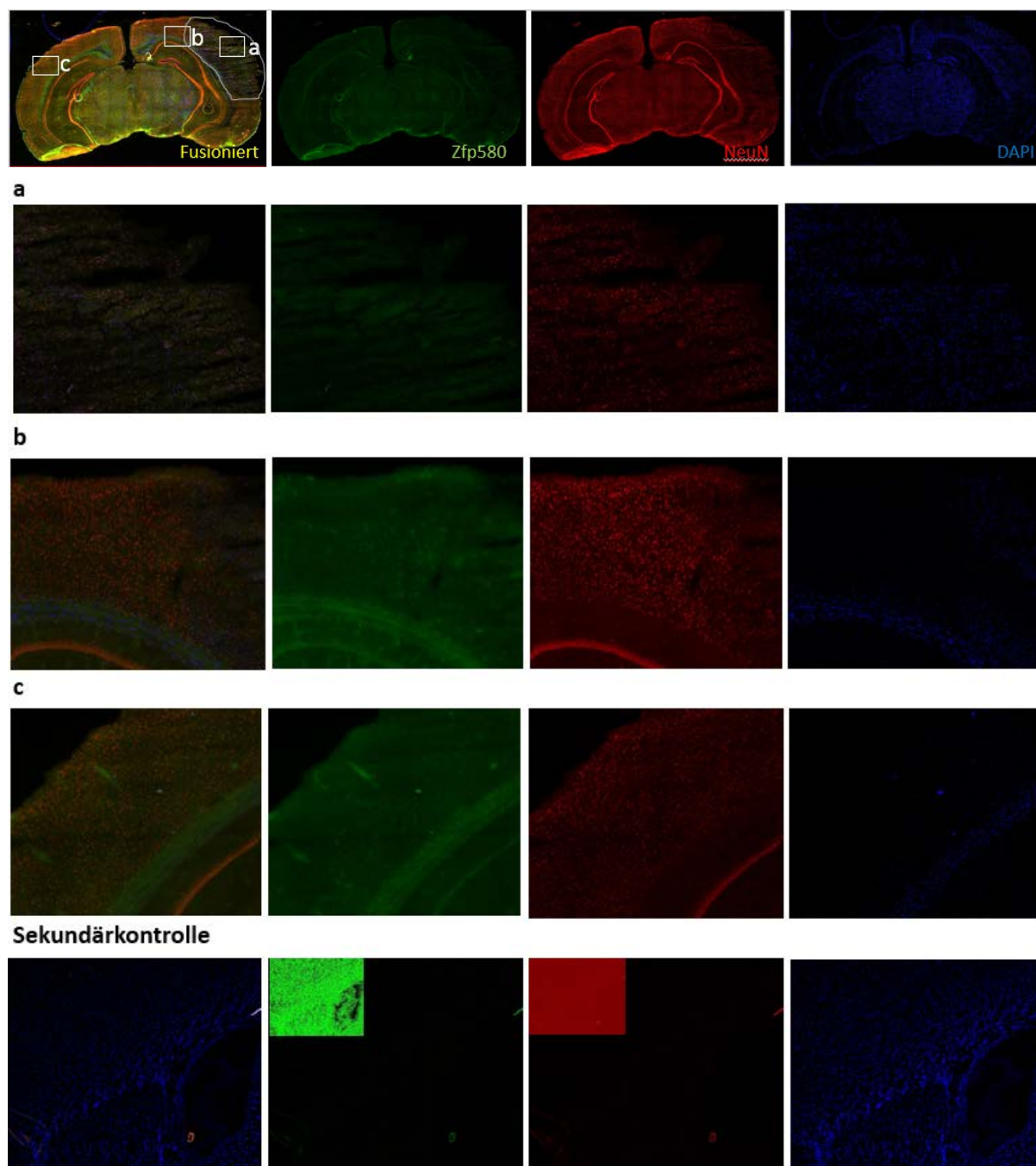


Abbildung 19: Zfp580 Protein liegt nach MCAo vermindert in Gehirnschnitten vor.

A. In den 10-fach vergrößerten Übersichtsaufnahmen war das Infarktareal durch MCAo deutlich zu erkennen. Das Fluoreszenzsignal für Zfp580 (grün) war im gesamten Gehirnschnitt im Vergleich zu sham kontrollierten Schnitten stark vermindert, während die Färbungen für NeuN (rot) und DAPI (blau) in entfernteren Gehirngebieten in unverminderter Stärke zu detektieren waren. **B.** Detailaufnahmen von Infarktbereich (a), Periinfarktgebiet (b) und

kontralateralem Kortex (c) und kontralateral (c). Es wurde bestätigt, dass die Zfp580 Expression im gesamten Gehirnschnitt, auch in der kontralateralen Hemisphäre, reduziert vorlag. Die Negativkontrolle verifiziert die Spezifität des Fluoreszenzsignals.

5.2.2 Ex vivo steigen mRNA Mengen von Zfp580 in Gesamthirnlysaten nach MCAo an

Die Zfp580 mRNA Mengen von Gesamthirnlysaten wurden nach MCAo mit Reperfusionzeiten von 3h, 8h, 24h, 48h respektive 72h wurden aus Hirnscheiben von je 30 µg nach Hemisphäre getrennt mittels rt-qPCR und ddCt-Berechnung im Verhältnis zu den Normierungsgenen Sdha und Ywhaz analysiert. Als Kontrollen dienten *sham*-operierte und unbehandelte Geschwistertiere. Die Varianzanalyse der Faktoren Hemisphäre und Zeitpunkt bzw. Art der Behandlung mittels ungepaarter zweifaktorieller ANOVA ergab, dass die Interaktion beider Faktoren mit $F(6,39) = 0,954$ und $p = 0,4688$ nur 3,791 % der Varianz erklären konnte und statistisch nicht signifikant war. Interessanterweise gab es kaum Unterschiede zwischen den Hemisphären, was sich in $F(1,39) = 1,099$ und $p = 0,301$ ausdrückte. Im Gegensatz dazu konnte der Zeitpunkt und die Art der Behandlung mit $F(6,39) = 17,33$ 68,88 % der Varianz erklären, was mit $p < 0,0001$ statistisch hochsignifikant war (Abb. 21). In der post hoc Analyse nach Sidak, wurden die jeweiligen behandelten Gehirnhälften mit der gleichseitigen unbehandelten Gehirnhälfte verglichen. Die *sham* operierten Tiere zeigten keinen signifikanten Anstieg der mRNA Expression von Zfp580. Eine besonders eindruckliche Steigerung der mRNA Menge war dabei schon drei Stunden nach MCAo in beiden Hemisphären zu beobachten. Auch nach 8 h und 48 h war ein signifikanter Anstieg der mRNA in beiden Gehirnhälften zu detektieren. Nur nach 24 h unterschieden sich die Werte beider Gehirnhälften: Während auf der Seite der Läsion auch zu diesem Zeitpunkt eine signifikante Steigerung der mRNA detektiert werden konnte, war der Anstieg der mRNA Menge auf der kontralateralen Seite zwar diskret vorhanden, jedoch nicht statistisch signifikant. Erst nach 72 h normalisierten sich die Werte auf ein dem Ausgangswert entsprechendes Niveau. Es ist also zu schließen, dass die durch MCAo induzierte transiente Hypoxie im gesamten Gehirn zu einer Mehrexpression von Zfp580 führte.

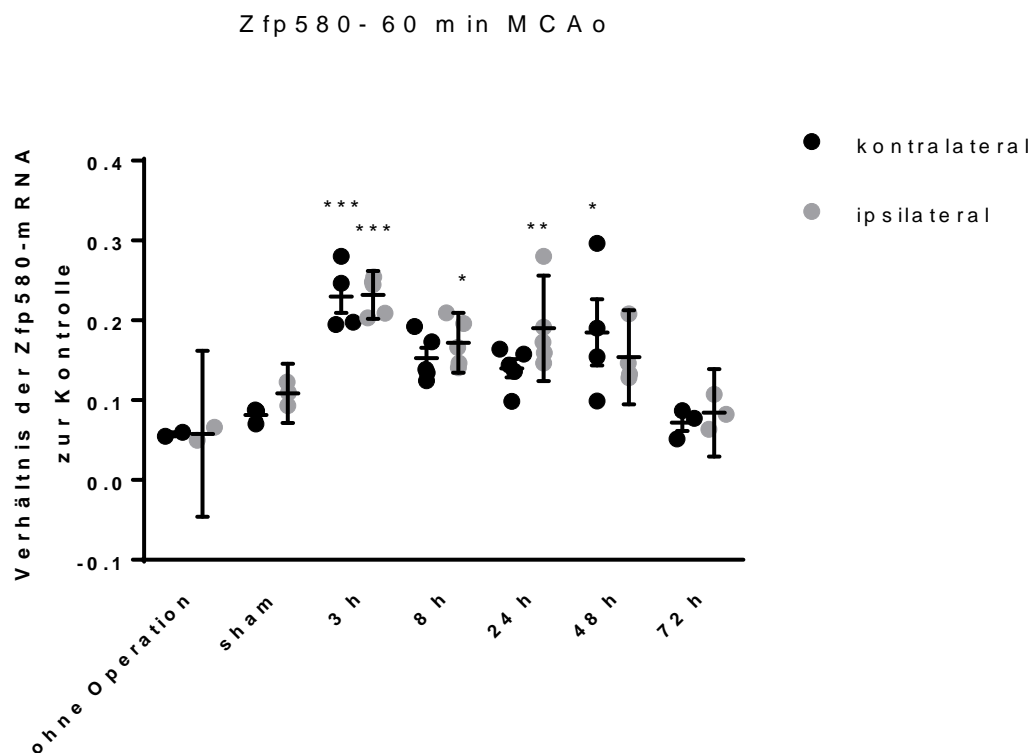


Abbildung 20: Expressionssteigerung von Zfp580 mRNA in Gesamthirnlysaten nach MCAo

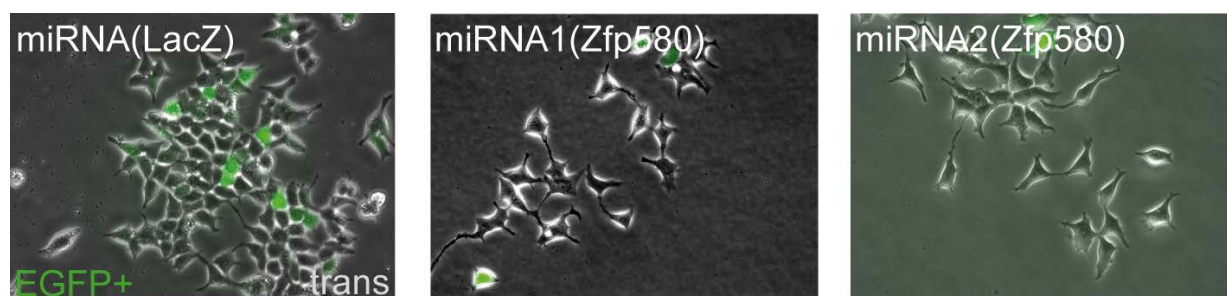
Rt-qPCR aus Gewebelysaten der Hemisphären von nicht operierten versus Sham operierten versus MCAo operierten Tieren im Verhältnis zu den Referenzgenen Sdha und Ywhaz. Die Interaktion von Zeitpunkt und Hemisphäre in Bezug auf die Expression der mRNA wurde mittels ungepaarter zweifaktorieller ANOVA auf die Varianzaufklärung getestet. Keine signifikante Interaktion von Hemisphäre und Behandlung ($F(6,39) = 0,9537$, $p = 0,4688$, % der Varianz = 3,791 %) und dem Faktor Hemisphäre allein ($F(1,39) = 1,099$; $p = 0,3009$, % der Varianz = 0,7282 %). Die Zeit und Art der Behandlung machten einen hochsignifikanten Teil der Varianz aus und trugen zu 68,88 % zur den Unterschieden der Werte bei ($p < 0,0001$). Der Vergleich der Einzelwerte mittels Sidaks post hoc Analyse konnte die signifikante Steigerung der mRNA Mengen nach 3, 8 und 48 h auf beiden Seiten, und nach 24 h auf der ipsilateralen Seite bestätigen. Nach 72 h waren die mRNA Mengen auf ein Normalniveau zurückgekehrt.

5.3 RNA Interferenz und Proteinmengenabnahme von Zfp580 *in vitro* ist neuroprotektiv nach OGD

5.3.1 Neuronenspezifische RNA Interferenz von Zfp580

Um die Rolle von Zfp580 auf das neuronale Überleben nach OGD zu untersuchen, wurden die Verpackungs- und Hüllplasmide (pmd2G und psPAX) für die lentivirale Produktion sowie die spezifischen Transfervektoren in HEK Zellen ko-transduziert, was mittels EGFP Fluoreszenz überprüft wurde (Abb. 21A). Die Medien der Kulturflaschen wurden über zwei Tage gesammelt und die Lentiviren isoliert. Die TU der Viren in neuronalen Primärkulturen wurden anhand des Fluoreszenzsignals EGFP exprimierender Neurone im Verhältnis zu allen in Transmissionsaufnahmen sichtbaren Zellen berechnet (Abb. 21B).

A



B

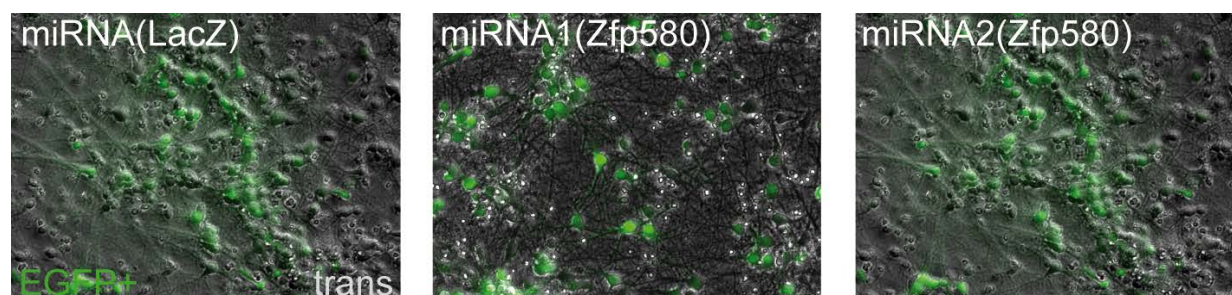


Abbildung 21: Darstellung der Virusproduktion in HEK Zellen und Neuronenkulturen.

A. Kulturen von HEK Zellen wurden mit Partikeln lentiviraler Virushüllen der 3. Generation (pmd2G und psPAX) sowie der VektorDNA der miRNA eingebetteten shRNA transduziert. Als Kontrollvektor diente gegen LacZ gerichtete miR-shRNA. Die erfolgreiche Virusproduktion wurde durch grün fluoreszierende HEK Kulturen nachgewiesen. **B.** Transduzierte Neuronenkulturen für die Bestimmung des Virustiters.

5.3.2 Nachweis der Reduktion von Zfp580 auf mRNA- und Proteinebene

Um die Effizienz der miR-shRNA (Zfp580) zu ermitteln wurden mRNA Mengen primärer kortikaler Neuronenkulturen nach Transduktion durch rt- und rt-qPCR gemessen und mittels ddCt Methode relativ zu Kontrollkulturen quantifiziert. Die Kontrollkulturen waren mit miR-shRNA (LacZ) transduziert. Die ddCt Werte wurden mittels ungepaartem t-Test statistisch analysiert (Fig. 22A). Hierbei konnte bei $n=3$, $t=20,39$ und $df=4$ eine mittlere Reduktion von mRNA(Zfp580) auf das 0,223-fache der Kontrollen ermittelt werden. Dieser Befund mit einem p -Wert $< 0,0001$ konnte als statistisch hochsignifikant bewertet werden. Es war also davon auszugehen, dass die Virustransduktion und Expression der mi-shRNA gegen Zfp580 zu einer effektiven Reduktion der mRNA von Zfp580 führte.

Zur Analyse der Reduktion auf Proteinebene wurde Gesamtprotein aus miR-shRNA1/2 (Zfp580) transduzierten DIV9 Neuronenkulturen isoliert und Zfp580 mittels Immunoblot dargestellt. Als Kontrolle der beiden miR-shRNA-Konstrukte dienten miR-shRNA (LacZ) transduzierte Kulturen. Als Kontrolle der gleichmäßigen Virustransduktion diente EGFP, als Kontrolle der gleichmäßigen aufgetragenen Proteinmenge das ubiquitär exprimierte Protein GAPDH (Fig. 22B). In der Färbung gegen Zfp580 konnte eine deutliche Reduktion des Proteins bei vergleichbarer EGFP und GAPDH Menge festgestellt werden.

