

Analyse der Wirkung von microRNAs auf die Monozyten- Makrophagen Differenzierung am Beispiel von THP-1 Zellen

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Aslantas, Özden, geb. Tastan
aus Berlin

Gießen 2025

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Physiologisches Institut

Gutachterin: Prof. Dr. Euler, Gerhild

Gutachter: Prof. Dr. Borggreffe, Tilman

Tag der Disputation: 02.10.2025

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	<i>Pathophysiologie der Atherosklerose</i>	<i>1</i>
1.2	<i>Entstehung der Atherosklerose</i>	<i>1</i>
1.3	<i>Synthese und Funktion von microRNAs</i>	<i>6</i>
1.4	<i>microRNAs und Atherosklerose</i>	<i>6</i>
1.5	<i>THP-1 Zellen und ihre Bedeutung für Untersuchungen von atherosklerotischen Prozessen</i>	<i>8</i>
1.6	<i>Ziel dieser Arbeit</i>	<i>9</i>
2	Material und Methoden	11
2.1	<i>Zellkultur</i>	<i>11</i>
2.1.1	<i>Basale Kultur von THP-1 Zellen</i>	<i>11</i>
2.1.2	<i>Stimulation mit PMA zu Makrophagen – Differenzierung</i>	<i>12</i>
2.1.3	<i>Transfektion der Zellen mit AgomiRen/AntagomiRen</i>	<i>13</i>
2.2	<i>PCR</i>	<i>14</i>
2.2.1	<i>RNA-Isolation</i>	<i>14</i>
2.2.2	<i>Geräte und verwendete Primer</i>	<i>15</i>
2.2.3	<i>Verwendete Primer und ihre Sequenzen</i>	<i>16</i>
2.2.4	<i>Umschreiben von mRNA in cDNA</i>	<i>16</i>
2.2.5	<i>CD14-PCR</i>	<i>17</i>
2.2.6	<i>Umschreiben von microRNA in cDNA</i>	<i>17</i>
2.2.7	<i>Primeroptimierung</i>	<i>18</i>
2.2.8	<i>PCR der MicroRNAs</i>	<i>21</i>
2.3	<i>Statistik</i>	<i>21</i>
3	Ergebnisse	22
3.1	<i>Differenzierung von THP-1 Monozyten zu MO-Makrophagen</i>	<i>22</i>
3.2	<i>PCR der microRNAs</i>	<i>24</i>
3.2.1	<i>PCR von microRNAs der mit PMA-stimulierten Zellen</i>	<i>24</i>
3.3	<i>Wirkung von AgomiRen/AntagomiRen auf die Makrophagen-Differenzierung</i>	<i>25</i>
3.3.1	<i>Runterregulierte microRNAs</i>	<i>25</i>
3.3.2	<i>Hochregulierte microRNAs</i>	<i>28</i>
3.3.3	<i>Ansatz mit allen Anta- und AgomiRen</i>	<i>31</i>

4	Diskussion	35
4.1	<i>Die Bedeutung von let-7f.....</i>	35
4.2	<i>Die Bedeutung von miR-92a.....</i>	40
4.3	<i>Die Bedeutung von miR-1.....</i>	44
4.4	<i>Die Rolle von miR-22 und miR-143.....</i>	47
4.5	<i>Reduktion der Makrophagen-Differenzierung als führende Rolle aller untersuchten miRs ...</i>	47
4.6	<i>Limitationen der Arbeit</i>	47
4.7	<i>Ausblick</i>	48
5	Zusammenfassung.....	49
6	Summary.....	50
7	Literaturverzeichnis.....	51
8	Abkürzungsverzeichnis	57
9	Publikationsverzeichnis	59
10	Erklärung zur Dissertation.....	60
11	Danksagung.....	61
12	Lebenslauf	62

1 Einleitung

1.1 Pathophysiologie der Atherosklerose

Die Atherosklerose ist eine Erkrankung der Intima von Arterien. Im alltäglichen Gebrauch wird der Begriff der Atherosklerose mit dem Begriff der Arteriosklerose gleichgesetzt. Die Arteriosklerose ist eine Sammelbezeichnung für Arterienerkrankungen und schließt die folgenden drei Erkrankungen ein:

- Atherosklerose, die Erkrankung der Arterienintima
- Mönckeberg-Sklerose, die Kalkablagerung in der Arterienmedia und
- Arteriosklerose mit Wandverdickung und Lumeneinengung kleiner Gefäße (Silbernagl & Lang, 2019).

Bei der Atherosklerose verdickt die Intima durch entzündliche Geschehen am Endothel. Es lagern sich Lipoproteine in der Intima ein. Die Endothelzellen werden aktiviert. Sie exprimieren Adhäsionsmoleküle und Chemokine, welche die Einwanderung von Monozyten zur Folge haben, die sich zu Makrophagen differenzieren. Die Makrophagen phagozytieren Lipoproteine und wandeln sich zu sogenannten Schaumzellen um. Auch die Bindegewebsmatrix verändert sich hierbei. Es werden vermehrt kollagenreiche Fasern gebildet, die die Gefäßwand sklerosieren (Brandes et al., 2019).

Diese Prozesse führen unter anderem auch zu Stenosen in den Gefäßen. Durch die Bildung instabiler Plaques kann es dazu kommen, dass die Plaques rupturieren und Thrombosen bilden, die zu Lungenembolien, Myokardinfarkten und Schlaganfällen führen können und im schlimmsten Fall tödlich enden.

Die Wichtigkeit der atherosklerotischen Prozesse wird klar, wenn wir uns die Ursachen der häufigsten Todesfälle anschauen. Die Atherosklerose führt in der Folge zur Koronaren Herzkrankheit, die die häufigste Todesursache in den Industrienationen darstellt. „In Deutschland sind 14% der Todesfälle durch KHK verursacht.“ (Herold, 2020).

1.2 Entstehung der Atherosklerose

Mit dem folgenden Schaubild wird die Aktivierung und Adhäsion von Monozyten und Makrophagen und der Einfluss von Cytokinen, Oberflächenmarkern und Rezeptoren auf die Entstehung der Atherosklerose verdeutlicht.

Atherosklerose

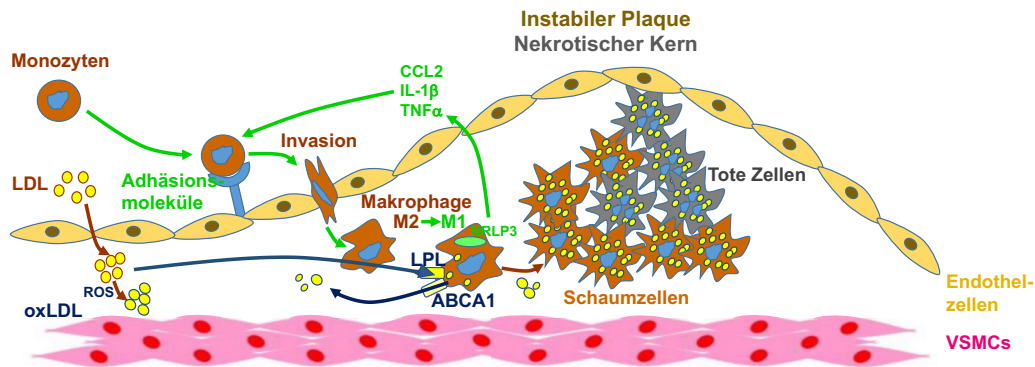


Abbildung 1: Makrophagen zu verschiedenen Zeitpunkten der Atherosklerose (Euler & Parahuleva, 2025)

1.2.1. Aktivierung von Monozyten/Makrophagen in der Atherosklerose

Die Atherosklerose steht im Mittelpunkt unserer Betrachtung. Es gilt vorerst zu klären, wie Monozyten und Makrophagen aktiviert werden und welche weiteren Immunzellen, Cytokine, Oberflächenmarker und Rezeptoren in diesen Prozess involviert sind.

Am Anfang der Atherosklerose steht die Störung des laminaren Blutflusses oder die endotheliale Schädigung der Arterienwand und die damit einhergehende Akkumulation von Low-density Lipoproteinen (LDL) in das Subendothel, wobei es zu einer Verdickung der Intima kommt. Die Low-density Lipoproteine werden modifiziert und lösen mit den dort befindlichen entzündlichen Prozessen eine Immunantwort aus. Diese Immunantwort trägt zur Entstehung der Atherosklerose bei. Die Modifizierung der Low-density Lipoproteine findet im Sinne einer Oxidation statt, die durch reaktive Sauerstoffspezies ausgelöst wird (Fig. 1).

Allen voran gehen diese Prozesse mit der Einwanderung von Monozyten in das Subendothel einher. Während der Schädigung der Endothelschicht werden bestimmte Adhäsionsmoleküle exprimiert, die dafür sorgen, dass Monozyten an die Endothelschicht binden und daran entlang rollen bis sie in das Gewebe migrieren. Zu diesen Adhäsionsmolekülen zählen Selektine, sowie die Moleküle VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule 1) und ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1). An die Selektine binden Monozyten und andere Leukozyten mit ihrem Oberflächenliganden PSGL-1 (P-Selektin-Glykoprotein-Ligand-1). Anschließend binden Monozyten mit den Monozyten-Integrinen über VCAM-1 und ICAM-1 an Endothelzellen (Mestas & Ley, 2008). Eines

der häufigsten Integrine ist das very-late antigen 4 (VLA-4), das auch $\alpha 4\beta 1$ -Integrin genannt wird (Huo & Ley, 2001). Der PSGL-1 bindet neben dem Selektin der Endothelzellen auch an die Chemokinliganden CCL-21 und CCL-19 der $CD4^+$ -T-Zellen und lockt sie auf diesem Weg an (Veerman et al., 2012). Die dadurch aktivierten $CD4^+$ -T-Zellen produzieren unter anderem die Chemokine Interferon γ ($INF\gamma$) und Tumornekrosefaktor α ($TNF\alpha$). Diese Zytokine wirken proinflammatorisch und sorgen dafür, dass die Entzündungsreaktion gefördert wird und dass wiederum weitere Monozyten angelockt werden.

Im Subendothel differenzieren sich die Monozyten unter dem Einfluss von M-CSF (macrophage colony-stimulating factor) zu Makrophagen der Subgruppe M1 und dendritischen Zellen. Die akkumulierten Low-density-Lipoproteine, welche zu oxidierten Low-density Lipoproteinen modifiziert wurden, werden überwiegend über den Scavenger Rezeptor A (SR-A) in die Makrophagen aufgenommen. Weitere Rezeptoren auf Makrophagen, die oxidierte Low-density-Lipoproteine erkennen, sind zum Beispiel CD36, Lectin-like oxidized LDL Rezeptor-1 (LOX-1), Scavenger Rezeptor für Phosphatidylserin und oxidiertes Lipoprotein (SR-PSOX) und der Scavenger Rezeptor Klasse B Typ 1 (SR-B1) (Moriya, 2019). Es kommt zur Akkumulation der oxidierten LDLs in Makrophagen, die anschließend zu Schaumzellen werden. Wenn man den Scavenger Rezeptor A blockiert, reduziert sich die Aufnahme von Lipoproteinen und die Bildung von Schaumzellen (Robbins et al., 2013).

Durch die Bindung von Phospholipiden an CD36 auf Makrophagen bildet sich das Heterodimer TLR4/TLR6 (Stewart et al., 2010). Dadurch werden verschiedene Signalkaskaden in den aktivierten Makrophagen und den daraus entstandenen Schaumzellen in Gang gesetzt, die entzündliche Auswirkungen haben und unter anderem folgende pro-inflammatorische Moleküle umfassen: Myeloid differentiation factor 88 (MyD88), Interleukin-1 (IL-1), Toll-like-Rezeptor domain containing adaptor (TRIF) und zusätzlich $NF-\kappa B$. Die Chemokine Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-3 (IL-3), Interleukin-4 (IL-4), $TNF\alpha$ und $INF\gamma$ stimulieren Endothelzellen, glatte Muskelzellen und Thrombozyten CD40 zu exprimieren. Der CD40-Ligand bindet sodann an das exprimierte CD40, was dazu führt, dass Läsionen weiter fortschreiten und Thromboembolien gefördert werden. Der CD40-Ligand befindet sich auf aktivierten T-Lymphozyten sowie auf aktivierten B-Zellen und Thrombozyten. In einer inflammatorischen Umgebung können auch monozytäre Zellen, natürliche Killerzellen,

Mastzellen und Basophile den CD40-Liganden exprimieren (Elgueta et al., 2009). Zusätzlich werden proinflammatorische Cytokine und Zelladhäsions-Faktoren an Endothelzellen stimuliert.

Des Weiteren wird der Makrophagen-Inflammasom-Signalweg über kristallines Cholesterol aktiviert. Kristallines Cholesterol induziert die Stimulierung des NLRP3-Inflammasoms (Caspase-1-activated nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat pyrin domain containing 3 inflammasome) (Düwell et al., 2010). Das NLRP3-Inflammasom spielt eine wichtige Rolle bei der Bildung des nekrotischen Kerns in fortgeschrittenen Stadien der Atherosklerose.

Neben Monozyten haben glatte Muskelzellen die Eigenschaft, sich in Makrophagen zu trans-differenzieren. Man vermutet, dass diese Trans-Differenzierung über den Krüppel-like Faktor 4 (KLF-4) geschieht. Somit wandern glatte Muskelzellen in den Ort des Geschehens ein, formieren sich zu Makrophagen um und tragen zur Atherosklerose bei. Des Weiteren können Monozyten auch zu M2-Makrophagen differenzieren. Diese bilden einen Gegenpol zu den M1-Makrophagen, indem sie proinflammatorische Prozesse gegenbalancieren, um die Entzündungsreaktion zu modulieren. Sie reinigen apoptotische Zellen, beschleunigen die Angiogenese und fördern die Reparatur des Gewebes (Gordon & Martinez, 2010). Sie wirken damit der Bildung der Atherosklerose entgegen.

1.2.2. Die Entstehung instabiler Plaques

Zu Beginn sind die Plaques von einer fibrösen Abdeckung umschlossen, was sie zu stabilen Plaques macht. Stabile Plaques führen nur selten zu gefährlichen Komplikationen. Sobald die fibröse Abdeckung dünner wird und der nekrotische Kern aus dem Endothel herausbricht, wird der Plaque instabil. Es kann in Folge dessen zu thrombembolischen Ereignissen kommen, bei der die Arterien des Herzens oder des Gehirns in Form eines Herzinfarktes oder eines Schlaganfalls betroffen sein können.

Verschiedene Prozesse können die Ausprägung instabiler Plaques verursachen. Dazu gehört unter anderem die reduzierte Ausschüttung von Transforming growth factor β (TGF β) aus Makrophagen, was zu einer reduzierten Kollagensynthese führt. Über Matrix-Metalloproteasen (vor allem MMP-2 und MMP-9) fördern die Makrophagen in Läsionen das Remodelling der extrazellulären Matrix. Hierbei gehen Proteine der extrazellulären Matrix zugrunde. Das Material, welches dort fehlt, sorgt dafür, dass die fibröse Abdeckung dünner wird. In der frühen Phase der Atherosklerose fördern Matrix

-Metalloproteasen die Migration und Proliferation von glatten Muskelzellen in die Läsionen. In fortgeschrittenen Stadien fördern sie die Zerstörung der Matrix.

Das zweite Merkmal der Instabilität bildet der nekrotische Kern. Der nekrotische Kern ist ein Kennzeichen für die Vulnerabilität einer Plaque und trägt zur Entzündung, Thrombosierung, zum Einbruch des fibrösen Plaquedeckels und zur Plaqueruptur bei. Dadurch wird eine proinflammatorische Umgebungsreaktion gebildet. Signale, die zur Entstehung des nekrotischen Kerns führen, sind der Entzug von Wachstumsfaktoren, oxidativer Stress und die Aktivierung von Todesrezeptoren durch Liganden. INF β fördert die Migration von Makrophagen an den Ort des Geschehens und trägt zur Bildung des nekrotischen Kerns bei. Die Bindung der oxidierten Low-density Lipoprotein an CD36 fördert den TLR2-Signalweg, der dazu führt, dass Makrophagen in die Apoptose gehen. Zusätzlich wandern glatte Muskelzellen aus dem umliegenden Gewebe ein. Die Makrophagen in den Läsionen fördern die Apoptose der glatten Muskelzellen über verschiedene Signalwege wie zum Beispiel dem Fas-L-Weg, über Stickstoffmonoxid (NO) und TNF α .

Ein weiterer Faktor, der zur Bildung des nekrotischen Kerns führt, ist die defekte Efferocytose. Dies bezeichnet den Vorgang, apoptotische Zellen durch Phagozytose aufzunehmen. Sie wird vor allem in späten Stadien der Apoptose beobachtet. Ist die Efferocytose gestört, verbleiben mehr tote Zellen im Plaque und instabilisieren diesen (Schrijvers et al., 2005). Mehrere Dinge führen dazu, dass die Efferocytose scheitert. Als erstes ist ein veränderter Phänotyp der Plaquezellen, zum Beispiel durch die Expression des Oberflächenmarkers CD47, zu nennen, der dazu führt, dass die Efferocyten in den Läsionen die Plaquezellen schlechter erkennen (Kojima et al., 2016). Der zweite Grund einer defekten Efferocytose ist das reduzierte Calreticulin. Calreticulin ist ein bekanntes Signal auf apoptotischen Zellen, das die Efferocytose einleitet. Bei Reduktion dieses Startermoleküls wird die Efferocytose ebenfalls reduziert (Kojima et al., 2014). Zusätzlich kommt noch hinzu, dass oxidierte Low-density Lipoproteine und apoptotische Zellen um die Bindung an Efferocytose-Rezeptoren konkurrieren, was die Efferocytose apoptotischer Zellen erschwert (Gillotte-Taylor et al., 2001). Weiterhin wird die Efferocytose durch oxidativen Stress induzierten Tod der Efferocyten gehemmt (Yvan-Charvet et al., 2010). Die mangelnde Expression und Funktion von Efferocytose-Rezeptoren, sowie deren Brückenmolekülen wie das Molekül MerTK-Gas6, behindern ebenfalls die Efferocytose und tragen somit zur Entstehung vom nekrotischen Kern bei (Cai et al., 2017). In Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass durch die Blockade von

CD47 und durch den Schutz von MerTK auf apoptotischen Zellen die Efferocytose gefördert und dadurch die Atherosklerose reduziert werden konnte (Kojima et al., 2016).

1.3 Synthese und Funktion von microRNAs

Was sind microRNAs? MicroRNAs sind einzelsträngige, kurze (22-25 Nukleotide) Ribonukleinsäuren, die aus nichtkodierenden VorläuferRNAs stammen und mRNA-Strukturen erkennen und deren Translation verhindern können. Somit wirken sie bei der Regulation von posttranskriptionaler Genexpression mit. Durch ihre vielfältigen Angriffspunkte stellen sie ein mögliches Ziel für die Arzneimittelforschungen dar und werden auch in Zusammenhang mit atherosklerotischen Ereignissen gebracht.

Bevor wir klären, wie microRNAs genau wirken, sollten wir uns der Frage widmen, wie sie entstehen. Im Nukleus wird durch die Polymerase II die primäre microRNA (pri-microRNA) durch Transkription produziert. Die Klasse 3 Ribonuklease III Drosha prozessiert die pri-microRNA zu kleinen Precursor-microRNAs (pre-microRNA). Diese wandern anschließend ins Cytoplasma. Im Cytoplasma werden die pre-microRNAs durch Einsatz von Klasse 4 Ribonuklease III Dicer zu microRNAs prozessiert. Die ausgereiften microRNAs sind in der Lage an die 3'UT-Region der mRNA zu binden und so deren Expression zu steuern. Dabei kann eine microRNA viele verschiedene mRNAs regulieren, was die Wirkungsanalyse der microRNAs sehr komplex macht (Fasolo et al., 2019).

Die Funktion der microRNA besteht darin, über Wasserstoffbrückenbindungen an komplementäre Sequenzen der Ziel-mRNA zu binden. Die Bindung führt proteinbasiert zur Deadenylierung und damit zur microRNA-vermittelten Inhibition der Proteinbiosynthese. Neben mRNAs können microRNAs auch an andere RNAs binden und an deren Regulierung mitwirken. Sie binden zum Beispiel an non-coding RNAs und andere microRNAs. Nicht alle ihre Effekte sind auf die Bindung und Unterdrückung von mRNAs zurückzuführen (Schober & Weber, 2016).

1.4 microRNAs und Atherosklerose

MicroRNAs sind Schlüsselregulatoren verschiedener physiologischer und pathophysiologischer Prozesse in kardiovaskulären Ereignissen. Sie werden bei verschiedenen Herzerkrankungen im Herzgewebe oder im Blutkreislauf moduliert, zum Beispiel beim Myokardinfarkt, akutem Herzversagen, bei der hypertrophen

Kardiomyopathie oder der Hypertonie (Wronska et al., 2015). Sie besitzen nicht nur Funktionen innerhalb von Zellen, sondern werden auch von Zellen exportiert oder freigesetzt. Sie sind im Blut bemerkenswert stabil (Goretti et al., 2014) und können zwischen verschiedenen Zelltypen übertragen werden (Das & Halushka, 2015).

Im Vorfeld dieser Versuchsreihe wurden verschiedene Untersuchungen durchgeführt, die das Ziel verfolgten, microRNAs zu identifizieren, die eine Rolle in kardiovaskulären Erkrankungen spielen.

2018 untersuchten Parahuleva et al. Plaques in Koronararterien von 12 Patienten mit fortgeschrittener Atherosklerose, die an einem akuten Koronarsyndrom litten. Als Kontrolle dienten 14 gesunde, nicht-atherosklerotische Proben aus den Arteriae thoracicae internae von Patienten, die sich einer Bypass-Operation unterzogen. Die monozentrische Studie von 2018 konnte microRNAs anhand von RT-PCR nachweisen, die signifikant unterschiedlich in Koronararterienplaques bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom waren im Vergleich zu Proben aus den inneren Brustkorbarterien von Bypass-Patienten. Dabei waren die microRNAs miR-21, miR-92a und miR-99a signifikant erhöht. Eine Erniedrigung verzeichnete man für die microRNAs miR-1, miR-22 und let-7f. Die microRNAs miR-9, miR-19b, miR-29b, miR-143 und miR-223 zeigten keine Veränderung zwischen den untersuchten Gruppen (Parahuleva et al., 2018).

