

Differentielle Expression von microRNAs nach Ischämie/Reperfusion und
permanenter Ischämie des Myokards und Verbesserung der systolischen
Funktion nach Myokardinfarkt durch Inhibierung von miR-223 in der Maus

Inauguraldissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Medizin

der Justus- Liebig- Universität Gießen

Vorgelegt von Florian Rybinski aus Stuttgart

Gießen 2023

Differentielle Expression von microRNAs nach Ischämie/Reperfusion und
permanenter Ischämie des Myokards und Verbesserung der systolischen
Funktion nach Myokardinfarkt durch Inhibierung von miR-223 in der Maus

Inauguraldissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Medizin

der Justus- Liebig- Universität Gießen

Vorgelegt von Florian Rybinski aus Stuttgart

Gießen 2023

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus- Liebig- Universität Gießen

Campus Kerckhoff der Justus- Liebig- Universität Gießen

Gutachter: PD Dr. Christian Troidl

Gutachter: Prof. Dr. Dr. Rainer Schulz

Tag der Disputation: 19.02.2024

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	1
1.1 Definition und Begrifflichkeit der ischämischen Herzkrankheit.....	1
1.2 Epidemiologie und sozioökonomische Bedeutung der ischämischen Herzkrankheit	1
1.3 Myokardinfarkt.....	2
1.3.1 Definition.....	2
1.3.2 Diagnose und Therapie.....	3
1.3.3 Stand der Versorgung.....	4
1.3.4 Ätiologie des Myokardinfarkts	4
1.3.5 Komplikationen	5
1.4 Ischämie/ Reperfusionsschaden	6
1.5 MicroRNA.....	9
1.5.1 Biogenese und Regulation.....	9
1.5.2 Rolle von miRNA bei myokardialer Ischämie	11
1.5.3 Expression von miR-223	11
1.5.4 Bekannte Funktionen von miR-223: Stand der Forschung vor dieser Arbeit.....	13
1.6 Fragestellung der Arbeit.....	15
2 Material und Methoden	16
2.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen	16
2.2 Differentielle Expression von miRNA nach Myokardinfarkt und Ischämie/ Reperfusion	16
2.2.1 miRNA- microarray	16
2.2.2 Quantitative real- time PCR.....	22
2.3 miR-223- Expressionsprofil	26
2.3.1 Gewebeproben.....	26
2.3.2 Gewinnung von neonatalen Ratten- Kardiomyozyten und -Fibroblasten	26
2.3.3. Gewinnung von TIB71 und NB4- Zellen.....	27
2.4 In- situ- Hybridisierung	27
2.4.1 Einleitung.....	27
2.4.1 Verwendete Sonde und Locked nucleic acid- modifizierte RNA (LNA)	27
2.4.2 Entwicklung des Hybridisierungsprotokolls und Übersicht über das Protokoll	28
2.4.3 Protokoll in-situ-Hybridisierung	32
2.5 Inhibition von miR-223	33
2.5.1 Murine Echokardiografie.....	33
2.5.2 Narbengröße nach I/R unter Inhibition von miR-223.....	34

3 Ergebnisse.....	36
3.1 Differentielle Expression von miRNA nach Myokardinfarkt und Ischämie/ Reperfusion	36
3.1.1 MiRNA Microarray.....	36
3.1.2 Validierung der Microarray- Daten mittels qRT-PCR.....	38
3.2 Expression von miR-223 in verschiedenen Geweben und Zellreihen.....	40
3.3 Lokalisation von miR-223 im Herzen nach I/R und permanenter Ischämie	41
3.4 Antagonisierung von miR-223 <i>in vivo</i>	45
3.4.1 Validierung der Antagonisierung.....	45
3.4.2 Antagonisierung von miR-223 vor experimentellem Myokardinfarkt	46
3.4.3 Echokardiografie nach Antagonisierung von miR-223 und experimentellem Myokardinfarkt.....	46
3.4.4 Narbengröße nach Antagonisierung von miR-223 vor experimentellem Myokardinfarkt.....	49
4 Diskussion.....	51
4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse	51
4.2 Diskussion	52
4.2.1 Differentielle Expression von miRNA nach Myokardinfarkt und Ischämie/ Reperfusion	52
4.2.2 Expression von miR-223 in verschiedenen Geweben und Zellreihen	53
4.2.3 Expression von miR-223 im Herzen nach I/R und permanenter Ischämie.....	54
4.2.4 Antagonisierung von miR-223 <i>in vivo</i>	55
4.3 Einordnung in den Stand der Forschung und Ausblick.....	56
4.3.1 Thrombozytenaggregation	56
4.3.2 Angiogenese	57
4.3.3 Lipidmetabolismus und Atherogenese.....	57
4.3.4 Inflammation und Apoptose	58
4.3.5 Myokardiales Remodeling und Kontraktilität	60
4.4 Ausblick und Fazit.....	60
5 Zusammenfassung.....	62
6 Abkürzungsverzeichnis	64
7 Publikationsverzeichnis	66
Wissenschaftliche Beiträge	75
Ehrenwörtliche Erklärung.....	76
Danksagung	77
Curriculum Vitae.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.

1 Einleitung

1.1 Definition und Begrifflichkeit der ischämischen Herzkrankheit

Der ischämischen Herzkrankheit werden unter epidemiologischen Gesichtspunkten Myokardinfarkt, *Angina pectoris* und ischämische Herzinsuffizienz zugeordnet. Diesen drei Krankheitsentitäten liegt ein gemeinsamer Pathomechanismus zugrunde, nämlich eine im Verhältnis zu den metabolischen Bedürfnissen des Myokards inadäquate Versorgung mit Sauerstoff.¹ Der Terminus „Herzinfarkt“ bezeichnet dabei die Nekrose myokardialer Zellen durch eine myokardiale Ischämie.² *Angina pectoris* ist der klinische Terminus für ein Engegefühl in der Brust und das Leitsymptom einer myokardialen Ischämie. In epidemiologischen Studien wird der Begriff allerdings für die stabile koronare Herzkrankheit (stabile KHK) verwendet,³ die sich durch *Angina pectoris*, aber auch andere Symptome äußern kann, die auf pathologische oder auch anatomisch oder funktionell stabile koronare Verhältnisse zurückzuführen sind.⁴ Unter Herzinsuffizienz versteht man Symptome und Untersuchungsbefunde, die auf eine verminderte Auswurfleistung des Herzens zurückzuführen sind;⁵ unter ischämischer Herzinsuffizienz wird dementsprechend eine Herzinsuffizienz verstanden, der ätiologisch eine verminderte Sauerstoffversorgung des Myokards zugrunde liegt.

1.2 Epidemiologie und sozioökonomische Bedeutung der ischämischen Herzkrankheit

Die ischämische Herzkrankheit ist weltweit die aktuell häufigste Todesursache⁶ und die Erkrankung, die zu den meisten durch einen vorzeitigen Tod verlorenen Lebensjahren führt.³ Die bei weitem häufigste Ursache der ischämischen Herzkrankheit ist die koronare Herzkrankheit.⁷ Während die altersstandardisierte Inzidenz des Myokardinfarkts und der *Angina pectoris* seit 1990 in Europa abnimmt, steigt demgegenüber die Prävalenz der ischämischen Herzinsuffizienz an. Damit ist auch ein Anstieg der mit der Krankheit gelebten Lebensjahre verbunden, was auf eine geringere Mortalität zurückzuführen ist^{8,9}. In Deutschland werden die Behandlungskosten für die ischämische Herzkrankheit mit 6 Milliarden Euro pro Jahr beziffert. Hinzu kommen Behandlungskosten für die Herzinsuffizienz, deren häufigste Ursache in Deutschland die ischämische Herzkrankheit ist,^{10, 11} mit über 3 Milliarden Euro jährlich bei steigender Tendenz.¹² Die ischämische

Herzinsuffizienz entwickelt sich in der Regel in der Folge eines akuten Myokardinfarkts. Eine Verschlechterung der Herzfunktion ohne eine myokardiale Infarzierung ist selten,¹³ wobei Myokardinfarkte auch asymptomatisch verlaufen können.

1.3 Myokardinfarkt

1.3.1 Definition

Unter einem Myokardinfarkt versteht man eine myokardiale Nekrose durch eine Ischämie. Für die klinische Diagnose und Klassifizierung eines Myokardinfarkts wurden mit der vierten universellen Definition des Myokardinfarkts von 2018 stringente Kriterien festgelegt.² Im Vordergrund stehen dabei dynamische Veränderungen von kardialen biochemischen Markern (Biomarkern) und insbesondere des Troponins und die Abgrenzung einer ischämischen Ursache dieser Erhöhung von einer nicht-ischämischen. Nach dieser Definition wird die Diagnose eines nicht periprozedural im Rahmen einer Bypassoperation oder einer Koronarangiografie eingetretenen Myokardinfarkts durch dynamische Veränderungen des Troponins mit mindestens einem Wert über der 99. Perzentile des Referenzbereichs gestellt, wobei für die Annahme einer ischämischen Genese die Erfüllung zusätzlicher Kriterien gefordert wird. Zu diesen Kriterien gehören Symptome einer kardialen Ischämie, wie bei *Angina pectoris* oder bei Angina-Äquivalenten, charakteristische Veränderungen des Elektrokardiogramms (EKG), ein Nachweis von neuen Wandbewegungsstörungen oder eines Verlustes eines vormals vitalen Myokards und der Nachweis eines intrakoronaren Thrombus durch eine Angiografie oder bei einer Autopsie. Wenn beim Tod eines Patienten durch eine kardiale Ursache ein Myokardinfarkt vermutet wird, ohne dass kardiale Biomarker vorliegen oder der Patient verstirbt, ohne dass zu diesem Zeitpunkt bereits ein Anstieg der Biomarker zu erwarten gewesen wäre, dann kann die Diagnose dennoch gestellt werden, wenn Symptome einer kardialen Ischämie und für eine Ischämie typische EKG-Veränderungen vorlagen. Periprozedurale Myokardinfarkte bei Bypassoperationen, perkutanen Koronarinterventionen oder Stentthrombosen werden gesondert definiert, wobei für die Diagnose dynamische Erhöhungen des Troponins mit besonderen Grenzwerten in einem Zusammenhang mit der Evidenz einer ischämischen Genese dieser Erhöhungen gefordert werden.

1.3.2 Diagnose und Therapie

Bei Patienten mit klinisch begründetem Verdacht auf einen akuten Myokardinfarkt wird zunächst die Diagnose eines akuten Koronarsyndroms gestellt. Typische Beschwerden sind dabei ein thorakales Enge- oder Schweregefühl, das über 20 Minuten lang in Ruhe andauert, neu bei Anstrengung auftritt oder bei vormals stabilem Auftreten bei stärkerer Belastung bereits bei geringer Anstrengung auftritt. Auch bei Patienten mit *Angina pectoris* nach einem vormaligen Myokardinfarkt wird zunächst von einem akuten Koronarsyndrom ausgegangen.¹⁴ Als atypische Beschwerden treten beispielsweise epigastrische Schmerzen, Völlegefühl oder isolierte Dyspnoe auf, die sich häufiger bei Diabetikern, älteren Patienten, Frauen oder Patienten mit chronischer Nierenerkrankung oder Demenz zeigen.¹⁴ Die körperliche Untersuchung ist bei einer ischämischen Genese der Beschwerden oft nicht diagnostisch wegweisend, kann aber eine Abgrenzung von anderen kardiovaskulären und extrakardialen Differentialdiagnosen ermöglichen und dabei helfen, Hinweise für Komplikationen zu finden, wie Anzeichen für eine Herzinsuffizienz oder Vitien.

Nach der Diagnose «akutes Koronarsyndrom» dient die weitere Diagnostik der Risikostratifizierung, um die Patienten einer hinsichtlich der Dringlichkeit und der Invasivität angepassten Diagnostik und Therapie zuzuführen. Nach den Ergebnissen der EKG-Untersuchung und der Troponin-Konzentration können die Patienten einer von drei Gruppen zugeordnet werden:

Myokardinfarkt mit persistierenden ST-Hebungen

Myokardinfarkt ohne ST-Hebungen

Instabile *Angina pectoris*

Die Zuordnung zu einer dieser Gruppen entscheidet über die weitere Behandlung der Patienten. So wird beispielsweise bei Patienten mit persistierenden ST-Hebungen im EKG eine sofortige Reperfusion des Myokards durch eine Wiedereröffnung des verschlossenen Gefäßes mit einer perkutanen Koronarintervention (percutaneous coronary intervention, PCI) oder einer medikamentösen Thrombolyse angestrebt,¹⁵ während ansonsten die Revaskularisation durch eine PCI zu einem späterem und an das Risiko angepassten Zeitpunkt erfolgen kann.¹⁴

Die Rekanalisierung der verschlossenen Koronararterie führt zu einer geringeren Infarktgrösse und einer verringerten Morbidität und Mortalität,¹⁶⁻¹⁸ wobei dieser Erfolg vom Zeitpunkt der Intervention und der Erfolgs- und Komplikationsrate bei der gewählten Reperfusionstrategie abhängt.¹⁹ Dabei stellt die PCI seit wegweisenden Studien, die die Überlegenheit gegenüber der Thrombolyse zeigen konnten,^{20, 21} den Goldstandard dar. Die Einführung von intrakoronaren Stents, wobei zunächst bare-metal-Stents²² und später mit Medikamenten beschichtete Stents²³ verwendet wurden, bildeten in diesem Zusammenhang eine weitere Verbesserung. Nur noch in Situationen, in denen eine PCI nicht innerhalb von zwei Stunden nach dem medizinischen Erstkontakt durchgeführt werden kann, sollte besonders bei Personen, die sich früh nach dem Beschwerdebeginn vorstellen, primär eine medikamentöse Thrombolyse und dann später eine PCI durchgeführt werden.^{15, 24, 25}

1.3.3 Stand der Versorgung

Die Versorgung von Patienten mit akutem Myokardinfarkt in Deutschland ist gemessen an Kennzahlen, wie der Zeit zwischen medizinischem Erstkontakt und Reperfusion, beim grössten Teil der Patienten innerhalb der von den aktuellen Leitlinien vorgegebenen Zeit¹⁵ möglich.²⁶ Diese Empfehlungen basieren auf der Beobachtung, dass die Zeit vom Symptombeginn bis zur Reperfusion einen direkten und deutlichen Einfluss auf die Mortalität hat.²⁷ Interessanterweise konnte eine Studie aus den USA zeigen, dass eine weitere Reduktion der Zeit vom Eintreffen des Patienten im Krankenhaus bis zur Reperfusion von 83 auf 67 Minuten, was unterhalb der in den Leitlinien geforderten 90 Minuten liegt, nicht mehr zu einem weiteren Rückgang der Mortalität nach 30 Tagen führt.²⁸ Dadurch rücken neben einer weiteren Optimierung der Abläufe für eine Minimierung der Zeit zwischen medizinischem Erstkontakt und Reperfusion auch Therapieversuche in den Fokus, die als Ergänzung zur zeitlich und technisch optimalen Reperfusion den entstandenen Schaden am Myokard eingrenzen oder sogar zum Teil rückgängig machen können.

1.3.4 Ätiologie des Myokardinfarkts

Ätiologisch werden nach der vierten universellen Definition des Myokardinfarkts fünf Typen unterschieden.² Beim Myokardinfarkt Typ 1 liegen eine Ruptur, Fissur oder Erosion einer atherosklerotischen Plaque mit einer sich daraus ergebenden intraluminalen Thrombusbildung oder Embolisierung von Thrombusbestandteilen in den folgenden

Gefäßen zugrunde. Beim Myokardinfarkt Typ 2 kommt es durch eine andere Ursache als eine koronare Herzkrankheit zu einer Imbalance zwischen Sauerstoffbedarf und -versorgung, die zu einer myokardialen Nekrose führt. Dazu gehören z. B. embolische Verschlüsse der Koronararterien, aber auch koronare Spasmen, Hypoxämie oder Hypotonie. Ein Myokardinfarkt Typ 3 wird postuliert, wenn ein Patient mit typischen Symptomen eines Myokardinfarkts verstorben ist, ohne dass ein Anstieg kardialer Biomarker nachgewiesen werden konnte. Dies kann etwa dann auftreten, wenn der Patient vor der Blutentnahme verstirbt oder ein Anstieg der Biomarker wegen des kurzen Abstands zwischen dem Symptombeginn und der Blutabnahme nicht erwartet werden konnte. Ein Myokardinfarkt Typ 4 tritt bei einer PCI auf; entweder in einem direkten Zusammenhang mit der Intervention oder zeitlich verzögert als In-Stent-Thrombose. Analog dazu wird ein Myokardinfarkt, der als Folge einer aortokoronaren Bypassoperation auftritt, als Myokardinfarkt Typ 5 bezeichnet. Für die interventionsbedingten Myokardinfarkte gelten jeweils gesonderte Kriterien für die kardialen Biomarker. So wird beim Myokardinfarkt Typ 4 ein Anstieg über das Fünffache der 99. Perzentile bei normalen Ausgangswerten oder um mindestens 20 Prozent bei vorher fallenden oder stabilen Biomarkern gefordert. Bei einem Myokardinfarkt Typ 5, der mit einer aortokoronaren Bypass-Operation verbunden ist, sollte ein Anstieg um das Zehnfache der 99. Perzentile vorliegen.

1.3.5 Komplikationen

Zu den Komplikationen des Myokardinfarkts zählen hämodynamische Komplikationen, Arrhythmien und mechanische Komplikationen. Dabei kann eine Herzinsuffizienz sowohl direkte Folge des Infarkts sein, als auch indirekt durch die Arrhythmien und mechanischen Komplikationen auftreten. Bei der Aufnahme präsentieren sich ca. 25 %^{29, 30} mit klinischen Anzeichen einer Herzinsuffizienz (Kilip-Klasse ≥ 2).

Eine Herzinsuffizienz nach der Akutphase des Myokardinfarkts korreliert gut mit der Infarktgröße, wobei meist erst ab einer Infarktgröße von ca. 14 % der Masse des linken Ventrikels eine Beeinträchtigung der linksventrikulären Auswurfraction (LVEF, left ventricular ejection fraction) festzustellen ist.³¹ In dieser Studie zeigten nur ca. 3 % sechs Monate nach einem Myokardinfarkt eine klinische Herzinsuffizienz, während in einer anderen Studie³² im Mittel nach erst ca. 6 Jahren bei insgesamt 30 % eine Herzinsuffizienz auftrat.

Die Bedeutung der durch einen Myokardinfarkt bedingten Herzinsuffizienz und ihr Zusammenhang mit der Infarktgröße zeigt sich vor allem in der Gruppe der am schwersten betroffenen Patienten mit kardiogenem Schock.³³ Durch die verbesserten Therapieoptionen konnte zwar die Mortalität von 2003 bis 2010 von 45 % auf 34 % gesenkt werden, aber die Inzidenz stieg in diesem Zeitraum bei den Patienten mit STEMI auch von 6,5 % auf 10,1 % an.³⁴ Damit war sowohl ein deutlicher Anstieg der Verweildauer im Krankenhaus als auch der Kosten verbunden. Die häufigste Ursache für einen kardiogenen Schock ist mit ca. 80 % ein Pumpversagen des linken Ventrikels durch einen ausgedehnten Infarkt mit einem Verlust der Kontraktilität, gefolgt von einer schweren Mitralinsuffizienz, einer Ventrikelseptumruptur, einem rechtsventrikulären Infarkt und der Ruptur des Ventrikels mit Perikardtamponade.³⁵

Ein weiteres Phänomen, das zur Entwicklung einer Herzinsuffizienz beiträgt, ist das Remodeling bzw. der strukturelle Umbau des Herzens, zu dem es nach einem Infarkt kommen kann. Entscheidend für das Remodeling ist eine durch den Ausfall eines Teils des Myokards bedingte Veränderung der Ventrikelgeometrie durch eine Dilatation des Ventrikels oder das Entstehen von Vitien. Beides kann durch eine verstärkte Volumenbelastung des Ventrikels zu einer weiteren Zunahme der Dilatation des Ventrikels führen.³⁶

Es wird klar, wie wichtig es ist, durch unterschiedliche Ansätze die Infarktgröße zu reduzieren, wenn man bedenkt, dass die Infarktgröße auch beim Einsatz modernster Therapie nach wie vor den Hauptrisikofaktor für die Entwicklung eines kardiogenen Schocks und die Entwicklung einer Herzinsuffizienz nach Remodeling darstellt.

1.4 Ischämie/ Reperfusionsschaden

Bereits kurz nach der Erkenntnis, dass eine Koronarthrombose die Ursache und nicht ein Nebeneffekt eines Myokardinfarkts ist,³⁷ wurde nach ersten erfolgreichen Versuchen einer Revaskularisation der Koronarthrombose die These aufgestellt, dass die Reperfusion neben der Verringerung der Infarktgröße auch mit negativen Effekten verbunden sein kann,³⁸ wobei etwa eine beschleunigte Nekrose irreversibel geschädigter Kardiomyozyten, das No-reflow-Phänomen, Stunning und Reperusionsarrhythmien erwähnt wurden.

Aktuell werden unter dem Begriff Ischämie/ Reperfusionsschaden Reperfusionsarrhythmien, myokardiales Stunning, mikrovaskuläre Obstruktion und letaler Reperfusionsschaden zusammengefasst. Reperfusionsarrhythmien sind meistens ventrikuläre Arrhythmien, die unabhängig von der Reperfusionsmodalität innerhalb von 48 h auftreten. Dabei handelt es sich hauptsächlich um nicht bedrohliche Rhythmusstörungen, wie einen akzelerierten idioventrikulären Rhythmus, nicht anhaltende ventrikuläre Tachykardien, gehäufte ventrikuläre Extrasystolen oder Vorhofflimmern. Deutlich seltener treten anhaltende ventrikuläre Tachykardien, höhergradige AV-Blockierungen oder Kammerflimmern auf.³⁹

Unter myokardialem Stunning versteht man eine reversible Einschränkung der myokardialen Kontraktilität in einem Gebiet mit ansonsten vitalen Kardiomyozyten.⁴⁰ Die zellulären Mechanismen, die zu einem Verlust der Kontraktilität führen, sind bisher nicht geklärt, es werden aber eine Störung des Calciumhaushalts und des sarkoplasmatischen Retikulums und auch die Auswirkungen freier Sauerstoffradikale auf den kontraktilen Apparat diskutiert.⁴¹ Da dieser Zustand innerhalb von Tagen bis Wochen spontan reversibel ist, ergibt sich daraus außer bei einem kardiogenen Schock in der Regel keine therapeutische Konsequenz. Im Falle eines kardiogenen Schocks wird entsprechend mit Inotropika behandelt, wodurch das im Stunning befindliche Myokard wieder an der Kontraktion teilnehmen kann.⁴² Unter «hibernating myocardium» (überwinterndes Myokard) versteht man im Unterschied zum Stunning eine eingeschränkte Kontraktilität aufgrund einer Ischämie ohne Nekrose bzw. Infarzierung. In diesem Zustand reicht die Sauerstoffversorgung aus, dass die Zellen des Myokards überleben können, aber nicht, um eine Kontraktion zu ermöglichen. Die Kontraktilität des hibernating myocardiums lässt sich in der Regel über ein Zwischenstadium des Stunnings durch eine Reperfusion wiederherstellen.⁴²

Das No-Reflow-Phänomen bezeichnet einen unzureichenden Blutfluss nach einer Wiedereröffnung der den Infarkt verursachenden epikardialen Arterie.⁴³ Angiografisch zeigt sich dies an einem, trotz vollständig wiedereröffnetem Gefäß, langsamen oder fehlenden intrakoronaren Fluss. Das Auftreten des No-Reflow-Phänomens ist dabei mit größeren Infarkten, einer schlechteren Herzfunktion, schlechteren Überlebensraten und Herzinsuffizienz verbunden.⁴⁴⁻⁴⁶ Pathophysiologisch gibt es für dieses Phänomen mehrere Ursachen. Sowohl eine Obstruktion des Gefäßlumens durch geschädigte Endothelzellen, eine verminderte Stickstoffmonoxid-Produktion mit einer konsekutiven

Vasokonstriktion, eine Störung der vaskulären Integrität mit einer Extravasation von Plasma und zellulären Blutbestandteilen als auch eine Schwellung der Kardiomyozyten können zu einem reduzierten Blutfluss führen.⁴⁴ Bei der Reperfusion kommt es darüber hinaus zu einer Aktivierung der dann in das Infarktgebiet strömenden Granulozyten und Thrombozyten und einer entsprechenden Bindung an die Gefäßwand, wodurch es zu einer mechanischen Obstruktion kleiner Gefäße kommt.⁴⁴ Außerdem kann es bei der mechanischen Rekanalisation durch eine Fragmentierung des Thrombusmaterials auch zu einer distalen Embolisierung kommen.⁴⁴

Um einer Embolisierung bei der mechanischen Rekanalisation vorzubeugen, wurden Verfahren zur Entfernung des Thrombusmaterials entwickelt, wie etwa die Thrombusaspiration. In klinischen Studien konnten zunächst bessere Ergebnisse nach einer Thrombusaspiration erzielt werden,^{47, 48} aber in Metaanalysen konnte kein langfristiger Vorteil nachgewiesen werden,^{49, 50} weshalb eine routinemäßige Thrombusaspiration bei akutem Myokardinfarkt aktuell nicht empfohlen wird.⁵¹

Unter einem Reperfusionsschaden versteht man im engeren Sinne den durch die Reperfusion erfolgenden Zelltod von Kardiomyozyten, die zum Zeitpunkt der Reperfusion noch lebensfähig waren und nach der Reperfusion untergehen. Der Anteil des vorher ischämischen Myokards, der bei der Reperfusion noch nicht irreversibel geschädigt wurde, sollte deshalb durch eine Verhinderung des Reperfusionsschadens zu retten sein. Die Theorie des Reperfusionsschadens konnte durch Interventionen zu Beginn der Reperfusion unterstützt werden, da damit nicht mehr der bereits eingetretene ischämische Schaden beeinflusst werden kann. Dies gelang erstmals durch ein mehrmaliges Öffnen und Verschließen einer Koronararterie am Ende einer längeren Ischämiephase (Postconditioning) am Hundeherz, wobei eine Reduktion der endgültigen Infarktgröße um ca. 30-40 % erreicht werden konnte.⁵² Während in kleineren Studien nach Postconditioning auch beim Menschen eine Reduktion der Infarktgröße oder der Surrogatparameter, wie der Kreatinkinase, beobachtet werden konnte, konnte dies in größeren Studien bisher nicht bestätigt werden.⁵³ Auch eine wiederholte künstliche Ischämie der Extremitäten vor der Reperfusion (Remote ischemic Preconditioning) führte im Tiermodell zu einer Reduktion der Infarktgröße,^{54,55} ein remote ischemic conditioning zeigte in einer größeren klinischen Studie aber keine Wirksamkeit.⁵⁶ Auch pharmakologische Interventionen zum Zeitpunkt der Reperfusion wurden untersucht. Der Einsatz von Ciclosporin A führte zwar in kleineren Studien zu einem Vorteil, dieser

Effekt konnte aber in einer größeren Studie nicht bestätigt werden.^{57, 58} Für Metoprolol konnten in einer großen Studie keine Vorteile nachgewiesen werden.⁵⁹ Auch für den Glucagon-like-Peptide (GLP) 1-Agonisten Exenatid konnten nach vielversprechenden ersten Resultaten⁶⁰ in einer größeren Studie⁶¹ keine positiven Effekte ermittelt werden. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass trotz vielversprechender experimenteller Daten bisher für keinen Ansatz ein Nutzen hinsichtlich der Reduktion der Ischämie und des Reperfusionsschadens in klinischen Studien nachgewiesen werden konnte.

