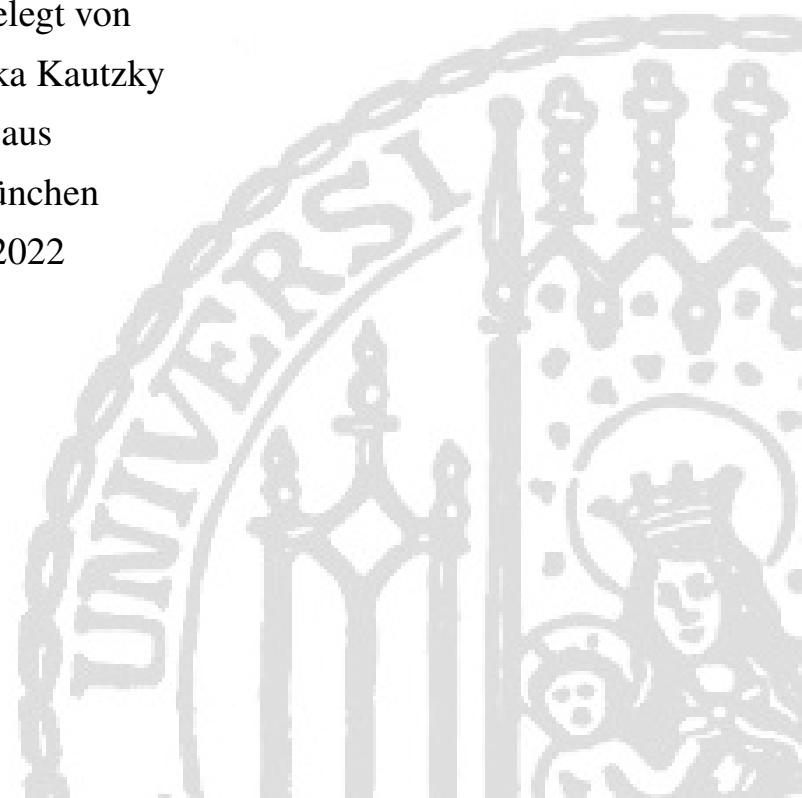
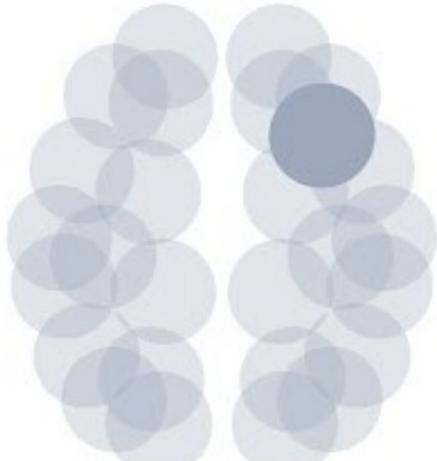


Aus dem Institut für Schlaganfall- und Demenzforschung
Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Martin Dichgans

**Identifizierung von Einflussfaktoren auf die
Konzentrationen der zirkulierenden microRNAs
miR-125a-5p, miR-125b-5p und miR-143-3p nach
ischämischem Schlaganfall**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Veronika Kautzky
aus
München
2022



Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Martin Dichgans

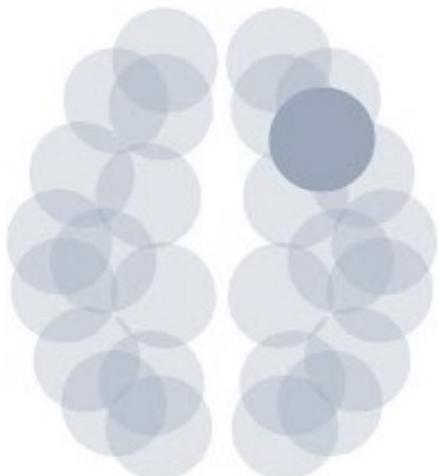
Mitberichterstatter: Prof. Dr. Anne-Laure Boulesteix

Prof. Dr. Christian Weber

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. Dr. med. Steffen Tiedt

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 31.03.2022



Die in dieser Dissertation genutzten Daten wurden zum Teil bereits veröffentlicht in:

Tiedt, S., M. Prestel, R. Malik, N. Schieferdecker, M. Duering, V. Kautzky, I. Stoycheva, J. Böck, B. H. Northoff, M. Klein, F. Dorn, K. Krohn, D. Teupser, A. Liesz, N. Plesnila, L. M. Holdt, and M. Dichgans

2017. RNA-Seq Identifies Circulating miR-125a-5p, miR-125b-5p, and miR-143-3p as Potential Biomarkers for Acute Ischemic Stroke. *Circulation Research*, 121(8):970–980.



Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	III
1 Einleitung	1
1.1 Der Schlaganfall	1
1.1.1 Definition	1
1.1.2 Epidemiologie	1
1.1.3 Ätiologie	2
1.1.4 Diagnostik	4
1.1.5 Biomarker	6
1.1.6 Therapie	7
1.2 microRNA	9
1.2.1 Definition	9
1.2.2 Biogenese und Funktion	11
1.2.3 Zirkulierende microRNA als Biomarker	13
1.3 Fragestellung	16
2 Material und Methoden	18
2.1 Material	18
2.1.1 Venöse Blutentnahme	18
2.1.2 Allgemeine Ausrüstung und Geräte	18
2.1.3 Chemikalien und Kits	19
2.2 Patienten- und Kontrollgruppen	19
2.2.1 Dokumentation	21
2.2.2 Probengewinnung	22
2.2.3 Neurologische Scores	23
2.2.3.1 Schlaganfallskala der <i>National Institutes of Health</i>	23
2.2.3.2 Modified Rankin Scale	24
2.2.4 Infarktlokalisierung, -volumen und -ätiologie	25
2.2.5 Rekrutierung der Kontrollgruppe	25
2.3 RNA-Sequenzierung	26
2.4 Validierung	26
2.4.1 RNA-Isolierung	27
2.4.2 cDNA-Synthese	27
2.4.3 qRT-PCR	28
2.5 Statistische Verfahren	28
3 Ergebnisse	30
3.1 Studienkohorten	30
3.1.1 Screening-Kohorte	30
3.1.2 Validierungskohorte	32
3.1.3 Vergleich der beiden Studiengruppen	34
3.2 RNA-Sequenzierung und Validierung mittels qRT-PCR	39
3.3 Profil zirkulierender microRNA und potentielle Einflussfaktoren	40
3.3.1 Patientenabhängige Faktoren	41
3.3.1.1 Demographie	41
3.3.1.2 Vorerkrankungen und kardiovaskuläre Risikofaktoren	41
3.3.1.3 Blutdruck bei Aufnahme	44

3.3.1.4	Laborwerte	44
3.3.2	Thrombolysetherapie mit rt-PA	45
3.3.3	Zeitlicher Verlauf	47
3.3.3.1	Verlauf und Zusammenhang der microRNA	47
3.3.3.2	Zeit zwischen Symptombeginn und Blutentnahme	51
3.3.4	Schlaganfall-Charakteristika	51
3.3.4.1	Infarktvolumen	51
3.3.4.2	Klinischer Schweregrad	52
3.3.4.3	Ätiologie und Lokalisation	54
4	Diskussion	56
4.1	Allgemeines zu Studiendesign und Population	56
4.2	Wirkung der verschiedenen Einflussfaktoren	57
4.2.1	Demographie	57
4.2.2	Vormedikation	58
4.2.3	Kardiovaskuläre Risikofaktoren und Vorerkrankungen	58
4.2.4	Zeitlicher Verlauf	60
4.2.5	Laborparameter	62
4.2.6	Thrombolysetherapie mit rt-PA	64
4.2.7	Schlaganfall-Charakteristika	64
4.3	Zusammenfassung	67
Abbildungsverzeichnis	68	
Tabellenverzeichnis	68	
Literaturverzeichnis	94	
Danksagung	95	
Eidesstattliche Erklärung	96	
Lebenslauf	97	

Abkürzungsverzeichnis

3'UTR	3' untranslatierte Region	KHK	Koronare Herzkrankheit
ACM	Arteria cerebri media	LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
ALT	Alanin-Aminotransferase	miRNA	microRNA
ANOVA	Varianzanalyse	mRNA	messengerRNA
aPTT	aktivierte partielle Thromboplastinzeit	mRS	modifizierte Rankin-Skala
ASS	Acetylsalicylsäure	MRT	Magnetresonanztomographie
AST	Aspartat-Aminotransferase	NIHSS	Schlaganfallskala der <i>National Institutes of Health</i>
BHS	Blut-Hirn-Schanke	pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
BMI	Body-Mass-Index	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
cDNA	komplementäre DNA	pmRS	prämorbid modifizierte Rankin-Skala
Cq-Wert	Schwellenwert-Zyklus	pre-miRNA	Vorläufer-microRNA
CRP	C-reaktives Protein	pri-miRNA	primäre microRNA
CT	Computertomographie	qRT-PCR	quantitative Echtzeit-PCR
DNA	Desoxyribonukleinsäure	RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
DNase	Desoxyribonuklease	RNA	Ribonukleinsäure
dsRNA	doppelsträngige RNA	RNase	Ribonuklease
DWI	<i>Diffusion weighted imaging</i>	rt-PA	rekombinanter Gewebspasminogenaktivator
EDTA	Ethyldiamintetraacetat	SAB	Subarachnoidalblutung
EKG	Elektrokardiogramm	SDH	Subduralhämatom
FLAIR	<i>Fluid-attenuated inversion recovery</i>	SHT	Schädelhirntrauma
GGT	Gamma-Glutamyl-Transferase	TIA	Transiente Ischämische Attacke
GLMM	Generalisiertes lineares gemischtes Modell	TOAST	<i>Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment</i>
HDL	<i>High Density Lipoprotein</i>	t-PA	Gewebspasminogenaktivator
ICB	Intrazerebrale Blutung	ZNS	Zentrales Nervensystem
INR	<i>International Normalized Ratio</i>		
ISD	Institut für Schlaganfall- und Demenzforschung		

Der besseren Lesbarkeit halber wird in dieser Arbeit die männliche Form stellvertretend für die männliche und die weibliche genutzt, beispielsweise steht „der Patient“ für „der Patient oder die Patientin“ und „Patienten“ für „Patienten und Patientinnen“.

1 Einleitung

1.1 Der Schlaganfall

1.1.1 Definition

Der ischämische Schlaganfall (aus dem Griechischen *íschein* = hemmen und *haīma* = Blut) ist definiert als akute fokale neurologische Dysfunktion, die durch ischämischen Zelltod in Gehirn, Rückenmark oder Retina verursacht ist. Die Diagnose stützt sich einerseits auf Befunde der Pathologie, Befunde der Bildgebung oder andere objektive Anhaltspunkte für eine entsprechende fokale ischämische Schädigung in einem definierten Gefäßareal, andererseits basiert sie auf durch die ischämische Schädigung hervorgerufenen klinischen Symptomen. Gleichzeitig müssen andere Ursachen dieser klinischen Auffälligkeiten ausgeschlossen sein (Sacco et al., 2013).

Neben dem ischämischen gibt es den selteneren hämorrhagischen Schlaganfall (aus dem Griechischen *haimorragía* = Blutfluss, Blutsturz), dem eine Ruptur kleiner Blutgefäße mit daraus resultierender Hirnblutung zu Grunde liegt (Busch and Kuhnert, 2017).

Die beiden Formen des Schlaganfalls sind klinisch nicht voneinander zu unterscheiden. Beide äußern sich in durch die zerebrale Minderversorgung ausgelösten und plötzlich auftretenden neurologischen Ausfällen, wie zum Beispiel der Lähmung einer Extremität oder einer Körperhälfte, einer Gesichtslähmung oder einer Sprachstörung. Neben motorischen Ausfällen können auch Störungen der Sensibilität oder des Gleichgewichts, sowie Kopfschmerzen oder Bewusstseinseinschränkungen auftreten (Busch and Kuhnert, 2017). Diese neurologische Symptomatik kann nur wenige Minuten oder Stunden anhalten oder lebenslang persistieren (Hennerici et al., 2017).

Klinisch wie ein Schlaganfall äußert sich auch eine sogenannte Transiente Ischämische Attacke (TIA). Hier kommt es ebenfalls zur Ischämie mit entsprechender fokalneurologischer Symptomatik, diese ist jedoch vorübergehend und es kommt nicht zu einem Infarkt mit Korrelat in Bildgebung oder Pathologie (Easton et al., 2009).

1.1.2 Epidemiologie

Der Schlaganfall ist ein gesundheitspolitisch äußerst relevantes Thema. Die Lebenszeitprävalenz von 2,5% und die Sterberate von bis zu einem Drittel innerhalb des ersten Jahres machen ihn in Deutschland wie auch weltweit zur zweithäufigsten Todesursache nach der koronaren Herzkrankheit (KHK), hinzu kommt eine massive finanzielle Belastung (Kolominsky-Rabas et al., 2006, 1998; Palm et al., 2010; Plass et al., 2014; Robert-Koch-Institut (Hrsg.), 2015; Schmid, 2015; Wang et al., 2016).

Über die letzten 20 Jahre hat die Prävalenz des Schlaganfalls deutlich zugenommen. Weltweit sind etwa 17 Millionen Menschen jährlich von einem Schlaganfall betroffen, 5,9 Millionen

versterben im Zusammenhang mit einem Schlaganfall und 33 Millionen leben mit dessen Folgen (Feigin et al., 2014).

Etwa 80-85% der Schlaganfälle sind ischämische Hirninfarkte, deren Mortalität geringer ist als die der hämorrhagischen (Busch and Kuhnert, 2017; Kolominsky-Rabas et al., 1998; Palm et al., 2010; Robert-Koch-Institut (Hrsg.), 2015). Laut Lozano et al. (2012) sind trotz der unterschiedlichen Fallzahlen der ischämische und der hämorrhagische Schlaganfall verantwortlich für je etwa die Hälfte der weltweiten Todesfälle durch Schlaganfälle (etwa 10% der Gesamttodesfälle).

In Deutschland erleiden jedes Jahr knapp 200 000 Menschen einen ersten Schlaganfall und bei etwa 65 000 Patienten wird die Diagnose zum wiederholten Mal gestellt, so dass der Schlaganfall zu den zehn häufigsten Diagnosen in Krankenhäusern zählt (Heuschmann et al., 2010; Statistisches Bundesamt (Destatis), 2016). Knapp 16 000 Patienten starben in Deutschland im Jahr 2015 an einem Schlaganfall oder dessen Folgen (Statistisches Bundesamt (Destatis), 2015).

Der Schlaganfall ist zudem eine der häufigsten Ursachen für Behinderung im Erwachsenenalter (Murray et al., 2012; O'Donnell et al., 2016; Plass et al., 2014; Robert-Koch-Institut (Hrsg.), 2015). Rechnet man weltweit mit ähnlichen Raten für Sterblichkeit und Behinderung, so müssen jedes Jahr etwa 3,4 Millionen Patienten mindestens 15 Jahre mit den Folgen eines zerebralen Infarkts leben (Feigin et al., 2014).

Obwohl die alterskorrigierte Inzidenz, die Prävalenz, sowie die Sterblichkeit und die durch Schlaganfälle verursachte Behinderung in den letzten etwa 30 Jahre abnahmen, steigen die absoluten Fallzahlen weiter an. Diese Zunahme ist durch die Kombination aus Bevölkerungsalterung und -wachstum, sowie der mit dem Alter deutlich zunehmenden Prävalenz des Schlaganfalls zu erklären (Busch et al., 2013; Feigin et al., 2015; Wang et al., 2016).

1.1.3 Ätiologie

Im Falle eines ischämischen Hirninfarkts liegt in einem der hirnversorgenden Blutgefäße eine Verengung oder ein Verschluss vor, in Folge dessen das dazugehörige Hirngewebe nicht mehr ausreichend mit Sauerstoff versorgt wird und stirbt. Zu den häufigsten Ursachen des ischämischen Schlaganfalls zählen neben kardialen Embolien arteriosklerotische Veränderungen der großen und kleinen Hirngefäße (Kolominsky-Rabas et al., 2001; Palm et al., 2012).

Kardiale Embolien werden verursacht durch Bildung eines Blutgerinnsels im Herzen beispielsweise bei Herzrhythmusstörungen wie Vorhofflimmern oder dem Vorliegen von Herzwand-Aneurysmen. Von diesen Thromben können sich Bruchstücke lösen, die dann über die Aorta und die Carotiden direkt in die zerebrale Strombahn gelangen, wo sie zu akuten Gefäßverschlüssen führen können (Kolominsky-Rabas et al., 2001; Palm et al., 2012).

Die Arteriosklerose ist ein langfristiger Prozess, der schon bei jungen Menschen beginnt und zur Einlagerung von Fetten in die Wand der Arterien, deren bindegewebigen Umbau und

schließlich zur Bildung sogenannter Plaques führt (Libby et al., 2019). In der Folge kann es - entweder durch die Plaque selbst oder aber durch einen aufgelagerten Thrombus nach Ruptur der Plaque - zu einer Gefäßstenose am Ort der Plaquebildung und einer entsprechenden Minderversorgung der nachgeschalteten Gefäßgebiete kommen. Löst sich ein Teil des aufgelagerten Thrombus ab, kann dies außerdem eine sogenannte arterio-arterielle Embolie weiter peripher verursachen. Auch in den kleinsten Gefäßen kann die dann Arteriosklerose genannte Veränderung durch Engstellen Ischämien bedingen.

Ursachen für die Gefäßveränderungen sind unter anderem längerfristig bestehende Vorerkrankungen wie Bluthochdruck, Diabetes mellitus und Fettstoffwechselstörungen wie die Hypercholesterinämie, sowie die oft damit einhergehende Adipositas (Libby et al., 2019; Pantoni, 2010). Daher zählen diese „Volkskrankheiten“ zu den typischen kardiovaskulären Risikofaktoren, ebenso beispielsweise der Konsum von Nikotin oder Alkohol. Diese Risikofaktoren sind veränderbar und können durch entsprechende Prävention positiv beeinflusst werden (Hankey, 2017; O'Donnell et al., 2016). Zu den nicht beeinflussbaren Risikofaktoren dagegen zählt neben zunehmendem Alter auch eine positive Familienanamnese für kardiovaskuläre Ereignisse (Pantoni, 2010).

In dieser Arbeit wurde zur Bestimmung der Ätiologie die TOAST-Klassifikation genutzt, die in der *Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment*-Studie eingeführt wurde, um Outcome und Prognose der jeweiligen Schlaganfall-Subtypen bestimmen zu können (Adams et al., 1993). Makroangiopathische, also durch arteriosklerotische Stenosen der hirnversorgenden Gefäße verursachte Schlaganfälle wurden so der Klasse 1 zugeordnet, kardiale Embolien der Klasse 2 und mikroangiopathische Schlaganfälle der Klasse 3. Für die Diagnose der Mikroangiopathie müssen andere Emboliequellen (kardial und in den vorgesetzten Gefäßen) ausgeschlossen sein, zum anderen müssen die Ergebnisse der bildgebenden Verfahren zu einer lakunären Ischämie passen. Andere definierte Ursachen wie Gefäßdissektionen oder Vaskulitiden werden der Klasse 4 zugerechnet. Schlaganfälle mit nicht bestimmbarer Ätiologie fallen in Klasse 5 (siehe auch 2.2.4).

Im Gegensatz zum ischämischen ist der hämorrhagische Schlaganfall durch eine fokale Blutung im Hirnparenchym (mit oder ohne Blutung in das Ventrikelsystem) als sogenannte Intrazerebrale Blutung (ICB) oder durch eine Subarachnoidalblutung (SAB) im Raum unterhalb der dünnsten Hirnhaut, der Arachnoidea mater (aus dem Griechischen ἀράχνη = Spinne und -ειδές = gestaltet, ähnlich) gekennzeichnet (Sacco et al., 2013).

Der Hauptauslöser der spontanen, also nicht durch ein Trauma ausgelösten ICB, die etwa 10–15% aller Schlaganfälle ausmacht, ist die zerebrale Mikroangiopathie bei arterieller Hypertonie (Busch and Kuhnert, 2017; Hennerici et al., 2017). Gerade ältere Patienten leiden zusätzlich häufig an einer zerebralen Amyloidangiopathie, bei der die Architektur der Gefäßwände gestört ist, sodass diese leichter rupturieren. Auch Gefäßmissbildungen oder Aneurysmen sind häufige Ursachen der ICB (Hennerici et al., 2017). Viele Patienten

nehmen darüber hinaus Antikoagulanzien oder Thrombozytenaggregationshemmer ein, die das Blutungsrisiko weiter steigern (Pantoni, 2010).

Auch bei der SAB muss zwischen einer traumatischen und einer spontanen Blutung unterschieden werden, wobei nur letztere als hämorrhagischer Schlaganfall gewertet wird und etwa 5% aller Schlaganfälle ausmacht (Hennerici et al., 2017). Die spontane SAB wird in der Mehrzahl der Fälle durch die Ruptur eines Aneurysmas verursacht. Die nicht aneurysmatische Blutung (beispielsweise bei arteriovenöser Malformation oder Dissektion) ist dagegen seltener (Rinkel et al., 1993; Sacco et al., 2013). Eine der wichtigsten Komplikationen der SAB ist ein folgender durch zerebrale Vasospasmen ausgelöster ischämischer Schlaganfall (Hennerici et al., 2017).

1.1.4 Diagnostik

Wie im ersten Absatz bereits erwähnt, gehören zu den typischen Symptomen des Schlaganfalls neben der plötzlichen Halbseitenlähmung auch Störungen der Sensibilität, der Sprache, des Sehens, sowie des Gleichgewichts und des Bewusstseins. Zur raschen prähospitalen Diagnose eines Schlaganfalls wurde daher an Hand einiger häufiger Symptome früh der sogenannte *Face-Arm-Speech-Test* (FAST) eingeführt (Harbison et al., 2003; Kothari et al., 1997). Dieses Diagnoseinstrument hat den Anspruch schnell und auf laiengerechte Weise potentiell bedrohliche Situationen zu identifizieren, die umgehend medizinischer Unterstützung bedürfen. Wie der Name schon andeutet, werden hier die drei Punkte Lähmung einer Gesichtshälfte, Lähmung eines Arms und Sprachstörung abgefragt. Diese hatten in vorhergehenden Studien gute prädiktive Werte für die Diagnose des Schlaganfalls gezeigt, so dass die Entscheidung über eine Aufnahme in die Klinik erleichtert wird (Kidwell et al., 2000; Kothari et al., 1999). Zur schnellen Einleitung einer Therapie muss die weitere Diagnostik in der Zielklinik zügig und effizient erfolgen, da rein klinisch die Unterscheidung zwischen einem ischämischen Schlaganfall und einer zerebralen Blutung nicht möglich ist, die beiden Ursachen aber völlig unterschiedliche Therapieschemata verlangen. Neben der gezielten Anamnese und der neurologischen Untersuchung, die durch die Erhebung verschiedener Scores (Schlaganfallskala der *National Institutes of Health* (NIHSS), modifizierte Rankin-Skala (mRS), Barthel-Index) unterstützt werden kann, spielt die zerebrale Bildgebung daher die entscheidende Rolle (Powers et al., 2018). Die Einleitung der Therapie darf hierdurch jedoch nicht verzögert werden (Hennerici et al., 2017; Powers et al., 2018).

Als initiale Modalität der Bildgebung stehen sowohl die Computertomographie (CT) idealerweise mit Perfusions-Darstellung zur Erhöhung der Diagnosesicherheit (Hopyan et al., 2010; Zhu et al., 2013), als auch die Magnetresonanztomographie mit DWI-Sequenz zur sensitiven Detektion der Ischämie zur Verfügung (Fiebach et al., 2002; Jauch et al., 2013). Die Bildgebung dient vor allem dem Ausschluss einer zerebralen Blutung, kann aber auch die Erkennung von Infarktfühzeichen, sowie der Lokalisation des Infarktkerns beziehungsweise ischämischer Risikozonen (Penumbra) ermöglichen. Ersteres ist absolut notwendig für die

Indikationsstellung zur intravenösen Thrombolysetherapie mit rekombinantem Gewebsplasminogenaktivator (rt-PA). Die direkte Darstellung der Ischämie schließt dagegen andere Ursachen der neurologischen Symptomatik, sogenannte *stroke mimics*, aus (Hennerici et al., 2017; Powers et al., 2018).

Der größte Vorteil der Magnetresonanztomographie (MRT) mit verschiedenen Sequenzen ist der sensitive Nachweis auch kleiner oder infratentoriell gelegener Infarkte, die in der CT oft nicht sicher zu beurteilen sind. Zudem werden in der CT Frühzeichen eines Infarkts frühestens zwei Stunden nach Ereignis sichtbar (Hennerici et al., 2017). Auch die fehlende Strahlenbelastung ist ein Vorteil der MRT. Nachteile sind die geringere Verfügbarkeit, die höheren Kosten, sowie die längere Aufnahmedauer. Zudem stellen metallische Implantate wie beispielsweise Herzschrittmacher oder Klaustrophobie beim Patienten Kontraindikationen dar (Jauch et al., 2013). Zur Indikationsstellung zur systemischen Thrombolysetherapie im Zeitfenster von 4,5 Stunden zeigten sich beide Modalitäten aber gleichwertig (Hennerici et al., 2017).

Idealerweise sollte zusätzlich zur nativen Bildgebung eine CT- oder MR-Angiographie durchgeführt werden, wenn dadurch die Einleitung der Therapie nicht verzögert wird. Zeigt sich in der Darstellung der intra- und extrakraniellen Gefäße ein proximaler oder in der Basilaris-Strombahn gelegener Verschluss, kann eine endovaskuläre Thrombektomie erwogen werden (Hennerici et al., 2017; Powers et al., 2018).

Für die beiden therapeutischen Optionen gibt es ein Zeitfenster (siehe Abschnitt 1.1.6), in dem ihr Nutzen gezeigt wurde. Liegt der Symptombeginn bereits länger zurück, können mittels Perfusionsbildgebung Aussagen über das ungefähre Alter der Läsion, die Perfusion der umgebenden Hirnanteile und die Gefäßsituation getroffen werden, so dass eine Therapie im erweiterten Zeitfenster in Betracht gezogen werden kann (Hennerici et al., 2017; Powers et al., 2018).

Ergänzend zu klinischer Untersuchung und Bildgebung gehört eine Blutentnahme zur Routineagnostik. Neben der Überprüfung der Gerinnung im Hinblick auf eine eventuelle Fibrinolyse-Therapie werden meist zusätzlich Laborparameter wie Blutbild, Elektrolyte, Nieren- und Leberwerte bestimmt (Hennerici et al., 2017). Nach den aktuellen Leitlinien der *American Heart Association / American Stroke Association* ist lediglich die Blutglucose zum Ausschluss einer Hypo- oder Hyperglykämie im Sinne eines *stroke mimics* unverzichtbar vor Anwendung von rt-PA, während die Gerinnungsparameter nur bei konkretem Verdacht auf eine Gerinnungsstörung oder eine niedrige Thrombozytenzahl notwendig sind (Powers et al., 2018). Die Einnahme von Antikoagulanzien sollte trotzdem soweit möglich anamnestisch eruiert werden, da nicht für alle Medikamente ein schneller und verlässlicher Bluttest existiert, die kürzliche Einnahme einiger dieser Medikamente aber eine Kontraindikation für die Thrombolysetherapie darstellt (Hennerici et al., 2017; Powers et al., 2018).

1.1.5 Biomarker

Keiner der genannten Blutwerte trägt jedoch zur Diagnosefindung bei. Bisher gibt es keinen etablierten Laborparameter, der bei Verdacht auf einen ischämischen Schlaganfall als Biomarker zielführend genutzt werden kann. Biomarker sind - im Gegensatz zu Symptomen, die vom Patienten subjektiv beschrieben werden - objektiv und reproduzierbar mit geringer Invasivität messbare Parameter, die Aussagen über physiologische oder pathologische Prozesse im Körper zulassen (Strimbu and Tavel, 2010).

Biomarker könnten verschiedene klinische Prozesse bei Schlaganfallpatienten unterstützen. Die Nutzung eines oder mehrerer diagnostischer Biomarker könnte die frühe Diagnose eines Schlaganfalls ermöglichen und den ischämischen mit hoher Sensitivität und Spezifität von hämorrhagischem Schlaganfall und *stroke mimics* unterscheiden, um so rasche Therapieentscheidungen zu gestatten (Bonaventura et al., 2016; Misra et al., 2017). Hierfür müsste ein solcher Parameter spezifisch für das zentrale Nervensystem (ZNS) sein und die Blut-Hirn-Schranke (BHS) überwinden können, um im peripheren Blut nachweisbar zu sein. Weitere Biomarker könnten die Differenzierung der verschiedenen Schlaganfall-Subtypen nach Ätiologie oder die Vorhersage der Wahrscheinlichkeit von Komplikationen erlauben. Zudem könnten prognostische Biomarker genutzt werden, um den weiteren Verlauf einschätzen zu können (Bonaventura et al., 2016).

Die Vorteile der venösen Blutentnahme mit folgender Analyse im Labor oder besser als *Point-of-care-Testing* (POCT) direkt in der Notaufnahme sind gegenüber der zerebralen Bildgebung die schnellere und einfachere Durchführbarkeit, die höhere Verfügbarkeit und die geringeren Kosten. Vor allem in kleineren Krankenhäusern, in abgelegenen Regionen und Entwicklungs- oder Schwellenländern stellt die Verfügbarkeit auch auf Grund der Kosten das größte Problem dar (Misra et al., 2017).

Zudem bedeutet wie unter 1.1.4 beschrieben eine CT eine Strahlenbelastung (Misra et al., 2017), ist nicht immer sofort aussagekräftig (Hennerici et al., 2017) und hat nativ nur eine mittelmäßige Sensitivität (Hopyan et al., 2010). Zwar ist die MRT oft genauer, die Untersuchung dauert jedoch länger und es gibt mehr Kontraindikationen (Jauch et al., 2013). Ein Biomarker, der mittels venöser Blutentnahme gewonnen werden und einen ischämischen Schlaganfall rasch diagnostizieren und von der Hirnblutung abgrenzen könnte, wäre also eine wünschenswerte Alternative zur Bildgebung.

Aus diesem Grund wurden bereits unter anderem Parameter der systemischen Entzündungsreaktion wie C-reaktives Protein (CRP) oder Interleukin-6 als potentielle Kandidaten untersucht. Sie zeigten zwar in einzelnen Studien eine gute Differenzierung zwischen ischämischen und hämorrhagischen Schlaganfällen, sowie eine Korrelation mit der Schwere der Symptomatik und die Fähigkeit, ein schlechtes Outcome zu prognostizieren, insgesamt sind die Ergebnisse jedoch widersprüchlich und nicht ausreichend in großen Studien belegt. Zudem sind diese

Parameter sehr unspezifisch (Bonaventura et al., 2016; Hasan et al., 2012; Li and Wang, 2016; Misra et al., 2017).

Auch Proteine wie das Calcium-bindende Protein S100B und die neuronenspezifische Enolase, die neuronale Zellschäden oder eine Störung der Blut-Hirn-Schranke anzeigen, wurden hinsichtlich einer Nutzung als Biomarker überprüft (Bonaventura et al., 2016; González-García et al., 2012; Jickling and Sharp, 2011; Misra et al., 2017). Keiner der beiden Kandidaten zeigte jedoch eine ausreichende Sensitivität und Spezifität. Zudem zeigte sich S100B erst etwa 8 Stunden nach dem Infarkt erhöht und kann daher nicht zur akuten Diagnosestellung verwendet werden.

Da ein großer Teil der Schlaganfälle durch thrombotische Ereignisse verursacht wird, wurden außerdem verschiedene Gerinnungsparameter überprüft. In einzelnen Studien konnten beispielsweise D-Dimere, Spaltprodukte des Fibrins, die Ätiologie des Schlaganfalls anzeigen und waren mit der Prognose assoziiert, ein Anstieg der D-Dimere ist jedoch ebenfalls völlig unspezifisch (Bonaventura et al., 2016; Donkel et al., 2019). Die Messung einzelner Gerinnungsfaktoren oder des Gewebsplasminogenaktivators im Blut konnten das klinische Outcome ebenfalls nicht verlässlich vorhersagen (Donkel et al., 2019).

Neben der klinischen Untersuchung und der zerebralen Bildgebung steht also kein einzelnes Diagnostikum zur Verfügung, das den ischämischen Schlaganfall eindeutig nachweisen und dessen Schweregrad abbilden könnte.

1.1.6 Therapie

Ist die Diagnose eines ischämischen Schlaganfalls gestellt, muss rasch die Therapie eingeleitet werden. Generell gilt hier, dass Patienten mit ischämischem Schlaganfall auf spezialisierten *Stroke Units* versorgt werden sollten (Hennerici et al., 2017; Powers et al., 2018).

Die Standard-Therapie für den ischämischen Schlaganfall ist die fibrinolytische Therapie mit Alteplase (rt-PA), einem rekombinant hergestellten Analogon des Gewebsplasminogenaktivators (t-PA). Diese endogene Protease wird von Endothelzellen sezerniert und zum Teil auch wieder gebunden und setzt Plasminogen zu seiner aktiven Form Plasmin um. Dieses wiederum

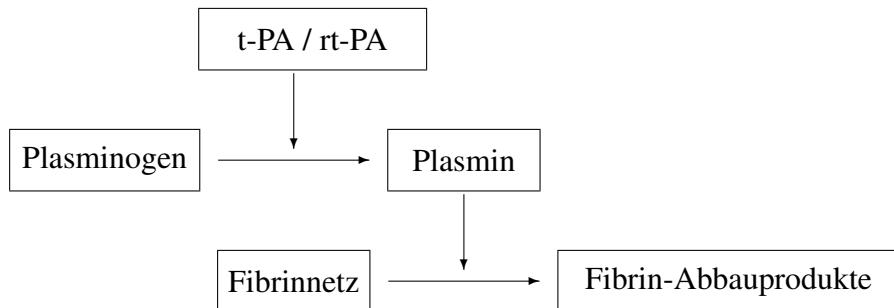


Abbildung 1 Aktivierung der Fibrinolyse durch Gewebsplasminogenaktivator (t-PA)

ist der Hauptakteur der Fibrinolyse, die zur Auflösung von Fibrinnetzen im Gefäßsystem führt (Abb. 1, Urano et al., 2018).

Nach der ersten Isolierung und Charakterisierung des t-PA als Akteur in der physiologischen Fibrinolyse (Astrup and Permin, 1947; Rijken et al., 1980, 1979) zeigte sich bald, dass in der klinischen Anwendung bei Patienten mit ischämischem Schlaganfall trotz einer erhöhten Rate an Hirnblutungen nach der Therapie mit rt-PA das Langzeit-Outcome verbessert war. In der Folge wurde rt-PA 1996 zuerst in den USA (The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group, 1995; Wardlaw et al., 2012) und nach weiteren Studien 2002 in Europa als Therapieoption für den ischämischen Schlaganfall zugelassen (Hacke et al., 1995, 1998). Weitere Studien konnten im Verlauf den Vorteil einer frühen Therapie mit rt-PA trotz des Risikos für Hirnblutungen und der möglichen Verstärkung der Folgen der Ischämie durch Störung der BHS belegen (Emberson et al., 2014; Li et al., 2019; Reijerkerk et al., 2013; Wardlaw et al., 2012).

Auf Grund des nach rt-PA-Gabe erhöhten Blutungsrisikos durch Absinken des Fibrinogen-Spiegels (Matosevic et al., 2013) sind die akute intra- oder extrakranielle Blutung, sowie die Einnahme von Blutgerinnungshemmern wie Phenprocoumon mit einem INR-Wert von >1,7 in den aktuellen Leitlinien absolute Kontraindikationen für die systemische Lysetherapie. Liegen relative Kontraindikationen vor, die eine Thrombolysetherapie nicht kategorisch ausschließen, aber eine konsequente Abwägung von Risiko und Nutzen erforderlich machen, kann eine *off-label*-Anwendung in Erwägung gezogen werden (Powers et al., 2018; Ringleb et al., 2015). Zu den relativen Kontraindikationen gehören unter anderem ein sehr geringes oder aber schwerstes Defizit, ein Schlaganfall in den drei Monaten vor Ereignis, sowie die Einnahme der in Kombination mit rt-PA schwer einzuschätzenden neuen oralen Antikoagulanzen (Powers et al., 2018). Ein Alter über 80 Jahre gilt in den neuen Leitlinien nicht mehr als Kontraindikation (Emberson et al., 2014; Powers et al., 2018, 2019; Wardlaw et al., 2012). Liegen keine Kontraindikationen vor, ist die Thrombolysetherapie innerhalb der ersten 4,5 Stunden nach Beginn der Symptomatik die Therapie der Wahl (Emberson et al., 2014; Ringleb et al., 2015; Thomalla et al., 2020). Dieses Zeitintervall kann im Rahmen eines sogenannten individuellen Heilversuchs bei entsprechenden Befunden in der Bildgebung (*Mismatch* zwischen abgestorbenem Infarktkern und rettbarer Penumbra) auch auf bis zu 9 Stunden nach Symptombeginn beziehungsweise bis 4,5 Stunden nach Erkennen der Symptome (beispielsweise im Falle eines *wake-up-strokes*) ausgedehnt werden (Ma et al., 2019; Powers et al., 2019; Thomalla et al., 2020).

Neben der medikamentösen Thrombolyse stehen an spezialisierten Zentren endovaskuläre Verfahren wie die intraarterielle Fibrinolyse oder die mechanische Rekanalisation durch Thrombektomie mittels *Stent-Retriever* zur Verfügung. Letztere ist indiziert, wenn ein proximaler Verschluss im vorderen Kreislauf vorliegt und dadurch der Patient schwer betroffen ist (Jauch et al., 2013; Ringleb et al., 2015). Für die Indikationsstellung wird zusätzlich zur nativen Bildgebung eine Gefäßdarstellung benötigt, meist wird eine nicht-invasive Darstellung

wie CT- oder MR-Angiographie bevorzugt (Ringleb et al., 2015). Das Zeitfenster für die endovaskuläre Therapie beträgt im Allgemeinen 6 Stunden nach Auftreten der Symptome, kann jedoch ebenfalls bei Vorliegen eines *Mismatches* in der Perfusionsbildgebung bis auf 24 Stunden verlängert werden (Nogueira et al., 2018; Powers et al., 2018; Ringleb et al., 2015; Thomalla et al., 2020).

Auch hier gilt wie bei der intravenösen Therapie mit rt-PA, dass die Zeit bis zum Beginn der Intervention möglichst niedrig (idealerweise unter 90 Minuten) gehalten werden sollte (Ringleb et al., 2015). Liegen keine Kontraindikationen gegen rt-PA vor, wird im Allgemeinen zusätzlich eine intravenöse Thrombolysetherapie eingeleitet; dies ist insbesondere dann empfohlen, wenn die Indikation in einem Krankenhaus ohne Möglichkeit zur endovaskulären Therapie gestellt wird, so dass der Patient in ein anderes Haus verlegt werden muss (Powers et al., 2018; Ringleb et al., 2015). Nach Goyal et al. (2016) verbessert die endovaskuläre Therapie unabhängig von Alter, NIHSS oder vorangegangener Thrombolyse mit rt-PA das Outcome, erhöht gleichzeitig aber nicht das Risiko für Blutungen oder die Mortalität.