In einer weiteren Pilotstudie im Jahr 2017 (Parahuleva et al.) wurde Blut von Patienten mit akutem ST-Hebungsinfarkt abgenommen und auf potentielle microRNAs als Biomarker in zirkulierenden Monozyten untersucht. Myokardinfarkte sind die Folge einer Ruptur atherosklerotischer Plaques, wobei der Entzündungsreaktion möglicherweise eine Schlüsselrolle zukommt. Der Anstieg von Monozyten im Blut stellt einen erweiterten Pool an Entzündungszellen bereit, die in wachsende arterielle Plaques eindringen können. Die Monozyten lösen dort eine Entzündungsreaktion aus und liefern mit den klassischen M1-Makrophagen, zu denen sie werden, proteolytische Enzyme, die die extrazelluläre Matrix verdauen und so möglicherweise zur Instabilität der Plaques beitragen. In der Studie von Parahuleva et al. (2017) sollte die Hypothese getestet werden, ob während und kurz nach einem Myokardinfarkt die microRNA-Profile menschlicher Monozyten im Vollblut verändert sind. Es zeigte sich, dass die Konzentration von miR-143 bei einem akuten Infarkt erhöht war im Vergleich zu Blutproben von gesunden Probanden. MiR-143 war positiv mit dem Entzündungsmarker CrP korreliert, jedoch nicht mit dem kardialen Zelluntergangsmarker Troponin T. Die microRNA-Konzentrationen von miR-1, miR-92a, miR-99a und miR-223 waren im Vergleich zur

Kontrollgruppe erniedrigt. Im Verlauf von 3 Monaten normalisierten sich die Werte von miR-1 und miR-223 und erreichten den Ausgangszustand. Auch miR-92a und miR-99a normalisierten sich im Verlauf, lagen jedoch etwas niedriger als in der Kontrollgruppe (Parahuleva et al., 2017).

In einer Studie von 2010 wurden Intimaproben und Blutseren von Patienten mit nachgewiesener Atherosklerose auf das Vorhandensein verschiedener microRNAs geprüft. Die miR-21 Konzentration in atherosklerotischen Plaques war signifikant erhöht im Vergleich zu Kontrollproben von gesunden Patienten (Li et al., 2011). In einer anderen Studie konnte gezeigt werden, dass die Konzentration von miR-92a im Blutplasma von Patienten mit einer koronaren Herzkrankheit im Vergleich zu gesunden Patienten erniedrigt war (Economou et al., 2015).

Diese Studien zeigten eine Korrelation veränderter miR-Expressionen mit dem Auftreten atherosklerotischer Ereignisse. Ob diese miRs funktionell an der Atheroskleroseentstehung beteiligt sind, blieb jedoch unklar. Da ein wesentlicher Schritt in der Atherosklerose die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen ist, sollte nun in meiner Arbeit untersucht werden, ob die von Parahuleva et al. (2017, 2018) detektierten miRs (let-7f, miR-1, miR-21, miR-22, miR-92a, miR-99a, miR-143 und miR-223) Einfluss auf die Makrophagendifferenzierung nehmen.

1.5 THP-1 Zellen und ihre Bedeutung für Untersuchungen von atherosklerotischen Prozessen

Die THP-1 Zelllinie wird weltweit als das häufigste in vitro Model zur Erforschung von Entzündungsprozessen in humanen Makrophagen genutzt (Park et al., 2007). Die Zellen stammen aus monozytären Leukämiezellvorstufen ab und lassen sich vergleichsweise unkompliziert unter Kulturbedingungen differenzieren. Dabei führt eine Stimulation mit zum Beispiel PMA (Phorbol-12-myristat-13-acetat) oder M-CSF (macrophage colony-stimulating factor) zur Differenzierung dieser Monozyten zu Makrophagen, was sie zu guten Forschungsobjekten macht. Sie sind homogen und verfügen über eine hohe Plastizität (Aldo et al., 2013).

Unter dem Einfluss von PMA differenzieren sich THP-1 Zellen zu reifen M0-Makrophagen. Das Vorhandensein verschiedener Cytokine entscheidet dann, ob sich die M0 Makrophagen zu M1- oder M2-Makrophagen polarisieren lassen. Bekannt ist, dass

die Cytokine $\text{INF}\gamma$ und LPS, die von Th1-Zellen sezerniert werden, die Polarisation zu M1-Makrophagen begünstigen. Angelehnt an die Namensgebung von Th1- und Th2-Zellen werden die Makrophagen M1 und M2 genannt. M1-Makrophagen, auch bekannt als klassisch aktivierte Makrophagen, sind in der Abwehr von Krankheitserregern und in der Tumorregression involviert. Sie produzieren ihrerseits proinflammatorische Cytokine wie $\text{TNF } \alpha$, IL-1 β , IL-6, IL-8 und IL-12 und exprimieren auf ihrer Oberfläche Pattern Recognition Rezeptoren (PRR) wie den Toll-like Rezeptor (TLR). M2-Makrophagen hingegen entstehen bei Exposition gegenüber der Cytokine der Th2-Zellen wie zum Beispiel IL-4 oder IL-13. M2-Makrophagen werden auch alternativ aktivierte Makrophagen genannt. Im Gegensatz zu M1-Makrophagen wirken M2-Makrophagen eher anti-inflammatorisch. Sie finden sich bei parasitären Infektionen, bei Gewebemodellierungen, bei der Immunregulation, bei allergischen Reaktionen und bei der Tumorprogression (Chanput et al., 2013). Sie können aber auch bei der Atherosklerose auftreten und hier zur Plaquerückbildung beitragen.

Auf der Zelloberfläche von Monozyten und Makrophagen befindet sich der Oberflächenmarker CD14, der über einen GPI-Anker an die Zellen gebunden ist. Eine Zunahme des Oberflächenmarkers CD14 spricht für die Differenzierung zu Makrophagen. Die Abnahme der CD14-Konzentration auf von Monozyten abstammenden Zellen ist mit einem Phänotyp von dendritischen Zellen assoziiert. CD14 ist ein Oberflächenmarker, der LPS (Lipopolysaccharid) auf gramnegativen Bakterien erkennt und die LPS-Monomere von LBP (Lipopolysaccharid bindendes Protein) auf den TLR4/MD-2 Komplex überträgt (Ciesielska et al., 2022). Damit trägt auch das auf den Makrophagen befindliche CD14 zur proinflammatorischen Umgebung bei.

Alle diese Differenzierungsprozesse von Monozyten in Makrophagen können in THP-1 Zellen nachvollzogen werden. Deshalb sollten THP-1 Zellen als Grundlage unserer Experimente zur Atherosklerose verwendet werden. Unter dem Einfluss von PMA differenzierten sich die THP-1 Zellen zu M0-Makrophagen. In unseren Untersuchungen nutzen wir den Anstieg der CD14-Expression als Nachweis, dass die Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen erfolgreich war.

1.6 Ziel dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es zu zeigen, dass unter atherosklerotischen Bedingungen microRNAs bei der Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen eine Rolle spielen.

Die microRNAs, die in vorangegangenen Studien in atherosklerotischen Plaques oder in zirkulierenden Monozyten von Infarktpatienten gefunden wurden, werden in dieser Studie auf ihre Expression während der Monozyten-Makrophagen-Differenzierung von THP-1 Zellen untersucht. Damit kann gezeigt werden, welche microRNAs stärker exprimiert sind und welche während der Differenzierung inhibiert werden. Die Experimente wurden um gain-of-function und loss-of-function-Versuche der identifizierten miRs erweitert, um zu entscheiden, ob die differentiell exprimierten microRNAs Einfluss auf die Makrophagendifferenzierung haben.

2 Material und Methoden

2.1 Zellkultur

2.1.1 Basale Kultur von THP-1 Zellen

1 x PBS	10 x PBS, Eigenherstellung Physiologie Gießen
Absauger	Integra Biosciences, Biebertal
Brutschrank	Heraeus, Hanau
Bunsenbrenner	Integra Biosciences, Biebertal
Eis	Eismaschine Physiologie Gießen
FCS	Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Medium	RPMI 1640 Lonza, Belgien
Mikroskop	TMS-F, Japan
Penicillin-Streptomycin	Lonza, Belgien
Pipetten	Eppendorf Reference, Wesseling-Berzdorf
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
PMA	Invivogen, Frankreich
Sicherheitswerkbank	Heraeus, Hanau
THP-1 Zellen	DMSZ, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkultur GmbH, Braunschweig
Vortexer	MS2 Minishaker Ika, Staufen
Wasserbad	GFL, Lauda-Königshofen
Zählkammer	Neubauer Superior Marienfeld, Lauda-Königshofen
Zellkulturflaschen	TC-Flasche T75 Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturschalen	Falcon Thermo Fisher Scientific, Dreieich
Zellschaber	Falcon Thermo Fisher, Dreieich
Zentrifuge	Allegra 25 R Centrifuge Beckman Coulter, Krefeld Allegra 6 Centrifuge Beckman Coulter, Krefeld Microfuge 18 Centrifuge Beckman Coulter, Krefeld

Die Experimente wurden an THP-1-Zellen durchgeführt. THP-1-Zellen sind humane Monozyten, die aus dem peripheren Blut eines Patienten mit akuter monozytischer Leukämie vom Subtyp M5 stammen.

Sie wurden von der DMSZ tiefgefroren geliefert und vor Gebrauch von uns in RPMI 1640 mit 20% FCS und mit 5ml/5000ml Penicillin-Streptomycin kultiviert. Dabei wurden

die Zellen mit $0,5 \times 10^6$ Zellen pro ml in 30 ml angesetztem RPMI 1640-Medium ausplattiert. Dies geschah in T75-Kulturflaschen.

Pro Bedingung wurden für die Versuche 4 Schalen mit je 1×10^6 Zellen benötigt. Das Weiterpassagieren der Zellen erfolgte mit $0,5 \times 10^6$ Zellen pro ml in Kulturflaschen mit 30 ml Medium.

2.1.2 Stimulation mit PMA zu Makrophagen – Differenzierung

Die Differenzierung der Monozyten geschah mittels Phorbol-12-myristate-13-acetat (PMA). PMA ist ein Phorbolster, der bestimmte Zellen zur Zelldifferenzierung stimuliert. Um die genaue Dosis von PMA zu ermitteln, bei der eine Differenzierung der Monozyten zu M0-Makrophagen erfolgt, wurden 3 verschiedene Konzentrationen an PMA untersucht: 5 ng/ml, 25 ng/ml und 100 ng/ml.

Dafür wurden Zellschalen angesetzt, welche die Bedingungen des Experiments widerspiegeln. Die erste Bedingung war die Inkubation der Zellen, die mit 5 ng/ml PMA stimuliert wurden, die weiteren Zellen wurden mit 25 ng/ml PMA oder mit 100 ng/ml PMA stimuliert. Diese Bedingungen wurden um die Inkubationszeiten erweitert. Somit gab es Zellen, die mit 5 ng/ml PMA stimuliert waren und 24 Stunden, 48 Stunden und 72 Stunden inkubiert wurden, neben denen, die mit 25 ng/ml PMA stimuliert wurden und ebenfalls 24, 48 und 72 Stunden Inkubation erfuhren, sowie diejenigen Zellen, die mit 100 ng/ml PMA stimuliert und für die oben genannten Zeiten inkubiert wurden. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank mit 5%igem CO₂-Gehalt bei 37° Celsius. Als Negativkontrollen fungierten die Zellen, die keine Stimulation mit PMA erfuhren und ebenfalls 24, 48 und 72 Stunden inkubiert wurden.

Zur Beurteilung der Adhärenz wurden die Zellen einmalig nach abgelaufener Inkubationszeit und nach 2-maligem Waschen mit 3 ml RPMI 1640-Medium unter dem Mikroskop beurteilt, gezählt, abfotografiert und gespeichert. Zusätzlich wurden die Zellen aus dem Überstand vor der ersten Waschung gezählt.

Für die weiteren Versuche wurden die Zellen mit 5 ng/ml für 24, 48 und 72 Stunden stimuliert. Als Kontrolle wurden Zellen genommen, die keine PMA-Stimulation erfahren. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit 1 x PBS geerntet und bei -80°C bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt.

2.1.3 Transfektion der Zellen mit AgomiRen/AntagomiRen

hsa-let-7f-5p Mimic	UGAGGUAGUAGAUUGUAUAGUU
hsa-miR-1-3p Inhibitor	ACATACTTCTTTACATTCCA
hsa-miR-143-3p Inhibitor	GAGCTACAGTGCTTCATCTC
hsa-miR-22-5p Inhibitor	AAGCTTGCCACTGAAGAAC
hsa-miR-92a-3p-Mimic	UAUUGCACUUGUCCCGGCCUGU
Inhibitor Negativkontrolle	TAACACGTCTATACGCCCA
miRMimic Negativkontrolle	UCACCGGGUGUAAAUCAGCUUG
Lipofectamine	Invitrogen Thermo Fisher, Dreieich
Opti-MEM	Life Technologies, GB

Im nächsten Schritt widmen wir uns den Experimenten, die die Wirkung der Inhibierung und Stimulation der microRNA-Expression näher untersuchen.

Der Versuchsaufbau ist ähnlich den Vorversuchen, nur dass hier der Schritt der Transfektion vor der PMA-Stimulation erfolgt. Um zu prüfen, ob die THP-1-Zellen das Lipofectamine und das Transfektionsmedium vertragen, wurden die Zellen für 8 und 24 Stunden inkubiert. Dafür setzten wir 3 Schalen an. In der ersten Schale befanden sich THP-1-Zellen, welche mit Lipofectamine und Opti-MEM behandelt wurden. In der zweiten Schale wurden die Zellen ausschließlich in Opti-MEM aufgenommen. In der dritten Schale wurden die THP-1-Zellen in gewöhnliches RPMI 1640 Medium aufgenommen. Diese Schale diente als Kontrolle. Nach 8 und 24 Stunden wurden die Zellen unter dem Mikroskop beurteilt und gezählt. Auch nach 24 Stunden sahen die in Lipofectamine und Opti-MEM inkubierten Zellen lebendig aus, sodass die 24-stündige Inkubation der Zellen in Transfektionsmedium unbedenklich ist.

Die Frage, in wie weit eine Transfektion die microRNA- und CD14-Expression beeinflusst, führt uns anhand von drei Kontrollen zur Beantwortung dieser Frage. Die ersten Kontrollzellen wurden weder transfiziert noch mit PMA stimuliert. Die zweiten Kontrollzellen wurden nicht transfiziert, jedoch mit PMA stimuliert. Die 3. Kontrollzellen wurden transfiziert, jedoch nicht mit PMA stimuliert, sodass ein Vergleich dieser drei Kontrollgruppen erfolgen konnte.

Die Transfektion der THP-1-Zellen wird mit dem jeweiligen Anta- oder AgomiR, mit Lipofectamine und dem Serum-freien Medium Opti-MEM vollzogen. Die Kontrollzellen erhielten nur Lipofectamine und Serum-freies Medium Opti-MEM .

Um die Zellen in 15 ml Volumen aufzunehmen, setzten wir im ersten Schritt 30 µl Lipofectamine mit 1,5 ml Opti-MEM an und ließen diesen Ansatz für 5 Minuten stehen. Zeitgleich setzten wir 10 µl AntagomiR bzw. AgomiR mit 1,5 ml Opti-MEM an und ließen auch diesen Ansatz nach guter Homogenisierung 5 Minuten ruhen. Anschließend wurden beide Ansätze mit 12 ml Opti-MEM zusammengeführt, homogenisiert und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Die THP-1-Zellen wurden nach Zentrifugation in das wie oben beschrieben angesetzte Transfektionsmedium aufgenommen und in einer Zellkulturflasche für 24 Stunden bei 37°C im CO₂-Brutschrank (5 % CO₂) transfiziert.

Nach der Transfektion erfolgte die Stimulation mit PMA nach bekanntem Schema. Die THP-1-Zellen wurden zentrifugiert. Das Opti-MEM wurde verworfen und die Zellen in RPMI 1640 aufgenommen, in 60-mm-Schalen auf 3 ml RPMI 1640 ausplattiert und mit 5 ng/ml PMA für 24, 48 und 72 Stunden stimuliert. Die Kontrollzellen erfuhren keine PMA-Stimulation. Weitere Kontrollzellen erfuhren eine PMA-Stimulation ohne transfiziert worden zu sein.

Nach der PMA-Stimulation wurden die THP-1-Zellen mit 1 x PBS geerntet und bis zur RNA-Isolation bei -80°C aufbewahrt. Anschließend erfolgte die RNA-Isolation mit TRIzol-Reagenz und die RNA-Quantifizierung am NanoDrop-Gerät. Die microRNA sowie die mRNA wurden in cDNA umgeschrieben. Die Umschreibung der mRNA in cDNA erfolgte zur Bestimmung der CD14-Expression in der PCR. Die microRNA-Umschreibung wurde für die Expression der microRNA miR-92a, let-7f, miR-1, miR-22 und miR-143 mittels PCR verwendet.

In einem weiteren Versuch wurden alle AntagomiRe und AgomiRe in einem Transfektionsansatz zu den THP-1-Zellen gegeben und die microRNA-Expression unter dieser Bedingung geprüft.

2.2 PCR

2.2.1 RNA-Isolation

Abzug	WRT Hemling Abzug Labexchange, Burladingen
Heizblock	Techne AG, Burkhardsdorf
peqGOLD Trifast	Qiagen, Hilden
RNA-Quantifizierung	Nanodrop ND-1000 PEQLAB, Erlangen
RNase Destroyer Spray	Thermo Fisher, Dreieich

Es erfolgte die RNA-Isolation der geernteten Zellen mit dem peqGOLD Trifast-Reagenz der Firma Qiagen unter dem Abzug. Es wurden 500 µl Trifast auf die Zellen gegeben, womit das Pellet unter Benutzung des Vortexers aufgelöst wird. Anschließend wurden 100 µl Chloroform zugegeben und kräftig per Hand geschüttelt für 15 Sekunden. Die Zellen wurden für 2 -3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, ehe sie bei 4 °C und 12000 U für 15 Minuten zentrifugiert wurden. Nach der Zentrifugation wurde die obere Phase in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Es wurden 280 µl Isopropanol dazu gegeben und für mindestens 30 Minuten bei -20 °C inkubiert. Es erfolgte eine weitere Zentrifugation bei 4 °C und 12000 U für 15 Minuten. Der Überstand wurde gesondert in einen dafür vorgesehenen Behälter unter dem Abzug gekippt. Es wurden 500 µl 70%iges Ethanol auf das Sediment gegeben und zur Homogenisierung gevortext. Die 3. Zentrifugation erfolgte nach oben genannter Vorgehensweise. Der Überstand wurde abgekippt, die Eppendorf-Reaktionsgefäße sorgfältig ausgeklopft und in den Heizblock bei 37°C zum Trocknen gestellt. Es wurden 10 µl RNase freies Wasser auf die getrockneten Proben gegeben und homogenisiert. Anschließend wurde die RNA-Quantifizierung am Nanodrop-Gerät der Firma Thermo Fisher bei einer Wellenlänge von 260 nm durchgeführt.

Mit der Quantifizierung der RNA haben wir ein Tool, welches uns ermöglicht zu beweisen, dass RNA in der Probe enthalten ist und darüber hinausgehend die Möglichkeit, der Vergleichbarkeit von Proben durch den Einsatz gleicher Mengen RNA in den weiteren Untersuchungen. Bei Überschreitung der Grenze von 2000 ng/µl wurden die Proben mit Aqua dest. verdünnt und erneut auf die RNA-Menge überprüft. Die eingesetzte RNA-Menge belief sich auf 1 µg pro Probe.

2.2.2 Geräte und verwendete Primer

PCR-Gerät	CFX Maestro Bio-Rad, München
SYBR-Green	Fluorescein Mix Thermo Fisher, Dreieich
Thermocycler	Techne Cyclogene Scientific Support, USA
Umschreibe-Kits	MystiCq microRNA cDNA Synthesis Mix Sigma-Aldrich, Taufkirchen
	QuantiTect Reverse Transkription Kit Qiagen, Hilden
Universal-Primer	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

2.2.3 Verwendete Primer und ihre Sequenzen

CD14 (F)	CTGGAACAGGTGCCTAAAGGAC
CD14 (R)	GTCCAGTGTCAGGTTATCCACC
hppt (F)	CATTATGCTGAGGATTTGGAAAGG
hppt (R)	CTTGAGCACACAGAGGGCTACA
Aktin (F)	TCCCTGGAGAAGAGCTACG
Aktin (R)	GTAGTTTCGTGGATGCCACA
SNORD44	CCUGGAUGAUGAUAAGCAAAUGCUGACUGAACAUAGAAGGU CUUAAUUAGCUCUAACUGACU
has let-7f-5p	UGAGGUAGUAGAUUGUAUAGUU
hsa-miR-1	ACAUACUUCUUUAUAUGCCCAU
hsa-miR-21-5p	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA
hsa-miR-22-5p	AGUUCUUCAGUGGCAAGCUUUA
hsa-miR-92a-3p	UAUUGCACUUGUCCCGGCCUGU
hsa-miR-99a-5p	AACCCGUAGAUCCGAUCUUGUG
hsa-miR-143-3p	UGAGAUGAAGCACUGUAGCUC
hsa-miR-223-3p	UGUCAGUUUGUCAAAUACCCCA
Universalprimer	Betriebsgeheimnis der Firma Merck / Sigma Aldrich

2.2.4 Umschreiben von mRNA in cDNA

Für die PCR wird mRNA und microRNA in cDNA umgeschrieben. Für die reverse Transkription der mRNA benutzen wir das QuantiTect Reverse-Transkriptions-Kit der Firma Qiagen.