1.5 MicroRNA

Micro-Ribonukleinsäuren (micro ribonucleic acid, miRNA), sind kleine und ca. 20-23 Nukleotide lange einzelsträngige RNA-Moleküle. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation der Genexpression durch eine Steuerung des Abbaus und der Inaktivierung von Boten-Ribonukleinsäuren (messenger-RNA, mRNAs).^{62, 63} Dabei vermitteln sie Proteinen, die mRNA abbauen oder für die Translation unzugänglich machen können, durch eine Basenpaarung mit der Ziel-mRNA eine Spezifität für die mRNA, zu der sie selbst komplementär sind.⁶⁴ Sie funktionieren dabei als eine Art molekularer Adapter, wobei sie einerseits an ein Effektormolekül und andererseits an eine Ziel-mRNA binden können.⁶⁵ Durch die Steuerung der Expression von miRNAs können dann die Menge der mRNAs bzw. ihre Translation beeinflusst werden.⁶³ Dabei wird angenommen, dass ein Großteil der Transkripte einer Steuerung der Translation durch miRNAs unterliegen.⁶⁶ miRNAs beeinflussen dadurch wahrscheinlich nahezu alle physiologischen und pathophysiologischen Vorgänge, etwa bei der Embryonalentwicklung,^{67, 68} der Entstehung maligner Erkrankungen,⁶⁹⁻⁷² der Immunantwort^{73, 74} und Herz-Kreislauferkrankungen.⁷⁵⁻⁷⁷

1.5.1 Biogenese und Regulation

Die Expression reifer miRNAs wird auf der Ebene der Expression, bei den verschiedenen Reifungsschritten, bei der Bindung an die Effektorproteine und beim Abbau reguliert.⁷⁸ Reife miRNAs entstehen aus längeren und teilweise Doppelstränge bildenden Primärtranskripten, die als pri-miRNAs bezeichnet werden. Sie werden in mehreren Schritten geschnitten, teilweise verändert und in einzelsträngige miRNAs entwunden.

Der erste Regulationsschritt bei der Biogenese der miRNAs erfolgt bereits bei der Transkription. Die Sequenzen der pri-miRNAs kommen sowohl als Intron in kodierenden und nicht-kodierenden Transkripten als auch als Exon vor.⁷⁹ In vielen Fällen liegen sie

als polycistronische Transkriptionseinheit mit einer gleichzeitigen Transkription hintereinander angeordneter miRNAs vor, deren individuelle Expression dann posttranskriptionell reguliert wird.⁸⁰ Bei intronischer Lage wird die Expression sowohl von den Promotoren des Gens, in dessen Intron sich die miRNA befindet, als auch teilweise von separaten Promotoren gesteuert,⁸¹ während es für exonische miRNAs eigene Promotoren gibt.⁷⁹ Die Transkription erfolgt hauptsächlich durch die RNA-Polymerase II,⁸² bei einigen miRNAs durch die RNA-Polymerase III.⁸³ Dabei wird die Transkription ähnlich wie bei der Expression von mRNA durch Transkriptionsfaktoren und epigenetische Mechanismen beeinflusst.^{82, 84} Nach der Transkription wird auch die weitere Prozessierung der pri-miRNAs durch den Microprocessor-Komplex zu pre-miRNAs und dann durch den Dicer-Komplex zu reifen miRNAs regulatorisch beeinflusst.

Dabei wird zunächst die transkribierte pri-miRNA, ein mehr als 1 kb langer RNA-Einzelstrang mit lokalen Hairpin-Strukturen, noch im Zellkern durch den Microprocessor-Komplex zur pre-miRNA gekürzt. Der Microprocessor-Komplex besteht aus der RNase Droscha und dem akzessorischen Protein DGCR8, wobei seine Effektivität bei der Prozessierung bestimmter pri-miRNAs differentiell reguliert werden kann.^{85, 86}

Nach dem nukleären Transport, der energieabhängig durch Exportin 5 und unter Beteiligung des Guanosintriphosphat (GTP) tragenden Cofaktors Ran durch eine Hydrolyse von GTP zu Guanosindiphosphat und Phosphat erfolgt, wird die pre-miRNA ins Zytosol freigesetzt.⁸⁷ Dabei wird durch die RNA-Endonuklease Dicer die Schlaufe der Haarnadelstruktur abgespalten, wodurch ein Duplex aus zwei reifen miRNAs mit meistens zwei nicht vollständig komplementären Strängen entsteht. Einer dieser Stränge wird dann u. a. in Abhängigkeit von der Stellung eines Uracilrestes am 5'-Ende präferentiell in Argonaute-Proteine (AGO) geladen, während der andere⁸⁷ abgebaut wird. Dabei wird häufig gewebspezifisch der eine oder der andere Strang deutlich häufiger geladen als der jeweils andere, wobei die beiden Stränge als 5-p oder 3-p-miRNA bezeichnet werden. Der Komplex aus einer miRNA, die die spezifische Interaktion mit einem miRNA-responsiven Element einer mRNA vermittelt, und dem AGO-Protein, an das die jeweilige miRNA gebunden ist, wird als miRNA induced silencing complex (miRISC) bezeichnet. Die Regulation der Expression von Ziel-mRNAs erfolgt sowohl co- und posttranslational als auch durch eine Inhibition der Translation. Dadurch kann

noch im Zellkern durch die Endonukleaseaktivität von AGO2 mRNA gespalten werden, häufiger kommt es aber in Säugetierzellen nach der Bindung von GW182-Proteinen zu einer Polyadenylierung, einem Decapping und einem sich anschließenden durch Exonuklease vermittelten Abbau der mRNA.⁸⁸ Dabei werden die Effektivität und der Mechanismus der Steuerung der Genexpression vor allem von der subzellulären Lokalisation des miRISCs und den vorhandenen akzessorischen Proteinen beeinflusst.⁸⁸ Unter spezifischen Bedingungen scheint auch eine Hochregulierung der Translation möglich zu sein, die durch das fragile x mental retardation related protein (FXR) 1 anstelle von GW182 vermittelt wird.⁸⁹

1.5.2 Rolle von miRNA bei myokardialer Ischämie

Für einige miRNAs gibt es bereits Arbeiten über ihre Rolle bei der Entstehung von Ischämie und Reperfusionsschaden. So konnte z. B. für miR-146b eine Verringerung der Infarktgröße nach einer Injektion vor der Auslösung einer kardialen Ischämie/Reperfusion bei Ratten nachgewiesen werden.⁹⁰ Ähnliches konnte für eine Transfektion mit miR-93 gezeigt werden, wobei als Mechanismus eine verminderte Expression des miR-93-Targets „Phosphatase and Tensin homolog“ (PTEN) postuliert wurde.⁹¹ Für miR-144 konnte nach einer mit einer durch einen Adenovirus vermittelten Transfektion mit einer intramyokardialen Injektion ebenfalls eine Verringerung der Infarktgröße nach Ischämie/Reperfusion (I/R) erreicht werden.⁹² Dabei konnte in diesen Studien jeweils in nicht transfizierten Tieren eine Verringerung der Expression der kardioprotektiven miRNAs nach I/R nachgewiesen werden, womit die kardioprotektive Wirkung dieser miRNAs bestätigt werden konnte.

1.5.3 Expression von miR-223

Der Bereich des Genoms, der für die miR-223 codiert, befindet sich auf dem langen Arm des X-Chromosoms (Xq12).⁹³ Die miR-223 wurde erstmals als regulatorische miRNA in der Myelopoese beschrieben und wird vor allem im Knochenmark exprimiert.⁹⁴ Dabei exprimieren myeloide Vorläuferzellen basale Mengen von miR-223, wobei die Expression während der granulozytären Differenzierung zu- und bei der monozytären Differenzierung abnimmt.⁹⁵ Dabei scheint die Bindung von CEBP α anstelle von NFI-A an den Promotor der miR-223 die Expression von miR-223 zu erhöhen, während die Translation von NFI-A durch miR-223 dann reduziert wird. Deshalb könnte dieser

Feedbackmechanismus als molekularer Schalter zugunsten der Granulopoese funktionieren.⁹⁶

Der Transkriptionsfaktor E2F1, der bei der Granulopoese die Proliferation zu Lasten der Differenzierung fördert, scheint die Expression von miR-223 zu verringern,⁹⁷ seine mRNA ist aber gleichzeitig Ziel von miR-223. Bei der akuten myeloischen Leukämie scheint durch inaktivierende Mutationen von CEBP α die Expression von miR-223 verringert zu werden, was dazu führt, dass die mRNA des Transkriptionsfaktors E2F1 durch miR-223 nicht mehr supprimiert wird. E2F1 kann daher in einem negativen Feedbackbogen durch eine Bindung an den miR-223-Promotor deren Transkription inhibieren, was zu einer verstärkten Proliferation führt.⁹⁷

Auf epigenetischer Ebene kann schließlich etwa bei Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML), die durch eine t(8;21)-Translokation das Fusionsprotein AML1/ETO aufweisen, die Expression durch die Bildung von Heterochromatin vermindert werden, das durch eine Chromatin-Remodeling den miR-223-Promotor unzugänglich macht.⁹⁸

Neben der Regulation der Expression von miR-223 wird vermutlich auch die Effektivität der durch miR-223 induzierten translationalen Hemmung der Ziel-mRNAs reguliert. Dabei kann etwa die Effektivität der translationalen Repression der reifen miRNAs durch kleine und zur 5'-UTR der reifen miRNAs komplementäre RNAs verringert werden, die als semi-miRNAs (smiRNAs) bezeichnet werden. Diese smi-RNAs werden vermutlich aus dem bei der Biogenese nicht abgebauten komplementären Strang gebildet.⁹⁹

Neben der kanonischen Regulation von Ziel-mRNAs durch eine Hemmung der Translation scheint gerade die miR-223 auch durch einen Austausch von Mikrovesikeln die Translation anderer Zellen zu beeinflussen. So exprimieren reife Makrophagen und Megakaryozyten miR-223, die sich dann auch in den hauptsächlich von Thrombozyten und Makrophagen gebildeten Mikrovesikeln findet.¹⁰⁰ Dabei konnte nachgewiesen werden, dass miR-223 zwar in frisch isolierten Endothelzellen vorkommt, aber in kultivierten Zellen deutlich abnimmt, wobei miR-223 in diesen Zellen die durch den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) vermittelten Prozesse der Angiogenese, des Sproutings und der Migration von Endothelzellen inhibiert.¹⁰¹ Die in den Mikrovesikeln enthaltene miR-223 kann von Endothelzellen, Monozyten und Fibroblasten aufgenommen werden und dann in diesen Zellen die Translation von Zielgenen beeinflussen.¹⁰⁰ Deshalb könnte aus Thrombozyten und Makrophagen

stammende miR-223, die durch Mikrosvesikel in Endothelzellen transferiert wird, eine wichtige Rolle bei der Angiogenese spielen.

1.5.4 Bekannte Funktionen von miR-223: Stand der Forschung vor dieser Arbeit

Für miR-223 wurden vor allem Funktionen bei der Differenzierung und bei der Funktion von Zellen der myeloischen Reihe dokumentiert,^{102, 103} zu denen neben den Erythrozyten vor allem Thrombozyten, Granulozyten und Monozyten und Makrophagen gehören.

miR-223-Knockout-Mäuse zeigen einen Phänotyp, der sowohl durch eine gesteigerte Zahl neutrophiler Granulozyten als auch durch eine übersteigerte Reaktion auf inflammatorische Stimuli gekennzeichnet ist, bei der es zu spontaner neutrophiler Pneumonitis und einer deutlich aggravierten und prolongierten systemischen Entzündungsreaktion nach einem inflammatorischen Stimulus kommt.⁹⁵ Deshalb spielt miR-223 wahrscheinlich eine wichtige Rolle bei der Begrenzung einer überschießenden neutrophilen Inflammation als Reaktion auf einen proinflammatorischen Stimulus.

Außerdem spielt miR-223 bei der Differenzierung und Aktivierung von Monozyten und Makrophagen eine kritische Rolle: Während die Expression von miR-223 bei der Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen deutlich abnimmt, was dann einerseits zu einer Repression von proinflammatorischen Zielgenen des nuclear factors κ B (NF- κ B) führt. Andererseits wird durch die Stabilisierung der miR-223 Ziel-mRNA IKK α und eine Anhäufung von p52 die Reaktion auf proinflammatorische Stimuli durch eine verstärkte Expression von Zielgenen des nicht-kanonischen NF- κ B-Signalings gesteigert.¹⁰⁴ Dieser Mechanismus könnte dazu beitragen, eine vorzeitige Aktivierung der Makrophagen ohne einen adäquaten Stimulus zu verhindern und beim Vorliegen eines adäquaten Stimulus die inflammatorische Antwort zu verstärken.

In einer weiteren Studie konnte nachgewiesen werden, dass miR-223-Knockout-Mäuse auf eine Diät mit hohem Fettanteil nicht nur mit einer verstärkten Inflammation im Fettgewebe reagierten, sondern auch eine gesteigerte Insulinresistenz aufwiesen, wobei dieser Effekt auch in einem knochenmarksspezifischen Knockoutmodell, also durch eine Knochenmarkstransplantation von miR-223-defizienten Mäusen, reproduziert werden konnte.¹⁰⁵ Außerdem konnten die Autoren einen deutlichen Anstieg von miR-223 in Makrophagen nach einer Behandlung mit Interleukin 4 nachweisen, das *in vitro* zu einer

Differenzierung in den eher anti-inflammatorischen M2-Phänotyp führt. Darüber hinaus zeigte sich eine leichte Abnahme der miR-223-Expression nach einer Behandlung mit Lipopolysaccharid, das *in vitro* eine proinflammatorische M1-Differenzierung bewirkt. Dementsprechend bildeten aus miR-223-Knockoutmäusen gewonnene Makrophagen nach einer Stimulation mit Lipopolysaccharid mehr proinflammatorische Zytokine als Wildtyp-Makrophagen. In der Durchflusszytometrie zeigten sie ein M1-typisches Muster bei den Oberflächenmarkern. Insgesamt weist diese Studie darauf hin, dass miR-223 ein regulatorisches Element bei der differentiellen Aktivierung von Makrophagen darstellt, welches die Differenzierung hinsichtlich des eher anti-inflammatorischen M2-Subtyps begünstigt.

In Thrombozyten ist miR-223 die häufigste miRNA. Dabei ist der ADP-Rezeptor P2Y12, der durch Thrombozyten-Aggregationshemmer wie Clopidogrel blockiert wird, ein potentiell Ziel von miR-223, wobei dessen mRNA in miRISC-ähnlichen Komplexen in Thrombozyten vorkommt.¹⁰⁶ Daher kann spekuliert werden, ob miR-223 in Thrombozyten die Expression des P2Y12-Rezeptors aus in miRISCs gespeicherter mRNA reguliert. So könnte etwa eine Antagonisierung von miR-223 eine verstärkte Expression von P2Y12 und dadurch auch eine stärkere durch ADP vermittelte Aktivierbarkeit von Thrombozyten bewirken.

Hinsichtlich der Ergebnisse dieser publizierten Arbeiten zu miR-223 liegt die Vermutung nahe, dass eine Inhibierung von miR-223 vor allem mit proinflammatorischen Effekten verbunden sein könnte. Dabei sollte es insbesondere zu einer erhöhten Anzahl von neutrophilen Granulozyten mit einer gesteigerten Reaktivität auf inflammatorische Stimuli und einer Verschiebung der Makrophagen-Differenzierung hinsichtlich des proinflammatorischen M1-Subtyps kommen, wobei eine vorzeitige Aktivierung zugleich verhindert werden sollte. Möglicherweise könnte dabei auch eine gesteigerte Thrombozyten-Aggregationsfähigkeit vorliegen.

Da die experimentell nachgewiesenen Effekte auf diese einzelnen Komponenten der Pathogenese des Myokardinfarkts und seine Heilung zum einen zeitlich nicht simultan zu erwarten sind und daher unklar bleibt, welche Effekte welchen Anteil an der Pathogenese haben, lässt sich zunächst keine Aussage darüber treffen, ob insgesamt von einer Inhibierung von miR-223 nach einem Myokardinfarkt positive oder negative Effekte auf die Herzfunktion zu erwarten sind. So könnten eine verstärkte Inflammation und

Thrombozyten-Aggregation zu einem größeren Schaden am Myokard führen, während eine Verhinderung einer vorzeitigen Makrophagenaktivierung und eine verstärkte Expression von Zielgenen des nicht-kanonischen „nuclear faktor kappa B“ (NF-κB)-Signalings zu einer Verbesserung des funktionellen Ergebnisses führen könnten.

Da diese pathogenetischen Mechanismen auch bei der Entstehung und Heilung eines Myokardinfarktes eine zentrale Rolle spielen, wird davon ausgegangen, dass sich durch eine Inhibition von miR-223 auch in einem experimentellen Modell des Myokardinfarkts das funktionelle Ergebnis nach einem Myokardinfarkt beeinflussen lässt.

1.6 Fragestellung der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit besteht in einer Identifikation von miRNAs, die eine pathogenetische Rolle beim Ischämie/Reperfusionsschaden spielen könnten, um durch eine Beeinflussung ihrer Expression diesen Schaden verringern zu können. Da viele pathophysiologische Vorgänge, wie z. B. die Invasion von Leukozyten, die Inflammation, die Apoptose und die Regeneration sowohl bei einem Myokardinfarkt als auch bei Ischämie/Reperfusion ablaufen, sollten durch einen Vergleich Unterschiede zwischen diesen beiden Modellen erschlossen werden. Differentiell regulierte miRNAs könnten dabei zur Erkenntnis von pathophysiologischen Unterschieden zwischen reiner Ischämie und Ischämie/Reperfusion beitragen und dadurch zum besseren Verständnis des Reperfusionsschaden beitragen.

In dieser Untersuchung zeigten sich keine gegensätzlich oder nur in einer Gruppe regulierten miRNA, es zeigten sich jedoch Unterschiede in der relativen Stärke der Expression zwischen beiden Gruppen. Um zu untersuchen, ob diese unterschiedliche Expression Unterschiede in der Infarktheilung reflektiert und damit möglicherweise ein therapeutisches Ziel darstellen könnte, untersuchten wir den Effekt einer Inhibition einer solchen differentiell regulierten miRNA, miR-223, auf die kardiale Funktion und Narbengröße nach Ischämie/ Reperfusion.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Alle Tierversuche wurden an Mäusen der Rasse C57BL/6 (Charles River, Wilmington, MA, USA) durchgeführt. Die Versuche wurden nach Prüfung durch die Ethikkommission durch das Regierungspräsidium Darmstadt genehmigt (Gen. Nr. B 2/224). Für die verwendeten neonatalen Rattenkardiomyozyten (2.3.2) erfolgte eine Tötung zur Entnahme der Organe gem. §4 des Tierschutzgesetzes. Für die Versuche zum Unterschied beim miRNA-Expressionsprofil zwischen Ischämie/Reperfusion und permanenter Okklusion wurden männliche und weibliche Mäuse mit einem Gewicht von 23-28 g verwendet. Für die Untersuchungen zum Effekt der Inhibierung von miR-223 wurden nur männliche Tiere verwendet, um zyklusbedingte Einflüsse auf die Expression von miR-223 zu vermeiden.¹⁰⁷ Die Mäuse wurden in einem 12-Stunden Licht/Dunkel-Zyklus bei 22 °C und 55-65 % Luftfeuchtigkeit in Gruppen von 6 Tieren gehalten und erhielten eine Standarddiät mit Futter und Wasser zur freien Verfügung. Bereits einen Tag vor den Operationen wurden die Tiere in den Operationsraum gebracht, um den Tieren eine Gewöhnung an die Umgebung zu ermöglichen. Dadurch sollten stressbedingte Einflüsse auf die Experimente vermieden werden.

2.2 Differentielle Expression von miRNA nach Myokardinfarkt und Ischämie/ Reperfusion

2.2.1 MiRNA- microarray

2.2.1.1 Versuchsaufbau

Zur Untersuchung der Fragestellung, inwieweit sich die miRNA-Expressionsprofile im Infarktgebiet nach Ischämie/Reperfusion und permanenter Ischämie zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Operation unterscheiden, wurden die Mäuse zunächst per Zufall entweder der Operationsart I/R oder permanenter Ischämie (Myokardinfarkt, MI) zugeordnet und dann innerhalb dieser Gruppe für eine Gewebeentnahme zwei, fünf oder zehn Tage nach der Operation vorgesehen. Dabei wurden für jede Operationsart insgesamt dreißig Mäuse verwendet, also zehn für jeden Zeitpunkt (Abbildung 2.1). Mäuse, die während der Versuche verstarben, wurden nicht verwendet und durch neue Mäuse ersetzt.

wurde visuell durch ein Verblassen des linken Ventrikels überprüft und gegebenenfalls wurde die Umstechung wiederholt. Um eine permanente Okklusion zu induzieren, wurde der Knoten belassen und die Fadenenden wurden knapp abgesetzt.

Bei der Ischämie/Reperfusiongruppe wurde ein Polyethylen-Röhrchen (1 mm Durchmesser) gemeinsam mit dem RIVA umschlungen. Nach 45 min wurde bei dieser Gruppe der Faden durch das Durchschneiden des Knotens auf dem Röhrchen zusammen damit wieder entfernt. Während der Ischämiezeit wurde das Operationsgebiet mit einer sterilen mit 0,9%iger Natriumchloridlösung (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) getränkten Kompresse bedeckt.

Nach dieser Prozedur wurde die Wunde schichtweise mit 5-0-Fäden verschlossen und zur lokalen postoperativen Analgesie wurde Xylocain 1%ig (AstraZeneca, Wedel, Deutschland) als Spray aufgetragen. Die Isofluranzufuhr wurde danach unter fortgesetzter maschineller Beatmung unterbrochen. Beim Einsetzen von Spontanatmungsbewegungen wurde auch die Beatmung unterbrochen. Bei ausreichender Spontanatmung wurde schließlich extubiert und die Mäuse erhielten eine subkutane Injektion von 300 µl 0,9%iger Natriumchloridlösung, um Flüssigkeitsverluste bei der Operation auszugleichen und 0,1 mg/kg Körpergewicht Buprenorphin (Indivior, North Chesterfield, Virginia, USA) s. c. alle 12 h für zwei Tage zur Analgesie. Im Anschluss an die OP wurden die Tiere 2 h lang überwacht. Die Wunden heilten, was von außen betrachtet und bei der Organentnahme durch Autopsie bestätigt werden konnte, ohne offensichtliche Anzeichen einer Wundinfektion ab. Antibiotika wurden nicht verabreicht. Alle Schritte der Operation wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

2.2.1.3 Probengewinnung

Die Gewebeentnahmen erfolgten zu dem bei der Zuordnung zur Versuchsgruppe festgelegten Zeitpunkt. Die Tiere wurden dafür mit 5%igem Isofluran anästhesiert und unter Narkose durch eine zervikale Dislokation getötet. Nach gründlicher Desinfektion der Haut wurde der Thorax eröffnet und das Herz wurde entnommen. Nach kurzem Auswaschen des Blutes mit 4 °C kalter und steriler 0,9%iger Natriumchloridlösung wurde das Infarktgebiet visuell identifiziert, aus dem linken Ventrikel herausgeschnitten und in 2 ml-Einfrierröhrchen (Cryo.s 2 ml, Greiner bio one, Frickenhausen, Deutschland) bei -80 °C bis zur RNA-Isolation asserviert.

2.2.1.4 Isolation der RNA für das miRNA- microarray

Für die Isolation der gesamt- RNA aus den Gewebeproben wurde eine saure Guanidinisothiocyanat-Phenol-Chloroform-Extraktion mit einer Fällung und Waschung der RNA mit Ethanol verwendet. Dazu wurden die nach der Entnahme bei -80 °C gefrorenen Gewebestücke zusammen mit einer 6 mm Edelstahlkugel (Retsch, Haan, Deutschland) in ein mit 700 µl QiAzol (Qiagen, Venlo, Niederlande) gefülltes 2 ml-Eppendorf-Gefäß (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) gegeben und in der Schwingmühle (MixerMill MM301, Retsch, Haan, Deutschland) 4 min bei 20/s zermahlen. Das Homogenisat wurde 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, dann wurden 140 µl Chloroform (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) zugegeben. Die Proben wurden dann 15 s kräftig geschüttelt und 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Um die Phasen zu trennen, wurde bei 12000 g (Kühlzentrifuge, Eppendorf AG; Hamburg, Deutschland) und 4 °C zentrifugiert und die wässrige Phase wurde in ein neues 2 ml-Reaktionsgefäß überführt. Dann wurden 100 µl 100%iger Ethanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) zugegeben und durch Auf- und Abpipettieren mit dem Überstand durchmischt. Nach der Kühlung bei -80 °C für eine Stunde wurde das Präzipitat bei 4 °C und 20.000 g zu einem RNA-Pellet zentrifugiert, wobei der Überstand verworfen wurde. Das Pellet wurde erneut mit 1 ml 75%igem Ethanol gewaschen und anschließend für 5 min bei 16.000 g und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet wurde getrocknet. Anschließend wurde das Pellet in ca. 30-50 µl nukleasefreiem Wasser (Qiagen, Venlo, Niederlande) resuspendiert.