Um die Einschränkung im Alltag möglichst zu minimieren, sollten nach der Akutbehandlung zeitig erste Rehabilitationsmaßnahmen eingeleitet werden (Powers et al., 2019). Laut Knecht et al. (2011) erhält in Deutschland jeder vierte Schlaganfallpatient entweder eine neurologische Frührehabilitation oder stationäre Rehabilitationsmaßnahmen.

Doch nicht nur die Weiterentwicklung der Diagnostik und Therapie des ischämischen Schlaganfalls, auch die effektive Prophylaxe im Sinne der Prävention oder Therapie kardiovaskulärer Risikofaktoren sollte in Zukunft bedacht werden (O'Donnell et al., 2016).

Bisher stehen hauptsächlich sekundärprophylaktische Maßnahmen zur Verfügung. Hier kommt im Allgemeinen eine Kombination aus dem Thrombozytenaggregationshemmer Acetylsalicylsäure (ASS) und einem Lipidsenker aus der Klasse der Statine zum Einsatz. Liegt eine Indikation zur Antikoagulation vor (zum Beispiel bei Vorhofflimmern), so wird statt ASS ein Antikoagulans verordnet (Powers et al., 2019). Weiter wird empfohlen, eventuell vorliegende kardiovaskuläre Risikofaktoren wie arterielle Hypertonie oder Hyperlipidämie möglichst effektiv zu behandeln (Powers et al., 2019).

1.2 microRNA

1.2.1 Definition

microRNAs (miRNAs) sind etwa 22 Nukleotide lange, endogene, nicht kodierende RNA-Moleküle, die die Expression einer Vielzahl von Genen steuern und in fast allen Lebewesen vorkommen. Diese Genregulation erfolgt über komplementäre Bindung an die Ziel-messengerRNA (mRNA) entweder direkt durch den Abbau der Ziel-mRNA oder durch Translationshemmung. miRNAs spielen eine lange unterschätzte Rolle in fast allen zellulären Prozessen (Bartel, 2018).

Die erste miRNA wurde 1993 von Lee et al. als ein wichtiges regulatorisches Element in der Entwicklung von *Caenorhabditis elegans* identifiziert (Lee et al., 1993). Die Autoren konnten zeigen, dass die Larvalentwicklung dieses Fadenwurms essentiell von der Funktion des lin-4-Gens abhängig war, als dessen Produkt allerdings kein Protein, sondern lediglich zwei kurze RNA-Stränge mit 22 beziehungsweise 61 Nukleotiden Länge identifiziert wurden. Beide wiesen Sequenzen auf, die zu repetitiven Sequenzen in der 3' untranslatierten Region (3'UTR) der lin-14-mRNA komplementär waren, was die Autoren die negative Regulation des LIN-14-Proteins über eine posttranskriptionelle direkte RNA-RNA-Interaktion vermuten ließ. Ein weiterer Hinweis auf die Bedeutung des lin-4-Produkts war die Tatsache, dass nicht nur der größte Teil der Sequenz, sondern auch die Funktion des Genprodukts in drei weiteren *Caenorhabditis*-Spezies konserviert war.

Erst sieben Jahre später wurde eine weitere nicht-kodierende RNA ebenfalls in *Caenorhabditis elegans* nachgewiesen (Reinhart et al., 2000). Auch das RNA-Produkt des let-7-Gens wies zu Teilen der 3'UTR der lin-14-mRNA komplementäre Sequenzen auf und regulierte ebenfalls die Larvalentwicklung.

Die Tatsache, dass entsprechende nicht-kodierende kurze RNAs sich als über verschiedene Tierarten (von *Drosophila* über den Zebrafisch zum Menschen) hinweg konserviert erwiesen und auch in diesen Arten eine zeitlich regulierte Expression zeigten, unterstrich ihre Bedeutung in vielen regulatorischen Prozessen (Chen et al., 2015; Lagos-Quintana et al., 2001, 2003; Lau et al., 2001; Pasquinelli et al., 2000).

Besonders die Sequenzen, aus denen letztendlich die reifen miRNAs hervorgehen, erwiesen sich als stark konserviert, während die Abschnitte zwischen diesen Sequenzen deutlich mehr Variabilität zeigten (Chen et al., 2015). Innerhalb der miRNA-Sequenzen erwiesen sich wiederum die Kernregionen (Position 2-7 oder 2-8), die der Erkennung der Ziel-mRNA dienen, als am stärksten konserviert (Bartel, 2009). Bei solchen stark konservierten miRNA-Genen wird im Allgemeinen davon ausgegangen, dass ihre Produkte mehrere mRNAs zum Ziel haben und essentielle Funktionen für beispielsweise die Entwicklung des Embryos übernehmen (Lewis et al., 2003; Stark et al., 2003). Einige miRNAs können bis zu 200 Gene über deren entsprechende mRNAs regulieren, während umgekehrt ein Gen auch von mehreren miRNAs kontrolliert werden kann (Enright et al., 2003; Jonas and Izaurralde, 2015; Krek et al., 2005).

Den Namen microRNA erhielten die kleinen, zelltyp- und stadienabhängig exprimierten RNA-Moleküle erst 2001 (Lagos-Quintana et al., 2001; Lau et al., 2001; Lee and Ambros, 2001). In diesen Studien zeigte sich zudem, dass die miRNAs deutlich zahlreicher waren, als ursprünglich angenommen und dass sie nicht nur den zeitlichen Ablauf der Entwicklung steuern, sondern möglicherweise auch die Zelldifferenzierung beeinflussen.

Über die letzten Jahre ist die Zahl der bekannten miRNAs rapide angestiegen. Zählte das *microRNA-Registry* im Jahr 2003 noch 506 miRNAs aus sechs Organismen (Griffiths-Jones, 2004), so waren es 2005 schon 2909 miRNAs aus 36 Spezies (Griffiths-Jones et al., 2006). Die

letzte Version der Datenbank vom Oktober 2018 umfasst 48860 verschiedene reife miRNAs aus 271 Spezies (Kozomara et al., 2018).

1.2.2 Biogenese und Funktion

Die Gene, aus denen miRNAs hervorgehen, sind über das gesamte Genom verteilt und liegen zum größeren Teil in Clustern vor, so dass die Expression der zusammenhängenden miRNA-Gene auch eng korreliert (Lagos-Quintana et al., 2001; Lau et al., 2001; Lee and Ambros, 2001; Lee et al., 2002). Andere Gene liegen in Introns Protein-kodierender Gene (Lagos-Quintana et al., 2003) und werden möglicherweise mit der entsprechenden RNA abgelesen (Lee et al., 2004). Wieder ein anderer Teil der miRNA-Gene befindet sich zwar in Introns Protein-kodierender Gene, liegen jedoch in Antisense-Richtung. Dies bedeutet, dass das Primärtranskript der miRNA nicht einfach durch Transkription des entsprechenden Gens produziert wird, sondern dass es eine eigene Promotor-Sequenz für eine unabhängige Transkription durch RNA-Polymerasen gibt (Lagos-Quintana et al., 2003; Lee et al., 2004). Insgesamt ist mittlerweile klar, dass ein großer Teil des menschlichen Genoms Zielsequenzen für verschiedenste miRNAs enthält (Lewis et al., 2005).

Die miRNAs entstehen aus einem längeren Vorläufermolekül, der sogenannten Vorläufer-microRNA (pre-miRNA), die eine Haarnadelstruktur mit nicht perfekter Komplementarität im Stamm und endständiger Schleife unterschiedlicher Größe aufweist (Lagos-Quintana et al., 2001; Lau et al., 2001; Lee and Ambros, 2001; Lee et al., 1993). Neben der reifen miRNA und der Vorläufer-microRNA gibt es ein weiteres, deutlich längeres RNA-Molekül, das dem direkten Transkript entspricht, die sogenannte primäre microRNA (pri-miRNA) (Lee et al., 2002). Diese pri-miRNA liegt wie die intermediäre pre-miRNA in der Form einer Haarnadel-Schleife vor, die in diesem Fall allerdings deutlich länger sein kann.

Die Prozessierung der miRNA erfolgt nach Lee et al. in zwei Schritten: im ersten wird die pri-miRNA im Zellkern zur kürzeren Haarnadelstruktur der pre-miRNA prozessiert und im zweiten im Zytoplasma die pre-miRNA zur reifen miRNA (Abb. 2).

Im ersten Schritt wird die pri-miRNA durch die Ribonuklease (RNase) III Drosha gespalten, so dass die etwa 60-70 Nukleotide lange pre-miRNA entsteht (Lee et al., 2003; Zeng et al., 2005). Drosha ist eine vor allem im Zellkern konzentrierte RNase, die die pri-miRNA an Hand ihrer Struktur erkennt und kurz nach der endständigen Schleife spaltet. Später zeigte sich, dass Drosha im Komplex mit dem dsRNA-bindenden Protein DGCR8 im sogenannten Microprocessor wirkt (Gregory et al., 2004). DGCR8 ist ein evolutionär konserviertes Protein, dessen Mutation ein sogenanntes Mikrodeletionssyndrom verursacht: das DiGeorge-Syndrom, das häufig mit angeborenen Fehlbildungen des Herzens und anderer Organe, sowie einem Immundefekt einhergeht (Gregory et al., 2004). Die pre-miRNA wird anschließend über den Transporter Exportin 5 aus dem Kern in das Zytoplasma transportiert (Bohsack et al., 2004; Yi et al., 2003).

Im Zytoplasma wird dann im zweiten Schritt die endständige Schleife der pre-miRNA durch die RNase III Dicer abgetrennt, so dass ein kurzes, doppelsträngiges RNA-Molekül resultiert (Bernstein et al., 2001). Schon vor Bindung der pre-miRNA ist Dicer mit Argonaute 2 (Ago2) und weiteren Proteinen im sogenannten miRLC (*human miRNA loading complex*) assoziiert (Maniataki and Mourelatos, 2005).

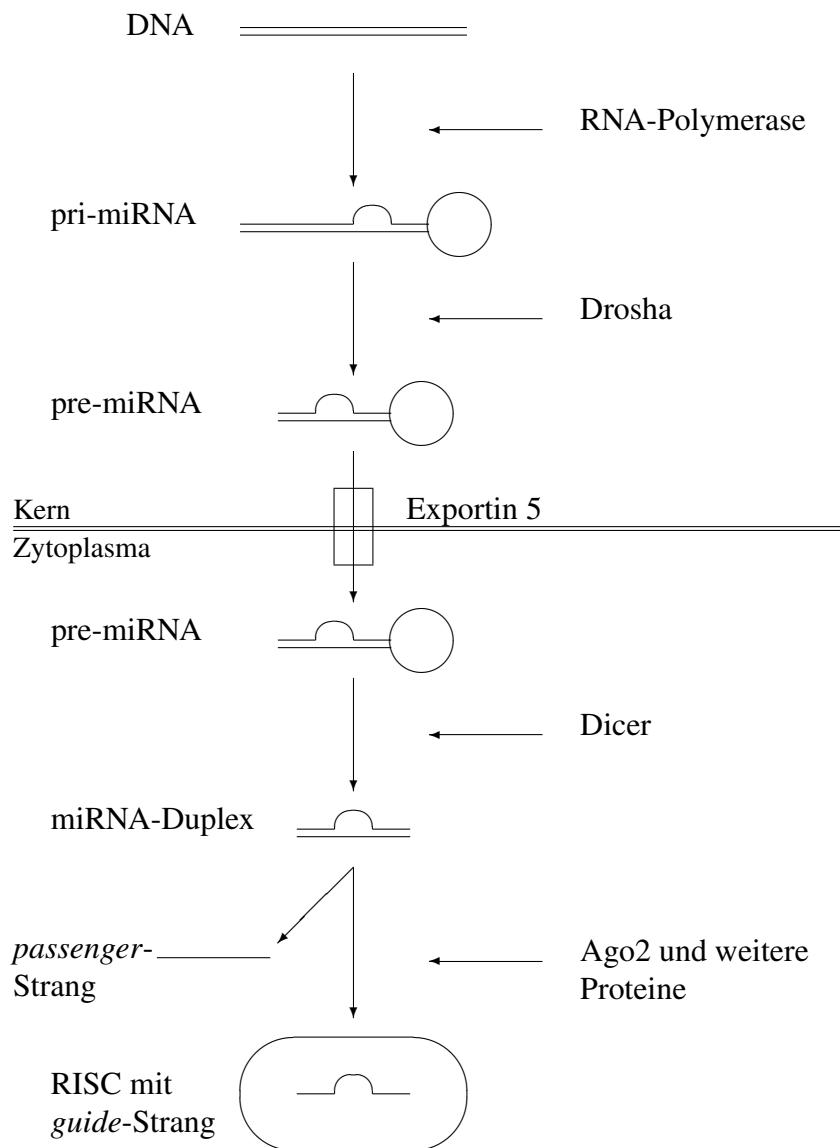


Abbildung 2 Biogenese der miRNAs. pri-miRNA = primäre microRNA, pre-miRNA = Vorläufer-microRNA, RISC = *RNA-induced silencing complex*

Nach der Spaltung der pre-miRNA zur reifen, doppelsträngigen miRNA wird dann einer der beiden Stränge (*guide-Strang*) in den sogenannten *RNA-induced silencing complex* (RISC) geladen, der Komplex, der die posttranskriptionale Beeinflussung der Expression (*Silencing*) durch miRNAs mediert. Meist wird der Strang mit dem weniger stabilen 5'-Ende in den RISC

geladen (Khvorova et al., 2003; Schwarz et al., 2003). Es gibt allerdings Ausnahmen, bei denen beide Stränge funktionell zu sein scheinen (Lim et al., 2003). Eine solche miRNA wurde beispielsweise in Lau et al. (2001) genannt, es handelte sich um miR-56 beziehungsweise dessen weniger stark exprimierten Gegenpart miR-56*. Da im Verlauf immer mehr miRNAs nachgewiesen wurden, bei denen beide Stränge biologisch aktiv sein können, wurde die Markierung des nicht dominanten Produkts mit einem * zu Gunsten einer neuen Nomenklatur aufgegeben. Seitdem wird den beiden Sequenzen das Suffix -5p beziehungsweise -3p für die Herkunft vom 5'- oder 3'-Ende der pre-miRNA angefügt (Griffiths-Jones, 2004).

Während der *guide*-Strang an Ago gebunden wird, wird der *passenger*-Strang durch eine Domäne des Ago aus dem Komplex entfernt und abgebaut (Sheu-Gruttaduria and MacRae, 2017). Nachdem die entsprechende miRNA nun ihrerseits Teil des RISC ist, dissoziiert Dicer von dem Komplex (Maniataki and Mourelatos, 2005).

Die Ziel-mRNA kann nun über die Basen 2-4 der Kernsequenz identifiziert werden, was zur Bindung der übrigen Basen der Kernsequenz und dadurch zur Einleitung der *Silencing*-Mechanismen führt (Sheu-Gruttaduria and MacRae, 2017). Da pro miRNA oft mehrere zur Zielsequenz komplementäre Stellen vorhanden sind, können an die mRNA auch mehrere RISC binden, was die Effizienz beider Vorgänge erheblich steigert (Grimson et al., 2007).

Nach der Identifizierung des Ziels gibt es verschiedene Wege zur posttranslationalen Regulation der Genexpression. Bei perfekter Komplementarität zur Ziel-mRNA findet eine Spaltung derselben durch die *Slicer*-Domäne von Ago2 statt. In der überwiegenden Mehrheit der Fälle weisen miRNAs jedoch nur eine inkomplette Komplementarität zur Ziel-mRNA auf. Unter diesen Umständen wird die mRNA nicht gespalten, sondern lediglich ihr Abbau durch Destabilisierung über Deadenylierung und Decapping beschleunigt oder seltener auch die Initiierung der Translation inhibiert (Bartel, 2004, 2009; Eichhorn et al., 2014; Liu et al., 2012b; Sheu-Gruttaduria and MacRae, 2017).

Diese nicht perfekte Komplementarität hat den Vorteil einer höheren Instabilität und Flexibilität der Bindung an die Ziel-mRNA. Dadurch kann die jeweilige mRNA nach der Spaltung relativ einfach frei gesetzt werden und der RISC kann ein weiteres mRNA-Substrat binden, ohne die Bindung zur miRNA zu verlieren (Khvorova et al., 2003). So kann der RISC mit maximaler Geschwindigkeit die Zielmoleküle identifizieren und im Anschluss supprimieren, während die unzähligen „falschen“ RNA-Moleküle konsequent vermieden werden (Salomon et al., 2015; Sheu-Gruttaduria and MacRae, 2017).

1.2.3 Zirkulierende microRNA als Biomarker

miRNAs liegen nicht nur intrazellulär vor, sondern können durch verschiedene Mechanismen sowohl aktiv, als auch passiv freigesetzt und in den Blutstrom abgegeben werden. Passiv werden miRNAs beispielsweise von sterbenden Zellen über sogenannte *apoptotic bodies* abgegeben, extrazelluläre Vesikel, die bei der Apoptose entstehen. Das Vorhandensein von miR-126 in solchen Vesikeln setzt bei Schädigung der Gefäßwand atheroprotektive Prozesse

in Gang (Zernecke et al., 2009). Zudem besteht die Möglichkeit der passiven Freisetzung entlang eines Konzentrationsgefälles, so zeigte sich die Konzentrationen verschiedener miRNAs intra- und extrazellulär relativ ähnlich (Pigati et al., 2010). Zusätzlich konnten die Autoren jedoch eine aktive, gezielte und zelltypabhängige Sekretion oder auch Retention einzelner miRNAs nachweisen (Pigati et al., 2010). Einer der bisher bekannten Mechanismen dieser aktiven Sekretion ist der den Einbau der miRNAs in Exosomen (Pigati et al., 2010; Valadi et al., 2007). Exosomen sind extrazelluläre Membranvesikel, die von einer Vielzahl von Zellen freigesetzt werden, der Zell-Zell-Kommunikation dienen und so unter anderem am Vorgang der Antigenpräsentation und der Entwicklung von Immuntoleranz (Valadi et al., 2007), dem Prozess der kardialen Hypertrophie (Bang et al., 2014) oder der Metastasierung maligner Tumoren (Mathieu et al., 2019; Wortzel et al., 2019) beteiligt sind. Auch in thrombozytären Mikropartikeln lassen sich miRNAs nachweisen, diese stammen aus durch Ischämie aktivierten Thrombozyten (Willeit et al., 2013).

Der Transport von miRNAs im Blut beruht ebenfalls auf verschiedenen Mechanismen. Für das Cluster miR-143 / miR-145 wurde nicht nur ein Transport über Exosomen zwischen Endothelzellen und glatten Muskelzellen in Gefäßen nachgewiesen (Hergenreider et al., 2012). Zudem fanden sich Hinweise für einen direkten Zell-Zell-Transport von miR-143 und miR-145 zwischen den glatten Muskelzellen und Endothelzellen über sogenannte *tunneling nanotubes*. Bei *tunneling nanotubes* handelt es sich um lange, dünne Ausstülpungen der Zellmembran, über die Proteine, Vesikel oder eben auch miRNAs direkt von Zelle zu Zelle transportiert werden können (Climent-Salarich et al., 2015; Thayanithy et al., 2014). Auf diesem Weg kann durch miRNAs aus den Muskelzellen die Proliferation der Endothelzellen und damit die Angiogenese gehemmt werden (Climent-Salarich et al., 2015).

Der deutlich größere Teil der zirkulierenden miRNAs scheint allerdings nicht in Membranvesikeln, sondern frei im Blut vorzuliegen (Arroyo et al., 2011). Um sich vor dem Abbau durch RNase zu schützen, gehen diese miRNAs Bindungen mit RNA-bindenden Proteinen wie dem oben genannten Argonaute2 (Ago2, Arroyo et al. (2011)) oder Lipoproteinen wie dem *High Density Lipoprotein* (HDL) ein (Vickers et al., 2011).

miRNAs werden sehr spezifisch abhängig von Zellart und -differenzierung freigesetzt und sind im Blut relativ stabil. Sie erfüllen daher die für einen Biomarker notwendigen Voraussetzungen: nicht- beziehungsweise wenig invasive Gewinnung (venöse Blutentnahme), hohe Stabilität, sowie vergleichsweise unkomplizierte, schnelle und genaue Messmethoden (Polymerase-Kettenreaktion (PCR) oder Microarrays).

Es konnten bereits einige miRNAs als vielversprechende Biomarker identifiziert werden, vor allem onkologische Krankheitsbilder sind Gegenstand aktueller Forschung (Matsuzaki and Ochiya, 2017). Beispielsweise könnten miR-139 und miR-550a für das hepatozelluläre Karzinom als Biomarker dienen (Nagy et al., 2018), miR-195, miR-107 und verschiedene andere für das Mammakarzinom (Heneghan et al., 2010; Kodahl et al., 2014; Zeng et al., 2013b), mir-196a für das Pancreaskarzinom (Liu et al., 2012a; Slater et al., 2014; Wang et al.,

2009) und miR-141 für das Prostatakarzinom (Mitchell et al., 2008; Nguyen et al., 2013). Auch für das Lungenkarzinom (Cazzoli et al., 2013; Heegaard et al., 2012; Roth et al., 2012; Shen et al., 2011), und gastrointestinale Karzinome (Li et al., 2012; Pu et al., 2010; Song et al., 2012; Toiyama et al., 2014) wurden miRNAs identifiziert, deren Konzentrationen im Blut durch die Erkrankung verändert wird.

Die Aktivität von Autoimmunerkrankungen spiegelt sich ebenfalls in den zirkulierenden miRNAs wieder (Liu et al., 2019) und auch Infektionserkrankungen wie Hepatitis C gehen mit Veränderungen des miRNA-Profils einher (Lendvai et al., 2014). Ebenso bewirkt eine Sepsis eine Änderung der miRNA-Spiegel (Wu et al., 2018).

Doch auch bei kardiovaskulären Erkrankungen stehen die miRNAs zunehmend im Fokus. Einige miRNAs stehen in Zusammenhang mit verschiedenen Herzerkrankungen (Endo et al., 2013; Zampetaki et al., 2012; Zhao et al., 2019; Zhu et al., 2018), andere spielen eher für zerebrovaskuläre Erkrankungen eine Rolle. So konnte eine Kombination von fünf miRNAs (miR-125b-2*, -27a*, -422a, -488, -627) mit relativ hoher Verlässlichkeit die akute Phase einer zerebralen Ischämie anzeigen (Sepramaniam et al., 2014). Die Autoren konnten zudem zeigen, dass das Profil verschiedener weiterer zirkulierender miRNAs noch bis zu zwei Jahren nach dem Schlaganfall verändert war und auch noch nach sechs Monaten die Ätiologie daraus abgeleitet werden konnte.

In Tiedt et al. (2017) konnte für die Kombination von miR-125a-5p, miR-125b-5p und miR-143-3p gezeigt werden, dass diese drei miRNAs einen ischämischen Schlaganfall mit höherer Sensitivität als die CT erkennen können und bereits innerhalb der ersten 24 Stunden nach Schlaganfall erhöht messbar sind. Auch in dieser Studie ergab sich eine anhaltende Erhöhung der miRNAs im Blut noch drei Monate nach Ereignis.

In vielen weiteren Studien zeigte sich das Potential der miRNAs als Biomarker für den ischämischen Schlaganfall. Neben einzelnen miRNAs wie miR-21 und miR-221 (Tsai et al., 2013), miR-124 (Sun et al., 2013) oder miR-126 (Long et al., 2013) wurden auch miRNA-Cluster wie miR-17-92 als potentielle Biomarker identifiziert (Li et al., 2015; Liu et al., 2013b; Long et al., 2013; Tan et al., 2009).

Die Veränderungen der miRNA-Konzentrationen beim ischämischen Schlaganfall werden verschiedenen Ursachen zugeschrieben. So weisen beispielsweise die Größe (Du et al., 2019; Fu et al., 2019; He et al., 2019; Shan et al., 2021) und Lokalisation des Infarkts (Bak et al., 2008; He et al., 2012; Hua et al., 2009; Ziats and Rennert, 2014), sowie die klinische Betroffenheit der Patienten (Chen et al., 2017; Jia et al., 2015; Modak et al., 2019; Xiang et al., 2017) und die Prognose (Chen et al., 2017; Tan et al., 2009; Zeng et al., 2013a) einen Zusammenhang mit der Höhe der jeweiligen miRNAs auf. Zudem kann die Schlaganfall-Ätiologie auf der Basis verschiedener miRNAs bestimmt werden (Gui et al., 2019; Sepramaniam et al., 2014; Tan et al., 2009; van Kralingen et al., 2019).

Doch auch die ischämiebedingte Inflammationsreaktion scheint mit den miRNA-Konzentrationen zusammen zu hängen (Banerjee et al., 2013; Graff et al., 2012; Smith et al., 2004; Xu

et al., 2015). Entsprechend ergab sich eine Korrelation verschiedener miRNAs mit Entzündungsparametern wie dem CRP und verschiedenen Zellen des Blutes (Allantaz et al., 2012; Liu et al., 2019; Lv et al., 2020; Parahuleva et al., 2017; Wu et al., 2018). Zudem spielen Thrombozyten eine wichtige Rolle bei der Freisetzung von miRNAs wie Tiedt et al. (2017) und andere zeigen konnten (Kaudewitz et al., 2016; Willeit et al., 2013).

miRNAs könnten jedoch bereits das Risiko einer Ischämie bestimmen. So zeigten sich einzelne miRNAs assoziiert mit kardiovaskulären Risikofaktoren wie Atherosklerose (Huang et al., 2018; Sala et al., 2014; Santovito et al., 2016; Tsai et al., 2013), Hypercholesterinämie (Goedeke et al., 2015; Vickers et al., 2014), Diabetes mellitus (Osmai et al., 2016; Zampetaki et al., 2010) oder dem Body-Mass-Index (BMI) (Esau et al., 2004; Kajimoto et al., 2006; Keller et al., 2011; Ortega et al., 2010). Auch mit der arteriellen Hypertonie (Kemp et al., 2014; Marques et al., 2011) beziehungsweise direkt mit dem Blutdruck (Huang et al., 2016; Marques et al., 2015) bestand ein Zusammenhang.

miRNAs bergen also großes Potential für die Nutzung als Biomarker zur Prognose oder Diagnose eines ischämischen Schlaganfalls, für Therapieentscheidungen, zur Prognose von Komplikationen oder zur Differenzierung nach Subklassen.

1.3 Fragestellung

Weltweit ist der ischämische Schlaganfall eine der führenden Ursachen für Behinderung und Tod. Für die Prognose essentiell ist die zeitnahe Diagnose und die zügige Einleitung einer adäquaten Therapie. Aktuell ist der Goldstandard der Diagnostik die teils kosten- und zeitintensive Bildgebung. Ein Biomarker, der mittels venöser Blutentnahme aus dem peripheren Blut gewonnen und vor Ort analysiert werden kann, wäre eine schnellere, kostengünstigere und besser verfügbare Alternative.

Vielversprechende Kandidaten für einen solchen Biomarker sind miRNAs, ubiquitäre Regulatoren der Genexpression, die häufig gewebsspezifisch exprimiert werden und im Blut in einer relativ stabilen Form vorliegen. miRNAs weisen bei einer Vielzahl von Pathologien ein verändertes Expressionsmuster auf und bergen damit großes Potential für die Diagnose verschiedener Erkrankungen. Per RNA-Sequenzierung wurden so von Tiedt et al. (2017) drei miRNAs identifiziert und in zwei weiteren unabhängigen Kohorten validiert, die einen akuten ischämischen Schlaganfall innerhalb der ersten Stunden mit höherer Sensitivität und Spezifität als die CT erkennen: miR-125a-5p, miR-125b-5p und miR-143-3p.

Die Sensitivität kann jedoch durch verschiedene Parameter wie die Größe und Ätiologie des Infarkts, das kardiovaskuläre Risikoprofil des Patienten oder die Therapie mit rt-PA beeinträchtigt werden. Um einen Biomarker in der klinischen Praxis daher effektiv nutzen zu können, muss bekannt sein, ob Assoziationen dieser Faktoren mit den Konzentrationen der miRNAs bestehen. Bei Nachweis einer solchen Assoziation muss von einer Verzerrung der miRNA-Werte ausgegangen werden und diese müssen entsprechend korrigiert werden.

Gleichzeitig eröffnet sich in diesem Fall aber auch die Möglichkeit, die miRNAs als Biomarker für sekundäre Fragestellungen wie beispielsweise die nach der Ätiologie zu etablieren und damit die diagnostischen Methoden zu erweitern.

Das Ziel dieser Arbeit ist folglich die Identifikation klinischer und laborchemischer Einflussfaktoren auf die Konzentrationen der zirkulierenden miRNAs miR-125a-5p, miR-125b-5p und miR-143-3p beim ischämischen Schlaganfall.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Venöse Blutentnahme

Sarstedt Safety Multifly® Kanülen 21G / 23G	SARSTEDT AG & Co. KG, Nürnberg, Deutschland
S-Monovette® 7.5ml / 4.5ml Z (Serum)	SARSTEDT AG & Co. KG, Nürnberg, Deutschland
S-Monovette® 9ml / 3.4ml K3E (EDTA)	SARSTEDT AG & Co. KG, Nürnberg, Deutschland
S-Monovette® 4.3ml 9NC (Citrat)	SARSTEDT AG & Co. KG, Nürnberg, Deutschland

2.1.2 Allgemeine Ausrüstung und Geräte

AlumaSeal® Verschlussfolie 96-Well-Platten	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
DNA LoBind Tubes 0,5ml / 5ml	Eppendorf AG, Hamburg, D
Falcon™ 15ml Conical Centrifuge Tubes	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Filter Tips Pipettenspitzen	VWR Peqlab, Darmstadt, Deutschland
Heraeus™ Labofuge™ 400	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Heraeus™ Megafuge™ 16	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Matrix™ 500µl ScrewTop Tubes mit 2D-Barcode	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Mikrotiterplatten 96 Wells	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
peqGOLD SafeGuard™ Pipettenspitzen	VWR Peqlab, Darmstadt, Deutschland
Pipetman classic Pipetten P2 / P10 / P20 / P100 / P200 / P1000	Gilson, Middleton, USA
Racks for Matrix™ ScrewTop Tubes	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
RNase AWAY™ Oberflächendekontaminationsmittel	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Roche LightCycler 480/II	Roche, Rotkreuz, Schweiz

Thermocenter Wärmeschrank	Renggli AG / SalvisLab, Rotkreuz, Schweiz
Vortex Shaker Peqlab	VWR by Avantor, Radnor, USA
Zentrifuge 5427 R	Eppendorf AG, Hamburg, D
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf AG, Hamburg, D
4 °C Kühlschrank	Siemens AG, München, Deutschland
-80 °C Gefrierschrank	Thermo Fisher Scientific Inc., Wal- tham, USA

2.1.3 Chemikalien und Kits

Ethanol 99%	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Glycogen Ambion	Thermo Fisher Scientific Inc., Wal- tham, USA
Isopropanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Nuklease-freies Wasser	QIAGEN, Aarhus, Dänemark
ExiLENT SYBR® Green	Exiqon by QIAGEN, Aarhus, Däne- mark
microRNA LNA™ Uni-Sp6 PCR Primer Set	Exiqon by QIAGEN, Aarhus, Däne- mark
miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR	Exiqon by QIAGEN, Aarhus, Däne- mark
miRCURY™ RNA Isolation Kit - Biofluids	Exiqon by QIAGEN, Aarhus, Däne- mark
RNA Spike-In Kit, For RT	Exiqon by QIAGEN, Aarhus, Däne- mark

2.2 Patienten- und Kontrollgruppen

Diese Arbeit entstand im Rahmen der *Circulating Biomarkers in Acute Stroke* CIRCULAS-Studie am Klinikum Großhadern der Ludwig-Maximilians-Universität München. Insgesamt je 60 Patienten mit ischämischem Schlaganfall und gesunde Kontrollpersonen wurden zwischen Februar 2014 und August 2015 am Klinikum Großhadern in die Studie eingeschlossen. Die Studie ist eine klinikbasierte Fall-Kontroll-Studie, die die Identifizierung eines miRNA-Profiles zum Ziel hat, das mit dem Auftreten eines ischämischen Schlaganfalls in einem frühen Zeitintervall (innerhalb von 24 Stunden nach Beginn der Symptomatik) assoziiert ist.

Das Projekt wurde von der Ethikkommission der Ludwig-Maximilians-Universität München genehmigt (Aktenzeichen 121-09), für jeden Patienten und jede Kontrollperson wurde eine Einverständniserklärung eingeholt.

Zur initialen Identifizierung differentiell regulierter miRNAs durch RNA-Sequenzierung wurden jeweils 20 Schlaganfallpatienten und gesunde Kontrollpersonen rekrutiert (Screening-Kohorte), für die Validierung mittels quantitativer Echtzeit-PCR (qRT-PCR) je 40 Patienten und Kontrollpersonen (Validierungskohorte).

Die Ein- und Ausschlusskriterien sollten idealerweise vor dem Studieneinschluss überprüft werden, also vor Prozessierung der ersten Blutproben; da zum Zeitpunkt der ersten Blutabnahme die Diagnose aber im Allgemeinen noch nicht definitiv gestellt und die medizinische Vorgeschichte uns weitgehend unbekannt war, mussten viele Patienten nachträglich aus der Studie ausgeschlossen werden.

Eingeschlossen wurden Patienten mit dem Nachweis eines ischämischen Schlaganfalls mit akuter neurologischer Symptomatik und einem entsprechenden Befund in der Bildgebung, bei denen die Zeit zwischen dem Beginn der Symptomatik und der ersten Blutentnahme in der Notaufnahme 24 Stunden nicht überschritt. Zudem war das schriftliche Einverständnis der volljährigen Patienten und Kontrollpersonen erforderlich. Die Ausschlusskriterien sind in Tabelle 1 dargestellt.

Während bei den Kontrollpersonen nur ein einzelner Termin für eine Blutentnahme, eine neurologische Beurteilung und die Datenerhebung (Vorerkrankungen, Medikamenteneinnahme, etc.) geplant war, erfolgte dies bei den Patienten sowohl am Aufnahmetag (D1), als auch am zweiten, dritten und siebten (oder letzten bei früherer Entlassung) Tag des stationären Aufenthalts (D2, D3, D7/E), sowie drei Monate nach Schlaganfall (D90) im Rahmen eines *Follow-up*-Termins.

Allgemeine Ausschlusskriterien	Zusätzliche Ausschlusskriterien für die Screening-Kohorte
Aktive maligne Erkrankung	Z. n. ischämischem Schlaganfall
Entzündliche / Infektionserkrankung	Z. n. TIA
Größere Operationen (bis 3 Monate vor Aufnahme)	Bekannte KHK / Z. n. Herzinfarkt
SHT (z. B. Sturz, bis 2 Wochen vor Aufnahme)	Hinweise auf silenten Schlaganfall in der zerebralen Bildgebung
Heparin (niedermolekular / unfaktioniert, bis 4 Wochen vor Aufnahme)	Thrombozytenaggregationshemmer (bis 4 Wochen vor Aufnahme)

Tabelle 1 Ausschlusskriterien. Z. n. = Zustand nach. SHT = Schädelhirntrauma

2.2.1 Dokumentation

Mittels eines standardisierten Fragebogens wurden Informationen wie die medizinische Vorgeschichte, die Eigenmedikation und das Vorliegen kardiovaskulärer Risikofaktoren erhoben. War der Patient nicht in der Lage die Fragen zu beantworten, wurden Angehörige oder der gesetzliche Vertreter befragt. Bei Patienten, die nicht in die Ambulanz kommen konnten oder wollten, wurde der Dokumentationsbogen am Telefon soweit möglich ausgefüllt oder eine laiengerechte Version per Post zugesandt. Folgende Punkte wurden abgefragt beziehungsweise aus den Patientendokumenten übernommen.

- Aufnahme
 - Zeitpunkt der Blutentnahme und Zeitpunkt des Symptombeginns (ggf. fremdanamnestisch erhoben; bei unklarem Beginn (z. B. *wake-up-stroke*) wurden der Zeitpunkt, zu dem der Patient zuletzt gesichert asymptomatisch war und der Zeitpunkt des Erwachens oder Auffindens mit Symptomatik erhoben)
 - Blutdruck bei Aufnahme (aus der Dokumentation in der Notaufnahme, ggf. aus dem Rettungsdienstprotokoll; waren nur Angaben wie „bis 200 mmHg systolisch“ vorhanden, wurde mit dem höchsten angegebenen systolischen Wert gerechnet)
 - Klinische Symptomatik bei Aufnahme (an Hand der beiden Skalen NIHSS und mRS; diese wurden teils aus den Aufnahmedokumenten übernommen, was nach Kasner et al. (1999) eine gute Näherung bietet) und prämorbid modifizierte Rankin-Skala (pmRS) (aus Angaben der Patienten, Angehörigen oder aus ggf. vorhandenen Arztbriefen)
- Therapie vor Aufnahme durch Rettungsdienst oder zuweisende Krankenhäuser, sowie im Klinikum Großhadern (insbesondere Einleitung einer Thrombolysetherapie, ggf. Kontraindikationen für Thrombolysetherapie)
- Kardiovaskuläre Risikofaktoren
 - Arterielle Hypertonie (definiert als Einnahme von Antihypertensiva vor oder nach Ereignis, siehe auch Palm et al. (2012))
 - Hypercholesterinämie (definiert als Einnahme von Cholesterinsenkern vor dem Ereignis, siehe auch Palm et al. (2012)), Hypertriglyceridämie oder sonstige Hyper- oder Dyslipidämien
 - Diabetes mellitus Typ 1 und 2
 - Nikotinkonsum in *pack years* (Anzahl der Zigaretten pro Tag x Jahre geraucht / 20; als ehemalige Raucher galten nur Patienten mit mindestens einem *pack year*) und Alkoholkonsum
 - BMI (Gewicht (kg) / [Größe (m)]², Definitionen von Unter- (<18,50 kg/m²), Normal- (18,50 - 24,99 kg/m²) und Übergewicht (25,00 - 29,99 kg/m²), sowie Adipositas (>30 kg/m²) nach World Health Organization (2000))
 - positive Familienanamnese für kardiovaskuläre Erkrankungen

- Vorerkrankungen
 - Ischämischer Schlaganfall, TIA, intrakranielle Blutung, Subduralhämatom (SDH), Sinus- / Hirnvenenthrombosen (Ausschlusskriterien für die Screening-Kohorte)
 - SHT (Allgemeines Ausschlusskriterium in den drei Monaten vor Aufnahme)
 - KHK, Herzinfarkt (Ausschlusskriterien für die Screening-Kohorte)
 - periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK)
 - Vorhofflimmern (oft Erstdiagnose während des stationären Aufenthalts)
 - Weitere Vorerkrankungen der verschiedenen Organsysteme, insbesondere maligne Erkrankungen (aktive Malignome galten als Ausschlusskriterium, Malignome nach erfolgreicher Therapie und ohne Hinweis auf Rezidiv nicht)
 - Transfusion, Transplantation
- Medikation vor Aufnahme (insbesondere Cholesterinsenker, ASS und Heparin: siehe oben), während des Aufenthalts und bei Entlassung
- Ereignisse während des Aufenthalts wie Rezidiv, sekundäre Verschlechterung, hämorrhagische Transformation eines Infarkts, neurochirurgische Interventionen (z. B. endovaskuläre Rekanalisationstherapie, Thrombendarteriektomie), kardiale Ereignisse, chirurgische Eingriffe
- *Follow-up* an D90
 - Relevante Ereignisse seit Entlassung, insbesondere Rezidive von TIA oder Schlaganfall, kardiovaskuläre Ereignisse, Operationen, Krankenhausaufenthalte, neu diagnostizierte Erkrankungen
 - Aktuelle häusliche Dauermedikation (besonders ASS und Heparin)

2.2.2 Probengewinnung

Sowohl am Aufnahmetag, als auch an allen Folgetagen wurde den Patienten eine Blutprobe für die Analyse der zirkulierenden miRNAs entnommen. Um mögliche Einflüsse auf das Profil der miRNAs überprüfen zu können, wurden zusätzlich Proben für die Klinische Chemie im Haus gewonnen (Tab. 2).