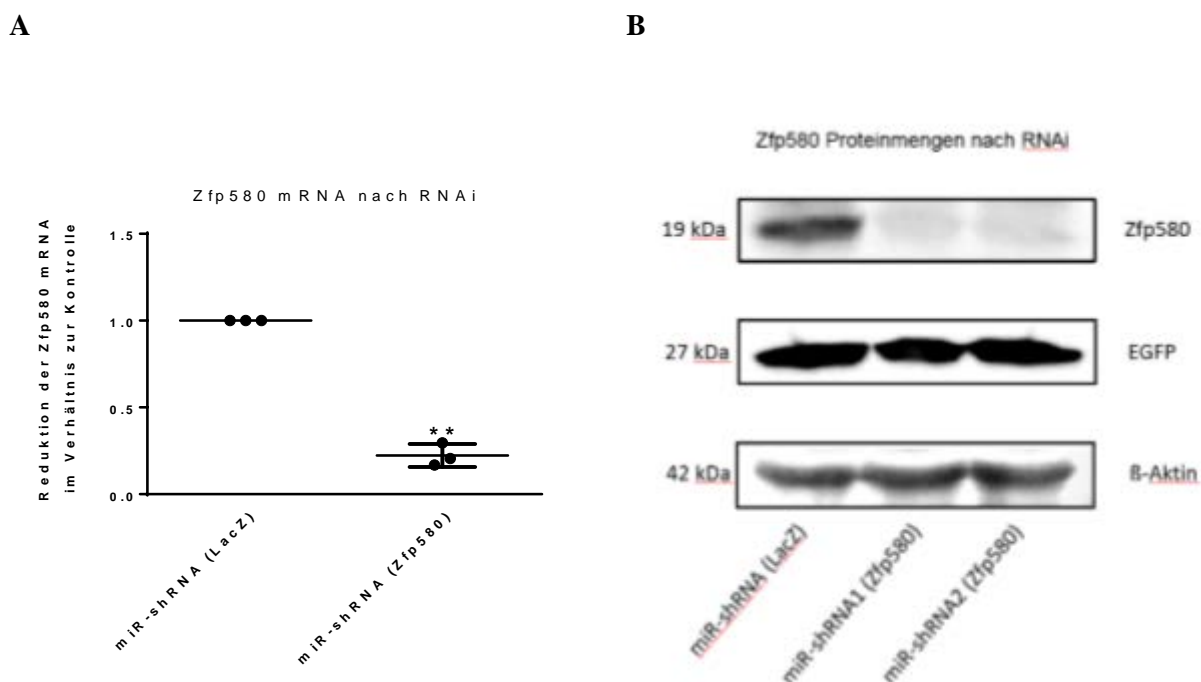


Abbildung 22: Lentiviral transduzierte miR-shRNA gegen Zfp580 ist effektiv.

A. ungepaarter t-Test zum Vergleich der mRNA Mengen nach Transduktion von miR-shRNA gegen Zfp580 im Vergleich zu kontrolltransduzierten Kulturen. Der Unterschied war mit $p < 0,0001$ ($t=20,39$, $df=4$) statistisch hochsignifikant. $n=3$ pro Kondition, $\alpha=0,05$. **B.**

Immunoblot von miR-shRNA1/2 (Zfp580) und miR-shRNA (LacZ) transduzierten Neuronenkulturen. Transduktionskontrolle: EGFP; Ladekontrolle: β -Actin. Es zeigt sich eine deutliche Reduktion der Proteinmenge von Zfp580 durch beide miR-shRNA1/2 (Zfp580) Konstrukte.

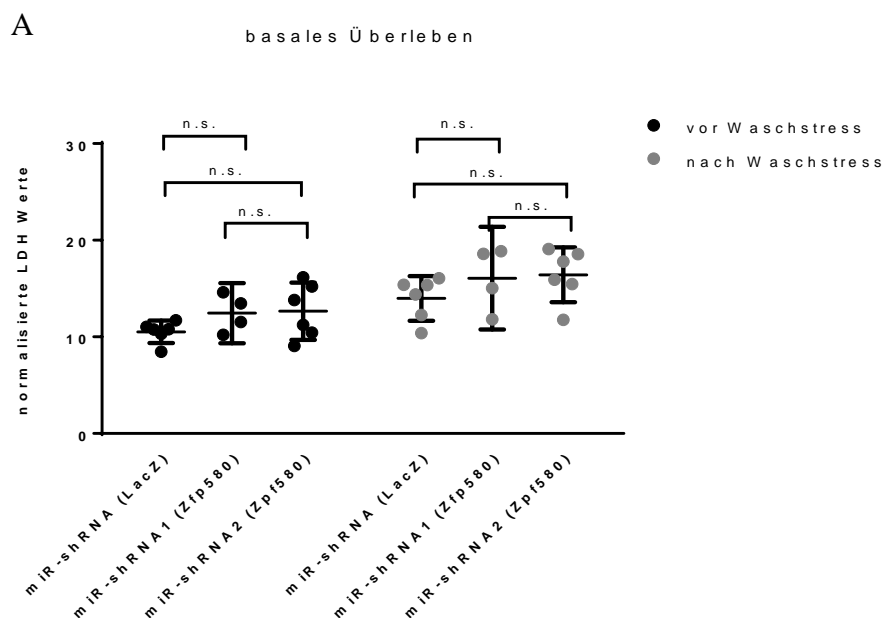
5.3.3 RNAi von Zfp580 macht Neuronenkulturen in Basisuntersuchungen nicht vulnerabler als Kontrollkulturen

Um zu ermitteln, ob die Reduktion der Gendosis von Zfp580 unter Normalbedingungen und leichtem Waschstress mit einer höheren Vulnerabilität der Zellen einherging, wurde die relative LDH Freisetzung miR-shRNA1/2 (Zfp580) bzw. miR-shRNA (LacZ) transduzierter Neuronenkulturen im Vergleich zum *full kill* vor und nach leichtem Stress durch dreimaliges Waschen gemessen und die Werte statistisch mittels gepaarter zweifaktorieller ANOVA mit multiplen Vergleichen ausgewertet (Abb. 23A). In der Varianzanalyse konnte ermittelt werden, dass der Genotyp mit $F(2,13) = 1,929$ und $p = 0,1847$ lediglich 3,031 % der Varianz erklären konnte. Auch die Interaktion zwischen Genotyp und Waschstress konnte lediglich 3 % der Varianz erklären. Somit konnte gezeigt werden, dass die Kulturen, in denen Zfp580 mRNA degradiert worden war, weder basal noch durch leichten Waschstress vulnerabler als ihre wt-Kontrollkulturen waren. Dies stellte eine wichtige Grundvoraussetzung für die weiteren Versuche dar.

5.3.4 RNA Interferenz mit Zfp580 führt zu geringerer Freisetzung der Laktatdehydrogenase nach 2,5 h OGD

Zur Untersuchung der Rolle von Zfp580 auf das Zellüberleben wurde durch Messung der Laktatdehydrogenase (LDH) im Medium vor und nach OGD untersucht. Es wurden Kulturen, in denen die Zfp580 durch spezifische miR-shRNA (miRNA1/2 (Zfp580)) reduziert worden war gegen Kontrollkulturen mit miR-shRNA (LacZ) Transduktion verglichen. Es wurden drei Messungen pro Kondition gemacht, die als Mittelwert in die nachfolgende Analyse gingen. Die Varianzanalyse der Daten erfolgte mittels ungepaarter zweifaktorieller ANOVA (Abb. 23B). Es konnte festgestellt werden, dass die Interaktion von OGD und RNAi (Zfp580) 22,25 % der Varianz erklärte und mit $F(2, 15) = 7,085$ und $p = 0,007$ statistisch ebenso signifikant war wie die Gendosisreduktion von Zfp580 mit $F(2, 15) = 7,678$, $p = 0,005$ und die OGD ($F(2,15) = 22,85$; $p = 0,0002$) alleine, wobei diese 24,11 % respektive 35,87 % der Varianz erklärten. Die Varianzaufklärung der einzelnen Werte wurde mit der post hoc Analyse

nach Tukey mit multiplen Vergleichen erhoben, wobei eine Familie mit je 15 Vergleichen pro Familie bei $\alpha=0,05$ untersucht wurden. Hierbei konnte ermittelt werden, dass der Unterschied zwischen dem LDH Anstieg der Kontroll- und der OGD-Werte im Falle der Kontrolle mit $p=0,0004$ hochsignifikant war, während zwischen den Werten beider miR-shRNA (Zfp580) Kulturen kein signifikanter Unterschied bestand. Kein signifikanter Unterschied bestand zwischen den waschkontrollierten miR-shRNA (Zfp5801(/2) respektive miR-shRNA (LacZ) Kulturplatten. Wurden die OGD Werte auf gleiche Weise miteinander verglichen, so war ein signifikanter Unterschied zwischen den Werten der miR-shRNA (LacZ) Kontrollen und der miR-shRNA (Zfp580) Kulturen erkennbar ($p=0,0058$ für miR-shRNA (LacZ) vs. miR-shRNA1 (Zfp580), beides OGD; $p=0,0054$ für miR-shRNA (LacZ) vs. miR-shRNA2 (Zfp580), beides OGD). Das zeigte, durch Reduktion der Gendosis von Zfp580 in der Neurokultur eine deutlich verbesserte Stresstoleranz gegen Hypoxie erreicht werden konnte.



B

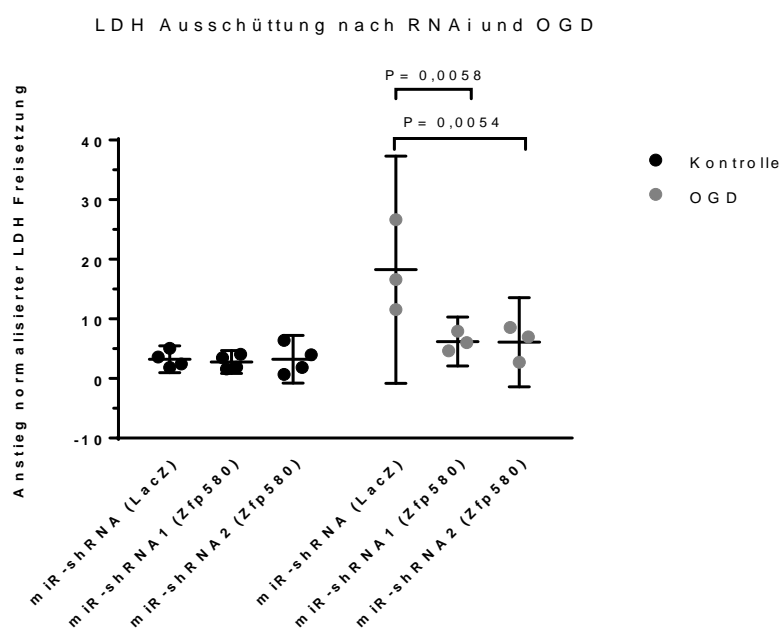


Abbildung 231: RNAi von Zfp580 führt zu ähnlichen LDH Konzentrationen in den Basisuntersuchungen und zu stark verminderten Konzentrationen nach OGD.

A. LDH-Ausschüttung im Vergleich zum full kill von miR-shRNA1/2 (Zfp580) transduzierten Kulturen im Vergleich zu kontrolltransduzierten Kulturplatten durch leichten Waschstress. Statistische Analyse mittels zweifaktorieller ANOVA mit multiplen Vergleichen. Die Varianzanalyse bestätigte, dass der Genotyp selbst mit $F(2,13) = 1,929$ und $p = 0,1847$ nicht signifikant zur Varianz der Werte beitrug, reduziert wurde, waren weder basal noch durch leichten Waschstress vulnerabler. $n = 4$ pro Kondition, $\alpha = 0,05$. **B.** Die Freisetzung von LDH nach OGD wurde durch RNAi von Zfp580 stark reduziert, was einem neuronalen Überlebensvorteil durch RNAi entsprach. Die Interaktion von RNAi und OGD war dabei für 22,25 % der Varianz verantwortlich ($F(2,15) = 7,085$) und statistisch mit $p = 0,007$ signifikant. Die RNAi alleine konnte 24,11 % der Varianz erklären ($F(2,15) = 7,678$, $p = 0,005$), während die OGD ($F(1,15) = 22,85$, $p = 0,0002$) 35,87 % der Varianz erklärt. Die Varianzaufklärung der einzelnen Werte wurde mit Tukeys post hoc Analyse mit multiplen Vergleichen erhoben. Der Unterschied zwischen Kontroll- und der OGD- Werten war für miR-shRNA (LacZ) mit $p = 0,0004$ hochsignifikant, während zwischen den Werten beider miR-shRNA (Zfp580) Kulturen kein signifikanter Unterschied bestand. Die Ergebnisse deuten auf eine verbesserte Stresstoleranz gegen Hypoxie durch RNAi von Zfp580 hin. $n = 3-4$ pro Kondition, eine Familie, 15 Vergleiche pro Familie, $\alpha = 0,05$.

5.3.5 RNA Interferenz von Zfp580 führt zu mehr überlebenden EGFP+ Zellen nach OGD

Die Anzahl der EGFP+ Zellen miR-shRNA1/2 (Zfp580) respektive miR-shRNA (LacZ) transduzierter Kulturen wurden an DIV8 und an DIV10 24 h nach OGD an 3 Position pro Kulturvertiefung verglichen. Als Kontrollen dienten auch hier Kulturplatten, die nur gewaschen wurden. (Abb. 24A). Die Varianzanalyse erfolgte mittels zweifaktorieller ANOVA und Tukeys post hoc Analyse mit multiplen Vergleichen (Abb. 24B). Hierbei konnte das Ergebnis der LDH Messungen bestätigt werden: Zwar machte die Interaktion nur 9,673 % der Interaktion aus, was bei $F(2,12) = 4,791$ und $p = 0,03$ dennoch statistisch signifikant zu bewerten war. Die RNAi mit Zfp580 war für 21,17 % der Varianz verantwortlich und mit einem p-Wert von 0,002 signifikant ($F(2,12) = 10,49$). Der größte Anteil der Varianz konnte durch die OGD erklärt werden, die 57,04 % der Unterschiede ausmachte und mit $p < 0,0001$ als hochsignifikant einzustufen war ($F(2,12) = 56,51$). Zur Analyse der Einzelwerte wurde ein post hoc Test nach Tukey durchgeführt. In den Einzelvergleichen konnte festgestellt werden, dass die OGD selbst für die miR-shRNA (LacZ) Kulturen (Kontrolle vs. OGD) einen hochsignifikanten Unterschied machte ($p = 0,0002$). Verglich man die Verhältnisse der überlebenden Zellen der OGD Kulturplatten der miR-shRNA(LacZ) transduzierten gegen die miR-shRNA1/2(Zfp580) transduzierten Kulturen, war das Verhältnis der EGFP+ Zellen nach OGD in beiden Fällen signifikant größer ($p = 0,0090/p = 0,0035$). Diese Ergebnisse untermauern den Befund, dass die RNAi von Zfp580 zu einem verbesserten Zellüberleben nach OGD führte.