2.2.1.5 Überprüfung von Menge und Integrität der isolierten RNA

Nach der Isolation wurden die Menge und der Reinheitsgrad der gewonnenen RNA überprüft. Abhängig davon, für welches Experiment die RNA verwendet wurde, wurde sie entweder durch eine Kapillarelektrophorese (Agilent 2100 Bioanalyzer, Santa Clara, Kalifornien, USA; für microarray) oder mit einem Spektralphotometer (NanoDrop 1000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA; alle übrigen Untersuchungen) untersucht. Beide Verfahren können zuverlässig und genau die Konzentration und Reinheit von RNA bestimmen,¹⁰⁸ wobei bei der Analyse durch Kapillarelektrophorese außerdem Schlüsse auf die Integrität der isolierten RNA möglich sind,¹⁰⁸ was insbesondere für die Verwendung bei microarray-Experimenten von Bedeutung ist. Deshalb wurden alle RNA-Proben, die für microarray-Experimente vorgesehen waren, durch Kapillarelektrophorese untersucht. Dabei wurde neben dem 28S- zu 18S-Verhältnis

auch die RNA integrity number (RIN) als ein Maß für die Integrität der RNA berechnet, das neben den rRNA-Banden auch die übrigen Fragmente in die Kalkulation der Integrität miteinbezieht. Für die Analysen im microarray wurden Proben mit einer RIN von über 7 akzeptiert.¹⁰⁹

2.2.1.6 miRNA- microarray

Um die Expression verschiedener miRNAs im Infarktgebiet bei permanenter Ischämie und Ischämie/Reperfusion vergleichen zu können, wurde eine microarray-Analyse durchgeführt. Die Hybridisierung, Auswertung und primäre statistische Aufarbeitung wurden dabei von der Arbeitsgruppe von Jochen Wilhelm aus der Abteilung für Innere Medizin am Universitätsklinikum Gießen übernommen. Für die Vorbereitung der Hybridisierung wurden nach der Gewebeentnahme, der RNA-Isolation und der Qualitätskontrolle die RNA-Proben zunächst mit einem Fluoreszenzfarbstoff ligiert. Danach wurde die RNA auf einem microarray-Chip inkubiert, auf dem sich Spots mit zu jeweils einer miRNA komplementären Sonden befanden, sodass auf jedem Spot die entsprechende miRNA mit dem ligierten Farbstoff hybridisiert wurde. Dabei korreliert die Menge an Fluorochrom, die auf einem Spot durch eine Messung der Fluoreszenzintensität bestimmt werden kann, mit der Menge der auf zu den auf diesem Spot befindlichen Sonden komplementären miRNA in der Probe. Dadurch können durch den Vergleich der Fluoreszenzintensitäten der Spots die relativen Anteile der einzelnen miRNAs im Vergleich miteinander bestimmt werden.

Im Einzelnen wurde dabei bei den entscheidenden Schritten die von Castoldi et al.¹⁰⁹ publizierte Methode verwendet. Die nach der vorher beschriebenen Methode isolierte und kontrollierte RNA der beiden Gruppen wurde dabei mit einer T4-Ligase entweder mit Cy3 oder Cy5 markierten Oligouridin-Molekülen markiert, um auf einem Chip je eine Probe von zwei Gruppen im direkten Vergleich hybridisieren zu können. Bei jeder Probe wurden 2 µg totale RNA markiert. Um einen eventuellen Einfluss des gewählten Fluorochroms auf die Effektivität der Ligation und damit auf Unterschiede zwischen den Gruppen auszugleichen, wurden in jeder Gruppe beide Farbstoffe nur für die Hälfte der Proben verwendet.

Zur Markierung der RNA wurden zunächst zwei Master Mix angesetzt und zwar einer mit Cy3 und einer mit Cy5 (Label master mix). Dabei wurden jeweils zu je zwei µg der gesamten RNA in 10 µl Wasser 20 µl des Labels master mix gegeben, um dann kurz zu

vortexen und abzuzentrifugieren. Der Ansatz wurde dann über Nacht bei 4 °C im Dunkeln inkubiert, um ein Verblässen der Fluorochrome zu verhindern. Am nächsten Tag wurde die Reaktion durch Erhitzen der Ansätze auf 95 °C für 5 min inaktiviert. Im Anschluss daran erfolgte die Präzipitation der gelabelten RNA-Moleküle. Dazu wurde zunächst ein Präzipitations-Mastermix hergestellt, von dem danach zu jeder Probe 70 µl zugegeben wurden. Durch die Zugabe von 300 µl Ethanol 100%ig und eine Kühlung bei -80 °C wurde die RNA präzipitiert und dann durch Zentrifugation bei 20.000 g und 4 °C pelletiert. Nach dem Verwerfen des Überstands wurde das entstandene Pellet erneut mit 1 ml 75%igem Ethanol gewaschen und bei Raumtemperatur mit 16.000 g für 5 min zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde für 5 min an der Luft getrocknet und anschließend bis zur Hybridisierung bei -80 °C gelagert.

Die RNA wurde dann auf microRNA-microarray-Chips mit LNA-modifizierten und schmelzpunktnormalisierten Sonden hybridisiert (EMBL miChip V 9.2).¹¹⁰ LNA-modifizierte Sonden sind vor allem wegen der Kürze der zu hybridisierenden Frequenz und ihrer Eigenschaft, den Schmelzpunkt der Hybride gegenüber RNA- und DNA-Sonden zu erhöhen, diesen Sonden in der Spezifität deutlich überlegen.^{111, 112}

Für die Hybridisierung wurde zunächst der Hybridisierungs-Mastermix hergestellt. Nach dem Lösen der RNA-Pellets in 150 µl RNase-freiem Wasser wurden jeder Probe 300 µl des Hybridisierungs-Mastermix zugesetzt. Die Mischung wurde dann bei 95 °C für 5 min denaturiert. Anschließend wurden die Proben bei 16.000 g und Raumtemperatur für fünf Minuten zentrifugiert und danach auf die microarray-Objektträger gegeben. Die Hybridisierung erfolgte bei 54 °C über Nacht in einem Hybridisierungsofen. Durch kontinuierliche Rotation mit 5 Umdrehungen/min und eine sich dadurch bewegende Luftblase in der Kammer wurden eine kontinuierliche Durchmischung der Hybridisierungslösung und gleichmäßige Hybridisierungsbedingungen auf dem gesamten Objektträger ermöglicht. Nach der Hybridisierung wurden die Objektträger bei Raumtemperatur gewaschen: Zunächst je 10 min in 2x SSC, in 0,1%iger Natriumdodecylsulfat-Lösung (sodium dodecylsulfate, SCS), in 0,2x SSC und 0,1x SSC, dann fünf Minuten in 0,1x SSC und kurz in Wasser. Abschließend wurden die gewaschenen Objektträger durch Zentrifugation (2 min bei 1500 Umdrehungen/min) getrocknet. Die Objektträger wurden dann mit einem Scanner bei 5 µm/Pixel gescannt und die Bilder wurden mit GenePix Pro 5.1 analysiert. Die Daten dieser Analyse wurden mit R statistisch aufbereitet. Nach dem Abziehen der lokalen Hintergrundsignale wurden

die einzelnen Spots getrennt für jeden Farbkanal auf den Median der jeweiligen Farbe normalisiert und die normalisierten Daten der jeweils vier Spot-Replikate wurden gemittelt. Differentiell regulierte miRNAs wurden in R (r-project.org) durch moderierte t-Statistiken identifiziert.¹¹³ Dabei wurden für multiples Testen korrigierte p-Werte unter 0,05 als statistisch signifikant gewertet. Die relativen Expressionen wurden als Koeffizienten zur Basis 2 angegeben, was eine logarithmische Darstellung der Daten erlaubt.

Zur Analyse ähnlich regulierter miRNA- Gruppen nach permanenter Okklusion und Ischämie/ Reperfusion wurden miRNA eingeschlossen, die zu mindestens einem Zeitpunkt in der betreffenden Operationsgruppe signifikant gemessen wurden und eine relative Expression von $>1,25$ respektive $<0,75$ aufwiesen.

2.2.2 Quantitative real- time PCR

2.2.2.1 *Versuchsplanung*

Für eine Validierung der Ergebnisse des microarrays wurden sie im Rahmen einer unabhängigen Stichprobe überprüft. Dazu wurden ähnlich wie bei der Versuchsplanung für den microarray die Tiere per Zufall den Gruppen Ischämie/ Reperfusion oder Permanente Ischämie zugeordnet, wobei innerhalb dieser Gruppen für eine Gewebeentnahme zwei, fünf oder zehn Tage nach der Operation vorgesehen wurden. Dabei wurden für jede Operationsart insgesamt dreißig Mäuse, also zehn für jeden Zeitpunkt verwendet. Mäuse, die während der Versuche verstarben, wurden nicht verwendet und durch neue Mäuse ersetzt.

2.2.2.3 *Probengewinnung*

Die Probengewinnung erfolgte nach der unter 2.2.1.3 beschriebenen Vorgehensweise. Bei jedem Entnahmezeitpunkt wurden darüber hinaus in beiden Gruppen bei jeweils drei Mäusen die Herzen für eine histologische Aufarbeitung für die in-situ-Hybridisierung entnommen. Für die histologischen Untersuchungen wurde das Herz nach der Entnahme und einer Spülung in Natriumchloridlösung mit dem Apex nach oben in ein mit Einbettmedium (TissueTek farblos, Sakura Finetek, Alphen aan den Rijn, Niederlande) gefülltes Plastikschrälchen (Cryomold intermediate, Sakura Finetek, Alphen aan den Rijn, Niederlande) gebettet und in einem auf flüssigem Stickstoff schwimmenden Plastikschrälchen eingefroren. Die so eingebetteten Herzen wurden ebenfalls bis zur histologischen Aufarbeitung bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren.

2.2.2.4 RNA- Isolation für qRT- PCR

Die gesamte RNA wurde aus dem Gewebe mit einem kommerziell erhältlichen Kit isoliert (Qiagen miRNeasy Mini Kit, Qiagen, Venlo, Niederlande). Dabei wurde eine Kombination aus einer Extraktion mit einem Gemisch aus Phenol und Chloroform und einer Reinigung der RNA durch die Bindung an eine Silicagel-Säule verwendet. Dazu wurden die nach der Entnahme bei -80 °C gefrorenen Gewebestücke zusammen mit einer 6 mm Edelstahlkugel in ein mit 700 µl QiAzol (Qiagen, Venlo, Niederlande) gefülltes 2 ml Eppendorf-Gefäß gegeben und in der Schwingmühle 4 min bei 20 Umdrehungen/s zermahlen. Das Homogenisat wurde 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden 140 µl Chloroform zugegeben, um das Gemisch dann 15 s kräftig zu schütteln und 2 min bei Raumtemperatur zu inkubieren. Um die Phasen zu trennen, wurde bei 12000 g und 4 °C zentrifugiert (RNA-Kühlzentrifuge). Die wässrige Phase wurde danach in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Es wurden 100 µl 100%iger Ethanol zugegeben, der durch Auf- und Abpipettieren mit dem Überstand durchmischt wurde. Dieses Gemisch wurde dann auf eine Silicagel-Säule (RNeasy® spin column, Qiagen, Venlo, Niederlande) in einem 2 ml Reaktionsgefäß gegeben. Durch Zentrifugation bei 8000 g wurde die Probe durch die Silicagel-Membran gepresst, wodurch sich die durch Ethanol präzipitierte RNA an die Gelmembran bindet. Die an die Säule gebundene RNA wurde danach gewaschen, indem ethanolhaltige Waschpuffer (RWT und RPE, Qiagen, Venlo, Niederlande) auf die Säule gegeben und durch Zentrifugation (15 s bei 8000 g) durch die Säule gedrückt wurden. Der Durchfluss wurde jeweils verworfen und die Säule wurde dann durch 2 min Zentrifugieren getrocknet. Die Säule wurde in ein frisches 2 ml Reaktionsgefäß überführt und ein weiteres Mal 1 min bei 16000 g zentrifugiert, um eventuelle Überreste von Puffern aus der Säule zu entfernen. Nach der Überführung der Säule in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß wurde die RNA durch die Zugabe von 30-50 µl RNase-freies Wasser und Zentrifugation 1 min bei 8000 g von der Gelmembran eluiert. Menge und Reinheit der eluierten RNA wurden unmittelbar mit einem Spektralphotometer überprüft und die Probe wurde dann in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

2.2.2.5 Reverse Transkription

Die für die quantitative Analyse der verschiedenen miRNA mittels real- time- PCR benötigte komplementäre DNA (complementary DNA, cDNA) wurde mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Kits (NCode VILO miRNA cDNA Synthesis kit, Invitrogen, Carlsbad, USA) hergestellt. Hierfür wurden jeweils 1 µg Gesamt- RNA zunächst 3'-

polyadenyliert. Anschließend wurde die polyadenylierte LNA mit einem Universalreverse-Transkription (RT)- primer hybridisiert, der an seinem 5'- Ende zusätzlich eine an poly-T angefügte Sequenz trug, die in der nachfolgenden Polymerase- Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) komplementär zum Universal- PCR- Primer war.

2.2.2.6 Primer

Die Sequenzen der miRNA- spezifischen Primer wurden nach den online verfügbaren miRNA- Sequenzen (mirbase.org) und verfügbaren miRNA- Primersequenzen (NCode-Primerdatenbank, Invitrogen, <http://escience.invitrogen.com/ncode>) unter Berücksichtigung von kalkulierten Primer- Template- Schmelzpunkten (Primer3, <http://primer3.ut.ee/>) ausgewählt und ihre Spezifität sowie optimale Hybridisierungstemperatur mittels Agarosegelelektrophorese überprüft. Die so ermittelten optimalen Hybridisierungstemperaturen wurden dann für die weiteren Analysen mittels quantitativer Echtzeit-PCR (quantitative real-time PCR) qRT- PCR verwendet.

2.2.2.7 Quantitative real- time PCR

Die mit einer synthetischen Universalprimersequenz versehene miRNA-cDNA wurde unter Verwendung der vorher überprüften miRNA- spezifischen Primer, eines Universalprimers (spezifisch für die mit dem NCode VILO Kit hergestellte cDNA) und eines kommerziell erhältlichen PCR-Mastermix (SYBR Green PCR Master Mix, Applied Biosystems) amplifiziert. Dieser PCR-Mastermix enthielt alle weiteren Bestandteile (Puffer, AmpliTaq Gold DNA-Polymerase, dNTPs, SYBR Green 1, ROX). Die quantitative Real-time-PCR basiert auf der Detektion doppelsträngiger DNA mit SYBR Green, einem Farbstoff, der bei der Bindung an doppelsträngige DNA stärker fluoresziert als bei der Bindung an einzelsträngige RNA oder DNA. Bei der Amplifikation wurde jeweils in der Amplifikationsphase die Fluoreszenz der einzelnen Proben gemessen, wobei jede Probe als Triplikat gemessen wurde. Dabei wurde der Zeitpunkt bestimmt, an dem die detektierte Fluoreszenz erstmals die Hintergrundfluoreszenz übersteigt, der sogenannte Schwellenzyklus (threshold cycle, ct). Dann wurden die ct-Werte der Normalisierungs-miRNA subtrahiert und die Differenzen der Δ ct-Werte ($\Delta\Delta$ ct-Wert) der verschiedenen Gruppen gebildet. Die n-fache relative Expression der Ziel-mRNA wurde danach mit der Formel $n = 2^{-\Delta\Delta ct}$ berechnet.

2.2.2.8 Normalisierung der relativen Expressionswerte

Um die Effekte technischer und systematischer Fehler bei der RNA-Isolation und der reversen Transkription auf die Ergebnisse der relativen Quantifizierung zu minimieren, müssen die ct-Werte der einzelnen biologischen Replikate auf ein konstitutiv exprimiertes Gen („Haushaltsgen“) normalisiert werden, das dem Zielgen in der Länge der RNA, in seiner Sekundärstruktur und dadurch seinem Verhalten im gesamten Isolations- und reversen Transkriptionsprozess und auch der Stabilität bei der Lagerung möglichst nahe kommt. Im Vergleich mit der Normalisierung von mRNA-Expressionsdaten, für die unterschiedliche und gut untersuchte Haushaltsgene beschrieben wurden (z. B. GAPDH,¹¹⁴ ACTB, TUBA1), gibt es für die Normalisierung von miRNAs nur wenige untersuchte Referenz-miRNAs.¹¹⁴ Die Verwendung von kleinen nukleolären RNAs (small nucleolar RNA, snoRNA) oder kleinen nukleären RNAs (small nuclear RNA, snRNA) werden zwar von Herstellern kommerzieller Kits empfohlen, sie haben sich aber unter bestimmten Umständen als weniger¹¹⁴ oder völlig ungeeignet^{115, 116} herausgestellt. Ein möglicher Grund für diese Limitierungen wird in der von reifen miRNAs deutlich abweichenden Sekundärstruktur und Größe dieser RNA-Moleküle gesehen. Deshalb wird die Verwendung von RNA-Molekülen der gleichen Klasse empfohlen, also miRNAs.¹¹⁷ Zur Identifikation von neuen Referenz-miRNAs für ein gegebenes Set an Proben können high-throughput-qRT-PCR-Ansätze verwendet werden, bei denen aus vielen Kandidaten-miRNAs anhand der qRT-PCR-Daten die am stabilsten exprimierten miRNAs durch ein dafür entwickeltes Statistikprogramm ausgewählt werden können.^{114, 118, 119} Diese Verfahren haben sich hinsichtlich der Zuverlässigkeit und Genauigkeit der Normalisierung als gegenüber snoRNAs und snRNAs überlegen erwiesen,^{114, 118} erfordern aber die Analyse einer Vielzahl von miRNAs über viele Proben. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit eine bereits als Referenz-miRNA etablierte miRNA¹¹⁴ als Normalisierungsgen verwendet, nämlich miR-25, nachdem die Stabilität der Expression im verwendeten Probenset durch microarray und qRT-PCR bestätigt werden konnte.

2.2.2.9 Datenanalyse und Statistik

Die dadurch gewonnenen Expressionsdaten wurden danach mit GraphPad Prism 5 weiter analysiert und visualisiert. Für die Testung auf statistisch signifikante Unterschiede bei der Expression zwischen den beiden Gruppen wurde zu einem gegebenen Zeitpunkt der Mann-Whitney-Test für nichtparametrische Tests verwendet, wobei p-Werte unter 0,05 als signifikant gewertet wurden.

2.3 miR-223- Expressionsprofil

2.3.1 Gewebeproben

Für die Expressionsanalyse von miR-223 in den verschiedenen Geweben wurden insgesamt drei Mäuse der Rasse C57BL/6 getötet, wie es unter 2.2.1.3 beschrieben wurde. Nach gründlicher Hautdesinfektion wurde ein Y-förmiger Hautschnitt von beiden Claviculae über das Sternum bis über das Abdomen vorgenommen. Danach wurde zunächst der Thorax eröffnet, um einen Teil des linken Herzventrikels und einen Teil des rechten unteren Lungenlappens zu entnehmen. Dann wurde das Abdomen eröffnet und unter Sicht wurden durch das Operationsmikroskop die Aorta und *Vena cava* am Eintritt ins Herz identifiziert. Dabei wurde zunächst die Aorta am Herzen abgesetzt, nach distal freipräpariert und entnommen und danach die *Vena cava inferior* entnommen. Für eine Entnahme von Skelettmuskel wurde der Y-förmige Schnitt auf die ventrale Seite des rechten Femurs verlängert, um ein Stück des *Musculus quadriceps femoris* aus dem mittleren Drittel des Muskelbauchs zu entnehmen. Für die Gewinnung von Knochenmark wurden Femur und Tibia von Muskeln und Sehnen befreit, jeweils die Gelenkflächen abgeschnitten, um dann das Knochenmark mit einer Spritze mit kalter Natriumchloridlösung auszuspülen. Die dadurch gewonnene Knochenmarkssuspension wurde für 3 min bei 300 g abzentrifugiert und das Pellet wurde dann in einem Eppendorfgefäß für die weitere Verwendung in flüssigem Stickstoff eingefroren.

2.3.2 Gewinnung von neonatalen Ratten- Kardiomyozyten und -Fibroblasten

Für die Kultivierung wurden nach der Dekapitierung die Herzen von 1-3 Tage alten Rattenembryonen (Sprague Dawley) entnommen, die dann nach der Entfernung von Atrien und Gefäßen in der Schwingmühle 4 min bei 20 Umdrehungen/s mit einer 6mm Edelstahlkugel in einem Eppendorfgefäß in ADS-Puffer zermahlen wurden. Das Homogenisat wurde danach mit 0,5%iger Collagenase in ADS für 30 min bei 37 °C verdaut und das Pellet wurde durch Zentrifugieren und Resuspendieren in ADS dreimal gewaschen. Das Pellet wurde schließlich in 1%igem iNBS für 2 h inkubiert und auf mit Fibronectin beschichteten 6-Well-Platten (Greiner bio one, Frickenhausen, Deutschland) für 1-3 d kultiviert. Die Zellen wurden nach dreimaligem Waschen mit NaCl-Lösung mit 700 µl QiAzol© versetzt und mit einem Schaber geerntet. Die weitere miRNA-Isolation, reverse Transkription und die RT-PCR wurden dann so durchgeführt, wie es unter 2.2.4-2.2.9 beschrieben wurde.

2.3.3. Gewinnung von TIB71 und NB4- Zellen

Die TIB-71- Zellen (ATCC RAW-264.7) wurden nach Protokoll der ATCC kultiviert, die NB4-Zellen wurden wie beschrieben kultiviert und mit all-trans-Retinsäure zu murinen neutrophilen Granulozyten transformiert.¹²⁰ Die Zellen wurden jeweils in 6-Well-Platten kultiviert und nach dreimaligem Waschen mit 0,9%iger NaCl-Lösung mit 700 µl QiAzol versetzt und dann mit einem Zellschaber geerntet. Die weitere miRNA-Isolation, reverse Transkription und die RT-PCR wurden dann so durchgeführt, wie es unter 2.2.4-2.2.9 beschrieben wurde.

2.4 In- situ- Hybridisierung

2.4.1 Einleitung

Für eine Lokalisation von miR-223 im Infarktgebiet wurde eine In-situ-Hybridisierung durchgeführt. Dabei erfolgt zunächst die Hybridisierung einer mit Digoxigenin markierten Sonde an die Ziel-miRNA im Gewebe. Danach wird die markierte Sonde im Gewebe durch eine Farbreaktion sichtbar gemacht. Darüber hinaus können nach der Hybridisierung der Sonde auch Oberflächen- und Strukturproteine immunhistochemisch angefärbt werden, sodass bei einer Überlappung dieser Signale mit der Färbung der hybridisierten Sonde Rückschlüsse auf die Expression der Ziel-miRNA in bestimmten Zellen möglich sind.¹²¹

2.4.1 Verwendete Sonde und Locked nucleic acid- modifizierte RNA (LNA)

Aufgrund der Kürze der zu hybridisierenden miRNAs mit ca. 20-23 Nukleotiden, der dadurch begrenzten Sondenlänge und der großen Ähnlichkeit verschiedener miRNAs in ihrer Basensequenz, die sich teilweise nur um ein Nukleotid unterscheiden, stellt die Herstellung spezifischer Hybridisierungssonden eine große Herausforderung dar.¹²² Gegenüber DNA-Hybridisierungssonden haben mit Locked nucleic acid (LNA) modifizierte Sonden dabei die Vorteile, dass die gebildeten LNA-RNA-Hybride eine höhere thermodynamische Stabilität aufweisen, wodurch bei vergleichbarem Schmelzpunkt des Hybrids die Sondenlänge verkürzt werden kann,¹²² und dass ein Mismatch in der Basenpaarung stärker diskriminiert wird, wodurch sich die Sequenzspezifität erhöht.¹¹² Diese Eigenschaften beruhen auf der besonderen Struktur der LNAs. In diesen Riboseeinheiten ist das 2'-Sauerstoffatom durch eine zusätzliche

Bindung mit dem 4'-Kohlenstoff verbunden, sodass die Ribose in der 3'-Endo-Form fixiert wird.¹²³

Für die Hybridisierung von miR-223 wurde eine eigens kommerziell angefertigte und zur Sequenz von miR-223 komplementäre Sonde verwendet, die einige LNA-modifizierte Riboseeinheiten enthält, deren genaue Position in der Basenfolge der Hersteller nicht bekannt gibt. Dadurch erhöht sich der Schmelzpunkt von mit komplementären Basensequenzen gebildeten Hybriden, wodurch im Vergleich mit DNA-Sonden eine höhere Spezifität bei kurzen Basensequenzen erzielt werden kann.¹²²

2.4.2 Entwicklung des Hybridisierungsprotokolls und Übersicht über das Protokoll

Für die Lokalisation von miR-223 im Mäuseherz wurden mit Digoxigenin modifizierte LNA-Sonden verwendet, deren Sequenz komplementär zur reifen miR-223 war. Die auf dem Schnitt hybridisierte Sonde wurde danach mit einem gegen Digoxigenin gerichteten Antikörper und einer Farbreaktion nachgewiesen. Für eine Kontrolle der Sequenzspezifität des detektierten Signals wurde die Hybridisierung mit einer kommerziell erworbenen Kontrollsonde durchgeführt.

Das dafür verwendete Protokoll wurde auf der Grundlage verschiedener Publikationen¹²⁴⁻¹²⁸ entwickelt und nach empirischen Methoden für den Nachweis von miR-223 im Herzwewebe modifiziert und optimiert. Dabei wurden vor allem die Sondenkonzentration, die Temperatur, der Proteinaseverdau und die Nachweismethode variiert, um einerseits eine gute Permeation der Sonde ins Gewebe zu ermöglichen und andererseits die Menge unspezifisch gebundener Sonden zu verringern und dadurch ein optimales Verhältnis des Signals zum Hintergrund in der Darstellung zu erreichen.

Durch diese Optimierung der Hybridisierungsbedingungen in einem konventionellen Protokoll konnte die Sensibilität des Sondennachweises durch die Einführung eines Tyramid- Amplifizierungsschrittes (TSA, tyramide signal amplification) erhöht werden, wodurch die Menge der benötigten Sonde reduziert werden konnte.

Um genauere Aussagen darüber treffen zu können, in welchen Zellen im Infarktgebiet miR-223 vorhanden ist, wurde danach die In-situ-Hybridisierung mit einem mit Phycoerythrin (PE) gekoppelten Antikörper gegen Ly 6G, einem spezifischen Marker für

neutrophile Granulozyten,¹²⁹ überprüft, ob miR-223 in neutrophilen Granulozyten im Infarktgebiet vorhanden war.

Die Vorbereitung für die Hybridisierung und die anschließende Detektion der Sonde wurden in mehreren Schritten durchgeführt: Dabei wurden zunächst die Schnitte fixiert, um das Gewebe haltbarer zu machen und zugleich die Zugänglichkeit der RNA-Moleküle für die Sonden zu verbessern. Danach wurden die Schnitte mit Wasserstoffperoxid behandelt, um endogene Peroxidasen zu blockieren, die sonst bei der späteren durch HRP (Meerrettichperoxidase, horseradish peroxidase) vermittelten TSA-Reaktion zu einer unspezifischen Hintergrundfärbung führen könnten. Die Schnitte wurden anschließend mit Proteinase K behandelt, um die Zugänglichkeit für die Sonde zu erhöhen. Anschließend wurden sie für eine Beendigung der Reaktion erneut fixiert. Die Schnitte wurden dann vor der Inkubation mit der Sonde in Hybridisierungslösung ohne Sonde inkubiert, um die Schnitte mit der Hybridisierungslösung zu sättigen. Die Hybridisierung mit der Sonde erfolgte danach bei 51 °C für 18 Stunden. Anschließende Waschschriffe dienten der Entfernung unspezifisch gebundener Sonde.