Für den späteren Vergleich mit den Werten der Kontrollgruppe wurden zum Teil Werte von verschiedenen Tagen herangezogen, wenn einzelne Parameter nicht bestimmt worden waren. Werte, die vom Labor als <0,1 berichtet wurden (wie unter anderem das CRP), wurden durch 0,01 ersetzt, um sie in die Berechnungen mit einbeziehen zu können.

Die Blutproben der Schlaganfallpatienten wurden direkt bei Ankunft in der Notaufnahme von den Pflegekräften beziehungsweise an den Folgetagen durch Mitarbeiter des ISD unter Verwendung eines Stauschlauchs und 21- oder seltener 23-Gauge-Flügelkanülen gewonnen. Für die miRNA-Analysen wurde Vollblut in EDTA-Plasma-Röhrchen abgenommen.

Nach 30-45 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Vollblutproben aus den EDTA-Röhrchen zur Gewinnung von Blutplasma einmal mit 2000 g für 10 Minuten und ein zweites Mal mit

2500 g für 15 Minuten zentrifugiert. Von diesem Thrombozyten-armen Plasma wurden sechs Aliquots à 300 µl erzeugt und bei -80 °C bis zur späteren Analyse gelagert.

Parameter	D1	D2	D3	D7/E	D90
CRP	x	x	x	x	x
Blutbild	x	x	x	x	x
Differentialblutbild		x	x	x	x
INR	x	x	x	x	x
aPTT	x	x	x	x	x
Glucose	x	x	x	x	x
Kreatinin	x	x	x	x	x
GGT		x			x
AST		x			x
ALT		x			x
Albumin		x	x	x	x
Bilirubin		x			x
Gesamtcholesterin		x			x
Triglyceride		x			x
LDL		x			x
HDL		x			x

Tabelle 2 Laborwerte nach Studientag. CRP=C-reaktives Protein, INR=International Normalized Ratio, PTT=aktivierte partielle Thromboplastinzeit, GGT=Gamma-Glutamyl-Transferase, AST=Aspartat-Aminotransferase, ALT=Alanin-Aminotransferase, LDL=Low Density Lipoprotein, HDL=High Density Lipoprotein

2.2.3 Neurologische Scores

2.2.3.1 Schlaganfallskala der National Institutes of Health

Für die Einschätzung des Schweregrads sowie die Verlaufskontrolle wurde unter anderem die NIHSS herangezogen, die bereits 1989 entwickelt worden war (Brott et al., 1989). Für diese Arbeit wurde die deutsche Übersetzung der aktuellen Version genutzt (Berger et al., 1999; Lyden et al., 1994).

Die Vorteile der NIHSS sind ihre schnelle und einfache Durchführbarkeit, für die fast keine Hilfsmittel benötigt werden und das unkomplizierte und effektive Training, welches die Anwendung der Skala auch Nicht-Neurologen ermöglicht (Goldstein and Samsa, 1997; Hills et al., 2009; Lyden et al., 2005), sowie eine stabile Inter- und Intrarater-Reliabilität (Berger et al., 1999; Kasner, 2006). Zudem ist eine Aussage über das Outcome nach ischämischem oder hämorrhagischem Schlaganfall (Aoki et al., 2013; Cheung et al., 2008; Gajurel et al., 2015) und das Infarktvolumen möglich (Furlanis et al., 2018).

Durch Testung von 11 verschiedenen Elementen ergibt sich eine Punktzahl zwischen 0 und 42, wobei ein Wert von 1 - 4 auf einen leichten, ein Wert von 5 - 14 auf einen mittelschweren und ein Score von 15 - 20 auf einen mittelschweren bis schweren Schlaganfall hinweist. Bei Werten über 20 gelten die Patienten als schwer betroffen (Gajurel et al., 2015). Hier wurden auf Grund der kleinen Kohorte die Kategorien „mittelschwer-schwer“ (15 - 20 Punkte) und „schwer“ (>20 Punkte) zur Kategorie „schwer“ zusammengefasst. Doch auch bei einem Wert von 0 ist ein Schlaganfall nicht völlig auszuschließen (Kasner, 2006; Martin-Schild et al., 2011; Yao et al., 2012).

Nach einer initialen Online-Zertifizierung wurde die NIHSS zu den jeweiligen Follow-up-Terminen (D2, D3, D7/E, D90) selbstständig erhoben, teilweise wurde der Wert nachträglich aus den Dokumenten des Patienten auf Station übernommen (siehe auch Kasner et al. (1999)).

2.2.3.2 Modified Rankin Scale

Um die Beeinträchtigung im Alltag durch den Schlaganfall einschätzen zu können, wurde die sogenannte modified Rankin Skala erhoben. Seit ihrer Entwicklung 1957 wurde sie mehrfach verändert. In dieser Arbeit wird ebenfalls die deutsche Übersetzung der aktuellen Version genutzt, diese ist in Tabelle 3 dargestellt (Berger et al., 1999; Farrell et al., 1991; Rankin, 1957).

Punkte	Beschreibung
0	Keine Symptome
1	Keine wesentliche Funktionseinschränkung trotz Symptomen (kann alle gewohnten Aufgaben und Aktivitäten verrichten)
2	Geringgradige Funktionseinschränkungen (unfähig, alle früheren Aktivitäten zu verrichten, ist aber in der Lage, die eigenen Angelegenheiten ohne Hilfe zu erledigen)
3	Mäßiggradige Funktionseinschränkungen (bedarf einiger Unterstützung, ist aber in der Lage, ohne Hilfe zu gehen)
4	Mittelschwere Funktionseinschränkung (unfähig, ohne Hilfe zu gehen und ohne Hilfe für die eigenen Bedürfnisse zu sorgen)
5	Schwere Funktionseinschränkung (bettlägerig, inkontinent, bedarf ständiger Pflege und Aufmerksamkeit)
6	Tod

Tabelle 3 modifizierte Rankin-Skala (mRS) nach Berger et al. (1999).

Auch die mRS zeigte eine gute Reliabilität und kann eine relativ präzise Prognose bezüglich des klinischen Outcomes abgeben, so dass sie in der Mehrzahl der Schlaganfallstudien als primäres Outcome genutzt wird (Broderick et al., 2017; Kasner, 2006).

Der Wert für die mRS wurde entweder im direkten Kontakt mit den Patienten oder partiell telefonisch erhoben (D90, siehe auch Savio et al. (2013)), sowie teils aus den Patientendokumenten auf Station übernommen. Um den Status der Patienten vor Aufnahme abzuschätzen, wurde zusätzlich die sogenannte pmRS erhoben (van Swieten et al., 1988).

2.2.4 Infarktlokalisierung, -volumen und -ätiologie

Auf der Basis der zerebralen Bildgebung während des Aufenthalts wurde die Lokalisation der Ischämie an Hand der betroffenen Strombahn (anterior oder posterior) und Hemisphäre ermittelt.

Für die Bestimmung des Infarktvolumens wurden CT- oder MRT-Aufnahmen (DWI, T2 oder FLAIR) genutzt, je nachdem, welche Modalität das größte Volumen aufwies. Das infarzierte Areal wurde dann von geschulten Bewertern manuell auf jeder Schicht markiert. Hier hatte sich eine gute Inter-Rater-Reliabilität ergeben (Tiedt et al., 2017).

Die Ätiologie des Infarkts wurde an Hand der unter 1.1.3 beschriebenen TOAST-Klassifikation benannt. Die Subklassen der Infarkte wurden nach folgendem Schema eingeteilt.

1. Makroangiopathie (definiert als nachgewiesene hämodynamisch relevante Stenose (>50 %) in einem der hirnversorgenden Gefäße)
2. Kardiale Embolie
 - 2.1 Bei Vorhofflimmern (nur bei Nachweis im EKG)
 - 2.2 Als paradoxe Embolie bei persistierendem Foramen ovale und atrialem Septumdefekt (echokardiographischer Nachweis)
 - 2.3 Bei anderer nachgewiesener kardialer Emboliequelle
3. Mikroangiopathie (nur bei Ausschluss anderer Emboliequellen wie unter 1. oder 2. und Nachweis einer lakunären Ischämie in der Bildgebung)
4. Andere definierte Ätiologie (wie Dissektionen, Vaskulitiden, Migräne-assozierter Schlaganfall und weitere definierte Ätiologien)
5. Ätiologie nicht bestimmbar
 - 5.1 Zwei oder mehr Gründe identifiziert
 - 5.2 Keine Ätiologie bestimmbar trotz vollständiger Diagnostik
 - 5.3 Unvollständige Diagnostik

2.2.5 Rekrutierung der Kontrollgruppe

Die Kontrollpersonen wurden in der Ambulanz des Institut für Schlaganfall- und Demenzforschung (ISD) in die Studie eingeschlossen, es handelte sich meistens um gesunde Begleitpersonen der Schlaganfall- und Demenzpatienten, die zu regulären Terminen in der Ambulanz vorstellig wurden. Es galten die gleichen Ausschlusskriterien wie für die Patienten, die Kontrollgruppe wurde der Patientengruppe hinsichtlich Alters- und Geschlechtsverteilung angepasst.

Neben der Probenentnahme für die Analyse der miRNAs (EDTA-Plasma) erfolgte eine Blutentnahme für die klinische Chemie mit den gleichen Parametern wie für die Patienten an D90 (Tab. 2). Zudem wurden die gleichen Informationen zu kardiovaskulären Risikofaktoren und Vorerkrankungen wie für die Patienten erhoben (siehe Abschnitt 2.2.1).

2.3 RNA-Sequenzierung

Um zwischen Patienten mit Schlaganfall und gesunden Kontrollen differentiell regulierte miRNAs zu identifizieren, wurde am Interdisziplinären Zentrum für Klinische Forschung (IZKF) der Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig eine RNA-Sequenzierung durchgeführt. Hierfür wurde aus Thrombozyten-armem Plasma RNA mit einer Länge von <1000 Nukleotiden isoliert wie unter 2.4.1 und in Tiedt et al. (2017) beschrieben. Aus diesem RNA-Pool wurden schließlich mit Hilfe des *TruSeq Small RNA sample prepkit v2* (Illumina) kleine RNA gewonnen, die die typischen Merkmale für Dicer-Prozessierung aufwiesen, also am ehesten miRNAs entsprachen. Diese RNA wurde dann mit Hilfe des *Library Quantification Kit - Illumina/Universal* (KAPA Biosystems, Woburn, MA) weiter aufbereitet, so dass die Sequenzierung im *Illumina HighScan-SQ sequencer* erfolgen konnte. Die in der Sequenzierung detektierten miRNA-Sequenzen wurden in Übereinstimmung mit *miRBase 20* benannt (Tiedt et al., 2017).

Die Ergebnisse der Sequenzierung wurden in einer unabhängigen Kohorte mittels qRT-PCR validiert (siehe 2.4).

Aus den in beiden Gruppen bestätigten 22 miRNAs wurden für die weitere Analyse nur die ausgewählt, die sowohl in der Sequenzierung, als auch in der Validierung eine deutlich signifikant veränderte Expression aufwiesen und in die gleiche Richtung reguliert waren (erhöht beziehungsweise erniedrigt im Vergleich zu den gesunden Kontrollpersonen).

2.4 Validierung

Die hier beschriebenen Methoden der miRNA-Prozessierung sind bereits in Tiedt et al. (2017) veröffentlicht worden. Nach der oben beschriebenen externen Sequenzierung wurde die Validierung mittels qRT-PCR am ISD durchgeführt.

Da die meisten Patienten ab D2 Heparin erhielten und Heparin die Ergebnisse der PCR verfälschen kann, wurden die Proben für die longitudinalen Analysen vor der RNA-Isolierung eine Stunde lang mit Heparinase behandelt (Boeckel et al., 2013; Kaudewitz et al., 2013). Dies wurde für die Proben von 32 Patienten durchgeführt, für die an mindestens vier Zeitpunkten Blutproben vorlagen. Diese 32 Patienten werden im Folgenden als die longitudinale Kohorte bezeichnet, sie stammen aus der Screening- und der Validierungskohorte.

2.4.1 RNA-Isolierung

Zur Isolierung der miRNAs aus den Plasmaproben wurde das *miRCURY RNA Isolation Kit - Biofluids* der Firma Exiqon verwendet.

Nach 1:1-Verdünnung der Plasmaprobe mit RNase-freiem Wasser wurde zur Lyse von Zellen und membranumhüllten Partikeln der Lyse-Puffer mit Glykogen gemischt und den Proben zugegeben. Das Glykogen diente als Träger für die miRNAs (McAlexander et al., 2013). Beides wurde kurz durch Schütteln (Vortex) gemischt und 3 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Zur Proteinpräzipitation wurde der Präzipitations-Puffer zugegeben, die Mischung erneut eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert und im Anschluss mit 11000 g für 3 min zentrifugiert. Nach Zugabe von Isopropanol zur Herstellung der Reaktionsbedingungen für die Bindung der RNA an die Filtersäule wurde die Probe in ein neues Probengefäß auf eine Filtersäule übertragen, 2 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann erneut mit 11000 g für eine halbe Minute zentrifugiert.

Die Reinigung der auf der Säule verbliebenen RNA erfolgte in mehreren Schritten durch abwechselnde Zugabe der beiden im Kit enthaltenen Waschlösungen (Waschlösung II wurde zuvor mit 99 %-igem Ethanol vorbereitet).

Nach den ersten beiden Waschvorgängen wurde DNase direkt auf die Filtersäule zur RNA gegeben um einer eventuellen Verunreinigung mit DNA entgegen zu wirken. Nach einer Inkubation bei Raumtemperatur für 15 min wurden noch zwei Waschvorgänge durchgeführt. Die Lösung der RNA erfolgte durch zweimalige Zugabe von RNase-freiem Wasser direkt auf den Filter, Inkubation bei Raumtemperatur für eine Minute und anschließende Zentrifugation mit 11000 g für 1 min.

Die so aufgereinigte RNA wurde entweder direkt zur Synthese von komplementärer DNA (cDNA) weiter verwendet oder bei -80 °C eingefroren.

2.4.2 cDNA-Synthese

Für die cDNA-Synthese und die nachfolgende PCR wurden ebenfalls Kits der Firma Exiqon genutzt. Als interne Kontrolle dienten verschiedene synthetische RNA, die als *Spike-Ins* verwendet wurden (*UniSp2*, *UniSp4*, *UniSp5*).

Der Reaktionspuffer und RNase-freies Wasser wurden auf Eis langsam aufgetaut und vermischt, ebenso wurden nach Lösung die *Spike-ins* auf Eis gelagert. Der Enzymmix, der die reverse Transkriptase enthielt, wurde erst kurz vor Gebrauch aufgetaut.

Die im vorhergehenden Schritt gewonnene RNA wurde nun mit RNase-freiem Wasser im Verhältnis 1:50 verdünnt.

Anschließend wurde die Reaktionslösung aus Reaktionspuffer, RNase-freiem Wasser, Enzymmix sowie den Spike-ins (oder der entsprechenden Menge Wasser, falls keine Kontrolle gewünscht) nach Angaben des Kits hergestellt und zur RNA-Lösung gegeben.

Nach kurzer Zentrifugation wurde die Reaktion durch Inkubation bei 42 °C für 60 min gestartet. Durch kurzfristige Erhöhung der Temperatur (95 °C für 5 min) wurde die reverse Transkriptase inaktiviert. Direkt im Anschluss wurde die Probe auf 4 °C gekühlt oder für die spätere Analyse bei -80 °C eingefroren.

2.4.3 qRT-PCR

Auch die qRT-PCR wurde mit Hilfe eines Kits der Firma Exiqon durchgeführt. Die im letzten Schritt hergestellte cDNA, RNase-freies Wasser, die Primer und der *PCR Master Mix* aus dem Kit wurden auf Eis aufgetaut, wobei der *Master Mix* vor direktem Lichteinfall geschützt wurde, da er den Fluoreszenzfarbstoff *SYBR® Green* enthielt, der für die anschließende qRT-PCR im *LightCycler* benötigt wurde.

In die Tiefe der Wells auf der 96-well-Platte wurde die cDNA vorgelegt und anschließend eine Mischung aus den Primern und *Master Mix* zugegeben.

Nachdem die Platte versiegelt war, wurde sie mit 1500 g für 2 min zentrifugiert. Die anschließende qRT-PCR erfolgte im *LightCycler*. Für jeden Reaktionsansatz wurden je eine RT⁻-Probe (ohne Enzym), sowie eine NTC (=non-template control) angelegt. Alle Experimente wurden mit ein oder zwei Replikaten ausgeführt.

Wie in Tiedt et al. (2017) genauer beschrieben wurden die ermittelten Cq-Werte (PCR-Zyklus, bei der das Fluoreszenzsignal der miRNAs die Hintergrundfluoreszenz übersteigt) mit der Median-Methode normalisiert. Anschließend wurden diejenigen miRNAs von der weiteren Analyse ausgeschlossen, deren Cq-Wert die Schwelle von 35 Zyklen in mehr als der Hälfte der Proben pro Gruppe überstieg, da hier die Amplifikation als zu gering angenommen wurde. Für die Bestimmung der absoluten miRNA-Konzentrationen war zu Beginn der Experimente über eine Verdünnungsreihe einmalig eine Standardkurve erstellt worden.

2.5 Statistische Verfahren

Alle Analysen wurden in der Programmierumgebung R durchgeführt, es galt ein Signifikanzniveau von $\alpha=0,05$.

Für den Vergleich von zwei Gruppen wurde für metrische Variablen ein Student's t-Test durchgeführt. Die Varianzgleichheit (Homoskedastizität) der zu vergleichenden Gruppen wurde mittels Levene-Test überprüft. Bei Ungleichheit der Varianzen wurde der Welch-Test angewendet.

Für im Allgemeinen normalverteilte Daten wie das Alter oder den BMI wurde in den relativ kleinen Patientenstichproben dieser Arbeit eine annähernde Normalverteilung angenommen. Alle anderen Variablen wurden mittels Shapiro-Wilks-Test hinsichtlich der Voraussetzung der Normalverteilung für den t-Test überprüft und im Fall einer fehlenden Normalverteilung mittels Mann-Whitney-U-Test analysiert. Alle Tests wurden zweiseitig durchgeführt.

Für kategoriale Merkmale wie das Geschlecht oder die TOAST-Klasse wurde für zwei oder mehr Gruppen der Exakte Test nach Fisher verwendet. Dieser Test stellt keine Anforderungen an die Stichprobengröße und liefert auch für kleine Gruppen zuverlässige Ergebnisse bezüglich der Ähnlichkeit der Stichproben.

Metrische Variablen in mehr als zwei Gruppen wurden, je nachdem, ob die Voraussetzung der Normalverteilung erfüllt war oder nicht, mittels Varianzanalyse (ANOVA) beziehungsweise Kruskal-Wallis-Test auf signifikante Zusammenhänge geprüft. In beiden Fällen wurden bei signifikantem Ergebnis im Anschluss über *Dunn's multiple comparison* (Bonferroni-Korrektur) die einzelnen Gruppen ermittelt, die signifikante Unterschiede voneinander aufwiesen.

Sollten Werte mit Messwiederholung im zeitlichen Verlauf geprüft werden, wurde ein Friedman-Test mit anschließender post-hoc-Testung nach Nemenyi (Nemenyi-Testung in R (*Pairwise Test For Multiple Comparisons Of Mean Rank Sums*)) durchgeführt, so beispielsweise für den zeitlichen Verlauf der miRNAs oder den Vergleich der Patientengruppen mit und ohne Thrombolysetherapie.

Korrelationen wurden mit der Methode der Rangkorrelation nach Kendall berechnet. Dieses Verfahren hat gegenüber der Rangkorrelation nach Spearman den Vorteil, dass es genauer für kleine Stichproben und darüber hinaus weniger fehleranfällig ist. Es wurde nicht für multiple Tests korrigiert. Nur Zusammenhänge, für die sich eine signifikante Korrelation ergeben hatte, wurden dargestellt. Hierfür wurden je nach Güte der jeweiligen Modelle lineare oder quadratische Regressionsmodelle über die Funktion *rlm* (*MASS*) berechnet und abgebildet, welche robuster gegenüber Ausreißern sind als die Standardfunktion *lm* (*stats*). Um die Signifikanz des Modells zu bestimmen, wurde im Anschluss ein Wald-Test für die betrachtete Variable durchgeführt.

Zudem wurde für den Zusammenhang der miRNA-Konzentrationen mit verschiedenen Variablen wie dem klinischen Schweregrad nach mRS und NIHSS oder den TOAST-Klassen ein Generalisiertes lineares gemischtes Modell berechnet. Als *Fixed Factors* wurden die zu prüfenden Variablen festgelegt (NIHSS, mRS, pmRS, TOAST-Klassen, betroffene Hemisphere, betroffene Zirkulation), als *Random Factors* Variablen wie die Patienten-ID oder der Studientag. Die Verteilung der Daten wurde graphisch und mittels *Goodness-of-Fit-Tests* (*fitdistrplus-package* in R) identifiziert, die Güte der Modelle wurde mittels Akaike-Informationskriterium überprüft. Waren die unabhängigen Variablen nicht kontinuierlich, sondern nominal- oder ordinalskaliert, wurde im Anschluss eine ANOVA (*car-package* in R) durchgeführt, um den Haupteffekt der jeweiligen Variable zu berechnen.

3 Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen der oben beschriebenen Studie durchgeführt. Im ersten Teil dieses Abschnitts werden die Studienkohorten charakterisiert, im Anschluss wird kurz erläutert, wie die hier untersuchten drei miRNAs identifiziert wurden (Tiedt et al., 2017). Im dritten Teil wird auf die Ergebnisse der unter 1.3 aufgeführten Fragestellungen eingegangen. Faktoren wie die Therapie mit rt-PA, das Infarktvolumen und verschiedene Laborparameter wurden hinsichtlich einer Assoziation mit dem Profil der zirkulierenden miRNAs überprüft. Einerseits sollen so potentielle Fehlerquellen bei der Interpretation der miRNA-Konzentrationen identifiziert werden, andererseits soll der potentielle Nutzen der miRNAs zur Beantwortung sekundärer Fragestellungen wie der nach der Ätiologie überprüft werden.

3.1 Studienkohorten

3.1.1 Screening-Kohorte

Zur externen RNA-Sequenzierung wurden je 20 Patienten mit akutem ischämischen Schlaganfall und gesunde Kontrollpersonen ausgewählt. Wie oben beschrieben waren die Auswahlkriterien für die Screening-Kohorte die Diagnose eines ischämischen Schlaganfalls mit Nachweis in der MRT oder CT und der Ausschluss kardio- oder zerebrovaskulärer Ereignisse in der Vorgeschichte, sowie der Ausschluss einer regelmäßigen Einnahme von ASS.

	Patienten n=20	Kontrollgruppe n=20	p-Wert
Demographie			
Alter (Mittelwert in Jahren \pm SD)	74,7 \pm 9,7	72,7 \pm 10,1	0,514
Weibliches Geschlecht (%; n)	60; 12	50; 10	0,751
Kardiovaskuläre Risikofaktoren			
Raucher (aktiv oder ehemalig) (%; n)	30; 6	45; 9	0,515
Positive Familienanamnese (%; n)	25; 5	10; 2	0,408
BMI (Mittelwert in kg/m ² \pm SD)	27,0 \pm 5,8	25,3 \pm 2,5	0,241
Arterieller Hypertonus (%; n)	80; 16	50; 10	0,0959
Hypercholesterinämie (%; n)	25; 5	15; 3	0,695
Diabetes mellitus Typ II (%; n)	20; 4	0	0,106
Kardiovaskuläre Vorerkrankungen			
Vorhofflimmern (%; n)	25; 5	5; 1	0,0915
KHK (%; n)	5; 1	5; 1	1

	Patienten n=20	Kontrollgruppe n=20	p-Wert
Maligne Erkrankung (%) n)	25; 5	15; 3	0,695
Einnahme von Aspirin (%) n)	5; 1	0	1
Ausgewählte Laborwerte			
(Mittelwert ± SD)			
CRP (mg/dl)	0,72 ± 1,60	0,43 ± 0,39	0,435
Kreatinin (mg/dl)	1,0 ± 0,18	1,0 ± 0,22	0,590
GGT (U/l)	42,6 ± 41,6	26,1 ± 12,6	0,104
AST (U/l)	24,7 ± 6,7	26,2 ± 5,4	0,453
ALT (U/l)	21,1 ± 9,1	21,3 ± 6,6	0,939
Albumin (g/dl)	3,69 ± 0,31	4,27 ± 0,22	4,18·10 ⁻⁸ *
Cholesterin (mg/dl)	208,2 ± 29,7	222,3 ± 36,7	0,205
Triglyzeride (mg/dl)	113,5 ± 40,3	134,7 ± 66,0	0,237
LDL (mg/dl)	134,8 ± 30,3	136,9 ± 23,8	0,810
HDL (mg/dl)	57,2 ± 14,1	67,0 ± 23,8	0,128
Glucose (mg/dl)	127,8 ± 30,1	99,2 ± 20,1	0,00122*
Leukozyten (G/l)	7,76 ± 2,62	6,72 ± 1,79	0,166
Lymphozyten (% der Leukozyten)	23,8 ± 9,1	25,2 ± 7,9	0,626
Monozyten (% der Leukozyten)	8,8 ± 2,4	7,0 ± 4,2	0,132
Neutrophile	63,9 ± 10,6	64,2 ± 9,6	0,939
Granulozyten (% der Leukozyten)			
Eosinophile	2,9 ± 2,5	2,5 ± 2,6	0,665
Granulozyten (% der Leukozyten)			
Basophile	0,7 ± 0,7	0,7 ± 0,6	0,752
Granulozyten (% der Leukozyten)			
Erythrozyten (T/l)	4,73 ± 0,50	4,653 ± 0,415	0,633
Hämoglobin (g/dl)	14,8 ± 1,5	14,3 ± 0,94	0,198
Hämatokrit	0,43 ± 0,04	0,42 ± 0,03	0,162
Thrombozyten (G/l)	210,6 ± 51,2	233,9 ± 60,3	0,212
aPTT (s)	23,5 ± 3,3	24,9 ± 1,4	0,0764
INR	1,1 ± 0,3	1,1 ± 0,2	0,749

Tabelle 4 Allgemeine Daten und ausgewählte Laborwerte der Screening-Kohorte. Vergleich mittels Student's t-Test bzw. Welch-Test oder Fisher's Exact Test. Lagen die Werte an D1 nicht vor, wurden die Werte von D2 verwendet. BMI = Body-Mass-Index, KHK = Koronare Herzkrankheit, CRP = C-reaktives Protein, GGT = Gamma-Glutamyl-Transferase, AST = Aspartat-Aminotransferase, ALT = Alanin-Aminotransferase, LDL = Low Density Lipoprotein, HDL = High Density Lipoprotein, aPTT = aktivierte partielle Thromboplastinzeit, INR = International Normalized Ratio. * = p<0,05.

Die Patienten- und Kontrollgruppe unterschieden sich nicht hinsichtlich demographischer Faktoren wie Alter und Geschlecht, ihres kardiovaskulären Risikoprofils und relevanter Vorerkrankungen (Tab. 4 und Tiedt et al., 2017).

Außer dem Albuminwert ($t(38)=6,83$, $p<0,0001$) und der Glucose ($t(33)=-3,54$, $p=0,00122$) zeigten sich auch die Laborwerte, die einen Einfluss auf die zirkulierenden miRNAs haben könnten, nicht signifikant verschieden zwischen den beiden Gruppen.

3.1.2 Validierungskohorte

Zur Validierung mittels qRT-PCR wurde im Anschluss eine zweite Gruppe von je 40 Patienten und Kontrollpersonen rekrutiert, die ebenfalls bezüglich Alter, Geschlecht, Risikofaktoren und Vorerkrankungen vergleichbar waren. Auch für diese Gruppe galten die allgemeinen Ein- und Ausschlusskriterien, im Unterschied zur Screening-Kohorte wurden hier, wie bereits erwähnt, ASS als Vormedikation, sowie zerebrovaskuläre Ereignisse in der Vorgeschichte akzeptiert, um eine für die Schlaganfallrisikopatienten in der Allgemeinbevölkerung repräsentative Kohorte zusammenzustellen (Tab. 5 und Tiedt et al., 2017).

Zwischen den Gruppen zeigten sich keine Unterschiede hinsichtlich der demographischen Faktoren Alter und Geschlecht, sowie der kardiovaskulären Risikofaktoren und Vorerkrankungen. Schlaganfallpatienten zeigten eine höhere Prävalenz von pAVK ($p=0,0238$) und Vorhofflimmern ($OR=3,87$, $p=0,0126$) im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die in der Patientengruppe höhere Zahl bereits stattgehabter Schlaganfälle ($OR=14,39$, $p=0,00326$) ist durch die Auswahl der Kontrollpersonen zu erklären, für die weiter die ursprünglichen strenger Kriterien galten.

Wie für die Screening-Kohorte wurden hier die Laborwerte untersucht, die potentiell das Profil zirkulierender miRNAs beeinflussen könnten. In der Patientengruppe zeigten sich signifikant höhere Werte für Leukozyten ($t(72)=-3,52$, $p=0,000747$) und CRP ($t(66)=-3,01$, $p=0,00372$), sowie für Monozyten ($t(72)=-2,94$, $p=0,00443$), Blutglucose ($t(61)=-4,39$, $p<0,0001$) und Aspartat-Aminotransferase (AST) ($t(73)=2,02$, $p=0,0473$).

	Patienten n=40	Kontrollgruppe n=40	p-Wert
Demographie			
Alter (Mittelwert in Jahren \pm SD)	74,7 \pm 13,8	70,2 \pm 8,7	0,0871
Weibliches Geschlecht (%; n)	45; 18	60; 24	0,263
Kardiovaskuläre Risikofaktoren			
Raucher (aktiv oder ehemalig) (%; n)	50; 20	30; 12	0,110
Positive Familienanamnese (%; n)	15; 6	5; 2	0,132
BMI (Mittelwert in kg/m ² \pm SD)	26,0 \pm 5,0	25,6 \pm 4,4	0,741
Arterieller Hypertonus (%; n)	85; 34	65; 26	0,0692

	Patienten n=40	Kontrollgruppe n=40	p-Wert
Hypercholesterinämie (%; n)	27,5; 11	25; 10	1
Diabetes mellitus Typ II (%; n)	10; 4	5; 2	0,675
Kardiovaskuläre Vorerkrankungen			
Vorhofflimmern (%; n)	40; 16	15; 6	0,0126*
KHK (%; n)	22,5; 9	10; 4	0,225
Herzinfarkt (%; n)	5; 1	2,5; 1	1
pAVK (%; n)	12,5; 5	0	0,0238*
TIA (%; n)	7,5; 3	2,5; 1	0,615
Schlaganfall (%; n)	27,5; 11	2,5; 1	0,00326*
Maligne Erkrankung (%; n)	15; 6	15; 6	1
Einnahme von Aspirin (%; n)	47; 19,5	40; 16	0,501
Ausgewählte Laborwerte (Mittelwert \pm SD)			
CRP (mg/dl)	0,53 \pm 0,54	0,22 \pm 0,34	0,00372*
Kreatinin (mg/dl)	1,1 \pm 0,3	1,0 \pm 0,2	0,0516
GGT (U/l)	24,1 \pm 7,0	35,3 \pm 30,9	0,446
AST (U/l)	31,0 \pm 15,9	27,6 \pm 7,7	0,0473*
ALT (U/l)	19,4 \pm 12,6	23,8 \pm 9,6	0,0923
Albumin (g/dl)	3,76 \pm 0,44	4,35 \pm 0,24	7,32·10 ⁻⁵ *
Cholesterin (mg/dl)	185,0 \pm 46,0	226,3 \pm 48,3	0,000339*
Triglyzeride (mg/dl)	104,8 \pm 60,7	159,1 \pm 71,3	0,000735*
LDL (mg/dl)	120,9 \pm 36,8	144,2 \pm 41,2	0,0139*
HDL (mg/dl)	49,4 \pm 12,4	59,4 \pm 16,8	0,00532*
Glucose (mg/dl)	129,3 \pm 38,8	98,5 \pm 20,7	4,63·10 ⁻⁵ *
Leukozyten (G/l)	7,72 \pm 2,22	6,10 \pm 1,62	0,000747*
Lymphozyten % der Leukozyten)	23,5 \pm 10,2	26,5 \pm 9,8	0,205
Monozyten (% der Leukozyten)	8,7 \pm 2,0	6,7 \pm 3,7	0,00443*
Neutrophile	65,3 \pm 11,0	63,5 \pm 10,1	0,477
Granulozyten (% der Leukozyten)			
Eosinophile	2,2 \pm 1,5	2,2 \pm 1,4	0,971
Granulozyten (% der Leukozyten)			
Basophile	0,6 \pm 0,5	0,9 \pm 0,8	0,128
Granulozyten (% der Leukozyten)			
Erythrozyten (T/l)	4,51 \pm 0,49	4,72 \pm 0,47	0,0744

	Patienten	Kontrollgruppe	p-Wert
	n=40	n=40	
Hämoglobin (g/dl)	13,6 ± 1,6	14,1 ± 1,0	0,128
Hämatokrit	0,40 ± 0,05	0,42 ± 0,03	0,0285*
Thrombozyten (G/l)	231,5 ± 64,8	240,6 ± 57,9	0,528
aPTT (s)	28,1 ± 18,1	25,5 ± 3,0	0,403
INR	1,1 ± 0,4	1,1 ± 0,3	0,538

Tabelle 5 Allgemeine Daten und ausgewählte Laborwerte der Validierungskohorte. Vergleich mittels Student's t-Test bzw. Welch-Test oder Fisher's Exact Test. Lagen die Werte an D1 nicht vor, wurden die Werte von D2 verwendet. BMI = Body-Mass-Index, KHK = Koronare Herzkrankheit, pAVK = periphere arterielle Verschlusskrankheit, TIA = Transiente Ischämische Attacke, CRP = C-reaktives Protein, GGT = Gamma-Glutamyl-Transferase, AST = Aspartat-Aminotransferase, ALT = Alanin-Aminotransferase, LDL = *Low Density Lipoprotein*, HDL = *High Density Lipoprotein*, aPTT = aktivierte partielle Thromboplastinzeit, INR = *International Normalized Ratio*. * = p<0,05.

Albumin (t(19)=5,04, p<0,0001) und Hämatokrit (t(72)=2,24, p=0,0285), sowie die Werte des Lipidstatus (Cholesterin: t(72)=3,76, p<=0,000339, Triglyceride: t(72)=3,53, p= 0,000735, *Low Density Lipoprotein* (LDL): t(70)=2,52, p=0,0139, HDL: t(70)=2,88, p= 0,00532) erwiesen sich dagegen als signifikant höher in der Kontrollgruppe.

3.1.3 Vergleich der beiden Studiengruppen

Trotz der unterschiedlichen Ein- und Ausschlusskriterien für die Screening- und Validierungskohorte zur besseren Abbildung der Allgemeinbevölkerung zeigten sich die beiden Studienkohorten nicht relevant verschieden.

Besonders bezüglich der demographischen Faktoren, des kardiovaskulären Risikoprofils (abgesehen von den geänderten Kriterien) und der Charakterisierung der Schlaganfälle zeigte sich kein signifikanter Unterschied (Tab. 6, 7 und 8).

	Screening	Validierung	p-Wert
	n=20	n=40	
Demographie			
Alter (Mittelwert in Jahren ± SD)	74,7 ± 9,7	74,7 ± 13,8	0,987
weibliches Geschlecht (%; n)	60; 12	45; 18	0,412
Kardiovaskuläre Risikofaktoren			
Raucher (aktiv oder ehemalig) (%; n)	30; 6	50; 20	0,174
positive Familienanamnese(%; n)	25; 5	15; 6	0,728
BMI (Mittelwert in $\frac{\text{kg}}{\text{m}^2}$ ± SD)	27,0 ± 5,8	26,0 ± 5,0	0,493
arterieller Hypertonus (%; n)	80; 16	85; 34	0,718

	Screening	Validierung	p-Wert
	n=20	n=40	
Hypercholesterinämie (%; n)	25; 5	27,5; 11	1
Diabetes mellitus Typ II (%; n)	20; 4	10; 4	0,422
Kardiovaskuläre Vorerkrankungen			
Vorhofflimmern (%; n)	25; 5	40; 16	0,385
KHK (%; n)	5; 1	22,5; 9	0,142
Herzinfarkt (%; n)	0	5; 2	0,548
pAVK (%; n)	0	12,5; 5	0,164
TIA (%; n)	0	7,5; 3	0,544
Schlaganfall (%; n)	0	27,5; 11	0,0108*
Maligne Erkrankung (%; n)	25; 5	15; 6	0,481
Einnahme von Aspirin (%; n)	5; 1	47,5; 19	0,000993*
Ausgewählte Laborwerte			
(Mittelwert \pm SD)			
CRP (mg/dl)	0,72 \pm 1,6	0,52 \pm 0,34	0,486
Kreatinin (mg/dl)	1,0 \pm 0,2	1,1 \pm 0,3	0,258
GGT (U/l)	42,6 \pm 41,6	31,0 \pm 15,9	0,243
AST (U/l)	24,7 \pm 6,7	24,1 \pm 7,0	0,756
ALT (U/l)	21,1 \pm 9,1	19,4 \pm 12,6	0,612
Albumin (g/dl)	3,69 \pm 0,31	3,76 \pm 0,44	0,600
Cholesterin (mg/dl)	208,2 \pm 29,7	185,0 \pm 46,0	0,0577
Triglyzeride (mg/dl)	113,5 \pm 40,3	104,8 \pm 60,7	0,582
LDL (mg/dl)	134,8 \pm 30,3	120,9 \pm 36,8	0,166
HDL (mg/dl)	57,2 \pm 14,1	49,4 \pm 12,4	0,0402*
Glucose (mg/dl)	127,8 \pm 30,1	129,3 \pm 38,8	0,876
Leukozyten (G/l)	7,8 \pm 2,6	7,7 \pm 2,2	0,951
Lymphozyten % der Leukozyten)	23,8 \pm 9,1	23,5 \pm 10,2	0,944
Monozyten (% der Leukozyten)	8,8 \pm 2,4	8,7 \pm 2,0	0,940
Neutrophile	63,9 \pm 10,6	65,3 \pm 11,0	0,685
Granulozyten (% der Leukozyten)			
Eosinophile	2,9 \pm 2,5	2,2 \pm 1,5	0,317
Granulozyten (% der Leukozyten)			
Basophile	0,7 \pm 0,7	0,6 \pm 0,5	0,674
Granulozyten (% der Leukozyten)			
Erythrozyten (T/l)	4,73 \pm 0,50	4,51 \pm 0,49	0,124

	Screening	Validierung	p-Wert
	n=20	n=40	
Hämoglobin (g/dl)	14,8 ± 1,5	13,6 ± 1,6	0,00676*
Hämatokrit	0,43 ± 0,04	0,40 ± 0,05	0,0108*
Thrombozyten (G/l)	210,6 ± 51,2	231,5 ± 64,8	0,214
aPTT (s)	23,5 ± 3,3	28,1 ± 18,1	0,264
INR	1,1 ± 0,3	1,1 ± 0,4	0,620

Tabelle 6 Vergleich Screening- und Validierungskohorte - Patienten. BMI = Body-Mass-Index, KHK = Koronare Herzkrankheit, pAVK = periphere arterielle Verschlusskrankheit, TIA = Transiente Ischämische Attacke, CRP = C-reaktives Protein, GGT = Gamma-Glutamyl-Transferase, AST = Aspartat-Aminotransferase, ALT = Alanin-Aminotransferase, LDL = *Low Density Lipoprotein*, HDL = *High Density Lipoprotein*, aPTT = aktivierte partielle Thromboplastinzeit, INR = *International Normalized Ratio*. * = p<0,05.