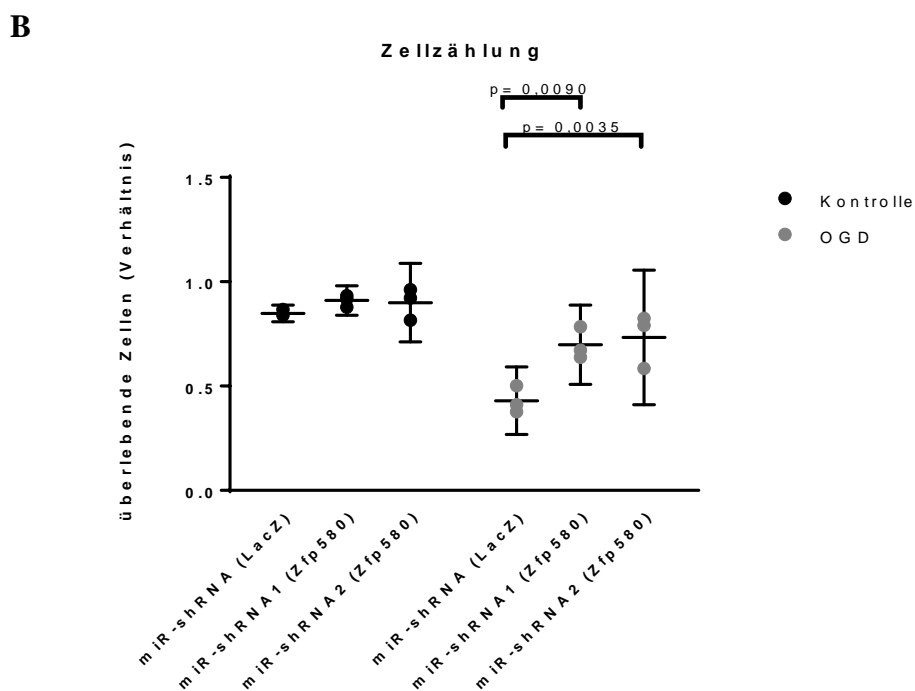
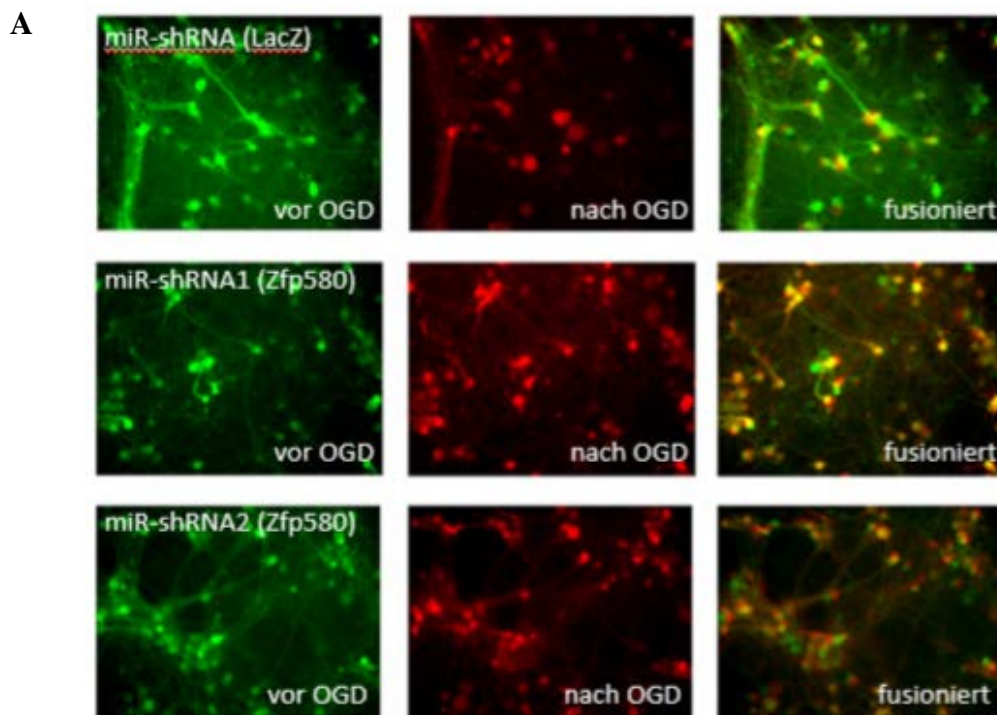


Abbildung 24: RNAi von Zfp580 führt zu geringerer Abnahme EGFP-exprimierender Neurone nach OGD.

A. Darstellung des Zellüberlebens vor und nach OGD 1. Zeile: Im Vergleich der Zellzahlen

vor OGD (grün) wiesen die miR-shRNA (LacZ) transduzierten Kulturen nach OGD (rot) eine deutlich reduzierte Zellzahl auf. Diese Reduktion wurde durch die Transduktion von miR-shRNA(Zfp580) durch die beiden Konstrukte (2. und 3. Zeile) vermindert. **B. Quantifizierung der in A dargestellten Befunde mittels Zellzählung.** Die Werte wurden als Verhältnis zwischen EGFP+ Zellen nach OGD/EGFP+ Zellen vor OGD angegeben. Die Varianzanalyse zwischen den Waschkontrollen und den OGD Platten mit den jeweils miR-shRNA(LacZ) vs. miR-shRNA(Zfp580) transduzierten Neuronen erfolgte mittels zweifaktorieller ANOVA mit wiederholten Messungen und Tukeys post hoc Analyse mit multiplen Vergleichen. Interaktion von RNAi und OGD ($F(2,12) = 4,791$) erklärte 9,673 % der Varianz ($p = 0,03$). RNAi mit Zfp580 mit $F(2,12) = 10,49$ war für 21,17 % der Varianz verantwortlich und mit einem $p = 0,0023$ hochsignifikant. Die OGD ($F(2,12) = 56,51$) erklärte 57,04 % der Varianz ($p = 0,0001$). $n = 3$ Kondition, eine Familie, 15 Vergleiche pro Familie, $\alpha = 0,05$.

5.4 Ein Fehlen von Zfp580 *in vivo* führte zu keiner verbesserten funktionellen Erholung nach MCAo

5.4.1 Genotypisierung

Zur Identifikation des Genotyps der Tiere wurden Ohrstanzen lysiert und die DNA mittels PCR analysiert. Eine Bande bei 386 bp identifizierte das wt Allel von Zfp580, die Bande bei 247 bp war nur in Tieren mit tm1aZfp580 Gendeletion zu sehen (Abb. 25). Doppelbanden identifizierten die heterozygoten Geschwistertiere. Die Genotypisierung erfolgte unter Verblindung der Experimentatoren.

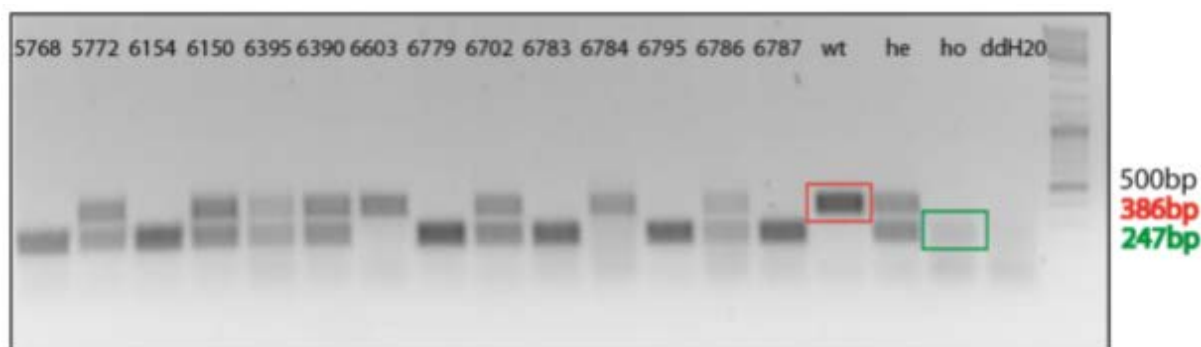


Abbildung 25: Die Genotypisierung per Elektrophorese klärte über den Genotyp der Geschwistertiere auf.

Die Bande bei 386 bp war spezifisch für die wt Tiere (rote Umrandung), während die Bande bei 247 bp charakteristisch für die *tm1aZfp580* Tiere war (grüne Umrandung). Die Nummern stehen für die untersuchten Tiere, als Kontrollen wurden bekannte Genotypen als Positiv- und ddH₂O als Negativkontrolle geladen. He= heterozygot, ho= homozygot.

5.4.2 Basisuntersuchungen

In einer siebentägigen Verhaltensstudie wurde getestet, ob ein konstitutives Fehlen von Zfp580 *in vivo* zu einem besseren funktionellen Erholen nach MCAo führt. Wt und *tm1aZfp580* Mäuse wurden als Geschwister eines Wurfes für die Untersucher verblindet und randomisiert in drei Gruppen unter Normalbedingungen gehalten. Durch tägliche Messungen des Gewichtes und Inspektion der Tiere und Käfigumgebung wurde das Wohlbefinden der Tiere überwacht (Abb. 26A). Die Gruppenstärke betrug zu Beginn der Untersuchungen 34 Tiere (wt = 16, *tm1aZfp580* = 18), in die statistischen Analysen flossen nur die Tiere ein, die den Versuchstag sieben erreichten (wt = 13, *tm1aZfp580* = 15). In einem Tier der *tm1aZfp580* Gruppe wurde kein Infarkt verursacht, sodass es ausgeschlossen wurde. Der Gewichtsverlauf der Genotypen wurde als Mittelwert mit 95 % KI dargestellt. Der Genotyp hatte über den Zeitverlauf keine signifikante Auswirkung auf das Gewicht ($F(12, 312) = 0,238$; $p = 0,630$). Es trat ein zu erwartender Gewichtsverlust nach MCAo ungeachtet der Genotypen auf, der in der Varianzaufklärung mit $F(12, 312) = 40,09$ und $p < 0,0001$ statistisch hochsignifikant zu bewerten war. Die Interaktion von Genotyp und Zeit war mit $F(12, 312) = 0,2862$ und einem p-Wert von 0,9912 nicht signifikant. Insgesamt sechs Tiere aus beiden Gruppen wurden frühzeitig entsprechend der vorher festgelegten Abbruchkriterien des bewilligten Tierversuchsantrags aus der Studie ausgeschlossen. Dies wurde anhand einer Ka-

plan- Mayer Kurve (Abb. 26B) dargestellt. Das Überleben der Tiere wurde anhand eines Logrank-Tests auf Varianz überprüft. Die Chi-Quadrat-Verteilung betrug hierbei 0,06251, was einem p-Wert von 0,803 entsprach und statistisch als nicht signifikant zu bewerten war.

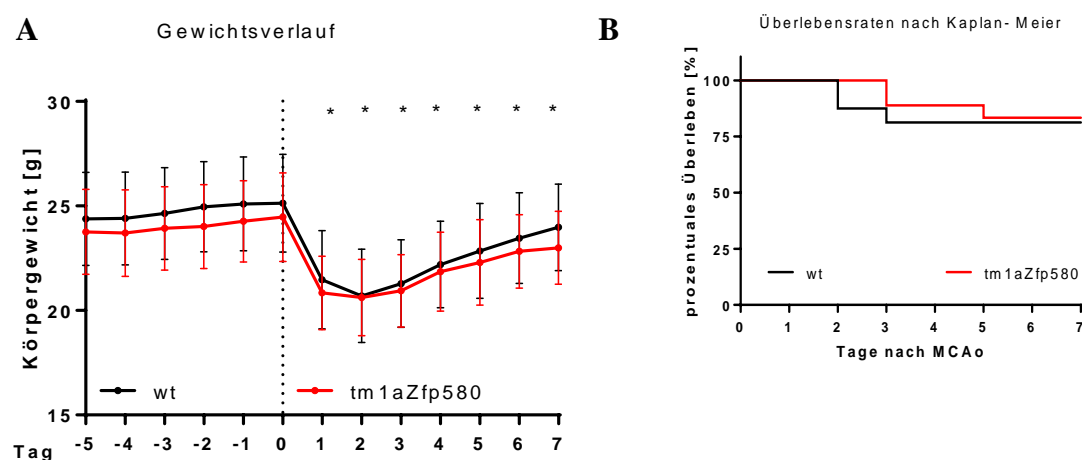


Abbildung 26: Im Gewichtsverlauf und den Überlebensraten konnte kein Unterschied zwischen den Genotypen festgestellt werden.

A. Gewichtsverlauf der beiden Versuchsgruppen als Mittelwert und 95% KI. Von Versuchstag -5 bis 7. Die gestrichelte Linie indiziert den Operationszeitpunkt. Der Gewichtsverlauf war für beide Gruppen vergleichbar ($p = 0,9912$), der Faktor Zeit (nach MCAo) war ungeachtet der Genotypen für die Varianz der Werte hochsignifikant ($p < 0,0001$). Der Gewichtsverlust nach MCAo entsprach einem normalen Verlauf. **B.** Gesamtanzahl [wt ($n = 16$) und $tm1aZfp580$ ($n = 18$)] und Überlebensraten bzw. Tiere, die bis zum Ende der Untersuchungen die humanen Endpunkte nicht erreicht hatten [wt ($n = 13$), $tm1aZfp580$ ($n = 15$)]. Sechs Mäuse, je drei aus jeder Gruppe, erreichten humane Endpunkte und wurden getötet. Ein Tier aus der $tm1a$ Gruppe zeigte keinen ischämischen Insult und wurde bereits an Tag 0 ausgeschlossen. Darstellung als Kaplan- Meier- Kurve, Varianzanalyse mittels Logrank-Test, $p = 0,803$.

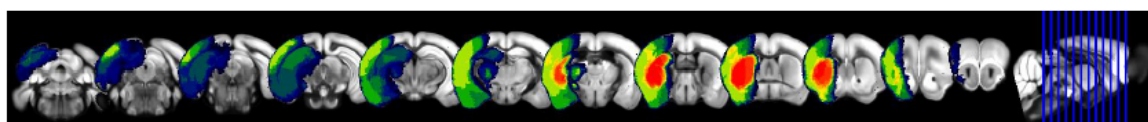
5.4.3 Vergleichbare Läsionsgrößen bei KO von Zfp580

Die ödemkorrigierten Infarktgrößen wurden mit freundlicher Unterstützung von Fr. Susanne Müller (AG Böhm-Sturm) verblindet für die Gruppenzugehörigkeit oder den Genotyp gemessen und die Lokalisationen des geschädigten Gewebes aller Tiere durch heat maps dargestellt (Abb. 31A). Aufgrund des Allgemeinzustandes wurde bei einem Tier der Wildtypgruppe keine Narkose durchgeführt und auf das MRT verzichtet. Das Tier erreichte zeitnah den humanen Endpunkt. Die Läsionsgrößen betragen im Durchschnitt $42,6 \text{ mm}^3$ (wt = $42,0 \text{ mm}^3$; $tm1aZfp580$ = $43,2 \text{ mm}^3$). Aus bislang ungeklärten Gründen entsprach dies weitaus größeren

Läsionen als erfahrungsgemäß zu erwarten war. Die errechneten Läsionsgrößen wurden mit zweiseitigem Mann Whitney Test auf signifikante Unterschiede zwischen den beiden Genotypen untersucht. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Läsionsgrößen festgestellt werden ($p = 0,682$). Es fiel auf, dass die Infarktgrößen sehr heterogen ausfielen. Dementsprechend waren die 95 % Konfidenzintervalle groß. In der Gruppe der KO Tiere waren Streubreite und KI unwesentlich geringer (Abb. 31B).

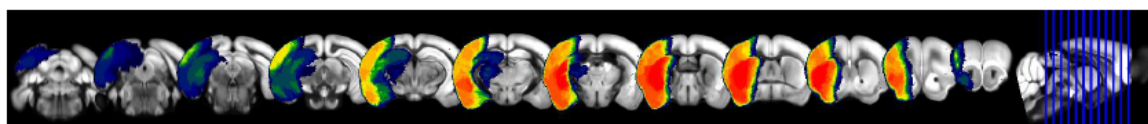
A

Wt



1 15 Tiere mit Läsion

Tm1aZfp580



1 17 Tiere mit Läsion

B

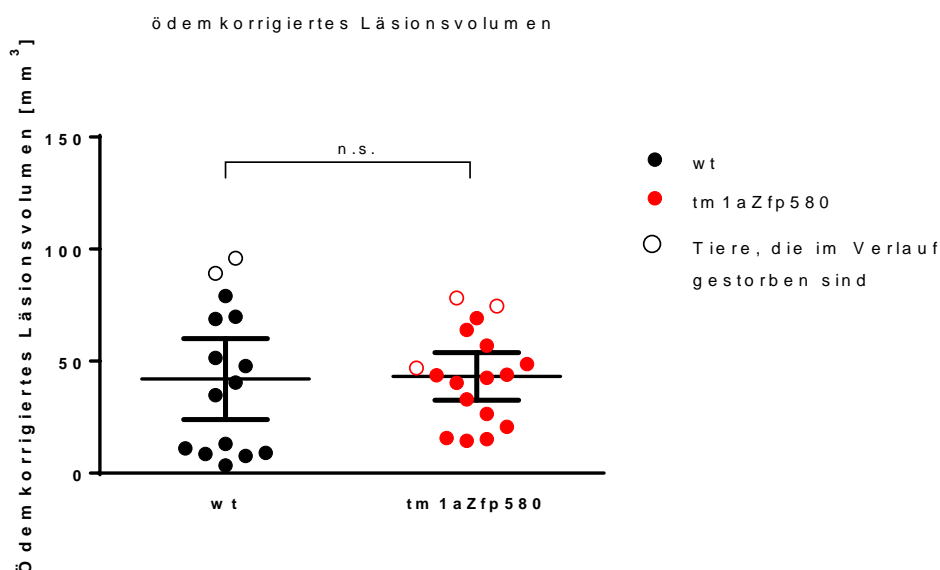


Abbildung 27: Im MRT zeigte sich kein Unterschied zwischen den Genotypen in der Läsionsgröße der Infarkte.