Für den Nachweis von neutrophilen Granulozyten erfolgte dann eine Inkubation mit anti-Ly6G bzw. anti-glattmuskulärem Aktin und danach erfolgte die Detektion der Sonde. Dazu wurde zunächst ein mit Meerrettichperoxidase (HRP, horseradish peroxidase) gekoppelter Antikörper gegen das an das 3'- und 5'-Ende der Sonde angehängte Digoxigenin zugegeben. Dann erfolgte die durch Tyramid vermittelte Signalamplifikation, bei der das Substrat durch HRP in mit alkaliner Phosphatase (AP) gekoppelte Tyramid-Radikale gespalten wird, die sich wegen ihrer großen Reaktivität an Proteine in der Umgebung der Sonde anlagern und dadurch die Menge der zu detektierenden Moleküle vervielfachen. In einer zweiten Reaktion wurde NBT/BCIP bzw. Fast Red, ein Substrat der alkalinen Phosphatase, zugegeben, die damit einen unlöslichen und visuell sichtbaren bzw. fluoreszierenden Farbstoff bilden.

Tabelle 1: Protokoll In-situ-Hybridisierung

Arbeitsschritt	Reagenz	Inkubationszeit (min)	Temperatur	Bemerkungen
Fixierung	4% PFA	10	Raumtemperatur	
Waschen	DPBS	3x4	Raumtemperatur	
Quenching	H ₂ O ₂ 0,3%	30	Raumtemperatur	
Waschen	DPBS	3x3	Raumtemperatur	
Proteinase K	10µg/ml	10	Raumtemperatur	75 µl 20 mg/ml stock in 150ml DPBS
Refixierung	4% PFA	10	Raumtemperatur	
Waschen	DPBS	3x4	Raumtemperatur	
Prähybridisierung	Hyb	60	Raumtemperatur	ca. 120 µl pro slide
Hybridisierung	Hyb mit Sonde	18 Stunden	51°C	Hybridisierungsmix zuvor 5 min bei 80° denaturiert
Waschen	0,5x SSC	2x15	51°C	
Waschen	DPBS	2x3	Raumtemperatur	
Blocken	TNB	30	Raumtemperatur	ca. 200 µl pro slide
Anti-DIG-HRP	1:100 in TNB	30	Raumtemperatur	ca. 120 µl pro slide
Waschen	TNT	3x5	Raumtemperatur	
Amplifikation	AmpBuffer	5	Raumtemperatur	ca. 120 µl pro slide
Waschen	TNT	3x5	Raumtemperatur	
Anti-DNP- AP	1:100 in TNB	30	Raumtemperatur	ca. 120 µl pro slid
Waschen	TNT	3x5	Raumtemperatur	
Visualisierung	NBT/BCIP	variabel	Raumtemperatur	bis Blaufärbung erkennbar
Reaktionsstopp	PTB	5 und 2x 10	Raumtemperatur	

Tabelle 2: Protokoll In-situ-Hybridisierung mit Immunhistochemie

Arbeitsschritt	Reagenz	Inkubationszeit (mi	Temperatur	Bemerkungen
Fixierung	4% PFA	10	Raumtemperatur	
Waschen	DPBS	3x4	Raumtemperatur	
Peroxidasen blocken	H ₂ O ₂ 0,3%	30	Raumtemperatur	
Waschen	DPBS	3x3	Raumtemperatur	
Proteinase K	10µg/ml	10	Raumtemperatur	75 µl 20 mg/ml stock in 150ml DPBS
Refixierung	4% PFA	10	Raumtemperatur	
Waschen	DPBS	3x4	Raumtemperatur	
Prähybridisierung	Hyb	60	Raumtemperatur	ca. 120 µl pro slide
Hybridisierung	Hyb mit Sonde	18 Stunden	51°C	Hybridisierungsmix zuvor 5 min bei 80° denaturiert
Waschen	SSC 0,5x	2x 15	51°C	
Waschen	DPBS	2x3	Raumtemperatur	
Blocken	TNB	30	Raumtemperatur	ca. 200 µl pro slide
Cofärbung	1:100 in TNB	60	Raumtemperatur	
Waschen	TNT	3x5	Raumtemperatur	
Anti-DIG-HRP	1:100 in TNB	3x5	Raumtemperatur	ca. 150 µl pro slide
Waschen	TNT	3x5	Raumtemperatur	
Amplifikation	AmpBuffer	5	Raumtemperatur	ca. 120 µl pro slide
Waschen	TNT	3x5	Raumtemperatur	
Anti-DNP-AP	1:100 in TNB	30	Raumtemperatur	ca. 120 µl pro slide
Waschen	TNT	3x5	Raumtemperatur	
Visualisierung	NBT/BCIP oder Fast F	variabel	Raumtemperatur	bis Blau- oder Rotfärbung erkennbar
Waschen	PBS	3x5	Raumtemperatur	
DAPI	DAPI 1:1000 in PBS	20	Raumtemperatur	
Waschen	PBS	3x5	Raumtemperatur	

Tabelle 3: Verwendete Puffer und deren Zusammensetzung

Puffer	Zusammensetzung
ADS	0,5 ml P/S (Thermo fisher scientific, Waltham, Massachusetts, USA) 0,5 ml inactivated bovine serum (R&D systems, Minnesota, USA) 6,8g NaCl 4,76g HEPES 0,12 g NaH ₂ PO ₂ 1g Glucose 0,4g KCl 0,1g MgSO ₄ ad 1l mit destilliertem Wasser, pH titriert auf 7,4 mit NaOH, filtriert
SSC (20x)	800 ml destilliertes Wasser 175 g NaCl (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten) 77,4 g Natriumcitrat (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten) pH titrieren auf 7.0 mit HCl, auffüllen auf 1l, Verdünnung je nach gewünschter Lösung (z.B. 0,1x SSC)
PFA 4%	800 ml DPBS, auf 80°C erhitzt 40g Paraformaldehyd (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten) hinzufügen durch Zugabe von 1N NaOH lösen ad 1l mit PBS, pH titriert auf 6,9 mit verdünnter HCL gefroren aufbewahren (-20°C)
DPBS	2l PBS mit 2 ml Diethylpyrocarbonat (DEPC, Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten) versetzen, autoklavieren
PBS (10x)	800 ml destilliertes Wasser 80g NaCl 17,4 g Na ₂ HPO ₄ 2,4 g KH ₂ PO ₄ 2 g KCL auf 1l mit destilliertem Wasser auffüllen, Verdünnung 1:10 für die Herstellung von (1x) PBS
Hyb	5ml 100% Formamid 2,5ml 20x SSC 250µl 20mg/ml yeast tRNA 200µl 50x Denhardt's ad 10 ml mit DEPC- behandeltem Wasser 118,8 µl hyb+1,2 µl Sonde (10uM) pro Slide
TNB	5ml 1M TrisHCl (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), pH 7,5 7,5ml 1M NaCl (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) 0,25g Blocking reagent (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA) auf 60°C erwärmen, dann blocking reagent zugeben. Lagerung bei -20°C
TNT	200ml 1M TrisHCl pH 7,5 300ml 1M NaCl 1ml Tween20 (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) ad 2l H ₂ O
AmpStock	(Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA), 150µl DMSO zugeben, bei 4°C lagern
AmpBuffer	Amp Stock solution 1:50 mit Amplification diluent (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA) verdünnen, 120µl pro slide
PTB	5g BSA 250µl Tween20 ad 500ml mit PBS
NBT/BCIP	3,4 µl 100mg/ml NBT (Roche) 3,5 µl 50 mg/ml BCIP (Roche) 2,4 µl 24 mg/ml Levamisol (Sigma) 5 µl 10% Tween20 986 µl B3
B3	200 ml 0,5 M Tris 0,5M NaCl, pH 9,5 50 ml 1 M MgCl ₂

2.4.3 Protokoll in-situ-Hybridisierung

Die Protokolle für die in-situ-Hybridisierung werden in den oben angegebenen Tabellen zusammengefasst (Tabelle 1-3). Die 10 µm dicken gefrorenen Gewebeschnitte wurden auf Objektträgern getrocknet, in 4%igem Paraformaldehyd (PFA) fixiert und in DPBS gewaschen. Um die endogenen Peroxidasen für die spätere durch HRP vermittelte TSA-Reaktion zu inaktivieren, wurden die Schnitte für 30 min mit 0,3%igem Wasserstoffperoxid behandelt. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Schnitte dann in DPBS mit 10 µg/ml Proteinase K verdaut, um die RNA-Moleküle für die Sonden besser zugänglich zu machen. Nach einem weiteren Waschschrift (dreimal 4 min in DPBS) wurden die Schnitte mit Hybridisierungslösung ohne Sonde bedeckt und eine Stunde lang bei Raumtemperatur prähybridisiert, um zu vermeiden, dass die eigentliche Hybridisierungslösung mit der Sonde durch noch auf dem Schnitt vorhandenes DPBS verdünnt wird. Die Hybridisierungslösung wurde vorsichtig von den Schnitten abgeschüttelt und durch Hybridisierungslösung mit Sonde ersetzt. Die Schnitte wurden nun für 18 h bei 51 °C inkubiert. Überschüssige und unspezifisch gebundene Sonden wurden mit zwei Waschschriften in 0,5x SSC und PBS bei Raumtemperatur abgewaschen. Danach wurden die Schnitte für eine Blockade unspezifischer Proteinbindungsstellen mit TNB-Puffer überdeckt und dann mit 1:100 in TNB-Puffer gelöst und mit Anti-DIG-Antikörpern gekoppelter Meerrettichperoxidase für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Wenn im selben Versuch eine Cofärbung von Ly6G durchgeführt wurde, dann wurde der anti-Ly6G-Antikörper nach diesem Schritt für eine Stunde 1:100 in TNB verdünnt inkubiert (Tabelle 2). Danach wurden ungebundene Antikörper in drei Waschschriften mit Puffer B1 für jeweils 5 min entfernt. Die Slides wurden dann für 10 min mit Puffer B3 inkubiert, um dann die chromogenen Substrate NBT und BCIP in Puffer B3 zuzugeben, die mit Levamisol zur Blockade nicht-intestinaler unspezifischer Phosphatasen und Tween20 zur Herabsetzung der Oberflächenspannung versetzt waren. Die Slides wurden dann bis zu einer sichtbaren Entwicklung einer bläulichen Färbung im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Bei ausreichender Farbentwicklung wurde die Entwicklung bei allen Slides gleichzeitig durch dreimaliges Waschen für je 10 min in PBT gestoppt. Anschließend wurden die Schnitte mit Mowiol und einem Deckglas eingedeckt. Nach Trocknung des Eindeckmediums wurden die Schnitte unter dem Lichtmikroskop (DM 6000, Leica, Wetzlar, Deutschland)

bzw. mit laserinduzierter Fluoreszenz (EL 6000, Leica, Wetzlar, Deutschland) untersucht und fotografiert.

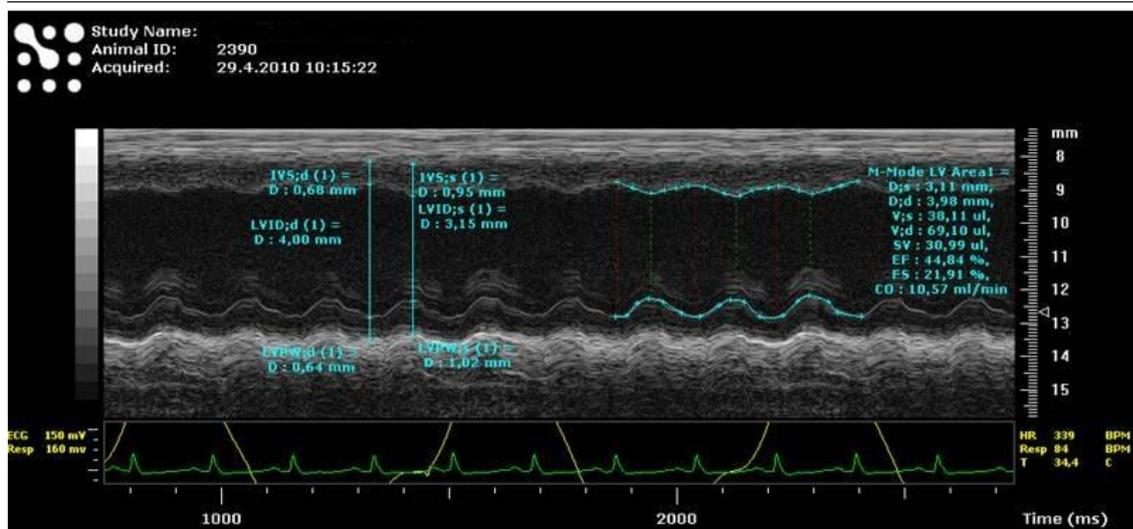
2.5 Inhibition von miR-223

Zur in- vivo- Inhibition von miR-223 wurden synthetische, modifizierte RNA-Oligonukleotide (Locked nucleic acid, LNA) verwendet, die sich durch erhöhte Stabilität gegenüber endogenen RNAsen auszeichnen (s.o.). Die Gabe des Inhibitors bzw. des Kontroll- Inhibitors erfolgte intraperitoneal am Tag vor der geplanten Operation.

2.5.1 Murine Echokardiografie

Die echokardiografische Untersuchung der Mäuse erfolgte mit einem hochauflösenden Ultraschallgerät mit 25 MHz Schallkopf (VisualSonics Vevo 770) am Institut des Exzellenzclusters cardiopulmonary system (ECCPS) in Gießen. Dabei wurden die Mäuse unter Narkose mit Isofluran auf einer beheizbaren Platte auf dem Rücken fixiert. Das linke Bein wurde über das rechte Bein geführt, wodurch die Rippen leicht gespreizt wurden, um das Auffinden eines ausreichenden Schallfensters zu erleichtern. Untersucht wurde in verschiedenen Schnittebenen (parasternaler Längsschnitt, parasternale kurze Achse, apikaler Vierkammerblick) sowohl im M-Mode als auch mit PW- und tissue-Doppler. Die echokardiographische Untersuchung und ihre Auswertung erfolgten durch eine Nummerierung ohne Gruppenbezeichnung der Mäuse verblindet. Die statistische Auswertung wurde mit GraphPad Prism 5 durchgeführt. Für die Untersuchung auf statistische Unterschiede zwischen der miR-223-Inhibitor-Gruppe und der Kontrollgruppe wurde der Mann-Whitney-Test für nichtparametrische Tests verwendet, wobei beidseitige p-Werte unter 0,05 als signifikant gewertet wurden.

Abbildung 2.2: Echokardiografische Darstellung im M- Mode zur Untersuchung des fractional shortening und der Ejektionsfraktion



2.5.2 Narbengröße nach I/R unter Inhibition von miR-223

Für eine volumetrische Untersuchung der Narbengröße wurde die Färbung mit Sirius Red verwendet. Dabei handelt es sich um eine Färbemethode für Kollagenfasern als einem wesentlichen Bestandteil der Infarkttnarbe. Dabei werden nach der Färbung der Kerne mit Eisen-Hämatoxylin die Schnitte mit Picrosirius red gefärbt, überflüssige Farblösung wird mit Essigsäure abgewaschen, um die Schnitte dann in einer aufsteigenden Alkoholreihe und Xylol zu entwässern.

Für die Untersuchung der Narbengröße wurden die Herzen nach zehn Tagen I/R nach Inhibitor- oder Kontrollsubstanzgabe, wie oben beschrieben, entnommen und eingefroren. Der gesamte Prozess der Bestimmung der Narbengröße erfolgte gegenüber der Gruppenzuordnung der Mausnummern verblindet. Im Cryostat wurden Gefrierschnitte von 6 µm Dicke angefertigt. Die Herzen wurden jeweils senkrecht zur Längsachse von apikal zur Basis hin komplett aufgeschnitten, wobei alle 250 µm jeweils ein Schnitt für die jeweilige Färbung verwendet wurde. Zwischen den einzelnen Schnittebenen wurden Schnitte größerer Dicke verwendet. Die Schnitte wurden nach ihrem Abstand zum ersten Anschnitt des Apex markiert, sodass zusammen mit der planimetrischen Bestimmung der Infarktausdehnung im einzelnen Schnitt eine näherungsweise Bestimmung der Volumina des linken Ventrikels und des Narbengewebes ermöglicht wurde. Die einzelnen Schnitte wurden unter dem Lichtmikroskop untersucht und in 1,6-facher Vergrößerung fotografiert, was die Darstellung eines kompletten Schnittes erlaubte. Die gespeicherten Bilder wurden dann

mit einem Bildbearbeitungsprogramm (ImageJ 1.46R) analysiert. Dabei wurden jeweils in einem Schnitt die Fläche des linken Ventrikelmyokards zusammen mit dem Septum und abzüglich des LV-Lumens und des Narbengewebes markiert und ausgemessen. Dazu wurden die verschiedenen Bereiche (linker Ventrikel, LV-Lumen, Infarkt) manuell markiert und die innerhalb der gezogenen Markierung gelegenen Pixel berechnet, woraus nach der Kalibrierung von Pixeln in mm die Fläche in mm^2 berechnet wurde. Die Berechnung der verschiedenen Volumina erfolgte näherungsweise anhand von aufeinandergesetzten Pyramidenstümpfen. Dafür wurden die Volumina für jeden Abschnitt zwischen zwei Schnitten aus den Flächen des unteren und oberen Schnittes und des Abstandes zwischen beiden Schnitten berechnet, um dann die Summe der Volumina aller Abschnitte zu bilden. Die Berechnung des Volumens eines solchen Abschnitts erfolgte nach der Formel $V = h/3 * (A1 + \sqrt{(A1 * A2)} + A2)$. V entspricht dabei dem Volumen in μm^3 . A1 entspricht der Fläche auf der apikalen Schnittebene in μm^2 , A2 der Fläche auf der basalen Schnittebene in μm^2 . h entspricht dem Abstand zwischen den Flächen in μm .

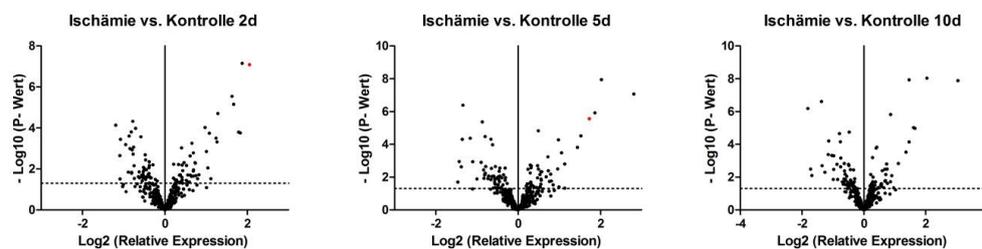
3 Ergebnisse

3.1 Differentielle Expression von miRNA nach Myokardinfarkt und Ischämie/ Reperfusion

3.1.1 MiRNA Microarray

Um zu untersuchen, ob sich die miRNA-Signaturen im ischämischen Gebiet zwischen reiner Ischämie und Ischämie/Reperfusion unterscheiden, wurde eine Hybridisierung von aus entsprechendem Gewebe gewonnener RNA auf miRNA-microArrays durchgeführt. Dabei wurden die Gewebe zwei, fünf und zehn Tage nach der Operation untersucht, um zeitabhängige Unterschiede bei der Expression detektieren zu können. Dabei erfolgte zunächst ein Vergleich jeweils zwischen permanenter Ischämie bzw. Ischämie/Reperfusion und einer Kontrollgruppe. Sowohl nach der Ischämie als auch nach der Ischämie/Reperfusion ändert sich das miRNA-Expressionsprofil im ischämischen Gebiet mit zeitabhängigen Unterschieden.

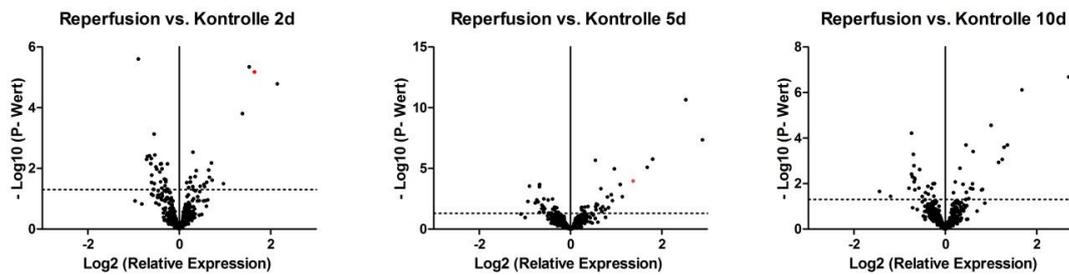
Abbildung 3.1.1: Volcano- Plot der relativen Expression von miRNAs im Infarktgebiet nach Ischämie im Vergleich zur Kontrollgruppe im microArray



X- Achse: Logarithmische Darstellung der relativen Expression gegenüber der Kontrollgruppe.
Y- Achse: Logarithmische Darstellung des P- Werts. Gestrichelte Linie: $p=0,05$.

Nach permanenter Ischämie waren insgesamt 125 miRNAs in ihrer Expression zu mindestens einem Zeitpunkt signifikant in ihrer Expression im Infarktgebiet gegenüber der Kontrollgruppe verändert. Besonders stark exprimiert wurden dabei nach zwei Tagen miR-223 und miR-689, nach fünf Tagen miR-689, miR-223, miR-21 und miR-142-3p und nach zehn Tagen miR-21 und miR-689. Weniger stark exprimiert wurden nach permanenter Ischämie vor allem miR-29 nach zwei Tagen, miR-149, miR-133a und miR-499 nach fünf Tagen und miR-805, miR-298, miR-149 nach zehn Tagen.

Abbildung 3.1.2: Volcano- Plot der relativen Expression von miRNAs im ischämischen Gebiet nach Ischämie/ Reperfusion im Vergleich zur Kontrollgruppe im microArray

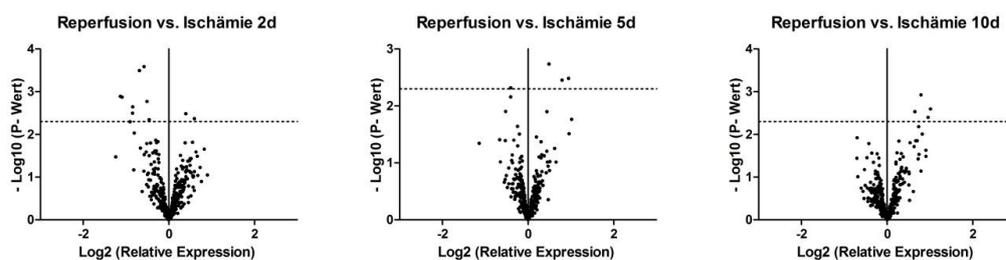


X- Achse: Logarithmische Darstellung der relativen Expression gegenüber der Kontrollgruppe.
Y- Achse: Logarithmische Darstellung des P- Werts. Gestrichelte Linie: $p = 0,05$.

Nach Ischämie/Reperfusion waren insgesamt 52 miRNAs in ihrer Expression zu mindestens einem Zeitpunkt signifikant verändert. Besonders stark exprimiert wurden die miRNAs miR-21 und miR-698 zu allen drei Zeitpunkten und miR-142-3p an Tag fünf. Weniger stark exprimiert wurden vor allem miR-328 an Tag 2, miR-149 und miR-805 an Tag 5 und miR-298, miR-805 und miR-328 an Tag 10.

In einer Gegenüberstellung der Expressionsdaten nach Ischämie/Reperfusion und permanenter Ischämie zeigten sich im Vergleich zu den Unterschieden der beiden Gruppen jeweils zur Kontrollgruppe nur geringe Unterschiede:

Abbildung 3.1.3: Volcano- Plot der relativen Expression von miRNAs nach Ischämie/ Reperfusion im Vergleich zu permanenter Ischämie im microArray



X- Achse: Logarithmische Darstellung der relativen Expression gegenüber der Gruppe Ischämie.
Y- Achse: Logarithmische Darstellung des P- Werts. Gestrichelte Linie: $p = 0,05$.

Insgesamt wurden im Vergleich zwischen den beiden Gruppen 42 miRNAs zu mindestens einem Zeitpunkt signifikant unterschiedlich exprimiert. Ein Großteil davon erfolgte mit anfangs geringerer Expression nach I/R, ein weiterer Teil mit höherer Expression nach Tag 5 bzw. 10. Es ergaben sich aber kleinere Expressionsunterschiede zwischen den Gruppen als beim direkten Vergleich der Expressionsdaten der beiden

Gruppen mit der Kontrollgruppe. Nach Ischämie/Reperfusion wurden an Tag zwei geringer als nach permanenter Ischämie vor allem miR-351, miR-714 und miR-298 exprimiert, höher exprimiert nach Tag zehn wurden insbesondere miR-805, miR-208 und miR-149, wobei sich auch hier die Richtung (verstärkte oder verminderte Expression) nicht unterschied. In Abbildung 31.1.4 werden die am deutlichsten differentiell exprimierten miRNAs nochmals zusammengefasst.