Für den ersten Schritt der reversen Transkription wird 1 µg RNA-Probe eingesetzt und je nach quantifizierter Menge mit Aqua dest. auf 12 µl aufgefüllt. Anschließend fügt man 2 µl gDNA Wipeout Buffer hinzu und inkubiert die Proben bei 42°C für 5 Minuten im Thermocycler. In dieser Zeit setzt man einen Mix aus 1 µl Reverse Transkriptase, 4 µl RT Buffer und 1 µl RT Primer Mix an und homogenisiert diesen Mix anschließend. Zu jeder Probe werden 6 µl Mix hinzugegeben und für 15 Minuten bei 42°C und für 3 Minuten bei 95°C inkubiert. Die angesetzte cDNA von 20 µl kann mit 180 µl Wasser 1:10 verdünnt für die PCR eingesetzt werden.

2.2.5 CD14-PCR

Anschließend erfolgt die PCR mit den forward und reverse Primern CD14, sowie den forward und reverse Primern der Housekeepinggene Aktin und hppt. Die Annealingtemperaturen von CD14, Aktin und hppt sind:

CD14	57°C
Aktin	60°C
hppt	60°C

Es wird ein Mastermix angesetzt, der pro Ansatz aus 10 µl SYBR-Green, jeweils 0,6 µl des forward und reverse Primers und aus 6,8 µl Aqua dest. besteht. Da die Proben in doppeltem Ansatz pipettiert werden, multipliziert man die Mengen mit der Probenanzahl und dem Faktor 2 und setzt so den Mastermix an. Aus diesem Mastermix entnimmt man 18 µl und pipettiert sie zu 2 µl Probe.

Die PCR wird zu Beginn bei 95°C für 5 Minuten aktiviert. Es folgen 40 Zyklen aus Denaturierung bei 95°C für 5 Sekunden, dem Annealing für 15 Sekunden bei der jeweiligen Annealingtemperatur des Primers und der Elongation für 15 Sekunden bei 70°C.

2.2.6 Umschreiben von microRNA in cDNA

Für das Umschreiben der microRNA in cDNA wurde das MystiCq microRNA cDNA Synthesis Mix-Kit der Firma Sigma-Aldrich benutzt. Das Umschreiben der miRNA erfolgte in zwei Schritten. Da die miRNA für die Umschreibung in cDNA einen Poly-A-Cap besitzen muss, wurde die Polyadenylierung mit der Poly-A-Polymerase als erstes durchgeführt. Auch hier benutzten wir wieder 1 µg RNA-Probe, das mit Aqua dest. auf 7 µl aufgefüllt wurde. Anschließend wurden zu jeder Probe 2 µl Poly (A) Tailing Buffer und 1 µl Poly (A) Polymerase hinzugegeben. Die daraus resultierenden 10 µl wurden für 60 Minuten bei 37°C und für 5 Minuten bei 70°C inkubiert. Im zweiten Schritt folgte die eigentliche cDNA Synthese. Zu der 10 µl polyadenylierten Probe wurden je 9 µl MystiCq microRNA cDNA Reaction Mix und 1 µl ReadyScript Reverse Transcriptase zugesetzt. Nach vorsichtigem Vortexen erfolgte die Inkubation für 20 Minuten bei 42°C und für 5 Minuten bei 85°C.

2.2.7 Primeroptimierung

Die Stellschrauben, an denen wir drehen können, um eine Primeroptimierung zu erlangen, sind in erster Linie die Annealingtemperatur und die Primerkonzentration. Weiterhin könnte man die Amplifikatlänge und die homologen Regionen verändern, um die Effizienz der PCR zu verbessern.

Die Effizienz eines Laufes sollte um die 100 % betragen, wobei ein Bereich von 90 % bis 110 % toleriert wird. Die eingesetzten Primer wurden systematisch auf die Effizienz geprüft mit einer logarithmischen Verdünnung von 100 %, 10 %, 1 % und 0,1 %. Am Ende eines jeden Laufes, der die Effizienz von 90 – 110 % erlangte, wurden die Proben zur Überprüfung in den Kühlschrank gestellt und schließlich in einer Gelelektrophorese nach Länge aufgetrennt.

Wir wollten folgende microRNA-Expressionen untersuchen: let-7f, miR-1, miR-21, miR-22, miR92a, miR-99a, miR-143 und miR-223. Als Housekeepinggen für die microRNA kam SNORD44 zum Einsatz. Zur Primeroptimierung verwendeten wir die PMA-stimulierten Proben, die 72 Stunden mit PMA inkubiert wurden, poolten sie und setzten eine logarithmische Verdünnungsreihe an:

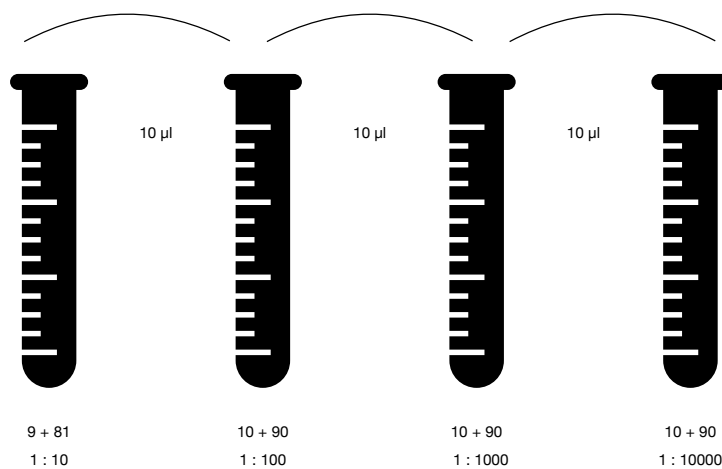


Abbildung 2: Proben für die Primeroptimierung

Die Zusammensetzung des Mastermixes für die Primeroptimierung wurde getestet. Zu Beginn wurde folgendes Pipettierschema befolgt:

Ansatz 1:

- 10 µl SYBR Green
- 0,4 µl Assay Primer
- 0,4 µl Universal Primer
- 7,2 µl Nuklease-freies Aqua dest. und

2 μ l cDNA-Probe.

Wir verwendeten zusätzlich statt 0,4 μ l die Menge 0,3 μ l an Assay- und Universalprimern, welches Ansatz 2 darstellt:

Ansatz 2:

10 μ l SYBR-Green

0,3 μ l Assay Primer

0,3 μ l Universal Primer

7,4 μ l Nuklease-freies A. dest. und

2 μ l Probe.

Wir starteten die Läufe bei 60°C. Die Effizienz dieses Ansatzes für den jeweiligen Primer wurde bestimmt und bei Optimierungsbedarf wurde die Menge des Primers und die Annealing-Temperatur des PCR-Laufes variiert. Nach mehreren PCR-Läufen konnte für jeden Primer eine optimale Annealing-Temperatur mit individueller Mastermix-Zusammensetzung identifiziert werden.

Für die Primer SNORD44, let-7f, miR-1, miR-21 und miR-143 wählten wir Ansatz 1 des Mastermixes, wobei 60°C für miR-1 und miR-21 gewählt wurden, 56°C für SNORD44 und let-7f optimal sind und 58°C das Temperaturoptimum für miR-143 darstellt.

Ansatz 2 wurde für die Primer miR22, miR-92a, miR99a und miR-223 angewendet mit den Optimaltemperaturen von 58°C für miR-22 und miR-92a, sowie 61°C für miR-99a und 60,5°C für miR-223.

Zusammenfassend arbeiteten wir unter folgenden Bedingungen:

Ansatz 1: für

SNORD44 56 ° C

let-7f 56 ° C

miR-1 60 ° C

miR-21 60 ° C

miR-143 58 ° C

Ansatz 2: für

miR-22 58 ° C

miR-92a 58 ° C

miR-99a 61 ° C

miR-223 60,5 ° C.

Um das Vorhandensein der PCR-Produkte zu prüfen, wurden nach jedem Testlauf diejenigen Proben aufbewahrt, die die Effizienz von ca. 100% erreichten, und eine Gel-

Elektrophorese mit diesen Proben durchgeführt. Dafür nimmt man 20 ml des fertigen 50 x TAE und füllt es mit Aqua dest. auf 1000 ml auf. Zunächst gibt man 2 g Agarose-Pulver in einen Erlenmeyerkolben und füllt es auf 100 ml mit 1 x TAE auf. Dieses Gemisch wird in der Mikrowelle erwärmt bis es durchsichtig ist. Anschließend gibt man 5 ml DNA-Bindemedium („Gel-Red“) hinzu und gießt die entstandene Masse auf eine mit einem Kamm besetzte Kammer. Es folgt die Inkubation für 30 Minuten im Dunkeln. Das Gel wird anschließend in die vorgesehene Halterung eingesetzt. Die Proben werden mit jeweils 2 µl Dye, einer Färbelösung angefärbt. In die erste Kammer wird 5 µl DNA-Leiter als Marker gegeben. Die restlichen Kammern werden jeweils mit 20 µl Probe befüllt. Der Gelelektrophoreselauf findet bei 90 mA für ca. 45 Minuten statt. Bei Bedarf kann diese Zeit um ca. 15 Minuten erweitert werden. Die Auswertung findet im Gelanalysegerät statt, welches ein Foto des Gels schießt, das im Folgenden zu sehen ist. Die Agarosegelelektrophorese zeigt das Vorhandensein von gleich langen Amplifikationsprodukten an.

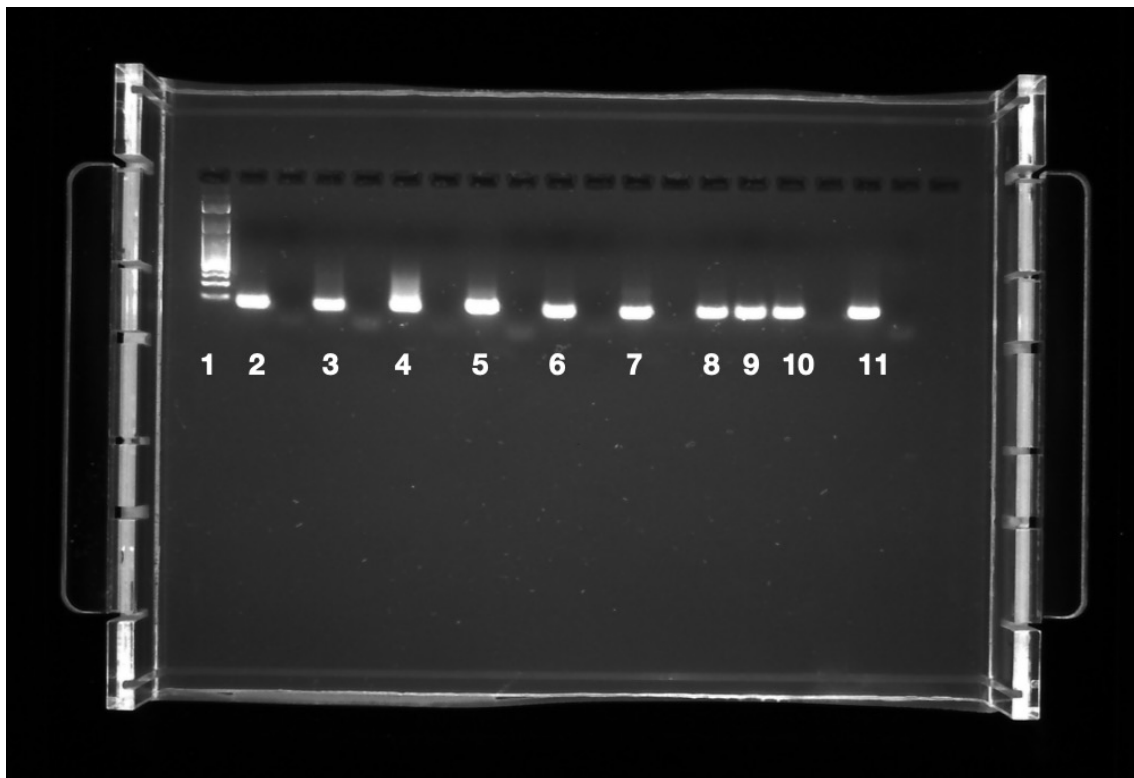


Abbildung 3: Gelelektrophorese der optimierten PCR-Amplifikate

1) DNA-Leiter (Marker), 2) miR-21, 3) miR-143, 4) let-7f, 5) SNORD44, 6) miR-99a, 7) miR-22, 8) miR-92a, 9) miR-223, 10) miR-1, 11) andere Probe

2.2.8 PCR der MicroRNAs

Nach der Optimierung der Standardkurven wurden die von microRNA auf cDNA umgeschriebenen Proben anhand der PCR auf die Expression der oben erwähnten microRNAs geprüft.

Der Mastermix der microRNAs richtet sich nach der zu untersuchenden microRNA. Man pipettiert pro Ansatz 10 µl SYBR-Green und 0,3 µl oder 0,4 µl Universal- und Assayprimer sowie Aqua dest. von 7,4 µl oder 7,2 µl Menge. Dieser Ansatz wird mit der Probenanzahl und dem Faktor 2 multipliziert und kann dann nach Homogenisierung direkt für die PCR genutzt werden. Es werden zu 2 µl Probe 18 µl Mastermix hinzugegeben.

2.3 Statistik

Die Ergebnisse der PCR wurden mit Excel-Tabellen erfasst und zusammengefasst. Die verwendeten Programme für die statistische Analyse sind Microsoft Excel und SPSS. Messwerte, die im Boxplot nicht in die homogene Gruppe fielen, wurden von der anschließenden Statistik ausgeschlossen. Es wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen zweier Gruppen bestimmt. Zum Vergleich zwischen Test- und Kontrollzellen wurde der T-Test angewandt. Als Signifikanzschwelle wird wie üblich $p < 0,05$ festgelegt.

3 Ergebnisse

Das Ziel dieser Arbeit war es herauszufinden, welche microRNAs in der Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen eine Rolle spielen. Eingesetzt wurde eine menschliche Monozyten-Zelllinie, die unter Verwendung von Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) zu Makrophagen differenziert wurde. Im Anschluss daran wurden Experimente durchgeführt, die die Expression der in vorangehenden Studien gefundenen microRNAs näher beleuchteten.

3.1 Differenzierung von THP-1 Monozyten zu M0-Makrophagen

Zur Stimulation der Zellen wird PMA verwendet. Wir untersuchten die Zellzahl und Morphologie unter den Bedingungen, dass wir 5 ng/ml, 25 ng/ml und 100 ng/ml PMA verwendeten. Da die Ergebnisse bei Benutzung von 5 ng/ml sowie 25 ng/ml und 100 ng/ml ähnlich sind, erfolgten die weiteren Stimulationen mit der Konzentration von 5 ng/ml für die Zeiten 24, 48 und 72 Stunden.

Um anfangs festzustellen, ob die THP-1 Zellen nach Stimulation mit 5 ng/ml PMA ihre morphologische Erscheinungsform veränderten, wurden sie unter dem Mikroskop begutachtet. Die noch nativen Monozyten sehen rundlich und in der Gesamtschau homogen aus (Abb. 4). Sie verteilen sich diffus im Medium und besitzen einen großen prominenten Zellkern. Im Gegensatz dazu adhärieren Makrophagen an der Zellkulturschale und man erkennt sie an ihren Ausläufern und der polymorphen Erscheinungsform (Abb. 5).

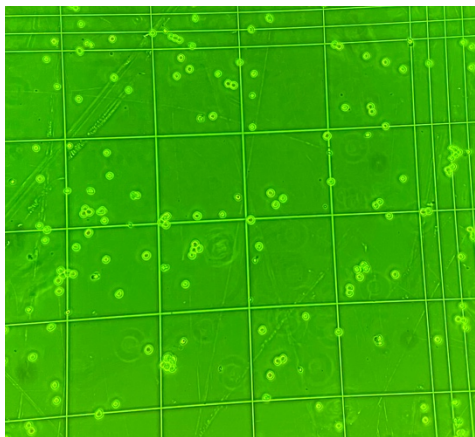


Abbildung 4: THP-1 Zellen vor PMA-Stimulation

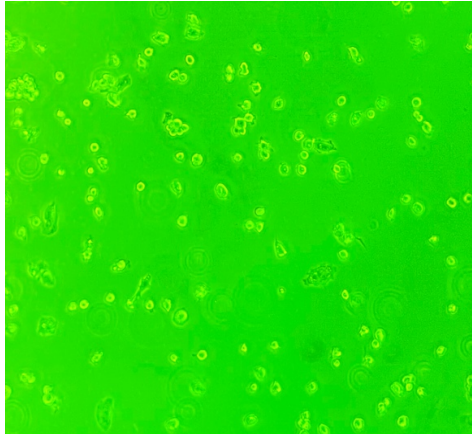


Abbildung 5: THP-1 Zellen nach 3-tägiger PMA-Stimulation (5 ng/ml PMA)

Um dieses Ergebnis zu verifizieren, führten wir anschließend PCR-Tests durch, anhand derer wir die Differenzierung von Monozyten zu M0-Makrophagen mittels der Expression des Oberflächenantigens CD14 bestätigen konnten.

Die mit PMA stimulierten Zellen wurden mit Zellen verglichen, die keine PMA-Stimulation erfuhren.

Das folgende Diagramm zeigt, dass die CD14-Expression drei Tage nach PMA-Stimulation signifikant erhöht ist ($n=4$, $p<0,05$ vs. unstimulierter Kontrolle).

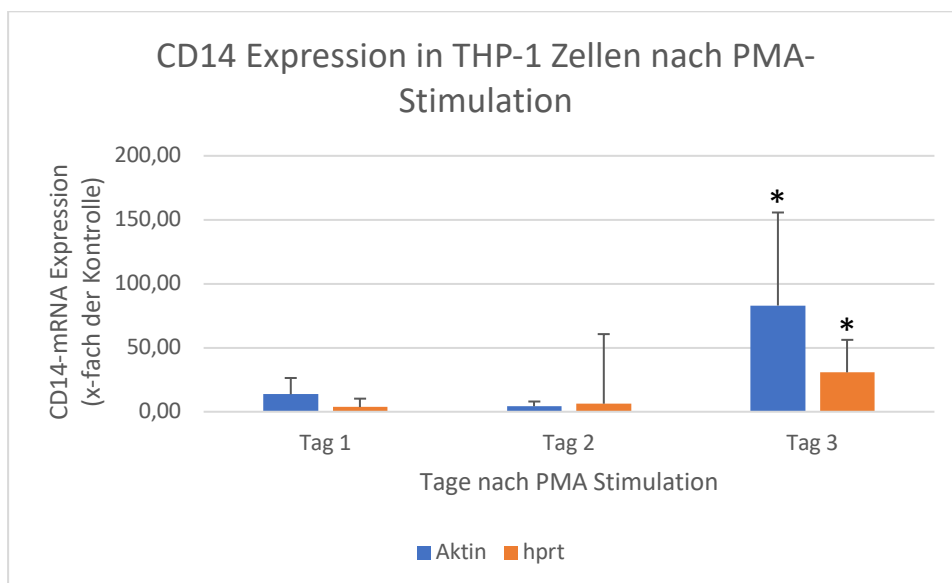


Abbildung 6: CD14 mRNA-Expression in THP-1-Zellen nach PMA-Stimulation ($n=4$, $*p<0,05$ vs. unstimulierter Kontrolle)

Die CD14-mRNA-Expressionen wurden auf die Housekeepinggene Aktin oder Hprt bezogen und beide zeigen einen signifikanten Anstieg der CD14-mRNA Expression drei Tage nach PMA-Gabe.

3.2 PCR der microRNAs

Eine Aussage darüber, ob das Umschreiben der microRNA und der mRNA in cDNA funktioniert hat, liefern uns indirekt die Ergebnisse der Cq-Werte der jeweiligen PCR-Läufe.

3.2.1 PCR von microRNAs der mit PMA-stimulierten Zellen

Eingangs überprüften wir welche microRNAs exprimiert werden, wenn wir die THP-1 Zellen mit PMA (5 ng/ml) zu Makrophagen stimulieren.

Die Ergebnisse zeigen eine signifikante Runterregulation der let-7f-microRNA nach 24 und 48 Stunden Inkubation mit PMA.

Runterreguliert wird auch miR-92a, welches nach 24-stündiger Inkubation mit PMA erniedrigt ist.

Neben der Runterregulation fanden wir heraus, dass bestimmte microRNAs auch hochreguliert werden.

Zu diesen hochregulierten microRNAs zählt miR-1, welches nach 48 und 72 Stunden PMA-Inkubation auf ein fünf- bis sechsfaches ansteigt.

Die miR-22-microRNA erfährt nach 48- und 72-stündiger PMA-Inkubation ebenfalls einen Anstieg um ungefähr das dreifache.

Ähnlich verhält es sich mit miR-143, welches ebenfalls nach 72 Stunden Inkubation mit PMA auf ein dreifaches ansteigt.

Die Expression der übrigen von uns geprüften microRNA blieb unverändert. Die microRNAs miR-21, miR-99a und miR-223 zeigen weder eine Hoch- noch eine Runterregulation bei der Dedifferenzierung von Monozyten zu Makrophagen, sie zeigen keine veränderte Expression nach 24-, 48- und 72-stündiger Inkubation mit PMA.

