

# **Charakterisierung zirkulierender Mikropartikel-gebundener microRNAs bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Hohen Medizinischen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität  
Bonn

**David Koch** geb. Przybilla

aus Bonn

2017

Angefertigt mit der Genehmigung  
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Nikos Werner
2. Gutachter: PD Dr. med. Jacob Nattermann

Tag der Mündlichen Prüfung: 04.09.2017

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II, Universitätsklinikum Bonn  
Direktor: Prof. Dr. med. Georg Nickenig

**Meiner Familie**



## Inhaltsverzeichnis

	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>7</b>
<b>1.</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>9</b>
1.1	Atherosklerose.....	9
1.2	Das Krankheitsbild.....	11
1.3	Risikofaktoren für die Koronare Herzkrankheit.....	11
1.4	Stabile KHK versus Akutes Koronarsyndrom .....	11
1.4.1	Akutes Koronarsyndrom .....	11
1.4.2	Stabile KHK .....	12
1.5	Biomarker bei der KHK.....	13
1.6	MicroRNA. ....	13
1.7	Mikropartikel .....	15
1.8	Fragestellung und Ziel der Arbeit.....	16
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>17</b>
2.1	Material .....	17
2.1.1	Laborgeräte .....	17
2.1.1.1	Probenaufbereitung .....	17
2.1.1.2	Mikropartikel-Isolierung .....	17
2.1.1.3	384 Wells Taqman low density Array (Microarray).....	17
2.1.1.4	Real-Time PCR.....	17
2.1.2	Allgemeines.....	17
2.1.3	Lösungen und Puffer.....	18
2.1.4	Antikörper .....	18
2.1.5	Kits und Mastermixe.....	18
2.1.6	Primer für Real-Time PCR .....	19
2.2	Patientenauswahl .....	19
2.3	Koronarangiografie .....	20
2.4	Probenaufbereitung .....	20
2.5	FACS (fluorescence-activated cell sorting) -Analyse.....	21
2.6	Mikropartikel-Isolierung.....	22

2.7	384 Wells Taqman low density Array (Microarray).....	22
2.7.1	Reverse Transkription.....	22
2.7.2	Preamplifikation .....	24
2.7.3	Real-Time PCR Reaktion .....	25
2.8	Quantitative PCR .....	26
2.8.1	Reverse Transkription.....	26
2.8.2	Quantitative PCR- Amplifikation .....	28
2.9	Statistische Auswertung .....	29
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>30</b>
3.1	Basis-Charakteristika .....	30
3.2	Mikropartikel-Charakterisierung.....	32
3.3	Micro-Array .....	343
3.4	Selektion der miRNAs für die weitere Analyse .....	34
3.5	Quantitative PCR.....	34
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>38</b>
4.1	Ausblick .....	42
4.2	Limitationen der Studie .....	42
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>43</b>
<b>6.</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>45</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>46</b>
<b>8.</b>	<b>Danksagung</b> .....	<b>55</b>
<b>9.</b>	<b>Lebenslauf</b> .....	<b>56</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin-converting enzyme
ACS	Acute coronary syndrom
Ago	Argonaute
CAD	Coronary artery disease
CRP	C-reaktives-Protein
DM	Diabetes mellitus
dNTP	Nukleosidtriphosphate
EDTA	Ethylendiamintetraacetate
EKG	Elektrokardiogramm
EMP	Endotheliale Mikropartikel
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
HDL	High-density lipoprotein
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule-1
KHK	Koronare Herzkrankheit
LDL	Low-Density-Lipoprotein
MI	Myocardial infarction
miRNA	Micro-RNA
mRNA	Messenger-RNA
MP	Mikropartikel
NCAD	Non-coronary artery disease
NDM	Non-diabetes mellitus
NSTEMI	Non-ST-elevating myocardial infarction
PCI	Percutaneous coronary intervention

PCR	Polymerase chain reaction
PMP	platelet derived Micropartikel
pre-miRNA	precursor Micro-RNA
pri-miRNA	primary Micro-RNA
RISC	RNA-induced silencing complex
RNA	Ribonucleid acid
STEMI	ST- elevating myocardial infarction
TRBP	Trans-activation response RNA-binding protein
tRNA	Target-RNA

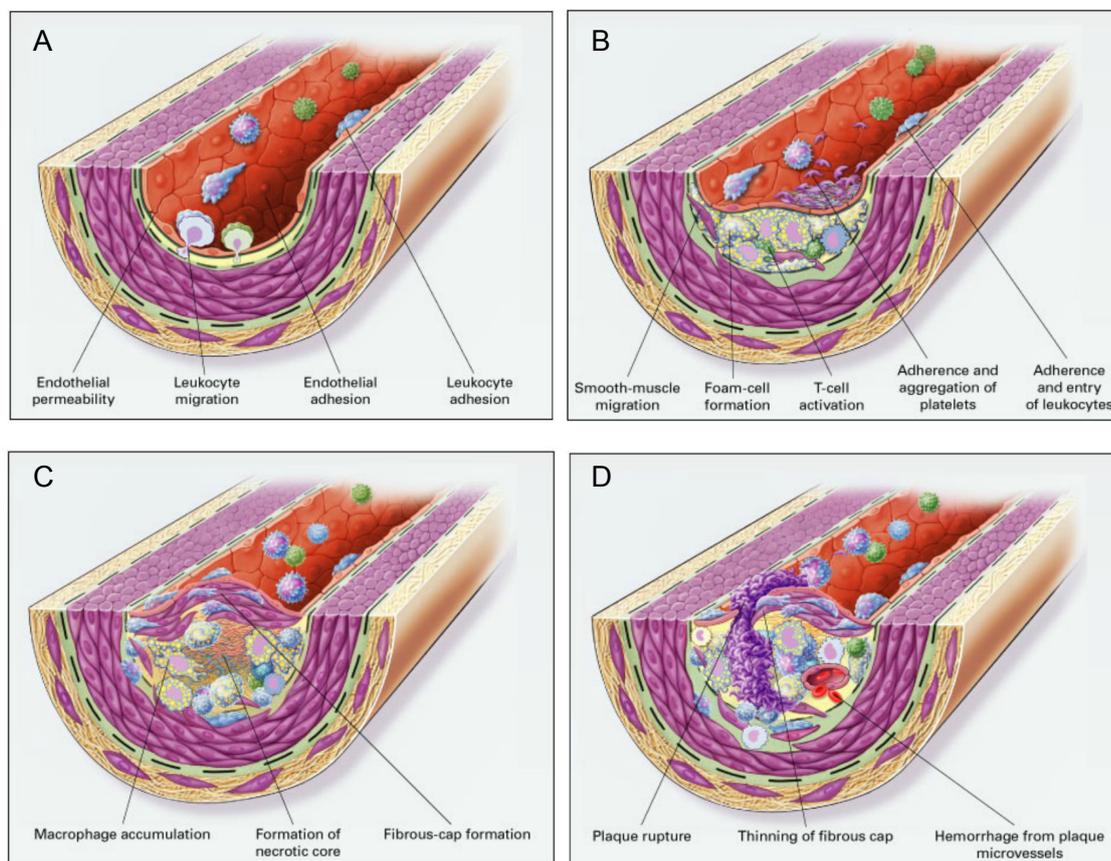
# 1 Einleitung

## 1.1 Atherosklerose

Atherosklerose ist eine Krankheit des arteriellen Gefäßsystems. Über einen jahrzehntelangen Prozess entsteht durch die Einlagerung von Fetten, Modifikations- und Oxidationsprozesse eine chronische Entzündung der Gefäßwand. Die gebildeten Plaques können Stenosen und bei Ruptur akute thrombotische Verschlüsse verursachen (Insull Jr., 2009).

Nach aktuellem Forschungsstand entwickelt sich die Atherosklerose als Folge einer Endothelzellschädigung (Response-to-Injury-Hypothese). Die innerste Gefäßwandzellschicht (Endothel) kann durch verschiedene Einflüsse geschädigt werden. Dazu zählt vor allem oxidativer Stress, der mit arterieller Hypertonie, Hyperlipidämie, Diabetes und Nikotinabusus assoziiert ist. Auch eine mechanische Belastung, zum Beispiel durch arterielle Hypertonie, kann zu endothelialer Dysfunktion führen (Bonetti et al., 2003). Dies führt zu veränderten homöostatischen Eigenschaften des Endothels. Die Adhäsionsfähigkeit von Leukozyten und Thrombozyten steigt wie auch die Permeabilität des Endothels. Durch den Gefäßschaden treten zunehmend prokoagulative Eigenschaften des normalerweise antikoagulativen Endothels hervor wie die Bildung von vasoaktiven Molekülen, Zytokinen und Wachstumsfaktoren. Es kommt als Folge zu einer zunehmenden Akkumulation von Low-density Proteinen (LDL). Die reine Entzündungsreaktion wird der Histologie entsprechend fettige Streifung (fatty streak) genannt und kann schon bei Kindern und Heranwachsenden beobachtet werden (Napoli et al., 1997). Die Entzündungsreaktion führt wiederum zu verstärkter Proliferation von glatten Muskelzellen. Die dadurch verdickte Gefäßwand kann schließlich zu einem verengten Gefäßlumen führen. Durch weitere Einwanderung von Makrophagen und Lymphozyten und deren Aktivierung werden hydrolytische Enzyme, Zytokine und andere Moleküle freigesetzt, die fokale Nekrosen verursachen können (Ross, 1999). Durch die endotheliale Dysfunktion mit Freisetzung von Chemokinen kommt es unter anderem durch erleichterte Migration und Internalisation von Monozyten und Proliferation von glatten Muskelzellen bei gesteigerter Lipid-Akkumulation und erhöhter Bindegewebsproduktion zur Bildung eines Plaques. Es entsteht ein

Teufelskreis, da durch die Anwesenheit von Lipiden die Entzündungsreaktion aufrecht gehalten wird, diese jedoch nicht zur Verminderung der Lipidkonzentration führt. Der gebildete Plaque kann so weiter an Größe zunehmen und schließlich zu einer Ruptur führen (Falk et al., 1995; Zaman et al., 2000). Nach Ruptur kann es zu Thrombozytenaggregation und -adhäsion mit der möglichen Folge einer lokalen Thrombose, Vasokonstriktion und einer distalen Thrombembolie kommen. Die Vasokonstriktion wird dabei durch das von Thrombozyten freigesetzte Serotonin und Thromboxan A<sub>2</sub> verursacht. Im Falle der Herzkranzarterien kann es durch den reduzierten Blutfluss zu einer myokardialen Ischämie kommen (Lusis, 2000).



**Abb. 1.:** Response-to-injury-Hypothese (Ross, 1999): Nach dieser Hypothese beginnt die Atherosklerose mit einem endothelialen Schaden oder einer Dysfunktion (A). Dies führt zu erhöhter endothelialer Durchlässigkeit unter anderem für low-density-Lipoproteine (LDL), die sich subendothelial anlagern können und wiederum die Anlagerung von Leukozyten und deren Migration durch das Endothel zur Folge haben. Im nächsten Stadium (B) bilden sich Cholesterin enthaltende Makrophagen (foam cells), es kommt zu einer Entzündungsreaktion mit T-Zell-Aktivierung und zu einer Anlagerung von Thrombozyten. Dadurch aktiviert durchwandern zusätzlich Leukozyten das Endothel und

glatte Muskelzellen (smooth-muscle cells) dringen in die Gefäßlumen-anliegende Gefäßschicht (Intima) ein. Im dritten Stadium (C) akkumulieren zusätzlich Makrophagen, es bildet sich eine fibröse Auflagerung (fibrous-cap) und es findet Nekrose im Inneren des gebildeten Plaques statt. In Abhängigkeit vom Lipidgehalt sowie der Dicke der fibrösen Kappe kann es im letzten Stadium (D) zu einer Plaqueruptur mit oben genannten Komplikationen kommen (Ross, 1999; Stocker und Keaney, 2004).

## **1.2 Das Krankheitsbild**

Die Koronare Herzkrankheit (KHK) beschreibt die Ausbildung der Atherosklerose in den Herzkranzarterien. Durch die Bildung von Plaques in den Herzkranzarterien kann es zu einer Blutflusslimitierung mit einer daraus resultierenden Koronarischämie kommen. Diese kann asymptomatisch bleiben, sich aber auch in Angina pectoris, Herzrhythmusstörungen oder einer Linksherzinsuffizienz äußern. Eine gefürchtete Komplikation stellt der plötzliche Herztod dar. Aktuelle Studien zufolge sind Herz-Kreislauf-Erkrankungen und hierbei vor allem die KHK die häufigsten Todesursachen in den Industrienationen (Lloyd-Jones et. al, 2010; RKI, 2006).