Abbildung 3.1.4: Auswahl der am deutlichsten differentiell exprimierten miRNA

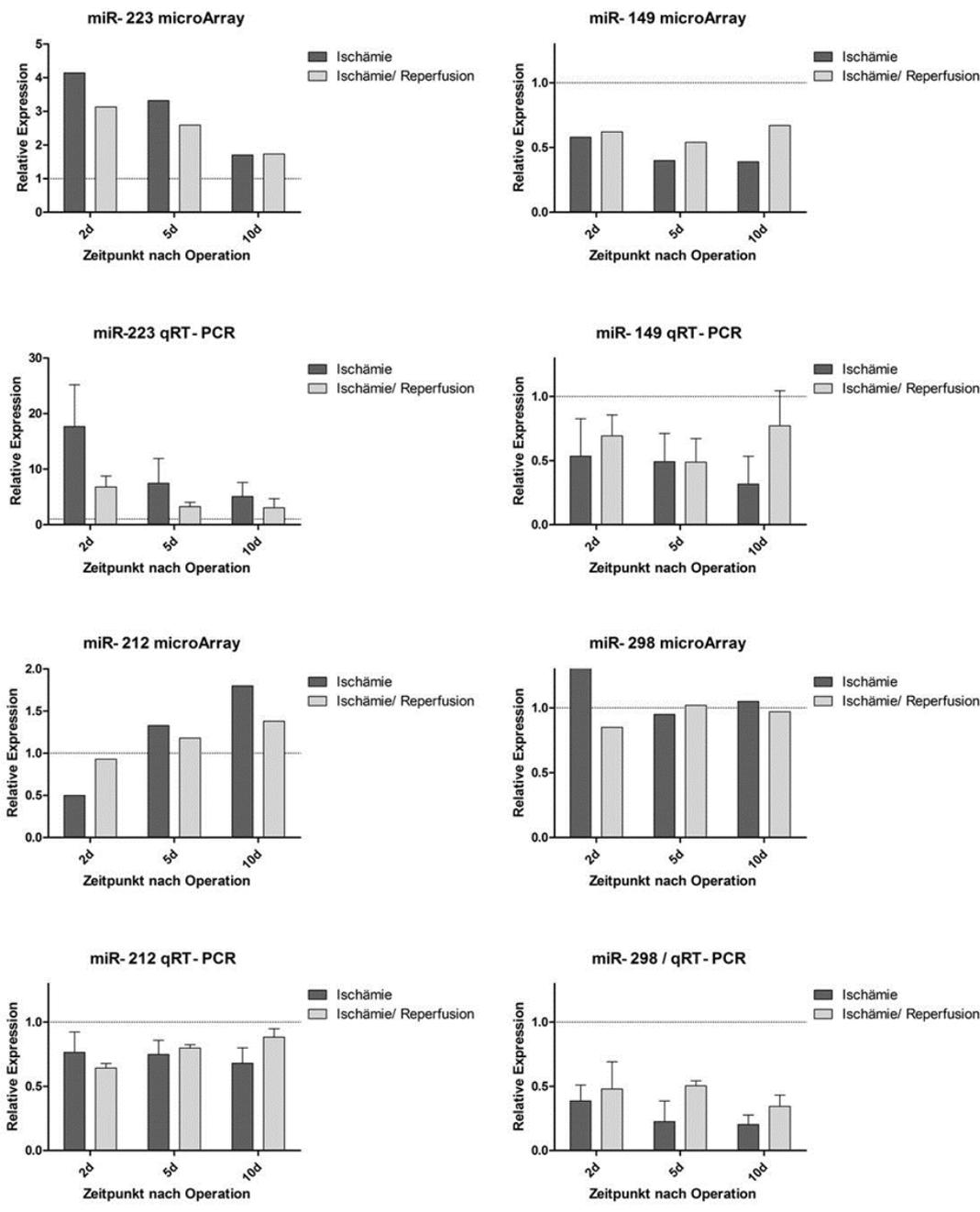
miRNA	Myokardinfarkt			Ischämie/Reperfusion			I/R versus MI		
	2d	5d	10d	2d	5d	10d	2d	5d	10d
mmu-miR-21	3,55	7,03	8,25	4,44	7,43	6,51	n.s.	n.s.	n.s.
mmu-miR-223	4,14	3,32	1,70	3,13	2,59	1,73	n.s.	n.s.	n.s.
mmu-miR-689	3,67	4,07	4,12	2,89	5,78	3,20	n.s.	n.s.	n.s.
mmu-miR-142-3p	2,40	3,65	2,76	2,61	3,21	2,25	n.s.	n.s.	n.s.
mmu-miR-29b	0,44	0,58	0,49	0,68	0,67	n.s.	1,55	n.s.	1,63
mmu-miR-149	0,58	0,40	0,39	0,62	0,54	0,67	n.s.	n.s.	1,73
mmu-miR-133a	n.s.	0,37	0,39	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	2,03	1,88
mmu-miR-499	0,68	0,45	0,46	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	1,74	1,67
mmu-miR-805	0,57	0,47	0,29	n.s.	0,52	0,58	n.s.	n.s.	2,02
mmu-miR-298	n.s.	0,36	0,31	n.s.	n.s.	0,37	n.s.	n.s.	n.s.

Relative Expression von miRNAs in den Gruppen Myokardinfarkt und Ischämie/Reperfusion gegenüber der Kontrollgruppe sowie im Vergleich beider Gruppen. n.s., nicht signifikant. Soweit nicht anders angegeben, ist der 5-p- Strang des miRNA- duplexes angegeben. Rot hinterlegt: relative Expression >1,5; grün: relative Expression < 0,5

3.1.2 Validierung der Microarray- Daten mittels qRT-PCR

Um die Expressionsprofile der ausgewählten miRNAs weiter zu untersuchen und zu validieren, wurde die relative Expression dieser miRNAs durch eine quantitative real-time-PCR nach einer reversen Transkription an einer unabhängigen Stichprobe überprüft. Dazu wurde ebenfalls Gewebe aus dem ischämischen Bereich zu verschiedenen Zeitpunkten entnommen, um dann die RNA inklusive kleiner RNA-Moleküle zu isolieren und mit einer reversen Transkription eine cDNA zu synthetisieren.

Abbildung 3.1.5: Gegenüberstellung der Ergebnisse von microArray und qRT-PCR
 exemplarisch: differentiell exprimierte (miR-223, miR-149) und ähnlich exprimierte (miR-212, miR-298)



Zur besseren Gegenüberstellung wurden die relative Expression des microarray als Foldchange dargestellt.
 P- Werte für differentielle Expression (2d, 5d, 10d): miR-223: 0.23, 0.29, 0.93 ;
 miR-149: 0,67, 0,06, 0,00, miR-212: 0,09, 0,73, 0,47; miR-298: 0,96, 0,44, 0,69.

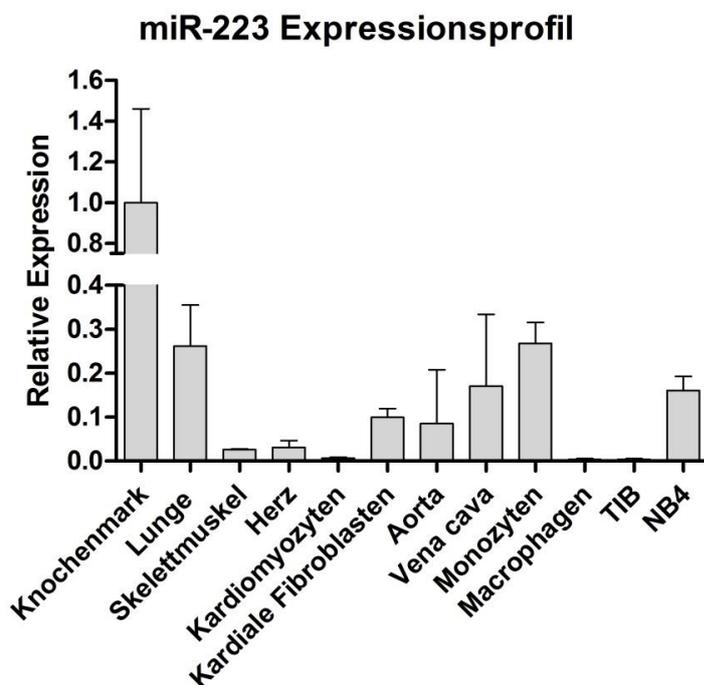
Bei den im microArray signifikant gemessenen miRNAs zeigte sich eine gute Übereinstimmung mit den Ergebnissen der qRT-PCR, während bei den im microArray nicht signifikant gemessenen miRNAs durch die qRT-PCR Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen besser detektiert werden konnten. Für die weitere Analyse und

funktionelle Untersuchung erfolgte dann eine Beschränkung auf miRNA-223, die sowohl nach I/R als auch nach permanenter Ischämie differentiell exprimiert wurde, aber in unterschiedlichem Ausmaß. Dabei wurde miR-223 an Tag zwei und fünf nach der Operation im von der Ligatur betroffenen Gebiet in beiden Gruppen deutlich stärker exprimiert als in gesunden Kontrollen mit einer signifikant höheren Expression nach permanenter Ischämie. Nach zehn Tagen war der Unterschied zwischen den beiden Gruppen nicht mehr signifikant nachweisbar.

3.2 Expression von miR-223 in verschiedenen Geweben und Zellreihen

Die Expression von miR-223 in verschiedenen Geweben wurde bereits in anderen Studien untersucht, etwa in Leukozyten und ihren Vorläuferzellen, in Thrombozyten und im Knochenmark. Ein Vergleich der Expression in zahlreichen weiteren Organen lag allerdings noch nicht vor. Für einen Vergleich der Expression von miR-223 in verschiedenen Geweben und Zellreihen wurden ebenfalls qRT-PCRs durchgeführt.

Abbildung 3.2: Expressionsprofil von miR-223 in verschiedenen Geweben und Zellen



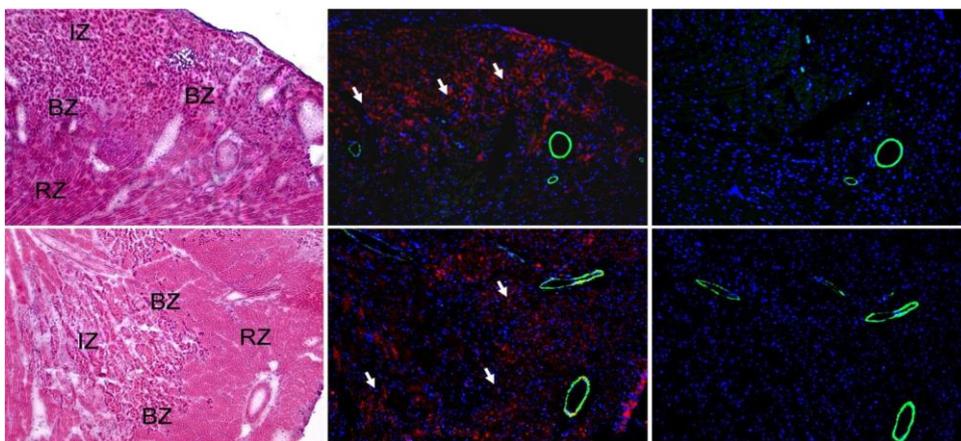
Kardiomyozyten und Kardiale Fibroblasten: Isolierte und kultivierte neonatale Zellen (Ratte), Monozyten/Makrophagen: aus humanem Vollblut isoliert, TIB: Zelllinie ATCC TIB-71, NB4: Zellen des Klons NB4 (PMID: 1995093)

Dabei konnte die bekannt hohe Expression von miR-223 im Knochenmark und in den Zellen der myeloischen Reihe bestätigt werden. In diesem Zusammenhang konnte miR-223 nicht nur im Knochenmark, sondern auch in isolierten Monozyten und NB4-Zellen, einer Zelllinie aus transformierten Promyelozyten, in großen Mengen nachgewiesen werden, während die Expression in differenzierteren Zellen der myeloischen Reihe deutlich geringer war. Außerdem konnte miR-223 in neonatalen Kardiomyozyten, in den großen Gefäßen, in der Herz- und Skelettmuskulatur und in der Lunge nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich, dass miR-223 zwar in geringen Mengen im Mäuseherz nachweisbar war, in neonatalen Rattenherzen aber vornehmlich in den kardialen Fibroblasten vorkam.

3.3 Lokalisation von miR-223 im Herzen nach I/R und permanenter Ischämie

Für eine Lokalisation von miR-223 im Mäuseherzen nach permanenter Ischämie und nach I/R wurden auf histologischen Schnitten durch das Infarktgebiet in-situ-Hybridisierungen von miR-223 mit einer auf LNA basierenden und mit Digoxigenin gekoppelten Sonde durchgeführt, die dann mit einer alkalischen Phosphatase-Reaktion durch ein chromogenes Substrat visualisiert wurden.

Abbildung 3.3.1: Verteilung von miR-223 im Mäuseherz nach Ischämie und Ischämie/ Reperfusion

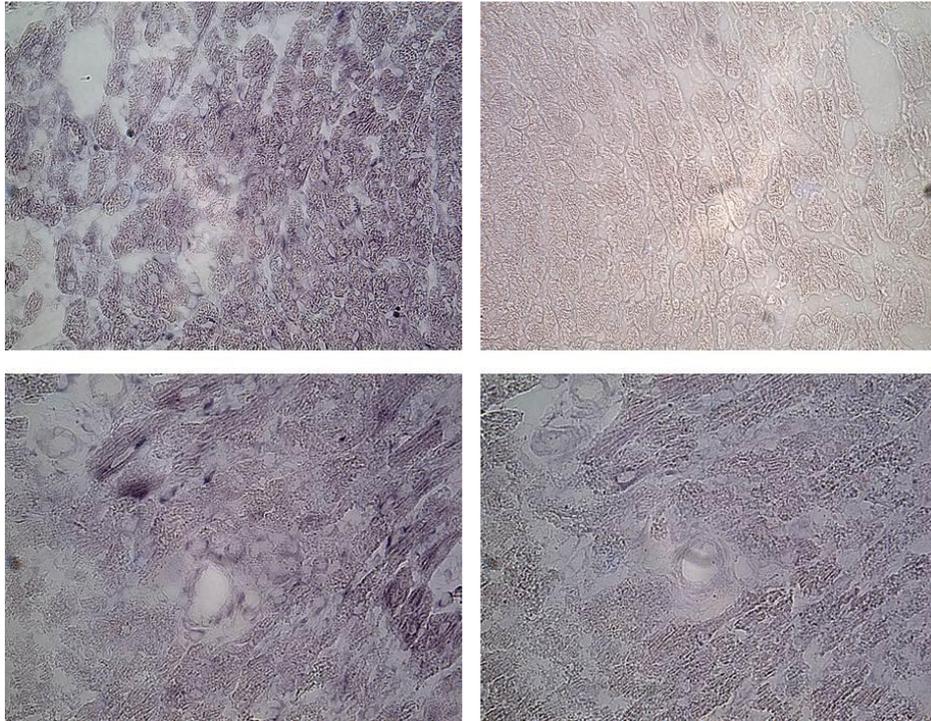


Linke Spalte: HE- Färbung. IZ: Ischämische Zone, RZ: Remote Zone/ nichtischämisches Myokard, BZ: Border zone/ Grenzgebiet zwischen ischämischen und nichtischämischem Myokard. Mittlere Spalte: Mit Hilfe des unter Fluoreszenzlicht rot leuchtenden chromogenen Substrats Fast Red wurde miR-223 im Overlay mit DAPI zur Färbung der Zellkerne sowie einer Immunhistochemischen Färbung gegen glattmuskuläres Aktin zur besseren vergleichbarkeit der Bildausschnitte in seriellen Schnitten dargestellt. Rechte Spalte: Hybridisierung mit einer unspezifischen Kontrollsonde.

Insgesamt zeigte sich sowohl nach permanenter Ischämie als auch nach Ischämie/Reperfusion eine Konzentration von miR-223 vor allem im Grenzgebiet oder in

der Border zone zwischen der ischämischen Zone, der sich nach zwei Tagen in der HE-Färbung nekrotisch darstellenden Zone und dem unbeteiligten nicht ischämischen Myokard. Eine genauere Zuordnung der Färbung zu einzelnen Zellen war wegen eines grob granulären Färbungsverhaltens von Fast Red nicht möglich. Deshalb wurden weitere Färbungen mit dem chromogenen Substrat NBT/BCIP und Aufnahmen der Border Zone unter höherer Vergrößerung durchgeführt.

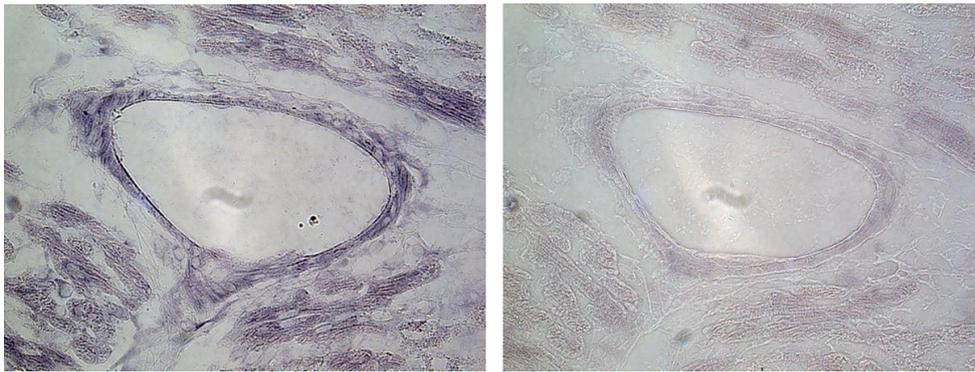
Abbildung 3.3.2: Lokalisation von miR-223 im Grenzgebiet zwischen Ischämischem und unbeteiligttem Myokard



Links: Hybridisierung mit einer miR-223- spezifischen Sonde. Rechts: Hybridisierung mit einer Kontrollsonde.
Oben: Nach zwei Tagen permanenter Ischämie, Unten: Nach zwei Tagen I/R.

Dabei zeigte sich eine verstärkt zytoplasmatische Anfärbung unter Aussparung des Zellkerns vor allem bei nekrotischen Zellen und Gefäßanschnitten lokalisierter Zellen mit teilweise ausgezogenen Zellgrenzen, die größtenteils zwischen den Kardiomyozyten bzw. ihren Residuen zu liegen kommen, wobei auch intakte Myozyten eine schwächere Anfärbung aufwiesen. Außerdem wurden auch Zellen im Bereich von Gefäßwänden intensiv angefärbt.

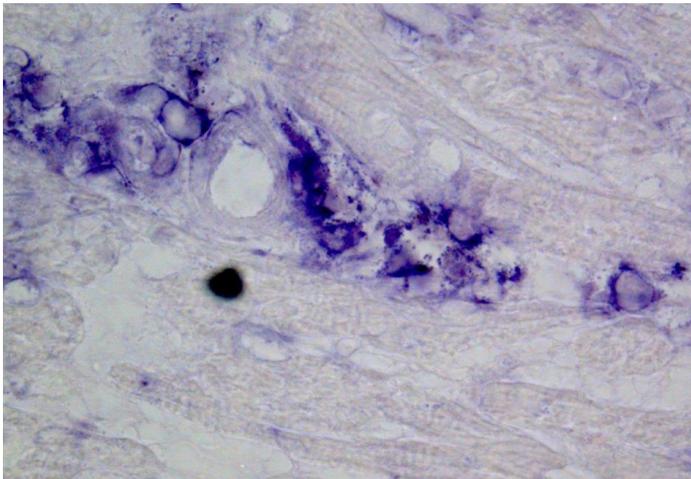
Abbildung 3.3.3: Lokalisation von miR-223 in einer Gefäßwand



Links: Hybridisierung mit einer miR-223- spezifischen Sonde. Rechts: Hybridisierung mit einer Kontrollsonde.

Wegen der dafür benötigten hohen Konzentrationen an Hybridisierungssonden wurde dann für die folgenden Experimente eine niedrigere Sondenkonzentration mit einem nach der Hybridisierung erfolgenden HRP-antiDIG Amplifikationsschritt mit Tyramidgekoppelter alkalischer Phosphatase verwendet, wodurch die Darstellung der miR-223-positiven Zellen nochmals verbessert werden konnte:

Abbildung 3.3.4: Detektion der miR-223- Sonde mit Tyramide signal amplification

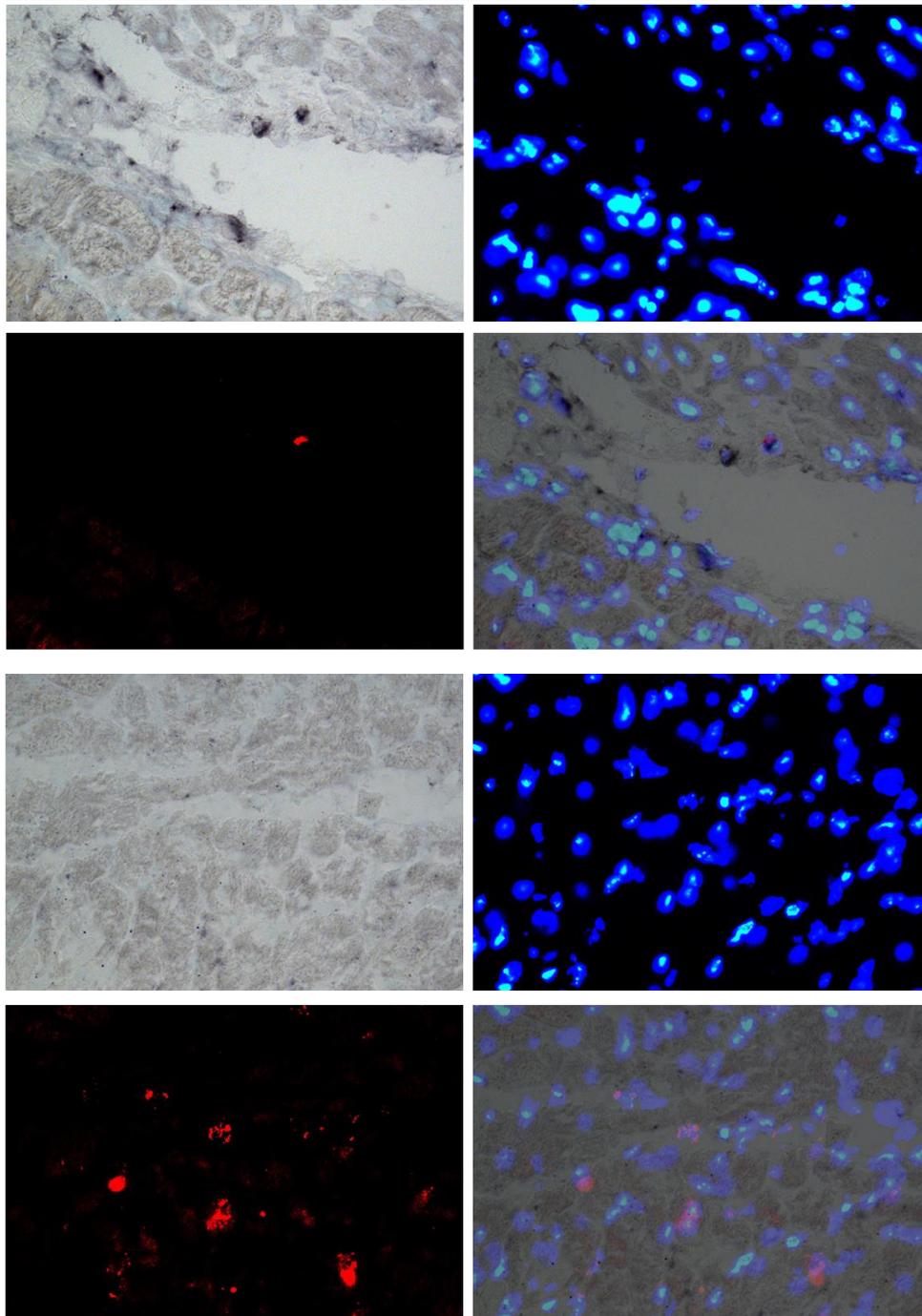


Blau: NBT/ BCIP- Niederschlag nach Hybridisierung von miR-223 und Nachweis der Sonde mittels eines mit HRP gekoppelten anti- DIG- Antikörpers zur Detektion Tyramid- gekoppelter alkaliner Phosphatase

Insgesamt konnte dabei eine Lokalisation von miR-223 im Grenzgebiet zwischen Infarkt und unbeteiligttem Myokard vornehmlich in perivaskulären und interstitiellen Zellen festgestellt werden. Dabei war außerdem eine deutliche Färbung des Zytoplasmas auffällig, während die Zellkerne fast kein Signal zeigten. Um eine weitere Zuordnung der Färbung zu inflammatorischen Zellen oder Fibroblasten zu ermöglichen, wurden Cofärbungen mit Antikörpern gegen verschiedene Oberflächenmarker durchgeführt.

Dabei lieferten nur die erwähnte Cofärbung mit glattmuskulärem Aktin und eine Cofärbung mit einem Antikörper gegen Ly6G, einem vornehmlich von neutrophilen Granulozyten exprimierten Oberflächenantigen, reproduzierbare Ergebnisse.

Abbildung 3.3.5: Lokalisation von miR-223 in einem neutrophilen Granulozyt im Infarktgebiet nach zwei Tagen



Rot: Ly6G, Blau: Zellkerne. Oberes Panel: Blauschwarz: miR-223
Unteres Panel: Hybridisierung mit einer Kontrollsonde.

Durch eine Cofärbung von miR-223 mit einem chromogenen Substrat und eine immunhistochemische Darstellung eines Oberflächenmarkers neutrophiler Granulozyten

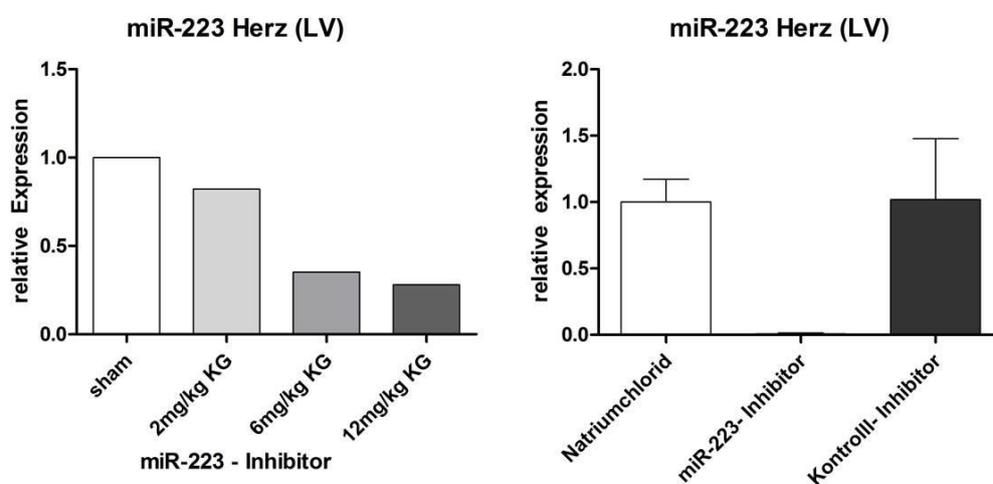
konnte nachgewiesen werden, dass einige der miR-223-positiven Zellen auch Ly6G-positiv waren, woraus sich ableiten lässt, dass es sich bei einem Teil der miR-223-positiven Zellen in der Border zone um neutrophile Granulozyten handelt. Dennoch fanden sich neben diesen Zellen auch andere, die nur miR-223-positiv waren.

3.4 Antagonisierung von miR-223 *in vivo*

3.4.1 Validierung der Antagonisierung

Nachdem nachgewiesen werden konnte, dass zumindest ein Teil der erhöhten miR-223-Expression im Infarktgebiet vermutlich auf eine Expression in eingewanderten interstitiellen Entzündungszellen zurückgeht, wurde die Frage untersucht, ob die Expression von miR-223 eine biologische Rolle bei den Remodeling-Prozessen nach einem Myokardinfarkt spielt und dadurch einen Einfluss auf die myokardiale Funktion und die Größe der entstehenden Narbe hat. Um dies zu untersuchen, entschieden wir uns aufgrund der erhöhten Expression postischämisch zu einer Antagonisierung dieser miRNA. Zur Antagonisierung von miR-223 *in vivo* wählten wir eine LNA- basierte komplementäre Sonde mit Phosphorothioatbrücken, welche durch eine thermodynamisch sehr stabile Bindung zu komplementärer RNA biologische Interaktionen dieser RNA behindert und damit die biologischen Effekte der Expression der miRNA antagonisiert. Um die optimale Dosis für unseren Inhibitor zu finden führten wir eine Dosis- Wirkungs-Studie zur Ermittlung der optimalen Dosierung für eine suffiziente Antagonisierung von miR-223 durch unseren Inhibitor durch.