	Screening	Validierung	p-Wert
	n=20	n=40	
Demographie			
Alter (Mittelwert in Jahren ± SD)	72,7 ± 10,1	70,2 ± 8,7	0,327
weibliches Geschlecht (%; n)	50; 10	60; 24	0,582
Kardiovaskuläre Risikofaktoren			
Raucher (aktiv oder ehemalig) (%; n)	45; 9	30; 12	0,268
positive Familienanamnese (%; n)	10; 2	5; 2	0,595
BMI (Mittelwert in $\frac{\text{kg}}{\text{m}^2}$ ± SD)	25,3 ± 2,5	25,6 ± 4,4	0,770
arterieller Hypertonus (%; n)	50; 10	65; 26	0,280
Hypercholesterinämie (%; n)	15; 3	25; 10	0,513
Diabetes mellitus Typ II (%; n)	0	5; 2	0,548
Kardiovaskuläre Vorerkrankungen			
Vorhofflimmern (%; n)	5; 1	15; 6	0,407
KHK (%; n)	5; 1	10; 4	0,656
Herzinfarkt (%; n)	0	2,5; 1	1
TIA (%; n)	0	2,5; 1	1
Schlaganfall (%; n)	0	2,5; 1	1
Maligne Erkrankung (%; n)	15; 3	15; 6	1
Einnahme von Aspirin (%; n)	0	40; 16	0,000502*
CRP (mg/dl)	0,43 ± 0,40	0,22 ± 0,34	0,0383*
Kreatinin (mg/dl)	1,0 ± 0,2	1,0 ± 0,2	0,903

	Screening	Validierung	p-Wert
	n=20	n=40	
GGT (U/l)	26,1 ± 12,6	35,3 ± 30,9	0,207
AST (U/l)	26,2 ± 5,4	27,6 ± 7,7	0,484
ALT (U/l)	21,3 ± 6,6	23,8 ± 9,6	0,293
Albumin (g/dl)	4,27 ± 0,22	4,35 ± 0,24	0,234
Cholesterin (mg/dl)	222,3 ± 36,7	226,3 ± 48,3	0,745
Triglyzeride (mg/dl)	134,7 ± 66,0	159,1 ± 71,3	0,211
LDL (mg/dl)	136,9 ± 23,8	144,2 ± 41,2	0,403
HDL (mg/dl)	67,0 ± 23,8	59,4 ± 16,8	0,169
Glucose (mg/dl)	99,2 ± 20,1	98,5 ± 20,7	0,911
Leukozyten (G/l)	6,7 ± 1,8	6,1 ± 1,6	0,215
Lymphozyten % der Leukozyten)	25,2 ± 7,9	26,5 ± 9,8	0,572
Monozyten (% der Leukozyten)	7,0 ± 4,2	6,7 ± 3,7	0,800
Neutrophile	64,2 ± 9,6	63,5 ± 10,1	0,804
Granulozyten (% der Leukozyten)			
Eosinophile	2,5 ± 2,6	2,2 ± 1,4	0,632
Granulozyten (% der Leukozyten)			
Basophile	0,7 ± 0,6	0,9 ± 0,8	0,531
Granulozyten (% der Leukozyten)			
Erythrozyten (T/l)	4,7 ± 0,42	4,7 ± 0,46	0,630
Hämoglobin (g/dl)	14,2 ± 0,9	14,1 ± 1,0	0,614
Hämatokrit	0,42 ± 0,03	0,42 ± 0,03	0,565
Thrombozyten (G/l)	233,9 ± 60,3	240,6 ± 57,9	0,701
aPTT (s)	24,9 ± 1,4	25,5 ± 3,0	0,408
INR	1,1 ± 0,2	1,1 ± 0,3	0,783

Tabelle 7 Vergleich Screening- und Validierungskohorte - Kontrollpersonen. BMI = Body-Mass-Index, KHK = Koronare Herzkrankheit, TIA = Transiente Ischämische Attacke, CRP = C-reaktives Protein, GGT = Gamma-Glutamyl-Transferase, AST = Aspartat-Aminotransferase, ALT = Alanin-Aminotransferase, LDL = *Low Density Lipoprotein*, HDL = *High Density Lipoprotein*, aPTT = aktivierte partielle Thromboplastinzeit, INR = *International Normalized Ratio*. * = p<0,05.

	Screening	Validierung	p-Wert
	n=20	n=40	
Infarktgröße (Mittelwert in ml ± SD)	18,69 ± 45,34	18,59 ± 38,94	0,993
Zeit bis Blutentnahme (Mittelwert in Stunden ± SD)	3,94 ± 3,6	6,07 ± 4,4	0,0689
Thrombolyse (%; n)	35; 7	47,5; 19	0,416
Rekanalisation (%; n)	0	5; 2	0,548
Verstorben (%; n)	0	15; 6	0,165
NIHSS (Mittelwert ± SD)	4,8 ± 5,4	6,7 ± 5,7	0,214
mRS			0,398
0 (%; n)	5; 1	2,5; 1	
1 (%; n)	40; 8	22,5; 9	
2 (%; n)	15; 3	22,5; 9	
3 (%; n)	15; 3	7,5; 3	
4 (%; n)	25; 5	20; 8	
5 (%; n)	0	12,5; 5	
betroffene Strombahn			0,540
anteriore Zirkulation (%; n)	70; 14	77,5; 31	
posteriore Zirkulation (%; n)	20; 4	20; 8	
beide Strombahnen (%; n)	10; 2	2,5; 1	
betroffene Hemisphäre			0,386
rechts (%; n)	30; 6	37,5; 15	
links (%; n)	60; 12	60; 24	
beidseits (%; n)	10; 2	2,5; 1	
TOAST-Klassifikation			0,734
1 (%; n)	25; 5	35; 14	
2 (%; n)	35; 7	22,5; 9	
3 (%; n)	5; 1	2,5; 1	
4 (%; n)	0	2,5; 1	
5 (%; n)	35; 7	37,5; 15	

Tabelle 8 Schlaganfallcharakterisierung, Vergleich von Sequenzierungs- und Validierungskohorte. NIHSS = Schlaganfallskala der *National Institutes of Health*, mRS = modifizierte Rankin-Skala, TOAST = *Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment*. * = p<0,05.

3.2 RNA-Sequenzierung und Validierung mittels qRT-PCR

Die in Abschnitt 2.3 beschriebene Sequenzierung erbrachte den Nachweis von insgesamt 532 miRNAs mit mindestens fünf Reads in den 40 Blutproben der Screening-Kohorte mit einem Median von 8,1 Millionen Reads sowohl im Plasma von Patienten, als auch in den Proben der gesunden Kontrollpersonen (Tiedt et al., 2017).

In zwei unabhängig voneinander durchgeführten Normalisierungsschritten erwiesen sich 32 miRNAs als signifikant verschieden zwischen den beiden Gruppen, von denen im Vergleich zu den gesunden Kontrollpersonen in den Proben der Schlaganfallpatienten vier erhöht und 28 erniedrigt waren (Tab. 9 und Tiedt et al., 2017).

↑	hsa-miR-99b-5p <i>hsa-miR-143-3p*</i>	<i>hsa-miR-125a-5p*</i>	<i>hsa-miR-125b-5p*</i>
↓	hsa-let-7b-3p hsa-let-7i-5p hsa-miR-17-3p hsa-miR-18a-5p hsa-miR-92a-3p hsa-miR-130a-3p hsa-miR-193a-5p hsa-miR-532-5p hsa-miR-3158-5p hsa-miR-3688-5p	hsa-let-7d-3p* hsa-miR-1 hsa-miR-17-5p hsa-miR-20a-5p hsa-miR-101-3p hsa-miR-140-3p hsa-miR-378a-3p hsa-miR-660-5p hsa-miR-3184-5p	hsa-let-7f-5p hsa-miR-16-2-3p hsa-miR-18a-3p hsa-miR-26b-5p hsa-miR-126-5p* hsa-miR-181a-5p hsa-miR-423-3p* hsa-miR-3158-3p hsa-miR-3688-3p

Tabelle 9 Auflistung der in der RNA-Sequenzierung nachgewiesen veränderten miRNAs. ↑ = In der Sequenzierungskohorte im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht; ↓ = In der Sequenzierungskohorte im Vergleich zur Kontrollgruppe erniedrigt. * = Auch in der Validierungskohorte im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant verändert. *kursiv* = Auch in der Validierungskohorte signifikant erhöht im Vergleich zur Kontrollgruppe. Siehe Tiedt et al. (2017).

In der Validierung durch qRT-PCR in einer Gruppe von je 40 Patienten und gesunden Kontrollpersonen konnten 22 der in Tabelle 9 aufgeführten 32 miRNAs nachgewiesen werden. Lediglich sechs davon zeigten signifikant veränderte Konzentrationen in der Schlaganfallgruppe (in der Tabelle mit * markiert, siehe Tiedt et al., 2017). miR-125a-5p, miR-125b-5p und miR-143-3p wiesen wie in der RNA-Sequenzierung im Vergleich zur Kontrollgruppe bei den Patienten eine signifikant erhöhte Expression auf.

Dies konnte in der Gesamtkohorte (je 60 Patienten und Kontrollpersonen) bestätigt werden, also in der Kombination der qRT-PCR-Ergebnisse der Screening- und Validierungskohorte (Tiedt et al., 2017).

In Tiedt et al. (2017) konnte zudem nachgewiesen werden, dass diese drei miRNAs auch in einer größeren Stichprobe bei Schlaganfallpatienten im Vergleich zu gesunden Kontroll-

personen und auch im Vergleich zu Patienten mit TIA nach Korrektur für verschiedene konfundierende Variablen wie Alter, Geschlecht, arterielle Hypertension oder die Einnahme von Thrombozytenaggregationshemmern signifikant erhöht waren.

3.3 Profil zirkulierender microRNA und potentielle Einflussfaktoren

Wie in Absatz 1.3 beschrieben war das Ziel dieser Arbeit die weitere Charakterisierung der so identifizierten miRNAs hinsichtlich ihres Potentials als Biomarker für den ischämischen Schlaganfall. Faktoren wie das kardiovaskuläre Risikoprofil der Patienten, die Thrombolysetherapie mit rt-PA oder die Größe des Infarkts wurden daher auf eine Assoziation mit den miRNA-Konzentrationen untersucht. Gleichzeitig wurde überprüft, ob die miRNAs in der Lage waren, zusätzliche Fragestellungen wie die nach der Ätiologie oder der genauen Dauer der Ischämie zu beantworten.

Da die meisten Patienten ab D2 mit Heparin behandelt wurden und bereits mehrfach gezeigt worden war, dass Heparin die Ergebnisse der PCR verfälschen kann (Boeckel et al., 2013; Kaudewitz et al., 2013), wurden die Proben von 32 Patienten (longitudinale Kohorte) mit Heparinase behandelt wie unter 2.4 beschrieben.

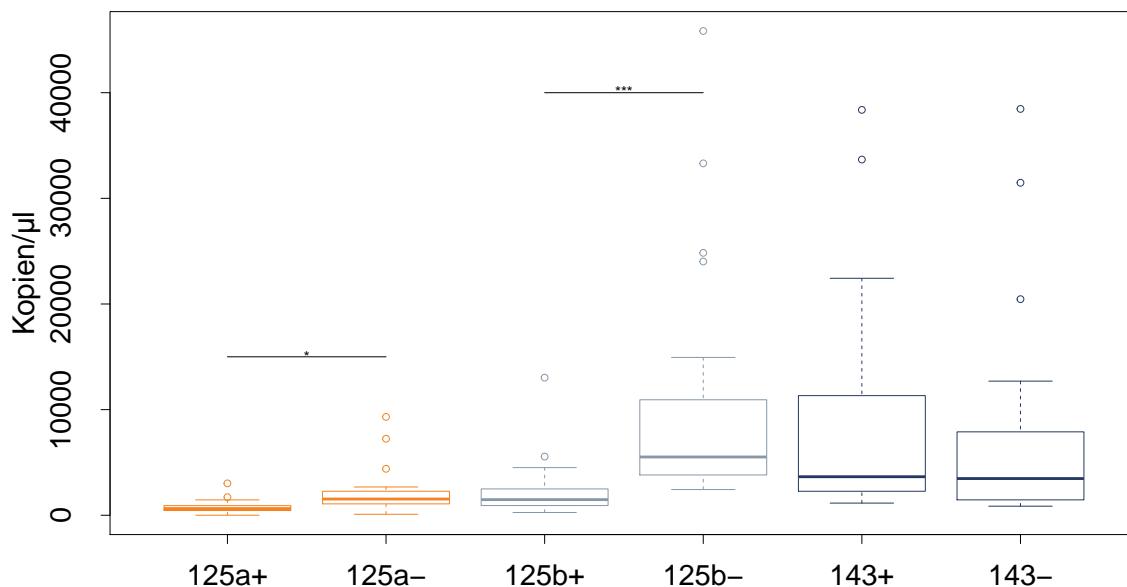


Abbildung 3 Vergleich der miRNA-Konzentrationen an D1 mit und ohne Heparinase mit Angabe der signifikanten Unterschiede (* = $p < 0,05$, *** = $p < 0,001$). +/- = Ergebnisse mit/ohne Heparinase.

Im direkten Vergleich der PCR-Ergebnisse der Proben des Aufnahmetags mit und ohne Zusatz von Heparinase in der longitudinalen Kohorte erwiesen sich die miRNA-Konzentrationen in den unbehandelten Proben für miR-125a-5p und miR-125b-5p als signifikant höher als in den mit Heparinase versetzten Proben ($t(36,4)=3,47$, $p=0,00137$ beziehungsweise $t(34,5)=4,28$, $p=0,000140$, Abb. 3). Für miR-143-3p ergab sich kein signifikanter Unterschied.

Wegen des hier gezeigten Einflusses von Heparinase auf die Ergebnisse der PCR wurden für die longitudinalen Analysen die Werte der mit Heparinase behandelten Proben (longitudinale Kohorte, 32 Patienten) herangezogen.

Wurden nur die Werte vom Aufnahmetag betrachtet, wurden die Werte der Gesamtkohorte herangezogen, um eine größere Stichprobe zu erhalten. Hierfür wurden die Ergebnisse der in Screening- und Validierungskohorte durchgeführten qRT-PCR kombiniert.

3.3.1 Patientenabhängige Faktoren

3.3.1.1 Demographie

Das mittlere Alter in der longitudinalen Kohorte betrug $71,9 \pm 13,5$ Jahre, in der Gesamtkohorte $74,7 \pm 12,5$ Jahre. Es konnte weder am Aufnahmetag, noch im Verlauf eine Korrelation des Alters mit den miRNA-Konzentrationen nachgewiesen werden (Abb. 4).

Auch zwischen den Geschlechtern konnte weder im Verlauf (longitudinale Kohorte mit 15 Frauen und 17 Männern), noch am Aufnahmetag (Gesamtkohorte mit jeweils 30 Frauen und Männern) ein signifikanter Unterschied in den Konzentrationen der drei miRNAs festgestellt werden (Abb. 4).

3.3.1.2 Vorerkrankungen und kardiovaskuläre Risikofaktoren

Keinen Zusammenhang mit den miRNA-Konzentrationen ($p>0,05$ im Friedman-Test) zeigten in der longitudinalen Kohorte die kardiovaskulären Risikofaktoren (Raucheranamnese, positive Familienanamnese, BMI, arterielle Hypertonie, Hypercholesterinämie, Diabetes mellitus Typ II) und Vorerkrankungen (Vorhofflimmern, KHK, pAVK, Schlaganfall, maligne Erkrankung), sowie die Einnahme von ASS. Die Berechnungen konnten für Herzinfarkt und TIA nicht durchgeführt werden, da es in diesen Fällen nur einen, beziehungsweise keinen Patienten gab, der diese Frage mit „ja“ beantwortet hatte.

Für den BMI ergab sich hier ebenfalls keine signifikante Korrelation mit miR-125a-5p und miR-125b-5p ($p>0,05$). Es konnte jedoch für miR-143-3p an D3 eine zwar nicht signifikante, aber mittelstarke (definiert nach Cohen als $\tau \geq |0,3|$) negative Korrelation mit dem BMI ($\tau=-0,33$, $p=0,0669$) und an D7 eine signifikante negative Korrelation ($\tau=-0,51$, $p=0,00623$) nachgewiesen werden.

Zudem zeigte sich ein Konzentrationsunterschied zwischen Patienten mit und ohne Adipositas für miR-125b-5p und miR-143-3p (miR-125b-5p: Friedman $X^2(9)=18,2$, $p=0,0329$; miR-143-3p: Friedman $X^2(9)=17,04$, $p=0,0482$). An D2 waren die Werte beider miRNAs signifikant höher in der Gruppe mit Adipositas (miR-125b-5p: $p=0,00062$, miR-143-3p: $p=0,0149$). Im Gegensatz dazu ergaben sich an D3 für miR-125b-5p in der Gruppe ohne Adipositas signifikant höhere Werte ($p=0,00598$, Abb. 5).

Auch in der Gesamtkohorte ergab sich für miR-125a-5p kein signifikanter Zusammenhang mit den kardiovaskulären Risikofaktoren, Vorerkrankungen oder der Vormedikation ($p>0,05$ im

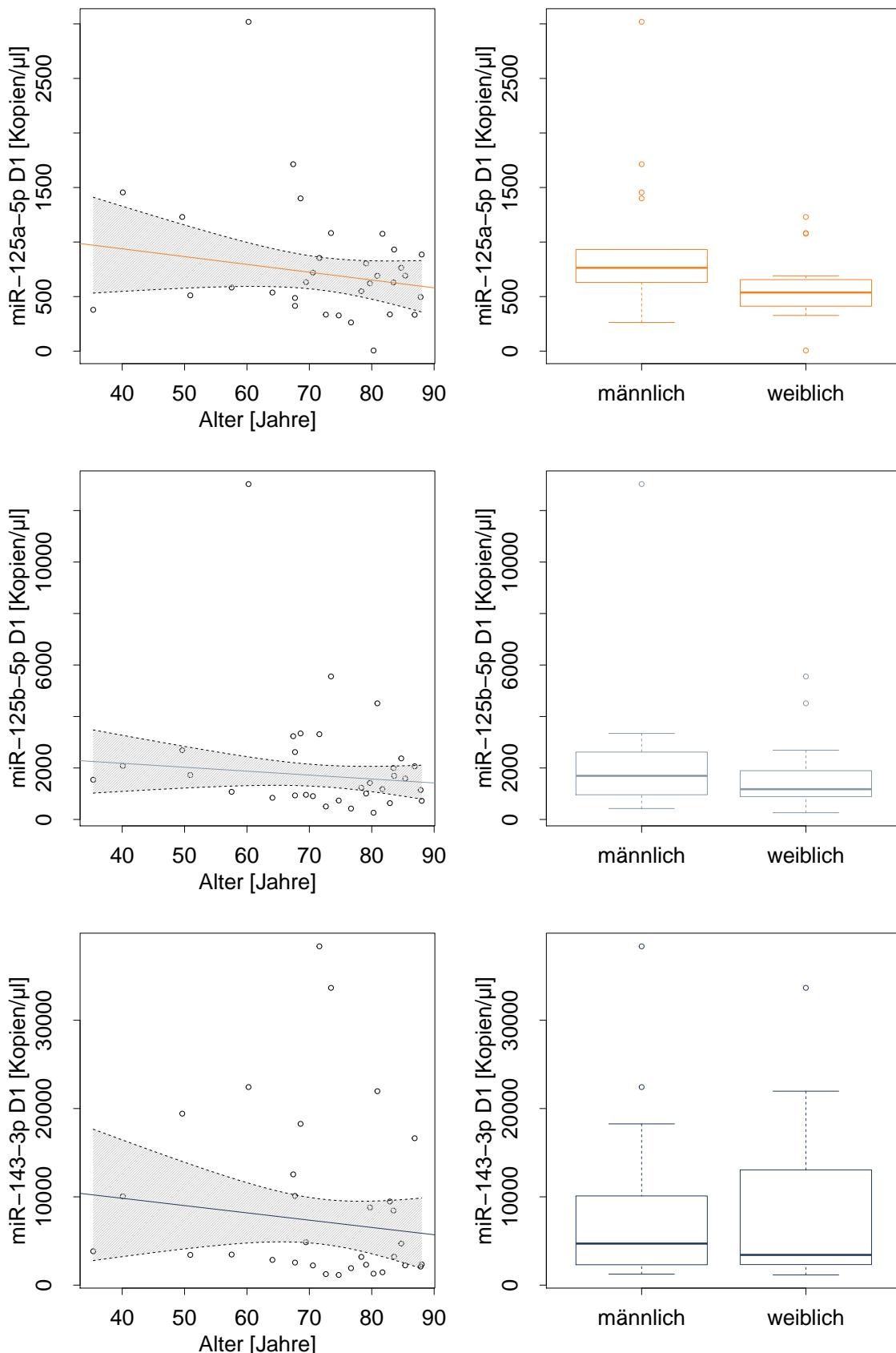


Abbildung 4 Darstellung der miRNAs abhängig von Alter und Geschlecht exemplarisch an D1 in der longitudinalen Kohorte. Regressionsmodelle mit Darstellung des 95%-Konfidenzintervalls. miR-125a-5p: RSE(30)=434, F=1,66, p=0,207; miR-125b-5p: RSE(30)=1212, F=1,12, p=0,298; miR-143-3p: RSE(30)=7349, F=0,63, p=0,433 mit RSE = Standardschätzfehler.

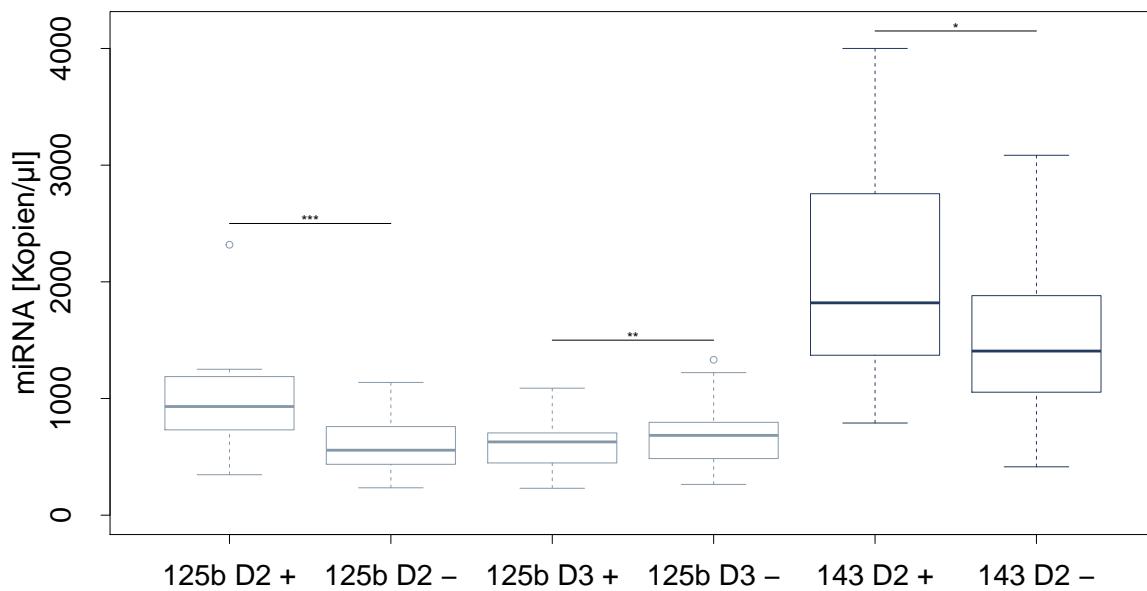


Abbildung 5 Darstellung der miRNAs abhängig von Adipositas in der longitudinalen Kohorte. * $<0,05$, ** $<0,01$, *** $<0,001$. +/- = Ergebnisse mit/ohne Adipositas.

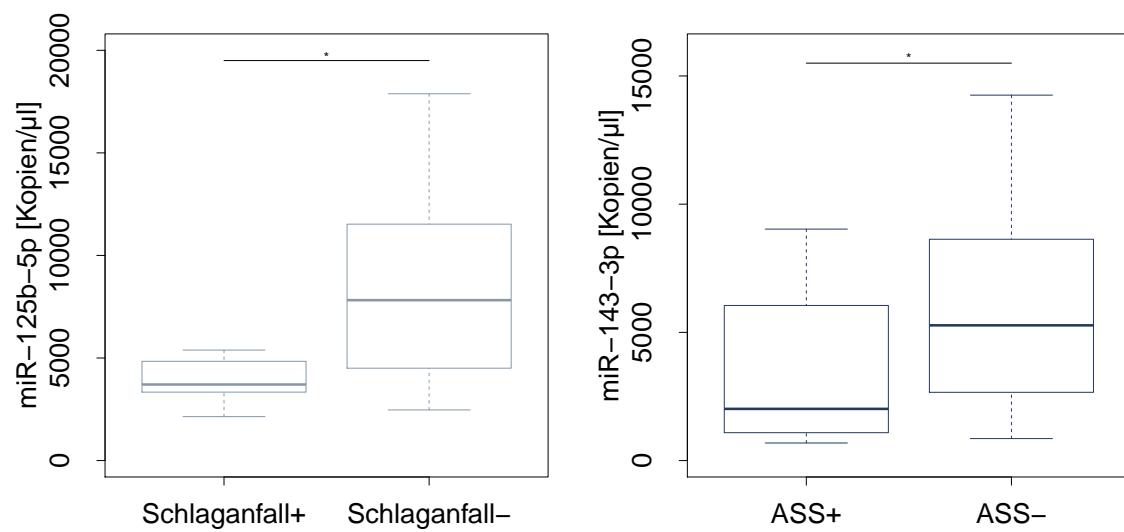


Abbildung 6 Darstellung der miRNAs abhängig von Vorerkrankungen und Vormedikation in der Gesamtkohorte. * $<0,05$. +/- = Ergebnisse mit/ohne Einnahme von ASS in den 4 Wochen vor Aufnahme beziehungsweise mit/ohne Schlaganfall in der Vorgeschichte.

Student's t- beziehungsweise Welch-Test). Für miR-125b-5p zeigten sich jedoch signifikant höhere Werte für Patienten ohne Schlaganfall in der Vorgeschichte als für Patienten, die bereits einen Schlaganfall erlitten hatte ($t(58)=-2,16$, $p=0,0349$, Abb. 6). Für miR-143-3p ergaben sich signifikant höhere Werte in der Patientengruppe, die kein ASS eingenommen hatte ($t(57)=-2,02$, $p=0,0479$, Abb. 6). Die übrigen Risikofaktoren inklusive BMI und Adipositas, sowie die Vorerkrankungen und die Vormedikation wiesen keinen Zusammenhang mit den miRNA-Konzentrationen auf.

Schlaganfälle oder die Einnahme von ASS in der Anamnese zeigten also einen Zusammenhang mit den miRNA-Werten am Aufnahmetag, während der BMI mit den Werten im Verlauf korrelierte.

3.3.1.3 Blutdruck bei Aufnahme

Ein erhöhter Blutdruck in der Akutsituation könnte zum Beispiel durch Zelltod bei Organ-schädigung zu einer unkontrollierten Freisetzung von miRNAs führen, sodass möglicherweise deren Profil durch hypertensive Blutdruckwerte verfälscht wird. Daher wurde der Blutdruck bei Aufnahme für alle Patienten bestimmt.

In der longitudinalen Kohorte zeigten die Patienten einen mittleren Blutdruck von 165,7 / 88,6 mmHg, 58,1% zeigten hypertensive Werte, 25,8% eine hypertensive Entgleisung.

Die Berechnung einer Rangkorrelation nach Kendall ergab in der longitudinalen Kohorte keinen Hinweis auf einen signifikanten Zusammenhang der miRNA-Konzentrationen mit den systolischen und diastolischen Blutdruckwerten bei Aufnahme ($p>0,05$).

Da hier nur der Blutdruck des Aufnahmetags betrachtet wurde, wurde auch die Gesamtkohorte als größere Stichprobe überprüft. Hier zeigte sich ein mittlerer Blutdruck von 167,7 / 88,7 mmHg und ebenfalls kein signifikanter Zusammenhang mit den miRNA-Konzentrationen ($p>0,05$).

3.3.1.4 Laborwerte

Einige miRNAs hängen mit verschiedenen Laborparametern zusammen, so unter anderem mit HDL, CRP oder verschiedenen Zellen des Blutes (Allantaz et al., 2012; Vickers et al., 2011; Willeit et al., 2013; Wu et al., 2018). Aus diesem Grund wurde in der longitudinalen Kohorte überprüft, ob die Werte des Aufnahmetags einen Einfluss auf den Verlauf der miRNA-Konzentrationen haben. Zudem wurden die miRNA-Konzentrationen jeden Tages (D1-90) auf einen Zusammenhang mit den Laborparametern vom selben Tag getestet. Für den Aufnahmetag wurden hier zusätzlich die Werte der Gesamtkohorte verwendet, um die gleichen Berechnungen mit einer größeren Stichprobe durchführen zu können.

Insgesamt ergaben sich nur für zwei Laborwerte signifikante Zusammenhänge mit den miRNAs. Zum Einen handelte es sich um Albumin, das an D3 eine negative Beziehung mit miR-125a-5p zeigte ($\tau=-0,38$, $p=0,0359$) und als Risikofaktor für einen ischämischen

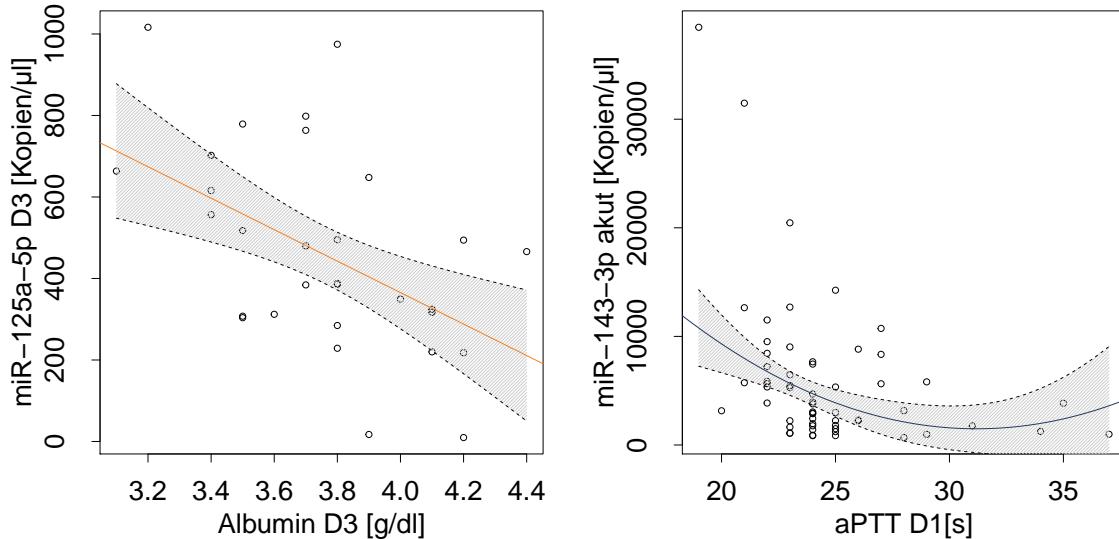


Abbildung 7 Regressionsmodelle für die signifikante Korrelation von miR-125a-5p mit dem Albuminwert in der longitudinalen Kohorte an D3 mit Darstellung des 95%-Konfidenzintervalls ($RSE(28)=196,2$, $F=8,17$, $p=0,00796$ mit RSE = Standardschätzfehler), sowie für die signifikante Korrelation von miR-143-3p mit der aPTT (= aktivierte partielle Thromboplastinzeit) am Aufnahmetag in der Gesamtkohorte mit Darstellung des 95%-Konfidenzintervalls ($RSE(56)=3885$, $F=5,69$, $p=0,0205$, ein extremer Ausreißer (aPTT=138s) wurde entfernt).

Schlaganfall und ein schlechteres Outcome gilt (Abubakar et al., 2013; Kisialiou et al., 2012; Xu et al., 2014). In Abbildung 7 ist das Modell der linearen Regression dieses Zusammenhangs dargestellt.

Zum Anderen konnte am Aufnahmetag in der größeren Gesamtkohorte eine signifikante negative Korrelation der aktivierten partiellen Thromboplastinzeit (aPTT) mit den Konzentrationen von miR-125a-5p ($\tau=-0,26$, $p=0,0419$) und miR-143-3p ($\tau=-0,29$, $p=0,0265$) nachgewiesen werden, nicht jedoch mit miR-125b-5p. Der Zusammenhang der aPTT mit miR-125a-5p ergab kein signifikantes Regressionsmodell. In Abbildung 7 ist das quadratische Regressionsmodell für den Zusammenhang mit miR-143-3p dargestellt, welches eine höhere Güte aufwies als das lineare.

Einen signifikanten Zusammenhang mit den miRNA-Konzentrationen am Aufnahmetag zeigte also nur die aPTT, während der Albuminwert einen Zusammenhang mit den miRNA-Konzentrationen im Verlauf aufwies.

3.3.2 Thrombolysetherapie mit rt-PA

Bisher ist die Wirkung von rt-PA auf die hier identifizierten miRNAs unbekannt. Daher wurden die miRNA-Konzentrationen in den beiden Gruppen mit und ohne Lysetherapie verglichen.

In der longitudinalen Kohorte ergab sich kein Unterschied zwischen den miRNA-Konzentrationen der Gruppen mit (13 Patienten) und ohne Thrombolysetherapie (Abb. 8).

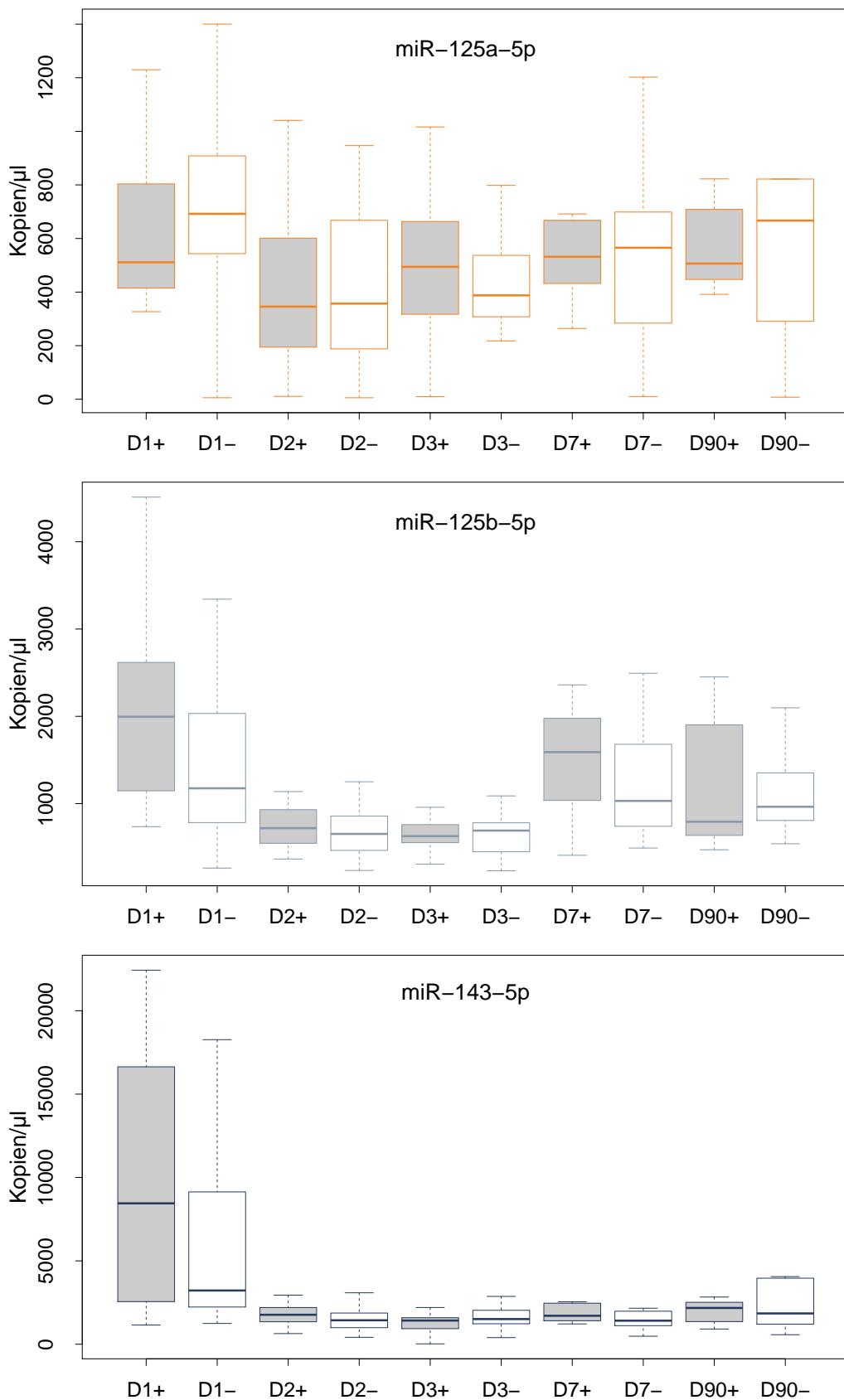


Abbildung 8 Vergleich der miRNA-Konzentrationen mit und ohne Thrombolysetherapie vom Aufnahmetag bis Tag 90. Ausreißer sind nicht mit abgebildet. Lyse+/- = Ergebnisse mit/ohne Thrombolysetherapie.

In der Gesamtkohorte waren 26 Patienten mit rt-PA behandelt worden, auch in dieser Kohorte ergab sich kein Unterschied in den miRNA-Konzentrationen zwischen den beiden Gruppen ($p>0,05$ im Student's t- beziehungsweise Welch-Test).