## **1.3 Risikofaktoren für die Koronare Herzkrankheit**

Zu den Hauptrisikofaktoren für das Entstehen einer KHK zählen hohes Alter, das männliche Geschlecht, eine positive Familienanamnese, Nikotinabusus, fettreiche Ernährung mit Bewegungsmangel und Übergewicht, Bluthochdruck, Hyperlipidämie und Diabetes mellitus. Weitere Risikofaktoren sind Bestandteil aktueller Forschung. Hierzu zählen psychosoziale Faktoren wie z. B. Stress oder eine Depression, Alkoholabusus, genetische Faktoren, hohe Lipoprotein A Konzentrationen im Blut, hohe Level verschiedener Gerinnungsfaktoren und ein hohes C-reaktives Protein (CRP) (Kounis und Hahalis, 2016; Luc et al., 2002; Soufer et al., 2016).

## **1.4 Stabile KHK versus Akutes Koronarsyndrom**

### **1.4.1 Akutes Koronarsyndrom**

Das akute Koronarsyndrom ist ein Überbegriff und beinhaltet die instabile Angina pectoris, den akuten Myokardinfarkt und den plötzlichen Herztod.

Als Angina pectoris bezeichnet man typischerweise retrosternal lokalisierte Schmerzen. Diese Schmerzen können auch in den Hals, den Unterkiefer, den linken Arm oder in die Schultergegend ausstrahlen.

Von einer instabilen Angina Pectoris wird gesprochen, wenn die herzspezifischen Biomarker Troponin T oder -I laborchemisch nicht nachweisbar sind, die Symptomatik jedoch auf eine kardiale Ischämie hinweist. Als Synonym wird auch vom Präinfarktsyndrom gesprochen. Hierunter fallen jede Erstangina, eine Ruheangina und die Crescendo-Angina, bei der die Intensität und/ oder Häufigkeit der Angina Pectoris zunimmt.

Der Myokardinfarkt wird je nach EKG-Veränderung in einen ST-Strecken-Hebungsinfarkt (STEMI) und den Nicht-ST-Strecken-Hebungsinfarkt (NSTEMI) eingeteilt. Bei beiden Formen kann die Symptomatik der instabilen Angina pectoris präsent sein und die herzspezifischen Biomarker fallen positiv aus (Hamm, 2004).

Der plötzliche Herztod wird als natürlicher Tod innerhalb einer Stunde nach dem Auftreten von Symptomen definiert, dem bekannte oder unbekannte kardiale Ursachen zu Grunde liegen. Die Zeit und Art des Todes sind hierbei unerwartet (Priori et al., 2001).

#### **1.4.2 Stabile KHK**

Bei der stabilen KHK besteht episodewise eine Blut-Minderversorgung des Myokards.

Es handelt sich um eine belastungsabhängige Form der Angina pectoris, die gut auf eine Nitratgabe anspricht. In diese Gruppe fallen auch behandelte Patienten nach einem Herzinfarkt, die nach Behandlung symptomfrei sind, aber noch Kontrolluntersuchungen benötigen. Verschiedene Mechanismen können für die Ausbildung einer stabilen KHK verantwortlich gemacht werden:

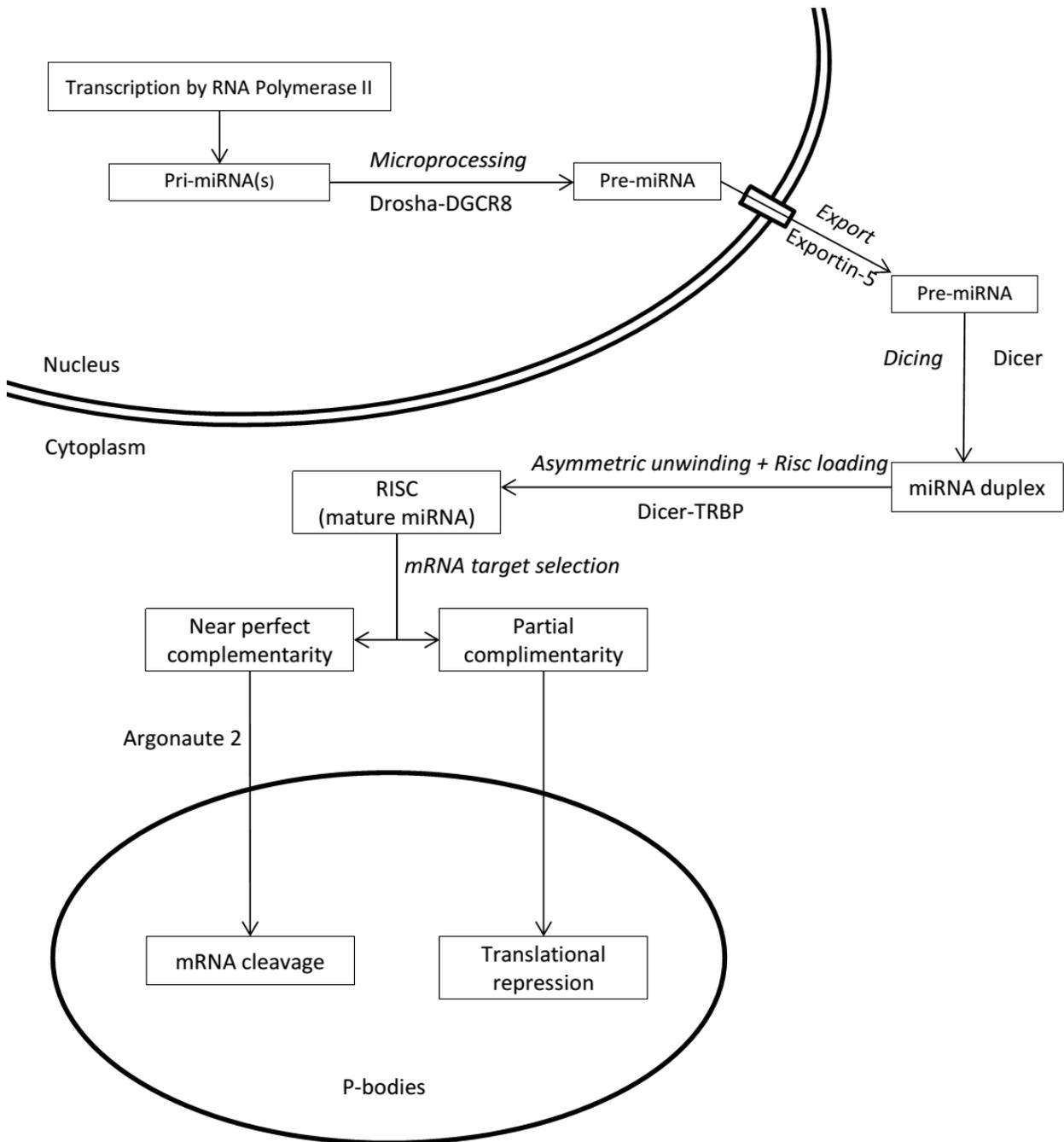
Eine Ursache liegt in der Plaque-bedingten Obstruktion der Koronargefäße. Hinzu kommt ein diffuser oder auch fokaler Koronarspasmus, der unter anderem als Folge des Plaques entstehen kann. Der Entstehung einer stabilen Angina pectoris kann auch eine mikrovaskuläre Dysfunktion oder eine ischämische Kardiomyopathie ursächlich zugrunde liegen (Montalescot et al., 2013).

## 1.5 Biomarker bei der KHK

Die Diagnostik der KHK nimmt aufgrund ihrer klinischen Relevanz einen hohen Stellenwert in der Medizin ein. Neben klinischen Symptomen sowie elektrokardiografischen Untersuchungen spielen im Blut zirkulierende Biomarker eine große Rolle. Zunächst wurden unspezifische Marker wie die Aspartat-Aminotransferase (AST), die Laktatdehydrogenase (LDH) und die Kreatinkinase (CK) etabliert. Fortschritte in der Forschung ergaben kardiospezifischere Biomarker wie CK-MB sowie LDH-1. Die höchste Sensitivität wie auch Spezifität wurde bisher bei kardialen Troponinen festgestellt, sodass diese heutzutage den Goldstandard in der Diagnostik des kardialen Zelluntergangs darstellen (Danese und Montagnana, 2016). In den letzten Jahren haben experimentelle Forschungsarbeiten gezeigt, dass auch MicroRNAs und Mikropartikel bei Patienten mit KHK signifikant reguliert sind (Ahlin et al., 2016; Fichtlscherer et al., 2010).

## 1.6 MicroRNA

MicroRNAs (miRNA) sind kurze, nicht-kodierende, einzelsträngige RNAs mit einer Länge von 19-25 Nukleotiden (Small und Olson, 2011). MiRNAs können an eine Vielzahl von mRNAs binden, deren Translation in ein funktionsfähiges Protein inhibieren und auf diese Weise die Expression zahlreicher Proteine regulieren (Kim, 2005; Small et al., 2010). Es gibt Berechnungen, wonach die Expression von über 30 % der menschlichen Gene Ziele von miRNAs sind und durch diese beeinflusst werden. MiRNAs werden im Zellkern als lange primary-miRNAs (pri-miRNAs) transkribiert. Nachfolgend wird die pri-miRNA im Zellkern durch die RNase III (Drosha) zu etwa 70 Nukleotiden langen precursor-miRNA (pre-miRNA) prozessiert. Diese ordnet sich als Haarnadelstruktur an (Lee et al., 2003). In Abhängigkeit von Exportin-5 und nur unter Anwesenheit von Ran-GTP Kofaktor wird die so geformte Pre-miRNA vom Zellkern in das Zytoplasma überführt (Yi et al., 2003). Im Zytoplasma wird die Pre-miRNA mithilfe der RNase III (Dicer) gespalten und schließlich zusammen mit dem trans-activation response RNA-binding protein (TRBP) und dem notwendigen Protein Argonaute 2 (Ago2) den sogenannten RNA-induced silencing complex (RISC) bildet. Dieser bewirkt die gezielte Spaltung von Target-RNA (tRNA) und damit eine Regulierung der Proteinexpression (Gregory et al., 2005).



**Abb. 2.:** Darstellung der miRNA Biogenese in Säugetieren modifiziert von David Koch (Wienholds und Plasterk, 2005)

Wie in der Abbildung 2 dargestellt erfolgt die Translationsregulation über zwei bekannte Wege. Ist die miRNA überwiegend komplementär zur Ziel-messenger-RNA (mRNA), kommt es zur Spaltung und damit zur Degradierung der Ziel-mRNA. Bei nur

schwacher Komplementarität wird die Translation der mRNA gehemmt (Wienholds und Plasterk, 2005).

MiRNAs zirkulieren in stabiler Form im Plasma und sind resistent gegenüber endogener RNase-Aktivität. 24 Stunden Lagerung der Proben bei Raumtemperatur oder mehrmaliges Einfrieren und Auftauen hat nur minimale Effekte auf die miRNA-Level (Mitchell et al., 2008).

### **1.7 Mikropartikel**

Mikropartikel sind 100-1000 nm große Vesikel, die von verschiedenen Zelltypen abgeschnürt und freigesetzt werden. Dabei wird durch Ausstülpung eines Teils der Zellmembran unter Mitnahme von Zellbestandteilen ein Vesikel geformt. Davon abzugrenzen sind Exosomen, die mit einer Größe von unter 100 nm intrazellulär gespeichert und aktiv sezerniert werden können. Die Bildung von Mikropartikeln erfolgt bei einer Reihe verschiedener biologischer Prozesse (Mause und Weber, 2010). Dazu gehören u. a. der apoptotische Zelluntergang oder auch die Scherbelastung in Arterien wie sie bei Gefäßstenosen auftreten (Holme et al., 1997). Die mit einer Lipiddoppelschicht überzogenen Mikropartikel können mit anderen Zellen durch Fusion mit deren Zellmembran, endozytischer Internalisation oder direkter Bindung an Oberflächenmoleküle kommunizieren. Mikropartikel beinhalten verschiedene bioaktive Moleküle der Mutterzelle. Dazu gehören miRNAs, Zytokine, Chemokine oder andere RNA-Formen (Sluijter et al., 2014).

In einer klinischen Studie konnte nachgewiesen werden, dass Patienten mit Koronargefäßschäden im Vergleich zu gesunden Probanden signifikant erhöhte EMP-Level aufweisen (Bernal-Mizrachi et al., 2004) und auch Studien der eigenen Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass EMP-Spiegel in Patienten mit koronarer Herzerkrankung mit dem Grad der Endotheldysfunktion und dem kardiovaskulären Outcome korrelieren (Sinning 2011; Werner et al., 2006).

Darüber hinaus hat sich gezeigt, dass Mikropartikel nicht nur als Biomarker, sondern auch als Effektor der Gefäßfunktion fungieren (Jansen et al., 2012). Sie beeinflussen die Zielzellen durch den Transfer bioaktiver Moleküle, insbesondere durch miRNAs (Jansen et al., 2013). Dabei ist die Expression vaskuloprotektiver miRNAs mit einer

reduzierten Rate kardiovaskulärer Ereignisse assoziiert (Jansen et al., 2014). Bekannt ist, dass sich die Expression von miRNAs bei Patienten mit und ohne KHK signifikant unterscheidet (Fichtlscherer et al., 2010). Völlig unbekannt ist hingegen, ob sich die miRNA Expression in MPs bei Patienten mit und ohne KHK ebenfalls unterscheidet.