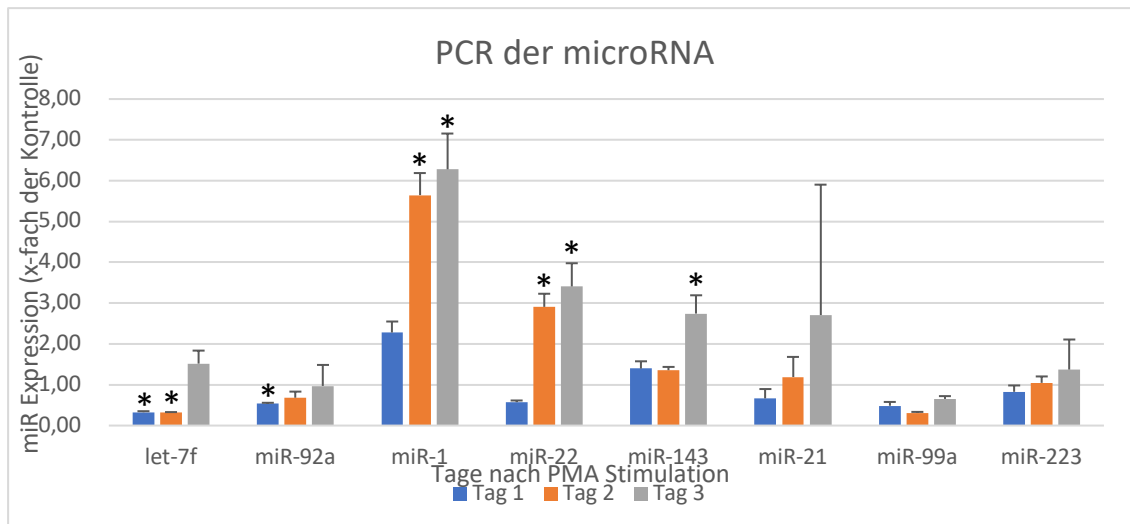


Abbildung 7: PCR Ergebnisse der microRNA Expression unter PMA-Stimulation, SNORD wurde als Housekeeping-Gen verwendet, (n=10, *p<0,05 vs. unstimulierter Kontrolle)

3.3 Wirkung von AgomiRen/AntagomiRen auf die Makrophagen-Differenzierung

Der Gedanke hier ist, ob eine Inhibition oder Stimulation der microRNA durch AntagomiRe oder AgomiRe Auswirkungen auf die Monozyten-Makrophagen-Differenzierung haben. Dafür nutzen wir AgomiRe, um eine gain-of-function-Situation herzustellen bei denjenigen microRNAs, die während der Differenzierung runterreguliert werden. Die Runterregulation von let-7f und miR-92a wird also mit den jeweiligen AgomiRen untersucht.

Im Gegensatz dazu werden diejenigen microRNAs, die während der Differenzierung hochreguliert werden, mit den jeweiligen AntagomiRen inhibiert. Dazu zählen die folgenden microRNAs: miR-1, miR-22 und miR-143.

3.3.1 Runterregulierte microRNAs

Die Feststellung, dass let-7f und miR-92a runterreguliert werden, führen uns zu der Frage zu überprüfen, was geschieht, wenn wir die Runterregulation dieser beiden microRNAs verhindern. Wir setzen hierbei spezifische AgomiRe ein, die dafür sorgen, dass die Runterregulation genau dieser microRNAs verhindert wird. Verhindern die AgomiRe die Runterregulation der microRNAs merklich und wie verhalten sich die CD14-Expressionen der Zellen dabei?

Es werden 30 µl Lipofectamine mit 1,5 ml Opti-MEM angesetzt und dieser Ansatz wird für 5 Minuten stehen gelassen. Zeitgleich werden 10 µl AgomiR-let-7f oder AgomiR-92a

mit 1,5 ml Opti-MEM angesetzt und ebenfalls 5 Minuten ruhen gelassen. Anschließend werden beide Ansätze mit 12 ml Opti-MEM zusammengeführt, homogenisiert und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgt die 24-stündige Inkubation der Zellen. Dem schließt sich die Stimulation mit 5 ng/ml PMA für 24, 48 und 72 Stunden an.

Die PCR der mit AgomiR-let-7f transfizierten Zellen zeigt, dass die Konzentration von let-7f im Vergleich zu den Zellen, die nicht transfiziert sind, um das 30-fache erhöht ist (Abb. 8). Der Einsatz von AgomiR hat somit die durch PMA-induzierbare Runterregulation von let-7f unterdrückt. Im Anschluss daran wurde die Expression von CD14 ermittelt. Bei Verwendung von AgomiR-let-7f zur Verhinderung der Runterregulation von let-7f steigt die CD14-Expression um ein Vielfaches an (Abb. 9). Die CD14-Expression als Marker für die Monozyten-Makrophagen-Differenzierung erfährt also eine Steigerung, wenn viel let-7f vorhanden ist.

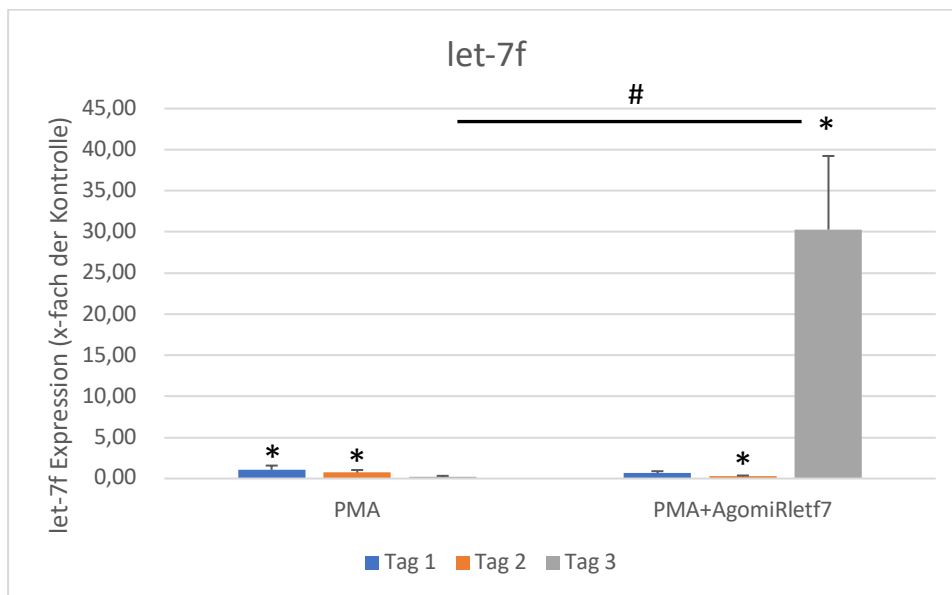


Abbildung 8: let-7f-Expression unter AgomiRlet-7f-Einfluss (n=5, *p<0,05 vs. unstimulierter Kontrolle, #p<0,05 vs. PMA Stimulation)

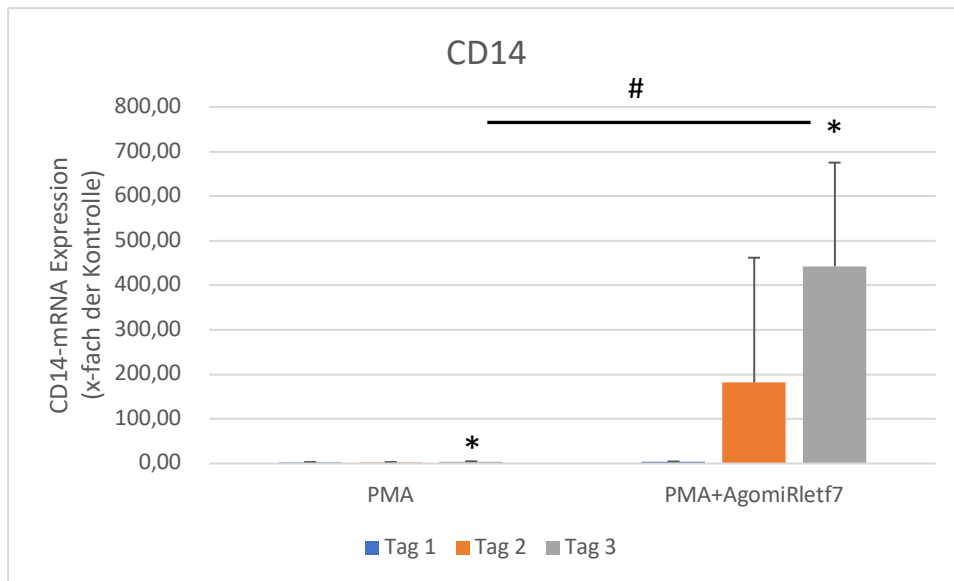


Abbildung 9: CD14-mRNA Expression unter AgomiRlet-7f-Einfluss ($n=5$, $*p<0,05$ vs. unstimulierter Kontrolle, $\#p<0,05$ vs. PMA Stimulation)

Bei den AgomiR-92a-Versuchen galt es auch erst zu klären, ob der Einsatz von AgomiR-92a die Runterregulation von miR-92a verhindert. Auch hier konnte gezeigt werden, dass die Konzentration an miR-92a bei Einsatz von AgomiR-92a steigt (Abb. 10). Die CD14-Expression hingegen wird bei einem Anstieg an miR-92a reduziert (Abb. 11).

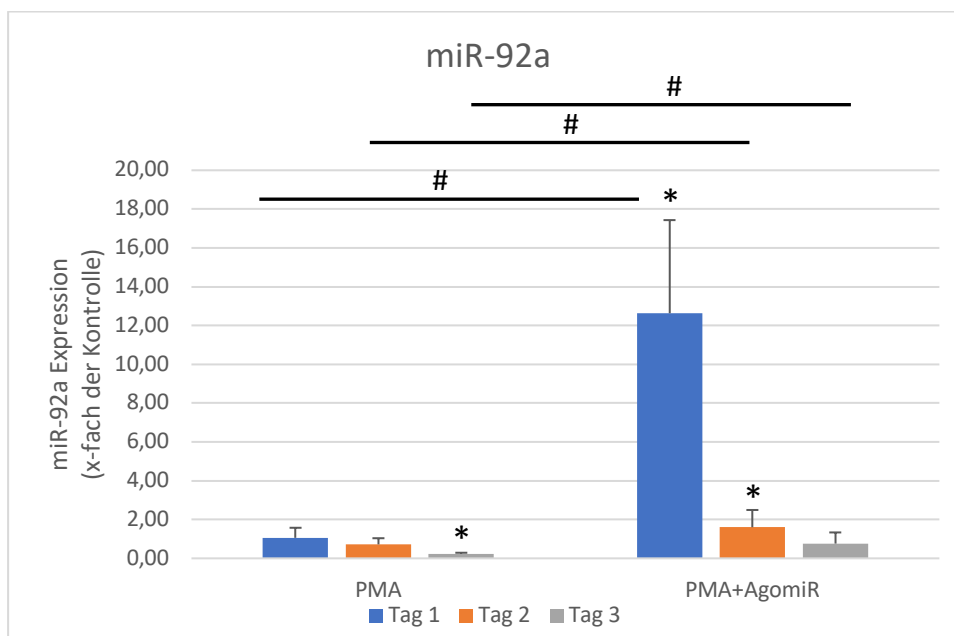


Abbildung 10: miR-92a Expression unter AgomiR-92a-Einfluss ($n=5$, $*p<0,05$ vs. unstimulierter Kontrolle, $\#p<0,05$ vs. PMA Stimulation)

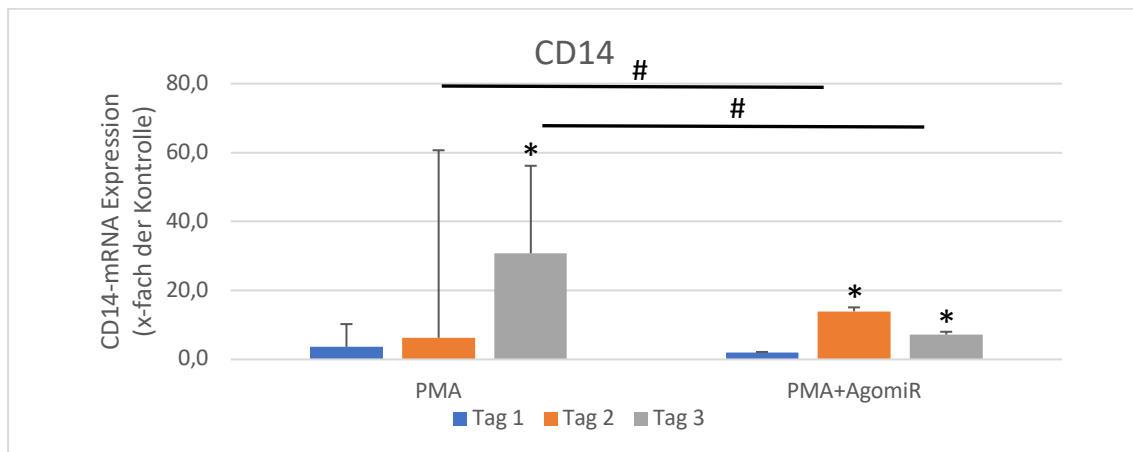


Abbildung 11: CD14-mRNA Expression unter AgomiR-92a-Einfluss (n=5, *p<0,05 vs. unstimulierter Kontrolle, #p<0,05 vs. PMA Stimulation)

3.3.2 Hochregulierte microRNAs

Die Frage, die sich uns bei den hochregulierten microRNAs stellte, war ob eine Inhibition dieser microRNAs zu einer Abnahme der Konzentration führte und wie sich die CD14-mRNA-Expressionen in diesem Fall verhielten.

Unter Stimulation mit 5 ng/ml PMA kommt es zu einer sehr starken miR-1 Erhöhung von 1920-fach nach einem Tag, 1570-fach nach zwei Tagen sowie 350-fach nach 3 Tagen. Bei Anwesenheit von AntagomiR-1 kann die PMA-Stimulation die miR-1 Expression nicht mehr so stark erhöhen. Nach einem Tag kommt es zu einer 4-fachen und nach 2 Tagen zu einer 2-fachen Erhöhung von miR-1 (Abb. 12). Bei Erniedrigung der miR-1 Konzentration durch Transfektion der Zellen mit AntagomiR-1 steigt die CD14-mRNA-Expression an (Abb.13). Niedrige Werte an miR-1 führen somit zu einer verstärkten Makrophagendifferenzierung.

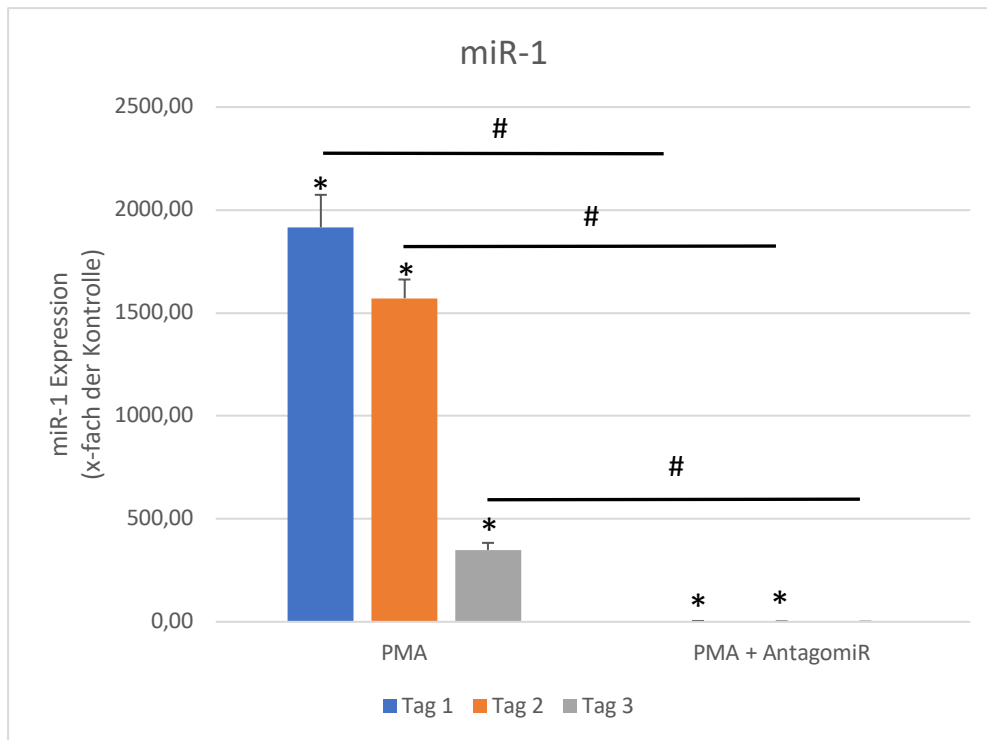


Abbildung 12: miR-1 Expression unter AntagomiR-1-Einfluss ($n=5$, $*p<0,05$ vs. unstimulierter Kontrolle, $\#p<0,05$ vs. PMA Stimulation)

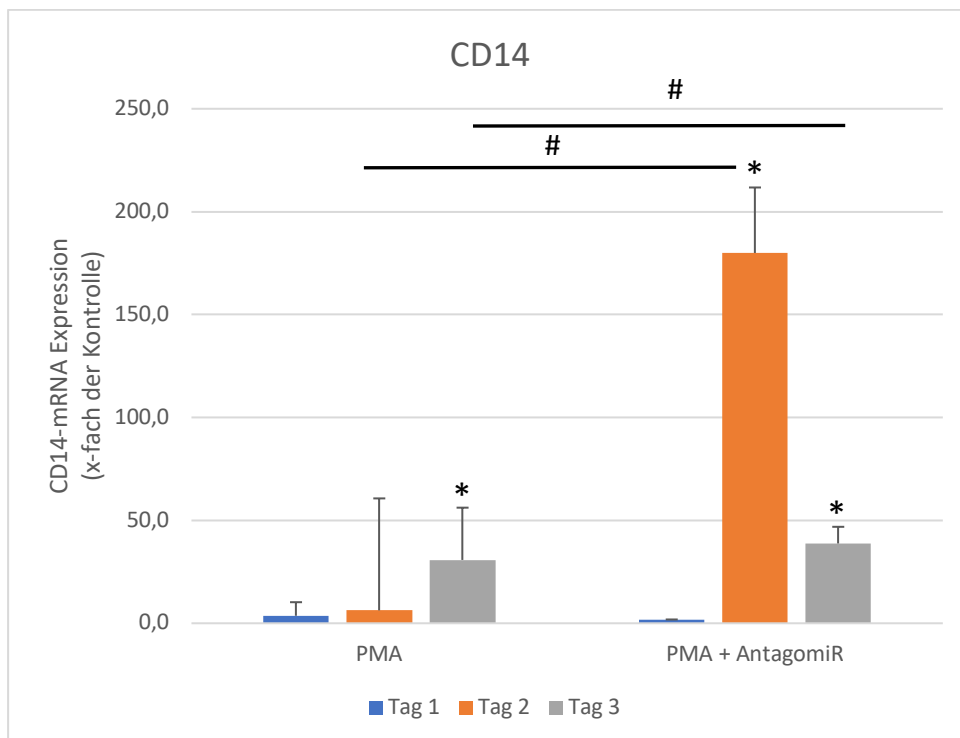


Abbildung 13: CD14-mRNA Expression unter AntagomiR-1-Einfluss ($n=5$, $*p<0,05$ vs. unstimulierter Kontrolle, $\#p<0,05$ vs. PMA Stimulation)

Nach Transfektion der THP-1 Zellen mit AntagomiR-22 ist keine signifikante Änderung an der Konzentration von miR-22 zu verzeichnen (Abb. 14). Die Expression an CD14 nimmt im Vergleich zur Kontrolle jedoch deutlich zu (Abb. 15).

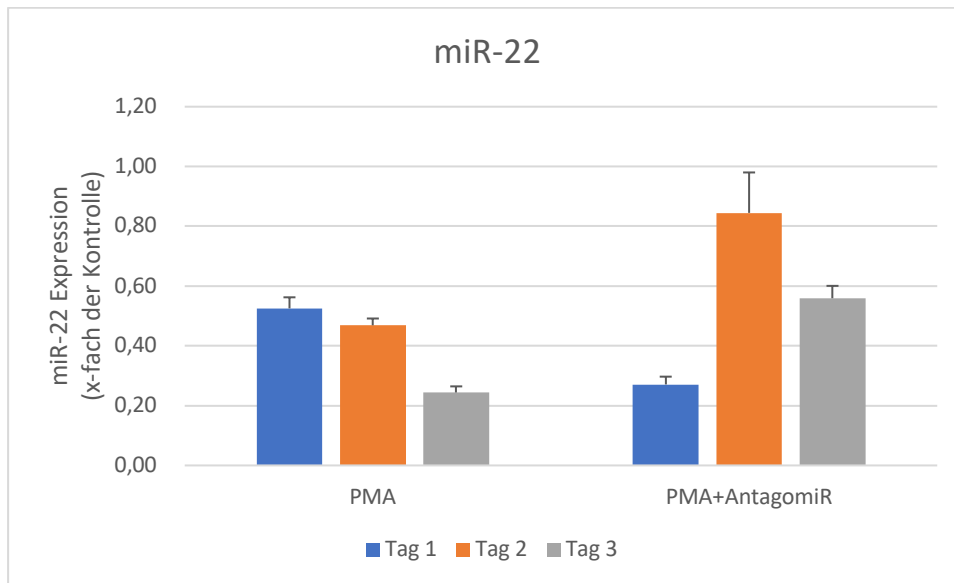


Abbildung 14: miR-22 Expression unter AntagomiR-22-Einfluss ($n=5$, $*p<0,05$ vs. unstimulierter Kontrolle, $\#p<0,05$ vs. PMA Stimulation)

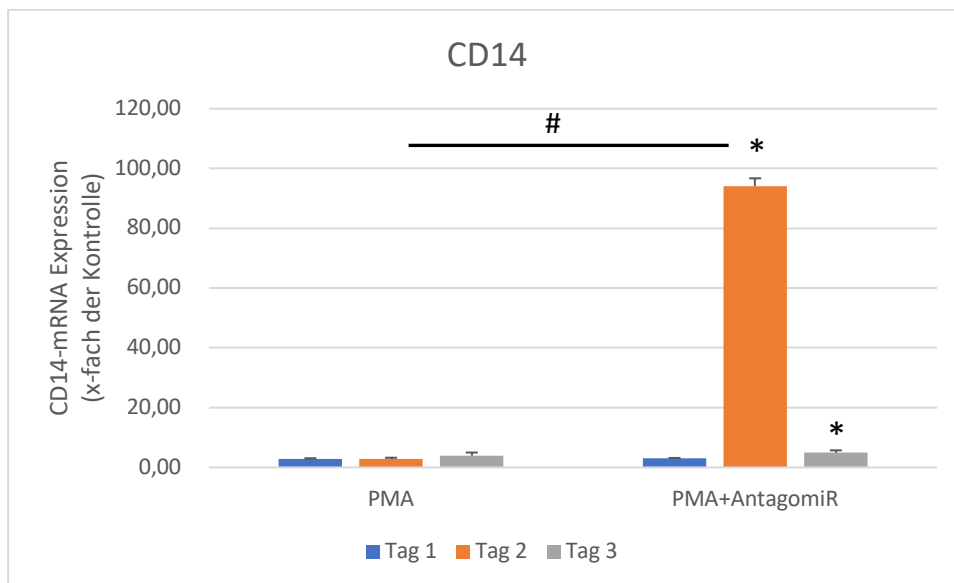


Abbildung 15: CD14-mRNA Expression unter AntagomiR-22-Einfluss ($n=5$, $*p<0,05$ vs. unstimulierter Kontrolle, $\#p<0,05$ vs. PMA Stimulation)

Bei Verwendung des AntagomiR-143, welches als Inhibitor fungieren soll, kommt es zu einer Steigerung der miR-143 Konzentration (Abb. 16). Der Einsatz dieses AntagomiRs zeigt keine Wirkung, da er nicht in der Lage ist die miR-143 Konzentration zu reduzieren. Die CD14-Expression der mit AntagomiR-143 transfizierten Zellen zeigt eine starke

Erhöhung dieses Markers (Abb. 17) und damit eine starke Monozyten-Makrophagen-Differenzierung.