3.3.3 Zeitlicher Verlauf

3.3.3.1 Verlauf und Zusammenhang der microRNA

Um die drei miRNAs als Biomarker nutzen zu können, sollte deren zeitlicher Verlauf auch im Vergleich mit gesunden Kontrollpersonen nach dem akuten Ereignis bekannt sein, um bei einem erneuten Schlaganfall die miRNAs richtig interpretieren zu können. Es wurde bereits gezeigt, dass miRNAs teilweise noch ein halbes Jahr nach Schlaganfall verändert waren (Sepramaniam et al., 2014).

Wie in Abbildung 9 dargestellt ergaben sich signifikant unterschiedliche Werte über die Zeit und im Vergleich mit der Kontrollgruppe (miR-125a-5p: Friedman $X^2(5)=25,615$, $p=0,000106$; miR-125b-5p: Friedman $X^2(5)=17,527$, $p=0,00360$; miR-143-3p: Friedman $X^2(5)=22,231$, $p=0,000473$)).

Die Konzentrationen von miR-125a-5p an D1 waren bei den Patienten im Vergleich zu den Kontrollpersonen deutlich höher und blieben bis D90 auf einem relativ stabilen Level erhöht. Auch miR-125b-5p und miR-143-3p zeigte die initiale Erhöhung an D1. Nach einer Senke an D2 und D3 stiegen die Konzentrationen wieder, um sich an D90 ebenfalls auf einem im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöhten Level einzupendeln.

Da die miRNA-Konzentrationen von vielen Faktoren beeinflusst werden, ist es nicht sinnvoll nur eine einzelne miRNA als Diagnostikum zu verwenden. Der Konzentrationsverlauf einer Kombination von mehreren definierten miRNAs könnte eine Verfälschung durch solche Einflussfaktoren dagegen ausgleichen.

Die Beobachtung, dass alle drei miRNAs ein recht ähnliches Verlaufsmuster zeigten, ließ sich durch den Nachweis teils starker positiver Korrelationen der miRNAs untereinander an verschiedenen Tagen stützen (für die Modelle der signifikanten Korrelationen siehe Abb. 10, 11, 12 und 13).

So konnten für miR-125a-5p und miR-125b-5p signifikante Korrelationen an D1 ($\tau=0,51$, $p=0,00269$), D2 ($\tau=0,87$, $p<0,0001$), D3 ($\tau=0,56$, $p=0,000772$) und D90 ($\tau=0,69$, $p=0,00207$) nachgewiesen werden. Für miR-125a-5p und miR-143-3p zeigte sich an D2 ein signifikanter positiver Zusammenhang ($\tau=0,56$, $p<0,0001$). Auch miR-125b-5p und miR-143-3p wiesen einen signifikanten Zusammenhang an D1 ($\tau=0,54$, $p=0,00148$) und D2 ($\tau=0,54$, $p<0,0001$) auf.

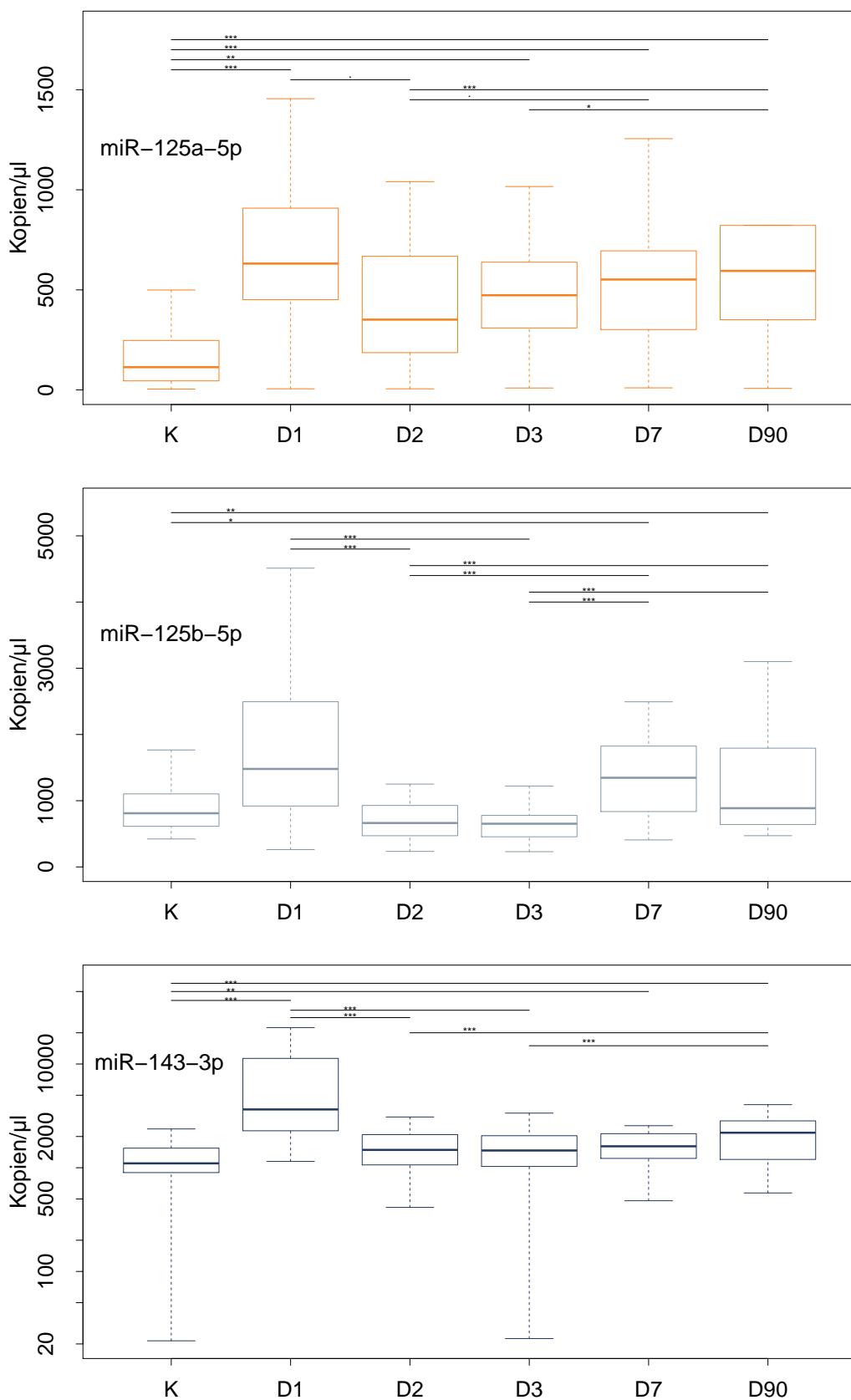


Abbildung 9 Zeitlicher Verlauf der miRNA-Konzentrationen im Verhältnis zur Kontrollgruppe. .<0,1, *<0,05, **<0,01, ***<0,001. Ausreißer sind nicht mit abgebildet. K=Kontrollen.

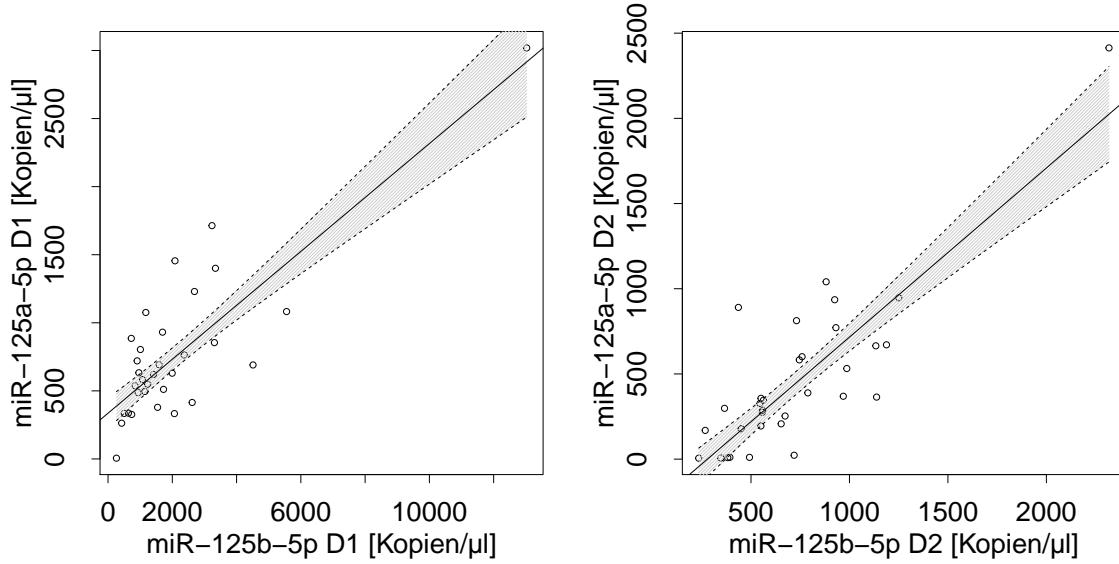


Abbildung 10 Regressionsmodelle für die signifikanten Korrelationen der Konzentrationen von miR-125a-5p und miR-125b-5p mit Darstellung des 95%-Konfidenzintervalls. D1: RSE(30)=240,2, F=54,65, p<0,0001; D2: RSE(30)=194,7, F=73,91, p<0,0001 mit RSE = Standardschätzfehler.

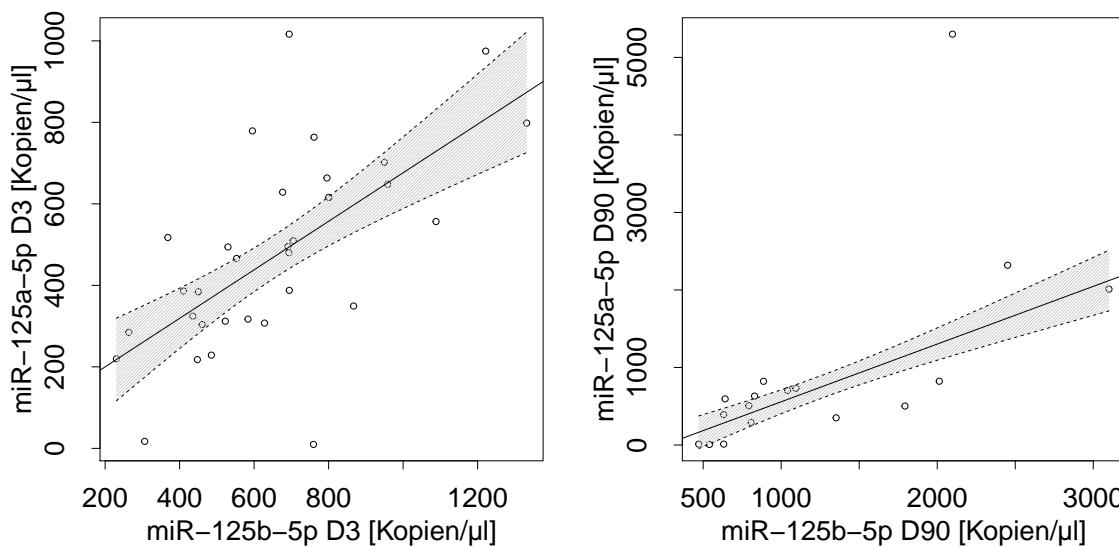


Abbildung 11 Regressionsmodelle für die signifikanten Korrelationen der Konzentrationen von miR-125a-5p und miR-125b-5p mit Darstellung des 95%-Konfidenzintervalls. D3: RSE(30)=151,5, F=27,51, p<0,0001; D90: RSE(15)=308,3, F=25,14, p=0,000154 mit RSE = Standardschätzfehler.

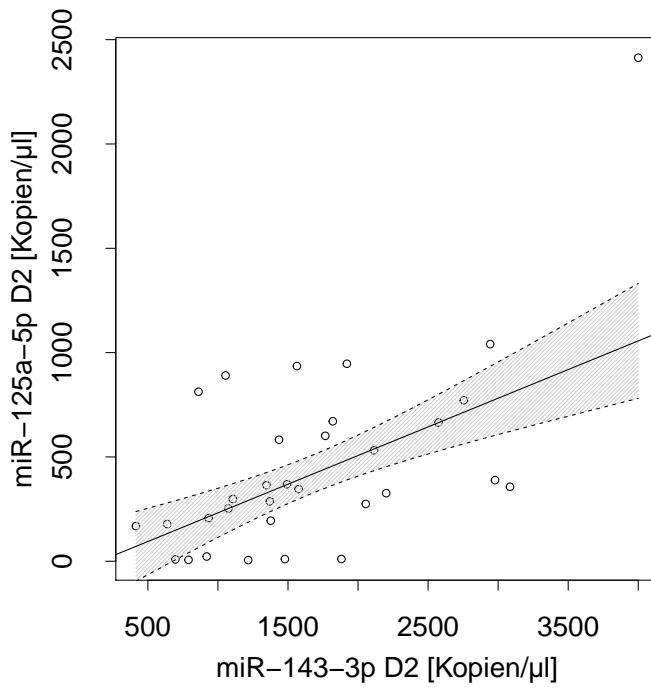


Abbildung 12 Regressionsmodell für die signifikante Korrelation der Konzentrationen von miR-125a-5p mit miR-143-3p mit Darstellung des 95%-Konfidenzintervalls. RSE(30)=262,8, F=13,12, p=0,00107 mit RSE = Standardschätzfehler.

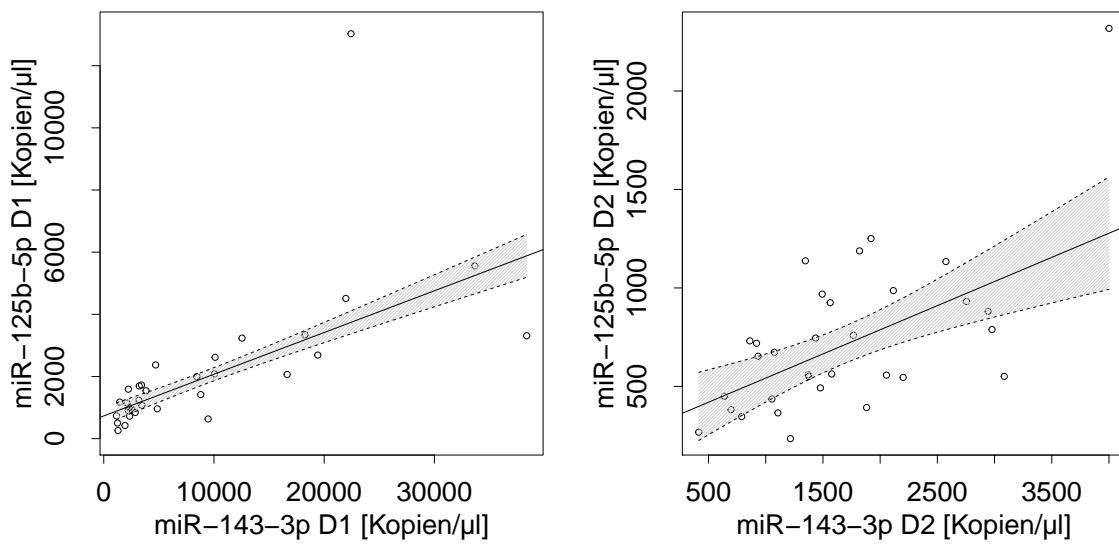


Abbildung 13 Regressionsmodelle für die signifikanten Korrelationen der Konzentrationen von miR-125b-5p mit miR-143-3p mit Darstellung des 95%-Konfidenzintervalls. D1: RSE(30)=606,8, F=86,78, p<0,0001; D2: RSE(30)=272,3, F=13,58, p=0,0009 mit RSE = Standardschätzfehler.

3.3.3.2 Zeit zwischen Symptombeginn und Blutentnahme

Die Zeit, die zwischen dem Beginn der Symptome und der Blutentnahme in der Notaufnahme verging, könnte einerseits die miRNA-Konzentrationen verändern und damit deren Interpretation erschweren. Andererseits könnte bei einem Zusammenhang möglicherweise der Zeitpunkt des Schlaganfalls im Sinne einer zusätzlichen Fragestellung aus den miRNA-Konzentrationen abgelesen werden, um die Entscheidung für oder gegen eine Thrombolysetherapie zu erleichtern.

Diese Zeit betrug in der longitudinalen Kohorte $5,98 \pm 5,13$ Stunden. Es konnte kein Zusammenhang mit den miRNAs im Verlauf nachgewiesen werden, auch am Aufnahmetag war in der Gesamtkohorte (mittlere Zeit $5,36 \pm 4,27$ Stunden) kein Zusammenhang erkennbar (jeweils $p>0,05$ in der Rangkorrelation nach Kendall).

Wurde zwischen Patienten unterschieden, die im Thrombolyse-Zeitfenster von 4,5 Stunden aufgenommen wurden und denen, die erst später in der Notaufnahme ankamen, zeigte sich weder am Aufnahmetag (Gesamtkohorte), noch im Verlauf (longitudinale Kohorte) ein Unterschied in den miRNA-Konzentrationen zwischen diesen beiden Gruppen ($p>0,05$ im Student's t-Test beziehungsweise Friedman-Test).

3.3.4 Schlaganfall-Charakteristika

3.3.4.1 Infarktvolumen

In Tiedt et al. (2017) konnte bereits gezeigt werden, dass die drei hier untersuchten miRNAs vermutlich thrombozytären und nicht neuronalen Ursprungs sind. Trotzdem ist bei einer zerebralen Ischämie mit entsprechendem Zelluntergang und umgebender Entzündungsreaktion ein Einfluss der Infarktgröße auf zirkulierende miRNAs denkbar. Ebenso besteht natürlich die Möglichkeit, dass von der Konzentration der miRNAs auf die Größe des Infarkts geschlossen werden könnte.

Am Aufnahmetag konnte jedoch in der Gesamtkohorte (mittleres Infarktvolumen von $18,62 \text{ ml} \pm 40,79 \text{ ml}$) kein Zusammenhang der miRNA-Konzentrationen mit dem Infarktvolumen nachgewiesen werden ($p>0,05$ in der Rangkorrelation nach Kendall).

Im Verlauf (longitudinale Kohorte mit mittlerem Volumen von $19,40 \text{ ml} \pm 44,43 \text{ ml}$) konnte eine zwar signifikante, aber nur schwache positive Korrelation des Infarktvolumens mit der Konzentration von miR-125a-5p an D3 ($\tau=0,35$, $p=0,0490$) gezeigt werden, sonst ergaben sich ebenfalls keine statistisch signifikanten Zusammenhänge (Abb. 14).

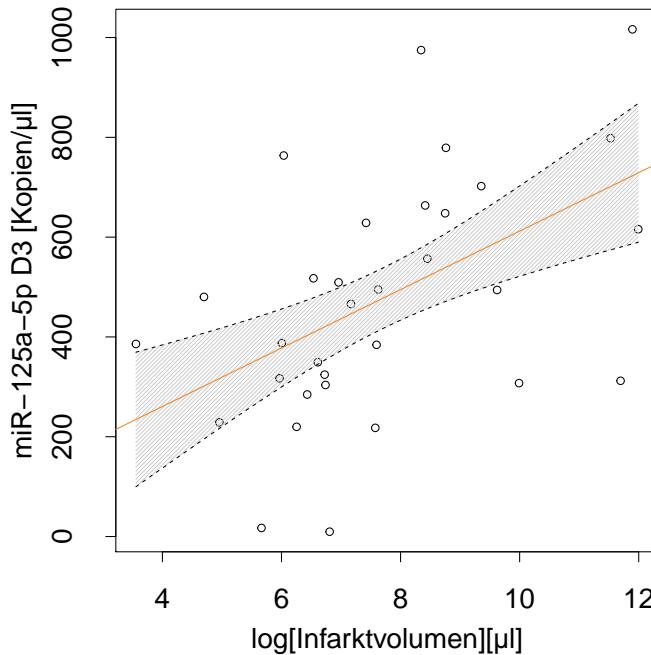


Abbildung 14 Regressionsmodell für die signifikanten Korrelation von miR-125a-5p an D3 mit dem Infarktvolumen. Um eine Normalverteilung zu erreichen, wurden die Werte des Volumens logarithmisiert. RSE(30)=174,8, F=8,86, p=0,00573 mit RSE = Standardschätzfehler.

3.3.4.2 Klinischer Schweregrad

Als Maß des Schweregrads eines Schlaganfalls kann neben der Größe des Infarkts auch die neurologische Symptomatik verwendet werden. Hierfür wurden die beiden oben erläuterten Skalen NIHSS und mRS angelegt.

In der longitudinalen Kohorte hatten 56,3% der Patienten einen leichten Schlaganfall erlitten ($\text{NIHSS } 2 \pm 1,3$), 34,4% einen mittelschweren ($\text{NIHSS } 7,5 \pm 2,4$) und 9,4% einen schweren ($\text{NIHSS } 19 \pm 2,6$). Nach der mRS waren am Aufnahmetag 62,5% leicht ($\text{mRS} \leq 2$) und 37,5% schwer ($\text{mRS} > 2$) betroffen.

Für miR-125a-5p ergaben sich keine statistisch signifikanten Zusammenhänge mit der NIHSS oder mRS im Verlauf. An D2 zeigte sich dagegen eine positive Korrelation der Konzentration von miR-125b-5p mit der NIHSS ($\tau=0,39$, $p=0,0258$) und an D7/E mit der mRS ($\tau=0,56$, $p=0,00576$). Auch für miR-143-3p an D2 ergab sich ein signifikanter Zusammenhang mit der NIHSS an D2 ($\tau=0,44$, $p=0,0123$), zudem wies miR-143-3p an D3 eine signifikante Korrelation mit der mRS ($\tau=0,53$, $p=0,00186$) auf. In Abbildung 15 ist der Zusammenhang zwischen miR-143-3p und der NIHSS an D2 dargestellt, für die übrigen Korrelationen waren die Regressionsmodelle nicht signifikant.

In einer multivariaten Analyse mittels GLMM in der longitudinalen Kohorte zeigte sich überraschenderweise jedoch keine signifikante Assoziation der drei miRNAs mit den Schlaganfall-Skalen. Lediglich die mRS zeigte tendenziell einen geringen positiven Zusammenhang mit miR-125b-5p (Estimate=0,17, $p=0,0737$) und die pmRS einen ebensolchen mit miR-125a-5p

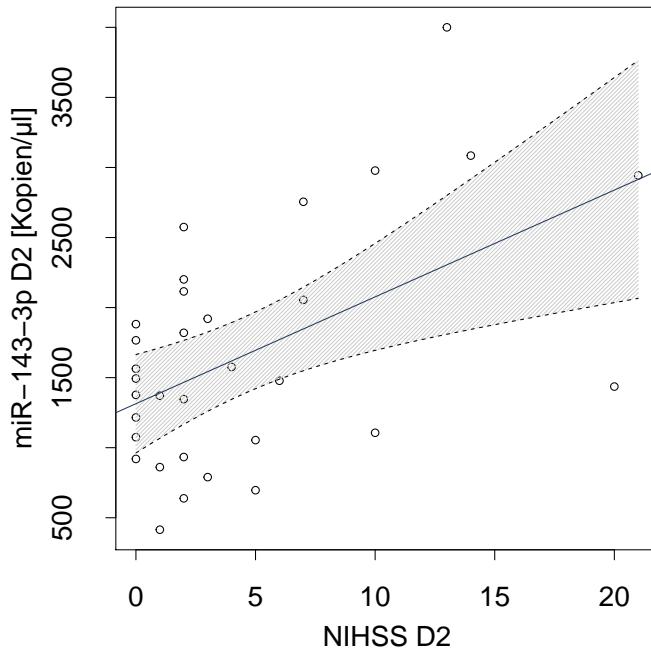


Abbildung 15 Regressionsmodell für die signifikante Korrelation von miR-143-3p an D2 mit der NIHSS an D2. RSE(30)=787,3, F=10,24, p=0,00324 mit RSE = Standardschätzfehler.

und miR-143-3p (Estimate=0,93, p=0,0974 beziehungsweise Estimate=0,80, p=0,0880). Für miR-143-3p zeigten sich signifikante Interaktionen zwischen den Skalen (NIHSS - pmRS p=0,0197, Interaktion aller drei Skalen p=0,0206), so dass die Ergebnisse mit Vorsicht zu interpretieren sind.

Um die Berechnungen in einer größeren Stichprobe durchführen zu können, wurden die Werte der Gesamtkohorte ebenfalls überprüft. Es ergab sich eine ähnliche Verteilung schwerer, mittelschwerer und leichter Schlaganfälle nach NIHSS und mRS wie in der longitudinalen Kohorte. Korrelationen zwischen den miRNA und den Skalen zeigten sich hier nicht.

In einem GLMM mit den Daten vom Aufnahmetag fiel allerdings eine signifikante negative Assoziation der NIHSS mit miR-125a-5p (Estimate=-0,21, p=0,0381) auf, auch für die pmRS konnte eine negative Assoziation mit miR-125b-5p (Estimate=-1,40, p=0,0121) und miR-143-3p (Estimate=-1,92, p=0,0111) nachgewiesen werden. Die mRS schien nicht mit den miRNA-Konzentrationen assoziiert zu sein. Auch hier bestanden signifikante Interaktionen zwischen den Faktoren für miR-125b-5p (mRS - pmRS p=0,0287) und miR-143-3p (mRS - pmRS p=0,0159, NIHSS - pmRS p=0,0465, Interaktion aller drei Skalen p=0,0223).

Insgesamt konnten hier Hinweise auf Assoziationen aller drei miRNA mit dem klinischen Schweregrad nach NIHSS und mRS festgestellt werden.

Anhand der mRS wurde weiter überprüft, ob ein Zusammenhang der miRNA-Konzentrationen des Aufnahmetags mit dem Outcome der Patienten drei Monate nach Schlaganfall besteht. Da nicht für alle Patienten ein mRS-Wert an D90 vorlag, wurde mit den Werten

der Gesamtkohorte gerechnet, um eine größere Stichprobe nutzen zu können. Im Vergleich der an D90 wenig ($mRS \leq 2$) oder schwer ($mRS > 2$) betroffenen Patienten ergab sich kein signifikanter Unterschied ($p > 0,05$ im Student's t- beziehungsweise Welch-Test).

Die gleichen Berechnungen können auch mit der NIHSS an D90 angestellt werden, auch hier scheinen die initialen miRNA-Konzentrationen jedoch nicht mit dem Outcome an D90 zusammen zu hängen.

3.3.4.3 Ätiologie und Lokalisation

Auch die Ätiologie oder die Lokalisation des Schlaganfalls könnten einen Einfluss auf zirkulierende miRNAs haben. Ebenso ist es aber vorstellbar, dass miRNA-Konzentrationen auf die Ätiologie oder Lokalisation hinweisen könnten.

Die häufigste Ätiologie nach TOAST-Klassifikation in der longitudinalen Kohorte war die Makroangiopathie (Klasse 1, 31,25%), bei ebenso vielen Patienten war die Ätiologie nicht bestimmbar (Klasse 5). Insgesamt 28,13% hatten eine kardiale Embolie (Klasse 2) erlitten, 6,25% eine mikroangiopathische Ischämie (Klasse 3) und 3,13% einen Schlaganfall mit anderer definierter Ätiologie (Klasse 4). In zwei Dritteln der Fälle (65,63%) war die linke Hemisphäre und in 80% der Fälle die anteriore Strombahn betroffen.

In einem GLMM konnte hier eine Assoziation der Ätiologie nach TOAST-Klassifikation, sowie der betroffenen Strombahn mit allen drei miRNAs gezeigt werden. Tendenziell zeigten sich in TOAST-Klasse 1 und 2 höhere Werte als in den anderen Klassen, die Stichprobe ist jedoch zu klein, um reliable Aussagen zu treffen. Die betroffene Hemisphäre hatte keinen Einfluss auf die zirkulierenden miRNAs (Tab. 10). Auch in diesem Modell hatte sich für miR-125a-5p eine signifikante Interaktion von betroffener Hemisphäre und Stromgebiet ergeben ($p=0,003229$).

Parameter	miRNA	χ^2 , p
TOAST	miR-125a-5p	$\chi^2(4)=10,48$, $p=0,0331^*$
	miR-125b-5p	$\chi^2(4)=16,38$, $p=0,00255^*$
	miR-143-3p	$\chi^2(4)=10,20$, $p=0,0373^*$
Stromgebiet	miR-125a-5p	$\chi^2(2)=6,24$, $p=0,0441^*$
	miR-125b-5p	$\chi^2(2)=10,07$, $p=0,00652^*$
	miR-143-5p	$\chi^2(2)=6,39$, $p=0,0409^*$
Hemisphäre	miR-125a-5p	$\chi^2(1)=0,90$, $p=0,344$
	miR-125b-5p	$\chi^2(1)=1,26$, $p=0,263$
	miR-143-3p	$\chi^2(1)=0,44$, $p=0,505$

Tabelle 10 Ergebnisse des GLMM zu Ätiologie und Lokalisation in der longitudinalen Kohorte. ANOVA nach GLMM bei nominalskalierten Variablen. * = $p < 0,05$.

Eine ähnliche Verteilung von Ätiologie und Lokalisation fand sich auch in der Gesamtkohorte, deren Werte für die Berechnungen vom Aufnahmetag herangezogen wurden. Hier ergab sich in einem GLMM jedoch kein Hinweis auf einen Zusammenhang der Ätiologie oder der Lokalisation mit den Konzentrationen der miRNAs am Aufnahmetag ($p>0,05$).

4 Diskussion

In Tiedt et al. (2017) wurden drei miRNAs identifiziert, die großes Potential als Biomarker für den ischämischen Schlaganfall zeigen: miR-125a-5p, miR-125b-5p und miR-143-3p. Das Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung klinischer und laborchemischer Faktoren, die mit den Konzentrationen dieser drei miRNAs im Plasma von Patienten mit akutem ischämischem Schlaganfall assoziiert waren. Einerseits diente dies der Erfassung potentieller Fehlerquellen bei der Nutzung des Biomarkers, andererseits sollte überprüft werden, ob die miRNAs zusätzliche Fragestellungen wie die nach der Größe des Infarkts oder der Ätiologie beantworten könnten.

4.1 Allgemeines zu Studiendesign und Population

Vorteile dieser Studie sind der prospektive Einschluss von Patienten, sowie der festgelegte Zeitplan mit einer ersten Probenentnahme sofort nach Ankunft der Patienten in der Notaufnahme und maximal 24 Stunden nach Symptombeginn, sowie das *Follow-up* bis 90 Tage nach Ereignis. Zusätzlich wurden durch Anwendung zweier verschiedener Methoden zur Isolierung von miRNAs (RNA-Sequencing und qRT-PCR) potentielle Beeinträchtigungen durch die Art der Analysen ausgeglichen (Tiedt et al., 2017). Insgesamt wurde für diese Arbeit nur mit einem relativ kleinen Teil der Studienpopulation gearbeitet, es wurde jedoch bereits eine Validierungsstudie mit größerer Fallzahl durchgeführt (Tiedt et al., 2017).

Die Häufigkeit der in unseren Studienkohorten abgefragten kardiovaskulären Risikofaktoren ist zudem mit der verschiedener Patientenkollektive aus anderen und meist größeren Schlaganfallstudien relativ gut vergleichbar, so dass die Kohorten hier als adäquate Stichprobe gelten können (Kulesh et al., 2010; Luengo-Fernandez et al., 2013; Palm et al., 2012; Thomalla et al., 2020).

Die Studienpopulation zeigte sich zudem im Vergleich mit dem bundesdeutschen Durchschnitt repräsentativ für die Allgemeinbevölkerung bezüglich Risikofaktoren wie Nikotinkonsum (Robert-Koch-Institut (Hrsg.), 2015), Übergewicht und Adipositas (World Health Organization, 2000) oder Hypercholesterinämie (Scheidt-Nave et al., 2013).

Der Anteil der Patienten mit arterieller Hypertonie liegt mit etwa 80% nach Neuhauser et al. (2016) etwas über den Werten im bundesdeutschen Durchschnitt (Robert-Koch-Institut (Hrsg.), 2015), auch die Prävalenz des Diabetes mellitus Typ II liegt etwas über dem Durchschnitt von 7,2% (Heidemann et al., 2013; Heidemann and Scheidt-Nave, 2017; Robert-Koch-Institut (Hrsg.), 2015). Dies kann durch die Tatsache zu erklären sein, dass unsere Kohorte einen deutlich höheren Altersdurchschnitt als die Allgemeinbevölkerung aufwies und die Häufigkeit dieser Erkrankungen mit dem Alter zunimmt. Zudem handelt es sich um Schlaganfallpatienten, die im Allgemeinen ein deutlich höheres kardiovaskuläres Risiko haben.

Die Anzahl der Patienten mit Zustand nach Herzinfarkt oder Schlaganfall beziehungsweise TIA und bekannter KHK spiegelt in unserer Studie aufgrund der Selektion der Studien-

gruppen naturgemäß nicht die Verbreitung in der Bevölkerung wieder (Busch et al., 2013; Gößwald et al., 2013). Zum einen galt initial eine kardiovaskuläre Vorerkrankung als Ausschlusskriterium (deutlich geringere Zahlen in der Screening-Kohorte), zum anderen ist in der Validierungskohorte eine andere Altersverteilung anzunehmen als in der Allgemeinbevölkerung, was die Prävalenz erhöhen dürfte. Zudem handelt es sich bei unserer Stichprobe um Schlaganfallpatienten, die entsprechend bereits ein höheres kardiovaskuläres Risiko aufwiesen. Auch die Beobachtung, dass etwa 10% der Schlaganfallpatienten ein Rezidiv erleiden, kann die größere Häufigkeit in der Validierungskohorte erklären (Kolominsky-Rabas et al., 2001; Robert-Koch-Institut (Hrsg.), 2015).

Die Unterschiede in der Prävalenz kardiovaskulärer Risikofaktoren und Vorerkrankungen zwischen den Patienten und den gesunden Kontrollpersonen in dieser Studie sind ähnlichen Gründen zuzuschreiben. So lagen typische Risikofaktoren für einen Schlaganfall wie die arterielle Hypertonie, das Vorhofflimmern und die pAVK in der Patientengruppe häufiger vor (Aboyans et al., 2017; Hankey, 2017). Da die kardiale Embolie vor allem durch Vorhofflimmern neben der Arteriosklerose eine der häufigsten Ursachen des ischämischen Schlaganfalls ist, verwundert es nicht, dass in der Patientengruppe deutlich häufiger Vorhofflimmern bereits bekannt war oder während des stationären Aufenthalts diagnostiziert wurde (Kolominsky-Rabas et al., 2001; O'Donnell et al., 2016; Palm et al., 2012).

Die erhöhten Entzündungsparameter wie CRP und Leukozyten bei den Patienten lassen sich durch die ischämiebedingte Inflammation erklären (Anuk et al., 2002; ElAli and Jean LeBlanc, 2016; Smith et al., 2004), die signifikant höhere Glucose lässt sich vermutlich als Stresshyperglykämie einordnen (Capes et al., 2001). Niedrige Albuminwerte sind ein Risikofaktor für einen ischämischen Schlaganfall und korrelieren zudem mit einem schlechteren Outcome und einem größeren Infarktvolumen, wie mehrere Studien zeigen konnten (Abubakar et al., 2013; Kisialiou et al., 2012; Xu et al., 2014). Auch eine niedrige AST korreliert mit einem schlechteren Outcome (Campos et al., 2011). Die insgesamt niedrigeren Werte im Lipidstatus der Patienten (Gesamtcholesterin, Triglyceride und LDL) mögen durch den höheren Bekantheitsgrad in der Gruppe der Patienten mit kardiovaskulären Vorerkrankungen und in der Folge höheren Anteil therapiierter Dyslipidämien begründet sein (Scheidt-Nave et al., 2013). Das HDL ist ein im Gegensatz zu den gerade genannten Werten negativ mit dem Risiko korreliert, ein niedrigerer Wert in einer Gruppe von Schlaganfallpatienten passt zu dieser Annahme (Prospective Studies Collaboration, 2007).

4.2 Wirkung der verschiedenen Einflussfaktoren

4.2.1 Demographie

Die demographischen Faktoren Alter und Geschlecht zeigten in dieser Kohorte keinen Einfluss auf die zirkulierenden miRNAs. Zu diesem Ergebnis kamen auch andere Studien, in denen unter anderem miR-125b-2* bei Schlaganfallpatienten im Vergleich zu Kontrollpersonen

verändert nachgewiesen wurde. Diese Veränderung war jedoch in diesen Studien unabhängig von Patientenalter und -geschlecht (Long et al., 2013; Modak et al., 2019; Sepramaniam et al., 2014).

4.2.2 Vormedikation

Wie schon in anderen Studien gezeigt, beeinflusst auch hier die Gabe von Heparin die Ergebnisse der PCR (Boeckel et al., 2013; Kaudewitz et al., 2013). Dieses Problem wurde jedoch durch die Behandlung der Proben mit Heparinase vor den Analysen gelöst.

In Tiedt et al. (2017) hatte sich zudem die Einnahme von Thrombozytenaggregationshemmern wie Aspirin als Variable mit relevantem Einfluss auf die Konzentration der miRNAs erwiesen. Auch in dieser Arbeit war eine deutlich niedrigere Konzentration von miR-143-3p in der Patientengruppe aufgefallen, die Aspirin in den vier Wochen vor Aufnahme eingenommen hatte.

Das Ergebnis steht im Einklang mit den Ergebnissen von de Boer et al. (2013). Die Autoren konnten hier einerseits zeigen, dass die thrombozytäre miRNA miR-126 bei der Aktivierung von Thrombozyten freigesetzt wird und dass andererseits diese Freisetzung durch die aspirinbedingte Hemmung reduziert wird. Auch Willeit et al. (2013) konnten nachweisen, dass die Plasmakonzentrationen verschiedener miRNAs thrombozytären Ursprungs bei Einnahme von Thrombozytenaggregationshemmern wie Aspirin und Prasugrel deutlich erniedrigt waren; der Effekt war dosisabhängig.

Dass auch miR-143-3p thrombozytären Ursprungs ist, wurde in Tiedt et al. (2017) und Elgheznawy et al. (2015) nachgewiesen. Es liegt hier also die Vermutung nahe, dass diese deutliche Abnahme der Konzentration von miR-143-3p im Plasma durch die Hemmung der Thrombozytenaktivierung durch Aspirin und die daraus resultierende geringere Freisetzung von miR-143-3p verursacht ist.

Auf die anderen beiden miRNAs schien die Einnahme von Aspirin hier jedoch keinen Einfluss zu haben. Die Kombination dreier miRNAs scheint also ein guter Ansatz, diesen Einflussfaktor zu vermeiden.

4.2.3 Kardiovaskuläre Risikofaktoren und Vorerkrankungen

Wie in der Einleitung beschrieben, können verschiedene kardiovaskuläre Risikofaktoren eine Veränderung der zirkulierenden miRNAs verursachen (Creemers et al., 2012; Huang et al., 2018). Auch ein direkter Zusammenhang mit den Blutdruckwerten ist beispielsweise für miR-21 bekannt (Kriegel et al., 2015; Li et al., 2016).