### **1.8 Fragestellung und Ziel der Arbeit**

Das Ziel der Arbeit ist die Charakterisierung des miRNA-Expressionsprofils in zirkulierenden MPs bei Patienten mit und ohne KHK.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Material**

#### **2.1.1 Laborgeräte**

##### **2.1.1.1 Probenaufbereitung**

Zentrifuge: Centrifuge 5810 R, Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland; FACS-Analyse: BD FACSCalibur™: BD Biosciences Heidelberg, Deutschland; Zentrifuge: Centrifuge 5430 R, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

##### **2.1.1.2 Mikropartikel-Isolierung**

Centrifuge 5430 R, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

##### **2.1.1.3 384 Wells Taqman low density Array (Microarray)**

7900 Fast Real-Time PCR-System, Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland  
TaqMan® Array Human MicroRNA A Card v2.0, Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland

##### **2.1.1.4 Real-Time PCR**

Eppendorf Mastercycler®, Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland

7500 Fast Real-Time PCR System (Software: 7500 Software v2.0.6) Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland; TaqMan® MicroRNA Assays, Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland; Zentrifuge: Labofuge 400R, Thermo Scientific, Braunschweig, Deutschland

#### **2.1.2 Allgemeines**

Pipettenspitzen: Sarstedt AG & Co, Nürmbrecht, Deutschland; Tubes (verschiedene Größen): Eppendorf Safe-Lock Tubes, Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland; Blutentnahmeröhrchen: (Sarstedt AG, Nürmbrecht, Deutschland); TruCOUNT™ absolute counting tubes: BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland

### **2.1.3 Lösungen und Puffer**

TRIZOL Lösung: Invitrogen Life Technologies, Darmstadt, Deutschland;  
miR-39 Lösung, Chloroform, DEPC-Wasser, Ethanol;

Tris EDTA Buffer (TE buffer), Affymetrix, Lahr, Deutschland

### **2.1.4 Antikörper**

Annexin V-FITC: BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland; CD31-PE: BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland; CD42b-APC: BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland;

### **2.1.5 Kits und Mastermixe**

TaqMan<sup>®</sup> miRNA Isolation Kit, Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland;  
TaqMan<sup>®</sup> MicroRNA Reverse Transcription Kit, Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland; TaqMan<sup>®</sup> PreAmp Master Mix (2X), Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland; TaqMan<sup>®</sup> Universal Master Mix, No AmpErase<sup>®</sup> UNG, (2X), Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland; TaqMan<sup>®</sup> MicroRNA Reverse Transcription Kit, Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland; TaqMan<sup>®</sup> 2X Universal PCR Master Mix, with AmpErase<sup>®</sup> UNG, Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland

### 2.1.6 Primer für Real-Time PCR

**Tab.1:** Primerauswahl für die Taqman Realtime-PCR mit entsprechenden RNA-Sequenzen

Assay Name	Mature miRNA Sequence
Hsa-let-7d <sup>1</sup>	AGAGGUAGUAGGUUGCAUAGU
Hsa-miR-21 <sup>1</sup>	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA
Hsa-miR-26a <sup>1</sup>	UUCAAGUAAUCCAGGAUAGGCU
Hsa-miR-30b <sup>1</sup>	UGUAAACAUCCUACACUCAGCU
Cel-miR-39 <sup>1</sup>	UCACCGGGUGUAAAUCAGCUUG
Hsa-miR-92a <sup>1</sup>	UAUUGCACUUGUCCCGGCCUGU
Hsa-miR-126 <sup>1</sup>	UCGUACCGUGAGUAAUAAUGCG
Hsa-miR-139-5p <sup>1</sup>	UCUACAGUGCACGUGUCUCCAGU
Hsa-miR-199a <sup>1</sup>	ACAGUAGUCUGCACAUUGGUUA
Hsa-miR-222 <sup>1</sup>	AGCUACAUCUGGCUACUGGGU

<sup>1</sup>Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland

## 2.2 Patientenauswahl

Die in dieser Arbeit verwendeten Proben stammen von 180 Patienten, die sich elektiv oder notfallmäßig in der Kardiologie der Universität Bonn zu einer Koronarangiografie vorgestellt haben. Die im Rahmen der Studie notwendigen Blutentnahmen und die Datendokumentation wurde von der Ethikkommission der Uni Bonn genehmigt und alle eingeschlossenen Patienten gaben ihr schriftliches Einverständnis zur Durchführung dieser Studie. Jedem Patienten wurden venös 8 Blutproben entnommen. 5 Proben dienten dem Standard-Labor (je 1 Röhrchen Glucose, Heparin, Serum, EDTA, Citrat), bei dem neben Routineparametern (klinische Chemie, großes Blutbild, Gerinnung) auch Blutfette, Herzenzyme Interleukin 2 und Interleukin 6

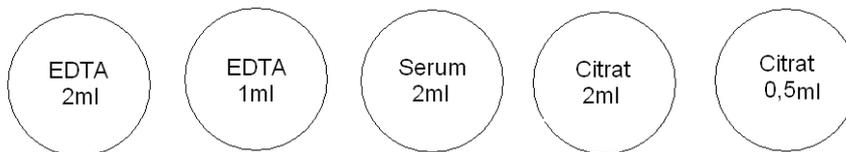
quantitativ erfasst wurden. 3 Proben (je 1 Röhrchen EDTA, Serum und Citrat) dienten den weiteren Messungen in unserem Experimental-Labor.

### 2.3 Koronarangiografie

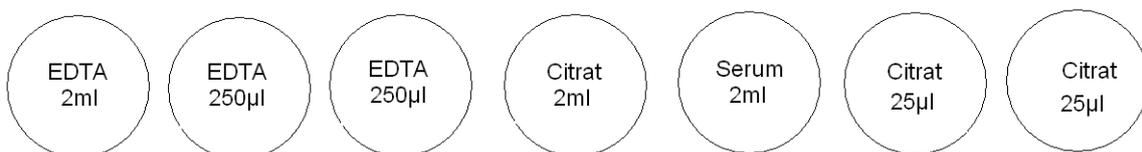
Die Koronarangiografie wurde nach den Leitlinien der American Heart Association und dem American College of Cardiology durchgeführt und war nicht Bestandteil der Studie. Der Grad der KHK wurde von mindestens zwei unabhängigen interventionellen Kardiologen gemessen. Eine KHK wurde definiert als eine Stenose ab 50 % in mindestens einer Hauptstammarterie des Herzens. Die Ejektionsfraktion wurde mithilfe eines Computersystems (Digital Cardiac Imaging Software; Philips, Amsterdam, Netherlands) aus dem enddiastolischen und endsystolischen linksventrikulären Areal berechnet.

### 2.4 Probenaufbereitung

Die Proben wurden innerhalb von maximal 60 Minuten nach Entnahme bei 1500 g für 15 Minuten zentrifugiert. Die Überstände wurden nach folgendem Schema in 2 ml Eppendorf Tubes<sup>®</sup> aliquotiert:



Diese Proben wurden bei 13.000 g für 2 Minuten zentrifugiert. Die Überstände wurden nun wiederum nach folgendem Schema aliquotiert:



Bis auf die zwei mit 25 µl Citrat gefüllten Eppendorf Tubes<sup>®</sup> wurden die übrigen Proben bis zur Weiterverarbeitung bei - 80 °C tiefgefroren. Das so erhaltene Blutplasma ist thrombozytenfrei (Jansen et al., 2014).

## 2.5 FACS (fluorescence-activated cell sorting) -Analyse

Zur Differenzierung der verschiedenen Mikropartikel wurden in die Citrat-Plasma-Proben folgende Antikörper gegeben:

**Tab.2:** Reaktionsansatz für Mikropartikelmessung

Probe 1	Annexin V-FITC, CD31-PE und CD42b-APC
---------	---------------------------------------

Nach kurzem Vortexen der Proben wurden diese für 45 Minuten bei Raumtemperatur in Dunkelheit inkubiert. Den Proben wurde jeweils im Anschluss 1 ml Annexin V Binding Buffer (10 mM HEPES, pH 7,4, 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl<sub>2</sub>) hinzugefügt. Nach mehrmaligem Auf- und Abpipettieren wurde die gesamte Menge (1028 µl) in zwei TruCOUNT™ absolute counting Tubes pipettiert. An diesen Proben wurden nun die FACS-Messungen vorgenommen. Mikropartikel zeichnen sich durch ihre Größe von ca. 100-1000 nm und die Bindung an Annexin V aus. Um darüber hinaus thrombozytäre (PMP) und erythrozytäre (EMP) Mikropartikel zu unterscheiden wurde nach folgender Antikörper-Affinität unterschieden:

**Tab.3:** Antikörperauswahl für den entsprechenden Mikropartikelnachweis

Mikropartikelart	Antikörperbindung
EMP	CD31-PE positiv, CD42b-APC negativ
PMP	CD31-PE und CD42b-APC positiv
Sonstige	Annexin positiv, CD31-PE und CD42b-APC negativ

Um die verschiedenen Mikropartikel-Subspezies zu sortieren, wurde ein FACSAria™ III Durchflusszytometer (BD Biosciences) verwendet. Vesikel mit einem Durchmesser von 100-1000 nm wurden eingeschlossen. CD31 + /CD42b-, CD31 + / CD42b + und CD31- / CD42b-MPs wurden gemessen, sortiert und gesammelt.

## **2.6 Mikropartikel-Isolierung**

Zu den sortierten MPs wurde RNase freies Wasser gegeben um eine Gesamtmenge von 250 µl zu erhalten. Im Anschluss wurde die Probe mit 750 µl TRIZOL Lösung ergänzt.

RNA-Isolation:

Nach Zugabe von 5 µl einer 1 mikromolaren synthetischen miR-39 Lösung wurden die Proben gevortext und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 150 µl Chloroform hinzugefügt, die Proben 15 Sekunden gevortext und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zentrifugation mit 12.000 g für 20 Minuten bei 4 °C wurde der Überstand in ein neues Tube überführt und mit eiskaltem 75 %-igen Ethanol auf 1,5 ml aufgefüllt und invertiert. Bei 7500 g wurden diese Proben nun für 5 Minuten bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand abpipetiert. Nach dem Trocknen wurde das entstandene Pellet in 30 µl DEPC-Wasser resuspendiert und die RNA eingemessen. Um die Ausbeute an kleinen RNAs zu erhöhen, wurde die RNA zuvor in Ethanol bei -20 °C über Nacht mit Glykogen (Invitrogen) präzipitiert.

## **2.7 384 Wells Taqman low density Array (Microarray)**

Der Microarray wurde nach dem Protokoll „Megaplex™ Pools for microRNA Expression Analysis“ (Applied Biosystems, Life Technologies, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt. Für die Untersuchung wurde die card A verwendet.

### **2.7.1 Reverse Transkription**

Es wurden die vom Protokoll empfohlenen Megaplex RT Primer und das Taqman® MicroRNA Reverse Transcription Kit genutzt und nach Auftauen folgendermaßen pipettiert (außer RNase freiem Wasser waren alle Bestandteile im Kit enthalten):

**Tab.4:** Reaktionsansatz für die reverse Transkription beim Microarray

<b>T Reaction Mix Components</b>	<b>Volume for Ten Samples (µl)</b>
Megaplex™ RT Primers (10X)	9,0
dNTPs with dTTP (100nM)	2,25
Multiscribe™ Reverse Transcriptase (50 U/µl)	16,88
10X RT Buffer	9,0
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	10,12
RNase Inhibitor (20 U/µl)	1,12
Nuclease-free water	2,25
Total:	50,62

Nach 6-maligem Invertieren und kurzem Zentrifugieren wurden jeweils 4,5 µl in die Vertiefungen einer 96-Loch-Platte gegeben. Im Anschluss wurden je 3 µl RNA (1-350 ng) in jede Vertiefung gegeben (oder 3 µl Wasser für die Kontrolle). Die Platte wurde mittels MicroAmp® Clear adhesive Film versiegelt und nach 6-maligem invertieren und kurzer Zentrifugation für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Im 7900HT-System wurden folgende Thermal-Zyklen für die Reverse Transkription eingestellt und das Programm mit der vorbereiteten Platte gestartet:

**Tab.5:** Thermalzyklen für reverse Transkription beim Microarray

Stage	Temp	Time
Cycle (40 Cycles)	16°C	2 min
	42°C	1 min
	50°C	1 sec
Hold	85°C	5 min
Hold	4°C	∞

### 2.7.2 Preamplifikation

Da von sehr kleinen RNA-Mengen auszugehen war, wurde anschließend die empfohlene Preamplifikation durchgeführt:

Zunächst wurde der Mastermix in einer 1,5 ml Eppendorf Tube® angesetzt (nach auftauen und invertieren der jeweiligen Bestandteile):

**Tab.6:** Reaktionsansatz für die Preamplifikationsreaktion beim Microarray

PreAmp Reaction Mix Components	Volume for 10 Samples (µl)
Taqman® PreAmp Master Mix (2X)	140,62
Megaplex™ PreAmp Primers (10X)	28,13
Nuclease-free water	84,37
Total	253,12

Nach 6-maligem Invertieren und kurzer Zentrifugation wurde in 10 Löcher einer 96-Loch-Platte je 2,5 µl RT-Produkt gegeben. Im Anschluss wurden jeweils 22,5 µl PreAmp Reaction Mix hinzugegeben. Nach Verschließen der Platte mittels

MicroAmp® Clear Adhesive Film, Invertieren der Platte und kurzer Zentrifugation wurde die Platte für 5 Minuten auf Eis inkubiert.