A. Darstellung der ödemkorrigierten Läsionsvolumina in heat maps. Die durchschnittlichen Läsionsgrößen betrugen $42,6 \text{ mm}^3$ ($\text{wt} = 41,0 \text{ mm}^3$; $\text{tm1aZfp580} = 43,2 \text{ mm}^3$). Es fielen große Infarkte in beiden Gruppen auf. Die Farben stellen die Häufigkeit der verschiedenen Infarkt-

lokalisation innerhalb der Versuchsgruppe dar. B. Statistischer Vergleich der ödemkorrigierten Läsionsvolumina aller Tiere in mm^3 mittels zweiseitigem Mann Whitney Test, $p = 0,682$. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Läsionsvolumina festgestellt werden ($p = 0,659$). $N = 32$ ($wt = 15$, $tm1aZfp580 = 17$).

5.4.4 Neuroscore

Mit dem Neuroscore wird dem Versucher die Möglichkeit gegeben, das grundlegende Wohlbefinden der Versuchstiere und ihr sensomotorisches Verhalten nach einem Eingriff wie der MCAo mittels Punktesystem zu objektivieren (Abb. 28). Die erzielten Punktwerte wurden pro Zeitpunkt und Tier statistisch analysiert. Das Abschneiden der beiden Gruppen wurde als Mittelwert mit 95 % KI angegeben und die Varianzen zwischen den Genotypen mittels gepaarter zweifaktorieller ANOVA mit wiederholten Messungen durchgeführt und die Einzelvergleiche an den verschiedenen Zeitpunkten mit einer Bonferonikorrektur ermittelt. Der Genotyp zwischen den Gruppen trug mit $p = 0,5713$ ($F(1,26) = 0,3289$) nicht signifikant zur Varianz zwischen den Ergebnissen bei. Auch die Interaktion von Zeit und Genotyp ($F(3,78) = 0,1934$) war mit $p = 0,901$ statistisch nicht signifikant und erklärte lediglich 0,1 % der Interaktion. Die Zeitpunkte nach MCAo ungeachtet der Genotypen erklärten 57,67 % der Varianz, was mit $p < 0,0001$ als hochsignifikant zu bewerten war ($F(3, 78) = 84,87$). Die Tiere erreichten also auch noch sieben Tage nach MCAo noch signifikant höhere Punktzahlen. Wurden die Unterschiede zwischen den Gruppen pro Zeitpunkt verglichen (Zahl der Familie = 1, Zahl der Vergleiche pro Familie = 4, $\alpha = 0,05$) so ergaben die Unterschiede der Mittelwerte keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen und Zeitpunkten, was auch mit der großen Streubreite der Messungen zu erklären war. Dieses Ergebnis ließ darauf schließen, dass die MCAo ungeachtet der Genotypen einen signifikanten Effekt auf das Abschneiden in den Neuroscore Untersuchungen hatte.

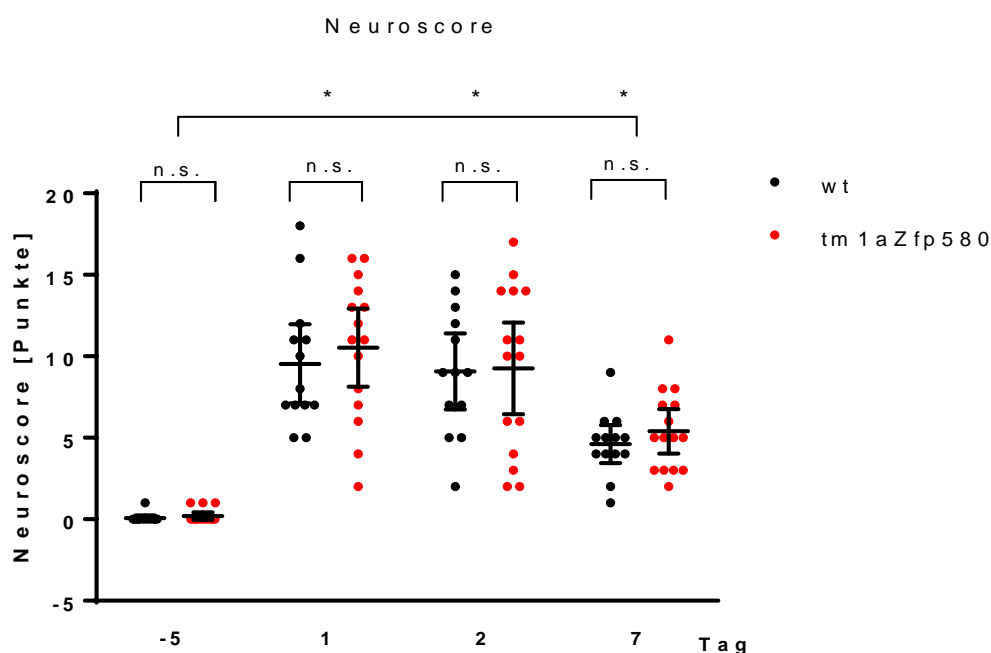


Abbildung 282: Kein unterschiedliches Abscheiden der Versuchsgruppen im Neuroscore.

Messungen 5 Tage vor und 1, 2 und 7 Tage nach MCAo. Die erreichten Punktzahlen wurden statistisch als Mittelwert der erreichten Punktzahlen pro Genotyp mit 95 % KI angegeben. In die Statistik flossen lediglich Messungen der bis zu Tag 7 überlebenden Tiere ein. Zur Varianzanalyse wurde eine gepaarte zweifaktorielle ANOVA mit wiederholten Messungen mit einer Bonferronikorrektur durchgeführt. Der Genotyp trug mit $p = 0,571$ nicht signifikant zur Varianz der Ergebnisse bei ($F(1,26) = 0,329$). Auch die Einzelanalyse der verschiedenen Zeitpunkte ergab zu keiner Zeit signifikante Unterschiede zwischen den Vergleichsgruppen. Das Abscheiden zu den verschiedenen Versuchszeitpunkten war mit $p < 0,0001$ hochsignifikant. Die Tiere hatten sich also ungeachtet der Genotypen auch sieben Tage nach MCAo noch nicht vollständig von dem Eingriff erholt. Eine Familie, 4 Vergleiche pro Familie, $\alpha = 0,05$. $n = 28$ ($wt = 13$; $tm1aZfp580 = 15$).

5.4.5 Rotarod

Mit dem Rotarod Test wurden Koordination, Balance und Lateralisation sowie Ausdauer vor und nach MCAo getestet. Die Tiere wurden an Tag -5, 2 und 7 verblindet getestet. Die Gruppengrößen betragen $n = 13$ für die wt Mäuse und $n = 15$ für die $tm1aZfp580$ Tiere. Die Tiere wurden maximal 10 min auf dem Laufrad belassen. Die Zeiten (in Sek.) wurden statistisch mittels gepaarter zweifaktorieller ANOVA mit wiederholten Messungen und einer post hoc Analyse nach Bonferroni ausgewertet und als Mittelwert und 95 % KI angegeben

(Abb. 29A). Die Interaktion von Zeit und Genotyp erklärte mit $F(2, 52) = 4,984$ knapp 6 % der Varianz, war aber mit $p = 0,011$ statistisch signifikant. Dies war vor allem durch die Varianz der Messungen zu den verschiedenen Zeitpunkten zu erklären, die mit $F(2, 52) = 15,8$ und $p < 0,0001$ 18,97 % der Varianz erklärt und als hochsignifikant zu bewerten war. Der Unterschied zwischen den Genotypen war mit $F(1, 26) = 0,2588$ und $p = 0,615$ für nur 0,435 % nicht wesentlich für die Varianz der Werte verantwortlich, obwohl der Unterschied im Gegensatz zu den anderen Untersuchungen interessanterweise deutlicher war. Interessanterweise schnitten die *tm1aZfp580* Tiere vor MCAo diskret besser ab als die *wt* Geschwister-tiere, während sich dieses Verhältnis nach OGD umkehrte. Zudem fällt die große Streubreite der Ergebnisse ins Auge, die eine statistische Signifikanz weiterhin erschwert. Bei der Bonferronikorrektur wurden die Genotypen zu den verschiedenen Zeitpunkten gegeneinander verglichen, wobei kein signifikanter Unterschied zu sehen war. Die Zahl der Familien betrug 1. 3 Vergleiche wurden pro Familie durchgeführt, $\alpha = 0,05$. Die Werte wurden als mittlere Differenz mit 95 % KI angegeben. Es war also zu sehen, dass die MCAo einen Effekt auf die Koordination der Tiere ungeachtet der Genotypen hatte. Zudem war anhand der Zeiten in beiden Gruppen ein gewisser Lerneffekt zu beobachten, sodass die Tiere nach sieben Tagen ungeachtet der Läsion sogar besser als vor MCAo abschnitten.

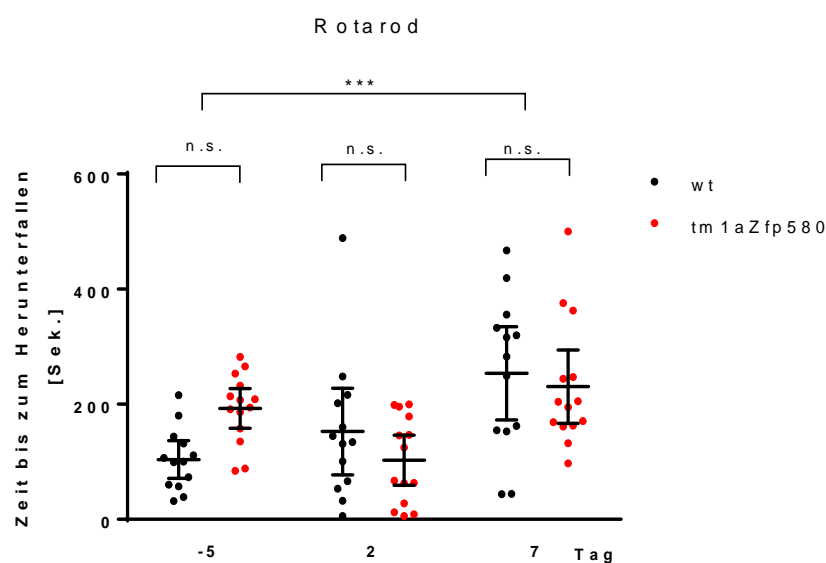


Abbildung 29: Kein Unterschied zwischen den Genotypen im Rotarodversuch.

Durchschnittszeit der Gruppen bis zum Herunterfallen von der Rotarod-Apparatur in Sek. Angaben als Mittelwert und 95 % KI. Mittels zweifaktorieller ANOVA konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen festgestellt werden ($p = 0,615$). Zahl der Familie: 1, Anzahl der Messung pro Familie 3. $\alpha = 0,05$. $N = 28$ ($wt = 13$; $tm1aZfp580 = 15$).

5.4.6 Klebestreifentest

Mit dem Klebestreifentest wurde die sensomotorische Integrität und die motorisch- koordinativen Fähigkeiten der $tm1aZfp580$ gegen wt Mäuse nach MCAo an Tag -5 und 7 auf Unterschiede hin untersucht. Die Zeit des ersten Kontakts wurde als Äquivalent für sensomotorische Defizite mittels gepaarter zweifaktorieller ANOVA in einem separaten Test statistisch analysiert. Die Differenz zwischen Entfernungs- und Kontaktzeit wurde als Repräsentation der sensomotorischen Fähigkeiten interpretiert und statistisch analysiert. 28 Tiere wurden statistisch analysiert ($wt = 13$; $tm1aZfp580 = 15$).

5.4.6.1 Kontaktzeit

Mittels gepaarter zweifaktorieller ANOVA mit $\alpha = 0,05$ wurde die Kontaktzeit vor bzw. nach MCAo auf Unterschiede zwischen den Genotypen analysiert (Abb. 30). Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen festgestellt werden. Dieser war laut Berechnung für nur 2,688 % der Varianz zwischen den Werten verantwortlich. Dies entsprach bei $F(1, 26) = 1,389$ einem p-Wert von 0,249. Nur 0,314 % der Varianz konnten durch die Inter-

aktion von Genotyp und MCAo bei $F(1, 26) = 0,217$ und $p = 0,645$ erklärt werden. Die Intervention in Form der MCAo konnte 8,825 % der Varianz erklären, was bei $F(1, 26) = 6,106$ einem p-Wert von 0,020 entsprach und damit als signifikant bewertet wurde. Dies bestätigte, dass die Intervention ungeachtet des Genotypes auch sieben Tage nach Operation noch zu signifikanten sensorischen Defiziten führte. Auch bei dieser Untersuchung fiel die große Streubreite der Messergebnisse insbesondere nach Intervention ins Auge.

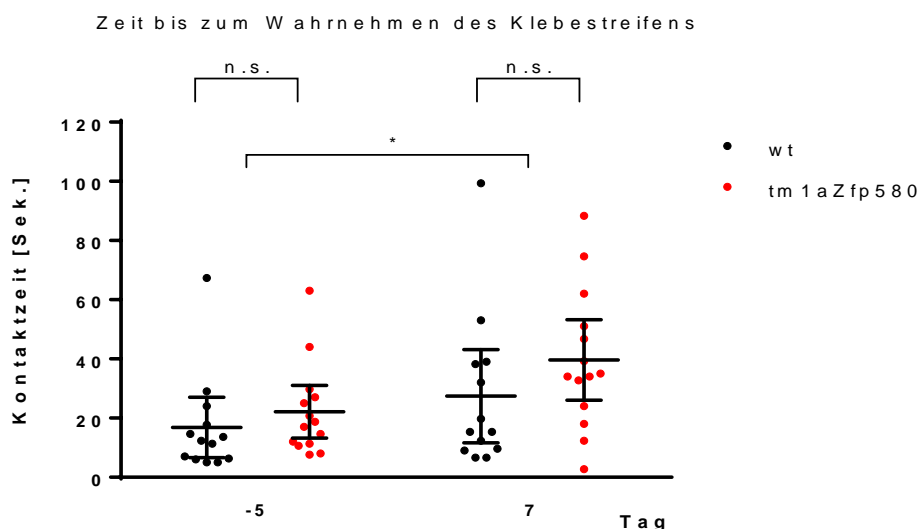


Abbildung 30: Kein Unterschied zwischen den Genotypen in der Wahrnehmung des Klebestreifens.

Durch eine Varianzanalyse mittels gepaarter zweifaktorieller ANOVA konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen festgestellt werden. Ein signifikanter Unterschied zwischen den zwei Messzeitpunkten vor und nach OGD bestätigte, dass die Intervention auch sieben Tage danach noch zu sensorischen Defiziten führte. Es fiel eine große Streubreite in den Messergebnissen insbesondere nach MCAo ins Auge. $N = 28$ ($wt = 13$, $tm1aZfp580 = 15$), Zahl der Familien = 1, Vergleiche pro Familie = 2, $\alpha = 0,05$.

5.4.6.2 Entfernungszeit

Zur Analyse der sensomotorischen Fähigkeiten der $tm1aZfp580$ Mäuse im Vergleich zu ihren wt Geschwistertieren wurde die Zeit von erstem Kontakt bis zum erfolgreichen Entfernen des Klebestreifens analysiert. Sie errechnete sich auch der Differenz zwischen Entfernungszeit und Kontaktzeit (Abb. 31). Die Werte wurden statistisch mittels gepaarter zweifaktorieller ANOVA mit wiederholten Messungen durchgeführt. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen festgestellt werden. Dieser war laut Berechnung für 1,8 %

der Varianz zwischen den Werten verantwortlich. Dies entsprach bei $F(1, 26) = 1,542$ einem p-Wert von 0,225. 0,085 % der Varianz konnten durch die Interaktion von Genotyp und MCAo bei $F(1, 26) = 0,071$ und $p = 0,7921$ erklärt werden. Die Intervention in Form der MCAo konnte 36,29 % der Varianz erklären, was bei $F(1, 26) = 30,39$ einem p-Wert $< 0,0001$ entsprach und damit als hochsignifikant zu bewerten war. Auch dieses Ergebnis legt nahe, dass die MCAo ungeachtet des Genotyps zu deutlichen sensomotorischen Defiziten geführt hatte, was auch sieben Tage nach MCAo deutlich zu bemerken war.