Für die hier untersuchten miRNAs, vor allem für miR-143, hatten sich ebenfalls Hinweise auf eine Beteiligung an der Regulation des Blutdrucks ergeben (Deng et al., 2015a; Kontaraki et al., 2014; Kriegel et al., 2015). Auch in Tiedt et al. (2017) hatte sich eine bestehende arterielle Hypertonie als konfundierende Variable erwiesen. In der vorliegenden Arbeit zeigten jedoch

erfreulicherweise weder der systolische oder diastolische Blutdruck bei Aufnahme, noch eine vorbestehende arterielle Hypertonie einen Einfluss auf die miRNA-Konzentrationen. Eine Verfälschung der miRNA-Konzentrationen beispielsweise durch hypertone Blutdruckwerte bei Aufnahme ist daher nicht anzunehmen.

Im Gegensatz dazu schien das Körpergewicht einen deutlichen Einfluss auf das Profil zirkulierender miRNAs zu haben. So konnte eine negative Korrelation von miR-143-3p mit dem BMI gezeigt werden, wie sie auch schon in Keller et al. (2011) beschrieben ist. Die Expression von miR-143-3p ist zwar in der Differenzierung von Vorgängerzellen zu reifen Fettzellen erhöht, in Fettzellen adipöser Mäuse oder Menschen jedoch deutlich erniedrigt (Keller et al., 2011; Xie et al., 2009). Auch für miR-125b-5p und in deutlich geringerem Umfang für miR-125a-5p konnte eine Rolle in der Adipogenese festgestellt werden (Esau et al., 2004; Kajimoto et al., 2006; Ortega et al., 2010; Xie et al., 2009), so dass ein Zusammenhang der miRNAs mit dem BMI nicht überrascht.

Am Aufnahmetag lagen zudem die Konzentrationen von miR-125b-5p und miR-143-3p im peripheren Blut, wie bereits zuvor in der Literatur beschrieben (Keller et al., 2011; Ortega et al., 2010; Xie et al., 2009), bei adipösen Patienten deutlich niedriger als bei nicht adipösen Patienten (1278/ μ l beziehungsweise 3958/ μ l im Vergleich mit 2505/ μ l beziehungsweise 11028/ μ l). Auch miR-125a-5p zeigte dieses Muster (598/ μ l verglichen mit 840/ μ l), statistisch war der Unterschied jedoch nicht signifikant.

An den Folgetagen waren diese Konzentrationsunterschiede nicht mehr ebenso eindeutig nachweisbar und teils sogar umgekehrt, was wahrscheinlich daran liegt, dass im Rahmen des akuten Schlaganfalls eine Vielzahl weiterer Einflussfaktoren auf die miRNAs wirken. Alle drei miRNAs zeigten zwar noch an D7/E bei adipösen Patienten eine niedrigere Konzentration als bei nicht adipösen, drei Monate nach Schlaganfall war das Muster jedoch umgekehrt.

Auch diese längerfristige Änderung ist vermutlich eher mit der Wirkung des Schlaganfalls und seiner Folgeerscheinungen zu erklären. Wie bereits mehrfach gezeigt, bleiben die miRNA-Konzentrationen oft noch Monate bis Jahre nach einem ischämischen Ereignis verändert (Long et al., 2013; Sepramaniam et al., 2014; Tiedt et al., 2017).

Da die Kohorte in dieser Arbeit jedoch nicht besonders groß war, sollten die Ergebnisse in einer größeren Studie überprüft werden, um eine Verzerrung der Biomarker durch das Gewicht der Patienten zu vermeiden.

Die Tatsache, dass auch an D90 noch eine veränderte Konzentration der miRNAs vorlag, erklärt vermutlich auch den Unterschied der Konzentration von miR-125b-5p abhängig von der Schlaganfallanamnese der Patienten. In dieser wie in weiteren Studien wurde zwar eine langanhaltende Veränderung der miRNAs gezeigt, ein Rückgang zum Ausgangsniveau konnte jedoch auf Grund der zeitlich begrenzten Datenerhebung meist nicht nachgewiesen werden (Long et al., 2013; Sepramaniam et al., 2014; Tiedt et al., 2017). Auch in der vorliegenden

Arbeit blieb trotz des langen *Follow-ups* von 90 Tagen unklar, ob und wenn ja, nach welcher Zeit sich die miRNA-Konzentrationen wieder normalisieren.

Patienten, die vor Aufnahme in die Studie bereits einen Schlaganfall erlitten hatten, wiesen hier deutlich niedrigere Konzentrationen von miR-125b-5p auf als diejenigen, die mit einem ersten Schlaganfall aufgenommen wurden. Für die anderen beiden miRNAs zeigten sich die Ergebnisse hier zwar nicht signifikant, es war jedoch die gleiche Tendenz zu beobachten. Auch in Tiedt et al. (2017) war in einer Kohorte von 200 Schlaganfallpatienten ein kardiovaskuläres Ereignis wie ein Schlaganfall in der Vorgeschichte als relevanter Einflussfaktor identifiziert worden.

Die hier vorliegende Patientengruppe mit vorherigem Schlaganfall ist zwar mit 11 von 60 Patienten relativ klein, dennoch sollte bei der weiteren Untersuchung dieser miRNA-Kombination besonderes Augenmerk auf relevante zerebrovaskuläre Ereignisse in der Anamnese gerichtet werden.

4.2.4 Zeitlicher Verlauf

Warum die miRNA-Konzentrationen in der Gruppe, die vor Aufnahme bereits einen Schlaganfall erlitten hatte, niedriger waren, ist unklar und steht auch im Gegensatz zu den im Vergleich zur Kontrollgruppe noch deutlich erhöhten Konzentrationen an D90. Diese waren für alle drei miRNAs nachzuweisen und könnten verschiedene Gründe haben.

So hat miR-125a eine wichtige Funktion im Stoffwechsel von Endothelzellen und damit in der Angiogenese inne. In einem miR-125a-*Knock-out*-Modell bei Zebrafischen zeigten diese Tiere eine deutlich vermehrte Gefäßneubildung (Wade et al., 2019), möglicherweise induziert durch Hypoxie (Jin et al., 2017). Die Beeinträchtigung der Angiogenese durch erhöhte miR-125a-Spiegel wurde auch in anderen Studien gezeigt (Che et al., 2014). Zudem scheint miR-125a-5p an der Aufrechterhaltung der BHS beteiligt zu sein (Reijerkerk et al., 2013).

Auch für miR-125b konnte eine bedeutende Funktion in der Regulation der Angiogenese nachgewiesen werden (Muramatsu et al., 2013), zudem scheint diese miRNA auch eine neuroprotektive Funktion zu übernehmen. Liang et al. (2018) zeigten im Rattenmodell, dass ein Inhibitor von miR-125b durch Ischämie und Reperfusion hervorgerufene neuronale Schäden verringern konnte. Weiter spielt miR-125b eine bedeutende Rolle in der Differenzierung von Stammzellen zu Neuronen (Benchoua and Peschanski, 2013; Deng et al., 2015b; Le et al., 2009).

miR-143-3p schließlich besitzt ebenfalls großes Potential in der Angiogenese. So wurde mehrfach gezeigt, dass der Transport des Clusters miR-143 / miR-145 eine wichtige Form der Kommunikation zwischen glatten Muskelzellen und Endothelzellen darstellt (Climent-Salarich et al., 2015; Deng et al., 2015a; Hergenreider et al., 2012) und für die Funktion der glatten Muskelzellen essentiell ist (Zampetaki and Mayr, 2012). Zudem schützt miR-143 Zellen vor den Folgen von oxidativem Stress (Xu et al., 2017) und reguliert Proliferation und

Apoptose, sowie die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine in verschiedenen Zellen (Yang et al., 2018).

Nach einer zerebralen Ischämie sind die Wiederherstellung der Blutversorgung durch Neoangiogenese, sowie die zerebrale Neurogenese essentiell. Dass an der Neoangiogenese auch verschiedene miRNAs beteiligt sind, wurde bereits mehrfach nachgewiesen (Bai et al., 2011; Liu et al., 2013a). Noch acht Wochen nach dem initialen Infarkt laufen diese Prozesse ab, wie Doeppner et al. (2013) an Hand von miR-124 zeigen konnten. Auch die Neurogenese nach ischämischem Schlaganfall ist ein längerfristiger Prozess, der partiell von miRNAs gesteuert wird. Einige dieser miRNAs waren zudem zirkulierend im Blut von Schlaganfallpatienten nachweisbar (Liu et al., 2013b, 2011; Zeng et al., 2016).

Die Erhöhung der drei hier untersuchten miRNAs an D90 könnte also einerseits auf deren Funktion in der Angiogenese und eine damit einhergehende Beteiligung beim post-ischämischen Gefäß-Remodeling zurück zu führen sein. Andererseits liegt die Vermutung nahe, dass miR-125b-5p in der Funktion als Regulator der neuronalen Differenzierung auch längerfristig nach zerebraler Ischämie wirkt.

Doch schon in den ersten 24 Stunden nach dem Schlaganfall waren die Konzentrationen aller drei miRNAs im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich erhöht. Hier spielt vermutlich die ischämiebedingte zerebrale Entzündungsreaktion eine Rolle, die durch verschiedene Mechanismen wie die Aktivierung von Mikroglia, die Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen und die Einwanderung von Leukozyten initiiert und aufrecht erhalten wird (Bonaventura et al., 2016; Li et al., 2018; Wu et al., 2015). Diese Prozesse beginnen zügig nach Einsetzen der Ischämie, die Einwanderung von neutrophilen Granulozyten wurde von Liu et al. (2001) innerhalb der ersten drei Stunden und bis zu einem Zeitpunkt von 24 Stunden nach Reperfusion nachgewiesen.

Leukozyten sind allgemein einer der Haupttreiber der Inflammation, doch auch miRNAs spielen eine direkte Rolle in der post-ischämischen Entzündungsreaktion (Wu et al., 2015; Xu et al., 2015). Wie Allantaz et al. (2012) zeigen konnten, enthalten neutrophile Granulozyten miR-125a und miR-143. Dass miR-125a in verschiedenen Leukozyten und vor allem in Makrophagen vorkommt, wurde auch in anderen Studien belegt (Banerjee et al., 2013; Graff et al., 2012), zudem ist miR-125a über die Differenzierung regulatorischer T-Zellen an der Regulierung des Immunsystems beteiligt (Pan et al., 2015).

miR-125b scheint ebenfalls eine Rolle in der Differenzierung von Makrophagen zu spielen und kommt insbesondere in Mikroglia vor, den Gewebsmakrophagen des ZNS (Butovsky et al., 2014; Ratliff et al., 2014; Zhang et al., 2013).

miR-143 gilt als pro-inflammatorisch. So kann diese miRNA von Monozyten, die im Rahmen einer systemischen Inflammation aktiviert werden, in Exosomen verpackt sezerniert werden, ist nach akutem Herzinfarkt über die zirkulierenden Monozyten an der Entzündungsreaktion

beteiligt und korreliert mit dem Entzündungsparameter CRP (Akao et al., 2011; ElAli and Jean LeBlanc, 2016; Parahuleva et al., 2017; Zhang et al., 2013).

Interessanterweise konnten Parahuleva et al. (2017) zeigen, dass die nach Herzinfarkt initial erhöhten Konzentrationen von miR-143 nach drei Monaten wieder auf das Ausgangslevel sanken. Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Studie, wonach die Konzentrationen von miR-143-3p nach 3 Monaten im Vergleich zur Kontrollgruppe noch signifikant erhöht waren. Möglicherweise liegt dies an einer höheren Aktivität der miRNA im ZNS, weitere Untersuchungen sind jedoch wünschenswert.

Eine weitere Ursache für die Erhöhung der drei miRNAs im Rahmen eines ischämischen Schlaganfalls könnte ihre thrombozytäre Herkunft sein, wie sie in Tiedt et al. (2017) nachgewiesen wurde. Neben der thrombozytären Herkunft der drei miRNAs konnte in einer Replikationskohorte zudem gezeigt werden, dass die Thrombozytenzahl, sowie eine Therapie mit Thrombozytenaggregationshemmern relevante konfundierende Variablen sind, so dass von einem Zusammenhang mit der Aggregation und Thrombusbildung ausgegangen werden kann (Tiedt et al., 2017).

Beim ischämischen Schlaganfall sind Thrombozyten naturgemäß durch die Thrombusbildung beteiligt. Bereits mehrfach wurde nachgewiesen, dass bei einem akuten Infarkt die Zahl der Thrombozyten absinkt, während die verbliebenen vergrößert und funktionell eher hyperaktiv sind (Sadeghi et al., 2020; Tohgi et al., 1991). Zudem haben Thrombozyten eine pro-inflammatorische Funktion und interagieren auf bisher unklare Weise mit verschiedenen Leukozyten, vor allem aber mit T-Lymphozyten und befeuern so die lokale Entzündungsreaktion im Rahmen des post-ischämischen Reperfusionsschadens (Burkard et al., 2020; Stegner et al., 2019; Stoll and Nieswandt, 2019).

Sowohl die Inflammationsreaktion, als auch die Freisetzung aus Thrombozyten könnten also durchaus zu einer akuten Veränderung der Konzentrationen der zirkulierenden miRNAs bei zerebraler Ischämie führen.

4.2.5 Laborparameter

Trotz der Beteiligung der drei miRNAs an der post-ischämischen Entzündungsreaktion und ihres thrombozytären Ursprungs erwiesen sie sich als unempfindlich gegenüber Schwankungen von Laborparametern wie Leukozyten, CRP oder Thrombozyten. Bei der Untersuchung der Laborwerte auf Zusammenhänge mit den miRNA-Konzentrationen hatte sich nur für Albumin und die aPTT ein signifikantes Ergebnis gezeigt.

Wie beim Vergleich von Patienten- und Kontrollgruppe schon beschrieben, ist ein niedriger Albuminwert nicht nur ein Risikofaktor für den Schlaganfall selbst, sondern auch ein Prädiktor für ein schlechteres Outcome und ein größeres Infarktvolumen und korreliert negativ mit der NIHSS (Abubakar et al., 2013; Kisialiou et al., 2012; Xu et al., 2014).

In dieser Arbeit war für das Albumin lediglich an D3 ein negativer Zusammenhang mit miR-125a-5p erkennbar. Diese miRNA zeigte jedoch keinen Zusammenhang mit der NIHSS

an D3. Interessanterweise konnte ein schwacher negativer Zusammenhang zwischen dem Albuminwert an D3 und dem NIHSS-Wert an D3 gezeigt werden, dieser war jedoch nur bei einem Signifikanzniveau von 0,1 signifikant und ist deswegen hier nicht dargestellt. Auch an anderen Tagen hatten sich Hinweise auf einen Zusammenhang des Albumins mit miR-125a-5p und miR-125b-5p ergeben, diese erreichten jedoch keine Signifikanz. miR-143-3p schien völlig unabhängig vom Albuminwert zu sein, was erneut den Vorteil der Kombination mehrerer miRNAs hervorhebt.

Woher die Assoziation von miR-125a-5p mit dem Albumin in diesem Fall kommt, ist unklar. Bisher konnte unter anderem bei kritisch kranken Patienten mit Sepsis eine negative Korrelation von miR-125a mit dem Albumin gezeigt werden (Liu et al., 2020). Auch andere miRNAs waren bei Sepsispatienten mit dem Albumin korreliert (Wang et al., 2020). Dies und die klare Assoziation eines niedrigen Albuminwerts mit höheren NIHSS-Werten, größeren Infarkten und schlechterem Outcome könnte durch die neuroprotektive Funktion von Albumin als Antioxidans zu erklären sein (Abubakar et al., 2013; Rael et al., 2019). Sowohl durch die zerebrale Ischämie, als auch durch die Reperfusion wird das Gleichgewicht zwischen Oxidantien wie reaktiven Sauerstoffspezies und Antioxidantien gestört, was die sekundäre Schädigung des Hirnparenchyms mit bedingt (Li et al., 2018). Zudem konnte bereits mehrfach gezeigt werden, dass manche miRNAs einen Einfluss auf die Expression verschiedener Antioxidantien haben (Liu et al., 2015; Zhao et al., 2014). Um diese Frage zu beantworten, sind jedoch weitere Studien notwendig.

Für die aPTT, den Marker der intrinsischen Gerinnung, hatte sich am Aufnahmetag in der Gesamtkohorte ein Zusammenhang mit den Konzentrationen von miR-125a-5p und miR-143-3p ergeben. Der Mittelwert war hier mit 26,5 Sekunden im Normbereich, wie auch in Xie et al. (2019) beschrieben. Die aPTT erwies sich als unabhängig von der Einnahme von ASS vor Aufnahme. Auch die Thrombolysetherapie kommt hier als Ursache einer Veränderung nicht in Frage, da in dieser Studie die erste Blutentnahme immer vor der Gabe von rt-PA erfolgt war. Zu einem potentiellen Zusammenhang der miRNAs mit der aPTT gibt es jedoch kaum Studien, so dass die Ursache an dieser Stelle unklar bleibt. Lediglich für miR-122 war eine Korrelation mit der aPTT bei Sepsis-Patienten mit Störung der Blutgerinnung nachgewiesen worden (Wang et al., 2014). Auch die INR zeigte entsprechende Tendenzen, die Werte erreichten aber keine Signifikanz.

Neben diesen zeigten sich weitere Tendenzen, die allerdings bei einem Signifikanzniveau von 0,05 keine Signifikanz erreichten. Hier ist das Kreatinin als Marker der Nierenfunktion zu nennen, das auch in Tiedt et al. (2017) als konfundierende Variable identifiziert worden war. Eine Korrelation des Kreatinins mit miR-125a, miR-125b und miR-143 wurde bereits in anderen Veröffentlichungen zu verschiedenen Themen nachgewiesen (Li et al., 2020; Roderburg et al., 2013; Wang et al., 2017). Da alle drei miRNAs bereits im Urin nachgewiesen

werden konnten, könnte der Zusammenhang durch renale Elimination dieser miRNAs zu erklären sein (Abulaban et al., 2016; Debernardi et al., 2015; Erdmann et al., 2020).

Zudem zeigten verschiedene Zellen des Blutbilds (vor allem die Thrombozyten und verschiedene Granulozyten) tendenziell einen Zusammenhang mit den Konzentrationen der miRNAs. Dies war ebenfalls bereits in Tiedt et al. (2017) gezeigt worden und hat seinen Grund vermutlich in den oben aufgeführten Funktionen der drei untersuchten miRNAs in der Inflammationsreaktion, sowie im thrombozytären Ursprung der miRNAs.

Auch die Alanin-Aminotransferase (ALT) erwies sich als tendenziell zusammenhängend mit den Konzentrationen von miR-125b-5p. In Zhou et al. (2018) konnte ebenfalls eine Korrelation der Konzentration von miR-125b mit den ALT-Werten gezeigt werden. Diese Studie hatte sich allerdings mit dem hepatzellulären Karzinom beschäftigt, so dass der Grund des Zusammenhangs weiter unklar bleibt.

4.2.6 Thrombolysetherapie mit rt-PA

Erfreulicherweise zeigte sich in unserer Studie kein Unterschied zwischen den Patienten die eine Thrombolysetherapie erhalten hatten und denjenigen, die keine erhalten hatten. Weder in der Testung der Gesamtstichprobe am Aufnahmetag, noch über die Zeit von drei Monaten nach dem Schlaganfall hinweg zeigte sich ein Einfluss von rt-PA auf die Konzentrationen der miRNAs. Die in dieser Arbeit untersuchten miRNAs sind nicht neuronalen Ursprungs (Tiedt et al., 2017), so dass es nicht überraschend erscheint, dass direkte Effekte von rt-PA auf die BHS und damit eine veränderte Freisetzung von miRNAs nicht zu beobachten sind.

Zu diesem Ergebnis kamen auch Modak et al. (2019), die ebenfalls keinen Einfluss der Therapie mit rt-PA auf eine Kombination verschiedener miRNAs nachweisen konnten. In dieser Studie war die Stichprobe mit 16 Patienten relativ klein, zudem beschränkten sich die Autoren auf Patienten mit kardioembolischen Infarkten der Arteria cerebri media (ACM). Doch auch die in der vorliegenden Arbeit analysierte Stichprobe ist nicht sehr groß, so dass weitere Studien notwendig sind, um die hier angedeuteten Ergebnisse zu bestätigen.

Auch die Zeit zwischen Symptombeginn und erster Blutentnahme in der Notaufnahme zeigte keinerlei Einfluss auf die miRNAs. Weder konnte eine Korrelation mit den miRNA-Konzentrationen nachgewiesen werden, noch ein Unterschied zwischen Patienten, die im Zeitfenster von 4,5 Stunden in der Klinik ankamen und denen, die erst später aufgenommen worden waren. Die Höhe der miRNA-Konzentration kann also bei unklarem Zeitfenster nicht als Entscheidungshilfe bezüglich der Thrombolysetherapie mit rt-PA herangezogen werden.

4.2.7 Schlaganfall-Charakteristika

Mehrere Studien hatten für das Infarktvolumen einen Zusammenhang mit verschiedenen miRNAs, unter anderem miR-125b-5p gezeigt (Du et al., 2019; Fu et al., 2019; He et al., 2019;

Shan et al., 2021). Das Infarktvolumen in der vorliegenden Arbeit zeigte jedoch lediglich an D3 eine vergleichsweise schwache Korrelation mit der Konzentration von miR-125a-5p. Möglicherweise spielt hier wieder die ischämiebedingte Inflammationsreaktion eine Rolle. Da sich in Tiedt et al. (2017) Hinweise darauf ergeben hatten, dass die drei untersuchten miRNAs nicht neuronalen Ursprungs sind, ist ein direkter Zusammenhang mit der Menge abgestorbenen Hirngewebes unwahrscheinlich. Von einem einzelnen Zusammenhang in dieser kleinen Kohorte auf einen generellen Zusammenhang oder von den miRNA-Konzentrationen auf das Infarktvolumen zu schließen, scheint daher voreilig.

Der klinische Schweregrad, beurteilt mit den Skalen NIHSS und mRS war ein weiterer Faktor, dessen Einfluss auf die miRNA-Konzentrationen überprüft wurde. Ein Zusammenhang ließe möglicherweise auch den umgekehrten Schluss von der Höhe der jeweiligen miRNAs auf die zu erwartende Betroffenheit des Patienten zu.

Dass bei einem ischämischen Schlaganfall veränderte miRNAs auch mit der Schwere des Infarkts zusammenhängen, war bereits zuvor mehrfach gezeigt worden (Chen et al., 2017; Jia et al., 2015; Modak et al., 2019; Xiang et al., 2017), auch noch nach drei Monaten zeigte die NIHSS nach Fu et al. (2019) einen Zusammenhang mit miR-451. Für miR-125b-5p war schon in He et al. (2019) ein positiver Zusammenhang mit den NIHSS-Werten bei Aufnahme aufgefallen, zudem war diese miRNA in der Lage, zwischen Patienten mit einem guten und einem ungünstigen Outcome definiert nach mRS zu unterscheiden. In verschiedenen Studien hatten weitere miRNAs Potential als Prädiktoren des funktionellen Outcomes nach Schlaganfall gezeigt (Chen et al., 2017; Tan et al., 2009; Zeng et al., 2013a).

Auch in dieser Arbeit konnten positive Korrelationen der NIHSS und mRS mit miR-125b-5p und miR-143-3p im Verlauf nachgewiesen werden. In einem GLMM hatte sich außerdem auch am Aufnahmetag eine signifikante Assoziation der NIHSS, sowie der pmRS mit den miRNAs ergeben. Die Assoziation mit der pmRS ist möglicherweise dadurch zu erklären, dass der Schlaganfall als eine der führenden Ursachen für Behinderung einen großen Teil der Einschränkung im Alltag (höhere pmRS) verursacht und daher ein höherer mRS-Wert teils durch einen vorangegangenen Schlaganfall bedingt sein könnte.

Dass das GLMM im Verlauf keine signifikante Assoziation des Schweregrads mit den miRNAs nachweisen konnte und teils andere Ergebnisse als die univariaten Analysen erbrachte, könnte an der relativ kleinen Stichprobe oder an den signifikanten Interaktionen der Faktoren untereinander liegen.

Das Outcome an D90 nach mRS und NIHSS zeigte in dieser Studie eindeutig keinen Zusammenhang mit den miRNA-Spiegeln am Aufnahmetag. Um den Wert der hier untersuchten miRNAs als Prädiktor zu bestimmen, sind daher noch größere Studien notwendig.

Wie der Schweregrad könnte auch die Ätiologie des Schlaganfalls einen Einfluss auf die Konzentration der miRNAs haben, ebenso wäre es von Vorteil, von den miRNA-Konzentrationen

auf die Ätiologie schließen zu können. Hier konnte entsprechend eine deutliche Assoziation der Ätiologie nach TOAST-Klassifikation mit allen drei miRNAs nachgewiesen werden. Auch in anderen Studien war bereits aufgefallen, dass sich das Profil zirkulierender miRNAs im Blut von Schlaganfallpatienten je nach Ätiologie der Ischämie unterschied (Sepramaniam et al., 2014; Tan et al., 2009; van Kralingen et al., 2019). Gui et al. (2019) wiesen auch für miR-125a und miR-125b nach, dass ihre Konzentrationen im Serum von Schlaganfallpatienten mit kardioembolischer Ätiologie im Vergleich zu Patienten mit anderen Ursachen, sowie mit gesunden Kontrollpersonen deutlich erhöht waren.

Die Ätiologie könnte also durchaus als eine sekundäre Fragestellung an den Biomarker etabliert werden.

Wie mehrere Autoren gezeigt hatten, werden miRNAs in unterschiedlichen Hirnarealen und neuronalen Zellarten unterschiedlich stark exprimiert (Bak et al., 2008; He et al., 2012; Ziats and Rennert, 2014). Die Lokalisation eines Infarkts ist daher durchaus als potentieller Einflussfaktor beziehungsweise als zusätzliche Fragestellung an den Biomarker in Betracht zu ziehen.

Im Vergleich zwischen den Gruppen rechts- und linkshemisphärischer Schlaganfälle hatte sich kein Unterschied gezeigt, es ergab sich jedoch eine Assoziation des betroffenen Stromgebiets mit den miRNA-Konzentrationen im GLMM.

Tiedt et al. (2017) hatten gezeigt, dass die drei hier untersuchten miRNAs nicht nach Hypoxie aus murinen Neuroblastomzellen (Neuro2a) freigesetzt werden. Verschiedene andere Studien konnten allerdings im ZNS von Mäusen und auch Menschen sowohl miR-125a und miR-125b, als auch miR-143 nachweisen (Bak et al., 2008; Hua et al., 2009; Ziats and Rennert, 2014). Nach Ziats and Rennert (2014) weisen die drei hier betrachteten miRNAs zudem lokal unterschiedliche Expressionsmuster auf. Es ist also durchaus denkbar, dass diese miRNAs eher aus der Glia oder dem zerebralen Endothel stammen und sich aus diesem Grund ihre Konzentrationen im Blut bei einem Schlaganfall verändern (He et al., 2012; Reijerkerk et al., 2013).

Sowohl die Ätiologie, als auch der klinische Schweregrad, sowie die Lokalisation des Schlaganfalls sind demnach Parameter, deren Einfluss auf die miRNAs noch weiter untersucht werden muss, um eine sichere Interpretation der Werte zu ermöglichen. Zudem sollten die miRNAs genauer auf ihr Potential hinsichtlich der Frage nach Ätiologie und Lokalisation des Schlaganfalls getestet werden.

4.3 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit konnte klinische und laborchemische Parameter identifizieren, die mit den Plasmakonzentrationen der zirkulierenden miRNAs miR-125a-5p, miR-125b-5p und miR-143-3p nach ischämischem Schlaganfall assoziiert sind.

So zeigten vor allem die Lokalisation (anterior oder posterior) und die Ätiologie des Schlaganfalls eine signifikante Assoziation mit den Konzentrationen aller drei miRNAs. Für den klinischen Schweregrad nach NIHSS und mRS, sowie für den BMI konnten ebenfalls einzelne signifikante Assoziationen nachgewiesen werden, wenngleich die Ergebnisse weniger eindeutig waren.

Da die nachgewiesenen Assoziationen ungerichtet sind, sollte in weiteren Studien überprüft werden, ob es sich um einen kausalen Zusammenhang der miRNA-Konzentrationen mit den getesteten Faktoren handelt oder bisher nicht erkannte konfundierende Variablen vorliegen. Zudem muss die Frage geklärt werden, ob und wie die gemessenen miRNA-Konzentrationen in der klinischen Praxis für die Einflussfaktoren korrigiert werden müssen, um den ischämischen Schlaganfall weiter sensitiv und spezifisch zu diagnostizieren.

Besonders auch in Anbetracht der Tatsache, dass verschiedene weitere Variablen (bereits stattgehabter Schlaganfall, häusliche Medikation mit ASS, isolierte Laborwerte) jeweils eine Assoziation mit einzelnen miRNAs zeigten, erscheint die Kombination dreier verschiedener miRNAs sinnvoll, um Verzerrungen der Konzentrationen einer miRNA durch die jeweils anderen beiden auszugleichen. Ein weiterer Vorteil dieser miRNA-Kombination ist zudem die rasche und parallele Erhöhung der drei miRNAs bereits wenige Stunden nach zerebraler Ischämie, die eine zügige Diagnose ermöglicht.

Die Konzentrationen der miRNAs erwiesen sich als weitestgehend unabhängig von Alter und Geschlecht der Patienten, sowie den übrigen kardiovaskulären Risikofaktoren und Routinelaborwerten bei Aufnahme. Weder die Größe des Infarkts, noch die Therapie mit rt-PA zeigten eine Assoziation mit den Konzentrationen der miRNAs. Eine bereits prähospital begonnene Thrombolysetherapie scheint also nicht gegen die Bestimmung der miRNA-Konzentrationen für die weitere Diagnostik zu sprechen. Bei fehlender Assoziation der miRNA-Konzentrationen mit der Zeit, die zwischen Beginn der Symptomatik und Ankunft in der Notaufnahme verging, kann diese bedauerlicherweise nicht zur Feststellung der Ischämiedauer und damit zur Unterstützung der Therapieentscheidung genutzt werden.

Wenngleich die Ergebnisse dieser Arbeit noch in größeren Studien validiert werden müssen, präsentierte sich die Kombination von miR-125a-5p, miR-125b-5p und miR-143-3p hier als ein vielversprechender Biomarker zur Diagnose des akuten ischämischen Schlaganfalls.

Abbildungsverzeichnis

1	Aktivierung der Fibrinolyse durch t-PA	7
2	Biogenese der miRNAs	12
3	Vergleich der miRNA-Konzentrationen an D1 mit und ohne Heparinase . .	40
4	miRNAs abhängig von Alter und Geschlecht	42
5	miRNAs abhängig von Adipositas	43
6	miRNAs abhängig von Vorerkrankungen und Vormedikation	43
7	miRNAs abhängig von Albumin und aPTT	45
8	Vergleich der miRNA-Konzentrationen mit und ohne Thrombolysetherapie	46
9	Zeitlicher Verlauf der miRNA-Konzentrationen im Verhältnis zur Kontrollgruppe	48
10	Signifikante Korrelationen der Konzentrationen von miR-125a-5p und miR-125b-5p (D1, D2)	49
11	Signifikante Korrelationen der Konzentrationen von miR-125a-5p und miR-125b-5p (D3, D90)	49
12	Signifikante Korrelation der Konzentrationen von miR-125a-5p mit miR-143-3p (D2)	50
13	Signifikante Korrelationen der Konzentrationen von miR-125b-5p mit miR-143-3p (D1, D2)	50
14	Signifikante Korrelation von miR-125a-5p an D3 mit dem Infarktvolumen .	52
15	Signifikante Korrelation von miR-143-3p an D2 mit der NIHSS an D2 . .	53

Tabellenverzeichnis

1	Ausschlusskriterien	20
2	Laborwerte nach Studientag	23
3	modifizierte Rankin-Skala (mRS)	24
4	Daten und Laborwerte der Screening-Kohorte	31
5	Daten und Laborwerte der Validierungskohorte	34
6	Vergleich Screening- und Validierungskohorte - Patienten	36
7	Vergleich Screening- und Validierungskohorte - Kontrollpersonen	37
8	Schlaganfallcharakterisierung	38
9	RNA-Sequenzierung	39
10	Ergebnisse des GLMM zu Ätiologie und Lokalisation, longitudinale Kohorte	54

Literaturverzeichnis

- Aboyans, V., J.-B. Ricco, M.-L. E. L. Bartelink, M. Björck, M. Brodmann, T. Cohnert, J.-P. Collet, M. Czerny, M. De Carlo, S. Debus, C. Espinola-Klein, T. Kahan, S. Kownator, L. Mazzolai, A. R. Naylor, M. Roffi, J. Röther, M. Sprynger, M. Tendera, G. Tepe, M. Vennermo, C. Vlachopoulos, I. Desormais, and E. S. D. Group
 2017. 2017 ESC Guidelines on the Diagnosis and Treatment of Peripheral Arterial Diseases, in collaboration with the European Society for Vascular Surgery (ESVS): Document covering atherosclerotic disease of extracranial carotid and vertebral, mesenteric, renal, upper and lower extremity arteries. Endorsed by: the European Stroke Organization (ESO)The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Peripheral Arterial Diseases of the European Society of Cardiology (ESC) and of the European Society for Vascular Surgery (ESVS). *European Heart Journal*, 39(9):763–816.
- Abubakar, S., A. Sabir, M. Ndakotsu, M. Imam, and M. Tasiu
 2013. Low admission serum albumin as prognostic determinant of 30-day case fatality and adverse functional outcome following acute ischemic stroke. *Pan African Medical Journal*, 14(1).
- Abulaban, K. M., N. Fall, R. Nunna, J. Ying, P. Devarajan, A. Grom, M. Bennett, S. P. Ardoine, and H. I. Brunner
 2016. Relationship of cell-free urine MicroRNA with lupus nephritis in children. *Pediatric Rheumatology*, 14(1):1–7.
- Adams, H. P., B. H. Bendixen, L. J. Kappelle, J. Biller, B. B. Love, D. L. Gordon, and E. E. Marsh
 1993. Classification of subtype of acute ischemic stroke. Definitions for use in a multicenter clinical trial. TOAST. Trial of Org 10172 in Acute Stroke Treatment. *Stroke*, 24(1):35–41.
- Akao, Y., A. Iio, T. Itoh, S. Noguchi, Y. Itoh, Y. Ohtsuki, and T. Naoe
 2011. Microvesicle-mediated RNA molecule delivery system using monocytes/macrophages. *Molecular therapy*, 19(2):395–399.
- Allantaz, F., D. T. Cheng, T. Bergauer, P. Ravindran, M. F. Rossier, M. Ebeling, L. Badi, B. Reis, H. Bitter, M. D’Asaro, A. Chiappe, S. Sridhar, G. D. Pacheco, M. E. Burczynski, D. Hochstrasser, J. Vonderscher, and T. Matthes
 2012. Expression Profiling of Human Immune Cell Subsets Identifies miRNA-mRNA Regulatory Relationships Correlated with Cell Type Specific Expression. *PLOS ONE*, 7(1):1–12.
- Anuk, T., E. B. Assayag, R. Rotstein, R. Fusman, D. Zeltser, S. Berliner, D. Avitzour, I. Shapira, N. Arber, and N. M. Bornstein
 2002. Prognostic implications of admission inflammatory profile in acute ischemic neurological events. *Acta Neurologica Scandinavica*, 106(4):196–199.
- Aoki, J., K. Kimura, M. Koga, K. Kario, J. Nakagawara, E. Furui, Y. Shiokawa, Y. Hasegawa, S. Okuda, H. Yamagami, Y. Okada, K. Shibasaki, Y. Sakamoto, and K. Toyoda
 2013. NIHSS-time score easily predicts outcomes in rt-PA patients: The SAMURAI rt-PA registry. *Journal of the Neurological Sciences*, 327(1):6–11.

- Arroyo, J. D., J. R. Chevillet, E. M. Kroh, I. K. Ruf, C. C. Pritchard, D. F. Gibson, P. S. Mitchell, C. F. Bennett, E. L. Pogosova-Agadjanyan, D. L. Stirewalt, J. F. Tait, and M. Tewari 2011. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(12):5003–5008.
- Astrup, T. and P. M. Permin
1947. Fibrinolysis in the Animal Organism. *Nature*, 159:681–682.
- Bai, Y., X. Bai, Z. Wang, X. Zhang, C. Ruan, and J. Miao
2011. MicroRNA-126 inhibits ischemia-induced retinal neovascularization via regulating angiogenic growth factors. *Experimental and Molecular Pathology*, 91(1):471–477.
- Bak, M., A. Silahtaroglu, M. Møller, M. Christensen, M. F. Rath, B. Skryabin, N. Tommerup, and S. Kauppinen
2008. MicroRNA expression in the adult mouse central nervous system. *RNA*, 14(3):432–444.
- Banerjee, S., H. Cui, N. Xie, Z. Tan, S. Yang, M. Icyuz, V. J. Thannickal, E. Abraham, and G. Liu
2013. miR-125a-5p Regulates Differential Activation of Macrophages and Inflammation. *Journal of Biological Chemistry*, 288(49):35428–35436.
- Bang, C., S. Batkai, S. Dangwal, S. K. Gupta, A. Foinquinos, A. Holzmann, A. Just, J. Remke, K. Zimmer, A. Zeug, E. Ponimaskin, A. Schmiedl, X. Yin, M. Mayr, R. Halder, A. Fischer, S. Engelhardt, Y. Wei, A. Schober, J. Fiedler, and T. Thum
2014. Cardiac fibroblast-derived microRNA passenger strand-enriched exosomes mediate cardiomyocyte hypertrophy. *The Journal of Clinical Investigation*, 124(5):2136–2146.
- Bartel, D.
2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116(2):281–97.
- Bartel, D. P.
2009. MicroRNAs: Target recognition and regulatory functions. *Cell*, 136(2):215–233.
- Bartel, D. P.
2018. Metazoan MicroRNAs. *Cell*, 173(1):20–51.
- Benchoua, A. and M. Peschanski
2013. Pluripotent stem cells as a model to study non-coding RNAs function in human neurogenesis. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 7:140.
- Berger, K., B. Weltermann, P. Kolominsky-Rabas, S. Meves, P. Heuschmann, J. Böhner, B. Neundörfer, H. Hense, and T. Büttner
1999. Untersuchung zur Reliabilität von Schlaganfallskalen. Die deutschen Versionen von NIHSS, ESS und Rankin Scale. *Fortschritte der Neurologie Psychiatrie*, 67(2):81–86.
- Bernstein, E., A. A. Caudy, S. M. Hammond, and G. J. Hannon
2001. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, 409:363–366.