In dem 7900 HT System wurde bei standard ramp speed folgende Thermal-Zyklen eingestellt und das Programm nach Beladung mit der Platte gestartet:

**Tab.7:** Thermal-Zyklen für die Preamplifikationsreaktion beim Microarray

Stage	Temp	Time
Hold	95°C	10 min
Hold	55°C	2 min
Hold	72°C	2 min
Cycle (12 Cycles)	95°C	15 sec
	60°C	4 min
Hold	99,9°C	10 min
Hold	4°C	∞

Die Folie wurde im Anschluss abgenommen und in jedes befüllte Loch der Platte 75 µl 0,1X TE pH 7.0 gegeben. An diesem Punkt konnten die Proben bis zu einer Woche bei -15 - -25 °C gelagert werden.

### 2.7.3 Real-Time PCR Reaktion

Für die Real-Time PCR Reaktionen wurden folgende Komponenten in ein 1,5-ml Tube pipettiert:

**Tab.8:** Reaktionsansatz für die Real-Time-PCR-Reaktion beim Microarray

<b>Component</b>	<b>Volume for One Array (<math>\mu</math>l)</b>
TaqMan <sup>®</sup> Universal PCR Master Mix, No AmpErase <sup>®</sup> UNG 2X (Mix by swirling the bottle)	450
Diluted PreAmp product (after thawing, inverting six times and centrifugation)	9
Nuclease-free water	441
Total	900

Nach 6-maligem Invertieren und kurzer Zentrifugation wurde in jeden der 8 Ports der Microarray-Karte 100  $\mu$ l dieses Mixes pipettiert. Nach 1 minütigem Zentrifugieren wurde die Karte in Richtung der Ports ausgewalzt und auf ein blasenfreien Inhalt der Karten geachtet. Die Einmessung der Karten im 7900HT System erfolgte nach dem Protokoll von Applied Biosystems. Verwendet wurde die Software SDS v2.2.

## 2.8 Quantitative PCR

### 2.8.1 Reverse Transkription

Für die Messung der verschiedenen miRNA-Konzentrationen wurde mit den isolierten RNA-Proben zunächst eine Reverse Transkription durchgeführt und daraufhin eine quantitative PCR. Beide Abläufe wurden streng nach dem Protokoll „TaqMan<sup>®</sup> Small RNA Assays“ von applied biosystems durchgeführt. Die Patienten-RNA-Proben wurden mit RNA-freiem Wasser auf 2 ng/ $\mu$ l verdünnt und auf Eis gestellt. Im Anschluss wurde folgender Mastermix für die reverse Transkription zusammengestellt. Die Mengenangabe bezieht sich auf eine Probe. Da für jede Patientenprobe 10 verschiedene miRNAs bestimmt werden sollten und 15 % Reserve eingeplant wurde, musste die Menge je nach zu messender Patientenanzahl n mit  $n*115$  multipliziert werden:

**Tab.9:** Reaktionsansatz für die reverse Transkription bei der quantitativen PCR

<b>Component</b>	<b>Volume (µl)</b>
100mM dNTPs (with dTTP)	0,15
MultiScribe™ Reverse Transcriptase, 50 U/µl	1,00
10X Reverse Transcription Buffer	1,50
RNase Inhibitor, 20 U/µl	0,19
Nuclease-free water	4,16
Total volume	7,00

Nachdem dieser Mastermix vorsichtig vermischt und kurz zentrifugiert wurde, um den Tube-Inhalt auf den Boden des Tubes zu bringen, wurde dieser auf Eis gestellt. Nun wurden 7 µl RT-Mastermix mit jeweils 5 µl RNA-Probe vermischt (1-10 ng RNA pro Reaktion). Die 5X RT-Primer wurden parallel auf Eis aufgetaut mit RNase freiem Wasser auf 1X RT Primer verdünnt, gevortext und kurz zentrifugiert. 3 µl der 1X RT-Primer wurden nun dem Testmedium zugefügt, sodass 15 µl Testmedium in einem 0,2 ml Tube zur Verfügung standen. Pro Patient ergaben sich so 10 Proben mit je einem unterschiedlichen RT-Primer. Nach mehrmaligem Invertieren wurden die Proben in den Thermal-Cycler gegeben und unter folgenden Bedingungen die reverse Transkription durchgeführt:

**Tab.10:** Thermal-Zyklen für die Reverse Transkription bei der quantitativen PCR

Step	Time	Temperature
Hold	30 min	16°C
Hold	30 min	42°C
Hold	5 min	85°C
Hold	∞	4°C

Wenn sich die folgende Amplifikation nicht innerhalb von Stunden anschloss, wurden die Proben bei -18 °C eingefroren.

### 2.8.2 Quantitative PCR- Amplifikation

Nach folgendem Schema wurde der qPCR-Reaktions-Mix in einem sterilen 1,5 ml Tube hergestellt:

**Tab.11:** Reaktionsansatz für die quantitative PCR-Amplifikation

Component	Volume per 20 µl Reaction (Three replicates)
Taqman® Small RNA Assay (20X)	3,6 µl
Product from RT reaction	4,8 µl
Taqman® Universal PCR Master Mix II (2X), no UNG	36,0 µl
Nuclease-free water	27,61 µl
Total volume	72,01 µl

Das Tube wurde verschlossen und mehrmals invertiert bevor es kurz zentrifugiert wurde. Je drei Wells einer 96-well- Platte wurde mit je 20 µl des Reaktionsmixes gefüllt. Zusätzlich wurden pro Primer auch zwei „No template controls (NTC)“ mitlaufen gelassen, bei denen an Stelle der Patienten-Probe RNase-freies Wasser pippetiert wurde, um Hintergrund-Signale bewerten zu können.

Bei 10 Primern konnten so auf einer Platte sieben Patientenproben eingemessen werden.

Die 96-Well-Platte wurde mit eine Folie bedeckt und mithilfe eines Spatels glatt ausgestrichen. Die überstehenden Kanten wurden abgetrennt. Mit Gegengewicht wurde die 96-Well-Platte bis ca. 1000 g zentrifugiert und dann im 7500 Fast Real Timer PCR System (Applied biosystems) eingemessen.

## **2.9 Statistische Auswertung**

Um die Expression der miRNAs in den drei verschiedenen Patientengruppen (Patienten mit stabiler KHK, Patienten mit ACS, gesunde Kontrollgruppe) zu vergleichen, wurde nach der Durchführung einer quantitativen PCR eine statistische Auswertung mittels ANOVA-Test und Bonferroni-Korrektur vorgenommen.

Die Ergebnisse sind in 3.5 graphisch dargestellt. Dabei zeigt ein P-Wert <0,05 einen signifikanten Unterschied an.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Basis-Charakteristika

Insgesamt wurden 180 Patienten mit einem durchschnittlichen Alter von 65,1 Jahren in die Studie eingeschlossen und in drei Untersuchungsgruppen aufgeteilt: Patienten mit invasivem Ausschluss einer KHK (n=41), Patienten mit stabiler Angina pectoris (n=77) und Patienten mit akutem Koronarsyndrom (n=62). Mit insgesamt 68,9 % konnten mehr Männer als Frauen in die Studie eingebunden werden. Dabei waren die Männer mit 84,4 % (stabile Angina) und 71 % (akutes Koronarsyndrom) in zwei Gruppen stärker vertreten, wohingegen die Frauen in der Gruppe ohne KHK mit 63,4 % in der Mehrzahl waren.

Die Patienten in den Gruppen mit stabiler KHK und ACS hatten durchschnittlich mehr kardiovaskuläre Risikofaktoren (z. B. arterielle Hypertonie und Hyperlipoproteinämie) als die Patienten mit angiographischem Ausschluß einer KHK. Zusätzlich war unter den Patienten mit ACS der Prozentsatz der Patienten, die eine Dauermedikation einnehmen, im Vergleich zu den anderen zwei Gruppen am höchsten (z. B. Beta-Blocker, Calcium-Kanal-Blocker).

Im Folgenden sind die bei Eintritt in die Studie vorliegenden Merkmale der eingeschlossenen Patienten tabellarisch dargestellt:

**Tab. 12:** Hier dargestellt sind die drei untersuchten Gruppen NCAD (invasiver Ausschluss KHK), stable angina (stabile Angina pectoris) und ACS (akutes Koronarsyndrom) verglichen in Bezug auf verschiedene Kriterien; Kontinuierliche Daten werden als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung und kategoriale Daten werden als Häufigkeit in Prozent ausgedrückt.

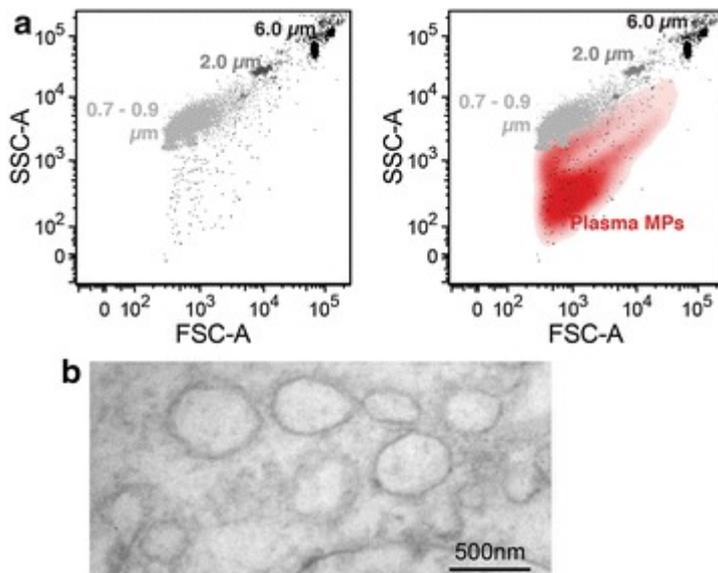
CAD = Coronary artery disease; nCAD, non-coronary artery disease; DM, diabetes mellitus; NDM, Non-diabetes mellitus; MI, myocardial infarction; PCI, percutaneous coronary intervention; ACE, angiotensin-converting enzyme; LDL, low-density lipoprotein; HDL, high-density lipoprotein; MP, microparticle. Eine chronische Nierenerkrankung wurde als glomeruläre Filtrationsrate  $<60\text{ml}/\text{min}$  definiert (NCAD Patienten gegen Patienten mit stabiler Angina gegen Patienten mit ACS).