Abbildung 3.4.1: Dosisabhängige Antagonisierung von miR-223 nach Gabe des miR-223- Inhibitors



Dabei zeigte sich im Mäuseherz eine dosisabhängige Suppression der Expression einen Tag nach der Applikation. Da eine intraperitoneale Injektion zuverlässiger und für die Mäuse schonender erschien, wurde danach geprüft, ob mit der gewählten Dosis von 12 mg/kg eine ausreichende Suppression von miR-223 im Herzen erreicht werden konnte. In diesem Zusammenhang konnte die Wirksamkeit des miR-223-Inhibitors bei intraperitonealer Gabe bestätigt werden, wobei die Gabe des Kontroll-Inhibitors die Expression von miR-223 nicht beeinflusste. Als Kontrolle diente eine Gruppe, die Kochsalzlösung i. p. erhielt.

3.4.2 Antagonisierung von miR-223 vor experimenteller Ischämie/ Reperfusion

Um zu untersuchen, welchen Einfluss die Antagonisierung von miR-223 auf die Auswirkungen eines experimentellen Herzinfarktes bei der Maus auf die kardiale Funktion und die Narbengröße hat, wurden einen Tag vor der geplanten Operation 12 mg/kg des gegen miR-223 gerichteten Inhibitors appliziert (n=12), während die Kontrollgruppe (n=8) wiederum den Kontroll-Inhibitor erhielt.

3.4.3 Echokardiografie nach Antagonisierung von miR-223 und experimenteller Ischämie/ Reperfusion

Für eine Evaluierung der kardialen Funktion wurden an den Tagen zwei und neun bzw. zehn echokardiografische Untersuchungen durchgeführt. Dabei wurde neben anderen Parametern vor allem die myokardiale Kontraktilität in der Form der LVEF und der relativen Verkürzung des Herzens (fractional shortening, FS) bestimmt.

Abbildung 3.4.2: Ejektionsfraktion nach Myokardinfarkt nach Antagonisierung von miR-223

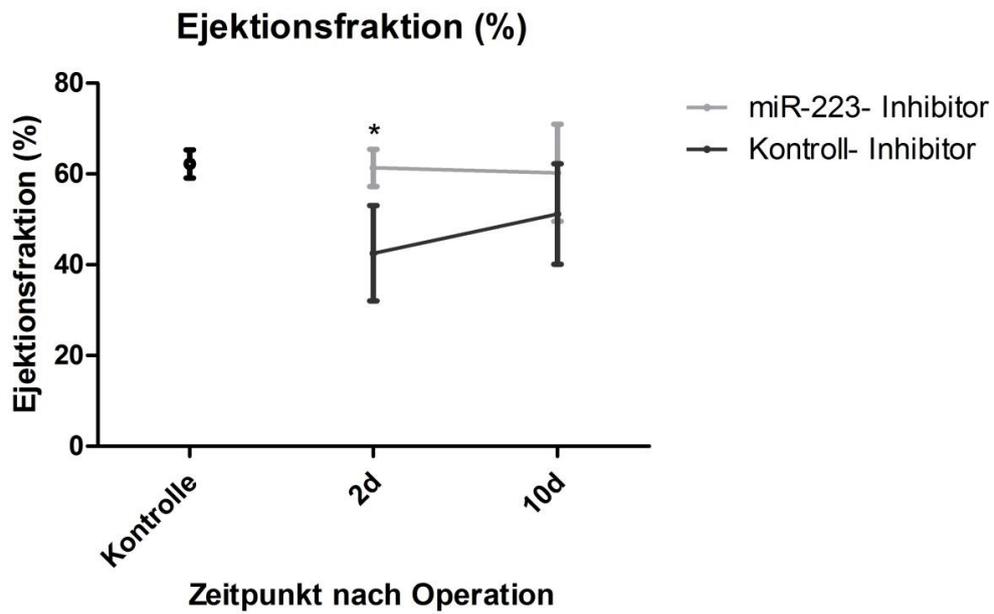


Abbildung 3.4.3: Fractional shortening nach Myokardinfarkt nach Antagonisierung von miR-223

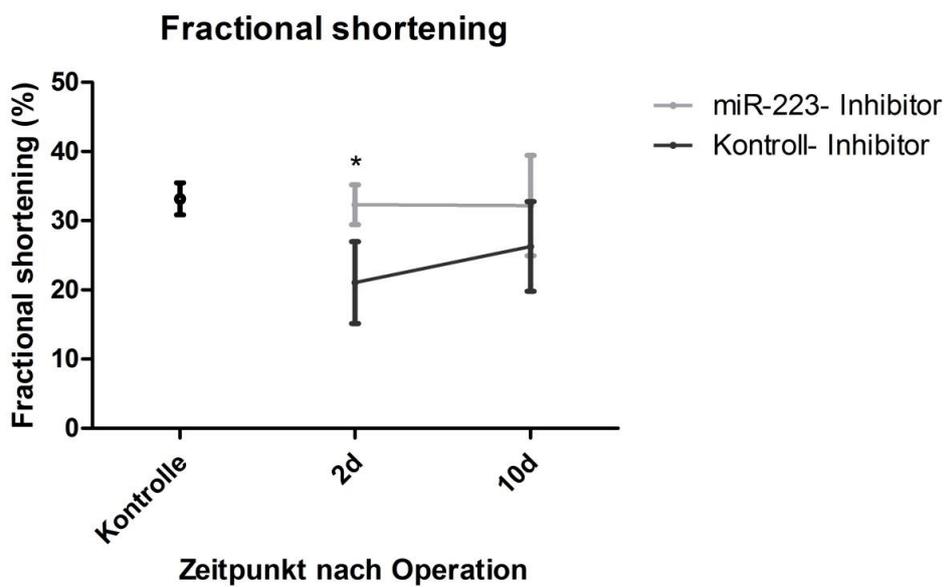
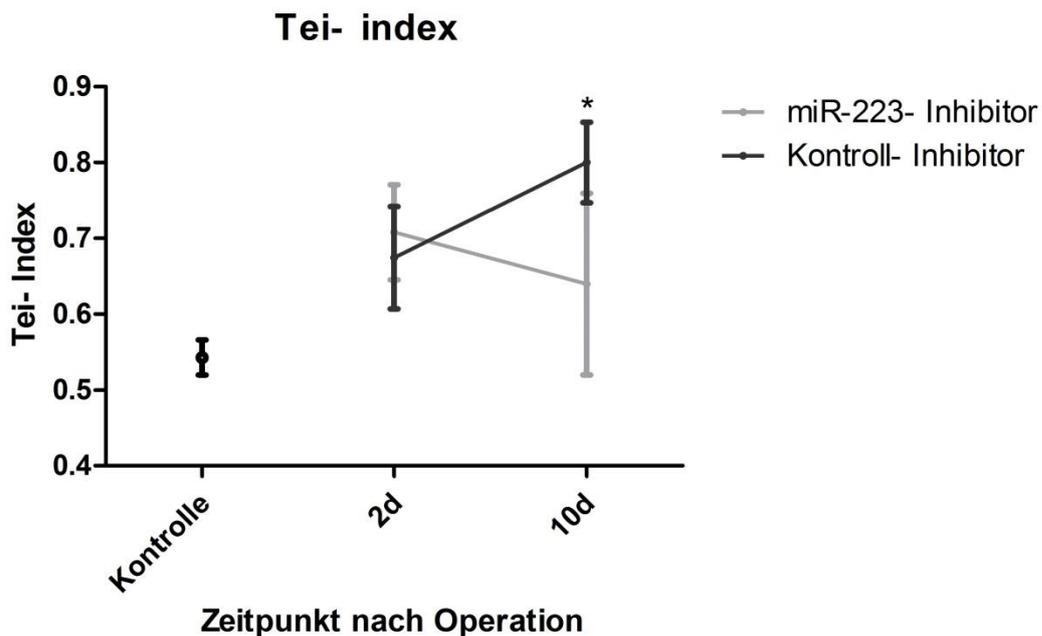
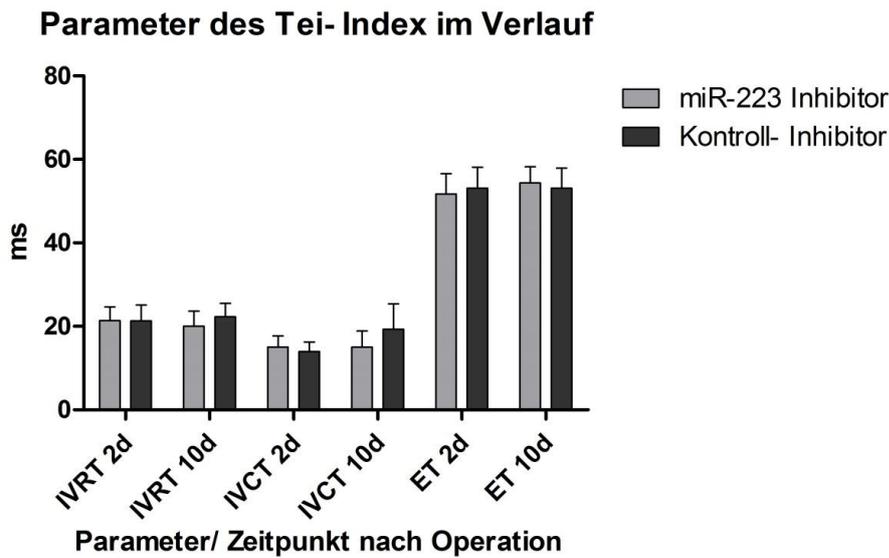


Abbildung 3.4.4: Tei- Index nach Myokardinfarkt nach Antagonisierung von miR-223



Dabei zeigte sich, dass die LVEF nach der Antagonisierung von miR-223 an Tag zwei nach einem experimentellen Myokardinfarkt signifikant höher war als nach der Gabe des Kontroll-Inhibitors. Acht Tage später war dieser Unterschied zwischen den beiden Gruppen zwar nicht mehr signifikant messbar, aber dennoch tendenziell vorhanden. Ähnlich verhielt es sich mit dem fractional shortening, sodass insgesamt gefolgert werden kann, dass die systolische Funktion an Tag zwei in der miR-223-Inhibitor-Gruppe besser war als in der Kontrollgruppe. Im Unterschied dazu war der Tei-Index, ein Index, der sowohl systolische als auch diastolische Messzeiten einbezieht, an Tag zwei zwischen beiden Gruppen nicht signifikant verändert. An Tag zehn zeigte sich jedoch ein gegenüber der Kontrollgruppe signifikant geringerer Index, was einer besseren globalen Herzfunktion systolisch und diastolisch entspricht.

Abbildung 3.4.5: Parameter des Tei- index im Vergleich



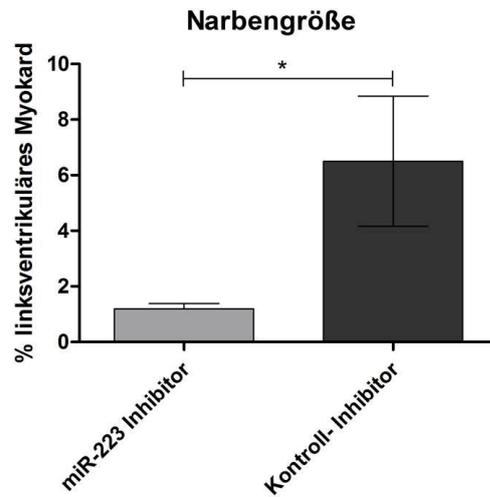
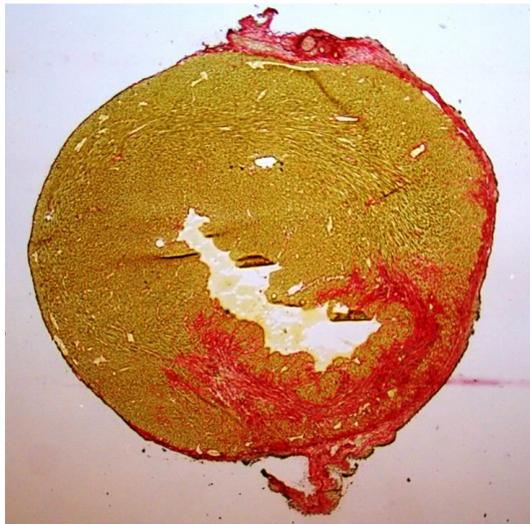
IVRT: Isovolumetrische Relaxationszeit, IVCT: Isovolumetrische Kontraktionszeit, ET: Ejektionszeit

Bei einer Untersuchung, welche Veränderungen in den Ausgangsparametern des Tei-Index ursächlich für den an Tag 10 signifikant geringeren Index der mit miR-223-Inhibitor behandelten Tiere ursächlich waren, konnte kein signifikanter Unterschied bei den einzelnen untersuchten Parametern festgestellt werden, aber eine Tendenz bei allen drei Parametern, die insgesamt zu einem signifikant veränderten Index führte.

3.4.4 Narbengröße nach Antagonisierung von miR-223 vor Ischämie/ Reperfusion

Um in dem verwendeten Modell die Narbengröße und ihren Anteil am linken Ventrikel zu bestimmen, wurden serielle Schnitte durch den gesamten linken Ventrikel durchgeführt und näherungsweise ausgehend von der narbig veränderten Fläche in den einzelnen Schnitten und ihrem Abstand zueinander die Größe der Narbe und ihr Anteil am Gesamtvolumen des linksventrikulären Myokards berechnet. Für eine bessere visuelle Erkennbarkeit des narbig veränderten Gebiets wurde eine Färbung mit Sirius red verwendet, bei der sich kollagene Fasern, wie sie vor allem in der Infarkt Narbe vorkommen, gut vom gesunden Myokard abheben.

Abbildung 3.4.6: Infarktgröße nach Sirius red



Links: Beispielhafter Schnitt durch die Infarktnarbe, diese kommt rot zur Darstellung
Rechts: Vergleich der relativen Narbengrößen in Bezug auf das gesamte Linksventrikuläre Myokard zwischen mit miR-223 Inhibitor und mit Kontroll- Inhibitor behandelten Tieren nach experimentellem Myokardinfarkt

Dabei zeigte sich, dass nach der Applikation des miR-223-Inhibitors die Infarktgröße im Vergleich mit der Applikation des Kontroll-Inhibitors signifikant kleiner war. Dadurch konnte nachgewiesen werden, dass die Antagonisierung von miR-223 zwei Tage nach einem Myokardinfarkt nicht nur zu einer verbesserten Herzfunktion führt, sondern auch zu einer verminderten Narbengröße.

4 Diskussion

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Bei den Untersuchungen des miRNA-Expressionsprofils im Infarktgebiet der Mäuseherzen zeigte sich eine über den Zeitverlauf von 2, 5 und 10 Tagen differentielle Expression einer Vielzahl von miRNAs sowohl nach permanenter Ischämie als auch nach Ischämie/Reperfusion.

Im Vergleich zwischen permanenter Ischämie und Ischämie/Reperfusion konnte allerdings keine gegensätzlich regulierte miRNA nachgewiesen werden. In den RT-PCR-Validierungen der Array-Ergebnisse zeigte sich eine im Vergleich jeweils stärkere Regulation in der Gruppe der permanenten Ischämie gegenüber der Gruppe mit Ischämie/Reperfusion. Die stärkste differentielle Expression ergab sich im Microarray bei miR-223.

Danach wurde untersucht, von welchen Zellen im Infarktgebiet miR-223 exprimiert wird. Bei einer Untersuchung der globalen Expression in verschiedenen Geweben und Zellreihen zeigte sich eine vorwiegende Expression im Knochenmark, in myeloiden Zellkulturlinien und Monozyten. Außerdem zeigte sich eine hohe Expression im Lungengewebe, wozu in der Lunge sequestrierte neutrophile Granulozyten beigetragen haben könnten. In gesundem Herzgewebe zeigte sich eine nur geringe Expression.

Um zu überprüfen, ob die gesteigerte Expression im Infarktgebiet auf eine Invasion von inflammatorischen Zellen oder eine verstärkte Expression in Kardiomyozyten, Fibroblasten oder Endothelzellen zurückzuführen ist, wurde die örtliche Verteilung von miR-223 im Infarktgebiet mit einer in-situ-Hybridisierung untersucht. Durch eine Untersuchung serieller Schnitte, die abwechselnd mit H. E. und durch eine in-situ-Hybridisierung gefärbt wurden, konnte eine verstärkte Expression in der Übergangszone zwischen nekrotischem Gewebe und gesundem Myokard nachgewiesen werden. Außerdem zeigte sich eine verstärkte Anfärbung sowohl von Endothelzellen als auch von perivaskulären Zellen, die wegen der sonst fehlenden Färbung nur anhand der Morphologie und daher nicht sicher differenziert werden konnten. Auffällig war darüber hinaus auch eine fast ausschließlich zytoplasmatische Färbung der Zellen.

Um eine Zuordnung zu einem bestimmten Zelltyp zu ermöglichen, wurden sequentiell am selben Schnitt eine in-situ-Hybridisierung für miR-223 und danach immunhistochemische Färbungen durchgeführt. Dabei zeigte sich ein Teil der miR-223 stark exprimierenden Zellen als positiv für Ly6G, einem Marker für neutrophile Granulozyten. Eine Cofärbung mit anderen Markern, z. B. von Makrophagen oder Fibroblasten, gelang leider technisch nicht, weshalb keine weitere Zuordnung perivaskulärer Zellen, die miR-223 exprimieren, möglich war. Hinsichtlich der Lokalisation der Zellen kommen dabei vor allem Makrophagen in Betracht. Diese Ergebnisse stützen daher die Vermutung, dass die verstärkte Expression von miR-223 im Infarktgebiet vor allem durch eine Invasion miR-223 exprimierender Zellen aus dem Blutstrom und im Endothel hervorgerufen wird.

Um zu untersuchen, ob miR-223 beim Infarktgeschehen eine protektive oder eine schädliche Wirkung auf die Infarktheilung und dadurch auch auf die Herzfunktion hat, wurde die Herzfunktion nach einer Antagonisierung von miR-223 und einem experimentellen Myokardinfarkt echokardiografisch untersucht. Dabei zeigte sich ohne Antagonisierung und in der Kontrollgruppe, wie es zu erwarten war, eine deutlich reduzierte Pumpfunktion des linken Ventrikels, aber in der Gruppe, die zuvor einen miR-223-Inhibitor erhalten hatte, zeigte sich eine erhaltene Ejektionsfraktion. Eine Antagonisierung von miR-223 kann also die Herzfunktion nach einem experimentellen Myokardinfarkt erhalten. Im Einklang mit diesen Ergebnissen konnte auch bei der Färbung mit Sirius red und der volumetrischen Analyse von Stufenschnitten komplett aufgeschnittener Herzen eine geringere Narbengröße im Vergleich mit der Kontrollgruppe nachgewiesen werden.

4.2 Diskussion

4.2.1 Differentielle Expression von miRNA nach Myokardinfarkt und Ischämie/ Reperfusion

Die gezielte Untersuchung des miRNA-Expressionsprofils bei einer Gruppe mit permanenter Ischämie und einer Gruppe mit Ischämie/Reperfusion war auf die miRNAs ausgerichtet, die spezifisch durch die Reperfusion und den damit verbundenen Reperfusionsschaden differenziell exprimiert werden. Dabei sollten die miRNAs identifiziert werden, deren Expression in einem pathophysiologischen Zusammenhang

mit dem Reperfusionsschaden steht, um dadurch potentielle Ziele für eine Verringerung dieses Schadens zu erschließen.

Bei den durchgeführten Experimenten konnten allerdings keine miRNAs nachgewiesen werden, die nur in einer der beiden Gruppen differentiell exprimiert wurden. In ähnlicher Weise konnte auch keine miRNA ermittelt werden, die in einer Gruppe verstärkt und in der anderen vermindert exprimiert wurde. Dabei fiel allerdings der relative Unterschied bei der permanenten Ischämie tendenziell jeweils deutlicher aus oder die differentielle Expression hielt länger an. Eine miRNA-Expressionssignatur, die spezifisch mit dem Reperfusionsschaden assoziiert werden kann, konnte insofern zu den untersuchten Zeitpunkten nicht nachgewiesen werden. Da für die Untersuchung von Ischämie/Reperfusionsschaden auch die ersten Stunden nach dem Eintritt entscheidend sein könnten, wäre es für zukünftige Studien interessant, einen solchen Vergleich der Expressionsprofile zwischen den beiden Gruppen auch zu einem früheren Zeitpunkt durchzuführen.

Bei der Validierung durch RT-PCR stellten sich die Unterschiede bei der Expression zwischen den Gruppen deutlicher dar als im Microarray, wobei sich etwa bei der differentiellen Expression von miR-212 und miR-298 deutliche Unterschiede gegenüber den Microarray-Daten zeigten. Möglicherweise lässt sich dies auf die grundsätzlich andere Normalisierungsmethodik der Rohdaten zurückführen, die sich beim microArray auf die gesamte RNA und die insgesamt gebundenen miRNAs bezog, bei der RT-PCR aber auf eine Referenz-miRNA (miR-25), die wiederum normalisiert auf die gesamte RNA die größte Stabilität über alle Proben und Gruppen hinweg aufwies. Die Beobachtung, dass die Expressionsunterschiede in der RT-PCR deutlicher ausfielen als im Microarray wirft die Frage auf, ob möglicherweise eine relevante Anzahl differentiell regulierter miRNAs im Microarray fälschlicherweise als nicht signifikant reguliert angegeben wurden.

4.2.2 Expression von miR-223 in verschiedenen Geweben und Zellreihen

Für miR-223 wurde vor allem eine wichtige Rolle bei der Differenzierung der myeloischen Zellreihe beschrieben, wobei die Expression dort am stärksten ist.⁹⁶ Dieser Befund konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Bisher gab es dafür aber nur wenige Daten zur relativen Expression in anderen Geweben.

Um die möglichen Effekte einer systemischen Antagonisierung von miR-223 besser einschätzen zu können, wurde zunächst die globale Expression über verschiedenste Gewebe und Zellkulturlinien hinweg analysiert. Die mit Abstand robusteste Expression zeigte sich dabei, wie sich aus der beschriebenen Rolle bei der Myelopoese ableiten lässt, im Knochenmark, in den Monozyten und in der Zelllinie NB4, die einer akuten Promyelozyten-Leukämie entstammt und für die nach einer Differenzierung zu reifen neutrophilen Granulozyten mit all-trans-Retinsäure nochmals eine Steigerung der Expression beschrieben wurde.⁹⁶ Außerdem zeigte sich eine deutliche Expression in der Lunge, was möglicherweise darauf zurückgeführt werden kann, dass ein Großteil der intravaskulär zirkulierenden neutrophilen Granulozyten in den Lungenkapillaren sequestriert vorliegt.

Auch in der Aorta und der *Vena cava* konnte miR-223 nachgewiesen werden. Wegen der deutlich dickeren *Tunica media* der Aorta würde man bei einer Expression in dieser Schicht allerdings eine deutlich höhere Expression erwarten. In der Literatur wurde ein Vorkommen bisher vor allem in Endothelzellen beschrieben, wobei interessanterweise die dort vorkommende miR-223 nicht endogen in den Endothelzellen exprimiert wird, sondern aus Mikrovesikeln, Thrombozyten und HDL aufgenommen wird und dann in den Endothelzellen eine anti-angiogenetische Wirkung entfaltet.^{101, 130}

4.2.3 Expression von miR-223 im Herzen nach I/R und permanenter Ischämie

Im Einklang mit diesen Befunden konnte in der vorliegenden Arbeit auch bei der in-situ-Hybridisierung in intramyokardialen Blutgefäßen miR-223 nachgewiesen werden. Ein Teil der miR-223 positiven Zellen konnte immunhistochemisch mit Ly6G cogefärbt werden, was im Einklang mit der beschriebenen Expression in myeloiden Zellen steht. Die übrigen Zellen konnten allerdings nicht differenziert werden, weil nach der Durchführung der in-situ-Hybridisierung die anschließende immunhistochemische Färbung vermutlich durch eine Zerstörung der Zielepitope der verwendeten Antikörper keine Färbung mehr ergab. Morphologisch kann festgehalten werden, dass es sich neben einer schwachen Färbung von Kardiomyozyten vorwiegend um perivaskulär und interstitiell gelegene Zellen handelt. Dabei konnten perivaskulär eine intensive zytoplasmatische Färbung von Zellen mit schmalen Zytoplasmasaum und rundlichem Kern und interstitiell eine zytoplasmatische Färbung spindelförmiger Zellen nachgewiesen

werden. Hinsichtlich der Morphologie kommen für die beschriebenen Zellen am ehesten Monozyten oder Lymphozyten respektive Myofibroblasten in Betracht.

Über welche Mechanismen die Antagonisierung von miR-223 in dem verwendeten Modell kardioprotektiv gewirkt hat, wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht. Weil die Expression hauptsächlich in den Blutgefäßen und vor allem in einem Teil der perivaskulären Zellen und dabei auch der neutrophilen Granulozyten erfolgte, kann eine kardioprotektive Beeinflussung der Funktion dieser Zellen durch die Inhibierung von miR-223 angenommen werden, die sowohl beim Myokardinfarkt als auch bei Ischämie/Reperfusionsschaden eine zentrale Rolle spielen.

4.2.4 Antagonisierung von miR-223 *in vivo*

In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass nach der Antagonisierung von miR-223 nach einer intraperitonealen Gabe eines Inhibitors die Herzfunktion nach einem experimenteller Ischämie/Reperfusion im Unterschied zur Kontrollgruppe, die einen Kontroll-Inhibitor erhielt, erhalten blieb. Die Operation mit einer Ligatur des RIVAs erfolgte dabei nicht verblindet, was mit dem Risiko eines Bias verbunden ist. Dabei handelt es sich allerdings um eine standardisierte Operation, bei der die Lokalisation der Ligatur, die letztlich die Infarktgröße beeinflusst, genau vorgegeben wird. Wegen dieses standardisierten Vorgehens ist auch bei einer nicht konsequenten Verblindung keine relevante Beeinflussung des Ergebnisses zu erwarten. Bei der echokardiografischen Auswertung wurden die Untersuchung und Auswertung verblindet durchgeführt, sodass dabei eine systematische Beeinflussung des Ergebnisses ausgeschlossen werden kann. Bei der Untersuchung der Narbengröße wurden für die volumetrische Auswertung des Infarktgebietes Stufenschnitte verwendet. Diese Methode wurde deshalb ausgewählt, weil damit einerseits dieselben Herzen sequentiell aufgeschnitten werden konnten, um aus äquidistanten Schnitttiefen jeweils Schnitte für die in-situ-Hybridisierung und die Analyse der Narbengröße mit einer Färbung mit Sirius red zu erhalten. Bei der Standardmethode einer Färbung mit Evan's blue ist die Analyse der Infarktgröße durch eine manuelle Ausführung der Schnitte mit einem gewissen Fehler behaftet, der grösser sein dürfte als bei den maschinell vorgenommenen Schnitten. Zudem erfordert diese Methode im Gegensatz zu der oben beschriebenen die Operation zusätzlicher Mäuse, die nur für diese Analyse verwendet werden können, während die hier verwendete die gleichzeitige Verwendung für Analyse der Narbengröße und In-situ-hybridisierung bzw. Immunhistochemie ermöglicht. Durch Dehydratation und eine

Akkumulation kleiner Abweichungen der Schnittdicke beim wiederholten Schneiden könnte zwar das errechnete Volumen vom wahren Volumen abweichen, wobei aber auch dabei mit einer gleichmäßigen Verteilung eines möglichen Fehlers auf beide Gruppen zu rechnen wäre. Eine technisch nicht erfolgreiche Ligatur konnte außerdem durch den Nachweis eines Infarktareals in allen untersuchten Herzen ausgeschlossen werden, weshalb auch ein fehlender Infarkt in der mit dem miR-223-Inhibitor behandelten Gruppe als Ursache einer erhaltenen Pumpfunktion ausgeschlossen werden kann.