- Boeckel, J.-N., C. E. Thomé, D. Leistner, A. M. Zeiher, S. Fichtlscherer, and S. Dimmeler
 2013. Heparin Selectively Affects the Quantification of MicroRNAs in Human Blood Samples. *Clinical Chemistry*, 59(7):1125–1127.
- Bohnsack, M. T., K. Czaplinski, and D. Görlich
 2004. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA*, 10(2):185–191.
- Bonaventura, A., L. Liberale, A. Vecchié, M. Casula, F. Carbone, F. Dallegrì, and F. Montecucco
 2016. Update on inflammatory biomarkers and treatments in ischemic stroke. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(12):1967.
- Broderick, J. P., O. Adeoye, and J. Elm
 2017. Evolution of the Modified Rankin Scale and Its Use in Future Stroke Trials. *Stroke*, 48(7):2007–2012.
- Brott, T., H. P. Adams, C. P. Olinger, J. R. Marler, W. G. Barsan, J. Biller, J. Spilker, R. Holleran, R. Eberle, and V. Hertzberg
 1989. Measurements of acute cerebral infarction: a clinical examination scale. *Stroke*, 20(7):864–70.
- Burkard, P., T. Vögtle, and B. Nieswandt
 2020. Platelets in thrombo-inflammation: concepts, mechanisms, and therapeutic strategies for ischemic stroke. *Hämostaseologie*, 40(02):153–164.
- Busch, M., A. Schienkiewitz, E. Nowossadeck, and A. Gößwald
 2013. Prävalenz des Schlaganfalls bei Erwachsenen im Alter von 40 bis 79 Jahren in Deutschland - Ergebnisse der Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland (DEGS1). *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz*, 56(5):656–660.
- Busch, M. A. and R. Kuhnert
 2017. 12-Monats-Prävalenz von Schlaganfall oder chronischen Beschwerden infolge eines Schlaganfalls in Deutschland. *Journal of Health Monitoring*, 2(1):70–76.
- Butovsky, O., M. P. Jedrychowski, C. S. Moore, R. Cialic, A. J. Lanser, G. Gabriely, T. Koeglsperger, B. Dake, P. M. Wu, C. E. Doykan, et al.
 2014. Identification of a unique TGF- β -dependent molecular and functional signature in microglia. *Nature neuroscience*, 17(1):131–143.
- Campos, F., T. Sobrino, P. Ramos-Cabrera, M. Castellanos, M. Blanco, M. Rodríguez-Yáñez, J. Serena, R. Leira, and J. Castillo
 2011. High blood glutamate oxaloacetate transaminase levels are associated with good functional outcome in acute ischemic stroke. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 31(6):1387–1393. PMID: 21266984.
- Capes, S. E., D. Hunt, K. Malmberg, P. Pathak, and H. C. Gerstein
 2001. Stress hyperglycemia and prognosis of stroke in nondiabetic and diabetic patients: a systematic overview. *Stroke*, 32(10):2426–2432.
- Cazzoli, R., F. Buttitta, M. Di Nicola, S. Malatesta, A. Marchetti, W. N. Rom, and H. I. Pass
 2013. microRNAs Derived from Circulating Exosomes as Noninvasive Biomarkers for Screening and Diagnosing Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology*, 8(9):1156 – 1162.

- Che, P., J. Liu, Z. Shan, R. Wu, C. Yao, J. Cui, X. Zhu, J. Wang, M. S. Burnett, S. Wang, and J. Wang
 2014. miR-125a-5p impairs endothelial cell angiogenesis in aging mice via RTEF-1 downregulation. *Aging Cell*, 13(5):926–934.
- Chen, L., L. Heikkinen, K. E. Knott, Y. Liang, and G. Wong
 2015. Evolutionary conservation and function of the human embryonic stem cell specific-302/367 cluster. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 16:83 – 98.
- Chen, Y., Y. Song, J. Huang, M. Qu, Y. Zhang, J. Geng, Z. Zhang, J. Liu, and G.-Y. Yang
 2017. Increased Circulating Exosomal miRNA-223 Is Associated with Acute Ischemic Stroke. *Frontiers in Neurology*, 8:57.
- Cheung, CM and Tsoi, T., S. F. Hon, M. Au-Yeung, K. Shiu, C. Lee, and C. Huang
 2008. Using the National Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS) to predict the mortality and outcome of patients with intracerebral haemorrhage. *Hong Kong Medical Journal*, 14(5):367–70.
- Climent-Salarich, M., M. Quintavalle, M. Miragoli, J. Chen, G. Condorelli, and L. Elia
 2015. TGF β Triggers miR-143/145 Transfer from Smooth Muscle Cells to Endothelial Cells, Thereby Modulating Vessel Stabilization. *Circulation Research*.
- Creemers, E. E., A. J. Tijsen, and Y. M. Pinto
 2012. Circulating microRNAs: novel biomarkers and extracellular communicators in cardiovascular disease? *Circulation Research*, 110(3):483–495.
- de Boer, H. C., C. van Solingen, J. Prins, J. M. Duijs, M. V. Huisman, T. J. Rabelink, and A. J. van Zonneveld
 2013. Aspirin treatment hampers the use of plasma microRNA-126 as a biomarker for the progression of vascular disease. *European Heart Journal*, 34(44):3451–3457.
- Debernardi, S., N. J. Massat, T. P. Radon, A. Sangaralingam, A. Banissi, D. P. Ennis, T. Dowe, C. Chelala, S. P. Pereira, H. M. Kocher, et al.
 2015. Noninvasive urinary miRNA biomarkers for early detection of pancreatic adenocarcinoma. *American journal of cancer research*, 5(11):3455.
- Deng, L., F. J. Blanco, H. Stevens, R. Lu, A. Caudrillier, M. McBride, J. D. McClure, J. Grant, M. Thomas, M. Frid, K. Stenmark, K. White, A. G. Seto, N. W. Morrell, A. C. Bradshaw, M. R. MacLean, and A. H. Baker
 2015a. MicroRNA-143 Activation Regulates Smooth Muscle and Endothelial Cell Crosstalk in Pulmonary Arterial Hypertension. Novelty and Significance. *Circulation Research*, 117(10):870–883.
- Deng, S., Y. Zhang, C. Xu, and D. Ma
 2015b. MicroRNA-125b-2 overexpression represses ectodermal differentiation of mouse embryonic stem cells. *International Journal of Molecular Medicine*, 36.
- Doeppner, T. R., M. Doehring, E. Bretschneider, A. Zechariah, B. Kaltwasser, B. Müller, J. C. Koch, M. Bähr, D. M. Hermann, and U. Michel
 2013. MicroRNA-124 protects against focal cerebral ischemia via mechanisms involving Usp14-dependent REST degradation. *Acta neuropathologica*, 126(2):251–265.

- Donkel, S. J., B. Benaddi, D. W. Dippel, H. ten Cate, and M. P. de Maat
 2019. Prognostic hemostasis biomarkers in acute ischemic stroke. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 39(3):360–372.
- Du, K., C. Zhao, L. Wang, Y. Wang, K.-Z. Zhang, X.-Y. Shen, H.-X. Sun, W. Gao, and X. Lu
 2019. MiR-191 inhibit angiogenesis after acute ischemic stroke targeting VEZF1. *Aging*, 11(9):2762–2786.
- Easton, J. D., J. L. Saver, G. W. Albers, M. J. Alberts, S. Chaturvedi, E. Feldmann, T. S. Hatsukami, R. T. Higashida, S. C. Johnston, C. S. Kidwell, H. L. Lutsep, E. Miller, and R. L. Sacco
 2009. Definition and evaluation of transient ischemic attack: a scientific statement for healthcare professionals from the American Heart Association/American Stroke Association Stroke Council; Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia; Council on Cardiovascular Radiology and Intervention; Council on Cardiovascular Nursing; and the Interdisciplinary Council on Peripheral Vascular Disease: the American Academy of Neurology affirms the value of this statement as an educational tool for neurologists. *Stroke*, 40(6):2276–2293.
- Eichhorn, S. W., H. Guo, S. E. McGeary, R. A. Rodriguez-Mias, C. Shin, D. Baek, S.-h. Hsu, K. Ghoshal, J. Villén, and D. P. Bartel
 2014. mRNA destabilization is the dominant effect of mammalian microRNAs by the time substantial repression ensues. *Molecular cell*, 56(1):104–115.
- ElAli, A. and N. Jean LeBlanc
 2016. The Role of Monocytes in Ischemic Stroke Pathobiology: New Avenues to Explore. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 8:29.
- Elgheznawy, A., L. Shi, J. Hu, I. Wittig, H. Laban, J. Pircher, A. Mann, P. Provost, V. Randriambavonjy, and I. Fleming
 2015. Dicer Cleavage by Calpain Determines Platelet microRNA Levels and Function in Diabetes. *Circulation Research*, 117(2):157–165.
- Emberson, J., K. R. Lees, P. Lyden, L. Blackwell, G. Albers, E. Bluhmki, T. Brott, G. Cohen, S. Davis, G. Donnan, J. Grotta, G. Howard, M. Kaste, M. Koga, R. von Kummer, M. Lansberg, R. I. Lindley, G. Murray, J. M. Olivot, M. Parsons, B. Tilley, D. Toni, K. Toyoda, N. Wahlgren, J. Wardlaw, W. Whiteley, G. J. del Zoppo, C. Baigent, P. Sandercock, and Werner Hacke for the Stroke Thrombolysis Trialists' Collaborative Group
 2014. Effect of treatment delay, age, and stroke severity on the effects of intravenous thrombolysis with alteplase for acute ischaemic stroke: a meta-analysis of individual patient data from randomised trials. *The Lancet*, 384(9958):1929–1935.
- Endo, K., Y. Naito, X. Ji, M. Nakanishi, T. Noguchi, Y. Goto, H. Nonogi, X. Ma, H. Weng, G. Hirokawa, T. Asada, S. Kakinoki, T. Yamaoka, Y. Fukushima, and N. Iwai
 2013. MicroRNA 210 as a Biomarker for Congestive Heart Failure. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 36(1):48–54.
- Enright, A. J., B. John, U. Gaul, T. Tuschl, C. Sander, and D. S. Marks
 2003. MicroRNA targets in Drosophila. *Genome Biology*, 5(1):R1.

- Erdmann, K., K. Salomo, A. Klimova, U. Heberling, A. Lohse-Fischer, R. Fuehrer, C. Thomas, I. Roeder, M. Froehner, M. P. Wirth, and S. Fuessel
 2020. Urinary MicroRNAs as Potential Markers for Non-Invasive Diagnosis of Bladder Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(11).
- Esau, C., X. Kang, E. Peralta, E. Hanson, E. G. Marcusson, L. V. Ravichandran, Y. Sun, S. Koo, R. J. Perera, R. Jain, N. M. Dean, S. M. Freier, C. F. Bennett, B. Lollo, and R. Grifey
 2004. MicroRNA-143 Regulates Adipocyte Differentiation. *Journal of Biological Chemistry*, 279(50):52361–52365.
- Farrell, B., J. Godwin, S. Richards, and C. Warlow
 1991. The United Kingdom transient ischaemic attack (UK-TIA) aspirin trial: final results. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 54(12):1044–1054.
- Feigin, V. L., M. H. Forouzanfar, R. Krishnamurthi, G. A. Mensah, M. Connor, D. A. Bennett, A. E. Moran, R. L. Sacco, L. Anderson, T. Truelsen, et al.
 2014. Global and regional burden of stroke during 1990–2010: findings from the Global Burden of Disease Study 2010. *The Lancet*, 383(9913):245–255.
- Feigin, V. L., G. A. Mensah, B. Norrving, C. J. L. Murray, and G. A. Roth
 2015. Atlas of the Global Burden of Stroke (1990-2013): The GBD 2013 Study. *Neuroepidemiology*, 45(3):230–236.
- Fiebach, J., P. Schellinger, O. Jansen, M. Meyer, P. Wilde, J. Bender, P. Schramm, E. Juttler, J. Oehler, M. Hartmann, et al.
 2002. CT and diffusion-weighted MR imaging in randomized order: diffusion-weighted imaging results in higher accuracy and lower interrater variability in the diagnosis of hyperacute ischemic stroke. *Stroke*, 33(9):2206–2210.
- Fu, C., S. Chen, N. Cai, Z. Liu, P. Wang, and J. Zhao
 2019. Potential Neuroprotective Effect of miR-451 Against Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury in Stroke Patients and a Mouse Model. *World Neurosurgery*, 130:e54–e61.
- Furlanis, G., M. Ajčević, L. Stragapede, C. Lugnan, M. Ridolfi, P. Caruso, M. Naccarato, M. Ukmar, and P. Manganotti
 2018. Ischemic Volume and Neurological Deficit: Correlation of Computed Tomography Perfusion with the National Institutes of Health Stroke Scale Score in Acute Ischemic Stroke. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*, 27(8):2200 – 2207.
- Gajurel, B., K. Dhungana, P. Parajuli, R. Karn, R. Rajbhandari, D. Kafle, and K. Oli
 2015. The National Institute of Health Stroke Scale Score and Outcome in acute Ischemic Stroke. *Journal of Institute of Medicine*, 38(1):9–13.
- Goedeke, L., N. Rotllan, A. Canfrán-Duque, J. F. Aranda, C. M. Ramírez, E. Araldi, C.-S. Lin, N. N. Anderson, A. Wagschal, R. De Cabo, et al.
 2015. MicroRNA-148a regulates LDL receptor and ABCA1 expression to control circulating lipoprotein levels. *Nature medicine*, 21(11):1280–1289.
- Goldstein, L. B. and G. P. Samsa
 1997. Reliability of the National Institutes of Health Stroke Scale: Extension to Non-Neurologists in the Context of a Clinical Trial. *Stroke*, 28(2):307–310.

- González-García, S., A. González-Quevedo, M. Peña-Sánchez, C. Menéndez-Saínz, R. Fernández-Carrera, M. Arteche-Prior, A. Pando-Cabrera, and O. Fernández-Concepción 2012. Serum neuron-specific enolase and S100 calcium binding protein B biomarker levels do not improve diagnosis of acute stroke. *The Journal of the Royal College of Physicians of Edinburgh*, 42:199–204.
- Goyal, M., B. K. Menon, W. H. van Zwam, D. W. J. Dippel, P. J. Mitchell, A. M. Demchuk, A. Dávalos, C. B. L. M. Majoe, A. van der Lugt, M. A. de Miquel, G. A. Donnan, Y. B. W. E. M. Roos, A. Bonafe, R. Jahan, H.-C. Diener, L. A. van den Berg, E. I. Levy, O. A. Berkhemer, V. M. Pereira, J. Rempel, M. Millán, S. M. Davis, D. Roy, J. Thornton, L. S. Román, M. Ribó, D. Beumer, B. Stouch, S. Brown, B. C. V. Campbell, R. J. van Oostenbrugge, J. L. Saver, M. D. Hill, and T. G. Jovin 2016. Endovascular thrombectomy after large-vessel ischaemic stroke: a meta-analysis of individual patient data from five randomised trials. *The Lancet*, 387(10029):1723 – 1731.
- Graff, J. W., A. M. Dickson, G. Clay, A. P. McCaffrey, and M. E. Wilson 2012. Identifying Functional MicroRNAs in Macrophages with Polarized Phenotypes. *Journal of Biological Chemistry*, 287(26):21816–21825.
- Gregory, R. I., K.-p. Yan, G. Amuthan, T. Chendrimada, B. Doratotaj, N. Cooch, and R. Shiekhattar 2004. The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature*, 432:235–240.
- Griffiths-Jones, S. 2004. The microRNA Registry. *Nucleic Acids Research*, 32(suppl_1):D109–D111.
- Griffiths-Jones, S., R. J. Grocock, S. van Dongen, A. Bateman, and A. J. Enright 2006. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Research*, 34(suppl_1):D140–D144.
- Grimson, A., K. K.-H. Farh, W. K. Johnston, P. Garrett-Engele, L. P. Lim, and D. P. Bartel 2007. MicroRNA Targeting Specificity in Mammals: Determinants beyond Seed Pairing. *Molecular Cell*, 27(1):91–105.
- Gui, Y., Z. Xu, T. Jin, L. Zhang, L. Chen, B. Hong, F. Xie, W. Lv, and X. Hu 2019. Using extracellular circulating microRNAs to classify the etiological subtypes of ischemic stroke. *Translational stroke research*, 10(4):352–361.
- Gößwald, A., A. Schienkiewitz, E. Nowossadeck, and M. Busch 2013. Prävalenz von Herzinfarkt und koronarer Herzkrankheit bei Erwachsenen im Alter von 40 bis 79 Jahren in Deutschland. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz*, 56(5/6).
- Hacke, W., M. Kaste, C. Fieschi, D. Toni, E. Lesaffre, R. Von Kummer, G. Boysen, E. Bluhmki, G. Höxter, M.-H. Mahagne, et al. 1995. Intravenous Thrombolysis With Recombinant Tissue Plasminogen Activator for Acute Hemispheric Stroke: The European Cooperative Acute Stroke Study (ECASS). *JAMA*, 274(13):1017–1025.

- Hacke, W., M. Kaste, C. Fieschi, R. von Kummer, A. Davalos, D. Meier, V. Larrue, E. Bluhmki, S. Davis, G. Donnan, D. Schneider, E. Diez-Tejedor, and P. Trouillas
 1998. Randomised double-blind placebo-controlled trial of thrombolytic therapy with intravenous alteplase in acute ischaemic stroke (ECASS II). *The Lancet*, 352(9136):1245 – 1251.
- Hankey, G. J.
 2017. Stroke. *Lancet*, 389:641–654.
- Harbison, J., O. Hossain, D. Jenkinson, J. Davis, S. J. Louw, and G. A. Ford
 2003. Diagnostic Accuracy of Stroke Referrals From Primary Care, Emergency Room Physicians, and Ambulance Staff Using the Face Arm Speech Test. *Stroke*, 34(1):71–76.
- Hasan, N., P. McColgan, P. Bentley, R. J. Edwards, and P. Sharma
 2012. Towards the identification of blood biomarkers for acute stroke in humans: a comprehensive systematic review. *British journal of clinical pharmacology*, 74(2):230–240.
- He, M., Y. Liu, X. Wang, M. Q. Zhang, G. J. Hannon, and Z. J. Huang
 2012. Cell-Type-Based Analysis of MicroRNA Profiles in the Mouse Brain. *Neuron*, 73(1):35–48.
- He, X.-W., Y.-H. Shi, R. Zhao, Y.-S. Liu, G.-F. Li, Y. Hu, W. Chen, G.-H. Cui, J.-J. Su, and J.-R. Liu
 2019. Plasma levels of miR-125b-5p and miR-206 in acute ischemic stroke patients after recanalization treatment: a prospective observational study. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*, 28(6):1654–1661.
- Heegaard, N. H., A. J. Schetter, J. A. Welsh, M. Yoneda, E. D. Bowman, and C. C. Harris
 2012. Circulating micro-RNA expression profiles in early stage nonsmall cell lung cancer. *International Journal of Cancer*, 130(6):1378–1386.
- Heidemann, C., Y. Du, I. Schubert, W. Rathmann, and C. Scheidt-Nave
 2013. Prävalenz und zeitliche Entwicklung des bekannten Diabetes mellitus. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz*, 56(5/6).
- Heidemann, C. and C. Scheidt-Nave
 2017. Prävalenz, Inzidenz und Mortalität von Diabetes mellitus bei Erwachsenen in Deutschland – Bestandsaufnahme zur Diabetes-Surveillance. *Journal of Health Monitoring*, 2(3).
- Heneghan, H. M., N. Miller, R. Kelly, J. Newell, and M. J. Kerin
 2010. Systemic miRNA-195 differentiates breast cancer from other malignancies and is a potential biomarker for detecting noninvasive and early stage disease. *The oncologist*, 15(7):673.
- Hennerici, M. G., R. Kern, et al.
 2017. S1-Leitlinie Diagnostik zerebrovaskulärer Erkrankungen. In: *Deutsche Gesellschaft für Neurologie, Hrsg. Leitlinien für Diagnostik und Therapie in der Neurologie*.

- Hergenreider, E., S. Heydt, K. Tréguer, T. Boettger, A. J. Horrevoets, A. M. Zeiher, M. P. Scheffer, A. S. Frangakis, X. Yin, M. Mayr, T. Braun, C. Urbich, R. A. Boon, and S. Dimmeler
 2012. Atheroprotective communication between endothelial cells and smooth muscle cells through miRNAs. *Nature Cell Biology*, 14:249–256.
- Heuschmann, P. U., O. Busse, M. Wagner, M. Endres, A. Villringer, J. Röther, P. Kolominsky-Rabas, K. Berger, et al.
 2010. Schlaganfallhäufigkeit und Versorgung von Schlaganfallpatienten in Deutschland. *Aktuelle Neurologie*, 37(07):333–340.
- Hills, N. K., S. A. Josephson, P. D. Lyden, and S. C. Johnston
 2009. Is the NIHSS Certification Process Too Lenient? *Cerebrovascular Diseases*, 27(5):426–432.
- Hopyan, J., A. Ciarallo, D. Dowlatshahi, P. Howard, V. John, R. Yeung, L. Zhang, J. Kim, G. MacFarlane, T.-Y. Lee, and R. I. Aviv
 2010. Certainty of Stroke Diagnosis: Incremental Benefit with CT Perfusion over Noncontrast CT and CT Angiography. *Radiology*, 255(1):142–153. PMID: 20308452.
- Hua, Y.-J., Z.-Y. Tang, K. Tu, L. Zhu, Y.-X. Li, L. Xie, and H.-S. Xiao
 2009. Identification and target prediction of miRNAs specifically expressed in rat neural tissue. *BMC genomics*, 10(1):1–12.
- Huang, Y., J. Chen, Y. Zhou, S. Tang, J. Li, X. Yu, Y. Mo, Y. Wu, Y. Zhang, and Y. Feng
 2016. Circulating miR155 expression level is positive with blood pressure parameters: Potential markers of target-organ damage. *Clinical and Experimental Hypertension*, 38(3):331–336. PMID: 27028953.
- Huang, Y.-Q., J. Li, C. Huang, and Y.-Q. Feng
 2018. Plasma microRNA-29c levels are associated with carotid intima-media thickness and is a potential biomarker for the early detection of atherosclerosis. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 50(2):452–459.
- Jauch, E. C., J. L. Saver, H. P. Adams, A. Bruno, J. B. Connors, B. M. Demaerschalk, P. Khatri, P. W. McMullan, A. I. Qureshi, K. Rosenfield, P. A. Scott, D. R. Summers, D. Z. Wang, M. Wintermark, and H. Yonas
 2013. Guidelines for the Early Management of Patients With Acute Ischemic Stroke. *Stroke*, 44(3):870–947.
- Jia, L., F. Hao, W. Wang, and Y. Qu
 2015. Circulating miR-145 is associated with plasma high-sensitivity C-reactive protein in acute ischemic stroke patients. *Cell biochemistry and function*, 33(5):314–319.
- Jickling, G. C. and F. R. Sharp
 2011. Blood Biomarkers of Ischemic Stroke. *Neurotherapeutics*, 8(3):349.
- Jin, F., Y. Wang, Y. Zhu, S. Li, Y. Liu, C. Chen, X. Wang, K. Zen, and L. Li
 2017. The miR-125a/HK2 axis regulates cancer cell energy metabolism reprogramming in hepatocellular carcinoma. *Scientific reports*, 7(1):1–12.

- Jonas, S. and E. Izaurrealde
 2015. Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing. *Nature Reviews Genetics*, 16.
- Kajimoto, K., H. Naraba, and N. Iwai
 2006. MicroRNA and 3T3-L1 pre-adipocyte differentiation. *RNA*, 12(9):1626–1632.
- Kasner, S. E.
 2006. Clinical interpretation and use of stroke scales. *Lancet Neurology*, 5(7):603–612.
- Kasner, S. E., J. A. Chalela, J. M. Luciano, B. L. Cucchiara, E. C. Raps, M. L. McGarvey, M. B. Conroy, and A. R. Localio
 1999. Reliability and Validity of Estimating the NIH Stroke Scale Score from Medical Records. *Stroke*, 30(8):1534–1537.
- Kaudewitz, D., R. Lee, P. Willeit, R. McGregor, H. S. Markus, S. Kiechl, A. Zampetaki, R. F. Storey, K. M. Channon, and M. Mayr
 2013. Impact of intravenous heparin on quantification of circulating microRNAs in patients with coronary artery disease. *Thrombosis and Haemostasis*, 110(3):609–615.
- Kaudewitz, D., P. Skroblin, L. H. Bender, T. Barwari, P. Willeit, R. Pechlaner, N. P. Sunderland, K. Willeit, A. C. Morton, P. C. Armstrong, M. V. Chan, R. Lu, X. Yin, F. Gracio, K. Dudek, S. R. Langley, A. Zampetaki, E. de Rinaldis, S. Ye, T. D. Warner, A. Saxena, S. Kiechl, R. F. Storey, and M. Mayr
 2016. Association of MicroRNAs and YRNAs With Platelet Function: Novelty and Significance. *Circulation Research*, 118(3):420–432.
- Keller, P., V. Gburcik, N. Petrovic, I. J. Gallagher, J. Nedergaard, B. Cannon, and J. A. Timmons
 2011. Gene-chip studies of adipogenesis-regulated microRNAs in mouse primary adipocytes and human obesity. *BMC Endocrine Disorders*, 11.
- Kemp, J. R., H. Unal, R. Desnoyer, H. Yue, A. Bhatnagar, and S. S. Karnik
 2014. Angiotensin II-regulated microRNA 483-3p directly targets multiple components of the renin–angiotensin system. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 75:25–39.
- Khvorova, A., A. Reynolds, and S. D. Jayasena
 2003. Functional siRNAs and miRNAs Exhibit Strand Bias. *Cell*, 115(2):209–216.
- Kidwell, C. S., S. Starkman, M. Eckstein, K. Weems, and J. L. Saver
 2000. Identifying stroke in the field: prospective validation of the Los Angeles Prehospital Stroke Screen (LAPSS). *Stroke*, 31(1):71–76.
- Kisialiou, A., G. Pelone, A. Carrizzo, G. Grillea, V. Trimarco, M. Marino, M. Bartolo, A. M. De Nunzio, R. Grella, A. Landolfi, A. Puca, C. Colonnese, and C. Vecchione
 2012. Blood biomarkers role in acute ischemic stroke patients: higher is worse or better? *Immunity & Ageing*, 9:22.
- Knecht, S., S. Hesse, and P. Oster
 2011. Rehabilitation after stroke. *Deutsches Ärzteblatt International*, 108(36):600–606.

- Kodahl, A. R., M. B. Lyng, H. Binder, S. Cold, K. Gravgaard, A. S. Knoop, and H. J. Ditzel 2014. Novel circulating microRNA signature as a potential non-invasive multi-marker test in ER-positive early-stage breast cancer: A case control study. *Molecular Oncology*, 8(5):874 – 883.
- Kolominsky-Rabas, P. L., P. U. Heuschmann, D. Marschall, M. Emmert, N. Baltzer, B. Neundörfer, O. Schöffski, and K. J. Krobot 2006. Lifetime Cost of Ischemic Stroke in Germany: Results and National Projections From a Population-Based Stroke Registry. *Stroke*, 37(5):1179–1183.
- Kolominsky-Rabas, P. L., C. Sarti, P. U. Heuschmann, C. Graf, S. Siemonsen, B. Neundoerfer, A. Katalinic, E. Lang, K.-G. Gassmann, and T. R. von Stockert 1998. A Prospective Community-Based Study of Stroke in Germany - The Erlangen Stroke Project (ESPro). *Stroke*, 29(12):2501–2506.
- Kolominsky-Rabas, P. L., M. Weber, O. Gefeller, B. Neundoerfer, and P. U. Heuschmann 2001. Epidemiology of Ischemic Stroke Subtypes According to TOAST Criteria: Incidence, Recurrence, and Long-Term Survival in Ischemic Stroke Subtypes: A Population-Based Study. *Stroke*, 32(12):2735–2740.
- Kontaraki, J., M. Marketou, E. Zacharis, F. Parthenakis, and P. Vardas 2014. Differential expression of vascular smooth muscle-modulating microRNAs in human peripheral blood mononuclear cells: novel targets in essential hypertension. *Journal of human hypertension*, 28(8):510–516.
- Kothari, R., K. Hall, T. Brott, and J. Broderick 1997. Early Stroke Recognition: Developing an Out-of-hospital NIH Stroke Scale. *Academic Emergency Medicine*, 4(10):986–990.
- Kothari, R. U., A. Pancioli, T. Liu, T. Brott, and J. Broderick 1999. Cincinnati Prehospital Stroke Scale: Reproducibility and Validity. *Annals of Emergency Medicine*, 33(4):373 – 378.
- Kozomara, A., M. Birgaoanu, and S. Griffiths-Jones 2018. miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Research*, 47(D1):D155–D162.
- Krek, A., D. Grün, M. N. Poy, R. Wolf, L. Rosenberg, E. J. Epstein, P. MacMenamin, I. da Piedade, K. C. Gunsalus, M. Stoffel, and N. Rajewsky 2005. Combinatorial microRNA target predictions. *Nature Genetics*, 37(5):495–500.
- Kriegel, A. J., M. A. Baker, Y. Liu, P. Liu, A. W. Cowley, and M. Liang 2015. Endogenous MicroRNAs in Human Microvascular Endothelial Cells Regulate mRNAs Encoded by Hypertension-Related Genes. *Hypertension*, 66(4):793–799.
- Kulesh, S. D., N. A. Filina, N. M. Frantava, N. L. Zhytko, T. M. Kastsinevich, L. A. Kliatskova, M. S. Shumskas, M. J. Hilz, S. Schwab, and P. L. Kolominsky-Rabas 2010. Incidence and Case-Fatality of Stroke on the East Border of the European Union. *Stroke*, 41(12):2726–2730.
- Lagos-Quintana, M., R. Rauhut, W. Lendeckel, and T. Tuschl 2001. Identification of Novel Genes Coding for Small Expressed RNAs. *Science*, 294(5543):853–858.

- Lagos-Quintana, M., R. Rauhut, J. Meyer, A. Borkhardt, and T. Tuschl
 2003. New microRNAs from mouse and human. *RNA*, 9(2):175–179.
- Lau, N. C., L. P. Lim, E. G. Weinstein, and D. P. Bartel
 2001. An Abundant Class of Tiny RNAs with Probable Regulatory Roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 294(5543):858–862.
- Le, M. T. N., H. Xie, B. Zhou, P. H. Chia, P. Rizk, M. Um, G. Udolph, H. Yang, B. Lim, and H. F. Lodish
 2009. MicroRNA-125b promotes neuronal differentiation in human cells by repressing multiple targets. *Molecular and cellular biology*, 29(19):5290—5305.
- Lee, R. C. and V. Ambros
 2001. An Extensive Class of Small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 294(5543):862–864.
- Lee, R. C., R. L. Feinbaum, and V. Ambros
 1993. The *C. elegans* Heterochronic Gene lin-4 Encodes Small RNAs with Antisense Complementarity to lin-14. *Cell*, 75:843–854.
- Lee, Y., C. Ahn, J. Han, H. Choi, J. Kim, J. Yim, J. Lee, P. Provost, O. Rådmark, S. Kim, and V. N. Kim
 2003. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, 425:415–419.
- Lee, Y., K. Jeon, J.-T. Lee, S. Kim, and V. N. Kim
 2002. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *The EMBO Journal*, 21(17):4663–4670.
- Lee, Y., M. Kim, J. Han, K.-H. Yeom, S. Lee, S. H. Baek, and V. N. Kim
 2004. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO Journal*, 23(20):4051–4060.
- Lendvai, G., K. Jármay, G. Karácsony, T. Halász, I. Kovácszky, K. Baghy, T. Wittmann, Z. Schaff, and A. Kiss
 2014. Elevated miR-33a and miR-224 in steatotic chronic hepatitis C liver biopsies. *World Journal of Gastroenterology*, 20:15343–15350.
- Lewis, B. P., C. B. Burge, and D. P. Bartel
 2005. Conserved Seed Pairing, Often Flanked by Adenosines, Indicates that Thousands of Human Genes are MicroRNA Targets. *Cell*, 120(1):15 – 20.
- Lewis, B. P., I.-h. Shih, M. W. Jones-Rhoades, D. P. Bartel, and C. B. Burge
 2003. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell*, 115(7):787–798.
- Li, B.-s., Y.-l. Zhao, G. Guo, W. Li, E.-d. Zhu, X. Luo, X.-h. Mao, Q.-m. Zou, P.-w. Yu, Q.-f. Zuo, N. Li, B. Tang, K.-y. Liu, and B. Xiao
 2012. Plasma microRNAs, miR-223, miR-21 and miR-218, as Novel Potential Biomarkers for Gastric Cancer Detection. *PLOS ONE*, 7(7):1–8.
- Li, G., K. C. Morris-Blanco, M. S. Lopez, T. Yang, H. Zhao, R. Vemuganti, and Y. Luo
 2018. Impact of microRNAs on ischemic stroke: From pre- to post-disease. *Progress in Neurobiology*, 163-164:59 – 78. Neurobiology of Stroke: advances, challenges, and future directions.

- Li, H., X. Zhang, F. Wang, L. Zhou, Z. Yin, J. Fan, X. Nie, P. Wang, X.-D. Fu, C. Chen, and D. W. Wang
 2016. MicroRNA-21 Lowers Blood Pressure in Spontaneous Hypertensive Rats by Upregulating Mitochondrial Translation. *Circulation*, 134(10):734–751.
- Li, J. and Y. Wang
 2016. Blood biomarkers in minor stroke and transient ischemic attack. *Neuroscience bulletin*, 32(5):463–468.
- Li, P., F. Teng, F. Gao, M. Zhang, J. Wu, and C. Zhang
 2015. Identification of Circulating MicroRNAs as Potential Biomarkers for Detecting Acute Ischemic Stroke. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 35(3):433–447.
- Li, S., D. Zhao, J. Cui, L. Wang, X. Ma, and Y. Li
 2020. Correlation of microRNA-125a/b with acute respiratory distress syndrome risk and prognosis in sepsis patients. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 34(3):e23098.
- Li, Y., W. Zhong, Z. Jiang, and X. Tang
 2019. New progress in the approaches for blood–brain barrier protection in acute ischemic stroke. *Brain Research Bulletin*, 144:46 – 57.
- Liang, Y., J. Xu, Y. Wang, J.-Y. Tang, S.-L. Yang, H.-G. Xiang, S.-X. Wu, and X.-J. Li
 2018. Inhibition of MiRNA-125b decreases cerebral ischemia/reperfusion injury by targeting CK2 α /NADPH oxidase signaling. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 45(5):1818–1826.
- Libby, P., J. E. Buring, L. Badimon, G. K. Hansson, J. Deanfield, M. S. Bittencourt, L. Tokgozoglu, and E. F. Lewis
 2019. Atherosclerosis. *Nature Reviews: Disease Primers*.
- Lim, L. P., N. C. Lau, E. G. Weinstein, A. Abdelhakim, S. Yekta, M. W. Rhoades, C. B. Burge, and D. P. Bartel
 2003. The microRNAs of *Caenorhabditis elegans*. *Genes & Development*, 17(8):991–1008.
- Liu, F. J., K. Y. Lim, P. Kaur, S. Sepramaniam, A. Armugam, P. T. H. Wong, and K. Jeyaseelan
 2013a. microRNAs Involved in Regulating Spontaneous Recovery in Embolic Stroke Model. *PLOS ONE*, 8(6):1–13.
- Liu, J., J. Gao, Y. Du, Z. Li, Y. Ren, J. Gu, X. Wang, Y. Gong, W. Wang, and X. Kong
 2012a. Combination of plasma microRNAs with serum CA19-9 for early detection of pancreatic cancer. *International Journal of Cancer*, 131(3):683–691.
- Liu, P., H. Zhao, R. Wang, P. Wang, Z. Tao, L. Gao, F. Yan, X. Liu, S. Yu, X. Ji, and Y. Luo
 2015. MicroRNA-424 Protects Against Focal Cerebral Ischemia and Reperfusion Injury in Mice by Suppressing Oxidative Stress. *Stroke*, 46(2):513–519.
- Liu, S., S. Zhou, and C. Xue
 2001. Effect of tetrandrine on neutrophilic recruitment response to brain ischemia/reperfusion. *Acta pharmacologica Sinica*, 22(11):971–975.
- Liu, W., F. Geng, and L. Yu
 2020. Long non-coding RNA MALAT1/microRNA 125a axis presents excellent value in

- discriminating sepsis patients and exhibits positive association with general disease severity, organ injury, inflammation level, and mortality in sepsis patients. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 34(6):e23222.
- Liu, X., D.-Y. Jin, M. T. McManus, and Z. Mourelatos
 2012b. Precursor MicroRNA-Programmed Silencing Complex Assembly Pathways in Mammals. *Molecular Cell*, 46(4):507 – 517.
- Liu, X., S. Ni, C. Li, N. Xu, W. Chen, M. Wu, A. J. van Wijnen, and Y. Wang
 2019. Circulating microRNA-23b as a new biomarker for rheumatoid arthritis. *Gene*.
- Liu, X. S., M. Chopp, X. L. Wang, L. Zhang, A. Hozeska-Solgot, T. Tang, H. Kassis, R. L. Zhang, C. Chen, J. Xu, and Z. G. Zhang
 2013b. MicroRNA-17-92 Cluster Mediates the Proliferation and Survival of Neural Progenitor Cells after Stroke. *Journal of Biological Chemistry*, 288(18):12478–12488.
- Liu, X. S., M. Chopp, R. L. Zhang, T. Tao, X. L. Wang, H. Kassis, A. Hozeska-Solgot, L. Zhang, C. Chen, and Z. G. Zhang
 2011. MicroRNA Profiling in Subventricular Zone after Stroke: MiR-124a Regulates Proliferation of Neural Progenitor Cells through Notch Signaling Pathway. *PLOS ONE*, 6(8):1–11.
- Long, G., F. Wang, H. Li, Z. Yin, C. Sandip, Y. Lou, Y. Wang, C. Chen, and D. W. Wang
 2013. Circulating miR-30a, miR-126 and let-7b as biomarker for ischemic stroke in humans. *BMC neurology*, 13(1):178.
- Lozano, R., M. Naghavi, K. Foreman, S. Lim, K. Shibuya, V. Aboyans, J. Abraham, T. Adair, R. Aggarwal, S. Y. Ahn, M. A. AlMazroa, M. Alvarado, H. R. Anderson, L. M. Anderson, K. G. Andrews, C. Atkinson, L. M. Baddour, S. Barker-Collo, D. H. Bartels, and et al.
 2012. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *The Lancet*, 380:2095 – 2128.
- Luengo-Fernandez, R., N. L. Paul, A. M. Gray, S. T. Pendlebury, L. M. Bull, S. J. Welch, F. C. Cuthbertson, and P. M. Rothwell
 2013. Population-based study of disability and institutionalization after transient ischemic attack and stroke: 10-year results of the Oxford Vascular Study. *Stroke*, 44(10):2854–2861.
- Lv, H.-F., X.-Q. Sun, H.-X. Zhou, Z. Qin, Y.-Y. Shi, Q. Wang, and F. Li
 2020. Diagnostic value of miRNA-122 in Kawasaki disease. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 24(21):11222–11226.
- Lyden, P., T. Brott, B. Tilley, K. Welch, E. Mascha, S. Levine, E. Haley, J. Grotta, and M. J. 1994. Improved reliability of the NIH Stroke Scale using video training. NINDS TPA Stroke Study Group. *Stroke*, 25(11):2220–2226.
- Lyden, P., R. Raman, L. Liu, J. Grotta, J. Broderick, S. Olson, S. Shaw, J. Spilker, B. Meyer, M. Emr, M. Warren, and J. Marler
 2005. NIHSS Training and Certification Using a New Digital Video Disk Is Reliable. *Stroke*, 36(11):2446–2449.