Characteristic	Total (n=180)	NCAD (n=41)	Stable angina (n=77)	ACS (n=62)	P value
Age, year	65.3±11.3	63.4± 13.2	65.3±10.6	66.5±10.9	0.413
Gender, no. (%)					0.000
Female	56(31.1%)	26(63.4%)	12(15.6%)	18(29.0%)	
male	124(68.9%)	15(36.6%)	65(84.4%)	44(71.0%)	
<b>Cardiovascular risk factors. (%)</b>					
Arterial hypertension	141(78.3%)	30(73.2%)	60(77.9%)	51(82.3%)	0.545
Hyperlipoproteinemia	94(52.2%)	16(39.0%)	39(50.6%)	39(62.9%)	0.043
Family history	43(24.2%)	11(26.8%)	18(23.4%)	14(22.6%)	0.876
Diabetes	55(30.6%)	7(12.2%)	23(29.1%)	25(40.3%)	0.042
Smoking	43(23.9%)	7(17.1%)	24(31.2%)	14(22.6%)	0.209
Body mass index, kg/m <sup>2</sup>	27.9±11.3	26.6±6.0	28.2±3.9	28.3±5.6	0.183
<b>Medical history. (%)</b>					
Previous bypass	21(11.7%)	0(0%)	9(11.7%)	12(19.4%)	0.011
Previous MI (6 months)	45(25.0%)	0(0%)	33(42.9%)	12(19.4%)	0.000
Previous stroke	7(3.9%)	2(4.9%)	1(1.3%)	4(6.5%)	0.275
Chronic kidney disease	6(3.3%)	2 (4.9%)	1(1.3%)	3(4.8%)	0.421
<b>PCI</b>					
Previous	101(56.1%)	0 (0%)	61(79.2%)	40 (64.5%)	0.000
Current	90(50.0%)	0(0%)	48(62.3%)	42(67.7%)	0.000
<b>Coronary artery disease. no. (%)</b>					0.000
1 Vessels	28(15.6%)	0(0%)	16(20.8%)	12(19.4%)	
2 Vessels	48(26.7%)	0(0%)	29(37.7%)	19(30.6%)	
3 Vessels	63(35.0%)	0(0%)	32(41.6%)	31(50.0%)	
Left ventricular ejection fraction, %	57.4±12.3	62.8±8.9	55.8±10.8	55.2±15.0	0.004
<b>Medication on admission. no. (%)</b>					
ACE inhibitors	114(63.3%)	14(34.1%)	58(75.3%)	42(67.7%)	0.000
Angiotensin receptor blockers	34(18.9%)	10(24.4%)	11(14.3%)	13(21.0%)	0.359
Beta blockers	150(83.3%)	25(61.0%)	69(89.6%)	56(90.3%)	0.000
Calcium channel blockers	33(18.3%)	7(17.1%)	11(14.3%)	15(24.2%)	0.315
Diuretics	77(42.8%)	21(51.2%)	27(35.1%)	29(46.8%)	0.176
Statins	148(82.2%)	15(36.5%)	75(97.4%)	58(93.5%)	0.000
Nitrates	9(5.0%)	1(2.4%)	5(6.5%)	3(4.8%)	0.628
Aspirin	140(77.8%)	8(19.5%)	75(97.4%)	57(91.9%)	0.000
Clopidogrel	54(30.0%)	1(2.4%)	23(29.9%)	30 (48.4%)	0.000
<b>Laboratory parameters</b>					
glucose	117.3±46.5	108.8±35.9	120.4±48.5	119.5±50.5	0.412
Hb A1c(%)	6.2±0.9	6.0±0.5	6.3±0.9	6.3±1.0	0.108
Serum creatinine, mg/dL	1.0±0.3	0.9±0.4	1.0±0.3	1.0±0.3	0.166
Glomerular filtration rate, mL/min	66.1±10.2	67.6±9.2	65.6±10.7	65.7±10.1	0.567
Triglycerides, mg/dL	157.2±179.7	116.9±47.3	150.1±82.9	192.7±286.9	0.100
Cholesterol, mg/dL	184.4±47.7	206.4±40.4	178.6±44.2	177.1±52.4	0.003
HDL cholesterol, mg/dL	49.3±17.5	63.9±22.1	45.3±12.3	44.6±14.2	0.000
LDL cholesterol, mg/dL	112.6±37.7	121.6±32.2	109.7±33.1	110.3±45.4	0.221
C-reactive protein, mg/L	5.2±11.2	3.3±4.6	5.7±13.9	5.7±10.4	0.483
Leucocytes, 10 <sup>9</sup> /L	7.3±2.1	6.9±2.3	7.4±2.1	7.3±2.1	0.413
<b>CD marker</b>					
concentration_AnnV_MP	738.0±1866.7	557.8 ±887.6	716.7±1300.7	883.6±2748.9	0.683

### 3.2 Mikropartikel-Charakterisierung

Für die Studie wurden neun von vaskulären und endothelialen Zellen exprimierte miRNAs ausgewählt (miRNAs: miR-126, miR-222, miR-let7d, miR-21, miR-30, miR-92a, miR-139, miR-199a und miR-26a). In vorhergehenden Studien konnte gezeigt werden, dass diese miRNAs bei der Pathogenese der KHK eine Rolle spielen (Fichtlscherer et al., 2010). In der aktuellen Arbeit wurde die jeweilige Expression in den drei unterschiedlichen Untersuchungsgruppen (Patienten ohne KHK, Patienten mit stabiler Angina, Patienten mit ACS) verglichen. Da aus vorherigen Studien hervorgeht, dass miRNAs in von Zellen exprimierten Mikropartikeln im Blutkreislauf zirkulieren (Jansen et al., 2014; Mitchell et al., 2008), wurden die miRNAs in zirkulierenden Mikropartikeln gemessen.

Die isolierten Mikropartikel wurden hinsichtlich ihrer Größe unter Verwendung von Elektronenmikroskopie und Durchflußzytometer charakterisiert. Die Charakterisierungsexperimente zeigten, dass die überwiegende Mehrheit der isolierten MPs eine Größe zwischen 0,1  $\mu\text{m}$  und 1  $\mu\text{m}$  im Durchmesser hatte (siehe Abbildung 3).

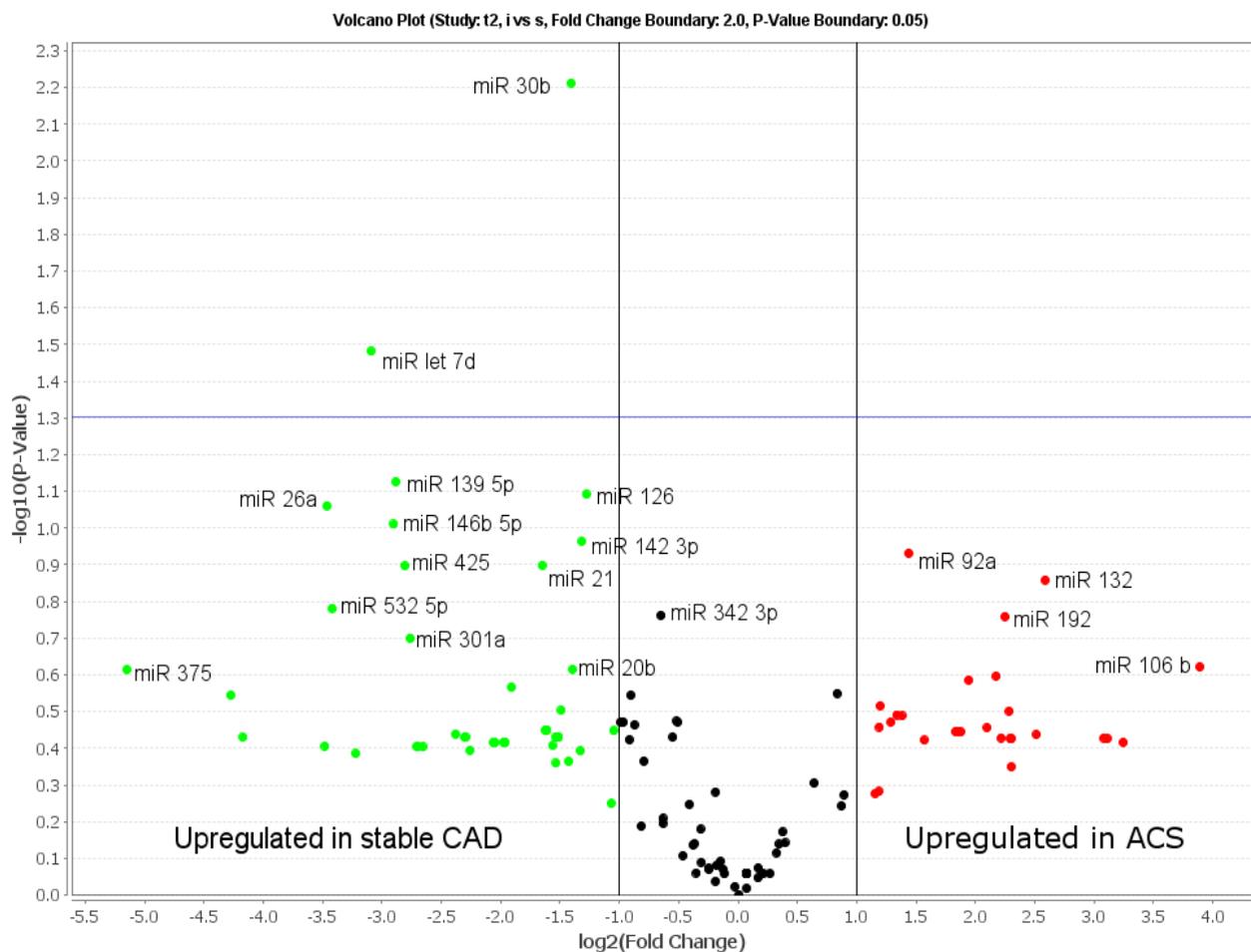


**Abb. 3:** Charakterisierung zirkulierender Mikropartikel. a: Zirkulierende MPs wurden durch 20.000 g Ultrazentrifugation von Plättchen-defizientem Plasma gesammelt. Fluoreszierende Polystyrolpartikel (0,7-0,9, 2 und 6  $\mu\text{m}$ ) wurden verwendet, um die Größe von isolierten MPs zu untersuchen. Im Durchflußzytometer hatten analysierte MPs (rot) eine Größe  $<1 \mu\text{m}$ , wie unter Verwendung von fluoreszierenden Polystyrolpartikeln

gezeigt wurde. b: Das erhaltene Pellet wurde nach 20.000 g Ultrazentrifugation in 3 % Glutaraldehyd-PBS über Nacht bei 4 °C fixiert und in Epon-pur eingebettet. 50 nm-Schnitte wurden auf Kupfergittern hergestellt. Die Proben wurden auf einem elektronischen Mikroskop von Philips CM 10 visualisiert und mit der analySiS-Software (Olympus) analysiert (Jansen et al., 2016).

### 3.3 Micro-Array

Um zu untersuchen, ob ein akutes Koronarsyndrom zu einem veränderten miRNA-Expressionprofil in zirkulierenden MPs führt, wurde aus je 5 Patienten mit stabiler KHK und 5 Patienten mit einem ACS ein miRNA Microarray durchgeführt. Folgende Grafik stellt die mittels DataAssist™ (Life Technologies, Deutschland) durchgeführte Datenanalyse als Volcanoplot dar:



**Abb. 4.:** Volcano-Plot: Auswertung des Microarrays. Patienten mit stabiler KHK wurden mit Patienten mit ACS (n=5) verglichen. Die rot markierten miRNAs sind bei Patienten mit

ACS stärker exprimiert. Die grün markierten miRNAs sind bei Patienten mit stabiler KHK stärker ausgeprägt. Die blaue horizontal verlaufende Linie stellt das Signifikanzniveau  $p=0,05$  dar.

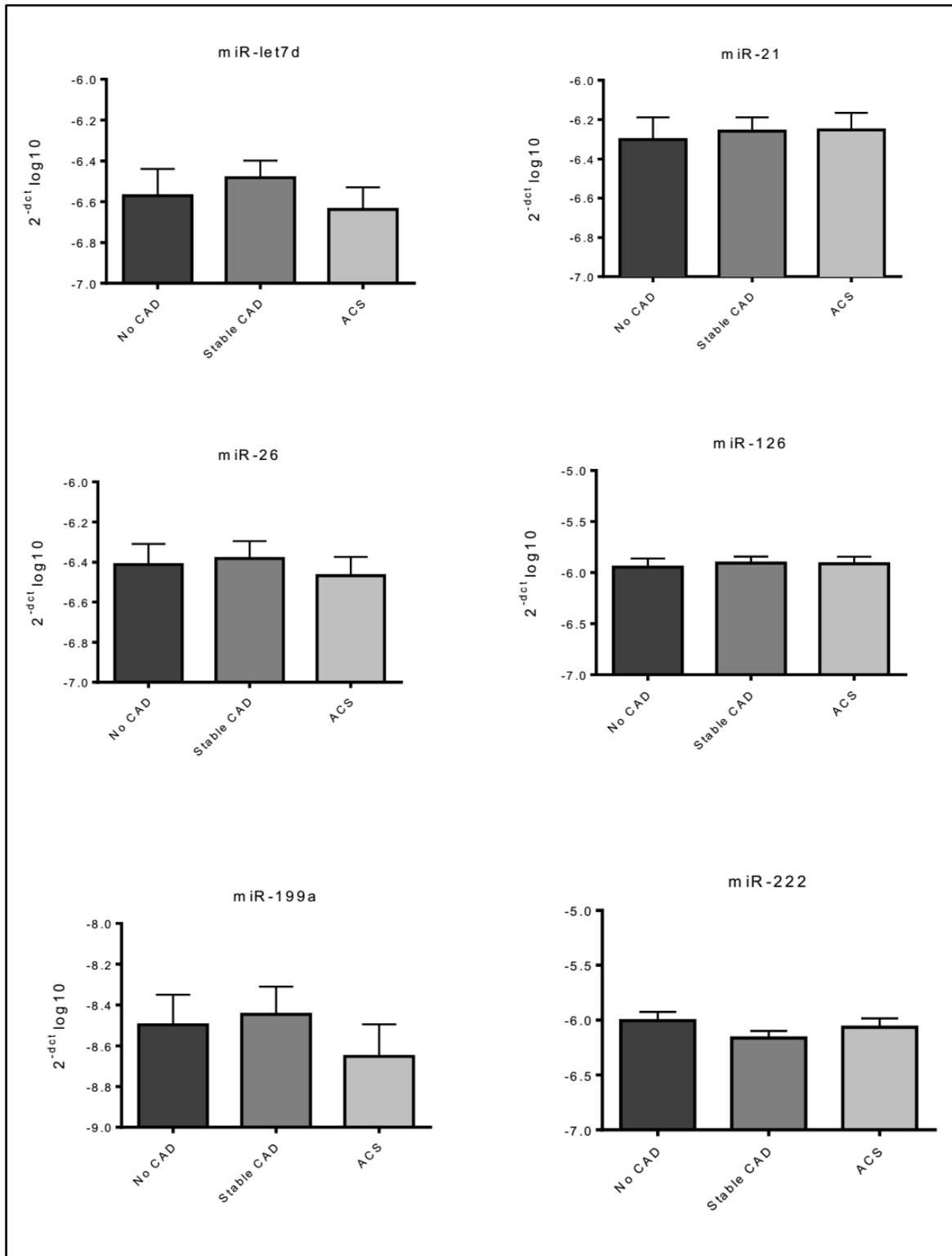
### **3.4 Selektion der miRNAs für die weitere Analyse**

Anhand der Array-Ergebnisse sowie durch die Auswertung verschiedener Studien wurden 9 miRNAs für die weiteren Untersuchungen ausgewählt:

miR hsa-Let-7d sowie hsa-miR-30b waren bei Patienten mit stabiler KHK gegenüber Patienten mit akutem Koronarsyndrom signifikant hochreguliert. Vom Trend her unterschiedlich reguliert waren auch hsa-miR-26a, hsa-139-5p sowie hsa-92a. Für hsa-92a konnte bereits zwischen einer gesunden Kontrollgruppe und Patienten mit einer stabilen KHK ein signifikanter Unterschied in der Regulierung festgestellt werden (Fichtlscherer et al., 2010b). hsa-miR-126, hsa-miR-199 wurden ausgewählt, da Studien der eigenen Arbeitsgruppe Vorhersagen in Beziehung auf das Auftreten von kardiovaskulären Geschehen zeigen konnten (Jansen et al., 2014). hsa-miR-222 zeigte in eigenen Vorarbeiten einen antiinflammatorischen Effekt im Mausmodell (Jansen et al., 2015). Hsa-miR-21 wurde ausgewählt, da sich in einer Studie ein signifikanter Unterschied zwischen Patienten mit Atherosklerose und einer gesunden Kontrollgruppe gezeigt hat und sich damit auch ein möglicher Marker zur Differenzierung einer KHK ergibt (Raitoharju et al., 2011).