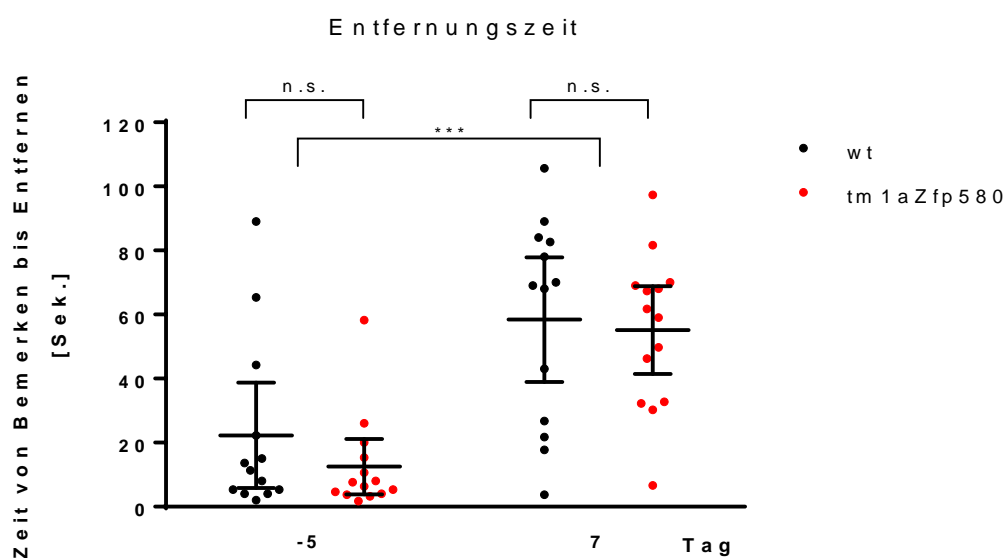


Abbildung 31: Kein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen bei der Entfernung des Klebestreifens.

Durch eine Varianzanalyse mittels gepaarter zweifaktorieller ANOVA konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen festgestellt werden. Ein signifikanter Unterschied zwischen den zwei Messzeitpunkten vor und nach MCAo bestätigte, dass die Intervention ungeachtet des Genotyps auch sieben Tage danach noch zu sensomotorischen Defiziten führte und der KO von Zfp580 zu keinem Vorteil in der funktionalen Rehabilitation führte ($F(1, 26) = 30,39$; $p < 0,0001$). Der Genotyp hatte mit $F(1, 26) = 1,542$ und $p = 0,2254$ keine signifikante Bedeutung für die Varianz der Ergebnisse. Zudem fielen große Unterschiede in den Messergebnissen auf, was auf große interindividuelle Erholung der Einzeltiere hindeutet. $N = 28$ ($wt = 13$, $tm1aZfp580 = 15$), Zahl der Familien = 1, Vergleiche pro Familie = 2, $\alpha = 0,05$.

5.4.7 Eckenrotationstest

Mit dem Eckenrotationstest sollten Defizite in der motorisch-koordinativen Funktion auf Unterschiede zwischen den *tm1aZfp580* Mäusen und *wt* Geschwistertieren sieben Tage nach MCAo untersucht werden. Die Varianzanalyse erfolgte mittels gepaarter zweifaktorieller ANOVA mit den Faktoren Behandlung (MCAo) und Genotyp (Abb. 32). Dabei konnte die Interaktion der beiden Faktoren mit $F(1,26) = 0,045$ lediglich 0,079 % der Varianz erklären, was mit $p = 0,8332$ statistisch nicht signifikant war. Vergleichbar zu den Verhaltenstests machte der Genotyp ($F(1,26) = 0,1917$) ebenfalls nur 0,305 % der Varianz aus ($p = 0,6651$). Trotzdem konnte eine deutliche Lateralisierungstendenz zur betroffenen linken Seite hin beobachtet werden, die sich im Faktor Intervention ($F(1,26) = 7,372$) mit $p = 0,012$ statistisch signifikant niederschlug und ungeachtet des Genotyps 12,89 % der Varianz erklären konnte. Die post hoc Analyse nach Sidak mit einer Familie und zwei Vergleichen pro Familie bei $\alpha = 0,05$ bestätigte das Ergebnis. Auch dieser Test zeigte also, dass kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Phänotypen im Kurzzeitergebnis nach MCAo bestand.

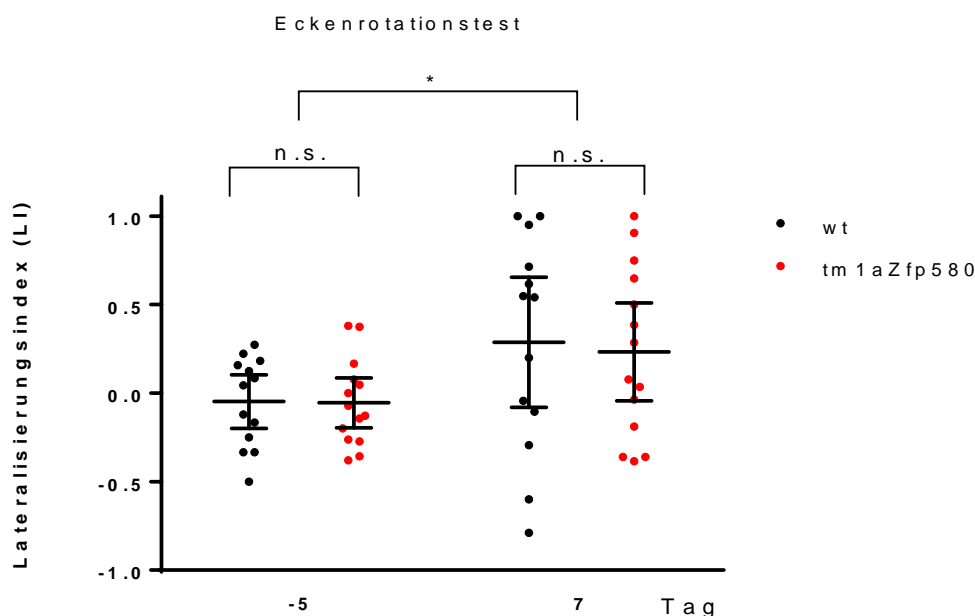


Abbildung 32: Die Lateralisierung nach MCAo ist für beide Genotypen vergleichbar.

Die statistische Analyse erfolgte mittels gepaarter zweifaktorieller ANOVA mit den Faktoren Intervention (MCAo) und Genotyp. Die Interaktion beider Faktoren ($F(1, 26) = 0,045$; Varianzaufklärung 0,079 %; $p = 0,8332$) und der Genotyp ($F(1, 26) = 0,1917$; Varianzaufklärung 0,305 %; $p = 0,6651$) trugen dabei kaum zur Varianz der Werte bei. Die MCAo erklärte mit $F(1, 26) = 7,372$ 12,89 % der Varianz und war mit $p = 0,012$ statistisch signifikant. Zahl

der Familie = 1, Vergleiche pro Familie = 2, $\alpha = 0,05$. $N = 28$ ($wt = 13$; $tm1a(Zfp580) = 15$).

6 Diskussion

6.1 Expression in Neuronen *in vitro*

Diese Arbeit bietet eine Auseinandersetzung mit dem Transkriptionsfaktor Zfp580, der an dieser Stelle zum ersten Mal in Neuronen beschrieben wurde. Zfp580 ist ein C2H2 Zinkfingerprotein aus 172 AS, dessen C-Terminus drei charakteristische Zinkfinger trägt und der für die DNA Bindung zuständig ist, während der N-Terminus prolinreich ist und für Protein-Protein Interaktionen von Bedeutung ist. Diese strukturellen Eigenschaften legen eine Bedeutung in der Vermittlung von Signalen mit der Folge der alternativen Genexpression nahe. Es konnte festgestellt werden, dass Zfp580 in Neuronen der Maus *in vivo* und *in vitro* exprimiert wird. Obwohl sein ubiquitäres Vorhandensein in humanem Gewebe bereits bekannt war (Sun et al., 2010), war die Expression in muralem Gehirngewebe bislang noch nicht untersucht worden. Zudem konnte die Lokalisation des Proteins innerhalb der Neuronen als intranukleär identifiziert werden. Dieser Befund stimmt mit der bisherigen Datenlage zur Lokalisation in HEK Zellen, *Multinukleated Giant Cells* (MGC) und humanen endothelialen Hybridoma Zellen (EA.hy) überein, wo das Protein im Nukleus zu finden war (Luo et al., 2014, Hoffmann et al., 2011, Meng et al., 2014). Meng et al. berichteten, dass der Transkriptionsfaktor in den Zellkernen von humanen Endothelzellen der Aorta zum ersten Mal identifiziert wurde (Meng et al., 2014). Auch Hoffmann et al. fanden den Transkriptionsfaktor im Zellkern von HUVEC Zellen lokalisiert (Hoffmann et al., 2011). Diese Lokalisation ist mit einer Funktion als Transkriptionsfaktor vereinbar. Auch *in vivo* konnte das Vorhandensein von Zfp580 im Gehirn der Maus bestätigt werden.

6.2 Expression *in vivo*

In immunhistochemischen Färbungen von koronaren Gehirnschnitten konnten die *in vitro* Befunde bestätigt werden. Dabei konnte gezeigt werden, dass Zfp580 in Neuronen in allen untersuchten Arealen des Gehirns der Maus qualitativ zu detektieren war. Dieser Befund legt nahe, dass das Protein auch in der Homöostase der Gehirnzellen ungeachtet ihrer spezifischen Funktion oder der Region eine Rolle spielen könnte. Meng et al. zeigten bereits, dass Zfp580 Einfluss auf Proteine des Zellzyklus nimmt (Meng et al., 2014). Das ubiquitäre Vorhandensein in Zellen des Gehirns legt eine solche Aufgabe nahe. Dies ist zudem vereinbar mit der Tatsache, dass Zfp580 evolutionär hochkonserviert in den meisten Spezies vorliegt. Dass Zfp580 in Kardiomyozyten Einfluss auf den Zellzyklus nimmt, untermauert diese Hypothese zusätzlich (Meng et al., 2014). Die hippokampale Expression, die im Vergleich zu den ande-

ren Gehirnbereichen am stärksten war, lässt vermuten, dass das Protein auch eine Rolle in Gedächtnis- und Lernprozessen spielt. Da es sich bei dieser Arbeit um eine erste Charakterisierung des Transkriptionsfaktors im Neuron unter hypoxischem Stress handelt, wurden noch keine Untersuchungen angestrebt, um die intrazelluläre Funktion des Proteins besser zu verstehen. Dass das Protein jedoch in allen Gehirnarealen exprimiert wurde, legt nahe, dass die Funktionen des Proteins in grundlegenden Prozessen der Zellen zu suchen sind.

6.3 Regulation von Zfp580 durch hypoxischen Stress

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine OGD in neuronalen Primärkulturen *in vitro* zu einer raschen und effizienten Reduktion von Zfp580 auf Protein- und auf mRNA Ebene führte. Die Reduktion wurde besonders nach drei, sechs und 24 Stunden auf Proteinebene deutlich. Auch in immunhistochemischen Färbungen von Gehirnschnitten war eine generelle Reduktion des Zfp580 Fluoreszenzsignals nach MCAo zu beobachten. Gegensätzlich dazu konnte in Gesamthirnlysaten von Mäusen nach MCAo eine schnelle Induktion von Zfp580 mRNA ipsi- und kontralateral des Infarktgebietes gezeigt werden. Beide Befunde waren bisher in der Literatur nicht beschrieben. Die aktuelle Studienlage stimmt dahingehend überein, dass Zfp580 durch Hypoxie reguliert wird. Eine verstärkte Expression von Zfp580 in Kardiomyozyten der Ratte durch chronische leichte Hypoxie im Sinne einer hypoxischen Präkonditionierung wurde beschrieben (Meng et al., 2014). Daneben wurde Zfp580 durch akute Ischämie sehr rasch auf RNA- und Proteinebene induziert, was die Autoren schlussfolgern ließ, dass Zfp580 anti-apoptotisch wirkt (Meng et al., 2014). Interessanterweise kam es auch in dieser Studie nach einem längeren Zeitraum zu einer Verringerung der Proteinmenge auf ein Niveau unterhalb der Kontrollkulturen. Diese Tatsache wurde von den Autoren nicht diskutiert, es bleibt zu vermuten, dass auch in diesen Zellen durch die Induktion starker hypoxischer Reize ein Milieu geschaffen wurde, das mit einer Repression von Zfp580, möglicherweise im Kontext der Apoptose-einleitung oder Unterbrechung des Zellzyklus einherging. Verschiedene Arbeiten diskutieren die Rolle des Zfp580 als anti-apoptotischer Mediator. Meng et al. beschrieben, dass Zfp580 ein Signalübermittler von ERK1/2 (*extracellular signal-regulated Kinase*) ist (Meng et al., 2014), ein Protein, das durch Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren die Regulation des Zellzyklus moduliert (Roskoski et al., 2012). Es wurde dargelegt, dass eine akute Ischämie zu einer Induktion von ERK1/2 führt, infolgedessen Zfp580 induziert wird, was schlussendlich durch Inhibition der Caspase 3 anti-apoptotisch wirkt. Mao et al. beschrieben, dass Zfp580 Teil der anti-apoptotischen Kaskade

des TGF- β 1/Smad Signalwegs ist, wobei die Induktion von Zfp580 proportional zur vermehrten Expression von Hif1 α nach Carbonylchlorid-Behandlung und ROS Ausschüttung verlief. Auch hier kam es durch TGF- β 1 Präkonditionierung zu erhöhten Zfp580-Spiegeln, die sich im akuten Stress protektiv auf das Zellüberleben auswirkten (Mao et al., 2017). Interessanterweise wurde auch hier beschrieben, dass zunehmende Hypoxie die anfängliche Mehrexpression von Zfp580 umkehrte und die Proteinmengen reduzierte. Wir sehen darin einen Hinweis darauf, dass die Reduktion von Zfp580 Teil der Stressreaktion des Neurons auf starke Hypoxie ist, während leichte Hypoxie und Präkonditionierung das Protein induziert. Für die erste Charakterisierung des Proteins im Neuron in dieser Arbeit haben wir uns zunächst der Regulation durch starke Hypoxie gewidmet. Dies hatte unter anderem technische Gründe, da eine neuronale Primärkultur sehr viel vulnerabler ist als andere Zellkulturen, was sich u. a. in der Wahl der OGD Zeiten widerspiegelt. Die von uns gewählte 2,5-stündige OGD ging in den Neuronenkulturen mit einem eindeutigen hypoxischen Schaden einher. Die Wahl dieser Zeitspanne ist nicht unüblich (z.B. Harms, 2003; Singh, 2009). Demgegenüber wurden OGDs in nichtneuronalen Zellkulturen weitaus länger durchgeführt (z. B.: Zhang et al., 2016; Xu et al., 2017). Tatsächlich wurden zur Untersuchung von neuronalen Zellen in der Literatur aber auch oft geringere OGD Zeiten gewählt (z. B.: Chen et al., 2016; Kasprowska et al., 2017). Wir wählten den starken hypoxischen Reiz als Ersteinschätzung, weil diesen zu gut objektivierbaren Resultaten wie dem LDH-Anstieg und der Zellzahlreduktion führte. In den Kulturen gibt es eine relativ einheitliche Schädigung der Neuronen, wie es dem Kerngebiet eines Infarktes entsprechen dürfte. Eine Reduktion des Proteins durch die von uns angewandte Hypoxie bestätigte also unsere Hypothese. Gleichzeitig wurde die Vergleichbarkeit unserer Ergebnisse mit den Ergebnissen der bislang veröffentlichten Studien erschwert. Als weiteren Hinweis sehen wir die Induktion von Zfp580 mRNA aus Gesamthirnlysaten nach MCAo. In diesem Gewebe ist anteilig sowohl der stark geschädigte Kern des Infarktes, aber auch die Penumbra enthalten. Diese ist eine Region, in der die Neurone im Randgebiet metabolisch depriviert, aber noch nicht letal geschädigt wurden. Eine Interpretation in einem Lysat, dass dann auch noch gesundes Gewebe enthält, lässt eine eindeutige Zuordnung der mRNA Herkunft von einem Zelltyp und auch die Infarktregion nicht zu. Des Weiteren gibt es auch in das Ischämieareal einwandernde inflammatorische Zellen, die möglicherweise auch Zfp580 mRNA enthalten könnten.