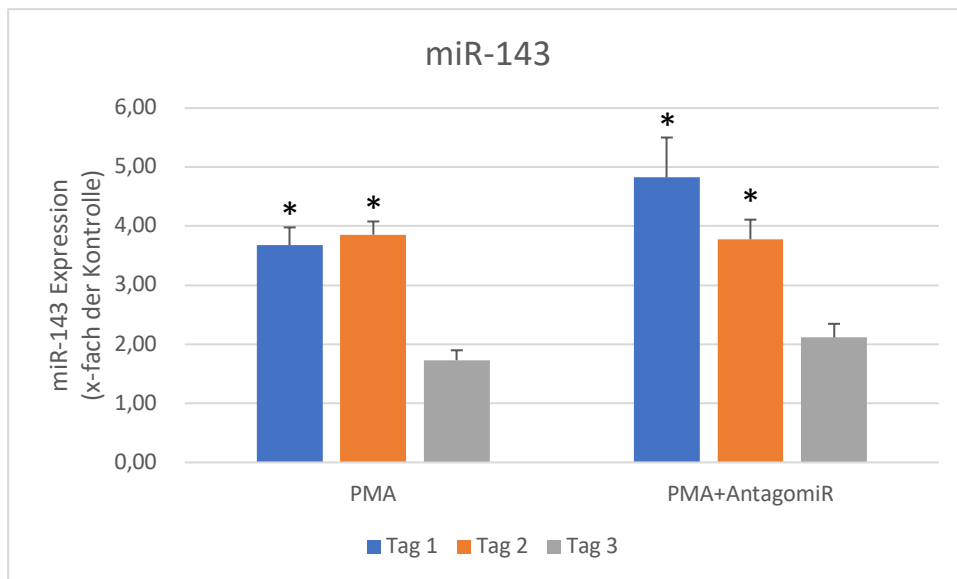


Abbildung 16: miR-143 Expression unter AntagomiR-143-Einfluss ($n=5$, $*p<0,05$ vs. unstimulierter Kontrolle, $*p<0,05$ vs. PMA Stimulation)

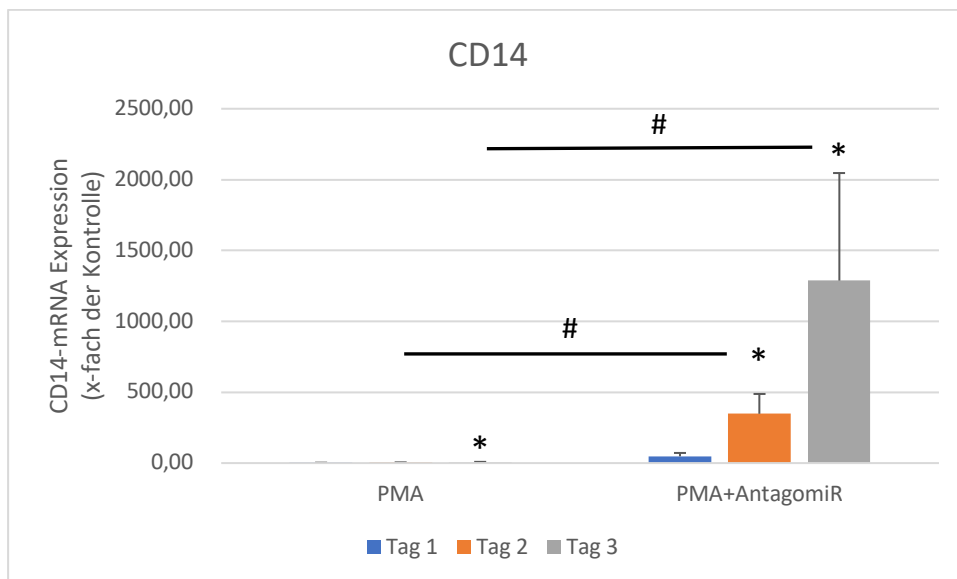


Abbildung 17: CD14-mRNA Expression unter AntagomiR-143-Einfluss ($n=5$, $*p<0,05$ vs. unstimulierter Kontrolle, $*p<0,05$ vs. PMA Stimulation)

3.3.3 Ansatz mit allen Anta- und AgomiRen

Um die Interaktionen der AntagomiRe und AgomiRe in einem Ansatz beleuchten zu können, wurden die THP-1 Zellen während der Transfektion mit allen AgomiRen und AntagomiRen, die wir in dieser Experimentenreihe einsetzten, behandelt.

Die Ergebnisse sind ähnlich wie die Ergebnisse der Einzelzugabe von AgomiR oder AntagomiR.

Es zeigt sich, dass let-7f, welches normalerweise nach PMA-Stimulation runterreguliert ist, unter diesen Bedingungen einen Anstieg der Konzentration verzeichnet (Abb. 18).

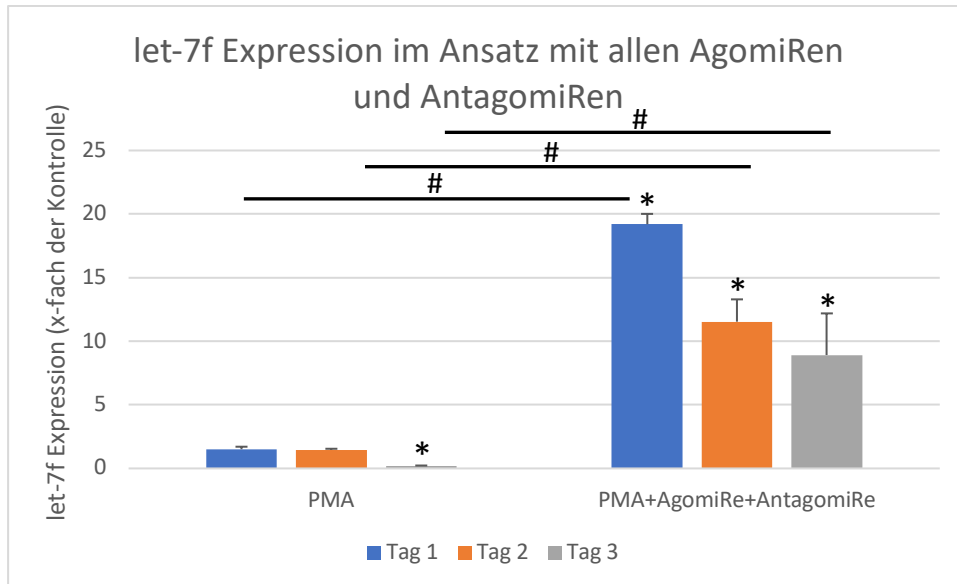


Abbildung 18: let-7f Expression unter AgomiRlet-7f-, AgomiR-92a-, AntagomiR-1-, AntagomiR-22- und AntagomiR-143-Einfluss (n=5, *p<0,05 vs. unstimulierter Kontrolle, #p<0,05 vs. PMA Stimulation)

Die Konzentration der microRNA miR-92a steigt ebenfalls in diesem Ansatz an (Abb. 19).

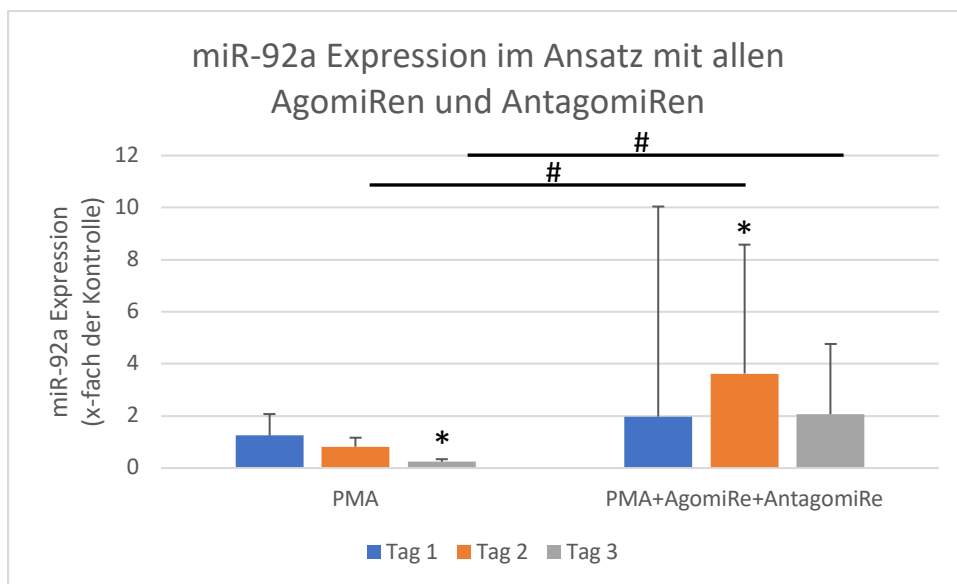


Abbildung 19: miR-92a Expression unter AgomiRlet-7f-, AgomiR-92a-, AntagomiR-1-, AntagomiR-22- und AntagomiR-143-Einfluss (n=5, *p<0,05 vs. unstimulierter Kontrolle, #p<0,05 vs. PMA Stimulation)

Der Anstieg von miR-1 ist zu sehen. Dieser ist aber nicht so stark ausgeprägt wie wenn die Zellen direkt mit PMA stimuliert sind (Abb. 20).

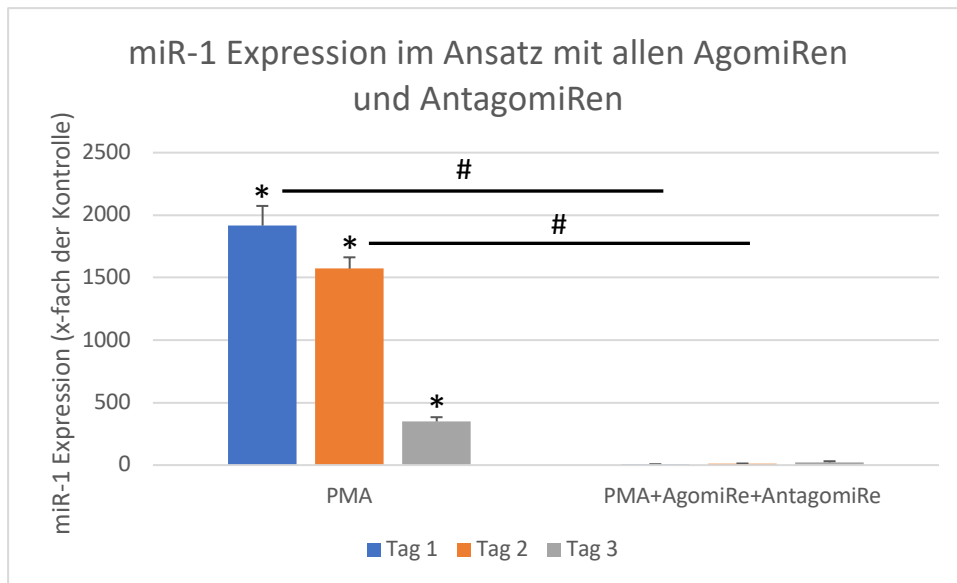


Abbildung 20: miR-1 Expression unter AgomiRlet-7f-, AgomiR-92a-, AntagomiR-1-, AntagomiR-22- und AntagomiR-143-Einfluss (n=5, *p<0,05 vs. unstimulierter Kontrolle, #p<0,05 vs. PMA Stimulation)

Bei miR-22 ist keine Veränderung zu sehen (Abb. 21).

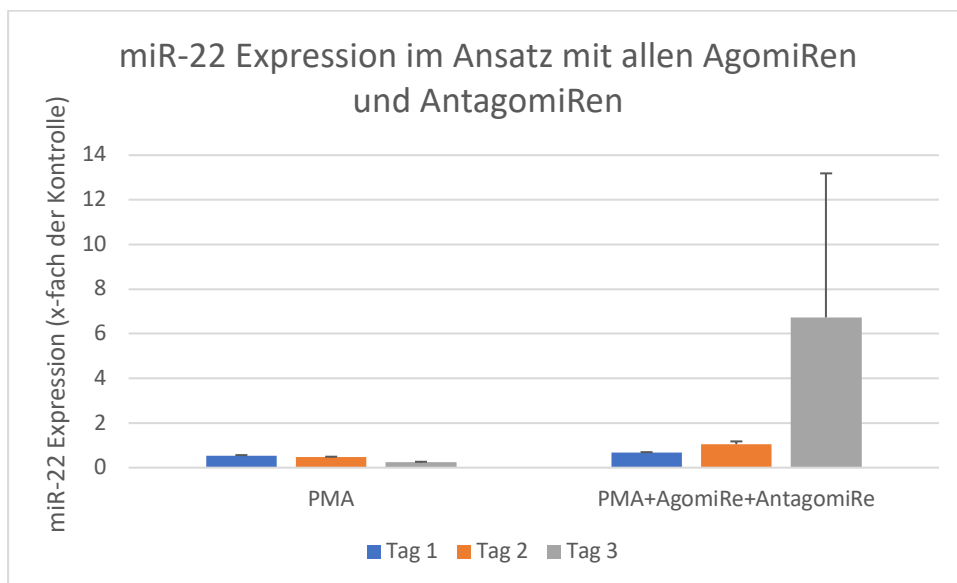


Abbildung 21: miR-22 Expression unter AgomiRlet-7f-, AgomiR-92a-, AntagomiR-1-, AntagomiR-22- und AntagomiR-143-Einfluss (n=5, *p<0,05 vs. unstimulierter Kontrolle, #p<0,05 vs. PMA Stimulation)

Die Konzentration an miR-143 ist nach Transfektion mit allen Anta- und AgomiRen erhöht (Abb. 22).

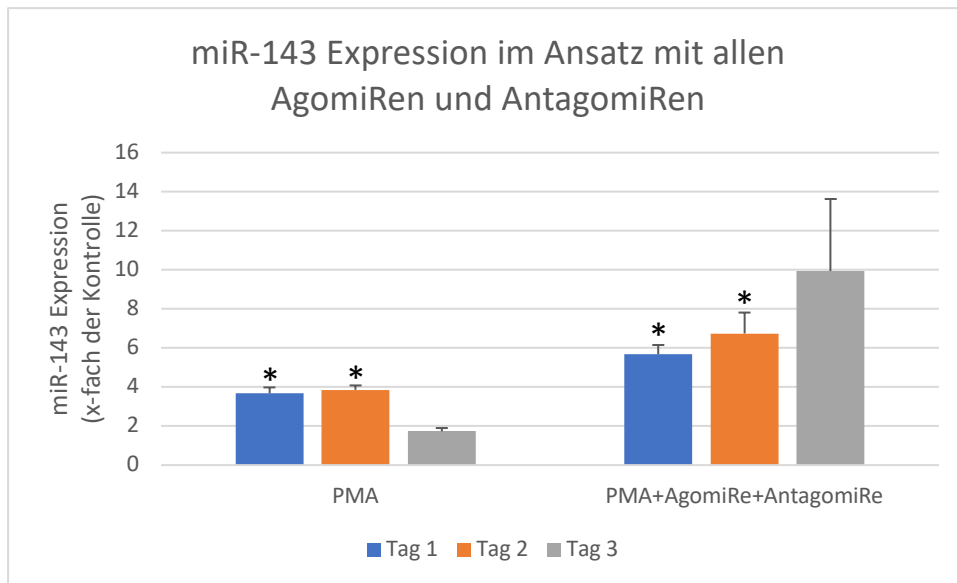


Abbildung 22: miR-143 Expression unter AgomiRlet-7f-, AgomiR-92a-, AntagomiR-1-, AntagomiR-22- und AntagomiR-143-Einfluss (n=5, *p<0,05 vs. unstimulierter Kontrolle, #p<0,05 vs. PMA Stimulation)

Die CD14-Expression erfährt eine starke Zunahme, wenn wir die THP-1 Zellen vor der PMA-Stimulation mit allen vorhandenen Anta- und AgomiRen behandeln (Abb. 23).

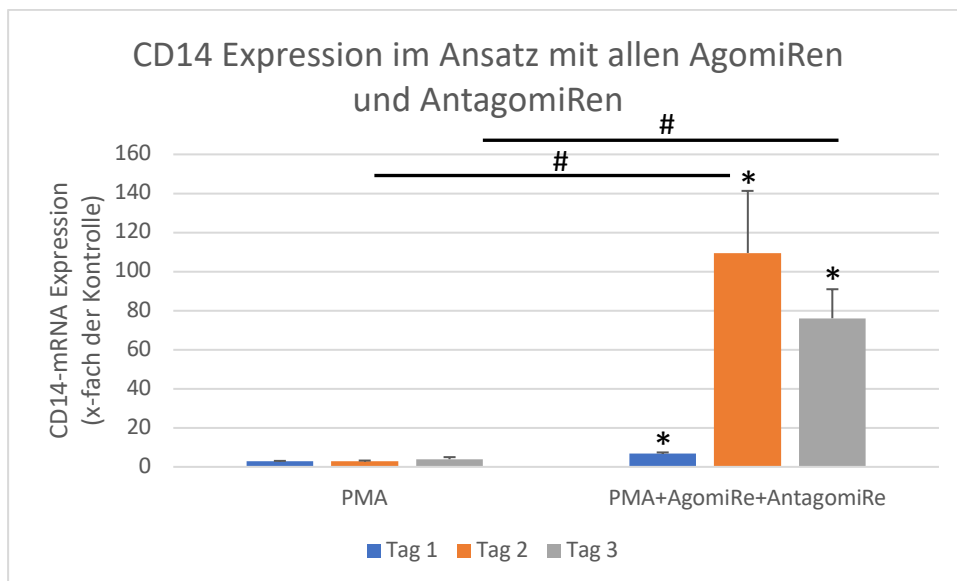


Abbildung 23: CD14-mRNA Expression unter AgomiRlet-7f-, AgomiR-92a-, AntagomiR-1-, AntagomiR-22- und AntagomiR-143-Einfluss (n=5, *p<0,05 vs. unstimulierter Kontrolle, #p<0,05 vs. PMA Stimulation)

4 Diskussion

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die Stimulation von THP-1 Zellen mit PMA zur Differenzierung zu Makrophagen, einer erhöhten Expression von miR-1, miR-22 und miR-143 und einer erniedrigten Expression von let-7f und miR-92a führt. Dabei nehmen let-7f, miR-92a und miR-1 Einfluss auf die CD14-Expression und damit beeinflussen sie die Differenzierung von Monozyten zu M0-Makrophagen. In vivo könnte es bedeuten, dass die drei zuletzt genannten microRNAs einen Einfluss auf die Atherosklerose haben könnten, da die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen einen entscheidenden Schritt in der Atheroskleroseentwicklung darstellen.

4.1 Die Bedeutung von let-7f

Die Bedeutung von let-7f wird deutlich, wenn wir uns die Experimente von Parahuleva et al. zur microRNA Expression anschauen. In einer Analyse der microRNA Expression in atherosklerotischen Plaques der Koronararterien konnten Parahuleva et al. (2018) eine Reduktion von let-7f zeigen. Dies korreliert gut mit meinen Daten, einer Reduktion von let-7f während der Makrophagendifferenzierung in THP-1-Zellen nach PMA-Stimulation. Im Gegensatz dazu wurde let-7f in zirkulierenden Monozyten von Patienten mit ST-Hebungsinfarkten jedoch als nicht differentiell exprimiert gefunden (Parahuleva et al., 2017). Das Ergebnis der Analyse von atherosklerotischen Plaques von Parahuleva et al. im Jahr 2018 zeigt eine Reduktion von let-7f (Parahuleva et al., 2018). Diese Ergebnisse könnten folgenden Hintergrund haben: Wie unsere Studie zeigt, kommt es erst während der Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen zu der Reduktion von let-7f. In der Phase der Zirkulation von Monozyten sind diese noch nicht zu Makrophagen differenziert und zeigen damit noch keine Expressionsveränderung von let-7f bei den STEMI-Patienten. Der Bildung von atherosklerotischen Plaques geht jedoch die Einwanderung von Monozyten und die Differenzierung zu M0-Makrophagen voraus, weshalb es hier zu einer Reduktion von let-7f kommt wie in den PMA-stimulierten THP-1 Zellen.

Zusätzlich konnte ich zeigen, dass die Erhöhung von let-7f durch Transformation der Zellen mit let-7f zu einer verstärkten CD14-Expression, also zu einer stärkeren Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen, führt. Die Reduktion von let-7f könnte ein interner Schutzmechanismus der Zelle sein, einer M0-Differenzierung entgegen zu wirken und so die Entstehung der Atherosklerose zu verhindern bzw. zu reduzieren.

Bei der Recherche von let-7f fällt auf, dass es mehrere Studien im Zusammenhang mit Atherosklerose gibt. In einer Studie von Li et al. wurden Blut- und Gewebeproben von 105 Patienten mit atherosklerotischen Plaques auf das Vorhandensein von microRNAs getestet. Die Ergebnisse zeigen keine Änderung der let-7f Konzentration im Serum der Patienten, jedoch eine Erhöhung von let-7f im atherosklerotischen Gewebe (T. Li et al., 2011). Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu den Ergebnissen von Parahuleva et al. (2018), welche eine Reduktion von let-7f in atherosklerotischen Plaques gezeigt haben. Eine mögliche Erklärung dieser Diskrepanz wäre der Zeitpunkt, zu dem man die Gewebeproben während der Entstehung des atherosklerotischen Plaques entnommen hatte. Zu Beginn könnte eine Reduktion von let-7f als Schutz der Zelle im Vordergrund stehen, die mit der Zeit nicht mehr gewährleistet werden kann und im Verlauf einer Erhöhung von let-7f weicht, die den Zeitpunkt der unwiderruflichen Bildung der Atherosklerose markiert.