4.3 Einordnung in den Stand der Forschung und Ausblick

Der Befund, dass eine Inhibierung von miR-223 bei einem Myokardinfarkt kardioprotektiv wirkt, wird durch die bisherigen Forschungsergebnisse gestützt. So konnten z. B. für eine Antagonisierung von miR-223 in einem Rattenmodell diabetischer Kardiomyopathie anti-inflammatorische, anti-apoptotische und antifibrotische Wirkungen nachgewiesen werden.¹³¹

4.3.1 Thrombozytenaggregation

Wie bereits unter 1.5.4 beschrieben wurde, konnten Landry und Kollegen¹⁰⁶ zeigen, dass miR-223 in Thrombozyten die häufigste miRNA darstellt, dass Thrombozyten mit Ago2-Proteinen und Dicer über einen Effektor-Komplex verfügen, der essentiell für die Regulation der mRNA-Translation ist, dass P2Y12-mRNA eine Zielsequenz für miR-223 enthält und mit Ago2 assoziiert in Thrombozyten vorkommt, was eine Regulation der P2Y12-Rezeptor-Expression durch miR-223 nahelegt. Ein direkter Einfluss dieses möglichen regulatorischen Mechanismus auf die Thrombozyten-Reaktivität konnte bislang zwar nicht nachgewiesen werden, aber diese Befunde legen nahe, dass die Expression von P2Y12 nach der Gabe eines miR-223-Antagonisten gesteigert werden sollte, wodurch dann auch die Reaktivität der Thrombozyten zunehmen würde. Beim Myokardinfarkt wäre dabei durch die Antagonisierung eine ausgedehntere Thrombosierung und dadurch eine Vergrößerung des Infarktareals zu erwarten, während in der vorliegenden Arbeit ein kleineres Infarktareal durch die Antagonisierung nachgewiesen werden konnte. Denkbar wäre es allerdings, dass es durch die Gabe des Inhibitors bereits am Vortag des experimentellen Infarkts durch eine gesteigerte Aktivierung der Thrombozyten zu einer Verringerung der Thrombozytenzahl durch Verbrauch gekommen sein könnte.

4.3.2 Angiogenese

Shi et al.¹⁰¹ konnten zeigen, dass miR-223 zwar in frisch isolierten Endothelzellen stark exprimiert wird, die Expression aber bei der Kultivierung und bei einer Exposition gegenüber VEGF und basischem Fibroblasten-Wachstumsfaktor (bFGF) deutlich abnimmt. Außerdem konnte die Gruppe nachweisen, dass sowohl ein miR-223 knockdown als auch ein knockout zu einer vermehrten Angiogenese *in vitro* und *in vivo* führen, während eine miR-223-Überexpression die durch VEGF und bFGF induzierte intrazelluläre Signaltransduktion und Angiogenese beeinträchtigte; dieser Effekt war abhängig von β 1-Integrin, dessen mRNA ein Ziel von miR-223 ist.

Dai et al.¹³² konnten zeigen, dass miR-223 in ischämischen kapillären Endothelzellen des Myokards die Proliferation und Migration inhibiert und dadurch die Angiogenese vermindert.¹³² Dabei ist es bemerkenswert, dass miR-223 hier nicht von Endothelzellen selbst transkribiert, sondern aus dem Blutstrom aus HDL-Partikeln aufgenommen wird.¹³⁰ Dadurch könnte miR-223 eine konstitutionelle Suppression der Angiogenese in Endothelzellen bewirken, während eine verminderte Perfusion zu einer Abnahme von miR-223 und auf diese Weise zu einer verstärkten Angiogenese führen könnte.

Zusammenfassend belegen diese Arbeiten eine anti-angiogenetische Rolle von miR-223, was den eigenen Befund einer verbesserten Infarktheilung mit geringerer Narbengröße und besserer Pumpfunktion stützt, auch wenn diese Fragestellung nicht histologisch oder funktionell untersucht wurde.

4.3.3 Lipidmetabolismus und Atherogenese

Shan et al. konnten nachweisen, dass miR-223 von Thrombozyten und Monozyten in Mikropartikeln abgegeben und von vaskulären glatten Muskelzellen aufgenommen wird, wobei es dort die Expression von Zielgenen verändern kann.¹³³ Außerdem konnte die Gruppe zeigen, dass in einem ApoE-knockout-Mausmodell die Inhibierung von miR-223 zu deutlich ausgedehnteren atherosklerotischen Veränderungen führte. Interessanterweise führt miR-223 in Hepatozyten zu einer verminderten Expression des Scavenger Receptors B1 und dadurch zu einer verminderten Aufnahme von HDL-Cholesterin.¹³⁴ Da miR-223 in HDL enthalten¹³⁰ ist und wahrscheinlich auch auf diesem Weg von Hepatozyten aufgenommen wird, könnte dieser Zusammenhang einen regulatorischen Feedback-Mechanismus bilden.

Diese Arbeiten machen deutlich, dass miR-223 eine endokrine Funktion im Lipidmetabolismus spielt, wobei eine Antagonisierung atherogene Veränderungen zu begünstigen scheint. Von einer Antagonisierung von miR-223 wären daher zumindest längerfristig eher schädliche Effekte auf die Vaskulatur zu erwarten; im Vordergrund der eigenen Untersuchungen stand allerdings der unmittelbare Effekt auf den Myokardinfarkt.

4.3.4 Inflammation und Apoptose

Einige Funktionen von miR-223 hinsichtlich der zellulären Immunantwort und der Thrombozyten-Aggregation waren, wie unter 1.5.4 beschrieben wurde, bereits bekannt. So wird bei einem knockout von miR-223 insgesamt wegen der erhöhten Anzahl von neutrophilen Granulozyten von einer gesteigerten Reaktivität auf inflammatorische Stimuli⁹⁵ und einer Verschiebung der Makrophagen-Differenzierung hinsichtlich des proinflammatorischen M1-Subtyps^{104, 105} und damit von einem proinflammatorischen Effekt der Inhibition ausgegangen.

Zusätzlich liegen Erkenntnisse vor, die nahelegen, dass miR-223 eine wichtige Rolle in der Eindämmung von Inflammation und Apoptose spielt:

So konnte gezeigt werden, dass hohe Glucosespiegel in kultivierten Ratten-Kardiomyoblasten miR-223 induzieren und miR-223 durch eine Inhibition des Transkriptionsfaktors PU.1 die Transkription von Caspase 1 als einem kritischen Faktor der Pyroptose inhibiert.¹³⁵⁻¹³⁷ Pyroptose bezieht sich auf einen Zelltod durch eine Aktivierung des Inflammasoms durch Sensoren einer Zellschädigung oder damage-associated molecular patterns (DAMPs), die durch eine Aktivierung von Caspase-1 über eine Degradation von Enzymen der Glycolyse zum Zelltod und einer Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen führt, nämlich vor allem IL-1 β und IL-18.¹³⁸ Dabei sind sowohl kardiale Fibroblasten, kardiale Myozyten und Zellen des Immunsystems der Pyroptose ausgesetzt.¹³⁸

Diese Arbeiten stützen die Ergebnisse der bisherigen Arbeiten, die insgesamt für einen proinflammatorischen Effekt der Inhibition von miR-223 sprechen, wobei pathophysiologisch eine verstärkte Aktivität und Anzahl von neutrophilen Granulozyten, eine Beeinflussung der Makrophagen-Differenzierung zugunsten des proinflammatorischen M1-Subtyps und eine Förderung der Pyroptose und Inflammation

im Vordergrund stehen. Im Unterschied dazu konnten einige Arbeiten aber auch eine anti-apoptotische und anti-inflammatorische Rolle der Inhibition von miR-223 nachweisen:

So zeigte sich in einem Rattenmodell der diabetischen Kardiomyopathie nach einer Induktion der diabetischen Kardiomyopathie eine deutlich erhöhte Expression von miR-223. Außerdem konnten nach einer Inhibition von miR-223 eine verminderte Apoptoserate, eine morphologisch verminderte Fibrose, eine verminderte Blutglucose, eine verbesserte Herzfunktion und eine verminderte Expression von NLRP3 und Kollagenen nachgewiesen werden.¹³¹ In einer weiteren Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass miR-223 die häufigste von Makrophagen abgegebene und in Mikrovesikeln vorkommende miRNA bildet und in unterschiedlichen anderen Zellen in der Zellkultur (Endothelzellen, Epithelzellen und Fibroblastenlinien) aufgenommen wird und dort die mRNA-Translation von Zielgenen beeinflusst.¹⁰⁰ Darüber hinaus stellten die Autoren fest, dass die Expression von miR-223 im Verlauf der Differenzierung abnimmt und eine Inhibition von miR-223 die Adhärenz, Differenzierung und das Überleben von Monozyten beeinträchtigt. Deshalb legt diese Arbeit im Unterschied zu den bisherigen einen anti-inflammatorischen Effekt der Inhibition von miR-223 durch eine verminderte Differenzierung und Adhärenz von Makrophagen nahe.

Daher lassen sich die Effekte der Inhibition von miR-223 nicht klar den groben Kategorien pro- oder anti-inflammatorisch zuordnen, weshalb eine differenzierte Betrachtung der einzelnen Effekte erforderlich ist. So könnten etwa eine gesteigerte neutrophile Inflammation und M1-Makrophagenantwort zu einem schnelleren Abräumen geschädigter und nekrotischer Zellen beitragen, während die verminderte Differenzierung von Makrophagen und ein beeinträchtigt Signaling durch die in Mikrovesikeln abgegebene miR-223 den fibrotischen Umbau bremsen könnten.

Im Unterschied zur vorliegenden Arbeit konnte eine andere Arbeitsgruppe im Rattenmodell eine verminderte Expression von miR-223 im Infarktgebiet nachweisen. Dabei wurde eine anti-apoptotische Rolle von miR-223 in H₂O₂-exponierten H9c2-Zellen postuliert, einer Rattenmyoblasten-Zelllinie *in vitro*,¹³⁹ die einen negativen Effekt der Inhibition von miR-223 nahelegte.

Diese widersprüchlichen Daten zur Expression von miR-223 im Infarktgebiet verdeutlichen die Notwendigkeit einer sorgfältigen Untersuchung der Expression mit mehreren Methoden. Eine Stärke der vorliegenden Arbeit zeigt sich dabei im robusten

Nachweis einer verstärkten Expression sowohl im Microarray als auch in der RT-PCR. Darüber hinaus konnte auch bei der in-situ-Hybridisierung eine starke Expression von miR-223 direkt im Infarktgebiet nachgewiesen werden.

4.3.5 Myokardiales Remodeling und Kontraktilität

Myokardiale Nekrose, Apoptose und Inflammation durch einen Myokardinfarkt werden nach einigen Tagen abgelöst durch regenerative Vorgänge, die durch den Abbau beschädigter Strukturen und einen bindegewebigen Umbau gekennzeichnet sind.¹⁴⁰ Der Grad der Beeinträchtigung der myokardialen Funktion und der Kontraktilität nach einem Myokardinfarkt wird daher nicht nur durch die Ausdehnung der myokardialen Nekrose und Apoptose, sondern auch durch den strukturellen Umbau des betroffenen und angrenzenden Myokards bestimmt.¹⁴¹ Auch für diese Vorgänge wurde in der Literatur eine Rolle von miR-223 belegt. So zeigten etwa Wang et al.,¹⁴² dass eine myokardiale Überexpression von miR-223 im Mausmodell eine myokardiale Hypertrophie erzeugt, weshalb miR-223 physiologisch durch eine zirkuläre RNA sequestriert wird, wobei eine Überexpression dieser zirkulären RNA vor einer durch Isoproterenol induzierten Hypertrophie schützt. Außerdem konnte die Arbeitsgruppe nachweisen, dass diese Sequestrierung von miR-223 auch vor einem pathologischen Remodeling des Myokards schützt.¹⁴² Eine chinesische Arbeitsgruppe untersuchte den Effekt einer intramyokardialen Injektion eines miR-223-Inhibitors, wobei sich ähnlich wie in der vorliegenden Arbeit sonografisch im Rattenmodell eine verbesserte Pumpfunktion nach 48 h zeigte. Von den Autoren wurde dabei eine ursächliche Rolle von SOX6 angenommen, einem proapoptotischen Faktor in Kardiomyozyten mit einer Ziel-mRNA von miR-223.¹⁴³ In Zellkulturstudien mit ischämischen Ratten-Kardiomyozyten konnte außerdem eine anti-angiogenetische Rolle von miR-223 nachgewiesen werden.¹³²

4.4 Ausblick und Fazit

In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass die Antagonisierung von miR-223 ein therapeutisches Potential für eine Verbesserung der Herzfunktion nach einem Myokardinfarkt aufweist. Unter Berücksichtigung der Literatur können die positiven Effekte auf eine Beeinflussung mehrerer pathophysiologischer Mechanismen zurückgeführt werden, nämlich insbesondere eine Beeinflussung der Thrombozyten-Aggregation, der Entzündungsreaktion, der Angiogenese und des Remodelings.

Bevor eine klinische Testung dieses spannenden Therapieansatzes am Menschen in Erwägung gezogen werden kann, sind weitere präklinischen Studien erforderlich. Zum einen liegt im klinischen Alltag ein reperfundiertes Infarktgebiet vor, wobei die Auswirkungen einer miR-223-Inhibition auf Ischämie/Reperfusion und der optimale Zeitpunkt der Anwendung bisher noch nicht untersucht wurden. Dabei wäre auch zu klären, ob eine systemische und etwa intravenöse Gabe vor, unmittelbar nach oder sogar erst verzögert eine optimale Wirkung zeigt. Auch eine intracoronare Gabe während der Reperfusion wäre zu diskutieren. Weil die Expression von miR-223 vermutlich vor allem in zirkulierenden Zellen erfolgt, sollte eine intravenöse Gabe gut wirksam sein. Hinsichtlich der Frage, ob sich nach einer erfolgten Reperfusion auch eine weitere Verringerung der Infarktgröße erreichen lässt, kann zumindest durch die Ähnlichkeit der Expression von miR-223 und das Vorliegen des Interventionsziels auch nach Ischämie/Reperfusion eine Wirksamkeit angenommen werden. Auch die Infarktheilung, bei der Angiogenese und Inflammation, die nach der Literatur durch die Inhibierung von miR-223 beeinflusst werden können eine große Rolle spielen, verläuft vermutlich bei Ischämie/Reperfusion und einem Myokardinfarkt ähnlich, weshalb eine Übertragung der Ergebnisse als möglich erscheint.

Die Unterschiede bei der Expression von miRNA nach Ischämie/Reperfusion und permanenter Ischämie wurden nach eigener Einschätzung bisher in keiner Arbeitsgruppe untersucht. In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals nachgewiesen werden, dass einige miRNAs in beiden Gruppen differentiell reguliert werden, während eine gegensätzliche Regulation nicht nachgewiesen werden konnte. Es konnte bestätigt werden, dass die Antagonisierung von miR-223 hinsichtlich der Narbengröße und der sonografisch bestimmten Funktion des Herzens eine kardioprotektive Wirkung hat.

5 Zusammenfassung

Einleitung

Die ischämische Herzkrankheit stellt weltweit die häufigste Todesursache dar. Der akute Myokardinfarkt ist weiterhin mit einer hohen Mortalität und Morbidität verbunden. Dessen Folgen zu verringern, hat daher eine hohe klinische Relevanz. Diese Arbeit untersucht in diesem Kontext Unterschiede im Expressionsprofil von miRNA zwischen permanenter Ischämie und Ischämie/ Reperfusion, die Lokalisation von miR-223 im Infarktgebiet sowie den Effekt ihrer Antagonisierung auf Herzfunktion und Narbengröße nach Myokardinfarkt.

Methoden

Das miRNA- Expressionsprofil im Infarktgebiet nach permanenter Ischämie und Ischämie/ Reperfusion wurde im Mausmodell zu verschiedenen Zeitpunkten mittels microArray analysiert und mittels qRT-PCR validiert. Die Lokalisation von miR-223 im Infarktgebiet wurde mittels kombinierter in-situ-Hybridisierung und Immunhistochemie untersucht. Der Einfluss von miR-223 auf die echokardiografische Herzfunktion und Narbengröße nach Myokardinfarkt wurde durch Gabe eines spezifischen Inhibitors untersucht.

Ergebnisse

Im Vergleich zwischen permanenter Ischämie und Ischämie/ Reperfusion zeigen sich deutliche Unterschiede in der miRNA- Expression, wobei miR-223 eine der am stärksten differentiell exprimierten miRNA darstellt. MiR-223 konnte mittels in- situ-Hybridisierung im Infarktgebiet lokalisiert werden. Die Inhibition von miR-223 vor experimenteller Ischämie/ Reperfusion führt zu einer verbesserten Pumpfunktion und geringerer Narbengröße.

Konklusion

Das miRNA- Expressionsprofil unterscheidet sich zwischen permanenter Ischämie und Ischämie/ Reperfusion deutlich. Mir-223 wird dabei im Myokardinfarkt deutlich stärker exprimiert und die Antagonisierung dieser miRNA führt zu einer verbesserten Herzfunktion und kleinerer Infarktnarbe nach Ischämie/ Reperfusion.

Abstract

Introduction

Ischemic heart disease represents the leading cause of death worldwide. Acute myocardial infarction continues to be associated with high mortality and morbidity. Reducing its consequences is therefore of high clinical relevance. In this context, this work investigates differences in the expression profile of miRNA between permanent ischemia and ischemia/reperfusion, the localization of miR-223 in the infarct area, and the effect of its antagonization on cardiac function and scar size after myocardial infarction.

Methods

The miRNA- expression profile in the infarct area after permanent ischemia and ischemia/reperfusion was analysed in a mouse model at different time points by microArray and validated by qRT-PCR. The localization of miR-223 in the infarct area was investigated by combined in situ hybridization and immunohistochemistry. The effect of miR-223 on echocardiographic cardiac function and scar size after myocardial infarction was investigated by administration of a specific inhibitor.

Results

Comparison between myocardial infarction and ischemia/reperfusion revealed marked differences in miRNA expression, with miR-223 being one of the most differentially expressed miRNAs. MiR-223 could be localized to the infarct area by in situ hybridization. Inhibition of miR-223 before experimental myocardial infarction results in improved cardiac function and reduced scar size.

Conclusion

The miRNA expression profile differs markedly between myocardial infarction and ischaemia/ reperfusion. MiR-223 is significantly more expressed in myocardial infarction and antagonising this miRNA leads to improved cardiac function and smaller infarct scar.

6 Abkürzungsverzeichnis

AGO	Argonaute- Protein
AML	akute myeloische Leukämie
AP	alkaline Phosphatase
aSMA	glattmuskuläres Aktin (anti smooth muscle actin)
bFGF	basischer Fibroblasten- Wachstumsfaktor (basic fibroblast growth factor)
Biomarker	Biochemische Marker
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure, complementary DNA
ct	Schwellenzyklus (threshold cycle)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)
EKG	Elektrokardiogramm
FAM	Fluorescein amitid
FMC	First medical contact
FS	relative Verkürzung (fractional shortening)
GTP/GDP	Guanosintriphosphat/ Guanosindiphosphat
H.E.	Hämatoxilin/Eosin
HRP	Meerrettichperoxidase (hoseradish peroxidase)
I/R	Ischämie/ Reperfusion
IKK α	Inhibitor of nuklear factor kappa-B kinase subunit alpha
KHK	koronare Herzkrankheit
LNA	fixierte Nukleinsäure (locked nucleic acid)
LVEF	linksventrikuläre Auswurffraktion (left ventricular ejection fraction)
MI	Myokardinfarkt
miRISC	miRNA induced silencing complex
miRNA/ miR	micro- Ribonukleinsäure (micro- ribonucleic acid)
MRE	miRNA responsive element
mRNA	Boten- Ribonukleinsäure (messenger ribonucleic acid)
NF- κ B	nuclear factor κ B
PCI	Perkutane Koronarintervention (Percutaneous Coronary Intervention)
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
qRT-PCR	quantitative Echtzeit-PCR (quantitative real-time-PCR)
RIN	RNA integrity number
RIVA	ramus interventrikularis anterior der linken Koronararterie
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
RT	Reverse Transkription
RT-PCR	Reverse Transkriptase/Real-Time PCR
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
smiRNA	semi-miRNA
snoRNA	kleine nukleoläre RNA (small nucleolar RNA)

snRNA	kleine nukleäre RNA (small nuclear RNA)
STEMI	ST- Hebungsinfarkt (ST Elevation myocardial Infarction)
TSA	Tyramid- Signalamplifikation (tyramide signal amplifikation)
UTR	untranslatierte Region
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor (vascular endothelial growth factor)

7 Publikationsverzeichnis

1. Harrison TR, Longo DL, Diemel M. *Principles of Internal Medicine*. London: McGraw-Hill, 2012.
2. Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, *et al.* Fourth universal definition of myocardial infarction (2018). *Eur. Heart J.* 2019;**40**(3):237–69.
3. GBD 2013 Mortality and Causes of Death Collaborators. Global, regional, and national age–sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990–2013: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *The Lancet* 2015;**385**(9963):117–71.
4. Knuuti J, Wijns W, Saraste A, *et al.* 2019 ESC Guidelines for the diagnosis and management of chronic coronary syndromes. *Eur. Heart J.* 2020;**41**(3):407–77.
5. McDonagh TA, Metra M, Adamo M, *et al.* 2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. *Eur. Heart J.* 2021;**42**(36):3599–726.
6. Khan MA, Hashim MJ, Mustafa H, *et al.* Global Epidemiology of Ischemic Heart Disease: Results from the Global Burden of Disease Study. *Cureus* 2020;**12**(7):e9349.
7. Buja LM, Vander Heide RS. Pathobiology of Ischemic Heart Disease: Past, Present and Future. *Cardiovascular Pathology* 2016;**25**(3):214–20.
8. Moran AE, Forouzanfar MH, Roth GA, *et al.* The Global Burden of Ischemic Heart Disease in 1990 and 2010: The Global Burden of Disease 2010 Study. *Circulation* 2014;**129**(14):1493–501.
9. Kovacic JC, Castellano JM, Fuster V. Cardiovascular defense challenges at the basic, clinical, and population levels. *Ann N Y Acad Sci* 2012;**1254**:1–6.
10. McMurray JJV, Pfeffer MA. Heart failure. *The Lancet* 2005;**365**(9474):1877–89.
11. Mosterd A, Hoes AW. Clinical epidemiology of heart failure. *Heart* 2007;**93**(9):1137–46.
12. *Krankheitskosten - Krankheitskosten in Mio. EUR für Deutschland*, 12.05.16. (Accessed 12.05.16, at http://www.gbe-bund.de/oowa921-install/servlet/oowa/aw92/dboowasys921.xwdevkit/xwd_init?gbe.isgbetol/xs_start_neu/&p_aid=i&p_aid=18503261&nummer=553&p_sprache=D&p_indsp=99999999&p_aid=57420888).
13. Sutton GC, Erik Otterstad J, Kirwan B-A, *et al.* The development of heart failure in patients with stable angina pectoris. *Eur J Heart Fail* 2007;**9**(3):234–42.
14. Roffi M, Patrono C, Collet J-P, *et al.* 2015 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation: Task Force for the Management of Acute Coronary Syndromes in Patients Presenting without Persistent ST-Segment Elevation of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur Heart J* 2016;**37**(3):267–315.
15. Steg PG, James SK, Atar D, *et al.* ESC Guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation. *Eur Heart J* 2012;**33**(20):2569–619.
16. Chazov EI, Matveeva LS, Mazaev AV, Sargin KE, Sadovskaia GV, Ruda MI. Intracoronary administration of fibrinolysin in acute myocardial infarct. *Ter Arkh* 1976;**48**(4):8–19.