Weitere Arbeiten schrieben Zfp580 eine bedeutsame Rolle in der zellulären Antwort auf andere Stressoren zu. Hoffmann et al. wiesen dessen antiinflammatorische Rolle durch die

Suppression von IL-8 in Endothelzellen nach (Hoffman et al., 2011). Im gleichen Zelltyp wurde Zfp580 als Teil des Smad 2/3 Signalwegs beschrieben, der durch TGF- β Expression induziert wurde (Luo et al., 2014). Eine erhöhte Menge des Proteins wirkte der Ausschüttung von ROS entgegen. Auch im Kontext des Schlaganfalls wurde TGF- β als antiinflammatorisch und neuroprotektiv charakterisiert (Jin et al., 2013). Während also vieles darauf hindeutet, dass Zfp580 ein antiinflammatorischer Mediator ist, ist die Rolle der Inflammation selbst in der Pathophysiologie des Schlaganfalls bis heute nicht eindeutig geklärt. So zeigten Gertz et al., dass das Zytokin IL-6 zwei Tage nach 30-minütiger MCAo durch Interaktion der verschiedenen Zelltypen exponentiell vermehrt und ausgeschüttet wurde und als positiver Verstärker der Angiogenese fungierte, was für den Langzeitverlauf vorteilhaft war (Gertz et al., 2014). Stenzel et al. zeigten, dass sich Znf580, das humane Pendant zu Zfp580, in humanen Monozyten invers zur IL-6 Ausschüttung nach inflammatorischer Reizung durch Lipopolysaccharid (LPS) verhielt: Eine Überexpression von Znf580 verminderte die Ausschüttung von IL-6, RNAi von Zfp580 steigerte diese. Eine schnelle Induktion von Znf580 erfolgte 8 h nach LPS-Stress, welche im Verlauf über 16 h rückläufig war und mit einer Ausschüttung von IL-6 negativ korrelierte (Stenzel et al., 2018). Eine Suppression von Zfp580 nach hypoxischem Stress in neuronalen Kulturen käme also einer induzierten Entzündungsreaktion gleich, was in der Pathophysiologie des Schlaganfalls durchaus denkbar ist. Insbesondere die zeitliche Verzögerung der Reduktion von endogenem Zfp580, die ihre Maxima 6 bzw. 24 h nach OGD erfuhr, macht diese Erklärung plausibel. Im Langzeitverlauf wiederum spielen andere Mechanismen eine Rolle. Als wichtiger Mediator der Angiogenese gilt der *vascular endothelial growth factor*, VEGF. Hypoxischer Stress gilt allgemein als ein direkter Induktor der VEGF Ausschüttung. Sun et al. stellten fest, dass auch Zfp580 als direkter Induktor auf VEGF wirkte und so die Angiogenese positiv beeinflusste (Sun et al., 2010). Auf der anderen Seite gibt es Studien, die besagen, dass hohe VEGF Mengen nach Schlaganfall zu einer Destruktion der Blut-Hirn-Schranke und auf diese Weise zu größeren Ödemen und größerem zellulären Schaden im Periinfarktgebiet führten (Guo et al., 2016). Eine akute Reduktion von Zfp580 kann also im Kontext der zerebralen Hypoxie zum Erhalt der Gewebsintegrität beitragen. Gleichzeitig muss in diesem Kontext das Zusammenspiel der verschiedenen Zelltypen und Faktoren diskutiert werden. So wirkt VEGF primär auf Endothelzellen und TGF- β trägt antiinflammatorisch zur Neuroprotektion bei (Dobolyi, 2012). Die Erhöhung der mRNA von Zfp580 Mengen der Gesamthirnllysate nach MCAo über mehrere Tage könnte also durch das Zusammenspiel der „neurovaskulären Einheit“ (Dirnagl, 2012) zu einer Induktion von

Zfp580 geführt haben, was mit der Schaffung eines antiinflammatorischen Milieus einherging. Tatsächlich zeigten sich auch in manchen unserer Mikroskoppräparate nach MCAo Zfp580 immunreaktive Zellen, die nicht mit dem neuronalen Marker NeuN angefärbt wurden und die möglicherweise auch der mikroglialen Population zugeordnet werden könnten.

Die Untersuchung von zerebralen Endothelzellen (bEnd3, *brain endothelial cells*) in experimentellen Modellen des Schlaganfalls ist Gegenstand der aktuellen Forschung der Arbeitsgruppe. Bisherige Ergebnisse weisen darauf hin, dass das Protein auch in diesem Zelltyp durch Hypoxie herunterreguliert wird. Arbeiten zu Expressionsmustern in Mikroglia liegen nach unserem Wissen bis dato nicht vor.

Ein weiterer Befund dieser Arbeit ist, dass sich die Reduktion von Zfp580 vor allem auf Proteinebene abspielt. Die Reduktion der Zfp580 Proteinmenge konnte sowohl im Western Blot als auch statistisch signifikant in Grauwertanalysen von Immunfluoreszenzaufnahmen dargestellt werden, während in mRNA-Untersuchungen erst nach 24 h eine signifikante Reduktion des Proteins festgestellt werden konnte. Dieser Befund weist darauf hin, dass nicht nur die Expression von Zfp580 modifiziert wurde, sondern das bereits in der Zelle vorliegende Zfp580 posttranslational modifiziert worden sein könnte. Posttranslationale Modifikation (PTM) beinhaltet Modifikationen wie Phosphorylierung, Ubiquitylierung oder SUMOylierung, die dazu führen, dass Zielproteine degradiert, transloziert oder in ihrer Aktivität verändert werden. Die PTM stellt damit eine wirksame Reaktion auf pathophysiologische Reize und zelluläre Stressoren dar (Peters et al., 2018). Prominente Kandidaten der PTM sind Ubiquitin und SUMO. Im Kontext der zerebralen Ischämie hat SUMO großes wissenschaftliches Interesse geweckt. Nicht nur wurde gezeigt, dass die SUMOylierung von Proteinen in Neuronen neuroprotektiv ist (Datwyler et al., 2012), sondern auch, dass sie zu den evolutionär hochkonservierten Mechanismen bestimmter Nagetiere gehört, um einen Winterschlaf mit extrem reduziertem Blutfluss und einer Sauerstoffversorgung unterhalb des ischämischen Niveaus ohne Schaden zu überstehen (Lee et al., 2009). Eine Besonderheit der SUMOylierung ist auch deren Reversibilität, da die Konjugation durch spezifische Proteasen wieder aufgehoben werden kann. Dieser dynamische Prozess, auch SUMO-Kreislauf genannt, spielt auch in physiologischen Prozessen eine wichtige Rolle. Einige hundert Zielproteine wurden nachgewiesen, besonders viele davon im Nukleus, ein großer Anteil davon sind Transkriptionsfaktoren (Bernstock et al., 2018). Interessanterweise konnte auch in der Sequenz des Zfp580 Proteins eine SUMO-Bindungsstelle gefunden werden: das Lysin in Position 31 des Proteins und die beiden Serine in Position 36 und 37 bilden eine SUMO Bindungsstelle und sog. *Phosphorylation-dependent Sumoylation motifs* (PDSMs), SUMO-Bindungspartner, de-

ren Konjugation von der Phosphorylierung der Aminosäuren abhängen. Unveröffentlichte Untersuchungen aus der Arbeitsgruppe in einem anderen Zelltyp weisen darauf hin, sodass es denkbar erscheint, dass die schnelle Regulierung von Zfp580 durch SUMOylierung als Teil einer hochkonservierten und -effizienten zellulären Stressantwort geschieht.

In Mikroskopiepräparaten von Gehirnen der Maus nach MCAo konnten die *in vitro* Befunde bestätigt werden: Im Infarktkern und im Periinfarktgebiet konnte dabei eine stark reduzierte Zfp580 Expression beobachtet werden. Das verminderte Fluoreszenzsignal konnte dabei im Falle des Kerns unter anderem durch den generellen Verlust von Zellmasse erklärt werden, im Randbereich aber, wo die Zellen gut ihrem neuronalen Ursprung zugeordnet werden konnten und den neuronalen Marker exprimierten, war die Signalminderung am ehesten durch eine Verminderung der Proteinmenge zu erklären. Interessanterweise war die Signalminde- rung über den ganzen Ghirnschnitt hinweg zu beobachten. Wir erklären uns dieses Ergebnis am ehesten durch generell schwache Signalstärke, die nicht zuließ, dass dezente Expressions- unterschiede visuell sichtbar wurden. Trotzdem bestätigte das Ergebnis sowohl die *in vitro* Reduktion, die mit dem Infarktkern und -randbereich der Mikroskopiepräparate vergleichbar ist, als auch die Mengensteigerung aus Ganzhirnlysaten zumindest dahingehend, dass die Ex- pression von Zfp580 ungeachtet der Hemisphäre beeinflusst war.

6.4 Resilienzsteigerung durch Zfp580-Reduktion

Wir konstruierten in lentivirale Vektoren eingebettete miR-shRNA gegen Zfp580, die eine neuronenspezifische Reduktion der Gendosis bei bizistronischer EGFP-Expression bewirkte. Diese Methode gilt als gut etabliertes und effizientes Werkzeug, die dank hoher Flexibilität und kurzfristiger Modifikation sehr gut geeignet ist, um die Folgen der Reduktion des Pro- teins auf das neuronale Überleben nach OGD zu untersuchen. Wir konnten zeigen, dass die Reduktion des Proteins unter Normalbedingungen und leichtem (Wasch)stress nicht zu einer größeren Vulnerabilität der primären kortikalen Neuronenkulturen führte, obwohl die miR- shRNA vermittelte Reduktion des Proteins zu einer rund 80-prozentigen Reduktion der mRNA Dosis führte und damit hocheffizient war. Dieser Befund stellte nicht nur eine wichti- ge Grundvoraussetzung für alle weiteren Untersuchungen dar, sondern wies in unseren Au- gen auch darauf hin, dass die Hauptfunktion des Proteins weniger in der Homöostase der Zel- le unter Normalbedingungen, als vielmehr in der Reaktion der Zelle auf externe Stressoren zu suchen ist. Dieser Befund ist konkordant zum aktuellen Stand der Forschung, die den Tran- skriptionsfaktor als umweltsensibel charakterisiert (z. B.: Hoffmann et al., 2012; Meng et al.,

2014). Danach konnten wir zeigen, dass diese Reduktion der Zfp580 durch lentiviral transduzierte miR-shRNA zum signifikant besseren neuronalen Überleben nach OGD führte. Diesen Befund werten wir als Bestätigung, dass es sich bei der Reduktion des Proteins *in vivo* und *in vitro* im Kontext experimenteller Modelle des Schlaganfalls um einen endogenen neuroprotektiven Mechanismus handelt, dessen Funktion und weitere Mediatoren bislang noch nicht bekannt sind. Folgende Vermutungen sind plausibel: Zum einen könnte es sein, dass die Reduktion von Zfp580 in den neuronalen Kulturen einen präkonditionierenden Effekt bezüglich der akuten Hypoxie hatte. So konnten auch Meng et al. zeigen, dass eine Stresspräkonditionierung durch intermittierende Höhenhypoxie (*Intermittend high altitude hypoxia*) Zfp580-vermittelt zu einem signifikant besseren Überleben von Kardiomyozyten nach akuter Hypoxie führte (Meng et al., 2014). Es ist also möglich, dass die Herunterregulation des Transkriptionsfaktors in Neuronen an DIV0 endogene Reaktionen in Gang gesetzt hat, die einer Stressreaktion ähnlich waren, was im Falle der akuten Hypoxie zu einer besseren Toleranz führte. Die von Stenzel et al., beschriebene inverse Regulation von IL-6 durch Znf580 unterstützt diese These dahingehend, dass die Reduktion von Zfp580 durch RNAi eine entsprechende Entzündungsreaktion hervorgerufen haben könnte, die gemäß einer Präkonditionierung protektiv auf das Überleben der Zellkulturen nach OGD geführt haben könnte (Stenzel et al., 2018). Interessanterweise wurde zudem bereits eine stressinduzierte Regulation von Zfp580 durch endogene miRNA diskutiert, da Zfp580 in seiner 3'UTR Bindungsstellen für miRNA-1 und miRNA-206 besitzt, zwei prominenten Vertretern aus der Familie der endogenen miRNA (Meng et al., 2014). Diesen wurde u. a. eine regulatorische Rolle in der myokardialen Ischämie zugeschrieben (Shan et al., 2009). Untersuchungen der miRNA-1 im Kontext der zerebralen Ischämie wiesen deren pro-apoptischen Charakter auf, sodass die Reduktion von miRNA-1 zu einem besseren neuronalen Überleben nach OGD führte (Chang et al., 2016) Es ist also davon auszugehen, dass lentivirale Suppression von Zfp580 durch exogene miR-shRNA endogene neuroprotektive Mechanismen imitierte, die das signifikant bessere Ergebnis erklären. Weiterhin gehen wir davon aus, dass die Neuronenspezifität der miR-shRNA durch den Synapsinpromotor eine entscheidende Rolle gespielt hat. Aus Untersuchungen der Arbeitsgruppe ist bekannt, dass der Anteil der Astrozyten in den neuronalen Primärkulturen bei 10 - 20 % liegt (Bösel et al., 2005). Diese Zellen konnten Zfp580 weiterhin exprimieren. Die Rolle von Zfp580 in Astrozyten ist bislang unerforscht. Es ist jedoch denkbar, dass ein synergistischer Effekt aus Reduktion von Zfp580 in Neuronen und Vorhandensein in Astrozyten mit antiinflammatorischem Effekt zu einem besseren neuronalen Überleben beigetragen hat. Ein denkbarer Mechanismus wären die antiinflammatorischen Eigenschaften von

Zfp580, die bereits in Endothelzellen nachgewiesen wurden (Luo et al., 2014). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass TGF- β und Smad2 induzierte Suppression von Zfp580 einen positiven Effekt auf die Homöostase von Endothelzellen hat. Im Kontext der zerebralen Ischämie ist bekannt, dass die Überexpression von TGF- β zu geringeren Infarktvolumina führte (Pang et al., 2001). Eine astrozytenvermittelte Suppression von Zfp580, die mit besserem neuronalen Überleben einhergeht, ist also denkbar.

6.5 Einfluss von genomischer Ablation von Zfp580 auf Infarktvolumen und Analyse der funktionellen Defizite

Die Befunde aus den *in vitro* Untersuchungen mit miR-shRNA vermittelter Gendosisreduktion von Zfp580 konnten *in vivo* anhand von MCAo Versuchen mit tm1aZfp580 Tieren nicht bestätigt werden. Hier zeigte sich, dass der konstitutive Verlust von Zfp580 keinen Effekt auf das Kurzzeitüberleben oder das funktionelle Ergebnis nach MCAo im Vergleich zu den wt Tieren hatte. Einige Gründe sind hierfür zu diskutieren. Als Erstes ist anzuführen, dass das Protein schon in der Embryonalentwicklung der Tiere fehlte. Da nicht auszuschließen ist, dass Zfp580 eine wichtige Rolle in der Entwicklung und Differenzierung spielt ist auch nicht bekannt, ob endogene Kompensationsmechanismen den Verlust ausgeglichen haben und andere Mediatoren die Rolle von Zfp580 in den KO Mäusen ersetzen. Hierfür spricht, dass sich die tm1aZfp580 Tiere nicht von ihren wt Geschwistern unterschieden. Die Datenlage in Endothelzellen weist darauf hin, dass das Protein dort eine entscheidende Rolle in der Differenzierung und Proliferation dieses Zelltyps hat (Meng et al. 2014). Wei et al. konnten die Zfp580-vermittelte Induktion von VEGF im Sinne der Gefäßproliferation zuschreiben (Wie et al., 2015). Eine Interaktion von Znf580 (das humane Pendant zu Zfp580) mit 14 Proteinen in einer Analyse der cDNA-Gendatenbank fötaler menschlicher Gehirne wurde beschrieben (Luo et al., 2014). Wird also davon ausgegangen, dass Zfp580 in der Gehirnentwicklung eine Rolle spielt, so ist zu vermuten, dass diese Mechanismen entweder durch endogene Mechanismen kompensiert wurden oder die KO Tiere funktionelle oder strukturelle Defizite vorwiesen, die phänotypisch nicht zum detektierbar waren. Des Weiteren betraf der KO alle Zelltypen des gesamten Organismus. So fehlte Zfp580 auch in Endothelzellen, wo es eine wichtige Rolle in der Stammzellendifferenzierung (Wei et al., 2018), Proliferation und Angiogenese von Endothelzellen spielt (Sun et al., 2010). Ein Fehlen von Zfp580 in Endothelzellen würde demnach zu einer verminderten Angiogenese und daher zu weniger Kollateralisierung des Gefäßnetzwerkes führen, was im Falle der MCAo mit einer erhöhten Vulnerabilität ein-