- Ma, H., B. C. Campbell, M. W. Parsons, L. Churilov, C. R. Levi, C. Hsu, T. J. Kleinig, T. Wijeratne, S. Curtze, H. M. Dewey, F. Miteff, C.-H. Tsai, J.-T. Lee, T. G. Phan, N. Mahant, M.-C. Sun, M. Krause, J. Sturm, R. Grimley, C.-H. Chen, C.-J. Hu, A. A. Wong, D. Field, Y. Sun, P. A. Barber, A. Sabet, J. Jannes, J.-S. Jeng, B. Clissold, R. Markus, C.-H. Lin, L.-M. Lien, C. F. Bladin, S. Christensen, N. Yassi, G. Sharma, A. Bivard, P. M. Desmond, B. Yan, P. J. Mitchell, V. Thijs, L. Carey, A. Meretoja, S. M. Davis, and G. A. Donnan 2019. Thrombolysis Guided by Perfusion Imaging up to 9 Hours after Onset of Stroke. *New England Journal of Medicine*, 380(19):1795–1803. PMID: 31067369.
- Maniataki, E. and Z. Mourelatos
2005. A human, ATP-independent, RISC assembly machine fueled by pre-miRNA. *Genes & Development*, 19(24):2979–2990.
- Marques, F. Z., A. E. Campain, M. Tomaszewski, E. Zukowska-Szczechowska, Y. H. J. Yang, F. J. Charchar, and B. J. Morris
2011. Gene Expression Profiling Reveals Renin mRNA Overexpression in Human Hypertensive Kidneys and a Role for MicroRNAs. *Hypertension*, 58(6):1093–1098.
- Marques, F. Z., S. P. Romaine, M. Denniff, J. Eales, J. Dormer, I. M. Garrelds, L. Wojnar, K. Musialik, B. Duda-Raszewska, B. Kisszka, et al.
2015. Signatures of miR-181a on the Renal Transcriptome and Blood Pressure. *Molecular medicine*, 21(1):739–748.
- Martin-Schild, S., K. C. Albright, J. Tanksley, V. Pandav, E. B. Jones, J. C. Grotta, and S. I. Savitz
2011. Zero on the NIHSS Does NOT Equal the Absence of Stroke. *Annals of Emergency Medicine*, 57(1):42–45.
- Mathieu, M., L. Martin-Jaular, G. Lavieu, and C. Thery
2019. Specificities of secretion and uptake of exosomes and other extracellular vesicles for cell-to-cell communication. *Nature cell biology*, 21(1):9–17.
- Matosevic, B., M. Knoflach, P. Werner, R. Pechlaner, A. Zangerle, M. Ruecker, M. Kirchmayr, J. Willeit, and S. Kiechl
2013. Fibrinogen degradation coagulopathy and bleeding complications after stroke thrombolysis. *Neurology*, 80(13):1216–1224.
- Matsuzaki, J. and T. Ochiya
2017. Circulating microRNAs and extracellular vesicles as potential cancer biomarkers: a systematic review. *International Journal of Clinical Oncology*, 22(3):413–420.
- McAlexander, M. A., M. J. Phillips, and K. W. Witwer
2013. Comparison of Methods for miRNA Extraction from Plasma and Quantitative Recovery of RNA from Cerebrospinal Fluid. *Frontiers in Genetics*, 4.
- Misra, S., A. Kumar, P. Kumar, A. K. Yadav, D. Mohania, A. K. Pandit, K. Prasad, and D. Vibha
2017. Blood-based protein biomarkers for stroke differentiation: A systematic review. *PROTEOMICS-clinical applications*, 11(9-10):1700007.

- Mitchell, P. S., R. K. Parkin, E. M. Kroh, B. R. Fritz, S. K. Wyman, E. L. Pogosova-Agadjanyan, A. Peterson, J. Noteboom, K. C. O'Briant, A. Allen, D. W. Lin, N. Urban, C. W. Drescher, B. S. Knudsen, D. L. Stirewalt, R. Gentleman, R. L. Vessella, P. S. Nelson, D. B. Martin, and M. Tewari
 2008. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(30):10513–10518.
- Modak, J. M., M. Roy-O'Reilly, L. Zhu, I. Staff, and L. D. McCullough
 2019. Differential MicroRibonucleic Acid Expression in Cardioembolic Stroke. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*, 28(1):121 – 124.
- Muramatsu, F., H. Kidoya, H. Naito, S. Sakimoto, and N. Takakura
 2013. microRNA-125b inhibits tube formation of blood vessels through translational suppression of VE-cadherin. *Oncogene*, 32:414–421.
- Murray, C. J. L., T. Vos, R. Lozano, M. Naghavi, A. D. Flaxman, C. Michaud, M. Ezzati, K. Shibuya, J. A. Salomon, S. Abdalla, V. Aboyans, J. Abraham, I. Ackerman, R. Aggarwal, S. Y. Ahn, M. K. Ali, M. A. AlMazroa, M. Alvarado, and et al.
 2012. Disability-adjusted life years (DALYs) for 291 diseases and injuries in 21 regions, 1990–2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *The Lancet*, 380:2197 – 2223.
- Nagy, Á., A. Lánczky, O. Menyhárt, and B. Győrffy
 2018. Validation of miRNA prognostic power in hepatocellular carcinoma using expression data of independent datasets. *Scientific reports*, 8(1):1–9.
- Neuhauser, H., C. Diederichs, H. Boeing, S. B. Felix, C. Jünger, R. Lorbeer, C. Meisinger, A. Peters, H. Völzke, C. Weikert, P. Wild, and M. Dörr
 2016. Hypertension in Germany. *Dtsch Arztebl International*, 113(48):809–815.
- Nguyen, H. C. N., W. Xie, M. Yang, C.-L. Hsieh, S. Drouin, G.-S. M. Lee, and P. W. Kantoff
 2013. Expression differences of circulating microRNAs in metastatic castration resistant prostate cancer and low-risk, localized prostate cancer. *The Prostate*, 73(4):346–354.
- Nogueira, R. G., A. P. Jadhav, D. C. Haussen, A. Bonafe, R. F. Budzik, P. Bhuva, D. R. Yavagal, M. Ribo, C. Cognard, R. A. Hanel, C. A. Sila, A. E. Hassan, M. Millan, E. I. Levy, P. Mitchell, M. Chen, J. D. English, Q. A. Shah, F. L. Silver, V. M. Pereira, B. P. Mehta, B. W. Baxter, M. G. Abraham, P. Cardona, E. Veznedaroglu, F. R. Hellinger, L. Feng, J. F. Kirmani, D. K. Lopes, B. T. Jankowitz, M. R. Frankel, V. Costalat, N. A. Vora, A. J. Yoo, A. M. Malik, A. J. Furlan, M. Rubiera, A. Aghaebrahim, J.-M. Olivot, W. G. Tekle, R. Shields, T. Graves, R. J. Lewis, W. S. Smith, D. S. Liebeskind, J. L. Saver, and T. G. Jovin
 2018. Thrombectomy 6 to 24 Hours after Stroke with a Mismatch between Deficit and Infarct. *New England Journal of Medicine*, 378(1):11–21. PMID: 29129157.
- O'Donnell, M. J., S. L. Chin, S. Rangarajan, D. Xavier, L. Liu, H. Zhang, P. Rao-Melacini, X. Zhang, P. Pais, S. Agapay, P. Lopez-Jaramillo, A. Damasceno, P. Langhorne, M. J. McQueen, A. Rosengren, M. Dehghan, G. J. Hankey, A. L. Dans, A. Elsayed, A. Avezum, C. Mondo, H.-C. Diener, D. Ryglewicz, A. Czlonkowska, N. Pogosova, C. Weimar, R. Iqbal, R. Diaz, K. Yusoff, A. Yusufali, A. Oguz, X. Wang, E. Penaherrera, F. Lanas, O. S. Ogah, A. Ogunniyi, H. K. Iversen, G. Malaga, Z. Rumboldt, S. Oveisgharan, F. A. Hussain,

- D. Magazi, Y. Nilanont, J. Ferguson, G. Pare, and S. Yusuf
 2016. Global and regional effects of potentially modifiable risk factors associated with acute stroke in 32 countries (INTERSTROKE): a case-control study. *The Lancet*, 388(10046):761 – 775.
- Ortega, F. J., J. M. Moreno-Navarrete, G. Pardo, M. Sabater, M. Hummel, A. Ferrer, J. I. Rodriguez-Hermosa, B. Ruiz, W. Ricart, B. Peral, and J. M. Fernández-Real
 2010. MiRNA Expression Profile of Human Subcutaneous Adipose and during Adipocyte Differentiation. *sPLOS ONE*, 5(2):1–9.
- Osmai, M., Y. Osmai, C. H. Bang-Berthelsen, E. M. H. Pallesen, A. L. Vestergaard, G. W. Novotny, F. Pociot, and T. Mandrup-Poulsen
 2016. MicroRNAs as regulators of beta-cell function and dysfunction. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, 32(4):334–349.
- Palm, F., C. Urbanek, S. Rose, F. Buggle, B. Bode, M. G. Hennerici, K. Schmieder, G. Inselmann, R. Reiter, R. Fleischer, K.-O. Piplack, A. Safer, H. Becher, and A. J. Grau
 2010. Stroke Incidence and Survival in Ludwigshafen am Rhein, Germany. *Stroke*, 41(9):1865–1870.
- Palm, F., C. Urbanek, J. Wolf, F. Buggle, T. Kleemann, M. G. Hennerici, G. Inselmann, M. Hagar, A. Safer, H. Becher, et al.
 2012. Etiology, risk factors and sex differences in ischemic stroke in the Ludwigshafen Stroke Study, a population-based stroke registry. *Cerebrovascular diseases*, 33(1):69–75.
- Pan, W., S. Zhu, D. Dai, Z. Liu, D. Li, B. Li, N. Gagliani, Y. Zheng, Y. Tang, M. T. Weirauch, X. Chen, W. Zhu, Y. Wang, B. Chen, Y. Qian, Y. Chen, J. Fang, R. Herbst, L. Richman, B. Jallal, J. B. Harley, R. A. Flavell, Y. Yao, and N. Shen
 2015. MiR-125a targets effector programs to stabilize Treg-mediated immune homeostasis. *Nature Communications*, 6:7096.
- Pantoni, L.
 2010. Cerebral small vessel disease: from pathogenesis and clinical characteristics to therapeutic challenges. *The Lancet Neurology*, 9(7):689 – 701.
- Parahuleva, M. S., G. Euler, A. Mardini, B. Parviz, B. Schieffer, R. Schulz, and M. Aslam
 2017. Identification of microRNAs as potential cellular monocytic biomarkers in the early phase of myocardial infarction: a pilot study. *Scientific reports*, 7(1):1–10.
- Pasquinelli, A. E., B. J. Reinhart, F. Slack, M. Q. Martindale, M. I. Kuroda, B. Maller, D. C. Hayward, E. E. Ball, B. Degnan, P. Muller, J. Spring, A. Srinivasan, M. Fishman, J. Finnerty, J. Corbo, M. Levine, P. Leahy, E. Davidson, and G. Ruvkun
 2000. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature*, 408:86–89.
- Pigati, L., S. C. S. Yaddanapudi, R. Iyengar, D.-J. Kim, S. A. Hearn, D. Danforth, M. L. Hastings, and D. M. Duelli
 2010. Selective Release of MicroRNA Species from Normal and Malignant Mammary Epithelial Cells. *PLoS One*, 5(10):1–13.

- Plass, D., T. Vos, C. Hornberg, C. Scheidt-Nave, H. Zeeb, and A. Krämer
 2014. Trends in Disease Burden in Germany. *Dtsch Arztebl International*, 111(38):629–638.
- Powers, W. J., A. A. Rabinstein, T. Ackerson, O. M. Adeoye, N. C. Bambakidis, K. Becker, J. Biller, M. Brown, B. M. Demaerschalk, B. Hoh, E. C. Jauch, C. S. Kidwell, T. M. Leslie-Mazwi, B. Ovbiagele, P. A. Scott, K. N. Sheth, A. M. Southerland, D. V. Summers, and D. L. Tirschwell
 2018. 2018 Guidelines for the Early Management of Patients With Acute Ischemic Stroke: A Guideline for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*, 49(3):e46–e99.
- Powers, W. J., A. A. Rabinstein, T. Ackerson, O. M. Adeoye, N. C. Bambakidis, K. Becker, J. Biller, M. Brown, B. M. Demaerschalk, B. Hoh, E. C. Jauch, C. S. Kidwell, T. M. Leslie-Mazwi, B. Ovbiagele, P. A. Scott, K. N. Sheth, A. M. Southerland, D. V. Summers, D. L. Tirschwell, and null null
 2019. Guidelines for the Early Management of Patients With Acute Ischemic Stroke: 2019 Update to the 2018 Guidelines for the Early Management of Acute Ischemic Stroke: A Guideline for Healthcare Professionals From the American Heart Association/American Stroke Association. *Stroke*, 50(12):e344–e418.
- Prospective Studies Collaboration
 2007. Blood cholesterol and vascular mortality by age, sex, and blood pressure: a meta-analysis of individual data from 61 prospective studies with 55 000 vascular deaths. *The Lancet*, 370(9602):1829–1839.
- Pu, X.-x., G.-l. Huang, H.-q. Guo, C.-c. Guo, H. Li, S. Ye, S. Ling, L. Jiang, Y. Tian, and T.-y. Lin
 2010. Circulating miR-221 directly amplified from plasma is a potential diagnostic and prognostic marker of colorectal cancer and is correlated with p53 expression. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 25(10):1674–1680.
- Rael, L. T., J. Leonard, K. Salottolo, R. Bar-Or, R. E. Bartt, J. C. Wagner, and D. Bar-Or
 2019. Plasma oxidized albumin in acute ischemic stroke is associated with better outcomes. *Frontiers in Neurology*, 10:709.
- Rankin, J.
 1957. Cerebral vascular accidents in patients over the age of 60: II. prognosis. *Scottish Medical Journal*, 2:200–215.
- Ratliff, M., T. Templeton, J. Ward, and C. Webb
 2014. The Bright Side of Hematopoiesis: Regulatory Roles of ARID3a/Bright in Human and Mouse Hematopoiesis. *Frontiers in Immunology*, 5:113.
- Reijerkerk, A., M. A. Lopez-Ramirez, B. van het Hof, J. A. Drexhage, W. W. Kamphuis, G. Kooij, J. B. Vos, T. C. van der Pouw Kraan, A. J. van Zonneveld, A. J. Horrevoets, A. Prat, I. A. Romero, and H. E. de Vries
 2013. MicroRNAs Regulate Human Brain Endothelial Cell-Barrier Function in Inflammation: Implications for Multiple Sclerosis. *Journal of Neuroscience*, 33(16):6857–6863.

- Reinhart, B. J., F. J. Slack, M. Basson, A. E. Pasquinelli, J. C. Bettinger, A. E. Rougvie, H. R. Horvitz, and G. Ruvkun
 2000. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 403:901–906.
- Rijken, D. C., G. Wijngaards, and J. Welbergen
 1980. Relationship between tissue plasminogen activator and the activators in blood and vascular wall. *Thrombosis research*, 18(6):815–830.
- Rijken, D. C., G. Wijngaards, M. Zaal-de Jong, and J. Welbergen
 1979. Purification and partial characterization of plasminogen activator from human uterine tissue. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure*, 580(1):140 – 153.
- Ringleb, P. A., G. F. Hamann, J. Röther, O. Jansen, C. Groden, and R. Veltkamp
 2015. Akuttherapie des ischämischen Schlaganfalls – Ergänzung 2015: Rekanalisierte Therapie. *Aktuelle Neurologie*.
- Rinkel, G. J. E., J. van Gijn, and E. F. M. Wijdicks
 1993. Subarachnoid hemorrhage without detectable aneurysm. a review of the causes. *Stroke*, 24 9:1403–9.
- Robert-Koch-Institut (Hrsg.)
 2015. Kapitel 2.3.2: Schlaganfall. In: Gesundheit in Deutschland. Gesundheitsberichterstattung des Bundes. Gemeinsam getragen von RKI und Destatis. RKI, Berlin, S. 43 – 50. *Gesundheitsbericht, GBE*.
- Roderburg, C., A. Koch, F. Benz, M. Vucur, M. Spehlmann, S. H. Loosen, M. Luedde, S. Rehse, G. Lurje, C. Trautwein, et al.
 2013. Serum levels of miR-143 predict survival in critically ill patients. *Disease markers*, 2019.
- Roth, C., I. Stückrath, K. Pantel, J. R. Izbicki, M. Tachezy, and H. Schwarzenbach
 2012. Low Levels of Cell-Free Circulating miR-361-3p and miR-625* as Blood-Based Markers for Discriminating Malignant from Benign Lung Tumors. *PLOS ONE*, 7(6):1–10.
- Sacco, R. L., S. E. Kasner, J. P. Broderick, L. R. Caplan, J. B. Connors, A. Culebras, M. S. Elkind, M. G. George, A. D. Hamdan, R. T. Higashida, B. L. Hoh, L. S. Janis, C. S. Kase, D. O. Kleindorfer, J.-M. Lee, M. E. Moseley, E. D. Peterson, T. N. Turan, A. L. Valderrama, and H. V. Vinters
 2013. An Updated Definition of Stroke for the 21st Century. *Stroke*, 44(7):2064–2089.
- Sadeghi, F., S. Kovács, K. S. Zsóri, Z. Csiki, Z. Bereczky, and A. H. Shemirani
 2020. Platelet count and mean volume in acute stroke: a systematic review and meta-analysis. *Platelets*, 31(6):731–739. PMID: 31657263.
- Sala, F., J. F. Aranda, N. Rotllan, C. M. Ramírez, B. Aryal, L. Elia, G. Condorelli, A. L. Catapano, C. Fernández-Hernando, and G. D. Norata
 2014. MiR-143/145 deficiency protects against progression of atherosclerosis in Ldlr-/ mice. *Thrombosis and haemostasis*, 112(4):796.
- Salomon, W. E., S. M. Jolly, M. J. Moore, P. D. Zamore, and V. Serebrov
 2015. Single-molecule imaging reveals that Argonaute reshapes the binding properties of its nucleic acid guides. *Cell*, 162(1):84–95.

- Santovito, D., V. Egea, and C. Weber
 2016. Small but smart: MicroRNAs orchestrate atherosclerosis development and progression. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1861(12, Part B):2075–2086. MicroRNAs and lipid/energy metabolism and related diseases.
- Savio, K., G. L. Della Pietra, E. Oddone, M. Reggiani, and M. A. Leone
 2013. Reliability of the modified Rankin Scale applied by telephone. *Neurology international*, 5(1).
- Scheidt-Nave, C., Y. Du, H. Knopf, A. Schienkiewitz, T. Ziese, E. Nowossadeck, A. Gößwald, and M. Busch
 2013. Verbreitung von Fettstoffwechselstörungen bei Erwachsenen in Deutschland. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz*, 56(5/6).
- Schmid, T.
 2015. Costs of treating cardiovascular events in Germany: a systematic literature review. *Health Economics Review*, 5(1):27.
- Schwarz, D. S., G. Hutvágner, T. Du, Z. Xu, N. Aronin, and P. D. Zamore
 2003. Asymmetry in the Assembly of the RNAi Enzyme Complex. *Cell*, 115(2):199–208.
- Sepramaniam, S., J.-R. Tan, K.-S. Tan, D. A. DeSilva, S. Tavintharan, F.-P. Woon, C.-W. Wang, F.-L. Yong, D.-S. Karolina, P. Kaur, F.-J. Liu, K.-Y. Lim, A. Armugam, and K. Jeyaseelan
 2014. Circulating MicroRNAs as Biomarkers of Acute Stroke. *International Journal of Molecular Sciences*, 15:1418 – 1432.
- Shan, Y., J. Hu, H. Lv, X. Cui, and W. Di
 2021. miR-221 Exerts Neuroprotective Effects in Ischemic Stroke by Inhibiting the Proinflammatory Response. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*, 30(2):105489.
- Shen, J., Z. Liu, N. W. Todd, H. Zhang, J. Liao, L. Yu, M. A. Guarnera, R. Li, L. Cai, M. Zhan, and F. Jiang
 2011. Diagnosis of lung cancer in individuals with solitary pulmonary nodules by plasma microRNA biomarkers. *BMC Cancer*, 11:374.
- Sheu-Gruttaduria, J. and I. J. MacRae
 2017. Structural Foundations of RNA Silencing by Argonaute. *Journal of Molecular Biology*, 429(17):2619 – 2639. John Kendrew's 100th Anniversary Special Edition.
- Slater, E. P., K. Strauch, S. Rospleszcz, A. Ramaswamy, I. Esposito, G. Klöppel, E. Matthäi, K. Heeger, V. Fendrich, P. Langer, and D. K. Bartsch
 2014. MicroRNA-196a and -196b as Potential Biomarkers for the Early Detection of Familial Pancreatic Cancer. *Translational Oncology*, 7(4):464 – 471.
- Smith, C. J., H. C. Emsley, C. M. Gavin, R. F. Georgiou, A. Vail, E. M. Barberan, G. J. del Zoppo, J. M. Hallenbeck, N. J. Rothwell, S. J. Hopkins, and P. J. Tyrrell
 2004. Peak plasma interleukin-6 and other peripheral markers of inflammation in the first week of ischaemic stroke correlate with brain infarct volume, stroke severity and long-term outcome. *BMC Neurology*, 4(1):2.

- Song, M.-y., K.-f. Pan, H.-j. Su, L. Zhang, J.-l. Ma, J.-y. Li, Y. Yuasa, D. Kang, Y. S. Kim, and W.-c. You
 2012. Identification of Serum MicroRNAs as Novel Non-Invasive Biomarkers for Early Detection of Gastric Cancer. *PLOS ONE*, 7(3):1–9.
- Stark, A., J. Brennecke, R. B. Russell, and S. M. Cohen
 2003. Identification of *Drosophila* MicroRNA Targets. *PLOS Biology*, 1(3).
- Statistisches Bundesamt (Destatis)
 2015. Gesundheit - Todesursachen in Deutschland. Fachserie 12 Reihe 4. *Wiesbaden: Statistisches Bundesamt*.
- Statistisches Bundesamt (Destatis)
 2016. Gesundheit - Diagnosedaten der Patienten und Patientinnen in Krankenhäusern (einschl. Sterbe- und Stundenfälle). Fachserie 12 Reihe 6.2.1. *Wiesbaden: Statistisches Bundesamt*.
- Stegner, D., V. Klaus, and B. Nieswandt
 2019. Platelets as Modulators of Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury. *Frontiers in Immunology*, 10:2505.
- Stoll, G. and B. Nieswandt
 2019. Thrombo-inflammation in acute ischaemic stroke — implications for treatment. *Nature Reviews Neurology*, 15:473–481.
- Strimbu, K. and J. A. Tavel
 2010. What are biomarkers? *Current Opinion in HIV and AIDS*, 5(6):463.
- Sun, Y., H. Gui, Q. Li, Z.-M. Luo, M.-J. Zheng, J.-L. Duan, and X. Liu
 2013. MicroRNA-124 Protects Neurons Against Apoptosis in Cerebral Ischemic Stroke. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 19(10):813–819.
- Tan, K. S., A. Armugam, S. Sepramaniam, K. Y. Lim, K. D. Setyowati, C. W. Wang, and et al.
 2009. Expression Profile of MicroRNAs in Young Stroke Patients. *PLoS ONE*, 4:e7689.
- Thayanithy, V., E. L. Dickson, C. Steer, S. Subramanian, and E. Lou
 2014. Tumor-stromal cross talk: direct cell-to-cell transfer of oncogenic microRNAs via tunneling nanotubes. *Translational Research*, 164(5):359 – 365.
- The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group
 1995. Tissue Plasminogen Activator for Acute Ischemic Stroke. *The New England Journal of Medicine*, 333(24):1581–1587.
- Thomalla, G., F. Boutitie, H. Ma, M. Koga, P. Ringleb, L. H. Schwamm, O. Wu, M. Bendszus, C. F. Bladin, B. C. V. Campbell, B. Cheng, L. Churilov, M. Ebinger, M. Endres, J. B. Fiebach, M. Fukuda-Doi, M. Inoue, T. J. Kleinig, L. L. Latour, R. Lemmens, C. R. Levi, D. Leys, K. Miwa, C. A. Molina, K. W. Muir, N. Nighoghossian, M. W. Parsons, S. Pedraza, P. D. Schelling, S. Schwab, C. Z. Simonsen, S. S. Song, V. Thijs, D. Toni, C. Y. Hsu, N. Wahlgren, H. Yamamoto, N. Yassi, S. Yoshimura, S. Warach, W. Hacke, K. Toyoda, G. A. Donnan, S. M. Davis, and Christian Gerloff on behalf of the Evaluation of unknown Onset Stroke thrombolysis trials (EOS) investigators
 2020. Intravenous alteplase for stroke with unknown time of onset guided by advanced

- imaging: systematic review and meta-analysis of individual patient data. *The Lancet*, 396(10262):1574 – 1584.
- Tiedt, S., M. Prestel, R. Malik, N. Schieferdecker, M. Duering, V. Kautzky, I. Stoycheva, J. Böck, B. H. Northoff, M. Klein, F. Dorn, K. Krohn, D. Teupser, A. Liesz, N. Plesnila, L. M. Holdt, and M. Dichgans
 2017. RNA-Seq Identifies Circulating miR-125a-5p, miR-125b-5p, and miR-143-3p as Potential Biomarkers for Acute Ischemic Stroke. *Circulation Research*, 121(8):970–980.
- Tohgi, H., H. Suzuki, K. Tamura, and B. Kimura
 1991. Platelet volume, aggregation, and adenosine triphosphate release in cerebral thrombosis. *Stroke*, 22(1):17–21.
- Toiyama, Y., K. Hur, K. Tanaka, Y. Inoue, M. Kusunoki, C. R. Boland, and A. Goel
 2014. Serum miR-200c is a novel prognostic and metastasis-predictive biomarker in patients with colorectal cancer. *Annals of surgery*, 259:735–743.
- Tsai, P.-C., Y.-C. Liao, Y.-S. Wang, H.-F. Lin, R.-T. Lin, and S.-H. H. Juo
 2013. Serum microRNA-21 and microRNA-221 as Potential Biomarkers for Cerebrovascular Disease. *Journal of vascular research*, 50(4):346–354.
- Urano, T., F. J. Castellino, and Y. Suzuki
 2018. Regulation of Plasminogen Activation on Cell Surfaces and Fibrin. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 16:1–11.
- Valadi, H., K. Ekström, A. Bossios, M. Sjöstrand, J. J. Lee, and J. O. Lötvall
 2007. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature cell biology*, 9(6):654.
- van Kralingen, J. C., A. McFall, E. N. Ord, T. F. Coyle, M. Bissett, J. D. McClure, C. McCabe, I. M. Macrae, J. Dawson, and L. M. Work
 2019. Altered extracellular vesicle microRNA expression in ischemic stroke and small vessel disease. *Translational stroke research*, 10(5):495–508.
- van Swieten, J. C., P. J. Koudstaal, M. C. Visser, H. J. Schouten, and J. van Gijn
 1988. Interobserver agreement for the assessment of handicap in stroke patients. *Stroke*, 19(5):604–7.
- Vickers, K. C., S. R. Landstreet, M. G. Levin, B. M. Shoucri, C. L. Toth, R. C. Taylor, B. T. Palmisano, F. Tabet, H. L. Cui, K.-A. Rye, P. Sethupathy, and A. T. Remaley
 2014. MicroRNA-223 coordinates cholesterol homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(40):14518—14523.
- Vickers, K. C., B. T. Palmisano, B. M. Shoucri, R. D. Shamburek, and A. T. Remaley
 2011. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nature cell biology*, 13(4):423.
- Wade, S., N. Ohnesorge, H. McLoughlin, M. Biniecka, S. P. Carter, M. Trenkman, C. C. Cunningham, T. McGarry, M. Canavan, B. N. Kennedy, D. J. Veale, and U. Fearon
 2019. Dysregulated miR-125a promotes angiogenesis through enhanced glycolysis. *EBio-Medicine*, 47:402–413.

- Wang, H., M. Naghavi, C. Allen, R. M. Barber, Z. A. Bhutta, A. Carter, D. C. Casey, F. J. Charlson, A. Z. Chen, M. M. Coates, M. Coggeshall, L. Dandona, D. J. Dicker, H. E. Erskine, A. J. Ferrari, C. Fitzmaurice, et al.
2016. Global, regional, and national life expectancy, all-cause mortality, and cause-specific mortality for 249 causes of death, 1980–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *The Lancet*, 388(10053):1459–1544.
- Wang, H.-J., J. Deng, J.-Y. Wang, P.-J. Zhang, Z. Xin, K. Xiao, D. Feng, Y.-H. Jia, Y.-N. Liu, and L.-X. Xie
2014. Serum miR-122 levels are related to coagulation disorders in sepsis patients. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, 52(6):927–933.
- Wang, J., J. Chen, P. Chang, A. LeBlanc, D. Li, J. L. Abbruzzesse, M. L. Frazier, A. M. Killary, and S. Sen
2009. MicroRNAs in Plasma of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Patients as Novel Blood-Based Biomarkers of Disease. *Cancer Prevention Research*, 2(9):807–813.
- Wang, Q., Q. Feng, Y. Zhang, S. Zhou, and H. Chen
2020. Decreased microRNA 103 and microRNA 107 predict increased risks of acute respiratory distress syndrome and 28-day mortality in sepsis patients. *Medicine*, 99(25).
- Wang, S., L. Wu, L. Du, H. Lu, B. Chen, and Y. Bai
2017. Reduction in miRNA-125b-5p levels is associated with obstructive renal injury. *Biomedical reports*, 6(4):449–454.
- Wardlaw, J. M., V. Murray, E. Berge, G. del Zoppo, P. Sandercock, R. L. Lindley, and G. Cohen
2012. Recombinant tissue plasminogen activator for acute ischaemic stroke: an updated systematic review and meta-analysis. *The Lancet*, 379(9834):2364–2372.
- Willeit, P., A. Zampetaki, K. Dudek, D. Kaudewitz, A. King, N. S. Kirkby, R. Crosby-Nwaobi, M. Prokopi, I. Drozdov, S. R. Langley, S. Sivaprasad, H. S. Markus, J. A. Mitchell, T. D. Warner, S. Kiechl, and M. Mayr
2013. Circulating MicroRNAs as Novel Biomarkers for Platelet Activation. *Circulation Research*, 112(4):595–600.
- World Health Organization
2000. *Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO Consultation*. World Health Organization.
- Wortzel, I., S. Dror, C. M. Kenific, and D. Lyden
2019. Exosome-mediated metastasis: communication from a distance. *Developmental cell*, 49(3):347–360.
- Wu, D., C. Cerutti, M. A. Lopez-Ramirez, G. Pryce, J. King-Robson, J. E. Simpson, S. M. van der Pol, M. C. Hirst, H. E. de Vries, B. Sharrack, D. Baker, D. K. Male, G. J. Michael, and I. A. Romero
2015. Brain Endothelial miR-146a Negatively Modulates T-Cell Adhesion through Repressing Multiple Targets to Inhibit NF- κ B Activation. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 35(3):412–423. PMID: 25515214.

- Wu, X., J. Yang, L. Yu, and D. Long
 2018. Plasma miRNA-223 correlates with risk, inflammatory markers as well as prognosis in sepsis patients. *Medicine*, 97(27).
- Xiang, W., C. Tian, J. Lin, X. Wu, G. Pang, L. Zhou, S. Pan, and Z. Deng
 2017. Plasma let-7i and miR-15a expression are associated with the effect of recombinant tissue plasminogen activator treatment in acute ischemic stroke patients. *Thrombosis Research*, 158:121 – 125.
- Xie, H., B. Lim, and H. F. Lodish
 2009. MicroRNAs Induced During Adipogenesis that Accelerate Fat Cell Development Are Downregulated in Obesity. *Diabetes*, 58(5):1050–1057.
- Xie, X., X. Wang, D. T. Laskowitz, X. Zhao, Z. Miao, L. Liu, H. Li, X. Meng, Y. Wang, Y. Wang, and the CHANCE investigators
 2019. Effect of dual versus mono antiplatelet therapy on recurrent stroke modulated by activated partial thromboplastin time. *European Journal of Neurology*, 26(9):1168–e78.
- Xu, L.-J., Y.-B. Ouyang, X. Xiong, C. M. Stary, and R. G. Giffard
 2015. Post-stroke treatment with miR-181 antagonir reduces injury and improves long-term behavioral recovery in mice after focal cerebral ischemia. *Experimental Neurology*, 264:1–7.
- Xu, W.-H., C. Dong, T. Rundek, M. S. Elkind, and R. L. Sacco
 2014. Serum albumin levels are associated with cardioembolic and cryptogenic ischemic strokes: Northern Manhattan Study. *Stroke*, 45(4):973–978.
- Xu, X., D. Li, X. Li, Q. Shi, and X. Ju
 2017. Mesenchymal stem cell conditioned medium alleviates oxidative stress injury induced by hydrogen peroxide via regulating miR143 and its target protein in hepatocytes. *BMC Immunology*, 18(51).
- Yang, Z., J. Wang, Z. Pan, and Y. Zhang
 2018. miR-143-3p regulates cell proliferation and apoptosis by targeting IGF1R and IGFBP5 and regulating the Ras/p38 MAPK signaling pathway in rheumatoid arthritis. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 15(4):3781–3790.
- Yao, M., D. Hervé, N. Allili, E. Jouvent, M. Duering, M. Dichgans, and H. Chabriat
 2012. NIHSS Scores in Ischemic Small Vessel Disease: A Study in CADASIL. *Cerebrovascular Diseases*, 34(5-6):419–423.
- Yi, R., Y. Qin, I. G. Macara, and B. R. Cullen
 2003. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes & Development*, 17(24):3011–3016.
- Zampetaki, A., S. Kiechl, I. Drozdov, P. Willeit, U. Mayr, M. Prokopi, A. Mayr, S. Weger, F. Oberholzer, E. Bonora, A. Shah, J. Willeit, and M. Mayr
 2010. Plasma MicroRNA Profiling Reveals Loss of Endothelial MiR-126 and Other MicroRNAs in Type 2 Diabetes. *Circulation Research*, 107(6):810–817.
- Zampetaki, A. and M. Mayr
 2012. MicroRNAs in Vascular and Metabolic Disease. *Circulation Research*, 110(3):508–522.

- Zampetaki, A., P. Willeit, L. Tilling, I. Drozdov, M. Prokopi, J.-M. Renard, A. Mayr, S. Weger, G. Schett, A. Shah, C. M. Boulanger, J. Willeit, P. J. Chowienczyk, S. Kiechl, and M. Mayr 2012. Prospective Study on Circulating MicroRNAs and Risk of Myocardial Infarction. *Journal of the American College of Cardiology*, 60(4):290 – 299.
- Zeng, L., J. Liu, Y. Wang, L. Wang, S. Weng, S. Chen, and G.-Y. Yang
2013a. Cocktail Blood Biomarkers: Prediction of Clinical Outcomes in Patients with Acute Ischemic Stroke. *European Neurology*, 69:68–75.
- Zeng, L.-L., X.-S. He, J.-R. Liu, C.-B. Zheng, Y.-T. Wang, and G.-Y. Yang
2016. Lentivirus-Mediated Overexpression of MicroRNA-210 Improves Long-Term Outcomes after Focal Cerebral Ischemia in Mice. *CNS Neuroscience & Therapeutics*, 22(12):961–969.
- Zeng, R.-c., W. Zhang, X.-q. Yan, Z.-q. Ye, E.-d. Chen, D.-p. Huang, X.-h. Zhang, and G.-l. Huang
2013b. Down-regulation of miRNA-30a in human plasma is a novel marker for breast cancer. *Medical oncology*, 30(1):477.
- Zeng, Y., R. Yi, and B. R. Cullen
2005. Recognition and cleavage of primary microRNA precursors by the nuclear processing enzyme Drosha. *The EMBO Journal*, 24(1):138–148.
- Zernecke, A., K. Bidzhekov, H. Noels, E. Shagdarsuren, L. Gan, B. Denecke, M. Hristov, T. Köppel, M. N. Jahantigh, E. Lutgens, S. Wang, E. N. Olson, A. Schober, and C. Weber
2009. Delivery of MicroRNA-126 by Apoptotic Bodies Induces CXCL12-Dependent Vascular Protection. *Science Signaling*, 2(100):ra81–ra81.
- Zhang, Y., M. Zhang, M. Zhong, Q. Suo, and K. Lv
2013. Expression profiles of miRNAs in polarized macrophages. *International journal of molecular medicine*, 31(4):797–802.
- Zhao, H., Z. Tao, R. Wang, P. Liu, F. Yan, J. Li, C. Zhang, X. Ji, and Y. Luo
2014. MicroRNA-23a-3p attenuates oxidative stress injury in a mouse model of focal cerebral ischemia-reperfusion. *Brain Research*, 1592:65–72.
- Zhao, J., H. Yu, P. Yan, X. Zhou, Y. Wang, and Y. Yao
2019. Circulating microRNA-499 as a diagnostic biomarker for acute myocardial infarction: a meta-analysis. *Disease markers*, 2019.
- Zhou, P., M. Dong, J. Wang, F. Li, J. Zhang, and J. Gu
2018. Baseline serum miR-125b levels predict virologic response to nucleos (t) ide analogue treatment in patients with HBeAg-positive chronic hepatitis B. *Experimental and therapeutic medicine*, 16(5):3805–3812.
- Zhu, G., P. Michel, A. Aghaebrahim, J. T. Patrie, W. Xin, A. Eskandari, W. Zhang, and M. Wintermark
2013. Computed Tomography Workup of Patients Suspected of Acute Ischemic Stroke: Perfusion Computed Tomography Adds Value Compared With Clinical Evaluation, Noncontrast Computed Tomography, and Computed Tomography Angiogram in Terms of Predicting Outcome. *Stroke*, 44(4):1049–1055.

- Zhu, L., F. Liu, H. Xie, and J. Feng
2018. Diagnostic performance of microRNA-133a in acute myocardial infarction: A meta-analysis. *Cardiology Journal*, 25(2):260 – 267.
- Ziats, M. N. and O. M. Rennert
2014. Identification of differentially expressed microRNAs across the developing human brain. *Molecular psychiatry*, 19(7):848–852.

Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Martin Dichgans, der mir diese Promotion ermöglichte, sowie allen Mitarbeitern des ISD im Labor und in der Ambulanz. Ganz besonders danke ich meinem Betreuer Dr. Steffen Tiedt, dessen erste Doktorandin ich sein durfte und ohne dessen ansteckende Begeisterung, unermüdliches Engagement und geduldige Anleitung diese Arbeit schwerlich zustande gekommen wäre. Mein Dank gilt auch den Patienten und ihren Angehörigen, die ich im Rahmen dieser Studie begleiten durfte. Last but not least danke ich meiner Familie für ihre unendliche Geduld mit mir und ihren unerschütterlichen Glauben an diese Arbeit.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel „Identifizierung von Einflussfaktoren auf die Konzentrationen der zirkulierenden microRNAs miR-125a-5p, miR-125b-5p und miR-143-3p nach ischämischem Schlaganfall“ selbstständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 31.03.2022

Veronika Kautzky