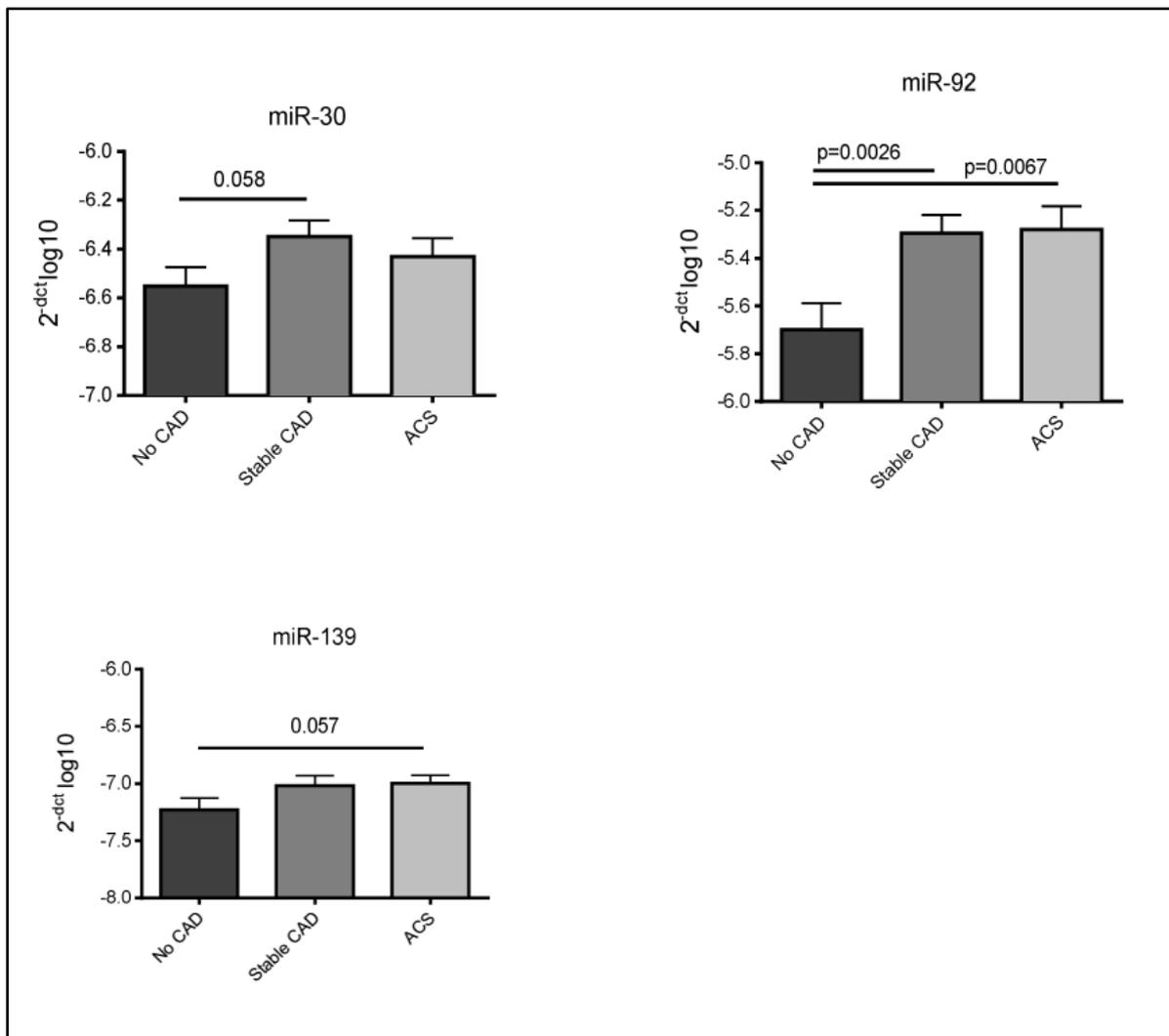
### **3.5 Quantitative PCR**

Die ausgewählten miRNAs wurden anschließend mittels quantitativer PCR in den verschiedenen Patientengruppen analysiert. Nachfolgend sind die Ergebnisse grafisch dargestellt:



**Abb. 5:** Darstellung der Expression von miR-let7d, miR-21, miR-26, miR-126, miR-199a und miR-222 bei einer gesunden Kontrollgruppe, bei Patienten mit stabiler KHK sowie bei Patienten mit einem akuten Koronarsyndrom.

In Abbildung 5 werden die Expressionen von miR-let7d, miR-21, miR-26, miR-126, miR-199a und miR-222 bei einer gesunden Kontrollgruppe, bei Patienten mit stabiler KHK sowie bei Patienten mit einem akuten Koronarsyndrom im Vergleich dargestellt. Die in dieser Grafik aufgeführten Messungen ergaben keinen signifikanten Unterschied der miR-Expression beim Vergleich der drei gewählten Probandengruppen.



**Abb. 6:** Darstellung der Expression von miR-30, miR-92 und miR-139 bei einer gesunden Kontrollgruppe, bei Patienten mit stabiler KHK sowie bei Patienten mit einem akuten Koronarsyndrom.

In Abbildung 6 werden die Expression der miRs dargestellt, die sich in den Messungen bei der gesunden Kontrollgruppe und Patienten mit einer KHK als unterschiedlich dargestellt haben.

Bei der Expression von miR-30 konnte ein Unterschied zwischen Patienten mit invasivem Ausschluss einer koronaren Herzerkrankung und Patienten mit stabiler KHK festgestellt werden, der jedoch nicht signifikant ist ( $p=0,058$ ).

Ähnlich zeigt sich das Ergebnis bei miR-139. Bei dieser Messung konnte ein Unterschied zwischen Gesunden und Patienten mit ACS gezeigt werden, der jedoch wiederum nicht als signifikant zu bewerten ist ( $p=0,057$ ).

Bei der Expression der Spiegel von miR-92 konnte ein signifikanter Unterschied zwischen Gesunden und an KHK Erkrankten festgestellt werden. Die miR 92 ist in der gesunden Kontrollgruppe schwächer exprimiert ( $p=0,0026$  zwischen Patienten ohne KHK und Patienten mit stabiler Angina;  $p=0,0067$  zwischen Patienten ohne KHK und Patienten mit ACS).

## 4 Diskussion

Da die KHK und ihre Komplikationen weltweit eine sehr häufige Todesursache ist, ist die Entwicklung weiterer spezifischer Biomarker für die Diagnostik ein wichtiges Ziel der aktuellen Forschung. Ziel der vorliegenden Arbeit war es durch die Charakterisierung des Expressionsprofils unterschiedlicher miRNAs in zirkulierenden Mikropartikeln mögliche neue Biomarker für die KHK herauszuarbeiten.

Bekannt ist, dass die zirkulierenden miRNAs bei Patienten mit und ohne KHK signifikant unterschiedlich exprimiert sind (Fichtlscherer et al., 2010).

Zudem konnte in vorherigen Studien gezeigt werden, dass zirkulierende miRNAs bei Patienten mit ACS unterschiedlich reguliert sind (Ahlin et al., 2016).

miRNAs werden im Plasma an Proteine (Ago-2, LDL) gebunden oder in extrazellulären Vesikeln (Exosomen, Mikropartikel) transportiert. Die Mikropartikel-Spiegel bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung korrelieren unter anderem mit dem kardiovaskulären Outcome (Werner et al., 2006; Sinning 2011). Bisher ist die miRNA-Expression in Mikropartikeln bei Patienten mit ACS unbekannt.

In der aktuellen Studie wurden Mikropartikel aus EDTA-Plasma isoliert und die jeweilige miRNA-Expression in den Mikropartikeln gemessen. Mikropartikel werden aus aktivierten oder apoptotischen Zellen freigesetzt und sind dementsprechend in Situationen der Zellschädigung wie z. B. bei kardiovaskulären Erkrankungen in höherer Anzahl vorhanden (Jansen et al., 2014, Mause und Weber, 2010). Die Messung der miR-Expression aus Mikropartikeln ist im Vergleich zu der Messung von frei zirkulierenden miRNAs besonders interessant, da miRNAs in Mikropartikeln nicht nur Biomarker für Zellschädigungen sein können, sondern eine wichtige Rolle bei dem interzellulären Austausch von biologischen Informationen spielen und somit Effektoren von kardiovaskulären Erkrankungen sind (Jansen et al., 2014, Rautou et al., 2011). So haben verschiedene Studien gezeigt, dass miRNA-transferierende Mikropartikel die Gefäßfunktion beeinflussen können. Dabei weisen neuere Studien darauf hin, dass die Funktion der Mikropartikel von der jeweiligen miRNA-Expression in den Mikropartikeln abhängig ist (Cantaluppi et al., 2012, Diehl et al., 2012).

Hergenreider et. al fanden 2012 heraus, dass eine miRNA- und Mikropartikelvermittelte Kommunikation zwischen Endothelzellen und glatten Muskelzellen stattfindet. Der artheroprotektive Transkriptionsfaktor KLF2 induziert dabei die Hochregulation von miR-143/145 in Mikropartikeln, welche wiederum die Genexpression in den glatten Muskelzellen steuern.

Insgesamt ergibt sich somit aus der soweit bisher bekannten Funktion der Mikropartikel und den darin exprimierten und regulierten miRNAs ein vielversprechender Ansatz zu einer möglichen Bekämpfung der Artherosklerose.

Für unsere aktuelle Studie wurden neun von vaskulären und endothelialen Zellen exprimierte miRNAs ausgewählt, die bei der Pathogenese der KHK eine Rolle spielen: miR-126, miR-222, miR-let7d, miR-21, miR-30, miR-92a, miR-139, miR-199a und miR-26a. Für diese miRNAs wurde in vorhergehenden Studien eine spezifische Regulation bei Patienten mit kardiovaskulären Erkrankungen beschrieben (Fichtlscherer et al., 2010) sowie in unterschiedlicher Weise eine Funktion bei vaskulären Prozessen festgestellt.

So unterstreicht die Studie von Zerneck et. al 2009 beispielsweise die Funktion von miRNAs sowohl in physiologischen als auch in pathologischen Vorgängen. In der Studie konnte nachgewiesen werden, dass miR-126, das in apoptotischen Mikrovesikeln wie sie z. B. auch bei Artherosklerose freigesetzt werden angereichert vorliegt, die Produktion von CXCL12 förderte. Dieses Chemokin und sein Rezeptor rekrutieren im Falle einer Gewebeschädigung Progenitorzellen.

Desweiteren konnten Jansen et. al 2013 in einer Studie zeigen, dass endotheliale Mikropartikel durch die Bereitstellung von miR-126 die Endothelreparatur in den Empfängerzellen fördern. Zusätzlich wurde dabei festgestellt, dass die Mikropartikel von Patienten mit Diabetes mellitus signifikant weniger miR-126 enthielten und somit weniger Reparaturkapazität für die Endothelzellen bereitstellen konnten. Die Endothelreparatur ist dabei entscheidend für den Erhalt der vaskulären Integrität und somit für die Verhinderung der Entstehung von Gefäßerkrankungen.