In einer Studie von Egea et al. (2023) wurde nachgewiesen, dass let-7f die Invasion von mesenchymalen Stammzellen in atherosklerotische Plaques durch Einfluss von Zytokinen und Chemokinen kontrolliert. Es wurden humane mesenchymale Stammzellen mit einem antimikrobiellen Peptid, dem LL-37 behandelt. Dieses Peptid wird in Plaques angereichert. Es bindet an N-formylpeptidrezeptor-2 (FPR-2) und fördert die Biosynthese von let-7f, was die chemotaktische Invasion der Zellen in Richtung LL-37 ermöglicht. let-7f fördert somit die Invasion von humanen mesenchymalen Stammzellen durch Einfluss von Zytokinen und Chemokinen in die Plaqueregion und trägt dadurch zur Plaquestabilisierung bei (Egea et al., 2023). Hier kommt let-7f also eine atheroprotektive Schutzwirkung zu. Während nach meinen Ergebnissen die Reduktion von let-7f die Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen hemmt und somit atheroprotektiv wirken könnte, wäre in mesenchymalen Stammzellen eine Erhöhung von let-7f atheroprotektiv.

In einer weiteren Studie von Bogucka-Kocka et al. wurden im Serum von Patienten mit Verschlusskrankheit der unteren Extremität erhöhte Konzentrationen für let-7f gefunden im Vergleich zur Kontrollgruppe, die aus Patienten besteht, welche keine vaskulären Erkrankungen haben (Bogucka-Kocka et al., 2019). Der Verschlusskrankheit liegt die Arteriosklerose zugrunde, die durch die Bildung von Plaques in Arterienwänden gekennzeichnet ist. Durch die Bildung der Plaques kommt es zur Verengung und im Verlauf zur Verhärtung und zum Elastizitätsverlust der Arterien. Dies hat zur Folge, dass die peripheren Abschnitte der verengten Region mit weniger Sauerstoff und Nährstoffen

versorgt werden. Wenn man davon ausgeht, dass let-7f im Plasma atheroprotektiv wirkt, bildet die erhöhte Konzentration von let-7f einen Vorteil für Patienten mit Verschlusskrankheiten.

Das metabolische Syndrom stellt einen Risikofaktor für die Entstehung der Atherosklerose dar. Die WHO definiert das metabolische Syndrom als einen pathologischen Zustand, der durch abdominale Adipositas, Insulinresistenz, Bluthochdruck und Hyperlipidämie gekennzeichnet ist (Saklayen, 2018). Die Hyperlipidämie wird durch den Einsatz von Statinen behandelt. Ein bestimmter Prozentsatz der Patienten zeigt jedoch eine Statin-Intoleranz und ist somit für die Statintherapie nicht geeignet. Die Studie von Mangas et al. verfolgt das Ziel, microRNAs als Biomarker für eine Statin-Intoleranz zu identifizieren, um im Vorfeld Patienten auszusortieren, die für eine Statin-Therapie ungeeignet sind. Auch in diesem Fall spielt let-7f eine wichtige Rolle. Mangas et al. zeigten, dass let-7f im Plasma von Patienten mit Statin-Intoleranz erhöht ist. Gemeinsam mit den beiden weiteren microRNAs miR-376a und miR-376c, sowie einigen klinischen Faktoren (zum Beispiel Jahre der Dyslipidämie und Nicht-HDL-Cholesterin) entsteht ein prädiktiver Vorhersagewert für die Wahrscheinlichkeit einer Statin-Intoleranz (Mangas et al., 2022). Das Wissen über diese Wahrscheinlichkeit hätte klinische Bedeutung für die Therapie der Patienten.

Insulinresistenz bildet die pathogene Hauptkomponente für die Entstehung des Diabetes mellitus Typ 2 (Lee et al., 2022). Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 haben ein erhöhtes Risiko für die Entstehung von Atherosklerose. Santovito et al. untersuchten unbehandelte Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 auf zirkulierende microRNA-Expressionen, um auf die Auswirkungen dieser microRNAs in der Pathophysiologie dieser Erkrankung schließen zu können. Dazu wurde das Plasma der unbehandelten Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 und das Plasma der Kontrollpatienten ohne Diabetes mellitus auf die Expression von microRNAs hin untersucht. Aus den Untersuchungen von Santovito et al. geht hervor, dass eine erhöhte Expression von miR-326 und eine erniedrigte Expression von let-7a und let-7f zu sehen ist. Mit dem HbA1c-Wert, dem sogenannten Langzeitwert der Blutzuckereinstellung, korrelieren miR-326 und let-7a. Mit der Plasmaglukosekonzentration korrelieren alle drei oben genannten microRNAs. Anschließend erfuhr die Versuchsgruppe eine adäquate Diabetes-Therapie für 12 Monate. Patienten mit gebesserten HbA1c- und Plasmaglukosewerten zeigen einen signifikanten Anstieg von let-7f und let-7a (Santovito et al., 2014). Auch hier scheint die erniedrigte Expression von let-7f eventuell einen Schutzmechanismus darzustellen, der

sich bei gebesserter Glukosekonzentration wieder dem Normwert der Kontrollgruppe nähert.

Es gibt eine weitere Studie, die sich mit der Erforschung von microRNAs und Diabetes mellitus beschäftigt. In der groß angelegten Studie von Collares et al. wurden spezifische microRNAs als Biomarker für die Unterscheidung von Diabetes mellitus Typ 1, Diabetes mellitus Typ 2 und Gestationsdiabetes untersucht. Die Untersuchungen weisen darauf hin, dass es spezifische microRNAs für die spezifischen Diabetes Typen gibt, und dass einige andere microRNAs bei allen drei Typen vorkommen. Hier spielt auch let-7f eine Rolle als spezifischer Biomarker für den Diabetes mellitus Typ 1 (Collares et al., 2013). Man kann also davon ausgehen, dass let-7f eine Relevanz für Stoffwechselerkrankungen hat.

Die Atherosklerose führt in Gefäßen in fortgeschrittenen Stadien zur Bildung von Plaques. Diese Plaques können in einigen Fällen rupturieren und den nekrotischen Kern freisetzen, der Thrombozyten aktiviert. Dies führt zur Bildung von Thromben, welche das Gefäßlumen verengen. Durch diesen Prozess entstehen akute ischämische Ereignisse, die zu Herzinfarkt und Apoplex führen (Badimon & Vilahur, 2014). Eine Studie von Pienimaeki-Roemer et al. untersuchte microRNAs aus Exosomen von alternden Thrombozyten. Laut dieser Studie wurden microRNAs, die an vaskulären und metabolischen Erkrankungen beteiligt sind, während der in-vitro-Alterung von Thrombozyten aus deren Exosomen sezerniert (Pienimaeki-Roemer et al., 2017). Zu diesen microRNAs zählt auch let-7f, welches aus alternden Thrombozyten stammend vermehrt im Plasma zu sein scheint und auf diesem Wege in die Blutbahn gelangt sein könnte.

Eine weitere Studie beschäftigte sich mit der Erforschung von microRNAs in verschiedenen Zellen von Patienten mit Aortenaneurysmen. Die Studie von Spear et al. zeigt, dass let-7f in glatten Muskelzellen, sowie M1- und M2-Makrophagen in Patienten mit abdominellem Aortenaneurysma im Vergleich zur Kontrollgruppe runterreguliert ist. Es konnte auch gezeigt werden, dass let-7f im Plasma von Patienten mit abdominellem Aortenaneurysma erhöht ist (Spear et al., 2019). Auch diese Studie bestätigt die von uns erzielten Ergebnisse, dass let-7f in Makrophagen runterreguliert ist. Die Erhöhung von let-7f im Plasma der Patienten könnte auch in diesem Prozess mit der Stabilisierung der Aortenwand in Zusammenhang stehen.

Doch nicht nur die lokale Aussackung von Gefäßen scheint in Zusammenhang mit let-7f zu stehen, sondern auch die Neubildung von Gefäßen. Schon im Jahre 2007 entdeckten

Kuehbacher et al., dass die let-7-Familie eine Schlüsselrolle bei der Entstehung von Angiogenese spielt. Sie geben an, dass das Ausschalten von Dicer, einem Enzym, das die microRNA-Bildung ermöglicht, in Endothelzellen dazu führt, dass let-7a, let-7b, let-7c, let-7f und let-7g runterreguliert werden und dass die Runterregulation von let-7f die Sprossbildung reduziert, was darauf schließen lässt, dass let-7f die Angiogenese fördert (Kuehbacher et al., 2007). Das bedeutet, dass die Runterregulation von let-7f nicht nur protektiv auf die Atherosklerose wirkt, sondern auch an der Neubildung von Gefäßen beteiligt ist.

Dass let-7f proangiogene Wirksamkeit hat, wird auch deutlich, wenn man die Studie von Gong et al. betrachtet. In der Studie von Gong et al. wurden mesenchymale Stammzellen einer Zelllinie auf die microRNA-Expression ihrer Exosomen untersucht. Die Konzentrationen von miR-30b, miR-30c, miR-242 und let-7f waren erhöht. Durch den Transfer der exosomalen microRNAs aus mesenchymalen Stammzellen in humane Nabelvenenendothelzellen wird die HUVEC-vermittelte Sprossbildung, sowie die Migration und Proliferation von Endothelzellen gefördert (Gong et al., 2017). Diese Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass let-7f proangiogene Wirkung zeigt.

Nicht nur die Erforschung von Stoffwechselerkrankungen wie Diabetes mellitus und die Gefäßneubildung profitieren von den pathophysiologischen Erkenntnissen von let-7f sondern auch die Neurologie und Tumorerforschung. In einigen Studien wurde gezeigt, dass Mitglieder der let-7-Familie bei globaler Ischämie runterreguliert werden und dass let-7f-Antagonisten neuroprotektiv wirken (Koutsis et al., 2013). Die microRNAs let-7f und miR-1 werden als potenzielle IGF-1-Antagonisten gesehen. IGF-1 reduziert ischämische Prozesse in bestimmten Spezies und wirkt auf diese Weise neuroprotektiv. Selvamani et al. fanden heraus, dass let-7f-AntagomiRe in weiblichen Ratten die kortikale und striatale Infarktgröße reduzieren, wohingegen man bei männlichen Ratten keinen Effekt auf Ischämiedefekte finden konnte (Selvamani et al., 2012). Hier steht die Reduktion von let-7f in Zusammenhang mit der Abmilderung infarktspezifischer Folgen. Auch in der Tumorforschung scheint let-7f eine Rolle zu spielen. In einer Studie von Johnson et al. wurde die Expression der let-7-Familie in humanen Proben aus Lungengewebe untersucht. Das Ergebnis zeigt eine negative Korrelation zwischen den let-7-microRNAs zu dem Proto-Onkogen RAS. Es wird davon ausgegangen, dass let-7-microRNAs die Bildung des Proto-Onkogens RAS beeinflussen und die Entstehung von Lungenkrebs bestimmen (Johnson et al., 2005). Das Wissen über die detaillierte Wirkung

von let-7f auf die Entstehung von Lungenkrebs würde uns weitere Türen in der Therapie dieser Erkrankung eröffnen.

In einer weiteren Studie zur Erforschung von immunmodulatorischen Signalwegen wurden microRNA Expressionen von Schweinemonozyten analysiert, die Bb12, einem Probiotikum mit immunregulierender Funktion, ausgesetzt waren. Die Studie zeigt unter anderem, dass eine Hochregulation von let-7f in Monozyten von Schweinen in Anwesenheit von Bb12 stattfindet, jedoch nur wenn der Toll-like-Rezeptor-2 blockiert wurde (Arenas-Padilla et al., 2022). Wir sehen also, dass let-7f auch in der Erforschung des Immunsystems von Interesse sein könnte.

Die Freisetzung und Wirkung von let-7f müsste in weiteren Experimenten genauer analysiert werden, um Aussagen zum diagnostischen und therapeutischen Nutzen treffen zu können. Aktuell stehen wir vor einer Vielzahl von Ergebnissen diverser Experimente, die eine Rolle für let-7f in vaskulären, metabolischen und immunmodulatorischen Prozessen aufzeigt. Ob als Biomarker zu diagnostischen, oder als AntagomiR zu therapeutischen Zwecken, könnte let-7f in der Medizin genutzt werden, um Krankheiten zu erkennen und zu heilen. Aufgrund des ubiquitären Vorkommens von let7f in verschiedenen Zellen wäre ein systemischer Einsatz für einige Zellen protektiv und für andere schädigend, sodass ein therapeutischer Nutzen erst gegeben wäre, wenn let-7f gezielt in bestimmten Zellen und an bestimmten Organen eingesetzt werden könnte.

4.2 Die Bedeutung von miR-92a

In dieser Studie wurde eine Runterregulation von miR-92a in THP-1 Zellen nach PMA-Stimulation festgestellt. Passend zu diesem Ergebnis zeigte die Studie von Parahuleva et al. ebenfalls eine erniedrigte Expression von miR-92a in zirkulierenden Monozyten von STEMI-Patienten im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe (Parahuleva et al., 2017). Im Gegensatz dazu wurde eine erhöhte Expression von miR-92a in atherosklerotischen Plaques von Koronararterien gefunden (Parahuleva et al., 2018). Weiterhin wurde in dieser Studie gezeigt, dass ein Anstieg an miR-92a die CD14-Expression und damit die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen reduziert. Der Grund für die Erhöhung von miR-92a in atherosklerotischen Koronararterien könnte darin liegen, dass eine weitere Differenzierung der Monozyten zu Makrophagen in atherosklerotischer Umgebung verhindert werden soll.

Es gibt viele Studien zu miR-92a, die in Zusammenhang mit der Atherosklerose stehen. Fang et al. berichteten in einem Modell an Schweinen, dass die Expression von miR-92a in Atherosklerose anfälligen Gebieten wie zum Beispiel im Endothel des Aortenbogens erhöht ist und dass die atheroprotektiven Transkriptionsfaktoren KLF2 und KLF4 direkte Zielgene von miR-92a sind (Fang & Davies, 2012). Somit reguliert miR-92a die Expression von KLF2 und KLF4 in arteriellen Endothelzellen.

Ähnliche Ergebnisse erzielten Wu et al. im Jahre 2011, wo sie zeigten, dass eine Überexpression von miR-92a KLF2 reduziert und eine Inhibition von miR-92a KLF2 erhöht (Wu et al., 2011).

Loyer et al. führten in-vivo Studien an Mäusen durch, um die Auswirkung auf die Atherosklerose zu untersuchen. Sie demonstrieren, dass eine in-vivo Hemmung von miR-92a in *Ldlr^{-/-}*- Mäusen die endotheliale Entzündung reduziert, die Plaquegröße verringert und einen stabileren Läsionsphänotyp fördert. Eine Hochregulierung von miR-92a durch oxidiertes LDL in atheroanfälligen Gebieten fördert die endotheliale Aktivierung und die Entwicklung atherosklerotischer Läsionen (Loyer et al., 2014). Die in dieser Arbeit gezeigte Runterregulation von miR-92a in THP-1 Zellen könnte also ein Schutzmechanismus der Zelle vor einer Entzündungsreaktion und Plaquebildung sein. Die Hochregulation von miR-92a stellt den Zustand der Atherosklerosebildung dar und kommt dem pathologischen Prozess gleich, der unter anderem zur Atherosklerose führt. Zu dieser Erkenntnis kommen auch Chen et al. in der Studie von 2015, in der sie beobachten, dass oxidativer Stress SREBP2 (Sterol-regulatorisches Element-bindendes Protein 2) und miR-92a induzieren, die die angeborene Immunantwort des Endothels aktivieren und zu einer Funktionsstörung des Endothels führen und somit die Atherosklerose fördern (Chen et al., 2015).

Wenn die Hochregulation von miR-92a die Atherosklerose begünstigt, könnte man davon ausgehen, dass die Hemmung von miR-92a vor Atherosklerose schützen kann. Hinkel et al. führten 2013 Experimente an Schweinen durch, die diese Theorie stützen. Die Schweine wurden in der Studie einer perkutanen Ischämie oder Reperfusion des Ramus interventricularis anterior, dem vorderen absteigenden Ast der linken Koronararterie unterzogen und AntagomiR-92a wurde entweder regional über einen Katheter oder systemisch über einen intravenösen Zugang verabreicht. In beiden Fällen konnte eine Reduktion der Expression von miR-92a im Infarktgebiet beobachtet werden, jedoch führte nur die lokale Verabreichung über den Katheter zu einer Reduktion der

Infarktgröße, was mit einer verbesserten Ejektionsfraktion und mit einem verbesserten linksventrikulären enddiastolischen Druck assoziiert war (Hinkel et al., 2013).

5 Jahre später kamen Gou et al. ebenfalls zu dem Schluss, dass die Hemmung von miR-92a die endotheliale Entzündungsreaktion unterdrückt und die Atherosklerose verzögert. Die Studie wurde an diabetischen Mäusen durchgeführt. Gou et al. konnten zeigen, dass die Expression von miR-92a im Endothel der Aorta diabetischer Mäuse erhöht war und dass die Inhibition von miR-92a zu einer vasoprotektiven Wirkung beisteuert, indem die Häm-Oxygenase-1 hochreguliert und oxidativer Stress dadurch gemindert wird (Gou et al., 2018).

Kin et al. untersuchten microRNAs aus atherosklerotischen abdominellen Aortenaneurysmen und fanden heraus, dass miR-92a signifikant erhöht war in den untersuchten atherosklerotischen Geweben im Vergleich zu gesundem Aortengewebe (Kin et al., 2012).

Die Studie von Karere et al. im Jahre 2023 beschäftigte sich mit der Expression von microRNAs im Frühstadium der atherosklerotischen Läsionen. Dafür wurde 16 Pavianen 2 Jahre lang eine cholesterin- und fettreiche Diät angeboten und anschließend wurden Fettstreifen und fibröse Plaques der Arteria iliaca communis untersucht. Im Vergleich zu den läsionsfreien Stellen der Arterien zeigte sich in den fibrösen Plaques eine erhöhte Expression von miR-92a (Karere et al., 2023). Also zeigt sich auch hier, dass die erhöhte Expression von miR-92a mit atherosklerotischen Prozessen in Verbindung steht.

Im Jahre 2016 extrahierten Wang et al. Exosomen aus dem Plasma von Patienten mit koronarer Atherosklerose. Sie fanden heraus, dass die Expression von miR-92a in den Exosomen erhöht ist (Wang et al., 2019). Dies deutet darauf hin, dass miR-92a nicht nur in atherosklerotischem Gewebe vorkommt, sondern auch in den von Zellen separierten Exosomen zu finden ist.

Um der Frage nachzugehen, welche Funktion miR-92a in extrazellulären Vesikeln erfüllt, untersuchten Chang et al. die Expression von miR-92a in einem Zellkulturmodell aus Endothelzellen und im Serum von Mäusen. Ihre Ergebnisse geben Hinweise darauf, dass miR-92a aus Endothelzellen stammt und durch extravasikuläre Partikel zu Makrophagen transportiert wird. Man geht davon aus, dass miR-92a KLF4 reguliert und dadurch zur Aufnahme von LDL in M0-Makrophagen und schließlich zur Bildung von atherosklerotischen Läsionen führt (Chang et al., 2019). Diese Erkenntnisse decken sich mit unseren Ideen über die pro-atherogene Wirkung von miR-92a.

Ein weiteres Beispiel dafür, dass eine verminderte Expression von miR-92a mit einem anti-atherosklerotischen Effekt einhergeht, zeigt die Studie von Jia et al. aus dem Jahre 2014. Jia et al. behandelten ApoE-defiziente Mäuse mit Notoginsenosid R1, einer natürlich vorkommenden Verbindung. Nach der Behandlung mit Notoginsenosid R1 konnte eine deutliche Minderung der atherosklerotischen Läsionen beobachtet werden, die durch eine Reduzierung der Lipidablagerung, der Fibrose, des oxidativen Stresses und durch eine Reduktion der entzündlichen Zytokine gekennzeichnet war, sowie mit einer verminderten Expression von miR-92a einherging (Jia et al., 2014). Ähnliche Ergebnisse erzielten Lin et al. mit ihrer Studie an humanen Koronararterien-Endothelzellen. Nach einer Ballonverletzung zeigten die humanen Koronararterien-Endothelzellen eine erhöhte Expression von miR-92a. Durch die Behandlung mit Chrysin, einem pflanzlichen Flavonoid, wurde die Hochregulierung von miR-92a wieder rückgängig gemacht und es zeigten sich reduzierte miR-92a Expressionen, was einen atheroprotektiven Effekt vermuten lässt (Lin et al., 2021).

Im Gegensatz zu der atheroprotektiven Wirkung einer Runterregulation von miR-92a stehen die Erkenntnisse von Yang und Li aus dem Jahre 2020. In ihrer Studie an Mäusen, die einer hochfettreichen Diät unterzogen wurden, zeigten sie, dass erhöhte TUG1-Werte die Expression von miR-92a inhibieren, welches zu einer Erhöhung von FXR1 und einer Runterregulation von ApoM führt. Umgekehrt führt die Ausschaltung von TUG1 zu einer erhöhten Expression von miR-92a und über den FXR1-Weg zu einer erhöhten ApoM-Expression. ApoM wirkt der Atherosklerose entgegen, sodass die Runterregulation von TUG1 über die miR-92a/FXR1 Achse ein Fortschreiten der Atherosklerose verhindern kann (Yang & Li, 2020). Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen der oben genannten Studien, die die Hochregulation von miR-92a mit der Entstehung der Atherosklerose in Verbindung setzen.

Somit muss in weiteren Studien geklärt werden, unter welchen Bedingungen miR-92a pro- bzw. anti-atherogen wirkt. Bisher zeigt die Mehrzahl der Studien, ebenso wie meine eigenen Daten, eine pro-atherogene Wirkung von miR-92a, so dass der Einsatz von AntagomiR-92a zu therapeutischen Zwecken in der Zukunft am aussichtsreichsten erscheint.