herginge. Das ubiquitäre Fehlen des Proteins hat also möglicherweise zu einer Maskierung der neuroprotektiven Effekte geführt. Um dies zu verhindern müsste mit zelltypspezifischen KO Mäusen gearbeitet werden, um herauszufinden, wie sich das isolierte Fehlen des Proteins in einem Zelltyp auf das organische Gesamtgefüge auswirkt. Ein weiterer Grund für die unterschiedlichen Ergebnisse kann auch in der Menge des noch vorhandenen Proteins liegen. Während die miR-shRNA zu einer mRNA Reduktion um 80% führte, so war Zfp580 in den tm1aZfp580 Zellen nicht exprimiert. Auch trunktierte Proteine können hier nicht exprimiert werden, da nur ein Exon vorliegt, dass durch loxP Sequenzen flankiert und entfernt wird. Es ist davon auszugehen, dass das absolute Fehlen des Transkriptionsfaktors mit einem veränderten intrazellulären Milieu einherging, sodass auch Gene, die durch Zfp580 induziert oder reprimiert werden, in verändertem Maße vorlagen. Gemäß Stenzel et al. sowie unveröffentlichten Untersuchungen aus der Arbeitsgruppe handelt es sich bei Zfp580 um einen Repressor der Transkription handelt (Stenzel et al., 2018). Dies bedeutet, dass das Protein im Regelfall an Promotoren der Zielgene bindet und deren Expression reprimiert. Eine physiologische Reduktion von Zfp580 im Rahmen von hypoxischem Stress würde demnach die Expression der Zielgene also steigern. Eine Disinhibition und damit Änderung der transkriptionellen Musters kann allerdings nur durch das Vorhandensein des Repressors, also Zfp580, in der Zelle stattfinden. Wir gehen also davon aus, dass der konstitutive KO von Zfp580 dazu führte, dass Zielgene im Falle des akuten hypoxischen Stresses nicht mehr disinhibiert werden konnten und eine Stressantwort auf diese Weise ausblieb. Das neutrale Abschneiden in Verhaltenstests nach MCAo zwischen den Genotypen könnte auch noch einen anderen Grund haben: die Schädigung der Tiere durch die Operation war unerwartet groß und überschritt das Volumen der Schädigung um mehr als doppelte (ca. 18-20 mm³ ödemkorrigiertes Schadensvolumen nach 30-minütigem Verschluss statt ca. 43 mm³ ödemkorrigierten Volumens, siehe Abb. 27). Ist eine Schädigung so ausgeprägt, könnte es sich also auch um einen Deckeneffekt handeln; ein neuroprotektiver Effekt kann immer nur in der Penumbra, jedoch nicht im Infarkt kern selber neuronales Überleben beeinflussen. Das könnte bedeuten, dass bei einer kürzeren Verschlusszeit der mittleren Zerebralarterie eine Veränderung der Resilienz der Neuronen durch den Genotyp erkennbar wäre. Warum hier die Operation mit 30-minütiger Verschlusszeit derart ausgeprägte Infarkte auslöste, kann nur spekuliert werden und könnte auch auf einem technischen Fehler beruhen, der uns bislang verborgen geblieben ist (Temperaturkontrolle, Anästhesie, Metabolismus der Tiere, Filamentbatch, Operateur, genetischer Hintergrund der Tiere etc.). In Folgestudien sollten konditionale KO Tieren untersucht werden. Das bedeutet, dass durch die Fusion des Cre-Enzyms an einen tamoxifen-sensiblen Estrogenrezeptor eine

pharmakogenetische Ablation von Neuronen wenige Tage vor dem Beginn des Experimentes im erwachsenen Tier erfolgen könnte. Der kurzfristige KO würde verhindern, dass das Fehlen des Proteins durch alternative Mechanismen in der Embryonalentwicklung kompensiert wird. Die Arbeit mit dem *tm1a*-Mausmodell ermöglicht uns, solche Tiere durch Kreuzung mit anderen Mauslinien zu erzeugen. Dies könnte Forschungsarbeit der nächsten Jahre sein. Beim Vergleich der Infarkt volumina fiel neben der unerwarteten Größe der Infarkte auch auf, dass die Infarkte beider Gruppen meistens auch das Stromgebiet der A. cerebri posterior betrafen. Wurden die Infarkte der Tiere verglichen, deren Ischämien sich auf das Stromgebiet der A. cerebri media beschränkten, konnten signifikant größere Infarkte in den *tm1aZfp580* Tieren festgestellt werden. Dies könnte bedeuten, dass entweder die Kollateralisierung des Mediatoromgebietes der *tm1aZfp580* Tiere zwischen den Genotypen variierte bzw. schlechter ausgeprägt war in der KO oder die Blutgerinnung der Tiere zwischen den Genotypen zu einer prothrombogenen Veränderung führte, die bei dem Vergleich der Vulnerabilität der Neurone in Kultur natürlich keine Rolle spielen kann. Eine weitere mögliche Erklärung ist der Zeitpunkt der Verhaltenstestung. Die starke Regulation von *Zfp580* nach Hypoxie erfolgte sehr kurz nach dem ischämischen Stress. Zudem konnten die *in vivo* mRNA Analysen nach MCAo zeigen, dass die Regulation von *Zfp580* schon nach drei Tagen wieder auf ein Normalniveau gesunken war. Es ist also durchaus denkbar, dass sieben Tage nach erfolgter MCAo ein potenziell besseres neuronales Überleben oder eine kleinere Infarktgröße durch andere defizitäre Mechanismen des fehlenden *Zfp580* überlagert worden waren, wie zum Beispiel eine stärkere pro-inflammatorische Stressantwort auf die MCAo. Schlussendlich gehen wir davon aus, dass das neutrale Ergebnis der Komplexität des biologischen Systems geschuldet ist und durch die bisher nicht ausreichende Zuordnung der Effekte von *Zfp580* in einzelnen Zelltypen der neurovaskulären Einheit des Tiermodells zu erklären ist.

7 Fazit

Ziel dieser Dissertation war es, den Transkriptionsfaktor Zfp580 erstmals in Neuronen und im Kontext der akuten Hypoxie zu untersuchen. Es wurde dargelegt, dass Zfp580 ubiquitär in Neuronen exprimiert wird und durch *in vivo* und *in vitro* Modelle der akuten Ischämie im Sinne einer endogenen Stressantwort reduziert wird. Des Weiteren wurde festgestellt, dass die kurzfristige RNAi vermittelte Reduktion des Proteins einen neuroprotektiven Effekt *in vitro* aufwies, der sich in konstitutionellen tm1aZfp580-KO-Tieren *in vivo* nicht bestätigen ließ. Damit stellt Zfp580 einen interessanten Kandidaten für weitere Untersuchungen im Sinne der Resilienzsteigerung nach Hypoxie dar.

8 Ausblick

In dieser Arbeit wurde erstmals gezeigt, dass Zfp580 im Kontext der Hypoxie auf neuronaler Ebene reguliert wird und die Regulation des Proteins sich in der neuronalen Primärkultur vorteilhaft auf das Zellüberleben auswirkt. Demnach erachten wir es als sinnvoll das Protein in weiteren Studien noch näher zu untersuchen

Als Erstes bleibt zu klären, welcher Mechanismus hinter der schnellen und effizienten Reduktion der Zfp580 mRNA- und Proteine führte. Wir hypothetisieren, dass es sich dabei um eine posttranslationale Modifikation durch SUMO handelt, die Zfp580 durch Mechanismen wie Translokation aus dem Kern oder inaktivierende Bindung weniger verfügbar macht.

Als nächsten Schritt wäre interessant zu untersuchen, welche Mediatoren in Neuronen durch Zfp580 beeinflusst werden. Dies könnte zunächst durch Analysen des gesamten Transkriptomts wie RNA-Sequenzierung oder Proteomics erfolgen. Diese Methode würde erlauben, den Transkriptionsfaktor in einen breiteren Kontext einordnen zu können.

Soweit uns bekannt, stellt diese Studie erste Untersuchungen des Zfp580 in Neuronen im Kontext der zerebralen Ischämie dar. Die Tatsache, dass das Protein in experimentellen Modellen des Schlaganfalls in Neuronen herabreguliert wird und dessen exogene kurzfristige Suppression neuroprotektiv ist, macht es zu einem attraktiven Ziel, um das Gehirn im Falle der Hypoxie stressresistenter zu machen. Es bleibt zu untersuchen, welche Mediatoren zur Suppression des Proteins in der akuten Hypoxie führen. Mögliche Kandidaten sind SUMO im Sinne einer posttranslationalen Modifikation oder miRNA-1 im Sinne einer endogenen mRNA-Degradierung. Auch bleibt bislang offen, welche Moleküle durch Zfp580 beeinflusst werden. Mögliche Kandidaten aus der Literatur beinhalten Mediatoren der Apoptose wie Caspase-3 oder Hif1 α sowie pro-inflammatorische Mediatoren wie IL-6 oder TGF- β . Zudem

könnte untersucht werden, inwiefern die Orchestrierung der Zfp580-vermittelten Signale verschiedener Zelltypen einem vorteilhaften oder schädlichen Effekt auf ein Langzeitüberleben nach zerebraler Hypoxie haben.

9 Literaturverzeichnis

- Adams HP Jr, Bendixen BH, Kapelle LJ, Biller J, Love BB, Gordon DL, Marsh. EE 3rd. 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*. 1993 Jan;24(1):35-41.
- Allen Mouse Brain Atlas [Internet]. Seattle (WA): Allen Institute for Brain Science. c2017 [zitiert am 29.11.2018]. Verfügbar unter: <https://mouse.brain-map.org/>
- Apweiler R, Bairoch A, Wu CH, Barker WC, Boeckmann B, Ferro S, Gasteiger E, Huang H, Lopez R, Magrane M, Martin MJ, Natale DA, O'Donovan C, Redaschi N, Yeh LSL. UniProt: the Universal Protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res*. 2004 Nov;32 [Database issue]:D115-9.
- Ayadi A, Birling MC, Bottomley J, Bussell J, Fuchs H, Fray M, Gailus-Turner M, Greenaway S, Houghton R, Karp N, Leblanc S, Lengger C, Maier H, Mallon AM, Marschall S, Melvin D, Morgan H, Pavlovic G, Ryder E, Skarners WC, Selloum M, Ramirez-Solis R, Sorg T, Teboul L, Vasseur L, Walling A, Weaver T, Wells S, White JK, Bradley A, Adams DJ, Steel KP, Hrabě de Angelis M, Brown SD, Herault Y. Mouse large-scale phenotyping initiatives: overview of the European Mouse Disease Clinic (EUMODIC) and of the Wellcome Trust Sanger Institute Mouse Genetics Project. *Genome*. 2012 Oct;23:600-10. doi:10.1007/s00335-0129418-y.
- Azad TD, Veeravagu A, Steinberg GK. Neurorestoration after stroke. *Neurosurg Focus*. 2016 May;40(5):E2. doi:10.3171/2016.2.FOCUS15637.
- Balkaya M, Kröber J, Gertz K, Peruzzaro S, Endres M. Characterization of long-term functional outcome in a murine model of mild brain ischemia. *J Neurosci Methods*. 2013 Mar;15;213(2):179-87.
- Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004 Jan 23;116:281-97.
- Bernstock JD, Yang W, Ye DG, Shen Y, Pluchino S, Lee YJ, Hallenbeck JM, Paschen W. SUMOylation in brain ischemia: Patterns, targets, and translational implications. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2018 Jan;38(1):5-16.

BLOCK-iT™ RNAi Designer [Internet]. Waltham(MA): Thermo Fisher Scientific; c2009 [zitiert am 13.11.2018]. Verfügbar unter: <https://rnaidesigner.thermofisher.com/rnaiexpress/>.

Bösel J, Gandor F, Harms C, Synowitz M, Harms U, Djoufack PC, Megow D, Dirnagl U, Hörtnagl H, Fink KB, Endres M. Neuroprotective effects of atorvastatin against glutamate-induced excitotoxicity in primary cortical neurones. *J Neurochem*; 2005 Mar;92(6):1386-1398. doi: 10.1111/j.1471-4159.2004.02980.x.

Brayer K, Segal DJ. Keep Your Fingers Off My DNA: Protein-Protein Interactions Mediated by C2H2 Zinc Finger Domains. *Cell Biochem Biophys*. 2008;50:111-31. doi:10.1007/s12013-008-9008-5.

Caggiu E, Paulus K, Mameli G, Arru G, Sechi GP, Sechi LA. Differential expression of miRNA 155 and miRNA 146a in Parkinson's disease patients. *eNeurologicalSci*. 2018 Dec;13:1-4. doi:10.1016/j.ensci.2018.09.002.

Chang CY, Lui TN, Lin JW, Lin YL, Hsing CH, Wang JJ, Chen RM. Roles of microRNA-1 in hypoxia- induced apoptotic insults to neuronal cells. *Arch Toxicol*. 2016 Jan;90:191-202. doi:10.1007/s00204-014-1364-x.

Chen H, Lin W, Zhang Y, Lin L, Chen J, Zeng Y, Zheng M, Zhuang Z, Du H, Chen R, Liu N. IL-10 Promotes Neurite Outgrowth and Synapse Formation in Cultured Cortical Neurons after the Oxygen-Glucose Deprivation via JAK1/STAT3 Pathway. *Sci Rep*. 2016 Jul;6:30459. doi:10.1038/srep30459.

DanLi R, HeKong W, JiQin L, MingHua Z, Wencheng Z. ROS-induced ZNF580 expression: a key role for H₂O₂/NF-κB signaling pathway in vascular endothelial inflammation. *Mol Cell Biochem*. 2012 Jan;359:183-91.

Dätwyler AL, Lättig-Tünnemann G, Yang W, Paschen W, Lee SLL, Dirnagl U, Endres M, Harms C. SUMO2/3 conjugation is an endogenous neuroprotective mechanism. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2011 Nov;31(11):2152-59.

Dätwyler, Anna Lena: SUMOylation is an endogenous neuroprotective mechanism in stroke. [Dissertation]. Berlin: Medizinische Fakultät Charité Universitätsmedizin Berlin, 2012.

Davis MPA, Abreu-Goodger C, van Dongen S, Lu D, Tate PH, Bartonicek N, Kutter C, Liu P, Skarnes WC, Enright AJ, Dunham I. Large Scale Identification of MicroRNA Tar-

- gets in Murine Dgcr8-Deficient Embryonic Stem Cell Lines. PLoS ONE. 2012 Aug;7(8):e41762. doi:10.1371/journal.pone.0041762.
- Dirnagl U, Iadecola C, Moskowitz MA. Pathobiology of ischaemic stroke: an integrated view. Trends Neurosci. 1999 Sep;22:391-97.
- Dirnagl U, Becker K, Meisel A. Preconditioning and tolerance against cerebral ischaemia. Lancet Neurol. 2009 Apr;8(4):398-412.
- Dirnagl U. Pathobiology of injury after stroke: the neurovascular unit and beyond. Ann N Y Acad Sci. 2012 Sep;1268:21-5. doi:10.1111/j.1749-6632.2012.06691.x.
- Dittgen T, Nimmerjahn A, Komai S, Licznanski P, Waters J, Margrie TW, Helmchen F, Denk W, Brecht M, Osten P. Lentivirus-based genetic manipulations of cortical neurons and their optical and electrophysiological monitoring in vivo. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2004 Dec 28;101(52):18206-18211. doi:10.1073/pnas.0407976101.
- Dobolyi A, Vincze C, Pál G, Lovas G. The Neuroprotective Functions of Transforming Growth Factor Beta Proteins. Int J Mol Sci. 2012 Jul;13(7):8219-8258.
- Donath S, An J, Lee SL, Gertz K, Datwyler AL, Harms U, Müller S, Farr TD, Fuchtemeier M, Lättig-Tünnemann G, Lips J, Foddiss M, Mosch L, Bernard R, Grittner U, Balkaya M, Kronenberg G, Dirnagl U, Endres M, Harms C. Interaction of ARC and Daxx: A Novel Endogenous Target to Preserve Motor Function and Cell Loss after Focal Brain Ischemia in Mice. J Neurosci. 2016 Aug;36(31):8132-48.
- Endres M. Statins and Stroke. J Cereb Blood Flow Metab. 2005 Sep;25(9):1093-1110.
- Engel O, Kolodziej S, Dirnagl U, Prinz V. Modeling Stroke in Mice - Middle Cerebral Artery Occlusion with the Filament Model. J Vis Exp. 2011;(47):2423. doi:10.3791/2423.
- Fluri F, Schuhmann MK, Kleinschnitz C. Animal models of ischemic stroke and their application in clinical research. Drug Des Devel Ther. 2015 Jul 2;9:3445-3454. doi:10.2147/DDDT.S56071.
- Freyer D, Harms C. Kinetic Lactate Dehydrogenase Assay for Detection of Cell Damage in Primary Neuronal Cell Cultures. Bio-protocol. 2017;7(11):e2308.
- Gao XY, Zhu SZ, Xiang W, Huang KB, Hu YF, Gu Y, Pan SY. Prolonged hypothermia exposure diminishes neuroprotection for severe ischemic-hypoxic primary neurons. Cryobiology. 2016 Apr;72(2):141-7. doi:10.1016/j.cryobiol.2016.01.003.