17. Gruppo Italiano per lo Studio della Streptochinasi nell'Infarto Miocardico. Effectiveness of intravenous thrombolytic treatment in acute myocardial infarction. *The Lancet* 1986;**327**(8478).
18. Randomised trial of intravenous streptokinase, oral aspirin, both, or neither among 17,187 cases of suspected acute myocardial infarction: ISIS-2. ISIS-2 (Second International Study of Infarct Survival) Collaborative Group. *Lancet* 1988;**2**(8607):349–60.
19. Asseburg C, Vergel YB, Palmer S, *et al.* Assessing the effectiveness of primary angioplasty compared with thrombolysis and its relationship to time delay: a Bayesian evidence synthesis. *Heart* 2007;**93**(10):1244–50.
20. A clinical trial comparing primary coronary angioplasty with tissue plasminogen activator for acute myocardial infarction. The Global Use of Strategies to Open Occluded Coronary Arteries in Acute Coronary Syndromes (GUSTO IIb) Angioplasty Substudy Investigators. *N Engl J Med* 1997;**336**(23):1621–8.
21. Grines CL, Browne KF, Marco J, *et al.* A comparison of immediate angioplasty with thrombolytic therapy for acute myocardial infarction. The Primary Angioplasty in Myocardial Infarction Study Group. *N Engl J Med* 1993;**328**(10):673–9.
22. Zhu MM, Feit A, Chadow H, Alam M, Kwan T, Clark LT. Primary stent implantation compared with primary balloon angioplasty for acute myocardial infarction: a meta-analysis of randomized clinical trials. *Am J Cardiol* 2001;**88**(3):297–301.
23. Bangalore S, Kumar S, Fusaro M, *et al.* Short- and long-term outcomes with drug-eluting and bare-metal coronary stents: a mixed-treatment comparison analysis of 117 762 patient-years of follow-up from randomized trials. *Circulation* 2012;**125**(23):2873–91.
24. Bonnefoy E, Steg PG, Boutitie F, *et al.* Comparison of primary angioplasty and pre-hospital fibrinolysis in acute myocardial infarction (CAPTIM) trial: a 5-year follow-up. *Eur Heart J* 2009;**30**(13):1598–606.
25. Pinto DS, Frederick PD, Chakrabarti AK, *et al.* Benefit of transferring ST-segment-elevation myocardial infarction patients for percutaneous coronary intervention compared with administration of onsite fibrinolytic declines as delays increase. *Circulation* 2011;**124**(23):2512–21.
26. Breuckmann F, Hochadel M, Voigtlander T, *et al.* On versus off-hour care of patients with acute coronary syndrome and persistent ST-segment elevation in certified German chest pain units. *Eur Heart J Acute Cardiovasc Care* 2015.
27. Cannon CP, Gibson CM, Lambrew CT, *et al.* Relationship of symptom-onset-to-balloon time and door-to-balloon time with mortality in patients undergoing angioplasty for acute myocardial infarction. *JAMA* 2000;**283**(22):2941–7.
28. Menees DS, Peterson ED, Wang Y, *et al.* Door-to-balloon time and mortality among patients undergoing primary PCI. *N Engl J Med* 2013;**369**(10):901–9.
29. Torabi A, Cleland JG, Rigby AS, Sherwi N. Development and course of heart failure after a myocardial infarction in younger and older people. *J Geriatr Cardiol* 2014;**11**(1):1–12.
30. Szummer KE, Solomon SD, Velazquez EJ, *et al.* Heart failure on admission and the risk of stroke following acute myocardial infarction: The VALIANT registry. *Eur Heart J* 2005;**26**(20):2114–9.
31. Limalanathan S, Andersen GO, Klow N-E, Abdelnoor M, Hoffmann P, Eritsland J. Effect of ischemic postconditioning on infarct size in patients with ST-elevation myocardial infarction

- treated by primary PCI results of the POSTEMI (POStconditioning in ST-Elevation Myocardial Infarction) randomized trial. *J Am Heart Assoc* 2014;**3**(2):e000679.
32. Gerber Y, Weston SA, Enriquez-Sarano M, *et al.* Atherosclerotic Burden and Heart Failure After Myocardial Infarction. *JAMA Cardiol* 2016;**1**(2):156–62.
 33. Page DL, Caulfield JB, Kastor JA, DeSanctis RW, Sanders CA. Myocardial changes associated with cardiogenic shock. *N. Engl. J. Med.* 1971;**285**(3):133–7.
 34. Kolte D, Khera S, Aronow WS, *et al.* Trends in incidence, management, and outcomes of cardiogenic shock complicating ST-elevation myocardial infarction in the United States. *J Am Heart Assoc* 2014;**3**(1):e000590.
 35. Hochman JS, Buller CE, Sleeper LA, *et al.* Cardiogenic shock complicating acute myocardial infarction—etiologies, management and outcome: A report from the SHOCK Trial Registry. *Journal of the American College of Cardiology* 2000;**36**(3):1063–70.
 36. Buja LM, Vela D. Cardiomyocyte death and renewal in the normal and diseased heart. *Cardiovasc. Pathol.* 2008;**17**(6):349–74.
 37. DeWood MA, Spores J, Notske R, *et al.* Prevalence of total coronary occlusion during the early hours of transmural myocardial infarction. *N. Engl. J. Med.* 1980;**303**(16):897–902.
 38. Braunwald E, Kloner RA. Myocardial Reperfusion: A Double-edged Sword? *Journal of clinical investigation* 1985;(Vol. 76):1713–9.
 39. Tatli E, Alicik G, Buturak A, Yilmaztepe M, Aktöz M. Arrhythmias following revascularization procedures in the course of acute myocardial infarction: Are they indicators of reperfusion or ongoing ischemia? *ScientificWorldJournal* 2013;**2013**:160380.
 40. Neri M, Riezzo I, Pascale N, Pomara C, Turillazzi E. Ischemia/Reperfusion Injury following Acute Myocardial Infarction: A Critical Issue for Clinicians and Forensic Pathologists. *Mediators Inflamm* 2017;**2017**:7018393.
 41. Bolli R, Marban E. Molecular and cellular mechanisms of myocardial stunning. *Physiol Rev* 1999;**79**(2):609–34.
 42. Heusch G, Schulz R. Characterization of hibernating and stunned myocardium. *Eur Heart J* 1997;**18**(suppl D):102–10.
 43. Ito H. No-reflow phenomenon and prognosis in patients with acute myocardial infarction. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2006;**3**(9):499–506.
 44. Bouleti C, Mewton N, Germain S. The no-reflow phenomenon: State of the art. *Arch Cardiovasc Dis* 2015;**108**(12):661–74.
 45. Bolognese L, Carrabba N, Parodi G, *et al.* Impact of microvascular dysfunction on left ventricular remodeling and long-term clinical outcome after primary coronary angioplasty for acute myocardial infarction. *Circulation* 2004;**109**(9):1121–6.
 46. Brosh D, Assali AR, Mager A, *et al.* Effect of no-reflow during primary percutaneous coronary intervention for acute myocardial infarction on six-month mortality. *Am. J. Cardiol.* 2007;**99**(4):442–5.
 47. Vita M de, Burzotta F, Biondi-Zoccai GGL, *et al.* Individual patient-data meta-analysis comparing clinical outcome in patients with ST-elevation myocardial infarction treated with percutaneous coronary intervention with or without prior thrombectomy. ATTEMPT study: A pooled Analysis of Trials on ThrombEctomy in acute Myocardial infarction based on individual Patient data. *Vasc Health Risk Manag* 2009;**5**(1):243–7.
 48. Svilaas T, Vlaar PJ, van der Horst IC, *et al.* Thrombus aspiration during primary percutaneous coronary intervention. *N. Engl. J. Med.* 2008;**358**(6):557–67.

49. Mongeon F-P, Belisle P, Joseph L, Eisenberg MJ, Rinfret S. Adjunctive Thrombectomy for Acute Myocardial Infarction: A Bayesian Meta-Analysis. *Circulation: Cardiovascular Interventions* 2010;**3**(1):6–16.
50. Mancini JG, Filion KB, Windle SB, Habib B, Eisenberg MJ. Meta-Analysis of the Long-Term Effect of Routine Aspiration Thrombectomy in Patients Undergoing Primary Percutaneous Coronary Intervention. *Am. J. Cardiol.* 2016;**118**(1):23–31.
51. Windecker S, Kolh P, Alfonso F, *et al.* 2014 ESC/EACTS Guidelines on myocardial revascularization: The Task Force on Myocardial Revascularization of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Association for Cardio-Thoracic Surgery (EACTS) Developed with the special contribution of the European Association of Percutaneous Cardiovascular Interventions (EAPCI). *Eur. Heart J* 2014;**35**(37):2541–619.
52. Zhao Z-Q, Corvera JS, Halkos ME, *et al.* Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *AJP: Heart and Circulatory Physiology* 2003;**285**(2):H579-88.
53. Engstrøm T, Kelbæk H, Helqvist S, *et al.* Effect of Ischemic Postconditioning During Primary Percutaneous Coronary Intervention for Patients With ST-Segment Elevation Myocardial Infarction: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Cardiol* 2017;**2**(5):490–7.
54. Heusch G, Bøtker HE, Przyklenk K, Redington A, Yellon D. Remote ischemic conditioning. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2015;**65**(2):177–95.
55. Schmidt MR, Smerup M, Konstantinov IE, *et al.* Intermittent peripheral tissue ischemia during coronary ischemia reduces myocardial infarction through a KATP-dependent mechanism: first demonstration of remote ischemic preconditioning. *AJP: Heart and Circulatory Physiology* 2007;**292**(4):H1883-90.
56. Hausenloy DJ, Kharbanda RK, Møller UK, *et al.* Effect of remote ischaemic conditioning on clinical outcomes in patients with acute myocardial infarction (CONDI-2/ERIC-PPCI): a single-blind randomised controlled trial. *The Lancet* 2019;**394**(10207):1415–24.
57. Piot C, Croisille P, Staat P, *et al.* Effect of cyclosporine on reperfusion injury in acute myocardial infarction. *N. Engl. J. Med.* 2008;**359**(5):473–81.
58. Cung T-T, Morel O, Cayla G, *et al.* Cyclosporine before PCI in Patients with Acute Myocardial Infarction. *N. Engl. J. Med.* 2015;**373**(11):1021–31.
59. Roolvink V, Ibáñez B, Ottervanger JP, *et al.* Early Intravenous Beta-Blockers in Patients With ST-Segment Elevation Myocardial Infarction Before Primary Percutaneous Coronary Intervention. *Journal of the American College of Cardiology* 2016;**67**(23):2705–15.
60. Lønborg J, Vejlstrop N, Kelbæk H, *et al.* Exenatide reduces reperfusion injury in patients with ST-segment elevation myocardial infarction. *Eur. Heart J* 2012;**33**(12):1491–9.
61. Roos ST, Timmers L, Biesbroek PS, *et al.* No benefit of additional treatment with exenatide in patients with an acute myocardial infarction. *Int. J. Cardiol.* 2016;**220**:809–14.
62. Bartel DP. MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell* 2009;**136**(2):215–33.
63. Huntzinger E, Izaurralde E. Gene silencing by microRNAs: Contributions of translational repression and mRNA decay. *Nat Rev Genet* 2011;**12**(2):99–110.
64. Peters L, Meister G. Argonaute proteins: Mediators of RNA silencing. *Molecular Cell* 2007;**26**(5):611–23.
65. Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat. Rev. Genet* 2008;**9**(2):102–14.

66. Friedman RC, Farh KK-H, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Research* 2008;**19**(1):92–105.
67. Gross N, Kropp J, Khatib H. MicroRNA Signaling in Embryo Development. *Biology (Basel)* 2017;**6**(3).
68. Colas AR, McKeithan WL, Cunningham TJ, *et al.* Whole-genome microRNA screening identifies let-7 and mir-18 as regulators of germ layer formation during early embryogenesis. *Genes & Development* 2012;**26**(23):2567–79.
69. Leichter AL, Sullivan MJ, Eccles MR, Chatterjee A. MicroRNA expression patterns and signalling pathways in the development and progression of childhood solid tumours. *Mol Cancer* 2017;**16**(1):15.
70. Kim SW. The Role of MicroRNAs in Colorectal Cancer. *Korean J Gastroenterol* 2017;**69**(4):206–11.
71. Inamura K. Diagnostic and Therapeutic Potential of MicroRNAs in Lung Cancer. *Cancers (Basel)* 2017;**9**(5).
72. Marcucci G, Mrózek K, Radmacher MD, Garzon R, Bloomfield CD. The prognostic and functional role of microRNAs in acute myeloid leukemia. *Blood* 2011;**117**(4):1121–9.
73. Mehta A, Baltimore D. MicroRNAs as regulatory elements in immune system logic. *Nat. Rev. Immunol.* 2016;**16**(5):279–94.
74. Chen C-Z, Schaffert S, Fragoso R, Loh C. Regulation of immune responses and tolerance: The microRNA perspective. *Immunol Rev* 2013;**253**(1):112–28.
75. Romaine SPR, Tomaszewski M, Condorelli G, Samani NJ. MicroRNAs in cardiovascular disease: An introduction for clinicians. *Heart* 2015;**101**(12):921–8.
76. Maegdefessel L. The emerging role of microRNAs in cardiovascular disease. *J Intern Med* 2014;**276**(6):633–44.
77. Weiss JB, Eisenhardt SU, Stark GB, Bode C, Moser M, Grundmann S. MicroRNAs in ischemia-reperfusion injury. *Am J Cardiovasc Dis* 2012;**2**(3):237–47.
78. Ha M, Kim VN. Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014;**15**(8):509–24.
79. Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, Bradley A. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Research* 2004;**14**(10A):1902–10.
80. Kim VN, Han J, Siomi MC. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009;**10**(2):126–39.
81. Ramalingam P, Palanichamy JK, Singh A, *et al.* Biogenesis of intronic miRNAs located in clusters by independent transcription and alternative splicing. *RNA* 2014;**20**(1):76–87.
82. Lee Y, Kim M, Han J, *et al.* MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.* 2004;**23**(20):4051–60.
83. Babiarz JE, Ruby JG, Wang Y, Bartel DP, Blelloch R. Mouse ES cells express endogenous shRNAs, siRNAs, and other Microprocessor-independent, Dicer-dependent small RNAs. *Genes & Development* 2008;**22**(20):2773–85.
84. Morales S, Monzo M, Navarro A. Epigenetic regulation mechanisms of microRNA expression. *Biomol Concepts* 2017;**8**(5-6):203–12.
85. Trabucchi M, Briata P, Garcia-Mayoral M, *et al.* The RNA-binding protein KSRP promotes the biogenesis of a subset of microRNAs. *Nature* 2009;**459**(7249):1010–4.
86. Guil S, Cáceres JF. The multifunctional RNA-binding protein hnRNP A1 is required for processing of miR-18a. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2007;**14**(7):591–6.

87. Okada C, Yamashita E, Lee SJ, *et al.* A high-resolution structure of the pre-microRNA nuclear export machinery. *Science* 2009;**326**(5957):1275–9.
88. O'Brien J, Hayder H, Zayed Y, Peng C. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2018;**9**:402.
89. Truesdell SS, Mortensen RD, Seo M, *et al.* MicroRNA-mediated mRNA translation activation in quiescent cells and oocytes involves recruitment of a nuclear microRNP. *Sci Rep* 2012;**2**:842.
90. Di Y-F, Li D-C, Shen Y-Q, *et al.* MiR-146b protects cardiomyocytes injury in myocardial ischemia/reperfusion by targeting Smad4. *Am J Transl Res* 2017;**9**(2):656–63.
91. Ke Z-P, Xu P, Shi Y, Gao A-M. MicroRNA-93 inhibits ischemia-reperfusion induced cardiomyocyte apoptosis by targeting PTEN. *Oncotarget* 2016;**7**(20):28796–805.
92. E L, Jiang H, Lu Z. MicroRNA-144 attenuates cardiac ischemia/reperfusion injury by targeting FOXO1. *Exp Ther Med* 2019;**17**(3):2152–60.
93. Rodríguez AE, Hernández JÁ, Benito R, *et al.* Molecular characterization of chronic lymphocytic leukemia patients with a high number of losses in 13q14. *PLoS ONE* 2012;**7**(11):e48485.
94. Chen C-Z. MicroRNAs Modulate Hematopoietic Lineage Differentiation. *Science* 2004;**303**(5654):83–6.
95. Johnnidis JB, Harris MH, Wheeler RT, *et al.* Regulation of progenitor cell proliferation and granulocyte function by microRNA-223. *Nature* 2008;**451**(7182):1125–9.
96. Fazi F, Rosa A, Fatica A, *et al.* A minicircuitry comprised of microRNA-223 and transcription factors NFI-A and C/EBPalpha regulates human granulopoiesis. *Cell* 2005;**123**(5):819–31.
97. Pulikkan JA, Dengler V, Peramangalam PS, *et al.* Cell-cycle regulator E2F1 and microRNA-223 comprise an autoregulatory negative feedback loop in acute myeloid leukemia. *Blood* 2010;**115**(9):1768–78.
98. Fazi F, Racanicchi S, Zardo G, *et al.* Epigenetic silencing of the myelopoiesis regulator microRNA-223 by the AML1/ETO oncoprotein. *Cancer Cell* 2007;**12**(5):457–66.
99. Plante I, Plé H, Landry P, Gunaratne PH, Provost P. Modulation of microRNA Activity by Semi-microRNAs. *Front. Gene.* 2012;**3**:99.
100. Ismail N, Wang Y, Dakhallah D, *et al.* Macrophage microvesicles induce macrophage differentiation and miR-223 transfer. *Blood* 2013;**121**(6):984–95.
101. Shi L, Fisslthaler B, Zippel N, *et al.* MicroRNA-223 antagonizes angiogenesis by targeting β 1 integrin and preventing growth factor signaling in endothelial cells. *Circ. Res.* 2013;**113**(12):1320–30.
102. Yuan J-Y, Wang F, Yu J, Yang G-H, Liu X-L, Zhang J-W. MicroRNA-223 reversibly regulates erythroid and megakaryocytic differentiation of K562 cells. *J. Cell. Mol. Med.* 2009;**13**(11-12):4551–9.
103. Sugatani T, Hruska KA. Impaired micro-RNA pathways diminish osteoclast differentiation and function. *Journal of Biological Chemistry* 2009;**284**(7):4667–78.
104. Li T, Morgan MJ, Choksi S, Zhang Y, Kim Y-S, Liu Z. MicroRNAs modulate the noncanonical transcription factor NF-kappaB pathway by regulating expression of the kinase IKKalpha during macrophage differentiation. *Nat. Immunol* 2010;**11**(9):799–805.
105. Zhuang G, Meng C, Guo X, *et al.* A Novel Regulator of Macrophage Activation: miR-223 in Obesity-Associated Adipose Tissue Inflammation. *Circulation* 2012;**125**(23):2892–903.

106. Landry P, Plante I, Ouellet DL, Perron MP, Rousseau G, Provost P. Existence of a microRNA pathway in anucleate platelets. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2009;**16**(9):961–6.
107. Dai R, Phillips RA, Zhang Y, Khan D, Crasta O, Ahmed SA. Suppression of LPS-induced Interferon-gamma and nitric oxide in splenic lymphocytes by select estrogen-regulated microRNAs: a novel mechanism of immune modulation. *Blood* 2008;**112**(12):4591–7.
108. Aranda R, Dineen SM, Craig RL, Guerrieri RA, Robertson JM. Comparison and evaluation of RNA quantification methods using viral, prokaryotic, and eukaryotic RNA over a 10(4) concentration range. *Anal. Biochem.* 2009;**387**(1):122–7.
109. Castoldi M, Schmidt S, Benes V, Hentze MW, Muckenthaler MU. miChip: an array-based method for microRNA expression profiling using locked nucleic acid capture probes. *Nat Protoc* 2008;**3**(2):321–9.
110. Castoldi M, Schmidt S, Benes V, *et al.* A sensitive array for microRNA expression profiling (miChip) based on locked nucleic acids (LNA). *RNA* 2006;**12**(5):913–20.
111. Vester B, Wengel J. LNA (locked nucleic acid): high-affinity targeting of complementary RNA and DNA. *Biochemistry* 2004;**43**(42):13233–41.
112. Válóczy A, Hornyik C, Varga N, Burgyán J, Kauppinen S, Havelda Z. Sensitive and specific detection of microRNAs by northern blot analysis using LNA-modified oligonucleotide probes. *Nucleic Acids Research* 2004;**32**(22):e175.
113. Gentleman R, Ed. *Bioinformatics and computational biology solutions using R and Bioconductor: Limma: linear models for microarray data*, 1st edn.: Springer US, 2005.
114. Peltier HJ, Latham GJ. Normalization of microRNA expression levels in quantitative RT-PCR assays: identification of suitable reference RNA targets in normal and cancerous human solid tissues. *RNA* 2008;**14**(5):844–52.
115. Benz F, Roderburg C, Vargas Cardenas D, *et al.* U6 is unsuitable for normalization of serum miRNA levels in patients with sepsis or liver fibrosis. *Exp Mol Med* 2013;**45**(9):e42.
116. Lim Q, Zhou L, Ho Y, Wan G, Too H. snoU6 and 5S RNAs are not reliable miRNA reference genes in neuronal differentiation. *Neuroscience* 2011;**199**:32–43.
117. Meyer SU, Pfaffl MW, Ulbrich SE. Normalization strategies for microRNA profiling experiments: a 'normal' way to a hidden layer of complexity? *Biotechnol. Lett.* 2010;**32**(12):1777–88.
118. Mestdagh P, van Vlierberghe P, an de Weer, *et al.* A novel and universal method for microRNA RT-qPCR data normalization. *Genome Biol.* 2009;**10**(6):R64.
119. Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol. Lett.* 2004;**26**(6):509–15.
120. Idres N, Benoît G, Flexor MA, Lanotte M, Chabot GG. Granulocytic differentiation of human NB4 promyelocytic leukemia cells induced by all-trans retinoic acid metabolites. *Cancer Res.* 2001;**61**(2):700–5.
121. Nuovo GJ. In situ detection of microRNAs in paraffin embedded, formalin fixed tissues and the co-localization of their putative targets. *Methods* 2010;**52**(4):307–15.
122. Vester B, Wengel J. LNA (locked nucleic acid): high-affinity targeting of complementary RNA and DNA. *Biochemistry* 2004;**43**(42):13233–41.
123. Petersen M, Nielsen CB, Nielsen KE, *et al.* The conformations of locked nucleic acids (LNA). *J. Mol. Recognit.* 2000;**13**(1):44–53.

124. Obernosterer G, Martinez J, Alenius M. Locked nucleic acid-based in situ detection of microRNAs in mouse tissue sections. *Nat Protoc* 2007;**2**(6):1508–14.
125. Nuovo GJ. *In situ detection of microRNAs in paraffin embedded, formalin fixed tissues and the co-localization of their putative targets*, 2010. (Accessed March 16, 2015).
126. Yamamichi N, Shimomura R, Inada K, *et al.* Locked nucleic acid in situ hybridization analysis of miR-21 expression during colorectal cancer development. *Clin. Cancer Res* 2009;**15**(12):4009–16.
127. Silaharoglu AN, Nolting D, Dyrskjøtt L, *et al.* Detection of microRNAs in frozen tissue sections by fluorescence in situ hybridization using locked nucleic acid probes and tyramide signal amplification. *Nat Protoc* 2007;**2**(10):2520–8.
128. Silaharoglu AN. LNA-FISH for detection of microRNAs in frozen sections. *Methods Mol. Biol* 2010;**659**:165–71.
129. Fleming TJ, Fleming ML, Malek TR. Selective expression of Ly-6G on myeloid lineage cells in mouse bone marrow. RB6-8C5 mAb to granulocyte-differentiation antigen (Gr-1) detects members of the Ly-6 family. *J. Immunol* 1993;**151**(5):2399–408.
130. Tabet F, Vickers KC, Cuesta Torres LF, *et al.* HDL-transferred microRNA-223 regulates ICAM-1 expression in endothelial cells. *Nat Commun* 2014;**5**:3292.
131. Xu D, Zhang X, Chen X, Yang S, Chen H. Inhibition of miR-223 attenuates the NLRP3 inflammasome activation, fibrosis, and apoptosis in diabetic cardiomyopathy. *Life Sciences* 2020;**256**:117980.
132. Dai G-H, Ma P-Z, Song X-B, Liu N, Zhang T, Wu B. MicroRNA-223-3p inhibits the angiogenesis of ischemic cardiac microvascular endothelial cells via affecting RPS6KB1/hif-1a signal pathway. *PLoS ONE* 2014;**9**(10):e108468.
133. Shan Z, Qin S, Li W, *et al.* An Endocrine Genetic Signal Between Blood Cells and Vascular Smooth Muscle Cells: Role of MicroRNA-223 in Smooth Muscle Function and Atherogenesis. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2015;**65**(23):2526–37.
134. Wang L, Jia X-J, Jiang H-J, *et al.* MiRNA-185, MiRNA-96 and MiRNA-223 Repress Selective HDL-Cholesterol Uptake through Posttranscriptional Inhibition of Scavenger Receptor Class BI in Hepatic Cells. *Molecular and Cellular Biology* 2013.
135. Zhao S, Tan Y, Qin J, *et al.* MicroRNA-223-3p promotes pyroptosis of cardiomyocyte and release of inflammasome factors via downregulating the expression level of SPI1 (PU.1). *Toxicology* 2022;**476**:153252.
136. Bauernfeind F, Rieger A, Schildberg FA, Knolle PA, Schmid-Burgk JL, Hornung V. NLRP3 Inflammasome Activity Is Negatively Controlled by miR-223. *The Journal of Immunology* 2012.
137. Yashiro T, Yamamoto M, Araumi S, *et al.* PU.1 and IRF8 Modulate Activation of NLRP3 Inflammasome via Regulating Its Expression in Human Macrophages. *Front Immunol* 2021;**12**:649572.
138. Rauf A, Shah M, Yellon DM, Davidson SM. Role of Caspase 1 in Ischemia/Reperfusion Injury of the Myocardium. *J Cardiovasc Pharmacol* 2019;**74**(3):194–200.
139. Zhang L, Yang J, Guo M, Hao M. MiR-223-3p affects myocardial inflammation and apoptosis following myocardial infarction via targeting FBXW7. *J Thorac Dis* 2022;**14**(4):1146–56.
140. Nikolaos G. Frangogiannis M. The Mechanistic Basis of Infarct Healing.
141. Frangogiannis NG. Pathophysiology of Myocardial Infarction. *Compr Physiol* 2015;**5**(4):1841–75.

142. Wang K, Long B, Liu F, *et al.* A circular RNA protects the heart from pathological hypertrophy and heart failure by targeting miR-223. *Eur. Heart J.* 2016;**37**(33):2602–11.
143. Zhang Z, Qiao G, Sun Z, *et al.* Expression of miR-223-3p in a rat model of myocardial infarction and the effects of miR-223-3p on cardiomyocytes. *All Life* 2020;**13**(1):407–15.

Wissenschaftliche Beiträge

Vortrag auf dem Jahreskongress der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie 2011:
«Inhibierung der miR-223 führt zu einer verbesserten Herzfunktion nach
Ischämie/Reperfusion in der Maus»; Rybinski F., Troidl C., Möllmann H., Wilhelm J.,
Dombrowski T., Szardien S., Voss S., Hoffman J., Troidl K., Willmer M., Hamm C.W.,
Nef H.

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.

Danksagung

Mein Dank gilt allen meinen Unterstützern, die mir bei dieser Arbeit geholfen haben. Zuerst an Prof. Hamm für die Schaffung einer Forschungsumgebung, die innovative Grundlagenforschung erst möglich macht; an Helge Möllmann und Holger Nef für Unterstützung bei der Konzeption und Entscheidungsfindung und schliesslich vor allem an meinen Betreuer Christian Troidl für die Begleitung und Unterstützung bei allen Ideen, für deren Diskussion die Tür immer offenstand.

Dem Laborteam des Franz- Grödel- Instituts danke ich für die Begeisterung für die experimentelle Forschung, die ich dort dank der hervorragenden Stimmung und Teamarbeit mit auf den Weg bekommen habe. Insbesondere Sandra für den Tierversuchsantrag, Moni für die Unterstützung bei unzähligen RT-PCRs, Sigrun und Oxana für die Operationen und Anette und Nora für Unkenrufe und kritische Diskussionen. Ausserdem geht ein grosses Dankeschön an Kerstin Troidl, die mich bei der Etablierung des in- situ- Hybridisierungs- Protokolls unterstützt hat.

Ich möchte mich bedanken bei meinen Eltern Bettina und Joachim, die diese Arbeit erst möglich gemacht haben und mich in jeder Hinsicht über all die Jahre in so vieler Hinsicht unterstützt haben und bei meinen Grosseltern, insbesondere bei meinem Opa Dr. Heinz Bühler, der mich durch sein fortgesetztes Interesse zur Fertigstellung bewegt hat.