4.3 Die Bedeutung von miR-1

Die Stimulation von THP-1 Zellen mit PMA zeigt in dieser Studie eine Hochregulation von miR-1. Dieses Ergebnis steht in Kontrast zu den Ergebnissen von Parahuleva et al., die eine erniedrigte Expression von miR-1 in Monozyten von STEMI-Patienten (Parahuleva et al., 2017) und in atherosklerotischen Plaques (Parahuleva et al., 2018) zeigen. Es stellt sich die Frage, warum dies so ist und wie diese Diskrepanz zustande kommt. In diesem Kapitel wird es darum gehen, die Rolle von miR-1 in der Entstehung und Progression der Atherosklerose näher zu beleuchten.

Im Jahre 2010 untersuchen D'Alessandra et al. das Plasma von 33 Patienten mit akutem ST-Hebungsmyokardinfarkt auf die Expression von microRNAs im Vergleich zur Expression von microRNAs im Plasma von gesunden Probanden. Unter anderem wurde gezeigt, dass miR-1 im Plasma von STEMI-Patienten zu Beginn des Auftretens von Infarktsymptomen erhöht exprimiert ist und dass sich fünf Tage nach dem akuten Ereignis die miR-1 Expression normalisiert (D'Alessandra et al., 2010). Ähnliche Ergebnisse liefern Versuche an Mäusen nach Ligation der Koronararterien, deren Plasma auf die Expression von microRNA hin untersucht werden (D'Alessandra et al., 2010). D'Alessandra et al. kommen zu dem Schluss, dass der akute Myokardinfarkt die miR-1 Expression in Mensch und Maus erhöht und dass miR-1 einen eventuellen Biomarker für akuten Myokardinfarkt bzw. für kardiale Schädigung darstellt (D'Alessandra et al., 2010). Diese Schlussfolgerungen decken sich mit den von uns erzielten Ergebnissen einer erhöhten miR-1 Expression im Rahmen eines atherosklerotischen Geschehens.

Cheng et al. führten im Jahre 2010 ebenfalls Studien zur Expression von miR-1 bei akutem Myokardinfarkt durch. In einer mit Triton-100 durchgeführten in-vitro Studie wurde gezeigt, dass miR-1 aus kardialen Zellen nach Nekrose in das Kulturmedium freigesetzt wird und mindestens 24 Stunden stabil ist (Cheng et al., 2010). In einer Studie an Ratten mit akutem Myokardinfarkt nach Koronarligatur steigt miR-1 schnell an, erreicht nach sechs Stunden den Höchstwert und nach drei Tagen wieder den Basalwert (Cheng et al., 2010). Die Serum-miR-1-Konzentration von Ratten mit akutem Myokardinfarkt zeigt eine positive Korrelation mit der Myokardinfarktgröße (Cheng et al., 2010). Zusätzlich ist miR-1 im Serum von Patienten mit akutem Myokardinfarkt signifikant erhöht und zeigt eine positive Korrelation mit den CK-MB-Werten im Serum, die auf eine Zellschädigung des Herzens hindeuten (Cheng et al., 2010). Die Forschungsergebnisse von Cheng et al. bestätigen erneut die Theorie, dass Atheroskleroseereignisse mit einer erhöhten Expression von miR-1 einhergehen.

Passend dazu konnten Long et al. zwei Jahre später zeigen, dass miR-1 im Plasma von Patienten mit akutem Myokardinfarkt erhöht ist und zeitlich mit den Troponin-Werten korreliert (Long et al., 2012).

Die im Jahre 2018 veröffentlichte Studie von Katano et al. untersucht die Expression von microRNAs aus kalzifizierten Plaques von Karotisendarterektomie Operationen. Dazu werden die Plaques in höhergradig kalzifizierte und niedrig kalzifizierte Plaques eingeteilt und miteinander verglichen (Katano et al., 2018). Die Expression von miR-1 ist in höhergradig kalzifizierten Plaques signifikant runterreguliert im Vergleich zu niedrig kalzifizierten Plaques (Katano et al., 2018). Das bedeutet, dass die Kalzifizierung der vorhandenen Plaques dazu führt, dass die Expression von miR-1 runterreguliert wird. Dies könnte eine mögliche Erklärung für die oben genannte Diskrepanz der Hoch- und Runterregulation von miR-1 sein. Die Verkalkung der Koronararterien von STEMI Patienten und die Verkalkung der atherosklerotischen Plaques in den Studien von Parahuleva et al. könnte zu einer runterregulierten Expression von miR-1 geführt haben. Dass die Plaquemorphologie eine Rolle bei der Expression verschiedener microRNAs spielt, zeigt uns die Studie von Badacz aus dem Jahre 2018. In der prospektiven Studie werden Zusammenhänge zwischen zirkulierenden microRNAs und symptomatischen und asymptomatischen Karotisstenosen untersucht, mit besonderem Augenmerk auf die Morphologie der Plaques und auf zukünftige kardiovaskuläre Ereignisse (Badacz et al., 2018). Es werden die zirkulierenden microRNAs von 92 Patienten mit signifikanten Karotisstenosen analysiert. Die Untersuchungsergebnisse deuten darauf hin, dass ulzerierte Plaques eine Hochregulation von miR-1 hervorrufen, wohingegen thrombotische Plaques zu einer Runterregulation von miR-1 führen (Badacz et al., 2018). Die morphologischen Unterschiede sind demnach entscheidend für die Expression von miR-1.

Im Jahre 2020 werden 17 Patienten mit akutem Myokardinfarkt, die sich einer perkutanen transluminalen koronaren Angioplastie unterziehen, in eine Studie von Kazimierczyk et al. aufgenommen. Die miR-1 Expression im Plasma dieser Patienten wird bei Aufnahme und nach 19 Wochen bestimmt und mit der Expression von miR-1 aus dem Plasma von freiwilligen gesunden Probanden, die den Patienten in Alter und Geschlecht gleich sind, verglichen. Es stellt sich heraus, dass die Expression von miR-1 in der Gruppe der Patienten mit akutem Myokardinfarkt signifikant höher ist als in der Gruppe der gesunden Freiwilligen (Kazimierczyk et al., 2020). Es wird beobachtet, dass die Expression im Follow Up Zeitraum signifikant abnimmt (Kazimierczyk et al., 2020). Die Expression

von miR-1 zeigt eine positive Korrelation zu der maximalen Troponin I Konzentration und eine negative Korrelation zu der linksventrikulären Ejektionsfraktion (Kazimierczyk et al., 2020). In Übereinstimmung mit den Forschungsergebnissen von D'Alessandra et al., Cheng et al. und Long et al. kann also festgehalten werden, dass ein akutes Infarktgeschehen am Herzen zu einer Erhöhung von miR-1 führt.

Eine weitere prospektive Studie von Badacz et al. aus dem Jahre 2021 beschäftigte sich mit der Frage nach sekundären kardiovaskulären Ereignissen bei Patienten mit akutem Ischämieereignis in Karotisstenosen oder Koronararterienstenosen. In einem 6-jährigen Follow Up werden 142 Patienten mit akuter Ischämie in Karotis oder in den Herzkranzgefäßen auf die Expression verschiedener zirkulierender microRNAs hin untersucht. Es wird herausgefunden, dass miR-1 und die periphere arterielle Verschlusskrankheit mit kardiovaskulärem Tod assoziiert sind (Badacz et al., 2021). Daraus resultiert, dass miR-1 als prognostischer Faktor für kardiovaskuläre Erkrankungen in Frage kommen könnte.

Zu diesem Schluss kommen auch Šatrauskienė et al., die 182 Patienten mit metabolischem Syndrom und hohem kardiovaskulären Risiko aber ohne kardiovaskuläre Erkrankung untersuchen. Es werden folgende Parameter dafür bewertet: der Kardio-Knöchel-Gefäß-Index, der Augmentationsindex, der auf eine Herzfrequenz von 75 / min modifiziert wird, die Aortenpulswellengeschwindigkeit und die Steifigkeit der Karotisarterien. Die verschiedenen microRNAs werden im Serum analysiert. MiR-1 zeigt eine negative Korrelation mit dem Kardio-Knöchel-Gefäß-Index und dem Augmentationsindex, der auf eine Herzfrequenz von 75 / min modifiziert ist. Zusätzlich hat man herausgefunden, dass miR-1 die Steifigkeit der linken Karotisarterie vorhersagen könne. In Kombination mit den anderen microRNAs, die getestet werden, kann miR-1 ein möglicher Biomarker für die Progression von kardiovaskulären Erkrankungen sein. Auch hier wird miR-1 eine prognostische Fähigkeit zur Erkennung der Atherosklerose zugesprochen.

Li und Cai beschreiben in einer Studie im Jahre 2024 die Bedeutung von miR-1 und anderen microRNAs in der Entstehung der diabetischen Retinopathie sowie der Atherosklerose und es werden die Gene NOX4 und PARP14 als potentielle Biomarker für die beiden Erkrankungen identifiziert (C. Li & Cai, 2024). Es zeigt sich also, dass miR-1 eine wichtige Bedeutung hat im physiologischen Prozess der Atherosklerose.

4.4 Die Rolle von miR-22 und miR-143

Über die Rolle von miR-22 und -143 lässt sich nach meinen Untersuchungen keine genaue Aussage treffen, da das jeweilige AntagomiR nicht die Expression von miR22 oder -143 reduzieren konnte. Die AntagomiRe nehmen also keinen Einfluss auf die Expression dieser beiden microRNAs. Gründe hierfür könnten in einer erhöhten Stabilität der miRs liegen oder in einer schlechten Passgenauigkeit der AntagomiRe. Interessanterweise kommt es trotzdem zu einer erhöhten Expression von CD14 unter beiden AntagomiRen. Dieser Effekt muss jedoch unspezifisch sein, da die Expression von miR-22 und -143 unter diesen Bedingungen unverändert ist. Aufgrund dieser unspezifischen Effekte wird in der Diskussion nicht weiter auf die Funktion dieser beiden miRs in der Atherosklerose eingegangen.

4.5 Reduktion der Makrophagen-Differenzierung als führende Rolle aller untersuchten miRs

Führt man eine gleichzeitige Gegenregulation der miR-Expression unter PMA mit allen AntagomiRen und AgomiRen in einem Ansatz durch, so kommt es zu einer Induktion der CD14-mRNA Expression und somit einer verstärkten Makrophagendifferenzierung. Die Induktion ist jedoch nicht so stark ausgeprägt wie in den einzelnen Ansätzen. Dies könnte daran liegen, dass der Einsatz von AntagomiR-92a die CD14-mRNA Expression reduziert, und somit der Erhöhung der CD14-mRNA Expression durch die anderen AntagomiRe und AgomiRe entgegenwirkt und somit schwächt. Trotzdem kommt es insgesamt zu einer erhöhten CD14-mRNA Expression unter allen Anta-/AgomiRen. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die differenziellen miR-Expressionen unter PMA eher als Schutzmechanismus gegen eine Makrophagendifferenzierung wirken; denn unter Antagonisierung ihrer Expression verstärkt sich die CD14 Expression und Makrophagendifferenzierung.

4.6 Limitationen der Arbeit

Ein limitierender Faktor dieser Arbeit liegt im Versuchsdesign und den Laborbedingungen. Die Versuche werden an immortalisierten THP-1 Zellen durchgeführt. THP-1 Zellen sind Monozyten, welche ursprünglich aus dem Blut eines Patienten mit monozytärer Leukämie stammen. Sie haben die Fähigkeit sich in Makrophagen zu differenzieren. In dieser Studie werden THP-1 Zellen mit PMA zu

Makrophagen stimuliert. Die Interaktionen mit anderen Zellen und Geweben hat in diesem Studiendesign demnach keinen Einfluss auf die Expression der untersuchten microRNAs.

Eine Gesamtdarstellung der in-vivo stattfindenden physiologischen und pathophysiologischen Prozesse ist somit nicht gegeben. In weiteren Studien könnte man die Expression der microRNAs zu verschiedenen Zeitpunkten der Atherosklerose in lebenden Tieren oder Menschen aus peripherem Blut und aus entnommenen Gefäßen mit Atherosklerose untersuchen und die Veränderungen antagonisieren. Dies könnte Aufschlüsse darüber geben, welche microRNAs in den verschiedenen Phasen hoch- und runterreguliert sind und könnte die verschiedenen Ergebnisse der oben genannten Studien näher beleuchten und erklären.

4.7 Ausblick

Im Jahre 2024 erhielten die Molekularbiologen Victor Ambros und Gary Ruvkun den Nobelpreis für Physiologie für die Entdeckung der microRNA. Ihre ersten Ergebnisse wurden im Jahre 1993 veröffentlicht. Seit Beginn des 21. Jahrhunderts weiß man, dass microRNAs auch im menschlichen Organismus eine nicht unerhebliche Rolle spielen.

Aktuell werden viele Studien an microRNAs durchgeführt. Anhand der großen Menge der vorhandenen Review-Artikel, die es zu den verschiedenen microRNAs gibt, kann man die zunehmende Relevanz erkennen. Neben der physiologischen Relevanz beispielsweise in der Modulation der Immunfunktion durch die Beeinflussung von Lymphozyten- und Monozytenproliferation spielen microRNAs vor allem in der Pathophysiologie eine wichtige Rolle. Neben der Atherosklerose sind hier vor allem die Entstehung von Tumoren und andere Herz-Kreislaufkrankungen zu nennen.

Das zentrale Thema dieser Arbeit ist die Atherosklerose. Meine Ergebnisse in Monozytenzellkultur deuten auf eine Bedeutung von let-7f, miR-92a und miR-1 in der Makrophagendifferenzierung und somit bei atherosklerotischen Prozesse hin. Dies muss jedoch in weiteren in-vivo-Studien bestätigt werden. Aufgrund der vielfältigen Wirkungsweise dieser miRs, müssen Wege einer zellspezifischen Modulation im Organismus gefunden werden, um deren therapeutische Einsatzmöglichkeit gegen atherosklerotische Prozesse verwirklichen zu können.

5 Zusammenfassung

Die Erforschung von microRNAs verspricht in Zukunft bahnbrechende Ergebnisse in der Diagnose und Therapie von Erkrankungen zu liefern. Sie beteiligen sich auch an der Entstehung der Atherosklerose, welche den Grundpfeiler für kardiovaskuläre Erkrankungen bildet. Ein wesentlicher Schritt bei der Entstehung der Atherosklerose ist die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen. Die hier vorgelegte Studie untersucht die Expression ausgewählter microRNAs während der Monozyten-Makrophagen-Differenzierung.

Die Untersuchung erfolgte an THP-1 Zellen, einer monozytären Zelllinie. Unter Stimulation der Zellen mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (5ng /ml PMA) differenzierten diese zu Makrophagen, was schon mikroskopisch an einem veränderten Phänotyp mit Pseudopodien und polymorpher Erscheinungsform zu erkennen war. Auch die CD14-mRNA Expression, als Marker für die Makrophagendifferenzierung, zeigte eine signifikante Erhöhung nach 72-stündiger PMA-Stimulation. Unter dieser PMA-Stimulation wurden Expressionen verschiedener microRNAs analysiert. let-7f und miR-92a wurden unter PMA-Gabe runterreguliert. Eine Hochregulation erfuhren miR-1, miR-22 und miR-143. Die Expression von miR-21, miR-99a und miR-223 blieb unverändert. Die unter PMA-Gabe runterregulierten microRNAs, let-7f und miR-92a, zeigten nach Transfektion mit ihren jeweiligen AgomiRen einen Anstieg der Expression in den behandelten Zellen. AgomiR-let-7f steigerte die CD14-mRNA Expression, wohingegen der Einsatz von AgomiR-92a dazu führte, dass die CD14-mRNA Expression unter PMA reduziert wurde. Unter den AntagomiRen bewirkte lediglich AntagomiR-1 eine signifikante Erniedrigung der miR-1 Expression unter PMA. Unter diesen Bedingungen stieg die CD14-mRNA Expression. Die Makrophagendifferenzierung ist demnach bei niedriger miR-1 Expression verstärkt.

Schlussfolgernd kann man sagen, dass von den untersuchten microRNAs let-7f, miR-92a und miR-1 die Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen unter PMA-Gabe beeinflussen. Verhindert man den Abfall von miR-92a, so wird die CD14-mRNA Expression und somit die Makrophagendifferenzierung reduziert. Dagegen bewirkt eine Reduktion von let-7f oder miR-1 eine erhöhte CD14-mRNA Expression, was auf eine verstärkte Differenzierung zu Makrophagen hinweist. Somit könnte eine Modulation der miR-1, miR-92a oder let-7f Expression therapeutisch genutzt werden, um atherosklerotische Vorgänge zu reduzieren.

6 Summary

The research about microRNAs promises to deliver groundbreaking results in the diagnosis and therapy of diseases in the future. microRNAs also participate in the development of atherosclerosis, which is the cornerstone of cardiovascular disease. An important step in the development of atherosclerosis is the differentiation of monocytes to macrophages. The study presented here examines the expression of selected microRNAs during monocyte-macrophage differentiation.

The experiments were performed on THP-1 cells which are human monocytes derived from the blood of a patient with monocytic leukemia. The cells were cultured and treated with phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA). PMA stimulates monocytes to M0 macrophages. In comparison to the native round and homologous monocytes the PMA stimulated cells show a microscopically altered phenotype with pseudopodia and polymorphic appearance. The CD14 PCR shows a significant increase of CD14 mRNA after 72 hours of PMA stimulation. These results indicate the successful differentiation into M0 macrophages.

Next, PCR was used to determine which of the microRNAs analyzed were downregulated and which were upregulated after PMA stimulation. The results show that let-7f and miR-92a were downregulated, and miR-1, miR-22 and miR-143 were upregulated. The expression of miR-21, miR-99a, and miR223 remained unchanged. The downregulated microRNAs let-7f and miR-92a show an increase in expression in the treated cells after transfection with their respective agomiRs. On the other hand, the CD14 mRNA expression behaves differently with let-7f and miR-92a agomiRs. The use of agomiR-let-7f leads to a significant increase in CD14 mRNA expression, whereas the use of agomiR-miR-92a leads to a decrease in CD14 mRNA expression. The use of antagomiRs only shows a significant decrease in miR-1. The CD14 mRNA expression increases when the miR-1 concentration is reduced by transfection with antagomiR-1. So the macrophage differentiation is increased at low miR-1 levels.

In conclusion, let-7f, miR-92a and miR-1 influence the differentiation of monocytes into macrophages. When the decrease of miR-92a is prevented under PMA stimulation, CD14 mRNA expression is reduced. In contrast, a reduction of let-7f or miR-1 results in increased CD14 mRNA expression, which indicates increased differentiation into macrophages. Thus, modulation of miR-1, miR-92a or let-7f expression could be used therapeutically to reduce atherosclerotic processes.

7 Literaturverzeichnis

- Aldo, P. B., Craveiro, V., Guller, S. et Mor, G. (2013). Effect of culture conditions on the phenotype of THP-1 monocyte cell line. *Am J Reprod Immunol*, 70(1), 80-86. doi:10.1111/aji.12129
- Arenas-Padilla, M., González-Rascón, A., Hernández-Mendoza, A., Calderón de la Barca, A. M., Hernández, J. et Mata-Haro, V. (2022). Immunomodulation by *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12: Integrative Analysis of miRNA Expression and TLR2 Pathway-Related Target Proteins in Swine Monocytes. *Probiotics Antimicrob Proteins*, 14(3), 510-522. doi:10.1007/s12602-021-09816-1
- Badacz, R., Kleczynski, P., Legutko, J., Zmudka, K., Gacon, J., Przewlocki, T. et Kablak-Ziembicka, A. (2021). Expression of miR-1-3p, miR-16-5p and miR-122-5p as Possible Risk Factors of Secondary Cardiovascular Events. *Biomedicines*, 9(8). doi:10.3390/biomedicines9081055
- Badacz, R., Przewlocki, T., Gacon, J., Stepień, E., Enguita, F. J., Karch, I., Zmudka, K. et Kablak-Ziembicka, A. (2018). Circulating miRNA levels differ with respect to carotid plaque characteristics and symptom occurrence in patients with carotid artery stenosis and provide information on future cardiovascular events. *Postępy Kardiologii Interwencyjnej*, 14(1), 75-84. doi:10.5114/aic.2018.74358
- Badimon, L. et Vilahur, G. (2014). Thrombosis formation on atherosclerotic lesions and plaque rupture. *J Intern Med*, 276(6), 618-632. doi:10.1111/joim.12296
- Bogucka-Kocka, A., Zalewski, D. P., Ruszel, K. P., Stępniewski, A., Gałkowski, D., Bogucki, J., Komsta, Ł., Kołodziej, P., Zubilewicz, T., Feldo, M. et Kocki, J. (2019). Dysregulation of MicroRNA Regulatory Network in Lower Extremities Arterial Disease. *Front Genet*, 10, 1200. doi:10.3389/fgene.2019.01200
- Brandes, R., Lang, F. et Schmidt, R. F. (2019). *Physiologie des Menschen : mit Pathophysiologie* (32nd ed. 2019 ed.). Berlin, Heidelberg.
- Cai, B., Thorp, E. B., Doran, A. C., Sansbury, B. E., Daemen, M. J., Dorweiler, B., Spite, M., Fredman, G. et Tabas, I. (2017). MerTK receptor cleavage promotes plaque necrosis and defective resolution in atherosclerosis. *J Clin Invest*, 127(2), 564-568. doi:10.1172/JCI90520
- Chang, Y. J., Li, Y. S., Wu, C. C., Wang, K. C., Huang, T. C., Chen, Z. et Chien, S. (2019). Extracellular MicroRNA-92a Mediates Endothelial Cell-Macrophage Communication. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 39(12), 2492-2504. doi:10.1161/ATVBAHA.119.312707
- Chanput, W., Mes, J. J., Savelkoul, H. F. et Wichers, H. J. (2013). Characterization of polarized THP-1 macrophages and polarizing ability of LPS and food compounds. *Food Funct*, 4(2), 266-276. doi:10.1039/c2fo30156c
- Chen, Z., Wen, L., Martin, M., Hsu, C. Y., Fang, L., Lin, F. M., Lin, T. Y., Geary, M. J., Geary, G. G., Zhao, Y., Johnson, D. A., Chen, J. W., Lin, S. J., Chien, S., Huang, H. D., Miller, Y. I., Huang, P. H. et Shyy, J. Y. (2015). Oxidative stress activates endothelial innate immunity via sterol regulatory element binding protein 2 (SREBP2) transactivation of microRNA-92a. *Circulation*, 131(9), 805-814. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.114.013675