- GBD 2015 Neurological Disorders Collaborator Group. Global, regional, and national burden of neurological disorders during 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet Neurol.* 2017 Nov;16(11):877-897. doi:10.1016/S1474-4422(17)30299-5.
- Gertz K, Kronenberg G, Kälin RE, Baldinger T, Werner C, Balkaya M, Eom GD, Hellmann-Regen J, Kröber J, Miller KR, Lindauer U, Laufs U, Dirnagl U, Heppner FL, Endres M. Essential role of interleukin-6 in post-stroke angiogenesis. *Brain.* 2012 Jun;135(Pt 6):1964-1980. doi:10.1093/brain/aws075.
- Guo H, Zhou H, Lu J, Qu Y, Yu D, Tong Y. Vascular endothelial growth factor: an attractive target in the treatment of hypoxic/ischemic brain injury. *Neural Regen Res.* 2016 Jan;11(1):174-9. doi:10.4103/1673-5374.175067.
- Hankey GJ. Stroke. *Lancet.* 2017 Feb;389:641-54.
- Harms CF. Endogene systeme der Neuroprotektion. Charakterisierung von Melatonin und 17-Beta-Estradiol in neuronalen Primärkulturen der Ratte [Dissertation]. Berlin: Medizinische Fakultät Charité Universitätsmedizin Berlin, 2003.
- Hoffmann CJ, Hohberg M, Chlench S, Maroski J, Drab M, Siegel G, Pries AR, Zakrzewicz A. Suppression of zinc finger protein 580 by high oxLDL/LDL-ratios is followed by enhanced expression of endothelial IL-8. *Atherosclerosis.* 2011 May;216(1):103-8. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2011.01.017
- Hoffman CJ, Harms U, Rex A, Szulzewsky F, Wolf SA, Grittner U, Lättig-Tünnemann G, Sendther M, Kettenmann H, Dirnagl U, Endres M, Harms C. Vascular Signal Transducer and Activator of Transcription-3 Promotes Angiogenesis and Neuroplasticity Long-Term After Stroke. *Circulation.* 2015 Mar;131(20):1772-82. doi: <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.114.013003>.
- Holloway PM, Gavins FN. Modeling Ischemic Stroke In Vitro: Status Quo and Future Perspectives. *Stroke.* 2016 Feb;47(2):561-9.
- Jin R, Liu L, Zhang S, Nanda A, Li G. Role of inflammation and its mediators in acute ischemic stroke. *J Cardiovasc Transl Res.* 2013 Oct;6(5):834-51.
- Kang Y, Wu Z, Cai, Lu B. Evaluation of reference gene expression studies in mouse and N2a cell ischemic stroke model using quantitative real-time PCR. *BMC Neuroscience.* 2018 Feb;19(1):3. doi:10.1186/s12868-018-0403-6.

- Kasprowska D, Machnik G, Kost A, Gabryel B. Time-Dependent Changes in Apoptosis Upon Autophagy Inhibition in Astrocytes Exposed to Oxygen and Glucose Deprivation. *Cell Mol Neurobiol.* 2017 Mar;37(2):223-234. doi:10.1007/s10571-0160363-2.
- Knoll T, Narayanan S, Coven A, Kmoch J, Byer S, Williams R, et al. Photoshop CS3 Extended [software]. Version 10.0. San Jose: Adobe Systems Incorporated; 2007.
- Kobayashi Y, Umemoto T, Takeshita Y, Kohyama N, Ohbayashi M, Sanada Y, Yamamoto T. Functional Characterization and substrate specificity of a novel gene encoding zinc finger-like protein, ZfLp, in *Xenopus laevis* oocytes. *J.Toxicol.Sci.* 2012;37(4):699-709.
- Koch S, Mueller S, Foddiss M, Bienert T, v.Elverfeldt D, Knab F, Farr TD, Bernard R, Dopatka M, Rex A, Dirnagl U, Harms C, Boehm-Sturm P. Atlas registration for edema-corrected MRI lesion volume in mouse stroke models. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2019 Feb;39(2):313-323. doi:10.1177/0271678X17726635.
- Krishna SS, Majumdar I, Grishin NV. Structural classification of zinc fingers: Survey and Summary. *Nucleic Acids Research.* 2003 Jan 15;31(2):532-50. doi:10.1093/nar/gkg161.
- Kunz A, Dirnagl U, Mergenthaler P. Acute pathophysiological processes after ischaemic and traumatic brain injury. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol.* 2010 Dec;24:495-509.
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementary to *lin.14*. *Cell.* 1993 Dec 3;75(5):843-54.
- Lee YJ, Castri P, Bembry J, Maric D, Auh S, Hallenbeck JM. SUMOylation participates in induction of ischemic tolerance. *J Neurochem.* 2009 Apr;109(1):257-67.
- Leica Microsystems. Leica Application Suite X [software]. Version 3.1.2. Wetzlar: Leica Microsystems; 2019.
- Linton Instrumentation [Internet]. Products: 47600 – Mouse Rota-Rod. c2011 [zitiert am 28.10.2018]. Linton Instrumentation. Verfügbar unter: http://www.lintoninst.co.uk/Products/tabid/63/ProdID/291/Language/en-US/47600__Mouse_RotaRod.aspx.
- Luo Y, Zhao Y, Xiaodong L, Zhao J, Zhang W. ZNF580 mediates eNOS expression and endothelial cell migration/proliferation via the TGF- β 1/ALK5/Smad2 pathway. *Mol Cell Biochem.* 2014 Aug;393(1-2):199–207. doi:10.1007/s11010-0142061-z.

- Mackay J, Mensah G, Mendis S, Greenland K. In: World Health Organization. The atlas of heart disease and stroke. Geneva, Schweiz: World Health Organization. 2004 [zitiert 18.05.2018]. Verfügbar auf: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/43007/9241562768.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
- Mao SY, Meng XY, Xu ZW, Zhang WC, Jin XH, Chen X, Li YM, Xu RC. The role of ZFP580, a novel zinc finger protein, in TGF-mediated cytoprotection against chemical hypoxia-induced apoptosis in H9c2 cardiac myocytes. *Mol Med Rep*. 2017 Apr;15:2154-62. doi:10.3892/mmr.2017.6236.
- Meng X-Y, Yu H-l, Zhang W-C, Wang T-H, Mai X, Mai X, Liu H-T, Xu R-C. ZFP580, a Novel Zinc Finger Transcription Factor, Is Involved in Cardioprotection of Intermittent High-Altitude Hypoxia against Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury. *PLoS ONE*. 2014 Apr;9(4):e94635. doi:10.1371/journal.pone.0094635.
- Milo R, Jorgensen P, Moran U, Weber G, Springer M. BioNumbers—the database of key numbers in molecular and cell biology. *Nucleic Acids Res*. 2010 Jan;38[database issue]:D750-3. doi: 10.1093/nar/gkp889.
- Ncbi gene¹. Sdha succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein (Fp) [Mus musculus (house mouse)]. Bethesda: National Center for Biotechnology Information (USA); 2019 Jan 31. [zitiert: 24.02.2019] Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/66945>.
- Ncbi gene². Ywhaz tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5 monooxygenase activation protein, zeta polypeptide [Mus musculus (house mouse)]. Bethesda: National Center for Biotechnology Information (USA); 2019 Jan 31. [zitiert: 24.02.2019] Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/22631>.
- Ncbi gene³ [Internet]. Zfp580 zinc finger protein 580 [Mus musculus (house mouse)]. Bethesda: National Center for Biotechnology Information (USA); 2019 Jan 31. [zitiert: 24.02.2019] Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=Zfp580+mus+musculus>.
- Neuhaus AA, Couch Y, Hadley G, Buchan AM. Neuroprotection in stroke: the importance of collaboration and reproducibility. *Brain*. 2017 Aug 1;140(8):2079-2092. doi:10.1093/brain/awx126.

Olympus. Xcellence Imaging Software for Life Science Microscopy [software]. Version 1.2. Hamburg: Olympus Soft Imaging Solutions GmbH; 2012.

Pang L, Ye W, Che XM, Riessler BJ, Betz AL, Yang GY. Reduction of inflammatory response in the mouse brain with adenoviral-mediated transforming growth factor- β 1 expression. *Stroke*. 2001 Feb;32(2):544-52.

Peters M, Wielsch B, Boltze J. The role of SUMOylation in cerebral hypoxia and ischemia. *Neurochem Int*. 2017 Jul;107:66-77. doi:10.1016/j.neuint.2017.03.011.

Pfaffl MW. Quantification strategies in real-time PCR. In: Bustin SA. *A-Z of quantitative PCR*. La Jolla: International University Line; 2004. S. 87-112.

Ringleb R, Veltkamp R, Hacke W. Anatomie und Pathophysiologie der Gefäßversorgung des Gehirns. In: Hacke W (Hrsg.). *Neurologie*, 14. Auflg. Berlin: Springer;2016. S. 184-89.

Roskoski R Jr. ERK1/2 MAP Kinase: structure, function, and regulation. *Pharmacol Res*. 2012 Aug;66(2):105-43. doi:10.1016/j.phrs.2012.04.005.

Rueden C, Guet R, Hiner R, De Vos K. Cell Counter. Version 2.2.2 [software]. 2017 Apr 29 [zitiert am 02.08.2018]. Verfügbar unter: https://imagej.net/Cell_Counter.

Sacco RL, Kasner SE, Broderick JP, Caplan LR, Connors JJ, Culebras A, Elkind MS, George MG, Hamdan AD, Higashida RT, Hoh BL, Janis LS, Kase CS, Kleindorfer DO, Lee JM, Moseley ME, Peterson ED, Turan TN, Valderrama AL, Vinters HV; American Heart Association Stroke Council, Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia; Council on Cardiovascular Radiology and Intervention; Council on Cardiovascular and Stroke Nursing; Council on Epidemiology and Prevention; Council on Peripheral Vascular Disease; Council on Nutrition, Physical Activity and Metabolism. An Updated Definition of Stroke for the 21st Century: A Statement for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*. 2013 Jul;44(7):2064–89. doi:10.1161/str.0b013e318296aeca.

Schindelin J, Arganda- Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schnid B, Tinevez JY, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P, Cardona A. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature methods*. 2012 Jun 28;9(7):676-682. doi:10.1038/nmeth.2019.

- Shan ZX, Lin QX, Fu YH, Deng CY, Zhou ZL, et al. Upregulated expression of miR-1/miR-206 in a rat model of myocardial infarction. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 Apr 17;381:597–601.
- Shaydurov VA, Kasianov A, Bolshakov AP. Analysis of Housekeeping Genes for Accurate Normalization of qPCR Data During Early Postnatal Brain Development. *J Mol Neurosci*. 2018 Mar;64(3):431-9.
- Singh G, Siddiqui MA, Khanna VK, Kashyap MP, Yadav S, Gupta YK, Pant KK, Pant AB. Oxygen glucose deprivation model of cerebral stroke in PC-12 cells: glucose as a limiting factor. *Toxicol Mech Methods*. 2009 Feb;19(2):154-60. doi:10.1080/15376510802355216.
- Skarnes WC, Rosen B, West AP, Koutsourakis M, Bushell W, Iyer V, Mujica AO, Thomas M, Harrow J, Cox T, Jackson D, Severin J, Biggs P, Fu J, Nefedov M, de Jong PJ, Stewart AF, Bradley A. A conditional knockout resource for the genome-wide study of mouse gene function. *Nature*. 2011 Jun 15;474(7351):337-42. doi:10.1038/nature10163.
- Smith CL, Blake JA, Kadin JA, Richardson JE, Bult CJ, the Mouse Genome Database Group. 2018. Mouse Genome Database (MGD)-2018: knowledgebase for the laboratory mouse. *Nucleic Acids Res*. 2018 Jan 4;46(4): D836–D842.
- Sun HY., Wei SP., Xu RC., Xu PX., Zhang WC. Sphingosine-1-phosphate induces human endothelial VEGF and MMP2 production via transcriptions factor ZNF580: Novel insights into angiogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 May 7;395:361-6.
- Stenzel P, Nagorsen K, Bernd J, Leppert U, Zakrzewicz A, Berkholz J. ZNF580 – a brake on Interleukin-6. *J Inflamm (Lond)*. 2018 Oct;15:20. doi: 10.1186/s12950-018-0196-5.
- Testa G, Schaft J, van der Hoeven F, Glaser S, Anastassiadis K, Zhang Y, Hermmann T, Stremmel T, Stewart AF. A reliable lacZ expression reporter cassette for multipurpose, knockout- first alleles. *Genesis*. 2004 Mar;38(3):151-8.
- The EUCOMM program: Targeting strategies [Internet]. Cambridge: International Mouse Phenotyping Consortium. 2019 [zitiert 23.02.2019]. Verfügbar unter: <http://www.mousephenotype.org/about-ikmc/eucomm-program/eucomm-targeting-strategies>.

The Jackson Laboratory. International Mouse Strain Research (IMSR). Version 3.7.2 [software]. 2011 [zitiert am 23.10.2019]. Verfügbar unter: <http://www.findmice.org>.

Thermo Fisher Scientific. https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FSLSG%2Fmanuals%2Fblockit_miRNAexpressionvector_man.pdf, (2010, letzter Zugriff 23.02.2019; 12:01 Uhr)

Warlow C, Sudlow C, Dennis M, Wardlaw J, Sandercock P. Stroke. *Lancet*. 2003 Oct;362(9391):1211-24.

Wei S, Zhang J, Han B, Liu J, Xiang X, Zhang M, Xia S, Zhang W, Zhang X. Novel Zinc Finger Transcription Factor ZFP580 Facilitates All-Trans Retinoic Acid induced Vascular Smooth Muscle Cells Differentiation by Rar α -Mediated PI3K/Akt and ERK Signaling. *Cell Physiol Biochem*. 2018 Nov;50(6):2390-2405. doi:10.1159/000495098.

Wei S, Huang J, Li Y, Zhao J, Luo Y, Meng X, Sun H, Zhou X, Zhang M, Zhang W. Novel zinc finger transcription factor ZFP580 promotes differentiation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells into endothelial cells via eNOS/NO pathway. *J Mol Cell Cardiol*. 2015 Oct;87:17-26. doi:10.1016/j.yjmcc.2015.08.004

Wiedemann C, Schulz HI, Weber BHF. Quantitative Real-Time PCR-Eine Frage der Normalisierung. *Biospektrum-Heidelberg*. 2004;10(1):99-102.

World Health Organisation. Metrics: Disability-Adjusted Life Year (DALY). Quantifying the Burden of Disease from mortality and morbidity. Health statistics and information systems [Internet]. Geneva: World Health Organisation; 2019 [zitiert am 23.02.2019]. Verfügbar unter: http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/metrics_daly/en/.

Xu M, Yang X, Zeng Q, He H, Lu P, Huang, G. BIRC5 is a novel target of peroxisome proliferator-activated receptor γ in brain microvascular endothelium cells during cerebral ischemia. *Mol Med Rep*. 2017 Dec;16(6):8882-90. doi:10.3892/mmr.2017.7750.

Yoshimura S, Uchida K, Daimon T, Takashima R, Kimura K, Morimoto T, ASSORT Trial Investigator. Randomized Controlled Trial of Early Versus Delayed Statin Therapy in Patients With Acute Ischemic Stroke: ASSORT Trial (Administration of Statin on

Acute Ischemic Stroke Patient). *Stroke*. 2017 Nov;48(11):3057-63. doi:10.1161/STROKEAHA.117.017623.

Zhang Y, Wang T, Yang K, Xu J, Ren L, Li W, Liu W. Cerebral Microvascular Endothelial Cell Apoptosis after Ischemia: Role of Enolase-Phosphatase 1 Activation and Aci-Reductone Dioxygenase 1 Translocation. *Front Mol Neurosci*. 2016 Aug 31;9:79. doi:10.3389/fnmol.2016.00079.

10 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Stephanie Cornelia Marie Lorenz, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: Expression und Regulation von Zinkfingerprotein 580 als Mediator endogener Neuroprotektion selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

11 Curriculum vitae

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

12 Danksagung

Mein Dank gilt Prof. Dr. Christoph Harms für seine unerschöpfliche Energie und Begeisterungsfähigkeit für die Forschung, die diese Arbeit ermöglicht hat. Des Weiteren danke ich Dr. Christian Hoffmann für seine fachliche Expertise und seinen wegweisenden Realitätssinn. Ich danke der gesamte AG Harms, insbesondere Dr. Gisela Lättig-Tünnemann für ihre Zeit und geduldige Unterstützung, Janet Lips für ihren unermüdlichen Einsatz für die AG, Mariana Cerdeira, Melanie Kuffner, Felix Knab, Moritz Eggers und besonders Magdalena Jochner für Begleitung, Inspiration, lebhaftes Gespräche und neu gewonnene Freundschaften.

Ich danke Alexej Funke, der Teil auch dieses Projektes ist.

Ein ganz besonderer Dank geht an Dr. Christian Schinke, ohne dessen Motivation, Zuspruch, Zeit und offene Gastfreundschaft die Vollendung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Ich danke meinem Vater, Prof. Dr. Hanns-Martin Lorenz, der mich mit seinem Ehrgeiz und Forschergeist geprägt und in meinen Vorhaben immer unterstützt hat.

Und meiner lieben, großen Familie.