Auch miR-222 scheint durch Genregulierung eine wichtige Rolle bei vaskulären Prozessen zu spielen. Dentelli et. al bezeichneten die miR-222 2010 als einen

Hauptregulator bei vaskulären inflammatorischen Prozessen wie sie beispielsweise bei der Entstehung von Artherosklerose von Bedeutung sind.

In einer Studie von Yu et. al wurde 2011 die Expression von miR-let7d zwischen einer vaskulär erkrankten Rattengruppe und einer gesunden Kontrollgruppe verglichen. Die Ergebnisse zeigten, dass miR-let7d in den glatten Muskelzellen der erkrankten Tiere signifikant niedriger exprimiert war als in der gesunden Kontrollgruppe. Da die Überexpression von miR-let7d zu einer gesteigerten Proliferation der glatten Muskelzellen führte, wurde miR-let7d so als wichtiger Regulator bei der Proliferation der glatten Muskelzellen heraus gearbeitet.

Von Thum et. al konnte 2008 in einem Mausmodell gezeigt werden, dass die strukturelle und funktionelle Verschlechterung der Herzinsuffizienz durch das Antagonisieren von miR-21 verhindert werden kann und miR-21 somit ein mögliches Ziel für einen therapeutischen Ansatz darstellen könnte.

Die Funktion von miR199a wurde in einer Studie von Rane et. al 2009 untersucht. Es wurde festgestellt, dass miR199a in Herzmuskelzellen bei Hypoxie akut herunter reguliert wird. Die miR199a konnte in der Studie als ein Regulator eines Hypoxie-getriggerten Weges herausgestellt werden, der es ermöglichen könnte Zellen gegen durch Hypoxie verursachte Schädigungen schützen.

Verglichen wurden in unserer aktuellen Studie die Expressionen der unterschiedlichen miRNAs jeweils bei einer gesunden Kontrollgruppe, bei Patienten mit stabiler KHK und bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom. Dabei konnten zwischen den Expressionsleveln von miR-let7d, miR-21, miR-26, miR-126, miR-199a und miR-222 bei Patienten mit stabiler und instabiler KHK keine Unterschiede festgestellt werden.

Bei drei miRNAs (miR-30, miR-139 und miR-92) wurden in den durchgeführten Messungen Unterschiede zwischen der gesunden Kontrollgruppe und den anderen Gruppen festgestellt. miR-30 war bei Patienten mit invasivem Ausschluss einer KHK schwächer exprimiert als bei Patienten mit stabiler KHK und ACS Patienten. Auch miR-139 zeigte sich in der gesunden Kontrollgruppe schwächer exprimiert.

Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen legt die Studie von Huang et. al 2016 einen Zusammenhang zwischen der Expression von miR-30 und der Entstehung von Artherosklerose nahe. Dort konnte gezeigt werden, dass miR-30 in einer Gruppe von Patienten mit essentieller Hypertonie und verdickter Intima media der A.carotis signifikant schwächer exprimiert war als in einer gesunden Kontrollgruppe. Eine mögliche Erklärung für die gegensätzlichen Ergebnisse könnte die relativ kleine Fallzahl unserer Studie darstellen.

Auch das Ergebnis der Messung von miR-139 in unserer Studie bleibt im Kontext mit vorhergehenden Studien schwer einzuordnen. Li et. al zeigten 2015, dass miR-139 in myokardialen Zellen bei oxidativem Stress schwächer exprimiert wurde und die Zellschädigung durch das Hochregulieren von miR-139 zu vermindern war.

In unserer Studie war jedoch bei miR-92 ein signifikanter Unterschied zwischen der gesunden Kontrollgruppe und den an KHK erkrankten Patienten zu verzeichnen. Die miR-92 war in der gesunden Kontrollgruppe im Vergleich zu den an KHK erkrankten Patienten signifikant schwächer exprimiert. Dies ist besonders interessant, da bereits veröffentlichte Studien ebenfalls gezeigt haben, dass die miR-92 bei der Pathogenese der Artherosklerose möglicherweise eine wichtige Rolle spielt (Giral et al., 2016). So wurde z. B. von Huang et. al 2016 ein signifikanter Unterschied der miR-92 Expression bei Patienten mit arterieller Hypertension und verdickter Intima media der Carotis im Vergleich zu einer gesunden Kontrollgruppe gefunden. Von Hinkel et. al wurde 2013 herausgefunden, dass die Hemmung von miR-92 ein möglicher therapeutischer Ansatz zur Erhaltung der Herzfunktion nach einem ischämischen Ereignis sein könnte.

Die Ergebnisse unserer Studie weisen durch den signifikanten Unterschied der Expression von miR-92 zwischen gesunden Patienten und Patienten mit KHK in eine ähnliche Richtung. Die miR-92 scheint bei der Pathogenese der KHK eine wichtige Rolle zu spielen und könnte sich ggf. als neuer Biomarker eignen.

Ein signifikanter Unterschied zwischen Patienten mit stabiler Angina und Patienten mit ACS konnte in unserer Studie jedoch nicht nachgewiesen werden.

#### **4.1 Ausblick**

Ob sich diese in unserer Studie signifikant unterschiedlich exprimierte miR-92 potentiell als neuer Biomarker bei Patienten mit KHK etablieren kann müssen weitere Studien mit größeren Patientenkollektiven ergeben.

Zukünftige Studien müssen zudem zeigen, in welchen zellspezifischen Mikropartikeln die regulierten miRNAs überwiegend exprimiert sind.

Darüberhinaus werden wir in grundlagenwissenschaftlichen Studien die Effekte von miR-92-exprimierenden MPs und deren potentieller Rolle in der Atherogenese untersuchen.

Grundsätzlich wird in vielen weiteren Studien versucht werden die Entstehung und Progression von Atherosklerose zu verstehen, bei der Mikropartikel und die darin exprimierten miRNAs als Biomarker und biologische Messenger eine wichtige Rolle zu spielen scheinen. Bei der Analyse der bisher vorliegenden Studien ergibt sich der Eindruck vielfältiger Ansätze für zukünftige therapeutische Ansätze in diesem Feld der Forschung.

#### **4.2 Limitationen der Studie**

Die vorliegende Studie hat Limitationen. Die saubere Isolierung von Mikropartikeln aus dem Plasma ist ein technisch anspruchsvolles Verfahren (Quackenbush et al., 2014). Desweiteren ist die miRNA Analyse im Plasma aufwendig und teuer, was die breite Einsetzbarkeit für den klinischen Alltag deutlich einschränkt.

Zu beachten ist außerdem, dass in der vorliegenden Studie nur eine limitierte Anzahl an miRNAs gemessen wurde, was die Aussagekraft dementsprechend einschränkt. Notwendig wären Studien mit größeren Patientenzahlen und der Messung weiterer miRNAs.

Dennoch ist dies die erste Studie, die zeigt, dass die miR Expression in zirkulierenden Mikropartikeln bei Patienten mit und ohne KHK signifikant reguliert sind.

## 5 Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung der miRNA- Expression in zirkulierenden Mikropartikeln bei Patienten mit und ohne KHK, um möglicherweise geeignete Biomarker zu finden, die sich gegebenenfalls für den Einsatz im klinischen Alltag durch schnelle Messbarkeit z. B. im Plasma eignen könnten. Da miRNAs in der Zirkulation unter anderem auch in Mikropartikeln verpackt und transportiert werden, analysierten wir die miRNA-Expressionen in zirkulierenden MPs. Darüberhinaus ist die Messung der miRNA-Expression aus Mikropartikeln im Vergleich zu der Messung von frei zirkulierenden miRNAs besonders interessant, da miRNAs in Mikropartikeln nicht nur Biomarker für Zellschädigungen sein können, sondern auch eine Funktion als biologische Messenger haben und somit Effektoren von kardiovaskulären Erkrankungen sind. Die Charakterisierung der miRNA-Expression aus Mikropartikeln trägt somit zusätzlich dazu bei, die Entstehung und Progression von Atherosklerose zu verstehen und ggf. sogar neue therapeutische Ansätze zu finden.

Daher wurden in unserer Studie die Mikropartikel aus EDTA-Plasma isoliert und die jeweilige miRNA-Expression gemessen.

Verglichen wurden jeweils die Expressionen von neun ausgewählten miRNAs, von denen aus vorherigen Studien hervorgeht, dass sie eine Rolle bei der Pathogenese der KHK spielen. Diese Expressionen wurden dann bei einer gesunden Kontrollgruppe, bei Patienten mit stabiler KHK sowie bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom verglichen. Dabei zeigten sich bei miR-let7d, miR-21, miR-26, miR-126, miR-199a und miR-222 keine signifikanten Unterschiede.

Bei der Expression von miR-30 und miR-139 jedoch konnten Unterschiede festgestellt werden, die sich allerdings nicht als signifikant dargestellt haben.

Signifikant zeigten sich die Expressionsunterschiede der Spiegel von miR-92 zwischen Gesunden und an KHK Erkrankten. Die miR-92 ist in der gesunden Kontrollgruppe deutlich schwächer exprimiert.

Abschließend kann somit festgestellt werden, dass die miR-92 eine wichtige Rolle in der Pathogenese der KHK zu spielen scheint. In diese Richtung wiesen auch bereits vorhergehende Studien. Somit ergibt sich, dass sich die miR-92 prinzipiell als

Biomarker für die KHK eignen könnte. Ob sich dies jedoch etablieren kann muss in Folgestudien noch gezeigt werden.

## 6 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Response-to-injury-Hypothese (Ross, 1999):
Abbildung 2	Darstellung der miRNA Biogenese in Säugetieren modifiziert von David Koch (Wienholds and Plasterk, 2005)
Abbildung 3	Charakterisierung zirkulierender Mikropartikel
Abbildung 4	Volcano-Plot: Auswertung des Microarrays
Abbildung 5	Darstellung der Expression von miR-let7d, miR- 21, miR-26, miR-126, miR-199a und miR-222
Abbildung 6	Darstellung der Expression von miR-30, miR-92 und miR-139

## 7 Literaturverzeichnis

Ahlin F, Arfvidsson J, Vargas KG, Stojkovic S, Huber K, Wojta J. MicroRNAs as circulating biomarkers in acute coronary syndromes: A review. *Vascular Pharmacology* 2016; 81: 15–21

Bernal-Mizrachi L, Wenche J, Fierro C, Macdonough R, Velazques HA, Purow J, Jimenez JJ, Horstman LL, Ferreira A, de Marchena E, Ahn YS. Endothelial microparticles correlate with high-risk angiographic lesions in acute coronary syndromes. *Int J Cardiol* 2004; 97: 439–446

Bonetti PO, Lerman LO, Lerman A. Endothelial Dysfunction A Marker of Atherosclerotic Risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 168–175

Cantaluppi V, Gatti S, Medica D, Figliolini F, Bruno S, Deregibus MC, Sordi A, Biancone L, Tetta C, Camussi G. Microvesicles derived from endothelial progenitor cells protect the kidney from ischemia-reperfusion injury by microRNA-dependent reprogramming of resident renal cells. *Kidney Int* 2012; 82: 412–427

Danese E, Montagnana M. An historical approach to the diagnostic biomarkers of acute coronary syndrome. *Ann Transl Med* 2016; 4: 194

Dentelli P, Rosso A, Orso F, Olgasi C, Taverna D, Brizzi MF. microRNA-222 Controls Neovascularization by Regulating Signal Transducer and Activator of Transcription 5A Expression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010; 30: 1562–1568

Diehl P, Fricke A, Sander L, Stamm J, Bassler N, Htun N, Ziemann M, Helbing T, El-Osta A, Jowett JBM, Peter K. Microparticles: major transport vehicles for distinct microRNAs in circulation. *Cardiovasc Res* 2012; 93: 633–644

Falk E, Shah PK, Fuster V. Coronary Plaque Disruption. *Circulation* 1995; 92: 657–671

Fichtlscherer S, De Rosa S, Fox H, Schwietz T, Fischer A, Liebetrau C, Weber M, Hamm CW, Röxe T, Müller-Ardogan M, Bonauer A, Zeiher AM, Dimmeler S. Circulating microRNAs in patients with coronary artery disease. *Circ Res* 2010; 107: 677–684

Giral H, Kratzer A, Landmesser U. MicroRNAs in lipid metabolism and atherosclerosis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2016; 30: 665–676

Gregory RI, Chendrimada TP, Cooch N, Shiekhattar R. Human RISC Couples MicroRNA Biogenesis and Posttranscriptional Gene Silencing. *Cell* 2005; 123: 631–640

Hamm CW. Leitlinien: Akutes Koronarsyndrom (ACS) – Teil 1: ACS ohne persistierende ST-Hebung. *Z Kardiologie* 2004; 93: 72-90

Hergenreider E, Heydt S, Tréguer K, Boettger T, Horrevoets AJG, Zeiher AM, Scheffer MP, Frangakis AS, Yin X, Mayr M, Braun T, Urbrich C, Boon RA, Dimmeler S. Atheroprotective communication between endothelial cells and smooth muscle cells through miRNAs. *Nat Cell Biol* 2012; 14: 249–256