- Cheng, Y., Tan, N., Yang, J., Liu, X., Cao, X., He, P., Dong, X., Qin, S. et Zhang, C. (2010). A translational study of circulating cell-free microRNA-1 in acute myocardial infarction. *Clin Sci (Lond)*, *119*(2), 87-95. doi:10.1042/CS20090645
- Ciesielska, A. et al., e. (2022). CD14 recycling modulates LPS-induced inflammatory responses of murine macrophages. *Traffic*, *23*(6), 310-330. doi:10.1111/tra.12842
- Collares, C. V., Evangelista, A. F., Xavier, D. J., Rassi, D. M., Arns, T., Foss-Freitas, M. C., Foss, M. C., Puthier, D., Sakamoto-Hojo, E. T., Passos, G. A. et Donadi, E. A. (2013). Identifying common and specific microRNAs expressed in peripheral blood mononuclear cell of type 1, type 2, and gestational diabetes mellitus patients. *BMC Res Notes*, *6*, 491. doi:10.1186/1756-0500-6-491
- D'Alessandra, Y., Devanna, P., Limana, F., Straino, S., Di Carlo, A., Brambilla, P. G., Rubino, M., Carena, M. C., Spazzafumo, L., De Simone, M., Micheli, B., Biglioli, P., Achilli, F., Martelli, F., Maggiolini, S., Marenzi, G., Pompilio, G. et Capogrossi, M. C. (2010). Circulating microRNAs are new and sensitive biomarkers of myocardial infarction. *Eur Heart J*, *31*(22), 2765-2773. doi:10.1093/eurheartj/ehq167
- Das, S. et Halushka, M. K. (2015). Extracellular vesicle microRNA transfer in cardiovascular disease. *Cardiovasc Pathol*, *24*(4), 199-206. doi:10.1016/j.carpath.2015.04.007
- Duewell, P., Kono, H., Rayner, K. J., Sirois, C. M., Vladimer, G., Bauernfeind, F. G., Abela, G. S., Franchi, L., Nunez, G., Schnurr, M., Espevik, T., Lien, E., Fitzgerald, K. A., Rock, K. L., Moore, K. J., Wright, S. D., Hornung, V. et Latz, E. (2010). NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature*, *464*(7293), 1357-1361. doi:10.1038/nature08938
- Economou, E. K., Oikonomou, E., Siasos, G., Papageorgiou, N., Tsalamandris, S., Mourouzis, K., Papaioanou, S. et Tousoulis, D. (2015). The role of microRNAs in coronary artery disease: From pathophysiology to diagnosis and treatment. *Atherosclerosis*, *241*(2), 624-633. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2015.06.037
- Egea, V., Megens, R. T. A., Santovito, D., Wantha, S., Brandl, R., Siess, W., Khani, S., Soehnlein, O., Bartelt, A., Weber, C. et Ries, C. (2023). Properties and fate of human mesenchymal stem cells upon miRNA let-7f-promoted recruitment to atherosclerotic plaques. *Cardiovasc Res*, *119*(1), 155-166. doi:10.1093/cvr/cvac022
- Elgueta, R., Benson, M. J., de Vries, V. C., Wasiuk, A., Guo, Y. et Noelle, R. J. (2009). Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system. *Immunol Rev*, *229*(1), 152-172. doi:10.1111/j.1600-065X.2009.00782.x
- Euler, G. et Parahuleva, M. (2025). Monocytic microRNAs—Novel targets in atherosclerosis therapy. *Br J Pharmacol*, *182*(2), 206-219. doi:10.1111/bph.16367
- Fang, Y. et Davies, P. F. (2012). Site-specific microRNA-92a regulation of Kruppel-like factors 4 and 2 in atherosusceptible endothelium. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, *32*(4), 979-987. doi:10.1161/ATVBAHA.111.244053
- Fasolo, F., Di Gregoli, K., Maegdefessel, L. et Johnson, J. L. (2019). Non-coding RNAs in cardiovascular cell biology and atherosclerosis. *Cardiovasc Res*, *115*(12), 1732-1756. doi:10.1093/cvr/cvz203
- Gillotte-Taylor, K., Boullier, A., Witztum, J. L., Steinberg, D. et Quehenberger, O. (2001). Scavenger receptor class B type I as a receptor for oxidized low density lipoprotein. *Journal of Lipid Research*, *42*(9), 1474-1482. doi:10.1016/s0022-2275(20)30281-9

- Gong, M., Yu, B., Wang, J., Wang, Y., Liu, M., Paul, C., Millard, R. W., Xiao, D. S., Ashraf, M. et Xu, M. (2017). Mesenchymal stem cells release exosomes that transfer miRNAs to endothelial cells and promote angiogenesis. *Oncotarget*, 8(28), 45200-45212. doi:10.18632/oncotarget.16778
- Gordon, S. et Martinez, F. O. (2010). Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity*, 32(5), 593-604. doi:10.1016/j.immuni.2010.05.007
- Goretti, E., Wagner, D. R. et Devaux, Y. (2014). miRNAs as biomarkers of myocardial infarction: a step forward towards personalized medicine? *Trends Mol Med*, 20(12), 716-725. doi:10.1016/j.molmed.2014.10.006
- Gou, L., Zhao, L., Song, W., Wang, L., Liu, J., Zhang, H., Huang, Y., Lau, C. W., Yao, X., Tian, X. Y., Wong, W. T., Luo, J. Y. et Huang, Y. (2018). Inhibition of miR-92a Suppresses Oxidative Stress and Improves Endothelial Function by Upregulating Heme Oxygenase-1 in db/db Mice. *Antioxid Redox Signal*, 28(5), 358-370. doi:10.1089/ars.2017.7005
- Herold, G. (2020). *Innere Medizin 2020*. Berlin.
- Hinkel, R., Penzkofer, D., Zuhlke, S., Fischer, A., Husada, W., Xu, Q. F., Baloch, E., van Rooij, E., Zeiher, A. M., Kupatt, C. et Dimmeler, S. (2013). Inhibition of microRNA-92a protects against ischemia/reperfusion injury in a large-animal model. *Circulation*, 128(10), 1066-1075. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.113.001904
- Huo, Y. et Ley, K. (2001). Adhesion molecules and atherogenesis. *Acta Physiol Scand*, 173(1), 35-43. doi:10.1046/j.1365-201X.2001.00882.x
- Jia, C., Xiong, M., Wang, P., Cui, J., Du, X., Yang, Q., Wang, W., Chen, Y. et Zhang, T. (2014). Notoginsenoside R1 attenuates atherosclerotic lesions in ApoE deficient mouse model. *PLoS One*, 9(6), e99849. doi:10.1371/journal.pone.0099849
- Johnson, S. M., Grosshans, H., Shingara, J., Byrom, M., Jarvis, R., Cheng, A., Labourier, E., Reinert, K. L., Brown, D. et Slack, F. J. (2005). RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell*, 120(5), 635-647. doi:10.1016/j.cell.2005.01.014
- Karere, G. M., Glenn, J. P., Li, G., Konar, A., VandeBerg, J. L. et Cox, L. A. (2023). Potential miRNA biomarkers and therapeutic targets for early atherosclerotic lesions. *Sci Rep*, 13(1), 3467. doi:10.1038/s41598-023-29074-1
- Katano, H., Nishikawa, Y., Yamada, H., Yamada, K. et Mase, M. (2018). Differential Expression of microRNAs in Severely Calcified Carotid Plaques. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 27(1), 108-117. doi:10.1016/j.jstrokecerebrovasdis.2017.08.009
- Kazimierczyk, E., Eljaszewicz, A., Kazimierczyk, R., Tynecka, M., Zembko, P., Tarasiuk, E., Kaminski, K., Sobkowicz, B., Moniuszko, M. et Tycinska, A. (2020). Altered microRNA dynamics in acute coronary syndrome. *Postepy Kardiol Interwencyjnej*, 16(3), 287-293. doi:10.5114/aic.2020.99263
- Kin, K., Miyagawa, S., Fukushima, S., Shirakawa, Y., Torikai, K., Shimamura, K., Daimon, T., Kawahara, Y., Kuratani, T. et Sawa, Y. (2012). Tissue- and plasma-specific MicroRNA signatures for atherosclerotic abdominal aortic aneurysm. *J Am Heart Assoc*, 1(5), e000745. doi:10.1161/JAHA.112.000745
- Kojima, Y., Downing, K., Kundu, R., Miller, C., Dewey, F., Lancero, H., Raaz, U., Perisic, L., Hedin, U., Schadt, E., Maegdefessel, L., Quertermous, T. et Leeper, N. J. (2014). Cyclin-dependent kinase inhibitor 2B regulates efferocytosis and atherosclerosis. *J Clin Invest*, 124(3), 1083-1097. doi:10.1172/JCI70391
- Kojima, Y., Volkmer, J. P., McKenna, K., Civelek, M., Lusic, A. J., Miller, C. L., Direnzo, D., Nanda, V., Ye, J., Connolly, A. J., Schadt, E. E., Quertermous, T., Betancur, P., Maegdefessel, L., Matic, L. P., Hedin, U., Weissman, I. L. et Leeper,

- N. J. (2016). CD47-blocking antibodies restore phagocytosis and prevent atherosclerosis. *Nature*, 536(7614), 86-90. doi:10.1038/nature18935
- Koutsis, G., Siasos, G.etSpengos, K. (2013). The emerging role of microRNA in stroke. *Curr Top Med Chem*, 13(13), 1573-1588. doi:10.2174/15680266113139990106
- Kuehbacher, A., Urbich, C., Zeiher, A. M.etDimmeler, S. (2007). Role of Dicer and Drosha for endothelial microRNA expression and angiogenesis. *Circ Res*, 101(1), 59-68. doi:10.1161/circresaha.107.153916
- Lee, S. H., Park, S. Y.etChoi, C. S. (2022). Insulin Resistance: From Mechanisms to Therapeutic Strategies. *Diabetes Metab J*, 46(1), 15-37. doi:10.4093/dmj.2021.0280
- Li, C.etCai, Q. (2024). Two ferroptosis-specific expressed genes NOX4 and PARP14 are considered as potential biomarkers for the diagnosis and treatment of diabetic retinopathy and atherosclerosis. *Diabetol Metab Syndr*, 16(1), 61. doi:10.1186/s13098-024-01301-3
- Li, T., Cao, H., Zhuang, J., Wan, J., Guan, M., Yu, B., Li, X.etZhang, W. (2011). Identification of miR-130a, miR-27b and miR-210 as serum biomarkers for atherosclerosis obliterans. *Clin Chim Acta*, 412(1-2), 66-70. doi:10.1016/j.cca.2010.09.029
- Lin, C. M., Wang, B. W., Pan, C. M., Fang, W. J., Chua, S. K., Cheng, W. P.etShyu, K. G. (2021). Chrysin boosts KLF2 expression through suppression of endothelial cell-derived exosomal microRNA-92a in the model of atheroprotection. *Eur J Nutr*, 60(8), 4345-4355. doi:10.1007/s00394-021-02593-1
- Long, G., Wang, F., Duan, Q., Chen, F., Yang, S., Gong, W., Wang, Y., Chen, C.etWang, D. W. (2012). Human circulating microRNA-1 and microRNA-126 as potential novel indicators for acute myocardial infarction. *Int J Biol Sci*, 8(6), 811-818. doi:10.7150/ijbs.4439
- Loyer, X., Potteaux, S., Vion, A. C., Guerin, C. L., Boulkroun, S., Rautou, P. E., Ramkhelawon, B., Esposito, B., Dalloz, M., Paul, J. L., Julia, P., Maccario, J., Boulanger, C. M., Mallat, Z.etTedgui, A. (2014). Inhibition of microRNA-92a prevents endothelial dysfunction and atherosclerosis in mice. *Circ Res*, 114(3), 434-443. doi:10.1161/CIRCRESAHA.114.302213
- Mangas, A., Pérez-Serra, A., Bonet, F., Muñoz, O., Fuentes, F., Gonzalez-Estrada, A., Campuzano, O., Rodriguez Roca, J. S., Alonso-Villa, E.etToro, R. (2022). A microRNA Signature for the Diagnosis of Statins Intolerance. *Int J Mol Sci*, 23(15). doi:10.3390/ijms23158146
- Mestas, J.etLey, K. (2008). Monocyte-endothelial cell interactions in the development of atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med*, 18(6), 228-232. doi:10.1016/j.tcm.2008.11.004
- Moriya, J. (2019). Critical roles of inflammation in atherosclerosis. *J Cardiol*, 73(1), 22-27. doi:10.1016/j.jjcc.2018.05.010
- Parahuleva, M. S., Euler, G., Mardini, A., Parviz, B., Schieffer, B., Schulz, R.etAslam, M. (2017). Identification of microRNAs as potential cellular monocytic biomarkers in the early phase of myocardial infarction: a pilot study. *Sci Rep*, 7(1), 15974. doi:10.1038/s41598-017-16263-y
- Parahuleva, M. S., Lipps, C., Parviz, B., Holschermann, H., Schieffer, B., Schulz, R.etEuler, G. (2018). MicroRNA expression profile of human advanced coronary atherosclerotic plaques. *Sci Rep*, 8(1), 7823. doi:10.1038/s41598-018-25690-4
- Park, E. K., Jung, H. S., Yang, H. I., Yoo, M. C., Kim, C.etKim, K. S. (2007). Optimized THP-1 differentiation is required for the detection of responses to weak stimuli. *Inflamm Res*, 56(1), 45-50. doi:10.1007/s00011-007-6115-5

- Pienimaeki-Roemer, A., Konovalova, T., Musri, M. M., Sigrüener, A., Boettcher, A., Meister, G. et Schmitz, G. (2017). Transcriptomic profiling of platelet senescence and platelet extracellular vesicles. *Transfusion*, 57(1), 144-156. doi:10.1111/trf.13896
- Robbins, C. S., Hilgendorf, I., Weber, G. F., Theurl, I., Iwamoto, Y., Figueiredo, J. L., Gorbato, R., Sukhova, G. K., Gerhardt, L. M., Smyth, D., Zavitz, C. C., Shikatani, E. A., Parsons, M., van Rooijen, N., Lin, H. Y., Husain, M., Libby, P., Nahrendorf, M., Weissleder, R. et Swirski, F. K. (2013). Local proliferation dominates lesional macrophage accumulation in atherosclerosis. *Nat Med*, 19(9), 1166-1172. doi:10.1038/nm.3258
- Saklayen, M. G. (2018). The Global Epidemic of the Metabolic Syndrome. *Curr Hypertens Rep*, 20(2), 12. doi:10.1007/s11906-018-0812-z
- Santovito, D., De Nardis, V., Marcantonio, P., Mandolini, C., Paganelli, C., Vitale, E., Buttitta, F., Bucci, M., Mezzetti, A., Consoli, A. et Cipollone, F. (2014). Plasma exosome microRNA profiling unravels a new potential modulator of adiponectin pathway in diabetes: effect of glycemic control. *J Clin Endocrinol Metab*, 99(9), E1681-1685. doi:10.1210/jc.2013-3843
- Schober, A. et Weber, C. (2016). Mechanisms of MicroRNAs in Atherosclerosis. *Annu Rev Pathol*, 11, 583-616. doi:10.1146/annurev-pathol-012615-044135
- Schrijvers, D. M. et al., e. (2005). Phagocytosis of apoptotic cells by macrophages is impaired in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 25(6), 1256-1261. doi:10.1161/01.ATV.0000166517.18801.a7
- Selvamani, A., Sathyan, P., Miranda, R. C. et Sohrabji, F. (2012). An antagomir to microRNA Let7f promotes neuroprotection in an ischemic stroke model. *PLoS One*, 7(2), e32662. doi:10.1371/journal.pone.0032662
- Silbernagl, S. et Lang, F. (2019). *Taschenatlas Pathophysiologie* (6 ed.). Stuttgart: Thieme.
- Spear, R., Boytard, L., Blervaque, R., Chwastyniak, M., Hot, D., Vanhoutte, J., Lamblin, N., Amouyel, P. et Pinet, F. (2019). Let-7f: A New Potential Circulating Biomarker Identified by miRNA Profiling of Cells Isolated from Human Abdominal Aortic Aneurysm. *Int J Mol Sci*, 20(21). doi:10.3390/ijms20215499
- Stewart, C. R., Stuart, L. M., Wilkinson, K., van Gils, J. M., Deng, J., Halle, A., Rayner, K. J., Boyer, L., Zhong, R., Frazier, W. A., Lacy-Hulbert, A., El Khoury, J., Golenbock, D. T. et Moore, K. J. (2010). CD36 ligands promote sterile inflammation through assembly of a Toll-like receptor 4 and 6 heterodimer. *Nat Immunol*, 11(2), 155-161. doi:10.1038/ni.1836
- Veerman, K. M., Carlow, D. A., Shanina, I., Priatel, J. J., Horwitz, M. S. et Ziltener, H. J. (2012). PSGL-1 regulates the migration and proliferation of CD8(+) T cells under homeostatic conditions. *J Immunol*, 188(4), 1638-1646. doi:10.4049/jimmunol.1103026
- Wang, Z., Zhang, J., Zhang, S., Yan, S., Wang, Z., Wang, C. et Zhang, X. (2019). MiR-30e and miR-92a are related to atherosclerosis by targeting ABCA1. *Mol Med Rep*, 19(4), 3298-3304. doi:10.3892/mmr.2019.9983
- Wronska, A., Kurkowska-Jastrzebska, I. et Santulli, G. (2015). Application of microRNAs in diagnosis and treatment of cardiovascular disease. *Acta Physiol (Oxf)*, 213(1), 60-83. doi:10.1111/apha.12416
- Wu, W., Xiao, H., Laguna-Fernandez, A., Villarreal, G., Jr., Wang, K. C., Geary, G. G., Zhang, Y., Wang, W. C., Huang, H. D., Zhou, J., Li, Y. S., Chien, S., Garcia-Cardena, G. et Shyy, J. Y. (2011). Flow-Dependent Regulation of Kruppel-Like

- Factor 2 Is Mediated by MicroRNA-92a. *Circulation*, 124(5), 633-641. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.110.005108
- Yang, L.etLi, T. (2020). LncRNA TUG1 regulates ApoM to promote atherosclerosis progression through miR-92a/FXR1 axis. *J Cell Mol Med*, 24(15), 8836-8848. doi:10.1111/jcmm.15521
- Yvan-Charvet, L., Pagler, T. A., Seimon, T. A., Thorp, E., Welch, C. L., Witztum, J. L., Tabas, I.etTall, A. R. (2010). ABCA1 and ABCG1 protect against oxidative stress-induced macrophage apoptosis during efferocytosis. *Circ Res*, 106(12), 1861-1869. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.217281

8 Abkürzungsverzeichnis

3'UT-Region	3' untranslatierter Bereich
Aqua dest.	Aqua destillata, destilliertes Wasser
CCL-19	Chemokine ligand 19
CCL-21	Chemokine ligand 21
CD	Cluster of differentiation
CD40L	CD40-Ligand
cDNA	complementary DNA, komplementäre DNA
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Cq-Wert	Quantifizierungszyklus
CrP	C-reaktives Protein
DMSZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
Fas-L	Fas-Ligand
FCS	fetal bovine serum, fetales Kälberserum
Gas6	Growth arrest-specific 6 (Gen)
GPI-Anker	Glykosylphosphatidylinositol-Anker
hprt	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule 1
IL	Interleukin
INF γ	Interferon γ
INF β	Interferon β
KHK	Koronare Herzkrankheit
KLF-4	Kruppel-like Faktor-4
LBP	Lipopolysaccharid bindendes Protein
LDL	Low-density Lipoprotein
LOX-1	Lectin-like oxidized LDL-Rezeptor-1
LPS	Lipopolysaccharid
M-CSF	Macrophage colony-stimulating factor
MerTK	Mer Proto-Onkogen, Tyrosin Kinase (Gen)
miR	microRNA
miRNA	microRNA, microRibonukleinsäure
MMP-2	Matrix-Metalloprotease-2
MMP-9	Matrix-Metalloprotease-9

mRNA	messenger-RNA, Boten-Ribonukleinsäure
MyD88	Myeloid differentiation factor 88
NFκB	Nuclear factor “kappa-light-chain-enhancer” of activated B-cells
NLRP3	Caspase-1-activated nucleotide-binding domain and leucin-rich repeat pyrin domain containing 3
NO	Stickstoffmonoxid
Opti-MEM	Kulturmedium, Minimum Essential Medium
PBS	phosphate-buffered saline, Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
pre-microRNA	Precursor-microRNA
pri-microRNA	primäre microRNA
PRR	Pattern Recognition Rezeptoren
PSGL-1	P-Selektin-Glykoprotein-Ligand-1
RNase	Ribonuklease
RPMI	Zellkulturmedium, entwickelt am Roswell Park Memorial Institute
RT-PCR	Real-time PCR
SNORD44	small nucleolar RNA, C/D Box 44, RNA Gen
SR-A	Scavenger Rezeptor A
SR-B1	Scavenger Rezeptor B Typ 1
SR-PSOX	Scavenger Rezeptor für Phosphatidylserin und oxidiertes Lipoprotein
TAE	Tris-Acetat-EDTA Puffer
TGFβ	Transforming growth factor β
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNFα	Tumornekrosefaktor α
TRIF	Toll-like-Rezeptor domain containing adaptor
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule 1
VLA-4	Very-late antigen 4

9 Publikationsverzeichnis

Die vorläufigen Ergebnisse der Dissertation wurden als Poster bei folgenden Kongressen präsentiert:

- *100. Jahrestagung der Deutschen Physiologischen Gesellschaft in Frankfurt am Main (DPG) 10/2021*

- *88. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie in Mannheim (DGK) 04/2022*

10 Erklärung zur Dissertation

Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort/Datum

Unterschrift

11 Danksagung

Die Danksagung wurde aus der elektronischen Version der Arbeit entfernt.

12 Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen Version der Arbeit entfernt.