Hinkel R, Penzkofer D, Zühlke S, Fischer A, Husada W, Xu QF, Baloch E, van Rooij E, Zeiher AM, Kupatt C, Dimmeler S. Inhibition of MicroRNA-92a Protects Against Ischemia/Reperfusion Injury in a Large-Animal Model Clinical Perspective. *Circulation*. 2013; 128: 1066–1075

Holme PA, Ørvim U, Hamers MJAG, Solum NO, Brosstad FR, Barstad RM, Sakariassen KS. Shear-Induced Platelet Activation and Platelet Microparticle Formation at Blood Flow Conditions as in Arteries With a Severe Stenosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 646–653

Huang Y, Chen J, Zhou Y, Yu X, Huang C, Li J, et al. Circulating miR-30 is related to carotid artery atherosclerosis. *Clin Exp Hypertens* 2016; 38: 489–494

Huang Y, Tang S, Ji-yan C, Huang C, Li J, Cai AP, Feng YP. Circulating miR-92a expression level in patients with essential hypertension: a potential marker of atherosclerosis. *J Hum Hypertens* 2016; doi: 10.1038/jhh.2016.66 [Epub ahead of print]

Insull Jr. W. The Pathology of Atherosclerosis: Plaque Development and Plaque Responses to Medical Treatment. *Am J Med* 2009; 122: 3–14

Jansen F, Wang H, Przybilla D, Franklin BS, Dolf A, Pfeifer P, Schmitz T, Flender A, Endl E, Nickenig G, Werner N. Vascular endothelial microparticles-incorporated microRNAs are altered in patients with diabetes mellitus. *Cardiovasc Diabetol* 2016; 15: 49

Jansen F, Yang X, Baumann K, Przybilla D, Schmitz T, Flender A, Paul K, Alhusseiny A, Nickenig G, Werner N. Endothelial microparticles reduce ICAM-1 expression in a microRNA-222-dependent mechanism. *J Cell Mol Med* 2015; 19: 2202-2214

Jansen F, Yang X, Hoelscher M, Cattelan A, Schmitz T, Proebsting S, Wenzel D, Vosen S, Franklin BS, Fleischmann BK, Nickenig G, Werner N. Endothelial Microparticle–Mediated Transfer of MicroRNA-126 Promotes Vascular Endothelial

Cell Repair via SPRED1 and Is Abrogated in Glucose-Damaged Endothelial Microparticles. *Circulation* 2013; 128: 2026–2038

Jansen F, Yang X, Hoyer FF, Paul K, Heiermann N, Becher MU, Hussein NA, Kobschull M, Bedorf J, Franklin BS, Latz E, Nickenig G, Werner N. Endothelial Microparticle Uptake in Target Cells Is Annexin I/Phosphatidylserine Receptor Dependent and Prevents Apoptosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2012; 32: 1925–1935

Jansen F, Yang X, Proebsting S, Hoelscher M, Przybilla D, Baumann K, Schmitz T, Dolf A, Endl E, Franklin BS, Sinning JM, Vasa-Nicotera M, Nickenig G, Werner Nikos. MicroRNA Expression in Circulating Microvesicles Predicts Cardiovascular Events in Patients With Coronary Artery Disease. *J Am Heart Assoc* 2014; 3: e001249

Kim VN. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; 6: 376–385

Kounis NG, Hahalis G. Serum IgE levels in coronary artery disease. *Atherosclerosis* 2016; 251: 498-500

Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Radmark O, Kim S, Kim VN. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 2003; 425: 415–419

Li T, Liang S, Zhang Y, Chen Y. Effects of microRNA-139 on myocardial cell injury induced by oxidative stress. *Int J Clin Exp Med* 2015; 8: 19994–20001

Lloyd-Jones D, Adams RJ, Brown TM, Carnethon M, Dai S, Simone GD, Ferguson TB, Ford E, Furie K, Gillespie C, Go A, Greenlund K, Haase N, Hailpern S, Ho PM, Howard V, Kissela B, Kittner S, Lackland D, Lisabeth L, Marelli A, McDermott MM, Meigs J, Mozaffarian D, Mussolino M, Nichol G, Roger VL, Rosamond W, Sacco R, Sorlie P, Stafford R, Thom T, Wasserthiel-Smoller S, Wong ND, Wylie-Rosett J. Executive Summary: Heart Disease and Stroke Statistics—2010 Update A Report From the American Heart Association. *Circulation*; 121: 948–954

Luc G, Bard J-M, Arveiler D, Ferrieres J, Evans A, Amouyel P, Fruchart JC, Ducimetiere P. Lipoprotein (a) as a predictor of coronary heart disease: the PRIME Study. *Atherosclerosis* 2002; 163: 377–384

Lusis AJ. *Atherosclerosis*. *Nature* 2000; 407: 233–241

Mause SF, Weber C. Microparticles Protagonists of a Novel Communication Network for Intercellular Information Exchange. *Circ Res* 2010; 107: 1047–1057

Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, Peterson A, Noteboom J, O'Brian KC, Allen A, Lin DW, Urban N, Drescher CW, Knudsen BS, Stirewalt DL, Gentleman R, Vessella RL, Nelson PS, Martin DB, Tewari M. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *PNAS* 2008; 105: 10513–10518

Montalescot G, Sechtem U, Achenbach S, Andreotti F, Arden C, Budaj A, Bugiardini R, Crea F, Cuisset T, Di Mario C, Ferreira JR, Gersh BJ, Gitt AK, Hulot JS, Marx N, Opie LH, Pfisterer M, Prescott E, Ruschitzka F, Sabaté M, Senior R, Taggart DP, van der Wall E, Vrints CJM, Zamorano JL, Achenbach JL, Baumgartner H, Bax JJ, Bueno H, Dean V, Deaton C, Erol C, Fagard R, Ferrari R, Hasdai D, Hoes AW, Kirchhof P, Knuuti J, Kolh P, Lancellotti P, Linhart A, Nihoyannopoulos P, Piepoli MF,

Ponikowski P, Sirnes PA, Tamargo JL, Tendera M, Torbicki A, Wijns W, Windecker S, Knuuti J, Valgimigli M, Bueno H, Claeys MJ, Donner-Banzhoff ND, Erol C, Frank H, Funck-Brentano C, Gaemperli O, Gonzalez-Juanatey JR, Hamilos M, Hasdai D, Husted S, James SK, Kervinen K, Kolh P, Kristensen SD, Lancellotti P, Maggioni AP, Piepoli MF, Pries AR, Romeo F, Rydén L, Simoons ML, Sirnes PA, GabrielSteg P, Timmis A, Wijns W, Windecker S, Yildirim A, Zamorano JL. 2013 ESC guidelines on the management of stable coronary artery disease. *Eur Heart J* 2013; 34: 2949

Napoli C, D'Armiento FP, Mancini FP, Postiglione A, Witztum JL, Palumbo G, Palinski W. Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia. Intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions. *J Clin Invest* 1997; 100: 2680–2690

Quackenbush J, Cassidy P, Pfeffer L, Boucher K, Hawkes J, Pfeffer S, Kopelovich L, Leachman SA. Isolation of Circulating MicroRNAs from Microvesicles Found in Human Plasma. *Methods Mol Biol* 2014; 1102: 641-653

Priori SG, Aliot E, Blomstrom-Lundqvist C, Bossaert L, Breithardt G, Brugada P, Camm AJ, Cappato R, Cobbe SM, Di Mario C, Maron BJ, McKenna WJ, Pedersen AK, Ravens U, Schwartz PJ, Trusz-Gluza M, Vardas P, Wellens HJJ, Zipes DP. Task Force on Sudden Cardiac Death of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 2001; 22: 1374–1450

Rane S, He M, Sayed D, Vashistha H, Malhotra A, Sadoshima J, Vatner DE, Vatner SV, Abdellatif M. Downregulation of miR-199a derepresses hypoxia-inducible factor-1alpha and Sirtuin 1 and recapitulates hypoxia preconditioning in cardiac myocytes. *Circ Res* 2009; 104: 879–886

Rautou P-E, Vion A-C, Amabile N, Chironi G, Simon A, Tedgui A, Boulanger CM, Weber C, Mause S. Microparticles, Vascular Function, and Atherothrombosis. *Circ Res* 2011; 109: 593–606

Raitoharju E, Lyytikäinen L-P, Levula M, Oksala N, Mennander A, Tarkka M, Klopp N, Illig T, Kähönen M, Karhunen PJ, Laaksonen R, Lehtimäki T. miR-21, miR-210, miR-34a, and miR-146a/b are up-regulated in human atherosclerotic plaques in the Tampere Vascular Study. *Atherosclerosis* 2011; 219: 211–217

Robert Koch-Institut (Hrsg) (2006) Koronare Herzkrankheit und akuter Myokardinfarkt. Gesundheitsberichterstattung des Bundes. Heft 33. RKI, Berlin

Ross R. Atherosclerosis — An Inflammatory Disease. *N Engl J Med* 1999; 340: 115–126

Sinning J-M, Losch J, Walenta K, Böhm M, Nickenig G, Werner N. Circulating CD31+/Annexin V+ microparticles correlate with cardiovascular outcomes. *Eur Heart J* 2011; 32: 2034–2041

Sluijter JPG, Verhage V, Deddens JC, Akker F van den, Doevendans PA. Microvesicles and exosomes for intracardiac communication. *Cardiovasc Res* 2014; 102: 302–311

Small EM, Frost RJA, Olson EN. MicroRNAs add a new dimension to cardiovascular disease. *Circulation* 2010; 121: 1022–1032

Small EM, Olson EN. Pervasive roles of microRNAs in cardiovascular biology. *Nature* 2011; 469: 336–342

Soufer R, Fernandez AB, Meadows J, Collins D, Burg MM. Body mass index and risk for mental stress induced ischemia in coronary artery disease. *Mol Med* 2016; 22: 286-291

Stocker R, Keaney JF. Role of Oxidative Modifications in Atherosclerosis. *Physiol Rev* 2004; 84: 1381–1478

Thum T, Gross C, Fiedler J, Fischer T, Kissler S, Bussen M, Galuppo P, Just S, Rottbauer W, Frantz S, Castoldi M, Soutschek J, Koteliansky V, Rosenwald A, Basson MA, Licht JD, Pena JTR, Rouhanifard SH, Muckenthaler MU, Tuschl T, Martin GR, Bauersachs J, Engelhardt S. MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts. *Nature* 2008; 456: 980–984

Werner N, Wassmann S, Ahlers P, Kosiol S, Nickenig G. Circulating CD31+/Annexin V+ Apoptotic Microparticles Correlate With Coronary Endothelial Function in Patients With Coronary Artery Disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006; 26: 112–116

Wienholds E, Plasterk RHA. MicroRNA function in animal development. *FEBS Lett* 2005; 579: 5911–5922

Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev* 2003; 17: 3011–3016

Yu M-L, Wang J-F, Wang G-K, You X-H, Zhao X-X, Jing Q, et al. Vascular smooth muscle cell proliferation is influenced by let-7d microRNA and its interaction with KRAS. *Circ J* 2011; 75: 703–709

Zaman AG, Helft G, Worthley SG, Badimon JJ. The role of plaque rupture and thrombosis in coronary artery disease. *Atherosclerosis* 2000; 149: 251–266

Zernecke A, Bidzhekov K, Noels H, Shagdarsuren E, Gan L, Denecke B, Hristov M, Köppel T, Jahantigh MN, Lutgens E, Wang S, Olson EN, Schober A, Weber C. Delivery of microRNA-126 by apoptotic bodies induces CXCL12-dependent vascular protection. *Sci Signal* 2009; 2: ra81

## 8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich einigen Menschen danken, ohne die die Fertigstellung dieser Arbeit für mich nicht möglich gewesen wäre.

Als erstes möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Nikos Werner für die Bereitstellung des Themas danken. Als zweites möchte ich Dr. Felix Jansen danken, der mich in allen Phasen der Arbeit wissenschaftlich betreut und mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat.

Desweiteren bin ich allen Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen der Kardiologie der Universitätsklinik in Bonn Dank schuldig. Ich wurde im Labor für molekulare Kardiologie herzlich willkommen geheißen und fand bei Fragen immer jemanden, der ein offenes Ohr für mich hatte.

Besonders erwähnen möchte ich dabei Theresa Schmitz und Sebastian Pröbsting, die mich während der Arbeit im Labor immer wieder unterstützt haben und mir sowohl während der Arbeit im Labor als auch während der Fertigstellung der Arbeit unzählige Fragen beantwortet und stets große Hilfsbereitschaft gezeigt haben.

Für die Förderung meiner Arbeit, die ich durch das Promotionsstipendium des Bonfor-Programmes der Universität Bonn erhalten habe, möchte ich mich ebenfalls herzlich bedanken.

Zum Schluss aber nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie, meiner Frau und all meinen Freunden für ihr unendliches Verständnis und ihre große Unterstützung bedanken. Mir wurde immer wieder der Rücken frei gehalten, sodass ich die Möglichkeit hatte, mich auf diese Arbeit zu konzentrieren.